

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 11 月 30 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H02177

研究課題名(和文) NAFLD-NASH-肝癌悪性化シークエンスでのOSMの機能とその治療への応用

研究課題名(英文) Functional roles of OSM in the development of NAFLD-NASH-HCC progression and its potential as a therapeutic target

研究代表者

森川 吉博 (Morikawa, Yoshihiro)

和歌山県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：60230108

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：野生型マウスとOSM遺伝子欠損マウスに対してMCD食を給餌しNASHを誘導したところ、野生型マウスと比較してOSM遺伝子欠損マウスで肝障害や炎症の悪化が認められた。また、NASHのモデルマウスにOSMを1週間腹腔内投与したところ、肝障害や炎症が軽減した。そこで、STAMモデルを用いてOSMの肝癌発症に対する抑制効果を検討したところ、NASH期のSTAMモデルに対するOSMの1週間の投与により、その後の肝癌の発症が抑制された。以上の結果より、OSMは、NAFLからNASHへの進行を抑制する効果、及びNASHを改善する効果を有し、その効果が肝癌発症の抑制へと繋がる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

NAFLDの増悪におけるNASH-肝硬変-肝癌の代謝性肝疾患悪性化シークエンスは炎症、線維化、癌化の過程が時間的に重複して進行していくため、各過程を個別に抑制するだけでは有効な治療効果は得られず、これらの過程を同時に抑制することが重要であると考えられる。本研究により、OSMはNAFLからNASHの進行における肝障害や炎症の抑制作用を有すること、また、NASHを基盤とした肝癌の発症を抑制することが明らかとなった。以前の研究で、OSMはNAFLの抑制効果も認めていることより、代謝性肝疾患悪性化シークエンスに対して複数の作用を有するOSMは、同疾患群に対する新規治療薬の候補となる可能性が考えられる。

研究成果の概要(英文)：Nonalcoholic steatohepatitis (NASH) is characterized by the presence of hepatocyte injury and inflammation in addition to steatosis, and can progress to more severe liver diseases, including cirrhosis and hepatocellular carcinoma. However, the mechanisms underlying the progression from simple steatosis to NASH are not fully understood. We demonstrated that methionine- and choline-deficient (MCD) diet-induced liver injury and inflammation were aggravated in oncostatin M (OSM)-deficient mice compared to those in wild-type mice. In addition, treatment with OSM ameliorated liver injury and inflammation in ob/ob mice fed MCD diet. Furthermore, OSM suppressed the progression from NASH to hepatocellular carcinoma (HCC) in STAM model. From these findings, OSM may be a novel cytokine that modulates liver injury and inflammation in NASH, and such effects of OSM leads to the suppression of HCC development.

研究分野：健康科学、代謝学

キーワード：メタボリック症候群 非アルコール性脂肪肝炎 肝硬変 肝癌 サイトカイン

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

肝癌は、全癌の中でも罹患率の高い癌の一つであり、その原因としては C 型肝炎の慢性罹患によるものが日本では最も多い。しかし、近年、非 B 非 C 型肝炎の割合が増加してきており、その原因として、非アルコール性脂肪肝疾患 (nonalcoholic fatty liver disease: NAFLD) が注目されている。NAFLD は、メタボリック症候群におけるインスリン抵抗性や高脂血症が原因となり、肝細胞に脂肪が蓄積することにより発症する。肝細胞の脂肪蓄積に炎症が加わった病態は、非アルコール性脂肪肝炎 (nonalcoholic steatohepatitis: NASH) と呼ばれ、線維化が進行すると NASH は肝硬変となり、さらには肝癌へと進行する。この一連の「代謝性肝疾患悪性化シークエンス」にはこれまで薬物療法、瀉血療法、及び肝移植など様々な治療が試みられてきたが、確立された治療方法がないのが現状である。また、NAFLD/NASH を基盤とした肝癌の発症原因に関しては、研究報告も少なく、有効な治療法の開発が望まれている。

### 2. 研究の目的

オンコスタチン M (OSM) は、IL-6 ファミリーに属するサイトカインで、機能的には、造血、肝の発生、種々の炎症性疾患に関与することが知られている。OSM の受容体サブユニットである OSMR $\beta$  の遺伝子欠損マウス (OSMRKO マウス) に高脂肪食を給餌すると、野生型と比較して肝脂肪蓄積の増加を認めた (Komori et al., J Biol Chem, 2014) ことから、OSM のシグナルの阻害が、肥満やそれに続く NAFLD を引き起こす原因となる可能性が示唆された。そこで、メタボリック症候群のモデルマウスに OSM を一週間投与したところ、NAFLD の著明な改善が認められ、加えて脂肪組織の炎症、インスリン抵抗性、肥満、及び高脂血症の改善が認められた (Komori et al., Diabetologia, 2015)。さらに、NAFLD のモデルマウスに対して、OSM を投与したところ、TNF- $\alpha$  などの炎症性サイトカインの肝での発現が抑制されたことから、NASH の発症過程において OSM は炎症を抑制していることが示唆された。また、肝癌を発症しない NASH モデルマウスの肝において、OSM の発現は NASH 発症後に著明に増加することから、OSM が NASH からの肝癌の発症を抑制する可能性が示唆された。近年、癌に対する運動療法が注目されており、前立腺癌や乳癌、直腸癌などに対する運動の効果が報告されている (Newton et al, Curr Treat Options Oncol, 2008)。肝癌に対しても、マウスやラットの化学発癌による肝癌モデルで、運動療法の効果が報告されている (Silva et al, Appl Physiol Nutr Metab, 2012; Pedersen et al, Cell Metab, 2016) が、NAFLD/NASH を基盤とした肝癌に対する運動療法の効果は不明である。我々は、運動負荷後の骨格筋や血中において OSM の発現が増加していることを見出した。また、in vitro の実験系において OSM が肝癌幹細胞の増殖を抑制するとの報告もあり (Yamashita et al, Cancer Res, 2010)、NAFLD/NASH を基盤とした肝癌に対しても運動療法は効果的な治療法であることから、OSM がその治療効果の一端を担っていると考えている。本研究は、代謝性肝疾患悪性化シークエンスの進行における OSM の役割を解明し、同疾患に対する新たな予防法・治療法を提供することを目的とする。

### 3. 研究の方法

(1) NASH モデルマウスとして、メチオニン・コリン欠乏食 (MCD 食) を 4 週間給餌した C57BL/6J マウス、及び *ob/ob* マウスに MCD 食を 4 週間給餌したモデル (*ob*MCD モデル) を、NASH を基盤として、肝癌を発症するモデルマウスとして STAM モデル (2 日齢のマウスにストレプトゾトシンを 200  $\mu$ g 皮下投与し、その後 4 週齢から 16 週間高脂肪食を給餌するモデル) を用い、肝における OSM と OSMR $\beta$  の発現をリアルタイム PCR 法にて、またその局在を免疫染色法にて検討した。

(2) OSM 遺伝子欠損マウス (OSMKO マウス) に MCD 食を給餌し、肝における組織学的解析 (HE 染色) や血中 AST/ALT の測定、リアルタイム PCR 法による炎症サイトカインの発現を評価し、NASH の程度を検討した。

(3) NASH モデルマウス (*ob*MCD モデル) に OSM を 1 週間腹腔内投与し、肝における組織学的解析 (HE 染色)、血中 AST/ALT の測定、及びリアルタイム PCR 法による炎症サイトカインの発現変化の検討により、NASH の程度を評価した。また、OSM を腹腔内投与し、投与後 1 時間と 2 時間において OSM により誘導される遺伝子をリアルタイム PCR 法にて検討した。

(4) 野生型マウスと OSMRKO マウスにおいて STAM モデルを作成し、肝における肝癌の発症を比較した。また、NASH 期である 8 週齢の STAM マウスに対し、1 週間 OSM を腹腔内投与し、肝癌の発症を検討した。さらには、1 週間 OSM を腹腔内投与後の肝における遺伝子発現の変化を、リアルタイム PCR 法にて検討した。

(5) トレッドミルによる有酸素運動 (走行速度:15 m/秒) を野生型マウスと OSMKO マウスに 1 時間負荷し、運動による代謝改善作用に対する OSM の役割を検討した。また、NASH モデルマウス (*ob*MCD モデル) に対し、有酸素運動 (走行速度:7.5 m/秒) を 1 日一回、7 日間負荷した。その後の肝、及び骨格筋における OSM の遺伝子発現変化をリアルタイム PCR 法にて検討した。

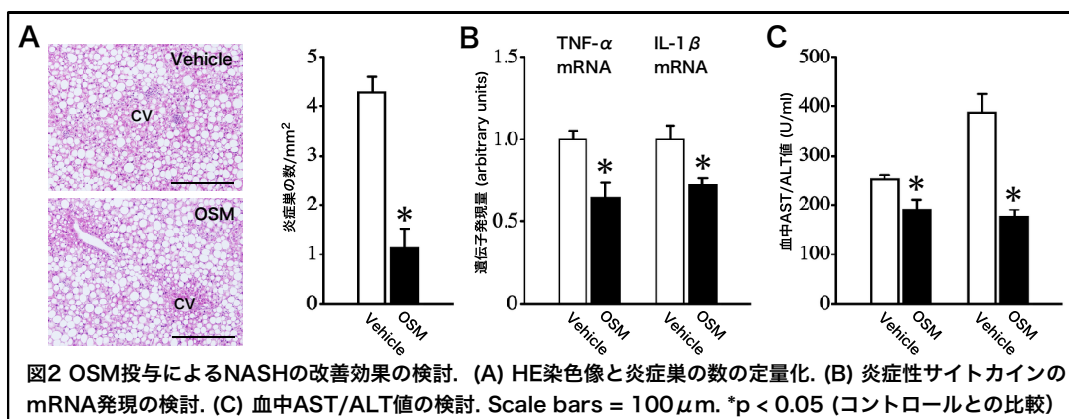
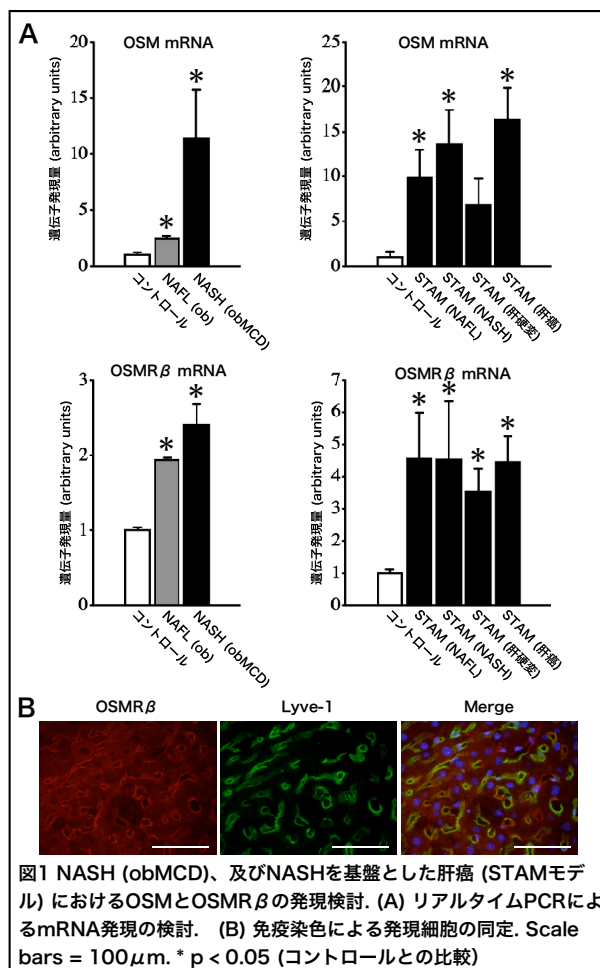
(6) C57BL/6J マウスに普通食、高脂肪食、高果糖食を 1 週間給餌した後、リアルタイム PCR 法により、OSM、及び OSMR $\beta$  の肝における発現解析を行った。また、OSMRKO マウスとその同

腹の野生型マウスに高果糖食を1週間給餌し、生理学的なパラメーター(体重、脂肪重量、及び摂食量)を比較するとともに、肝における組織学的解析(オイルレッドO染色)、及びリアルタイムPCR法にて肝遺伝子発現の変化を検討した。

#### 4. 研究成果

(1) NASH、及び肝癌の発症に対する OSM の役割を検討するために、NASH、及び肝癌発症モデルの肝における OSM と OSMR $\beta$  の発現を検討した。いずれのモデルマウスの肝においても、野生型マウスの肝(コントロール)と比較して OSM の有意な発現増加が認められた(図 1A 上段)。また、野生型マウスの肝と比較して、NASH の肝において OSMR $\beta$  の発現も有意に増加した(図 1A 下段)。さらに、STAM マウスにおいては、肝癌の肝においても OSM、及び OSMR $\beta$  の有意に高い発現が認められた(図 1A)。以上の結果より、OSM は、NASH、及び肝癌の発症に関与している可能性が示唆された。NASH モデルマウス(MCD 食給餌の C57BL/6J マウス)の肝における OSMR $\beta$  の発現細胞について検討したところ、類洞内皮細胞に発現が認められた(図 1B)。これらの結果より、OSM は、NASH の肝において、類洞内皮細胞に作用している可能性が示唆された。

(2) NASH の発症における OSM の役割を検討するために、OSMKO マウスに MCD 食を給餌し、NASH の程度を評価した。野生型マウスと比較して、OSMKO マウスの肝において、炎症細胞巣の有意な増加、及び炎症性サイトカインである TNF- $\alpha$  や IL-1 $\beta$  の遺伝子発現の有意な増加が認められた。抗炎症サイトカインである IL-10 の遺伝子発現は OSM 遺伝子欠損マウスの肝で有意に低下していた。また、肝障害の程度を検討するために、血中 AST・ALT の濃度を測定したところ、OSMKO マウスにおいて有意な増加が認められた。以上の結果より、OSM の欠損は、MCD 食により惹起される NASH を増悪させる可能性が示唆された。



(3) OSM の NASH に対する治療効果を検討するために、NASH モデルマウス (obMCD モデル) に OSM を1週間腹腔内投与し、NASH の程度を検討した。コントロール群では、肝細胞の炎症細胞巣が多数認められたが、OSM の投与によりそれらが有意に改善していた(図 2A)。また、炎症性サイトカインである TNF- $\alpha$  や IL-1 $\beta$  の遺伝子発現の有意な減少が認められた(図 2B)。コントロール群と比較して OSM 投与群で、血中 AST・ALT 濃度の有意な減少が認められた(図 2C)。これらの結果より、OSM は、NASH に対して治療的効果を有する可能性が示唆された。

OSM による NASH 改善作用の分子メカニズムを明らかにするため、NASH モデルマウスに OSM を腹腔内投与し、OSM により誘導される遺伝子を検討した。OSM 投与後1時間と2時間において、炎症関連遺伝子(IL-6, IL-4R $\alpha$ , eotaxin-1)の発現増加が認められた(図 3)。また、

類洞内皮機能と関連した遺伝子として、抗炎症に作用する endothelial NO synthase (eNOS) の発現、及び肝細胞増殖関連遺伝子として hepatocyte growth factor (HGF) の発現が有意に増加していた (図3)。

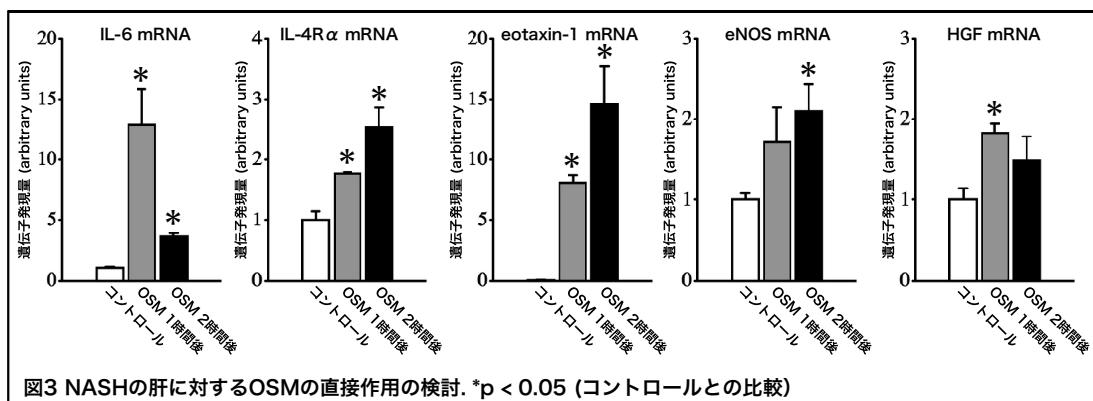


図3 NASHの肝に対するOSMの直接作用の検討. \*p < 0.05 (コントロールとの比較)

(4) OSMのNASHを基盤とする肝癌の発症に対する作用を検討するために、野生型マウスと OSMRKO マウスにおいて STAM モデルを作成し、肝における肝癌の発症を比較した。野生型マウス、OSMRKO マウス共に肝癌の発症が認められたが、OSMRKO マウスにおいて有意により多くの肝癌が発症していた。以上の結果より、OSM シグナルの欠損は、NASH を基盤とする肝癌の発症を促進する可能性が示唆された。

そこで、OSM の肝癌発症に対する抑制効果を検討するために、NASH 期である 8 週齢の STAM マウスに対し、1 週間 OSM を腹腔内投与し、肝癌の発症を検討した。コントロール群では多数の肝癌の発症が認められたが、OSM の投与により肝癌の発症が有意に抑制されていた (図4)。これらの結果より、OSM は、NASH を基盤とする肝癌の発症を抑制する可能性が示唆された。また、OSM の投与により、STAM モデルの肝における IL-6 の発現が増加していた (図5左)。そこで、肝細胞の一次培養系に対して OSM を処置したところ、IL-6 の発現増加が認められた (図5右、n=2)。

以上の結果より、NAFL から NASH への進行の過程において、OSM が肝障害や炎症を抑制している可能性が示唆された。OSM は、これらの作用により、NAFL から NASH への進行を抑制する効果、及び NASH を改善する効果を発揮し、肝癌発症の抑制へと繋がる可能性が示唆された。

(5)運動時の代謝改善効果における OSM の役割を検討した。野生型マウスでは、運動 24 時間後において、非運動群と比較して、インスリンによる血糖降下作用の亢進 (図 6A)、及び骨格筋におけるインスリンシグナル分子 (Akt) の活性上昇 (図 6B) が認められ、インスリン感受性が増加していた。しかし、OSMRKO マウスでは、それらの運動によるインスリン感受性の増加が減弱していた (図 6A, B)。また、運動後には、野生型マウスの骨格筋では M2 マクロファージ、及びインスリン感受性を増加させる IL-10 の発現が増加していたが、OSMRKO マウスの骨格筋では運動によるそれらの効果が減弱していた (図 6C, D)。以上の結果より、OSM は運動後の骨格筋において、M2 マクロファージの浸潤や IL-10 の発現増加を介してインスリン感受性を増加させる作用を持つ可能性が示唆された。次に、運動による NASH 改善効果に対する OSM の役割を検討するために、NASH モデルマウス (obMCD モデル) に有酸素運動を 1 日 1 回、7 日間負荷し、肝、及び骨格筋における OSM の発現変化を検討した。運動により、肝 (図 6E、n=2)、及び骨格筋 (図 6F、n=2) における OSM の発現が増加したことより、運動による NASH 改善効果には OSM の NASH 改善作用が貢献している可能性が示唆された。

(6) NASH 発症の原因となる栄養素として、近年、果糖が注目されている。脂肪と比較して果糖が NASH 発症を強く誘導する原因を検討するために、野生型マウスに普通食、高脂肪食、及び高果糖食を一週間給餌し、生理学的、組織学的、及び分子生物学的解析を行った。生理学的パラメーターに関しては、普通食群と比較して、高脂肪食群で体重、脂肪重量 (白色内臓脂肪)、及び摂取カロリー量の有意な増加が認められたのに対して、高果糖食給餌ではいずれの値も普通食群と有意な差は認められなかった。以上の結果より、果糖の短期過剰摂取は、脂肪とは異なり

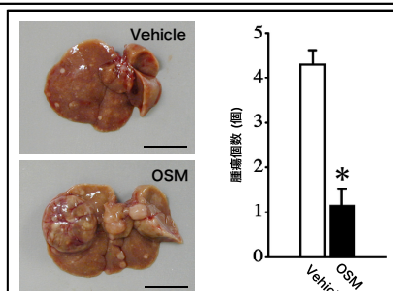


図4 OSM投与による肝癌の抑制効果の検討. Scale bars = 1 cm. \*p < 0.05 (Vehicleとの比較).

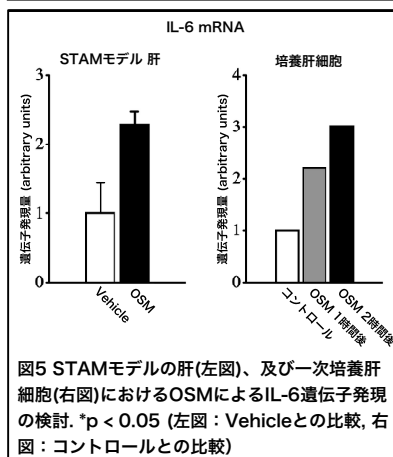


図5 STAMモデルの肝(左図)、及び一次培養肝細胞(右図)におけるOSMによるIL-6遺伝子発現の検討. \*p < 0.05 (左図: Vehicleとの比較, 右図: コントロールとの比較)



過食や肥満を誘導しないことが示された。

肝における組織学的解析では、オイルレッドO染色において、高脂肪食群、及び高果糖食群で肝細胞内に脂肪滴の蓄積が認められた。また、高果糖食群で認められた脂肪滴は高脂肪食群における脂肪滴よりも大型であった。これらの結果より、果糖の短期過剰摂取は脂肪肝を誘導し、NASHの病理所見に特徴的な脂肪滴の大型化に関連している可能性が示唆された。

高果糖食群でより大型の脂肪滴が蓄積した原因を検討するために、肝において脂肪滴の融合を促進する

分子である CIDEa と CIDEc の発現変化を解析した。普通食群、及び高脂肪食群の肝と比較して、高果糖食群の肝で有意な CIDEa、及び CIDEc の増加が認められた。以上の結果より、果糖は、CIDEa や CIDEc を誘導することにより、大型の脂肪滴を形成する可能性が示された。

また、NASHによる炎症と果糖の過剰摂取との関連性を検討するために、肝における F4/80 (マクロファージのマーカー) と好中球エラスターゼ (好中球のマーカー) の発現を検討した。普通食群の肝と比較して、高脂肪食群、及び高果糖食群の肝の好中球エラスターゼの発現が有意に増加しており、果糖の短期過剰摂取は脂肪と同様に好中球による炎症を惹起すると考えられた。

果糖誘導性の NASH と OSM との関連性について検討するために、C57BL/6J マウスに普通食、高脂肪食、及び高果糖食を一週間給餌し、それらのマウスの肝における OSM、及び OSMRβ の発現を検討した。普通食群の肝と比較して、高脂肪食群、及び高果糖食群の肝において OSM の有意な発現増加が認められた。OSMRβ の発現は、これら3群間で差は認められなかった。これらの結果より、果糖の過剰摂取時にも脂肪の過剰摂取時と同様に OSM が何らかの役割を担っている可能性が示唆された。

そこで、OSMRKO マウス、及びその同腹の野生型マウスに高果糖食を一週間給餌し、果糖の過剰摂取時の OSM の役割について検討した。体重、脂肪重量、及び摂食量に関しては、野生型と OSMRKO マウスの間で差は認められなかった。また、肝のオイルレッドO染色から、野生型マウスと比較して OSMRKO マウスにおいて、より大型の脂肪滴の蓄積が認められた。以上の結果より、OSM は、脂肪滴の融合を抑制する可能性が示唆された。

OSM と脂肪滴融合との関連性を検討するために、高果糖食を一週間給餌した OSMRKO マウス、及び野生型マウスの肝における CIDEa と CIDEc の発現を検討した。CIDEa の発現に野生型と OSMRKO マウスの間で差は認められなかったが、CIDEc の発現が OSMRKO マウスにおいて増加していた (図7左)。これらの結果より、OSM は CIDEc の発現を抑制することにより、脂肪滴の融合を抑制している可能性が示唆された。

OSM と果糖誘導性の炎症との関連性を検討するために、高果糖食を1週間給餌した OSMRKO マウス、及び野生型マウスの肝における F4/80 と好中球エラスターゼの発現を検討した。F4/80 の肝での発現量は、野生型と OSMRKO マウスの間で差は認められなかったが、OSMRKO マウスの肝において好中球エラスターゼ (NE) の発現増加が認められた (図7右)。以上の結果より、OSM は、好中球による炎症を制御する可能性が示唆された。

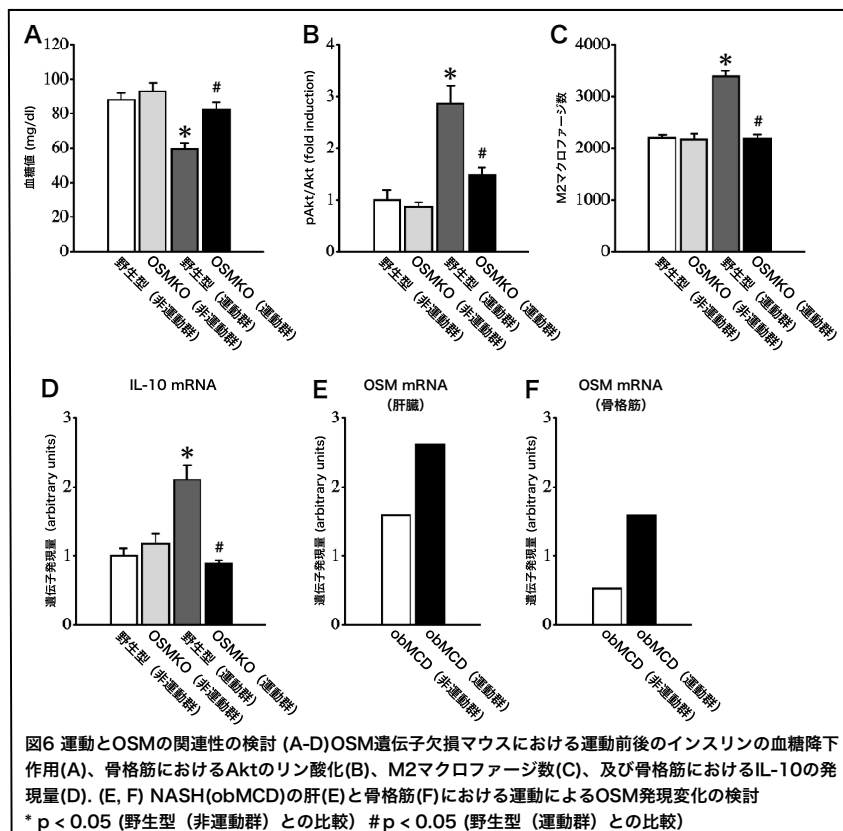


図6 運動とOSMの関連性の検討 (A-D)OSM遺伝子欠損マウスにおける運動前後のインスリンの血糖降下作用(A)、骨格筋におけるAktのリン酸化(B)、M2マクロファージ数(C)、及び骨格筋におけるIL-10の発現量(D)、(E、F) NASH(obMCD)の肝(E)と骨格筋(F)における運動によるOSM発現変化の検討  
\* p < 0.05 (野生型 (非運動群) との比較) # p < 0.05 (野生型 (運動群) との比較)

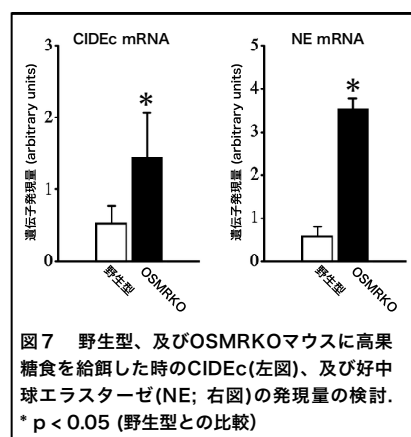


図7 野生型、及びOSMRKOMausに高果糖食を給餌した時のCIDEc(左図)、及び好中球エラスターゼ(NE; 右図)の発現量の検討。  
\* p < 0.05 (野生型との比較)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 佐々木亘、生駒宗禎、岩崎萌、熊野万理恵、脇山沙也加、小森忠祐、森川吉博
2. 発表標題 果糖の過剰摂取による生体への影響 . 生理学的解析 .
3. 学会等名 第86回和歌山医学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鈴木雅之、岡田拓真、廣部雅臣、本田優羽、佐々木亘、小森忠祐、森川吉博
2. 発表標題 果糖の過剰摂取による生体への影響 . 肝の組織学的解析 .
3. 学会等名 第86回和歌山医学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小森忠祐、森川吉博
2. 発表標題 肝脂肪滴形成における果糖の過剰摂取の影響
3. 学会等名 第124回日本解剖学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Komori T, Morikawa Y
2. 発表標題 Induction of oncostatin M expression by acute exercise in the skeletal muscles and sera of mice.
3. 学会等名 Cytokines 2019 (7th Annual Meeting of the International Cytokine and Interferon Society) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Morikawa Y, Komori T
2. 発表標題 Functional roles of oncostatin M in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis in mice.
3. 学会等名 Cytokines 2019 (7th Annual Meeting of the International Cytokine and Interferon Society) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森川吉博、久岡朋子、小森忠祐
2. 発表標題 非アルコール性脂肪肝炎(NASH)におけるオンコスタチンMの役割の検討
3. 学会等名 第125回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2020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
研究協力者	小森 忠祐  (Komori Tadasuke)	和歌山県立医科大学・医学部・講師	

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
---------	---------