

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24年5月25日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790079

研究課題名（和文）

脂肪細胞分化を促進する fad104 の肺形成における機能の解析

研究課題名（英文）

The roles of fad104, a positive regulator of adipogenesis, in lung maturation

研究代表者

西塚 誠 (Nishizuka Makoto)

名古屋市立大学・大学院薬学研究科・講師

研究者番号：00363953

研究成果の概要（和文）：

本研究において、脂肪細胞分化を促進する fad104 が肺の発生過程において、肺胞上皮 II 型細胞の分化・成熟にも極めて重要な役割を担うことを明らかにした。さらに、fad104 ホモ欠損マウスは骨形成にも異常が見られること、また、fad104 が骨分化を抑制する働きを有することを明らかにした。これらの検討により、fad104 の肺および骨における機能について極めて有用な知見を得ることができた。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we showed that novel gene fad104, a positive regulator of adipogenesis, has a crucial role for the differentiation of alveolar epithelial type II cells in lung maturation. Furthermore, we also demonstrated that fad104 was a potent inhibitor of osteoblast differentiation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：fad104, 脂肪細胞分化, 新生児疾患, 肺形成, 肺胞 II 型上皮細胞

1. 研究開始当初の背景

申請者らは脂肪細胞分化の分子メカニズムを明らかにすることを目的とし、これまでに脂肪細胞分化過程に極めて初期に発現が増加する遺伝子群を数多く単離し、その解析を進めてきた。単離した遺伝子の一つである

factor for adipocyte differentiation 104 (fad104) は、9つの fibronectin type III ドメインと膜貫通ドメインを有する新規遺伝子であり、過剰発現細胞および発現抑制系を用いた検討により、脂肪細胞分化を促進することを明らかにしてきた。

さらに申請者らは、生体内における fad104

の機能を解析するため、fad104のノックアウトマウスを樹立した。

その結果、大変興味深いことにfad104ホモ欠損マウスは、出生直後に死亡することが明らかになった。出生直後の胎児には脂肪組織はほとんどみられないため、fad104は出生直後には、脂肪組織とは異なる臓器において機能することにより、生命の維持にも極めて重要な役割を担う可能性が強く示唆された。そこで、出生直後のfad104ホモ欠損マウスの各臓器について組織切片を作製し、解析した結果、fad104ホモ欠損マウスは野生型マウスに比べて肺が小さく、さらに肺胞の開きが非常に狭いことが明らかになった。次に、肺組織におけるfad104の発現を検討した結果、肺胞の機能維持に必須なサーファクタントたんぱく質の発現、分泌に寄与する肺胞上皮II型細胞にfad104が発現していることを見出した。

これらの検討結果は、脂肪細胞分化を促進する遺伝子として単離したfad104が、出生直後には肺の形成、特に肺胞上皮II型細胞の機能に極めて重要な役割を担うことで、生命維持に寄与していることを強く示唆するものである。しかしながら、fad104がどのような分子メカニズムにより、肺の形成や肺胞上皮II型細胞の機能に関与しているかについては不明である。

Fad104の肺形成ならびにその機能維持における分子メカニズムを明らかにすることは、新生児における呼吸器系疾患の原因解明の糸口になると考えられた。

2. 研究の目的

申請者らはこれまでの検討により、fad104ホモ欠損マウスが出生直後に死亡すること、そしてその原因が肺形成、特に肺胞形成とその機能の破綻により引き起こされる可能性を示唆する結果を得ている。しかしながら、fad104がどのようなメカニズムにより、肺の形成、機能維持に寄与するかについては不明

である。そこで本研究では、肺胞上皮II型細胞の分化・成熟、機能維持におけるfad104の分子メカニズムを解明し、肺形成過程においてfad104が担う役割を明らかにする。

そのためにまず、電子顕微鏡によりfad104ホモ欠損マウスの肺胞上皮II型細胞の詳細な観察を行う。Fad104欠損による細胞の形態変化の検討に加えて、肺胞上皮II型細胞に存在する層板小体の形成状態を観察することにより、分化・成熟の度合いについても検討する。また、出生直後のfad104欠損マウスより肺を採取し、肺胞機能に重要な役割を担うサーファクタントたんぱく質の発現に加え、これまでに肺胞上皮細胞の分化に重要な役割を担うことが報告されているTyroid transcriptional factor (TTF)-1やFoxA2などの転写因子の発現についても解析することにより、肺形成におけるfad104の役割を明らかにする。

これまで脂肪細胞分化に関与する因子が肺形成にも大きく寄与するといった報告はない。そのため、肺形成および肺胞上皮II型細胞におけるfad104の分子メカニズムを明らかにする本研究は、肺形成および肺胞上皮II型細胞分化の新たな分子機構を解明するだけでなく、脂肪細胞分化と肺形成の接点を明らかにできる可能性があり、非常に独創性に富んだ研究である。

また、本研究で機能の解明をめざすfad104は、9つのfibronectin type IIIドメインと膜貫通ドメインを有する新規タンパク質である。これまでに肺形成に重要な遺伝子は多数報告されているが、fad104のような構造を有するタンパク質については報告されていない。本研究により肺発生におけるfad104の機能を明らかにすることにより、肺形成におけるまったく新しい分子メカニズムを明らかにすることができると考えられる。

新生児においては、出生後に呼吸器系の先天的な異常により死亡する例が多数あるが、

その原因遺伝子の特定に至っていない疾病も多い。肺形成ならびに機能維持における *fad104* の分子メカニズムを明らかにすることにより、これまで原因遺伝子が不明であった新生児疾患のメカニズムの解明と新しい治療、創薬ターゲットの発見につながる可能性が高い。そのため本研究において、肺の形成や肺胞上皮 II 型細胞の分化における *fad104* の役割と機能メカニズムを明らかとすることを試みた。

3. 研究の方法

野生型マウスおよび *fad104* 欠損マウスより採取した肺について、電子顕微鏡を用いた詳細な観察を行うことにより、形態的異常の有無について検討する。特に、*fad104* ホモ欠損マウスにおける肺胞上皮 II 型細胞に着目し、層板小体の形成状態を観察することにより、肺胞上皮 II 型細胞への分化・成熟の度合いについても検討した。

さらに、胎生 18.5 日目の野生型マウスおよび *fad104* ホモ欠損マウスの肺を採取し、*fad104* 欠損がサーファクタントたんぱく質の発現やこれまでに肺胞上皮細胞の分化に重要な役割を担うことが報告されている Tyroid transcriptional factor (TTF)-1 や FoxA2 などの転写因子の発現に影響を与えるかについて検討した。

4. 研究成果

2010 年度

申請者らは、脂肪細胞分化初期過程に発現が増加する遺伝子として単離された新規遺伝子 *fad104* のホモ欠損マウスは出生直後にチアノーゼを呈し死亡することから、*fad104* 欠損により肺形成、特に肺胞上皮 II 型細胞の異常により、出生直後に死亡する可能性が強く示唆されている。しかしながら、*fad104* がどのようなメカニズムで肺形成に寄与しているかについては不明である。そこで本研究では、肺の形成や肺胞上皮 II 型細胞の分化に

おける *fad104* の役割と機能メカニズムを明らかとすることを目的とし、検討を行った。まず、出生前である E18.5 の野生型ならびに *fad104* 欠損マウスから肺を摘出し、肺胞機能に重要な役割を担うサーファクタントタンパク質の発現を検討した。その結果、*fad104* ホモ欠損マウスの肺では、4 種類のサーファクタントタンパク質の発現はいずれも減少していることが明らかになった。次に、肺の発生に重要な転写因子群の発現を検討した結果、*fad104* 欠損マウスの肺では *foxa2* 等の発現が減少していた。さらに、電子顕微鏡を用いた観察の結果、*fad104* 欠損肺は、野生型マウスに比べて肺胞上皮 II 型細胞の分化が未熟であり、かつ、その数も顕著に減少していることが明らかとなった。このことから、*fad104* は新生児における肺形成、特に肺胞上皮 II 型細胞の分化に必須な因子であることが強く示唆された。

本検討において、*fad104* ホモ欠損マウスを詳細に観察した結果、*fad104* ホモ欠損マウスは、肺の異常だけでなく、骨組織にも異常があることがわかってきた。*Fad104* の機能メカニズムを解明するためには、肺の検討だけでなく、骨における役割も明らかにする必要があるため、まず、骨分化における *fad104* の役割について検討した。その結果、*fad104* 欠損細胞は、野生型細胞に比べて著しく骨分化が促進することを見出した。この結果より、脂肪細胞分化を促進する新規遺伝子 *fad104* は、肺の形成過程にも極めて重要な役割を担うことにより、出生後の生命維持に寄与していること、さらに、脂肪細胞と同じ中胚葉系細胞に属する骨分化も制御することが明らかになった。

2011 年度

昨年度の検討において、脂肪細胞分化を促進する新規遺伝子 *fad104* を欠損した肺では、

肺胞上皮II型細胞の分化・成熟が未熟であり、肺胞上皮II型細胞の分化を制御する転写因子群の発現も減少していることがわかった。これらの結果より、fad104は、未分化な上皮細胞から肺胞上皮II型細胞への分化に大きく寄与する因子であることが明らかになった。さらに、fad104ホモ欠損細胞は、野生型細胞と比較し、脂肪細胞分化が抑制される一方で、骨分化が顕著に促進することから、骨分化制御にも重要であることが示唆された。そこで、培養や遺伝子導入が比較的容易である株化骨芽細胞や、胎児のカルバリア細胞を用いてfad104が機能する分子メカニズムについて解析を行った。

まず、fad104欠損および野生型マウスの頭蓋より調製したカルバリア細胞に骨分化誘導剤を添加した結果、fad104欠損マウスでは野生型に比べ顕著な骨分化促進が観察された。さらに、fad104欠損マウスの胎児頭蓋を観察すると、野生型マウスと比較して骨化が進んでいることが明らかになった。これらの結果より、生体内において、fad104は肺形成に加えて、骨形成にも重要な役割を担うことが強く示唆された。

そこで次に、アデノウイルスによる fad104 過剰発現系を構築し、野生型および fad104 欠損カルバリア細胞に fad104 を過剰発現させた。その結果、野生型細胞では骨分化が抑制された。また、fad104 欠損細胞に fad104 の発現を戻すことによって、fad104 欠損により観察された骨分化の顕著な促進作用が消失した。このことから、fad104 は骨分化を阻害する機能を有することが示された。さらに、fad104 は、骨分化に重要な役割を担う BMP2 シグナルを阻害することも明らかにした。BMP2 シグナルは、骨分化だけでなく、肺形成にも重要であることから、fad104 は肺形成においても BMP2 シグナルを制御する可能性が考えられた。

これらの研究成果により、脂肪細胞分化の

制御因子として単離同定された新規遺伝子 fad104 が、肺形成および骨分化にも極めて重要な役割を担う因子であることが初めて明らかになった。今後、fad104 が機能する分子メカニズムをより詳細に解析すると共に、fad104 の発現制御機構を明らかにすることによって、肥満はもとより、骨粗鬆症や新生児の肺疾患における有用な創薬開発につながる可能性がある。

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)

1) Kishimoto K, Nishizuka M, Ueda T, Kajita K., Ugawa S, Shimada S, Osada S, Imagawa M
Indispensable role of factor for adipocyte differentiation 104 (fad104) in lung maturation *Exp. Cell Res.*, 317 (15), 2110-2123, 2011 (査読有)

2) Hayashi T, Nozaki Y, Nishizuka M, Ikawa M, Osada S, Imagawa M.
Factor for adipocyte differentiation 158 gene disruption prevents the body weight gain and insulin resistance induced by a high-fat diet. *Biol. Pharm. Bull.*, 34 (8), 1257-1263, 2011(査読有)

3) Ohno M, Komakine J, Suzuki E, Nishizuka M, Osada S, Imagawa M.
Interleukin enhancer-binding factor 3 functions as a liver receptor homologue-1 co-activator in synergy with the nuclear receptor co-activators PRMT1 and PGC-1 α . *Biochem. J.*, 437 (3), 531-540, 2011(査読有)

4) Kishimoto K, Kato A, Osada S, Nishizuka M, Imagawa M.
Fad104, a positive regulator of adipogenesis, negatively regulates osteoblast differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 397 (2), 187-191, 2010 (査読有)

5) Sato S, Nishizuka M, Asano M, Ohtake T, Imagawa M, Kobayashi E.
RNA interference-mediated knockdown of the mouse gene encoding potassium channel subfamily K member 10 inhibits hormone-induced differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 157 (1), 46-53, 2010 (査読有)

〔学会発表〕(計 15件)

- 1) 岸本圭史、加藤愛友美、長田茂宏、西塚誠、今川正良
脂肪細胞分化に重要な *fad104* の骨形成における役割
日本薬学会第 132 年会 2012. 3. 29. 札幌
- 2) 落合なつき、桐村拓也、長田茂宏、西塚誠、今川正良
脂肪細胞分化制御因子 *fad24* がマウスの胚発生において担う機能の解析
日本薬学会第 132 年会 2012. 3. 30. 札幌
- 3) 加藤大輝、西塚誠、岸本圭史、長田茂宏、今川正良
新規遺伝子 *fad104* が癌細胞の移動および浸潤能に与える影響の解析
日本薬学会第 132 年会 2012. 3. 30. 札幌
- 4) 落合なつき、桐村拓也、長田茂宏、西塚誠、今川正良
Fad24, a novel gene promoting adipogenesis, is involved in early embryonic development and muscle regeneration
第 34 回 日本分子生物学会年会 2011. 12. 13. 横浜
- 5) 加藤大輝、西塚誠、岸本圭史、長田茂宏、今川正良
新規遺伝子 *fad104* がヒトメラノーマ細胞の移動能に与える影響の解析
日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部合同学術大会 2011. 11. 23. 名古屋
- 6) 西塚誠、浅野真美、若林まい、佐藤 周史、長田茂宏、今川正良
脂肪細胞分化過程における *KCNK10* および *KCNK2* の役割
第 84 回日本生化学会大会 2011. 9. 23. 京都
- 7) 岸本圭史、西塚誠、植田高史、梶田健二、鶴川眞也、島田昌一、長田茂宏、今川正良
Fad104, a regulator of adipogenesis, is required for the differentiation of alveolar epithelial type II cell
第 84 回日本生化学会大会 2011. 9. 22. 京都
- 8) 落合なつき、桐村拓也、岸本圭史、長田茂宏、西塚誠、今川正良
脂肪細胞分化に関わる新規遺伝子 *fad24* の骨格筋における機能解析
第 57 回日本薬学会東海支部総会・大会 2011. 7. 9. 名古屋
- 9) Kishimoto, Makoto Nishizuka, Shigehiro Osada, and Masayoshi Imagawa

Novel gene *fad104* is required for lung morphogenesis
Experimental biology 2011 (EB2011) 2011. 4. 13. Washington D.C., U.S.A.

- 10) 加藤大輝、岸本圭史、加藤愛友美、長田茂宏、西塚誠、今川正良
新規遺伝子 *fad104* の細胞機能の解析
日本薬学会第 131 年会 2011. 3. 28-31. 静岡
- 11) 落合なつき、城村由和、岸本圭史、長田茂宏、西塚誠、今川正良
脂肪細胞分化を正に制御する新規遺伝子 *fad24* の生体内における機能解析
日本薬学会第 131 年会 2011. 3. 28-31. 静岡
- 12) 岸本圭史、西塚誠、長田茂宏、今川正良
新規遺伝子 *fad104* は肺形成に必須である
日本薬学会第 131 年会 2011. 3. 28-31. 静岡
- 13) Keishi Kishimoto, Makoto Nishizuka, Shigehiro Osada, and Masayoshi Imagawa
The crucial role of *fad104* in lung maturation
第 83 回日本生化学会・第 33 回日本分子生物学会合同大会 2010. 12. 7-10. 神戸
- 14) 落合なつき、城村由和、岸本圭史、長田茂宏、西塚誠、今川正良
新規遺伝子 *fad24* の生体内における機能解析
第 83 回日本生化学会・第 33 回日本分子生物学会合同大会 2010. 12. 7-10. 神戸
- 15) 加藤愛友美、岸本圭史、長田茂宏、西塚誠、今川正良
脂肪細胞分化を制御する新規遺伝子 *fad104* の骨分化における役割
第 9 回次世代を担う若手ファーマ・バイオフォーラム 2010 2010. 10. 2-3. 京都

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西塚誠 (Nishizuka Makoto)
名古屋市立大学・大学院薬学研究科・講師

研究者番号 : 00363953

(2) 研究分担者 なし ()

研究者番号 :

(3) 連携研究者 なし ()

研究者番号 :