

---

**トピックス**

---

## 骨格筋における異所性脂肪蓄積に対するレチノイン酸受容体アゴニストの抑制効果

### Inhibitory effects of retinoic acid receptor agonists on ectopic fat accumulation in skeletal muscle

#### はじめに

骨格筋の量と質の低下は、運動機能の低下をもたらす。日常生活に支障をきたす恐れがある。近年、骨格筋における脂肪浸潤が注目されている。この脂肪浸潤に関与する脂肪は異所性脂肪とよばれ、本来脂肪が蓄積されないはずの肝臓や心臓、膵臓、骨格筋に蓄積する。一般的に、脂肪は皮下脂肪と内臓脂肪に大別されるが、異所性脂肪はこれらと異なり第3の脂肪とよばれる。肝臓や膵臓に異所性脂肪が溜まると臓器障害を引き起こされ、非アルコール性脂肪肝炎(NASH)や2型糖尿病のような疾患につながるリスクが高まる<sup>1)</sup>。骨格筋における異所性脂肪の蓄積は筋機能の低下をもたらすと考えられる。その代表的な疾患にDuchenne型筋ジストロフィーがある<sup>2)</sup>。Duchenne型筋ジストロフィーはジストロフィンをコードする遺伝子の変異により引き起こされ、病状が進行すると筋線維の数と断面積が減少し、間質の線維化や脂肪化がおこる。その結果、筋力が低下し、歩行困難などの運動機能障害に陥る。これらのように異所性脂肪の蓄積は様々な障害を引き起こすため、異所性脂肪形成のメカニズムを理解し、さらにその予防方法と治療薬を開発する必要がある。

骨格筋における異所性脂肪の供給源として骨格筋間葉系前駆細胞(fibro-adipogenic progenitors; FAPs)が同定された<sup>3)</sup>。最近の研究により、FAPsの脂肪細胞への分化がレチノイン酸受容体(retinoic acid receptor; RAR)アゴニストにより阻害されることが明らかになった<sup>4)</sup>。本稿では、FAPsについて概説し、異所性脂肪蓄積の治療薬候補となりうるRARアゴニストに関する最近の知見について紹介する。

#### 骨格筋における異所性脂肪の供給源であるFAPs

骨格筋にはサテライト細胞とFAPsの少なくとも2種

類の幹細胞が存在する。これらの細胞は骨格筋の維持と修復に重要な役割を果たす。サテライト細胞は転写因子であるPax7(paired box 7)陽性細胞であり、骨格筋を構成する筋線維の形質膜と基底膜の間に存在する。成熟した骨格筋では通常サテライト細胞は休止状態であるが、損傷などの物理的な刺激により活性化し、Pax7の下流に位置する筋分化制御因子が発現する。その結果、筋分化が引き起こされ、損傷した骨格筋は再生される。一方、血小板由来増殖因子 $\alpha$ 受容体(platelet-derived growth factor receptor  $\alpha$ ; PDGFR $\alpha$ )陽性細胞であるFAPsは、健康な骨格筋に豊富に存在しており、サテライト細胞と同様に筋線維の基底膜に隣接している。FAPsも通常骨格筋で静止状態であるが、損傷を受けると活性化<sup>5)</sup>する。FAPsは間接的に筋形成に関与しており、サテライト細胞に作用することでその機能を発揮する<sup>5)</sup>。活性化されたFAPsはパラクライン因子を分泌することで、サテライト細胞が分化しやすい環境を作り出す。FAPsが分泌する因子の一つにWISP1(WNT1 inducible signaling pathway protein 1)が挙げられる<sup>6)</sup>。

FAPsは間葉系幹細胞の一種として知られており、脂肪細胞や線維芽細胞に分化する<sup>7)8)</sup>。筋線維間の脂肪蓄積はFAPsによって引き起こされ、筋ジストロフィーにおける異所性脂肪がFAPs由来であることが示されている<sup>2)</sup>。このようにFAPsの脂肪細胞への分化に関するさらなる研究は、骨格筋における異所性脂肪が関与する疾患の治療につながると期待される。

#### 治療薬としてのRARアゴニスト

FAPsの脂肪細胞への分化はRARアゴニストにより阻害されることが知られている<sup>9)</sup>。RARは核内受容体であり、生体内ではレチノイドの一つである全トランスレチノイン酸(ATRA)をアゴニストとして結合することで、転写因子としての機能を発揮する。RARは、もう一つのレチノイド受容体であるレチノイドX受容体(retinoid X receptor; RXR)とヘテロダイマーを形成

して標的遺伝子のプロモーター領域に存在するレチノイン酸応答エレメント (retinoic acid response element: RARE) に結合することで、標的遺伝子の発現を促進する。RAR には、 $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  の3つのサブタイプが存在する。これまでにいくつかの RAR アゴニストが治療薬として臨床で使用されており、RAR $\alpha$  と RAR $\beta$  に対するアゴニストであるタミバロテン (Am80) は、ATRA 耐性の急性前骨髄球性白血病の治療薬として使用されている<sup>10)</sup>。RAR $\beta$  と RAR $\gamma$  に対するアゴニストであるアダパレン (ADP) は、皮膚疾患の治療薬として期待されており、現在ニキビ治療薬として使用されている。また、ADP はがん細胞の増殖抑制作用を有しており、抗がん療法への可能性を秘めている<sup>11)</sup>。

### 脂肪細胞への分化に関わる遺伝子

肥満や糖尿病などの生活習慣病が世界規模で問題となっており、脂肪に関して広く研究されている。脂肪細胞への分化には、転写因子であるペルオキシソーム増殖剤活性化受容体  $\gamma$  (peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ ; PPAR $\gamma$ )、CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP)  $\alpha$ , C/EBP $\beta$ , C/EBP $\delta$  が重要な役割を果たしている<sup>12)</sup>。PPAR $\gamma$  には、選択的スプライシングの産物として PPAR $\gamma$ 1, PPAR $\gamma$ 2, PPAR $\gamma$ 3 の3種のアイソフォームが存在する。マウス胎児線維芽細胞株 NIH-3T3 細胞に PPAR $\gamma$ 2 を発現させると、脂肪細胞への分化が促進される<sup>13)14)</sup>。一方、Evan ら<sup>15)</sup> は脂肪細胞への分化が可能な ES 細胞を利用して、PPAR $\gamma$  ホモ欠損 ES 細胞とヘテロ欠損 ES 細胞が脂肪細胞へ分化するか否かを評価した。その結果、PPAR $\gamma$  ホモ欠損 ES 細胞では脂

肪細胞へ全く分化せず、ヘテロ欠損 ES 細胞では脂肪細胞への分化が抑制された。これらの結果より、脂肪細胞への分化には PPAR $\gamma$  が必要であり、PPAR $\gamma$  の発現量に依存して分化の程度が決まると推測された。一方で、C/EBP $\alpha$  を欠損したマウスから単離した線維芽細胞では脂肪細胞への分化が抑制され、PPAR $\gamma$  の発現は認められなかった<sup>16)</sup>。C/EBP $\beta$  と C/EBP $\delta$  に関しては、どちらか片方の遺伝子を欠損したマウスから単離した線維芽細胞では脂肪細胞への分化は完全に阻害されなかった。しかし、C/EBP $\beta$  と C/EBP $\delta$  の両方の遺伝子を欠損している場合は脂肪細胞への分化は完全に阻害され、PPAR $\gamma$  と C/EBP $\alpha$  の発現はみられなかった<sup>17)</sup>。これらの結果より C/EBP $\beta$  と C/EBP $\delta$  は C/EBP $\alpha$  と PPAR $\gamma$  の上流に存在し、C/EBP $\alpha$  と PPAR $\gamma$  の発現を調節すると推測された。

### 骨格筋の異所性脂肪蓄積を抑制する RAR アゴニスト

C/EBP $\beta$  に関してはその発現と Thr188 でのリン酸化が、初期の脂肪細胞の分化において重要な役割を果たす<sup>18)-20)</sup>。C/EBP $\beta$  の発現とリン酸化が阻害されると、ステロール調節エレメント結合タンパク質 1a (sterol responsive element binding protein 1a; SREBP1a) と PPAR $\gamma$ 2 の発現が阻害される<sup>20)</sup>。SREBP1a の発現は C/EBP $\beta$  のリン酸化を介した GSK3 $\beta$  活性に依存しており、SREBP1a の発現をノックダウンすると PPAR $\gamma$ 2 と C/EBP $\alpha$  の発現が阻害される<sup>20)</sup>。ATRA や RAR アゴニストは脂肪細胞への分化に対して強力な阻害剤としての役割を果たすことが知られている<sup>21)</sup>。白色脂肪細胞の

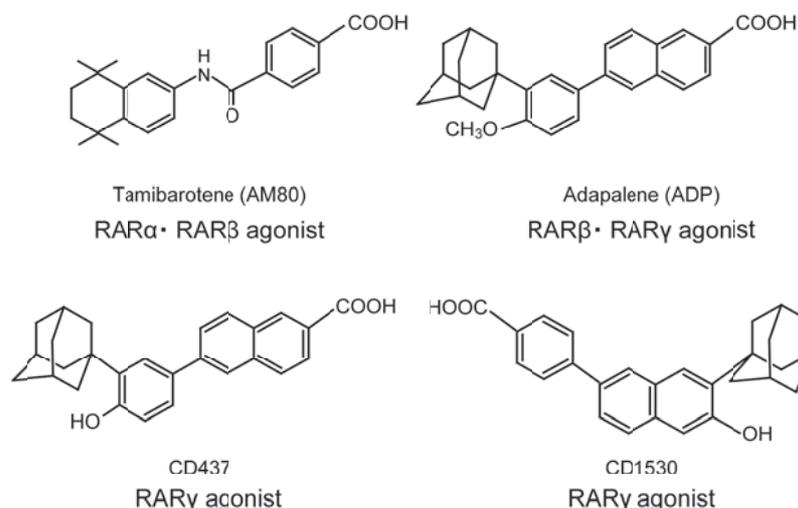


図1 様々な RAR agonist

前駆細胞株であるマウス前脂肪細胞株 ST-13 細胞や 3T3-F442 細胞, マウス線維芽細胞株 3T3-L1 細胞の脂肪細胞への分化がレチノールやその代謝物である ATRA により抑制された<sup>22)-24)</sup>. 3T3-L1 細胞において ATRA は C/EBP $\beta$  の誘導を阻害しないが, C/EBP $\beta$  の転写活性を阻害した<sup>25)</sup>. また ATRA は C/EBP $\alpha$  と PPAR $\gamma$  の誘導と脂肪細胞の分化を阻害した. さらに 3T3-F442 細胞において ATRA は C/EBP $\beta$  のリン酸化を阻害し, SREBP1a, PPAR $\gamma$ 2, C/EBP $\alpha$  をコードする遺伝子の発現を抑制した<sup>24)</sup>.

RAR アゴニストによる脂肪細胞への分化の抑制効果は, 骨格筋における異所性脂肪にも有用である可能性がある. Shirasawa ら<sup>4)</sup>は, 脂肪浸潤モデルマウスから骨格筋における異所性脂肪の前駆細胞である FAPs を単離し, RAR $\beta$  と RAR $\gamma$  に対するアゴニストである ADP, あるいは RAR $\gamma$  選択的アゴニストである CD437 の存在下で培養した. その結果, ADP と CD437 は FAPs の脂肪細胞への分化を抑制した. このとき C/EBP $\beta$  のリン酸化におよぼす ADP と CD437 の影響に関しては調べられていないが, Ppar $\gamma$  mRNA および C/ebp $\alpha$  mRNA の発現は ADP と CD437 によって有意に低下した. したがって, ADP と CD437 が PPAR $\gamma$  および C/EBP $\alpha$  の上流に作用して脂肪分化を抑制すると推測された. RAR アゴニストが FAPs の脂肪細胞への分化を抑制したので, 彼らは RAR アゴニストが *in vivo* において脂肪浸潤を抑制するかを検証した. 棘上筋に脂肪浸潤が誘発されるモデルマウスに RAR $\gamma$  選択的アゴニストである CD1530 を 4 週間経口投与した. その結果, 棘上筋における脂肪が占める面積は, CD1530 投与によって有意に減少し, Ppar $\gamma$  mRNA と C/ebp $\alpha$  mRNA 発現レベルも減少した. さらに *in vivo* のデータを確固たるものにするため, 同様のモデルマウスに ADP を筋肉注射して脂肪浸潤の程度が評価された. その結果, ADP 投与によって脂肪浸潤が著しく減少することが明らかとなった.

FAPs は脂肪細胞への分化のほか, コラーゲンの生成を担う線維芽細胞へも分化する. そこで, RAR アゴニストにより FAPs の脂肪分化が抑制されるときのコラーゲン生成が評価された<sup>4)</sup>. まず FAPs を脂肪細胞へ分化誘導すると, Colla1 mRNA と Col3a1 mRNA の発現レベルは減少した. 一方, FAPs を ADP または CD437 存在下で培養すると, Colla1 mRNA と Col3a1 mRNA の発現レベルが増加した. *in vivo* でも同様に CD1530 の経口投与により, 棘上筋の Colla1 mRNA と Col3a1 mRNA の発現レベルは増加した. これらの結果より, RAR アゴニストは FAPs の脂肪への分化を抑制

し, 線維芽細胞への分化を促進することが示唆された. そこで Colla1 mRNA と Col3a1 mRNA の発現レベルの上昇が棘上筋において線維性組織の蓄積をもたらしているのかを検討するため, CD1530 を経口投与したマウスの棘上筋の筋肉切片でのコラーゲンが van Gieson 染色によって染色された. しかし, vehicle 群と比較して有意な差はなく, Shirasawa らの設定した実験条件では, CD1530 は組織の線維化に影響をおよぼさなかった. 骨格筋におけるコラーゲン産生の増加は, 骨格筋の機能を損ない, 骨格筋の異所性脂肪の蓄積に対する RAR アゴニストの利点が相殺される可能性がある. したがって著者らが述べているように, RAR アゴニストの臨床応用を考慮するのならば, RAR アゴニストの投与による Colla1 mRNA と Col3a1 mRNA の発現レベルが増加した点に関してはさらに検討する必要がある.

以上の結果より, RAR アゴニストが PPAR $\gamma$  上流で作用することで骨格筋における異所性脂肪の生成は抑制されることが示唆された. 一方で, RAR アゴニストが骨格筋でのコラーゲン産生を増加する可能性があることについては, 今後の研究に注目が寄せられる.

#### おわりに

本稿では, 骨格筋における異所性脂肪の治療薬として期待される RAR アゴニストについて紹介した. ATRA や RAR アゴニストは脂肪細胞への分化に対する強力な阻害剤としての役割を果たすことが知られている. Shirasawa ら<sup>4)</sup>の研究成果により, この作用が骨格筋における異所性脂肪の蓄積を抑制するのに有効であることが示唆された. 骨格筋の異所性脂肪の治療薬として mTOR 経路の阻害剤であるラパマイシンや脂肪酸代謝に関与するタンパク質である FABP4 の阻害剤が有効であるかもしれない<sup>26)-28)</sup>. しかし, ラパマイシンは副作用が大きく, FABP4 の阻害剤は現在臨床で使用されていない. 一方, RAR アゴニストの中には現在臨床的に使用されているものがあり, それらの薬剤については安全性に関する情報が利用できる. したがって, 彼らの研究成果は異所性脂肪の治療に貢献する発見である. 他の疾患に対する治療薬としての RAR アゴニストの適応拡大を今後さらに期待したい.

**Key words** :fatty infiltration, fibro-adipogenic progenitors, muscle stem cells, retinoic acid receptor agonist, skeletal muscle

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

Rina Tatsumi, Tomoya Kitakaze, 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

辰巳 理奈, 北風 智也, 原田 直樹, 山地 亮一

利益相反自己申告：申告すべきものなし

(2022.1.19 受付)

## 文 献

- 1) Slawik M, Vidal-Puig AJ (2006) Lipotoxicity, overnutrition and energy metabolism in aging. *Ageing Res Rev* **5**, 144-164
- 2) Hogarth MW, Defour A, Lazarski C, Gallardo E, Diaz Manera J, Partridge TA, Nagaraju K, Jaiswal JK (2019) Fibroadipogenic progenitors are responsible for muscle loss in limb girdle muscular dystrophy 2B. *Nat Commun* **10**, 2430
- 3) Joe AW, Yi L, Natarajan A, Le Grand F, So L, Wang J, Rudnicki MA, Rossi FM (2010) Muscle injury activates resident fibro/adipogenic progenitors that facilitate myogenesis. *Nat Cell Biol* **12**, 153-163
- 4) Shirasawa H, Matsumura N, Yoda M, Okubo K, Shimoda M, Uezumi A, Matsumoto M, Nakamura M, Horiuchi K (2021) Retinoic acid receptor agonists suppress muscle fatty infiltration in mice. *Am J Sports Med* **49**, 332-339
- 5) Schmidt M, Schüler SC, Hüttner SS, von Eyss B, von Maltzahn J (2019) Adult stem cells at work: regenerating skeletal muscle. *Cell Mol Life Sci* **76**, 2559-2570
- 6) Lukjanenko L, Karaz S, Stuetsatz P, Gurriaran-Rodriguez U, Michaud J, Dammone G, Sizzano F, Mashinchian O, Ancel S, Migliavacca E, Liot S, Jacot G, Metairon S, Raymond F, Descombes P, Palini A, Chazaud B, Rudnicki MA, Bentzinger CF, Feige JN (2019) Aging disrupts muscle stem cell function by impairing extracellular WISP1 secretion from fibro-adipogenic progenitors. *Cell Stem Cell* **24**, 433-446
- 7) Uezumi A, Fukada S, Yamamoto N, Takeda S, Tsuchida K (2010) Mesenchymal progenitors distinct from satellite cells contribute to ectopic fat cell formation in skeletal muscle. *Nat Cell Biol* **12**, 43-52
- 8) Uezumi A, Ito T, Morikawa D, Shimizu N, Yoneda T, Segawa M, Yamaguchi M, Ogawa R, Matev MM, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Tsujikawa K, Tsuchida K, Yamamoto H, Fukada S (2011) Fibrosis and adipogenesis originate from a common mesenchymal progenitor in skeletal muscle. *J Cell Sci* **124**, 3654-3664
- 9) Zhao L, Son JS, Wang B, Tian Q, Chen Y, Liu X, de Avila JM, Zhu MJ, Du M (2020) Retinoic acid signalling in fibro/adipogenic progenitors robustly enhances muscle regeneration. *EBioMedicine* **60**, 103020
- 10) Tobita T, Takeshita A, Kitamura K, Ohnishi K, Yanagi M, Hiraoka A, Karasuno T, Takeuchi M, Miyawaki S, Ueda R, Naoe T, Ohno R (1997) Treatment with a new synthetic retinoid, Am80, of acute promyelocytic leukemia relapsed from complete remission induced by all-trans retinoic acid. *Blood* **90**, 967-973
- 11) Ocker M, Herold C, Ganslmayer M, Zopf S, Hahn EG, Schuppan D (2004) Potentiated anticancer effects on hepatoma cells by the retinoid adapalene. *Cancer Lett* **208**, 51-58
- 12) Farmer SR (2006) Transcriptional control of adipocyte formation. *Cell Metab* **4**, 263-273
- 13) Tontonoz P, Hu E, Spiegelman BM (1994) Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell* **79**, 1147-1156
- 14) Brun RP, Tontonoz P, Forman BM, Ellis R, Chen J, Evans RM, Spiegelman BM (1996) Differential activation of adipogenesis by multiple PPAR isoforms. *Genes Dev* **10**, 974-984
- 15) Rosen ED, Sarraf P, Troy AE, Bradwin G, Moore K, Milstone DS, Spiegelman BM, Mortensen RM (1999) PPAR gamma is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. *Mol Cell* **4**, 611-617
- 16) Wu Z, Rosen ED, Brun R, Hauser S, Adelmant G, Troy AE, McKeon C, Darlington GJ, Spiegelman BM (1999) Cross-regulation of C/EBP alpha and PPAR gamma controls the transcriptional pathway of adipogenesis and insulin sensitivity. *Mol Cell* **3**, 151-158
- 17) Tanaka T, Yoshida N, Kishimoto T, Akira S (1997) Defective adipocyte differentiation in mice lacking the C/EBP beta and/or C/EBP delta gene. *EMBO J* **16**, 7432-7443
- 18) Piwien-Pilipuk G, MacDougald O, Schwartz J (2002) Dual regulation of phosphorylation and dephosphorylation of C/EBP beta modulate its transcriptional activation and DNA binding in response to growth hormone. *J Biol Chem* **15**, 44557-44565
- 19) Park BH, Qiang L, Farmer SR (2004) Phosphorylation of C/EBP beta at a consensus extracellular signal-regulated kinase/glycogen synthase kinase 3 site is required for the induction of adiponectin gene expression during the differentiation of mouse fibroblasts into adipocytes. *Mol Cell Biol* **24**, 8671-8680
- 20) Ayala-Sumano JT, Velez-Delvalle C, Beltrán-Langarica A, Marsch-Moreno M, Cerbón-Solorzano J, Kuri-Harcuch W (2011) Srebf1a is a key regulator of transcriptional control for adipogenesis. *Sci Rep* **1**, 178
- 21) Kamei Y, Kawada T, Mizukami J, Sugimoto E (1994) The prevention of adipose differentiation of 3T3-L1 cells caused by retinoic acid is elicited through retinoic acid receptor alpha. *Life Sci* **55**, 307-312
- 22) Sato M, Hiragun A, Mitsui H (1980) Preadipocytes possess cellular retinoid binding proteins and their differentiation is inhibited by retinoids. *Biochem Biophys Res Commun* **95**, 1839-1845
- 23) Wang X, Yang P, Liu J, Wu H, Yu W, Zhang T, Fu H, Liu Y, Hai C (2014) RAR gamma-C-Fos-PPAR gamma 2 signaling rather than ROS generation is critical for all-trans retinoic acid-inhibited adipocyte differentiation.

- entiation. *Biochimie* **106**, 121-130
- 24) Ayala-Sumuano JT, Vélez-DelValle C, Marsch-Moreno M, Beltrán-Langarica A, Hernández-Mosqueira C, Kuri-Harcuch W (2016) Retinoic Acid Inhibits Adipogenesis Modulating C/EBP $\beta$  Phosphorylation and Down Regulating Srebf1a Expression. *J Cell Biochem* **117**, 629-637
- 25) Schwarz EJ, Reginato MJ, Shao D, Krakow SL, Lazar MA (1997) Retinoic acid blocks adipogenesis by inhibiting C/EBP $\beta$ -mediated transcription. *Mol Cell Biol* **17**, 1552-1561
- 26) Joshi SK, Liu X, Samagh SP, Lovett DH, Bodine SC, Kim HT, Feeley BT (2013) mTOR regulates fatty infiltration through SREBP-1 and PPAR $\gamma$  after a combined massive rotator cuff tear and suprascapular nerve injury in rats. *J Orthop Res* **31**, 724-730
- 27) Lee YS, Kim JY, Kim KI, Ki SY, Chung SW (2019) Effect of fatty acid-binding protein 4 inhibition on rotator cuff muscle quality: histological, biomechanical, and biomolecular analysis. *Am J Sports Med* **47**, 3089-3099
- 28) Lee YS, Kim JY, Oh KS, Chung SW (2017) Fatty acid-binding protein 4 regulates fatty infiltration after rotator cuff tear by hypoxia-inducible factor 1 in mice. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* **8**, 839-850