

## 乳腺組織構築における脂肪細胞分泌因子の重要性

山地 大介<sup>\*1</sup>, 齊藤 昌之<sup>\*2</sup>, 木村 和弘<sup>\*1</sup>

<sup>\*1</sup>北海道大学大学院獣医学研究科生化学教室 <sup>\*2</sup>天使大学大学院看護栄養学研究所

### はじめに

乳腺組織は、妊娠、泌乳および退縮の過程で、形態的にも機能的にも大きく変化する。すなわち、非妊娠期の乳腺組織は、間質脂肪組織が大部分を占め、これに囲まれた少数の導管からなるが、妊娠により乳腺上皮細胞が増殖し、より伸長、分岐した導管と、乳汁を産生する腺房構造を形成し、泌乳期には乳産生が最も活性化される。この時、脂肪細胞は数および脂肪含量を減らし、乳腺腺房構造の隙間に線維芽細胞様の細胞として存在するのみとなる。

この乳腺組織発達過程は卵巣や下垂体、副腎皮質由来の全身性のホルモンによって制御されている。これらのホルモンは乳腺上皮細胞に直接作用するだけでなく、間質の線維芽細胞や脂肪細胞などにも作用して組織局所で様々な成長因子やサイトカイン、細胞外マトリックス関連分子などを産生することによって乳腺組織の発達を調節するとされる<sup>1)</sup>。この乳腺発達における間質脂肪組織の重要性は、様々な事実から示唆されてきた。例えば、乳腺原基を摘出した乳腺脂肪組織に新たに乳腺上皮細胞を移植すると導管や乳汁を産生する腺房を形成する<sup>2)</sup>。一方、脂肪組織を欠く遺伝子改変マウスでは乳腺組織は正常に発達しない<sup>3)</sup>。しかしながら、そのメカニズム、とりわけ関与

する脂肪細胞由来の局所因子や全身性のホルモンとの関係などについては、未解明な点が多い。

脂肪細胞から分泌されるアディポサイトカインとしてはレプチンやアディポネクチンが代表的であるが、我々は、

肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor; HGF) に着目した。HGFは間質細胞で産生、分泌され、上皮細胞などの受容体c-Metに作用する多機能なサイトカインであり、乳腺を含む様々な臓器の形態形成や組織の修復に関わっていることが知られている<sup>4)</sup>。さらに、マウス3T3-L1脂肪細胞や単離ヒト脂肪細胞がHGFを産生することも報告されている<sup>5,6)</sup>。

本稿では、脂肪細胞から分泌されたHGFが乳腺上皮細胞の形態形成に及ぼす作用について、ウシ乳腺上皮細胞のコラーゲンゲル三次元培養法を用いた我々の成績を紹介し、併せてレプチンや泌乳ホルモンの効果、乳腺の発達と

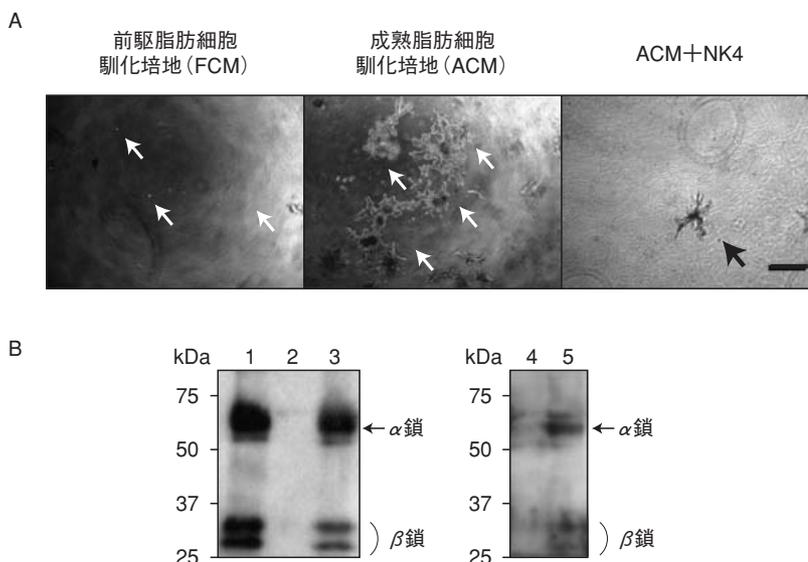


図1 ウシ脂肪細胞馴化培地によるウシ乳腺上皮細胞の形態変化とHGFの関与

ウシ前駆脂肪細胞がコンフルエントに達した後、無血清DMEM/F-12培地で48時間培養し、この培地を前駆脂肪細胞馴化培地 (FCM) として回収した。また、イソブチルメチルキサンチンおよびデキサメタゾンを含む脂肪細胞分化誘導培地を用いて分化させたウシ脂肪細胞からも同様に、無血清培地を用いて48時間培養し、成熟脂肪細胞馴化培地 (ACM) を得た。

A: FCM, ACMまたはHGFアンタゴニストNK4 添加ACMを用いて16日間三次元培養した乳腺上皮細胞の位相差顕微鏡像。矢印はゲル中に散在する乳腺上皮細胞、または形成された乳腺上皮細胞の構造物を示す。bar: 250 μm.

B: 脂肪細胞馴化培地中のHGFタンパク質はウェスタンブロット法により検出した。レーン1: リコンビナントヒトHGF, レーン2: ヘパリンビーズ, レーン3: ヘパリンビーズに結合したリコンビナントヒトHGF, レーン4: FCM中のヘパリン結合タンパク質, レーン5: ACM中のヘパリン結合タンパク質。矢印はHGFタンパク質のα鎖 (55-70kDa) およびβ鎖 (30-35kDa) を示す。

肥満との関連についても言及する。

### 1. 乳腺上皮細胞の形態形成に対する脂肪細胞由来因子HGFの作用

まず、脂肪細胞から分泌される因子が乳腺上皮細胞の形態形成に影響を及ぼすのかを調べるため、ウシ皮下脂肪組織から得た間質血管画分の細胞を脂肪細胞への分化させ、その前後の馴化培地を用いて、ウシ乳腺上皮細胞を16日間コラーゲンゲル包埋三次元培養した。その形態を観察したところ、前駆脂肪細胞馴化培地(FCM)で培養しても乳腺上皮細胞は各々がゲル中に散在したまま何の変化もみられなかった(図1A左)。一方、成熟脂肪細胞馴化培地(ACM)で培養すると、乳腺上皮細胞は導管および腺房様の構造物を形成した(図1A中)。この結果は、分化後の成熟脂肪細胞から、乳腺上皮細胞の形態形成を誘導する因子が分泌されていたことを示している。

ACMによる乳腺上皮細胞の形態形成作用にHGFが関与するか否かを検討するため、HGFアンタゴニストNK4を用いた。NK4は、HGFと受容体c-Metの結合に必要な4つのクリングルドメインを含む $\alpha$ 鎖を有するが、c-Metの細胞内シグナル伝達に必要な $\beta$ 鎖を欠いており、HGFと競合的に作用してその生理活性を阻害する<sup>7)</sup>。NK4を添加したACMで乳腺上皮細胞を培養すると、無添加のACMと比べて、構造物の形成が強く抑制された(図1A右)。

馴化培地中のHGFタンパク質を検出するため、ウシ脂肪細胞馴化培地中のHGFをヘパリンビーズで濃縮し、これをウェスタンブロットに供した(図1B)。HGFのヘパリンビーズへの結合性はリコンビナントヒトHGFの回収で確認された(レーン3)。FCM中からは、HGFタンパク質はほとんど検出されな

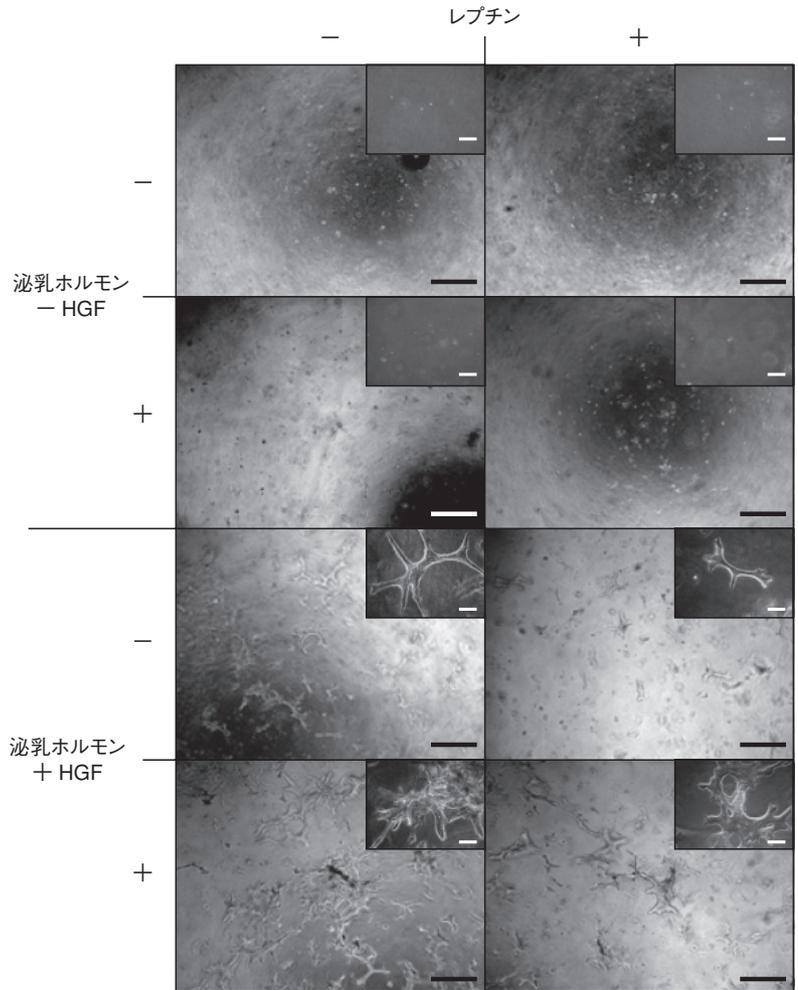


図2 HGFによる乳腺上皮細胞の形態形成に対する泌乳ホルモン、レプチンの効果  
乳腺上皮細胞を無血清DMEM/F-12培地にHGF(100ng/ml)、泌乳ホルモン(インスリン、コルチゾルおよびプロラクチン、それぞれ5 $\mu$ g/ml)またはレプチン(5nM)を加えて14日間三次元培養した。その位相差顕微鏡像。black bar : 500 $\mu$ m, white bar : 100 $\mu$ m。

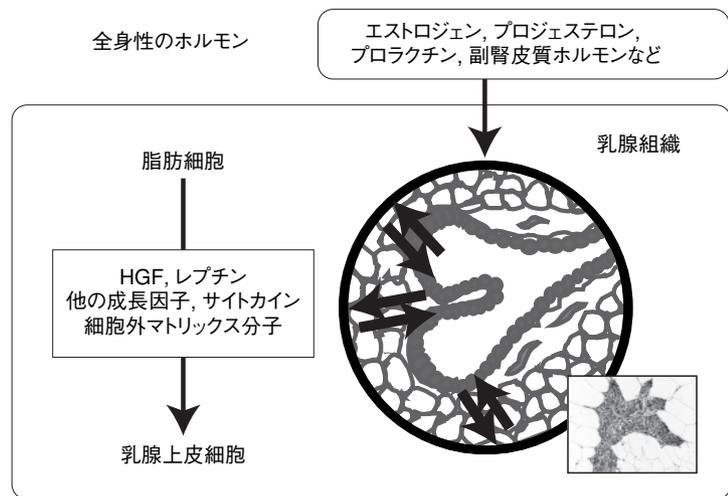


図3 乳腺組織構築における脂肪細胞の役割

かった(レーン4)が, ACM中には, HGFタンパク質が明らかに存在することが確認された(レーン5)。また, HGF mRNAの発現は, 分化前の細胞では検出されず, 脂肪細胞の分化に伴って著しく増加しており, 分化前後でのHGFタンパク質分泌の増減と一致した。

## 2. レプチンと泌乳ホルモンの複合作用

このように, 成熟脂肪細胞で産生, 分泌される因子, 特にHGFが乳腺上皮細胞の形態形成に大きく寄与していることが示されたが, 脂肪細胞からは他にも多くのアディポサイトカインが分泌される。さらに乳腺組織の発達にはプロラクチンなどのいわゆる泌乳ホルモンが重要であることは言うまでもない。そこで本培養系でレプチンと泌乳ホルモンの効果についても検討した<sup>8)</sup>。図2に示すように, 泌乳ホルモン剤(インスリン, コルチゾル, プロラクチンの混合)は, それ単独では乳腺上皮細胞の形態形成作用を示さなかったが, HGFと共存させるとHGF単独時よりも大きな構造物の形成を誘導した。一方, レプチンは, 泌乳ホルモンの有無にかかわらず, 形態形成作用を示さなかったが, HGF単独刺激およびHGFと泌乳ホルモンの共刺激による構造物形成を抑制した。

### おわりに

これらの結果を総合すると, 乳腺組織の形態形成には, 従来から知られていた全身性のホルモンに加えて, HGF

やレプチンなどの組織局所で産生される複数のアディポサイトカインが, 重要な役割を果たしていることが伺える(図3)。しかし, 同じ脂肪細胞から分泌される因子が, 一方では乳腺上皮細胞の形態形成を誘導し, 一方では抑制する, という結果は何を示しているのだろうか。Flintらは, 高脂肪食を給餌して肥満させたマウスでは, 乳腺導管の枝分かれ率が低下し腺房形成にも異常があるため, 乳汁産生に異常があり新生仔死亡率が増加することを報告している<sup>9)</sup>。このような動物では, レプチンが血中に高濃度に存在することにより, HGFによって誘導される導管の形成が阻害されたと推察される。すなわち, 増殖性または抑制性のアディポサイトカインの多寡が乳腺上皮細胞の形態を制御しているのかもしれない。今後, アディポサイトカインの合成分泌に対する性腺ホルモンや泌乳ホルモンの作用を初めとする*in vitro*ならびに*in vivo*でのさらなる検証が待たれる。

### 謝辞

本稿で紹介した研究の一部は, 日本学術振興会特別研究員奨励費により行われた。大阪大学中村敏一教授と水野信哉講師にNK4をご供与頂き, 本研究に御支援と御配慮を頂いた。また三次元培養法については佐賀大学杉原甫名誉教授に, 多大な御教示, 御協力を頂いた。併せて深謝する。

### 文献

- 1) Cunha GR, Hom KH: Role of mesenchymal-epithelial interactions in mammary gland development. J

Mammary Gland Biol Neoplasia 1996, **1**: 21-35.

- 2) DeOme KB, Faulkin LJ, Bern HA, et al.: Development of mammary tumors from hyperplastic alveolar nodules transplanted into gland free mammary fat pads of female C3H mice. Cancer Res 1959, **19**: 515-520.
- 3) Couldrey C, Moitra J, Vinson C, et al.: Adipose tissue: a vital in vivo role in mammary gland development but not differentiation. Dev Dyn 2002, **223**: 459-468.
- 4) Funakoshi H, Nakamura T: Hepatocyte growth factor: from diagnosis to clinical applications. Clin Chim Acta 2003, **327**: 1-23.
- 5) Rahimi N, Saulnier R, Nakamura T, et al.: Role of hepatocyte growth factor in breast cancer: a novel mitogenic factor secreted by adipocytes. DNA Cell Biol 1994, **13**: 1189-1197.
- 6) Rehman J, Considine RV, Bovenkerk JE, et al.: Obesity is associated with increased levels of circulating hepatocyte growth factor. J Am Coll Cardiol 2003, **41**: 1408-1413.
- 7) Date K, Matsumoto K, Shimura H, et al.: HGF/NK4 is a specific antagonist for pleiotrophic actions of hepatocyte growth factor. FEBS Lett 1997, **420**: 1-6.
- 8) Yamaji D, Kamikawa A, Soliman MM, et al.: Leptin inhibits hepatocyte growth factor-induced ductal morphogenesis of bovine mammary epithelial cells. Jpn J Vet Res 2007, **54**: 183-189.
- 9) Flint DJ, Travers MT, Barber MC, et al.: Diet-induced obesity impairs mammary development and lactogenesis in murine mammary gland. Am J Physiol Endocrinol Metab 2005, **288**: 1179-1187.