

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K08216

研究課題名(和文)慢性腎臓病に伴うサルコペニアにおけるオンコスタチンMの役割

研究課題名(英文)The role of oncostatin M in the pathogenesis of sarcopenia associated with chronic kidney disease

研究代表者

森岡 与明(Morioka, Tomoaki)

大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：30382154

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：慢性腎臓病に伴うサルコペニア(筋肉量減少・筋力低下)の病態形成におけるオンコスタチンM(OSM)の役割を検討した。アデニン負荷腎不全モデルマウスにおいて、骨格筋量の減少、筋組織のOSMとその受容体発現の上昇、および筋分解亢進・筋増殖抑制に関わる因子の発現上昇がみられた。さらに成熟C2C12筋管を用いた細胞実験において、OSMにより筋管サイズの縮小、筋分解系因子の発現上昇、筋分化系因子の発現低下がみられ、それらの効果はSTAT3の抑制により減弱した。以上より、OSMが慢性腎臓病における骨格筋萎縮に関与すること、またその効果はSTAT3経路を介した筋分化および分解の調節によることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、炎症性サイトカインに属する多機能蛋白オンコスタチンMが慢性腎臓病に伴うサルコペニアに関与すること、またその機序の一部が細胞レベルで明らかになった。慢性腎臓病患者の予後に関わるサルコペニアの機序としては、多様な要因が想定されている。今回、その一つとしてオンコスタチンMの役割が明らかになったことで、慢性腎臓病患者のサルコペニアを抑制し、予後改善につながる治療への発展が期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the role of oncostatin M (OSM) in the pathogenesis of sarcopenia associated with chronic kidney disease. The mouse model of kidney failure induced by adenine exhibited reduced skeletal muscle mass with increased expression of OSM and OSM receptor and increased expression of genes associated with muscle degradation and growth inhibition. Next, in mature C2C12 myotubes treated with OSM in vitro, the myotube size was reduced, the expression of genes related to myogenic differentiation was decreased, while the expression of genes related to muscle degradation was increased. Furthermore, the effects of OSM on myotube size and changes in the gene expression were attenuated by pretreatment with an STAT3 inhibitor or siRNA-mediated STAT3 knockdown in C2C12 myotubes. These results suggest that OSM contributes to muscle atrophy in chronic kidney disease by inhibiting myogenic differentiation and activating muscle degradation in a STAT3-dependent manner.

研究分野：内分泌代謝学，腎臓内科学

キーワード：サルコペニア オンコスタチンM 骨格筋萎縮 STAT3 慢性腎臓病 C2C12細胞

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

#### (1) 慢性腎臓病におけるサルコペニアの意義・重要性

高齢の慢性腎臓病(CKD)患者において、フレイル(加齢に伴う心身の活力低下・脆弱性)あるいはprotein-energy wasting (PEW) (低栄養状態)がしばしば認められる(Kopple. Am J Clin Nutr 1997). フレイル・PEWは、CKD患者のQOL低下、疾病や死亡に密接に関連する重要な病態である(Pereira. Nephrol Dial Transplant 2015). フレイル・PEWの関連病態として、サルコペニアはCKD患者においてしばしば認められ、その高い死亡率に関連している(Mak. Kidney Int 2006). CKDに伴うサルコペニアの成因としては炎症、栄養摂取不足、代謝亢進、アシドーシス、同化ホルモンの作用障害などが挙げられるが(Du. Eur J Clin Invest 2005)、全容の解明には至っていない。増加する高齢のCKD患者におけるサルコペニアの病態解明および治療介入は重要な研究課題といえる。

#### (2) 多機能蛋白オンコスタチンMの骨格筋量調節における役割

オンコスタチンMはIL-6ファミリーに属するサイトカインとして単球・マクロファージより産生され、生体において造血系、骨、脂肪、神経組織の恒常性維持、関節、皮膚、血管系の炎症促進、癌細胞の増殖抑制または促進など様々な作用を有することが知られている(Richards. ISRN Inflammation 2013). オンコスタチンMの骨格筋における役割については、培養筋芽細胞の分化抑制あるいは筋損傷後の再生過程の抑制が示されているが(Xiao. Cell Res 2011)、他に報告がなく十分に明らかではなかった。

#### (3) 腎不全・尿毒症におけるサルコペニアの機序～オンコスタチンMの可能性

CKDにおいて、レプチンなど炎症関連因子と低栄養・悪液質との関連が以前より示されている(Mak. Kidney Int 2006)。また、マウスにおいてCKDの悪液質・PEWの病態に副甲状腺ホルモン(PTH)/PTH受容体経路を介した脂肪細胞褐色化および骨格筋萎縮の機序が存在することが2016年に示された(Kir. Cell Metab 2016)。しかしながら、腎不全に関連するPEWあるいはサルコペニアに関する基礎研究の報告は限られており、十分に明らかではなかった。

### 2. 研究の目的

本研究において、CKDに伴うサルコペニアにおいてオンコスタチンMの果たす役割について基礎研究(培養細胞、マウス)および臨床的研究により明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) アデニン誘導性CKDモデルマウスにおけるサルコペニアとオンコスタチンMとの関連

C57BL/6マウス(オス6週齢)に対して通常食に0.2%アデニンを5週間混餌することにより腎不全を誘導した。体重、摂餌量、内臓脂肪量、皮下脂肪量、骨格筋量・筋線維径、腎の組織所見、血清生化学、血中オンコスタチンM濃度、サイトカイン濃度について通常食飼育(対照)群と比較検討した。また骨格筋組織および抽出した遺伝子、タンパクを用いて筋量調節因子および炎症関連因子の発現解析を行った。

#### (2) 培養筋芽細胞を用いたオンコスタチンMの骨格筋における直接作用の解析

C2C12マウス筋芽細胞を2%ウマ血清によりmyotubeへ分化誘導し、3日後にオンコスタチンM(20 ng/mL)を添加し、12~48時間後のmyotube最大径、筋量調節関連因子の遺伝子・蛋白発現変化、および細胞内シグナル伝達経路の変化について、RT-PCR法およびWestern blot法により解析した。

#### (3) 透析中CKD患者における血清オンコスタチンM濃度と骨格筋量の解析

愛仁会井上病院における血液透析患者コホート(ODCS研究、代表者:庄司哲雄)約300名の保存血清を用いてELISA法により血清オンコスタチンM濃度を測定する。また撮影済みの大腿部CTを用いた大腿筋断面積により骨格筋量を評価し、血清オンコスタチンM濃度との関連性を適切な解析方法を用いて解析する。

### 4. 研究成果

#### (1) アデニン誘導性CKDモデルマウスにおけるサルコペニアとオンコスタチンMとの関連

5週間のアデニン混餌を行ったマウス(アデニン群)は、通常食対照群と比較して血清尿素窒素濃度(176 vs. 27 mg/dL)およびクレアチニン濃度(0.65 vs. 0.11 mg/dL)の著明高値を示し、腎組織では尿細管間質性腎炎の所見を示しており、アデニンによる腎不全が確認された。またアデニン群では、体重(13.4±0.6 vs. 23.7±1.5 g, p<0.001)、皮下脂肪組織量(1.3±0.4 vs. 8.1±1.5 mg/gBW)、傍精巣上体脂肪組織量(0.6±0.3 vs. 9.1±1.8 mg/gBW)は著明に低値を示した。またアデニン群において、下肢骨格筋(腓腹筋)量は有意に低値を示し(9.5±1.3 vs. 11.8±1.3 mg/gBW)、筋線維横断径は約50%の低値を示した(p<0.001)。なお、飼育期間の摂餌量は両群で有意差を認めなかった。骨格筋組織を用いた遺伝子解析の結果、アデニン群においてオン

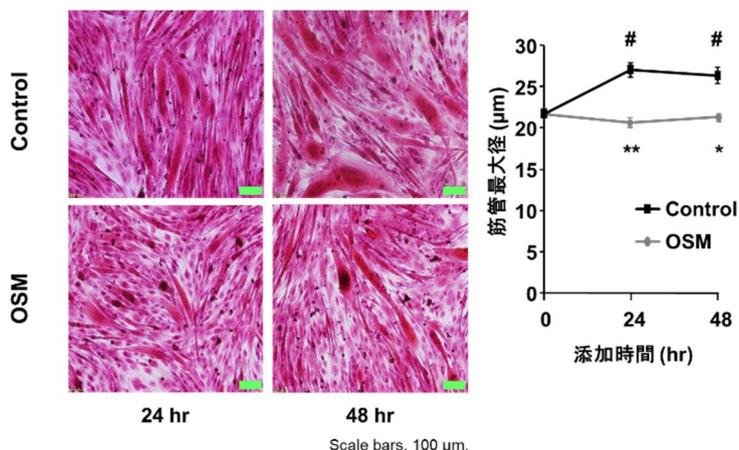
コスタチン M(p=0.040)およびオンコスタチン M 受容体(p=0.003)発現は有意に高値を示した。一方で、同じサイトカインファミリーに属するインターロイキン-6 (IL-6)(p=0.018)および白血病阻止因子(leukemia inhibitory factor, LIF)(p=0.007)の発現はむしろアデニン群で低値を示した。また、アデニン群において骨格筋分解に関わる因子は著明な高値(Fbxo32/atrogin-1, p=0.006; Trim63/MuRF-1, p=0.013)を、筋増殖促進に関わる IGF-1 の発現は低値(p=0.002)を、また筋増殖抑制因子 myostatin は高値の傾向を示した。

以上の結果は、マウスにおいてアデニン投与により腎不全が誘導され、摂食量の変化なく著明な体重減少および骨格筋萎縮が引き起こされること、また骨格筋においてオンコスタチンの作用が増強し、筋分解に関わる因子の発現が亢進することを示すものである。本研究の成績により、腎不全における骨格筋萎縮・サルコペニアにおいてオンコスタチン M が関与することが示唆された。

## (2) 培養筋芽細胞を用いたオンコスタチン M の骨格筋における直接作用の解析

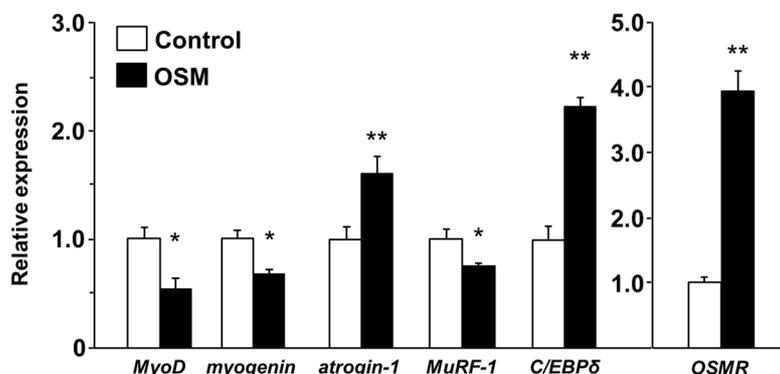
2%ウマ血清の添加により分化した C2C12 myotube の最大径は、オンコスタチン M の添加により非添加対照と比較して有意に低値を示した(24h, 対照の  $76.5 \pm 0.38\%$ ,  $p < 0.01$ ; 48h, 同  $81.1 \pm 1.47\%$ ,  $p < 0.05$ )(図1)。オンコスタチン M 添加 24 時間後の myotube において、オンコスタチン M 受容体遺伝子の発現上昇(対照の  $3.96 \pm 0.28$  倍,  $p < 0.01$ ), 筋萎縮に関わる因子の遺伝子発現上昇(atrogin-1, 同  $1.60 \pm 0.15$  倍,  $p < 0.01$ ; C/EBP $\beta$ , 同  $2.24 \pm 0.079$  倍  $p < 0.01$ )および蛋白発現上昇(atrogin-1, 同  $1.42 \pm 0.03$  倍,  $p < 0.01$ ), 筋分化に関わる因子の遺伝子発現低下(myogenin, 同  $0.68 \pm 0.04$  倍,  $p < 0.05$ ; MyoD, 同  $0.54 \pm 0.09$  倍,  $p < 0.05$ )および蛋白発現低下(myogenin, 同  $0.59 \pm 0.09$  倍,  $p < 0.01$ )が認められた(図2, 3)。また分化した myotube において、オンコスタチン M の添加 1~2 時間後に STAT3 蛋白のリン酸化が認められた。オンコスタチン M 添加 24 時間後の myotube の縮小効果(図4)および筋量調節因子の遺伝子(図5)・蛋白(図6)発現変化は STAT3 阻害剤(C188-9)の前処理あるいは siRNA による STAT3 のノックダウンにより減弱した。

以上の結果は、オンコスタチン M が STAT3 経路を介した筋分化および分解の調節により C2C12 myotube の萎縮を引き起こすことを示すものである。本成績より、オンコスタチン M と骨格筋萎縮との直接的な関連性が示唆された。



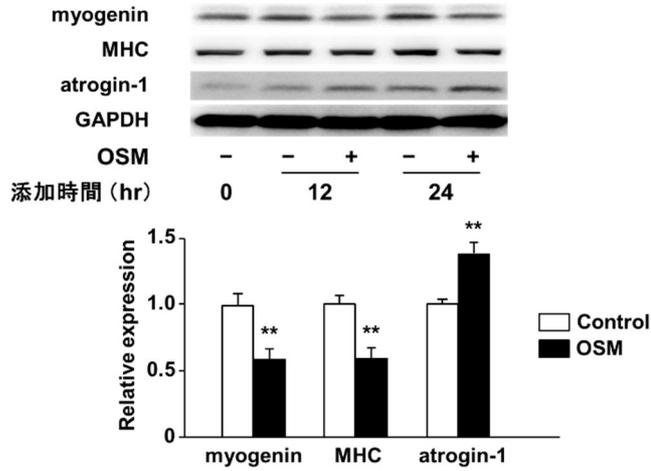
## (図1) オンコスタチン M 添加後の C2C12 myotube 最大径の変化

OSM, オンコスタチン M; control, 非添加対照. Mean  $\pm$  SEM, N=3. \*,  $p < 0.05$ , \*\*,  $p < 0.01$  vs. control by unpaired *t*-test. #,  $p < 0.01$  vs. baseline by a paired one-way ANOVA with post hoc Bonferroni test.



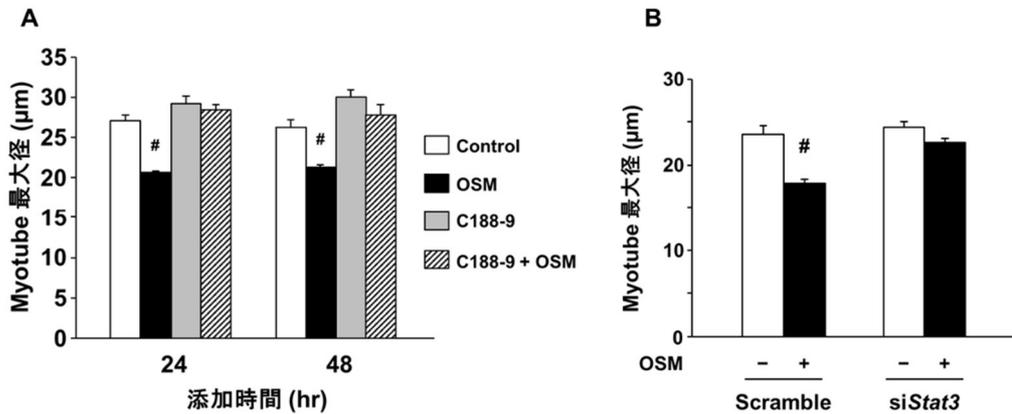
(図2) C2C12 myotube におけるオンコスタチン M による筋量調節因子の遺伝子発現変化(添加 24 時間後)

OSM, オンコスタチン M; control, 非添加対照; OSMR, OSM receptor. Mean  $\pm$  SEM, N=3. \*,  $p < 0.05$ , \*\*,  $p < 0.01$  vs. control by unpaired *t*-test.



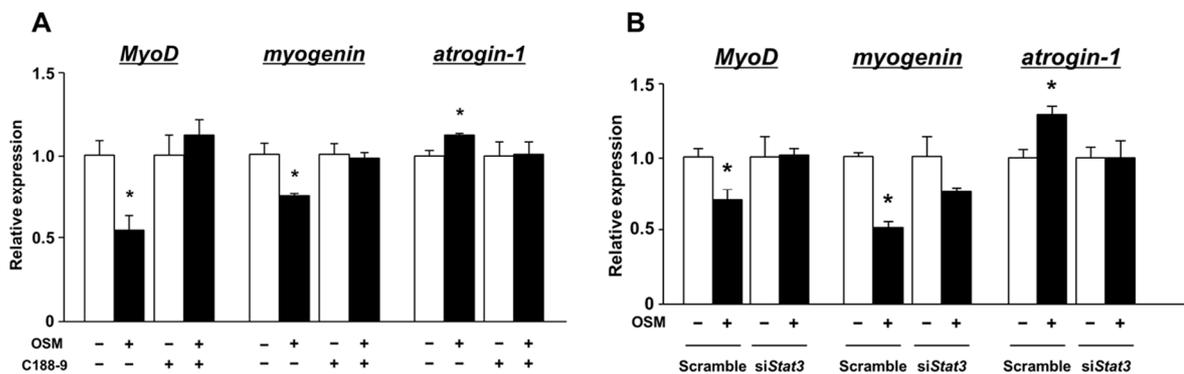
(図3) C2C12 myotube におけるオンコスタチン M による筋量調節因子の蛋白発現変化 (添加 24 時間後)

OSM, オンコスタチン M; control, 非添加対照; MHC, myosin heavy chain. Mean  $\pm$  SEM, N=3. \*\*,  $p < 0.01$  vs. control by unpaired *t*-test.



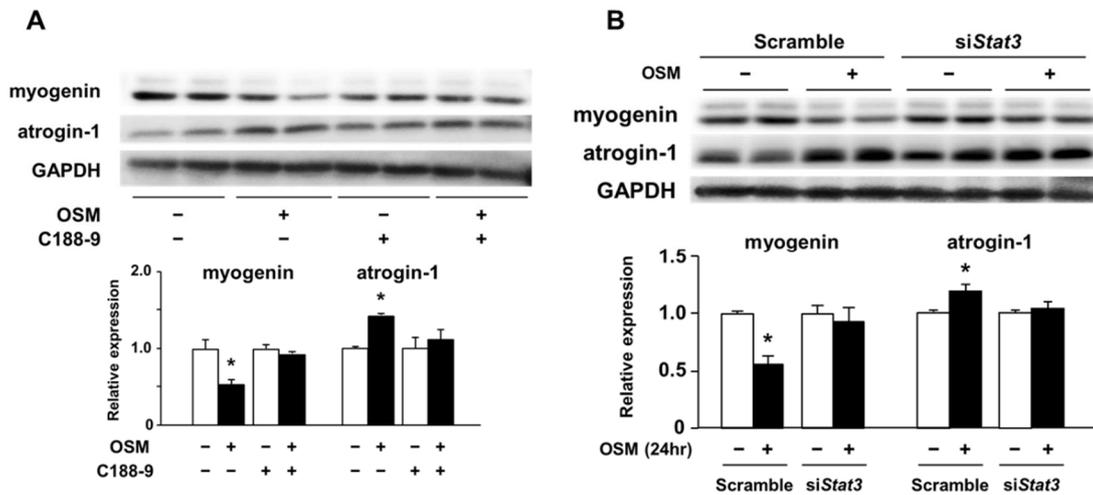
(図4) オンコスタチン M による myotube 形成抑制効果に対する STAT3 阻害薬(A)または Stat3 ノックダウン (添加 24 時間後) (B) による影響

OSM, オンコスタチン M; control, 非添加対照. Mean  $\pm$  SEM, N=3. #,  $p < 0.05$  vs. control without OSM/C188-9 or scramble by one-way ANOVA with Tukey-Kramer test.



(図5) オンコスタチン M による筋量調節因子の遺伝子変化に対する STAT3 阻害薬(A)または Stat3 ノックダウン (B) による影響 (添加 24 時間後)

OSM, オンコスタチン M; control, 非添加対照. Mean  $\pm$  SEM, N=3. \*,  $p < 0.05$ , vs. control without OSM or scramble by unpaired *t*-test.



(図6) オンコスタチン M による筋量調節因子の蛋白発現変化に対する STAT3 阻害薬(A)または Stat3 ノックダウン (B)による影響 (添加 24 時間後)

OSM, オンコスタチン M; control, 非添加対照. Mean ± SEM, N=3. \*, p < 0.05 vs. control without OSM/C188-9 or scramble by unpaired *t*-test.

### (3) 透析中 CKD 患者における血清オンコスタチン M 濃度と骨格筋量の解析

井上病院の維持血液透析患者を対象に行われた ODCS 研究における対象者 335 名のうち, CT スキャンにて大腿中央部筋肉断面積の測定のある対象が 155 例, 両側握力測定のある対象が 245 例, そして両側下肢筋力測定のある対象が 242 例存在した. これら対象の保存血清の一部を用いてヒトオンコスタチン M の ELISA 測定系の確立を行った. 本報告書作成時点 (2022 年 5 月) で測定中である.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Miki Y, Morioka T, Shioi A, Fujimoto K, Sakura T, Uedono H, Kakutani Y, Ochi A, Mori K, Shoji T, Emoto M, Inaba M.	4. 巻 516
2. 論文標題 Oncostatin M induces C2C12 myotube atrophy by modulating muscle differentiation and degradation.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 951-956
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2019.06.143	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Morioka T.	4. 巻 27
2. 論文標題 Myostatin: The Missing Link between Sarcopenia and Cardiovascular Disease in Chronic Kidney Disease?	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Atheroscler Thromb	6. 最初と最後の頁 1036-1038
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5551/jat.ED129	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Shioi A, Morioka T, Shoji T, Emoto M.	4. 巻 12
2. 論文標題 The Inhibitory Roles of Vitamin K in Progression of Vascular Calcification.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nutrients	6. 最初と最後の頁 583
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/nu12020583	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Fujimoto K, Shioi A, Miki Y, Kakutani Y, Morioka T, Shoji T, Emoto M, Inaba M.	4. 巻 249
2. 論文標題 Adenosine Attenuates Aortic Smooth Muscle Cell Calcification through A(3) Adenosine Receptor.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Tohoku J Exp Med	6. 最初と最後の頁 275-283
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1620/tjem.249.275	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Shoji T, Fujii H, Mori K, Nakatani S, Nagata Y, Morioka T, Inaba M, Emoto M.	4. 巻 -
2. 論文標題 Associations of cardiovascular disease and blood pressure with cognition in hemodialysis patients: The Osaka Dialysis Complication Study.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nephrol Dial Transplant	6. 最初と最後の頁 gfab247
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/ndt/gfab247	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 三木祐哉, 森岡与明, 塩井 淳, 佐倉剛史, 角谷佳則, 藤元健太, 上殿英記, 越智章展, 森 克仁, 庄司哲雄, 稲葉雅章, 絵本正憲
2. 発表標題 オンコスタチンMは腎不全に伴うサルコペニアに關与する
3. 学会等名 第65回日本透析医学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 三木祐哉, 森岡与明, 塩井淳, 佐倉剛史, 角谷佳則, 藤元健太, 上殿英記, 森克仁, 庄司哲雄, 絵本正憲, 稲葉雅章
2. 発表標題 オンコスタチンMはSTAT3経路を介して骨格筋萎縮に關与する
3. 学会等名 第62回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森岡与明
2. 発表標題 慢性腎臓病・糖尿病における骨格筋萎縮を考える
3. 学会等名 第11回分子骨格筋代謝研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三木祐哉, 森岡与明, 塩井 淳, 佐倉剛史, 角谷佳則, 藤元健太, 上殿英記, 森 克仁, 庄司哲雄, 絵本正憲, 稲葉雅章
2. 発表標題 オンコスタチンMによるSTAT3経路を介した骨格筋萎縮への関与
3. 学会等名 第40回日本肥満学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 YUYA MIKI, TOMOAKI MORIOKA, ATSUSHI SHIOI, TAKESHI SAKURA, KENTA FUJIMOTO, YOSHINORI KAKUTANI, HIDEKI UEDONO, KATSUHIITO MORI, TETSUO SHOJI, MASANORI EMOTO, MASAOKI INABA
2. 発表標題 Oncostatin M Inhibits C2C12 Myotube Formation through the STAT 3 Pathway
3. 学会等名 IDF Congress 2019 Busan
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三木祐哉, 森岡与明, 佐倉剛史, 角谷佳則, 藤元健太, 上殿英記, 森 克仁, 塩井 淳, 庄司哲雄, 絵本正憲, 稲葉雅章
2. 発表標題 オンコスタチンMはマウス筋管細胞の萎縮に関与する
3. 学会等名 第61回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 三木祐哉, 森岡与明, 塩井 淳, 佐倉剛史, 角谷佳則, 藤元健太, 上殿英記, 森 克仁, 庄司哲雄, 絵本正憲, 稲葉雅章
2. 発表標題 オンコスタチンMはSTAT3を介して骨格筋萎縮に関与する
3. 学会等名 第39回日本肥満学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 三木祐哉, 森岡与明, 塩井 淳, 佐倉剛史, 角谷佳則, 藤元健太, 上殿英記, 森 克仁, 庄司哲雄, 絵本正憲, 稲葉雅章
2. 発表標題 腎不全に伴うサルコペニアにオンコスタチンMが関与する
3. 学会等名 第5回日本サルコペニア・フレイル学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 三木祐哉, 森岡与明, 塩井 淳, 佐倉剛史, 角谷佳則, 藤元健太, 上殿英記, 森 克仁, 庄司哲雄, 絵本正憲, 稲葉雅章
2. 発表標題 オンコスタチンMはSTAT3経路を介して骨格筋萎縮に関与する
3. 学会等名 第62回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

#### 6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	塩井 淳  (Shioi Atsushi)  (90260801)	大阪市立大学・大学院看護学研究科・教授   (24402)	
研究分担者	庄司 哲雄  (Shoji Tetsuo)  (40271192)	大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授   (24402)	

#### 7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------