

令和 3 年 5 月 17 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16026

研究課題名(和文) 食事由来酸化ステロールの表皮基底細胞増殖亢進作用による乾癬悪化メカニズムの解析

研究課題名(英文) Analysis of the mechanism of exacerbation of psoriasis by the epidermal basal cell proliferation-enhancing effect of diet-derived oxidized sterols

研究代表者

嵯峨 礼美 (Saga, Ayami)

大阪大学・医学系研究科・特任研究員(常勤)

研究者番号：10535925

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：食事由来の外因性酸化ステロールである7-ketocholesterol (7-KC) が、イミキモド誘導乾癬モデルマウスの乾癬様皮膚炎を促進させるかどうかを解析した。高脂肪高コレステロール胆汁酸含食 $\pm$ 7-KCを3週間負荷させた後、乾癬様皮膚炎を誘導するイミキモドクリームを耳介及び背部皮膚に4日間塗布した。7-KC(+)群において、耳介厚差が増加し、背部皮膚の表皮層が肥厚した。また、背部皮膚において、7-KC(+)群でIL-23a、IL-17のmRNA量が増加した。これらの結果より、7-KCが乾癬様皮膚炎の促進に寄与していると示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

乾癬、動脈硬化、非アルコール性脂肪肝炎(NASH)は、疫学的に重複して発症すると示唆されているが、共通する特定の背景は報告されていない。食餌由来の外因性酸化ステロールである7-ketocholesterol (7-KC)は、様々な慢性炎症性疾患を惹起する可能性があることが報告されている。しかし、7-KCが乾癬を促進させるとの報告はなかった。今回の研究で、7-KCの摂取・蓄積により乾癬様皮膚炎の病態が悪化すること、並びにその分子メカニズムが明らかになれば、腸管での吸収に着目した新しい食事・薬物療法を提案できると考える。

研究成果の概要(英文)：We analyzed whether 7-ketocholesterol (7-KC), a dietary exogenous oxidized sterol, exacerbate psoriasis-like dermatitis in mice. After mice fed with high-fat, high-cholesterol bile acid  $\pm$  7-KC for 3 weeks, which induced psoriasis-like dermatitis by treated with imiquimod cream to the auricle and back skin for 4 days. At 7-KC (+), the auricular thickness increased and the epidermal layer of the back skin thickened. The amount of IL-23a and IL-17 mRNA increased in the 7-KC (+) in the back skin. These suggest that 7-KC contributed to the acceleration of psoriasis-like dermatitis.

研究分野：乾癬における脂質代謝

キーワード：7-ketocholesterol 乾癬 IL-23 IL-17

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

乾癬、動脈硬化、非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) は、疫学的に重複して発症すると示唆されている①。しかし、特定の遺伝的背景は報告されていない。これらの疾患の多くは 40-50 代頃に発症していることから生活習慣の関与が考えられるが、特定はされていない。

酸化ステロールには、体内において内因性に合成されるものと自然酸化や電子レンジ加熱、活性酸素により合成される食事性 (外因性) のものがあり、様々な慢性炎症性疾患 (メタボリックシンドローム、高脂血症、糖尿病) を惹起する可能性があることが報告されている②。外因性酸化ステロールである 7-ketcholesterol (7-KC) は、炎症性サイトカインの産生を亢進し動脈硬化促進的に作用することや、ヒトの頸動脈プラーク内に蓄積しているとの報告がある③。しかし、7-KC が乾癬を悪化させるかどうかはわかっていない。

### 2. 研究の目的

食事に含まれる外因性酸化ステロールはコレステロールに比して、その濃度は最も高い 7-KC で 700 : 1 と微量だが④、年余の摂食の結果、7-KC が、乾癬を悪化させるのではないかの仮説を立案した。イミキモド (IMQ) 誘導乾癬モデルマウスに 7-KC 添加食を与えて、食餌由来 7-KC が乾癬様皮膚炎を悪化させるかどうかを明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

8-12 週齢の野生型 (C57BL/6) マウスに、7-KC(-)群; 高脂肪+高シュクロース+胆汁酸+コレステロール 1.25%食、7-KC(+)群; 高脂肪+高シュクロース+胆汁酸+コレステロール 1.25%+酸化ステロール 0.0125%食を 3 週間負荷させた後、乾癬様皮膚炎を誘発する 5% IMQ クリームを右耳介に 12.5 mg、背部皮膚に 62.5 mg 4 日間塗布した。

#### (1) 耳介厚の計測

IMQ 塗布前から毎日耳介厚を測定し、7-KC(-)群に比べ、7-KC(+)群において耳介厚が増加するかを解析する。

#### (2) 表皮層の組織所見

IMQ 誘導乾癬マウスの耳介および背部皮膚を採取し、パラフィン切片を作成、ヘマトキシリン・エオジン染色 (HE 染色) を行い、7-KC(-)群に比べ、7-KC(+)群において、表皮が肥厚しているかどうか解析する。

#### (3) 基底細胞の増殖解析

基底層の細胞増殖を特異的に評価するため、DNA 合成が行われる際に取り込まれる 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) の取り込み実験を行う。乾癬誘導プロトコール終了の 24 時間前 EdU を投与し、24 時間後に耳介および背部皮膚を採取、パラフィン切片を作成、蛍光プローブにて着色し、7-KC(-)群に比べ、7-KC(+)群において、表皮基底細胞内で EdU 陽性細胞が増加するかを解析する。

#### (4) 背部皮膚における mRNA の発現解析

IMQ 誘導乾癬マウスの背部皮膚からの mRNA を抽出し、Taqman による定量的 PCR 法を用いて *Tnfa*、*Il23a*、*Il17*、*Il22* の mRNA 量を定量し、7-KC(-)群に比べ、7-KC(+)群で mRNA の発現量が増加するかを解析する。

#### (5) 背部皮膚における Pathway 解析

IMQ 誘導乾癬マウスの背部皮膚からの mRNA を抽出し、RNA-Seq 解析を行い、7-KC(+)群で促進している Pathway を解析する。

#### 4. 研究成果

##### (1) 7-KC による耳介厚の増加

8-12週齢の野生型マウスに7-KCを添加しない食餌(7-KC(-)群)、7-KCを添加した食餌(7-KC(+))群)を3週間与えた後、耳介にIMQ塗布し耳介厚を毎日測定した。その結果、7-KC(-)群に比べ7-KC(+))群において、耳介厚が有意に増加した。

##### (2) 7-KCによる表皮層の肥厚

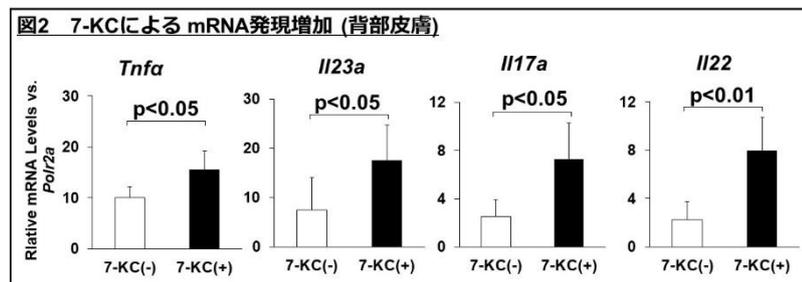
8-12週齢の野生型マウスに食餌±7-KCを与え、IMQを4日間塗布後の耳介及び背部皮膚のHE染色では、7-KC(-)群に比べ7-KC(+))群において、有意な表皮の肥厚がみられた(図1)。

##### (3) 7-KCによる表皮基底細胞の増殖促進

食餌±7-KCを与えたIMQ誘導乾癬モデルマウスにおいて、EdU取り込み実験を行った結果、7-KC(-)群に比べ7-KC(+))群で、背部皮膚表皮基底層において、EdU陽性細胞の有意な増加がみられ、7-KCにより基底細胞の増殖が促進されたことが示唆された。

##### (4) 7-KCによる乾癬関連サイトカイン発現の増加

食餌±7-KCを与えたIMQ誘導乾癬モデルマウスの背部皮膚における乾癬関連サイトカインのmRNA発現を解析した。その結果、7-KC(-)群に比べ7-KC(+))群において、



*Tnfa*、*Il23a*、*Il17*、*Il22*のmRNA発現が有意に増加した(図2)。

##### (5) 7-KCによる炎症性 signaling pathwayの促進

食餌±7-KCを与えたIMQ誘導乾癬モデルマウスの背部皮膚において、RNA-SeqによるPathway解析を行った。その結果、7-KC(-)群に比べ7-KC(+))群において、Cytokine-cytokine receptor interaction、Th17 cell differentiation、Jak-STAT signaling pathway、TNF signaling pathwayが亢進した。

IMQ誘導乾癬モデルマウスにおいて、食餌由来7-KCにより乾癬様皮膚炎が促進することが明らかになった。乾癬悪化の原因の一つとして7-KC摂食の可能性が示唆され、食餌療法による乾癬の治療方法の提案ができる。

#### 〈引用文献〉

- ① Psoriasis, non-alcoholic fatty liver disease, and cardiovascular disease: Three different diseases on a unique background, *World J Cardiol.* 2016; 2: 120-131

- ② Oxysterols in Metabolic Syndrome: From Bystander Molecules to Bioactive Lipids, *Trends in Molecular Medicine*. 2016; 22: 596-614
- ③ Oxysterols and atherosclerosis, *Atherosclerosis*. 1999; 142: 1-28
- ④ Presence of phytosterol oxides in crude vegetable oils and their fate during refining, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2003; 51; 2394-2401

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Chang Jiuyang, Koseki Masahiro, Saga Ayami, Kanno Kotaro, Higo Tomoaki, Okuzaki Daisuke, Okada Takeshi, Inui Hiroyasu, Tanaka Katsunao, Asaji Masumi, Zhu Yinghong, Kamada Yoshihiro, Ono Masafumi, Saibara Toshiji, Ichi Ikuyo, Ohama Tohru, Nishida Makoto, Yamashita Shizuya, Sakata Yasushi	4. 巻 11
2. 論文標題 Dietary Oxysterol, 7-Ketocholesterol Accelerates Hepatic Lipid Accumulation and Macrophage Infiltration in Obese Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Endocrinology	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fendo.2020.614692	査読の有無 無
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12件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 嵯峨礼美、小関正博、冠野昂太郎、常久洋、朝治真澄、岡田健志、鎌田佳宏、乾洋勉、朱穎竝、大瀨透、西田誠、山下静也、坂田泰史
2. 発表標題 食餌誘導性脂肪肝炎マウスモデルにおいて7-ketocholesterolは乾癬様皮膚炎を促進させる
3. 学会等名 第62回日本脂質生化学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 冠野昂太郎、小関正博、嵯峨礼美、常久洋、岡田健志、乾洋勉、朝治真澄、朱穎竝、大瀨透、鎌田佳宏、西田誠、山下静也、坂田泰史
2. 発表標題 食事由来7-ketocholesterolは、Ldl受容体欠損マウスにおいて、脂肪肝炎とアテローム性動脈硬化症を憎悪させる
3. 学会等名 第62回日本脂質生化学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Chang J, Koseki M, Saga A, Kanno K, Okada T, Saito S, Kamada Y, Inui H, Asaji M, Zhu Y, Ohama T, Nishida M, Yamashita S, Sakata Y.
2. 発表標題 The dietary 7-ketocholesterol accelerated steatohepatitis in ob/ob mice.
3. 学会等名 第62回日本脂質生化学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 嵯峨礼美、小関正博、冠野昂太郎、常久洋、朝治真澄、岡田健志、鎌田佳宏、乾洋勉、朱穎竝、大瀨透、西田誠、山下静也、坂田泰史
2. 発表標題 食餌誘発性脂肪肝炎マウスモデルにおいて7-ketocholesterolはイミキモド誘導乾癬様皮膚炎を増悪させる
3. 学会等名 第52回日本動脈硬化学会総会・学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 冠野昂太郎、小関正博、嵯峨礼美、常久洋、岡田健志、乾洋勉、朝治真澄、朱穎竝、大瀨透、西田誠、山下静也、坂田泰史
2. 発表標題 Dietary oxysterol, 7-ketocholesterol accelerated steatohepatitis and atherosclerosis in Ldlr deficient mice model
3. 学会等名 第52回日本動脈硬化学会総会・学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小関正博、冠野昂太郎、常久洋、嵯峨礼美、岡田健志、乾洋勉、鎌田佳宏、山下静也、坂田泰史
2. 発表標題 NAFLD/NASH、動脈硬化進展における外因性酸化ステロール7-ketocholesterolの影響
3. 学会等名 第52回日本動脈硬化学会総会・学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 嵯峨礼美、常久洋、小関正博
2. 発表標題 イミキモド誘導乾癬モデルマウスにおける食事誘導脂肪肝炎の影響
3. 学会等名 第56回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 常久洋、小関正博、 嵯峨礼美
2. 発表標題 The dietary 7-Ketocholesterol accelerated steatohepatitis in ob/ob mice by suppressing autophagy
3. 学会等名 第56回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Koseki M, Kanno K, Saga A, Chang J, Inui H, Okada T, Ohama T, Nishida M, Kamada Y, Miyoshi E, Yamashita S, Sakata Y.
2. 発表標題 Prevalence of Coronary Artery Disease and Achievement of Low-density Lipoprotein Cholesterol Management Targets in Familial Hypercholesterolemia Patients at Osaka University Hospital
3. 学会等名 88th European Atherosclerosis Congress (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Saga A, Koseki M, Kanno K, Chang J, Asaji M, Okada T, Inui H, Zhu Y, Ohama T, Nishida M, Yamashita S, Sakata Y.
2. 発表標題 A dietary oxysterol, 7-ketocholesterol, exacerbates imiquimod-induced psoriasis-like dermatitis in steatohepatitis mice
3. 学会等名 日本研究皮膚科学会 第45回年次学術大会・総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Masahiro Koseki, Juyang Chang, Kotaro Kanno, Ayami Saga, Hiroyasu Inui, Takeshi Okada, Shigeyoshi Saito, Tomoaki Higo, Seiko Ide, Katsunao Tanaka, Yinghong Zhu, Toru Ohhama, Makoto Nishida, Shizuya Yamashita, Yasushi Sakata
2. 発表標題 High Fat Diet Containing 7-Ketocholesterol Induces Steatohepatitis and Cardiac Inflammation in STZ-Induced Diabetic Mice
3. 学会等名 第85回日本循環器学会学術集会
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、朝治真澄、岡田健志、乾洋勉、朱穎広、大瀨透、西田誠、山下静也、坂田泰史
2. 発表標題 乾癬様皮膚炎マウスモデルにおける外因性酸化ステロールの影響の検討
3. 学会等名 第51回日本動脈硬化学会総会・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
---------------------------	-----------------------	----

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