

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26282195

研究課題名(和文) 運動負荷誘導性マイオカインOSMによるNASH改善のメカニズムとその治療への応用

研究課題名(英文) Role of exercise-induced oncostatin M in the treatment of NASH

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) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：高脂肪食給餌によるNASH発症マウスにオンコスタチンM(OSM)を投与するとNASHやグルコース不耐性、インスリン抵抗性、脂肪組織炎症の改善とともに、摂食量と腸管における脂肪吸収の低下が認められた。また、NASH発症マウスの門脈内にOSMを投与したところ、肝細胞における脂肪蓄積の抑制が示唆された。

高負荷のランニングにより下腿と大腿の筋群においてOSMの発現が増加した。また、OSMRは血管内皮細胞、筋衛星細胞、及び間葉系前駆細胞などに発現していたことから、運動負荷により誘導されたOSMが骨格筋内の細胞に作用することで、NASHにおける運動療法の効果を発揮する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)： In HFD-induced NASH model mice, intraperitoneal injection of OSM improved NASH as well as glucose intolerance, insulin resistance, and adipose tissue inflammation. OSM decreased food intake and intestinal lipid absorption, but did not affect on the body temperature and locomotor activity. In addition, the direct beneficial effects of OSM on lipid storage in hepatocytes were observed when OSM was injected into this model mice intraperitoneally.

Swimming and moderate-intensity running induced the expression of OSM in the calf muscle, but not in the quadriceps. High-intensity running induced the expression of OSM in both the calf muscle and the quadriceps. The expression of OSMR was observed in the endothelial cells, satellite cells, and mesenchymal progenitor cells in the skeletal muscle, suggesting that exercise may exert the therapeutic effects on NASH through the action of exercise-induced OSM on these cells.

研究分野：神経内分泌学、代謝学、分子生物学

キーワード：糖尿病 非アルコール性脂肪肝 サイトカイン 運動

1. 研究開始当初の背景

我が国における肥満の有病率は年々増加しており、肥満を基盤としたインスリン抵抗性は糖尿病、高血圧、高脂血症を惹起する。それらは動脈硬化性疾患の危険因子となり、しばしば糖尿病患者を死に至らしめることはよく知られている。しかし、糖尿病患者の死因の約 1/8 が肝硬変や肝臓という肝疾患によるものであり(Okanoue et al., *J Gastroenterol Hepatol*, 2011)、近年、これらの肝疾患の原因となる脂肪肝が注目されている。脂肪肝とは、肝に中性脂肪が蓄積した状態のことであり、飲酒歴のほとんどない人(エタノール換算で 1 日 20 グラム未満)におこる脂肪肝は非アルコール性脂肪肝疾患(nonalcoholic fatty liver disease: NAFLD)と呼ばれ、その患者数は国内に約 1000 万人存在すると推定されている。NAFLD は非進行性で良性の経過をたどる単純性脂肪肝と、肝硬変・肝臓へと進行する確率が高い非アルコール性脂肪肝炎(nonalcoholic steatohepatitis: NASH)に大別され、NASH の患者数は 100~200 万人と推定されている。NASH に対しては、これまで様々な治療が試みられてきた。薬物療法としては、脂質代謝異常治療薬であるフィブレート系の薬剤や、糖尿病治療薬、肝庇護剤、抗酸化剤が用いられ、さらには瀉血療法や肝移植まで行われてきた。しかし、いずれもその効果は低いため、NASH の治療として確立された方法はなく、最も効果的な治療法として食事療法と運動療法が行われているのが現状である。

2. 研究の目的

今回、申請者らが着目しているオンコスタチン M(OSM)は、IL-6 ファミリーに属するサイトカインであり、機能的には、造血、肝の発達、種々の炎症性疾患に関わることが知られている。研究代表者と連携研究者の宮島篤は、これまで神経系や肝の発生における OSM の役割に関して精力的に共同研究を進めてきた(Kamiya et al, *EMBO J*, 1999; Matsui et al, *EMBO J*, 2002; Tamura et al, *Eur J Neurosci*, 2003; Tamura et al, *Neuroscience*, 2003; Morikawa et al, *J Neurosci*, 2004)。また、宮島は *in vitro* の実験系において OSM が脂肪細胞の分化を抑制すると報告しているが(Miyaoka et al, *J Biol Chem*, 2006)、生体内における肥満とその関連疾患における OSM の役割は全く不明であった。

OSM の機能的受容体は固有の受容体サブユニットである OSMR β と gp130 のヘテロダイマーからなることが知られており、申請者らは OSM の生体内での役割を解明するために OSMR b欠損(OSMRKO) マウスを作製し、その解析を行ってきた。OSMRKO マウスは、

普通食給餌下において 20 週齢以降には肥満を呈し、32 週齢では脂肪肝も認められた(Komori et al, *J Biol Chem*, 2013)。また、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沈着の増加と炎症性変化を認めたことより、OSM のシグナルが阻害されることが、肥満やそれに続く NASH を引き起こす原因となることが考えられた。最近、運動負荷により骨格筋や血中の OSM が増加することが報告され(Hojman et al, *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2011)、運動療法による NASH の改善効果は、OSM の作用によるものである可能性が考えられた。そこで、NASH のモデルマウスの 1 つである高脂肪食負荷マウスに OSM を 1 週間投与したところ、肥満や糖尿病の改善とともに肝脂肪蓄積の著明な減少(図 2)が認められ、OSM が NASH の治療薬となりうる可能性が示唆された。これらの結果から、本研究は、NASH の運動療法における OSM の機能の分子メカニズムを解明し、OSM を分子標的とした NASH やその基盤にあるメタボリック症候群の統合的治療法の確立をめざすことを目的とする。

3. 研究の方法

- ①高脂肪食給餌により NASH を発症させたマウス(NASH 発症マウス)にオンコスタチン M(OSM)を 1 週間投与し、NASH の改善やその他の代謝パラメーターを検討した。
- ②NASH 発症マウスの門脈内に OSM を投与し、OSM の肝臓への直接効果を検討した。
- ③野生型マウスに様々な運動負荷を与え、骨格筋内における OSM や OSMR β の発現を検討した。

4. 研究成果

NASH 発症マウスにオンコスタチン M(OSM)を投与すると、摂食量の減少が認められた(図 1)。

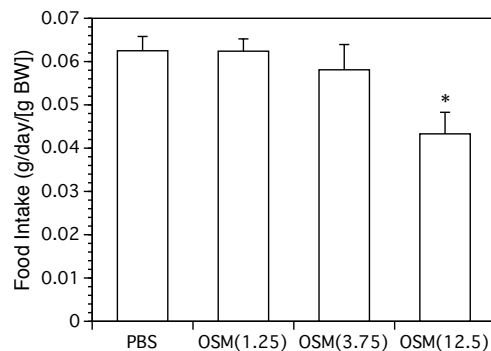


図 1 OSM 投与(1.25、3.75、及び 12.5 ng/g 体重)による 1 日摂食量の検討

また、OSM の投与により、肝臓中の中性脂肪や総コレステロール含有量の低下が認められた(図 2)。肝障害の指標である血清中の AST や ALT も低下していたことより、OSM は NASH を改善させる可能性が示唆された。しかし、コントロール群の摂食量を

OSM 投与群と同量に合わせても（ペアフィーディング）NASH の改善（肝臓中の中性脂肪や総コレステロール含有量の低下、AST や ALT の血中濃度の低下）がほとんど認められなかったことから（図 2）、OSM 投与による NASH 改善効果は摂食量の減少を介している可能性が低いと考えられた。

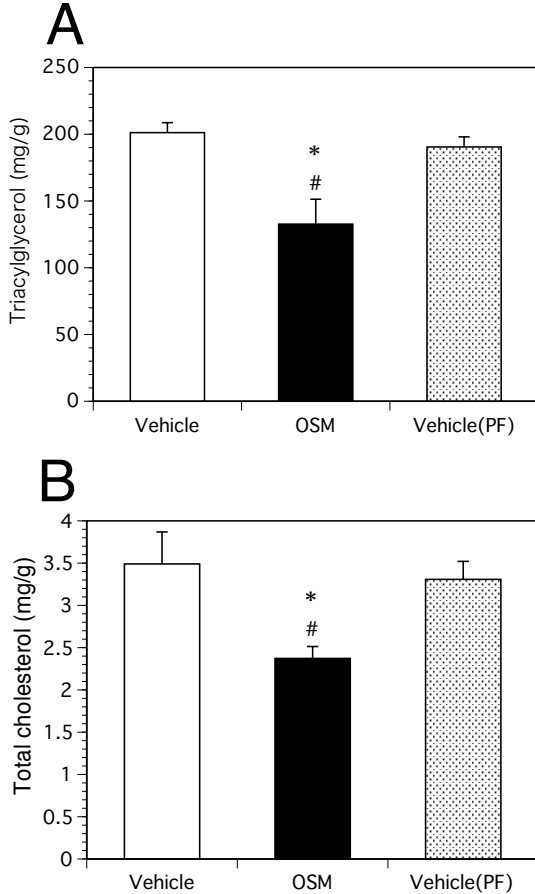


図 2 OSM 投与、及びペアフィーディングによる肝臓中の中性脂肪 (A)、及び総コレステロール (B) 含有量の検討. Vehicle; コントロール群、OSM; OSM 投与群、Vehicle (PF); ペアフィーディング群

NASH 発症マウスの門脈内に OSM を投与したところ、OSM 投与後 15 分で肝細胞に STAT3 や ERK の活性化が認められ、OSM が直接肝細胞に作用している可能性が示唆された。また、OSM 投与後 1 時間と 2 時間において、脂肪酸合成に働く酵素である FAS の発現が減少し、長鎖脂肪酸の β 酸化を促進する酵素である ACSL3 と ACSL5 の発現が増加したことから（図 3）、OSM は脂肪酸合成を抑制し、脂肪酸酸化を促進する可能性が示唆された。

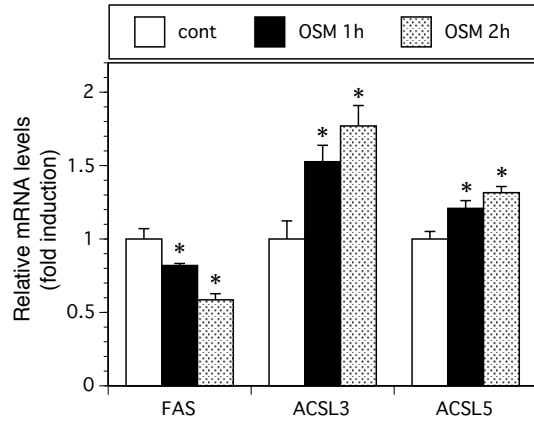


図 3 OSM 投与、及びペアフィーディングによる肝臓中の遺伝子発現の検討. Vehicle; コントロール群、OSM; OSM 投与群、Vehicle (PF); ペアフィーディング群

また、NASH 発症マウスにおいて、OSM 投与によりグルコース不耐性やインスリン抵抗性が改善し（図 4）、脂肪組織中の M1/M2 マクロファージの比が減少した（図 5）。さらに、脂肪組織中の TNF- α や IL-1 β などの炎症性サイトカインの発現量が減少し、IL-10 などの抗炎症性サイトカインの発現が増加し（図 6）、OSM が脂肪組織の炎症やインスリン抵抗性を改善する可能性が示唆された。

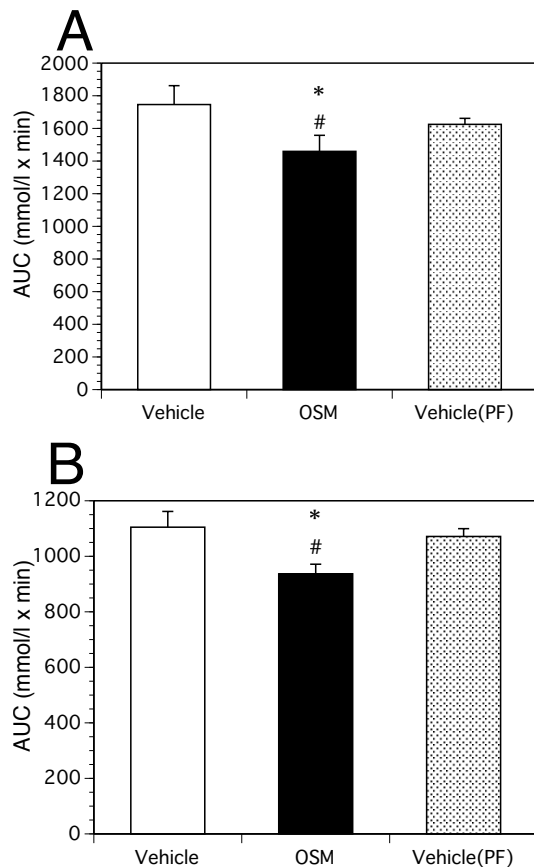


図 4 OSM 投与、及びペアフィーディングによる耐糖能異常 (A)、及びインスリン抵抗性 (B) の検討. Vehicle; コントロール群、OSM;

OSM 投与群、Vehicle (PF) ; ペアフィーディング群

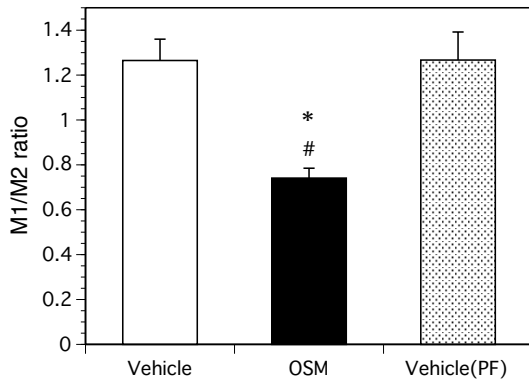


図5 OSM 投与、及びペアフィーディングによる脂肪組織中の M1、及び M2 マクロファージの比率の検討. Vehicle; コントロール群、OSM; OSM 投与群、Vehicle (PF) ; ペアフィーディング群

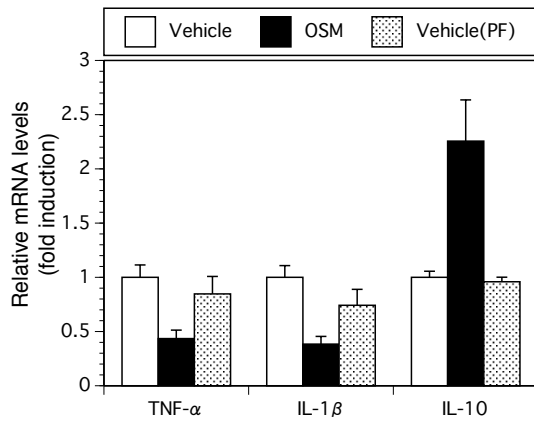


図6 OSM 投与、及びペアフィーディングによる脂肪組織中の遺伝子発現の検討. Vehicle; コントロール群、OSM; OSM 投与群、Vehicle (PF) ; ペアフィーディング群

腸管における脂肪吸収に対する OSM の役割を NASH 発症マウスにおいて検討した。OSM 投与により糞便中の総脂肪量や中性脂肪量が増加しており、脂肪の吸収の低下が示唆された (図7)。また、NASH 発症マウスにおいて、OSM 投与による体温、行動量の変化は認められなかった (図8)。

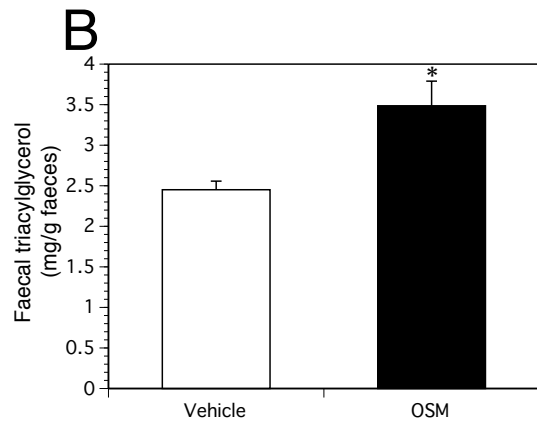
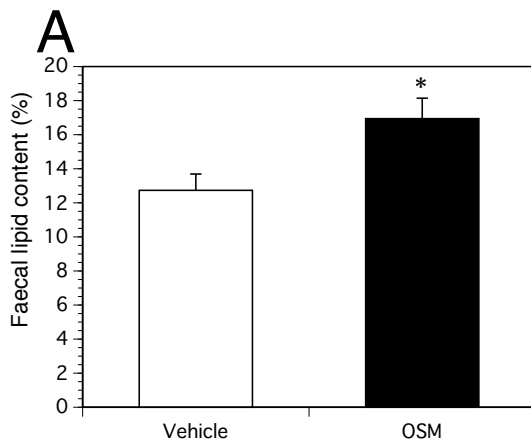


図7 OSM 投与による糞便中の総脂肪 (A)、及び中性脂肪 (B) 含有量の検討. Vehicle; コントロール群、OSM; OSM 投与群

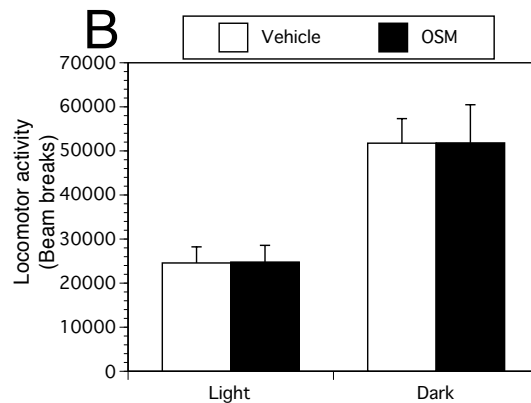
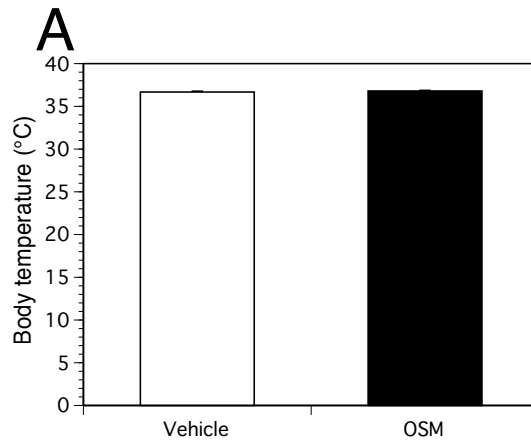


図8 OSM 投与による体温 (A)、及び行動量 (B) の検討. Vehicle; コントロール群、OSM; OSM 投与群

以上の結果より、OSM は肝臓への直接作用 (脂肪酸合成の抑制と脂肪酸酸化の促進作用)、慢性炎症とインスリン抵抗性改善作用、及び摂食と脂肪吸収の抑制作用を持ち、これらの作用が合わさって NASH の改善へと繋がっている可能性が示唆された。

運動によるメタボリック症候群の改善効果における OSM の役割を明らかにするため

に、運動負荷後の骨格筋における OSM と OSMR β の発現について検討した。運動負荷として、水泳（1 時間）とトレッドミルランニング（中等度負荷と高負荷）を行なった。水泳や中等度負荷のトレッドミルランニングでは、腓腹筋、ヒラメ筋、前脛骨筋などの下腿の筋群において OSM の発現が増加したが、大腿の筋群における OSM の発現に変化は認められなかった。高負荷のトレッドミルランニングでは、下腿の筋群と大腿の筋群の両者において OSM の発現が増加した。次に、OSMR β の発現を検討したところ、血管内皮細胞、筋衛星細胞、及び間葉系前駆細胞などに発現が認められた。以上の結果より、骨格筋において OSM は運動負荷後に発現が増加し、血管内皮細胞、筋衛星細胞、及び間葉系前駆細胞などの骨格筋内の細胞に作用し、血管新生、及び筋細胞や脂肪細胞への分化などの機能に関与する可能性が示唆された。

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 2 件）

- 1) Komori T, Tanaka M, Furuta H, Akamizu T, Miyajima A, Morikawa Y. Oncostatin M is a potential agent for the treatment of obesity and related metabolic disorders: a study in mice. *Diabetologia* 査読有 58(8): 1868-1876, 2015.
doi: 10.1007/s00125-015-3613-9
- 2) Komori T, Tanaka M, Senba E, Miyajima A, Morikawa Y. Deficiency of oncostatin M receptor β (OSMR β) exacerbates high-fat diet-induced obesity and related metabolic disorders in mice. *J Biol Chem* 査読有 289(20): 13821-13837, 2014.
doi: 10.1074/jbc.M113.542399

〔学会発表〕（計 5 件）

- 1) 小森忠祐、志風友規、森川吉博：骨格筋におけるオンコスタチン M の運動による発現変化とその作用部位の検討 第 122 回解剖学会総会・全国学術集会 2017 年 3 月 28 日 長崎大学坂本キャンパス（長崎県・長崎市）
- 2) 小森忠祐、古田浩人、田中稔、宮島篤、赤水尚史、森川吉博：メタボリック症候群の改善におけるオンコスタチン M の役割の検討。第 59 回日本糖尿病学会年次学術集会 2016 年 5 月 21 日 国立京都国際会館（京都府・京都市）
- 3) Komori T, Tanaka M, Miyajima A, Morikawa Y. The roles of Oncostatin M in the treatment of nonalcoholic fatty liver disease in mice. A Keystone Symposium [Liver Metabolism and Nonalcoholic Fatty

Liver Disease (NAFLD)] 2015.3.24 (poster). 2015.3.25 (Workshop). Whistler, BC, Canada

- 4) Komori T, Tanaka M, Miyajima A, Morikawa Y. The roles of Oncostatin M in the treatment of nonalcoholic fatty liver disease in mice. A Keystone Symposium [Liver Metabolism and Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD)], 2015.3.24. Whistler, BC, Canada
- 5) 小森忠祐、田中稔、宮島篤、森川吉博：メタボリック症候群に対するオンコスタチン M の治療効果の検討。第 26 回分子糖尿病学シンポジウム 2014 年 12 月 6 日 高知市文化プラザかるぼーと（高知県・高知市）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)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

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
小森 忠祐 (KOMORI TADASUKE)
和歌山県立医科大学・医学部・助教
研究者番号：90433359

久岡 朋子 (HISAOKA TOMOKO)
和歌山県立医科大学・医学部・助教
研究者番号：00398463

古田 浩人 (FURUTA HIROTO)
和歌山県立医科大学・医学部・准教授
研究者番号：90238684

宮島 篤 (MIYAJIMA ATSUSHI)
東京大学・分子細胞生物学研究所・教授
研究者番号：50135232

(4) 研究協力者

形部 裕昭 (GYOBU HIROAKI)