

マウスリンパ組織のレプチンレセプター 発現細胞の検出

阪口 恵子, 佐藤 紘子, 徳永 雅美, 西津 景子,
久湊 尚子, 松永美沙子, 宮田 堅司

Identification of leptin receptor-expressing cells
in lymphoid tissues of the mouse

Keiko Sakaguchi, Hiroko Satoh, Masami Tokunaga, Keiko Nishitsu,
Shyoko Hisaminato, Misako Matsunaga and Kenji Miyata

Leptin, the product of the *ob* gene expressed in adipocytes, is shown to influence energy intake and expenditure, proliferation of CD⁴⁺ T cells, neovascularization and intracellular triglycerides homeostasis in non-adipocytes. Leptin acts on target cells through receptor (OB-R). There are at least five different types of OB-R in mouse due to alternative splicing from *db* gene transcripts. OB-Ra ~ OB-Rd share identical extracellular and transmembrane domains and JAK binding consensus sequence at cytoplasmic domain. Only OB-Rb has an additional STAT binding motif and is essential for most of leptin's physiological functions through JAK-STAT pathway. OB-Ra is also reported to transduce weakly leptin's signal through JAK-phosphorylation pathway.

On this paper we examined which kinds of cell express OB-Ra or OB-Rb in lymphoid and fat tissues of the mouse. Both types of OB-R were detected in thymus, spleen and gastrolienal fat tissue by RTPCR method, then the constitutive cells were separated from dissected tissues and cultured in GIT medium with 10% heat-inactivated FBS. Primary cultured lymphocytes isolated from thymus or spleen expressed both OB-Ra and OB-Rb. On the other hand, in adhesive cells dispersed with enzymatic digestion and primary cultured OB-Rb was not detected, though OB-Ra detectable. Similarly, primary cultured adhesive cells of gastrolienal fat tissue expressed only OB-Ra. It is therefore most parsimonious to conclude that only lymphocytes express OB-Rb and response effectively to leptin in thymus.

I. はじめに

脂肪細胞の産生するレプチンは、エネルギー摂取を抑制し消費を促すホルモン作用のみでなく、サイトカインとして種々の生理機能を有していることが明らかにされつつある。レプチンはレセプター (OB-R) を介して標的細胞に作用する^{1,2)}。マウスでは *db* 遺伝子の転写産物である pre-mRNA のスプライシングの違いにより、少なくとも OB-Ra ~ OB-Re の5種類のレセプターが存在する¹⁻³⁾。OB-

Ra ~ OB-Rd 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。OB-Re 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、OB-Rb は302アミノ酸残基からなる最も長い細胞内領域を持ち、OB-R Long type (OB-RL) とも呼ばれている。

前報において⁴⁾、マウスのリンパ組織における OB-Rb の発現を検討し、一次リンパ性器官である胸腺、および二次リンパ性器官である脾臓、リンパ節およびパイエル板で OB-Rb が発現していること、さらに、胸腺および脾臓から分離したリンパ球

が OB-Rb を発現していることを明らかにした。リンパ組織では、上皮様の細胞がネットワーク構造をとり枠組みを構成している。これらの細胞間隙にリンパ球やマクロファージが存在する。また、結合組織性の被膜やトラベキュラには線維芽細胞などの結合組織性細胞が存在する。これらの細胞の中でリンパ球は浮遊性であり、その他の細胞は付着性を示す。したがって、リンパ組織を酵素処理することにより分散させた細胞集団を培養すれば、リンパ球以外の付着性細胞の集団を得ることができる。本報では、胸腺および脾臓で OB-Ra および OB-Rb を発現している細胞の同定を試みた。また、脂肪組織の構成細胞についても同様の検討を行った。

II. 方 法

1. 材 料

3 週齢の雌 BALB/c マウス (体重 9~12 g, SLC) を用いた。

1) 器官, 組織の抽出

頸椎脱臼後開腹開胸し、胸腺、脾臓、胃脾間膜脂肪組織を摘出した。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。

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 GIT 培養液 (日本製薬) で洗浄後、10% FBS を加えた GIT 培養液で培養した。1 日後遠心操作により得た細胞ペレットを生理食塩水 1 ml に再懸濁し、マウスリンパ球分離溶液 Lympholyte-M (Cedarlane Labo. Ltd., Canada) 2 ml に重層した。 10°C , 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。生理食塩水で洗浄後、遠心操作により細胞を回収した⁴⁾。細胞ペレットを液体窒素中で凍結した後、 -80°C で保存した。

3) 付着性細胞の分離

無菌的に摘出した胸腺、脾臓および胃脾間膜脂肪を 5 ml 生理食塩水中で細切した。2.5% トリプシン液 (大日本製薬) 0.5 ml を加え、 37°C , 5 分間インキュベートした。GIT 培養液 5 ml を加え、ピペ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 35 mm, IWAKI) に播種した。48 時

間後に培養液を交換することにより浮遊細胞を取り除いた。その後 3~4 日毎に培養液を交換しながら、ほぼコンフルエントな状態になるまで培養を継続することにより付着性細胞集団を得た。

2. RNA の抽出

1) 器官, 組織およびリンパ球の RNA の抽出

凍結した器官, 組織およびリンパ球より、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、エタノール沈殿法により精製した^{5,6)}。

2) 付着性細胞の RNA の抽出

付着性の細胞がほぼコンフルエントな状態になった後にトータル RNA を抽出した。生理食塩水 1 ml で培養ディッシュを 2 回洗浄し、顕微鏡下に細胞が付着していることを確認後水上で冷却した。800 μl のグアニジウムチオシアン酸溶液を加え、ピペティング操作により細胞を溶解させた後エッペンチューブに移した。その後、酸性グアニジウムチオシアン酸—フェノール—クロロホルム法にしたがってトータル RNA を抽出し、エタノール沈殿法により精製した。

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 リバーシトランスクリプターゼ (RT-PCR high, 東洋紡), 6 塩基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、OB-R 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 OB-Ra および OB-Rb を検出するために、下記の 3 種類のプライマーを準備した。

プライマー OBR-F3

5' p-ACACTGTTAATTTTCACACCAGAG

プライマー OBR-B2

5' p-TGGATAAACCCCTTGCTCTTCA

プライマー OBR-B4

5' p-ATTTGAACTCAGGACCTTTGGA

プライマー OBR-F3 と OBR-B2 との組み合わせによって、マウスのレプチンレセプターの中で、OB-Rb の cDNA の膜貫通領域から細胞質側領域の 446 塩基対の DNA フラグメントが増幅され⁶⁾、プライマー OBR-F3 と OBR-B4 との組み合わせによって OB-Ra の cDNA の膜貫通領域から細胞質側領域の 657 塩基対の DNA フラグメントが増幅される^{3,7)}。

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, 反応産物溶液 10 μ 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 (λ /Hind III) 0.5 μ g を同時に電気泳動し, 増幅されたバンドの大きさを確認した。

4. ジェノミック DNA の抽出

凍結した脾臓の組織片より, 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⁸⁾。

Ⅲ. 結 果

1. リンパ性器官および脂肪組織のレプチンレセプターの検出

胸腺, 脾臓, 胃脾間膜脂肪のトータル RNA 1 μ g を鋳型として RTPCR を行った。胸腺および脾臓では OB-Ra および OB-Rb の発現をあらゆる明瞭な増幅バンドが認められた (図1)。胃脾間膜脂肪組織では OB-Ra の増幅バンドは認められたけれども, 試料によっては OB-Rb の明瞭な増幅バンドは認められなかった (図2)。

2. リンパ球のレプチンレセプターの検出

胸腺および脾臓から培養分離したリンパ球から精

製したトータル RNA 約 300 ng を鋳型として RTPCR を行った。いずれのリンパ球においても, OB-Ra および OB-Rb の発現を示す増幅バンドが認められた (図3)。

3. 胸腺および脾臓の付着性細胞のレプチンレセプターの検出

トリプシン処理により分離してくる細胞を10日間以上培養し, 付着性の細胞集団を得た。この細胞集団を顕微鏡観察すると, 胸腺では, 線維芽細胞, 胸腺上皮様の細胞, 樹状細胞, 敷石状にコロニーを形成した細胞が多く認められ, さらに, マクロファージや脂肪滴を蓄積した細胞も認められた。脾臓では, 線維芽細胞, 杆状の細胞, マクロファージが多く認められた。これらの付着性の細胞集団から精製したトータル RNA 約 300 ng を鋳型として RTPCR を行った。いずれの場合にも, OB-Ra の発現を示す増幅バンドが認められた。OB-Rb の発現を示すバンドは認められなかった (図4)。

4. 胃脾間膜脂肪組織の付着性細胞のレプチンレセプターの検出

胃脾間膜をトリプシン処理することにより分離してくる細胞を10日間以上培養し, 付着性の細胞集団を得た。この細胞集団には線維芽細胞および敷石状にコロニーを形成した細胞が認められた。これらの

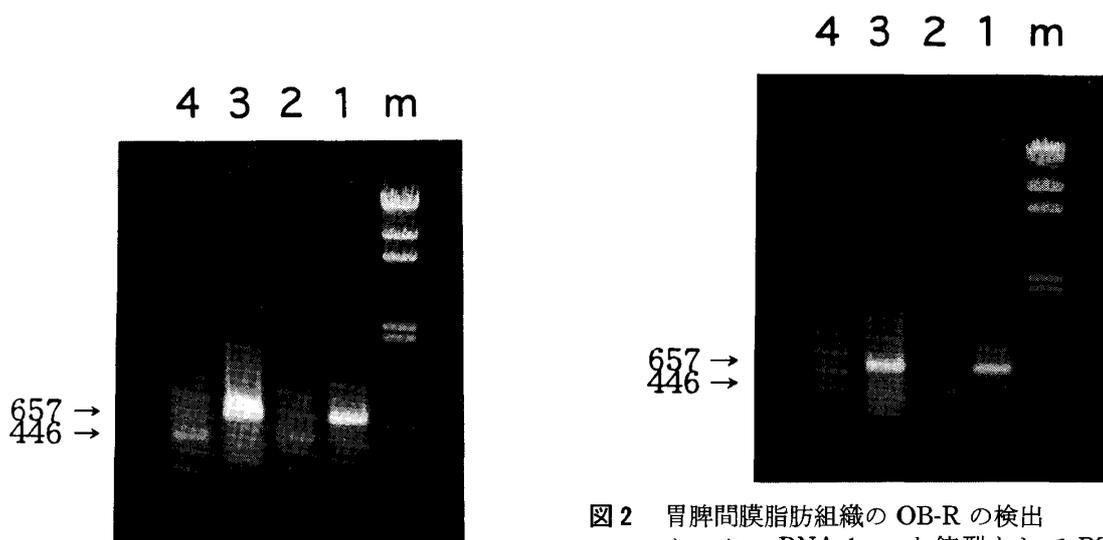


図1 胸腺および脾臓の OB-R の検出
トータル RNA 1 μ g を鋳型として RTPCR を行った。いずれの器官においても OB-Ra および OB-Rb に特異的な 657 b.p. および 446 b.p. の増幅バンドが認められた。
レーン: m; マーカー DNA, 1; 胸腺 OB-Ra, 2; 胸腺 OB-Rb, 3; 脾臓 OB-Ra, 4; 脾臓 OB-Rb

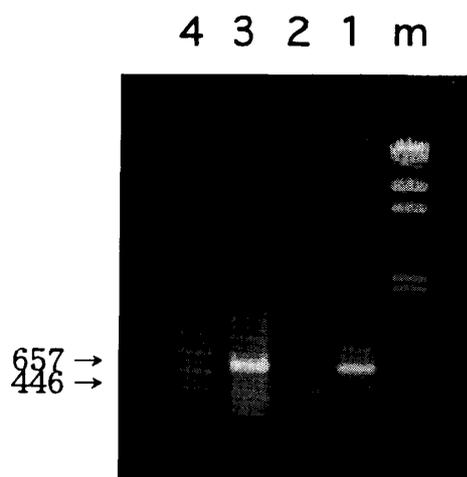


図2 胃脾間膜脂肪組織の OB-R の検出
トータル RNA 1 μ g を鋳型として RTPCR を行った。試料 A では OB-Ra および OB-Rb に特異的な増幅バンドが認められた。試料 B では OB-Ra の増幅バンドは認められたけれども, OB-Rb に特異的なバンドは認められなかった。
レーン: m; マーカー DNA, 1; 試料 A OB-Ra, 2; 試料 A OB-Rb, 3; 試料 B OB-Ra, 4; 試料 B OB-Rb

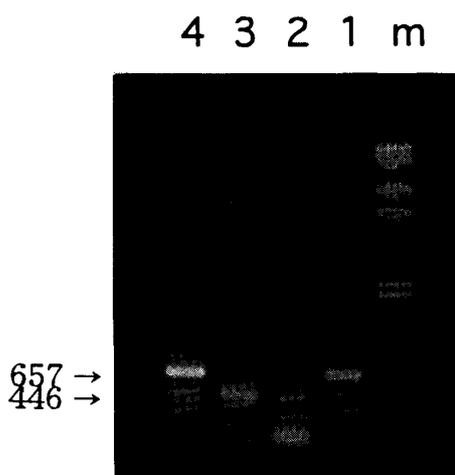


図3 リンパ球のOB-Rの検出
胸腺および脾臓から遊離した細胞を24時間培養し付着細胞を取り除いた。非付着性細胞からリンパ球分離溶液を用いて分離したリンパ球のトータルRNA約300 ngを鋳型としてRT-PCRをおこなった。胸腺および脾臓リンパ球ともにOB-RaおよびOB-Rbに特異的な増幅バンドが認められた。
レーン：m；マーカーDNA，1；胸腺リンパ球OB-Ra，2；胸腺リンパ球OB-Rb，3；脾臓リンパ球OB-Rb，4；脾臓リンパ球OB-Ra

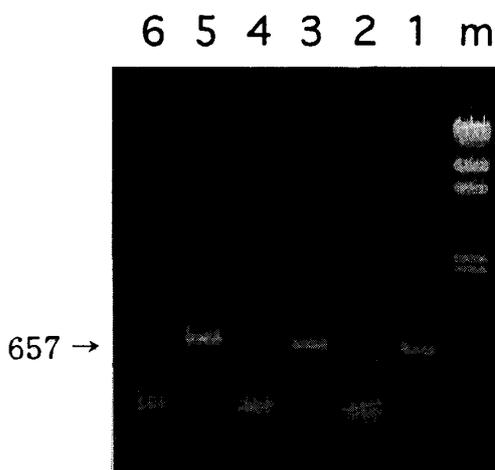


図4 付着性細胞のOB-Rの検出
胸腺，脾臓，および胃脾間膜脂肪から分離培養した付着性細胞のトータルRNA約300 ngを鋳型としてRT-PCRをおこなった。いずれの付着性細胞でもOB-Raに特異的な増幅バンドが認められたけれども，OB-Rbに特異的なバンドは認められなかった。
レーン：m；マーカーDNA，1；胸腺付着性細胞OB-Ra，2；胸腺付着性細胞OB-Rb，3；脾臓付着性細胞OB-Ra，4；脾臓付着性細胞OB-Rb，5；胃脾間膜脂肪付着性細胞OB-Ra，6；胃脾間膜脂肪付着性細胞OB-Rb

付着性の細胞集団から精製したトータルRNA約300 ngを鋳型としてRT-PCRを行った。OB-Raの発現を示す増幅バンドは認められたけれども，OB-Rbの発現を示すバンドは認められなかった（図4）。

5. ジェノミックDNAを鋳型とするPCR

次に，これらの446塩基対あるいは657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。脾臓から抽出したDNA 0.1，0.5および1.0 μgを鋳型としてPCRを行ったけれども，いずれの増幅バンドも認められなかった。

IV. 考 察

マウスレプチンのレセプターには，同一の遺伝子転写産物のスプライシングの違いにより5種類のアイソタイプOB-Ra～OB-Reが存在することが知られている¹⁻³⁾。これらの細胞外領域のアミノ酸配列は同一であり，レプチン結合サイトを有している。OB-Ra～OB-Rdは21アミノ酸残基からなる共通の膜貫通領域を持ち，さらに膜貫通領域に続く細胞質内のアミノ酸29残基も共通している。この領域にはJAK (Janus kinase) 結合サイトが存在する⁹⁾。OB-Rbは302アミノ酸残基からなる最も長い細胞質内領域を有し，STAT (Signal transducer and activator of transcription) と相互作用するモチーフおよびチロシン3残基が存在する¹⁰⁾。OB-Rbにレプチンが作用すると，細胞質内領域に結合しているJAK2がリン酸化され，リン酸化されたJAK2によりSTAT3がリン酸化され細胞核にシグナルを伝える。SHP-2 (SH2 domain containing protein tyrosine phosphatase 2) によってJAK2が脱リン酸化されて応答が終了すると考えられている^{12,13)}。したがって，レプチンの種々の生理機能の発現にはOB-Rbが寄与していると考えられており，器官，組織レベルでの発現部位が多数報告されている^{2,3,13-17)}。マウスの脳では，RT-PCR法^{2,7)}，RNase protection法¹³⁾，in situ hybridization法^{14,15)}により脈絡叢や視床下部でOB-Rbが強く発現していることが示されており，神経細胞が発現していると考えられている。細胞レベルで調べた報告もなされており，ヒト末梢血から分離したCD4+リンパ球がOB-Rbを発現している¹⁶⁾。また，合成ペプチドを抗原とするウサギ抗OB-Rポリクローナル抗体により，ヒト臍帯静脈内皮細胞がOB-Rbを発現していることが示された¹⁷⁾。

脈絡叢や，その他多くの組織で発現しているOB-

Ra の機能は明らかでない。しかし、OB-Ra および JAK を発現している COS-1 形質転換細胞では、JAK のリン酸化に始まり MAPK 経路が活性化されることより、OB-Ra もシグナル伝達能を有していると示唆されている¹¹⁾。その他のアイソタイプの機能は明らかにされていないけれども、OB-Re はその構造からレプチンの運搬やクリアランスに関与していると考えられている¹⁾。

本報では、膜貫通領域と細胞質領域の境界域に対する共通のリバースプライマーと、それぞれに特異的な細胞質領域に対するフォワードプライマーとを用いて、胸腺および脾臓、脂肪組織の付着性細胞の OB-Ra および OB-Rb の検出を試みた。胸腺や脾臓から分離培養した付着性の細胞としては線維芽細胞、上皮様細胞、樹状細胞が多く認められる。これらの細胞集団では OB-Ra が検出されたけれども、OB-Rb は検出されなかった。前報では、一次および二次リンパ組織において OB-Rb が発現していること、および胸腺および脾臓から分離したリンパ球が OB-Rb を発現していることを報告した⁴⁾。したがって、胸腺および脾臓において発現している OB-Rb はリンパ球に由来するものであることが明らかとなった。マウス胸腺では、遅くとも3週齢時には脂肪細胞が存在しレプチンを産生している⁶⁾、OB-Rb を介してレプチンがサイトカインとしてリンパ球に作用していることが示唆された。胸腺内ではこの伝達経路はリンパ球特異的と考えられ、リンパ球の分化等に関与していることが示唆される。OB-Ra はリンパ球および付着細胞で発現しており、ホメオスタティックな機能に関与すると考えられる。たとえば、レプチンの新しい機能として種々の細胞の脂肪酸およびトリグリセリド量のホメオスタシスに関与することが示唆されている¹⁸⁾。

マウス脂肪組織では OB-Rb が極微量発現していることが報告されている^{2,13)}。胃脾間膜脂肪組織では OB-Rb の発現を示すバンドが認められない試料も存在した。同一試料で同時に RTPCR を行い、共通のリバースプライマーを用いて OB-Ra は検出されるので、鋳型とした RNA が分解されたり、逆転写反応や PCR の段階に障害が存在するとは考え難い。今回、胃脾間膜の一次培養した付着性の細胞集団では OB-Rb の発現は認められなかった。したがって、脂肪組織中に混在するリンパ球数によって OB-Rb の検出結果が異なる可能性が示唆された。このことは、これまで報告されている種々の器官・組織での OB-Rb の発現に関する結果が異なること

の説明となり得る。たとえば、腎臓や肺では発現していないとの報告^{2,13)}、および発現しているとの報告^{3,15)}の両者が存在する。この矛盾は、試料中にリンパ球が多く混在してくるかどうかに基づく可能性が高い。したがって、組織レベルではなく、どの種類の細胞が発現しているのかを解明することが重要となる。そのためには、組織切片を用いた *in situ* ハイブリダイゼーション法による検討や、各器官の細胞を分離して検討することが必要となる。

以上より、胸腺および脾臓で、非付着性細胞であるリンパ球と付着性細胞集団とに分離し OB-R の発現を調べ、リンパ球のみが OB-Rb を発現していることを明らかにした。付着性の細胞集団では OB-Rb が検出されなかったもので、これらの細胞をさらに分離することは試みなかった。ただし、付着性細胞集団のなかで培養中に分裂増殖しない少数の細胞が OB-Rb を発現している可能性は存在する。脂肪組織の付着性細胞も同様であった。

V. 要 約

BALB/c 雌 3 週齢マウスの胸腺、脾臓、および胃脾間膜脂肪組織でレプチンレセプター OB-Ra および OB-Rb が発現していることを明らかにした。また、これらの器官・組織を構成する細胞を一次培養することにより、どの種類の細胞が発現しているのかを検討した。胸腺および脾臓のリンパ球は OB-Ra および OB-Rb を発現していた。付着性の細胞は OB-Ra を発現していたけれども OB-Rb は検出されなかった。胃脾間膜脂肪組織の付着性細胞でも OB-Ra は検出されたけれども OB-Rb は検出されなかった。5 種類のレセプターの中で OB-Rb が JAK-STAT 経路を介してシグナル伝達に関与するとされている。したがって、胸腺で加齢に伴って増殖してくる脂肪細胞が産生するレプチンが、サイトカインとしてリンパ球のみに作用している可能性が示唆された。

文 献

- 1) J. M. Friedman and J. L. Halaas: *Nature*, **395**, 763 (1998)
- 2) 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)
- 3) H. Chen, O. Charlat, L. A. Tartaglia, E. A. Woolf, 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)
- 4) 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)
 - 5) P. Chomczynski and N. Sacchi: *Analytical Biochem.*, **162**, 156 (1987)
 - 6) 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)
 - 7) 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. Woolf, C. A. Monroe and R. I. Tepper: *Cell*, **83**, 1263 (1995)
 - 8) J. Sambrook, E. F. Fritsch and T. Maniatis: *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, 2nd ed, 9.16 (1989)
 - 9) M. Narazaki, A. B. Witthuhn, K. Yoshida, O. Silvennoinen, K. Yasukawa, N. J. Ihle, T. Kishimoto and T. Taga: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 2285 (1994)
 - 10) H. Baumann, J. A. Symes, R. M. Comeau, K. K. Morella, Y. Wang, D. Friend, F. S. Ziegler, S. J. Fink and P. D. Gearing: *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 138 (1994)
 - 11) C. Björbek, S. Uotani, B. da Silva and Jeffrey S. Flier: *J. Biol. Chem.*, **272**, 32686 (1997)
 - 12) C. Li and J. M. Friedman: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 9677 (1999)
 - 13) N. Ghilardi, S. Ziegler, A. Wiestner, R. Stoffel, M. H. Heim and R. C. Skoda: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 6231 (1996)
 - 14) J. G. Mercer, N. Hoggard, L. M. Williams, C. B. Lawrence, L. T. Hannah and P. Trayhurn: *FEBS Lett.*, **387**, 113 (1996)
 - 15) H. Fei, H. J. Okano, C. Li, G.-H. Lee, C. Zhao, R. Darnell and J. Friedman: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 7001 (1997)
 - 16) G. M. Lord, G. Matarese, J. K. Howard, R. J. Baker, S. R. Bloom and R. I. Lechler: *Nature*, **394**, 897 (1998)
 - 17) 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)
 - 18) R. H. Unger, Y. -T. Zhou and L. Orci: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 2327 (1999)