

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460074

研究課題名(和文)新規骨分化抑制因子fad104の機能解析と骨関連疾患発症における役割の解明

研究課題名(英文)The functional analyses of fad104, a novel regulator of osteoblast differentiation.

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、脂肪細胞分化を促進する新規遺伝子として単離したfactor for adipocyte differentiation (fad)104と骨分化を制御する細胞内シグナル伝達因子Smad1の相互作用様式の一部を明らかにした。さらに、fad104が骨分化だけでなく、がん細胞の浸潤、転移、足場非依存的増殖能を抑制する機能を有すること、さらにその過程でFAD104が骨分化制御にも寄与することが知られているSTAT3のリン酸化レベルを調節していることも新たに明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In this study, we demonstrated that the amino acid region 161-277 of FAD104 is required for interaction with Smad1, a regulator of osteoblast differentiation. Furthermore, knockdown and overexpression experiments showed that FAD104 suppressed the invasion, metastasis and anchorage-independent growth of cancer cells. In addition, we demonstrated that the N-terminal region of FAD104 is essential for inhibiting STAT3 activity.

研究分野：分子生物学、生化学

キーワード：FAD104 骨分化 脂肪細胞分化 がん細胞

1. 研究開始当初の背景

最近申請者らは、脂肪細胞分化初期に発現が増加する新規遺伝子として単離したfactor for adipocyte differentiation 104 (fad104)が骨分化抑制因子として機能することを明らかにした。FAD104は、タンパク質の相互作用に寄与することが知られているPxxPドメインに加え、fibronectin type IIIドメインの9回繰り返し構造、さらに、C末端に膜貫通ドメインを有する新規遺伝子として単離された。前駆脂肪細胞株を用いた検討により、fad104が脂肪細胞分化を促進する役割を担うことを明らかにした。また、fad104が脂肪細胞分化初期に観察され、終末分化に必須と考えられている一過性の細胞増殖 (clonal expansion) の制御に寄与することも明らかにした。

さらに、fad104のノックアウトマウスを樹立し、生体内におけるfad104の機能について解析した。その結果、fad104欠損マウスが出生直後に死亡することがわかった。様々な臓器について解析した結果、fad104欠損マウスの肺では、肺の機能維持に必須な肺胞上皮II型細胞の分化が著しく未熟であり、かつ肺胞拡張に寄与するサーファクタントタンパク質の発現が減少していることを明らかにした。

骨分化におけるfad104の役割とその機能については以下のことを明らかにした。すなわち、Fad104欠損マウスより調製したmouse embryonic fibroblasts (MEFs)では野生型MEFsと比較し骨分化が促進され、骨分化に關与する転写因子Runx2の発現も亢進していることを明らかにした。さらに、fad104欠損マウスを詳細に観察した結果、fad104の頭蓋骨において、前頭骨と左右の頭頂骨との間に存在するひし形の間隙である大泉門付近の骨化が異常に亢進されていることを見出した。また、胎生18.5日齢の頭蓋

より調製した頭蓋骨由来の骨芽細胞であるcalvaria細胞を用いた検討から、fad104の欠損により、骨分化に重要な役割を担うBone morphogenetic protein (BMP)刺激条件におけるSmad1/5/8のリン酸化が顕著に亢進すること、逆に、fad104を過剰発現した細胞では、Smad1/5/8のリン酸化レベルが減弱されることを明らかにした。これらの結果に加え、FAD104がSmad1/5/8と相互作用していることも見出した。

以上の検討結果より、fad104が脂肪細胞分化、肺形成にとどまらず、BMP/Smadシグナルを制御する新規の骨分化抑制因子であることを明らかにしてきた。

2. 研究の目的

骨は身体の支持だけでなく、運動を可能にする骨格系の中心的役割を担う。高齢化社会の加速により、骨粗鬆症や変形関節炎等の骨関連疾患への迅速な対応が求められている。骨組織は、生体において常にその一部が破骨細胞により吸収され、同時にほぼ同量の新しい骨が骨芽細胞の分化により形成されることにより、骨量が維持され、ホメオスタシスが保たれる。それゆえ、骨関連疾患発症のメカニズムを理解し、より効果的な治療薬を開発するためには、破骨細胞による骨吸収メカニズムに加え、骨分化の分子メカニズムを解明することが必要不可欠である。

骨芽細胞から骨への分化には、osterixやRunx2などの転写因子、BMPなどの液性因子が骨分化促進に重要な役割を担うことは報告されているが、分化を抑制する機構については未だ不明な点が多い。そこで本研究では、特にfad104によるBMP/Smadシグナル制御機構とfad104の発現調節機構に焦点をあて、fad104による骨分化制御の分子メカニズムを明らかにすることをめざした。さらに、検討の過程でfad104ががん細胞の浸潤、転移に重要な役割を担うこ

とも見出したため、その制御機構について
も詳細に検討を行った。

3. 研究の方法

FAD104 および Smad1/5/8 のどの領域が
Smad1/5/8 との相互作用に重要であるかを
明らかにするために、FAD104 ならびに
Smad1/5/8 について各種欠失変異体を作製
し、相互作用に重要な領域を検討した。

ゲノムデータベースを利用し、マウスおよ
びヒトの fad104 のプロモーター領域を同定
し、その発現調節機構について検討した。

FAD104 のがん細胞の浸潤、転移における
役割を検討するため、siRNA を用いた発現抑
制系ならびにアデノウイルスを用いた過剰
発現系による検討により、メラノーマ細胞の
浸潤、転移における役割を検討した。さらに、
同様の実験方法を用いて、がん細胞の足場非
依存的増殖能獲得に FAD104 が担う役割に
ついて検討を行った。

4. 研究成果

複数の GST 融合 fad104 欠損変異体を作製
した。大腸菌で発現させ、精製した FLAG 融
合 Smad1 との pull down assay の結果、
FAD104 の 161-277 アミノ酸が Smad1 との
相互作用に重要である可能性が示唆された。
この領域には、タンパク質相互作用に重要な
グリシンリッチ領域を含むことから、グリシ
ンリッチ領域が Smad1 との相互作用に重要
である可能性が示唆された。次に、Myc 融合
Smad1 各種欠損変異体を作製した。これら
の変異体をヒト子宮頸がん細胞株 HeLa 細胞
に導入し、発現と局在を検討した結果、いず
れの各種変異体も細胞質に局在することが
わかった。そこで、HeLa 細胞に、Myc 融合
Smad1 各種欠損変異体と FLAG 融合
FAD104 を co-transfection し、免疫沈降法に
より相互作用を検討したが、FAD104 が

Smad1 のどの領域に結合するかについては
明らかにすることができなかった。

次に、fad104 の発現調節機構についても
検討を行った。その結果、脂肪細胞分化誘
導剤の一つであるデキサメタゾンが
fad104 の発現に重要であることが明らか
になった。また、fad104 の転写開始点の探
索を行った結果、fad104 には異なる転写開
始点を有する transcript variant が 2 種類
存在すること、さらに、脂肪細胞分化初期
に発現変化を示すのは、transcript variant
1 のみであることが明らかになった。

これまでの検討により、FAD104 を欠損
した mouse embryonic fibroblasts (MEFs)
は野生型 MEF と比較し、細胞の接着、移
動が低下することを明らかにしている。ま
た、FAD104 が制御する BMP/Smad シグ
ナルは骨分化だけでなく、がん細胞の浸潤
や転移にも重要であることが報告されてい
る。そこで、骨分化における FAD104 の機
能を明らかにする一助としてがん細胞の浸
潤、転移における FAD104 の役割と機能に
ついての検討を進めた。検討の結果、
FAD104 は高転移性のがん細胞では低転移
性のがん細胞に比べてその発現が低下して
いることを見出した。また、FAD104 の発現
を抑制したメラノーマ細胞は、浸潤能が亢進
した一方、FAD104 の過剰発現は浸潤能を抑
制することを明らかにした。さらに、FAD104
過剰発現細胞をマウスに導入した結果、コン
トロール細胞に比べて肺への転移が抑制さ
れることも見出した。以上の結果から、
FAD104 はがん細胞の浸潤、転移を負に制
御する役割を担うことを明らかにした。

さらに、がん細胞の浸潤に重要な細胞内シ
グナル伝達系について評価した結果、
FAD104 が STAT3 と相互作用し、そのリン
酸化レベルを減弱させることも明らかにし
た。一方、がん細胞においては FAD104 が
Smad のリン酸化レベルに影響を与えないこ

とも見出した。このことから、Fad104 の機能は細胞種により異なる可能性が考えられた。

次に、FAD104 ががん細胞の足場非依存的増殖能に与える影響を検討した。発現抑制系ならびに過剰発現系を用いた検討により、FAD104 ががん細胞の足場非依存的増殖能を阻害する役割を担うことを明らかにした。

さらに、FAD104 がどのように STAT シグナルを制御するのか検討した。FAD104 ならびに STAT3 の各種欠損変異体を作製し、免疫沈降法および pull down assay にて相互作用する領域を検討した結果、FAD104 は自身の N 末端領域を介して STAT3 の N 末端領域ならびに C 末端領域と結合することが明らかになった。

最後に、Smad ならびに STAT シグナルが重要な役割を担う生命現象の一つである上皮間葉転換 (EMT) に fad104 が及ぼす影響について検討を進めた。検討の結果、FAD104 は EMT の過程でその発現が顕著に増加することを見出した。さらに、FAD104 の発現を抑制すると EMT の誘導が亢進されること、逆に、FAD104 の過剰発現により EMT 誘導が阻害されることを見出した。また、その過程において FAD104 は TGF- β 依存性の Smad シグナルを制御することも新たに見出した。EMT はがん細胞の浸潤や抗がん剤に対する抵抗性惹起に極めて重要な生命現象である。本年度の検討により、FAD104 が脂肪細胞や骨細胞の分化にとどまらず、EMT の誘導にも重要な役割を担うという新しい知見を得ることができた。

以上、本研究により FAD104 の新しい役割と機能を見出すことができた。FAD104 が脂肪細胞分化や骨細胞分化にとどまらず、がん細胞の浸潤や転移、足場非依存的増殖能、さらには EMT の制御にも寄与することは非常に興味深い。今後、本研究で得られた知見を進展させ、骨分化、さらには骨分化異常を原

因とする疾患における FAD104 の役割を明らかにするとともに新たな創薬開発につなげていきたい。

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 4 件)

- 1) Nishizuka M., Horinouchi W., Yamada E., Ochiai N., Osada S., Imagawa M.
KCNMA1, a pore-forming α -subunit of BK channels, regulates insulin signalling in mature adipocytes
FEBS Lett. 2016, 590:4372-4380 査読有
- 2) Katoh D., Nishizuka M., Osada S., Imagawa M.
FAD104, a regulator of adipogenesis and osteogenesis, interacts with the C-terminal region of STAT3 and represses malignant transformation of melanoma cells.
Biol Pharm Bull. 2016, 39:849-855 査読有
- 3) Ochiai N., Nishizuka M., Osada S., Imagawa M.
Fad24, a positive regulator of adipogenesis, is required for S phase re-entry of C2C12 myoblasts arrested in G0 phase and involved in p27^{Kip1} expression at the protein level.
Biol Pharm Bull. 2016, 39:807-814 査読有
- 4) Katoh D., Nishizuka M., Osada S., Imagawa M.
Fad104, a positive regulator of adipocyte differentiation, suppresses invasion and metastasis of melanoma cells by inhibition of STAT3 activity.
Plos One 2015; 10 (2): e0117197 査読有

[学会発表](計 5 件)

- 1) 後藤元晴、長田茂宏、西塚 誠、今川正良
TGF- β 誘導性 EMT における脂肪細胞分化制御因子 fad104 の機能解析
日本薬学会第 137 年会 2017. 3.26 仙台
27H-pm03

- 2) 後藤元晴、加藤大輝、長田茂宏、西塚 誠、
今川正良
脂肪細胞分化関連遺伝子 fad104 は上皮
間葉転換を制御する
日本薬学会第 136 年会 2016.3.28.横浜
280-pm12
- 3) 後藤元晴、長田茂宏、西塚 誠、今川正
良
がん細胞の上皮間葉転換における脂肪細
胞分化促進因子 fad104 の役割
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 2016 2016.
10.30 岐阜 D-4
- 4) Goto M., Nishizuka M., Osada S.,
Imagawa M.
The role of fad104, a positive regulator
for adipogenesis, in TGF- β 1-induced
epithelial to mesenchymal transition.
2016 American Society Cell Biology
Annual Meeting 2016.12.6 San
Francisco, CA P1981
- 5) Katoh D., Nishizuka M., Osada S.,
Imagawa M.
Fad104, a positive regulator of
adipogenesis, inhibits invasion and
metastasis of cancer cells through the
suppression of STAT3 activity
40th FEBS Congress 2015.7.8 Berlin
P18-015

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