

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月25日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21380177

研究課題名（和文）乳腺組織形成と乳腺腫瘍におよぼす脂肪細胞の新たな役割とその分子基盤

研究課題名（英文）Novel roles of adipocytes in the mammary gland development and breast cancer progression, and involvement of adipokines in the roles

研究代表者

木村 和弘（KIMURA KAZUHIRO）

北海道大学・大学院獣医学研究科・教授

研究者番号：30192561

研究成果の概要（和文）：乳腺は皮下脂肪組織内に形成され、脂肪細胞は上皮細胞の栄養支持細胞として機能する。過栄養による脂肪細胞の肥大化に伴い、非妊娠期の乳腺導管形成は脆弱化し、妊娠期においては導管側枝形成が遅れ、その後の腺房形成やその成熟も遅れた。この時、脂肪細胞分泌因子レプチンの血中濃度は異常に高く、レプチンは *in vivo*, *in vitro* で乳腺上皮細胞機能を阻害した。よって、肥満による乳腺形成阻害の一部はレプチンを介することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：The mammary gland develops in subcutaneous adipose tissue in the post natal period, and adipocytes function as a nursing cell for epithelial cells. With hypertrophy of adipocytes, ductal development of mammary gland in non-pregnant mice was impaired. Hypertrophy of adipocytes also delayed side-branch formation from the duct in the early phase of pregnancy, and acinar formation and its maturation in the mid- and late phase of pregnancy. Hypertrophy of adipocytes caused hyper-leptinemia, and leptin mimicked some effects by hypertrophy of adipocytes both *in vivo* and *in vitro*. Therefore, it was suggested that hypertrophy of adipocytes suppressed mammary gland development and leptin partly played a role in the suppression.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,700,000	1,710,000	7,410,000
2010年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
2011年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
年度			
年度			
総計	14,900,000	4,470,000	19,370,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学 ・ 基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：乳腺、乳癌、脂肪細胞、エストロゲン、プロラクチン、レプチン、HGF, NGF

1. 研究開始当初の背景

(1) 動物個体の栄養摂取が過剰な場合は、脂肪が蓄積し肥満状態となるとともに、脂肪肝や糖尿病、心疾患などのリスクが高まる。また感染抵抗力の減弱やアレルギー性疾患の増加が起こる。

(2) 肥満したウシにおいては泌乳量の低下が知られ、また乳房炎の発生と母体の栄養状態に強い関連がある。イヌやネコでは乳腺腫瘍が好発するが、乳腺腫瘍の発生と過栄養の関連が示唆されている。

(3) 乳腺の発達は生後の導管形成と妊娠に

よる腺房形成、泌乳、離乳後の退縮の4段階に分けられる。いずれも脳-下垂体-性腺軸によって調節されるが、乳腺の実質細胞である上皮細胞のみならず、基底側間質部にある多数の間質脂肪細胞がそのホルモン作用の標的であり、性ホルモン調節性の上皮-間質相互作用の重要性が認識されつつある。しかしながら、その詳細は不明な点が多い。

(4) 体脂肪を貯蔵する脂肪細胞は、単なるエネルギー貯蔵場所ではなく多数のペプチドを合成・分泌することが報告され、脂肪組織は巨大な内分泌臓器と考えられる。これら脂肪細胞由来のペプチドはアディポカインと総称され、それらの発現・分泌は栄養代謝状態に応じて変化し、直接的あるいは間接的にエネルギー代謝や血管内皮細胞など様々な組織、細胞機能を調節する。しかし、その全容は明らかにされていない。

2. 研究の目的

乳腺は皮下脂肪組織内に形成され、間質脂肪細胞は上皮細胞、あるいは腫瘍化した上皮細胞の栄養支持細胞として機能し、炎症やその後の組織修復においても様々な役割を担うと推察される。支持細胞としての脂肪細胞の役割を、特にアディポカインの機能に着目して *in vivo*, *in vitro* で解析し、ウシ乳房炎や小動物の乳腺腫瘍の予防治療法の開発に資する基礎的知見を供することを目的とした。具体的には以下の三つの項目に焦点を絞り研究を行った。

- (1) 肥満動物における乳腺導管形成抑制メカニズムの解明
- (2) 肥満の乳腺腺房形成および胎児の成長に及ぼす作用とそのメカニズム
- (3) 乳癌の増殖におよぼすアディポカインの作用とそのメカニズム

3. 研究の方法

- (1) 肥満動物における乳腺導管形成抑制メカニズムの解明

脂肪細胞の状態が大きく異なる食餌性肥満 (HFD) マウスと対照 (ND) マウスを用い、未妊娠期の乳腺について調べたところ、両群とも複数の枝分かれをもつ導管が乳腺間質である皮下脂肪組織全体に広がっていた。しかし、HFD 群では皮下脂肪組織の拡大にともなって導管を伸長し、ND 群に比べ分枝頻度が低下した粗な導管形態を示した。また、ND 群の乳腺導管は管腔上皮細胞と筋上皮細胞の二層の上皮細胞層からなるのに対し、HFD 群の乳腺導管は筋上皮細胞層が不完全であり、部分的に欠損していた。さらに、乳腺導管を取り囲む1型コラーゲンを含む膠原線維層はHFD群でND群に比べて肥厚していた。HFD群では脂肪細胞分泌因子レプチンの異常な発現があり、レプチンは *in vitro* で乳腺上皮細胞の

増殖を抑制し、肝細胞増殖因子 HGF による乳腺上皮細胞の導管形成を抑制した。さらにレプチン受容体は導管とその側枝周囲に限局して観られ、肥満による非妊娠期の乳腺発達の抑制は高濃度レプチンによる乳腺導管上皮細胞の増殖分化不全が原因であると示唆された。この仮説を *in vivo* において証明するため、性ホルモンを用いた人為的なマウス乳腺発達モデルでアデノウイルスによる高濃度レプチンへの暴露実験を行い、乳腺の形態について検討した。

- (2) 肥満の乳腺腺房形成および胎児の成長に及ぼす作用とそのメカニズム

① 乳腺の組織形成は導管形成、腺房形成の2相に分かれ、性ホルモンの状態も大きく異なる。そのため妊娠期における腺房形成の時点では脂肪細胞の機能も大きく変化すると考えられる。乳腺間質脂肪細胞による乳腺の発達調節機構の解明のため、食餌性肥満 (HFD) マウスと対照 (ND) マウスを用い、それらの妊娠期の乳腺発達過程を詳細に検討した。また同時に肥満による胎児発育への影響の有無を調べた。

② 出産後の泌乳期および退縮期の乳腺組織の変化に及ぼす肥満 (脂肪細胞) の影響を明らかにするため、食餌性肥満 (HFD) マウスと対照 (ND) マウスを用い検討した。

- (3) 乳癌の増殖におよぼすアディポカインの作用とそのメカニズム

レプチンは正常乳腺上皮の増殖は抑制したが、神経成長因子 NGF 依存性増殖を示すヒト乳癌細胞 MCF-7 細胞の増殖には影響しなかった。一方、脂肪細胞分泌因子アディポネクチン (ADN) は多くの増殖因子と相互作用することが明らかとなった。そこで ADN による NGF の機能調節について検証し、乳癌細胞に対する効果を検討した。

4. 研究成果

- (1) 肥満動物における乳腺導管形成抑制メカニズムの解明

肥満していない卵巣摘出マウスにエストロゲン (E) を 8 日間投与するとほぼすべての導管で細胞増殖の亢進が観られたが、プロゲステロン (P) 投与では観られなかった。E と P の同時投与 (EP) では有意な導管分枝数の増加と側枝様の構造の発達が見られ、EP では E とは異なり側枝と推定される細い導管で多くの増殖細胞が認められた。そこで EP による乳腺の発達に対するレプチンの影響について調べたところ、レプチン投与は EP による導管分枝数の増加を減少させる傾向にあり、導管当たりの増殖細胞率は有意に減少した。またレプチン投与により有為なコラーゲン繊維の蓄積がみられた。以上の結果は仮説を支持し、肥満による非妊娠期の乳腺発達の抑制は高濃度レプチンが原因であると考えら

れた。

(2) 肥満の乳腺腺房形成および胎児の成長に及ぼす作用とそのメカニズム

①妊娠を誘導すると、ND 群乳腺では妊娠 8 日目に乳腺上皮細胞の増殖増加を伴って導管から側方に導管側枝が芽生え、妊娠 13 日目では導管側枝の先端に腺房構造が認められた。妊娠 18 日目では腺房はさらに大きく発達し、乳脂肪滴の蓄積や乳蛋白質遺伝子の発現が認められた。一方、HFD 群は、妊娠 8 日目では有意な細胞増殖の増加が見られず、導管側枝の芽生えも ND 群より少なく、その後の乳脂肪滴の形成や乳蛋白質遺伝子の発現など腺房機能の発達も遅延した。つまり、乳腺間質脂肪細胞の肥大化は乳腺の形態学的及び機能的発達を妊娠前および初期の段階で遅延させることが明らかとなった。これまでの *in vitro*におけるレプチンの乳腺上皮細胞機能に与える影響や(1)の結果を合わせて考えると、過剰に分泌されたレプチンが細胞増殖抑制や導管周囲の線維化を介して妊娠初期の導管側枝形成を阻害することが、食餌性肥満による妊娠期の腺房形成遅延の原因であることを示唆した。

なお HFD 群、ND 群において妊娠率、胎児数および胎児重量に差はなかった。

②まず出産後の泌乳期における肥満影響の解明を試みたが、HFD 群のマウスでは母性行動異常により授乳がほとんどの個体でみられず、ND 群との乳腺構造の単純な比較は意味がないと思われた。そこで、肥満と母性行動の関連について定量的解析を試みた。HFD 群、ND 群両間で妊娠率、胎児数に差はなかったが、肥満群では全ての胎児を娩出できた個体は 35%と対照群(85%)の半数以下であった。また対照群では妊娠中の巣作り行動が 80%の個体で観察されたのに対し、肥満群では 70%の個体は巣作りをしなかった。さらに、出産後の育児(仔マウスを集合させるか否か)についても対照群では 90%の個体で観察されたのに対し、肥満群ではわずか 15%の個体のみであった。この時、血中のグルコース、遊離脂肪酸、プロラクチン、プロゲステロン、エストロゲン濃度に両群で差はなかったが、レプチン濃度に大きな差が認められた。つまり食餌性肥満は母性行動に大きく影響し、妊娠期に見られる巣作り行動や出産後の育児行動を抑制することが明らかとなった。レプチンのある種の作用は脳視床下部弓状核を介することが知られているため、母性行動抑制作用はレプチンあるいは他の脂肪細胞分泌因子が中枢機能に影響を与えた結果であると考えられた。また本結果より人の肥満した母親は授乳期間が短いこと、肥満やストレスによるウシ泌乳量の低下といった事象のメカニズム、特に中枢経路を解明するモデルとして食餌性肥満マウスは有用であることが

示された

(3) 乳癌の増殖におよぼすアディポカインの作用とそのメカニズム

アディポネクチン(ADN)は脂肪細胞から最も多量に分泌される因子であり、そのノックアウトマウスでは高脂肪食給餌により腎障害や癌の発症が促進される。一方、神経成長因子(NGF)は中枢のみならず脂肪細胞を含む末梢組織でも産生される。Bicore を用い ADN と相互作用する因子を調べたところ、NGF が ADN と特異的に結合することを見出した。さらに NGF と ADN との相互作用は NGF による PC12 細胞の神経突起の伸長を阻害した。脂肪細胞が肥大化すると ADN の分泌が減弱し、NGF の分泌が増大するため、NGF と ADN との量比が変化し NGF の作用がより発現しやすくなることが推察された。

また細胞培養に用いるウシ胎児血清中に ADN がかなり含まれるため、MCF-7 細胞の増殖に及ぼす効果ははっきりしなかった。現在、ADN 除去血清の作製を試みている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 14 件)

① Ishii, T., Fukano, K., Shimada, K., Kamikawa, A., Okamatsu-Ogura, Y., Terao, A., Yoshida, T., Saito, M. and Kimura, K. Proinsulin C-peptide activates α -enolase activity: Implications for C-peptide - cell membrane interaction. J. Biochem. 査読有、(in press), 2012.

② Shimada, K., Ohno, Y., Okamatsu-Ogura, Y., Suzuki, M., Kamikawa, A., Terao, A. and Kimura, K. Neuropeptide Y activates phosphorylation of ERK and STAT3 in stromal vascular cells from brown adipose tissue, but fails to affect thermogenic function of brown adipocytes. Peptides 査読有、34, 336-342, 2012.

③ Okamatsu-Ogura, Y., Nio-Kobayashi, J., Iwanaga, T., Terao, A., Kimura, K. and Saito M. Possible involvement of uncoupling protein 1 in appetite control by leptin. Exp Biol Med 査読有、236, 1274-1281, 2011.

④ Shimba, S., Ogawa, T., Hitosugi, S., Ichihashi, Y., Nakadaira, Y., Kobayashi, M., Tezuka, M., Kosuge, Y., Ishige, K., Ito, Y., Komiyama, K., Okamatsu-Ogura, Y., Kimura, K. and Saito, M. Deficient of a clock gene, brain and muscle Arnt-like protein-1 (BMAL1), induces dyslipidemia and ectopic fat formation. PLoS ONE 査読有、6: e25231, 2011.

- ⑤ Sawada, T., Miyoshi, H., Shimada, K., Suzuki, A., Okamatsu, Y., Perfield II, J.W., Kondo, T., Nagai, S., Shimizu, C., Yoshioka, N., Greenberg, A.S., Kimura, K. and Koike, T. Perilipin overexpression in white adipose tissue induces a brown fat-like phenotype. PLoS ONE 査読有、5: e14006, 2010.
- ⑥ Abd Eldaim, M.A., Okamatsu-Ogura, Y., Terao, A., and Kimura, K. Effects of retinoic acid and hydrogen peroxide on sterol regulatory element-binding protein-1a activation during adipogenic differentiation of 3T3-L1 cells. Jpn. J. Vet. Res. 査読有、58, 149-154, 2010.
- ⑦ Abd Eldaim, M.A., Kamikawa, A., Soliman, M.M., Ahmed, M.M., Okamatsu-Ogura, Y., Terao, A., Miyamoto, T. and Kimura, K. Retinol binding protein 4 in dairy cows: its presence in colostrum and alteration in plasma during fasting, inflammation, and the peripartum period. J. Dairy Res. 査読有、77, 27-32, 2010.
- ⑧ Nordquist, L., Shimada, K., Ishii, T., Furuya, D.T., Kamikawa, A. and Kimura, K. Proinsulin C-peptide prevents Type-1 diabetes-induced decrease of renal Na⁺-K⁺-ATPase α 1-subunit in rats. Diab. Metab. Res. Rev. 査読有、26, 193-199, 2010.
- ⑨ 岡松優子, 木村和弘. 褐色脂肪細胞によるエネルギー代謝制御におけるPGC-1の役割、内分泌・糖尿病科 査読無、29, 109-116, 2009.
- ⑩ 上川昭博、鈴木千春、山本敦子、木村和弘. 食餌性肥満が乳腺発達に及ぼす影響、肥満研究 査読無、15, 222-224, 2009.
- ⑪ Furuya, D.T., Ishii, T., Kamikawa, A., Shimada, K., Machado, U.F., Saito, M. and Kimura, K. Proinsulin C-peptide induces c-Jun N-terminal kinase 1 expression in LEII mouse lung capillary endothelial cells. Jpn. J. Vet. Res. 査読有、57, 163-167, 2009.
- ⑫ Soliman, M.M., El-Senosi, Y. A.-F., Salem, M.M., Hamid, O.M.A., and Kimura K. Role of protease inhibitors and acylation stimulating protein in the adipogenesis in 3T3-L1 cells. J. Vet. Sci. 査読有、10, 197-201, 2009.
- ⑬ Kamikawa, A., Ichii, O., Yamaji, D., Imao, T., Suzuki, C., Okamatsu-Ogura, Y., Terao, A., Kon, Y. and Kimura, K. Diet-induced obesity disrupts ductal development in the mammary glands of nonpregnant mice. Dev. Dyn. 査読有、238, 1092-1099, 2009.
- ⑭ Ishioka, K., Omachi, A., Sasaki, N.,

Kimura, K., and Saito, M. Feline adiponectin: molecular structures and plasma concentrations in obese cats. J. Vet. Med. Sci. 査読有、71, 189-194, 2009.

[学会発表] (計 20 件)

- ① Kazuhiro Kimura, Yuu Okura, Akihiro Kamikawa, Yuko Okamatsu-Ogura, Akira Terao. Adiponectin inhibits nerve growth factor function through their direct interaction. The 47th EASD Annual Meeting, Lisbon, Portugal, 2011.9.12-16
- ② 岡松優子, 阪上浩, 寺尾晶, 齊藤昌之, 木村和弘. 脂肪細胞特異的 p27Kip1 発現マウスでは褐色脂肪組織の形成が著しく抑制される、第 48 回日本生化学会北海道支部例会、札幌医科大学記念ホール (札幌)、2011.8.5
- ③ Yuko Okamatsu-Ogura, Akira Terao, Kazuhiro Kimura, Masayuki Saito. The role of UCP1 in the regulation of energy metabolism. The 1th Brown Adipose Tissue 2011 Update, Sapporo, Japan, 2011.6.18-19
- ④ Kouhei Shimada, Yuko Okamatsu, Akira Terao, Kazuhiro Kimura. Possible roles of neuropeptide Y in the regulation of brown adipose tissue functions. The 1th Brown Adipose Tissue 2011 Update, Sapporo, Japan, 2011.6.18-19
- ⑤ 丹野翔伍, 寺尾晶, 岡松優子, 木村和弘. 食餌性肥満が睡眠に及ぼす影響、日本肥満学会、前橋テルサ (群馬)、2010.10.1-2
- ⑥ 山本敦子, 上川昭博, 鈴木千春, 加藤千絵子, 岡松優子, 寺尾晶, 木村和弘. 食餌性肥満はマウスの母性行動に影響する、日本肥満学会、前橋テルサ (群馬)、2010.10.1-2
- ⑦ Kimura, K., Kamikawa, A., Suzuki, C., Yamamoto, A. Diet-induced obesity disrupts postnatal and pregnancy-associated mammary gland development in mice: possible roles of leptin. The International Association for the Study of Obesity (ICO2010), Stockholm, Sweden, 2010.7.11-15
- ⑧ 木村和弘, マブルクアティアアブドゥルダイム. レチノイン酸の脂肪蓄積抑制作用は高グルコースにより解除される、第 53 回日本糖尿病学会年次学術集会、ホテルグランヴィア岡山 (岡山)、2010.5.27-29
- ⑨ Akihiro Kamikawa, Chiharu Suzuki, Atsuko Yamamoto, Yuko Okamatsu, Akira Terao, Kazuhiro Kimura. Diet-induced obesity disrupts postnatal and pregnancy induced mammary development in mice: Possible roles of leptin. The 14th International Congress of Endocrinology

- (ICE2010), Kyoto, Japan, 2010. 3. 26-30
- ⑩ Yuko Okamatsu, Akira Terao, Kazuhiro Kimura, Masayuki Saito. Thermogenic UCP1 enhances anorexigenic effect of leptin in mice. The 14th International Congress of Endocrinology (ICE2010), Kyoto, Japan, 2010. 3. 26-30
- ⑪ 寺尾 晶、丹野翔伍、酒井紀彰、岡松優子、木村和弘 肥満症と睡眠障害の病態関連を調べる、第 149 回日本獣医学会学術集会、日本獣医生命科学大学 (東京)、2010. 3. 26-28
- ⑫ 木村和弘 肥満の成因・病態とビタミン A による脂肪量の調節、第 149 回日本獣医学会学術集会、日本獣医生命科学大学 (東京)、2010. 3. 26-28
- ⑬ 島田光平、岡松優子、寺尾晶、木村和弘 血管内皮細胞における NPY 新規シグナル伝達分子としての転写因子 STAT3、第 82 回日本生化学会大会、神戸国際会議場 (兵庫)、2009. 10. 21-24
- ⑭ Abd El Daim Mabrouk, Mohamed Ahmed, 岡松優子、上川昭博、寺尾晶、木村和弘 Effects of retinoic acid on lipid accumulation in bovine and mouse adipocytes are inverted dependently on glucose concentration in the cultures、第 148 回日本獣医学会学術集会、とりぎん文化会館 (鳥取)、2009. 9. 25-27
- ⑮ 中平裕基、岡松優子、木村和弘、斉藤昌之、秦葉繁紀 時計遺伝子 Brain and Muscle Arnt like protein 1 (BMAL1) によるエネルギー代謝制御、第 14 回アディポサイエンス研究会シンポジウム、千里阪急ホテル (大阪)、2009. 8. 22
- ⑯ 一杉俊輔、市橋裕也、岡松優子、木村和弘、斉藤昌之、秦葉繁紀 時計遺伝子 Brain and Muscle Arnt like protein 1 (BMAL1) による脂肪組織ペントースリ酸回路の調節、第 14 回アディポサイエンス研究会シンポジウム、千里阪急ホテル (大阪)、2009. 8. 22
- ⑰ Okamatsu-Ogura, Y., Terao, A., Kimura, K., Saito, M. Thermogenic UCP1 controls appetite through modulation of leptin sensitivity. The 3rd international symposium on physiology and pharmacology of temperature regulation、くにびきメッセ (島根)、2009. 7. 23-26
- ⑱ 石井辰矢、岡松優子、寺尾晶、木村和弘 プロインスリン C ペプチド受容体同定の試み、第 147 回日本獣医学会学術集会、栃木県総合文化センター (栃木)、2009. 4. 2-4
- ⑲ Mabrouk Abd El Daim、上川昭博、寺尾晶、木村和弘 Quantification of retinol binding protein 4 (RBP4) level in cow plasma and milk and its relation to retinol concentration、第 147 回日本獣医学会学術

集会、栃木県総合文化センター (栃木)、2009. 4. 2-4

⑳ 上川昭博、鈴木千春、木村和弘 肥満による細胞外基質形成の異常と乳腺組織構築の阻害、第 147 回日本獣医学会学術集会、栃木県総合文化センター (栃木)、2009. 4. 2-4

〔図書〕 (計 2 件)

- ① Kimura, K. and Kamikawa, A. Is NO-eNOS a target for C-peptide action and its protective effects on diabetic nephropathy? In: Sima AAF (ed) Diabetes and C-Peptide: Scientific and Clinical Aspects. Contemporary Diabetes, DOI 10.1007/978-1-61779-391-2_6 (Chapter 6). Springer Science+Business Media, LLC 2012
- ② 木村和弘 UCP と酸素消費量、からだと酸素の辞典 (酸素ダイナミクス研究会編、朝倉書店) 3 章 pp285-287, 2009.

〔産業財産権〕

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.vetmed.hokudai.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村 和弘 (KIMURA KAZUHIRO)
北海道大学・大学院獣医学研究科・教授
研究者番号：30192561

(2) 研究分担者

岡松 優子 (OKAMATSU YOKO)
北海道大学・大学院獣医学研究科・助教
研究者番号：90527178