

2019 年度

博 士 論 文

非アルコール性脂肪肝炎（NASH）治療薬創製を指向した
代謝異常合併 NASH モデルの確立と
NASH 病態進展に対する鉄過剰是正の効果に関する研究

Establishment of diet-induced models of non-alcoholic steatohepatitis (NASH)
and effect of dietary iron restriction on disease progression of NASH

田辺三菱製薬株式会社
創薬本部 フロンティア創薬ユニット

阿部 直道

目 次

原著論文	4
略 語	5
序 論	6
第一章	8
1.1 緒言	8
1.2 方法	12
1.2.1 使用動物	12
1.2.2 実験プロトコル	12
1.2.3 血漿中生化学パラメータ解析	15
1.2.4 肝病理解析	15
1.2.5 遺伝子発現解析	18
1.2.6 統計解析	18
1.3 結果	19
1.3.1 FFD 給餌は全ての系統において体重増加を引き起こす.	19
1.3.2 FFD 給餌 ob/ob マウスはヒト NASH に特徴的な代謝異常を示す	22
1.3.3 FFD 給餌による脂肪肝炎と線維化は ob/ob マウスにおいて顕著である.	32
小活	39
1.3.4 FFD 給餌 ob/ob マウスはヒト NASH の肝病理学的な特徴を示す	40
1.3.5 FFD 給餌 ob/ob マウスの NASH 病態関連遺伝子パスウェイは有意に変化する. .	43
1.3.6 FFD 給餌 ob/ob マウスでは, 早期から炎症及び線維化遺伝子発現が増加する.	46
1.4 考察	49
1.5 結論	54

第二章.....	55
2.1 緒言	55
2.2 方法	57
2.2.1 使用動物.....	57
1.2.2 実験プロトコール	57
1.2.3 血清及び肝臓中生化学パラメータ解析	60
1.2.4 肝病理解析	60
1.2.5 肝組織免疫染色.....	60
1.2.6 統計解析.....	61
2.3 結果	63
2.3.1 鉄制限食は CDAA ラット血清鉄と血清 ALT 活性を低下させる.	63
2.3.2 鉄制限食は CDAA ラットの肝臓中鉄含量と血清中フェリチン濃度を低下させる. .	65
2.3.3 鉄制限食は CDAA ラットの NAFLD activity score に影響を及ぼさない.	67
2.3.4 鉄制限食は CDAA ラットの肝臓中 8-OHdG 陽性細胞数を低下させる.	69
2.3.5 鉄制限食は CDAA ラットの肝臓中 CD68 陽性マクロファージ面積を低下させる. 71	
2.3.6 鉄制限食は CDAA ラット肝臓中 Sirius Red 陽性面積を有意に低下させる.	73
2.4 考察	75
2.5 結論	78
総括.....	79
参考文献	81
謝辞.....	93

原著論文

本学位論文は、以下の原著論文に基づき作成されたものである。

第一章

Longitudinal characterization of diet-induced genetic murine models of non-alcoholic steatohepatitis with metabolic, histological, and transcriptomic hallmarks of human patients.

Naomichi Abe, Sayuka Kato, Takuma Tsuchida, Kanami Sugimoto, Ryuta Saito, Lars Verschuren, Robert Kleemann, and Kozo Oka

Biology Open. 2019 May 1;8(5). pii: bio041251. doi: 10.1242/bio.041251.

第二章

Dietary iron restriction leads to a reduction in hepatic fibrosis in a rat model of nonalcoholic steatohepatitis

Naomichi Abe, Takuma Tsuchida, Shin-ichiro Yasuda, and Kozo Oka

Biology Open. 2019 May 16;8(5). pii: bio040519. doi: 10.1242/bio.040519.

略 語

NAFLD ; non-alcoholic fatty liver disease

NAFL ; non-alcoholic fatty liver

NASH ; non-alcoholic steatohepatitis

BMI ; Body mass index

VLDL ; Very-low density lipoprotein

MCD ; Methionine choline deficient diet

CDAHFD ; choline-deficient, L-amino acid-defined, high-fat diet

FFD ; fast food diet ; high-fat, high-fructose and high-cholesterol diet

NCD ; normal chow diet

ALT ; alanine aminotransferase

hCLS ; hepatic crown-like structures

NAS ; NAFLD activity score

ROS ; reactive oxygen species

CDAA ; choline-deficient L-amino acid-defined diet

CSAA ; choline-sufficient amino acid-defined diet

DFO ; deferoxamine

DFX ; deferasirox

8-OHdG ; 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine

TAA ; thioacetamide

序 論

非アルコール性脂肪性肝疾患 (non-alcoholic fatty liver disease; NAFLD) は、組織診断或いは画像診断により脂肪肝を認め、アルコール性肝障害やウイルス性肝炎等の他の肝疾患を除外した病態である。肥満、糖尿病、高血圧及び脂質異常症を基盤に発症することが多く、メタボリックシンドロームの患者数増加に伴い、全世界的に急増している (Angulo, 2002; Sanyal, 2011; Saponaro et al., 2015)。NAFLD は非アルコール性脂肪肝 (non-alcoholic fatty liver; NAFL) と、肝組織に壊死・炎症や線維化を伴う非アルコール性脂肪肝炎 (non-alcoholic steatohepatitis; NASH) に分類される。NAFL は単純性脂肪肝とも呼ばれ、病態はほとんど進行しないのに対し、NASH は進行性であり、5～10 年で患者の 5～20%が肝硬変に移行する (Ascha et al., 2010; Sanyal et al., 2006; Yatsuji et al., 2009)。NASH は複合要因によるヘテロな病態であることが知られており、病態発症・進展メカニズムとして近年、“多重平行ヒットモデル (様々な要因が複合的に病態に寄与)” が提唱されている。要因の例として、インスリン抵抗性に伴う高インスリン血症や酸化ストレス、ミトコンドリア障害及び炎症性サイトカインの増加、肝星細胞の活性化等が挙げられ、これらを含めた複数の因子が同時多発的に病態進展に寄与していると考えられている (Tilg and Moschen, 2010)。

肝硬変や肝癌等による肝関連死を予防する上で、NASH を治療することの意義は非常に大きい。有効な治療法は未だ確立されていない (Filozof et al., 2015)。新薬開発を妨げている要因の一つは、化合物の有効性を評価するためのヒト病態を模した病態モデル動物が少ないことである。特に代謝的側面及び肝病理学的側面の両面で、ヒト NASH 病態を模倣するモデルは限られている (Santhekadur et al., 2018)。また、上述したように、NASH は複合要因によるヘテロな病態であることから、明確な治療効果につながる創薬標的を選定する難

易度が高い．実際に NASH に対する複数の開発品が臨床段階にあるものの、2019 年現在、治療薬として承認された医薬品はない．

著者は、第一章において、ヒト NASH の代謝的及び肝病理学的の両側面を模倣したマウス病態モデルの探索を目的として、正常及び 2 型糖尿病モデルマウスを用いた特殊飼料誘発 NASH モデルの長期解析を実施した．また、第二章においては、新規治療法の探索を目的として、ヒトで示唆されている NASH 病態における鉄過剰の寄与に着目し、ラット NASH モデルの病態進展に対する鉄制限食の抑制効果について検討した．

第一章

正常及び2型糖尿病モデルマウスを用いた 特殊飼料誘発 NASH モデルの長期解析

1.1 緒言

NASH の患者数は肥満や2型糖尿病といったメタボリックシンドロームの増加に伴い、劇的に増加している (Angulo, 2002; Sanyal, 2011; Saponaro et al., 2015). NASH は肝細胞癌とそれに伴う肝移植の要因となり、肝関連死を予防する上で、治療介入する意義は大きい (Ascha et al., 2010; Sanyal et al., 2006; Yatsuji et al., 2009). 近年、インスリン抵抗性、酸化ストレス、ミトコンドリア障害及び炎症といった様々な因子が NASH の脂肪肝炎と線維化の進展に寄与していることが明らかとなっていることから、“多重平行ヒットモデル”が NASH の病態進展メカニズムとして提唱されている (Tilg and Moschen, 2010).

肥満や2型糖尿病は明らかに NASH の病態進展と関連している. 約 44%の NASH 患者が2型糖尿病を合併し、約 82%の NASH 患者が肥満を合併している (Younossi et al., 2016). 肥満は NAFLD の発症と重篤度と明確に相関しており、BMI と NAFLD 進展リスクの増加との間に正の相関がある (Loomis et al., 2016). また、腹部脂肪量は NASH の病態進展との間に正の相関がある (Margariti et al., 2015). インスリン抵抗性は、単純性脂肪肝の患者と比較して、NASH 患者で多く認められることから、NASH の病態進展を加速する可能性 (Sanyal et al., 2001) や、高血糖と共に線維化進展に寄与する可能性が報告されている (Inoue et al., 1999; Paradis et al., 2001). さらに、糖尿病が NASH 患者の線維化の危険因子であることが報告されている (Hossain et al., 2009). これらの知見は、肥満、高インスリン血症及び糖尿病といった代謝異常が NASH 病態進展に対して重要な役割を演じていることを示唆している.

ヒト NASH の肝病理学的な特徴として、肝組織の脂肪化、炎症細胞の浸潤、風船様肝細胞（バルーン細胞）が認められることが知られている（Kleiner et al., 2005）。また、肝組織の中心静脈から線維化が認められ、次第に線維化の領域が拡大し、肝硬変に移行する（Ascha et al., 2010; Sanyal et al., 2006; Yatsuji et al., 2009）。近年では、脂肪化した肝細胞を取り囲む hepatic crown-like structures（hCLS）の形成が NASH に特徴的であることが報告されており（Itoh et al., 2013）、また大滴性の脂肪沈着（macrovesicular steatosis）、小滴性の脂肪沈着（microvesicular steatosis）、肝細胞の過形成（hypertrophy）及び炎症細胞の凝集所見（inflammatory cell aggregates）も認められる（Liang et al., 2014）

現在、NASH 治療薬として承認された医薬品はない（Filozof et al., 2015）。治療薬開発を妨げる一つの要因として、代謝的及び肝病理学的の両側面で、ヒト NASH 病態を模倣したモデルがない点を挙げることができる（Santhekadur et al., 2018）。NASH 治療薬創製における候補化合物の有効性評価に用いる NASH モデルは、主に特殊飼料の給餌により作製される。肝臓における Very-low density lipoproteins（VLDL）産生障害に基づく肝病理学的な脂肪肝、炎症及び重度の肝線維化を呈するメチオニン・コリン欠乏（MCD）食給餌モデルは NASH の研究において汎用されており、特に肝線維化を標的とする候補化合物の評価には有用である（Kajikawa et al., 2011）。しかしながら、MCD 食給餌モデルは、一般状態悪化に伴い、重度の体重低下と低インスリン血症を引き起こすことから、ヒト NASH 患者の代謝異常を模倣しているとは言えない（Pickens et al., 2009）。MCD 食給餌モデルで認められる重度の体重低下は、代謝異常を標的とする化合物の有効性評価には適していないと思われる。近年、MCD 食のアミノ酸組成と脂肪含量を改変した choline-deficient, L-amino acid-defined, high-fat diet（CDAHFD）食を給餌した C57BL6 マウスでは、肝線維化進展が早期に認められ、化合物の有効性評価のためのモデルとして期待されるが、肥満を呈さない点でヒトの NASH 病態を模倣しているとは言えない（Matsumoto et al., 2013）。

一方、他の特殊飼料給餌モデルとして、**high-fat, high-fructose and high-cholesterol diet** (**fast food diet; FFD**) の給餌が **C57BL/6** マウスの脂肪肝炎を惹起させ、同時に高インスリン血症、高血糖及び肥満を引き起こすことが報告されている (Charlton et al., 2011). しかしながら、病態進展が緩やかであり、24 週間の **FFD** 給餌でも肝病理学的な重度の脂肪肝炎と線維化まで進展しないことから、化合物の有効性評価に長期間を要するという問題がある。

著者は、上述した特殊飼料給餌モデルで生じる諸問題を解決するために、肥満、高インスリン血症及び糖尿病を呈するマウス系統 (肥満・2 型糖尿病モデルマウス) は、**NASH** モデル作製する上で有用であると考えた。**ob/ob** マウスは、レプチンを欠損し、過食による肥満と高インスリン血症を呈することが知られている。**KK-A^y** マウスは、**KK/Ta** マウスに **yellow obese** 遺伝子 (**A^y allele**) を挿入したマウスであり、摂食中枢においてアグーチペプチドが摂食を負に制御するメラノコルチン 4 受容体 (**MC4R**) のアンタゴニストとして作用し、**ob/ob** マウスと同様に、過食、肥満及び高インスリン血症を呈することが知られている (Kennedy et al., 2010). しかしながら、これらの 2 型糖尿病モデルマウスは、**normal chow diet (NCD)** 給餌下では脂肪肝炎と線維化を引き起こさない (Larter and Yeh, 2008; Takahashi et al., 2012). 一方で、**ob/ob** マウスへの **high trans-fat, high-fructose, and high-cholesterol diet** の給餌は、肝線維化を引き起こすことから (Kristiansen et al., 2016; Trevaskis et al., 2012)、肥満、高インスリン血症及び糖尿病は特殊飼料により誘発される脂肪肝炎と線維化進展を悪化させることが示唆されているが、特殊飼料給餌 2 型糖尿病モデルマウスの病態進展について、飼料給餌早期から長期的に解析した研究はない。

そこで著者は、ヒト **NASH** の代謝的特徴及び肝病理学的特徴を複合的に模倣したマウス病態モデルの探索を目的として、3 系統のマウス (**C57BL/6J**, **ob/ob** 及び **KK-A^y** マウス) に対して、**NCD**, **CDAHFD** 及び **FFD** を最大 30 週間給餌

し、代謝及び病理学的パラメータの測定により NASH 病態進展を解析することとした.

1.2 方法

1.2.1 使用動物

日本エスエルシー (Tokyo, Japan) より 5 週齢の雄性 C57BL/6J 及び C57BL/6J Ham Slc-ob/ob マウスを購入し、実験に供した。また、日本クレア (Tokyo, Japan) より 5 週齢の雄性 KK-A^y/TaJcl マウスを購入し、実験に供した。すべてのマウスは 12 時間の明暗周期で飼育した。室温は $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 、湿度は $50 \pm 20\%$ となるように制御した。本実験は、プロトコールが株式会社新薬リサーチセンターの動物実験委員会により承認されたのちに実施した。

1.2.2 実験プロトコール

1 週間の順化飼育後、それぞれのマウス系統 (6 週齢) に対して、3 種類の飼料の給餌を開始した。飼料は、normal chow diet (NCD, CRF1, Oriental, Tokyo, Japan), high-fat (62 kcal %), choline-deficient and 0.1% methionine diet (CDAHFD, A06071302, Research Diet, NJ, USA) (Matsumoto et al., 2013) 及び high-fat (41 kcal %), high-fructose (30 kcal %) and high-cholesterol (2% w/w) diet (FFD, D12042201, Research Diet, USA) (Charlton et al., 2011) を用いた。Table 1.及び 2 にはそれぞれ CDAHFD (A06071302) 及び FFD (D12042201) の特殊飼料の組成を示した。これらの飼料を、2, 4, 8, 12, 18, 24 及び 30 週間給餌し、期間中は体重と摂餌量を測定した。それぞれの時点において動物をペントバルビター麻酔下 (50 mg/kg, i.p.) で開腹後、腹部大静脈から採血し安楽死とした。各種パラメータ解析のため、肝臓と血漿を採取した。

Table 1. CDAHFD (A06071302)



A06071302 and A06071314

Formulated by:
Research Diets, Inc.

**L-Amino Acid Rodent Diet With 60 kcal% Fat and 0.1% Methionine
or 10 kcal% Fat Diet With Normal Choline and Methionine**

Product #	A06071302	A06071314
Ingredient	gm	gm
Casein, 80 Mesh	0	0
L-Cystine	4.2	4.2
L-Isoleucine	7.6	7.6
L-Leucine	15.8	15.8
L-Lysine	13.2	13.2
L-Methionine	0.8	5.1
L-Phenylalanine	8.4	8.4
L-Threonine	7.2	7.2
L-Tryptophan	2.1	2.1
L-Valine	9.3	9.3
L-Histidine	4.6	4.6
L-Alanine	5.1	5.1
L-Arginine	6.0	6.0
L-Aspartic Acid	12.1	12.1
L-Glutamic Acid	38.2	38.2
Glycine	3.0	3.0
L-Proline	17.8	17.8
L-Serine	10.0	10.0
L-Tyrosine	9.2	9.2
Corn Starch	0	502
Maltodextrin 10	130.1	130.1
Sucrose	68.8	68.8
Cellulose, BW200	50	50
Soybean Oil	25	25
Lard	245	20
Mineral Mix S10026	10	10
DiCalcium Phosphate	13	13
Calcium Carbonate	5.5	5.5
Potassium Citrate, 1 H ₂ O	16.5	16.5
Sodium BiCarbonate	7.5	7.5
Vitamin Mix V10001	10	10
Choline Bitartrate	0	2
FD&C Yellow Dye #5	0	0.04
FD&C Red Dye #40	0.025	0
FD&C Blue Dye #1	0.025	0.01
Total	756.05	1039.35
	A06071302	A06071314
gm		
Protein	174.6	178.9
Carbohydrate	198.9	700.9
Fat	270.0	45.0
Fiber	50.0	50.0
gm%		
Protein	23.1	17.2
Carbohydrate	26.3	67.4
Fat	35.7	4.3
Fiber	6.6	4.8
kcal		
Protein	698	716
Carbohydrate	796	2804
Fat	2430	405
Total	3924	3924
kcal%		
Protein	18	18
Carbohydrate	20	71
Fat	62	10
Total	100	100
kcal / gm	5.2	3.8

Research Diets, Inc.
20 Jules Lane
New Brunswick, NJ 08901 USA
info@researchdiets.com

A06071314.for



Table 2. FFD (D12042201)



D12042201

High-Fat Diet (Butter Fat) With Fructose and 2% Cholesterol

Product #	D12042201	
	gm%	kcal%
Protein	18	14
Carbohydrate	49	44
Fat	20	41
Total		100
kcal/gm	4.4	
Ingredient	gm	kcal
Casein	200	620
DL-Methionine	3	12
Corn Starch	50	200
Maltodextrin 10	125	500
Fructose	301	1204
Cellulose, BW200	50	0
Milk Fat, Anhydrous	200	1800
Corn Oil	0	0
Ethoxyquin	0.04	0
Mineral Mix S10001	35	0
Calcium Carbonate	4	0
Vitamin Mix V10001	10	40
Choline Bitartrate	2	0
Cholesterol	20	0
FD&C Yellow Dye #5	0	0
FD&C Red Dye #40	0.05	0
FD&C Blue Dye #1	0	0
Total	1000.09	4376

Based on formula published in Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2011 Nov;301(5):G825-34

Research Diets, Inc.
20 Jules Ln
New Brunswick, NJ 08901
info@researchdiets.com

D12042201.for



1.2.3 血漿中生化学パラメータ解析

血漿中 alanine aminotransferase (ALT) 活性及び血漿中グルコース濃度は auto analyzer HITACHI 7070 (HITACHI, Tokyo, Japan) を用いて測定した。血漿中インスリン濃度は、マウスインスリン定量 ELISA キット (Morinaga, Tokyo, Japan) を用いて測定した。血漿中フェリチン濃度は、マウスフェリチン定量 ELISA キット (GenWay Biotech Inc., CA, USA) を用いて測定した。肝臓中トリグリセライド含量及び肝臓中総コレステロール濃度はテスト・ワコー (Wako, Tokyo, Japan) を用いて測定した。すべての測定はキットの手順書に従い実施した。

1.2.4 肝病理解析

肝病理解析に用いる肝臓は外側左葉から切り出した。切り出した肝臓は 10% ホルマリンで固定し、パラフィン包埋し、ミクロトーム (RM2255, Leica microsystems, Wetzlar, Germany) を用いて 4 μ m の組織切片を作成した。NAFLD activity scores (NAS) (Brunt et al., 2011) 及び Sirius Red 陽性面積評価のため、各組織切片をそれぞれ hematoxylin and eosin (HE) 及び Sirius Red により染色した。NAFLD activity score の具体的な手法について、評価例と共に、Fig. 1 に示した。Kleiner et al., 2005 に従い、肝組織を HE 染色した際に認められる組織中の脂肪化の割合、炎症細胞の浸潤箇所、風船様肝細胞 (バルーニング細胞) の数を Fig. 1 に示す一定のクライテリアでスコア化した。スコアの合計が、0-2 が Non-NASH, 3-4 が境界、5-8 が NASH と判定した。Sirius Red 陽性面積は ImageJ software (National Institute of Health, MD, USA) により定量した。

FFD 給餌 ob/ob マウスの肝病理組織学的な macrovesicular steatosis, microvesicular steatosis, hypertrophy 及び inflammatory cell aggregates については、既報のスコアリング方法を用いて評価した (Liang et al., 2014)。Fig. 2 には macrovesicular steatosis, microvesicular steatosis, hypertrophy 及び inflammatory cell aggregates の所見例を示した。

肝病理組織学的な hepatic crown-like structures (hCLS) の形成を評価するため、免疫組織学的な解析を実施した。Fig. 3 には、hCLS の所見例を示しており、hCLS は脂肪化した肝細胞をマクロファージが取り囲むように形成する (Itoh et al., 2013)。hCLS の免疫染色では、一次抗体として anti-F4/80 antibody (T-2028, BMA Biomedicals, Augst, Switzerland) を、二次抗体として goat anti-rat immunoglobulin G (62-9520, Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA) を用いた。

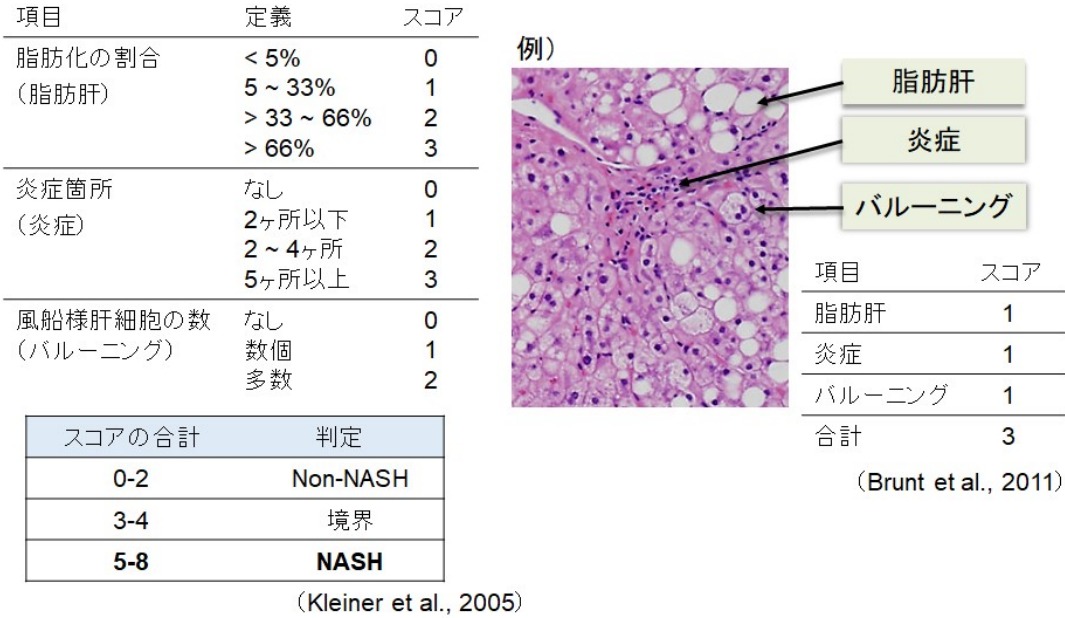


Fig. 1. NAFLD activity score (Kleiner et al., 2005 及び Brunt et al., 2011 より引用)

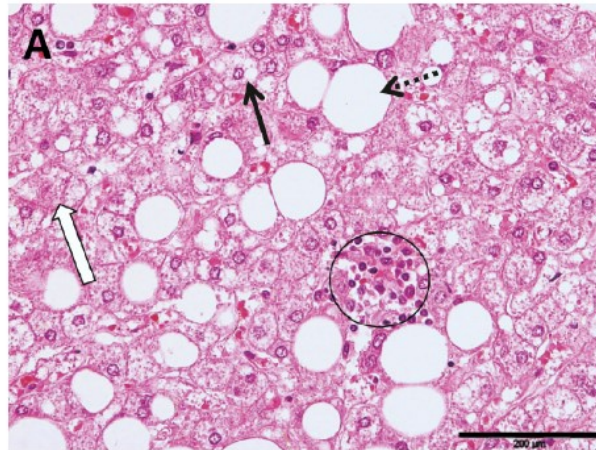


Fig. 2. Steatosis, hypertrophy and inflammation (Liang et al., 2014 より引用)

Macrovesicular steatosis (dotted line arrow), microvesicular steatosis (bold arrow), hypertrophy (open arrow), inflammatory cell aggregates (within circles).

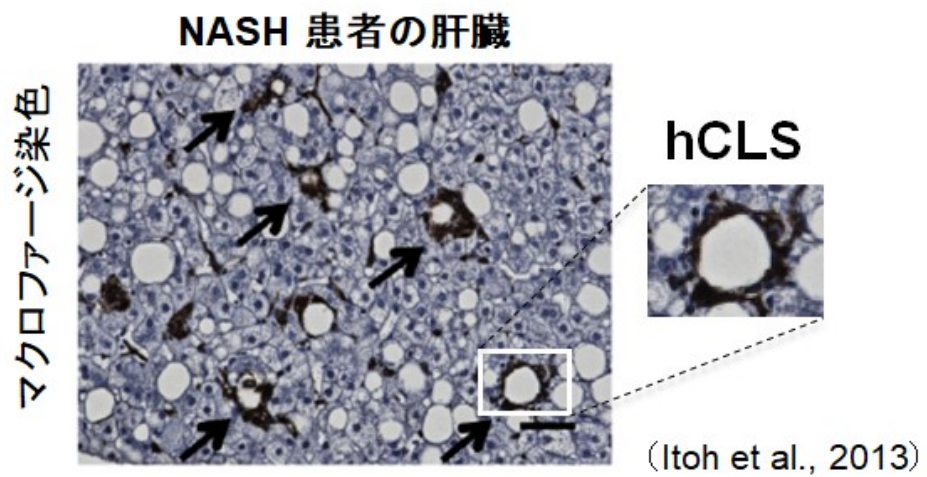


Fig. 3. Hepatic crown-like structures (Itoh et al., 2013 より引用)

1.2.5 遺伝子発現解析

NCD 給餌 ob/ob マウス及び FFD 給餌 ob/ob マウスの肝臓から Ambion RNAqueous total RNA isolation kit (Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA) を用いて Total RNA を抽出した。RNA 濃度は Nanodrop 1000 (Isogen Life Science, De Meern, the Netherlands) を用いて定量し、RNA 品質は 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Amstelveen, the Netherlands) を用いて評価した。Strand-specific mRNA-seq ライブラリーは GenomeScan (Leiden, the Netherlands) により作製した。その後、Illumina HiSeq 2500 の single-read 75-cycle sequencing protocol を用いて、1 サンプル当たり 15 万リードによる RNA シーケンス解析を実施した。遺伝子発現量としての Reads per kilobase of exon per million mapped reads (RPKM 値) は既報に基づき算出した (Mortazavi et al., 2008)。NCD 給餌群と FFD 給餌群との間の発現変動遺伝子 (Differentially expressed genes, DEGs) は、DEseq-method により解析した。遺伝子発現パスウェイ解析は、Ingenuity Pathway Analysis (IPA) suite (www.ingenuity.com, accessed 2016) のソフトウェアを用いて実施した。

1.2.6 統計解析

実験結果は、平均値 \pm SEM で示した。群間の比較は、EXSUS ver. 8.1 (CAC Croit Corporation) を用いて解析した。3 群間の比較は、分散分析 (ANOVA) を行った後、Tukey の多重比較により解析した。2 群間の比較は、Student's t-test により解析した。 p 値が 0.05 未満であった場合、統計学的に有意差があると判断した。遺伝子発現解析における DEseq を用いた統計解析は既報に基づき実施した (Anders et al., 2013)。

1.3 結果

1.3.1 FFD 給餌は全ての系統において体重増加を引き起こす.

NCD, CDAHFD 及び FFD の給餌が 3 系統のマウス (C57BL/6J, ob/ob 及び KK-A^y マウス) の体重及び摂餌量に及ぼす影響を明らかにするため, 経週の体重及び摂餌量を測定した.

特殊飼料の給餌を開始した 6 週齢時における ob/ob 及び KK-A^y マウスの体重は, C57BL/6J マウスの体重と比較して高値であった。FFD 給餌 C57BL/6J, ob/ob 及び KK-A^y マウスは, NCD を給餌したものと比較して体重増加の程度は大きかった. (Fig. 4A–C). CDAHFD を給餌した ob/ob 及び KK-A^y マウスは体重増加を示したが, CDAHFD 給餌 C57BL/6J マウスは NCD 給餌 C57BL/6J マウスと比較して体重が低値だった.

ob/ob 及び KK-A^y マウスの摂餌量は C57BL/6J マウスと比較して多かった (Fig. 5A–C). FFD 及び CDAHFD 給餌は, NCD 給餌と比較して, ob/ob 及び KK-A^y マウスの摂餌量を低下させた (Fig. 5A–C).

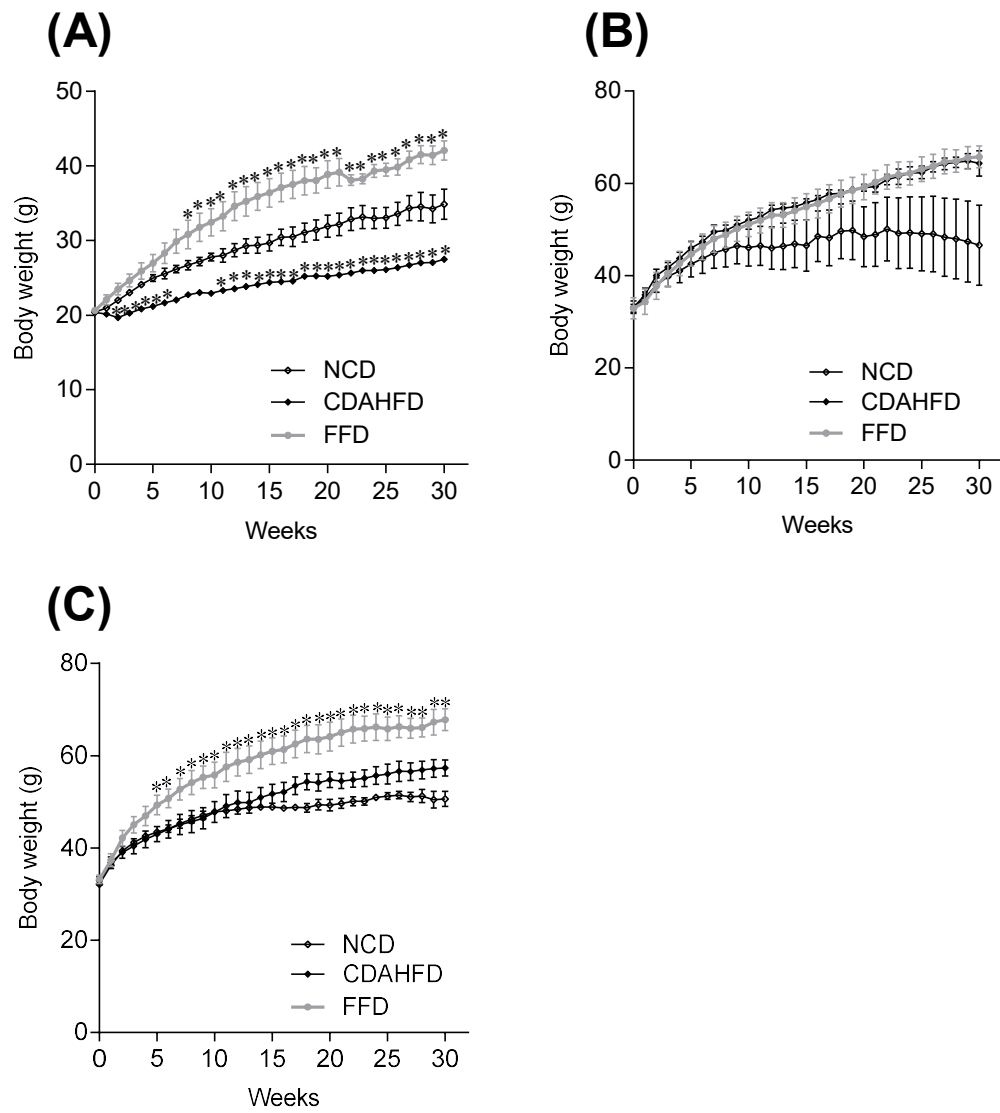


Fig. 4. Body weight changes in C57BL/6J, ob/ob, and KK-A^y mice under NCD, FFD, or CDAHFD regimes for 30 weeks. (A) C57BL/6J, (B) ob/ob, and (C) KK-A^y mice. Values are mean \pm SEM, n = 5. * p < 0.05 vs. NCD (One-way ANOVA with post-hoc Tukey's test).

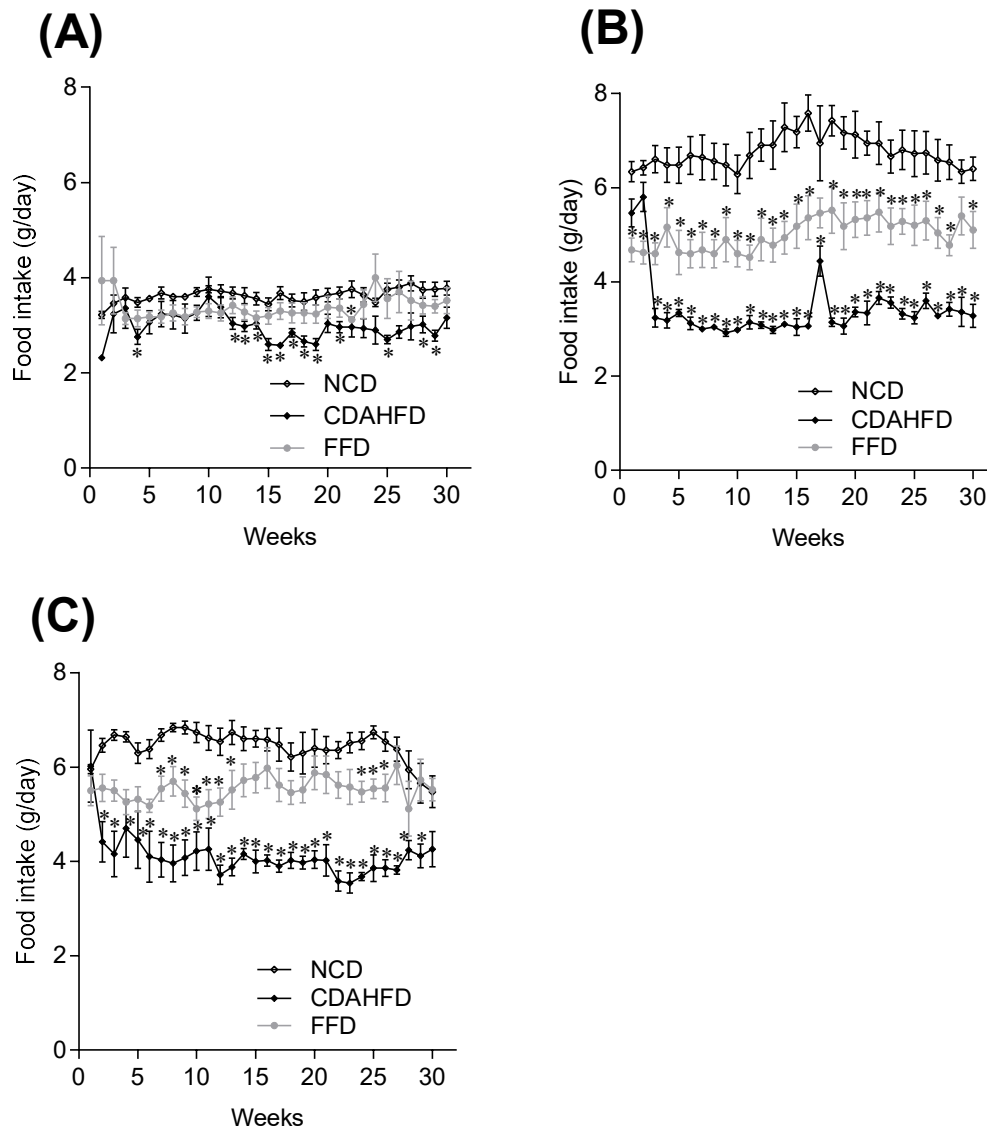


Fig. 5. Food intake changes in C57BL/6J, ob/ob, and KK-A^y mice under NCD, FFD, or CDAHFD regimes for 30 weeks. (A) C57BL/6J, (B) ob/ob, and (C) KK-Ay mice. Values are mean \pm SEM, $n = 5$. * $p < 0.05$ vs. NCD (One-way ANOVA with post-hoc Tukey's test).

1.3.2 FFD 給餌 ob/ob マウスはヒト NASH に特徴的な代謝異常を示す

NCD, CDAHFD 及び FFD の給餌が, 3 系統のマウス (C57BL/6J, ob/ob 及び KK-A^y マウス) の血漿中及び肝臓中の代謝パラメータに及ぼす影響を明らかにするため, 血漿中インスリン濃度, 血漿中 ALT 活性, 肝臓中総コレステロール濃度, 血漿中グルコース濃度, 血漿中フェリチン濃度, 血漿中コレステロール濃度及び肝臓中トリグリセライド含量を経週の測定した.

特殊飼料の給餌を開始時において, ob/ob 及び KK-A^y マウスの血漿中インスリン濃度は, C57BL/6J マウスの血漿中インスリン濃度と比較して高く, すでに高インスリン血症を呈していた. 飼料給餌 12 週及び 18 週時点において, NCD 給餌と比較して FFD 給餌は C57BL/6J マウスの血漿中インスリン濃度を有意に増加させた (Fig. 6A). FFD 給餌は ob/ob 及び KK-A^y マウスの高い血漿中インスリン濃度を維持した (Fig. 3B, C). 対照的に, CDAHFD 給餌は, C57BL/6J 及び KK-A^y マウスの血漿中インスリン濃度を低下させたが, ob/ob マウスの高い血漿中インスリン濃度を維持した (Fig. 6A–C).

ob/ob マウスにおける血漿中 ALT 活性は C57BL/6J マウスと比較して高値を示した (Fig. 7A, B). CDAHFD 給餌 C57BL/6J 及び KK-A^y マウスの血漿中 ALT 活性は, 給餌 30 週間を通して, NCD 給餌と比較して有意に高値を示した (Fig. 7A, C). FFD 給餌 C57BL/6J 及び KK-A^y マウスの血漿中 ALT 活性は, 給餌 30 週時点において, NCD 給餌と比較して有意に高値を示した (Fig. 7A, C). 給餌 2 週及び 4 週の時点において, FFD 給餌及び CDAHFD 給餌は, ob/ob マウスの血漿中 ALT 活性を有意に増加させた (Fig. 7B).

FFD 給餌及び CDAHFD 給餌は, 全ての系統の肝臓中総コレステロール濃度を有意に増加させた (Fig. 8A–C).

CDAHFD 給餌により, 全ての系統の血漿中グルコース濃度は NCD 給餌と比較して有意に低値を示した (Fig. 9A–C). 飼料給餌 4, 8 及び 12 週時点において, FFD 給餌は C57BL/6J マウスの血漿中グルコース濃度を有意に増加させた (Fig.

9A). FFD 給餌により, ob/ob マウスの血漿中グルコース濃度は有意に低下した (Fig. 9B). FFD 給餌 KK-A^y マウスの血漿中グルコース濃度は, 飼料給餌 2 週の時点において, NCD 給餌と比較して有意に高値を示した. しかしながら, 飼料給餌 12 週の時点において, FFD 給餌 KK-A^y マウスの血漿中グルコース濃度は, NCD 給餌と比較して有意に低値を示した (Fig. 9C).

飼料給餌 30 週時点において, CDAHFD 給餌は全ての系統の血漿中フェリチン濃度を有意に増加させた (Fig. 10A–C). C57BL/6J 及び ob/ob マウスにおいて, FFD 給餌は血漿中フェリチン濃度を変化させなかった (Fig. 10A, B). 飼料給餌 30 週時点において, FFD 給餌は KK-A^y マウスの血漿中フェリチン濃度を有意に増加させた (Fig. 10C).

C57BL/6J 及び ob/ob マウスにおいて, CDAHFD 給餌は血漿中トリグリセライド濃度を変化させなかった (Fig. 11A, B). 飼料給餌 2, 4 及び 30 週時点において, CDAHFD 給餌は, KK-A^y マウスの血漿中トリグリセライド濃度を有意に低下させた (Fig. 11C). FFD 給餌は, 飼料給餌 8 及び 30 週における C57BL/6J マウスの血漿中トリグリセライド濃度を有意に低下させた. さらに, FFD 給餌は, 飼料給餌 2 及び 12 週時点の KK-A^y マウスの血漿中トリグリセライド濃度を有意に低下させた (Fig. 11A, C). ob/ob マウスの血漿中トリグリセライド濃度は群間で有意差は認められなかった (Fig. 8B).

NCD 給餌と比較して, FFD 給餌は全ての系統の血漿中コレステロール濃度を増加させる傾向があった (Fig. 12A–C). 飼料給餌 2 及び 4 週時点の KK-A^y マウス及び C57BL/6J マウスの血漿中コレステロール濃度は, CDAHFD 給餌により有意に低値を示した (Fig. 12A, C).

すべての系統において, FFD と CDAHFD 給餌は肝臓中トリグリセライド含量を増加させる傾向があった (Fig. 13A–C).

以上の結果から, FFD 給餌 ob/ob マウスは, 重度な代謝異常を示すことが示された.

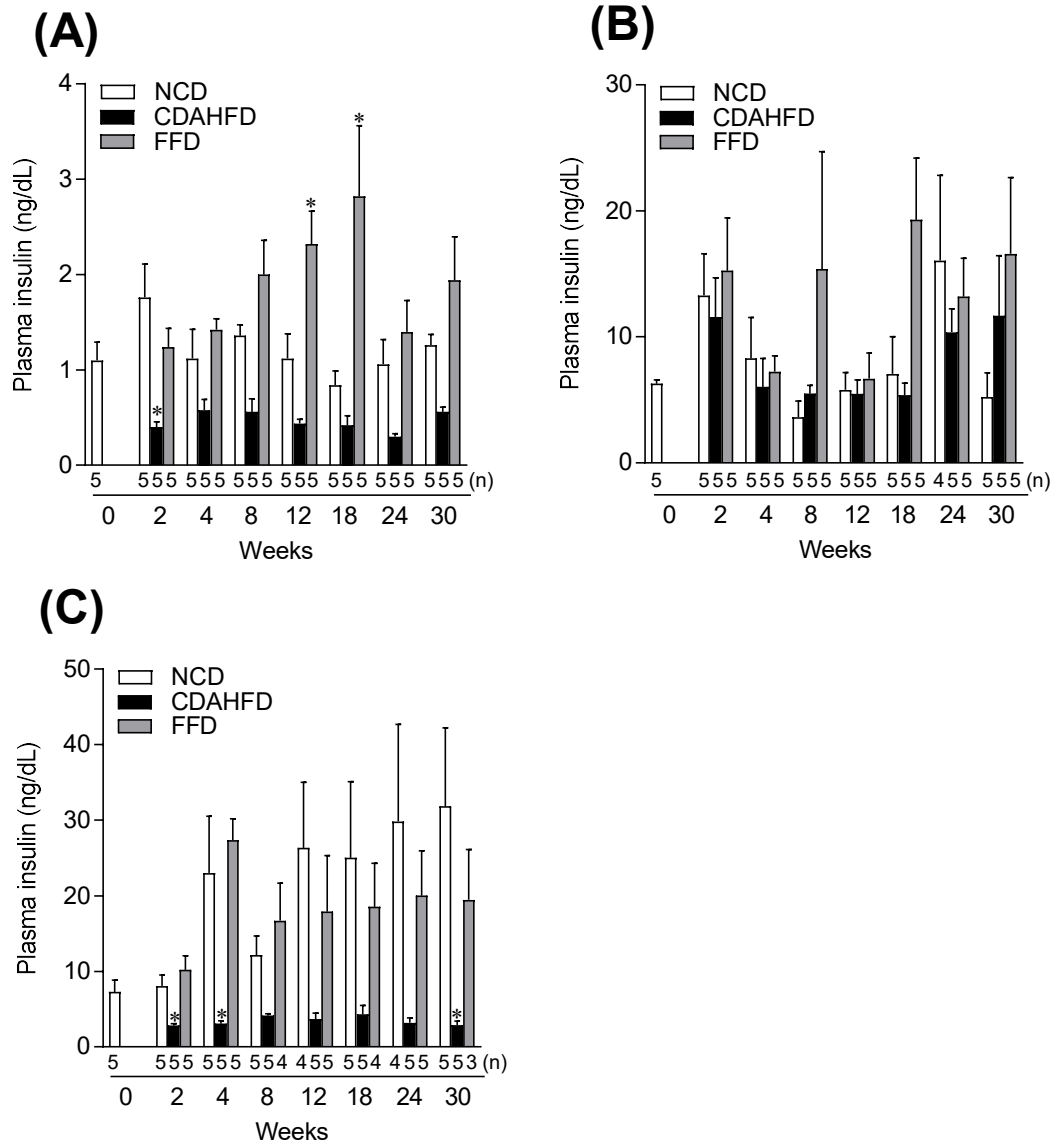


Fig. 6. Plasma insulin levels in C57BL/6J, ob/ob, and KK-A^y mice under NCD, FFD, or CDAHFD regimes for 2, 4, 8, 12, 18, 24, and 30 weeks. (A) C57BL/6J, (B) ob/ob, and (C) KK-Ay mice. Values are mean \pm SEM, $n = 3-5$ (the exact number of animals are shown in the figure). * $p < 0.05$ vs. NCD (One-way ANOVA with post-hoc Tukey's test).

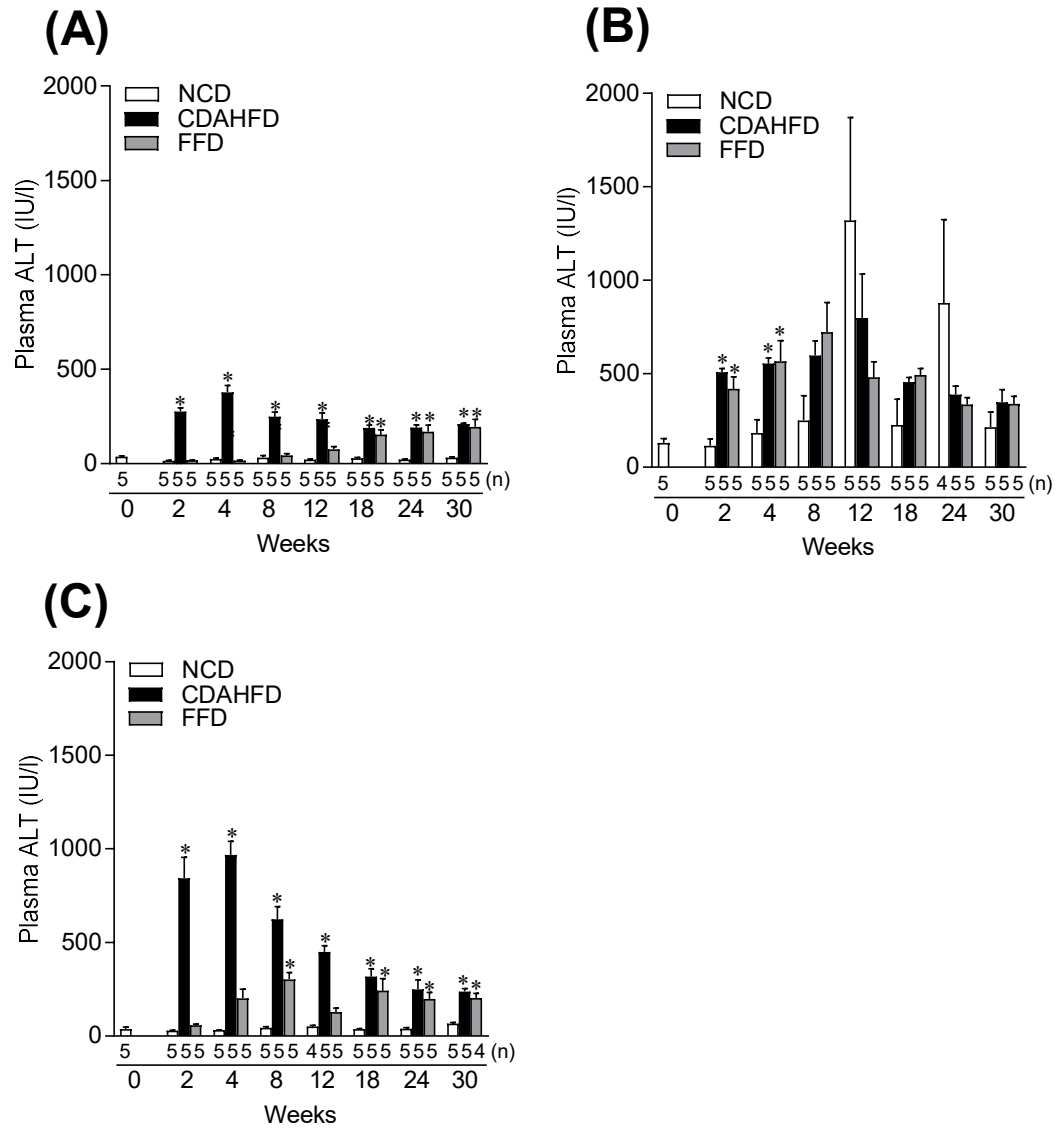


Fig. 7. Plasma ALT levels in C57BL/6J, ob/ob, and KK-A^y mice under NCD, FFD, or CDAHFD regimes for 2, 4, 8, 12, 18, 24, and 30 weeks. (A) C57BL/6J, (B) ob/ob, and (C) KK-A^y mice. Values are mean \pm SEM, n = 4–5 (the exact number of animals are shown in the figure). * p < 0.05 vs. NCD (One-way ANOVA with post-hoc Tukey's test).

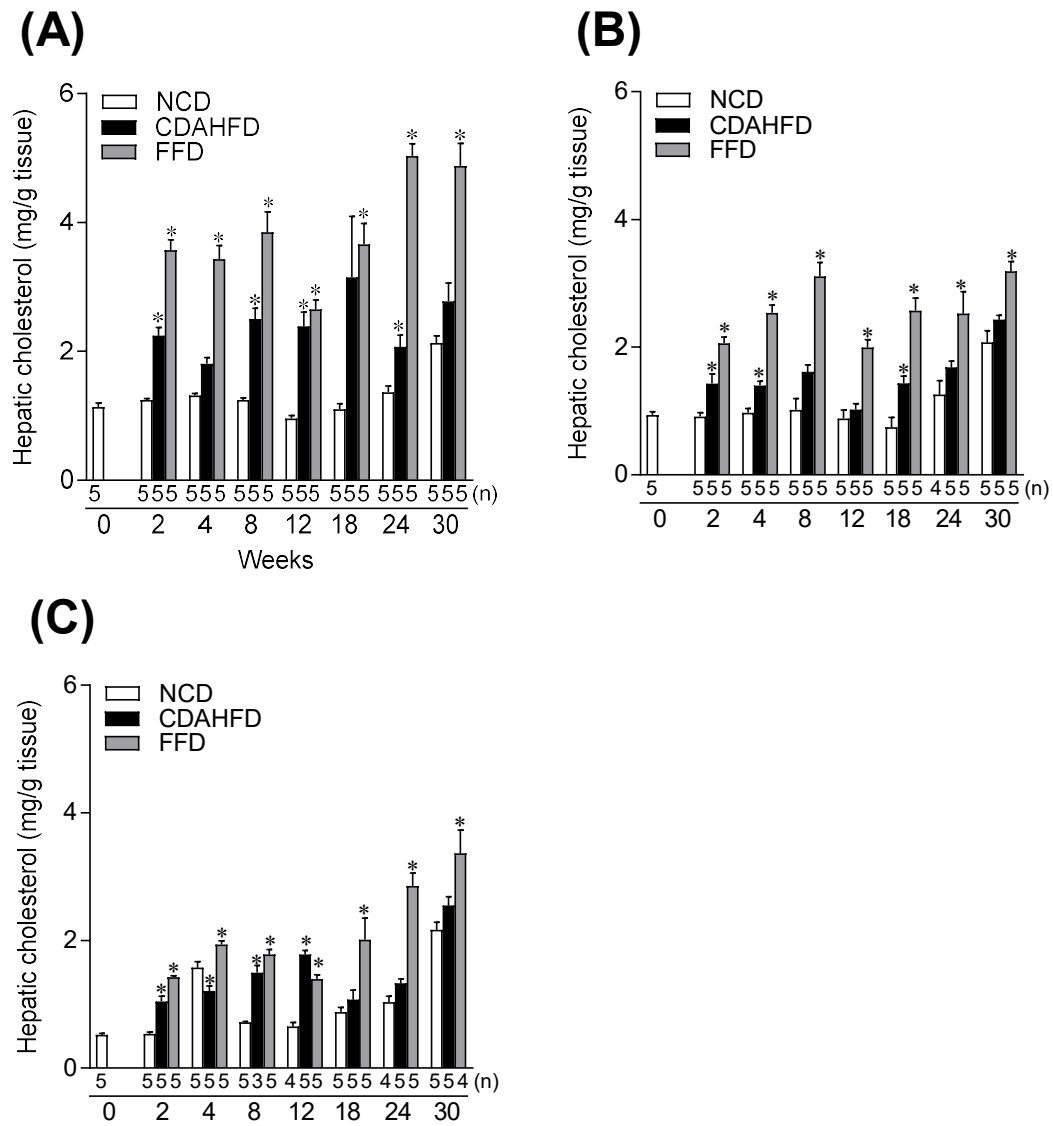


Fig. 8. Hepatic cholesterol levels in C57BL/6J, ob/ob, and KK-A^y mice under NCD, FFD, or CDAHFD regimes for 2, 4, 8, 12, 18, 24, and 30 weeks. (A) C57BL/6J, (B) ob/ob, and (C) KK-Ay mice. Values are mean \pm SEM, $n = 4-5$ (the exact number of animals are shown in the figure). * $p < 0.05$ vs. NCD (One-way ANOVA with post-hoc Tukey's test).

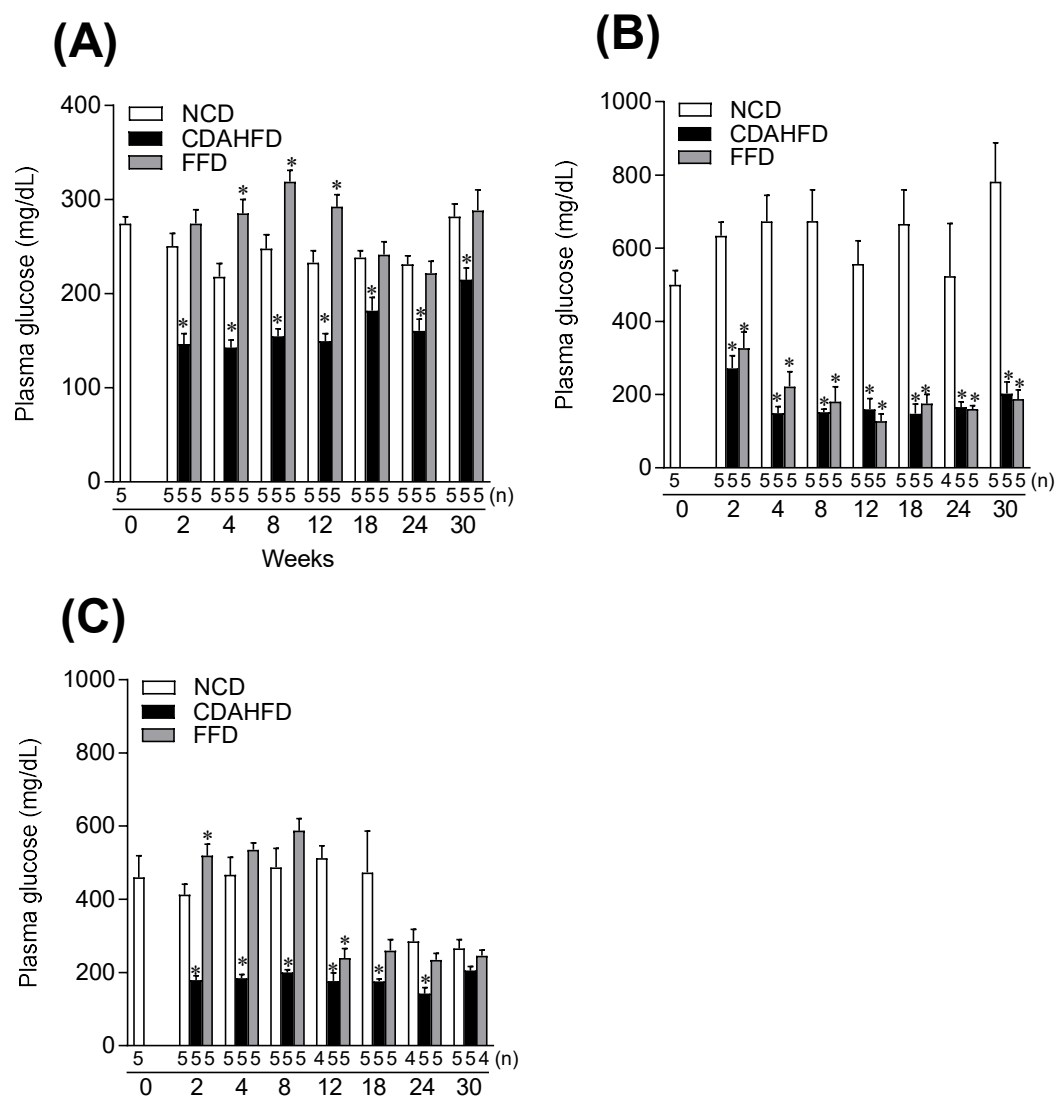


Fig. 9. Plasma glucose levels in C57BL/6J, ob/ob, and KK-A^y mice under NCD, FFD, or CDAHFD regimes for 2, 4, 8, 12, 18, 24, and 30 weeks. (A) C57BL/6J, (B) ob/ob, and (C) KK-Ay mice. Values are mean \pm SEM, n = 4–5 (the exact number of animals are shown in the figure). * $p < 0.05$ vs. NCD (One-way ANOVA with post-hoc Tukey's test).

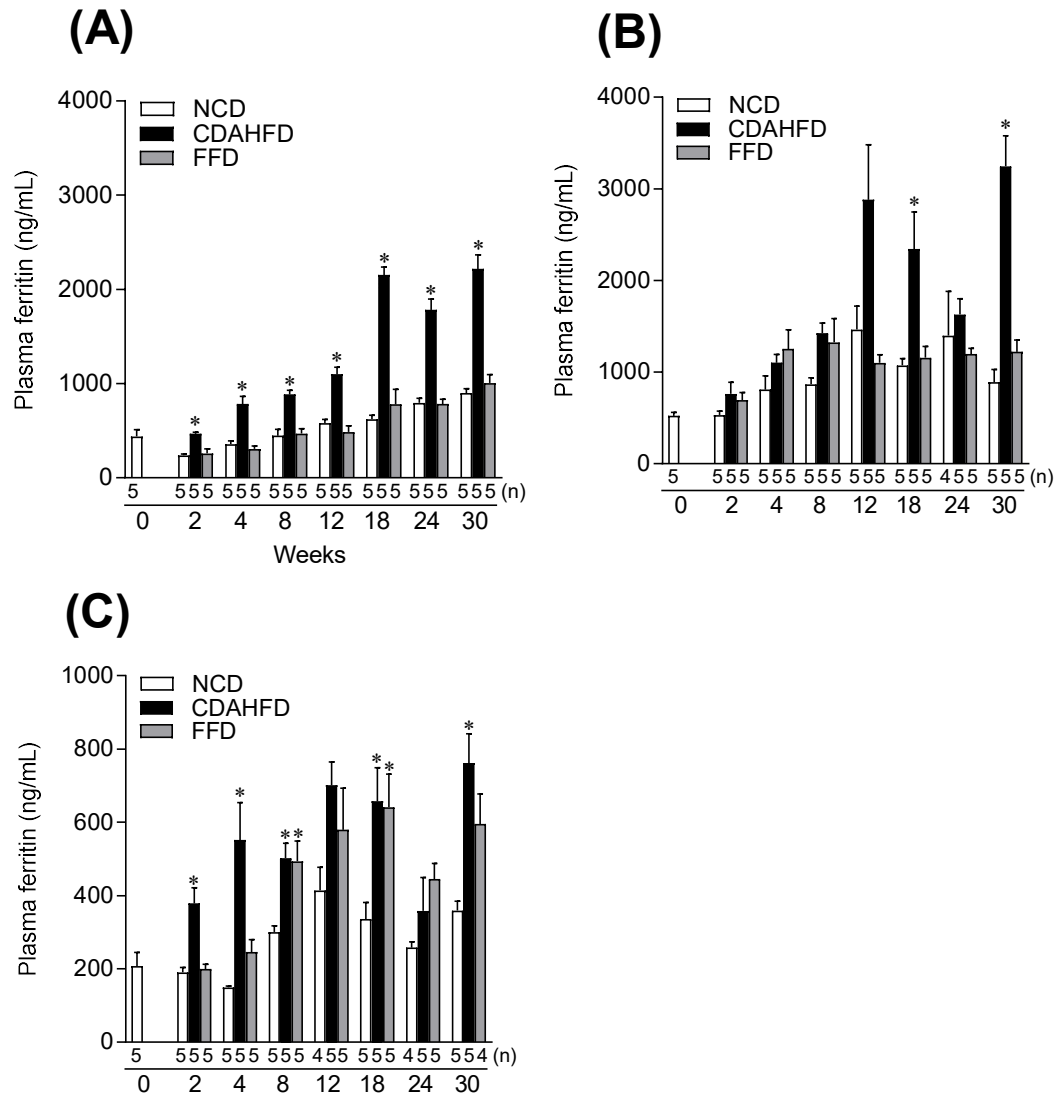


Fig. 10. Plasma ferritin levels in C57BL/6J, ob/ob, and KK-A^y mice under NCD, FFD, or CDAHFD regimes for 2, 4, 8, 12, 18, 24, and 30 weeks. (A) C57BL/6J, (B) ob/ob, and (C) KK-Ay mice. Values are mean \pm SEM, $n = 4-5$ (the exact number of animals are shown in the figure). * $p < 0.05$ vs. NCD (One-way ANOVA with post-hoc Tukey's test).

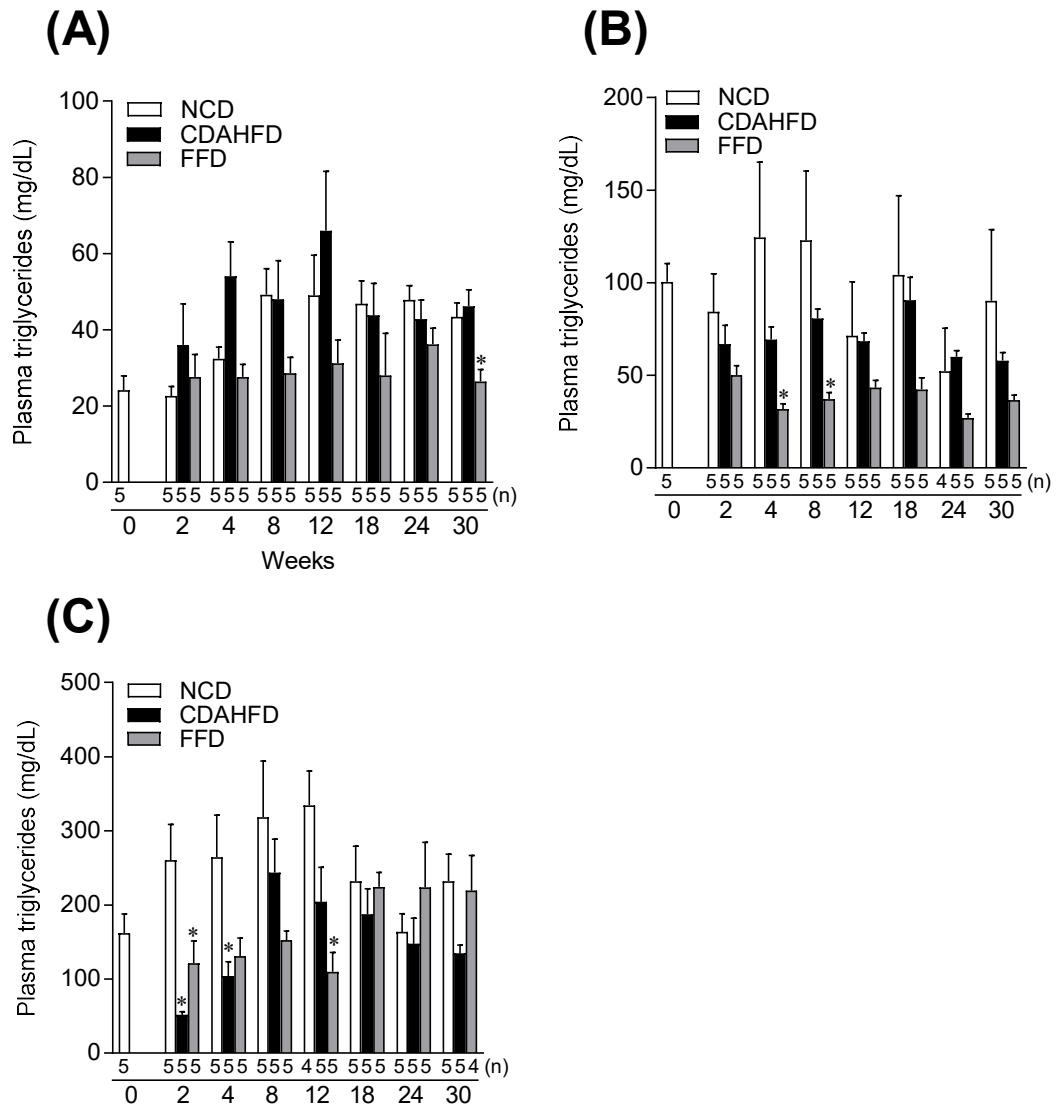


Fig. 11. Plasma triglyceride levels in C57BL/6J, ob/ob, and KK-A^y mice under NCD, FFD, or CDAHFD regimes for 2, 4, 8, 12, 18, 24, and 30 weeks. (A) C57BL/6J, (B) ob/ob, and (C) KK-Ay mice. Values are mean \pm SEM, $n = 4-5$ (the exact number of animals are shown in the figure). * $p < 0.05$ vs. NCD (One-way ANOVA with post-hoc Tukey's test).

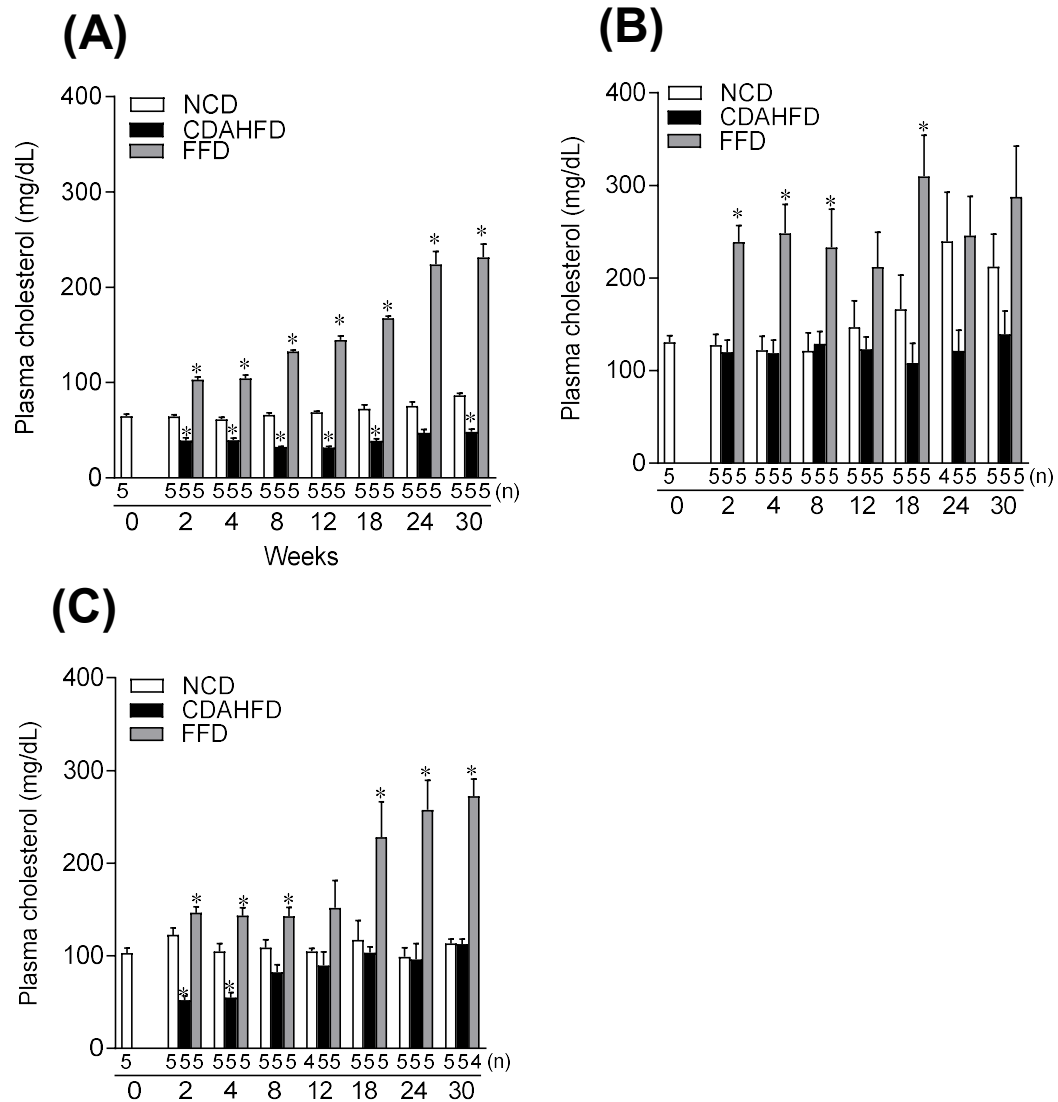


Fig. 12. Plasma cholesterol levels in C57BL/6J, ob/ob, and KK-A^y mice under NCD, FFD, or CDAHFD regimes for 2, 4, 8, 12, 18, 24, and 30 weeks. (A) C57BL/6J, (B) ob/ob, and (C) KK-Ay mice. Values are mean \pm SEM, $n = 4-5$ (the exact number of animals are shown in the figure). * $p < 0.05$ vs. NCD (One-way ANOVA with post-hoc Tukey's test).

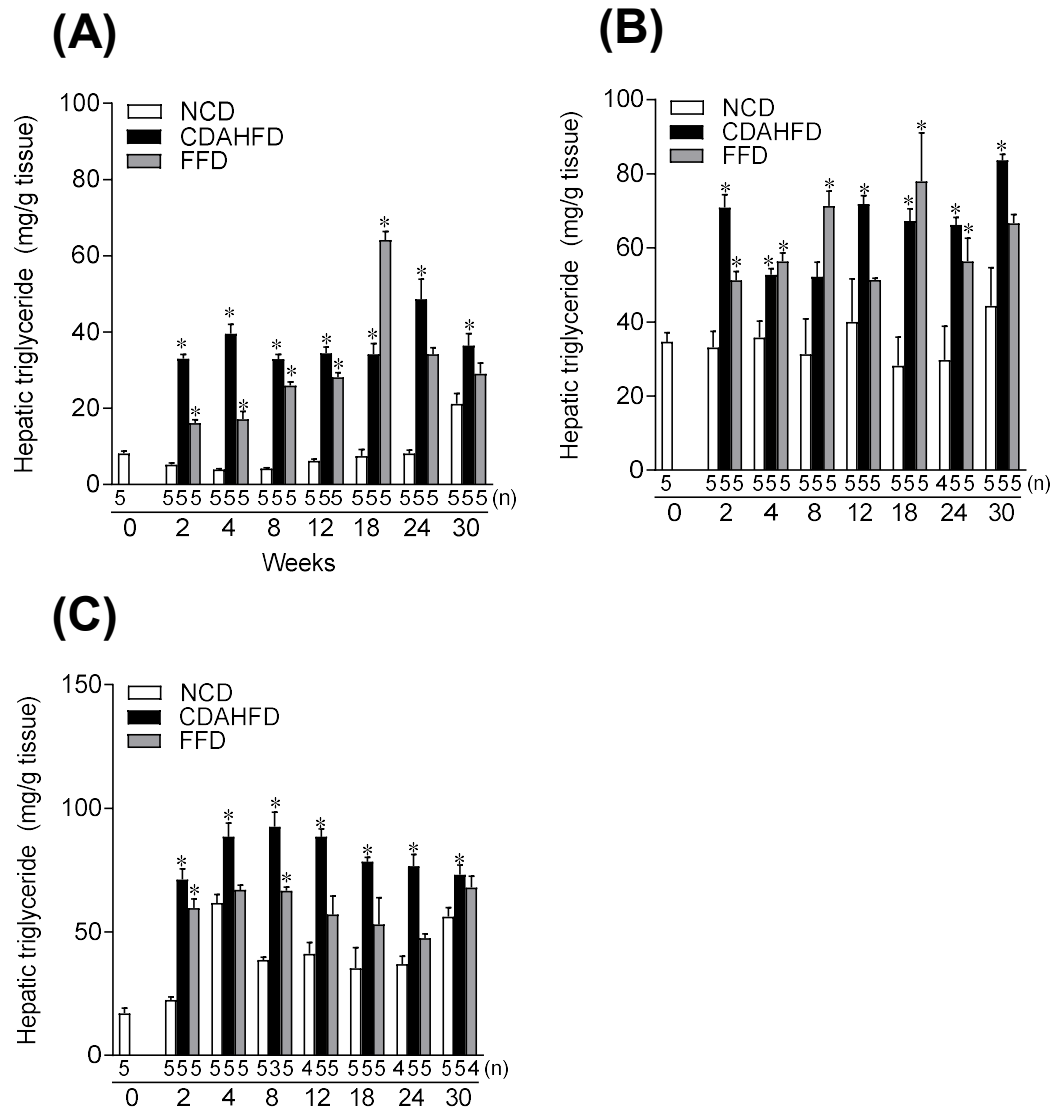


Fig. 13. Hepatic triglyceride levels in C57BL/6J, ob/ob, and KK-A^y mice under NCD, FFD, or CDAHFD regimes for 2, 4, 8, 12, 18, 24, and 30 weeks. (A) C57BL/6J, (B) ob/ob, and (C) KK-Ay mice. Values are mean \pm SEM, $n = 3-5$ (the exact number of animals are shown in the figure). * $p < 0.05$ vs. NCD (One-way ANOVA with post-hoc Tukey's test).

1.3.3 FFD 給餌による脂肪肝炎と線維化は ob/ob マウスにおいて顕著である.

NCD, CDAHFD 及び FFD の給餌が, 3 系統のマウス (C57BL/6J, ob/ob 及び KK-A^y マウス) の肝病理学的な NASH 病態進展に及ぼす影響を明らかにするため, 臨床において NASH の診断に用いられている NAFLD activity score (NAS) 及び Sirius Red 染色による肝線維化を経過的に評価した.

Fig. 14A, B には各飼料を給餌したすべての系統の飼料給餌 30 週の時点において HE 染色及び Sirius Red 染色を行った際に得られた典型的な染色結果を示している. NAS 及び Sirius Red 染色で示される線維化の肝病理解析は, 飼料給餌 2, 4, 8, 12, 18, 24 及び 30 週時点で実施した.

FFD 及び CDAHFD 給餌は全ての系統の NAS を増加させた (Fig. 15A–C). マウス系統に関わらず, CDAHFD 給餌群の NAS は 5~6 ポイントを示した. FFD 給餌により, C57BL/6J 及び KK-A^y マウスの NAS は 3~4 ポイントを示したが, FFD 給餌 ob/ob マウスの NAS は 5~6 ポイントに達した.

飼料給餌 30 週では, FFD 及び CDAHFD 給餌は, 全ての系統の Sirius Red 陽性面積を増加させた. FFD 給餌 ob/ob マウスの線維化進展は, FFD 給餌 C57BL/6J 及び KK-A^y マウスと比較して速かった (Fig.16A–C).

NAS の構成要素を Fig. 17-19 に示した. FFD 及び CDAHFD 給餌は全ての系統の脂肪肝スコアを有意に増加させた (Fig. 17A–C). FFD 給餌 ob/ob マウスの炎症スコアは FFD 給餌 C57BL/6J 及び KK-A^y マウスと比較して早期に高値を示した (Fig. 18A–C). FFD 及び CDAHFD 給餌した全ての系統において ballooned hepatocytes は認められなかった (Fig. 19A–C).

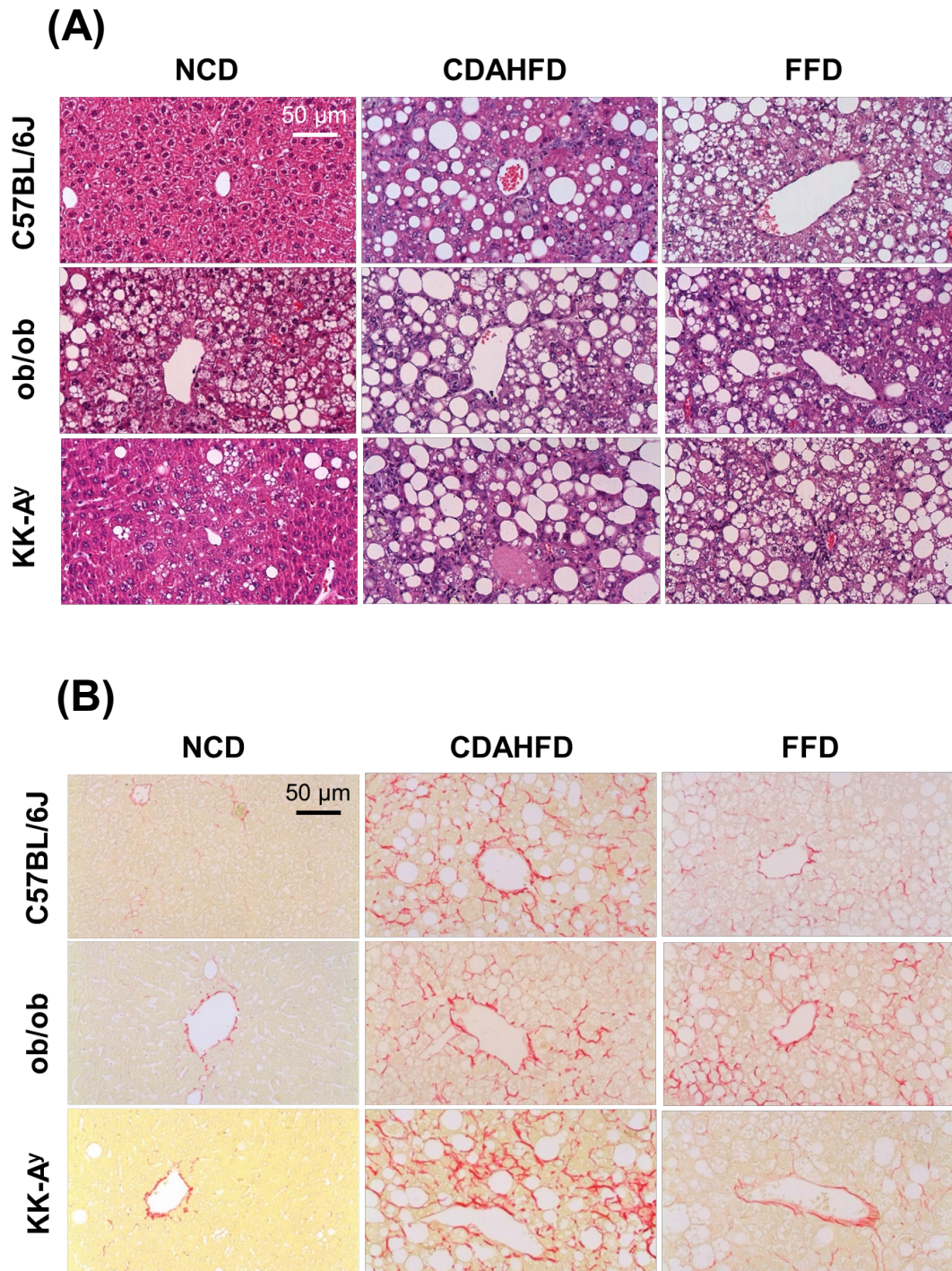


Fig. 14. Histological changes in C57BL/6J, ob/ob, and KK-A^y mice under NCD, FFD, or CDAHFD regimes. (A) Hematoxylin and eosin staining of liver sections at 30 weeks (Scale bars are 200 μ m) (B) Sirius Red staining of liver sections at 30 weeks (Scale bars are 50 μ m)

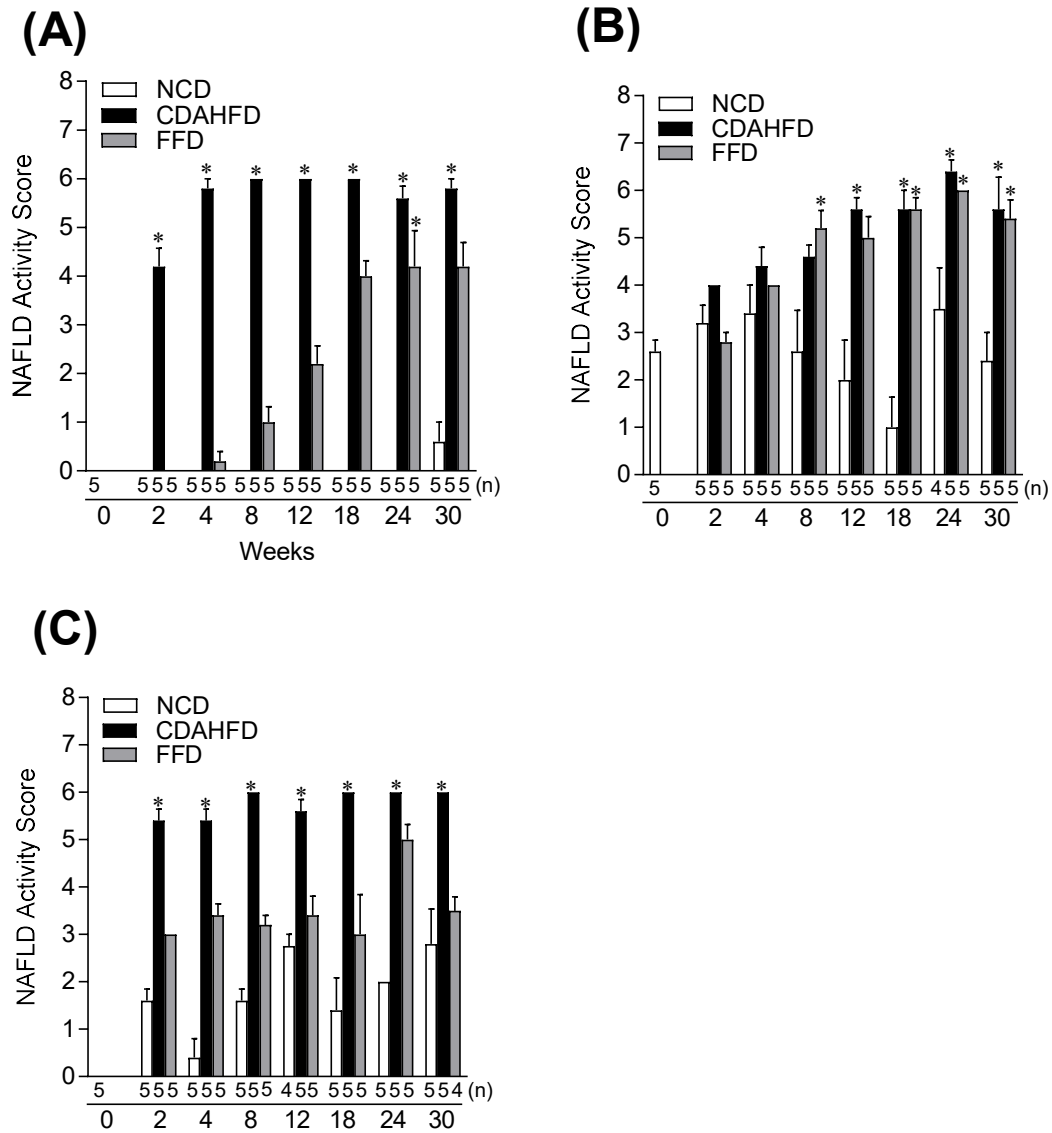


Fig. 15. NAFLD activity score (NAS) in C57BL/6J, ob/ob, and KK-A^y mice under NCD, FFD, or CDAHFD regimes for 2, 4, 8, 12, 18, 24, and 30 weeks. (A) C57BL/6J, (B) ob/ob, and (C) KK-Ay mice. Values are mean \pm SEM, n = 4–5 (the exact number of animals are shown in the figure). * $p < 0.05$ vs. NCD (One-way ANOVA with post-hoc Tukey's test).

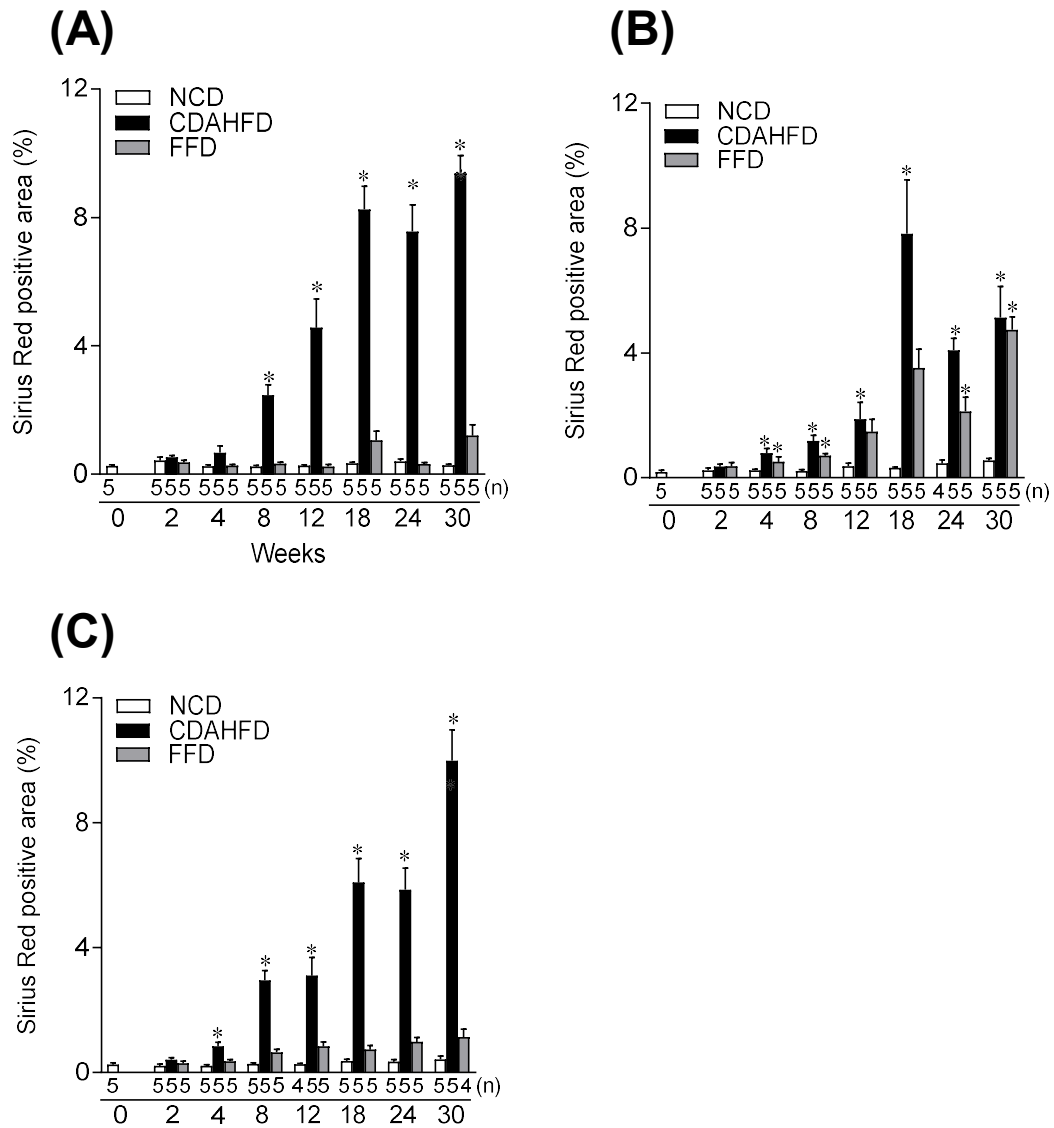


Fig. 16. Sirius Red-positive area in C57BL/6J, ob/ob, and KK-A^y mice under NCD, FFD, or CDAHFD regimes for 2, 4, 8, 12, 18, 24, and 30 weeks. (A) C57BL/6J, (B) ob/ob, and (C) KK-A^y mice. Values are mean \pm SEM, n = 4–5 (the exact number of animals are shown in the figure). * $p < 0.05$ vs. NCD (One-way ANOVA with post-hoc Tukey's test).

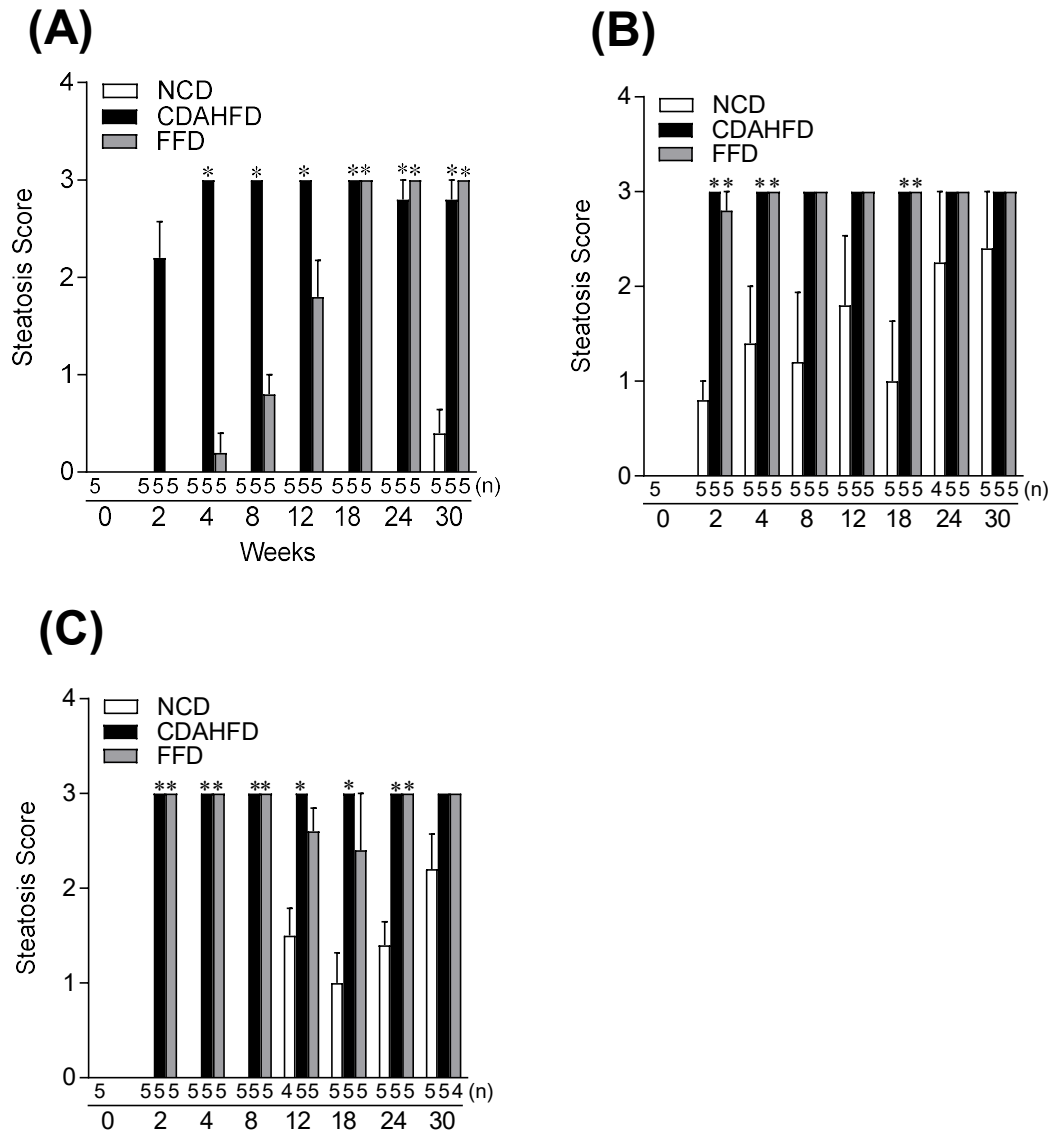


Fig. 17. Steatosis score in C57BL/6J, ob/ob, and KK-A^y mice under NCD, FFD, or CDAHFD regimes for 2, 4, 8, 12, 18, 24, and 30 weeks. (A) C57BL/6J, (B) ob/ob, and (C) KK-Ay mice. Values are mean \pm SEM, n = 4–5 (the exact number of animals are shown in the figure). * p < 0.05 vs. NCD (One-way ANOVA with post-hoc Tukey's test).

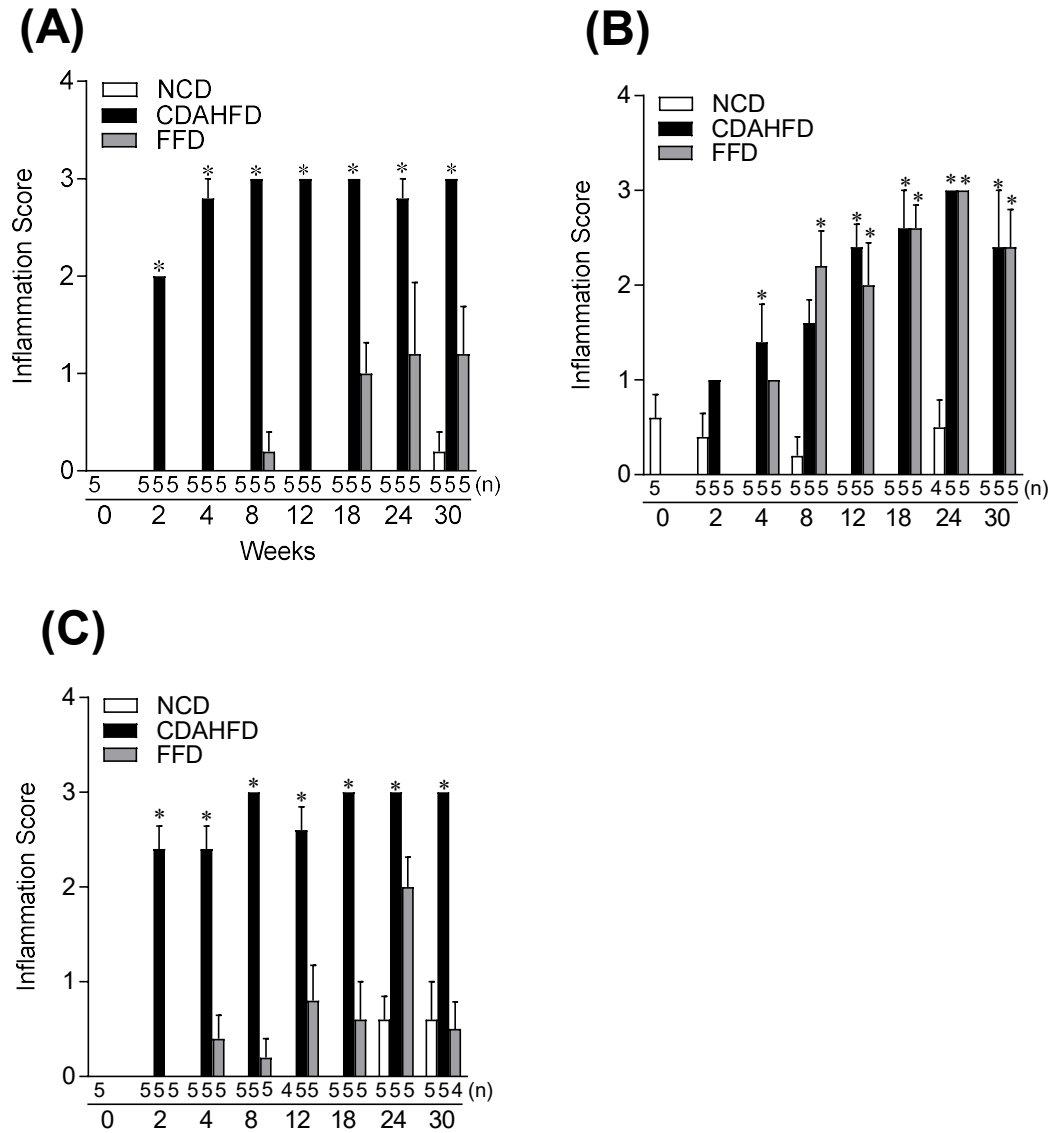


Fig. 18. Inflammation score in C57BL/6J, ob/ob, and KK-A^y mice under NCD, FFD, or CDAHFD regimes for 2, 4, 8, 12, 18, 24, and 30 weeks. (A) C57BL/6J, (B) ob/ob, and (C) KK-Ay mice. Values are mean \pm SEM, n = 4–5 (the exact number of animals are shown in the figure). * p < 0.05 vs. NCD (One-way ANOVA with post-hoc Tukey's test).

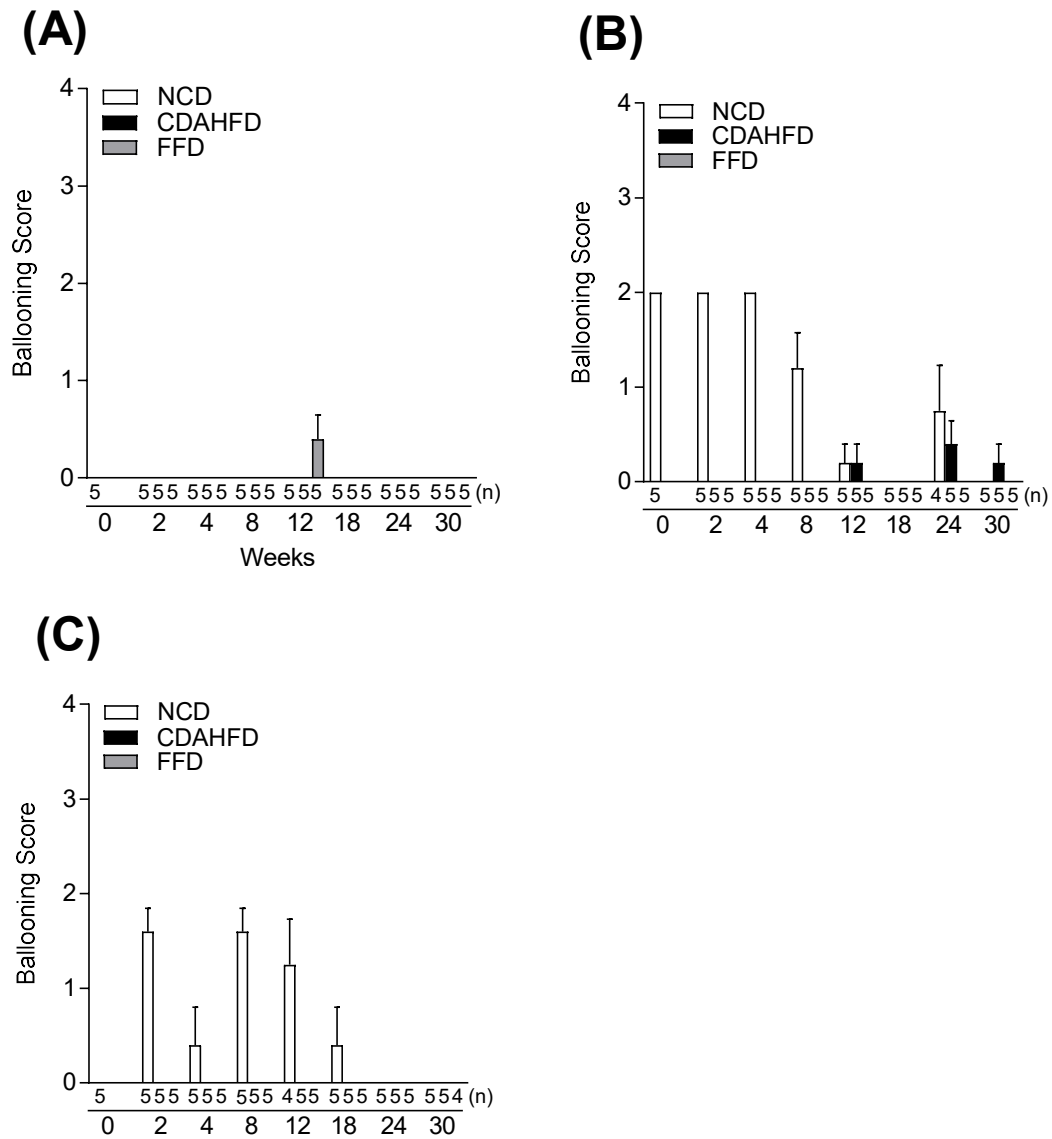


Fig. 19. Ballooning score in C57BL/6J, ob/ob, and KK-A^y mice under NCD, FFD, or CDAHFD regimes for 2, 4, 8, 12, 18, 24, and 30 weeks. (A) C57BL/6J, (B) ob/ob, and (C) KK-Ay mice. Values are mean \pm SEM, $n = 4-5$ (the exact number of animals are shown in the figure). * $p < 0.05$ vs. NCD (One-way ANOVA with post-hoc Tukey's test).

小活

CDAHFD 給餌 ob/ob マウス及び FFD 給餌 ob/ob マウスは，代謝的側面としての肥満，高インスリン血症，血漿中 ALT 活性の増加，肝病理学的側面としての脂肪肝炎及び線維化といったヒト NASH に特徴的な所見を呈した．CDAHFD 給餌 C57BL/6J マウス及び CDAHFD 給餌 KK-A^y マウスでは，代謝的側面としての肥満，高インスリン血症が認められなかった．以上の結果から，本研究では FFD 給餌 ob/ob マウスをヒト外挿性の高い NASH モデルとして選択し，詳細に肝病理解析と遺伝子発現解析を行うこととした．

1.3.4 FFD 給餌 ob/ob マウスはヒト NASH の肝病理学的な特徴を示す

FFD 給餌 ob/ob マウスの肝臓において、ヒト NASH の肝病理学的な特徴が認められるか否かについて明らかにするため、F4/80 染色による hCLS 数及び microvesicular steatosis, macrovesicular steatosis, hypertrophy 及び inflammatory aggregates を経過的に評価した。

NASH 患者の肝臓においてマクロファージは脂肪化した肝細胞を取り囲むように hepatic crown-like structures (hCLS) を形成する (Itoh et al., 2013). Fig. 20A には飼料給餌 12 時点における FFD 給餌 ob/ob マウス肝臓の F4/80 染色結果を示している。NCD 給餌では hCLS の形成は認められなかったが、FFD 給餌では hCLS の形成が多数認められた。hCLS の数を定量した結果、FFD 給餌は、NCD 給餌と比較して ob/ob マウスの hCLS の数を有意に増加させた (Fig. 20B)。

げっ歯類 NASH モデルでは、ヒト NASH の診断に使用される NAS の構成要素である ballooned hepatocytes が観察されないことが多い。近年、Liang et al. は、げっ歯類 NASH モデルのためのスコアリングシステムを構築した (Liang et al., 2014)。そのスコアリングシステムの構成要素は、microvesicular steatosis, macrovesicular steatosis, hypertrophy 及び inflammatory aggregates であり、いずれもヒト NASH 及びげっ歯類 NASH モデルに共通して観察される肝病理所見である (Liang et al., 2014; van Koppen et al., 2018)。FFD 給餌 ob/ob マウスの macrovesicular steatosis, inflammation 及び hypertrophy は NCD 給餌と比較して有意に高値を示した (Fig. 21A–D)。

以上の結果から、FFD 給餌 ob/ob マウスはヒト NASH の肝病理学的な特徴を示すことが明らかになった。

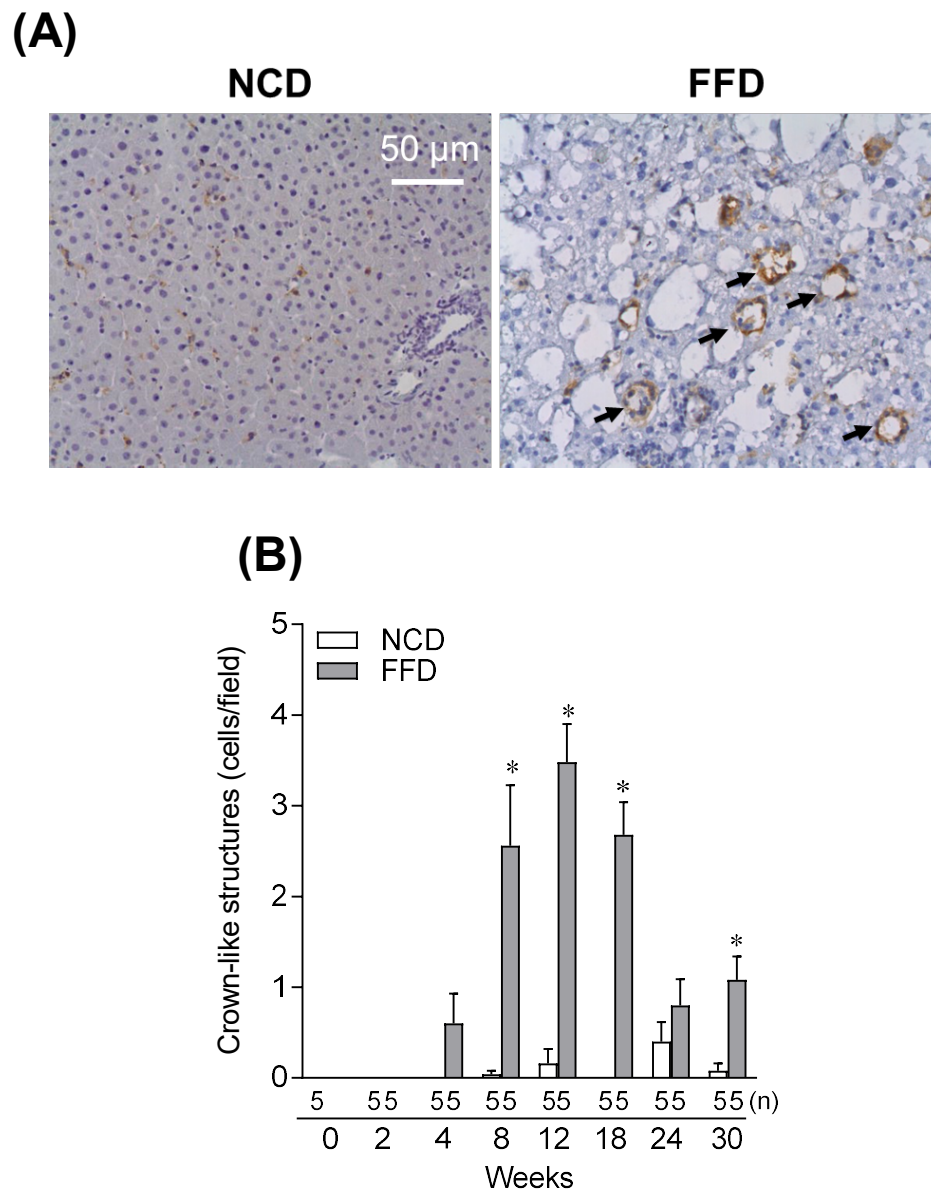


Fig. 20. Histological changes of hepatic crown-like structures (hCLS) in ob/ob mice under NCD or FFD regimes. (A) F4/80 staining of liver sections at 12 weeks (B) hCLS numbers (cells/field) at 2, 4, 8, 12, 18, 24, and 30 weeks. Values are mean \pm SEM, $n = 4-5$ (the exact number of animals are shown in the figure). * $p < 0.05$ vs. NCD (Student's t-test, two-tailed). Scale bars are 50 μm . Crown-like structures are indicated by arrows.

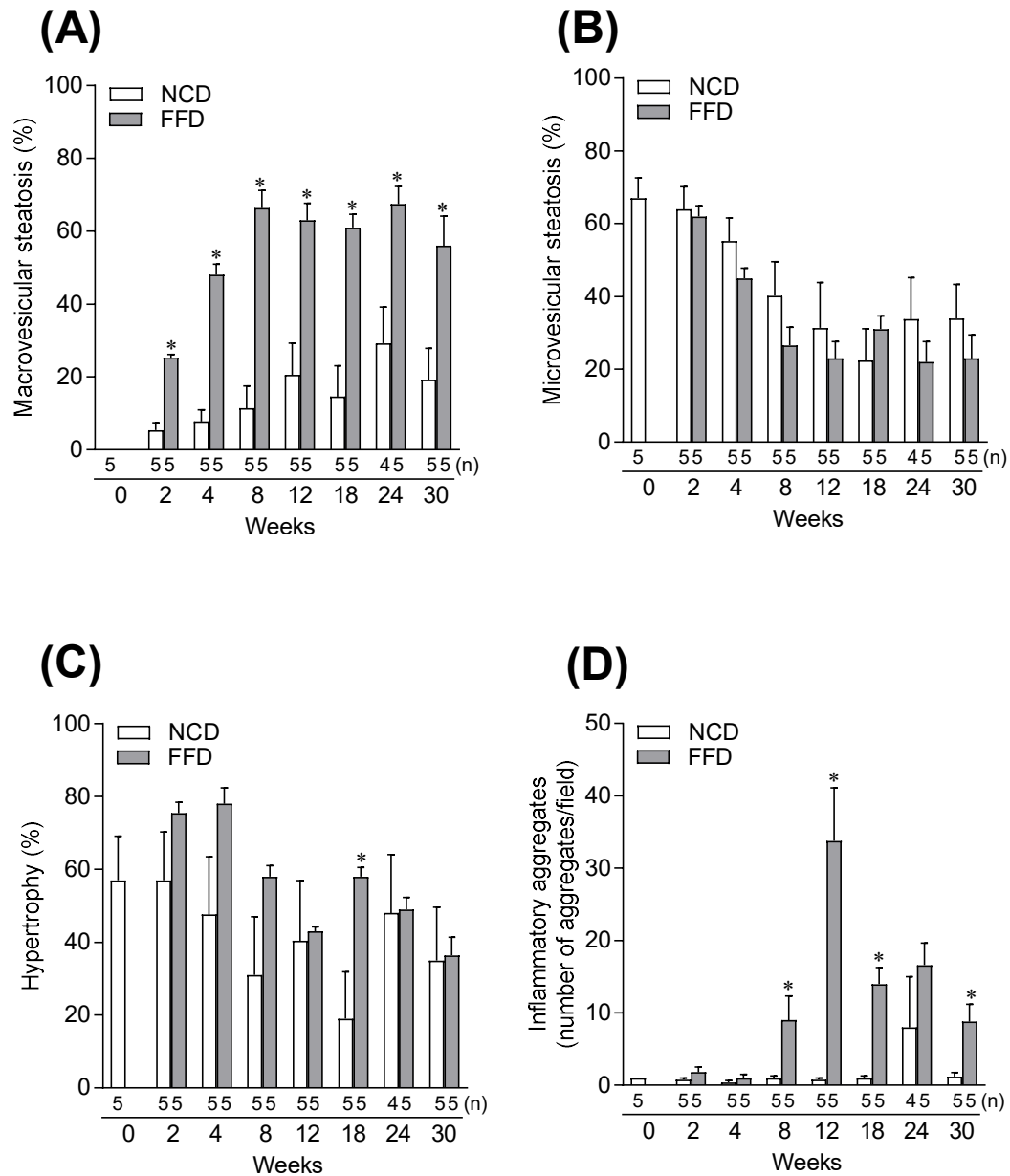


Fig. 21. Histological changes involved in human NASH histology in ob/ob mice under NCD or FFD regimes for 2, 4, 8, 12, 18, 24, and 30 weeks. (A) Macrovesicular steatosis (% surface area) (B) Microvesicular steatosis (% surface area) (C) Hepatocellular hypertrophy (% surface area) (D) Inflammatory aggregates (number of aggregates/field). Values are mean \pm SEM, $n = 4-5$ (the exact number of animals are shown in figure). * $p < 0.05$ vs. NCD (Student's t-test, two-tailed)

1.3.5 FFD 給餌 ob/ob マウスの NASH 病態関連遺伝子パスウェイは有意に変化する.

FFD 給餌 ob/ob マウスの病態進展を詳細に解析するため、次世代 RNA シーケンス解析手法により、経過的な肝臓の遺伝子発現解析を実施した.

Fig. 22 は、次世代 RNA シーケンス解析により得られた NASH 病態関連パスウェイ解析の結果を示している. FFD 給餌 ob/ob マウスの肝臓では、飼料給餌早期から、炎症、線維化、及び肝癌に関するパスウェイが有意に活性化していた. Fig. 23 は、IPA ソフトウェアを用いて詳細解析した、FFD 給餌 ob/ob マウスの飼料給餌 18 週時点における NASH 関連パスウェイのトップ 50 を示している. FFD 給餌 ob/ob マウスでは、肝線維化や星細胞の活性化、炎症、酸化ストレスに関連したパスウェイが強く活性化された. 一方で、シトルリン合成や尿素回路に関連したパスウェイは有意に下方制御されていたことから、FFD 給餌によりミトコンドリア機能や、アンモニア代謝が障害されていた.

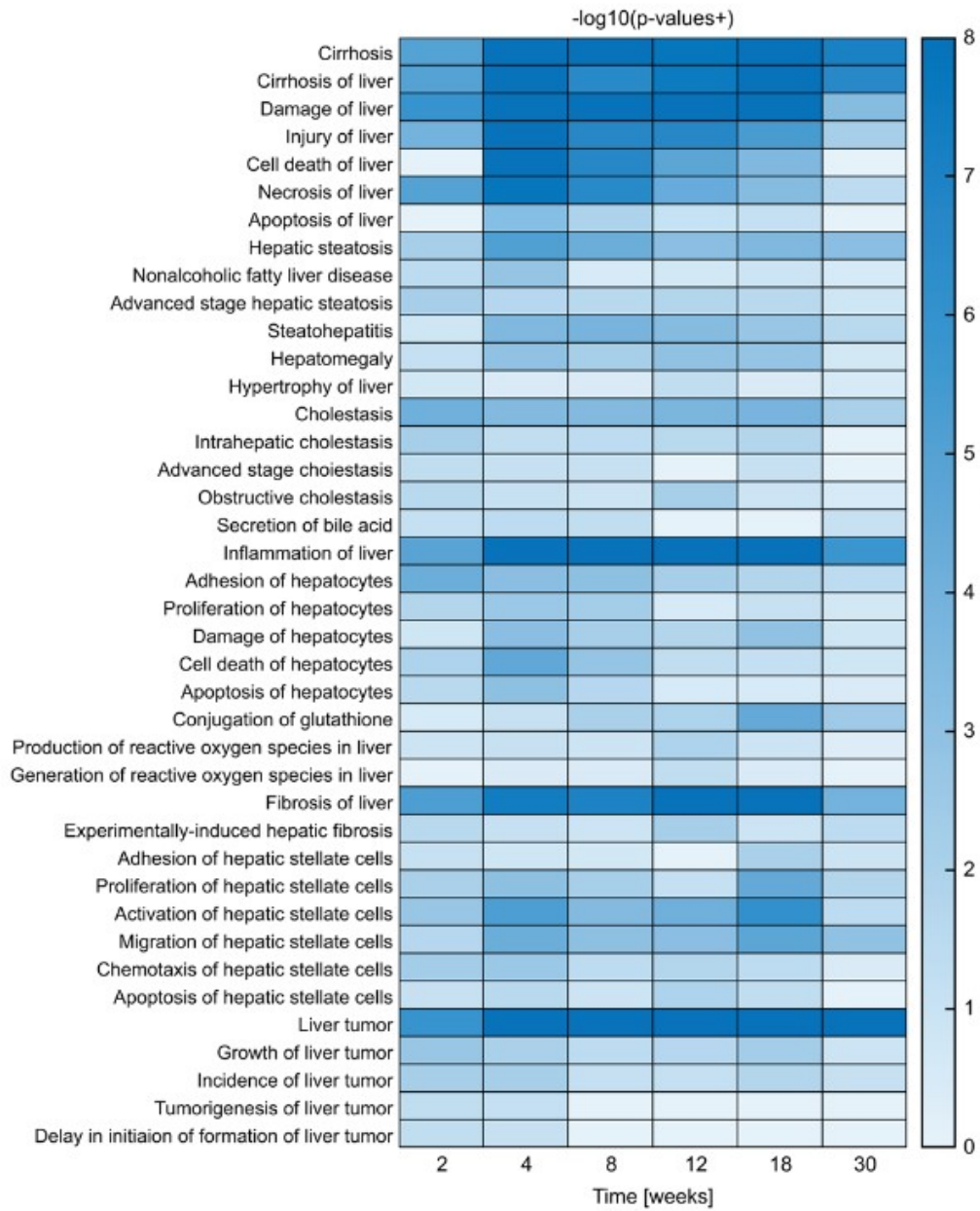


Fig. 22. Heat map visualization of biological categories related to NASH disease progression in ob/ob mice under FFD regimes for 30 weeks. Values are expressed as $-\log(p\text{ values})$.

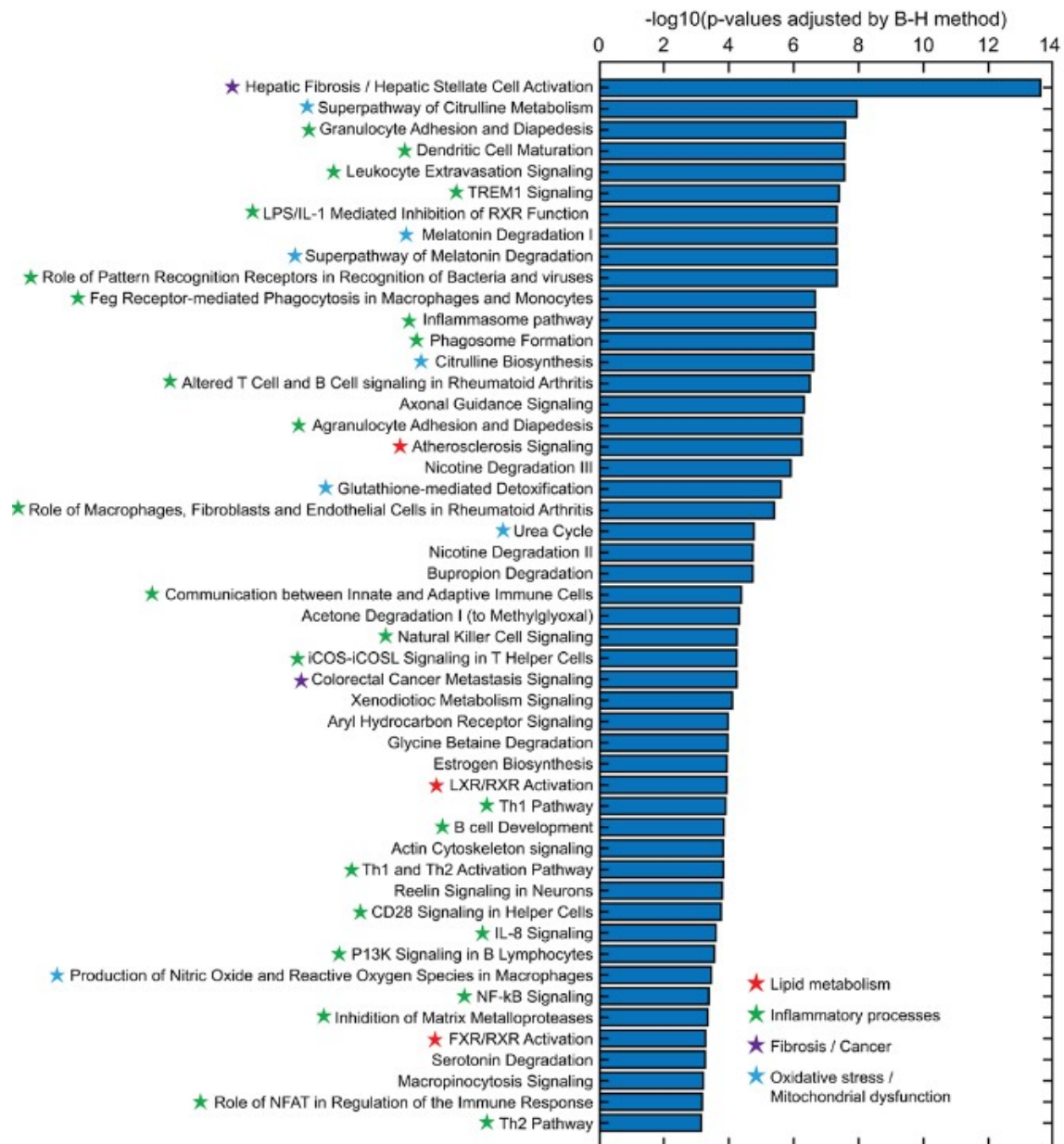


Fig. 23. Top 50 canonical pathways in ob/ob mice under FFD regimes at 18 weeks. Red stars, green stars, purple stars, and blue stars indicate pathways involved in lipid metabolism, inflammatory processes, fibrosis and cancer, and oxidative stress, respectively.

1.3.6 FFD 給餌 ob/ob マウスでは, 早期から炎症及び線維化遺伝子発現が増加する.

FFD 給餌 ob/ob マウスの肝臓において, 肝臓の炎症及び線維化関連遺伝子の変動が認められるか否かについて経週の的に検討した.

Fig. 24 は, FFD 給餌 ob/ob マウス肝臓において, NCD 給餌 ob/ob マウスと比較して上方制御或いは下方制御された遺伝子群を示している. FFD 給餌 2 週時点から, ob/ob マウス肝臓の炎症及び線維化に関連した遺伝子発現の増加が認められた. 代表的な炎症及び線維化関連遺伝子である *Tnf- α* , *Mcp-1*, *Colla1*, *Timp-1* 及び *Acta2* (α SMA) の発現量を Fig. 25A-E に示した. FFD 給餌 ob/ob マウスの肝炎症及び線維化関連遺伝子発現は, NCD 給餌 ob/ob マウスと比較して飼料給餌 2 週時点から有意に増加した.

		MouseType	Ob	Ob	Ob	Ob	Ob	Ob	Ob
Max_2logR	4.0	Treatment	-	Fast food	Fast food	Fast food	Fast food	Fast food	Fast food
Min_2logR	-4.0	Weeks	0	2	4	8	12	18	30
		Unit (vs Normal chow)	2logR	2logR	2logR	2logR	2logR	2logR	2logR
Category	Ass. Gene Name	EnsemblID							
Inflammation	cathepsin D	ENSMUSG00000007891	0.0	0.0	0.2	0.3	0.3	0.2	0.0
	Resistin	ENSMUSG00000012705	0.0	-2.6	-3.9	-4.1	MinInf	-1.6	MinInf
	Cd68	ENSMUSG00000018774	0.0	1.2	1.5	1.7	1.7	1.7	0.8
	Visfatin	ENSMUSG00000020572	0.0	0.3	0.4	0.1	0.1	-0.2	-0.3
	Lcp1	ENSMUSG00000021998	0.0	-0.3	-0.1	0.1	0.3	0.3	0.0
	Adiponectin	ENSMUSG00000022878	0.0	-1.6	-0.8	-0.5	Inf	MinInf	-0.9
	Cd4	ENSMUSG00000023274	0.0	-0.3	0.4	0.9	1.5	1.1	1.1
	TNFA	ENSMUSG00000024401	0.0	0.9	2.8	1.0	1.1	1.0	1.1
	Mip	ENSMUSG00000025389	0.0	NA	Inf	NA	MinInf	NA	NA
	Il6	ENSMUSG00000025746	0.0	-1.8	Inf	1.2	0.6	-1.5	MinInf
	Il1b	ENSMUSG00000027398	0.0	0.4	1.6	0.5	0.6	1.5	0.7
	KC	ENSMUSG00000029380	0.0	1.0	0.4	1.2	1.3	0.5	1.1
	Ccl2	ENSMUSG00000035385	0.0	2.3	2.6	2.3	1.6	2.0	1.2
	Apelin	ENSMUSG00000037010	0.0	0.7	1.0	0.1	0.1	1.0	-0.4
	Vaspin	ENSMUSG00000041567	0.0	1.4	1.6	1.9	0.1	1.3	0.2
	CD8a	ENSMUSG00000053977	0.0	0.7	1.4	4.4	4.1	2.3	1.6
	Ifng	ENSMUSG00000055170	0.0	Inf	-0.9	Inf	-0.1	Inf	-1.4
	RDB-4	ENSMUSG00000057722	0.0	1.1	1.3	0.2	-0.4	-0.9	-0.8
	Leptin	ENSMUSG00000059201	0.0	Inf	1.5	Inf	NA	NA	Inf
	SAA	ENSMUSG00000074115	0.0	1.5	1.1	0.9	1.3	2.0	3.3
	sPLA2	ENSMUSG00000041193	0.0	NA	-1.2	-0.7	-1.7	0.9	2.4
	Haptoglobin	ENSMUSG00000031722	0.0	0.8	0.9	1.2	1.0	1.2	1.0
	Ggta	ENSMUSG00000035778	0.0	0.6	1.1	1.1	1.0	1.2	0.4
	IL-8	ENSMUSG00000029375	0.0	NA	NA	Inf	NA	NA	NA
	MCP-1	ENSMUSG00000035385	0.0	2.3	2.6	2.3	1.6	2.0	1.2
	G-CSF	ENSMUSG00000038067	0.0	NA	Inf	NA	NA	-0.8	Inf
	Il-10	ENSMUSG00000016529	0.0	0.0	1.0	2.3	3.2	0.9	1.4
	IFN-gamma	ENSMUSG00000055170	0.0	Inf	-0.9	Inf	-0.1	Inf	-1.4
Fibrosis	TGFB	ENSMUSG00000002603	0.0	0.8	1.0	0.9	0.9	1.1	0.4
	COL18A1	ENSMUSG00000001435	0.0	-0.4	-0.2	-0.3	-0.5	-0.2	-0.3
	COL1A1	ENSMUSG00000001506	0.0	1.7	2.3	2.5	1.6	2.9	1.6
	COL1A2	ENSMUSG000000029661	0.0	1.5	2.0	2.2	1.4	2.5	1.5
	COL3A1	ENSMUSG000000026043	0.0	1.7	2.2	2.4	1.6	2.8	1.4
	COL4A1	ENSMUSG000000031502	0.0	1.3	1.8	1.8	1.1	1.9	1.4
	COL4A2	ENSMUSG000000031503	0.0	1.0	1.5	1.4	0.8	1.6	1.0
	COL5A1	ENSMUSG000000026837	0.0	1.3	1.8	1.6	0.9	1.6	0.8
	COL5A2	ENSMUSG000000026042	0.0	1.7	2.2	2.4	1.7	2.6	1.5
	COL6A2	ENSMUSG000000020241	0.0	1.1	1.5	1.4	1.1	2.0	1.3
	COL6A3	ENSMUSG000000048126	0.0	1.4	2.0	2.2	1.8	2.9	2.0
	COL8A1	ENSMUSG000000068196	0.0	1.1	1.4	1.3	1.6	1.5	3.3
	HGF	ENSMUSG000000028864	0.0	1.3	1.9	1.5	1.1	1.5	1.3
	IL1R1	ENSMUSG000000026072	0.0	0.6	0.7	1.2	0.7	1.0	1.7
	PDGFB	ENSMUSG00000000489	0.0	-0.2	0.3	0.8	0.9	1.2	0.7
	PDGFC	ENSMUSG000000028019	0.0	0.3	0.3	1.4	1.2	1.4	1.4
	PDGFD	ENSMUSG000000032006	0.0	0.3	0.6	1.1	0.9	1.4	1.4
	RELA	ENSMUSG000000024927	0.0	-0.2	-0.1	-0.1	0.0	-0.1	0.0
	TIMP1	ENSMUSG000000001131	0.0	1.9	3.0	2.6	1.8	2.5	1.7
	TIMP2	ENSMUSG000000017466	0.0	0.2	0.7	1.1	0.9	1.3	1.4
	TLR4	ENSMUSG000000039005	0.0	1.3	1.4	1.8	1.5	1.4	1.0
Biomarkers	CK-18-M30	ENSMUSG000000023043	0.0	1.0	1.1	0.9	0.6	0.8	0.7
	IL1Ra	ENSMUSG000000026072	0.0	0.6	0.7	1.2	0.7	1.0	1.7
	FGF21	ENSMUSG000000030827	0.0	2.9	3.3	2.9	0.5	0.6	0.1
	PDEF	ENSMUSG000000024215	0.0	MinInf	Inf	MinInf	0.4	1.0	Inf
	OPG	ENSMUSG000000063727	0.0	0.3	0.8	0.9	0.2	0.4	-0.5

Fig. 24. Heat map of genes involved in inflammation and fibrosis in ob/ob mice under NCD or FFD regimes for 2, 4, 8, 12, 18 and 30 weeks. Red = upregulated, green = downregulated.

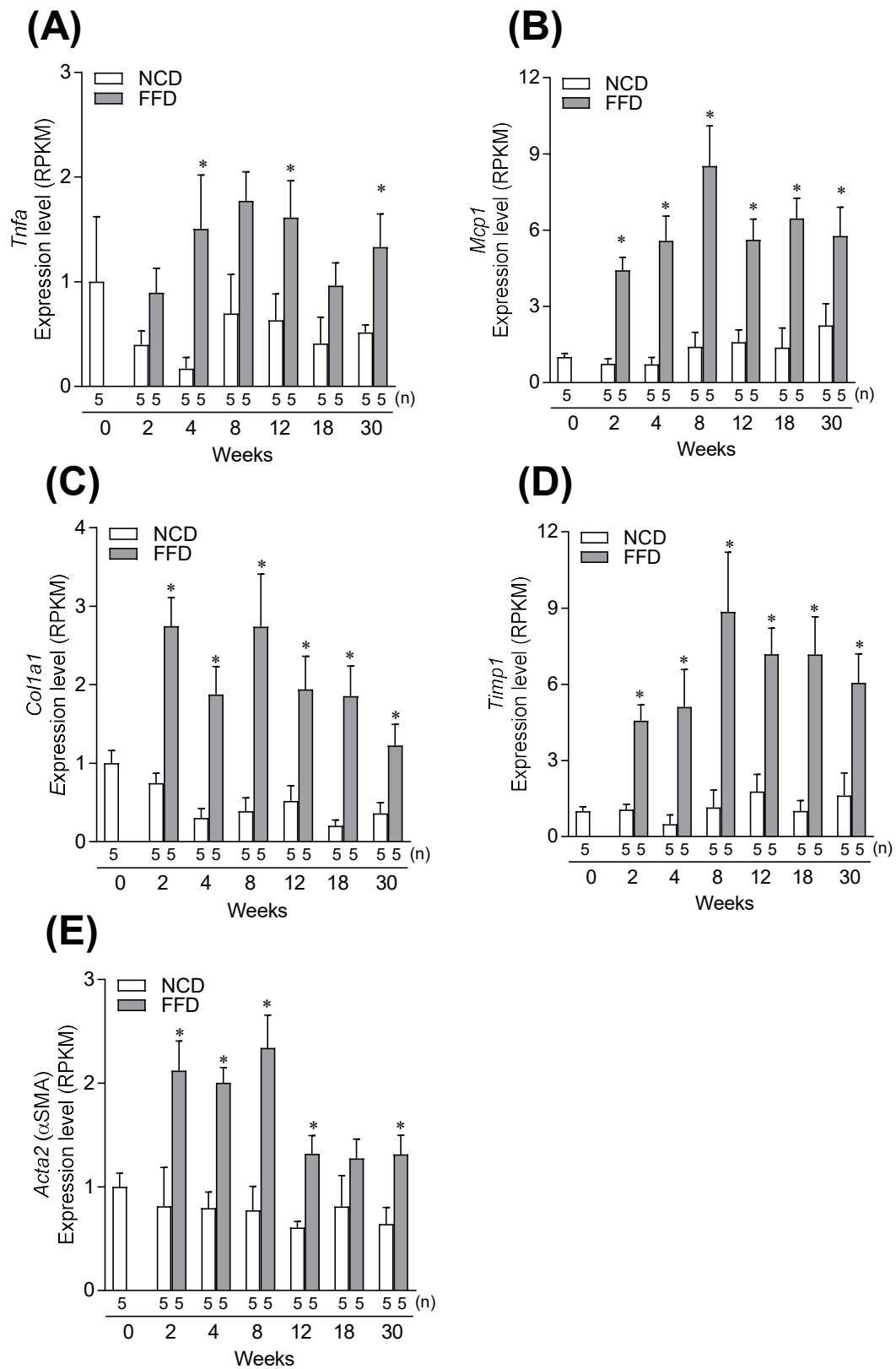


Fig. 25. Expression levels of selected hepatic genes involved in inflammation and fibrosis in ob/ob mice under NCD or FFD regimes for 2, 4, 8, 12, 18 and 30 weeks. Values are mean \pm SEM, n = 5. * p < 0.05 vs. NCD (Student's t-test, two-tailed).

1.4 考察

著者は、3 系統のマウス（C57BL/6J, ob/ob 及び KK-A^y マウス）に対して、NCD, CDAHFD 及び FFD を最大 30 週間給餌し、NASH の病態に関連したパラメータを測定することにより、FFD 給餌 ob/ob マウスがヒト NASH の代謝的及び病理学的特徴を示すことを明らかにした。CDAHFD 及び FFD を給餌したすべてのマウス系統は脂肪肝炎と肝線維化を発症したが（Fig. 15 及び Fig. 16）、NASH の病態に関連した代謝パラメータは、系統間に違いが認められた。すべての系統において、FFD 給餌は NASH の肝病理学的特徴を悪化させるだけでなく、肥満や高インスリン血症といった代謝異常を引き起こした。一方で、CDAHFD 給餌 ob/ob マウスは代謝異常を呈したが、CDAHFD 給餌は C57BL/6J 及び KK-A^y マウスの代謝異常を改善する傾向にあった（Fig. 3 及び Fig. 6）。以上から、CDAHFD 給餌と比較して FFD 給餌はヒト NASH の特徴を示す病態モデルマウスを作製する上で有用であることが示唆された。

CDAHFD を給餌した場合、代謝的及び肝病理学的な表現型は各マウス系統に依存していた。これは各マウス系統の遺伝的背景が NASH 病態進展に影響を及ぼしていることを示唆している。CDAHFD に類似したメチオニン・コリン欠乏食（MCD）は体重低下と低インスリン血症を引き起こすことが広く知られており（Pickens et al., 2009; Rinella et al., 2008）、CDAHFD 給餌 C57BL/6J マウスの体重低下と低インスリン血症の結果（Fig. 3A 及び Fig. 6A）は、既報の結果と一致していた（Matsumoto et al., 2013）。しかしながら、CDAHFD 給餌 ob/ob マウス及び CDAHFD 給餌 KK-A^y マウスの体重は増加した（Fig. 3B, C）。さらに、CDAHFD 給餌 KK-A^y マウスの血漿中インスリン濃度は有意に低下した（Fig. 6C）が、CDAHFD 給餌は ob/ob マウスの血漿中インスリン濃度に影響を及ぼさなかった（Fig. 6B）ことから、ヒト NASH の特徴を示す CDAHFD 給餌 ob/ob マウスは、FFD 給餌 ob/ob マウスと同様、化合物の有効性を評価する病態モデルとして有用であることが示唆される。しかしながら、なぜ ob/ob マウスだけ

が CDAHFD 給餌による体重低下や血漿中インスリン濃度低下に対して抵抗性を示すのかは明らかではない。今後、CDAHFD 給餌による各マウス系統の表現型の違いのメカニズムを明らかにすることが必要である。

FFD 給餌は、統計学的有意差はなく傾向を示すのみの時点がいくつかあるものの、全てのマウス系統の体重及び血漿中インスリン濃度を増加或いは維持した (Fig. 3 及び Fig. 6)。さらに、FFD 給餌 ob/ob マウスは、FFD 給餌 C57BL/6J 及び FFD 給餌 KK-A^y マウスと比較して、早期に脂肪肝炎と肝線維化を呈した (Fig. 15 及び Fig. 16)。ob/ob マウスの NASH 病態進展が速い理由として、ob/ob マウスは、C57BL/6J マウスと KK-A^y マウスと比較して、肝病理学的な脂肪肝スコアと炎症スコアが高く (Fig. 17B 及び Fig. 18B)、ob/ob マウスに生じている重度な脂肪肝と肝炎症状態が、FFD 給餌による病態進展に対する感受性を高めた可能性が考えられる。

FFD 給餌 ob/ob マウスの肝臓において、飼料給餌 2 週時点から炎症及び線維化関連遺伝子の発現上昇が認められた (Fig. 25)。早期に変動する肝炎症及び線維化関連遺伝子発現は、非臨床における化合物の有効性評価に有用である可能性がある。さらに、FFD 給餌 ob/ob マウスの肝臓では、酸化ストレス、炎症、肝星細胞の活性化、ミトコンドリア障害及び肝細胞癌進展に関連した分子群が有意に変動していた (Fig. 23)。また、FFD 給餌 ob/ob マウスの肝臓では、肝星細胞活性化のマーカーである α SMA 遺伝子が有意に発現上昇しており (Fig. 25)、この結果は Krishnan らの既報で示されている、FFD 給餌 C57BL/6J マウスの肝臓における α SMA 陽性領域が増加するとの免疫組織学的評価結果と同様だった (Krishnan et al., 2017)。

FFD は、高脂肪、高フルクトース及び高コレステロール (i.e. 2% w/w) を含有した飼料である。遊離脂肪酸はミトコンドリア障害、酸化ストレス及び肝星細胞の活性化を促進することが知られている (Day, 2002)。また、フルクトースは肝臓における脂肪毒性の主要因子であり、NAFLD の病態進展に寄与している

(Jensen et al., 2018). 例えば、肥満患者において、グルコース摂取よりもフルクトース摂取が内臓脂肪蓄積の増加とインスリン感受性の低下を引き起こすこと (Stanhope et al., 2009), NAFLD 患者では健常人と比較してフルクトース摂取量が多く、フルクトース消費量と線維化進展との間に正の相関があることが報告されている (Abdelmalek et al., 2010). さらに、遊離コレステロールが肝星細胞を直接活性化するとの報告もなされており (Tomita et al., 2014), FFD が含有している高コレステロールが肝線維化進展を促進している可能性がある. これらの知見から, FFD が含有する過剰な脂肪, フルクトース及びコレステロールが, ob/ob マウスの肝臓における脂肪毒性を悪化させ, 脂肪肝炎と肝線維化進展を加速化させているのではないかと考えられる.

本研究では, FFD 給餌 C57BL/6J マウス及び FFD 給餌 KK-A^y マウスと比較して, FFD 給餌 ob/ob マウスの肝線維化が最も顕著だった (Fig. 16). レプチンは肝星細胞の活性化と肝線維化進展において重要な役割を演じており, また, MCD 給餌 NASH モデルや CCl₄ 誘発肝線維化モデルでは, 正常マウスと比較して, ob/ob マウスの肝線維化進展は弱いことが報告されている (Leclercq et al., 2002; Sahai et al., 2004). 本研究における FFD 給餌 ob/ob マウスの成績とこれらの知見は相反しており, 著者は, レプチンによる肝星細胞の活性化よりも, レプチン欠損が引き起こす肥満と高インスリン血症が, FFD 給餌 ob/ob マウスの脂肪肝炎と肝線維化に大きな影響を及ぼしていると推察している.

NAS によるスコアリングは, NASH 患者の診断や臨床試験における有効性評価の指標として広く使用されているにもかかわらず, 動物モデルにおいて ballooned hepatocytes が観察されるのは稀である (Kleiner et al., 2005; Liang et al., 2014). 本研究においても, すべての実験群において ballooned hepatocytes は観察されなかった (Fig. 19). この結果は, FFD 給餌 C57BL/6J マウスの肝臓では ballooned hepatocytes が観察されない既報と一致していた (Krishnan et al., 2017). これらの知見は, NAS はヒトサンプルに最適化された評価手法であり, NASH

モデルに対して肝病理評価手法を最適化する必要があることを示唆している (Liang et al., 2014; Morrison et al., 2018b). FFD 給餌 ob/ob マウスの肝臓において ballooned hepatocytes は観察されなかったが, ヒト NASH と病態モデルに共通した肝病理学的特徴である macrovesicular steatosis, microvesicular steatosis, hypertrophy 及び inflammatory aggregates が観察され (Fig. 21), NASH 患者の肝病理学的特徴である hCLS の数が有意に増加していた (Fig. 20). hCLS については, 他の NASH モデルである高脂肪食給餌 melanocortin-4 receptor 欠損マウスにおいても認められ, NASH 患者において, hCLS の数と ballooned hepatocytes との間に正の相関があること, 肝線維化が進行するにつれて hCLS の数が高値を示すことが報告されている (Itoh et al., 2013). 肝細胞とクッパー細胞における cholesterol crystals が hCLS 数の増加と関連していることも報告されていることから (Ioannou et al., 2015), FFD が含有している高コレステロールが肝臓中コレステロール濃度を有意に増加させ, hCLS の数を増加させることが推察される. 以上の知見から, FFD 給餌 ob/ob マウスの肝臓で観察された病理所見は, ヒト NASH の肝病理学的特徴を模倣していると考えられる.

Table 3 にはこれまで報告されている特殊飼料給餌 NASH モデルの特徴と FFD 給餌 ob/ob マウスの特徴を比較した表を示している. 高脂肪・高コレステロール食や高脂肪・高ショ糖食を給餌したモデルでは肥満・脂質異常・高インスリン血症を呈するものの, 脂肪肝炎や線維化の進展は弱い. 一方で, コリン欠乏食を給餌したモデルは, 肝病理学的に脂肪肝炎と炎症は顕著に認められるものの, 体重低下が認められ, 低インスリン血症が惹起される. また, 近年 新生仔期にストレプトゾトシン処置し, 離乳後に高脂肪食で給餌することで病態を惹起させる STAM マウスが NASH モデルとして報告されている (Fujii et al., 2013). STAM マウスは短期間で著明な脂肪肝炎と線維化を惹起することから NASH モデルとして期待されている. しかしながら, 本モデルはストレプトゾトシン処置により膵 β 細胞を破壊するためインスリン分泌不全となり, 欧米人

に多い高インスリン血症によるインスリン抵抗性の病態を模倣していない。一方、FFD 給餌 ob/ob マウスは、肥満・高インスリン血症を示し、かつ肝病理学的に顕著な脂肪肝炎と線維化を呈するマウス病態モデルであることから、欧米型 NASH 患者の特徴を有していると考えられる。

Table 3. Characteristics of several NASH models

	Obesity	Hyper insulinemia	Dyslipidemia (TG, Cholesterol)	ALT	steatohepatitis	Fibrosis	Refs.
高脂肪・ 高コレステロール食	+	+	+	+	+	+	Zheng et al., 2008
高脂肪・高ショ糖食	+	+	+	+	+	+	Ishimoto et al., 2013
コリン欠乏食	-	-	+	+	++	++	Sanches et al., 2015
STAMマウス	-	-	+	+	+++	+++	Fujii et al., 2013
FFD 給餌 ob/ob マウス	+	+	+	+	+++	+++	Abe et al., 2019

FFD 給餌 ob/ob マウスを用いた薬剤の有効性評価の際には、1) FFD 給餌と同時に薬剤介入を開始し、飼料給餌 2~4 週程度で上昇する病態マーカー (e.g. ALT, 肝炎症・線維化遺伝子) が薬剤により低下するか否かを評価する手法、2) FFD を 8~12 週程度給餌し、病態が惹起された段階から薬剤介入を開始し、治療効果を確認する手法、の 2 通りが考えられる。前者は、化合物のスクリーニング、後者は、最適化された化合物の有効性を検証する手法として有用である可能性がある。

本研究ではいくつか限界がある。一つ目は、本研究の目的が、マウス 3 系統における FFD 誘発及び CDAHFD 誘発 NASH モデルの長期解析であり、飼料給餌 30 週間の複数の時点で動物を解剖、臓器採取することにより病理組織学的特徴を解析したため、使用したマウスの例数が少なかったことである。統計解析の観点では、十分な例数ではなかったかもしれないが、様々な血漿中生化学パラメータ及び肝病理組織像の解析により、NASH モデルの特徴をプロファイリングすることができた。これにより、FFD 給餌 ob/ob マウスがヒト NASH の

代謝的特徴及び肝病理学的特徴を示すことを明らかにできた。また、FFD 給餌 ob/ob マウスが化合物の有効性評価において価値があることを評価するために、現在臨床試験で NASH 患者における有効性が認められているオベチコール酸 (FXR 作動薬) を用いて検証することが大切である。加えて、FFD 給餌 ob/ob マウスのヒト外挿性を更に明らかにするため、他の NASH モデルである Ldlr-/-Leiden マウスで実施されているトランスクリプトーム解析やメタボロミクス解析のような特徴付け (Morrison et al., 2018a; Morrison et al., 2018b) を試みる必要がある。また、本研究では CDAHFD 給餌モデルの遺伝子発現解析を実施しなかった。CDAHFD 給餌 C57BL/6J マウス及び CDAHFD 給餌 KK-A^y マウスの両モデルにおける代謝的特徴 (e.g. 血漿中インスリン濃度) がヒト NASH の特徴を示さなかったことから、CDAHFD 給餌モデルの詳細解析の優先順位を下げた。しかしながら、FFD 給餌モデルと CDAHFD 給餌モデルの遺伝子発現解析及びパスウェイ解析の結果比較は、病態モデルの特徴づけのために有用な情報となるかもしれない。

1.5 結論

FFD 給餌 ob/ob マウスはヒト NASH の代謝的特徴、肝病理学的特徴を複合的に模倣したマウス病態モデルであることが明らかとなった。今後、ヒト外挿性担保のための詳細解析やツール化合物を用いた検証試験により、FFD 給餌 ob/ob マウスは化合物の有効性評価のための非臨床モデルとして有用となる可能性がある。

第二章

ラット NASH モデルにおける鉄制限食の肝線維化抑制作用

2.1 緒言

鉄は活性酸素種 (reactive oxygen species; ROS) の生成を促進し、活性酸素種の増加は脂質過酸化、蛋白質変性、DNA 傷害を介して細胞毒性を引き起こす (Bacon and Britton, 1990; Olynyk et al., 2005; Pietrangelo, 2016). 故に、組織中の鉄過剰状態は酸化ストレスと炎症を誘導し、臓器障害を引き起こす. 例えば、*Hfe* 遺伝子の欠損により引き起こされる遺伝性ヘモクロマトーシスは、鉄吸収抑制因子であるヘプシジンの産生が低下し、十二指腸における鉄吸収が亢進する. その結果、肝臓において鉄が過剰に蓄積し、肝障害が生じる (Andrews, 1999). 加えて、肝臓における鉄過剰状態は肝細胞癌の発症リスクを増加させる (Kowdley, 2004; Pietrangelo, 2009). 鉄過剰症の治療法として、生体内の鉄を低下させる瀉血療法や鉄キレート療法が確立されている (Bacon et al., 2011; European Association For The Study Of The, 2010; Musallam et al., 2013).

鉄過剰状態は、約 30 % の nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) と nonalcoholic steatohepatitis (NASH) 患者において認められる (Fargion et al., 2001; George et al., 1998; Sumida et al., 2003). フェリチンは鉄を貯蔵する蛋白であり、鉄過剰状態で増加することが一般的に知られている. そして血清中フェリチン濃度から、NAFLD 患者における肝病理的所見の悪化と肝線維化進展を予測できる (Kowdley et al., 2012). NASH 患者では、十二指腸における鉄吸収が亢進しており、それが肝臓における鉄蓄積を促進させる因子の一つとして病態進展に影響を及ぼす可能性が示されている. 実際に、鉄過剰症の治療法の一つである瀉血療法は、鉄過剰を合併した NASH 患者の血清 alanine transaminase (ALT) 濃度と NAFLD activity score を改善する (Hoki et al., 2015). また、生体内から鉄を排出させる瀉血療法は高フェリチン血症を合併した NAFLD 患者のインスリ

ン抵抗性を改善する (Valenti et al., 2007). これらの知見は, 生体内の過剰鉄は正が NASH 治療において有用であることを示唆している.

非臨床においては, ラット choline-deficient L-amino acid-defined (CDAA) 食誘発 NASH モデル (以下, CDAA ラット) において, 鉄キレート剤である deferoxamine (DFO) と deferasirox (DFX) が病態進展抑制作用を示すことが報告されている (Kaji et al., 2011; Sakaida et al., 1999). DFO 投与により, CDAA ラットの肝臓中鉄含量と酸化ストレスが低下し, 前癌病変が改善されること, また, DFX は CDAA ラットの肝臓における酸化ストレス, 血管新生及び星細胞の活性化を抑制することが報告されている (Kaji et al., 2011). 更に, CDAA ラットに対する食餌中の鉄制限は肝臓中の DNA と脂質過酸化を含む酸化ストレスを軽減することも報告されている (Yoshiji et al., 1992) が, 食餌中の鉄制限が CDAA ラットの肝線維化進展や他の肝病理所見に対して効果を示すか否かについては明らかでない.

著者は, NASH モデルである CDAA ラットの肝臓中鉄含量, 酸化ストレス, 炎症及び線維化に対する鉄制限食の治療効果を明らかにすることを目的として研究を行った.

2.2 方法

2.2.1 使用動物

日本エスエルシー (Tokyo, Japan) より 3 週齢の雄性 F344 ラットを購入し、実験に供した。すべてのマウスは 12 時間の明暗周期で飼育した。室温は $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 、湿度は $50 \pm 20\%$ となるように制御した。本実験は、プロトコールが田辺三菱製薬株式会社の動物実験委員会により承認されたのち実施した。

1.2.2 実験プロトコール

3 週間の順化飼育後 (6 週齢)、ラットを体重により群分けし、choline-sufficient amino acid-defined diet (CSAA 食, コントロール食, A06083102, Research Diet, United States), choline-deficient L-amino acid-defined diet (CDAA 食, A06083101, Research Diet, United States) 或いは iron-restricted CDAA diet (鉄制限 CDAA 食, A06083105, Research Diet, United States) の給餌を開始した。CSAA 食, CDAA 食及び鉄制限 CDAA 食の鉄含量はそれぞれ 58.5 mg/kg, 58.5 mg/kg 及び 0.5 mg/kg だった。Table 4.及び 5 にはそれぞれ CSAA 食 (A06083102), CDAA 食 (A06083101) 及び鉄制限 CDAA 食 (A06083105) の特殊飼料の組成を示した。体重及び摂餌量は 12 週間の給餌期間を通して測定した。血清は飼料給餌 0, 1, 2, 4, 8 及び 12 週の時点で尾静脈より採取し、血清中生化学パラメータ解析に供した。飼料給餌 4, 8 及び 12 週の時点において、動物をイソフルラン麻酔下で開腹後、腹部大静脈から採血し安楽死とした。各種パラメータ解析のため、肝臓と血漿を採取した。

Table 4. CSAA 食 (A06083102) 及び CDAA 食 (A06083101)

A06083101 and A06083102

L-Amino Acid Diet Without or With Added Choline

Product #	A06083101		A06083102	
	gm	kcal	gm	kcal
Protein	14.4	12.9	14.3	12.9
Carbohydrate	61.7	56.7	61.6	56.7
Fat	15.0	30.4	15.0	30.4
Total	91.1	100.0	90.9	100.0
Ingredient (gm)	gm	kcal	gm	kcal
L-Alanine	5.1	20.4	5.1	20.4
L-Arginine	12.7	50.8	12.7	50.8
L-Methionine	1.7	6.8	1.7	6.8
L-Aspartate	15.8	63.2	15.8	63.2
L-Cystine	3.7	14.8	3.7	14.8
L-Glutamate	28.9	115.6	28.9	115.6
Glycine	6.2	24.8	6.2	24.8
L-Histidine-HCl-H ₂ O	3.4	13.6	3.4	13.6
L-Isoleucine	6.1	24.4	6.1	24.4
L-Leucine	10.5	42	10.5	42
L-Lysine-HCl	9.1	36.4	9.1	36.4
L-Phenylalanine	7.3	29.2	7.3	29.2
L-Proline	7.6	30.4	7.6	30.4
L-Serine	7.2	28.8	7.2	28.8
L-Threonine	4.6	18.4	4.6	18.4
L-Tryptophan	1.8	7.2	1.8	7.2
L-Tyrosine	5.7	22.8	5.7	22.8
L-Valine	6.3	25.2	6.3	25.2
Sucrose	406.67	1626.68	406.67	1626.68
Corn Starch	100	400	100	400
Maltodextrin	100	400	100	400
Cellulose	50	0	50	0
Corn Oil	50	450	50	450
Primex	100	900	100	900
Mineral Mix S10001	35	0	35	0
Sodium Bicarbonate	4.3	0	4.3	0
Vitamin Mix V10001	10	90	10	90
Ferric Citrate	0.12	0	0.12	0
Choline Bitartrate	0	0	2	0
Total	999.79	4441.5	1001.79	4441.5

Research Diets, Inc. See Biochem Biophys Res Commun. 2004 Feb 27;315(1):187-95.

A06083102.for.xls

Table 5. CDAA 食 (A06083101) 及び 鉄制限 CDAA 食 (A06083105)

A06083101 and A06083105

L-Amino Acid Diet Without Added Choline Based on Dyets #518753

Product #	A06083101		A06083105	
	gm	kcal	gm	kcal
Protein	14	13	14	13
Carbohydrate	62	57	62	57
Fat	15	30	15	30
Total		100		100
Ingredient (gm)	gm	kcal	gm	kcal
L-Alanine	5.1	20	5.1	20
L-Arginine	12.7	51	12.7	51
L-Methionine	1.7	7	1.7	7
L-Aspartate	15.8	63	15.8	63
L-Cystine	3.7	15	3.7	15
L-Glutamate	28.9	116	28.9	116
Glycine	6.2	25	6.2	25
L-Histidine-HCl-H ₂ O	3.4	14	3.4	14
L-Isoleucine	6.1	24	6.1	24
L-Leucine	10.5	42	10.5	42
L-Lysine-HCl	9.1	36	9.1	36
L-Phenylalanine	7.3	29	7.3	29
L-Proline	7.6	30	7.6	30
L-Serine	7.2	29	7.2	29
L-Threonine	4.6	18	4.6	18
L-Tryptophan	1.8	7	1.8	7
L-Tyrosine	5.7	23	5.7	23
L-Valine	6.3	25	6.3	25
Sucrose	406.67	1627	406.67	1627
Corn Starch	100	400	100	400
Maltodextrin	100	400	100	400
Cellulose	50	0	0	0
Avicel	0	0	50	0
Corn Oil	50	450	50	450
Primex	100	900	100	900
Mineral Mix S10001	35	0	0	0
Mineral Mix S18703	0	0	35	0
Sodium Bicarbonate	4.3	0	4.3	0
Vitamin Mix V10001	10	90	10	90
Ferric Citrate	0.12	0	0	0
Choline Bitartrate	0	0	0	0
FD&C Yellow Dye #5	0	0	0.025	0
FD&C Red Dye #40	0	0	0.025	0
FD&C Blue Dye #1	0	0	0	0
Total	999.79	4441	999.72	4441

Research Diets, Inc.

MitsubishiTanabe10.for

1.2.3 血清及び肝臓中生化学パラメータ解析

血清 alanine aminotransferase (ALT) 活性は DRI-CHEM 3500 (FUJIFILM, Tokyo, Japan) を用いて測定した。血清中フェリチン濃度は、ラットフェリチン定量 ELISA キット (Rat Ferritin Quantification ELISA Kit, LSI Medience, Tokyo, Japan) を用いて測定した。血清鉄は、Iron assay kit LS (Metallogenics Co., Ltd., Chiba, Japan) を用いて測定した。すべての測定はキットの手順書に沿って測定した。

1.2.4 肝病理解析

肝病理解析に用いる肝臓は外側左葉から切り出した。切り出した肝臓は 10% ホルマリンで固定し、パラフィン包埋し、ミクロトーム (RM2255, Leica microsystems, Wetzlar, Germany) を用いて 4 μ m の組織切片を作成した。NAFLD activity scores (NAS) (Brunt et al., 2011) 及び Sirius Red 陽性面積評価のため、各組織切片をそれぞれ hematoxylin and eosin (HE) 及び Sirius Red により染色した。Sirius Red 陽性面積は ImageJ software (National Institute of Health, MD, USA) により定量した。組織像は DFC-280 camera (Leica microsystems) を用いて撮影した。肝臓中铁含量を評価するため、組織切片を Prussian blue (Wako, Tokyo, Japan) により染色し、陽性面積をスコアリングした。組織切片当たりの陽性面積のクライテリアを 0, <1%, 1%–5% 及び >5% に設定し、それぞれ 0, 1, 2 及び 3 の鉄スコアとした。

1.2.5 肝組織免疫染色

採取した肝臓は、組織包埋試薬である OCT compound (Sakura Finetek, Torrance, CA, USA) を用いて凍結した。凍結した肝臓から、クリオスタットを用いて厚さ 5 μ m の組織切片を作成し、スライドグラス上で乾燥させた。

CD68 陽性面積を評価するため、肝組織切片を 0.03% の過酸化水素溶液で洗浄し、ブロッキング溶液 (Block Ace Powder, DS Pharma Biomedical, Osaka, Japan)

に室温で 1 時間インキュベートした。マクロファージを標識するため、mouse anti-rat CD68 antibody (1:100, MCA341R, AbD SeroTec, Inc., Oxford, UK) に室温で 1 時間インキュベートした。phosphate-buffered saline (PBS) により数回洗浄した後、肝組織切片を peroxidase-labeled goat anti-mouse IgG antibody (1:100, P0447, Dako, Tokyo, Japan) に室温で 30 分間インキュベートし、発色基質である chromogenic substrate (Simple stain DAB, H1202, Nichirei Biosciences, Inc., Tokyo, Japan) にインキュベートした。免疫染色した肝組織切片は Aquatex (108562, Merck, Germany) を用いて封入し、組織像は DFC-280 camera (Leica microsystems) により取得した。CD68 陽性面積は ImageJ software (National Institute of Health) により定量した。

8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) 陽性面積を評価するために、肝組織切片を PBS で洗浄し、ブロッキング溶液 (Block Ace Powder, DS Pharma Biomedical, Osaka, Japan) に室温で 10 分間インキュベートした。8-OHdG を標識するため、mouse anti 8-OHdG antibody (1:100, MOG100P, Japan Institute for the Control of Aging, Shizuoka, Japan) に室温で 1 時間インキュベートした。PBS により数回洗浄した後、肝組織切片を HRP-labeled anti-mouse antibody 414171, Nichirei Biosciences) にインキュベートした。その後、発色基質である chromogenic substrate (Simple stain DAB, H1202, Nichirei Biosciences, Inc., Tokyo, Japan) にインキュベートした。免疫染色した肝組織切片は Aquatex (108562, Merck, Germany) を用いて封入し、組織像は DFC-280 camera (Leica microsystems) により取得した。8-OHdG 陽性面積は ImageJ software (National Institute of Health) により定量した。

1.2.6 統計解析

実験結果は、平均値 ± SEM で示した。群間の比較は、EXSUS ver. 8.1 (CAC Croit Corporation) を用いて解析した。3 群間の比較は、分散分析 (ANOVA) を

行った後, Tukey の多重比較により解析した. p 値が 0.05 未満であった場合, 統計学的に有意差があると判断した.

2.3 結果

2.3.1 鉄制限食は CDAA ラット血清鉄と血清 ALT 活性を低下させる.

鉄制限食の給餌が、CDAA ラットの体重と摂餌量に及ぼす影響を検討するため、経週の体重と摂餌量を測定した.

CDAA ラットの体重は、飼料給餌期間を通じて、コントロール群（CSAA 食給餌ラット）と比較して有意に低値を示した. 鉄制限食給餌は CDAA ラットの体重に影響を及ぼさなかった (Fig. 26A). 摂餌量については、群間で有意な差は認められなかった (Fig. 26B).

さらに、鉄制限食の給餌が、CDAA ラットの血中の鉄指標と肝機能パラメータに及ぼす影響を検討するため、経週の血清鉄と血清 ALT 活性を測定した.

CDAA ラットの血清鉄は、コントロールと比較して飼料給餌 4, 8 及び 12 週時点において有意に高値を示した. 鉄制限食給餌は CDAA ラットの血清鉄を有意に低下させた (Fig. 26C). また、CDAA ラットの血清 ALT 活性は、コントロールと比較して有意に高値を示した. 飼料給餌 8 週の時点において、鉄制限食は CDAA ラットの血清 ALT 活性を有意に低下させた (Fig. 26D).

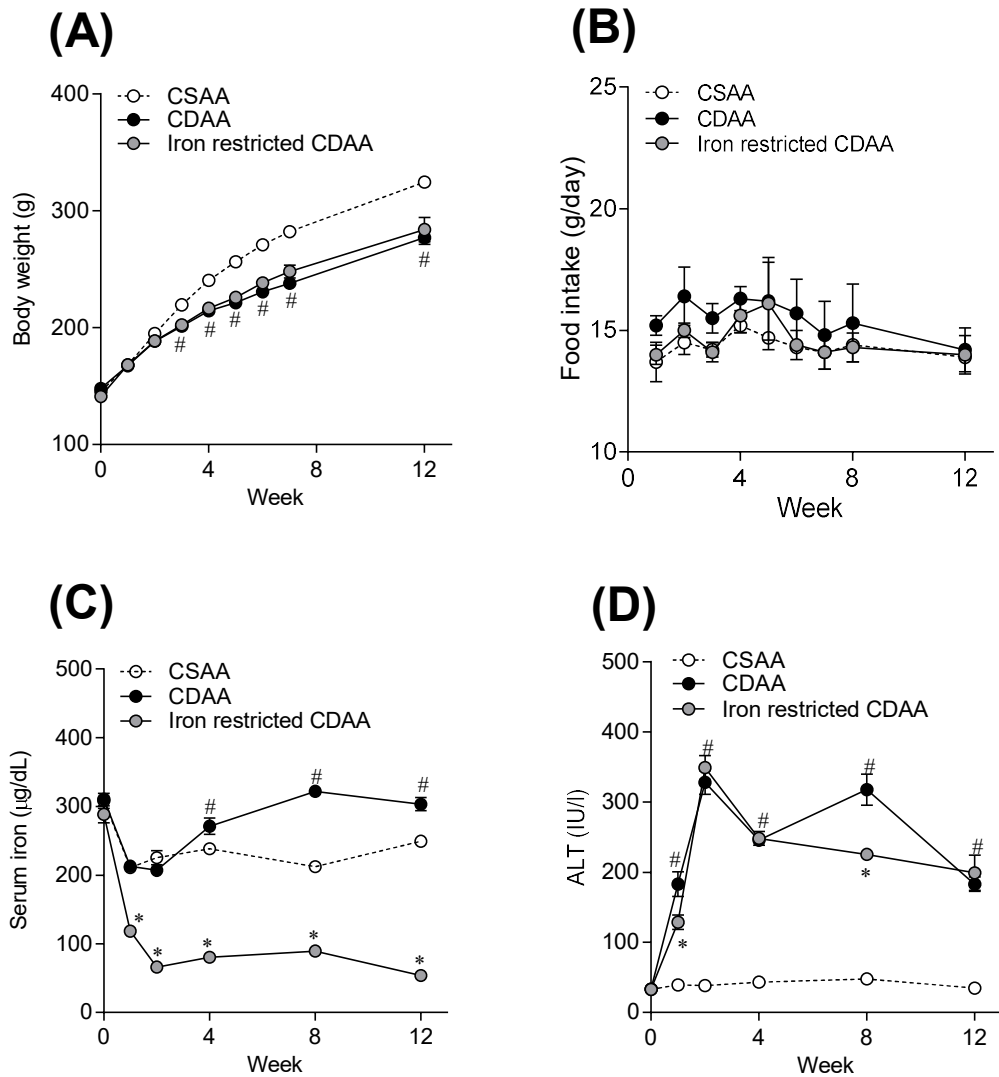


Fig. 26. Body weight, food intake, serum iron levels, and serum ALT changes at 12 weeks in rats fed CSAA, CDAA, and iron-restricted CDAA diets

(A) Body weight. (B) Food intake. (C) Serum iron levels. (D) Serum ALT levels. Values are mean \pm SEM, $n = 18$ (0–4 weeks), $n = 12$ (5–8 weeks), and $n = 6$ (9–12 weeks). # $P < 0.05$ CDAA diet-group versus CSAA diet-group. * $P < 0.05$ CDAA group versus iron-restricted CDAA group (One-way ANOVA with post-hoc Tukey's test).

2.3.2 鉄制限食は CDAA ラットの肝臓中鉄含量と血清中フェリチン濃度を低下させる.

鉄制限食の給餌が, CDAA ラットの肝組織中の鉄指標に及ぼす影響を検討するため, 経週的に肝病理学的な肝臓中鉄含量のスコアリングと臓器中の鉄量を反映した血清指標である血清中フェリチン濃度を測定した.

Fig. 27A には, 飼料給餌4, 8及び12週において Prussian blue 染色を行った際に得られた典型的な染色結果を示している. CDAA 食と CSAA 食の飼料中鉄含量は等しいにも関わらず, CDAA ラットの肝臓中鉄沈着は, 飼料給餌12週の時点において, コントロールと比較して有意に高値を示した (Fig. 27B). CDAA ラットの肝組織中の鉄沈着は, 特に肝実質細胞以外のマクロファージ等の網内皮系の細胞に観察された. 血清中フェリチン濃度は, 飼料給餌4週では個体間の変動が大きかったものの, 飼料給餌8週及び12週の時点において, コントロールと比較して有意に高値を示した (Fig. 27C). 以上の結果は, CDAA ラットが肝臓における鉄過剰状態を示すモデルであることを示している. また, 鉄制限食は, CDAA ラットの肝臓中鉄沈着と血清中フェリチン濃度を有意に低下させた (Fig. 27B, C).

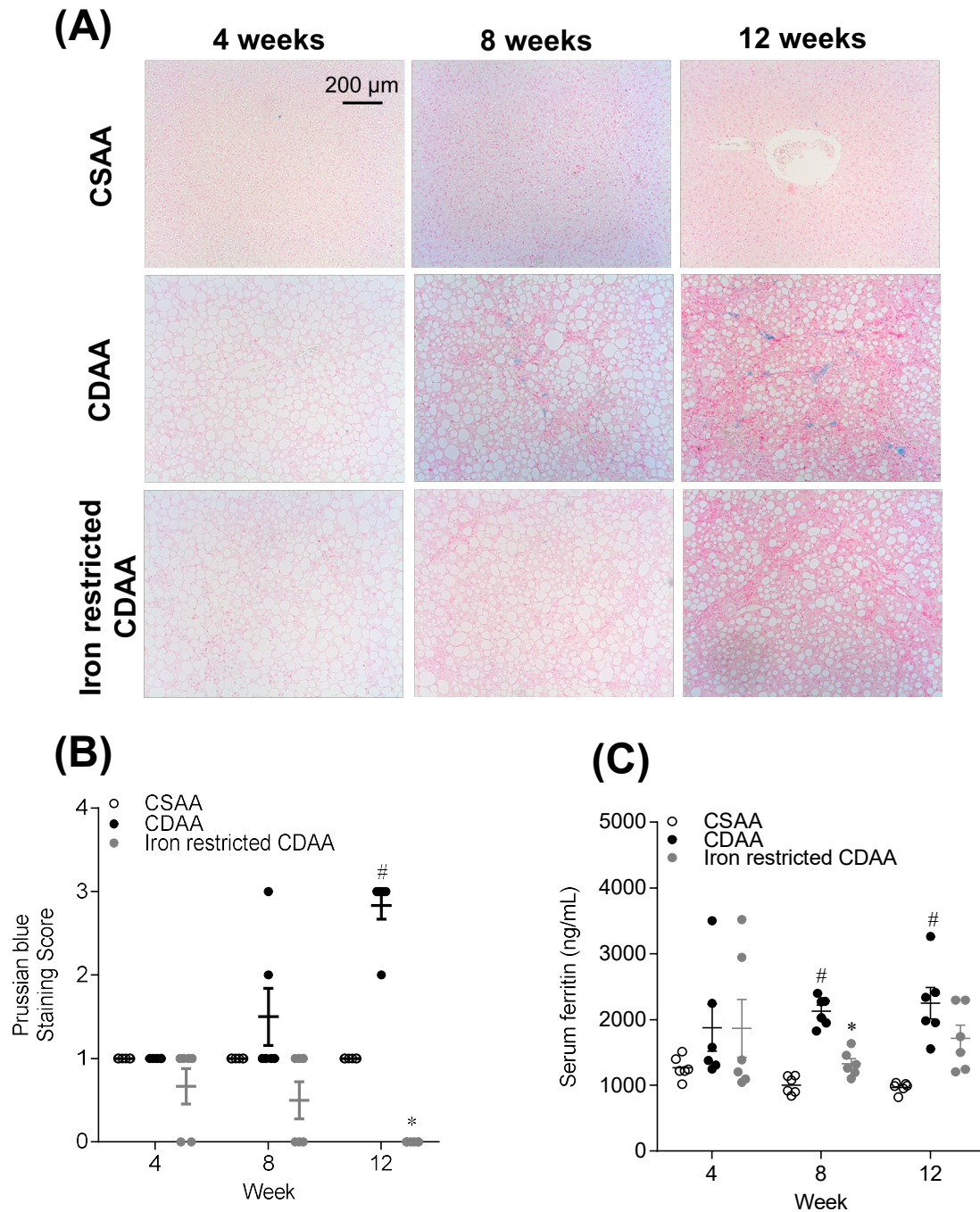


Fig. 27. Representative Prussian blue-stained liver sections and staining scores at 4, 8, and 12 weeks in rats fed CSAA, CDAA, and iron-restricted CDAA diets

(A) Typical Prussian blue-stained liver sections. (B) Prussian blue staining score. (C) Serum ferritin levels. Values are mean \pm SEM, $n = 6$. $^{\#}P < 0.05$ CDAA group versus CSAA group. $^{*}P < 0.05$ CDAA group versus iron-restricted CDAA group (One-way ANOVA with post-hoc Tukey's test). Scale bars are 200 μm .

2.3.3 鉄制限食は CDAA ラットの NAFLD activity score に影響を及ぼさない.

鉄制限食の給餌が、CDAA ラットの NASH 病態進展に及ぼす影響を検討するため、臨床において NASH の肝病理学的な診断に用いられている NAFLD activity score (NAS) を経週の的に評価した.

Fig. 28A には、飼料給餌4, 8及び12週において HE 染色を行った際に得られた典型的な染色結果を示している. CDAA ラットの NAS は、コントロールと比較して有意に高値を示したが、鉄制限食給餌群と CDAA 食給餌群との間に差は認められなかった (Fig. 28B).

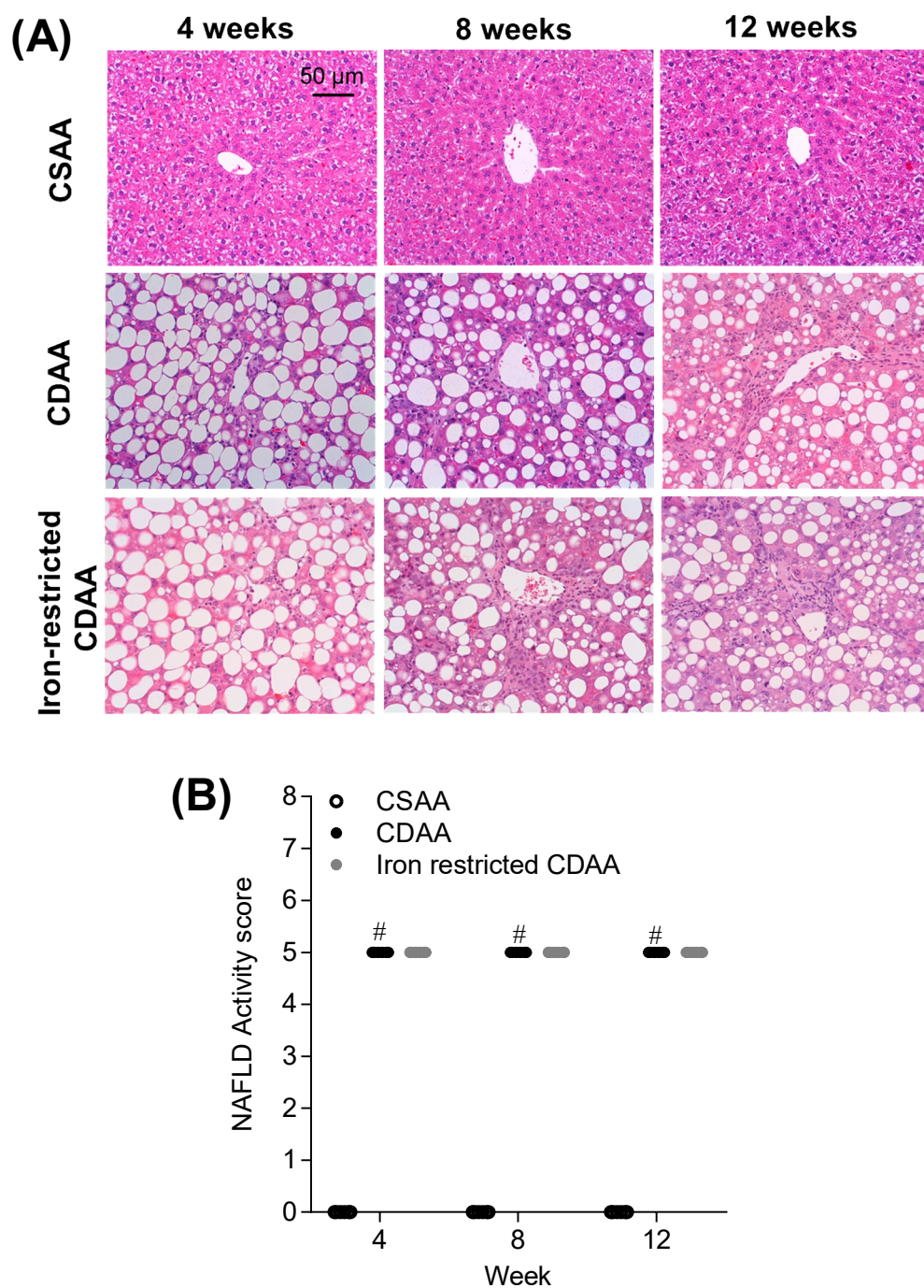


Fig. 28. Representative HE-stained liver sections and total NAFLD activity scores at 4, 8, and 12 weeks in rats fed CSAA, CDAA, and iron-restricted CDAA diets

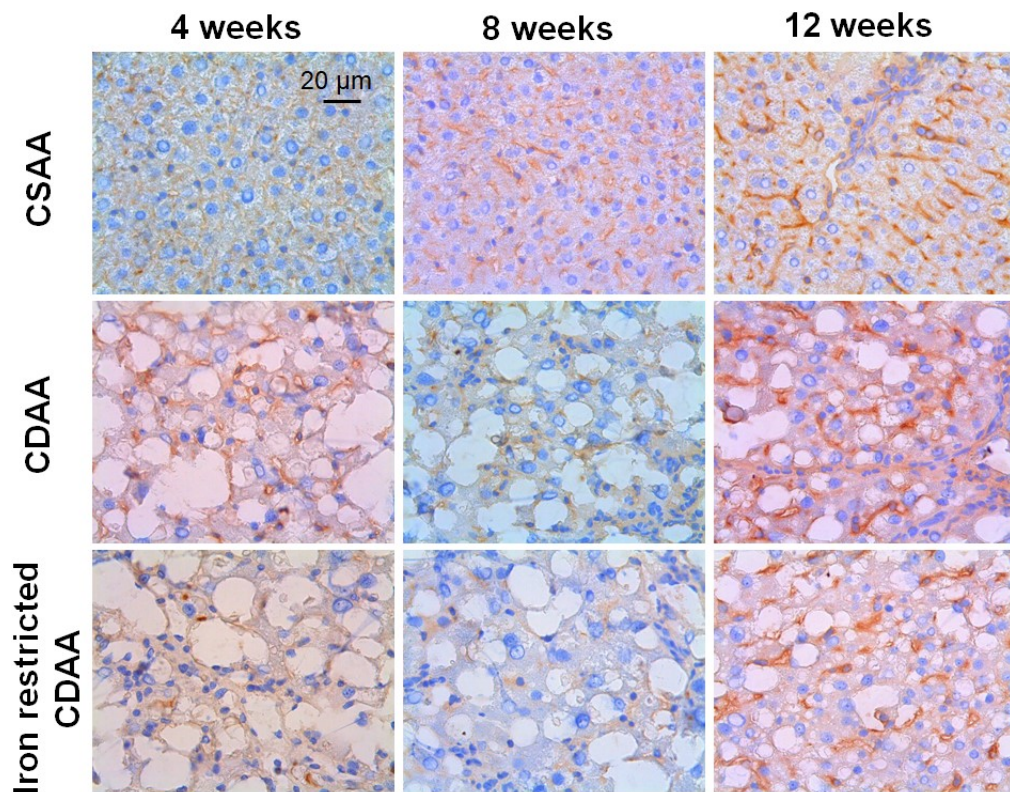
(A) Typical images of HE-stained liver sections. (B) Total NAFLD activity score. Values are mean \pm SEM, $n = 6$. $^{\#}P < 0.05$ CDAA group versus CSAA group. (One-way ANOVA with post-hoc Tukey's test). Scale bars are 50 μ m.

2.3.4 鉄制限食は CDAA ラットの肝臓中 8-OHdG 陽性細胞数を低下させる.

鉄制限食の給餌が，CDAA ラットの肝組織中の酸化ストレスに及ぼす影響を検討するため，肝病理学的な 8-OHdG 染色により，肝臓中 8-OHdG 陽性細胞数を経週の的に評価した．

Fig. 29A には，飼料給餌4，8及び12週において 8-OHdG 染色を行った際に得られた典型的な染色結果を示している．CDAA ラットの肝臓中 8-OHdG 陽性細胞数は，コントロールと比較して飼料給餌4週において有意に高値を示し，12週において高値傾向を示した．鉄制限食給餌は，飼料4週及び12週において，CDAA ラットの肝臓中 8-OHdG 陽性細胞数を有意に低下させた（Fig. 29B）．この結果から，鉄制限食は CDAA ラット肝臓中の酸化ストレスを低下させることが示された．

(A)



(B)

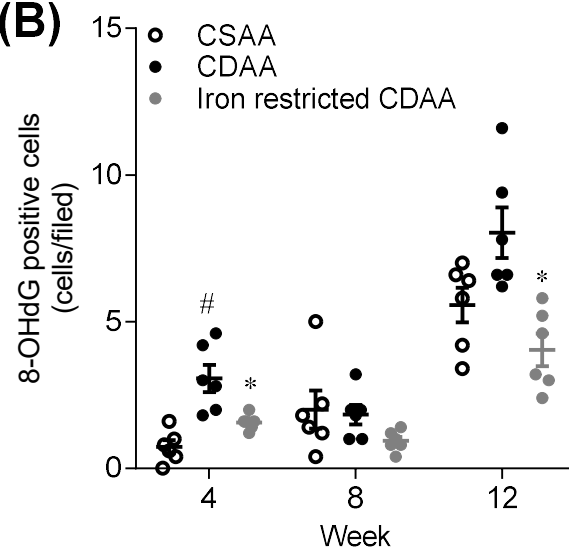


Fig. 29. Representative 8-OHdG-stained liver sections and positive cells at 4, 8, and 12 weeks in rats fed CSAA, CDAA, and iron-restricted CDAA diets

(A) Typical images of 8-OHdG stained liver sections. (B) The number of 8-OHdG positive cells. Values are mean \pm SEM, $n = 6$. [#] $P < 0.05$ CDAA group versus CSAA group. ^{*} $P < 0.05$ CDAA group versus iron-restricted CDAA group (One-way ANOVA with post-hoc Tukey's test). Scale bars are 20 μ m.

2.3.5 鉄制限食は CDAA ラットの肝臓中 CD68 陽性マクロファージ面積を低下させる.

鉄制限食の給餌が, CDAA ラットの肝組織中の炎症に及ぼす影響を検討するため, 肝病理学的な CD68 染色により, 肝臓中 CD68 陽性マクロファージ面積を経過的に評価した.

Fig. 30A には, 飼料給餌4, 8及び12週において CD68 染色を行った際に得られた典型的な染色結果を示している. CDAA ラットの肝臓中 CD68 陽性マクロファージ面積は, コントロールと比較して有意に高値を示した. 鉄制限食給餌は, 飼料給餌12週において, CDAA ラットの肝臓中 CD68 陽性マクロファージ面積を有意に低下させた (Fig. 30B).

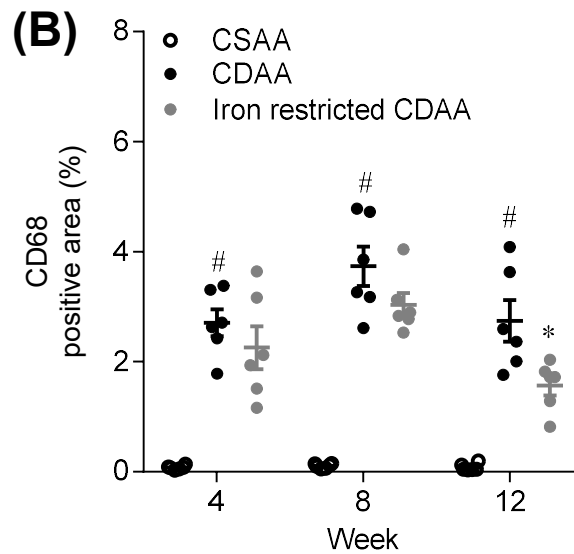
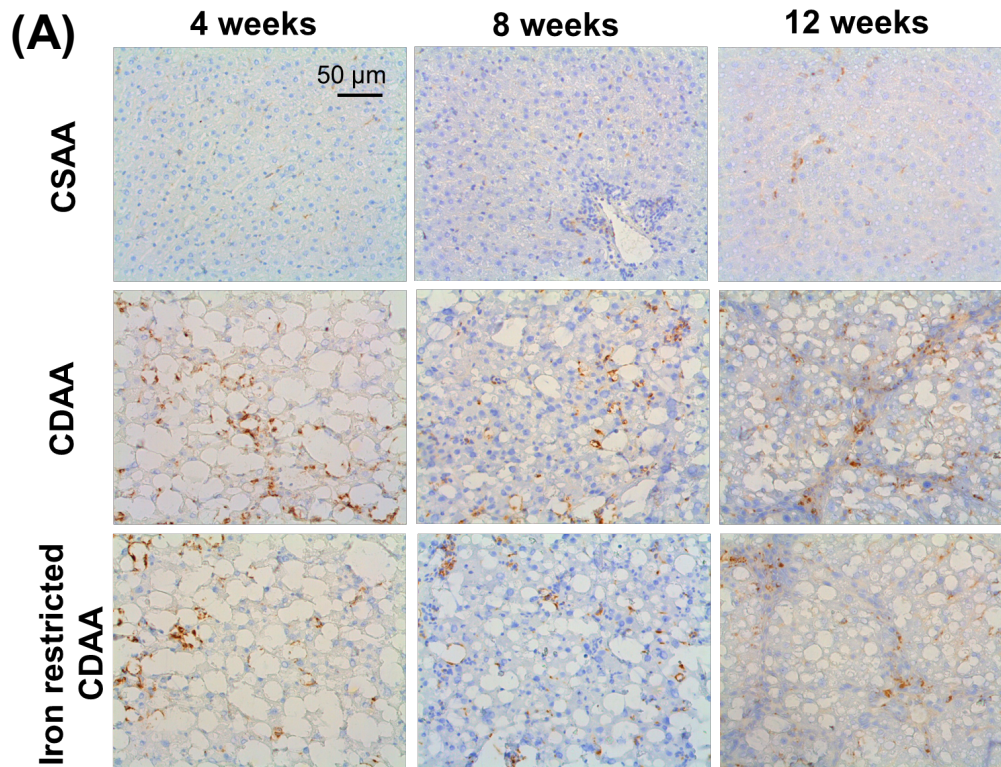


Fig. 30. Representative CD68-stained liver sections and positive macrophages at 4, 8, and 12 weeks in rats fed CSAA, CDA, and iron-restricted CDA diets

(A) Typical images of CD68 stained liver sections. (B) CD68 positive area. Values are mean \pm SEM, $n = 6$. [#] $P < 0.05$ CDA group versus CSAA group. ^{*} $P < 0.05$ CDA group versus iron-restricted CDA group (One-way ANOVA with post-hoc Tukey's test). Scale bars are 50 μm .

2.3.6 鉄制限食は CDAA ラット肝臓中 Sirius Red 陽性面積を有意に低下させる.

鉄制限食の給餌が，CDAA ラットの肝線維化に及ぼす影響を検討するため，肝病理学的な Sirius Red 染色により，肝線維化を経過的に評価した．

Fig. 31A には，飼料給餌4，8及び12週において Sirius Red 染色を行った際に得られた典型的な染色結果を示している．CDAA ラットの肝臓中 Sirius Red 陽性面積はコントロールと比較して有意に高値を示した．飼料給餌12週の CDAA ラット肝臓において時点では **Bridging fibrosis** (線維の架橋形成) が認められた．鉄制限食給餌は，CDAA ラットの肝臓中 Sirius Red 陽性面積を有意に低下させた (Fig. 31B)．この結果から，鉄制限食は CDAA ラットにおける肝線維化を抑制することが示された．

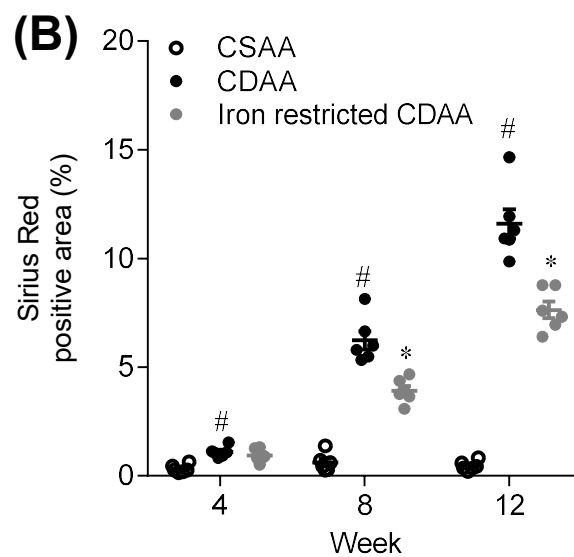
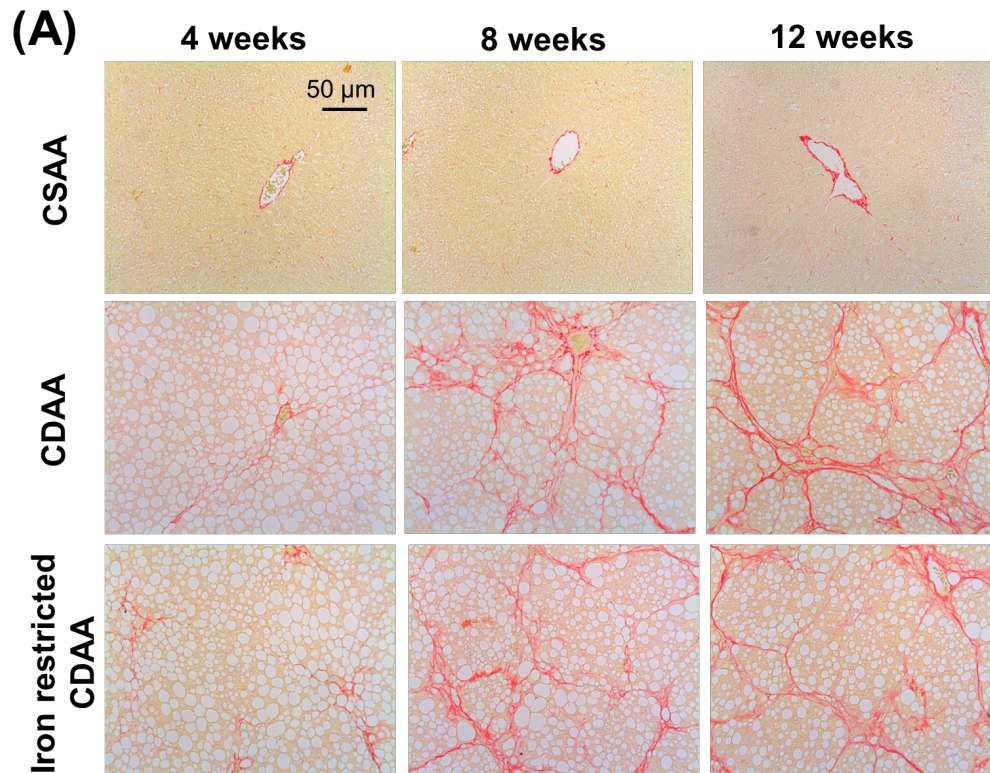


Fig. 31. Representative Sirius Red-stained liver sections and positive areas at 4, 8, and 12 weeks in rats fed CSAA, CDA, and iron-restricted CDA diets

(A) Typical images of Sirius Red-stained liver sections. (B) Sirius Red positive area. Values are mean \pm SEM, $n = 6$. # $P < 0.05$ CDA group versus CSAA group. * $P < 0.05$ CDA group versus iron-restricted CDA group (One-way ANOVA with post-hoc Tukey's test). Scale bars are 50 μ m.

2.4 考察

著者は、雄性 F344 ラットに対し CSAA 食（コントロール食）、CDAA 食、或いは鉄制限 CDAA 食をそれぞれ12週間給餌することにより、CDAA ラットにおける鉄制限食の病態進展に対する抑制作用について検討した。その結果、鉄制限食は、CDAA ラット肝臓中の鉄含量を低下させ、酸化ストレス、炎症、及び線維化進展を抑制することが示された。

ヒドロキシラジカルは、二価鉄、三価鉄及び過酸化水素の反応により生成され、生成されたヒドロキシラジカルは脂質、DNA、RNA、及び蛋白質と強力に反応し（フェントン反応）、脂質過酸化、DNA 傷害及びタンパク質変性を引き起こすことで細胞を傷害する。遺伝性ヘモクロマトーシスやサラセミアといった鉄過剰症患者では、肝臓における過剰な鉄沈着が組織障害や線維化を引き起こすことが報告されている（Bacon and Britton, 1990; Pietrangelo, 2002）。ヒドロキシラジカルとグアノシンの反応により生成される 8-OHdG は DNA 傷害と細胞傷害を引き起こし、NAFLD の炎症及び線維化進展に寄与する（Cheng et al., 1992; Kitada et al., 2001）。特に、肝細胞癌を合併していない NASH 患者と比較して、肝細胞癌を合併している NASH 患者において 8-OHdG は高値を示すことから、フェントン反応により鉄が誘導する 8-OHdG は NASH 患者における肝細胞癌の進展に寄与していることが示唆されている（Tanaka et al., 2013）。

F344 ラットに対する CDAA 食給餌は肝臓中の鉄含量、8-OHdG 陽性細胞数、CD68 陽性マクロファージを有意に増加させ、線維化を引き起こした。NASH 患者において、食事由来の鉄吸収増加は肝臓における過剰な鉄蓄積に寄与していることが報告されている（Valenti et al., 2012）。本研究では、CDAA 食と CSAA 食の飼料中铁含量が等しいにもかかわらず、CDAA ラットの血清鉄と肝臓中铁含量はコントロールと比較して有意に高値を示したことから、CDAA ラットでは十二指腸における食事由来の鉄吸収が増加していることが推察された。

本研究において、CDAA ラットの肝組織中の鉄沈着は、特に肝実質細胞以外のマクロファージ等の網内皮系の細胞に観察された。NASH 患者において、肝臓中の網内皮系細胞における鉄沈着は、アポトーシスや酸化ストレスの発生と関連している (Maliken et al., 2013)。十二指腸における食事由来の鉄吸収増加が肝臓中の網内皮系細胞の過剰な鉄沈着を引き起こし、酸化ストレスや炎症を惹起させることが推察された。これらの網内皮系細胞における肝毒性環境が、NASH における線維化進展を悪化させる可能性があるかもしれない。

本研究では、鉄制限食が CDAA ラットの血清鉄、肝臓中鉄含量を低下させ、酸化ストレス、炎症、及び線維化の進展を抑制することが示された。これらの結果は、過去に報告されている他の肝線維化モデルにおける鉄制限食の治療効果と一致していた。例えば、チオアセトアミド (TAA) 誘発肝線維化ラットにおいて、鉄制限食は、肝臓中鉄含量、酸化ストレス、炎症、線維化を改善し、更に肝臓中の 8-OHdG、肝線維化関連遺伝子発現及び生存率を有意に改善することが報告されている (Otogawa et al., 2008)。他の研究では、鉄キレート剤である deferoxamine (DFO) と deferasirox (DFX) が CDAA ラットの病態進展を抑制することが報告されている。これらの研究では、CDAA ラットへの鉄キレート剤投与により、肝臓において酸化ストレス (e.g., glutathione S-transferase, 8-OHdG, and malondialdehyde) が低下し、さらに肝線維化及び肝星細胞の活性化 (e.g., the α -smooth muscle actin 陽性面積) が改善された (Kaji et al., 2011; Sakaida et al., 1999)。今後、CDAA ラットにおける鉄制限食の病態進展抑制作用の機序を明らかにするために、既報と同様の肝遺伝子発現解析や他の酸化ストレス指標等を詳細に解析する必要がある。

鉄過剰症において、除鉄療法としての瀉血や鉄キレート療法は標準治療となっている (Bacon et al., 2011; European Association For The Study Of The, 2010; Musallam et al., 2013)。一方、NASH 患者における除鉄療法の効果の詳細は明らかではないが、幾つかの研究において、瀉血及び鉄制限食は高フェリチン血症

を有した NAFLD 患者において有効であることが示唆されている (Kaji et al., 2011; Sakaida et al., 1999; Sumida et al., 2009; Valenti et al., 2007). 例えば, Valenti らは, 遺伝性ヘモクロマトーシスの原因である *Hfe* 遺伝子変異を保有している NAFLD 患者において瀉血はインスリン抵抗性を改善することが報告している (Valenti et al., 2007). また, 高フェリチン血症を合併した NAFLD 患者において, 瀉血は血清 ALT 活性や AST 活性といった肝逸脱酵素を低下させるという報告がある (Valenti et al., 2014). Hoki らは, 消化管内の鉄吸収が亢進し鉄過剰を合併した NASH 患者において, 48カ月間の瀉血と鉄制限食による除鉄は, 肝臓中 8-OHdG と NAFLD activity score を低下させること (Hoki et al., 2015), さらに, Yamamoto らは, NAFLD 患者において, 6カ月間の鉄制限食による除鉄は, 血清 AST 活性, ALT 活性及びフェリチン濃度を有意に低下させることを報告している (Yamamoto et al., 2007). これらの既報と今回の研究結果より, 鉄過剰を合併した NASH 患者において除鉄療法は新規治療アプローチとして有望であるかもしれない. 特に, 瀉血療法が引き起こす代償的な消化管からの鉄吸収亢進を是正するため, 鉄制限食による維持療法としての使用が有望である可能性がある. 更に, 鉄キレート剤は腎障害や肝障害等の副作用を引き起こすことから, 鉄キレート剤の代替として鉄制限食による治療が有望である可能性がある.

しかしながら本研究には幾つかの限界がある. まず, 雄性 F344 ラットのみを試験に供したという点である. 雄性ラットと雌性ラットの性差が生体内の鉄代謝と NASH 病態進展に影響を及ぼす可能性があるため, 今後詳細な検討が必要である. また, CDAA ラットにおける鉄制限食の病態進展抑制作用の機序解析が限定的だったという点が挙げられる. 鉄が ROS の形成を促進し, 脂質過酸化, 蛋白質変性, DNA傷害を介して細胞傷害を引き起こすことは報告されている (Bacon and Britton, 1990; Olynyk et al., 2005; Pietrangelo, 2016) が, NASH における肝組織への鉄沈着と病態惹起のメカニズム, 食餌中の鉄制限と肝臓中の

酸化ストレス，炎症及び肝線維化抑制のメカニズムを解明するために，今後更なる解析が必要である．さらに，本研究では鉄制限食が血清鉄を著しく低下させたことから，臨床で鉄制限食による治療を試みる際には，貧血指標の管理が必要であると考えられる．加えて，貧血を引き起こさない程度の低～中程度の血清鉄低下が肝線維化抑制作用を示すか否かは今後の検討課題である．

2.5 結論

NASH モデルである CDAA ラットは肝臓中の鉄沈着を引き起こした．この鉄過剰合併 NASH モデルにおいて，鉄制限食は肝臓中鉄含量を低下させ，酸化ストレス，炎症及び肝線維化を抑制した．以上の結果より，食事中的鉄制限は鉄過剰合併 NASH 患者に対する有用な治療アプローチとなり得る可能性が示された．

総括

本研究において著者は、NASH 治療薬の開発難易度が高い原因の一つとして、化合物の有効性を評価するためのヒト病態を模した病態モデル動物が少ないことに着目し、第一章において、NASH 治療薬創製に向けて、ヒト NASH における代謝異常の特徴を複合的に模倣したマウス病態モデルの探索を実施した。さらに著者は、NASH の病態進展に寄与する複数因子の中からヒトで示唆されている鉄過剰の寄与に着目し、第二章において、NASH の新規治療法の探索として、CDAA ラットの NASH 病態進展に対する鉄制限食の効果を検討した。

第一章では、3 系統のマウス (C57BL/6J, ob/ob 及び KK-A^y マウス) に対して、NCD, CDAHFD 及び FFD を最大 30 週間給餌させた結果、FFD 給餌 ob/ob マウスがヒト NASH の代謝的特徴 (肥満, 高インスリン血症), 肝病理学的特徴 (脂肪肝炎, 線維化) を複合的に模倣したマウス病態モデルであることが明らかとなった。また、FFD 給餌 ob/ob マウスの肝臓では、ヒト NASH で認められる hCLS の形成が認められ、酸化ストレス, 炎症, 肝星細胞の活性化, ミトコンドリア障害及び肝細胞癌進展に関連した分子群が有意に変動していた。加えて、今回の研究結果より、レプチン欠損による肥満や高インスリン血症等の代謝異常が脂肪肝炎と肝線維化の進行を加速化させることが示唆された。今後、ヒト外挿性担保のための詳細解析やツール化合物を用いた検証試験により、FFD 給餌 ob/ob マウスは化合物の有効性評価のための非臨床モデルとして有用となる可能性がある。

第二章では、NASH モデルである CDAA ラットにおいて、コントロールと比較した血清鉄の上昇と病理学的な肝臓中の鉄沈着が認められたことから、CDAA ラットは食餌由来の鉄吸収が亢進する鉄過剰合併 NASH モデルであることが示唆された。CDAA ラットに対する鉄制限食の給餌は、肝臓中鉄含量を低下させ、酸化ストレス, 炎症及び肝線維化を抑制することが明らかとなった。NASH は複合要因によるヘテロな病態であることが知られており、複数の因子

が同時多発的に病態進展に寄与するが、今回の結果から、鉄過剰が病態進展に重要な役割を演じていることが明らかとなり、鉄制限食は有用な治療アプローチの一つとなり得ることが示唆された。今後、臨床において血中フェリチン等の鉄指標によりリクルートされた鉄過剰を合併した NASH 患者における鉄制限食の有効性評価、或いは他の薬剤と鉄制限食との併用による複合的な NASH 治療が望まれる。

第一章において、CDAHFD 給餌マウスの組織中の鉄蓄積指標としての血漿中フェリチン濃度が上昇していたこと、第二章において、CDAA ラットでは血清鉄の増加と肝組織中の鉄沈着が認められたことから、コリン欠乏食により引き起こされる肝障害は、鉄吸収抑制因子であるヘプシジンの産生を低下させ、消化管の鉄吸収を亢進させることで生体内の鉄過剰を引き起こすかもしれない。今後、NASH における詳細な鉄過剰による病態惹起のメカニズムを検討すると同時に、第一章で見出された CDAHFD 給餌 ob/ob マウス或いは FFD 給餌 ob/ob マウスの NASH 病態進展に対して鉄制限食が抑制効果を示すか否かについては興味深い点である。

以上の結果から、(1) 代謝的及び肝病理学的の両側面でヒト NASH を模倣する病態モデルとして FFD 給餌 ob/ob マウスが有望であること、(2) 鉄過剰が病態進展に寄与するラット NASH モデルを用いた検討から、鉄制限食が鉄過剰合併 NASH 患者において有効な治療法になり得ること、が明らかとなった。今後は、これら病態モデル及び治療法探索の知見に基づいた NASH 治療薬の開発が望まれる。また、本研究結果が、NASH を含めた生活習慣病の研究に広く応用されることを期待したい。

参考文献

- Abdelmalek, M. F., Suzuki, A., Guy, C., Unalp-Arida, A., Colvin, R., Johnson, R. J., Diehl, A. M. and Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research, N. (2010). Increased fructose consumption is associated with fibrosis severity in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* **51**, 1961-71.
- Anders, S., McCarthy, D. J., Chen, Y., Okoniewski, M., Smyth, G. K., Huber, W. and Robinson, M. D. (2013). Count-based differential expression analysis of RNA sequencing data using R and Bioconductor. *Nat Protoc* **8**, 1765-86.
- Andrews, N. C. (1999). Disorders of iron metabolism. *N Engl J Med* **341**, 1986-95.
- Angulo, P. (2002). Nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med* **346**, 1221-31.
- Ascha, M. S., Hanouneh, I. A., Lopez, R., Tamimi, T. A., Feldstein, A. F. and Zein, N. N. (2010). The incidence and risk factors of hepatocellular carcinoma in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* **51**, 1972-8.
- Bacon, B. R., Adams, P. C., Kowdley, K. V., Powell, L. W., Tavill, A. S. and American Association for the Study of Liver, D. (2011). Diagnosis and management of hemochromatosis: 2011 practice guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology* **54**, 328-43.
- Bacon, B. R. and Britton, R. S. (1990). The pathology of hepatic iron overload: a free radical-mediated process? *Hepatology* **11**, 127-37.

- Brunt, E. M., Kleiner, D. E., Wilson, L. A., Belt, P., Neuschwander-Tetri, B. A. and Network, N. C. R. (2011). Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) activity score and the histopathologic diagnosis in NAFLD: distinct clinicopathologic meanings. *Hepatology* **53**, 810-20.
- Charlton, M., Krishnan, A., Viker, K., Sanderson, S., Cazanave, S., McConico, A., Masuoko, H. and Gores, G. (2011). Fast food diet mouse: novel small animal model of NASH with ballooning, progressive fibrosis, and high physiological fidelity to the human condition. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **301**, G825-34.
- Cheng, K. C., Cahill, D. S., Kasai, H., Nishimura, S. and Loeb, L. A. (1992). 8-Hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage, causes G----T and A----C substitutions. *J Biol Chem* **267**, 166-72.
- Day, C. P. (2002). Pathogenesis of steatohepatitis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* **16**, 663-78.
- European Association For The Study Of The, L. (2010). EASL clinical practice guidelines for HFE hemochromatosis. *J Hepatol* **53**, 3-22.
- Fargion, S., Mattioli, M., Fracanzani, A. L., Sampietro, M., Tavazzi, D., Fociani, P., Taioli, E., Valenti, L. and Fiorelli, G. (2001). Hyperferritinemia, iron overload, and multiple metabolic alterations identify patients at risk for nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Gastroenterol* **96**, 2448-55.
- Filozof, C., Goldstein, B. J., Williams, R. N. and Sanyal, A. (2015). Non-Alcoholic Steatohepatitis: Limited Available Treatment Options but Promising Drugs in Development and Recent Progress Towards a Regulatory Approval Pathway. *Drugs* **75**, 1373-92.

- Fujii M, Shibazaki Y, Wakamatsu K, Honda Y, Kawauchi Y, Suzuki K, Arumugam S, Watanabe K, Ichida T, Asakura H, Yoneyama H (2013). A murine model for non-alcoholic steatohepatitis showing evidence of association between diabetes and hepatocellular carcinoma. *Med Mol Morphol* **46**, 141-52.
- George, D. K., Goldwurm, S., MacDonald, G. A., Cowley, L. L., Walker, N. I., Ward, P. J., Jazwinska, E. C. and Powell, L. W. (1998). Increased hepatic iron concentration in nonalcoholic steatohepatitis is associated with increased fibrosis. *Gastroenterology* **114**, 311-8.
- Hoki, T., Miyanishi, K., Tanaka, S., Takada, K., Kawano, Y., Sakurada, A., Sato, M., Kubo, T., Sato, T., Sato, Y. et al. (2015). Increased duodenal iron absorption through up-regulation of divalent metal transporter 1 from enhancement of iron regulatory protein 1 activity in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* **62**, 751-61.
- Hossain, N., Afendy, A., Stepanova, M., Nader, F., Srishord, M., Rafiq, N., Goodman, Z. and Younossi, Z. (2009). Independent predictors of fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* **7**, 1224-9, 1229 e1-2.
- Inoue, S., Fukuda, K., Kudara, T., Igura, T., Inui, Y., Tamura, S., Hanafusa, T., Kawata, S. and Matsuzawa, Y. (1999). Augmented growth response to IGF-1 via increased IRS-1 in Chinese hamster ovary cells expressing kinase-negative insulin receptors. *Diabetologia* **42**, 763-72.
- Ioannou, G. N., Van Rooyen, D. M., Savard, C., Haigh, W. G., Yeh, M. M., Teoh, N. C. and Farrell, G. C. (2015). Cholesterol-lowering drugs cause dissolution of cholesterol crystals and disperse Kupffer cell crown-like structures during resolution of NASH. *J Lipid Res* **56**, 277-85.

- Itoh, M., Kato, H., Suganami, T., Konuma, K., Marumoto, Y., Terai, S., Sakugawa, H., Kanai, S., Hamaguchi, M., Fukaishi, T. et al. (2013). Hepatic crown-like structure: a unique histological feature in non-alcoholic steatohepatitis in mice and humans. *PLoS One* 8, e82163.
- Jensen, T., Abdelmalek, M. F., Sullivan, S., Nadeau, K. J., Green, M., Roncal, C., Nakagawa, T., Kuwabara, M., Sato, Y., Kang, D. H. et al. (2018). Fructose and sugar: A major mediator of non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol*.
- Kaji, K., Yoshiji, H., Kitade, M., Ikenaka, Y., Noguchi, R., Shirai, Y., Aihara, Y., Namisaki, T., Yoshii, J., Yanase, K. et al. (2011). Combination treatment of angiotensin II type I receptor blocker and new oral iron chelator attenuates progression of nonalcoholic steatohepatitis in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 300, G1094-104.
- Kajikawa, S., Imada, K., Takeuchi, T., Shimizu, Y., Kawashima, A., Harada, T. and Mizuguchi, K. (2011). Eicosapentaenoic acid attenuates progression of hepatic fibrosis with inhibition of reactive oxygen species production in rats fed methionine- and choline-deficient diet. *Dig Dis Sci* 56, 1065-74.
- Kennedy, A. J., Ellacott, K. L., King, V. L. and Hasty, A. H. (2010). Mouse models of the metabolic syndrome. *Dis Model Mech* 3, 156-66.
- Kitada, T., Seki, S., Iwai, S., Yamada, T., Sakaguchi, H. and Wakasa, K. (2001). In situ detection of oxidative DNA damage, 8-hydroxydeoxyguanosine, in chronic human liver disease. *J Hepatol* 35, 613-8.
- Kleiner, D. E., Brunt, E. M., Van Natta, M., Behling, C., Contos, M. J., Cummings, O. W., Ferrell, L. D., Liu, Y. C., Torbenson, M. S.,

- Unalp-Arida, A. et al.** (2005). Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* **41**, 1313-21.
- Kowdley, K. V.** (2004). Iron, hemochromatosis, and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* **127**, S79-86.
- Kowdley, K. V., Belt, P., Wilson, L. A., Yeh, M. M., Neuschwander-Tetri, B. A., Chalasani, N., Sanyal, A. J., Nelson, J. E. and Network, N. C. R.** (2012). Serum ferritin is an independent predictor of histologic severity and advanced fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* **55**, 77-85.
- Krishnan, A., Abdullah, T. S., Mounajjed, T., Hartono, S., McConico, A., White, T., LeBrasseur, N., Lanza, I., Nair, S., Gores, G. et al.** (2017). A longitudinal study of whole body, tissue, and cellular physiology in a mouse model of fibrosing NASH with high fidelity to the human condition. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **312**, G666-G680.
- Kristiansen, M. N., Veidal, S. S., Rigbolt, K. T., Tolbol, K. S., Roth, J. D., Jelsing, J., Vrang, N. and Feigh, M.** (2016). Obese diet-induced mouse models of nonalcoholic steatohepatitis-tracking disease by liver biopsy. *World J Hepatol* **8**, 673-84.
- Larter, C. Z. and Yeh, M. M.** (2008). Animal models of NASH: getting both pathology and metabolic context right. *J Gastroenterol Hepatol* **23**, 1635-48.
- Leclercq, I. A., Farrell, G. C., Schriemer, R. and Robertson, G. R.** (2002). Leptin is essential for the hepatic fibrogenic response to chronic liver injury. *J Hepatol* **37**, 206-13.

- Liang, W., Menke, A. L., Driessen, A., Koek, G. H., Lindeman, J. H., Stoop, R., Havekes, L. M., Kleemann, R. and van den Hoek, A. M. (2014). Establishment of a general NAFLD scoring system for rodent models and comparison to human liver pathology. *PLoS One* **9**, e115922.
- Loomis, A. K., Kabadi, S., Preiss, D., Hyde, C., Bonato, V., St Louis, M., Desai, J., Gill, J. M., Welsh, P., Waterworth, D. et al. (2016). Body Mass Index and Risk of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Two Electronic Health Record Prospective Studies. *J Clin Endocrinol Metab* **101**, 945-52.
- Maliken, B. D., Nelson, J. E., Klintworth, H. M., Beauchamp, M., Yeh, M. M. and Kowdley, K. V. (2013). Hepatic reticuloendothelial system cell iron deposition is associated with increased apoptosis in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* **57**, 1806-13.
- Margariti, A., Kontogianni, M. D., Tileli, N., Georgoulis, M., Deutsch, M., Zafeiropoulou, R., Tiniakos, D., Manios, Y., Pectasides, D. and Papatheodoridis, G. V. (2015). Increased abdominal fat levels measured by bioelectrical impedance are associated with histological lesions of nonalcoholic steatohepatitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* **27**, 907-13.
- Matsumoto, M., Hada, N., Sakamaki, Y., Uno, A., Shiga, T., Tanaka, C., Ito, T., Katsume, A. and Sudoh, M. (2013). An improved mouse model that rapidly develops fibrosis in non-alcoholic steatohepatitis. *Int J Exp Pathol* **94**, 93-103.
- Morrison, M. C., Kleemann, R., van Koppen, A., Hanemaaijer, R. and Verschuren, L. (2018a). Key Inflammatory Processes in Human NASH Are Reflected in *Ldlr*(-/-) Leiden Mice: A Translational Gene Profiling Study. *Front Physiol* **9**, 132.

- Morrison, M. C., Verschuren, L., Salic, K., Verheij, J., Menke, A., Wielinga, P. Y., Iruarrizaga-Lejarreta, M., Gole, L., Yu, W. M., Turner, S. et al. (2018b). Obeticholic Acid Modulates Serum Metabolites and Gene Signatures Characteristic of Human NASH and Attenuates Inflammation and Fibrosis Progression in *Ldlr*^{-/-} Leiden Mice. *Hepatology Commun* **2**, 1513-1532.
- Mortazavi, A., Williams, B. A., McCue, K., Schaeffer, L. and Wold, B. (2008). Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nat Methods* **5**, 621-8.
- Musallam, K. M., Rivella, S., Vichinsky, E. and Rachmilewitz, E. A. (2013). Non-transfusion-dependent thalassemias. *Haematologica* **98**, 833-44.
- Olynyk, J. K., St Pierre, T. G., Britton, R. S., Brunt, E. M. and Bacon, B. R. (2005). Duration of hepatic iron exposure increases the risk of significant fibrosis in hereditary hemochromatosis: a new role for magnetic resonance imaging. *Am J Gastroenterol* **100**, 837-41.
- Otogawa, K., Ogawa, T., Shiga, R., Nakatani, K., Ikeda, K., Nakajima, Y. and Kawada, N. (2008). Attenuation of acute and chronic liver injury in rats by iron-deficient diet. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **294**, R311-20.
- Paradis, V., Perlemuter, G., Bonvoust, F., Dargere, D., Parfait, B., Vidaud, M., Conti, M., Huet, S., Ba, N., Buffet, C. et al. (2001). High glucose and hyperinsulinemia stimulate connective tissue growth factor expression: a potential mechanism involved in progression to fibrosis in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* **34**, 738-44.
- Pickens, M. K., Yan, J. S., Ng, R. K., Ogata, H., Grenert, J. P., Beysen, C., Turner, S. M. and Maher, J. J. (2009). Dietary sucrose is essential to the

- development of liver injury in the methionine-choline-deficient model of steatohepatitis. *J Lipid Res* **50**, 2072-82.
- Pietrangelo, A.** (2002). Mechanism of iron toxicity. *Adv Exp Med Biol* **509**, 19-43.
- Pietrangelo, A.** (2009). Iron in NASH, chronic liver diseases and HCC: how much iron is too much? *J Hepatol* **50**, 249-51.
- Pietrangelo, A.** (2016). Mechanisms of iron hepatotoxicity. *J Hepatol* **65**, 226-227.
- Rinella, M. E., Elias, M. S., Smolak, R. R., Fu, T., Borensztajn, J. and Green, R. M.** (2008). Mechanisms of hepatic steatosis in mice fed a lipogenic methionine choline-deficient diet. *J Lipid Res* **49**, 1068-76.
- Sahai, A., Malladi, P., Pan, X., Paul, R., Melin-Aldana, H., Green, R. M. and Whittington, P. F.** (2004). Obese and diabetic db/db mice develop marked liver fibrosis in a model of nonalcoholic steatohepatitis: role of short-form leptin receptors and osteopontin. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **287**, G1035-43.
- Sakaida, I., Hironaka, K., Uchida, K. and Okita, K.** (1999). Iron chelator deferoxamine reduces preneoplastic lesions in liver induced by choline-deficient L-amino acid-defined diet in rats. *Dig Dis Sci* **44**, 560-9.
- Santhekadur, P. K., Kumar, D. P. and Sanyal, A. J.** (2018). Preclinical models of non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* **68**, 230-237.
- Sanyal, A. J.** (2011). NASH: A global health problem. *Hepatol Res* **41**, 670-4.
- Sanyal, A. J., Banas, C., Sargeant, C., Luketic, V. A., Sterling, R. K., Stravitz, R. T., Shiffman, M. L., Heuman, D., Coterrell, A., Fisher, R. A.**

- et al. (2006). Similarities and differences in outcomes of cirrhosis due to nonalcoholic steatohepatitis and hepatitis C. *Hepatology* **43**, 682-9.
- Sanyal, A. J., Campbell-Sargent, C., Mirshahi, F., Rizzo, W. B., Contos, M. J., Sterling, R. K., Luketic, V. A., Shiffman, M. L. and Clore, J. N. (2001). Nonalcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. *Gastroenterology* **120**, 1183-92.
- Saponaro, C., Gaggini, M. and Gastaldelli, A. (2015). Nonalcoholic fatty liver disease and type 2 diabetes: common pathophysiologic mechanisms. *Curr Diab Rep* **15**, 607.
- Stanhope, K. L., Schwarz, J. M., Keim, N. L., Griffen, S. C., Bremer, A. A., Graham, J. L., Hatcher, B., Cox, C. L., Dyachenko, A., Zhang, W. et al. (2009). Consuming fructose-sweetened, not glucose-sweetened, beverages increases visceral adiposity and lipids and decreases insulin sensitivity in overweight/obese humans. *J Clin Invest* **119**, 1322-34.
- Sumida, Y., Nakashima, T., Yoh, T., Furutani, M., Hirohama, A., Kakisaka, Y., Nakajima, Y., Ishikawa, H., Mitsuyoshi, H., Okanoue, T. et al. (2003). Serum thioredoxin levels as a predictor of steatohepatitis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* **38**, 32-8.
- Sumida, Y., Yoshikawa, T. and Okanoue, T. (2009). Role of hepatic iron in non-alcoholic steatohepatitis. *Hepatol Res* **39**, 213-22.
- Takahashi, Y., Soejima, Y. and Fukusato, T. (2012). Animal models of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *World J Gastroenterol* **18**, 2300-8.
- Tanaka, S., Miyanishi, K., Kobune, M., Kawano, Y., Hoki, T., Kubo, T., Hayashi, T., Sato, T., Sato, Y., Takimoto, R. et al. (2013). Increased hepatic oxidative DNA damage in patients with nonalcoholic

- steatohepatitis who develop hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol* **48**, 1249-58.
- Tilg, H. and Moschen, A. R.** (2010). Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis. *Hepatology* **52**, 1836-46.
- Tomita, K., Teratani, T., Suzuki, T., Shimizu, M., Sato, H., Narimatsu, K., Okada, Y., Kurihara, C., Irie, R., Yokoyama, H. et al.** (2014). Free cholesterol accumulation in hepatic stellate cells: mechanism of liver fibrosis aggravation in nonalcoholic steatohepatitis in mice. *Hepatology* **59**, 154-69.
- Trevaskis, J. L., Griffin, P. S., Wittmer, C., Neuschwander-Tetri, B. A., Brunt, E. M., Dolman, C. S., Erickson, M. R., Nopora, J., Parkes, D. G. and Roth, J. D.** (2012). Glucagon-like peptide-1 receptor agonism improves metabolic, biochemical, and histopathological indices of nonalcoholic steatohepatitis in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **302**, G762-72.
- Valenti, L., Fracanzani, A. L., Dongiovanni, P., Bugianesi, E., Marchesini, G., Manzini, P., Vanni, E. and Fargion, S.** (2007). Iron depletion by phlebotomy improves insulin resistance in patients with nonalcoholic fatty liver disease and hyperferritinemia: evidence from a case-control study. *Am J Gastroenterol* **102**, 1251-8.
- Valenti, L., Fracanzani, A. L., Dongiovanni, P., Roviola, S., Rametta, R., Fatta, E., Pulixi, E. A., Maggioni, M. and Fargion, S.** (2014). A randomized trial of iron depletion in patients with nonalcoholic fatty liver disease and hyperferritinemia. *World J Gastroenterol* **20**, 3002-10.

- Valenti, L., Rametta, R., Dongiovanni, P., Motta, B. M., Canavesi, E., Pelusi, S., Pulixi, E. A., Fracanzani, A. L. and Fargion, S. (2012). The A736V TMPRSS6 polymorphism influences hepatic iron overload in nonalcoholic fatty liver disease. *PLoS One* **7**, e48804.
- van Koppen, A., Verschuren, L., van den Hoek, A. M., Verheij, J., Morrison, M. C., Li, K., Nagabukuro, H., Costessi, A., Caspers, M. P. M., van den Broek, T. J. et al. (2018). Uncovering a Predictive Molecular Signature for the Onset of NASH-Related Fibrosis in a Translational NASH Mouse Model. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* **5**, 83-98 e10.
- Yamamoto, M., Iwasa, M., Iwata, K., Kaito, M., Sugimoto, R., Urawa, N., Mifuji, R., Konishi, M., Kobayashi, Y. and Adachi, Y. (2007). Restriction of dietary calories, fat and iron improves non-alcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol Hepatol* **22**, 498-503.
- Yatsuji, S., Hashimoto, E., Tobari, M., Taniai, M., Tokushige, K. and Shiratori, K. (2009). Clinical features and outcomes of cirrhosis due to non-alcoholic steatohepatitis compared with cirrhosis caused by chronic hepatitis C. *J Gastroenterol Hepatol* **24**, 248-54.
- Yoshiji, H., Nakae, D., Mizumoto, Y., Horiguchi, K., Tamura, K., Denda, A., Tsujii, T. and Konishi, Y. (1992). Inhibitory effect of dietary iron deficiency on inductions of putative preneoplastic lesions as well as 8-hydroxydeoxyguanosine in DNA and lipid peroxidation in the livers of rats caused by exposure to a choline-deficient L-amino acid defined diet. *Carcinogenesis* **13**, 1227-33.
- Younossi, Z. M., Koenig, A. B., Abdelatif, D., Fazel, Y., Henry, L. and Wymer, M. (2016). Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver

disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology* **64**, 73-84.

謝辞

本研究を進めるにあたり，このような機会を与えて頂き，多大なるご指導，ご協力を頂きました，田辺三菱製薬株式会社の石井 伸一 博士，谷口 弘之 博士，鈴木 一夫 博士，藤田 拓也 博士，持田 英樹 博士，岡 幸蔵 博士，杉本 佳奈美 博士，土田 琢磨 博士，齊藤 隆太 博士，保田 慎一郎 博士，加藤 早由華 研究員及び吉田 久美子 技術職に厚く御礼申し上げます．第一章の研究は，田辺三菱製薬株式会社と TNO Pharma の共同研究により行われたものであり，TNO Pharma の Robert Kleemann 博士，Lars Verschuren 博士及び Martien Caspers 博士に厚く御礼申し上げます．また，動物試験を遂行して頂いた株式会社新薬リサーチセンター，病理評価を遂行して頂いた SMC laboratories, Inc に謹んで感謝申し上げます．

そしてご多忙の中，主査を引き受けてくださいました，北里大学薬学部薬理学教室 田辺 光男 教授，副査を引き受けてくださいました微生物薬品製造学教室 供田 洋 教授，生薬学教室 小林 義典 教授，分子薬理学教室 中原 努 教授に謹んで厚く御礼申し上げます．

最後に，本研究活動の遂行及び学位取得に際し深いご理解と多大なご指導を賜りました，北里大学薬学部分子薬理学教室 中原 努 教授，田辺三菱製薬株式会社創薬本部フロンティア創薬ユニットの皆様，長年にわたり支えとなってくれた家族並びに友人に心から厚く御礼申し上げます．

2020 年 1 月