

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成23年7月29日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21591169

研究課題名（和文）脂肪細胞分化における癌抑制遺伝子候補 BEC1/TUSC5 の役割

研究課題名（英文） The role of tumor suppressor candidate 5 (BEC1/TUSC5) in adipocyte differentiation

研究代表者

龍野 一郎 (TATSUNO ICHIRO)

千葉大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号：80282490

研究成果の概要（和文）：

我々が同定した Brain Endothelial Cell Derived Gene-1(BEC1)は、ヒト Tumor Suppressor Candidate 5(TUSC5)の相同遺伝子であることが明らかとなり、脂肪組織で強発現している特徴がある。TUSC5 はヒト前駆脂肪細胞分化の過程で発現が誘導されるが、PPAR γ の標的遺伝子である可能性が示唆された。また、生化学的解析から TUSC5 は複数のリン酸化を受けることが明らかとなった。TUSC5 は PPAR γ によって発現誘導され、リン酸化シグナルを受ける脂肪特異的分子であり、エネルギー・代謝変化における脂肪細胞機能調節に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

We have previously identified brain endothelial cell derived gene-1 (BEC-1) as a gene dominantly expressed in rat brain endothelial cells using suppression subtractive hybridization technique. Surprisingly, BEC-1 gene was thought to be a rat tumor suppressor candidate 5 (TUSC5), since this gene had considerable homology with both mouse TUSC5 and human located at seventeen-p-thirteen point three 1 (LOST1) categorized as human TUSC5. The expression of TUSC5 and adiponectin mRNA was induced drastically during the differentiation followed by PPAR γ -accumulation. Furthermore pioglitazone, a PPAR γ ligand, facilitated dose-dependent induction of TUSC5 as well as differentiation in both human preadipocytes and mouse 3T3-L1 cells. Thus, TUSC5 is a PPAR γ inducible gene and may play a role for the regulation of adipocyte function.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2009年度 | 1,500,000 | 450,000 | 1,950,000 |
| 2010年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 2011年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内分泌学

キーワード：癌、糖尿病、脂質代謝、発生・分化、脂肪

1. 研究開始当初の背景

高脂血症・耐糖能異常・高血圧などを合併し高率に動脈硬化性疾患を発症するメタリックシンドロームの病態の中心にはインスリン抵抗性と内臓肥満がある。

この10年間で、摂食やエネルギー代謝調節に関わる遺伝子が相次いで同定され、肥満発症機序や肥満治療のターゲットとして非常に注目を集めている。肥満の成因として、脂肪細胞の肥大化など脂肪組織での何らかの異常が病態の中心に位置していることは言うまでもないが、脂肪細胞は体内エネルギーの貯蔵源としての脂肪の産生、貯留、分解代謝を行うだけでなく、様々な刺激に応じて、レプチン、サイトカイン、ホルモンなど摂食やエネルギー代謝調節に関わる分子達を産生・分泌する機能があることも次第に明らかにされてきた。従って、脂肪細胞の発生や分化のメカニズムとその調節機構の破綻は、肥満・糖尿病・高脂血症などの代謝疾患の病態や発症に中心的役割を果たしているものと考えられ、その制御分子の探索と作用メカニズムの研究は、最近もっとも注目を集めている分野のひとつとして、世界中で精力的に解析が進められている。

我々は動脈硬化の成因に重要な血管内皮細胞に関する研究（神経栄養因子による脳血管新生の制御：基盤研究 C, 平成 13-14 年度・脳血管内皮細胞から同定された二つの新規遺伝子 (BEC1, 2) の機能：基盤研究 C, 平成 17-18 年度)を進める中で、ラット脳血管内皮細胞に優位に発現する遺伝子として Brain endothelial derived gene-1 (BEC1) をクローニングした (Shibata, T., et al, J Atheroscler Thromb 2005)。非常に興味深いことに、BEC1 は脂肪組織に強く発現しており、さらには血管内皮細胞だけでなく、副腎や中枢神経系などいくつかの臓器に発現していることを報告してきた (Shibata, T., et al, Mol Cell Endocrinol 2007)。更に、我々は BEC-1 が白色脂肪組織 (WAT) と褐色脂肪組織 (BAT) の両者に存在し、BAT では寒冷刺激によって減少する機能的な分子であることを明らかにした。一方、驚いたことに、ヒトの肺がんで高頻度に欠失している遺伝子領域 (LOH) 上に存在する遺伝子のひとつとして同定された Tumor Suppressor Candidate 5

(TUSC5) が (Konishi, H., et al, Oncogene 2003)、実は我々が同定した BEC1 のヒト及びマウスホモログであることが判明し、アミノ酸レベルでそれぞれ 75%、97% と非常に高い相同性を示していることがわかった。更にデータベースサーチでノバルティス研究財団ゲノミクス研究所の Gene Chip データを調べてみると、TUSC5 が脂肪組織で強発現しており、また副腎や交感神経節・胎児中枢神経系などの特定の組織に発現を認めるなど我々の結果と同様の分布パターンを示していた。加えて、BEC1/TUSC5 の配列構造を詳しく検討してみると、リン酸化や糖化そしてファルネシル化など様々な細胞内修飾を受けるアミノ酸配列や膜タンパク配列を有していたり、CD225 などの機能的モチーフが存在していたりする。これらのエビデンスは、BEC1/TUSC5 が癌抑制遺伝子候補として推定されながらも、高発現している脂肪細胞において何らかの重要な生理作用を発揮しているのではないかと、という予想外でもおもしろい可能性を強く示唆している。

2. 研究の目的

BEC1/TUSC5 遺伝子の生理的役割とその作用分子メカニズムを解明する目的で、特に脂肪細胞分化におけるその役割に焦点を当てて in vivo および in vitro の解析を行う。

3. 研究の方法

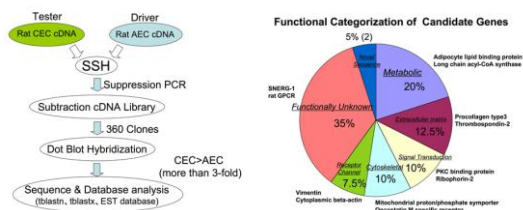
本研究のメインテーマは、癌抑制遺伝子候補であるが全く機能のわかっていない BEC1/TUSC5 遺伝子が、どうして脂肪細胞に強く発現しているのか？この遺伝子にはどんな生物学的・病態生理学的意義があるのか？という疑問を根本から明らかにすることである。そこで、BEC1/TUSC5 遺伝子の生理的役割とその作用分子メカニズムを解明するために、2つの異なるシステムを用いてアプローチを行なう。ひとつは、生理的役割をクリアーにするための KO マウスを用いた動物モデルの解析である。もうひとつは、作用機序を明らかにするための、プロテオミクスを用いた結合分子群の同定である。前述したように BEC1/TUSC5 は癌抑制遺伝子の候補でもありが同時に、神経系などにも比較的多く発現していることから、様々な機能を有してい

の可能性が考えられる。本研究では特に、「肥満と脂肪細胞の分化」におけるその役割と作用機序の解明に焦点を当てるため、in vitro と in vivo の解析について行なった。

4. 研究成果

マウス MC3T3-L1 による脂肪細胞分化モデルにおいて、分化刺激によって脂肪細胞分化の転写因子である PPAR- γ や分化マーカーの adiponectin の誘導、更に脂肪滴形成などの形態変化が観察された。BEC1/TUSC5 は、分化に伴って経時的にその発現が誘導された。さらにヒト前駆脂肪細胞の初代培養においてもマウスと同様に、BEC1/TUSC5 が、分化に伴

Fig. 1. Screening for Genes, Dominantly Expressed in Rat Cerebral Endothelial Cells by Suppression Subtractive Hybridization



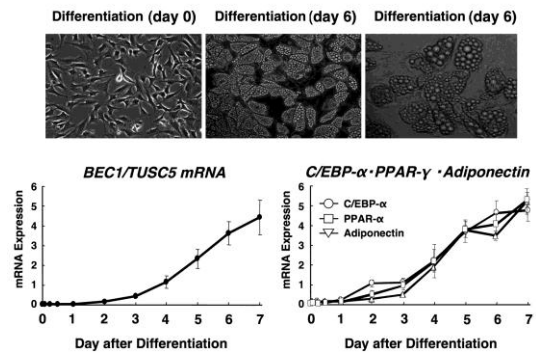
って顕著に発現増強してくることが明らかとなった。またマウスやヒト脂肪組織において、BEC1/TUSC5 はタンパク質レベルで発現していることが確認され、種を超えて脂肪に強く発現することから、脂肪において何らかの機能をもつことが予測された。高脂肪食負荷によるマウスの肥満誘発モデルにおいて、その発現を検討すると、体重増加に伴い脂肪組織での BEC1/TUSC5 の発現量が増強することが判明した。そこで、TUSC5 KO を作成した。TUSC5 KO は、妊孕性を示し明らかな外表奇形や行動異常は認めなかった。生後の体重推移は、WT に比較して著明な変化はみられず、中性脂肪や総コレステロールについても明らかな差は認めなかった。TUSC5 KO の脂肪組織における機能的フェノタイプを明らかにする目的で、高脂肪食負荷前後の遺伝子発現プロファイルについて、マイクロアレイを用いて WT と比較解析した。acyl-CoA dehydrogenase や hydroxyacyl-CoA dehydrogenase など脂肪酸分解に関与する遺伝子が、WT において高脂肪食負荷で増加す

Fig. 2. Homology of BEC-1 to Tumor Suppressor Candidate 5 (TUSC5)

| | | |
|------------|---|-----|
| ratBEC-1 | MANPQ---PQLDQPGSTPLDPEMEKLLTKVENKDDQALNLSKLSGALLDQNGHSL | 57 |
| mouseTUSC5 | MANPA---PPLDQPGSTPLDPEMEKLLTKVENKDDQALNLSKLSGALLDQNGHSL | 57 |
| humanTUSC5 | MAHPVQSEFPFAQDQPGSAASLDLPEMEILLTKAENKDDKTLNLSKLSGALLDQNGHSL | 60 |
| ratBEC-1 | PFKVISRGRQPSLGGSPSRASSRASSVVTTSYAGDQAFKDFLALASCFPCPWFNL | 117 |
| mouseTUSC5 | PFKVISRGRQPSLGGSPSRASSRASSVVTTSYAGDQAFKDFLALASCFPCPWFNL | 117 |
| humanTUSC5 | PFKAISEHGLAFLPRSPRASSRASSIATTSYAGDQAFKDFLALAVACFCPWFNL | 120 |
| ratBEC-1 | LPLIFPINSRSSVQGGDLGARRLGRRLARLLSITFIIIGLVIIVAVTVNFTVPR | 173 |
| mouseTUSC5 | LPLIFPINSRSSVQGGDLGARRLGRRLARLLSITFIIIGLVIIVAVTVNFTVPR | 173 |
| humanTUSC5 | LPLIFPINSRSSVQGGDLGARRLGRRLARLLSITFIIIGLVIIVAVTVNFTVPR | 177 |

| SeqA Name | amino acids | SeqB Name | amino acids | Score (%) |
|-------------|-------------|-------------|-------------|-----------|
| ratBEC-1 | 173 | mouse TUSC5 | 173 | 97 |
| ratBEC-1 | 173 | human TUSC5 | 177 | 75 |
| mouse TUSC5 | 173 | human TUSC5 | 177 | 74 |

Fig. 3. Changes in TUSC5 Expression during Adipocytes Differentiation

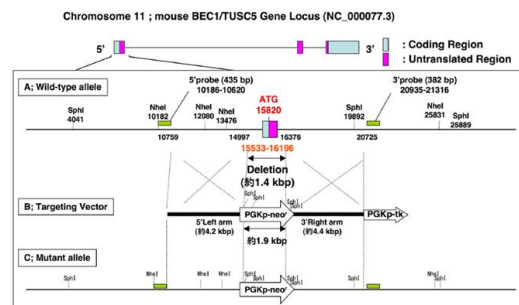


るのに対し、TUSC5 KO ではその発現誘導が抑制されていた。

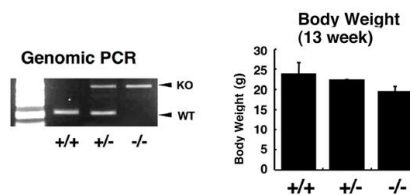
癌抑制候補遺伝子 BEC1/TUSC5 は、ヒト及びマウスの脂肪組織に強く発現し、脂肪細胞の分化に応じて誘導を受ける遺伝子であり、その機能のひとつとして、成熟脂肪細胞における脂質代謝機能調節に関与していることが推定された。

今後、病態解析を通じた肥満マーカーの開発や新規の肥満治療薬の開発につながる事が期待できる。

Fig. 4. Generation of TUSC5/BEC-1 Knockout Mouse



| | | F1 | | | F2 | | |
|----|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | | +/+ | +/- | -/- | +/+ | +/- | -/- |
| ES | ♂ | | 9 | | 2 | 4 | 4 |
| | ♀ | | 3 | | 3 | 4 | 3 |



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件) 全査読有

- Ikari J, Tanabe N, Tatsuno I, Yamanaka M, Sakao S, Tada Y, Kurosu K, Kasahara Y, Takiguchi Y,

- Tatsumi K. (2011) ACTH deficiency and PGI(2) therapy in chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Int J Cardiol.* 146(3):449-50.
2. Tatsuno I, Sugiyama T. (2011) Glucocorticoid-induced diabetes mellitus is a risk for vertebral fracture during glucocorticoid treatment. *Diabetes Res Clin Pract.* [Epub ahead of print].
 3. Sugiyama T, Suzuki S, Yoshida T, Mayama T, Hashimoto N, Suyama K, Tanaka T, Sueishi M, Tatsuno I. (2011) Age, Initial Dose and Dose Increase are Independent Risk Factors for Symptomatic Vertebral Fractures in Glucocorticoid-Treated Male Patients. *Intern Med.* 50(8):817-24.
 4. Tatsuno I, Suzuki S, Yoshida T, Nagano H, Hashimoto N, Mayama T, Tanaka T, Sugiyama T. (2011) Disease-related risk of vertebral fracture during glucocorticoid treatment in collagen vascular diseases. *J Rheumatology* (in press), 2011.
 5. 吉田知彦、田中知明、龍野一郎 (2011) RAGE シグナルにおける骨芽/破骨細胞 クロストーク。 *Osteoporosis Japan* Vol. 19, No4, 2011 p120-123.
- [学会発表] (計 18 件)
1. 永野秀和、田中知明、鈴木佐和子、橋本直子、龍野一郎、横手幸太郎 (2011) (口演) p53 下流遺伝子 DPYSL4 の同定とヒト脂肪細胞におけるエネルギー産生・酸素消費調節機構の解析。第 54 回日本糖尿病学会年次総会、5 月 21 日、札幌。
 2. 田中知明、橋本直子、龍野一郎、横手幸太郎 (2011) (口演) ゲノムワイドの解析を用いた p53 による核初期化・細胞老化のメカニズム。第 54 回日本糖尿病学会年次総会、5 月 20 日、札幌。
 3. 内田大学、中村 晋、吉田知彦、龍野一郎 (2011) (口演) 2 型糖尿病合併高血圧に対するアリスキレンの有用性と安全性の検討。第 54 回日本糖尿病学会年次総会、5 月 19 日～21 日、札幌。
 4. 鈴木佐和子、田中知明、永野秀和、龍野一郎、横手幸太郎 (2011) (YIA 審査口演) 転写因子 p53 による Phosphate Activated Glutaminase (GLS2) を介した新たな細胞内代謝調節機構。第 54 回日本糖尿病学会年次総会、5 月 19 日、札幌。
 5. 龍野一郎、寺野隆、鈴木佐和子、吉田知彦、田中知明、横手幸太郎、中村貢、鈴木公典、窪田和子、池上宏、山口淳一 (2011) (口演) 日本人女性の骨折リスクと糖尿病 -千葉市骨粗鬆症健診 7 万人のデータ解析-。第 54 回日本糖尿病学会年次総会、5 月 19 日、札幌。
 6. 永野秀和、今田英美、橋本直子、鈴木佐和子、間山貴文、吉田知彦、陶山佳子、田中知明、龍野一郎、横手幸太郎 (2011) (ポスター口演) 成人健診を契機に発見された先天性副腎過形成 (CAH) の二例 第 84 回日本内分泌学会学術総会、4 月 23 日、神戸。

7. 永野秀和、田中知明、鈴木佐和子、橋本直子、鈴木穰、菅野純夫、龍野一郎、横手幸太郎 (2011) (口演) 新規 p53 下流遺伝子 DPYSL4 のエネルギー代謝・酸素消費調節に関わる機能調節。第 84 回日本内分泌学会学術総会、4 月 23 日、神戸。
8. 鈴木佐和子、田中知明、龍野一郎、横手幸太郎 (2011) (口演) 過去 10 年間に経験した AIMAH 症例の臨床内分泌学的特徴。第 84 回日本内分泌学会学術総会、4 月 23 日、神戸。
9. 吉田知彦、樋口誠一郎、佐久間一樹、永野秀和、今田映美、橋本直子、鈴木佐和子、間山貴文、陶山佳子、田中知明、龍野一郎、横手幸太郎 (2011) (ポスター口演) Incidental Pheochromocytoma の臨床的特徴 第 84 回日本内分泌学会学術総会、4 月 22 日神戸。
10. 間山貴文、鈴木佐和子、小出尚史、陶山佳子、吉田知彦、田中知明、龍野一郎、横手幸太郎 (2011) (ポスター口演) 片側副腎摘除術後 10 年の経過を追った ACTH 非依存性大結節性副腎過形成(AIMAH)によるサブクリニカルクッシング症候群(subCS)の 1 例 -subCS を合併する AIMAH 治療の課題-。第 84 回日本内分泌学会学術総会、4 月 22 日、神戸。
11. 今田映美、陶山佳子、吉田知彦、橋本直子、間山貴文、鈴木佐和子、永野秀和、佐久間一樹、田中知明、龍野一郎、佐伯直勝、横手幸太郎 (2011) (ポスター口演) TSH 産生下垂体腫瘍にたこつば型心筋症を合併し、心不全をきたした一例 第 84 回日本内分泌学会学術総会、4 月 22 日、神戸。
12. 橋本直子、田中知明、鈴木穰、菅野純夫、龍野一郎、横手幸太郎 (2011) (ポスター口演) 新規 p53 クロマチン複合体合因子 SP110 による P53/p21 経路を介した細胞老化制御機構の解析。第 84 回日本内分泌学会学術総会、4 月 21 日、神戸。
13. 間山貴文、田中知明、小出尚史、龍野一郎、横手幸太郎 (2011) (ポスター口演) 脂肪細胞における PPAR γ 標的遺伝子 Tumor Suppressor Candidate 5 (TUSC5) の生理作用。第 84 回日本内分泌学会学術総会、4 月 21 日、神戸。
14. 田中知明、渡邊裕哉、石川直文、須山佳子、龍野一郎、横手幸太郎 (2011) (口演) 遺伝子解析にて確定診断に至った家族性異常アルブミン性高サイロキシン血症 (FDH) の 2 家系。第 84 回日本内分泌学会学術総会、4 月 21 日～23 日、神戸。
15. 陶山佳子、潤間励子、長尾啓一、田中知明、桜井健一、龍野一郎、横手幸太郎 (2011) (口演) 若年随時尿糖陽性者 93 人における耐糖能に関する検討。第 84 回日本内分泌学会学術総会、4 月 21 日、神戸。
16. 鈴木佐和子、田中知明、永野秀和、鈴木穰、菅野純夫、龍野一郎、横手幸太郎 (2011) (口演) 転写因子 p53 による新たな細胞内体調節機構 -Phosphate Activated Glutaminase (GLS2) を介したグルタミン代謝とミトコンドリア機能調節-。第 84 回日本内分泌学会学術総会、4 月 21 日、神戸。

17. 龍野一郎、寺野隆、中村貢、鈴木公典、窪田和子、池上宏、山口淳 (2011) (口演) 千葉県骨粗鬆症健診 7 万人のデータから見た女性の骨折に及ぼす多様な危険因子の存在。第 84 回日本内分泌学会学術総会、4 月 21 日～23 日、神戸。
18. 杉山隆夫、龍野一郎 (2011) (口演) ステロイド骨粗鬆性脊椎骨折の実態とその危険因子－膠原病疾患特異的な骨折リスク上昇－。第 84 回日本内分泌学会学術総会、4 月 21 日～23 日、神戸。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

龍野 一郎 (TATSUNO ICHIRO)
千葉大学・大学院医学研究院・准教授
研究者番号：80282490

(2) 研究分担者

田中 知明 (TANAKA TOMOAKI)
千葉大学・大学院医学研究院・講師
研究者番号：50447299