

---

## 研究報文

---

# マウス胸腺における脂肪化および脂肪細胞分化

松永美沙子, 江口晶紀子, 田邊 美和, 山下 真代, 宮田 堅司

## Study of adipogenesis in the thymus of the mouse

Misako Matsunaga, Akiko Eguchi, Miwa Tanabe, Masayo Yamashita and Kenji Miyata

The mouse thymus locates on a position close to the pericardial cavity and consists of two lobes. The lobes surrounded by a capsule are subdivided into many lobules by connective tissue trabeculae. Each lobule consists of lymphocytes-accumulated regions, cortex and medulla. In the previous study, since only lymphocytes in many kinds of thymus-constructing cell expressed the long type leptin receptor (OBR<sub>L</sub>), it was suggested that thymocytes were regulated with leptin produced by adipocytes differentiated and proliferated through thymic age involution. Then it is naturally interested in studying when lipogenesis and adipogenesis begin in the thymus either in embryogenesis or in postnatal growth.

We extracted and measured the quantity of total lipid of the thymus and found that that began to increase at the period of 5 to 8 week-old after birth. The quantity of DNA of the thymus was little changed for this period. Then we directly observed histologically HE-stained sections under light microscope. The small number of adipocytes was observed at surrounding connective tissue, but never found in trabeculae of thymus of neonatal. In 5 week-old thymus adipocytes were first observed in small groups in the trabeculae.

Secondly, we detected FGF10, PPAR $\gamma$  and leptin mRNA expressions by the RTPCR method as the indication of adipogenesis in the thymus from embryo just before birth to 6 month-old. Both FGF10 and PPAR $\gamma$ mRNA were detected in all specimens. The expression of PPAR $\gamma$  is slightly less than that of FGF10 in the embryonic thymus, but with increasing age it increased and apparently more than that of FGF10 in the 6 moth-old thymus.

These results suggest that adipogenesis in the thymus begins just before birth at the latest and that lipogenesis in the thymus does at 5 week-old after birth.

### I. はじめに

マウスの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。小葉内では胸腺上皮細胞がネットワーク構造をとり、その間に多くのリンパ球が存在する。このリンパ球領域は、春機発動期前後まで増大し、その後加齢に伴ってリンパ球数が減少することにより退縮する<sup>1)</sup>。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

肪細胞で置換された様相を呈する。胸腺を構成する種々の細胞のうち、リンパ球のみがレプチンレセプター b (OBR-b) を発現しており、レプチンを介して脂肪細胞がリンパ球の機能を調節していることが示唆されている<sup>2,3)</sup>。本報では、胸腺での脂肪細胞の分化時期を明らかにする目的で、週齢の異なるマウスの胸腺組織標本の観察、胸腺の総脂質量の測定、および脂肪細胞分化のマーカー遺伝子として FGF10 (Fibroblast Growth Factor 10), PPAR $\gamma$  (Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ ) およびレプチンの発現を検討した。また、脂肪細胞に分化する細胞系列を形態的に明らかにする目的で、胃脾間膜脂肪組織

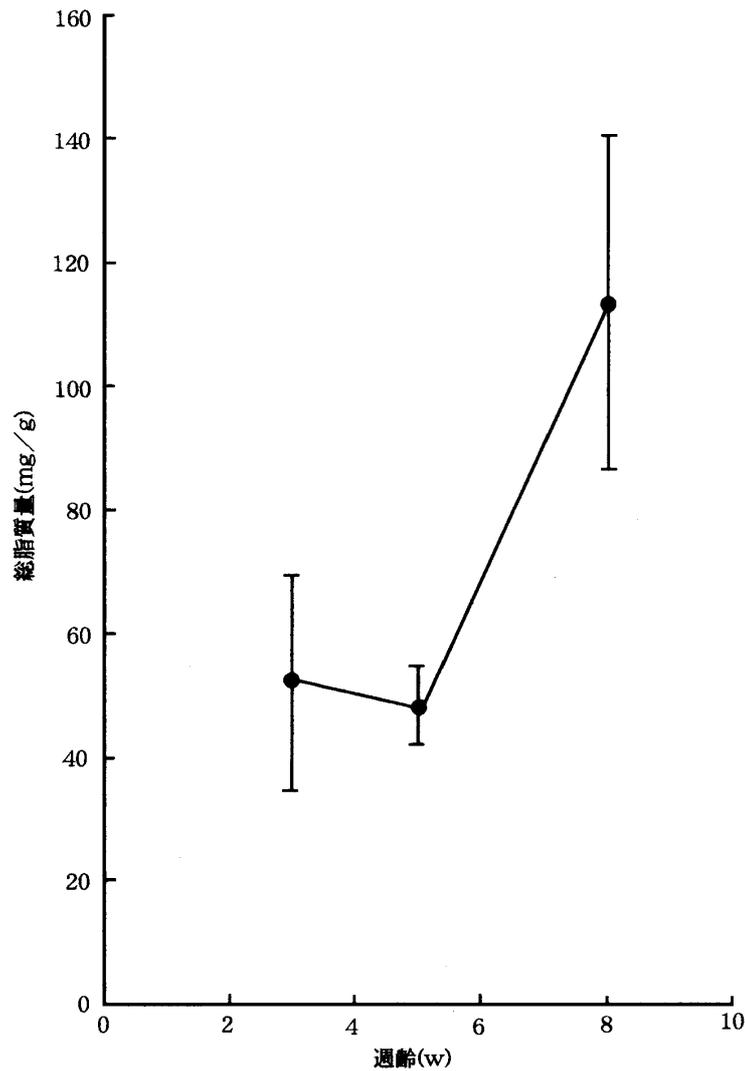


図 1 加齢による胸腺総脂質量の変化

液体窒素で凍結した胸腺をクロロホルム-メタノール-水混液中でホモジナイズし、クロロホルム層を回収、窒素気流中で溶媒留去後秤量した。各週齢毎に 2～4 個の試料を測定した。胸腺湿重量 1g あたりの総脂質量平均値±標準偏差を示した。

の細胞を一次培養し、出現した細胞コロニーの細胞形態と FGF10, PPAR $\gamma$  およびレプチン mRNA の発現との関係を検討した。

## II. 方 法

### 1. 材料

頸椎脱臼させたマウス (BALB/c, ♀) を開腹開胸し胸腺を摘出、直ちにサンプルチューブにいれ液体窒素中で凍結した後、-80°C で保存した。試料の一部を中性ホルマリンで固定した。また、無菌的に摘出した胃脾間膜脂肪組織より細胞を分離し一次培養した。

### 2. 脂質の抽出

凍結保存した胸腺を秤量後、Bligh and Dyer<sup>4)</sup> の方法にしたがって総脂質を抽出した。すなわち、凍

結した胸腺をクロロホルム-メタノール-水 (容量比 1:2:0.8) 混液 2ml 中でホモジナイズし、抽出液をスピッツ管に移した。この操作をさらに 2 回繰り返した。3 回分の抽出液を合わせ、クロロホルム-メタノール-水の最終容量比が 2:2:1.8 となるようにクロロホルム-水混液を加えた。遠心操作後クロロホルム層を回収し、窒素気流中で溶媒を留去、減圧乾燥後秤量し総脂質量を求めた。

### 3. DNAの抽出

凍結保存した胸腺を秤量後細切し、proteinase K による消化、RNase 処理、フェノール抽出法により DNA を抽出した<sup>5)</sup>。エタノール沈殿法により精製した後、260nm における吸収より DNA 量を求めた。

### 4. 組織切片の作製

中性ホルマリンで固定した胸腺をアルコールシ

リーズで脱水, アセトン-エタノール-クロロホルム混液処理した後にパラフィン包埋した。滑走式マイクロトームで 4 $\mu$ m 厚の切片を作製, 脱パラフィン, ヘマトキシリン・エオジン染色, 脱水, 封入後顕微鏡観察した。胸腺周囲の結合組織, 被膜およびトラベキュラを観察対象とした。

### 5. RNAの抽出

凍結した胸腺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>6)</sup>によってトータル RNA を抽出し, エタノール沈殿法により精製した。

また, 無菌的に摘出した胃脾間膜脂肪を 5ml 生理食塩水中で細切り, 2.5% トリブシン液 (大日本製薬) 0.5ml を加え, 37°C, 5 分間インキュベートした。GIT 培養液 (日本製薬) 5ml を加え, ピペッティング操作により遊離してきた細胞を遠心操作により回収した。GIT 培養液で洗浄後, 10% FBS 含有 GIT 培養液に懸濁し培養ディッシュ (Tissue Culture Dish 35mm あるいは 100mm, IWAKI) に播種した。48 時間毎に培養液を交換し, コロニーが認められるまで培養を継続した。生理食塩水で培養ディッシュを十分洗浄した後, 顕微鏡下に目的のコロニーにガラス

製クローニングリング (IWAKI) をかぶせた。クローニングリング内に 100 ~ 200 $\mu$ l の抽出液を加えることにより細胞を溶解させ, 直ちに溶解液を回収しトータル RNA を抽出, 精製した。

### 6. 脂肪細胞分化マーカーのRT-PCR

脂肪細胞分化のマーカーとして FGF10<sup>7)</sup>, PPAR $\gamma$ <sup>8)</sup> およびレプチン<sup>9)</sup> を検出した。胸腺および培養細胞コロニーから抽出したトータル RNA を鋳型として RT-PCR を行った。逆転写反応は M-MLV リバーシトランスクリプターゼ (RT-PCR high, 東洋紡), 6 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 分処理後反応産物にプライマーおよび rTaqDNA ポリメラーゼを加え PCR を行った。FGF10 を増幅するために<sup>7)</sup>,  
プライマー F10-F1 5' CTTCCAGTATGTTCTTCT-GATGAGAC

プライマー F10-B2 5' CAGTTAAAAGATGCATAG-GTGTTG

PPAR $\gamma$  を増幅するために (10),  
プライマー P-F1 5' TGAAAAGACCCAGCTCTA-CAAC

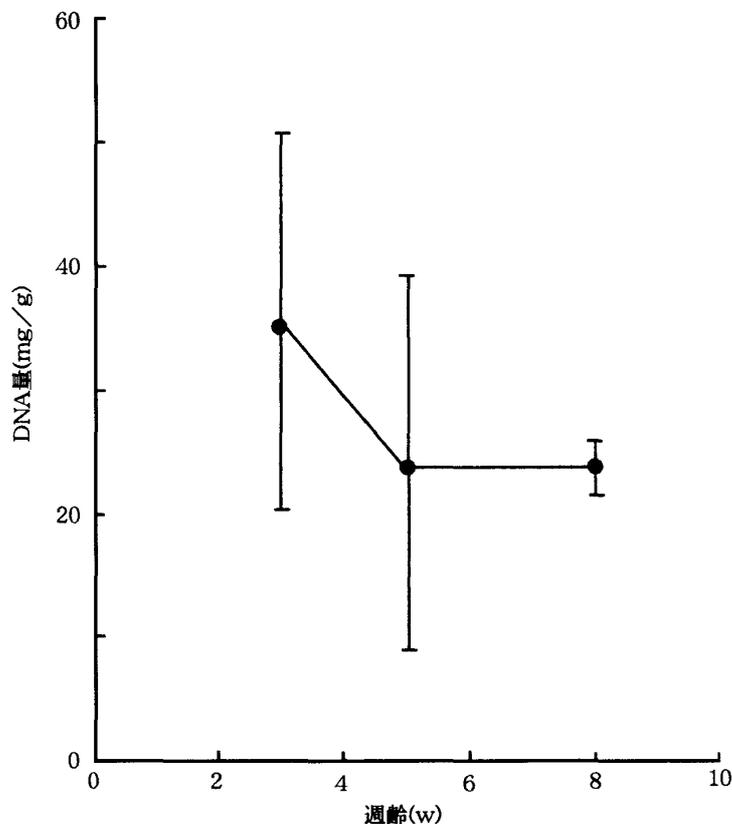


図 2 加齢による胸腺 DNA 量の変化

液体窒素で凍結した胸腺を proteinase K 消化, RNase 消化, フェノール処理により DNA を抽出し, 260nm の吸収より DNA 量を測定した。各週齢毎に 2 ~ 3 個の試料を測定した。胸腺湿重量 1g あたりの DNA 量平均値 ± 標準偏差を示した。

プライマー P-B1 5' CCACCTCTTTGCTCTGCTC-CTG

レプチンを増幅するために (9),  
 プライマー OF1 5' p-GAAGAGGGATCCCTGCTCCA  
 プライマー OB1 5' p-GATGGATGTGTGCACATGGC  
 を準備した。プライマー OF1 と OB1 との組み合わせによりレプチンの 665 塩基対の DNA フラグメントが増幅され、プライマー F10-F1 と F10-B2 との組み合わせにより FGF10 の 565 塩基対の DNA フラグメントが増幅され、プライマー P-F1 と P-B1 との組み合わせにより PPAR $\gamma$  の 565 塩基対の DNA フラグメントが増幅される。

PCR の条件は、反応溶液容量 50 $\mu$ l、鋳型変性温度 96 $^{\circ}$ C および変性時間 30 秒、プライマーアニーリング温度 55 $^{\circ}$ C およびアニーリング時間 1 分、相補鎖合成反応温度 72 $^{\circ}$ 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 $\mu$ 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。サイズマーカー DNA ( $\lambda$ /HindIII) 0.5 $\mu$ g を同時に電気泳動し、PCR で増幅された DNA フラグメントの大きさを確認した。

### III. 結 果

#### 1. 加齢による胸腺総脂質量の変化

3, 5 および 8 週齢の胸腺 (湿重量 50 ~ 90mg) から総脂質を抽出定量した結果を図 1 に示した。3 週齢および 5 週齢では、胸腺湿重量 1g あたり総脂質量は 30 ~ 70mg となり、両週齢間で差異は認められなかった。8 週齢では胸腺湿重量 1g あたり総脂質量は 90 ~ 140mg となり、5 週齢 ~ 8 週齢の間で増加した。

一方、加齢退縮により胸腺構成細胞数が変動することが予測されるので、細胞数の目安として胸腺から DNA を抽出定量した結果を図 2 に示した。胸腺湿重量 1g あたり DNA 量 n には 3 ~ 8 週齢の間では明瞭な変化は認められなかった。図 1 および 2 の各週齢での平均値を用いて、単位 DNA 重量あたりの総脂質量を求めた結果を図 3 に示した。胸腺の DNA 量すなわち細胞数あたりの総脂質量は 5 週齢から 8 週齢の間で著しく増加していることが明らかとなった。

#### 2. 組織標本による胸腺内脂肪細胞の観察

胸腺の加齢にともなう総脂質量の増加の原因を明らかにするために、出生直後、3, 4, 5, 6 および 8 週齢の HE 染色組織標本を作製し光学顕微鏡で観察した。出生直後の胸腺では、胸腺周囲の未分化間葉

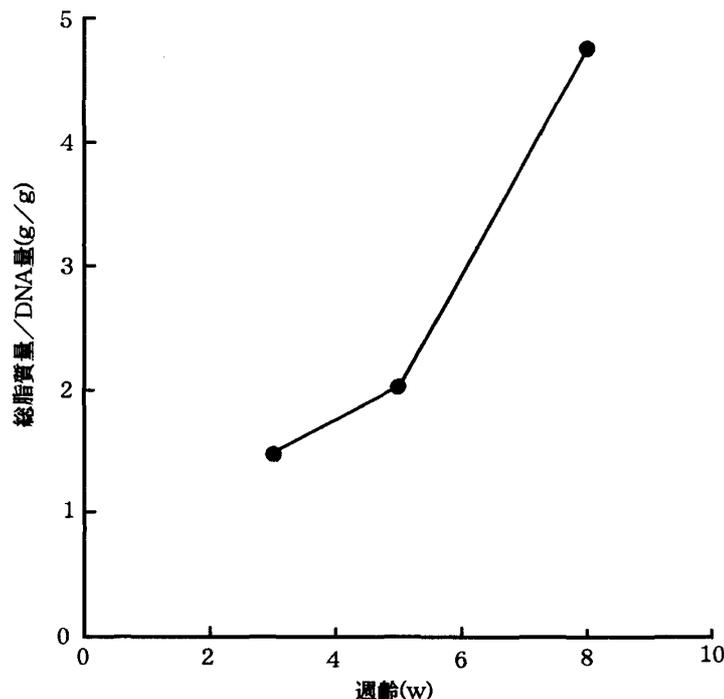
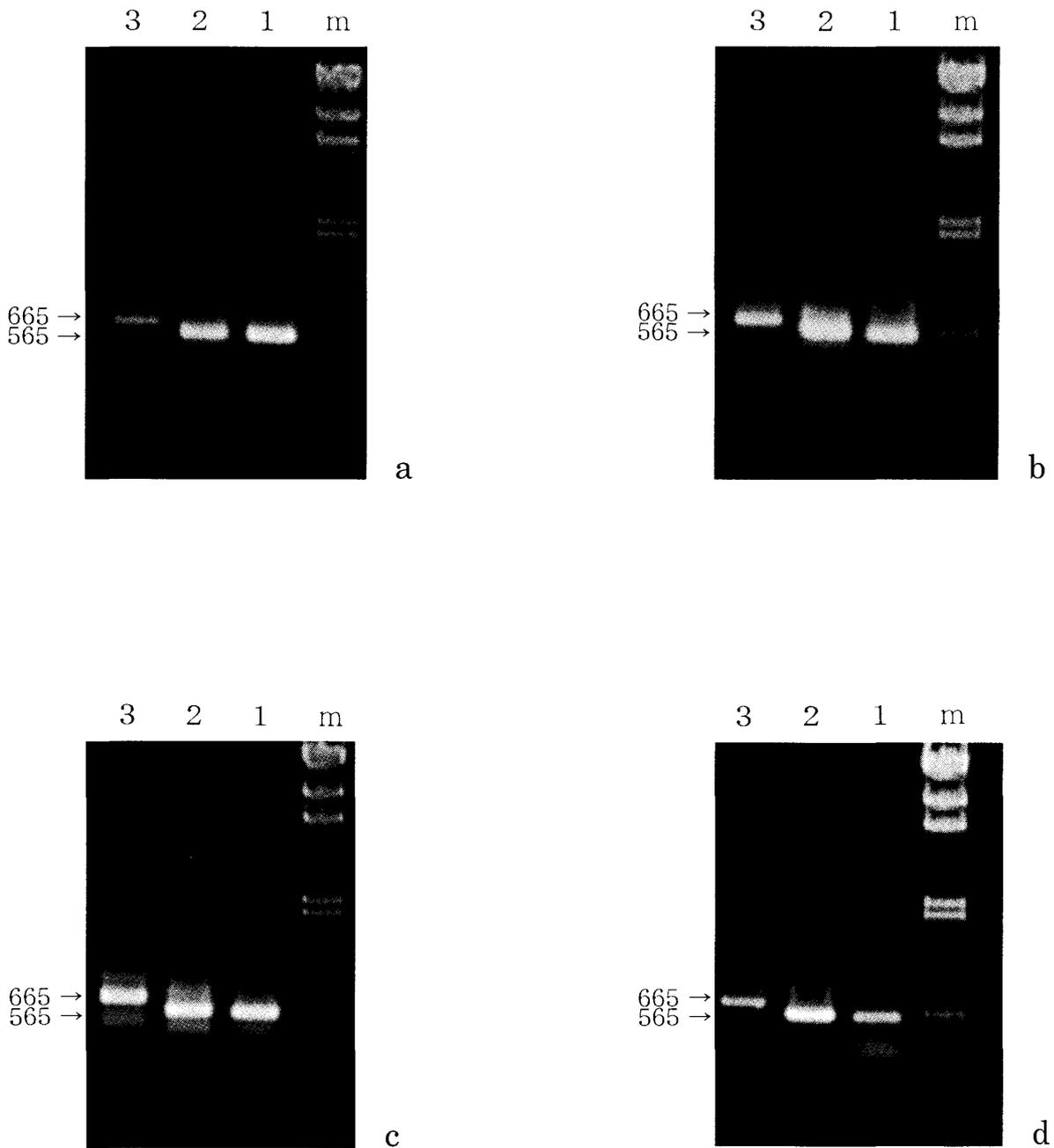


図 3 加齢による総脂質量/DNA 量比の変化  
 図 1 および 2 の各平均値より総脂質量/DNA 量比を求めた。



**図 4** 脂肪細胞分化マーカー FGF10, PPAR $\gamma$  およびレプチン mRNA の発現  
 胸腺から抽出したトータル RNA 1 $\mu$ g を鋳型として RTPCR を行った。FGF10 および PPAR $\gamma$  では 565b.p のバンドが、レプチンでは 665b.p のバンドが検出された。a. 20 日齢胎仔, b. 3 週齢, c. 5 週齢, d. 6ヶ月齢。FGF10 と PPAR $\gamma$  を比較すると 20 日齢胎仔では僅かに FGF10 の方のバンドが濃く染色された。3 週齢および 5 週齢では差は認められない。6 ヶ月齢では明らかに PPAR $\gamma$  の方のバンドが濃く染色された。レーン : m ; マーカー DNA, 1 ; FGF10, 2 ; PPAR $\gamma$ , 3 ; レプチン

組織様の疎性結合組織に少数の単胞性の脂肪細胞の存在が認められたけれども、被膜や胸腺内のトラベキュラには脂肪細胞は観察されなかった。3 週齢および 4 週齢の胸腺では、周囲の結合組織には単胞性の脂肪細胞が多数認められたけれども、胸腺内のトラベキュラには明瞭な脂肪細胞は観察されなかつ

た。5 週齢の胸腺で初めてトラベキュラに数個の細胞集団をなした脂肪細胞が観察された。

総脂質量が増加し始める時期と、トラベキュラに脂肪細胞が観察されるようになる時期とが一致したことから、加齢にともなう胸腺の総脂質量の増加は胸腺内での脂肪細胞の分化増殖に起因することが示

唆された。

### 3. 脂肪細胞分化マーカー mRNA の発現

胸腺から抽出したトータル RNA をもちいて脂肪細胞分化のマーカーとなる mRNA の発現を調べた。マーカーとして FGF10, PPAR $\gamma$  およびレプチンを対象とした。出生直前の胎仔期 (20 日胚) ~ 6ヶ月齢の胸腺で, RTPCR 法により FGF10 および PPAR $\gamma$  の mRNA の発現が認められた (図 4)。PCR によって増幅される FGF10 と PPAR $\gamma$  の DNA フラグメントはともに 565塩基対となるようにプライマーを設定した。FGF10 と PPAR $\gamma$  の増幅フラグメントの染色度より発現量を比較すると, 胎仔期には FGF10 の方が僅かに多く発現していた (図 4a)。3 週齢および 5 週齢ではほぼ同じ, あるいは僅かに PPAR $\gamma$  の方が多く発現していた (図 4b, 4c)。6ヶ月齢では PPAR $\gamma$  の方が多く発現していた (図 4d)。レプチンの増幅フラグメントは 665 塩基対であり FGF10 や PPAR $\gamma$  の増幅フラグメントと簡単に比較することはできないけれども, 胎仔期では発現量が少なかった。

また, 脂肪細胞分化の対照として, 3 週齢マウスの胃脾間膜から分離した細胞を一次培養した。胃脾間膜脂肪組織の一次培養により, 線維芽細胞, 脂肪滴を含有しない上皮細胞類似の敷石状に配列した細胞, および小さな脂肪滴を多数含有した多胞性の脂肪細胞のコロニーが得られた。多胞性の脂肪細胞のコロニーから抽出した RNA を用いた RTPCR で FGF10 および PPAR $\gamma$  mRNA とともに発現が認められた

(図 5)。レプチンの発現も僅かに認められた。脂肪滴を含有しない敷石状の細胞コロニーでも FGF10 および PPAR $\gamma$  mRNA の発現が認められた (図 5)。

### IV. 考 察

一次リンパ性器官である胸腺の皮質及び髄質に局在するリンパ球数は, 春機発動期前後から減少し始める<sup>11)</sup>。また, リンパ球の減少に伴って, 胸腺実質を多数の小葉に分ける結合組織性のトラベキュラ領域に多数の脂肪細胞が出現し, 萎縮したリンパ球領域が脂肪組織で置換された様相を呈する。この現象は胸腺の加齢退縮と呼ばれている。マウスでは, 胸腺に出現する脂肪細胞がレプチンを産生し, リンパ球がレプチンレセプター OBR-b を発現していることより, レプチンを介して脂肪細胞が胸腺リンパ球に作用している可能性が示唆されている<sup>2,3)</sup>。本報では, 胸腺に脂肪細胞が出現する時期を明らかにするために, マウスの加齢にともなう胸腺の総脂質量の測定および胸腺組織標本の観察を行った。また, 胸腺での脂肪細胞分化の機構を検討するために, 脂肪細胞分化のマーカーとして FGF10, PPAR $\gamma$  およびレプチンの mRNA の発現を RTPCR 法で調べた。

細胞質に多量の脂質を貯蔵する脂肪細胞が増殖分化するにつれて, 胸腺の総脂質量が増加することが予測される。Bligh and Dyer 法により, 3, 5 および 8 週齢マウスの胸腺の総脂質を抽出秤量した結果, 胸腺組織 1g あたりの総脂質量は 5 週齢と 8 週齢の間で

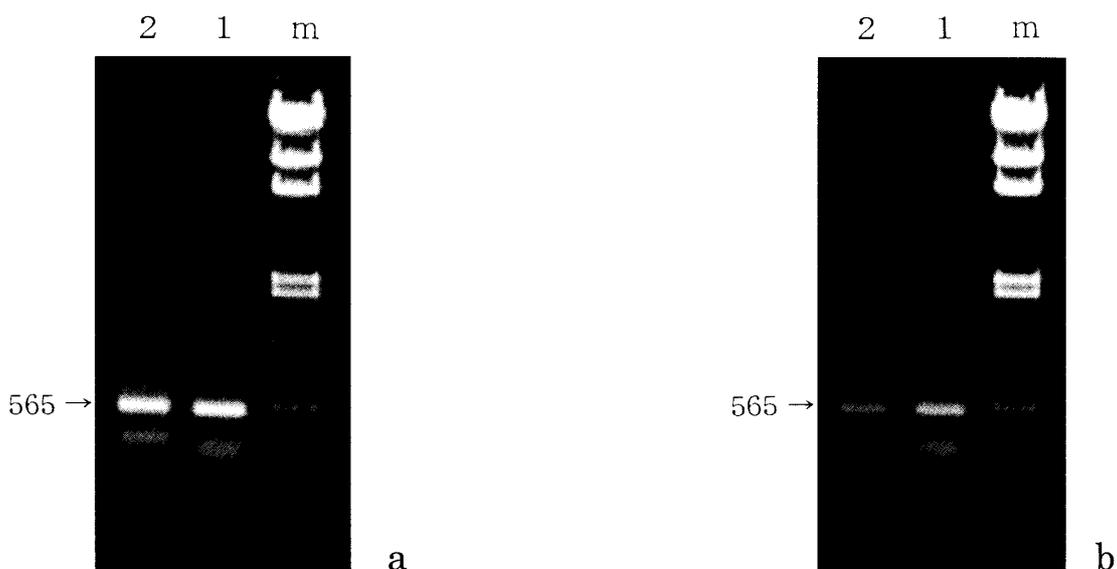


図 5 胃脾間膜脂肪組織一次培養コロニーの FGF10 および PPAR $\gamma$  mRNA の発現

3 週齢マウスの胃脾間膜脂肪組織を酵素処理して得た細胞を一次培養し, 出現したコロニーからクローニングリングを利用してトータル RNA を抽出し, RTPCR を行った。a. 脂肪滴を全く含有しない敷石状に配列した細胞コロニー, b. 小さな脂肪滴を多数含有する (多胞性) 細胞コロニー。いずれのコロニーの細胞からも FGF10 および PPAR $\gamma$  の mRNA の発現が認められた。レーン: m; マーカー DNA, 1; FGF10, 2; PPAR $\gamma$

増加し始めることが明らかとなった。また、脂肪化にともなって胸腺のリンパ球領域が退縮することにより胸腺構成細胞数が変化することが予測されるので、胸腺の DNA 含有量を測定した。3, 5 および 8 週齢の DNA 含有量に関しては、明瞭な変化は認められなかった。単位 DNA 量あたりの総脂質量を求めると図 3 となり、加齢にともなって増加した。このことは、加齢にともなう胸腺の総脂質量の増加は、胸腺細胞数の増加、すなわち胸腺の成長によるものではなく、脂質の蓄積に起因することを示している。

胸腺は結合組織性の被膜に囲まれたリンパ球の集積した皮質および髄質からなる。リンパ球領域は被膜に連続するトラベキュラによって小葉に分けられている。小葉内にはリンパ球の他に胸腺上皮細胞、樹状細胞やマクロファージなど種々の細胞が存在する。これらの胸腺構成細胞の中に脂質を蓄積する脂肪細胞が出現する時期を検討した。出生直後から 8 週齢までの胸腺の HE 染色組織標本を顕微鏡観察した。出生直後および 3 週齢の胸腺では、周囲の結合組織に脂肪細胞が存在するけれども、被膜やトラベキュラには脂肪細胞は認められなかった。5 週齢ではトラベキュラに少数の単胞性の脂肪細胞からなる細胞集団が観察され、胸腺総脂質量が増加し始める時期と一致した。したがって、遅くとも 5 週齢では胸腺内に脂肪細胞が存在していることが明らかとなり、加齢にともなう脂質の蓄積は胸腺内での脂肪細胞の分化増殖によることが組織学的にも示唆された。

次に、脂肪細胞分化のマーカーとして FGF10, PPAR $\gamma$  およびレプチン mRNA の発現を RTPCR 法により検討した。PPAR $\gamma$  は脂肪細胞特異的な細胞核レセプターであり脂肪細胞分化のマスタレギュレーターと考えられている<sup>12)</sup>。レプチンは成熟した脂肪細胞が産生し、エネルギー摂取および消費を促すホルモン作用を持つ<sup>13)</sup> のみでなく、サイトカインとして種々の生理機能を持つことが明らかにされている<sup>14, 15)</sup>。マウス FGF10 は肺や胎仔で多く発現していること、さらに、創傷修復時に産生されることが知られている<sup>7)</sup>。胎生 20 日のマウス胎仔～6ヶ月齢マウスの胸腺において、全ての試料で FGF10 および PPAR $\gamma$  の mRNA の発現が認められた。電気泳動後のゲル染色像の濃淡より発現量を比較するために、FGF10 および PPAR $\gamma$  の増幅される DNA フラグメントが 565 塩基対となるようにプライマーを設定した。胎仔胸腺では FGF10 が PPAR $\gamma$  よりも僅かに多く発現し、生後 3 週齢、5 週齢の胸腺ではほぼ同じ発現

量であり、6ヶ月齢では明らかに PPAR $\gamma$  の発現量の方が多かった。このことから、FGF10の方がより早期に発現し、加齢にしたがって PPAR $\gamma$  の発現が増大することが示唆された。このことは、マウス新生仔由来細胞での脂肪細胞分化誘導時に、FGF10の方が PPAR $\gamma$  よりも早期に誘導されること<sup>16)</sup>と一致した。また、出生直前の胎仔胸腺内ですでに脂肪細胞分化の過程が始まっていることが示唆された。

次に、脂肪細胞分化過程の細胞を同定する目的で、体腔脂肪に分類される胃脾間膜脂肪組織から分離した細胞を培養した。一次培養により、線維芽細胞のコロニー、上皮細胞様に隣接する細胞がすき間なく敷き詰められた様相を呈する細胞コロニー(敷石状の細胞)および小さな脂肪滴を多数含有した多胞性の脂肪細胞のコロニーが得られた。ガラス製のクローニングリングを用いて、各コロニーからトータル RNA を抽出し RTPCR を行った結果、多胞性の脂肪細胞および敷石状の細胞コロニーで FGF10 および PPAR $\gamma$  の mRNA の発現が認められ、これらの細胞は脂肪細胞分化の途中の段階にあることが示唆された。したがって、胸腺を構成する細胞を一次培養系に移し、同様の形態を示す細胞コロニーより RNA を抽出し、マーカー遺伝子 mRNA の発現を調べることにより、種々の胸腺構成細胞の中で脂肪細胞に分化する系列の細胞を形態的に同定することが可能であることが示唆された。

## V. 要 約

マウスの加齢にともなう胸腺の脂肪化の機構を検討する一環として、BALB/c 雌マウスを用いて、加齢による胸腺の総脂質量の変化、および組織学的に胸腺内に脂肪細胞が出現する時期を調べた。胸腺組織単位湿重量あたりの総脂質量は 5 週齢から 8 週齢の間で著しく増加し始めた。胸腺構成細胞数の変化を考慮した場合も同様であった。また、胸腺の HE 染色組織標本を顕微鏡観察した結果、出生直後のマウス胸腺周囲の結合組織にはすでに少数の脂肪細胞が認められたけれども、胸腺内の結合組織であるトラベキュラには全く観察されなかった。5 週齢マウスの胸腺トラベキュラに初めて少数の脂肪細胞が集団で存在するのが観察された。以上より、遅くとも生後 5 週齢の胸腺内のトラベキュラには脂肪細胞が存在すること、また、この時期に一致して胸腺の総脂質量が増加し始めることが明らかとなった。

脂肪細胞分化のマーカーとして FGF10, PPAR $\gamma$  およびレプチン mRNA の発現を RTPCR 法で調べた。

出生直前から6ヶ月齢マウス胸腺において、FGF10およびPPAR $\gamma$ のmRNAの発現が認められ、出生直前の胸腺内で脂肪細胞分化のプロセスが始まっていることが明らかとなった。また、FGF10とPPAR $\gamma$ の発現量を比較すると、出生直前の胸腺ではFGF10の発現量が多かった。しかし、加齢にともなってPPAR $\gamma$ の発現量の方が多くなることが明らかとなった。したがって、胸腺内での脂肪細胞分化のプロセスにおいて、FGF10とPPAR $\gamma$ の発現時期を比べると、FGF10の方がより早期に発現していることが示唆された。また、6ヶ月齢ではFGF10の発現量が少ないことから、幹細胞からの分化開始が鈍化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) 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, 幟川智子, 宮田堅司: 本誌, **54**, 1 (1999)
- 3) 坂口恵子, 佐藤紘子, 徳永雅美, 西津景子, 久湊尚子, 松永美佐子, 宮田堅司: 本誌, **55**, 23 (2000)
- 4) E. Bligh and J. W. Dyer: *Can. J. Biochem. Physiol.*, **37**, 911 (1959)
- 5) J. Sambrook and D. W. Russel: *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, 3rd ed., COLD SPRING HARBOR LABORATORY PRESS, 6, 24 (2000)
- 6) P. Chomczynski, N. Sacchi: *Analytical Biochem.*, **162**, 156 (1987)
- 7) S. Tagashira, H. Harada, T. Katsumata, N. Itoh and M. Nakatsuka: *Gene*, **197**, 399 (1997)
- 8) B. B. Lowell: *Cell*, **99**, 239 (1999)
- 9) Y. Zhang, R. Proenca, M. Maffei, M. Barone, L. Leopold, J. M. Friedman: *Nature*, **372**, 425 (1994)
- 10) Y. Zhu, K. Alvares, Q. Huang, M. S. Rao and J. K. Reddy: *J. Biol. Chem.*, **268**, 26817 (1993)
- 11) D. E. Kelly, R. L. Wood, A. C. Enders: *Bailey' Textbook of Microscopic Anatomy*, 18th ed (Williams and Wilkins), 453 (1984)
- 12) P. Tontonoz, E. Hu and B. M. Spiegelman: *Cell*, **79**, 1147 (1994)
- 13) B. M. Spiegelman and J. S. Flier: *Cell*, **104**, 531 (2001)
- 14) G. M. Lord, G. Matarese, J. K. Howard, R. J. Baker, S. R. Bloom and R. I. Lechler: *Nature*, **394**, 897 (1998)
- 15) R. H. Unger, Y.-T. Zhou and L. Orci: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 2327 (1999)
- 16) N. Itho: Personal communication