

## トピックス

## 抗肥満効果をもつ irisin のビタミン A による発現制御

## Vitamin A up-regulates the expression of irisin with anti-obesity effect

## はじめに

脂質や糖質を多く含む食品の過剰摂取(カロリー消費の増加)や座りがちな生活がもたらす運動不足(エネルギー消費の低下)は、脂肪組織だけでなく骨格筋、肝臓などの他の組織においても脂質を過剰に蓄積させ、体重を増加させる要因となっている<sup>1)</sup>。肥満者は先進国に限らず、開発途上国でも増加していることから、肥満は世界的規模で主要な健康問題として注目されている。内臓脂肪型の肥満は、高血糖、高血圧、脂質代謝異常などが組み合わさった状態(メタボリックシンドローム)を誘発し、2型糖尿病や心臓病に罹患するリスクを高める。したがって、内臓脂肪型の肥満の抑制がメタボリックシンドロームに関連した様々な疾患の予防対策となる。

脂肪組織は過剰となったエネルギーを貯蔵する組織として機能するだけでなく、多数の生理活性タンパク質(adipokine)を分泌し、炎症反応を調節する機能も有している<sup>2)</sup>。肥満になると tumor necrosis factor- $\alpha$  のような炎症性の adipokine の分泌が増加し、また adiponectin のような抗炎症性の adipokine の分泌が減少する。その結果、脂肪組織における炎症反応が末梢組織のインスリン抵抗性を誘導し、さらに脂質異常症や糖尿病、高血圧などの病態を惹起する。

ビタミン A は免疫機能や胚発生、細胞分化などを制御し、様々な組織の発達に重要な役割を果たしている<sup>3)</sup>。ビタミン A のカルボン酸型である all-trans retinoic acid (ATRA) は *in vivo* と *in vitro* において脂質およびエネルギー代謝に多くの有用な効果をもたらす。最近、ビタミン A が肥満の進行だけでなく、インスリン抵抗性、2型糖尿病、心臓疾患などを含む肥満に関連した疾病の進行にも影響することが報告されている<sup>4)</sup>。Felipe ら<sup>5)</sup> は、*in vitro* 実験において NMRI マウスから単離した初代褐色脂肪細胞またはマウス胎児線維芽細胞株 3T3-L1 を分化させた白色脂肪細胞を 24 時間 ATRA 存在下で培養したところ、インスリン抵抗性を惹起する炎症性

adipokine の一種である resistin の mRNA レベルが減少することを見いだした。さらに、ATRA と resistin の関係を *in vivo* で検証するために、12 週齢の NMRI 雄性マウスの腹腔内に 4 日間 ATRA (10 ~ 100 mg/kg body weight/day) を投与したところ、ATRA 投与が食餌摂取量に影響をあたえずに体重と白色脂肪重量を有意に減少させることも見いだした。

近年 adipokine のように免疫細胞以外から産生されるサイトカインの産生やその生理機能に関心が寄せられている。筋収縮による刺激で骨格筋から分泌されるサイトカインは myokine と呼ばれる。Pedersen ら<sup>6)</sup> は、運動時および運動後に血中の interleukin-6 (IL-6) 濃度が増加することを発見した。IL-6 は収縮する筋線維から放出され、運動後数時間以内に血中で最大濃度に達し、筋損傷が起りやすいレジスタンス運動だけでなく、ランニングなどの持久運動でも分泌が促進される。さらに、IL-6 は脂肪分解ならびに脂肪酸酸化を促進することが証明され、脂肪組織に作用する myokine として位置付けられた。近年、ATRA の抗肥満作用に期待が寄せられる一方で、その作用メカニズムは解明されておらず、ATRA 自身の作用によるのか、あるいは ATRA によって発現が増加する adipokine や myokine のような分泌因子による作用であるのかについては不明である。そこで本稿では、骨格筋から分泌され、脂質代謝に関与する myokine の一種である irisin の発現と ATRA との関連に関する文献を紹介する。

## myokine としての irisin の作用

Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator-1  $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ) は運動によって骨格筋で発現が増加し、熱産生、ミトコンドリアの生合成、エネルギー代謝などに関わる様々な遺伝子の発現を増加させる<sup>7)</sup>。Boström ら<sup>8)</sup> は、マウスの骨格筋で PGC-1 $\alpha$  を高発現させると、fibronectin type III domain-containing protein 5 (FNDC5) の発現が増加することを見いだした。FNDC5 は N 末端に位置するシグナルペプチドに続き、

fibronectin ドメインと疎水性ドメインを持つ膜貫通型のペプチドである(図1)。組換え体 FNDC5 存在下で間質血管細胞群(脂肪前駆細胞を含む細胞群)を脂肪細胞に分化させると、白色脂肪細胞の褐色化にかかわる因子である *Ucp1* や *Prdm16*, *Cidea* の発現レベルが増加した。また、マウスの骨格筋で PGC-1 $\alpha$  を高発現させると FNDC5 の発現が増加し、白色脂肪細胞の褐色化が誘導された。これらの結果を踏まえ、骨格筋の細胞表面で発現している FNDC5 の細胞外領域が切断され、血中を介して脂肪細胞に作用する可能性を検討するため、C 末端に FLAG-tag を有した FNDC5 を HEK 293 細胞で高発現させ、細胞と培養上清において FLAG-tag を有するタンパク質の存在がウエスタンブロットによって解析された。その結果、FLAG-tag を有する 23 kDa のタンパク質が細胞破碎液中で検出されたが、培養上清中では検出されなかった。一方で、培養上清中では 32 kDa のタンパク質が抗 FNDC5 抗体によって検出された。FNDC5 を発現させた細胞の培養上清をペプチド *N*-グリコシダーゼ F で処理すると、32 kDa のタンパク質は 20 kDa へとサイズが減少した。これらのことから、FNDC5 の C 末端側で切断された断片が培地中に分泌され、その断片は糖鎖修飾を受けていることが示唆された。培地中に見いだされた FNDC5 由来のポリペプチドのアミノ酸配列が質量分析法を用いて解析され、112 個のアミノ酸からなるポリペプチドとして放出されていることが判明した。つまり、FNDC5 は N 末端側と C 末端側で切断を受け、その結果生じた糖鎖修飾を受けた fibronectin III ドメイン(正確にはこのドメイン内の C 末端領域の一部を欠失している)が筋肉から分泌され、他の組織に作用するシグナル伝達物質として機能すると推測された。このタンパク質はギリシャ神話の天地をつなぐ虹の女神 Iris にちなんで、irisin と名付けられた。

野生型 BALB/c マウスに FNDC5 を含有するアデノウイルス粒子を静脈内注射したところ、irisin の血漿中濃度は 3 ~ 4 倍に増加した<sup>8)</sup>。ウイルス導入から 10 日後、皮下脂肪の *Ucp1* 発現量は 13 倍に増加したことから、血漿中 irisin レベルの増加により、*in vivo* で白色脂肪組織の褐色化が促進されることが示唆された。irisin は骨格筋から分泌され、脂肪細胞などにエンドクライン的に作用するだけでなく、骨格筋自身にオートクライン的にも作用する<sup>9)</sup>。マウス由来筋細胞 C2C12 細胞を irisin で刺激すると、筋芽細胞の分化に必要な因子である myogenin の発現が増加し、筋萎縮因子である myostatin およびユビキチンプロテアソーム系を介したタンパク質分解に寄与するユビキチンリガーゼである atrogen-1 と Murf1 の発現が低下した。さらに、irisin による刺激は C2C12 細胞においてミトコンドリア関連遺伝子である mitochondrial transcription factor A (*Tfam*)、NF-E2-related factor 1 (*Nrf1*) および *Ucp3* の発現を増加させたことから、irisin がミトコンドリアの生合成の促進に寄与することが推測された<sup>10)</sup>。

運動により *Fndc5* や irisin の発現が増加することは知られていたが、Amengual ら<sup>11)</sup> は C2C12 細胞への ATRA (0.1 ~ 10  $\mu$ M) 刺激が濃度依存的に *Fndc5* の発現レベルを増加させ、培地中の irisin レベルも増加させることを見いだした。12 週齢の NMRI 雄性マウスの皮下に ATRA を 4 日間投与 (50 mg/kg body weight/day) したところ、コントロールマウスと比較して血漿中の irisin 濃度は 5 倍以上に増加した。しかし、ATRA 投与マウスの骨格筋での *Fndc5* レベルには変化がなかった。近年、脂肪組織も irisin の産生源であると注目されているため、脂肪組織と肝臓における FNDC5 の発現が免疫組織染色により評価された。コントロールマウスにおいて FNDC5 は腓腹筋、肝臓そして褐色脂肪で発現しており、ATRA 処理マウスはコントロールマウス

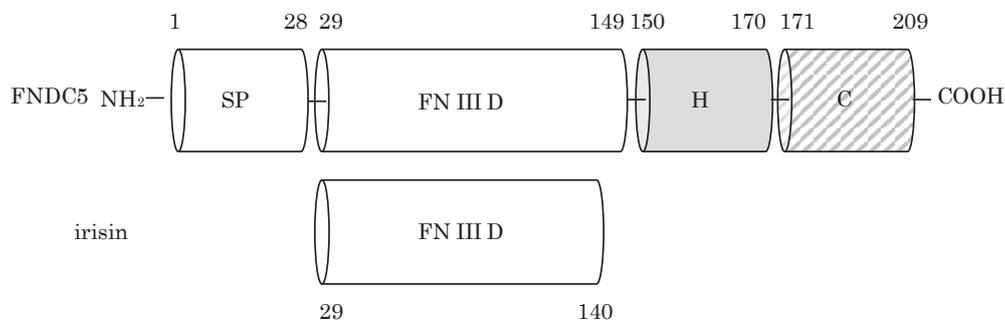


図1 マウス FNDC5 と irisin の構造

SP: シグナルペプチド; FN III D: fibronectin III ドメイン; H: 疎水性ドメイン; C: C 末端ドメイン

と比べ、FNDC5 レベルが腓腹筋と肝臓で減少し、褐色脂肪と精巣上体白色脂肪では増加した。さらに、ATRA 処理マウスにおいて鼠径部皮下脂肪における褐色化が免疫組織染色の解析から観察された。これらのことから、ATRA 刺激により骨格筋や肝臓から irisin が放出され、褐色脂肪や鼠径部皮下脂肪へ運搬され、脂肪組織に有益な作用をおよぼす可能性が示された。

ATRA は retinoic acid receptor (RAR) の特異的リガンドであり、細胞内で異性化されて 9-*cis* retinoic acid になり、retinoid X receptor (RXR) に結合する。RAR や RXR は核内受容体と呼ばれ、転写因子として機能する<sup>12)</sup>。一方で、RXR は RAR-RXR ヘテロダイマーを形成する以外に、RAR 以外の様々な核内受容体とヘテロダイマーを形成する。RXR とダイマーを形成する核内受容体には、vitamin D receptor, thyroid hormone receptor などのホルモン受容体、peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR), liver X receptor, farnesoid X receptor などの脂質やコレステロール代謝を制御する受容体がある<sup>13)</sup>。Amengual ら<sup>11)</sup> は ATRA による *Fndc5* レベルの増加が核内受容体を介したのか否かを検討するため、RAR, RXR, または PPAR $\beta/\delta$  に対する選択的アゴニストを用いて *Fndc5* レベルを評価した。C2C12 細胞において、*Fndc5* の増加は RAR アゴニストである TTNPB によっては誘導されず、RXR アゴニストである methoprene または PPAR $\beta/\delta$  アゴニストである GW0742 によって誘導された。これらのことから、ATRA による *Fndc5* や irisin の増加は RAR の活性化ではなく、RXR と PPAR $\beta/\delta$  の活性化によって媒介されると推測された。PPAR $\beta/\delta$  を高発現させたトランスジェニックマウスでは高脂肪食摂取による肥満、高脂血症、脂肪肝などが緩和させる<sup>14)</sup>。また、PPAR $\beta/\delta$  特異的アゴニストである GW501516 を 7 日間経口投与したマウスでは脂肪滴サイズの減少がみられる。これらのこと

から PPAR $\beta/\delta$  活性化による食事性肥満抑制効果には、PPAR $\beta/\delta$  アゴニストだけでなく、ATRA との併用が有望であるかもしれない。

### おわりに

irisin の発見から数年が経過し、様々な組織において irisin の発現調節機構や機能性の解析が進んでいる。irisin の発現が運動によって増加することから、肥満や生活習慣病などに対する irisin の改善効果が期待されている。この報告において、ATRA による肥満抑制作用に irisin が関与する可能性が見いだされ、さらに RXR-PPAR $\beta/\delta$  が irisin の発現調節に関与する可能性も示された。ATRA を核内へ輸送するタンパク質として cellular retinoic acid binding protein 2 と fatty acid binding protein 5 (FABP5) がある。このうち、PPAR 活性に関与するのは FABP5 であり、ATRA 刺激で FABP5 は核内に移行し、PPAR $\beta/\delta$  の転写活性を上昇させる<sup>15)</sup>。これらのことから、筋肉細胞内に取り込まれた ATRA は FABP5 を介して核内に運ばれ、PPAR $\beta/\delta$  を活性化し、その結果として irisin の発現を増加させると推測される(図 2)。PPAR のサブタイプである PPAR $\gamma$  アゴニスト (rosiglitazone) によってインスリン抵抗性の改善がみられるが、心臓発作のリスクが 43% 増加する<sup>16)</sup>。PPAR $\beta/\delta$  のアゴニストの抗肥満以外の作用については未だ不明な点が多く、上市には至っていないため、PPAR $\beta/\delta$  アゴニストの研究により副作用の少ない肥満抑制薬剤の開発が可能になるかもしれない。現時点で ATRA により活性化された RXR-PPAR $\beta/\delta$  が *Fndc5* の発現を直接制御するのかは不明である。今後、ATRA が irisin を増加させるメカニズムと irisin が肥満抑制作用を発揮するメカニズムがより詳細に解明され、臨床研究につながることを期待したい。

(2019.7.22 受付)

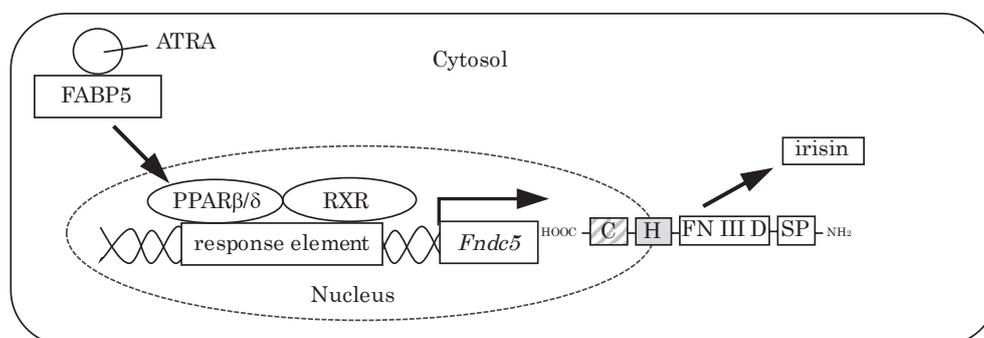


図 2 予測される ATRA による irisin の発現調節機構

**Key Words:** myokine, irisin, FNDC5, retinoic acid, obesity

Division of Applied Life Sciences, Graduate School of Life and Environmental Sciences, Osaka Prefecture University

Miki Yoshikawa, Naoki Harada, Ryoichi Yamaji

大阪府立大学大学院生命環境科学研究科応用生命科学専攻

吉川 実樹, 原田 直樹, 山地 亮一

## 文 献

- 1) Shimabukuro M (2009) Cardiac adiposity and global cardiometabolic risk: new concept and clinical implication. *Circ J* **73**, 27-34
- 2) Kwon H, Pessin JE (2013) Adipokines mediate inflammation and insulin resistance. *Front Endocrinol* **4**, 1-13
- 3) Duester G (2008) Retinoic acid synthesis and signaling during early organogenesis. *Cell* **134**, 921-931
- 4) Blaner WS (2019) Vitamin A signaling and homeostasis in obesity, diabetes, and metabolic disorders. *Pharmacol Ther* **197**, 153-178
- 5) Felipe F, Bonet ML, Ribot J, Palou A (2004) Modulation of resistin expression by retinoic acid and vitamin A status. *Diabetes* **53**, 882-889
- 6) Petersen AM, Pedersen BK (2005) The anti-inflammatory effect of exercise. *J Appl Physiol* **98**, 1154-1162
- 7) Puigserver P, Wu Z, Park CW, Graves R, Wright M, Spiegelman BM (1998) A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell* **92**, 829-839
- 8) Boström P, Wu J, Jedrychowski MP, Korde A, Ye L, Lo JC, Rasbach KA, Boström EA, Choi JH, Long JZ, Kajimura S, Zingaretti MC, Vind BF, Tu H, Cinti S, Höjlund K, Gygi SP, Spiegelman BM (2012) A PGC1- $\alpha$ -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. *Nature* **481**, 463-468
- 9) Rodríguez A, Becerril S, Méndez-Giménez L, Ramírez B, Sáinz N, Catalán V, Gómez-Ambrosi J, Frühbeck G (2015) Leptin administration activates irisin-induced myogenesis via nitric oxide-dependent mechanisms, but reduces its effect on subcutaneous fat browning in mice. *Int J Obes* **39**, 397-407
- 10) Vaughan RA, Gannon NP, Barberena MA, Garcia-Smith R, Bisoffi M, Mermier CM, Conn CA, Trujillo KA (2014) Characterization of the metabolic effects of irisin on skeletal muscle *in vitro*. *Diabetes Obes Metab* **16**, 711-718
- 11) Amengual J, García-Carrizo FJ, Arreguín A, Mušinić H, Granados N, Palou A, Bonet ML, Ribot J (2018) Retinoic acid increases fatty acid oxidation and irisin expression in skeletal muscle cells and impacts irisin *in vivo*. *Cell Physiol Biochem* **46**, 187-202
- 12) Bonet ML, Ribot J, Palou A (2012) Lipid metabolism in mammalian tissues and its control by retinoic acid. *Biochim Biophys Acta-Mol Cell Biol Lipids* **1821**, 177-189
- 13) Kojetin DJ, Matta-Camacho E, Hughes TS, Srinivasan S, Nwachukwu JC, Cavett V, Nowak J, Chalmers MJ, Marciano DP, Kamenecka TM, Shulman AI, Rance M, Griffin PR, Bruning JB, Nettles KW (2015) Structural mechanism for signal transduction in RXR nuclear receptor heterodimers. *Nat Commun* **6**, 1-14
- 14) Wang YX1, Lee CH, Tiep S, Yu RT, Ham J, Kang H, Evans RM (2003) Peroxisome-proliferator-activated receptor  $\delta$  activates fat metabolism to prevent obesity. *Cell* **113**, 159-170
- 15) Schug TT, Berry DC, Shaw NS, Travis SN, Noy N (2007) Opposing effects of retinoic acid on cell growth result from alternate activation of two different nuclear receptors. *Cell* **129**, 723-733
- 16) Nissen SE, Wolski K (2007) Effect of rosiglitazone on the risk of myocardial infarction and death from cardiovascular causes. *N Engl J Med* **356**, 2457-2471