

---

## 研究報文

---

### マウス胸腺脂肪化時期の検討

春那美由紀, 星島 直子, 井田めぐみ, 草信 映子, 鈴木真知子,  
坪田いずみ, 林 小百合, 宮田 堅司

#### Examination of fat cell development in the mouse thymus

Miyuki Haruna, Naoko Hoshijima, Megumi Ida, Eiko Kusanobu,  
Machiko Suzuki, Izumi Tsubota, Sayuri Hayashi, and Kenji Miyata

The thymus has an important role in the immune reaction. The lymphocytes localized both in thymic cortex and in medulla, known as T cells, proliferate in an environment of the epithelial reticular cells. T cells educated to react against non-self materials enter the circulation and function in peripheral immunity. Thymus of the mouse has almost developed and grown to its natal size by the 18 days gestation. After the birth thymus grows at a somewhat slower rate until puberty. It subsequently shows a decrease both in size and in weight. That is due to the decrease in the lymphocyte-accumulated region and to the partial replacement by fat tissue. The process is so-called "age involution".

Fat cells are classified as connective-tissue cells. They must develop and proliferate in the capsule or in the trabecula of the thymus after birth, because no typical fat cells containing lipid droplets are observed at birth.

We examined when fat cells appeared in the thymus after the birth. Fat cells are known to express leptin, so that the appearance of leptin mRNA was detected by the PCR method. The expression of leptin was detected as early as in the thymus of the 3 week-old mouse and increased with the age. It is suggested that fat tissue development begins immediately after the birth and precedes to the age involution in the thymus, although that the cortex and medulla develops until puberty.

#### I. はじめに

胸腺は胸腔中で心臓の前上方に位置する一次リンパ性器官である。胸腺は胎生期に著しく発達し、出生後には成長速度は減少し、繁殖可能期前後からリンパ球の集積した皮質および髄質の加齢退縮が始まり、脂肪組織で置換される<sup>1)</sup>。リンパ球集積領域の退縮に伴って増殖してくる脂肪組織を構成する脂肪細胞の由来は明らかでないが、出生時には胸腺に脂肪組織は存在せず、したがって、出生後繁殖可能期

前後に脂肪細胞が出現し増殖すると考えられている<sup>1~3)</sup>。

脂肪細胞は結合組織細胞に分類される細胞である。したがって、被膜あるいは胸腺を多数の小葉に分割するトラベキュラ中で脂肪細胞が増殖すると考えられる。加齢に伴う胸腺での脂肪細胞の増殖には、脂肪細胞あるいはその前駆細胞が、胸腔中の胸腺周囲の結合組織あるいは他の場所から移動してくるメカニズム、あるいは、出生時に、既に被膜あるいはトラベキュラ中に脂肪細胞の幹細胞が存在し、加齢に伴い増殖および分化するメカニズムが考えられる。いずれのメカニズムかは不明であるが、脂肪滴

を含有する成熟した脂肪細胞が出生時には認められず、加齢に伴い出現することは、胸腺が脂肪細胞、脂肪組織の増殖および分化のモデル器官となり得ることを示唆している。脂肪組織の増殖・分化のモデルとするためには、脂肪組織の増殖・分化時期を決定することが重要である。したがって、本報では、特異的に成熟した脂肪細胞が発現するホルモンであるレプチン<sup>4-6)</sup>の mRNA 量を調べることにより、マウス胸腺の成熟した脂肪細胞の出現時期を検討した。

## II. 方 法

### 1. 材 料

BALB/c マウス (雌, 3 週齢, 8 週齢および 6 ヶ月齢) を用いた。安楽死させたマウスを開腹、開胸し、胸腺、脾臓、肝臓、腎臓を摘出した。さらに、背部皮下より肩甲骨間の褐色脂肪を摘出した。摘出した試料はサンプルチューブに入れ直ちに液体窒素中で凍結した後、 $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。ただし、脾臓および腎臓では、摘出時に表面に付着している腹膜由来の脂肪を取り除いた後凍結した。

### 2. RNA の抽出および cDNA 合成

凍結した試料より、酸性グアニジウムチオシアン酸-フェノールクロロホルム法<sup>7)</sup>によってトータル RNA を抽出した。すなわち、あらかじめ氷冷しておいた 5 ml の RNA 抽出液 (4 M グアニジウムチオシアン酸, 25 mM クエン酸ナトリウム, 0.5% サルコシル, 0.1 M  $\beta$ -メルカプトエタノール) 中で、凍結試料をホモジナイズした。2 M 酢酸ナトリウム 0.5 ml, 0.1 M トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0) で飽和したフェノール 5 ml およびクロロホルム 1 ml を加え、良く混合後 15 分間氷冷した。遠心分離後水層を分取し、等容量のイソプロパノールを加え  $-20^{\circ}\text{C}$  で 1 時間静置することにより RNA を沈殿させた。沈殿を分取後、上記の RNA 抽出液に再溶解させ、等容量のイソプロパノールを加え  $-20^{\circ}\text{C}$  で 1 時間静置することにより RNA を再沈殿させた。沈殿を分取後、オートクレーブ処理した水に再溶解させ、エタノール沈殿法<sup>8)</sup>により精製した。トータル RNA 濃度は  $2\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$  に調整した。この溶液  $2\ \mu\text{l}$  (トータル RNA  $4\ \mu\text{g}$ ) を用いてトータル RNA に対する cDNA を合成した。cDNA の合成は市販キット (cDNA 合成キット, ベーリンガーマンハイム No. 1013882) の AMV リバーシトランスクリプターゼ, ランダムプライマーを利用し、推奨されている操作手順によって行った。フェノール抽出お

よびエタノール沈殿法により精製した cDNA をオートクレーブ処理した水に溶解し、濃度  $200\ \text{ng}/\mu\text{l}$  に調整した。褐色脂肪組織の cDNA は、濃度  $50\ \text{ng}/\mu\text{l}$  に調整した。

### 3. PCR 法および増幅バンドの定量

トータル RNA より合成した cDNA を鋳型として PCR を行った<sup>9,10)</sup>。胸腺、脾臓、肝臓および腎臓では、cDNA  $2.5\ \mu\text{l}$  ( $500\ \text{ng}$ ) を鋳型として用いた。褐色脂肪組織では、鋳型として  $1\ \mu\text{l}$  ( $50\ \text{ng}$ ),  $5\ \mu\text{l}$ ,  $10\ \mu\text{l}$  および  $20\ \mu\text{l}$  の cDNA を用いた。マウスレプチンの cDNA を増幅するために、下記のプライマー OF 1 および OB 1 を準備した。

プライマー OF 1

5' p-GAAGAGGGATCCCTGCTCCA

プライマー OB 1

5' p-GATGGATGTGTGCACATGGC

これらのプライマーを用いることにより、マウスレプチン cDNA<sup>4)</sup> のコーディング領域を含む 665 塩基対の DNA が増幅される。PCR の条件は、反応溶液容量  $50\ \mu\text{l}$ , 鋳型変性温度  $96^{\circ}\text{C}$  および変性時間 30 秒, プライマーアニーリング温度  $55^{\circ}\text{C}$  およびアニーリング時間 1 分, 相補鎖合成反応温度  $72^{\circ}\text{C}$  および反応時間 2 分, 25 サイクルに設定した。DNA ポリメラーゼとしてリコンビナントタック DNA ポリメラーゼ (TAKARA リコンビナント Taq, タカラ No. R001A) を用いた。

PCR 終了後、反応溶液  $10\ \mu\text{l}$  をアガロースゲルで電気泳動した。電気泳動終了後、エチジウムブロマイド液で染色し、ポラロイド撮影を行った。マーカー DNA  $1\ \mu\text{g}$  を同時に電気泳動し、分子量サイズおよび染色度を比較することにより、PCR で増幅されたバンドの大きさと量を決定した。さらにトータル RNA  $250\ \text{ng}$  中のレプチン mRNA の存在量比 Y を計算した。すなわち、電気泳動の結果より求めた増幅バンドの量を Xg とすると、次式により Y (ppb) を求めた。

$$Y = \frac{5X}{2^{25} \times 250 \times 10^{-9}} \times 10^9$$

ただし、 $2^{25}$  は理論的な数値にすぎないので、Y 値は相対的な比較でのみ有意である。

## III. 結 果

### 1. プライマー OF 1 と OB 1 による増幅

マウスの脂肪組織よりクローニングされたレプチン遺伝子の cDNA の塩基配列<sup>4)</sup> にしたがって設計したプライマー OF 1 と OB 1 を用いて、PCR をお

こなつた。褐色脂肪組織では、鋳型に用いた cDNA 量依存性に約650塩基対の大きさの増幅バンドが検出された (図1)。肝臓および腎臓では増幅バンドは検出されなかつた (図2)。したがつて、プライマー OF 1 と OB 1 により、脂肪細胞のレプチン遺伝子の cDNA が特異的に増幅されていると結論した。

### 2. 胸腺のレプチン cDNA の検出

3 週齢, 8 週齢および 6 ヶ月齢のマウス胸腺のトータル RNA より, ランダムプライマーにより合成した cDNA 500 ng を鋳型として PCR を行つた結果を図3に示した。同時に電気泳動したマーカー DNA の染色度と比較して, 各試料の増幅バンドの DNA 量を求めた。胸腺では, 3 週齢, 8 週齢, 6 ヶ月齢の順に, 増幅されたバンドは濃く染色され, レプチンの発現量は加齢と共に増大していた (図4)。

### 3. リンパ組織でのレプチン cDNA の検出

胸腺以外のリンパ性器官での脂肪化あるいは脂肪細胞の増殖は報告されていない。胸腺脂肪化の対照として, 脾臓のトータル RNA より合成した cDNA を鋳型として PCR をおこなつた。脾臓でも, レプチンの特異的な増幅バンドが検出された (図2)。しかし, 加齢とレプチン発現量との相関性は明瞭ではなかつた。

## IV. 考 察

マウスの胸腺原基は, 胎生12日目に第3鰓嚢の内胚葉から上皮性の細胞が分化することにより形成される。この細胞塊に接する間葉性の細胞が扁平になり胸腺被膜を形成する。胎生13日目には, 内胚葉由来の上皮性細胞の間にリンパ球の前駆細胞が出現する。胎生14~15日目には, トラベキュラが出現し実質内を小葉に区分する。トラベキュラ内に血管が侵入し, 骨髄由来の未成熟リンパ球が流入し T リンパ球へ分化する。胎生18日目には, 出生時と同程度の段階まで分化し, 心臓の前上方に位置するようになる<sup>1,2)</sup>。したがつて, 胸腺では, 被膜およびトラベキュラが間葉に由来し, 脂肪細胞が分化・増殖する部位となる。マウスおよび種々の哺乳動物の胸腺で, 胎生期および出生時に, 被膜およびトラベキュラに脂肪細胞が存在するとの報告はない。したがつて, 出生以降に加齢に伴つて脂肪細胞が出現すると考えられる。この脂肪細胞が, 他の部位より移動してくるのか, あるいは出生時に, 既にトラベキュラ中に存在する幹細胞あるいは脂肪芽細胞が増殖・分

化するのかは明らかでないけれども, 胸腺は脂肪組織形成のモデルと成り得る。

本報では, マウス胸腺の脂肪細胞の出現時期を検討した。中性脂質を脂肪滴として貯蔵している脂肪細胞が産生するタンパク質であるレプチン<sup>4,11)</sup> の mRNA を検出することにより, 成熟した脂肪細胞の存在を検討した。胸腺より抽出したトータル RNA を, dNTP のランダムヘキサマーをプライマーとして, cDNA に逆転写した。これを鋳型として用い, PCR 法によりレプチン cDNA を特異的に検出した。トータル RNA から作製した cDNA を鋳型とし, PCR のプライマーとして OF 1 と OB

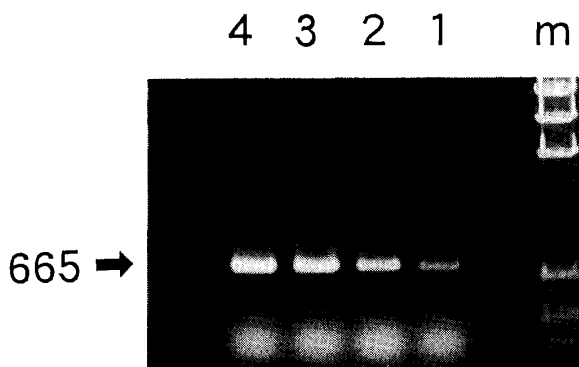


図1 褐色脂肪組織のレプチンの検出  
肩甲骨間褐色脂肪組織の cDNA (50 ng/ $\mu$ l) を鋳型として, 量を変化させて, PCR を行つた。特異的な665 b.p. のバンドが鋳型 cDNA 量依存的に増幅された。  
レーン: m; マーカー DNA, 1 ; cDNA 1  $\mu$ l, 2 ; cDNA 2  $\mu$ l, 3 ; cDNA 5  $\mu$ l, 4 ; cDNA 10  $\mu$ l。

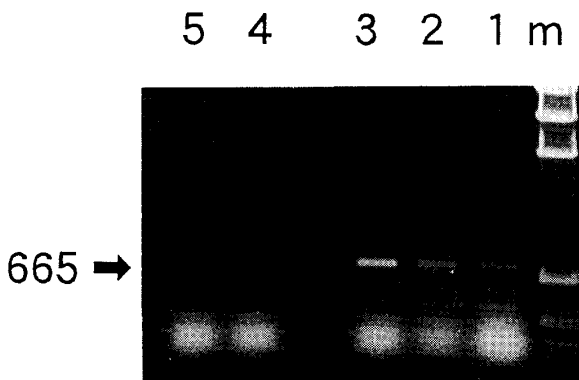
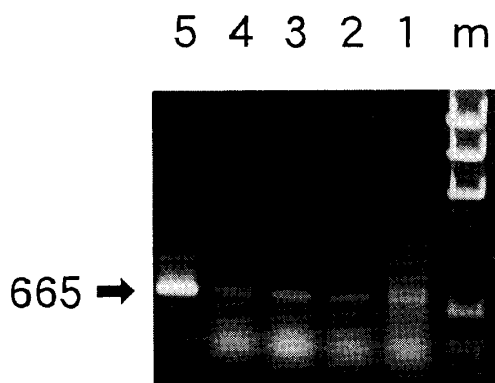
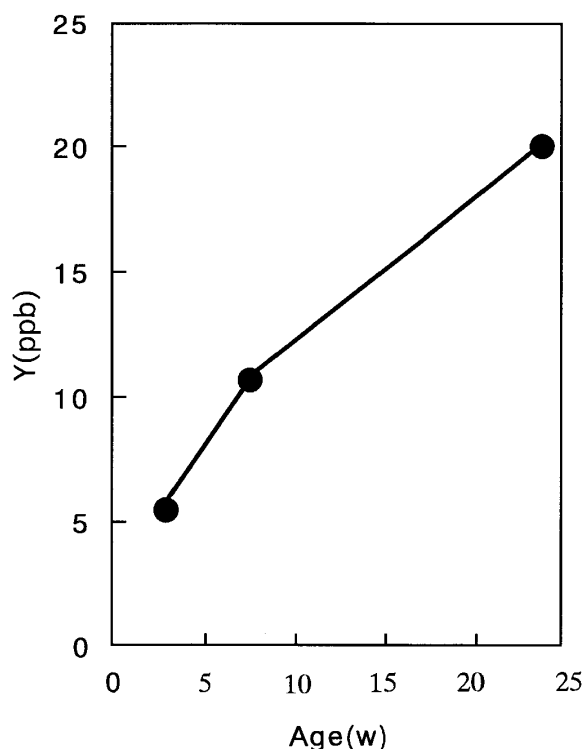


図2 脾臓, 肝臓および腎臓のレプチンの検出  
トータル RNA より作製した cDNA 500 ng を鋳型として PCR を行つた。脾臓で665 b.p. のバンドが増幅された。肝臓及び腎臓では増幅されなかつた。  
レーン: m; マーカー DNA, 1 ; 3 週齢脾臓, 2 ; 8 週齢脾臓, 3 ; 24 週齢脾臓, 4 ; 3 週齢肝臓, 5 ; 3 週齢腎臓。



**図3** 胸腺のレプチンの検出  
 胸腺のトータル RNA より作製した cDNA 500 ng を鋳型として PCR を行った。加齢に伴って665 b.p. のバンドの増幅度が大きくなった。ただし、3週齢では665 b.p. 以外の非特異的な増幅バンドも認められた。  
 レーン：m；マーカー DNA，1；3週齢胸腺，2；8週齢胸腺，3；24週齢胸腺，4；3週齢脾臓，5；3週齢褐色脂肪



**図4** 加齢による胸腺のレプチン mRNA 量の変化  
 図3より、665 b.p. のバンドの染色度をマーカー DNA と比較することにより、トータル RNA 250 ng 中に存在するレプチンの mRNA 量を求め、Y 値 (ppb) で表した。

1を用いることにより、レプチンの cDNA をマウスの脂肪組織で特異的に増幅できた<sup>12)</sup>。

同量の cDNA を鋳型として PCR を行った結果、3週齢、8週齢、6ヶ月齢の順に増幅バンドが濃く

染色された (図3)。すなわち、加齢と共にレプチンの発現量は増大していた。増幅バンドの染色度より、トータル RNA 250 ng 中に含まれるレプチン mRNA 量を求めると、加齢にほぼ比例して増大していた (図4)。しかし、わずかに、3週齢から8週齢の期間の方が増大する比率が高かった。3週齢マウスの胸腺でレプチンの mRNA が検出され、離乳直後のマウス胸腺に成熟脂肪細胞が存在することが明らかとなった。また、この時期に成熟脂肪細胞が存在することから、胸腺においては、乳仔期の段階から既に脂肪細胞の分化・増殖が開始されていることが示唆された。リンパ球の集積した領域である胸腺皮質や髄質は、繁殖可能期前後より脂肪組織で置換され、退縮し始めるとされている。しかし、レプチンを発現している脂肪細胞が3週齢で既に存在し、その後少なくとも6ヶ月齢まで増加することが明らかになった。すなわち、マウスの胸腺では、出生後から繁殖可能時期まではリンパ球および脂肪細胞ともに増殖し、その後皮質および髄質のリンパ球は減少し始めるが、脂肪細胞は増殖し続けた。このことより、胸腺における加齢に伴うリンパ球領域の退縮と、脂肪組織の増殖とは必ずしも平行する現象ではないことが示唆された。

また、二次リンパ性器官である脾臓においてもレプチンの発現が認められた。脾臓は、胃の後方、横隔膜前方に位置し腹膜に被われている。胃との間の胃脾間膜および横隔膜との間の横隔脾間膜により、その位置が固定されている。胃脾間膜は脂肪組織に富んだ結合組織であり、したがって、脾臓を摘出するとその臓側面に必ず白色の脂肪組織が付着している。この脂肪組織由来のレプチン mRNA が検出された可能性も存在するけれども、脾臓摘出後、凍結前に付着している脂肪組織を取り除いてもレプチンの mRNA が検出された。同様に、摘出時には必ず周囲の脂肪組織が付着している腎臓では、付着脂肪組織を取り除けばレプチンの増幅バンドは検出されなかった。脾臓の脂肪組織に関する報告は無く、組織学的にも明瞭な成熟した脂肪細胞により構成される脂肪組織は存在しない。したがって、検出されたレプチン mRNA がどの細胞に由来するのか、さらに詳細な検討が必要である。

## V. 要 約

加齢に伴うマウス胸腺の脂肪化時期を検討した。BALB/c 雌マウスの胸腺から抽出したトータル RNA よりランダムプライマーを用いて作製した

cDNA を鋳型として、成熟した脂肪細胞が特異的に産生するとされているレプチンの発現を PCR により検出した。3週齢マウスでレプチンの発現が認められた。さらに、8週齢、6ヶ月齢と加齢にしたがってレプチンの発現量は増大していた。遅くとも離乳直後から脂肪細胞が増殖していることが明らかとなり、脂肪組織の増大と胸腺皮質および髄質のリンパ球集積領域の退縮とは、必ずしも平行していないことが示唆された。出生時には、成熟した脂肪細胞は認められないので、出生後、胸腺の被膜あるいはトラベキュラで脂肪細胞の分化が進むことが示唆され、胸腺は脂肪組織の増殖モデルとして適している。

## 文 献

- 1) D. E. Kelly, R. L. Wood, A. C. Enders: *Bailey' Textbook of Microscopic Anatomy*, **18 th ed** (Williams and Wilkins), 453 (1984)
- 2) R. Rugh: *The Mouse, Its Reproduction and Development* (Burgess Publishing), 253 (1968)
- 3) 藤田恒夫, 藤田尚男: 標準組織学各論 (医学書院), 42 (1976)
- 4) Y. Zhang, R. Proenca, M. Maffei, M. Barone, L. Leopold, J. M. Friedman: *Nature*, **372**, 425 (1994)
- 5) M. Maffei: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 6257 (1995)
- 6) B. M. Spiegelman, J. S. Flier: *Cell*, **87**, 377 (1996)
- 7) P. Chomczynski, N. Sacchi: *Analytical Biochem.*, **162**, 156 (1987)
- 8) J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis: *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, **2nd ed**, E10 (1989)
- 9) K. Mullis, F. Falloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn, H. Erlich: *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, **101**, 263 (1986)
- 10) F. Ferre, F. Giarduno: *Nucl. Acid Res.*, **17**, 2141 (1989)
- 11) B. C. Kallen, A. M. Lazar: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 5793 (1996)
- 12) 春那美由紀, 星島直子: 京都女子大学卒業研究論文 (1998)