

令和 4 年 5 月 23 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K17149

研究課題名(和文) 食事由来酸化ステロール蓄積による糖尿病性心筋症進展メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of the Mechanism of Diabetic Cardiomyopathy Progression Due to Oxidized Sterol Accumulation

研究代表者

岡田 健志 (Okada, Takeshi)

大阪大学・医学系研究科・寄附講座助教

研究者番号：20750136

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)：糖尿病性心筋症進展のメカニズムとして、微量の食餌由来酸化ステロールが長期間吸収されることで、心筋組織に影響を及ぼすとの仮説をもとに本研究を開始した。酸化ステロール添加食・非添加食を作成し、糖尿病モデルマウスに食餌させたところ、心組織重量や心機能に有意な変化を認めなかったが、一方で酸化ステロール投与群で肝機能が障害されていることを新たに見出した。血清ALT値の上昇、肝組織における脂肪滴の蓄積、炎症細胞浸潤を認め、さらに、酸化関連蛋白やオートファジー関連蛋白の発現が低下していることを見出した。本研究により少量の食餌由来酸化ステロールが脂肪肝・肝炎を惹起することとそのメカニズムが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本邦において糖尿病患者数は増加の一途を辿っている。糖尿病では腸管の脂質吸収が亢進しており、食事由来成分である酸化ステロールが糖尿病性心筋症を進展させる可能性を着想し、糖尿病マウスモデルを用いて検討した。本モデルでは心機能に有意な差を認めなかった一方で、少量の酸化ステロール長期摂取により、肝機能障害が惹起されることを見出し、そのメカニズムを解明した。脂肪肝炎もまた糖尿病の重要な予後規定因子であり、食事由来酸化ステロールが増悪因子となり得ることが示されたことで、新たな治療法の開発や栄養指導に対する重要なエビデンスにつながる研究であると言える。

研究成果の概要(英文)：We started this project with the hypothesis that long-term absorption of a small amount of dietary oxidized sterols (7-ketocholesterol (7KC)) may affect the development of diabetic cardiomyopathy. We have prepared diets with and without 7KC and fed them to diabetic ob/ob and db/db mice. The mice fed diet with 7KC showed no significant difference in heart weight or cardiac function, compared to those fed with normal diet. On the other hand, we found that addition of 7KC in chow diet or western type diet showed elevated serum ALT levels and accelerated hepatic neutral lipid accumulation and macrophages infiltration. RNA sequence analysis demonstrated that 7KC reduced expression of genes which related to autophagy process as well as beta-oxidation. We demonstrated that a small amount of dietary 7KC contributed to accelerate hepatic steatosis and inflammation in obese diabetic mice models.

研究分野：心筋症や脂肪肝炎における脂質代謝の役割

キーワード：糖尿病性心筋症 脂肪肝炎 酸化ステロール ミトコンドリア機能障害 心不全

## 1. 研究開始当初の背景

糖尿病と心不全は密接な関係があることが知られており、糖尿病患者の心不全発症率は非糖尿病患者に比べて有意に高く、また生命予後も有意に不良であることが国内外で広く報告されている。糖尿病性心筋症は糖尿病性心不全の前段階と考えられ、心筋肥大や拡張機能不全を特徴とする。糖尿病性心筋症の段階で、増悪因子の測定や画像での診断を行い、早期介入できれば、糖尿病性心不全への進展を阻止できる可能性がある。一方、最近 2 型糖尿病患者に対して実施された EMPA-REG OUTCOME 試験・CANVAS 試験において、sodium/glucose cotransporter2 (SGLT-2)阻害薬は一次評価項目である主要心血管イベント (MACE) の抑制に加え、心不全による入院を減少させた。心不全を抑制したメカニズムとして、利尿仮説 ケトン体利用仮説 ナトリウムポンプ仮説が想定されている (Cardiovasc Res. 2018; 114: 12-18)。しかし、糖尿病性心筋症において何が増悪因子か、どの病態を改善すれば糖尿病性心筋症への進展を阻止できるのか、詳細な分子機構は明らかでない。

## 2. 研究の目的

糖尿病の病態は、遺伝要因だけでなく環境要因に大きく影響される。そのうち食事由来の成分が糖尿病性心筋症の進展に寄与する因子になり得るとの仮説を立てた。糖尿病では腸管の脂質吸収が亢進していることから、申請者は食事に含まれる酸化ステロールが糖尿病性心筋症を進展させる可能性を着想した。酸化ステロールには、体内で内因性に合成されるものと、食事中的コレステロールの自然酸化や電子レンジ加熱により生成される外因性のものがある。外因性の酸化ステロールのトランスポーターは一部の組織でのみ発現しているが、心筋細胞には発現しておらず、一度取り込まれると徐々に蓄積する。腸管の脂質吸収が亢進する糖尿病患者では血清中の酸化ステロール濃度は有意に高いことが近年報告されており (J Endocrinol Invest. 2018)、食事に含まれる酸化ステロールが心筋細胞内に蓄積することで糖尿病性心筋症の進展に寄与すると仮説を立てた。糖尿病性心筋症の増悪因子として酸化ステロールが関与している可能性について、動物モデルを用いて検討し、病態進展における酸化ステロール蓄積の役割を明らかにすることを目的として、本研究を開始した。

## 3. 研究の方法

(1)通常食 (CD、1%コレステロール含有) または高脂肪食 (WD、1%コレステロール含有) と、さらにそのいずれかに 0.01% (w/w) 7-ketocholesterol (7KC) を添加した餌 (CD+7KC、WD + 7KC) を作成し、糖尿病モデルマウスである ob/ob マウスおよび db/db マウス (6 週齢オス) に 4 週間投与する。

(2)心臓超音波検査、心重量測定、心筋組織サンプリング、組織像の観察を行う。

(3)血清 ALT 値測定、肝重量測定、肝臓組織サンプリング、組織像の観察を行う。

#### 4 . 研究成果

(1) ob/ob マウス (6 週齢オス) に CD、CD+7KC、WD、WD+7KC を 4 週間食餌させたところ、心臓超音波検査にて 4 群間に有意な心機能低下の差を認めなかった。また体重、肺重量、心重量についても有意な差を認めなかった。肝重量も 4 群間で有意な差を認めなかったが、血清 ALT 値、血清 TNF- $\alpha$  値については CD 投与群と WD 投与群、CD+7KC 投与群と WD+7KC 投与群で有意な差 (上昇) を認めた。

(2) 肝組織について更なる解析を進めたところ、肝組織の Oil Red O 染色にて、CD 投与群、WD 投与群に比し、CD+7KC 投与群、WD + 7KC 投与群において脂肪滴の蓄積が有意に促進され、脂質抽出分析から肝組織中のトリグリセリド量が有意に増加していることが明らかとなった。また F4/80 染色では、CD 投与群、WD 投与群ともに 7KC の添加により、マクロファージの浸潤が増加していた。

(3) 肝組織での RNA sequence analysis を行ったところ、WD+7KC 投与群は WD 投与群に比し、cell adhesion molecules、cytokine receptor interaction、Ras signaling pathway、NF-kappa B signaling pathway 等、多くの pathway に関連する遺伝子発現が亢進していた一方で、 $\beta$  酸化に関連する遺伝子発現は低下していた。定量 PCR では、WD+7KC 投与群では *Il-6* の発現が亢進しており、更に興味深いことに、ミトコンドリア機能に関連する *Cpt1a* の発現が低下していた。

さらに、RNA sequence analysis にて、WD+7KC 投与群においてオートファジー関連蛋白の遺伝子発現が低下しており、Western Blotting により LC3-II の蛋白発現レベルも同様に低下していることが明らかとなった。

(4) さらに db/db マウスモデルにおいても同様の実験を行った。WD+7KC 投与群では WD 投与群に比し、肝組織での脂肪滴や F4/80 陽性細胞浸潤の増加といった所見を認め、ob/ob マウスでの検討と同様に、db/db マウスでも 7KC が脂肪肝を増悪させることを確認した。

(5) 以上の検討から、少量の 7KC の長期摂取が、肥満糖尿病マウスモデルにおいて脂肪肝・脂肪肝を増悪させることとそのメカニズムが明らかとなった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Okada Takeshi, Sumida Mizuki, Ohama Tohru, Katayama Yuki, Saga Ayami, Inui Hiroyasu, Kanno Kotaro, Masuda Daisaku, Koseki Masahiro, Nishida Makoto, Sakata Yasushi, Yamashita Shizuya	4. 巻 -
2. 論文標題 Development and Clinical Application of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Oxidized High-Density Lipoprotein	5. 発行年 2020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.56887	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 Yamashita Shizuya, Okazaki Mitsuyo, Okada Takeshi, Masuda Daisaku, Yokote Koutaro, Arai Hidenori, Araki Eiichi, Ishibashi Shun	4. 巻 -
2. 論文標題 Distinct Differences in Lipoprotein Particle Number Evaluation between GP-HPLC and NMR: Analysis in Dyslipidemic Patients Administered a Selective PPAR Modulator, Pemafibrate	5. 発行年 2021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.60764	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 Nishikawa Ryo, Furuhashi Masato, Horii Mika, Ogura Masatsune, Harada-Shiba Mariko, Okada Takeshi, Koseki Masahiro, Kujiraoka Takeshi, Hattori Hiroaki, Ito Ryosuke, Muranaka Atsuko, Kokubu Nobuaki, Miura Tetsuji	4. 巻 -
2. 論文標題 A Resuscitated Case of Acute Myocardial Infarction with both Familial Hypercholesterolemia Phenotype Caused by Possibly Oligogenic Variants of the PCSK9 and ABCG5 Genes and Type I CD36 Deficiency	5. 発行年 2021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.58909	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 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 -
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 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 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 -
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 -

〔学会発表〕 計16件(うち招待講演 1件/うち国際学会 6件)

1. 発表者名 岡田健志、小関正博、井手盛子、齋藤茂芳、常久洋、冠野昂太郎、乾洋勉、朱穎竝、大濱透、西田誠、山下静也、坂田泰史
2. 発表標題 食餌由来7-ketocholesterolが糖尿病モデルラットの左室の収縮能、拡張能に及ぼす影響の検討
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 Takeshi Okada, Masahiro Koseki, Makoto Nishida, Hiroyasu Inui, Kotaro Kanno, Ayami Saga, Tohru Ohama, Takeshi Kujiraoka, Hiroaki Hattori, Shizuya Yamashita, Yasushi Sakata
2. 発表標題 Targeted Exon Sequencing of Lipid-Related Genes in Patients with Familial Hypercholesterolemia
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 Takeshi Okada, Masahiro Koseki, Hiroyasu Inui, Kotaro Kanno, Jiuyang Chang, Yinghong Zhu, Ayami Saga, Masumi Asaji, Tohru Ohama, Makoto Nishida, Shizuya Yamashita, Yasushi Sakata
2. 発表標題 The Current Status of Achievement of Low-density Lipoprotein Cholesterol Management Targets in Familial Hypercholesterolemia Patients in Osaka University Hospital
3. 学会等名 第84回日本循環器学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岡田健志、小関正博、乾洋勉、田中克尚、常久洋、冠野昂太郎、嵯峨礼美、朱穎竝、朝治眞澄、倉田隼人、西田浩之、大濱透、西田誠、坂田泰史
2. 発表標題 ヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞を用いた劇症型心筋炎に対する新規治療法の開発
3. 学会等名 第20回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takeshi Okada, Masahiro Koseki, Makoto Nishida, Katsunao Tanaka, Hiroyasu Inui, Kotaro Kanno, Ayami Saga, Tohru Ohama, Takeshi Kujiraoka, Hiroaki Hattori, Shizuya Yamashita, Yasushi Sakata
2. 発表標題 Targeted Exon Sequencing Reveals Overlapping of Lipid-Related Gene Variants in Patients with Clinically Diagnosed Familial Hypercholesterolemia
3. 学会等名 第85回日本循環器学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takeshi Okada, Masahiro Koseki, Hiroyasu Inui, Kotaro Kanno, Ayami Saga, Tohru Ohama, Makoto Nishida, Shizuya Yamashita, Yasushi Sakata
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 Society (EAS) Congress 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takeshi Okada, Masahiro Koseki, Makoto Nishida, Katsunao Tanaka, Hiroyasu Inui, Kotaro Kanno, Ayami Saga, Tohru Ohama, Takeshi Kujiraoka, Hiroaki Hattori, Shizuya Yamashita, Yasushi Sakata
2. 発表標題 Targeted Exon Sequencing of Lipid-Related Genes in Patients with Clinically Diagnosed Familial Hypercholesterolemia
3. 学会等名 American Heart Association (AHA) 2020 Scientific Sessions (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岡田健志、小関正博、西田誠、尾松卓、田中克尚、乾洋勉、冠野昂太郎、嵯峨礼美、大濱透、山下静也、坂田泰史
2. 発表標題 40年以上通院加療中の家族性コレステロール血症ホモ接合体の一例
3. 学会等名 第53回日本動脈硬化学会総会・学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岡田健志、小関正博、加藤恒、富田興一、松井崇浩、田中克尚、乾洋勉、冠野昂太郎、大濱透、西田誠、石原光昭、鯨岡健、服部浩明、山下静也、坂田泰史
2. 発表標題 巨大血小板性血小板減少症と両側肘部黄色腫を契機に診断されたシトステロール血症の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 岡田健志、小関正博、西田誠、尾松卓、田中克尚、乾洋勉、冠野昂太郎、嵯峨礼美、大濱透、山下静也、坂田泰史
2. 発表標題 40年以上通院加療中の家族性コレステロール血症ホモ接合体の一例
3. 学会等名 第55回日本成人病（生活習慣病）学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岡田健志、小関正博、尾松卓、田中克尚、乾洋勉、冠野昂太郎、嵯峨礼美、大濱透、西田誠、石原光昭、鯨岡健、服部浩明、山下静也、坂田泰史
2. 発表標題 巨大血小板性血小板減少症と両側肘部黄色腫を機に診断されたシトステロール血症の1例
3. 学会等名 第55回日本成人病（生活習慣病）学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岡田健志、小関正博、西田誠、尾松卓、田中克尚、乾洋勉、冠野昂太郎、嵯峨礼美、大濱透、石原光昭、鯨岡健、服部浩明、増田大作、山下静也、坂田泰史
2. 発表標題 次世代シーケンサを用いた家族性高コレステロール血症患者の脂質関連36遺伝子変異解析
3. 学会等名 第55回日本成人病（生活習慣病）学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takeshi Okada, Masahiro Koseki, Hisashi Kato, Koichi Tomita, Katsunao Tanaka, Jiuyang Chang, Hiroyasu Inui, Kotaro Kanno, Ayami Saga, Tohru Ohama, Takeshi Kujiraoka, Hiroaki Hattori, Makoto Nishida, Shizuya Yamashita, Yasushi Sakata
2. 発表標題 A Case with Sitosterolemia Accompanied with Macrothrombocytopenia and Bilateral Elbow Tuberos Xanthomas
3. 学会等名 89th European Atherosclerosis Society CONGRESS 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takeshi Okada, Masahiro Koseki, Makoto Nishida, Takashi Omatsu, Katsunao Tanaka, Hiroyasu Inui, Jiuyang Chang, Kotaro Kanno, Ayami Saga, Tohru Ohama, Mitsuaki Ishihara, Takeshi Kujiraoka, Hiroaki Hattori, Daisaku Masuda, Shizuya Yamashita, Yasushi Sakata
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 The 19th International Symposium on Atherosclerosis (国際学会)
4. 発表年 2021年



1. 発表者名 Takeshi Okada, Masahiro Koseki, Hisashi Kato, Koichi Tomita, Takahiro Matsui, Katsunao Tanaka, Jiuyang Chang, Hiroyasu Inui, Kotaro Kanno, Ayami Saga, Tohru Ohama, Mitsuaki Ishihara, Takeshi Kujiraoka, Hiroaki Hattori, Makoto Nishida, Shizuya Yamashita, Yasushi Sakata
2. 発表標題 A Case with Sitosterolemia Accompanied with Macrothrombocytopenia and Bilateral Elbow Tuberos Xanthomas
3. 学会等名 The 19th International Symposium on Atherosclerosis (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takeshi Okada, Masahiro Koseki, Makoto Nishida, Takashi Omatsu, Katsunao Tanaka, Hiroyasu Inui, Jiuyang Chang, Kotaro Kanno, Ayami Saga, Tohru Ohama, Mitsuaki Ishihara, Takeshi Kujiraoka, Hiroaki Hattori, Daisaku Masuda, Shizuya Yamashita, Yasushi Sakata
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 American Heart Association 2021 Scientific Sessions (国際学会)
4. 発表年 2021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
---------	---------