様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 22 年　5 月 21 日現在

研究種目：若手研究（B）
研究期間：2008～2009
課題番号：20790070
研究課題名（和文）
　生命維持およびインスリン感受性制御に関与する fad104 の機能解析
研究課題名（英文）
　Functional analyses of fad104 on survival just after birth and insulin sensitivity.

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）：
本検討により、これまで機能が不明であった遺伝子 fad104 が、脂肪組織形成に大きく寄与していること、インスリン感受性の制御に重要な役割を担うことを明らかにした。さらに、fad104 は出生直後の肺の機能維持に非常に重要な遺伝子であることを明らかにした。これらの検討より、これまで不明であった fad104 の機能の一端を明らかにすることができたと思われる。

研究成果の概要（英文）：
In this study, we demonstrated that fad104, a positive regulator of adipogenesis, has a crucial role for regulating the formation of white adipose tissue and insulin sensitivity. Furthermore, we also demonstrated that fad104 is essential for lung development just after birth.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総　計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：肥満、糖尿病、脂肪細胞分化、新生児疾患、遺伝子発現、肺形成

1．研究開始当初の背景

近年、我が国を含め先進国各国において、肥満を主な原因とする糖尿病、高血圧症、高脂血症等の生活習慣病が大きな社会問題となっている。肥満の形成には、前駆脂肪細胞から成熟脂肪細胞への分化が大きく寄与していることから、脂肪細胞分化の分子メカニズムを解明することが非常に重要である。脂肪細胞の分化機構については、活発な研究が行われているが、分化初期過程の分子メカニズムについては、未だ不明な

点が多い。分化初期過程は、脂肪細胞分化を決定づける非常に重要なステージであり、ダイナミックな遺伝子発現の変動が行われていると考えられることから、脂肪細胞分化初期過程の分子メカニズムを解明することにより、有効な肥満、糖尿病に対する創薬開発が期待できる。

申請者らはこれまでに、脂肪細胞分化初期に発現が増加する遺伝子群を数多く単離し、単離した遺伝子が脂肪細胞分化制御に重要な役割をになっていることを明らかにしてきた。本研究で機能の解析をめざす fad104 については既にノックアウトマウスを樹立し、解析を進めている。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を見い出した。さらに、fad104 ヘテロ欠損マウスは、野生型マウスと比較し、低体重であり、白色脂肪組織量も少ないことも見い出した。また、糖負荷試験ならびにインスリン感受性試験の結果、fad104 ヘテロ欠損マウスにおいてインスリン感受性の亢進が認められている。

さらに、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り、似たような構造を持ったタンパク質は、これまで報告されていない。そのため、fad104の機能を明らかにすることにより、脂肪細胞分化初期過程におけるまったく新しい分子メカニズムが明らかになるに留まらず、肥満、糖尿病に対する新たな治療、創薬のターゲットの発見につながる可能性が大きいと考えている。

また、当研究室で樹立した fad104 欠損マウスの検討から、fad104 が、脂肪細胞分化の制御だけでなく、インスリン感受性を低下させる機能も有すること、さらに、出生直後の生存に必須であることも示された。特に出生直後は、生体内に白色脂肪組織がほとんど見られないことから、fad104 が時期特異的に異なる機能を発揮する可能性を示唆するものであるが、その詳細なメカニズムはこれまで明らかになっていなかった。

２．研究の目的

これまでの検討より、fad104ヘテロ欠損マウスを用いた検討の結果、fad104が、脂肪組織形成、インスリン感受性の制御に重要な役割を担う可能性を示唆するデータを得ている。脂肪組織の過剰な形成は、肥満の原因であり、インスリン感受性の低下は、インスリン抵抗性を惹起させ、重篤な糖尿病を引き起こす。しかしながら、脂肪組織形成、インスリン感受性の制御の機序については不明な点が多い。

そこで本研究ではまず、fad104の脂肪組織形成ならびにインスリン感受性の制御メカニズムを明らかにする。脂肪細胞分化ならびにインスリン感受性には、インスリンシグナルが重要な役割を担っていると考えられるため、fad104とインスリンシグナルとの関係に特に着目し、fad104がどのようにインスリンシグナルを制御するかについて明らかにする。fad104欠損マウスを用いた解析に加え、fad104欠損マウス由来のMEF（マウス胎仔繊維芽）細胞の解析もあわせて実施する。上記検討により、fad104の機能を明らかにし、肥満および糖尿病との関連性を明らかにすることをめざす。

fad104ホモ欠損マウスは、出生後１日以内に死亡する。このため、fad104が、出生直後の生命維持に必須であることが強く示唆されるが、その分子メカニズムは不明である。そこで、出生直後にfad104ホモ欠損マウスが死亡する原因について明らかにする。生体内におけるfad104 の発現については、成体マウ

スを用いた検討は行っているが、出生直後、個体発生過程については、まだ検討していない。そこで、出生直後を含めた発生過程におけるfad104の発現組織を明らかにし、fad104発現臓器について詳細な病理学的解析を行う。このような検討により、fad104がどのようなメカニズムで、生命の維持に寄与するかについて明らかにし、fad104の機能について新しい、有意義な知見を得ることを目的とした。

３．研究の方法

本研究では、脂肪細胞分化初期過程に発現が増加する新規遺伝子として単離、同定したfad104 に着目し、fad104 の機能について、fad104 欠損マウスを用いた個体レベルの検討と、fad104 欠損マウス由来 MEF 細胞、株化前駆脂肪細胞を用いた細胞レベルの検討をあわせて進めた。これまでの検討を踏まえ、次の２点に着目し、fad104 の機能の解明を行った。

（１）fad104 による脂肪細胞分化ならびに脂肪組織形成機構の解明

fad104 ヘテロ欠損マウスを用いて、fad104 が、生体内においてどのようなメカニズムで脂肪細胞分化ならびに脂肪組織形成を制御しているかについて検討した。特に、食事性肥満のモデルである高脂肪食負荷における fad104 欠損の影響などについて検討した。また、fad104 欠損マウスから調製した MEF 細胞を用いて、脂肪細胞分化能ついて検討した。MEF 細胞を用いた検討は、株化培養細胞に比べ、より生体内における分化メカニズムを反映すると考えられることから、脂肪細胞分化における fad104 の機能を明らかにするためには必要不可欠であると思われる。これらの検討により、肥満の形成と fad104 の機能との関連性について検討した。

（２）胎生期ならびに出生直後における fad104 の発現組織の検討ならびに病理学的解析

胎生期ならびに出生直後における fad104 の発現組織は不明であることから、*in situ* hybridization 法を用いて、発生過程の fad104 の発現について検討した。さらに発現組織について病理学的解析を行うことにより、fad104 の各器官の形成に与える影響について検討した。さらに、出生直後に fad104 は肺に高い発現を示すことが明らかなったため、肺形成における fad104 の機能の解析を試みた。

４．研究成果

(1) 2008年度

fad104ヘテロ欠損マウスを用いて、fad104が、生体内においてどのようなメカニズムで脂肪細胞分化ならびに脂肪組織形成を制御しているかについて検討した。特に高脂肪食により肥満を呈する条件において検討した。

高脂肪食摂食条件下においてもfad104ヘテロ欠損マウスは、野生型マウスに比べ体重の増加が抑制された。また、脂肪組織重量の増加も抑制された。GTT、ITTの検討の結果、野生型マウスは高脂肪食負荷により、糖代謝能およびインスリン感受性が大きく低下したが、fad104ヘテロ欠損マウスにおいては、糖代謝能、インスリン感受性の低下が抑制されることが明らかになった。

次に、fad104欠損マウスから調製したMEF細胞を用いて、脂肪細胞分化過程における機能について検討した。まず、脂肪細胞分化能について検討した結果、fad104を欠損したMEFは、脂肪細胞分化能が大きく低下することが明らかになった。さらに、野生型ならび

にfad104欠損MEFにインスリンを添加し、インスリンシグナルにfad104が影響を与えるかについて検討した。その結果、fad104欠損MEFにインスリン刺激を行うと野生型MEFに比べてAktのリン酸化レベルが、より亢進することが明らかになった。この結果より、fad104がインスリンシグナルを負に制御する因子であることが示された。

以上の結果より、fad104 は、脂肪細胞分化を促進することにより脂肪組織を増加させ、さらにインスリンシグナルを抑制することにより、インスリン感受性を負に制御する新規の遺伝子である可能性が示唆された。

<u>(2) 2009年度</u>

Fad104ホモ欠損マウスは出生直後に全て死亡する。fad104は脂肪細胞分化制御だけでなく，出生直後の生命維持においても極めて重要な役割を担っていることが予想された。そこで、本検討では、fad104が出生直後に担う役割を明らかにすることをめざした。

胎生18.5日目に胎児を取り出し観察した結果，野生型マウスは取り出した直後から活発に呼吸をはじめ，徐々に赤みを帯びてくるのに対して，fad104ホモ欠損マウスは呼吸が非常に弱く，すぐにチアノーゼを示し，取り出してから15分以内にすべて死亡することがわかった。Fad104ホモ欠損マウスの呼吸が弱いため，肺の機能に異常がある可能性が考えられた。そこで次に, fad104ホモ欠損マウスの肺について検討を行った。その結果, fad104ホモ欠損マウスの肺は野生型よりも有意に小さいことが明らかになった。さらに肺の組織切片を作製し観察したところ，野生型マウスの肺胞に比べて，fad104ホモ欠損マウスの肺胞が小さいことが明らかになった。肺胞をひらくためには，サーファクタントタンパク質が重要な役割を担う。そこで, fad104ホモ欠損マウスの肺における4種類のサーファクタントタンパク質（SP-A, SP-B, SP-C, SP-D）の発現量を検討した。その結果, fad104ホモ欠損マウスの肺では野生型マウスの肺に比べて，SP-A, SP-C, SP-Dの発現量が顕著に減少していることが明らかとなった。

これらの結果より，出生直後において fad104 は、肺の機能維持に極めて重要な役割を担うことが示された。

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５件）

1) Kishimoto K., Kato A., Osada S., <u>Nishizuka M.</u>, Imagawa M.
Fad104, a positive regulator of adipogenesis, negatively regulates osteoblast differentiation.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 2010 (in press) 査読有

2) Hishida T., <u>Nishizuka M.</u>, Osada S., Imagawa M.
The role of C/EBPdelta in the early stages of adipogenesis.
Biochimie 91 (5):654-657,2009. 査読有

3) <u>Nishizuka M.</u>, Kishimoto K., Kato A., Ikawa, M., Okabe, M., Sato R., Niida H., Nakanishi M., Osada S., Imagawa M.
Disruption of the novel gene *fad104* causes rapid postnatal death and attenuation of cell proliferation, adhesion, spreading and migration
Exp. Cell Res. 315 (5):809-819, 2009. 査読有

4) Hishida T., Eguchi T., Osada S., <u>Nishizuka M.</u>, Imagawa M.
A novel gene, fad49, plays a crucial role in the immediate early stage of adipocyte differentiation via involvement in mitotic clonal expansion.
FEBS J. 275(22):5576-5588, 2008. 査読有

5) <u>Nishizuka M.</u>, Koyanagi A., Osada S., Imagawa M.
Wnt4 and Wnt5a promote adipocyte differentiation.
FEBS Lett. 582(21-22):3201-3205, 2008. 査読有

〔学会発表〕（計 10 件）

1) 岸本圭史、西塚　誠、長田茂宏、今川正良
肺形成における fad104 の機能解析
日本薬学会第 130 年会　2010 年 3 月 28 日（岡山）
2) 岸本圭史、西塚　誠、長田茂宏、今川正良
脂肪細胞分化に重要である fad104 の肺発生における役割
第 8 回次世代を担う若手ファーマ･バイオフォーラム 2009　2009 年 11 月 14 日（名古屋）
3) 岸本圭史、西塚　誠、加藤愛友美、長田茂宏、今川正良
脂肪細胞分化に重要な fad104 は出生直後の生命維持に必須である
第 82 回日本生化学会大会　2009 年 10 月 22 日（神戸）
4) Makoto Nishizuka, Junko Kako, Keishi Kishimoto, Shigehiro Osada, Masayoshi Imagawa
Heterozygous knockout of fad104 gene reduces body weight gain and increase glucose metabolism
21st IUBMB and 12th FAOBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology 2009 年 8 月 5 日（上海）
5) Keishi Kishimoto, Makoto Nishizuka, Ayumi Kato, Shigehiro Osada, Masayoshi Imagawa
The novel gene fad104 is indispensable for lung development and is crucial role for cell proliferation, adhesion, migration and cytoskeletal organization.
21st IUBMB and 12th FAOBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology　2009 年 8 月 5 日（上海）
6) 西塚　誠、加子順子、岸本圭史、長田茂宏、今川正良
fad104 ヘテロ欠損は体重増加ならびにインスリン抵抗性を抑制する
日本薬学会第 129 年会　2009 年 3 月 28 日（京都）
7) 岸本圭史、西塚　誠、長田茂宏、今川正良
脂肪細胞分化および出生直後の生命機能維持に必須である fad104 の機能解析
日本薬学会第 129 年会　2009 年 3 月 27 日（京都）
8) 西塚　誠、加子順子、岸本圭史、長田茂宏、今川正良
脂肪細胞分化を促進する fad104 が糖代謝能ならびにインスリン感受性に与える影響の解析
第 31 回日本分子生物学会年会、第 81 回日本生化学会大会合同大会　2008 年 12 月 11 日（神戸）
9) 岸本圭史、西塚　誠、長田茂宏、今川正良
脂肪細胞分化に重要である fad104 欠損 MEF (mouse embryo fibroblasts)の性状解析
第 31 回日本分子生物学会年会、第 81 回日本生化学会大会合同大会　2008 年 12 月 9 日（神戸）
10) 岸本圭史、西塚　誠、長田茂宏、今川正良新規遺伝子 fad104 欠損 MEF (mouse embryo fibroblasts)の性状解析
ファーマバイオフォーラム 2008　2008 年 11 月 30 日（東京）

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
（　　）

研究者番号：

(3)連携研究者
（　　）

研究者番号：