

## 主論文の要約

名古屋大学大学院生命農学研究科

安枝 武彦

乳に存在する脂質の大部分は微小な脂肪滴（約 1~10  $\mu\text{m}$ ）の形で分散しており、乳脂肪球と呼ばれている。乳脂肪球は、乳腺上皮細胞の小胞体で生合成されたトリグリセリドの油滴が、細胞頂端側から細胞膜に覆われて出芽することで乳中へと分泌される。主要な生体脂質であるリポタンパク質とは異なる特有な経路と機構で分泌される乳脂肪球は、トリグリセリドの油滴が乳腺上皮細胞の小胞体膜由来リン脂質一重層および細胞膜由来リン脂質二重層に覆われた特徴的な構造を有する。乳脂肪球の表面を覆うリン脂質二重層には多様な膜タンパク質が存在し、その多くは乳腺上皮細胞頂端側の細胞膜表面に由来する。

MFG-E8 (milk fat globule EGF-factor VIII) は、乳脂肪球表面に存在する主要な膜タンパク質の一つとして同定された糖タンパク質で、一つもしくは二つの EGF-like domain、血液凝固第 V および第 VIII 因子に相同性をもつ二つの discoidin/C domain から構成される。EGF-like domain に含まれる RGD 配列はインテグリンに結合し、discoidin/C domain は陰イオン性リン脂質のホスファチジルセリンに結合する。このように、MFG-E8 は RGD 配列および discoidin/C domain を介して、二つの分子に結合して連結することができる特徴を持つ架橋性タンパク質である。MFG-E8 は全身の多様な組織で発現しており、活性化マクロファージから分泌される MFG-E8 は、アポトーシス細胞表面に露出したホスファチジルセリンを介してアポトーシス細胞に結合し、標識分子となることでマクロファージによるアポトーシス細胞の選択的貪食を亢進することが報告されている。一方で、MFG-E8 は泌乳期乳腺で特に高発現しており、乳中に高濃度で含まれている。乳脂肪球に存在する膜タンパク質として同定された MFG-E8 は、長らく乳脂肪球の分泌に必須な内在性成分であると考えられてきたが、本学位論文の著者を含む研究グループにより、MFG-E8 は乳脂肪球の分泌に必須な内在性成分ではなく、また、必ずしも全ての乳脂肪球が MFG-E8 を含むわけではないことが明らかにされた。さらに、乳清にも遊離の状態で MFG-E8 が含まれ、授乳を停止してから時間が経過した乳には、MFG-E8 を含む乳脂肪球が増加することも報告されている。

MFG-E8 の分子構造や生体での機能に関する理解は、乳脂肪球に存在する膜タンパク質として同定され、全アミノ酸配列が決定されてから急速に進んできた。しかしながら、乳中に高濃度で含まれる MFG-E8 の生理的意義や、乳脂肪球表面に偏在する MFG-E8 の機能に関する理解は進んでいない。本学位論文の研究により、乳脂肪球表面の MFG-E8 は、乳腺上皮細胞による再吸収の標識分子として機能すること、また、乳脂肪球の構造的安定性に寄与することが明らかとなった。明らかになった現象とその生理的意義を以下にまとめ、考察する。

### 1. 乳腺上皮細胞による乳脂肪球の再吸収および MFG-E8 の関与

アポトーシス細胞の表面に露出するホスファチジルセリンに結合する MFG-E8、およびアポトーシス小体と乳脂肪球の膜構造の類似点に着目し、マウス乳腺上皮細胞 HC11 細胞株および MFG-E8 遺伝子欠損マウスを用いて、乳脂肪球と乳腺上皮細胞との相互作用を解析し、乳脂肪球表面の MFG-E8 の役割を評価した。その結果、乳脂肪球表面の MFG-E8 は、乳腺細胞へと一旦分泌された乳脂肪球が、乳腺上皮細胞に取り込まれ、再吸収される際の標識分子として機能することが明らかとなった。

MFG-E8 欠損型マウスでは、培養乳腺上皮細胞で観察される MFG-E8 を介した乳脂肪球の再吸収は起こらないと考えられ、泌乳中においても野生型マウスよりも乳中の脂肪含量が高値を示すことから、乳脂肪球の再吸収現象は、野生型マウスでは泌乳期間中においても常に行われていることが示唆された。言い換えると、乳腺上皮細胞は乳脂肪球の生合成、分泌とともに、一旦分泌した乳脂肪球を泌乳期間中においても再吸収することで、乳脂肪含量を制御していると推測される。乳脂肪含量が高値を示す MFG-E8 欠損型マウスにより飼育された哺乳マウスは、野生型マウスにより飼育された哺乳マウスよりも 5 日齢時点で有意に体重が約 30%増加していた。この体重差は離乳後の 4 週齢時点では解消されていたことから、乳脂肪含量の差異は仔の成長に著しい影響を及ぼすものではないと考えられた。このように離乳後に体重差は解消されているものの、近年、胎児期や新生児期の栄養状態がエピジェネティックに作用して成長後の健康状態や疾病罹患率に関与することが明らかにされつつあり、仔の成長に対する質的な差異を生じている可能性が考えられる。乳脂肪球表面の MFG-E8 は、乳脂肪球の再吸収を介して、新生児の発達に適切な脂肪含量になるように、乳中の脂肪含量を制御していることが示唆される。一方で、適切な摂取量となるよう乳児が自身で飲む量を調節していることも考えられる。その場合において、摂取カロリーが一定でも、その摂取カロリーを脂肪で摂取するか乳糖で摂取するか、という質的な差異が生じる。そのため、乳脂肪球の再吸収現象は、乳脂肪含量と同時に、脂質－糖質バランスを調節している、とも考察できる。MFG-E8 欠損型マウスの高脂肪乳により哺育されたマウスの、成長後の健康状態に関する更なる研究が期待される。

一方で、乳脂肪球は分泌後の時間経過とともに、乳脂肪球表面に MFG-E8 が増加し、このような乳脂肪球は培養乳腺上皮細胞に取り込まれやすいことから、乳腺胞内においても、長時間滞留した乳脂肪球は再吸収されやすいことが推測できる。また、野生型マウスでは、授乳の停止に伴い、乳中の脂肪含量のみが急激に低下することも明らかとなった。これらのことから、乳脂肪球は授乳停止後、時間の単位で乳中から徐々に消失すること、また、乳腺上皮細胞は、乳腺管腔に長時間滞留する一部の古くなった乳脂肪球を選択的に再吸収していることが示唆される。仔の哺乳による乳腺からの乳の排出は不完全であり、一部の乳は常に乳腺胞内に残留し、長時間滞留することになる。以下に記すような関連する先行研究から、乳腺胞内に残留した乳脂肪球は酸化的劣化を受けている可能性がある。泌乳ホルモンのオキシトシンが乳腺組織に残留すると、過酸化脂質産物が増加するという報告や、感染防御のため、乳腺管腔内に浸潤する免疫細胞は活性酸素種を産生するという報告、さ

らには活性酸素種の消去に関与するセルロプラスミンは、授乳の停止に伴い乳中濃度が上昇するということが報告されている。さらには、マウスを用いた予備的な研究により、授乳の停止に伴い乳中に過酸化脂質産物のマロンジアルデヒドが上昇するという結果が得られている。これらのことから、乳腺胞内はある種の酸化ストレス条件下にあると推測される。乳脂肪球には、乳児の脳や網膜の発達に必要なドコサヘキサエン酸などの多価不飽和脂肪酸が多く含まれている。乳腺胞内に長時間残留し、古くなった乳脂肪球を再吸収する生理的意義は、酸化的劣化を受けた乳脂肪を乳児に輸送しないための機構である可能性がある。

## 2. 乳腺胞内での乳脂肪球の生化学的・物理化学的变化および MFG-E8 の関与

野生型マウスと MFG-E8 欠損型マウスの乳を顕微鏡で観察すると、大きさがわずかに異なることに気づいた。さらに定量的な画像解析により MFG-E8 欠損型マウスの乳脂肪球はわずかに大きいことが明らかとなった。わずかな乳脂肪球の大きさの違いに着目し、乳腺胞に蓄積した乳中での乳脂肪球の生化学的、物理化学的变化および、それらと MFG-E8 との関連を、*in vitro* の生理条件下で乳を静置する実験系により解析した。その結果、MFG-E8 は、乳脂肪球表面のホスファチジルセリンと乳中のカルシウムイオンを介して、乳脂肪球同士が膜融合し、異常に大きくなるという生物物理学的な乳脂肪球の劣化を防止する役割を担っていることが明らかとなった。

MFG-E8 欠損型マウスの乳を 37℃の生理条件下で静置すると、乳脂肪球間での融合が生じ、異常に大きな乳脂肪球の割合が増加した。しかしながら、MFG-E8 欠損型マウスにおいて、搾乳した乳に含まれる乳脂肪球は、乳腺胞に長時間滞留した乳においてもこのような異常に大きな乳脂肪球は見られず、やや大きい乳脂肪球が微増した程度にとどまった。一方で、乳腺組織を切開し、漏出した乳には、異常に大きい乳脂肪球が存在した。さらには、異常に大きい乳脂肪球は、乳腺胞に長時間滞留した乳腺組織中の乳だけでなく、授乳停止直後の乳腺組織中の乳にも観察された。これらのことから、異常に大きい乳脂肪球は搾乳によっても乳腺から排出されないことが明らかとなった。異常に大きい乳脂肪球は仔の哺乳においても簡単に排出されず、長時間乳腺胞内に滞留すると考えられる。

乳中で、乳脂肪球がどのように、また、なぜ決められた範囲内の大きさで安定して保持され溶液中に分散しているかという基本的な疑問があった。どのように、という疑問に対しては、本研究によってその一部の機構が明らかにされ、乳脂肪球表面に露出したホスファチジルセリンを、MFG-E8 が結合し覆うことで、乳脂肪球の融合に抑制効果を持つことが示された。また、乳脂肪球が大きい脂肪滴にならないように、なぜ大きさを制御されているか、という疑問に対しては、乳脂肪球が大きすぎると、乳中で安定してコロイド状に懸濁して存在できない可能性があるということが考えられる。乳幼児期における食餌性脂肪摂取量は、成人に比べて少なくとも 3-5 倍高く、乳脂肪の効率的な消化と吸収は乳幼児の最適な成長と発達のためのエネルギー利用として非常に重要である。しかしながら、乳幼児の胃酸や胆汁酸の分泌量は成人に比べて逆説的に少ない。さらには、乳脂肪球の大きさが

消化管における乳脂肪の消化効率に影響を与えることも報告されている。そのため、乳脂肪球の大きさは乳幼児期における消化に大きな影響を与えることも推測される。乳幼児期における乳脂肪の消化、吸収の観点からの、授乳後の新生児消化管における乳脂肪の動態や運命に関する更なる研究が期待される。

本学位論文の研究により、MFG-E8 は乳腺上皮細胞による乳脂肪球の再吸収における標識分子となり、また、経時的に表面に露出してくる酸性リン脂質を被覆することにより膜融合を抑制して乳脂肪球の大きさを一定に保つことに寄与することが明らかとなった。生物種によって異なるが、乳脂肪球は 1~10  $\mu\text{m}$  の範囲内の大きさで保たれており、大きい乳脂肪球の直径は (5~10  $\mu\text{m}$ ) 乳腺上皮細胞の頂端側表面とおおよそ同程度である。乳脂肪球表面の MFG-E8 は、古くなった乳脂肪球の標識分子となることに加えて、non-professional な乳腺上皮細胞が取り込むことができる大きさに、乳脂肪球を保つことにも寄与している可能性がある。実際に、MFG-E8 欠損型マウスの乳を 37°C の生理条件下で静置し、培養乳腺上皮細胞の細胞培養液に添加すると、異常に巨大になった乳脂肪球の再吸収は、顕著に低下していた。また、乳脂肪球の大きさを一定に保つことで、乳腺組織からの乳脂肪球の排出をスムーズに行い、古くなり酸化的劣化を受け得る乳脂肪球が乳腺胞内に残留し続け、連鎖的に過酸化反応を生じることを防いでいるかもしれない。

泌乳期の乳腺において、乳腺胞内腔の乳脂肪球の供給と消費は、乳腺上皮細胞による乳脂肪の生合成と分泌および授乳による乳の排出さらには滞留した乳脂肪球の再吸収によって精巧に制御されていると推測される。このような乳脂肪球の緻密な動態を、MFG-E8 は、乳脂肪球の大きさを維持し、乳脂肪球と乳腺上皮細胞の相互作用を制御することにより、新生児の発達に適切な脂肪含量、脂質-糖質バランスになるように、乳中の脂肪含量を制御するとともに、乳脂肪の長期の滞留を抑制して乳児栄養に重要な高度多価不飽和脂肪酸などの微量脂質成分の酸化的劣化を抑制し、乳脂肪の品質制御に貢献している可能性がある。過酸化脂質を特異的に検出するプローブを用いた実験による乳脂肪の酸化的劣化の実証や、酸化的劣化を受ける脂質の同定など、乳児栄養の観点からの更なる研究が期待される。