

平成 28 年 11 月 16 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24390237

研究課題名(和文) 全身性脂肪萎縮症原因遺伝子産物セイピンの多彩な生理作用の解明

研究課題名(英文) Study on the pathophysiological roles of seipin, a generalized lipodystrophy causative gene product

研究代表者

海老原 健 (Ebihara, Ken)

自治医科大学・医学部・准教授

研究者番号：70362514

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：セイピンノックアウト(SK0)ラットを用いてセイピンの病態生理的意義を検討した。SK0ラットでは白色脂肪組織が著しく減少していることを確認した。褐色脂肪組織は重量の減少は認めるものの機能的に維持されていることが確認された。SK0ラットでは脳重量が軽度減少し、空間作業記憶が低下していることを確認した。脳重量の減少は神経細胞数の減少によると考えられた。ヒトのセイピン遺伝子異常症においても脳体積が軽度減少していることを確認した。SK0ラットの精巣では成熟精子が認められず、精母細胞が著しく減少していることが確認された。セイピンは精子形成過程の後期に重要な役割を有していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Mutations of BSCL2 cause the most severe form of congenital generalized lipodystrophy (CGL). BSCL2 mRNA is highly expressed in the brain and testis in addition to the adipose tissue in human, suggesting physiological roles of seipin in non-adipose tissues. Since we found BSCL2 mRNA expression pattern among organs in rat is similar to human while it is not highly expressed in mouse brain, we generated a Bsc12/seipin knockout (SK0) rat. SK0 rats showed total lack of white adipose tissues, while physiologically functional brown adipose tissue was preserved. Besides the lipodystrophic phenotypes, SK0 rats showed impairment of spatial working memory with brain weight reduction and infertility with azoospermia. We confirmed reduction of brain volume and number of sperm in human patients with BSCL2 mutation. This is the first report demonstrating that seipin is necessary for normal brain development and spermatogenesis in addition to white adipose tissue development.

研究分野：内分泌代謝学

キーワード：セイピン 脂肪萎縮症 ラットモデル 精神発達遅滞 精子低形成

1. 研究開始当初の背景

セイピンは、先天性全身性脂肪萎縮症の原因遺伝子産物として 2001 年に同定された新規蛋白質である。我々は我が国で初めてセイピン遺伝子異常症を報告した (*J Clin Endocrinol Metab* 89: 2360, 2004)。セイピンは既知蛋白質や既知のコンセンサスモチーフと相同性が認められずその機能は不明である。セイピン遺伝子異常症では脂肪組織の消失以外にも精神発達遅滞や妊孕性の低下などの多彩な表現型が認められ、セイピンは脂肪組織以外にも中枢神経系や精巣で高い発現が認められることから、これらの組織におけるセイピンの病態生理的意義が示唆される。最近我々はセイピン KO ラットの作製に成功した。これまでの予備検討において、このラットでは脂肪組織の消失のみならず、空間作業記憶の低下や精子低形成があることを確認した。また、ヒトにおけるセイピンの病態生理的意義を検討するために、京都大学 iPS センターとの共同研究により、セイピン遺伝子異常症患者より皮膚線維が細胞を採取し、疾患特異的人工多能性幹 (induced pluripotent stem: iPS) 細胞の樹立に成功した。

2. 研究の目的

セイピン遺伝子異常症より樹立した疾患特異的 iPS 細胞、さらに我々が有するセイピン遺伝子異常症コホートを対象に、生体におけるセイピンの多彩な生理作用の解明を目指す。

3. 研究の方法

セイピン KO ラットでは、ヒトのセイピン遺伝子異常症と同様に、生下時より全身の脂肪組織の消失が認められる他、空間作業記憶に障害のあることや、精子低形成が認められる。そこで本研究ではセイピン KO ラットを用いて脂肪細胞の発生・分化におけるセイピンの機能的意義を検討するとともに、中枢神経系や生殖細胞におけるセイピンの機能的意義についても検討する。また我々はすでに複数のセイピン遺伝子異常症患者より皮膚線維が細胞を採取し、疾患特異的 iPS 細胞の樹立に成功している。本研究ではセイピン遺伝子異常症 iPS 細胞を用いて脂肪細胞や神経細胞、生殖細胞の分化過程におけるセイピンの意義を解明する。

4. 研究成果

ENU ミュータゲネシスを用いた方法により作製したセイピンノックアウト (SKO) ラットを用いてセイピンの 1) 脂肪細胞の発生・分化、2) 脳の発生、3) 精子形成における病態生理的意義を検討した。

1) SKO ラットでは皮下および内臓の機能的白色脂肪組織、眼窩および骨髄の機械的脂肪組織はいずれも著

しく減少していることを確認した。一方、肩甲骨間の褐色脂肪組織は重量の減少は認めるものの寒冷暴露に反応し、機能的にも維持されていることが確認された。そこで SKO ラットより皮膚線維芽細胞を調整し脂肪細胞分化誘導実験を実施し、セイピンは PPAR の発現維持および脂肪分解抑制に重要な役割を有していることが明らかとなった。さらに、FGF-1 によりセイピンの欠損による PPAR の発現低下および脂肪分解亢進が抑制されることを見出した。FGF-1 がセイピン遺伝子異常による脂肪萎縮症の治療に有用である可能性が示唆された。

2) SKO ラットでは脳重量が軽度減少し、空間作業記憶も低下していることを確認した。SKO ラットの脳皮質、海馬、小脳で神経細胞密度を検討したが野生型と比較して明らかな変化はなく、脳重量の減少は神経細胞数の減少によるものと考えられた。ヒトのセイピン遺伝子異常症でも軽度の精神発達障害が認められることから MRI にて脳体積を検討したところヒトのセイピン遺伝子異常症においても脳体積が軽度減少していることが確認された。

SKO ラットの精巣では成熟精子、精子細胞が認められず、精母細胞も著しく減少していることが確認された。精子低形成の原因として精原細胞とセルトリ細胞の異常を考え、精原細胞は正常でセルトリ細胞を欠く sl/sl マウスとセルトリ細胞は正常で精原細胞を欠く w/w マウスにおいてセイピンの遺伝子発現を検討したがセイピンは精原細胞とセルトリ細胞のいずれにも発現は認められなかった。そこでラットの個体発生におけるセイピン遺伝子の発現を検討したところ精母細胞が出現してくる生後 6 週頃より精巣にセイピン発現が観察され、セイピンは精子形成過程の後期に重要な役割を有していることが示唆された。

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 7 件)

1. Mori E, Fujikura J, Noguchi M, Nakao K, Matsubara M, Sone M, Taura D, Kusakabe T, Ebihara K, Tanaka T, Hosoda K, Takahashi K, Asaka I, Inagaki N, Nakao K. Impaired adipogenic capacity in induced pluripotent stem cells from lipodystrophic patients with BSCL2 mutations. *Metabolism*. 65: 543-56,

- 2016.
2. Ebihara C, Ebihara K, Aizawa-Abe M, Mashimo T, Tomita T, Zhao M, Gumbilai V, Kusakabe T, Yamamoto Y, Aotani D, Yamamoto-Kataoka S, Sakai T, Hosoda K, Serikawa T, Nakao K. Seipin is necessary for normal brain development and spermatogenesis in addition to adipogenesis. *Hum Mol Genet.* 24: 4238-49, 2015.
 3. Iwanishi M, Ebihara K, Kusakabe T, Washiyama M, Ito-Kobayashi J, Nakamura F, Togawa T, Ozamoto Y, Hagiwara A, Nakao K. Primary intestinal follicular lymphoma and premature atherosclerosis in a Japanese diabetic patient with atypical familial partial lipodystrophy. *Intern Med* 53: 851-858, 2014.
 4. Aizawa-Abe M, Ebihara K, Ebihara C, Mashimo T, Takizawa A, Tomita T, Kusakabe T, Yamamoto Y, Aotani D, Yamamoto-Kataoka S, Sakai T, Hosoda K, Serikawa T, Nakao K. Generation of leptin deficient Lepmkyo/Lepmkyo rats and identification of leptin responsive genes in the liver. *Physiol Genomics* 45: 786-793, 2013.
 5. Noguchi N, Hosoda K, Nakane M, Mori E, Nakao K, Taura D, Yamamoto Y, Kusakabe T, Sone M, Sakurai H, Fujikura J, Ebihara K, Nakao K. In Vitro Characterization and Engraftment of Adipocytes Derived from Human Induced Pluripotent Stem Cells and Embryonic Stem Cells. *Stem Cells Dev* 22: 2895-2905, 2013.
 6. Iwanishi M, Ebihara K, Kusakabe T, Harada S, Ito-Kobayashi J, Tsuji A, Hosoda K, Nakao K. Premature atherosclerosis in a Japanese diabetic patient with atypical familial partial lipodystrophy and hypertriglyceridemia. *Intern Med* 51: 2573-2579, 2012.
 7. Aotani D, Ebihara K, Sawamoto N, Kusakabe T, Aizawa-Abe M, Kataoka S, Sakai T, Iogawa H, Ebihara C, Fujikura J, Hosoda K, Fukuyama H, Nakao K. Functional Magnetic Resonance Imaging Analysis of Food-Related Brain Activity in Patients with Lipodystrophy Undergoing Leptin Replacement Therapy. *J Clin Endocrinol Metab* 97: 3663-3671, 2012.

〔学会発表〕(計7件)

1. Ebihara C, Ebihara K, Aizawa-Abe M, Mashimo T, Tomita T, Zhao M, Gumbilai V, Kusakabe T, Yamamoto Y, Aotani D, Yamamoto-Kataoka S, Sakai T, Hosoda K, Serikawa T, Nakao K. Seipin is necessary for

normal brain development and spermatogenesis in addition to adipogenesis. 22nd European Congress on Obesity. 2015年5月7日 チェコ共和国、プラハ

2. Ebihara C, Ebihara K, Aizawa-Abe M, Yamamoto Y, Yamamoto-Kataoka S, Zhao M, Gumbilai V, Hosoda K, Serikawa T, Nakao K. Effects of thiazolidinediones on fatty liver and insulin sensitivity require white adipose tissue: An evidence from the comparison between mice and rats. Obesity Week 2015 / TOS Annual Meeting & ASMBS Annual Meeting. 2015年11月7日 米国、ロサンゼルス
3. 海老原千尋、海老原 健、阿部 恵、真下知士、細田公則、芹川忠夫、中尾一和。セイピン欠損(SK0)ラットを用いた先天性全身性脂肪萎縮症原因遺伝子セイピンの生理的意義の解明。第88回日本内分泌学会学術総会。2015年4月27日 東京、ホテルニューオータニ
4. Ebihara C, Ebihara K, Aizawa-Abe M, Zhao M, Gumbilai V, Yamamoto Y, Hosoda K, Nakao K. Pathophysiological role of *Bscl2/Seipin* haploinsufficiency in adiposity and metabolism. The Endocrine Society's 97th Annual Meeting. 2015年3月7日 米国、サンディエゴ
5. 海老原千尋、海老原 健、阿部 恵、真下知士、細田公則、芹川忠夫、中尾一和。セイピン欠損(SK0)ラットを用いた先天性全身性脂肪萎縮症原因遺伝子セイピンの生理的意義の解明。第29回日本糖尿病・肥満動物学会。2015年2月13日 京都市、京都大学医学部創立百周年記念施設「芝蘭会館」
6. Ebihara K, Aizawa-Abe M, Hosoda K, Kusakabe T, Aotani D, Nakao K. Translational Research of Leptin for Lipodystrophy in Japan. Lipodystrophy in 2014: Leptin and Beyond. 2014年10月18日 米国、アナーバー
7. Ebihara C, Ebihara K, Aizawa-Abe M, Zhao M, Gumbilai V, Yamamoto Y, Hosoda K, Nakao K. Pathophysiological role of *Bscl2/Seipin* haploinsufficiency in adiposity and metabolism. The Endocrine Society's 97th Annual Meeting. 2015年3月7日 米国、サンディエゴ

〔図書〕(計1件)

1. Ebihara K, Nakao K. Springer Open. Innovative Medicine: Basic Research and Development. P.165-175, 2015.

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等：なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

海老原 健 (KEN EBIHARA)
自治医科大学・医学部・准教授
研究者番号：70362514

(2) 研究分担者

阿部 恵 (MEGUMI ABE)
京都大学・生命科学研究科・助教
研究者番号：20568688

日下部 徹 (TORU KUSAKABE)
京都大学・医学研究科・准教授
研究者番号：60452356

(3) 連携研究者

()

研究者番号：