

トピックス

食餌性肥満が乳腺発達に及ぼす影響

上川 昭博, 鈴木 千春, 山本 敦子, 木村 和弘

北海道大学大学院獣医学研究科生化学教室

はじめに

乳腺組織は出生後に、生殖サイクルに合わせてその形態と機能を大きく変化させる¹⁾。図1Aに示すように出生時には痕跡的な乳腺原基が乳頭部周辺の皮下脂肪組織内に存在するのみであるが、春期発動から性成熟にかけて、乳腺導管が分岐しながら皮下脂肪組織内に伸長していく。さらに妊娠期には乳腺導管先端部に乳汁を産生する腺房が

発達し、出産後には乳汁を分泌する。これらの乳腺導管や腺房は常に脂肪細胞や線維芽細胞などの間質組織に取り囲まれており、上述のような乳腺組織の発達には、間質との相互作用が必要である¹⁾。特に間質脂肪細胞の重要性は、成熟脂肪細胞を欠く遺伝子改変マウスでは乳腺実質が正常に発達しないこと²⁾、脂肪細胞分泌因子が上皮細胞の形態形成を調節しうること³⁾から明らかである。また、これらの知見は、

脂肪の過剰蓄積にともなう間質脂肪細胞の機能変化が乳腺の発達に影響を与えることを想像させる。実際に、肥満した女性は正常体重の女性に比べ分娩直後の泌乳がうまくできず、泌乳期間が短縮する⁴⁾。また、マウス、ラット、ウシなど他の哺乳動物においても、食餌性肥満や過剰なエネルギーの摂取が妊娠期の腺房の発達や出産後の泌乳を阻害する⁵⁾。しかし、肥満による乳腺組織構造の変化や泌乳抑制のメカニズムは分かっていない。そこで、食餌性肥満が乳腺発達に及ぼす影響を妊娠前から妊娠期まで経時的に解析し、泌乳抑制のメカニズムの解明を試みた。

1. 食餌性肥満が妊娠前の乳腺導管の発達に与える影響

4週齢メスのC57BL/6Jマウスに通常食(ND)または高脂肪食(HFD)を16週間給餌した。HFD群は顕著な食餌

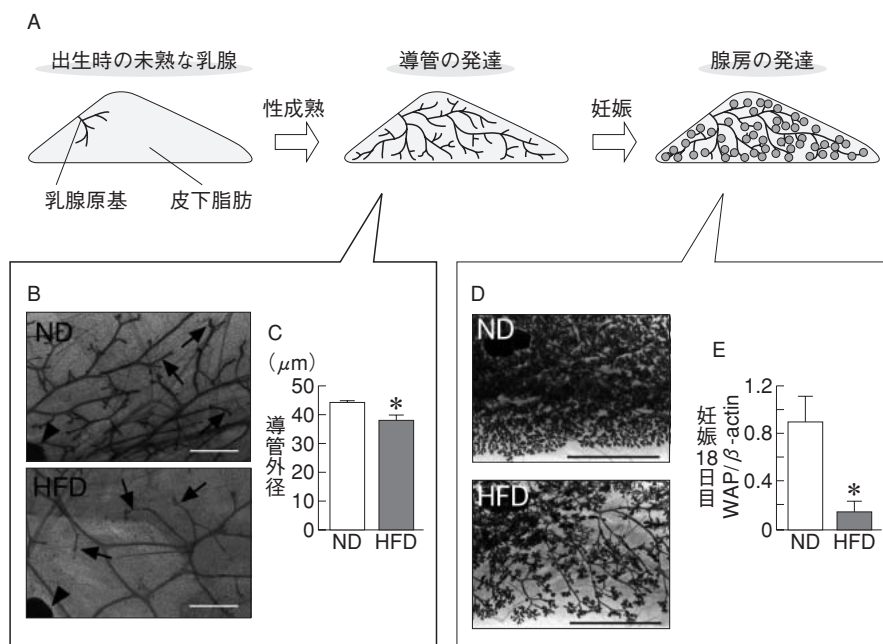


図1 生後の乳腺発達と食餌性肥満による乳腺発達抑制

A: 生後の乳腺発達の模式図。B,C: 食餌性肥満が妊娠前の乳腺発達に及ぼす影響を、通常食(ND)を給餌した対照マウスと高脂肪食(HFD)を給餌した食餌性肥満マウスの腹部乳腺を用いて解析した。妊娠前乳腺のホルマウントカーミン染色標本の典型例を示した(B)。リンパ節(B, 矢印)を含む皮下脂肪組織内に乳腺導管(B, 矢印)が伸長している。white bar=1mm。このホルマウント標本を用いて、導管先端部(B, 矢印)の導管外径を計測した(C)。D,E: ND群, HFD群マウスの妊娠後の乳腺発達。各群, 妊娠18日目の腹部乳腺ホルマウントカーミン染色標本の典型例を示した(D)。black bar=5mm。また妊娠18日目腹部乳腺からtotal RNAを抽出し、real-time RT-PCR法を用いてwhey acidic protein (WAP)と β -actinのmRNA発現量を定量した。図はWAP mRNA発現量を β -actin mRNA発現量に対する比で示している。

すべてのグラフは平均値±標準誤差。*, $p < 0.05$ vs ND。妊娠前(C)は各群n=5, 妊娠後(E)はND群; n=4, HFD群; n=7。

性肥満を呈し、体重(ND: 22.7 ± 1.0g, HFD: 34.0 ± 1.4g, $p < 0.05$, 各群n=5)、腹部乳腺(皮下脂肪組織)重量(ND: 321 ± 50mg, HFD: 1206 ± 140mg, $p < 0.05$, 各群n=5)が増大した。この時の乳腺の形態をホルマウント標本で評価したところ、乳腺導管は両群とも脂肪組織全体に伸長していたが、分枝頻度[分枝数(回)/導管長(mm)]や導管最終枝の外径が食餌性肥満により減少した(図1B, C)。

さらに組織標本を用いて導管とその周囲をより詳細に解析したところ、導管内腔の径は両群間で差はなかったが、ND群に比してHFD群で上皮細胞の層が薄くなっていた(図2A, B)。乳腺上皮は導管基底膜側に存在する α -smooth muscle actin(α -SMA)陽性の筋上皮細胞と、 α -SMA陰性で導管内腔側を内張りする管腔上皮細胞から構成される。ND群ではほとんどの導管上皮がこの二重構造を示すのに対して、HFD群ではおよそ半数の導管が筋上皮細胞を欠損していた(図2C)。さらに管腔上皮細胞高の低下も認められた。つまり、筋上皮細胞の欠損と管腔上皮の菲薄化が、ホルマウント標本で観察されたHFD群の乳腺導管外径低下の原因であった。筋上皮細胞は乳腺実質の基底膜側に存在し、泌乳時には収縮して乳汁を体外に押し出す役割を果たす。さらに、筋上皮細胞が管腔上皮細胞の極性を決定し、導管や腺房の形態発達に重要な働きをすることが報告されている⁶⁾。よって、筋上皮細胞の欠損が管腔上皮細胞の形態異常につながり、さらには導管の枝分かれ形成などを抑制したかもしれない。

また導管周囲の間質には脂肪細胞や線維芽細胞などの細胞成分の他に、細胞間隙を埋める細胞外基質(I型コラーゲンを含む膠原線維など)が豊富に存在する。HFD群では導管周囲の膠原

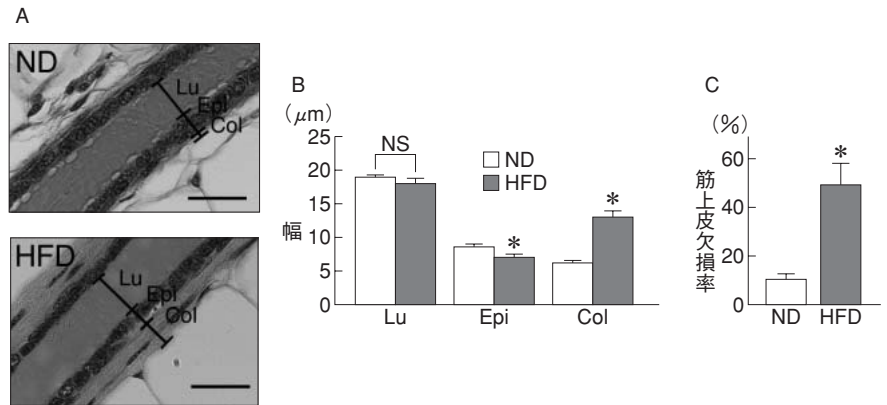


図2 食餌性肥満が妊娠前乳腺の微小構造に与える影響

A, B: 通常食(ND)マウスと食餌性肥満(HFD)マウスの腹部乳腺の組織標本を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色を施した。典型的な乳腺導管の周辺像を示す(A)。乳腺導管内腔(Lu)、乳腺上皮細胞層(Epi)、導管周囲膠原線維層(Col)の幅を数値化し群間で比較した(B)。black bar = 25 μm。グラフは平均値±標準誤差。*, $p < 0.05$ vs ND. NS, not significant. 各群5匹の組織標本よりND群46枚、HFD群50枚の導管像を得て計測し、その平均値を求めた。

C: 組織標本を α -smooth muscle actin抗体で免疫染色し(図示せず)、筋上皮細胞を部分的に欠く導管の割合を数値化した(C)。グラフは平均値±標準誤差。*, $p < 0.05$ vs ND. 各群n = 5。

線維の層が肥厚しており(図2A, B)、肥満は乳腺導管周囲の線維化を促すことが明らかになった。導管が側枝を形成する時には導管周囲の細胞外基質を分解しなければならないので⁷⁾、肥満により生じた導管周囲の線維化は側枝の形成を抑制し、分枝頻度低下を引き起こしたことが示唆された。

以上のように食餌性肥満は、乳腺微小構造の改変をともなって、妊娠前の正常な導管発達を妨げた。

2. 食餌性肥満が妊娠後の乳腺発達に与える影響

では、このように異常な乳腺導管形態をもつ肥満マウスを妊娠させると、その後の乳腺発達はどうか。ND群とHFD群のメスマウスを交配し、妊娠前、妊娠後8, 13, 18日目(それぞれ妊娠前期, 中期, 後期にあたる)に腹部乳腺を採取して解析した。ND群では、妊娠前から妊娠8日目にかけて導管側枝が密に出芽し分枝頻度は増加したが、HFD群では分枝頻度の有意な増加は認められなかった。ま

たND群では13日目には腺房が形成され、18日目にはそれがより発達したが、HFD群では腺房の形成、発達が遅延していた(図1D)。さらに組織切片を観察すると、妊娠18日目にはND群の大部分の腺房上皮細胞が乳脂肪滴をもつものに対し、HFD群では乳脂肪滴をもたない未熟な腺房が多く存在した。主要な乳蛋白質の1つであるwhey acidic protein(WAP)のmRNA発現を解析したところ、ND群、HFD群ともに妊娠13日目以降に発現が認められた。しかし妊娠18日目におけるHFD群のWAP mRNA発現量はND群よりもはるかに低く(図1E)、肥満は乳腺の形態形成だけでなく、その機能である乳汁産生を抑制することが明らかとなった。

以上のように食餌性肥満は妊娠の初期に起こる側枝の出芽と、その後の腺房の形態的、機能的発達を抑制した。妊娠後の乳腺発達は妊娠前の導管発達の上に成り立つので、妊娠前に肥満により生じた筋上皮細胞の欠損や導管周囲の線維化が、妊娠後の側枝出芽や腺

房発達にも抑制的に働いたと考えられた。

3. 脂肪細胞分泌因子レプチンが乳腺発達に及ぼす影響

肥満時の乳腺形態異常の要因を明らかにするために、乳腺発達への関与が指摘されているいくつかのサイトカインについて検討を行った。Hepatocyte growth factor (HGF), Insulin-like growth factor 1 (IGF-1), Transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) の mRNA 発現量は ND 群と HFD 群の乳腺組織で顕著な変化はなかった。一方、脂肪細胞分泌因子レプチンの mRNA 発現は ND 群に比べ HFD 群でおよそ 15 倍高く、血中レプチン濃度もこれに平行して増大した⁸⁾。また、免疫組織染色法により乳腺上皮細胞や導管周囲の線維芽細胞にレプチン受容体の発現を認めた。われわれはこれまでに、ウシの乳腺から単離した乳腺上皮細胞(管腔上皮細胞と筋上皮細胞を含む)の HGF 誘導性導管形成をレプチンが阻害すること⁹⁾、またそれはレプチンによる乳腺上皮細胞の増殖抑制作用によること⁸⁾を明らかにしている。一方でレプチンは腎臓や肝臓の間質細胞に作用し、線維化を促進することが報告されている¹⁰⁾。よって、肥満時には過剰に分泌されたレプチンが傍分泌的に作用し、上皮細胞の増殖抑制や導管周囲の線維化を介して、乳腺実質の発達を抑制したのではないかと考えている。

おわりに

乳腺内の導管や腺房は脂肪細胞や細

胞外基質などの間質組織に取り囲まれて存在し、生殖周期に合わせて形態と機能を大きく変化させる。われわれは肥満による泌乳抑制という一時点の現象を正確に理解するために、導管や腺房を形成する上皮細胞と間質組織の相互作用という空間的な側面と、生後から続く一連の乳腺発達という時間的な側面の両面から解析を行った。その結果、肥満は妊娠前の導管形態にも影響を及ぼすこと、この時生じる筋上皮の欠損や導管周囲の線維化が、妊娠前の導管分枝頻度の抑制だけではなく、妊娠初期に生じる側枝の出芽にも抑制的に働く可能性を示した。間質脂肪細胞から過剰に分泌されるレプチンが、肥満時の乳腺発達抑制に関与することが推察されるが、不明な点が多い。今後さらに検討を進めることで、泌乳抑制メカニズムの解明と脂肪細胞の支持細胞としての役割の確立につながることを期待される。

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、文献 8 に掲載された。

文 献

- 1) Lanigan F, O'Connor D, Martin F, et al. : Molecular links between mammary gland development and breast cancer. *Cell Mol Life Sci* 2007, **64** : 3159-3184.
- 2) 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.

- 3) Zangani D, Darcy KM, Shoemaker S, et al. : Adipocyte-epithelial interactions regulate the *in vitro* development of normal mammary epithelial cells. *Exp Cell Res* 1999, **247** : 399-409.
- 4) Hilson JA, Rasmussen KM, Kjolhede CL : Maternal obesity and breastfeeding success in a rural population of white women. *Am J Clin Nutr* 1997, **66** : 1371-1378.
- 5) Rasmussen KM, Hilson JA, Kjolhede CL : Obesity may impair lactogenesis II. *J Nutr* 2001, **131** : 3009S-3011S.
- 6) Faraldo MM, Teulière J, Deugnier MA, et al. : Myoepithelial cells in the control of mammary development and tumorigenesis : data from genetically modified mice. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2005, **10** : 211-219.
- 7) Wiseman BS, Sternlicht MD, Lund LR, et al. : Site-specific inductive and inhibitory activities of MMP-2 and MMP-3 orchestrate mammary gland branching morphogenesis. *J Cell Biol* 2003, **162** : 1123-1133.
- 8) Kamikawa A, Ichii O, Yamaji D, et al. : Diet-induced obesity disrupts ductal development in the mammary glands of nonpregnant mice. *Dev Dyn* 2009, **238** : 1092-1099.
- 9) 山地大介, 斉藤昌之, 木村和弘 : 乳腺組織構築における脂肪細胞分泌因子の重要性. *肥満研* 2007, **13** : 314-316.
- 10) Kümpers P, Gueller F, Rong S, et al. : Leptin is a coactivator of TGF- β in unilateral ureteral obstructive kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007, **293** : F1355-F1362.