

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 25 年 6 月 14 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2012

課題番号：21390024

研究課題名（和文） 脂肪細胞分化のひきがねとして機能する因子群のシグナル伝達連関の機構解明

研究課題名（英文） Molecular mechanisms of the signal transductions by the factors functioning as a trigger for the adipocyte differentiation.

研究代表者

今川 正良（IMAGAWA MASAYOSHI）

名古屋市立大学・大学院薬学研究科・教授

研究者番号：20136823

研究成果の概要（和文）：

肥満の分子機構を解明するためには、脂肪細胞肥大化の機構を解明すると共に脂肪細胞分化機構解明も必須課題である。研究代表者は、脂肪細胞分化の最も初期に注目し、分化のひきがねとして重要な役割を果たす遺伝子を単離すると共にその作用機作を解析した。その中の新規遺伝子は、当研究室で初めて見出した遺伝子であるが、その遺伝子破壊マウスを解析したところ、肺発生、骨形成、胚発生などこれまで報告のなかった新たな作用を見出すことにも成功した。

研究成果の概要（英文）：

Obesity is related to the development of type 2 diabetes mellitus, hypertension, and hyperlipidemia. Obesity results from hypertrophy of individual adipocytes and hyperplasia of adipocytes. Since hyperplasia of adipocytes is caused by the formation of mature adipocytes from preadipocytes, it is important to elucidate the molecular mechanism of adipocyte differentiation. In this study, many genes including novel genes were identified and characterized. Moreover, the knockout mice for two novel genes showed that these genes function as regulators for lung development, bone formation and embryonic development, indicating that these key genes have multiple functions in development.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
2010年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
2011年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
2012年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
総計	14,000,000	4,200,000	18,200,000

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、脂肪細胞、糖尿病、生活習慣病、シグナル伝達、胚形成、骨形成、肺形成

1. 研究開始当初の背景

心疾患や脳疾患を引き起こす元凶の一つは肥満であり、肥満形成機構の解明は21世紀における最重要課題の一つである。肥満は、小型成熟脂肪細胞がエネルギーの過剰摂取に伴い、大型の異常脂肪細胞に変化する【肥大化】が大きな要因である。一方、最近の研究により、前駆脂肪細胞が脂肪組織の中に存在し、環境にตอบสนองして新たに脂肪細胞に分化する【分化=数の増加】も主要な要因であることが明らかになってきた。従って、生活習慣病の克服には、肥大化の機構解明と共に、脂肪細胞分化機構の解明が必須と考えられる。

2. 研究の目的

これまで、脂肪細胞分化の重要な制御因子として、PPAR γ (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ) や C/EBP (CCAAT/Enhancer-Binding Protein) ファミリーが同定され、これらは共に脂肪細胞分化に関わる中心的な転写因子として考えられている。しかし、これらが発現するのは、脂肪細胞分化の中期以降であり、脂肪細胞分化の最も初期における変化は未だ不明な点が多い。そこで研究代表者らは、これまでの研究において、脂肪細胞分化の最も初期において発現が変動する遺伝子群を多数単離し、発現抑制系などを用いた解析により、Rho ファミリーの一つである TCL (TC10-like Rho GTPase)、インプリンティング遺伝子である Peg10 (paternally expressed gene 10) および新規遺伝子として fad24, fad 49, fad104, fad158 (fad; factor for adipocyte differentiation) などが脂肪細胞分化初期に重要な役割を果たしていることをすでに明らかにした。その中でも fad24 は、脂肪細胞分化初期に特有な一過性の細胞増殖 (clonal expansion) に重要な役割を果たすことを明らかにするとともに、DNA 複製関連因子 HB01 (histone acetyltransferase binding to ORC1) との相互作用を新たに見出した。

そこで本研究では、これらの遺伝子群のさらに詳細な機能解析を行い、脂肪細胞分化の最も初期における分子機構を明らかにし、分化のひきがねとなる出来事をシグナル伝達関連の観点から明らかにすることを目的とする。これらの基礎研究を踏まえ、将来的には、従来とは異なった観点、すなわち脂肪細胞分化をコントロールし、正常な小型成熟脂肪細胞を一定数維持し、インスリン抵抗性を改善する肥満治療薬開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) 細胞レベルにおける検討

①当研究室で単離した各種因子の clonal

expansion に対する影響の解析

マウス前駆脂肪細胞である 3T3-L1 細胞が脂肪細胞に分化する際、一旦コンプレントに達した後、1~2回増殖しその後分化に進む。この過程を clonal expansion とよび、分化過程における重要なステップと考えられている。このステップにおける遺伝子群の影響について RNAi 法を用いて検討する。

②TCL がアクチン骨格形成に及ぼす影響

TCL がアクチンと相互作用し、骨格形成に重要な役割を果たしていることを明らかにしつつある。脂肪細胞分化時には細胞形態が著しく変化するが、その制御の中心に TCL が位置する可能性が高い。そこで、ミオシン重鎖・軽鎖との相互作用や、各種リン酸化体を検出することにより Rho A とのクロストークの可能性を探る。

③fad104 が骨形成および肺形成に及ぼす影響の解析

fad104 の機能を解析する途上で、fad104 は脂肪細胞分化だけでなく、骨の形成に深く関与する結果を得たため、新たに骨形成への影響解析を計画に加えた。

④核内受容体と相互作用する因子の解析

脂肪細胞分化には PPAR γ などの核内受容体が深く関わっているが、核内受容体はスーパーファミリーを形成し種々のコファクターと相互作用している。そこで、これら相互作用因子の同定および作用機作を結合実験により検討した。

(2) 個体レベルにおける検討

①fad24, fad104, fad158, TCL のノックアウトマウスの作製

fad104 および fad158 については、ホモノックアウトマウスの作製を終了した。fad24 と TCL は、ES 細胞を用いた相同組換えの段階で何度か失敗している。そこで組換えエクソンを変更し、異なるターゲティングベクターの作製を終了したので、再度組換えを試みる。

②fad104 および fad158 ノックアウトマウスの解析

fad104 ホモノックアウトマウスは正常に生まれるものの、生後 24 時間以内に死亡することが明らかとなった。そこで、生後直後のマウスおよび直前の胎児を用いて、その死因を解析する。具体的には、心臓、肺、骨格などに着目し病理的な診断と共に、血糖値など生化学的パラメーターも検討する。fad158 については、外見的には正常なホモノックアウトマウスが誕生した。そこで、ホモノックアウトマウスを用いて、標準食および高脂肪食による体重の変遷、内臓脂肪の量、糖負荷

試験、インスリン感受性試験などを行い、fad158 の機能を個体レベルで明らかにする。

③fad24 強制発現トランスジェニックマウスの解析

上記のように、fad24 ノックアウトマウスの作製に苦戦しているため、並行して全身性に fad24 を強制発現するトランスジェニックマウスを作製した。そこでこのマウスの解析を行う。

4. 研究成果

(1) 研究の主な成果

①fad104 の機能解析

fad104 (factor for adipocyte differentiation 104) のホモノックアウトマウスは出生直後に死亡する。そこで、MEF (mouse embryonic fibroblast) を用いて検討したところ、fad104 は脂肪細胞を正に制御すると共に、細胞接着や細胞移動にも重要であることを明らかにした。さらに、出生直後に死亡する原因として、fad104 が欠損すると肺発生が正常に進まないことも明らかにした。すなわち、fad104 が肺発生に深く関わり、肺胞上皮細胞の分化・成熟に必須な新規遺伝子であることを明らかにした。

一方、fad104 は脂肪細胞分化のみならず骨分化にも関わっていることを新たに見出した。すなわち、幹細胞が脂肪細胞に分化するか骨細胞に分化するか、その方向性を決定する因子として fad104 が働いていることを発見した。さらに、fad104 ホモ欠損マウスは、頭部の異形成を引き起こすことも明らかにした。このように fad104 は、脂肪細胞分化のみならず骨分化にも関わっており、その制御に BMP/Smad シグナルが深く関わっていることを明らかにした。

これらの研究過程で fad104 が癌の浸潤・転移に深く関わっていることを新たに見出した。この結果は、上記の細胞接着や細胞移動にも重要である結果と一致する。

このように、fad104 が脂肪細胞分化のみならず、骨形成や肺形成にも重要な役割を果たすなど新たな機能が次々と見出された。

②fad24 の機能解析

fad24 については、強制発現トランスジェニックマウスを作製し、標準食および高脂肪食を用いて検討したところ、fad24 を高発現させると小型の脂肪細胞を多数できることが明らかとなった。さらに、血中のアディポネクチン量が増大し、糖代謝を改善させることが明らかになった。一方、fad24 は脂肪細胞分化のみならず、DNA 複製および細胞のトランスフォーメーションに対しても重要な役割を果たしていることを見出しているが、転写因子 NF κ B の活性化に関与する領域ドメ

インを同定した。

また、fad24 については、ターゲティングする場所を変更することにより、ノックアウトマウスの作製に成功した。ホモノックアウトマウスを作製したところ、胎生致死であることが明らかとなった。さらに詳細に解析したところ、胎児形成の比較的初期に致死性となることも判明した。このように、fad24 も、上記の fad104 と同様に、脂肪細胞分化以外にも重要な役割を果たしていることを明らかにした。

③fad158 の機能解析

fad158 のノックアウトマウスの作製に成功した。そのホモノックアウトマウスを用いて、食餌に対する影響を解析したところ、高脂肪食を与えると体重およびインスリン感受性に影響を与えることが明らかとなった。しかしその差が少ないため、類似遺伝子による機能の補完も考えられるため、より詳細な検討が必要と思われた。

④TCL および転写因子 C/EBP δ の機能解析

TCL は、脂肪細胞分化初期において、clonal expansion を正に制御することにより分化を促進することを見出した。さらに転写因子 C/EBP δ も clonal expansion を正に制御することを明らかとした。なお、TCL ホモノックアウトマウスの作製に成功したが、現在のところ、外観、高脂肪食の影響などについて明確な差は見出されていない。

⑤カリウムチャネルの脂肪細胞分化に及ぼす影響の解析

カリウムチャネルである KCNK10 が脂肪細胞分化に重要な役割を果たしていることを見出したが。さらに、KCNK10 と同じグループに属する KCNK2 は、脂肪細胞分化後期においてインスリンシグナルに重要な働きを有することも明らかにした。

⑥核内受容体と相互作用する因子の解析

ILF3 (Interleukin enhancer binding factor 3) が、核内受容体とコアクチベーターとして働くことを明らかにした。

(2) 成果の国内外における位置づけとインパクト、今後展望

脂肪細胞分化の最も初期に機能する因子群について、それらのシグナルネットワークの全容を明らかにすべく研究を開始した。しかし、これら因子には当研究室が見出した新規遺伝子が多く含まれており情報が少ないため、併行してノックアウトマウスを作製した。幸いにも4種のノックアウトマウス全ての作製に成功したが、特に新規遺伝子 fad24 および fad104 については、脂肪細胞分化以

外の重要な機能を明らかにすることができた。fad104の肺形成に関わる機能については、国内外で高い評価を受けている。また、fad24については、胚形成の最も初期で極めて重要な役割を果たしていると推定され今後の展開が急務である。

fad24およびfad104の興味ある新展開に時間を割いたため、本来のシグナルネットワークの解明についての成果は十分とはいえない。幸いにも、TCLの機能解析やカリウムチャンネルの関与など新たに見出した事実も多くあるので、これまでの知見を整理し、シグナル伝達連関の全体像が明らかにすべく、より詳細に解析を進めていきたい。

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 13 件)

① Ohno, M., Fujita, M., Nishizuka, M., Osada, S., and Imagawa, M.

Interactions of thyroid hormone receptor with Ku proteins and interleukin enhancer binding factor 3 modulate the promoter activity of thyroid-stimulating hormone alpha.

Biol. Pharm. Bull., 35 (3): 380-384 (2012).

査読有

<https://www.jstage.jst.go.jp/browse/bpb>

② Hayashi, T., Nozaki, Y., Nishizuka, M., Ikawa, M., Osada, S., and Imagawa, M.

Fad158 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

<https://www.jstage.jst.go.jp/browse/bpb>

③ Kishimoto, K., Nishizuka, M., Ueda, T., Kajita, K., Ugawa, S., Shimada, S., Osada, S., and 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

DOI: 10.1016/j.yexcr.2011.06.003

④ Ohno, M., Komakine, J., Suzuki, E., Nishizuka, M., Osada, S., and Imagawa, M.

Interleukin enhancer binding factor 3 functions as a liver receptor homolog-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

DOI: 10.1042/BJ20101793

⑤ Kishimoto, K., Kato, A., Osada, S., Nishizuka, M., and Imagawa, M.

Fad104, a positive regulator of adipogenesis, negatively regulates osteoblast differentiation.

Biochem. Biophys. Res. Commun., 397 (2): 187-191 (2010).

査読有

DOI: 10.1016/j.bbrc.2010.05.077

⑥ Kawaji, A., Nishizuka, M., Osada, S., and Imagawa, M.

TCL/TC10 β L regulates adipogenesis by controlling mitotic clonal expansion.

Biol. Pharm. Bull., 33 (3): 404-409 (2010).

査読有

<https://www.jstage.jst.go.jp/browse/bpb>

⑦ Johmura, Y., Watanabe, K., Kishimoto, K., Ueda, T., Shimada, S., Osada, S., Nishizuka, M., and Imagawa, M.

FAD24 causes hyperplasia in adipose tissue and improves glucose metabolism.

Biol. Pharm. Bull., 32 (10): 1656-1664 (2009).

査読有

<https://www.jstage.jst.go.jp/browse/bpb>

⑧ Hishida, T., Nishizuka, M., Osada, S., and Imagawa, M.

The role of C/EBP δ in the early stages of adipogenesis.

Biochimie, 91: 654-657 (2009).

査読有

DOI: 10.1016/j.biochi.2009.02.002

⑨ Nishizuka, M., Kishimoto, K., Kato, A., Ikawa, M., Okabe, M., Sato, R., Niida, H., Nakanishi, M., Osada, S., and 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

DOI: 10.1016/j.yexcr.2008.12.013

[学会発表] (計 50 件)

① 加藤大輝、西塚 誠、岸本圭史、長田茂宏、今川正良

脂肪細胞分化を制御する fad104 が癌細胞の

浸潤に与える影響の解析
日本薬学会第 133 年会 2013. 3. 28. 横浜

② Keishi Kishimoto, Makoto Nishizuka, Daiki Katoh, Shigehiro Osada, Masayoshi Imagawa

The role of fad104, a regulator of adipogenesis, in calvarial bone formation through BMP/Smad signaling.

2012 American Society Cell Biology (ASCB) Annual Meeting, San Francisco, CA, USA 2012.12.16.

③ 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 はマウス初期胚発生に必須である

第 85 回日本生化学会大会 2012. 12. 16. 福岡

④ 若林まい、浅野真美、長田茂宏、西塚 誠、今川正良

脂肪細胞分化過程における KCNK2 の機能解析
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集会 2012

2012. 11. 18. 岐阜

⑤ 加藤大輝、西塚 誠、岸本圭史、長田茂宏、今川正良

癌細胞の移動・浸潤における新規遺伝子 fad104 の役割

第 11 回次世代を担う若手ファーマ・バイオフィォーラム 2012 2012. 9. 15. 京都

⑥ 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 の骨分化における役割

日本薬学会第 132 年会 2012. 3. 29. 札幌

⑦ Keishi Kishimoto, Makoto Nishizuka, Shigehiro Osada, Masayoshi Imagawa

Novel gene fad104 is required for lung morphogenesis.

Experimental Biology 2011

Washington DC, USA, 2011. 4.13.

⑧ 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 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会 2010. 12. 10. 神戸

⑨ 加藤愛友美、岸本圭史、長田茂宏、西塚 誠、今川正良

脂肪細胞分化を正に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・バイオフィ

ォーラム 2010 2010. 10. 2. 京都

⑩ 大橋健吾、西塚 誠、長田茂宏、今川正良
脂肪細胞分化過程において Rho GTPase, TCL/TC10βL が RhoA シグナルに与える影響の解析

日本薬学会第 130 年会 2010. 3. 29. 岡山

⑪ 浅野真美、西塚 誠、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 の機能解析

日本薬学会第 130 年会 2010. 3. 28. 岡山

⑫ 今川正良

脂肪細胞分化の分子機構

北陸大学学術フロンティア年次研究集会・総括集会 2010. 3. 16. 金沢

⑬ 加藤愛友美、岸本圭史、長田茂宏、西塚 誠、今川正良

Mouse embryonic fibroblasts (MEF) を用いた fad104 の機能解析

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 2009

2009. 11. 23. 四日市

⑭ 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・バイオフィォーラム 2009 2009. 11. 14. 名古屋

⑮ Atsuko Kawaji, Makoto Nishizuka, Shigehiro Osada, Masayoshi Imagawa

RGS2, TCL/TC10betaL and fad104 promote mitotic clonal expansion at the early stage of adipocyte differentiation.

21st IUBMB and 12th FAOBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology. 2009. 8. 2-7. Shanghai, China.

⑯ Masae Ohno, Makoto Nishizuka, Shigehiro Osada, Masayoshi Imagawa

Ku proteins interact with farnesoid X receptor and function as corepressors.

21st IUBMB and 12th FAOBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology. 2009. 8. 2-7. Shanghai, China.

⑰ 今川正良

脂肪細胞分化に着目した新たな肥満治療薬および肥満予防薬の開発

第 8 回国際バイオフィォーラム 2009. 7. 2. 東京

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 1 件）

fad24 に関する特許を日米欧で取得

名称：脂肪細胞分化関連遺伝子およびタンパク質

発明者：今川正良、奥裕一

権利者：日水製薬株式会社

種類：特許

番号：第 4504682 号

取得年月日：2010. 4. 30.

国内外の別：国内

名称：Adipocyte differentiation-associated gene and protein

発明者：Imagawa, M., and Oku, Y.

権利者：NISSUI PHARMACEUTICAL CO, LTD.

種類：特許（European Patent）

番号：EP1 462 518 B1

取得年月日：2009. 4. 8.

国内外の別：国外

米国では、本課題開始以前に取得

番号：US 7, 351, 551 B2（US Patent）

取得年月日：2008. 4. 1.

〔その他〕

研究室ホームページ情報

<http://www.phar.nagoya-cu.ac.jp/hp/byg/index.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今川 正良（IMAGAWA MASAYOSHI）

名古屋市立大学・大学院薬学研究科・教授

研究者番号：20136823

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし