
研究報文

マウスリンパ組織におけるレプチンレセプターの発現

井田めぐみ, 草信 映子, 鈴木真知子, 酒井 奈美, 白井能富子,
永尾 命子, 熾川 智子, 宮田 堅司

Expression of leptin receptor detected by RTPCR method in lymphoid
tissues of the mouse

Megumi Ida, Eiko Kusanobu, Machiko Suzuki, Nami Sakai, Nobuko Shirai,
Meiko Nagao, Tomoko Noborikawa, and Kenji Miyata

The mammalian thymus involutes with age. Both the decrease of lymphocyte-accumulated region and the replacement by fat tissue begin at puberty and continue throughout life. In the mouse thymus, though no typical fat cells are found at birth, fat cells appeared at the latest 3 weeks old preceding to the atrophy of cortical and medullary regions. Physiological functions of fat cells proliferated and differentiated in the thymus after birth are unknown.

As fat cells appeared in the 3-week-old mouse thymus have shown to express leptin mRNA, we examined whether leptin receptor type b (OBRL) is expressed or not in the thymus and, in comparison, in the secondary lymphoid tissues, spleen, mesenteric lymph node and Peyer's patch. OBRL mRNA was detected in both thymus and all secondary lymphoid tissues examined by RTPCR method. Furthermore, OBRL mRNA was also detected in the isolated cells with mouse-lymphocyte separation medium from both thymus and spleen free cells washed out in saline from dissected tissues. It is suggested that fat cells differentiated as early as 3 weeks old in the thymus produce leptin and affect other thymus cells, lymphocytes probably, through OBRL. It remains to be clarified whether the leptin-OBRL interaction influences age involution in the thymus.

I. はじめに

一次リンパ性器官である胸腺の皮質および髄質に局在するリンパ球は、繁殖可能期前後から減少し始める¹⁾。リンパ球領域の萎縮は、皮質から始まり髄質に及ぶ。また、リンパ球の減少にともなって脂肪組織が増殖し、萎縮したリンパ球領域が脂肪組織で置換されると考えられている。この現象は加齢退縮とよばれている²⁾。前報において、レプチンの発現を指標として脂肪細胞の出現時期を検討し、生後3週齢マウスの胸腺に脂肪細胞が存在することを明らかにし、胸腺における脂肪細胞の分化は生後直後か

ら始まり、リンパ球領域の退縮に先行することを示した³⁾。本報では、胸腺脂肪細胞の機能を調べる目的で、胸腺においてレプチンのレセプターが発現しているかどうかを検討した。また、比較する目的で、二次リンパ性器官や組織に関してもレプチンレセプターの発現を検討した。

II. 方 法

1. 材 料

1) リンパ組織

BALB/c マウス (雌, 3週齢) を用いた。安楽死させたマウスを開腹、開胸し、胸腺、脾臓、腸間膜リンパ節を摘出した。さらに、空腸および回腸のバイエル板を、消化管壁外側より摘出した。この際

に、切除面が消化管内腔に達しない様にした。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°C で保存した。ただし、腸間膜リンパ節およびパイエル板は、摘出した数個をまとめて、それぞれ一本のサンプルチューブで凍結した。

2) リンパ球の分離

無菌的に摘出した胸腺および脾臓を生理食塩水中で細切し、ピンセットで軽く圧迫することにより遊離してくる細胞を遠心操作 (約 800 g) により集めた。細胞ペレットを、1 ml の生理食塩水に再懸濁し、2 ml のマウスリンパ球分離溶液 Lympholyte-M (Cedarlane Labo. Ltd., Canada) に重層した。室温、1,300 g で20分間遠心し、上層と下層の界面の細胞をパスツールピペットで分取した。直ちに、GIT 培養液 (日本製薬) 10 ml を加えることによりリンパ球分離溶液を希釈した後、遠心操作により細胞を回収した。細胞ペレットの一部は、液体窒素中で凍結した後、 -80°C で保存した。残りの細胞ペレットを、GIT 培養液に再懸濁し、一部をスライドグラス上で伸展し、空気乾燥後 May-Grunwald-Giemsa で染色後検鏡した。残りの細胞は、 37°C 、5% CO_2 条件下で18時間培養した後、培養液を回収、遠心することにより浮遊細胞を回収した。細胞ペレットを少量の生理食塩水に懸濁後、Lympholyte-M に重層、同様にして界面の細胞を回収後凍結保存した。

2. RNA の抽出

凍結したリンパ組織あるいは細胞より、酸性グアニジウムチオシアン酸—フェノール—クロロホルム法によってトータル RNA を抽出した^{3,4)}。エタノール沈殿法により精製したトータル RNA は、濃度 200 ng/ μl に調整した。脾臓を細切し Lympholyte-M により分離した細胞から抽出したトータル RNA 2 μg より、オリゴ dT ラテックス粒子 (Oligotex-dT30 <Super>, 日本合成ゴム, 日本ロッシュ) を用いて、推奨されている操作手順によって mRNA を分離精製した。

3. RTPCR

トータル RNA を鋳型として RTPCR を行った。逆転写反応は M-MLV リバーストランスクリプターゼ (RT-PCR high, 東洋紡 No. PCR-201), 6 塩基あるいは 9 塩基のランダムプライマーを用い、 30°C で10分、さらに 42°C で1時間行った。 99°C で5分処理することにより反応を停止させた。この反応産物に、レプチンレセプターを増幅するための

プライマーおよびリコンビナントタック DNA ポリメラーゼを加え PCR を行った。マウスのレプチンのレセプターを検出するために、下記のプライマー OBR-F3 および OBR-B2 を準備した。

プライマー OBR-F3

5' p-ACACTGTTAATTTTCACACCAGAG

プライマー OBR-B2

5' p-TGGATAAACCCCTTGCTCTTCA

これらのプライマーを用いることにより、マウスのレプチンレセプターの中で、ロングタイプレセプター cDNA の膜貫通領域から細胞質側領域の446塩基対の DNA が増幅される^{5,6)}。PCR の条件は、反応溶液容量 50 μl 、鋳型変性温度 96°C および変性時間30秒、プライマーアニーリング温度 55°C およびアニーリング時間1分、相補鎖合成反応温度 72°C および反応時間2分、35サイクルに設定した。

PCR 終了後、反応溶液 10 μl 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 (λ /HindIII) 0.5 μg を同時に電気泳動し、PCR で増幅されたバンドの大きさを確認した。

胸腺および脾臓から分離した細胞のトータル RNA を鋳型とする RTPCR により、スミアな電気泳動像が得られた場合には、RTPCR 産物の 5 μl を鋳型として再 PCR を行った。

4. ジェノミック DNA の抽出

凍結した胸腺、脾臓および肝臓の組織片より、プロテナーゼ K 処理、フェノール抽出法によりジェノミック DNA を抽出した⁷⁾。胸腺より得た DNA の一部は、18 G の注射針を用いて十分に剪断した。

III. 結 果

1. 胸腺におけるレプチンレセプターの検出

マウスのレプチンレセプター遺伝子の cDNA 配列にしたがって設計したプライマー OBR-F3 と OBR-B2 を用いて、RTPCR を行った。鋳型としてトータル RNA 1 μg を、逆転写酵素として M-MLV リバーストランスクリプターゼを用いることにより、6 塩基あるいは 9 塩基のいずれのランダムプライマーを用いた場合においても、ロングタイプレセプター (OBRL) の発現を示す446塩基対の DNA が増幅された (図1)。逆転写反応を行う際に6 塩基のランダムプライマーを用いた場合の方が、9 塩基のランダムプライマーを用いた場合よりも増幅バンドは濃く染色された。

2. 2次リンパ性器官・組織におけるレプチンレセプターの検出

脾臓、腸間膜リンパ節およびパイエル板から抽出したトータル RNA 1 μg を鋳型として、RTPCR を行った (図1)。脾臓では6塩基および9塩基のランダムプライマーを用い、リンパ節およびパイエル板では9塩基のランダムプライマーを用いた。いずれの場合にも446塩基対の DNA が増幅され、これらのリンパ性器官・組織においても OBRL が発現していた。脾臓の場合、逆転写反応を行う際に6塩基のランダムプライマーを用いた場合の方が、9塩基のランダムプライマーを用いた場合よりも増幅バンドは濃く染色された。

3. 分離細胞のレプチンレセプターの検出

摘出した胸腺および脾臓を、生理食塩水中で細切し、軽く圧迫することにより遊離した細胞から、マウスリンパ球遠心分離用の Lympholyte-M により分離した細胞の一部を染色し検鏡すると、50~70% がリンパ球の形態を示した。その他に、胸腺では約10%が、脾臓では20~30%が赤血球であった。分離した細胞から抽出したトータル RNA を鋳型として OBRL の検出を試みた。胸腺および脾臓の分離細胞ともに、RTPCR 産物を電気泳動するとスミアな像が得られ、明瞭な増幅バンドは認められなかったけれども、これらの RTPCR 産物を鋳型として再

PCR を行くと、明瞭な446塩基対の増幅バンドが認められた (図2)。また、脾臓の分離細胞から得たトータル RNA 2 μg より、オリゴ dT ラテックス法により精製した約 150 ng の mRNA を鋳型とした RTPCR により、446塩基対の増幅バンドが認められた (図2)。

胸腺の分離細胞を18時間培養することにより、培養ディッシュへ付着する細胞を取り除いた。浮遊細胞を Lympholyte-M で処理し、得られたリンパ球画分の細胞より抽出したトータル RNA を鋳型として RTPCR を行くと、産物はスミアな像を示し、明瞭な増幅バンドは認められなかったけれども、RTPCR 産物を鋳型として再 PCR を行くと、明瞭な増幅バンドが認められた (図3)。

次に、これらの446塩基対の増幅バンドが、混在する DNA によるものではないことを確かめた。胸腺、脾臓および肝臓から抽出した DNA および、18 G の注射針により剪断した胸腺 DNA を鋳型として PCR を行ったけれども、明瞭な増幅バンドは認められなかった (図4)。

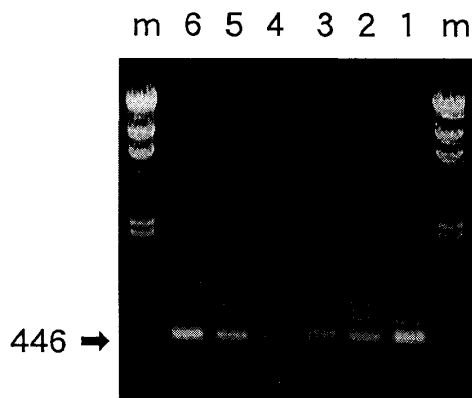


図1 リンパ組織の OBRL の検出
各リンパ組織から抽出したトータル RNA 1 μg を鋳型として RTPCR を行った。逆転写反応のプライマーとしては、ランダムプライマー (6 mer あるいは 9 mer) を用いた。いずれの組織においても OBRL に特異的な 446 b.p. のバンドが増幅された。
レーン：m；マーカー DNA，1；脾臓 (6 mer)，2；脾臓 (9 mer)，3；胸腺 (6 mer)，4；胸腺 (9 mer)，5；腸間膜リンパ節 (9 mer)，6；パイエル板 (9 mer)。

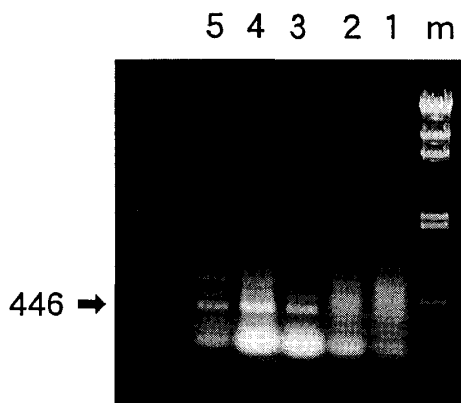


図2 胸腺および脾臓の遊離細胞の OBRL の検出
細切した組織から洗い出した遊離細胞をリンパ球分離溶液で処理し、得られた分離細胞のトータル RNA 1 μg を鋳型として RTPCR を行くとスミアな泳動像となった。しかし、RTPCR 産物 5 μl を鋳型として再 PCR を行くと、OBRL に特異的な 446 b.p. のバンドが増幅された。脾臓の分離細胞から抽出したトータル RNA より精製した mRNA を鋳型とした RTPCR では OBRL に特異的な 446 b.p. のバンドが増幅された。
レーン：m；マーカー DNA，1；胸腺分離細胞-RTPCR，2；脾臓分離細胞-RTPCR，3；胸腺分離細胞-再 PCR，4；脾臓分離細胞-再 PCR，5；脾臓分離細胞-mRNA-RTPCR。

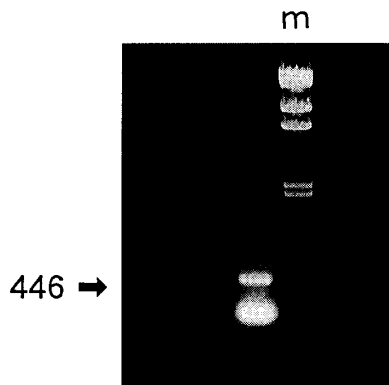


図3 胸腺非付着細胞の OBRL の検出
 胸腺の遊離細胞を18時間培養し付着細胞を取り除いた。非付着細胞をリンパ球分離溶液で処理し、得られた細胞のトータル RNA を抽出した。RT-PCR 産物を鋳型として再 PCR を行うと、OBRL に特異的な 446 b.p. のバンドが増幅された。
 レーン：m；マーカー DNA，

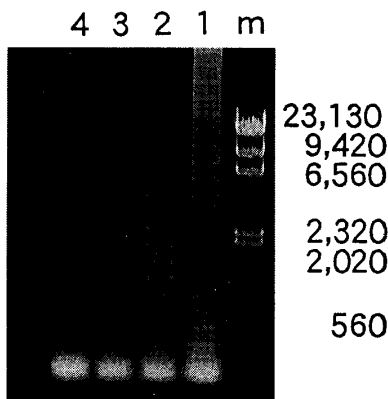


図4 ゲノム DNA を鋳型とした PCR
 肝臓、脾臓、胸腺から抽出したゲノム DNA、および胸腺の DNA を剪断した DNA を鋳型、OBR-F3 および OBR-B2 をプライマーとして PCR を行った。増幅バンドは認められなかった。右側の数値はマーカー DNA 断片の塩基数を表す。
 レーン：m；マーカー DNA，1；肝臓 DNA，2；脾臓 DNA，3；胸腺 DNA，4；胸腺剪断 DNA。

IV. 考 察

胸腺は、結合組織性の被膜に覆われ、被膜から実質内へ侵入するトラベキュラによって多数の小葉に分けられている。小葉は、胸腺上皮細胞がネットワーク構造をとり、その間に多数のリンパ球が存在し、比較的未成熟なリンパ球の局在する皮質と、より成熟したリンパ球の局在する髄質とからなる。皮質お

よび髄質のリンパ球領域は、繁殖可能期前後まで増大し、その後、加齢とともにリンパ球数が減少することにより退縮する。また、被膜やトラベキュラで脂肪細胞が増殖し、リンパ球の退縮した領域が脂肪組織で置換された様相を呈する^{1,2)}。

本報では、胸腺で増殖する脂肪細胞の産生するレプチンが、他の胸腺構成細胞へ作用している可能性を検討した。標的細胞に対するレプチンの作用はレセプター (OBR) を介することが明らかにされているので^{5,8)}、胸腺のレプチンレセプターの検出を試みた。また、比較するために、二次リンパ性器官・組織である脾臓、リンパ節およびパイエル板に関してもレセプターの検出を試みた。マウスのレプチンレセプター遺伝子は、脈絡叢の発現ライブラリーより、レプチンとの結合性によりクローニングされた⁵⁾。その後、この遺伝子の転写産物のスプライシングの違いにより少なくとも5種類のレセプター、OBRa~OBRe が存在することが示された^{6,8,9)}。OBRa~OBRd の細胞外領域および膜貫通領域は同一であり、細胞内領域のみアミノ酸配列が異なる。OBRe は細胞外領域のみからなる可溶性レセプターである。5種類のレセプターの中で、OBRb は302アミノ酸残基からなる最も長い細胞内領域を持ち、OBR Long type (OBRL) と呼ばれている。OBRL の細胞質領域には、Jak-Stat シグナル伝達に関与すると考えられるモチーフが2カ所保存されている^{10,11)}。OBRa~OBRd に共通な膜貫通領域と細胞質領域の境界域に対応するプライマー OBR-F3 と、OBRL の細胞質領域にのみ存在するアミノ酸配列に対応するプライマー OBR-B2 とにより、OBRL を特異的に検出した。

胸腺の脂肪細胞の由来は明らかでないけれども、3週齢マウスの胸腺には、すでに脂肪細胞が存在しレプチンが発現している³⁾。今回、プライマー OBR-F3 と OBR-B2 とを用いた RT-PCR により、OBRL が検出された。したがって、胸腺の加齢退縮に先行して分化・増殖を開始する脂肪細胞が、レプチンを介して胸腺を構成する細胞に作用している可能性が示唆された。また、脾臓、リンパ節およびパイエル板においても OBRL の発現が認められ、リンパ組織に共通する細胞が OBRL を発現していることが示唆された。

次に、各リンパ器官・組織を構成する種々の細胞の中で、どの種類の細胞が OBRL を発現しているのかを検討した。胸腺と脾臓を細切し遊離させた細胞から、リンパ球分離用密度勾配液を用いて分離さ

れてくる細胞は50%以上がリンパ球の形態を示した。これらの細胞集団は OBRL を発現していた。また、18時間培養し、培養ディッシュへ付着する細胞を除いた浮遊細胞から、リンパ球分離用密度勾配液を用いて分離されてくる細胞も OBRL を発現していた。少数の細胞から RNA を抽出する場合、十分にホモジナイズすることができず、DNA が混入してくる可能性が存在する。しかし、用いたプライマーは、ゲノム DNA の約 15 k 塩基対のイントロン領域を挟んでいること^{6,10)}、および、図 4 に示した様に、ゲノム DNA を鋳型とすると明瞭な増幅バンドは認められないことから、リンパ球様分離細胞で検出された増幅バンドは、混在する DNA によるのではなく、RNA に由来すると結論した。分離細胞では、RTPCR の結果はスミアな電気泳動像となったけれども、同じプライマーを用いて再 PCR を行うと、OBRL の特異的なバンドが検出された。

RTPCR 法により、ヒトの末梢リンパ球より分取した CD4⁺ T リンパ球で OBRb の発現が報告されている¹²⁾。また、抗レセプター抗体により、ヒト血管の内皮細胞に OBR が存在することが示されている¹³⁾。したがって、胸腺および脾臓から細胞を得る際に、酵素によって分散させることは避け、血管由来の細胞が混入する可能性を抑えた。また、18時間培養することにより、混入した付着性の細胞を取り除いたサンプルにおいても OBRL が検出された。これらのことから、検出された OBRL は非付着性の細胞に由来するものと考えられる。

V. 要 約

3週齢マウスの胸腺、脾臓、腸間膜リンパ節、およびパイエル板で、RTPCR 法により、OBRL が発現していることを明らかにした。また、これらのリンパ性器官を構成するどの種類の細胞が、OBRL を発現しているのかを検討した。胸腺および脾臓を細切して遊離してくる細胞より、リンパ球分離溶液により分取した非付着性の細胞で OBRL の発現を確認した。

胸腺ではリンパ球の加齢退縮に先行して脂肪細胞が分化・増殖し、すでに3週齢マウス胸腺に脂肪細胞が存在しレプチンが産生されている。したがって、レプチンが OBRL を介して胸腺の構成細胞に作用していることが示唆された。

文 献

- 1) R. Rugh: *The Mouse, Its Reproduction and Development* (Burgess Publishing), 253 (1968)
- 2) I. Roitt, J. Brostoff and D. Male: *Immunology*, 5th ed (Mosby), 32 (1998)
- 3) 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: 本誌, **53**, 13 (1998)
- 4) P. Chomczynski and N. Sacchi: *Analytical Biochem.*, **162**, 156 (1987)
- 5) L. A. Tartaglia, M. Dembski, X. Weng, N. Deng, J. Culpepper, R. Devos, G. J. Richards, L. A. Campfield, F. T. Clark, J. Deeds, C. Muir, S. Sanker, A. Moriarty, K. J. Moore, J. S. Smutko, G. G. Mays, E. A. Wolf, C. A. Monroe and R. I. Tepper: *Cell*, **83**, 1263 (1995)
- 6) H. Chen, O. Charlat, L. A. Tartaglia, E. A. Wolf, X. Weng, S. J. Ellis, N. D. Lakey, J. Culpepper, K. J. Moore, R. E. Breitbart, G. M. Duyk, R. I. Tepper and J. P. Morgenstern: *Cell*, **84**, 491 (1996)
- 7) J. Sambrook, E. F. Fritsch and T. Maniatis: *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, 2nd ed, 9.16 (1989)
- 8) J. M. Friedman and J. L. Halaas: *Nature*, **395**, 763 (1998)
- 9) G-H. Lee, R. Proenca, J. M. Montez, K. M. Carroll, J. G. Darvishzadeh, J. I. Lee and J. M. Friedman: *Nature*, **379**, 632 (1996)
- 10) N. Ghilardi, S. Ziegler, A. Wiestner, R. Stoffel, M. H. Heim and R. C. Skoda: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 6231 (1996)
- 11) C. Björbek, S. Uotani, B. da Silva and Jeffrey S. Flier: *J. Biol. Chem.*, **272**, 32686 (1997)
- 12) G. M. Lord, G. Matarese, J. K. Howard, R. J. Baker, S. R. Bloom and R. I. Lechler: *Nature*, **394**, 897 (1998)
- 13) M. R. Sierra-Honigmann, A. K. Nath, C. Murakami, G. Garcia-Cardena, A. Papapetropoulos, W. C. Sessa, L. A. Madge, J. S. Schechner, M. B. Schwabb, P. J. Polverini and J. R. Flores-Riveros: *Science*, **281**, 1683 (1998)