
研究報文

マウス胸腺の脂肪細胞分化過程の速度論による解析

清水 里枝, 竹内亜里沙, 田中麻由里, 玉井 千晶, 中西 美貴,
西尾依里奈, 二田智恵子, 宮崎木綿子, 山口 文乃, 宮田 堅司

Analysis of the Differential Process of Adipocytes in the Thymus of BALB/c Mouse by Kinetic Theory

Satoe Shimizu, Arisa Takeuchi, Mayuri Tanaka, Chiaki Tamai, Miki Nakanishi,
Erina Nishio, Chieko Nita, Yuhko Miyazaki, Ayano Yamaguchi and Kenji Miyata

The differential process of adipocytes was investigated in the thymus and spleen of BALB/c mice by the real time PCR method. The transcriptions of PPAR γ (PP), adiponectin (Ad) and resistin (Re) were considered as indications of differential stages of adipocytes and the transcription ratios, log Ad/PP and log Re/PP, were measured. These logarithmic ratios increased rapidly, at the border between fetal stage and neonatal, from negative value to positive in the thymus and to nearly 0 in the spleen. Subsequently, they were remained virtually constant throughout the experimental period. Kinetics was applied to the differential model of adipocytes in which the quantity of each transcription was assumed to be proportional to the cell number, and the changes of log Ad/PP and log Re/PP with age were interpreted successfully.

(Received September 7, 2009)

I. はじめに

マウスでは、胎生12日頃に第3咽頭溝に由来する上皮様細胞から胸腺原基が形成される¹⁾。この胸腺原基に多分化能を有した幹細胞が流入し、上皮様細胞の影響下にリンパ様細胞である胸腺細胞に分化する。胸腺は、リンパ球の増殖により急激に増大し、生後数週齢で最大となり、以降リンパ球の減少により退縮する。この胸腺の退縮に伴いトラベキュラや被膜に脂肪細胞が増殖し、リンパ球領域が脂肪細胞で置換された様相を呈するが²⁾、この現象の生理的意義は不明である。

本報では、マウス胸腺での脂肪細胞の分化過程を検討するために、脂肪細胞系列の細胞が発現することが知られている PPAR γ (PP)³⁾、アディポネクチ

ン (Ad)⁴⁾、およびレジスチン (Re)⁵⁾の転写量比を、リアルタイム PCR 法で測定した。また、比較のために脾臓でも測定し、その結果を速度論で解析することを試みた⁶⁾。

II. 方 法

1. 材料

コンベンショナルな条件下で飼育した雌雄の BALB/c マウスを用いた。出生後3週間は母親マウスと同居させ、21日齢で分離した。固型飼料 (MF, オリエンタル酵母) および水道水は自由に摂取させた。頸椎脱臼させたマウスを開腹、開胸し、胸腺および脾臓を摘出した。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°C で保存した。胎生期マウスの日齢は、1晩雄と同居させ翌朝交配を確認できた場合は胎生0.5日齢とした。胎仔の胸腺および脾臓は実体顕微鏡下に

摘出した。胎生期マウスの雌雄の判定は困難であり、区別は行なわなかった。

2. トータル RNA の抽出, 逆転写反応およびリアルタイム PCR

凍結した組織より, 酸性グアニジンチオシアン酸-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⁷⁾。エタノール沈殿法により精製したトータル RNA を, 濃度100ng/ μ l に調整した。トータル RNA 300ng を鋳型として逆転写反応を行った。逆転写反応は M-MLV リバーストランスクリプターゼ (ReverTra Ace- α , 東洋紡), oligo dT20 プライマーを用い, メーカーのプロトコールに従い, 30°C で10分間, さらに42°C で20分間行った。99°C で5分間処理することにより反応を停止させるとともに鋳型 RNA を分解した。この反応産物を水で15倍に希釈した溶液 (15倍希釈試料溶液) を試料としてリアルタイム PCR (Line Gene, Bio Flux) を行った。反応は, メーカーのプロトコールに従い, SYBR Green mix (Realtime PCR Master Mix, 東洋紡) 7.5 μ l, forward primer および reverse primer (4 pmol/ μ l) を各1.5 μ l, 15倍希釈試料溶液4.5 μ l, 合計15 μ l の溶液で行った。PCR 反応は, 95°C 10分の前処理の後, 変性94°C 15秒, アニーリング60°C 15秒, 伸長反応72°C 30秒のサイクルを45回行い, 各サイクルの伸長反応終了時点毎に蛍光強度を測定し, PP, Ad および Re の増幅曲線を得た。

増幅反応終了後に, 増幅された DNA の融点解析を行い, 増幅された DNA が均一なものであることを確認した。PP, Ad および Re の増幅反応に用いたプライマーを下記に示す。

プライマー PP-R	CTGACCCAATGGTTGCTGAT
プライマー PP-F	GAGCTGGGTCTTTTCAGAAT
プライマー AD-R	ATCCTGGCCACAATGGCACA
プライマー AD-F	ATCTCCTGTCTCACCCCTTAG
プライマー Re-R	CACTGTGTCCCATCGATGAA
プライマー RE-F	GGAGGAGACTGTCCAGCAAT

プライマーは, 少なくとも一つのイントロン領域を間を含むエクソン領域に相補的に結合するように設定した。これらのプライマーにより, PP, Ad および Re とともに110塩基対の DNA フラグメントが増幅される。

3. 転写量比の測定

リアルタイム PCR のインターカラー法では, 増幅された2本鎖 DNA に取り込まれた色素が励起されて発する蛍光強度を測定することにより, 増幅曲線がリアルタイムに得られる。増幅曲線より, それぞれ蛍光強度が一定値に達するまでに要した PCR のサイクル数 n_p, n_A , および n_R を読み取った。15倍希釈試料溶液中に存在した PP と Ad および Re とのコピー数比の常用対数値 $\log_{10} Ad/PP$, および $\log_{10} Re/PP$ は①式あるいは②式より求めた⁸⁾。

$$\log_{10} \frac{Ad}{PP} = (n_p - n_A) \log_{10} 2 \quad \text{①}$$

$$\log_{10} \frac{Re}{PP} = (n_p - n_R) \log_{10} 2 \quad \text{②}$$

Ⅲ. 結 果

1. 加齢に伴う転写量比の変化

BALB/c 雄マウスの胸腺および脾臓における転写量比 $\log_{10} Ad/PP$, および $\log_{10} Re/PP$ の加齢変化の測定値を図 1 a および 1 b に示した。胎仔期17.5日

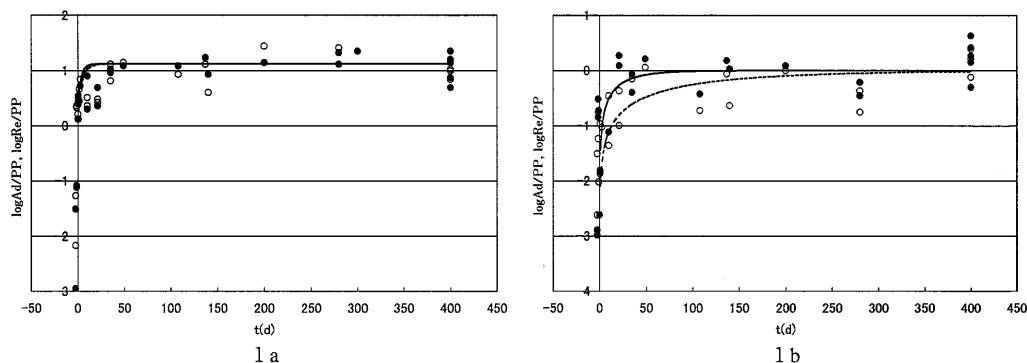


図 1 BALB/c 雄マウスの胸腺および脾臓における転写量比の加齢変化

1 a. 胸腺における転写量比 $\log Ad/PP$ (○), および $\log Re/PP$ (●) は, 出生を境に急激に増大し, 3週齢以降ほぼ一定になった。表 1 の速度定数 k_1 および a の値を用いて計算した理論値 $\log Ad/PP$ (—), および $\log Re/PP$ (⋯) も示した。

1 b. 脾臓における転写量比 $\log Ad/PP$ (○), および $\log Re/PP$ (●) は, 出生後急激に増大し 0 に近づいた。表 1 の速度定数 k_1 および a の値を用いて計算した理論値 $\log Ad/PP$ (—), および $\log Re/PP$ (⋯) も示した。

齢から出生直前の期間では、これらの値は負となったけれども、この時期から出生直後にかけて急激に増大した。胸腺では、生後直後から正の値となり、3 週齢以降はほぼ 1.1 となり一定値となった。脾臓では、出生後、負の値から 0 に漸近した。また、胸腺および脾臓の場合ともに、出生後には、各日齢毎に $\log_{10}Ad/PP$ 、および $\log_{10}Re/PP$ の値はほぼ等しかった。すなわち、 Ad および Re の転写量は等しかった。

雌マウスの結果を図 2 a および 2 b に示した。

胸腺および脾臓の場合ともに、雌雄の差異はほとんど認められなかった。

IV. 考 察

PP 、 Ad および Re は脂肪細胞系列の細胞が産生することが知られている^{3,4,5}。 PP は脂肪細胞系列の分化初期に必要な核内受容体タンパク質と考えられている⁹。したがって、 PP を脂肪細胞系列の未熟

な段階の細胞のマーカーとし、 PP に対する Ad および Re の転写量の加齢変化を調べることにより、脂肪細胞の分化過程を検討した。これらの遺伝子の転写量は、その転写細胞数に比例すると仮定し、脂肪細胞の分化過程を反応速度論に基づき解析することを試みた⁶。

図 3 に示した様な分化過程を考える。この場合には、 PP は $PPAR\gamma$ 転写細胞を表し、 Ad で表されるアディポネクチン転写細胞に分化し、その後機能を失うか細胞死に至る。 S は脂肪細胞系列の幹細胞を表し、 k_0 、 k_1 および k_2 は各過程の速度定数とする。 Re に関しても同様に表した。

Ad の場合について、 k_0 および k_2 過程を無視し、 k_1 過程を一次反応速度式で表すと、

$$\frac{d[PP]}{dt} = -k_1[PP] \tag{3}$$

$$\frac{d[Ad]}{dt} = k_1[PP] \tag{4}$$

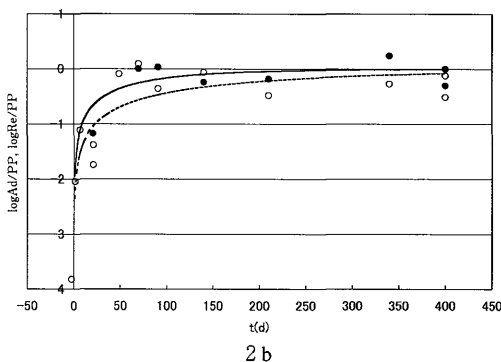
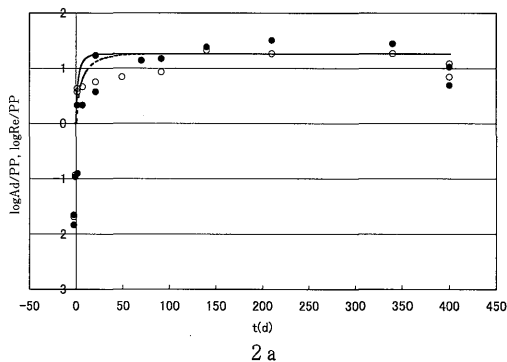


図 2 BALB/c 雌マウスの胸腺および脾臓における転写量比の加齢変化

2 a. 胸腺における転写量比 $\log Ad/PP$ (○), および $\log Re/PP$ (●) は、出生を境に急激に増大し、その後ほぼ一定になった。表 1 の速度定数 k_1 および a の値を用いて計算した理論値 $\log Ad/PP$ (—), および $\log Re/PP$ (.....) も示した。

2 b. 脾臓における転写量比 $\log Ad/PP$ (○), および $\log Re/PP$ (●) は、出生後急激に増大し 0 に近づいた。表 1 の速度定数 k_1 および a の値を用いて計算した理論値 $\log Ad/PP$ (—), および $\log Re/PP$ (.....) も示した。

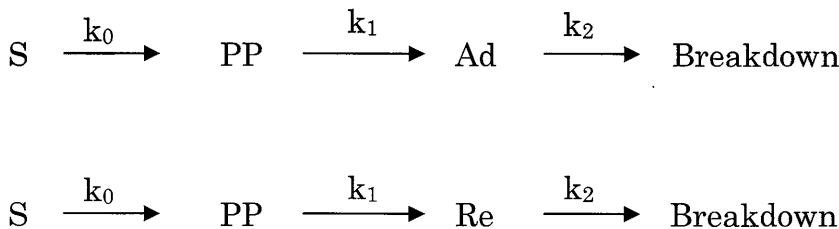


図 3 脂肪細胞系列の分化過程

$PPAR\gamma$ を転写する細胞は分化初期の細胞であり、アディポネクチンやレジスチンを転写する細胞へと分化する。 S は幹細胞、 PP は $PPAR\gamma$ 転写細胞、 Ad はアディポネクチン転写細胞、 Re はレジスチン転写細胞を表す。 k_0 、 k_1 、および k_2 は各分化過程の速度定数である。

となる。 $[PP]$ および $[Ad]$ は、それぞれ PP 細胞および Ad 細胞の濃度を表す。③、④式を解くと、

$$[Ad] = [PP]_0(1 - e^{-k_1 t}) \quad (5)$$

となる。ここで $[PP]_0$ は PP 細胞の初期濃度である。生体内では、 PP 細胞は幹細胞 S が分化することにより供給され続けるとすることにより、 k_0 過程を考慮する。すなわち、

$$a[PP]_0 = [PP] \quad (6)$$

とすると、⑤式より

$$\log_{10} \frac{[Ad]}{[PP]} = \log_{10}(1 - e^{-k_1 t}) + \log_{10} a \quad (7)$$

となり、この式が転写量比の日齢変化の理論値を与える。

⑦式は、 $t \gg 1$ の場合、

$$\log_{10} \frac{[Ad]}{[PP]} = -\log_{10} a \quad (8)$$

$t \ll 1$ の場合、

$$\log_{10} \frac{[Ad]}{[PP]} = \log_{10} t + \log_{10} k_1 - \log_{10} a \quad (9)$$

となる。雄の場合の実測値 $\log_{10} Ad/PP$ を $\log_{10} t$ に対してプロットし(図4)、 t が大きい領域の値と、 t が小さい領域で傾き1の直線を $t=0$ に外挿した値を読み取り、⑧および⑨式より、 k_1 および a の値を求めた(表1)。

Re の場合も、同様にして求めた k_1 および a の値

を表1に示した。雌の場合の結果も表1に示した。 a の値は、測定期間にわたっての平均値であるけれども、脾臓ではほぼ1となり、 PP 転写細胞濃度 $[PP]$ は初期濃度 $[PP]_0$ からほとんど変化しないことを示している。胸腺では、 a の値は雄では0.075、雌では0.055となり、 PP 転写細胞濃度が初期値の1/10~1/15に低下していた。このことは、胸腺においては、 PP 細胞の分化が起きていることを示している。

表1および2に示した k_1 および a 値を用いて、⑦式により計算した加齢変化の理論曲線も図1a、bおよび図2a、bに示した。胸腺の場合には、 $\log_{10} Ad/PP$ および $\log_{10} Re/PP$ の値は、出生直後に急激に増大し、10日齢以降はほぼ一定値となり、実験値とよく一致した。脾臓の場合には、 $\log_{10} Ad/PP$ および $\log_{10} Re/PP$ の値は、胸腺の場合と比較すると緩やかに増大し、0に漸近した。図3に示した様に、脂肪細胞系列の分化過程において、幹細胞 S を考慮することにより、速度論に基づき、 $\log_{10} Ad/PP$ および $\log_{10} Re/PP$ の生後の日齢変化を説明することができた。この方法では、胎仔期の値を計算することはできないけれども、生後直後に急激に増大する理論曲線を、日齢 t が負の値の領域に外挿することにより、実験値を説明可能であった。

本報で分化の指標として用いた Ad や Re の転写量は、出生時を境に急激に増大した。BALB/c雌マウスの胸腺では、組織学的には、生後4~5週齢で胸腺内のトラベキュラに脂肪を蓄積した脂肪細胞が観察され始める¹⁰⁾。したがって、脂肪細胞系列の細胞が成熟する前の段階で既に Ad や Re を盛んに転写していることが明らかとなった。また、脾臓では、

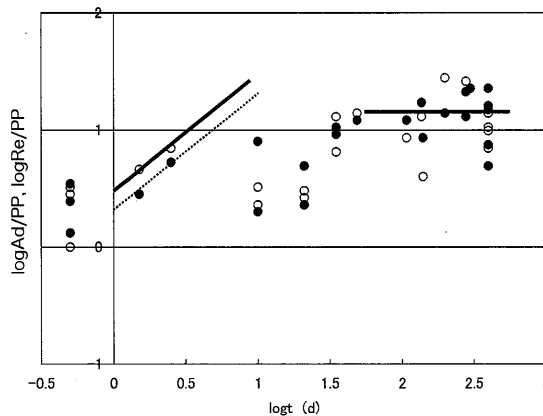


図4 BALB/c雄マウスの胸腺の場合の速度定数および a の決定

$\log Ad/PP$ および $\log Re/PP$ の測定値を $\log t$ に対してプロットした。 t が大きい領域の値から、 $-\log a = 1.12$ となった。また、 $\log t$ が小さい領域で傾き1の直線を $\log t \rightarrow 0$ に外挿することにより、 $\log k_1 - \log a$ の値を求めた。 $\log Ad/PP$ の場合には0.486と、 $\log Re/PP$ の場合には0.313と読み取った。

表 1 速度定数 k_1 , および a

			k_1 (1/d)	a
雄	胸 腺	Ad	0.232	0.075
		Re	0.156	0.075
	脾 臓	Ad	0.0369	1
		Re	0.00815	1
雌	胸 腺	Ad	0.169	0.055
		Re	0.0607	0.055
	脾 臓	Ad	0.0115	1.6
		Re	0.0045	1.6

成熟した脂肪細胞が認められることはないけれども、出生後、Ad や Re の転写量が PP の転写量と等しくなったことから、脂肪細胞へ分化し得る細胞が存在することが示唆された。

Ad は細胞の耐糖能を改善^{11,12)}、Re は耐糖能を低下させる^{3,13)}。今回、正常なマウスの胸腺および脾臓での Ad と Re の転写量はほぼ等しかったが、このことの生理的な意義は不明である。

V. 要 約

BALB/c マウスの胸腺および脾臓での脂肪細胞の分化過程を、PPAR γ (PP) に対するアディポネクチン (Ad)、およびレジスチン (Re) の転写量を指標として、リアルタイム PCR 法により検討した。加齢に伴い成熟脂肪細胞が増加してくる胸腺においては、アディポネクチンおよびレジスチンの転写量は、胎生期には PPAR γ の転写量より少なかったが、出生を境に急激に増大し、PPAR γ の転写量の数十倍となり、その後ほぼ一定となった。成熟した脂肪細胞が認められない脾臓では、アディポネクチンおよびレジスチンの転写量は、出生を境に増大し、PPAR γ の転写量とほぼ等しくなった。各遺伝子の転写量は細胞数に比例すると仮定し、脂肪細胞系列の幹細胞を考えることにより、これらの結果を、速度論により説明することができた。

文 献

- 1) R. Rugh: *The Mouse, Its Reproduction and Development* (Burgess Publishing), 253 (1968)
- 2) D.E.Kelly, R.L.Wood and A.G.Enders: *BAILEY'S*

TEXTBOOK OF MICROSCOPIC ANATOMY, 18th ed. (Williams & Wilkins), 453 (1984)

- 3) P.Tontonoz, A.R.Graves, I.A.Budavari and M.B. Spiegelman: *Genes & Dev.*, **8**, 1224 (1994)
- 4) E.Hu, P.Liang and M.B.Spiegelman: *J. Biol. Chem.*, **271**, 10697 (1996)
- 5) M.C.Steppan, T.S.Bailey, S.Bhat, J.E.Brown, R.R. Banerjee, M.C.Wright, R.H.Patel, S.R.Ahima and A. M.Lazar: *Nature* **409**, 307 (2001)
- 6) 楠本瑠美, 長尾由貴子, 橋本珠実, 舟木真知子, 三仲亜季子, 森林さやか, 山田 浄, 宮田堅司: 本誌 **62**, 13 (2007)
- 7) P. Chomczynski and N. Sacchi: *Analytical Biochem.*, **162**, 156 (1987)
- 8) 安達綾希子, 井上摩耶, 大野理絵, 城 清佳, 長尾美沙子, 宮田堅司: 本誌 **61**, 7 (2006)
- 9) B.B.Lowell: *Cell*, **99**, 239 (1999)
- 10) 瀬戸口美沙子, 宮田堅司: 本誌 **57**, 1 (2002)
- 11) T.Yamauchi, J.Kamon, H.Waki, Y.Terauchi, N. Kubota, K.Hara, Y.Mori, T.Ide, K.Murakami, N.T. Kasaoka, O.Ezaki, Y.Akanuma, O.Gavriloba, C. Vinson, M.L.Reitman, H.Kagechika, K.Shudo, M. Yoda, Y.Nakano, K.Tobe, R. Nagai, S.Kimura, M. Tomita, P.Froguel and T.Kadowaki: *Nature Med.*, **7**, 941 (2001)
- 12) A.H.Berg, T.P.Combs, X.Du, M.Brownlee and P.E. Scherer: *Nature Med.*, **7**, 947 (2001)
- 13) R.J.Levy, B.Davenport, N.J.Clore and W.Stevens: *Am.J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **282**, E626 (2002)