

平成 21 年 5 月 18 日現在

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2006～2008

課題番号：18380172

研究課題名 (和文) アディポ・免疫サイトカインを介する乳腺組織形成とその乳房炎、乳癌における役割

研究課題名 (英文) Role of adipokines and inflammatory cytokines in the regulation of the mammary gland development and the pathogenesis of mastitis and breast cancer.

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：

未妊娠の雌マウスにおいて肥満が乳腺発達異常（導管径の短縮と分岐数の減少、筋上皮細胞層の欠失とコラーゲン層の肥厚）をもたらすことを明らかにし、その異常の一部は脂肪細胞分泌因子レプチンに因ることを強く示唆した。一方、イヌ乳腺腫瘍組織より得た不死化細胞 5 株の増殖はレプチンにより影響されず、癌化に伴う応答性の変化が示唆された。さらに導管形成を促進する成長因子 HGF の脂肪細胞における発現調節機構などについて検討した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
2007 年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
2008 年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
年度			
年度			
総計	12,600,000	3,780,000	16,380,000

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、乳房炎、乳癌、脂肪細胞、肥満、サイトカイン、レプチン

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 動物個体の栄養状態が悪くなると感染症が増える事が良く知られている。例えば、ウシ乳房炎の発生には出産に至るまでの栄養状態が大きく作用することが知られる。一方、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、心疾患などいわゆる生活習慣病のリスクが高まる。

(2) 体脂肪量は動物の栄養・代謝状態の指標であるが、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・分泌する内分泌細胞でもある。これら脂肪細胞由来のペプチドはアディポサイトカインと総称され（代表例：レプチン）、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を調節するだけでなく、血管内皮細胞やマクロファージ、リンパ球、生殖細胞などにも強い影響を与えることが断片的に報告され始めている。

(3) 乳腺の発達や泌乳、退縮は性ホルモンや

下垂体ホルモンによって調節されることが知られる。しかし、乳腺の実質細胞である上皮細胞基底側間質部には多数の脂肪細胞が存在するにも関わらず、これらの脂肪細胞がアディポサイトカインを介して上皮細胞の機能をどのように調節するかは明らかではない。

(4)免疫サイトカインであるインターロイキン (IL) や腫瘍壊死因子(TNF)は、脂肪細胞や筋肉細胞、肝細胞などへの直接作用や脳を介する間接作用 (摂食抑制や発熱など)によって、栄養・代謝機能を修飾する。乳房炎においては多くの免疫細胞が乳腺組織内に移入し、免疫サイトカインの産生とともに免疫応答を引き起こす。しかし、これらの免疫サイトカインが乳腺上皮細胞と脂肪細胞との相互作用にどのような影響を与えるかは明らかではない。

(5)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、特に高タンパク、高脂肪摂取の関連が示唆されている。しかし、乳癌 (主に上皮性細胞由来) の発生や増殖に対するアディポサイトカインの関与は不明である。

## 2. 研究の目的

本研究では乳腺局所におけるアディポサイトカインの乳腺上皮細胞機能調節における役割と乳癌の増殖に及ぼす影響を明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1)食餌性肥満マウスの解析

4週齢メスのC57BL/6Jマウスを2群に分け、高脂肪食(HFD)あるいは通常食(ND)を20週間給餌した後、腹部乳腺(腹部皮下脂肪組織)を採取した。これら2群の乳腺組織について形態学および生化学・分子生物学的検討を行った。

### (2)ウシの乳腺上皮細胞および間質脂肪細胞の分離と解析

妊娠274日のウシより乳腺を摘出し、乳腺上皮細胞と間質脂肪細胞を分離した。上皮細胞は通常の平面培養の他、コラーゲンゲルに包埋して培養し *in vitro* での導管形成能について調べた。間質脂肪細胞は平面培養条件下で合成副腎皮質剤およびホスホジエステラーゼ阻害剤の存在下で脂肪細胞に分化させ発現する遺伝子を解析した。

### (3)ウシの免疫細胞の単離と解析

健康なウシの血液を採取し、密度勾配遠心

法や吸着法などを用いて、リンパ球画分、単球マクロファージ画分、好中球画分を得た。これらの細胞のサイトカイン産生能、脱顆粒応答、活性酸素産生能について検討した。

### (4)イヌ乳癌細胞の培養と解析

北海道大学獣医学研究科附属動物病院に来院したイヌ乳腺腫瘍患者より組織標本の供与を受け、コラゲナーゼ処理を行った。その後培養を行い、不死化細胞を得、細胞増殖応答を解析した。

### (5)培養細胞株を用いた解析

ウシ間質脂肪細胞およびイヌ乳癌細胞の対照として代表的な脂肪細胞株 3T3-L1、(良性)乳腺腫瘍細胞 MCF-7 および乳癌細胞 MDA-MB231 細胞を用いた。解析項目は遺伝子の発現、タンパクの発現、細胞増殖応答などである。なお性ホルモンの作用を調べる場合は、チャコール処理によって内在性のホルモンを除去した血清を用いた。

### (6)分子間の相互作用

ビアコアを用い、センサーチップ上に固定した因子と液中の分子との結合解離反応を解析した。

## 4. 研究成果

### (1)乳腺の発達におよぼす肥満の影響

乳腺導管は生後から思春期にかけて皮下脂肪組織内に伸長し、妊娠後に腺房が発達して泌乳を開始する。食餌性肥満が泌乳量を抑制し泌乳期間を短縮することがヒトやマウスなどで報告されているが、そのメカニズムや妊娠以前の乳腺導管発達に対する肥満の影響は知られていない。そこで我々は食餌性肥満が乳腺導管の発達に与える影響を解析した。

高脂肪食(HFD)群は通常食(ND)群に比して顕著な肥満、腹部乳腺重量はおおよそ4倍に増大した。乳腺ホルマウント標本を用いて導管の形態を定量的に観察したところ、導管は両群とも複数の枝分かれをもって脂肪組織全体に伸長していたが、導管先端部の太さと分枝頻度は食餌性肥満によって有意に減少した。

さらに乳腺薄切標本を用いて組織学的解析を行なった。乳腺導管は管腔側の上皮細胞と基底側の筋上皮細胞からなり、その外周は基底膜、膠原線維層、脂肪細胞の順で間質に取り囲まれている。HFD群では脂肪細胞

の肥大と導管周囲線維層の肥厚、および筋上皮細胞の減少といった異常が認められた。

以上のように食餌性肥満は妊娠以前の乳腺導管発達を抑制することが明らかとなり、これが妊娠後の腺房形成や泌乳の低下につながると思われた。

#### (2) 肥満による乳腺発達障害のメカニズム

乳腺導管の発達制御には実質と間質をまたぐ局所的な細胞間相互作用が必要である。HFD 群では高レプチン血症を呈し、乳腺局所においてもレプチン遺伝子の高発現をみとめた。さらにレプチン受容体が乳腺上皮細胞領域に局在し、レプチンは *in vitro* で乳腺上皮細胞の増殖を阻害し、肝細胞増殖因子 (HGF) による上皮細胞の導管形成を抑制した。

以上のように、肥満により増大した脂肪細胞分泌因子レプチンが乳腺上皮細胞の形態形成を直接作用により抑制する可能性を強く示唆した。

しかしながら、レプチンあるいは肥満 (脂肪細胞の肥大化) により変化する他の脂肪細胞分泌因子が、線維芽細胞や筋上皮細胞の機能に変化を与えた結果、乳腺導管の発達を間接的に抑制した可能性も残されており、今後更なる解析が必要である。

#### (3) レプチンによる免疫細胞機能の調節

肥満したマウス乳腺脂肪組織にはマクロファージの浸潤が見られた。このことはレプチンなどの脂肪細胞分泌因子が、免疫細胞の機能に変化を与え、乳腺実質の細胞機能を調節している可能性がある。ここではウシ T リンパ球、単球マクロファージ、および好中球の機能におよぼすレプチンの作用について検討した。

レプチンは好中球の活性酸素産生能および抗菌酵素の放出能 (脱顆粒応答) には影響を与えなかった。しかし、抗原提示による T リンパ球の増殖能を抑制したが、インターフェロン  $\gamma$  の産生を増強すること、マクロファージに対しては腫瘍壊死因子やインターロイキン-1 の産生を増強することが明らかとなった。

以上のように、肥満により増大したレプチンが免疫細胞を介して乳腺上皮細胞に作用する可能性を示した。これらは、また肥満 (レプチン) が乳房炎などの炎症を憎悪させる可能性を示唆した。

#### (4) アディポサイトカインの発現調節と相互作用

①ウシ間質脂肪細胞におけるレプチンの発現は成熟脂肪への分化 (あるいは肥満) により発現が亢進するが、反芻類のエネルギー源である揮発性脂肪酸で発現が促進される。

②HGF も脂肪細胞から分泌されるが、その発現は肥満によって大きく変化しなかった。これは HGF の発現が前駆脂肪細胞で強く見られ、成熟脂肪細胞でむしろ発現が低下することと関連すると思われた。

なお HGF の発現はエストロゲン (E2) で増加し、そのシグナルにはその核内受容体ではなく膜結合型エストロゲン受容体 (GPR30) が関与する可能性がある。

③神経成長因子 NGF が脂肪細胞から分泌され、炎症時に分泌が増大すること、また乳癌の増殖に NGF が関与することが報告されている。

本研究では抗炎症作用を持つアディポカイン、アディポネクチンが NGF に直接結合し、NGF の神経突起伸張作用を阻害することを示した。今後、アディポネクチンの抗炎症作用についてさらに検討したい。

#### (5) 乳癌の増殖に及ぼすレプチンの影響

イヌ乳腺腫瘍組織より不死化細胞を 5 株分離した。それらの増殖に対するレプチンあるいはエストロゲン E2 の作用を調べたところ、レプチンは増殖に影響を与えなかった。また MCF-7 および MDA-MB231 細胞を用いても、同様の結果が得られた。

この結果は正常な乳腺上皮細胞に対して見られるようなレプチンの作用が腫瘍化した細胞では消失することを示唆した。

#### 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 20 件)

- ① Kamikawa, A., Ichii, O., Yamaji, D., Imao, T., Suzuki, C., Okamatsu-Ogura, Y., Terao, A., Kon, Y. and Kimura, K. (2009) Diet-induced obesity disrupts ductal development in the mammary glands of nonpregnant mice. *Dev. Dyn.* 238, 1092-1099. 査読有
- ② Omachi, A., Matsushita, Y., Kimura, K. and Saito, M. (2008) Role of uncoupling protein 1 in the anti-obesity effect of  $\beta$ 3-adrenergic agonist in the dog. *Res. Vet. Sci.* 85, 214-219. 査読有

- ③ Ahmed, M., Kimura, K., Soliman, M., Yamaji, D., Ishioka, K., Hagiwara, K., and Saito, M. (2008) Leptin inhibits mitogen-induced proliferation of peripheral T lymphocytes from Holstein cows. **Vet. J.** 176, 361-368. 査読有
- ④ Makondo, K., Kamikawa, A., Ahmed, M., Terao, A., Saito, M. and Kimura, K. (2008) Geldanamycin enhances hepatocyte growth factor stimulation of eNOS phosphorylation in endothelial cells. **Eur. J. Pharmacol.** 582, 110-115. 査読有
- ⑤ Nishino, N., Tamori, Y., 他25名14番目 (2008) FSP27 contributes to efficient energy storage in murine white adipocytes by promoting the formation of unilocular lipid droplets. **J. Clin. Invest.** 118, 2808-2821. 査読有
- ⑥ 大町麻子、石岡克己、寺尾晶、木村和弘 (2008) 減量による肥満犬の糖代謝機能の改善、ペット栄養学会誌 11, 13-19. 査読有
- ⑦ Ishioka, K., Hosoya, K., Kitagawa, H., Shibata, H., Honjoh, T., Kimura, K. and Saito, M. (2007) Plasma leptin concentration in dogs: Effects of body condition score, age, gender and breeds. **Res. Vet. Sci.** 82, 11-15. 査読有
- ⑧ Ahmed, M., Kimura, K., Soliman, M., Yamaji, D., Okamoto-Ogura, Y., Makondo, K., Inanami, O. and Saito, M. (2007) Effects of leptin and tumor necrosis factor- $\alpha$  on degranulation and superoxide production of polymorphonuclear neutrophils from Holstein cows. **J. Vet. Med. Sci.** 69, 125-131. 査読有
- ⑨ Ahmed, M., Shaban, Z., Yamaji, D., Okamoto-Ogura, Y., Soliman, M., Abd Eldaim, M., Ishioka, K., Makondo, K., Saito, M. and Kimura, K. (2007) Induction of proinflammatory cytokines and caspase-1 by leptin in monocyte/macrophages from Holstein cows. **J. Vet. Med. Sci.** 69, 509-514. 査読有
- ⑩ Soliman, M., Kimura, K., Ahmed, M., Yamaji, D., Matsushita, Y., Okamoto-Ogura, Y., Makondo, K., Saito, M. (2007) Inverse regulation of leptin mRNA expression by short- and long-chain fatty acids in the cultured bovine adipocytes. **Domest. Anim. Endocrinol.** 33, 400-409. 査読有
- ⑪ Yamaji, D., Kamikawa, A., Soliman, M. M., Ito, T., Ahmed, M. M., Makondo, K., Watanabe, A., Saito, M. and Kimura, K. (2007) Leptin inhibits hepatocyte growth factor-induced ductal morphogenesis of bovine mammary epithelial cells. **Jpn. J. Vet. Res.** 54, 183-189. 査読有
- ⑫ Okamoto-Ogura, Y., Kitao, N., Kimura, K. and Saito, M. (2007) Brown fat UCP1 is not involved in the febrile and thermogenic responses to IL-1 $\beta$  in mice. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.** 292, E1135-E1139. 査読有
- ⑬ Okamoto-Ogura, Y., Uozumi, A., Kitao, N., Kimura, K. and Saito, M. (2007) Day-night difference in  $\beta$ 3-adrenoceptor agonist-induced energy expenditure: contribution of brown fat thermogenesis and physical activity. **Obesity Res. Clin. Pract.** 1, 61-67. 査読有
- ⑭ Okamoto-Ogura, Y., Uozumi, A., Toda, C., Kimura, K., Yamashita, H. and Saito, M. (2007) Uncoupling protein 1 contributes to fat-reducing effect of leptin. **Obesity Res. Clin. Pract.** 1, 233-241. 査読有
- ⑮ Kitao, N., Yahata, T., Matsumoto, T., Okamoto-Ogura, Y., Omachi, A., Kimura, K. and Saito, M. (2007) Molecular cloning and tissue distribution of uncoupling protein 1 (UCP1) in Plateau Pika (*Ochotona dauurica*). **J. Vet. Med. Sci.** 69, 1065-1068. 査読有
- ⑯ Fujimoto, W., Shiuchi, T., 他8名7番目 (2007) Dmbx1 is essential in agouti-related protein action. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 104, 15514-15519. 査読有
- ⑰ Omachi, A., Ishioka, K., Uozumi, A., Kamikawa, A., Toda, C., Kimura, K. and Saito, M. (2007)  $\beta$ 3-Adrenoceptor agonist AJ-9677 reduces body fat in obese beagles. **Res. Vet. Sci.** 83, 5-11. 査読有
- ⑱ Wang, Y., Kimura, K., Saito, M., Kontani, Y., Kobayashi, Y., Mori, N. and Yamashita, H. (2006) A novel phenotype of suppressing heat release contributes to homeothermic regulation in UCP1-deficient mice. **Pflügers Archiv-Eur. J. Physiol.** 452, 363-369. 査読有
- ⑲ Yamaji, D., Kimura, K., Watanabe, A., Soliman, M., Ahamed, M., Kon, Y., Iwanaga, T. and Saito, M. (2006) Hepatocyte growth factor and c-Met systems in bovine mammary gland.

*Domest. Anim. Endocrinol.* 30,  
239-246. 査読有

- ⑳ Ishioka, K., Omachi, A., Sagawa, M., Shibata, H., Honjoh, T., Kimura, K. and Saito, M. (2006) Canine adiponectin: cDNA structure, mRNA expression in adipose tissues and reduced plasma levels in obesity. *Res. Vet. Sci.* 80, 127-132. 査読有

[学会発表] (計 19 件)

- ① 木村和弘、大倉有生、今尾武士、上川昭博、石井辰矢、岡松優子、寺尾晶、アディポネクチンと生理活性因子の結合特性、第 29 回日本肥満学会(大分)、2008 年 10 月 17-18 日
- ② 上川昭博、岡松優子、寺尾晶、木村和弘、食事性肥満が乳腺導管の発達に及ぼす影響、第 29 回日本肥満学会 (大分)、2008 年 10 月 17-18 日
- ③ 岡松優子、米代武司、寺尾晶、木村和弘、斉藤昌之、白色脂肪での UCP1 発現はレプチン感受性を増強させる、第 29 回日本肥満学会 (大分)、2008 年 10 月 17-18 日
- ④ 木村和弘、大倉有生、今尾武士、上川昭博、石井辰矢、岡松優子、寺尾晶、脂肪細胞分泌因子アディポネクチンによる神経成長因子 NGF の機能阻害、第 146 回日本獣医学会学術集会 (宮崎)、2008 年 9 月 24-26 日
- ⑤ 木村和弘、大倉有生、今尾武士、上川昭博、石井辰矢、岡松優子、寺尾晶、アディポネクチンと生理活性因子の結合：その特性と生理機能の阻害、第 13 回アディポサイエンス研究会シンポジウム (大阪)、2008 年 8 月 22 日
- ⑥ 岡松優子、木村和弘、渡辺久美子、松下真美、斉藤昌之、レプチンの摂食抑制作用における脱共役蛋白質 UCP1 の役割、第 28 回日本肥満学会 (東京)、2007 年 10 月 19-20 日
- ⑦ 大倉有生、春山貴志、寺尾晶、木村和弘、脂肪細胞分泌因子アディポネクチンと神経成長因子 NGF の相互作用、第 28 回日本肥満学会 (東京)、2007 年 10 月 19-20 日
- ⑧ 伊藤智樹、山地大介、上川昭博、寺尾晶、木村和弘、エストロゲンによる脂肪細胞由来細胞増殖因子 HGF および HRG $\alpha$  の遺伝子発現調節の遺伝子発現調節、第 144 回日本獣医学会学術集会 (江別)、2007 年 9 月 2-4 日
- ⑨ 上川昭博、山地大介、伊藤智樹、今尾武士、寺尾晶、木村和弘、脂肪細胞分泌因子レプチンの乳腺導管形成抑制作用、第 144 回日本獣医学会学術集会 (江別)、2007 年 9 月 2-4 日
- ⑩ 大町麻子、石岡克己、寺尾晶、木村和弘、肥満犬の減量に伴う栄養代謝因子の変化

とインスリン抵抗性の改善、第 4 回日本獣医内科学アカデミー学術大会 (ペット栄養学会) (東京)、2007 年 8 月 12 日

- ⑪ Okamatsu-Ogura, Y., Kitao, N., Kimura, K., Saito, M. Minor role of brown fat thermogenesis in IL-1 beta-induced fever. 15th European congress on obesity (Hungary)、2007 年 4 月 22-25 日
- ⑫ 木村和弘、乳腺上皮細胞の形態形成における間質脂肪細胞の役割、第 43 回日本生化学会北海道支部例会 (札幌)、2006 年 11 月 3 日
- ⑬ 山地大介、木村和弘、渡部淳、上川昭博、Mohamed Soliman、斉藤昌之、脂肪細胞由来分泌因子の乳腺組織構築における動物種差、第 27 回日本肥満学会 (大阪)、2006 年 10 月 27-28 日
- ⑭ Saito, M., okamatsu-Ogura, Y., Inokuma, K., Omachi, A., Kimura, K.  $\beta$ -Adrenergically controlled energy metabolism in brown adipose tissue. 第 27 回日本肥満学会 (兵庫)、2006 年 10 月 27-28 日
- ⑮ Mohamed Ahmed、山地大介、岡松優子、Kennedy Makondo、稲波修、斉藤昌之、木村和弘、Effect of leptin on degranulation and superoxide production of polymorphonuclear neutrophils from Holstein cows、第 142 回日本獣医学会学術集会 (山口)、2006 年 9 月 22-24 日
- ⑯ 木村和弘、山地大介、マコンドケネディ、斉藤昌之、ウシ肝細胞増殖因子 HGF の発現とその機能、動物サイトカイン研究会第 4 回学術集会 (山口)、2006 年 9 月 24 日
- ⑰ Yamaji, D., Kimura, K., Soliman, M.M., Saito, M. Role of adipocytes in the regulation of morphogenic differentiation of bovine mammary epithelial cells. 10th International Congress on Obesity (Australia)、2006 年 9 月 3-8 日
- ⑱ Yamaji, D., Kimura, K., Watanabe, A., Kamikawa, A., Soliman, M.M., Saito, M. Species-Dependent Regulation of HGF Expression in Adipocytes Links the Morphogenic Differentiation of Mammary Epithelial Cells. 第 11 回アディポサイエンス研究会シンポジウム (大阪)、2006 年 8 月 19 日
- ⑲ Yamaji, D., Kimura, K., Watanabe, A., Soliman, M.M., Ahmed, M.M., Makondo, K., Saito, M. Adipocyte secreting factors control morphogenic differentiation of bovine mammary epithelial cells. 20th IUBMB International congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th. FAOBMB Congress (第 20 回国際生化学・分子生物学会議) (京都)、2006 年 6 月

18-23 日

〔図書〕(計1件)

- ① 木村和弘 (2007) レプチン (Section I-E-4-g)、ホルモンハンドブック 新訂 eBook版 (日本比較内分泌学会編、南江堂) pp1078-1094.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.vetmed.hokudai.ac.jp/biochemistry01.html>

## 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

なし

### (3) 連携研究者

なし