
研究報文

マウス胸腺での脂肪細胞分化過程の解析

大西 佐季, 高田 友里絵, 高橋 麻里絵, 塚本 智美, 徳田 梨紗,
富本 怜子, 久田 祥子, 三上 悠, 宮田 堅司

Analysis of The Adipocyte-Differential Process In The Thymus of Mouse

Saki Ohnishi, Yurie Takada, Marie Takahashi, Tomomi Tsukamoto,
Risa Tokuda, Reiko Tomimoto, Shoko Hisada, Yu Mikami
and Kenji Miyata

Summary

Logarithmic transcript-ratios of secreted frizzled-related protein 5 (SFRP5), lipocalin2 (LC2) and PPAR γ (PR), expressing in the thymus of mouse, were measured with aging by realtime PCR method. LogPR/SFRP5 and logPR/LC2 tended to increase for several weeks after birth and then became constant practically. Rate theory was applied to adipocyte-differential model, and rate constants were determined for the processes, where SFRP5- and LC2-transcribing cells differentiated into PR-transcribing cells. It was concluded that SFRP5 was transcribed firstly, then LC2 in the process where stem cells differentiated into preadipocytes.

(Received September 12, 2012)

I. はじめに

特定の細胞系列の細胞が、分化段階に応じて発現する複数の遺伝子間の転写量比の加齢変化を測定することにより、それらの遺伝子を発現する分化段階間の分化の速度定数を求めることが可能である⁽¹⁾。転写量比はリアルタイム PCR 法により容易に測定可能であり、これまでに、BALB/c 雌マウス胸腺での PPAR γ (PR), Adiponectin (Ad), Resistin (Re), および Hormone sensitive lipase (HSL) の転写量比の加齢変化を測定し、胸腺での脂肪細胞系列の細胞分化過程において、これらの遺伝子の転写開始順を明らかにしてきた^(2,3)。マウスでは、胎生期に第 3 咽頭溝に由来する上皮様細胞により胸腺原基が形成され、流入した幹細胞より分化したリンパ球様の胸腺細胞が出現することにより胸腺が形成される⁽⁴⁾。出生後、リンパ球の増殖により胸腺は急激に増大し、生後数週齢で最大となり、その後リンパ球の減少に

より退縮する。この退縮に伴い、胸腺内の結合組織に成熟脂肪細胞が認められる様になり、リンパ球領域が脂肪細胞で置換された様相を呈する様になるので、胸腺は脂肪細胞の分化過程を検討するのに適している⁽³⁾。

本報では、脂肪組織で発現する Lipocalin 2 (LC2)⁽⁵⁾ および Secreted frizzled-related protein 5 (SFRP5)⁽⁶⁾ の PR に対する転写量比の加齢変化を測定し、これらの遺伝子が脂肪細胞系列の分化過程のどの段階で転写が始まるのかを検討した。

II. 方法

コンベンショナルな条件下で飼育した雌の BALB/c マウスを用いた。組織の摘出、トータル RNA の抽出、逆転写反応およびリアルタイム PCR は前報と同様に行った^(1,2,3)。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、いずれの場合にも 110 塩基対の DNA フラグメントが増幅される。PR, LC2 および SFRP5

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 PR-R CTGACCCAATGGTTGCTGAT
 プライマー PR-F GAGCTGGGTCTTTTCAGAAT
 プライマー LC2-R GCACCATCTATGAGCTACAA
 プライマー LC2-F GGAGCTTGAACAATGTTCT
 プライマー SF5-R ATGCTGCACTGCCACAAGTT
 プライマー SF5-F TCACACTGGGCACAGATCTT

得られた増幅曲線より、蛍光強度が一定値 (相対強度 40) に達するまでに要した PCR のサイクル数 n を読み取った。例えば、LC2 に対する PR の転写量比の場合、得られたそれぞれの増幅曲線において、蛍光強度が一定値に達するまでに要したサイクル数 n_{LC2} および n_{PR} を読み取り、①式で転写量比を求めた。

$$\log \frac{PR}{LC2} = (n_{LC2} - n_{PR}) \log 2 \quad \dots \quad \text{①}$$

SFRP5 の場合には、①式の LC2 を SFRP5 で置き換えた式で転写量比を求めた。

Ⅲ．結果および考察

BALB/c 雌マウス胸腺での転写量比 $\log PR/LC2$ および $\log PR/SFRP5$ の加齢変化の測定値を図 1 に示した。いずれの値も加齢に伴い増加傾向を示した。Log $PR/LC2$ は、生後数週間は負の値となったが、その後正の値となった。Log $PR/SFRP5$ の値は生後直後から正の値となった。

前報と同様に、LC2 と PR の場合について、図 2 に示した様な脂肪細胞系列細胞の分化過程を考える^(2,3)。ここで、S は脂肪細胞系列の幹細胞を、PR および LC2 は、それぞれの転写細胞を表し、 k_0 、 k_1 および k_2 は各分化過程の速度定数である。転写量は、それらの転写細胞数に比例すると仮定すると、転写

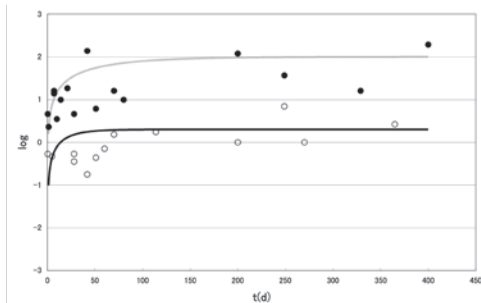


図 1 転写量比 $\log PR/LC2$ および $\log PR/SFRP5$ の加齢変化

転写量比 $\log PR/LC2$ (○) および $\log PR/SFRP5$ (●) とともに、生後数週間は加齢に伴い増大傾向を示した。表 1 に示した速度定数 k_1 および a の値を用いて、②式により計算した理論値 ($\log PR/LC2$ —, $\log PR/SFRP5$ - -) も示した。

量比の加齢変化の理論値は

$$\log \frac{[PR]}{[LC2]} = \log (1 - e^{-kt}) - \log a \quad \dots \quad \text{②}$$

で与えられる⁽²⁾。ここで、 $[LC2]$ および $[PR]$ は、それぞれ LC2 および PR 転写細胞の濃度を表し、 t は日齢、 a は転写量と転写細胞数との比例定数等を含めた定数である。

②式は、 $t \gg 1$ の場合

$$\log \frac{[PR]}{[LC2]} = -\log a \quad \text{③}$$

$t \ll 1$ の場合

$$\log \frac{[PR]}{[LC2]} = \log t + \log k_1 - \log a \quad \dots \quad \text{④}$$

となり、 $\log PR/LC2$ の実測値を $\log t$ に対してプロットした図 3 より、定数 a および速度定数 k_1 を求めた結果を表 1 に示した。PR と SFRP5 の場合も、同様にして求めた値を表 1 に示した。また、これらの値

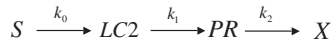


図 2 分化過程モデル

幹細胞 (S) の一部が lipocalin2 転写細胞 (LC2) へ、さらに PPAR γ 転写細胞 (PR) へと分化する。PR はさらに他の因子を転写する細胞へと分化する。 k_0 、 k_1 、および k_2 は各分化過程の速度定数である。ただし、速度式を解く場合には k_1 過程のみ考え、後に a を考えることにより k_0 過程を考慮する⁽²⁾。

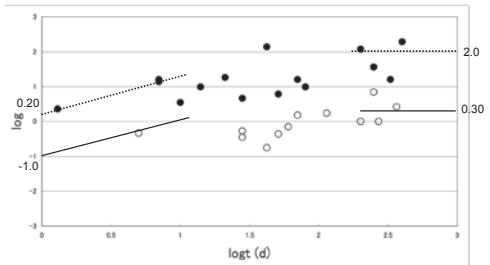


図 3 速度定数 k_1 および a の決定

測定値 $\log PR/LC2$ (—) および $\log PR/SFRP5$ (-----) を $\log t$ に対してプロットした。 t が大きい領域の値から $-\log a$ の値が、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。

	k_1 (1/d)	a
$\log PR/LC2$	0.0501	0.501
$\log PR/SFRP5$	0.0158	0.0100

表 1 速度定数 k_1 、および定数 a の値

を用いて②式により計算した加齢変化の理論値も図 1 に示した。

幹細胞から分化した前駆脂肪細胞は PR を転写し始め、脂肪滴を蓄積し肥大化することにより脂肪細胞となる⁽⁷⁾。速度定数 k_1 の値から、脂肪細胞系列の細胞の分化過程において、LC2 および SFRP5 は PR よりも先に転写されること、また、SFRP5 の方が LC2 よりも先に転写され始めることが明らかとなった。図 4 には、以前の結果^(2,3) も考慮して、脂肪細胞系列の細胞が分化するにしたがい転写されるようになる遺伝子の転写開始順を示した。

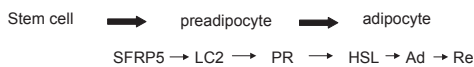


図 4 脂肪細胞系列の細胞分化過程での各遺伝子の転写開始順

SFRP5 や LC2 は前駆脂肪細胞の段階で転写が開始される。PR が発現すると脂肪細胞へと分化する。HSL, Ad や Re は脂肪細胞で転写される。

PR は前駆脂肪細胞の段階で発現し、脂肪蓄積に関与することが知られている⁽⁸⁾。SFRP5 はマウス白色脂肪組織で多量に発現しており、抗炎症性アディポカインとして作用し、成熟脂肪細胞の恒常性を保つのに重要であると考えられている⁽⁶⁾。今回、前駆脂肪細胞において SFRP5 の転写が、PR やプロ炎症性アディポカインである LC2 の転写に先行して開始されることが明らかとなった。このことは、SFRP5 が脂肪組織化する前段階から、組織中のマクロファージ等の細胞の恒常性からの逸脱を抑制している可能性を示唆している。

IV. 要約

BALB/c 雌マウスの胸腺で、脂肪組織で発現することが知られている PPAR γ (PR), Secreted frizzled-related protein 5 (SFRP5), および Lipocalin 2 (LC2) の転写量比の加齢変化をリアルタイム PCR 法により測定した。その結果を、脂肪細胞系列の幹細胞を考慮した分化速度式で解析し、これらの遺伝子の転写の開始順が SF, LC2, PR の順であることを示した。

文献

- 1) 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)
- 2) 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: 本誌 64, 11 (2009)
- 3) 朝日まどか, 池谷千咲, 吉良奈美子, 小西由佳, 小堀美佳, 辻ひとみ, 綱井典子, 村山涼子, 大和亜紗, 山本咲也夏, 宮田堅司: 本誌 65, 1 (2010)
- 4) R. Rugh: *The Mouse, Its Reproduction and Development* (Burgess Publishing), 253 (1968)
- 5) B.J.Cowland, T.Muta and N.Borregaard: *J. Immunol.*, 176, 5559 (2006)
- 6) N.Ouchi, A.Higuchi, K.Ohashi, Y.Oshima, N.Gokce, R.Shibata, Y.Akasaki, A.Shimono and K.Walsh: *Science*, 329, 454 (2010)
- 7) P.Tontonoz, A.R.Graves, I.A.Budavari and M.B.Spiegelman: *Genes & Dev.*, 8, 1224 (1994)
- 8) E.D.Rosen, C.-H.Hsu, X.Wang, S.Sakai, M.W.Freeman, F.J.Gonzalez, and B.M.Spiegelman: *Genes & Dev.*, 16, 22 (2002)