

令和 5 年 5 月 19 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20870

研究課題名(和文) Elucidation of the mechanism of steatohepatitis-related cardiomyopathy due to dietary 7-ketocholesterol

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of steatohepatitis-related cardiomyopathy due to dietary 7-ketocholesterol

研究代表者

常久洋(Chang, Jiuyang)

大阪大学・大学院医学系研究科・招へい研究員

研究者番号：60907707

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、8週齢の野生型雄マウスにストレプトゾトシン(STZ)を腹腔内投与し、血糖値150-250mg/dlのマウスを糖尿病マウスとして、酸化ステロールの7ケトコレステロール(7KC)を餌に混餌して4週間から12週間投与し、肝臓、心筋の組織増、mRNA、WBを解析し、心機能を超高磁場MRIで解析した。肝臓では、遊離コレステロール、トリグリセライドの蓄積が増加のほか、炎症細胞浸潤や線維化の亢進も認められた。それに伴い、心筋組織でもIL-1を中心としたインフラマソーム系の炎症マーカーの亢進を認めた。超高磁場MRIでの観察では、7KC投与群、非投与群ともに軽度の心筋障害を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

It has been demonstrated that cardiovascular disease is the leading cause of mortality among patients with non-alcoholic fatty liver diseases. We have demonstrated that 7KC in diet might accelerate cardiac inflammation through hepatic steatosis and inflammation by NLRP3 inflammasome activation.

研究成果の概要(英文)：C57Bl/6 mice were injected STZ (160mg/kg) intraperitoneally and confirmed that the blood glucose levels were in the range of 200-350 mg/dL two weeks after injection. Diabetic mice were fed high fat diet with or without 7KC for four or twelve weeks and sacrificed. In STZ-induced diabetic mice, oil Red O staining showed more and larger lipid droplets in WD+7KC. Lipid extraction analysis has demonstrated that triglycerides and free cholesterol were significantly increased in liver in WD+7KC group. Serum ALT and TNF- $\alpha$  were significantly increased in WD+7KC and F4/80 staining exhibited increased macrophages in WD+7KC. Pathway analysis by RNA sequencing demonstrated that several pathways, such as TNF signaling pathway were upregulated in WD+7KC. Importantly, in heart, inflammatory cytokine, IL-1 $\beta$  was upregulated in WD+7KC. In summary, dietary supplementation of 7KC accelerated cardiac inflammation through hepatic steatosis, inflammatory cell infiltration and fibrosis.

研究分野：循環器内科学

キーワード：心筋症 7-ケトコレステロール 脂肪肝炎 糖尿病

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1 . 研究開始当初の背景

Recent clinical studies have reported that the development of Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is associated with atherosclerosis and even heart failure. An oxidized cholesterol, 7-ketocholesterol (7KC), was contained in processed food and plasma 7KC levels were significantly higher in patients with diabetes or cardiovascular diseases. In the previous study, we have demonstrated that small amount of dietary 7KC in high fat diet induced hepatic steatosis and inflammation in obese mice (Chang J. et al. *Front Endocrinol* 2021). We have also revealed that cardiomyopathy was accompanied with diet-induced steatohepatitis in mice (Kanno K. et al. *Sci. Rep.* 2022).

## 2 . 研究の目的

The aim of this study is to determine whether dietary 7KC may accelerate cardiomyopathy and cardiac dysfunction accompanied with steatohepatitis. We hypothesize that dietary 7KC would induce fatty liver by activating inflammasome, leading to cardiac dysfunction, or dietary 7KC would induce fatty liver and produce abnormal lipoprotein, resulting in lipid accumulation in mitochondria and reduce ATP production in cardiomyocytes.

## 3 . 研究の方法

High fat / high cholesterol (1%) diet with 7KC (0.01%) (WD+7KC) or without 7KC (WD) were prepared. C57BL/6 mice at age of 8 weeks were injected STZ. At age of 11 weeks STZ-induced diabetic mice were fed western type diet (WD) with or without 0.01% 7KC.

a) Observation of myocardial histology and determination of heart failure markers: H&E, Oil Red O, F4/80 staining were performed. Expression of proteins involved in NLRP3 inflammasome such as Caspase1, NLRP3, ASC, and IL1 were evaluated.

b) Determination of cardiac mRNA and analysis of pathway by RNA-sequencing: Cardiac mRNA was extracted and RNA-sequencing was performed. As heart failure markers, serum ANP / BNP concentration and *Nppa* / *Nppb* mRNA expression were determined.

c) Evaluation of cardiac function: Cardiac function including left ventricular diastolic function and myocardial strain were evaluated by 7T-MRI.

## 4 . 研究成果

C57Bl/6 mice were injected STZ (160mg/kg) intraperitoneally (160mg/kg) and confirmed that the blood glucose levels were in the range of 200-350 mg/dL and that those had type 2 diabetes two week after injection. Diabetic mice were fed high fat diet with or without 7KC for four or twelve weeks and sacrificed. In STZ-induced diabetic mice, oil Red O staining showed more and larger lipid droplets in WD+-KC. Lipid extraction analysis has demonstrated that triglycerides and free cholesterol were significantly increased in liver in WD+7KC group. Serum ALT and TNF-a were significantly increased in WD+7KC and F4/80 staining exhibited increased macrophages in WD+7KC. Pathway analysis by RNA sequencing demonstrated that several pathways, such as TNF signaling pathway were upregulated in WD+7KC. Importantly, in heart,

inflammatory cytokine, IL-1b was upregulated in WD+7KC. In summary, dietary supplementation of 7KC accelerated cardiac inflammation through hepatic steatosis, inflammatory cell infiltration and fibrosis.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Kanno Kotaro, Koseki Masahiro, Chang Jiuyang, Saga Ayami, Inui Hiroyasu, Okada Takeshi, Tanaka Katsunao, Asaji Masumi, Zhu Yinghong, Ide Seiko, Saito Shigeyoshi, Higo Tomoaki, Okuzaki Daisuke, Ohama Tohru, Nishida Makoto, Kamada Yoshihiro, Ono Masafumi, Saibara Toshiji, Yamashita Shizuya, Sakata Yasushi	4. 巻 12
2. 論文標題 Pemafibrate suppresses NLRP3 inflammasome activation in the liver and heart in a novel mouse model of steatohepatitis-related cardiomyopathy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 2996
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-06542-8	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 Tanaka Katsunao, Koseki Masahiro, Kato Hisashi, Miyashita Kazuya, Okada Takeshi, Kanno Kotaro, Saga Ayami, Chang Jiuyang, Omatsu Takashi, Inui Hiroyasu, Ohama Tohru, Nishida Makoto, Yamashita Shizuya, Sakata Yasushi	4. 巻 -
2. 論文標題 Anti-GPIHBP1 Antibody-Positive Autoimmune Hyperchylomicronemia and Immune Thrombocytopenia	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Atherosclerosis and Thrombosis	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5551/jat.63348	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 Saga A, Koseki M, Kanno K, Chang J, Higo T, Okuzaki D, Okada T, Inui H, Asaji M, Tanaka K, Omatsu T, Nishihara S, Zhu Y, Ito K, Hattori H, Ichi I, Kamada Y, Ono M, Saibara T, Ohama T, Hikoso S, Nishida M, Yamashita S, Sakata Y.	4. 巻 23
2. 論文標題 A Dietary Oxysterol, 7-Ketocholesterol, Exacerbates Imiquimod-Induced Psoriasis-like Dermatitis in Steatohepatitic Mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 15855 ~ 15855
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms232415855	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 Inui H, Nishida M, Ichii M, Nakaoka H, Asaji M, Ide S, Saito S, Saga A, Omatsu T, Tanaka K, Kanno K, Chang J, Zhu Y, Okada T, Okuzaki D, Matsui T, Ohama T, Koseki M, Morii E, Hosen N, Yamashita S, Sakata Y.	4. 巻 176
2. 論文標題 XCR1+ conventional dendritic cell-induced CD4+ T helper 1 cell activation exacerbates cardiac remodeling after ischemic myocardial injury	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Molecular and Cellular Cardiology	6. 最初と最後の頁 68 ~ 83
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.yjmcc.2023.01.011	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 -

[学会発表] 計16件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 9件)

1. 発表者名 Inui H, Nishida M, Asaji M, Saga A, Kanno K, Jiuyang C, Zhu Y, Okada T, Tanaka K, Ohama T, Koseki M, Yamashita S, Sakata Y
2. 発表標題 Xcr1+ Dendritic Cell-Induced Cd4+ T Helper-1 Activation Leads to Exacerbation of Remodeling After Myocardial Infarction
3. 学会等名 AHA2021 (American Heart Association) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Okada T, Koseki M, Nishida M, Omatsu T, Tanaka K, Inui H, Chang J, Kanno K, Saga A, Ohama T, Ishihara M, Kujiraoka T, Hattori H, Masuda D, Yamashita S, Sakata Y
2. 発表標題 Targeted Next-generation Sequencing of 36 Lipid-Related Genes in Patients with Clinically Diagnosed Familial Hypercholesterolemia
3. 学会等名 AHA2021 (American Heart Association) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Koseki M, Kanno K, Chang J, Saga A, Okada T, Inui H, Tanaka K, Omatsu T, Higo T, Ide S, Saito S, Kamada Y, Ohama T, Nishida M, Yamashita S, Sakata Y
2. 発表標題 Steatohepatitis-related Atherosclerosis and/or Cardiomyopathy in a Rodent Model
3. 学会等名 ISA2021 (国際動脈硬化学会) The 19th International Symposium on Atherosclerosis (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Saga A, Koseki M, Kanno K, Chang J, Tanaka K, Omatsu T, Nishihara S, Asaji M, Okada T, Kamada Y, Zhu Y, Inui H, Ohama T, Nishida M, Yamashita S, Sakata Y
2. 発表標題 7-ketocholesterol exacerbates psoriasis-like dermatitis in diet-induced steatosis mice
3. 学会等名 ISA2021 (国際動脈硬化学会) The 19th International Symposium on Atherosclerosis (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tanaka K, Koseki M, Kato H, Chang J, Okada T, Kanno K, Inui H, Zhu Y, Ohama T, Nishida M, Miyashita K, Yamashita S, Sakata Y
2. 発表標題 A case of anti-GPIIb/IIIa antibody positive hyperchylomicronemia accompanied with idiopathic thrombocytopenic purpura
3. 学会等名 ISA2021 (国際動脈硬化学会) The 19th International Symposium on Atherosclerosis (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Okada T, Koseki M, Kato H, Tomita K, Matsui T, Tanaka K, Chang J, Inui H, Kanno K, Saga A, Ohama T, Ishihara M, Kujiraoka T, Hattori H, Nishida M, Yamashita S, Sakata Y
2. 発表標題 A Case with Sitosterolemia Accompanied with Macrothrombocytopenia and Bilateral Elbow Tuberos Xanthomas
3. 学会等名 ISA2021 (国際動脈硬化学会) The 19th International Symposium on Atherosclerosis (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Okada T, Koseki M, Nishida M, Omatsu T, Tanaka K, Inui H, Chang J, Kanno K, Saga A, Ohama T, Ishihara M, Kujiraoka T, Hattori H, Masuda D, Yamashita S, Sakata Y
2. 発表標題 Targeted Exon Sequencing of 36 Lipid-Related Genes in Patients with Clinically Diagnosed Familial Hypercholesterolemia
3. 学会等名 ISA2021 (国際動脈硬化学会) The 19th International Symposium on Atherosclerosis (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 冠野昂太郎, 小関正博, 嵯峨礼美, 常久洋, 尾松卓, 田中克尚, 乾洋勉, 西原紗恵, 朝治真澄, 岡田健志, 大濱透, 西田誠, 鎌田佳宏, 山下静也, 坂田泰史
2. 発表標題 動脈硬化惹起食によって発症する脂肪肝炎関連心筋症のメカニズムの解明
3. 学会等名 第53回日本動脈硬化学会総会・学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 嵯峨礼美, 小関正博, 冠野昂太郎, 常久洋, 田中克尚, 尾松卓, 朝治真澄, 岡田健志, 鎌田佳宏, 乾洋勉, 朱穎こう, 大濱透, 西田誠, 山下静也, 坂田泰史
2. 発表標題 7-ketocholesterolは食餌誘導性脂肪肝炎モデルマウスにおいて乾癬様皮膚炎を促進させる
3. 学会等名 第53回日本動脈硬化学会総会・学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 尾松卓, 小関正博, 岡田健志, 田中克尚, 冠野昂太郎, 嵯峨礼美, 乾洋勉, 常久洋, 大濱透, 石原光昭, 鯨岡健, 服部浩明, 西田誠, 山下静也, 坂田泰史
2. 発表標題 全身性に著明な腱黄色腫を認めた脳腱黄色腫症の一例
3. 学会等名 第53回日本動脈硬化学会総会・学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田中克尚, 小関正博, 加藤恒, 岡田健志, 嵯峨礼美, 冠野昂太郎, 常久洋, 乾洋勉, 朱穎こう, 大濱透, 西田誠, 宮下かずや, 山下静也, 坂田泰史
2. 発表標題 特発性血小板減少性紫斑病を伴う抗GPIIb/IIIa抗体陽性自己免疫性高カイトミクロン血症の1例
3. 学会等名 第53回日本動脈硬化学会総会・学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 乾洋勉, 西田誠, 朝治真澄, 嵯峨礼美, 冠野昂太郎, 常久洋, 朱穎広, 岡田健志, 田中克尚, 大濱透, 小関正博, 山下静也, 坂田泰史
2. 発表標題 心筋梗塞後に活性化したXCR1+樹状細胞によるTh1の誘導がリモデリングの増悪につながる
3. 学会等名 第53回日本動脈硬化学会総会・学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Masahiro Koseki, Jiuyang Chang, Ayami Saga, Kotara Kanno, Katsunao Tanaka, Takashi Omatsu, Takeshi Okada, Hiroyasu Inui, Tohru Ohama, Makoto Nishida, Yasushi Sakata
2. 発表標題 The Hepatic Lipid Type And Content Had An Impact On Hepatic Inflammation And Fibrosis In Streptozotocin-induced Diabetic Mice
3. 学会等名 AHA 2022 (American Heart Association Scientific Sessions 2022) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tanaka K, Koseki M, Ohyama H, Okada T, Kanno K, Inui H, Chang J, Omatsu T, Saga A, Ohama T, Nishida M, Sakata Y
2. 発表標題 Synergistic Effects of Pitavastatin and Pemafibrate on Hepatic Steatosis and Inflammation in Ldlr+/- Mice Fed Fat Diet
3. 学会等名 AHA 2022 (American Heart Association Scientific Sessions 2022) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田中克尚, 小関正博, 岡田健志, 冠野昂太郎, 常久洋, 尾松卓, 乾洋勉, 大濱透, 西田誠, 山下静也, 坂田泰史
2. 発表標題 妊娠希望、妊娠・授乳期間中のFH患者のLDL-C値管理におけるコレステミドの有用性と課題の検討
3. 学会等名 第54回日本動脈硬化学会総会・学術集会
4. 発表年 2022年



1. 発表者名 Koseki M, Saga A, Chang J, Sakata Y.
2. 発表標題 Beyond LDL：動脈硬化性疾患の残余リスクと戦う！ 7-ketocholesterol as a risk for steatohepatitis, psoriasis and cardiovascular disease
3. 学会等名 第87回日本循環器学会学術集会
4. 発表年 2023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	小関 正博  (Koseki Masahiro)		

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