

肥満 2 型糖尿病モデル SDT fatty ラットにおける非アルコール性脂肪肝炎発症の早期化
の検討と各種薬剤の薬効評価

2019 年

鳥庭 靖文

新潟大学大学院自然科学研究科博士後期課程

生命・食料科学専攻

略 語

- ACC (Acetyl-CoA carboxylase : アセチル CoA カルボキシラーゼ)
- ALT (Alanine aminotransferase : アラニンアミノトランスフェラーゼ)
- AMPK (AMP-activated protein kinase : AMP 活性化プロテインキナーゼ)
- AST (Aspartate aminotransferase : アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ)
- Bambi (bone morphogenetic protein and activin membrane-bound inhibitor)
- CCR (C-C chemokine receptor : CC ケモカイン受容体)
- CDAA (Choline-deficient L-amino acid-defined : コリン欠乏アミノ酸置換)
- cDNA (Complementary deoxyribonucleic acid : 相補的デオキシリボ核酸)
- CT (Computed tomography : コンピュータ断層撮影)
- DAG (Diacylglycerol : ジアシルグリセロール)
- ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)
- FC (Free cholesterol : 遊離コレステロール)
- FAS (Fatty acid synthase : 脂肪酸合成酵素)
- FDA (Food and Drug Administration : アメリカ食品医薬品局)
- FFA (Free fatty acid : 遊離脂肪酸)
- FLINT (The Farnesoid X Receptor (FXR) Ligand Obeticholic Acid in Nonalcoholic Steatohepatitis (NASH) Treatment)
- FXR (Farnesoid X receptor : ファルネソイド X 受容体)
- GWAS (Genome-Wide association study : ゲノムワイド関連解析)
- HE (Hematoxylin eosin) 染色
- HPLC (High performance liquid chromatography : 高速液体クロマトグラフィー)
- JNK (c-Jun N-terminal kinase)
- LDL (Low density lipoprotein : 低比重リポタンパク)
- MAPK (Mitogen-activated protein kinase : 分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ)
- MCP-1 (Monocyte chemoattractant protein -1 : 単球走化性タンパク質-1)
- MLK3 (Mixed lineage kinase 3)
- MRE (Magnetic Resonance Elastography)
- MRI (Magnetic Resonance Imaging : 磁気共鳴画像法)
- MRI-PDFF (MRI-proton density fat fraction)
- MTP (Microsomal triglyceride transfer protein : ミクロソームトリグリセリド輸送タンパク質)
- NAFLD (Non-alcoholic fatty liver disease : 非アルコール性脂肪性肝疾患)
- NAFL (Non-alcoholic fatty liver : 非アルコール性脂肪肝)

NAS (NAFLD activity score : NAFLD 活動性スコア)
NASH (Non-alcoholic steatohepatitis : 非アルコール性脂肪肝炎)
NEFA (Non-esterified fatty acid : 非エステル型脂肪酸)
NF- κ B (Nuclear factor- κ B)
PCR (Polymerase chain reaction : ポリメラーゼ連鎖反応)
PNPLA3 (Patatin-like phospholipase domain containing 3 gene)
PKC (Protein kinase C)
PPAR (Peroxisome proliferator-activated receptor : ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体)
RNA (Ribonucleic acid : リボ核酸)
SD (Sprague-Dawley) ラット
SDT (Spontaneously Diabetic Torii) fatty ラット
SNP (Single Nucleotide Polymorphisms : 一塩基多形)
SREBP-1 (Sterol regulatory element-binding protein : ステロール調節配列結合蛋白-1)
TC (Total cholesterol : 総コレステロール)
TG (Triglyceride : トリグリセリド)
TLR (Toll-like receptor : Toll 様受容体)
TNF- α (Tumor necrosis factor- α : 腫瘍壊死因子- α)
TGF- β (transforming growth factor- β : トランスフォーミング増殖因子- β)
VLDL (Very Low density lipoprotein : 超低比重リポタンパク)
ZF (Zucker fatty) ラット
 α -SMA (α -smooth muscle actin : α -平滑筋アクチン)

目 次

第1章 緒 論	6
第2章 SDT fatty ラットにおける肝臓の線維化発症の早期化の検討	17
第1節 緒 言	
第2節 材料および方法	
第3節 結 果	
第4節 考 察	
第5節 要 約	
第3章 高コレステロール食給餌 SDT fatty ラットの病態解析	37
第1節 緒 言	
第2節 材料および方法	
第3節 結 果	
第4節 考 察	
第5節 要 約	
第4章 高コレステロール食給餌 SDT fatty ラットにおける薬剤効果の検討	50
第1節 緒 言	
第2節 材料および方法	
第3節 結 果	
第4節 考 察	

第5節 要約

第5章 総括・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 69

謝辞・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 73

引用文献・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 74

SUMMARY・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 81

第1章 緒論

NAFLD は組織診断あるいは画像検診で脂肪肝を認め、アルコール性肝障害など、他の疾患を除外した病態である。NAFLD はメタボリックシンドロームの肝臓での表現型と言われ、近年、食生活の欧米化や運動不足により肥満やメタボリックシンドロームの人口が急増していることにより、世界中で増加の一途をたどっている。NAFLD は組織学的に大滴性の肝脂肪変性を基盤に発症し、病態がほとんど進行しないと考えられる NAFL と、進行性で肝線維化から肝硬変、肝がんの発症につながる NASH に分類され、現在、NAFLD の有病率は全人口の 25%と推定されている (Araujo et al., 2018)。

NAFLD では飲酒歴が無いことが前提となるため、正確な診断のために、まずは詳細な飲酒に関する問診を行う。飲酒歴の有無の判断基準として、エタノール摂取量で男性の場合 30g/day 未満、女性の場合 20g/day 未満とすることが提唱されている (日本消化器病学会, 2014)。NAFLD と診断された場合に、NASH か NAFL の診断を行うためには肝生検が必須とされている。肝生検による診断法の一例としては、脂肪肝、小葉内炎症、肝細胞のバルーニング変性をスコア化し、その合計を NAS として算出して診断する方法がある (表 1-1)。また、肝臓の線維化も肝生検によってステージングされてその重篤度が診断されている (表 1-2)。

現時点では NASH の確定診断のために肝生検が必須とされているが、肝生検は侵襲性の高い検査であり、それによる合併症のリスクもある。また、検査実施者や肝臓サンプルを採取する場所によって診断が異なってしまうサンプリングエラーも報告されていることから (Ratziu et al., 2010)、現在肝生検に代わる検査法の探索が積極的に行われている。NASH と NAFL の鑑別に関しては、フェリチン、インスリン、4 型コラーゲン 7S からなる NAFIC score が提案されており、日本国内でその有用性が検証されている

(Sumida et al., 2011)。肝線維化進展例を鑑別する手法としては、NAFLD fibrosis score や FIB4 index など、血液生化学検査や日常的に比較的容易に得られるパラメータを用いたスコアリングシステムが汎用されている。これらのスコアリングシステムを用いることで、高度に肝線維化が進展している可能性の高い患者を非侵襲的に抽出することができるようになった。特に FIB4 index はステージ 3 以上の肝線維化例の鑑別において、良好な鑑別能を有することが報告されている (Shah et al., 2009)。血液生化学値を用いたスコアリングシステムのみならず CT や MRI を用いた検査 (肝臓の弾性率測定 (MRE)、肝臓の脂肪比率の定量 (MRI-PDFF)) などの画像診断の有用性が報告されている (Hatta et al., 2010; Chen et al., 2011)。現状ではこれらのスコアリングシステムや画像診断を活用し、肝生検の必要性の判断がなされている。また、臨床試験の早期段階においては、これらを効果的に活用することにより、薬剤による脂肪肝の改善効果や肝線維化改善効果を非侵襲的にモニタリングすることができ、早期に開発化合物の有効性の有無が推測できるようになってきている。

NASH/NAFLD 発症、進展のメカニズムについても精力的に研究されている。NAFLD 発症のもっとも重要な因子は肥満であり、NAFLD 患者の内臓脂肪と肝臓内脂肪には正の相関があることが報告されている (Koda et al., 2007)。NAFLD の主な背景疾患としては、肥満のほかに 2 型糖尿病、脂質異常症、高血圧がある (de Alwis and Day, 2008)。特に 2 型糖尿病は NAFLD 発症との関連性が強い (El-Serag et al., 2004)。また、NAFLD の進展について、NAFL に二次的なストレスが加わることにより NASH に至る 2 hit theory が広く認知されていたが、最近では炎症が脂肪化と同時、もしくは脂肪化に先行しておこる機序 (multiple parallel hit) も提唱されている (Day and James, 1998; Tilg and Moschen, 2010; Takaki et al., 2013)。NASH 病態発症に関与する因子としては、インスリン抵抗性や酸化ストレスが特に広く認識されている。その他、小胞体ストレス、ミトコンドリア機能異常、オートファジー、腸内細菌叢の変化も NASH 発症、進展に関与

すると考えられているが、ヒトにおけるエビデンスはいずれも限定的であり、関与の真偽やその影響の大きさなど、詳細は依然不明である。

NASH発症に関与する遺伝的素因についての研究も積極的に行われている (Kawaguchi et al., 2018)。NASH/NAFLD患者と健常者においてGWASが行われ、種々の遺伝的素因がNASH発症に関与していることが報告されたが、その中でも特に注目されている因子としてPNPLA3が挙げられる (Romeo et al., 2008)。日本人を対象としたGWASでは、PNPLA3のSNP変異 (I148M) はNAFLDの内、Matteoni分類でtype4といったシビアな患者において有意に多く認められていることや線維化ステージとの関連も報告されていることから、NASH発症および進展に深く関与している因子であると考えられている (Hotta et al., 2010; Kawaguchi et al., 2012)。PNPLA3は脂肪滴膜に局在し、TGリパーゼ活性を有していることから、脂質代謝に関与してNASH/NAFLD発症に影響しているものと想定されるが、そのノックアウトマウスは脂肪肝や肝機能異常といった表現型を示さない (Basantani et al., 2011)。一方で、PNPLA3のリスク変異 (I148M) をノックインしたマウスにおいては、肝脂質蓄積の亢進が認められていることから、リスク変異がNASH発症に関与していることは示唆されている。しかし、現在に至るまで、PNPLA3のNASHへの影響については全世界で検討がなされているが、その詳細はいまだ不明である。

近年、NASHは肝がんや肝移植の原因疾患としての懸念が高まっており、2020年には肝移植の原因疾患第一位になると推測されている (Charlton et al., 2011)。このような背景から、NASHの治療法の確立は急務であるが、現時点においてNASHを適応とした治療薬は存在していない。現行治療は糖尿病や脂質異常症といった背景疾患の治療、および生活指導による減量が中心となっている。減量の効果については信頼性が高く、多くの場合に推奨される。3%以上の減量で、脂肪肝の改善が認められ、5%以上で肝炎、バロニンクの改善、7%以上ではNASHの消失、さらには10%以上の減量によって肝線維

化まで改善すると言われている（図 1-1、体重低下と NASH 改善の関係性）（Hannah and Harrison, 2016）。高度肥満を合併した NASH 患者には、減量手術が施されることがあり、劇的な改善効果が認められている（Dixon et al., 2004; Schneck et al., 2016）。

薬剤治療としては、PPAR γ 作動薬であるピオグリタゾンや抗酸化剤であるビタミン E 製剤の有効性が臨床試験において示されており、適応外処方で使用されている（Sanyal et al., 2010; He et al., 2016）。ピオグリタゾンについては体重増加や浮腫といったリスクが懸念されており、長期投与における安全性懸念がある（Musso et al., 2017）。ビタミン E については、長期投与により総死亡率が上昇することが報告されている（Miller et al., 2005）。また、これらの薬剤の肝硬変発症抑制および生命予後の改善効果については不明であり、今後は、これらの薬剤の長期間での有効性や安全性についての評価が待たれるところである。

NASH 治療の目標は肝硬変や肝がんといった致死性の肝関連イベントの発症抑制と死亡率の改善である。しかし、臨床試験においてこれらを示すには 10~20 年の期間が必要となり、製薬企業の経済活動としてはあまりに合理性に欠く。このような状況を受けて、2014 年、FDA は米国肝臓学会と共同で、NASH 治療薬の開発についての見解を示した（Sanyal et al., 2015）。その見解では、NASH 治療薬の開発においては適切なサロゲートエンドポイントの設定が認められ、肝関連イベントの発症抑制や死亡率の改善といったハードエンドポイントは市販後調査で示せばよいとされた。この見解を受け、現在多くの製薬企業が NASH 治療薬の創薬活動を活発化させており、多種多様なメカニズムを有する薬剤が臨床試験実施中である（Oseini and Sanyal, 2017）。現在いくつかの薬剤が臨床試験 Phase 3 を実施中であるが、その Phase 3 におけるサロゲートエンドポイントは“NASH を消散させ、かつ線維化ステージを悪化させない”または“線維化ステージを 1 ステージ以上改善し、かつ NASH を悪化させない”としている。サロゲートエンドポイントのいずれかもしくは両方を満たすことで、NASH を適応とした薬剤として

承認される見通しとなっている。

NASH を適応とした開発中の薬剤の中で、最も開発が進んでいる薬剤は Intercept 社によって開発されているオベチコール酸である。オベチコール酸は胆汁酸の一種であり核内受容体 FXR 作動薬である。オベチコール酸は、天然の胆汁酸のなかで最も強力な FXR リガンドであるケノデオキシコール酸の誘導体である。第 2 相臨床試験 FLINT (Neuschwander-Tetri et al., 2015) では、投薬開始 72 週後において投薬群でプラセボ群に対して、肝線維化悪化を伴わずに NAS を 2 ポイント以上低下させるといったプライマリーエンドポイント達成率が有意に上昇した (投薬群 vs プラセボ群 : 45% vs 21% $P=0.0002$)。また、投薬群において線維化ステージ 1 以上改善した患者率も有意に上昇していた (投薬群 vs プラセボ群 : 35% vs 19% $P=0.004$)。本試験においてはオベチコール酸による副作用も報告されており、投薬群で血中 LDL コレステロールの有意な上昇 (投薬群 vs プラセボ群 : ベースラインからの変化 0.22 mmol/L vs -0.22 mmol/L $P<0.0001$) と有意な掻痒の惹起 (投薬群 vs プラセボ群 : 23% vs 6% $P<0.0001$) がある。特に LDL コレステロール上昇作用については、患者の心血管リスクへの影響が懸念されている。NAFLD 患者の心血管イベントリスクは一般人口と比較して高率であることが報告されている (Hamaguchi et al., 2007) ことから、本剤の NASH 治療薬としての成否はいまだ不透明である。

オベチコール酸とほぼ同時期の発売が予測されている薬剤として、Genfit 社が開発している Elafibranor がある。本薬剤は PPAR α/δ 作動薬であり、第 2 相臨床試験 GOLDEN-505 (Ratziu et al., 2016) で、一年間の投薬により本薬剤投与群において post-hoc で設定されたプライマリーエンドポイント、線維化悪化を伴わない NASH 消散 (バルーニングスコア 0 かつ小葉内炎症スコア 0 or 1) 達成率が有意に上昇した (投薬群 vs プラセボ群 : 19% vs 12% $P=0.045$)。本剤は、オベチコール酸のようなコレステロール上昇作用や掻痒の惹起は報告されていないが、薬効面での劣勢は否めない。

GOLDEN-505 のより詳細な解析を行った結果、NAS \geq 4 で肝線維化を伴う NASH 患者においてより明らかなレスポンスが確認できたことから、本条件を第 3 相臨床試験における inclusion criteria として設定している。また、Genfit 社は臨床試験サンプルを用いたバイオマーカー探索を行い、NASH 患者の診断キットを作成し、Elafibranor 発売とほぼ同時期に発売する予定としている。その他のスコアリングシステムや画像解析と併せて、NASH 患者の簡便なスクリーニングが今後進んでいく可能性も期待される。

NASH では肝臓の線維化が死亡率や肝がんを含む肝関連イベントの発症に関与する最も重要な因子であることが報告されている (図 1-2、図 1-3) (Hagstrom et al., 2017)。これらのことから、肝線維化の改善作用の有無が NASH 治療に重要視されている。薬剤開発としても、線維化の改善作用の有無が重要視される傾向があるが、肝線維化を発症するモデル動物は限られている (Imajo et al., 2013)。また、それらの肝線維化モデル動物はヒト NASH 病態との類似性に乏しいものが多く、薬剤開発の難しさにつながっている。このような背景から、ヒト NASH 病態に類似した特徴を保持した NASH 肝線維化病態モデル動物の必要性は極めて高い。ob/ob マウス、db/db マウスといった肥満および肥満 2 型糖尿病モデル動物の多くは、通常飼育条件下で脂肪肝を呈するが、肝線維化は発症しない (Ge et al., 2010; Imajo et al., 2013)。また、CDA 食負荷モデルにおいては肝臓からの脂質分泌異常や脂質酸化能の低下により重度の脂肪肝を発症し、重篤な肝線維化を呈するが、ヒト NASH 患者で認められるような肥満、脂質異常症、糖代謝異常を呈さない (Kawaratani et al., 2008; Tsujimoto et al., 2008; Tsujimoto et al., 2009)。このように、NASH 治療薬の開発をしていく上で、ヒトの病態を完全に模倣したモデル動物が存在していないことは大きな問題となっている。SDT fatty ラットは ZF ラットと SDT ラットを掛け合わせて作成された肥満 2 型糖尿病モデル動物である (図 1-4) (Masuyama et al., 2005)。過去の検討で、雌性 SDT fatty ラットは 32~40 週という長期飼育条件下において、通常食条件で肝線維化を発症することが確認できている

(Ishii et al., 2015)。しかし、32~40 週という長期間を要する実験は、薬剤開発を実施していく上では利便性を欠き、より早期に肝線維化を発症させられる条件を見出すことが効率的な研究のために望まれる。

本研究では、雌性 SDT fatty ラットにおける肝線維化について、食事への脂質負荷による肝線維化発症の早期化およびそのメカニズム解析を行った。第 2 章では、通常食給餌 SDT fatty ラットと高コレステロール食、高脂肪食給餌 SDT fatty ラットにおける肝線維化発症の比較解析から、高コレステロール食給餌 SDT fatty ラットにおいて、肝線維化発症が早期化することが確認でき、その検討結果をまとめた。第 3 章では、高コレステロール食給餌 SDT fatty ラットでの肝線維化早期化メカニズムとその病態のヒト NASH 病態との類似性についての検討結果をまとめた。第 4 章では本モデル動物を用いた、ヒト NASH で有効性が確認できている薬剤での薬効評価を中心に、肝線維化改善効果について検討した結果をまとめた。

表 1-1. NAFLD Activity Score(日本消化器病学会, 2014)

項目	程度	点数
脂肪肝	5%未満	0
	5～33%	1
	33～66%	2
	66%以上	3
小葉内炎症	炎症巣なし	0
	1 箇所炎症巣	1
	2～4 箇所炎症巣	2
	5 箇所以上の炎症巣	3
バルーンニング	無し	0
	少数	1
	多数	2
診断 (合計点)	NAFL	0～2
	Borderline NASH	3～4
	NASH	5～8

表 1-2. 肝線維化ステージ(Kleiner et al., 2005)

Fibrosis stage	定義
0	線維化なし
1	中心静脈周囲 or 門脈周囲
2	中心静脈周囲+門脈周囲
3	Bridging fibrosis
4	肝硬変

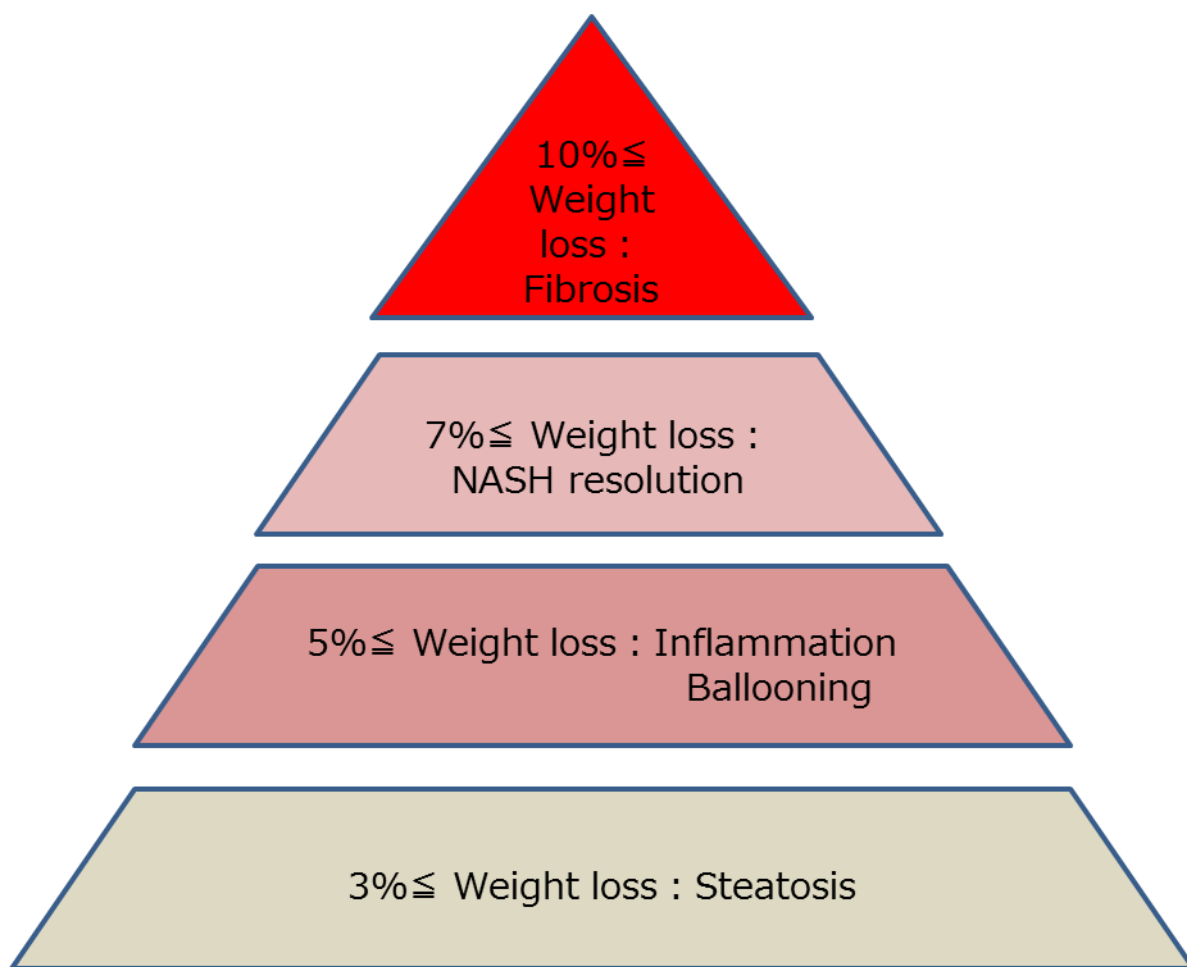


図 1-1. 体重低下と NASH 改善の関係性 (Hannah and Harrison, 2016)

体重低下によって NASH 病変は改善する。10%以上の体重低下によって線維化まで改善されると言われている。

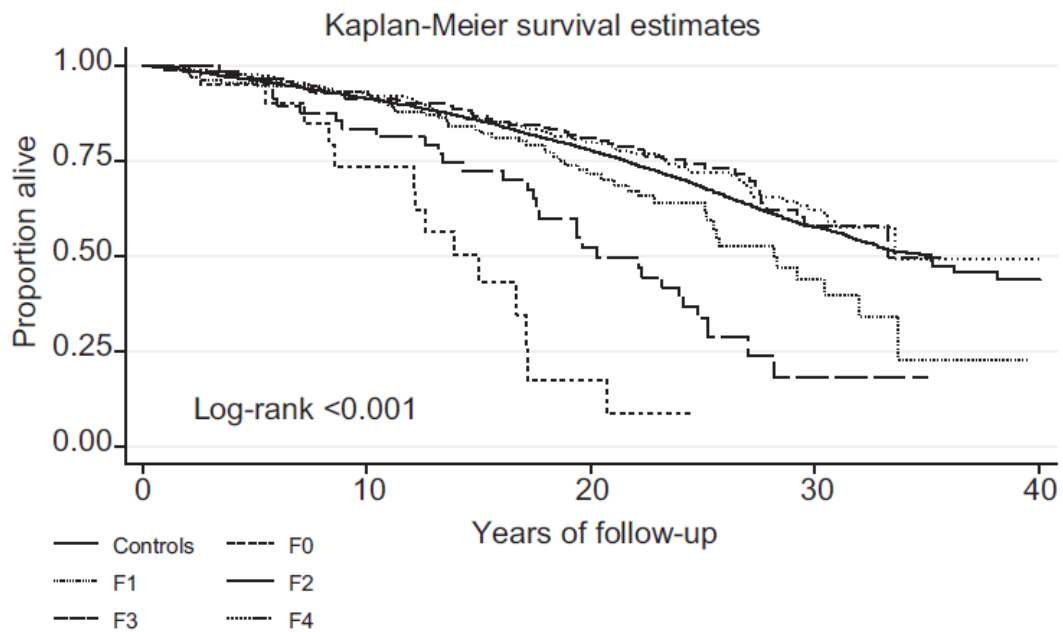


図 1-2. 肝線維化ステージと NAFLD 患者の生存率 (Hagstrom et al., 2017)

肝線維化ステージの進行は、生存率の低下に直結する。

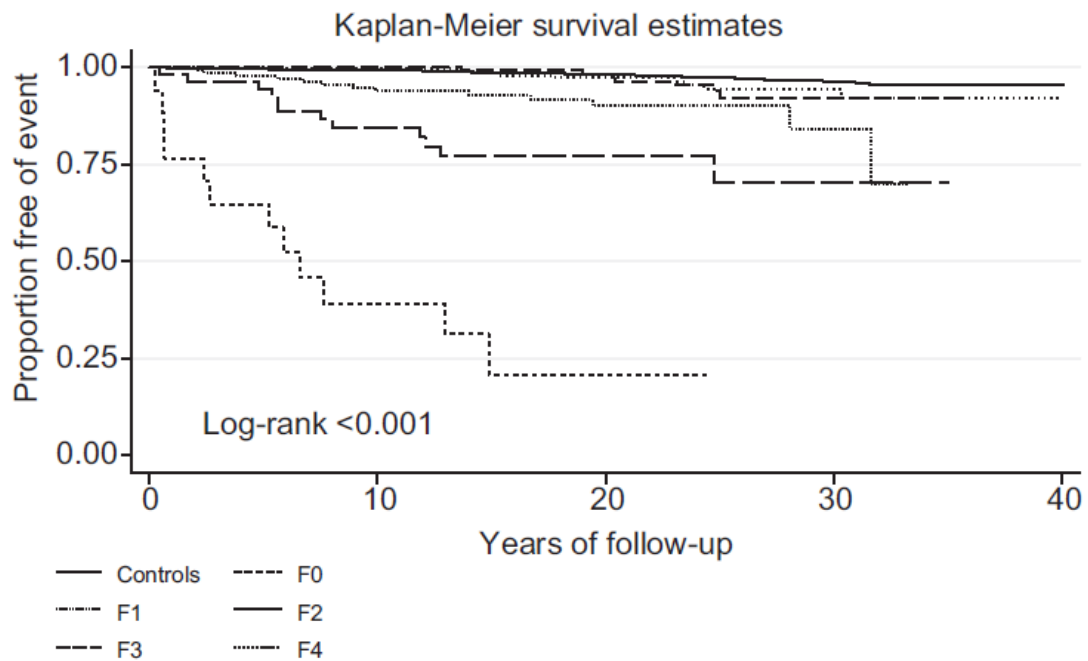


図 1-3. 肝線維化ステージと NAFLD 患者の肝関連イベント発症の関連性 (Hagstrom et al., 2017)

肝線維化ステージの進行は致死性の肝関連イベント発症リスクを上げる。

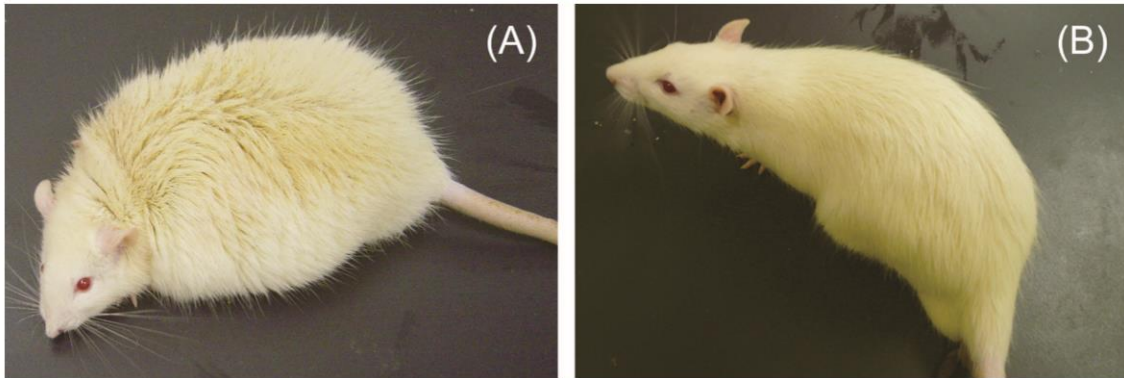


図 1-4. 16 週齢における SDT fatty ラット (A) および SD ラット (B)
SDT fatty ラットは、同一週齢の SD ラットに比べて、過食であり肥満を呈する。

第2章 SDT fatty ラットにおける肝臓の線維化発症の早期化の検討

第1節 緒言

雌性 SDT fatty ラットは、過食による肥満、高脂血症、高血糖、高インスリン血症などの肥満2型糖尿病の特徴を有したモデル動物である。過去の検討で、雌性 SDT fatty ラットを通常食条件で32～40週飼育することで、脂肪肝をともなった肝線維化を発症することが確認できている(図2-1)(Ishii et al., 2015)。予備的な実験では、雄性動物では肝線維化の発症は確認できなかった。雄性動物は糖尿病が雌性動物よりシビアであり、早期にインスリン分泌不全状態に陥る。一方で雌性動物は雄性動物と比較し糖尿病病態の発症がマイルドであり、高血糖を伴う高インスリン血症が長期間持続することで、インスリン抵抗性状態がより長期間持続していたと考えられる(Ohta et al., 2014)。インスリン抵抗性はヒトNASH発症において重要であると考えられており、この点が雌性 SDT fatty ラットの肝線維化発症に影響したと考えられる。

本研究では、まず雌性 SDT fatty ラットにおける肝線維化について、食事への脂質負荷によりその発症を早期化することを目的として検討を行った。他の動物実験において、高コレステロール食によって肝線維化誘導が促進されることが報告されている(Teratani et al., 2012)。また、高脂肪食を負荷することで、正常動物でも脂質異常症を呈し、肝脂質蓄積が確認できることが報告されている(Imajo et al., 2013)。これらの報告を参考に、本検討では通常食と高コレステロール食、高脂肪食を給餌した際の雌性 SDT fatty ラットにおける肝線維化発症について比較検討を行った。また、正常動物としてはSDラットを用いて同様の食事条件にて飼育し、その影響の確認を行った。

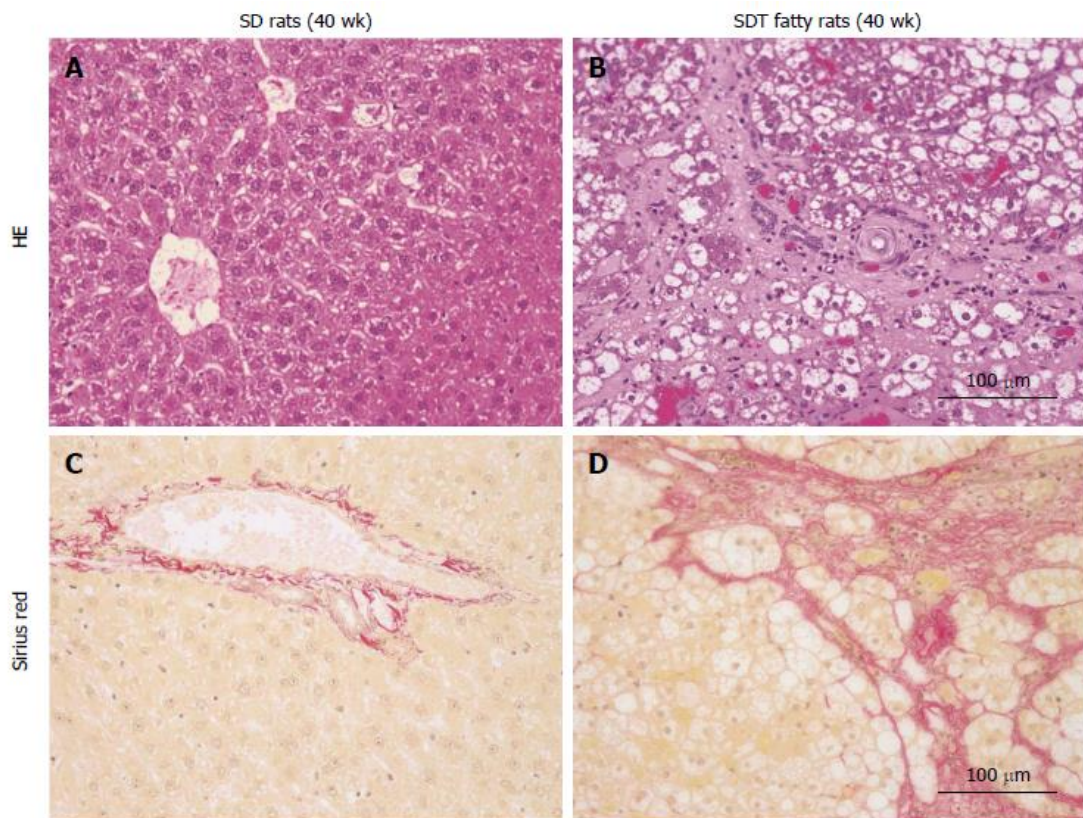


図 2-1. 通常食飼育雌性 SDT fatty ラットの 40 週齢における肝臓病理写真

通常食給餌条件において、雌性 SDT fatty ラットでは 40 週齢で明らかな肝線維化が確認できる (Ishii et al., 2015)。

第2節 材料および方法

試験には日本クレア社から購入した雌性 SDT fatty ラット、および正常対照として雌性 SD ラットを供した。通常食 (NC) としてオリエンタル酵母社の CRF-1 を用いた。高コレステロール食 (HC) として CRF-1 に 2% のコレステロールを添加した飼料を用いた。また、高脂肪食 (HF) としては日本クレア社の Quick Fat を用いた。動物は紫外線照射された水道水および上記飼料を自由摂取させ、12 時間の明暗周期 (明期 : 8~20 時、暗期 : 20 時~8 時)、温度 $23 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 15\%$ に環境統御された飼育室で維持した。

各動物の体重および血液生化学パラメータ (グルコース、インスリン、TG、TC、ALT、AST) を 8 週齢から 24 週齢まで 4 週間毎に測定した。血液生化学パラメータは、非絶食下のラット尾静脈より採血後、血漿中のグルコース、TG、TC、ALT、AST 濃度を自動分析器 (HITACHI 7180、日立ハイテクノロジーズ) により測定した。血漿中インスリン濃度はインスリン測定 ELISA キット (森永生化学研究所) を用いて測定した。食事負荷終了後は、イソフルラン麻酔下での放血致死にて屠殺し、肝臓の摘出を行った。16、20 週齢にて摘出した肝臓は病理組織学的検査に、24 週齢にて摘出した肝臓については肝臓重量を確認後に肝臓中各種脂質含量測定、mRNA 測定および病理組織学的検査に供した。肝臓中脂質の抽出は、肝切片 (約 100 mg) にメタノール (0.5 mL) を添加しホモジナイズ後、クロロホルム (1 mL) を添加することにより行った。脂質抽出液を乾固後、2-プロパノール 200 μL に再溶解し、自動分析器にて TG、TC を測定した。また、肝臓中 FFA 濃度は、NEFA-C キット (和光純薬工業) を用いて測定した。mRNA 測定は GenEluteTM Mammalian Total RNA キット (Sigma、USA) を用いて Total RNA を抽出し、MLV reverse transcriptase (Invitrogen、Carlsbad、CA、USA) および Oligo (dT) (12-18) primer を添加した後、Amp PCR system 9700 (Applied Biosystems、FosterCity、CA、USA) を

用いて cDNA を調製した。Real time PCR は、StepOne plus (Applied Biosystems、FosterCity、CA、USA) を用いて実施した。反応液は、cDNA サンプル約 50 ng、3.5 mmol/L MgCl₂、0.3 μmol/L primer、0.1 μmol/L 蛍光 probe および 1.25 U AmpliTaq Gold を加え調製した。FAS および ACC の primer と probe は、Primer Express software (Applied Biosystems、FosterCity、CA、USA) を用いて設計した。また、β-actin、SREBP-1、MTP、MCP-1、TNF-α、TGF-β、Collagen type 1α1 および α-SMA の定量には、Taqman Gene Expression Assays (Applied Biosystems、FosterCity、CA、USA) を用いた。内部標準としては、β-actin を使用した。

病理組織学的検査に供するサンプルについては、摘出直後に 10%ホルマリン液で浸漬固定し、パラフィン包埋後に薄切切片を作成した。パラフィン切片は脱パラフィン処理後、HE 染色およびシリウスレッド染色を施し、病理組織学的検査に供した。

統計学的解析は、病理組織学的検査を除く各パラメータについて、NC SD ラットと NC SDT fatty ラットにおいては、Student の *t* 検定または Aspin-Welch の *t* 検定を、各動物の食事による影響 (NC、HC および HF) の比較においては、Tukey-Kramer 検定または Steel-Dwass 検定を実施し、*P*<0.05 を有意とした。結果は、平均値±標準偏差で示した。

第3節 結果

NC 給餌群において、SDT fatty ラットの体重は SD ラットと比較して試験期間を通じて有意に高値を示した。SDT fatty ラットの体重について、HC 給餌群において NC 給餌群と比較して試験期間を通じて明らかな差は認められなかったが、HF 給餌群では NC 給餌群と比較して 8 週齢において有意に高値を示した。SD ラットの体重について、HC、HF 給餌群共に、NC 給餌群と比較して試験期間を通じて明らかな差は認められなかった (図 2-2a)。血糖値について、NC 給餌群では SDT fatty ラットは SD ラットと比較して試験期間を通じて有意に高値を示した。また、SDT fatty ラットの血糖値について、HC 給餌群においては NC 給餌群と比較して 16 週齢において有意に高値を示し、HF 給餌群では NC 給餌群と比較して 12 週齢において有意に高値を示した。SD ラットの血糖値について、HC 給餌群において NC 給餌群と比較して 8、16、20 週齢において有意に高値を示したが、HF 給餌群では NC 給餌群と比較して試験期間を通じて明らかな差は認められなかった (図 2-2b)。血中インスリン値について、NC 給餌群では SDT fatty ラットは SD ラットと比較して 8、12、16、20 週齢において有意に高値を示した。また、SDT fatty ラットの血中インスリン値について、HC、HF 給餌群共に、NC 給餌群と比較して試験期間を通じて明らかな差は認められなかった。SD ラットの血中インスリン値について、HC 給餌群において NC 給餌群と比較して 16、20、24 週齢において有意に低値を示し、HF 給餌群では NC 給餌群と比較して 24 週齢において有意に低値を示した (図 2-2c)。血中 TG 値について、NC 給餌群では SDT fatty ラットは SD ラットと比較して試験期間を通じて有意に高値を示した。また、SDT fatty ラットの血中 TG 値について、HC 給餌群では NC 給餌群と比較して 20 週齢において有意に低値を示したが、HF 給餌群では NC 給餌群と比較して 12 週齢以降継続的に有意に高値を示した。SD ラットの血中 TG 値に

については、HC、HF 給餌群共に、NC 給餌群との間に試験期間を通じて明らかな差は認められなかった (図 2-2d)。血中 TC 値について、NC 給餌群では SDT fatty ラットは SD ラットと比較して試験期間を通じて有意に高値を示した。また、SDT fatty ラットの血中 TC 値について、HC 給餌群では NC 給餌群と比較して試験期間を通じて有意に高値を示し、HF 給餌群では NC 給餌群と比較して、8 週齢および 20 週齢においてのみ有意に高値を示した。SD ラットの血中 TC 値について、HC 給餌群で NC 給餌群と比較して試験期間を通じて明らかな差は認められなかったが、HF 給餌群では NC 給餌群と比較して 16 週齢以降継続的に有意に低値を示した (図 2-2e)。血中 ALT 値について、NC 給餌群では SDT fatty ラットは SD ラットと比較して 8、12、24 週齢にて有意に高値を示した。また、SDT fatty ラットの血中 ALT 値について、HC 給餌群で NC 給餌群と比較して試験期間を通じて明らかな差は認められなかったが、HF 給餌群では NC 給餌群と比較して 8 週齢において有意に低値を示した。SD ラットの血中 ALT 値について、HC、HF 給餌群共に、NC 給餌群と比較して試験期間を通じて明らかな差は認められなかった (図 2-2f)。血中 AST 値について、NC 給餌群では SDT fatty ラットは SD ラットと比較して 8、12 週齢において有意に高値を示した。また、SDT fatty ラットの血中 AST 値について、HC、HF 給餌群共に NC 給餌群と比較して 24 週齢において有意に高値を示した。SD ラットの血中 AST 値については、HC、HF 給餌群共に NC 給餌群と比較して試験期間を通じて明らかな差は認められなかった (図 2-2g)。

SDT fatty ラット、SD ラット NC 給餌群、HC 給餌群、HF 給餌群について、24 週齢にて解剖を行った。肝臓重量については、NC 給餌群では、SDT fatty ラットにおいて SD ラットと比較して有意な増加が確認できた。一方で、SDT fatty ラットの肝臓重量は HC、HF 給餌群ともに、NC 給餌群と比較して有意な差は認められなかった。一方、SD ラットの肝臓重量は、HC、HF 給餌群ともに、NC 給餌群と比較して有意に低値を示した (図 2-3a)。肝臓中 TG 含量については、NC 給餌群では、SDT fatty ラットにおいて SD ラットと比較

して有意な上昇が確認できた。一方で、SDT fatty ラットの肝臓中 TG 含量は HC、HF 給餌群ともに、NC 給餌群と比較して有意な差は認められなかった。SD ラットの肝臓中 TG 含量においても、HC、HF 給餌群ともに、NC 給餌群と比較して有意な差は認められなかった (図 2-3b)。肝臓中 TC 含量については、NC 給餌群で、SDT fatty ラットにおいて SD ラットと比較して、有意な差は認められなかった。一方で、SDT fatty ラットの肝臓中 TC 含量は、HC 給餌群では NC 給餌群と比較して有意な上昇が確認できたが、HF 給餌群では NC 給餌群と比較して有意な差は認められなかった。SD ラットの肝臓中 TC 含量においても、HC 給餌群では NC 給餌群と比較して有意な上昇が確認できたが、HF 給餌群では NC 給餌群と比較して有意な差は認められなかった (図 2-3c)。肝臓中 FFA 含量については、NC 給餌群で、SDT fatty ラットにおいて SD ラットと比較して有意な増加が確認できた。一方で、SDT fatty ラットの肝臓中 FFA 含量は HC 給餌群では、NC 給餌群と比較して有意な上昇が認められたが、HF 給餌群では NC 給餌群と比較して有意な変化は認められなかった。SD ラットの肝臓中 FFA 含量は HC、HF 給餌群ともに、NC 給餌群と比較して有意な差は認められなかった (図 2-3d)。

24 週齢の各動物の遺伝子発現量の確認を行った。肝脂質合成関連遺伝子として *FAS*、*ACC*、*SREBP-1*、肝 VLDL 放出関連遺伝子として *MTP* の測定を行った。測定した肝脂質合成関連遺伝子すべてについて、NC 給餌群で SDT fatty ラットにおいて SD ラットと比較して有意な差は認められなかった。SDT fatty ラットでは、HC 給餌群で NC 給餌群と比較して肝脂質合成関連遺伝子すべてにおいて有意な差は認められなかった。一方で HF 給餌群では NC 給餌群と比較して、*FAS*、*ACC* の有意な発現低下、および *SREBP-1* の発現低下傾向が認められた。SD ラットにおいては、HC、HF 給餌群ともに、NC 給餌群と比較して肝脂質合成関連遺伝子すべてにおいて有意な差は認められなかった (図 2-4a, b, c)。肝 VLDL 放出関連遺伝子 *MTP* について、NC 給餌群で SDT fatty ラットにおいて SD ラットと比較して有意な発現低下が認められた。SDT fatty ラットの肝 *MTP* 発現は、HC 給餌

群では NC 給餌群と比較して有意な低下が認められた。一方で、HF 給餌群では NC 給餌群と比較して有意な差は認められなかった。肝 *MTP* 発現について、SD ラットにおいては、HC、HF 給餌群ともに、NC 給餌群と比較して有意な差は認められなかった (図 2-4d)。肝炎症関連遺伝子として *TNF- α* と *MCP-1* の発現量を確認した。両遺伝子ともに、NC 給餌群で SDT fatty ラットにおいて SD ラットと比較して有意な差は認められなかった。SDT fatty ラットにおいて、HC 給餌群では、NC 給餌群と比較して *TNF- α* の有意な発現増加および *MCP-1* の発現増加傾向が認められた。一方で HF 給餌群では NC 給餌群と比較してそれらの有意な差は認められなかった。肝炎症関連遺伝子について、SD ラットにおいては、HC、HF 給餌群ともに、NC 給餌群と比較して有意な差は認められなかった (図 2-4e, f)。肝線維化関連遺伝子として *Collagen Type 1 α 1*、*TGF- β* 、 *α -SMA* の発現量を確認した。上記すべての遺伝子について、NC 給餌群で SDT fatty ラットにおいて SD ラットと比較して有意な差は認められなかった。SDT fatty ラットにおいて、HC 給餌群では NC 給餌群と比較して *TGF- β* の有意な発現増加および *Collagen Type 1 α 1* の発現増加傾向が認められた。また、SDT fatty ラット HF 給餌群では NC 給餌群と比較して *TGF- β* の有意な発現増加が認められた。 *α -SMA* については、SDT fatty ラット NC 給餌群と比較して HC 給餌、HF 給餌両群において有意な変化は認められなかった。肝線維化関連遺伝子について、SD ラットにおいては、HC、HF 給餌群ともに、NC 給餌群と比較して有意な変化は認められなかった (図 2-4g, h, i)。

24 週齢の各動物について、肝臓の病理学的変化を確認するため、パラフィン切片を HE およびシリウスレッド染色後に鏡検した。SDT fatty ラットにおいて、NC 給餌群では、全例で軽度から中等度の肝細胞の脂肪化および肥大が確認できた。また、炎症、線維化についてはごく軽度に認められた。HC 給餌群については肝細胞の高度な脂肪化および肥大が確認でき、その程度は NC 給餌群と比較して明らかに重篤であった。また、NC 給餌群と比較して、HC 給餌群については線維化も重篤であり、病態の明らかな亢進

が確認できた。一方で、HF 給餌群においては NC 給餌群と比較して脂肪化、線維化ともに明らかな差異はなく同程度であった。HC 給餌群については 16 週齢、20 週齢においても解剖し、病理組織学的評価を行った。その結果、HC 給餌 SDT fatty ラットでは、16 週齢から高度に肝線維化した動物が認められ、その匹数は高週齢になると共に増えていくことが確認できた。また、SD ラットについては、すべての条件において明らかな病理所見は認められなかった（表 2-1、図 2-5、図 2-6）。

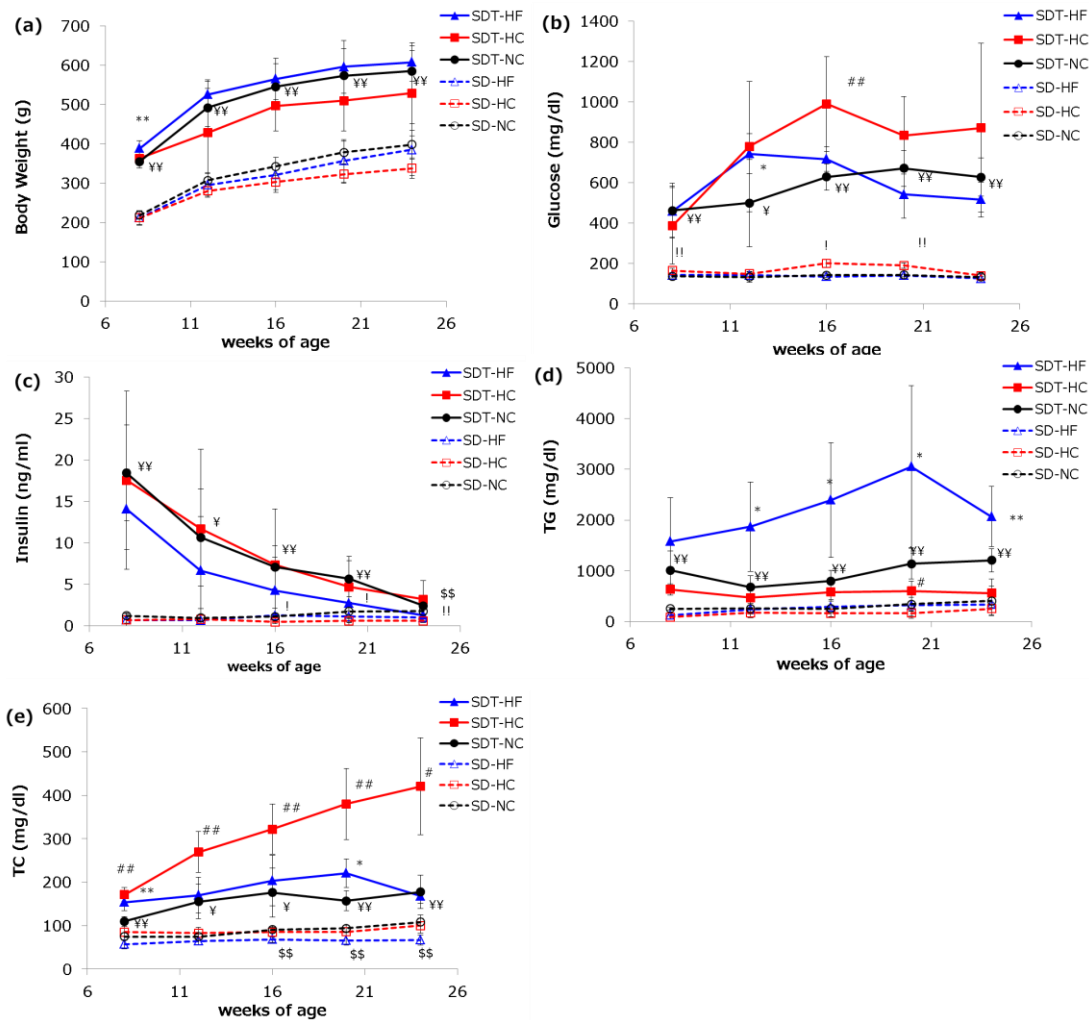


図 2-2a ~ 2-2e. 雌性 SD ラットおよび雌性 SDT fatty ラットの体重および糖脂質代謝に関連する血液生化学パラメータの経時変化

a : 体重 (Body Weight)、b : 血糖値 (Glucose)、c : 血中インスリン値 (Insulin)、
d : 血中 TG 値、e : 血中 TC 値

NC : 通常食群、HF : 高脂肪食群、HC : 高コレステロール食群

¥: $p < 0.05$ 、¥¥: $p < 0.01$ (NC SD ラットと NC SDT fatty ラットの比較)

#: $p < 0.05$ 、##: $p < 0.01$ (NC SDT fatty ラットと HC SDT fatty ラットの比較)

*: $p < 0.05$ 、**: $p < 0.01$ (NC SDT fatty ラットと HF SDT fatty ラットの比較)

!: $p < 0.05$ 、!!: $p < 0.01$ (NC SD ラットと HC SD ラットの比較)

\$\$: $p < 0.01$ (NC SD ラットと HF SD ラットの比較)

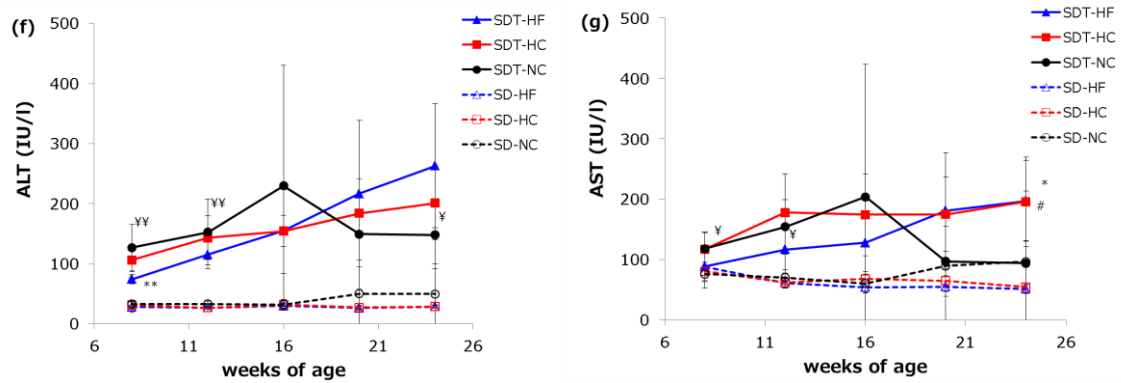


図 2-2f ~ 2-2g. 雌性 SD ラットおよび雌性 SDT fatty ラットの肝機能に関連する血液生化学パラメータの経時変化

f : 血中 ALT 値、g : 血中 AST 値

NC : 通常食群、HF : 高脂肪食群、HC : 高コレステロール食群

¥: $p < 0.05$ 、¥¥: $p < 0.01$ (NC SD ラットと NC SDT fatty ラットの比較)

#: $p < 0.05$ (NC SDT fatty ラットと HC SDT fatty ラットの比較)

*: $p < 0.05$ 、** : $p < 0.01$ (NC SDT fatty ラットと HF SDT fatty ラットの比較)

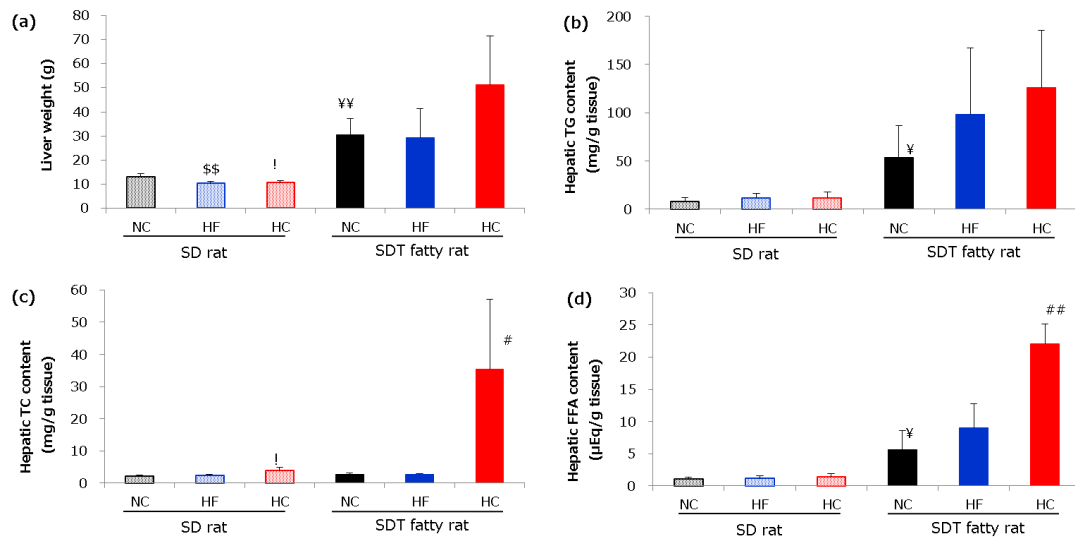


図 2-3a ~ 2-3d. 24 週齢における雌性 SD ラットおよび雌性 SDT fatty ラットの肝重量、肝中脂質含量

a: 肝重量 (Liver weight)、b: 肝中 TG 値 (Hepatic TG content)、c: 肝中 TC 値 (Hepatic TC content)、d: 肝中遊離脂肪酸値 (Hepatic FFA content)

NC: 通常食群、HF: 高脂肪食群、HC: 高コレステロール食群

¥: $p < 0.05$ 、¥¥: $p < 0.01$ (NC SD ラットと NC SDT fatty ラットの比較)

#: $p < 0.05$ 、##: $p < 0.01$ (NC SDT fatty ラットと HC SDT fatty ラットの比較)

\$\$: $p < 0.01$ (NC SD ラットと HF SD ラットの比較)

!: $p < 0.05$ (NC SD ラットと HC SD ラットの比較)

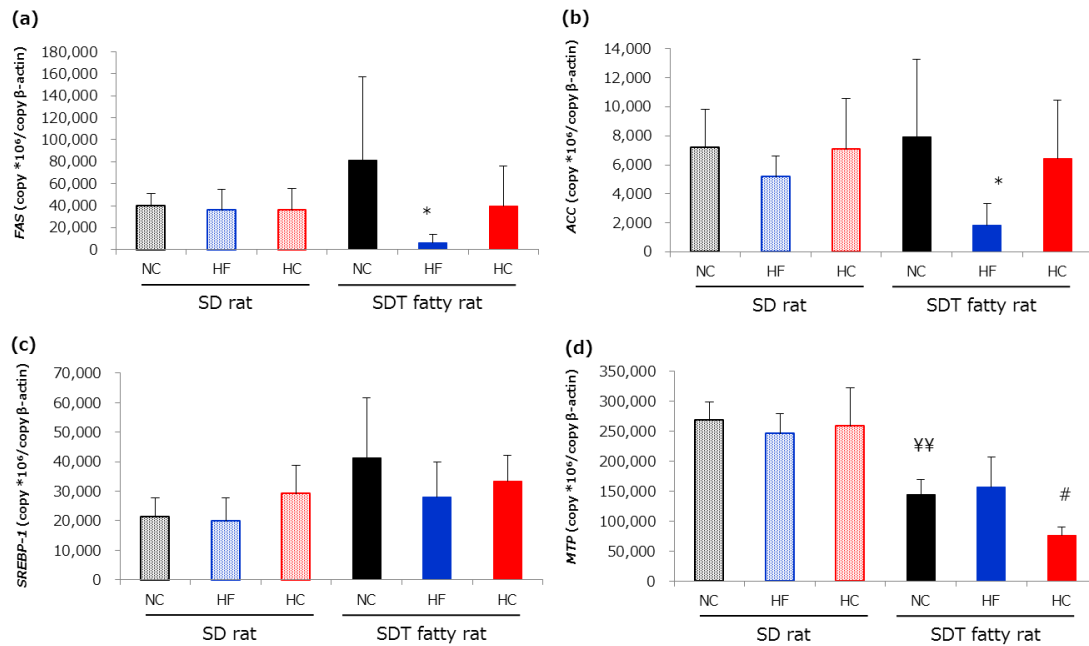


図 2-4a ~ 2-4d. 24 週齢における雌性 SD ラットおよび雌性 SDT fatty ラット肝臓の TG 合成・VLDL 放出に関連する遺伝子発現変動

a : *FAS*、 b ; *ACC*、 c : *SREBP-1*、 d : *MTP*

NC : 通常食群、 HF : 高脂肪食群、 HC : 高コレステロール食群

¥¥: $p < 0.01$ (NC SD ラットと NC SDT fatty ラットの比較)

*: $p < 0.05$ (NC SDT fatty ラットと HF SDT fatty ラットの比較)

#: $p < 0.05$ (NC SDT fatty ラットと HC SDT fatty ラットの比較)

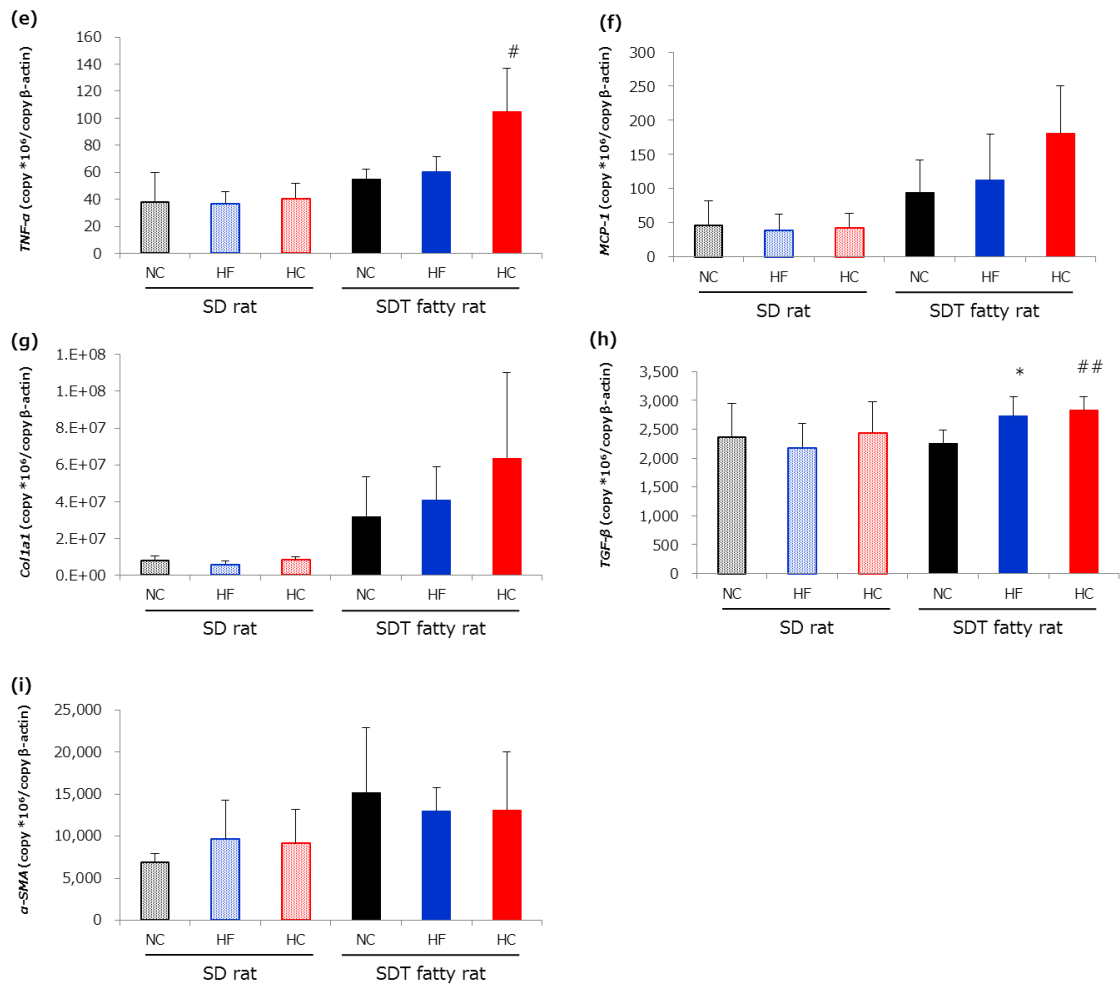


図 2-4e ~ 2-4i. 24 週齢における雌性 SD ラットおよび雌性 SDT fatty ラット肝臓の炎症、線維化に関連する遺伝子発現変動

e : *TNF-α*、f : *MCP-1*、g : *Collagen type 1a1 (Col1a1)*、h : *TGF-β*、i : *α-SMA*

NC : 通常食群、HF : 高脂肪食群、HC : 高コレステロール食群

*: $p < 0.05$ (NC SDT fatty ラットと HF SDT fatty ラットの比較)

#: $p < 0.05$ 、##: $p < 0.01$ (NC SDT fatty ラットと HC SDT fatty ラットの比較)

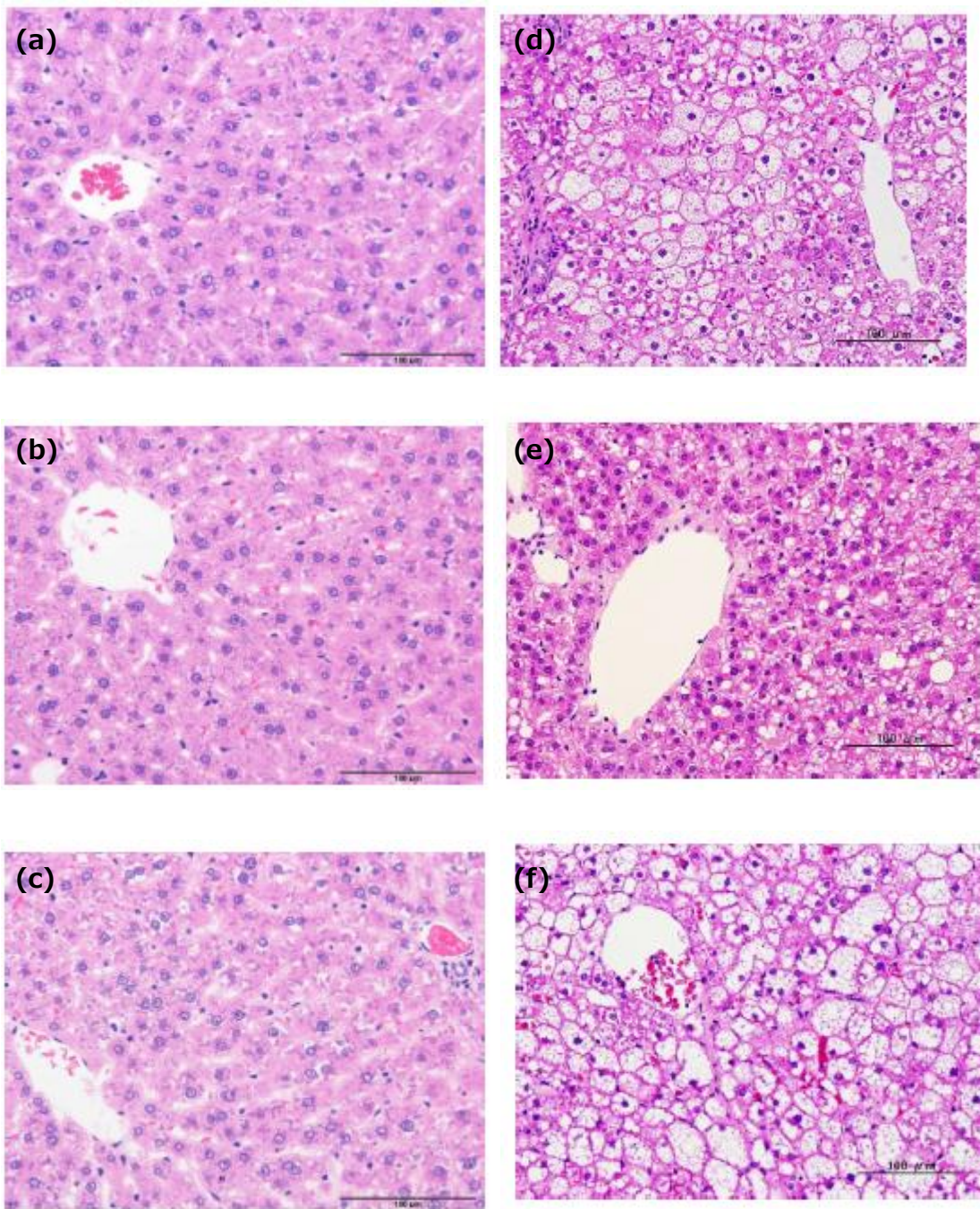


図 2-5. 24 週齢における雌性 SD ラットおよび雌性 SDT fatty ラット肝臓の肝臓病理写真 (HE 染色)

(a) NC SD ラット、(b) HF SD ラット、(c) HC SD ラット、(d) NC SDT fatty ラット、
 (e) HF SDT fatty ラット、(f) HC SDT fatty ラット

NC : 通常食群、HF : 高脂肪食群、HC : 高コレステロール食群

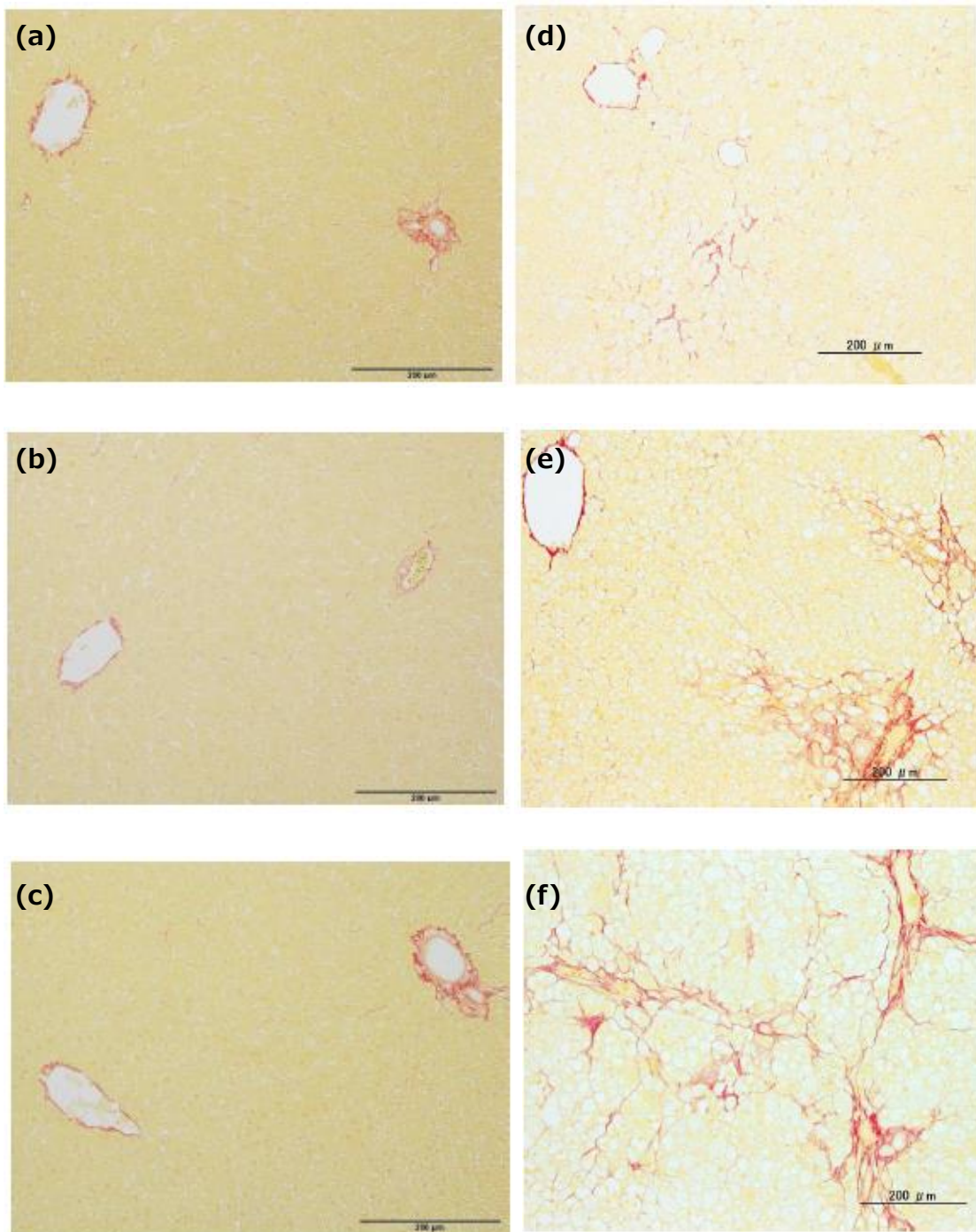


図 2-6. 24 週齢における雌性 SD ラットおよび雌性 SDT fatty ラット肝臓の肝臓病理写真 (シリウスレッド染色)

(a) NC SD ラット、(b) HF SD ラット、(c) HC SD ラット、(d) NC SDT fatty ラット、
 (e) HF SDT fatty ラット、(f) HC SDT fatty ラット

NC : 通常食群、HF : 高脂肪食群、HC : 高コレステロール食群

表 2-1. 24 週齢における雌性 SD ラットおよび 16~24 週齢における雌性 SDT fatty ラット肝臓の病理組織学的評価結果

Weeks of age		16 weeks	20 weeks	24 weeks					
Strain		SDT fatty					SD		
diet		HC			HF	NC	HC	HF	NC
Hepatoesteatosis (Vacuolar change/Fatty change)	-	0	0	0	0	0	5	5	5
	±	0	0	0	1	1	0	1	0
	+	0	0	0	2	0	0	0	0
	2+	1	1	1	2	4	0	0	0
	3+	4	5	5	1	0	0	0	0
Hypertrophy of hepatocyte (with Vacuolation/Fatty change)	-	0	0	0	0	0	5	6	5
	±	1	0	0	1	1	0	0	0
	+	1	0	0	2	0	0	0	0
	2+	3	1	1	2	4	0	0	0
	3+	0	5	5	1	0	0	0	0
Fibrosis	-	1	0	0	0	0	5	6	5
	±	3	4	2	6	5	0	0	0
	+	1	2	4	0	0	0	0	0
	2+	0	0	0	0	0	0	0	0
	3+	0	0	0	0	0	0	0	0
Infiltration, inflammatory cell,	-	2	4	4	3	3	5	6	5
	±	2	1	2	3	2	0	0	0
	+	1	1	0	0	0	0	0	0
	2+	0	0	0	0	0	0	0	0
	3+	0	0	0	0	0	0	0	0

- : Negative、± : Very slight、+ : Slight、2+ : Moderate、3+ : Severe

脂肪肝、肝細胞肥大、線維化、炎症細胞の浸潤についてスコア化を実施した。

第4節 考察

SDT fatty ラットは新規肥満2型糖尿病モデル動物であり、雌雄ともに若週齢から糖尿病を発症することが知られている。また、雌性 SDT fatty ラットは NC 給餌条件で長期飼育によって脂肪肝を伴う肝線維化が発症することが報告されている (Ishii et al., 2015)。本研究では、NC 給餌条件の雌性 SDT fatty ラットで確認される肝線維化について、より短期間で発症を惹起する目的で、HF、または HC を給餌することによる影響を確認した。その結果、HC 給餌により線維化の発症は早期化することが確認できたが、HF 給餌では線維化発症の促進に対し、明らかな影響が確認できなかった。

各条件において、肝臓中脂質蓄積量を検討した結果、HC 給餌群については NC 給餌群と比較して肝臓中 FFA の高度な蓄積が確認された。肝臓中の過剰な FFA 蓄積は MLK3 の活性化を介して、JNK や p38 MAPK を活性化し、肝炎を悪化させること (Ibrahim et al., 2016; Tomita et al., 2017)、また、TLR4 を介して NF- κ B を活性化させることが知られている (Sharifnia et al., 2015)。また、TLR4 は肝線維化への関与も報告されている (Tomita et al., 2014)。これらのことから、肝臓での FFA 蓄積は肝炎、肝線維化悪化に影響する可能性が考えられる。実際に、SDT fatty ラット HC 給餌群では *TNF- α* 、*MCP-1* といった肝炎に関連する遺伝子発現や、*TGF- β* 、*Collagen 1a1* といった肝線維化に関連する遺伝子発現が、NC 給餌群と比較し亢進していた。HC 給餌群での線維化発症促進は、肝臓中 FFA 蓄積が影響したと考えられた。

HC 給餌群の肝臓 FFA 蓄積は肝 VLDL 放出抑制の影響によって重篤化した可能性が考えられる。SDT fatty ラット HC 給餌群では、肝 VLDL 放出に関与する遺伝子である *MTP* の発現が NC 給餌群と比較し低下していた。このため、HC 給餌群では肝臓からの VLDL 放出が低下し、肝臓での TG 蓄積が引き起こされ、その結果肝臓中 FFA 蓄積が重篤化した

と考えられた。

一方、SDT fatty ラット HF 給餌群では、NC 給餌群と比較して肝臓中 FFA 蓄積亢進は認められなかった。SDT fatty ラット HF 給餌群では、NC 給餌群と比較して肝臓中脂質合成遺伝子の発現低下が認められた。この結果から、SDT fatty ラット HF 給餌群では肝脂質合成が低下していると推測できる。肝脂質合成について健常人と脂肪肝患者で比較検討した結果、肝脂質合成は脂肪肝患者で上昇しており (Lambert et al., 2014)、NASH 患者での肝中脂質蓄積亢進は、肝脂質合成が大きく影響していると考えられている。SDT fatty ラット HF 給餌群において、肝臓中 FFA 蓄積亢進が認められなかった原因としても、肝脂質合成の低下が大きく影響していると考えられた。その結果、肝 FFA 蓄積も亢進せず、肝線維化促進も認められなかった可能性が考えられた。

以上から SDT fatty ラットは HC 給餌条件において NASH 様病態発症が早期化し、そのメカニズムとしては過剰な FFA 蓄積が大きく影響している可能性が想定された。

第5節 要約

雌性 SDT fatty ラットは、通常食給餌条件で 32 週という長期飼育を行うことで NASH 様病態を発症する。効率的な創薬研究を行う際には 32 週という時間はあまりにも長く、その病態発症の早期化が、本病態モデル動物の有用性向上のために不可欠である。本研究では食事由来の脂質過剰供給による、SDT fatty ラットの NASH 様病態発症の早期化について検討した。高脂肪食、高コレステロール食による発症への影響を検討した結果、高コレステロール食給餌によって病態発症が早期化することが明らかとなった。その早期化メカニズムとしては肝臓中脂質蓄積亢進、特に肝 FFA の蓄積亢進が大きく影響している可能性が考えられた。

第3章 高コレステロール食給餌 SDT fatty ラットの病態解析

第1節 緒言

雌性 SDT fatty ラットは通常食給餌条件では 32 週齢という長期飼育の結果、肝脂質蓄積を伴った肝線維化という NASH 様の表現型を呈すが、その発症は高コレステロール食給餌により早期化される病態であることが示された。薬剤開発のためにモデル動物を使用していく際には、その特徴やヒト病態との類似性を把握する必要がある。本章では、高コレステロール食給餌雌性 SDT fatty ラットの病態発症メカニズムについて、その特徴を把握するため、肝臓中に蓄積した脂質のより詳細な解析を行った。第2章では、肝臓中 TG、TC、FFA の測定を行った結果、SDT fatty ラットでは高コレステロール給餌条件で、通常食給餌条件と比較して肝臓中 TC および FFA の蓄積が有意に亢進していることを確認した。肝臓の線維化については、FFA のみならず FC の関与 (Tomita et al., 2014) が考えられる。また、炎症に関連して PKC の活性化に関与する DAG や、NASH に関連するとされている酸化ストレスによる産物でありかつ肝炎悪化に影響を与えると考えられる酸化 DAG (Takekoshi et al., 1995) についても重要な因子である可能性が想定される。これらについて対象を通常食給餌条件と高コレステロール給餌条件に絞り検討を行い、病態発症へ影響を与える因子の考察を行った。

また、本モデル動物のヒト NASH 病態との類似性を確認する目的として、血漿中コリン濃度の測定を行った。NASH 患者では静脈内注射したコリンの肝臓での蓄積が低下し、血漿中コリン濃度が上昇することが報告されており、その変化は肝 *MTP* 発現の低下を伴うことが報告されている (図 3-1) (Fujita et al., 2009)。第2章では SDT fatty ラットにおいて、高コレステロール食給餌条件で通常食給餌条件と比較して肝 *MTP* 発現が

有意に低下することが確認できており、本モデル動物における血漿中コリン濃度と病態発症の関連性はヒト NASH との類似性といった観点から、非常に重要なデータとなると考えられる。本章では血漿中コリン濃度の検討も併せて行った。

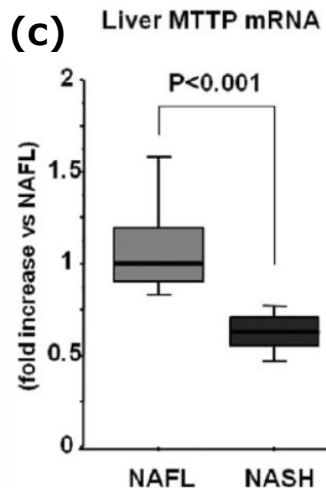
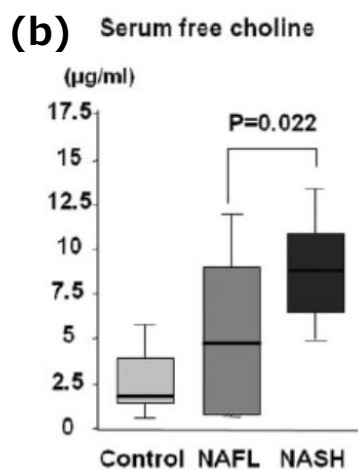
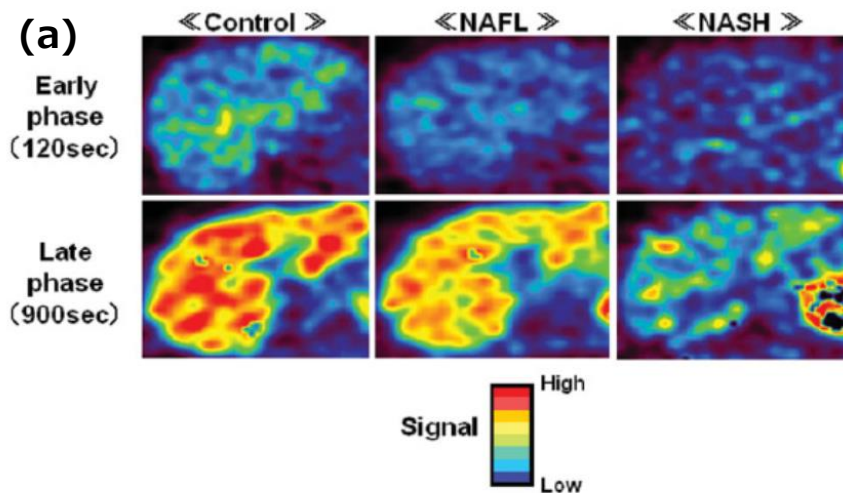


図 3-1. NAFLD 患者の肝臓でのコリン蓄積、血漿中コリン濃度、肝 *MTP* 発現の変化

a : 健常人 (Control)、NAFL 患者 (NAFL)、NASH 患者 (NASH) に対し [^{11}C] コリンを静脈内注射した際の肝臓での蓄積

b : 健常人 (Control)、NAFL 患者 (NAFL)、NASH 患者 (NASH) の血中コリン濃度

c : NAFL 患者 (NAFL)、NASH 患者 (NASH) の肝臓 *MTP* mRNA 発現

NASH 患者では、NAFL 患者と比較して静脈内注射した [^{11}C] コリンの肝臓での蓄積が低下し、血漿中コリン濃度の上昇と肝 VLDL 放出関連因子の 1 つである *MTP* の発現低下が認められる (Fujita et al., 2009)。

第2節 材料および方法

肝臓中 FC、DAG、酸化 DAG の測定や血漿中コリン濃度の測定には、第2章で採取した肝臓サンプルおよび血漿サンプルを用いた。肝臓中 FC 濃度測定は第2章と同様の方法で肝臓中脂質抽出を行い、脂質抽出液を乾固後、10% triton X-100 を含む 2-プロパノール 200 μ L に再溶解し、遊離コレステロール E キット（和光純薬工業）を用いて測定した。

肝臓中 DAG 濃度測定については以下に示す方法で行った。第2章と同様の方法で脂質抽出を行った後、抽出液全量を乾固し、750 μ L の 250 mmol/L sucrose と 1% Triton X を含む 100 mmol/L TRIS-HCl (pH 7.4) を添加した。攪拌後、同一容量の酢酸エチルを添加して再度よく攪拌した。攪拌後の液体を遠心分離 (16000g、4°C、5 分) し、脂質画分を回収した。回収した画分を乾固後、100 μ L のクロロホルムを添加して再溶解したのち、薄層クロマトグラフィーにて DAG を他の脂質画分から分離した。DAG 標準品を同一の薄層クロマトグラフィープレートに添加し、DAG の存在部位を確認した。DAG が存在する該当箇所のシリカゲルをチューブに回収し、1 mL のクロロホルムを添加した。クロロホルムを添加したチューブを乾固後、2-プロパノール 30 μ L に再溶解し、TG テストワコーキット（和光純薬工業）を用いて DAG 濃度を測定した。

肝臓中酸化 DAG 濃度の測定では、2-プロパノールによる抽出を行い、抽出サンプルを octadecylsilyl column を用いた逆相 HPLC、silica column を用いた順相 HPLC により精製後、pyrene-1-carbonyl cyanide を用いて蛍光標識した。蛍光標識した酸化 DAG を、逆相 HPLC を用いて定量した。

血漿中コリン濃度の測定はスカイライトバイオテック社において HPLC を用いて定量した。

統計学的解析は、2 群の比較においては、Student の t 検定または Aspin-Welch の t 検定を、多群の比較においては、Tukey-Kramer 検定または Steel-Dwass 検定を実施し、 $P < 0.05$ を有意とした。結果は、平均値±標準偏差で示した。

第3節 結果

24週齢において肝臓中に蓄積した脂質の詳細な解析を行った。肝臓中FCについて、通常食（NC）給餌群でSDT fatty ラットはSD ラットと比較して有意に高値を示した。SDT fatty ラットの肝臓中FCについて、高コレステロール食（HC）給餌群においてはNC給餌群と比較して増加傾向を示したが、有意差は認められなかった。また、SD ラットの肝臓中FCは食事条件による差は認められなかった（図3-2a）。肝臓中DAGについて、NC給餌群でSDT fatty ラットはSD ラットと比較して有意に高値を示した。SDT fatty ラットの肝臓中DAGはHC給餌群でNC給餌群と比較して有意に高値を示した。また、SD ラットの肝臓中DAGは食事条件による差は認められなかった（図3-2b）。肝臓中酸化DAGについて、NC給餌群ではSDT fatty ラットはSD ラットと比較して有意に高値を示した。SDT fatty ラットの肝臓中酸化DAGは、HC給餌群でNC給餌群と比較して増加傾向を示したが、有意差は認められなかった。また、SD ラットの肝臓中酸化DAGは、HC給餌群においてNC給餌群と比較して有意に高値を示した（図3-2c）。

血漿中コリン濃度の測定を行った。SDT fatty ラットではNC給餌群と比較して、HC給餌群で10週齢において有意な血漿中コリン濃度の上昇が確認でき、その傾向は16週齢でも確認できた。また、24週齢において、SDT fatty ラットはHC給餌群で血漿中コリン濃度の上昇が非常に顕著となった。また、SD ラットにおいては24週齢のみ血漿中コリン濃度測定を行ったが、食事条件による有意な差は認められなかったものの、HC給餌群において上昇傾向を認めた（図3-3）。

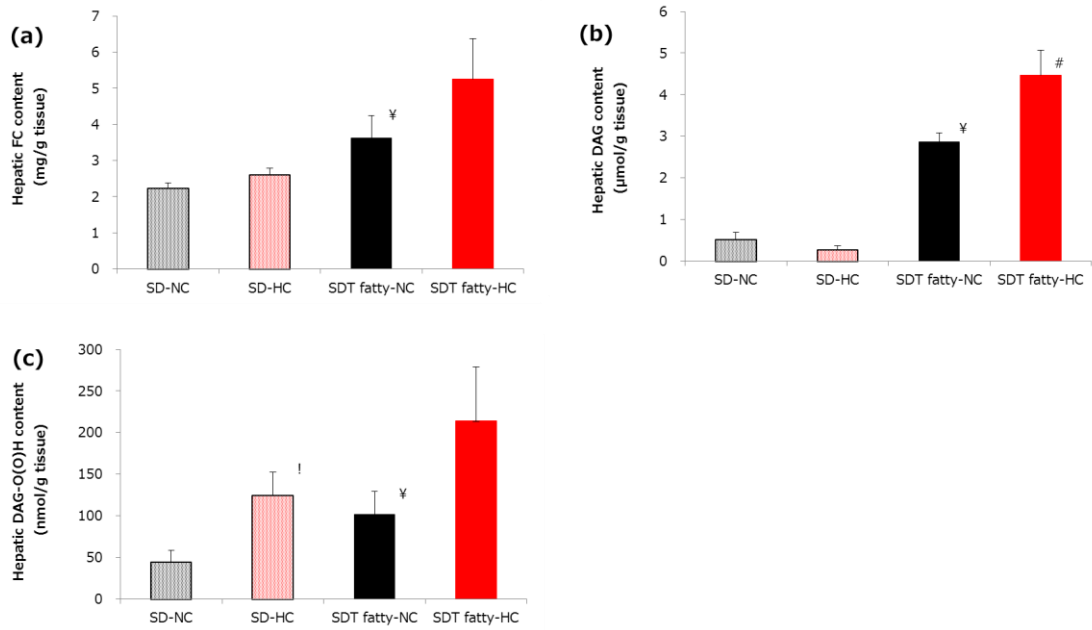


図 3-2a ~ 3-2c. 24 週齢における雌性 SD ラットおよび雌性 SDT fatty ラットの肝中 FC、DAG、酸化 DAG 含量

a : 肝中 FC 値 (Hepatic FC content)、b : 肝中 DAG 値 (Hepatic DAG content)、
c : 肝中酸化 DAG 値 (Hepatic DAG-O(O)H content)

NC : 通常食群、HC : 高コレステロール食群

¥: $p < 0.05$ (NC SD ラットと NC SDT fatty ラットの比較)

#: $p < 0.05$ (NC SDT fatty ラットと HC SDT fatty ラットの比較)

!: $p < 0.05$ (NC SD ラットと HC SD ラットの比較)

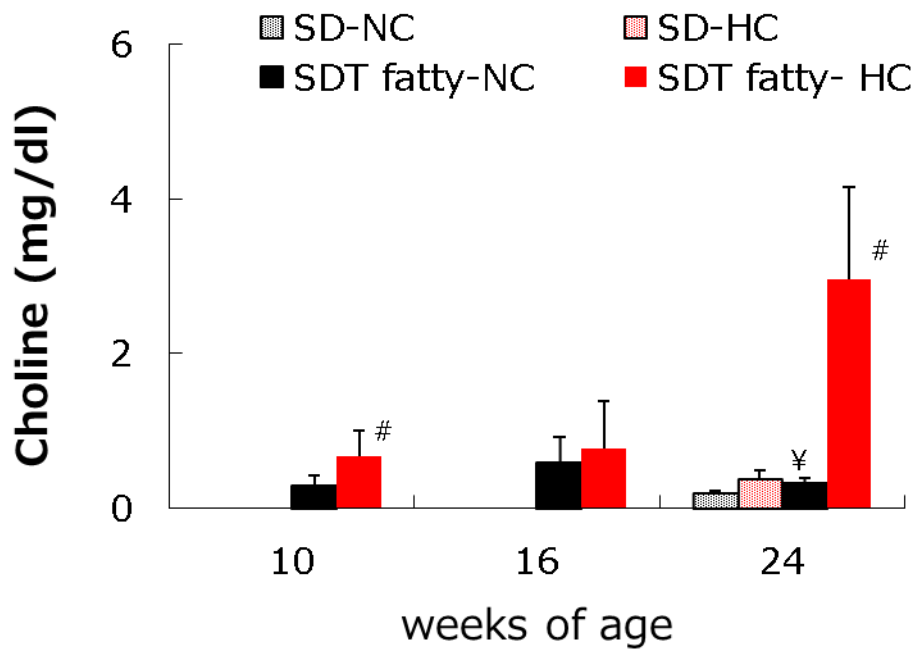


図 3-3. 週齢に伴う雌性 SD ラットおよび雌性 SDT fatty ラットの血漿中コリン濃度の変化

NC : 通常食群、HC : 高コレステロール食群

¥: $p < 0.05$ (NC SD ラットと NC SDT fatty ラットの比較)

#: $p < 0.05$ (NC SDT fatty ラットと HC SDT fatty ラットの比較)

第4節 考察

第2章にて得られた結果をもとに、本章ではHC給餌SDT fattyラットでの肝線維化促進メカニズムの解明およびそのヒトNASH病態との類似性を確認する目的で、肝臓中に蓄積している脂質の詳細な解析と、血漿中コリン濃度の測定を行った。肝臓中DAGを測定した結果、SDT fattyラットはHC給餌群でNC給餌群と比較して有意に高値であった。DAGはPKCを活性化することで、炎症の悪化に関与すると考えられる(Takekoshi et al., 1995)。また、第2章の結果から肝臓中FFAの蓄積が亢進していることと併せて考察すると、DAGやFFAの肝臓への蓄積が本病態発症に大きく影響している可能性が考えられた。

第2章にて得られた結果から、HC給餌条件ではSDT fattyラットおよびSDラット両群において肝臓中TCの上昇が確認できていた。このことから、肝臓中FC蓄積への影響を検討した。その結果、SDT fattyラットではNC給餌群と比較して、HC給餌群で肝臓中FCの上昇傾向が認められた。食事由来のコレステロールが肝星細胞における過剰なFC蓄積を介して肝星細胞を活性化し、肝炎悪化を伴わずに肝線維化を悪化させることが報告されている(Teratani et al., 2012)。そのメカニズムは肝星細胞におけるTGF- β の偽受容体であるBambiの発現低下を介したTGF- β シグナルの増強と考えられている。また、上記メカニズムにはノックアウトマウスを用いた実験でTLR4が関与する可能性が確認されている(Tomita et al., 2014)。TLR4はリガンド結合後にエンドソームへ移行しユビキチン化され、リソソームにて分解を受けることが報告されている(Husebye et al., 2006; Wang et al., 2007)。肝星細胞におけるFC蓄積によりリガンド結合後のTLR4分解が抑制され、その結果TLR4シグナルの増強を介してBambiの発現低下が起こっていることが報告されている(Tomita et al., 2014)。このように、肝星細胞におけるFC蓄積は、TLR4 \Rightarrow Bambi発現抑制 \Rightarrow TGF- β シグナル増強という流れで肝線維

化促進に影響していると考えられる。FFAはTLR4のリガンドとして機能することから、HC給餌SDT fattyラットでの過剰なFFA蓄積は、肝炎悪化を介した肝線維化への関与のみならず、上記メカニズムを介した肝線維化悪化への直接的な影響も考えられる。これらのことから、HC給餌SDT fattyラットで確認できた肝線維化の早期化は、肝臓において蓄積した種々の脂質が関与している可能性が考えられた(図3-4)。

肝臓中酸化DAGは酸化ストレス下で増加することが報告されている(Toriumi et al., 2013)。そこで、酸化ストレスによる影響を考察するため、肝臓中酸化DAGの測定を行った。肝臓中酸化DAGはSDT fattyラット、SDラットともにHC給餌群においてNC給餌群と比較して有意な蓄積亢進が認められた。酸化DAGはDAGと同様に、PKCを活性化することが報告されており(Takekoshi et al., 1995)、酸化DAGそのものが肝炎悪化に強力に影響すると考えられる。また、HC給餌SDラットにおいて、肝酸化DAG蓄積が顕著であったことは着眼に値する現象であり、コレステロールの過剰摂取の害悪は糖尿病の有無と無関係に肝酸化ストレスの惹起という形を介してNASH発症に関与する可能性が考えられた。HC給餌SDT fattyラットにおいても、肝酸化DAGの蓄積が亢進していることから、HC給餌によって肝酸化ストレスが惹起され、病態発症に影響を与えている可能性が考えられた。NASH患者においてもコレステロール摂取が亢進していることが報告されており(Musso et al., 2003)、HC給餌SDT fattyラットの病態が、ヒトNASHと類似している可能性が伺える。

ヒトNASH患者とHC給餌SDT fattyラットの類似性を考察するため、血漿中コリン濃度の測定を行った。血漿中コリン濃度はNASH患者でNAFL患者や健常人と比較して高値になることが報告されており、NAFLD患者においてMTP発現と逆相関することが報告されている(Imajo et al., 2012)。また、NASH患者では静脈内注射したコリンの肝臓への分布が低下しており、さらにはNAFL患者よりも肝MTP発現が有意に低下していることも報告されている(Fujita et al., 2009)。NASH患者における血漿中コリン濃度上

昇と肝臓へのコリン分布の低下から、NASH 患者の肝臓におけるコリン欠乏が示唆される。コリンは肝臓においてリポタンパクの原料となり、その不足は肝臓からの VLDL 放出の低下、ひいては肝脂質蓄積につながる。また、CDA 食 NASH モデルの表現型から、コリンの不足は重篤な脂肪肝や肝炎、肝線維化につながる現象であることが示唆される (Kawaratani et al., 2008; Tsujimoto et al., 2008; Tsujimoto et al., 2009)。これらのことから、ヒト NASH 患者での肝 VLDL 放出とコリンの関連性、およびコリンの NASH 病態への重要な関与が伺える。そこで、SDT fatty ラットの血漿中コリン濃度を確認した結果、SDT fatty ラットは HC 給餌群では NC 給餌群と比較して血漿中コリン濃度が上昇しており、それは肝線維化が重篤化する 24 週齢において特に顕著に認められた。また、第 2 章で確認した様に、24 週齢の SDT fatty ラットでは、HC 給餌群での肝 *MTP* の発現は NC 給餌群と比較して有意に低下していた。これらのことから、HC 給餌 SDT fatty ラットについて、血漿中コリン濃度の上昇は、ヒト NASH と同様に肝コリン蓄積の低下を意味していると推察できる。HC 給餌 SDT fatty ラットにおいても、CDA 食 NASH モデルと類似した病態が引き起こされている可能性があり、その結果重篤な肝脂質蓄積、肝線維化が確認されたものと考えられた。また、血漿中コリン濃度と肝 *MTP* 発現の関連性から、HC 給餌 SDT fatty ラットで引き起こされている NASH 様病態について、ヒト NASH 病態との類似性も伺えた。

以上から HC 給餌 SDT fatty ラットではヒト NASH に類似したメカニズムがある程度保持されており、その上で重篤な肝線維化を発症している有用な病態モデル動物となる可能性が考えられた。

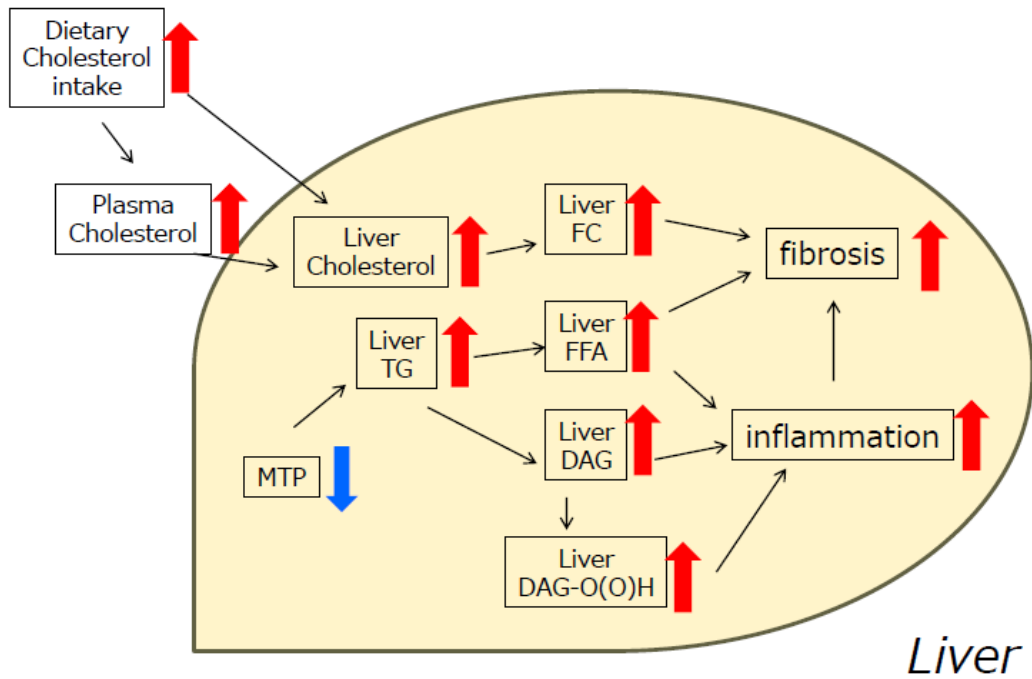


図 3-4. HC 給餌雌性 SDT fatty ラットの NASH 様病変発症メカニズム想定図

HC 給餌雌性 SDT fatty ラットでは、種々の脂質蓄積によって直接的、および肝炎悪化を介して肝線維化が惹起されている。

第5節 要約

第2章での検討により、雌性 SDT fatty ラットは高コレステロール食給餌により肝線維化発症が早期化し、そのメカニズムは肝脂質蓄積、特に肝 FFA 蓄積の亢進が大きく影響している可能性が考えられた。肝線維化発症メカニズムをより詳細に考察するため、肝臓中 FC、DAG の測定を行った。また、酸化ストレスの影響を検討するため、肝酸化 DAG の測定を行った。その結果、SDT fatty ラット高コレステロール食給餌群では、通常食給餌群と比較して肝臓中 FC 蓄積の亢進傾向が認められるとともに肝臓中 DAG 蓄積が有意に亢進しており、肝臓中 FFA 蓄積と同様に肝線維化発症の促進に影響しているものと想定された。肝臓中酸化 DAG については、SDT fatty ラット、SD ラットともに高コレステロール食給餌群で通常食給餌群と比較して有意に蓄積亢進しており、コレステロール負荷によって肝酸化ストレスが亢進したものと想定された。

SDT fatty ラット高コレステロール食給餌条件のヒト NASH 病態との類似性を把握する目的で、血漿中コリン濃度の測定を行った。その結果、SDT fatty ラットは高コレステロール食給餌群で通常食給餌群と比較して血漿中コリン濃度の上昇が確認でき、それは重篤な肝線維化と肝 *MTP* 発現の有意な低下を示す週齢において顕著であった。ヒト NASH でも血漿中コリン濃度上昇と肝 *MTP* 発現の低下が認められていることから、高コレステロール食給餌 SDT fatty ラットではヒト NASH と類似したメカニズムがある程度保持されており、その上で重篤な肝線維化を発症している可能性が期待できる。

第4章 高コレステロール食給餌 SDT fatty ラットにおける薬剤効果の検討

第1節 緒言

これまでの研究において、雌性 SDT fatty ラットは通常食給餌条件で 32 週齢において NASH 様の病態を呈することが示されている。2 章では、その病態の発症が高コレステロール食給餌により早期化されることを示した。また、3 章では、雌性 SDT fatty ラット高コレステロール食給餌条件での NASH 様病態が、ヒト NASH 病態と類似した部分を保持していることを、病態解析を通して示唆した。ヒト NASH 病態と類似した部分を有するモデル動物として、雌性 SDT fatty ラットは NASH 創薬研究に有用である可能性が考えられるが、ヒト NASH 病態は患者個別の背景疾患を基礎とした上で、脂肪肝、炎症、肝細胞死、線維化など多様な病態が複合的に関与し、それらに対して種々の因子が影響することにより複雑な過程で進行していく。そのため、高コレステロール食給餌雌性 SDT fatty ラットが、複雑なヒト NASH 病態のどの部分を反映したモデルであるかをヒトで有効性が報告されている薬剤を用いた薬効評価を通じ考察していくことが、実際の薬剤開発に応用していくためには非常に重要となる。

雌性 SDT fatty ラットは、過食を伴う高血糖、高インスリン血症、脂質異常症を基礎疾患として有しており、いわゆるメタボリックシンドローム様の症状を呈する。ヒト NASH でも同様の基礎疾患を有している患者が多く、このような患者にはインスリン抵抗性改善作用を有するピオグリタゾンの処方がガイドライン上推奨されており、本剤は実際に NASH 患者を対象とした臨床試験で有効性が報告されている(図 4-1) (Belfort et al., 2006; Sanyal et al., 2010; Della-Morte et al., 2014; He et al., 2016)。また、AMPK 活性化作用を有する別の抗糖尿病薬であるメトホルミンについても、小規模

の臨床試験において一過的ではあるが改善効果が報告されており、現時点では比較的多くの患者に処方されている（図 4-2）（Nair et al., 2004; Miller and Birnbaum, 2010）。NASH を適応とした薬剤は存在していないが、これらの薬剤はヒトでの臨床試験結果があることから、モデル動物の有効性とヒトでの有効性を比較していく薬剤ツールとして有用と考えられる。また、SDT fatty ラットは背景疾患として糖尿病を有することから、ヒトでの薬剤使用状況を考慮してもピオグリタゾンやメトホルミンの薬効評価から有用な情報が得られると期待できる。

本章においては高コレステロール食給餌雌性 SDT fatty ラットに、ヒトの有効性情報があるピオグリタゾンおよびメトホルミンを投与し、それらの薬効のキャラクタライズを行った。

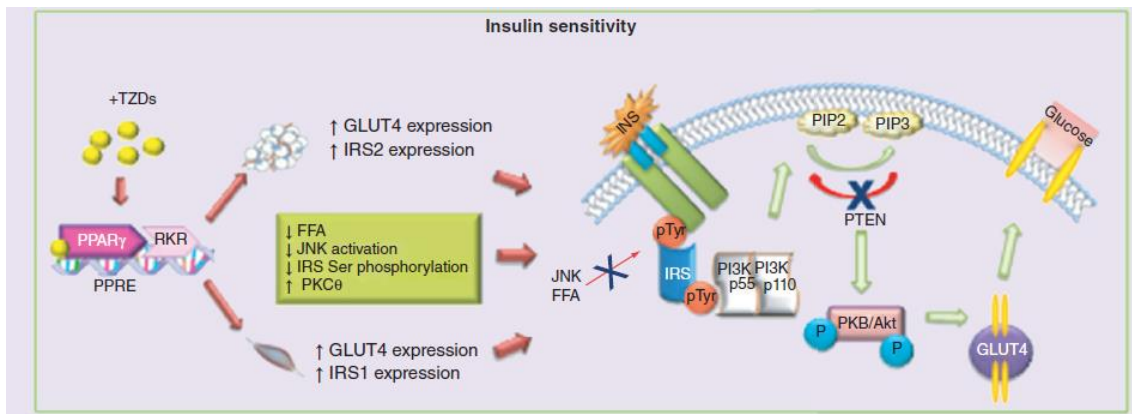


図 4-1. ピオグリタゾンの作用メカニズム(Della-Morte et al., 2014)

ピオグリタゾンに代表されるチアゾリジンジオン薬 (TZDs) は、核内受容体 PPAR γ に作用しインスリン抵抗性改善作用を発揮すると考えられている。

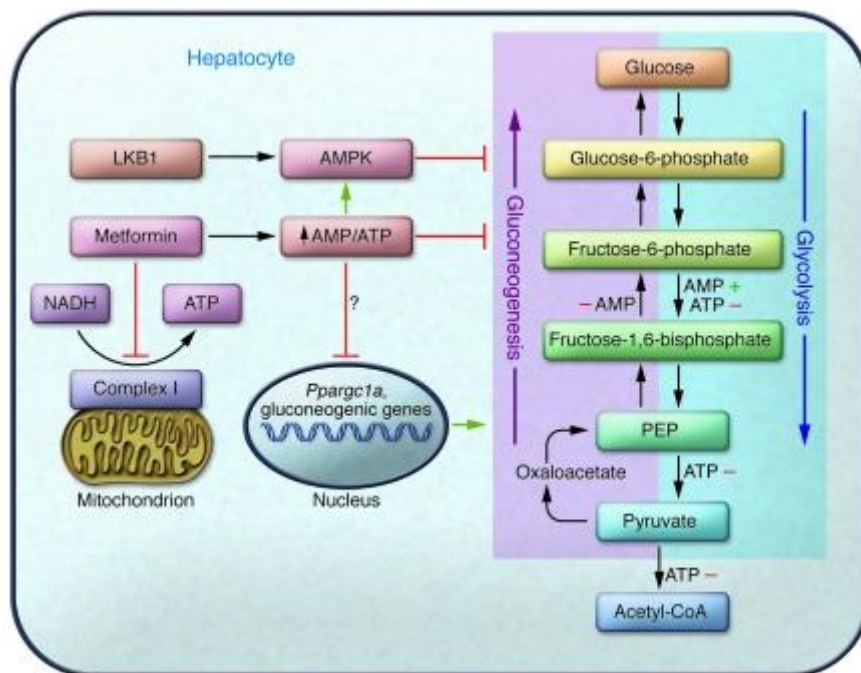


図 4-2. メトホルミンの作用メカニズム(Miller and Birnbaum, 2010)

メトホルミンは主に AMP/ATP ratio の上昇や AMPK の活性化を介し、肝臓での糖産生を抑制し抗糖尿病効果を発揮すると考えられている。

第2節 材料および方法

試験には日本クレア社から購入した雌性 SDT fatty ラット、および正常対照として雌性 SD ラットを供し、食事は高コレステロール食として CRF-1 に 2% のコレステロールを添加した飼料を用いた。飼育は第 2 章で記載した条件で行った。

ピオグリタゾンとメトホルミンは混餌投与し、試験期間を通じてピオグリタゾンは 10 mg/kg/day、メトホルミンは 300 mg/kg/day となるように各時点における動物の体重と摂餌量に合わせて 2 週間ごとに調製した。

雌性 SDT fatty ラットは 4 週齢での体重、血液生化学パラメータ (第 2 章と同じ項目、同じ方法) にてコントロール群、ピオグリタゾン投与群、メトホルミン投与群と各 N=6 として計 3 群に群分けし、試験を開始した。以降各動物の体重および血液生化学パラメータを、第 2 章と同様の方法で 8 週齢から 24 週齢まで約 4 週間間隔に測定した。摂餌量については約 4 週間間隔で、3 匹/ケージで飼育している飼育ケージ単位で測定を行った。全動物を 25 週齢にて第 2 章で記載した方法で屠殺し、摘出した肝臓については肝臓重量を確認後、肝臓中各種脂質含量測定 (肝臓中 TG、TC、FFA、FC)、mRNA 測定および病理組織学的検査に供した。以下、肝臓中脂質含量測定、mRNA 測定および病理組織学的検査については、第 2 章、第 3 章での記載と同様に行った。

統計学的解析は、摂餌量と病理組織学的検査を除く各パラメータについて、Tukey-Kramer 検定を実施し、 $P < 0.05$ を有意とした。結果は、摂餌量は平均値のみで示し、その他のパラメータは平均値 ± 標準偏差で示した。

第3節 結果

摂餌量について、コントロール群は試験期間を通じてSDラット群よりも高値を示した。また、ピオグリタゾン投与群は、13週齢まで他のSDT fattyラット群と比較して過食傾向が確認できた(図4-3a)。体重について、コントロール群の体重はSDラット群と比較して試験期間を通じて有意に高値を示した。ピオグリタゾン投与群の体重は、コントロール群と比較して8週齢から試験期間を通じて有意に高値を示した。メトホルミン投与群の体重は、コントロール群と比較して明らかな差は認められなかった(図4-3b)。

血糖値について、コントロール群はSDラット群と比較して8週齢時点から試験期間を通じて有意に高値を示した。また、ピオグリタゾン投与群の血糖値はコントロール群と比較して試験期間を通じて有意に低下しており、その値はSDラット群の値とほぼ同等であった。メトホルミン投与群の血糖値はコントロール群と比較して、8、13、20、24週齢時点で有意に低下したが、SDラット群と同等のレベルまで低下させることはなかった(図4-4a)。血中インスリン値について、コントロール群はSDラット群と比較して試験期間を通じて有意に高値を示した。また、ピオグリタゾン投与群の血中インスリン値はコントロール群と比較して13週齢で有意に低下した。メトホルミン投与群の血中インスリン値は、コントロール群と比較して明らかな差は認められなかった(図4-4b)。血中TG値について、コントロール群はSDラット群と比較して8および20週齢で有意に高値を示した。また、ピオグリタゾン投与群の血中TG値はコントロール群と比較して8、20、24週齢で有意に低下し、その値はSDラット群の値とほぼ同等であった。メトホルミン投与群の血中TG値は、コントロール群と比較して明らかな差は認められなかった(図4-4c)。血中TC値について、コントロール群はSDラット群と比較し

て8週齢から試験期間を通じて有意に高値を示した。また、ピオグリタゾン投与群の血中TC値は、コントロール群と比較して13週齢から24週齢まで継続して有意に低下した。メトホルミン投与群の血中TC値は、コントロール群と比較して明らかな差は認められなかった(図4-4d)。血中ALT値について、コントロール群はSDラット群と比較して試験期間を通じて有意に高値を示した。また、ピオグリタゾン投与群の血中ALT値はコントロール群と比較して17週齢から24週齢まで継続して有意に低下した。メトホルミン投与群の血中ALT値は、コントロール群と比較して8週齢で有意に低下した(図4-4e)。血中AST値について、コントロール群はSDラット群と比較して試験期間を通じて有意に高値を示した。また、ピオグリタゾン投与群の血中AST値はコントロール群と比較して8および17週齢で有意に低下した。メトホルミン投与群の血中AST値は、コントロール群と比較して明らかな差は認められなかった(図4-4f)。

25週齢にて各動物の解剖を行った。肝臓重量については、コントロール群においてSDラットと比較して有意な増加が確認できた。ピオグリタゾン投与群の肝臓重量はコントロール群と比較して有意に低下した。一方で、メトホルミン投与群の肝臓重量は、コントロール群と比較して明らかな差は認められなかった(図4-5a)。肝臓中TG含量については、コントロール群においてSDラットと比較して有意な増加が確認できた。ピオグリタゾン投与群の肝臓中TG含量はコントロール群と比較して有意に低下した。一方で、メトホルミン投与群の肝臓中TG含量は、コントロール群と比較して明らかな差は認められなかった(図4-5b)。肝臓中TC含量については、コントロール群においてSDラットと比較して有意な増加が確認できた。ピオグリタゾン投与群の肝臓中TC含量はコントロール群と比較して有意に低下した。一方で、メトホルミン投与群の肝臓中TC含量は、コントロール群と比較して明らかな差は認められなかった(図4-5c)。肝臓中FFA含量については、コントロール群においてSDラットと比較して有意な増加が確認できた。ピオグリタゾン投与群の肝臓中FFA含量はコントロール群と比較して有意に

低下した。一方で、メトホルミン投与群の肝臓中 FFA 含量は、コントロール群と比較して明らかな差は認められなかった (図 4-5d)。肝臓中 FC 含量については、コントロール群において SD ラットと比較して有意な増加が確認できた。ピオグリタゾン投与群の肝臓中 FC 含量はコントロール群と比較して有意に低下した。一方で、メトホルミン投与群の肝臓中 FC 含量は、コントロール群と比較して明らかな差は認められなかった (図 4-5e)。

25 週齢の各動物の遺伝子発現量の確認を行った。肝脂質合成関連遺伝子として *FAS*、*ACC*、*SREBP-1*、肝 VLDL 放出関連遺伝子として *MTP* の測定を行った。*FAS*、*ACC* について、コントロール群において SD ラットと比較して有意な増加が確認できた。一方で、ピオグリタゾン投与群、メトホルミン投与群では、コントロール群と比較して *FAS*、*ACC* 発現の明らかな差は認められなかった (図 4-6a, b)。*SREBP-1* について、コントロール群において SD ラットと比較して明らかな差が確認できなかった。ピオグリタゾン投与群、メトホルミン投与群では、コントロール群と比較して *SREBP-1* 発現の明らかな差は認められなかった (図 4-6c)。肝 VLDL 放出関連遺伝子 *MTP* について、コントロール群において SD ラットと比較して明らかな低下が確認できた。ピオグリタゾン投与群では、コントロール群と比較して、*MTP* の有意な発現上昇が確認できた。一方でメトホルミン投与群では、コントロール群と比較して *MTP* 発現の明らかな差は認められなかった (図 4-6d)。肝炎症関連遺伝子として *TNF- α* と *MCP-1* の発現量を確認した。コントロール群において両遺伝子ともに SD ラットと比較して有意な差は認められなかったが、コントロール群において SD ラットと比較して、それらの発現が上昇する傾向が確認できた。ピオグリタゾン投与群、メトホルミン投与群ではコントロール群と比較して有意な差は認められなかったが、それぞれ *TNF- α* と *MCP-1* 発現量の低下傾向が認められ、特にピオグリタゾン投与群は SD ラット群と同等レベルまで発現が低下していた (図 4-6e, f)。肝線維化関連遺伝子として *Collagen Type 1 α 1*、*TGF- β* 、 *α -SMA* の発現量を確認した。

*Collagen Type 1a1*について、コントロール群においてSDラットと比較して有意な発現上昇が確認できた。また、ピオグリタゾン投与群ではコントロール群と比較して *Collagen Type 1a1*は有意に発現が低下しており、その発現はSDラット群と同等レベルだった。一方で、メトホルミン投与群ではコントロール群と比較して *Collagen Type 1a1*の有意な差は認められなかった。また、*TGF-β*、*α-SMA*について、コントロール群においてSDラットと比較して有意な差は認められなかったが、コントロール群においてSDラットと比較してそれらの発現が上昇する傾向が確認できた。*TGF-β*について、ピオグリタゾン投与群ではコントロール群と比較して有意に発現が低下しており、その発現のレベルはSDラット群と同等レベルだった。一方で、メトホルミン投与群ではコントロール群と比較して *TGF-β* 発現の有意な差は認められなかった。*α-SMA*について、ピオグリタゾン投与群、メトホルミン投与群共にコントロール群との間に有意な差は認められなかった (図 4-6g, h, i)。

25週齢の各動物について、肝臓の病理学的変化を確認するため、パラフィン切片をHEおよびシリウスレッド染色後に鏡検した。コントロール群においては、全例で高度の肝細胞の脂肪化および中程度から高度の肝細胞の肥大が確認できた。また、炎症についてはごく軽度から中程度に、線維化については1動物はネガティブであったものの、その他の動物については軽度から中程度の線維化が認められた。メトホルミン群においては、一部の動物で組織学的な改善を認めるものの、その他の例においてはコントロール群と比較して明らかな改善効果は認められなかった。ピオグリタゾン群においては、全例で明らかに組織学的な改善が認められ、肝細胞の脂肪化、肥大、肝炎、線維化すべてにおいてコントロール群と比較して明らかな改善効果が認められた。(表 4-1、図 4-7)。

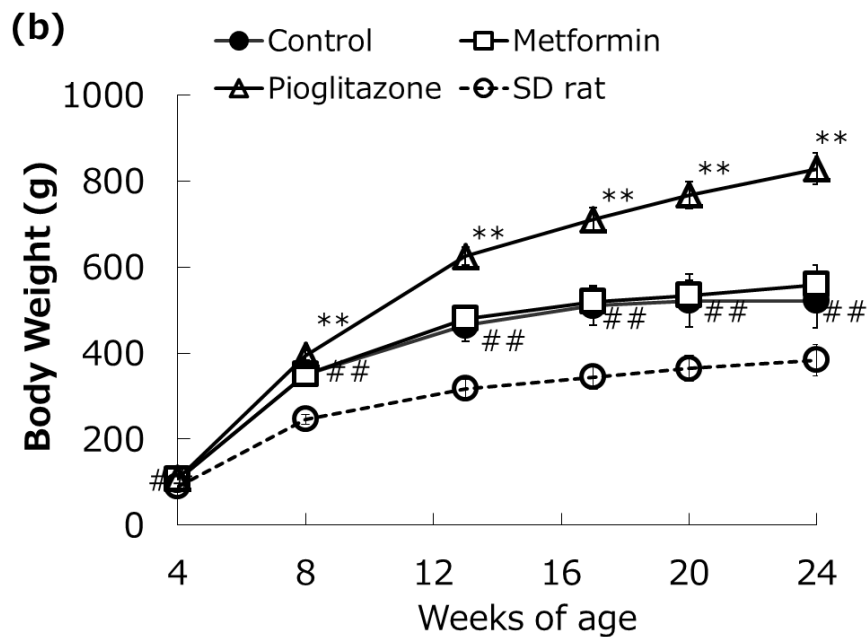
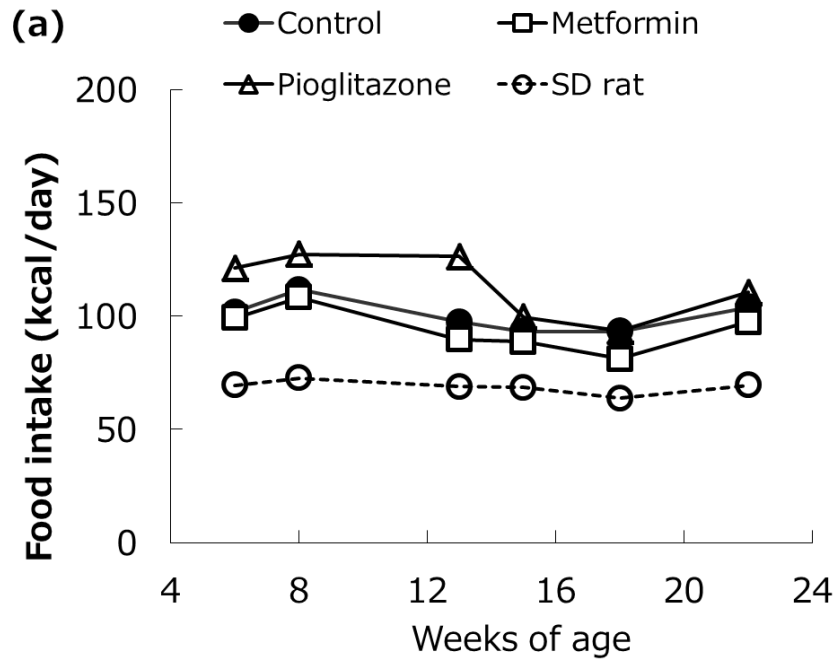


図 4-3a ~ 4-3b. 高コレステロール食給餌雌性 SDT fatty ラット、薬剤評価時における摂餌、体重の経時変化

a: 摂餌 (Food intake)、b: 体重 (Body Weight)

Control: 対照群、Metformin: メトホルミン投与群、Pioglitazone: ピオグリタゾン投与群、SD rat: 正常対照群

##: $p < 0.01$ (正常対照群と対照群の比較)

** : $p < 0.01$ (対照群とピオグリタゾン投与群の比較)

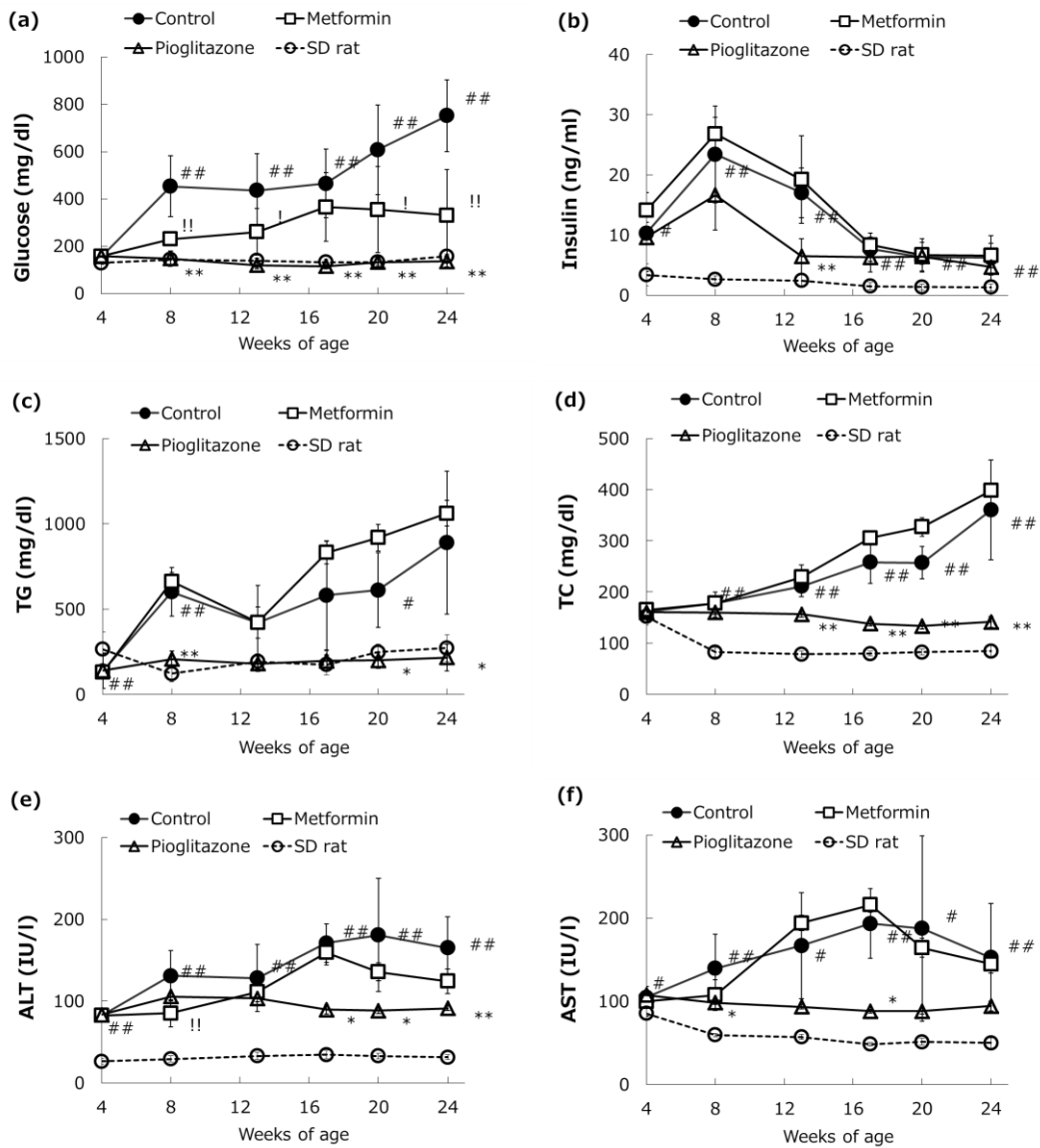


図 4-4a ~ 4-4f. 高コレステロール食給餌雌性 SDT fatty ラット、薬剤評価時における各種血液生化学パラメータの経時変化

a: 血糖値 (Glucose)、b: 血中インスリン値 (Insulin)、c: 血中 TG 値、d: 血中 TC 値、e: 血中 ALT 値、f: 血中 AST 値

Control: 対照群、Metformin: メトホルミン投与群、Pioglitazone: ピオグリタゾン投与群、SD rat: 正常対照群

#: $p < 0.05$, ##: $p < 0.01$ (正常対照群と対照群の比較)

!: $p < 0.05$, !!: $p < 0.01$ (対照群とメトホルミン投与群の比較)

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ (対照群とピオグリタゾン投与群の比較)

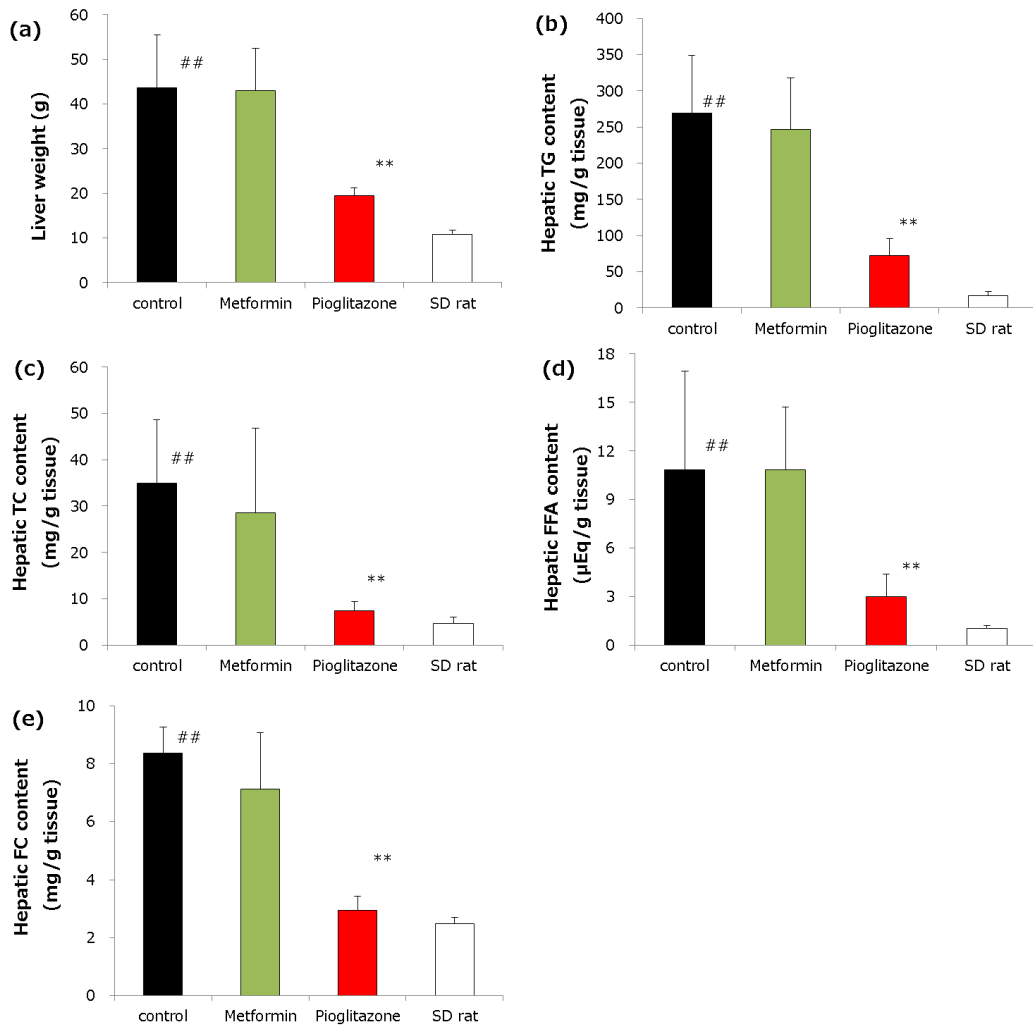


図 4-5a ~ 4-5e. 高コレステロール食給餌雌性 SDT fatty ラット、薬剤評価時における肝重量、肝中脂質含量

a: 肝重量 (Liver weight)、b: 肝中 TG 値 (Hepatic TG content)、c: 肝中 TC 値 (Hepatic TC content)、d: 肝中遊離脂肪酸値 (Hepatic FFA content)、e: 肝中 FC 値 (Hepatic FC content)

Control: 対照群、Metformin: メトホルミン投与群、Pioglitazone: ピオグリタゾン投与群、SD rat: 正常対照群

##: $p < 0.01$ (正常対照群と対照群の比較)

** $p < 0.01$ (対照群とピオグリタゾン投与群の比較)

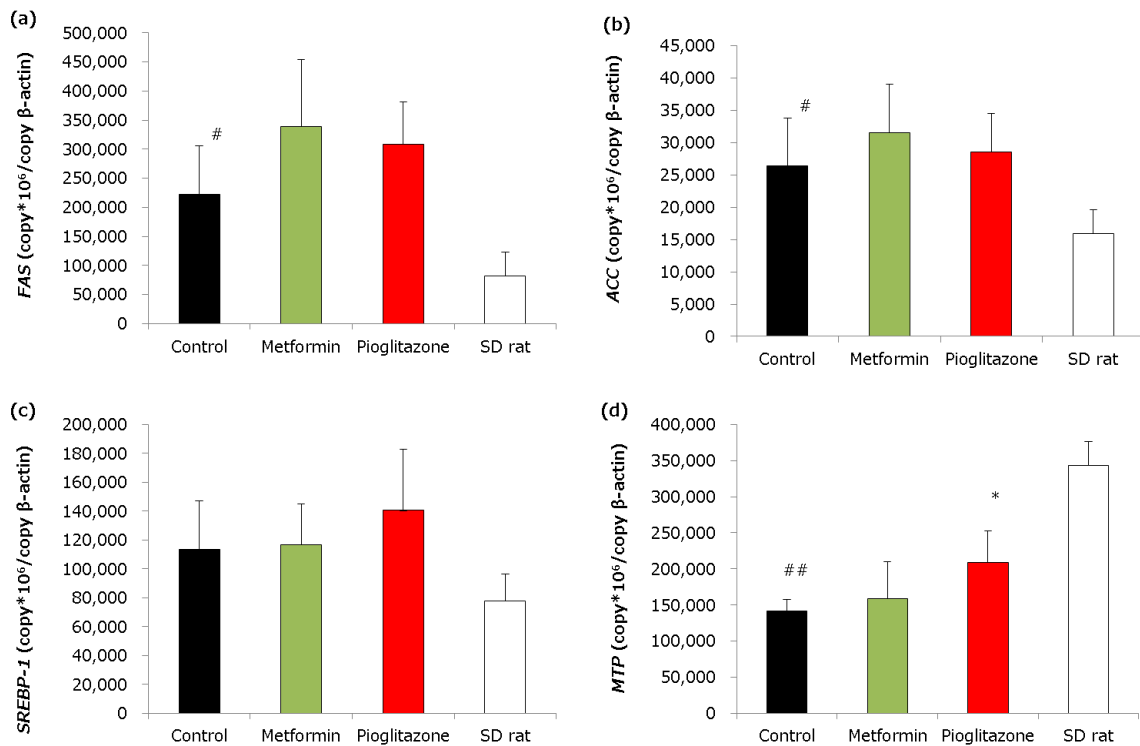


図 4-6a ~ 4-6d. 高コレステロール食給餌雌性 SDT fatty ラット、薬剤評価時における TG 合成・VLDL 放出に関連する肝遺伝子発現変動

a : FAS、b ; ACC、c : SREBP-1、d : MTP

Control : 対照群、Metformin : メトホルミン投与群、Pioglitazone : ピオグリタゾン投与群、SD rat : 正常対照群

: $p < 0.05$ 、## : $p < 0.01$ (正常対照群と対照群の比較)

* : $p < 0.05$ (対照群とピオグリタゾン投与群の比較)

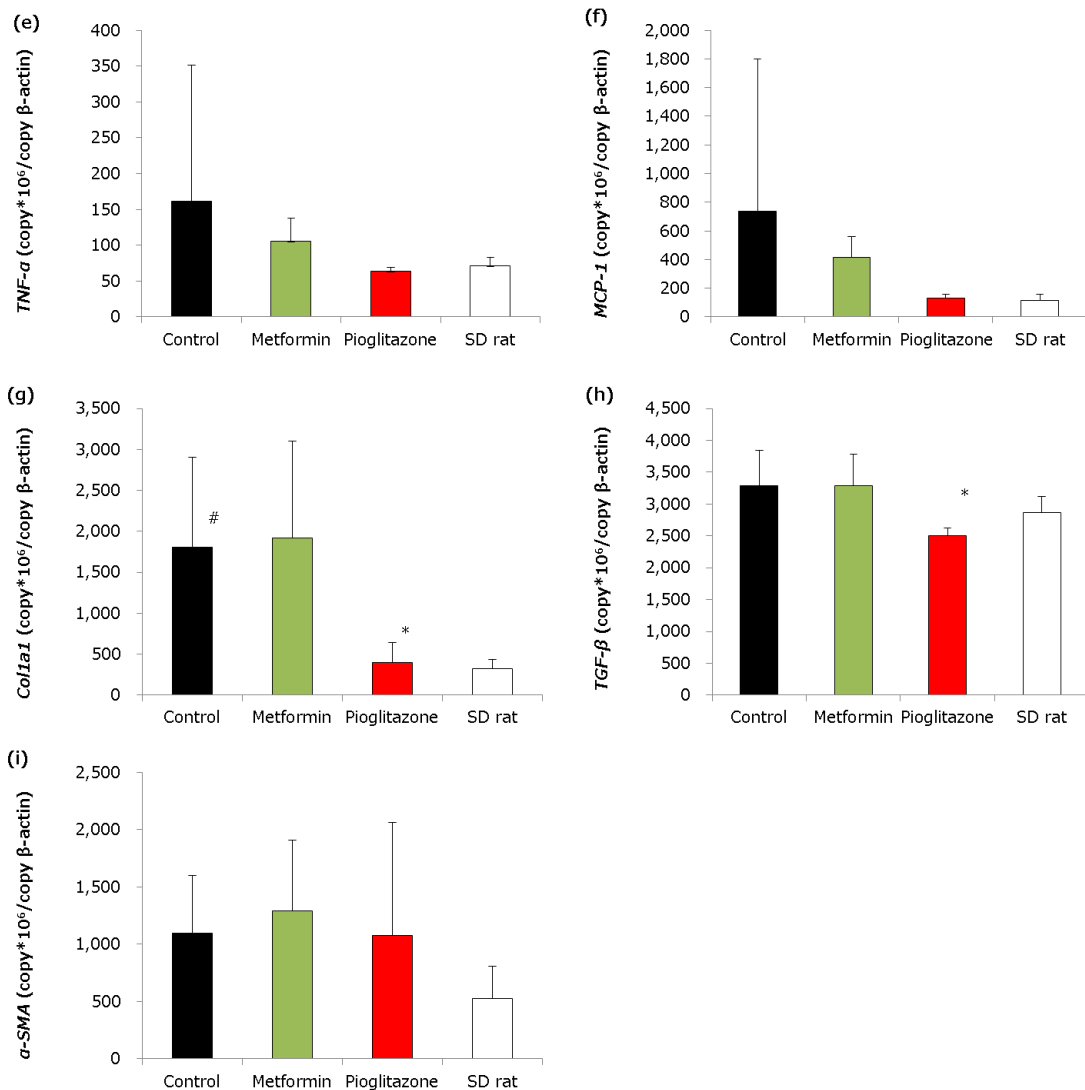


図 4-6e ~ 4-6i. 高コレステロール食給餌雌性 SDT fatty ラット、薬剤評価時における炎症、線維化に関連する肝遺伝子発現変動

e : *TNF-α*、f : *MCP-1*、g : *Collagen type 1α1 (Coll1a1)*、h : *TGF-β*、i : *α-SMA*

Control : 対照群、Metformin : メトホルミン投与群、Pioglitazone : ピオグリタゾン投与群、SD rat : 正常対照群

: $p < 0.05$ (正常対照群と対照群の比較)

* : $p < 0.05$ (対照群とピオグリタゾン投与群の比較)

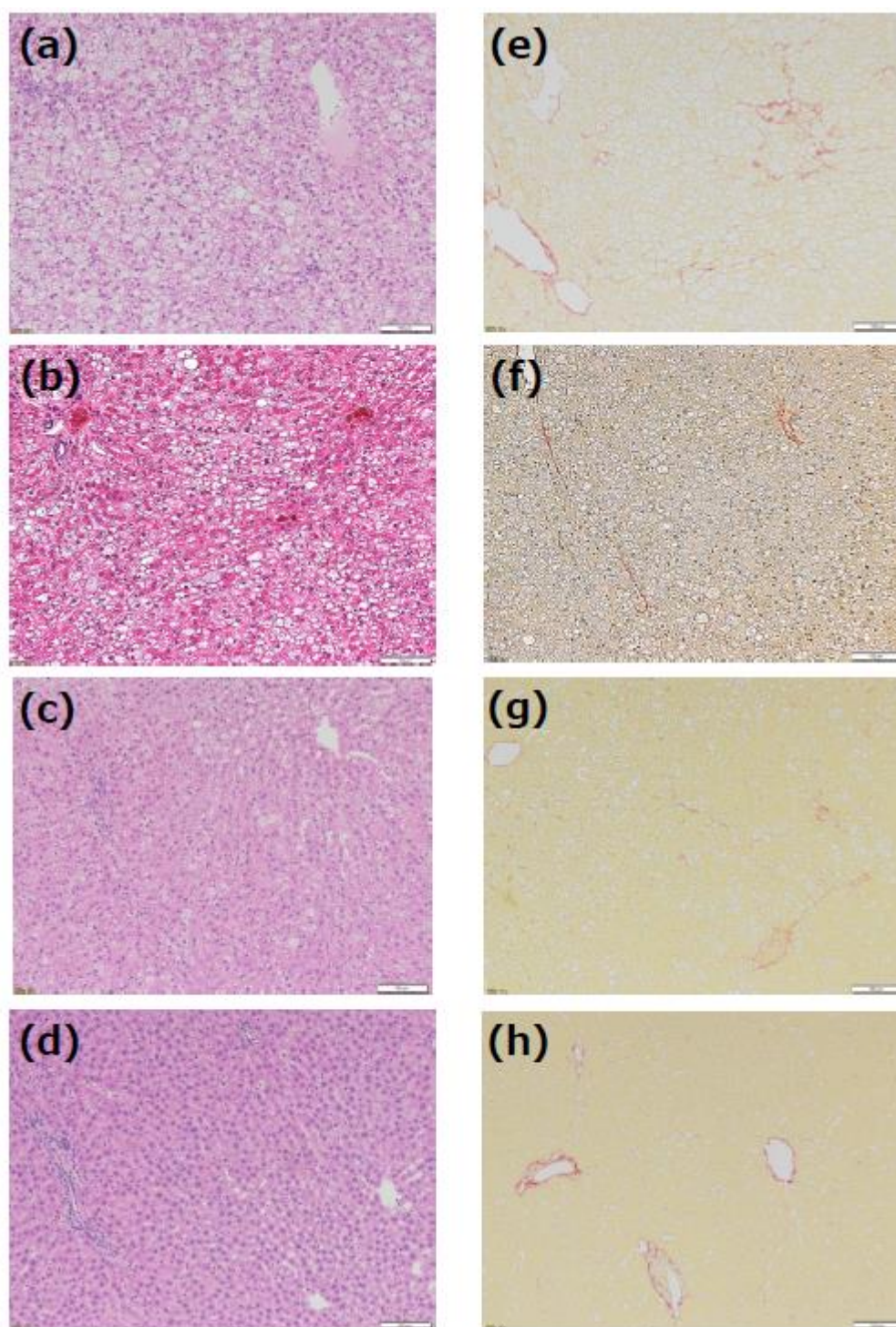


図 4-7. 高コレステロール食給餌雌性 SDT fatty ラット、薬剤評価時における肝臓病理写真

(a)-(d) HE 染色写真：

(a) 対照群、(b) メトホルミン投与群、(c) ピオグリタゾン投与群、(d) 正常対照群

(e)-(h) シリウスレッド染色写真：

(e) 対照群、(f) メトホルミン投与群、(g) ピオグリタゾン投与群、(h) 正常対照群

表 4-1. 高コレステロール食給餌雌性 SDT fatty ラット、薬剤評価時における肝臓病理組織学的評価結果

Weeks of age		25 weeks			
diet		HC			
Strain		SDT fatty			SD
group		control	metformin	pioglitazone	SD rat
Hepatosteatorsis (Vacuolar change/Fatty change)	-	0	0	0	6
	±	0	0	1	0
	+	0	0	5	0
	2+	0	1	0	0
	3+	6	5	0	0
Hypertrophy of hepatocyte (with Vacuolation/Fatty change)	-	0	0	0	6
	±	0	0	6	0
	+	0	1	0	0
	2+	5	3	0	0
	3+	1	2	0	0
Fibrosis	-	1	0	3	6
	±	0	2	3	0
	+	3	3	0	0
	2+	2	1	0	0
	3+	0	0	0	0
Infiltration, inflammatory cell,	-	0	0	3	5
	±	1	2	2	1
	+	3	3	1	0
	2+	2	1	0	0
	3+	0	0	0	0

- : Negative、± : Very slight、+ : Slight、2+ : Moderate、3+ : Severe
 脂肪肝、肝細胞肥大、線維化、炎症細胞の浸潤についてスコア化を実施した。

第4節 考 察

本章においては高コレステロール食を給餌した雌性 SDT fatty ラットにおけるメトホルミン、ピオグリタゾンといった抗糖尿病薬の処置による NASH 様病変改善効果の検討を行った。薬剤の投与用量は、予備検討にて雌性 SDT fatty ラットでの血糖値の低下効果を確認し、メトホルミンは 300 mg/kg、ピオグリタゾンは 10 mg/kg とした。ピオグリタゾンは明らかな肝線維化改善効果を示し、メトホルミンは一部の動物にのみ肝線維化改善効果を示した。特にピオグリタゾンによる改善効果は顕著であり、肝線維化改善効果に加え、血糖値、血中 TG 値の正常化、インスリン値の低下など各種血液生化学パラメータの改善効果、および脂肪肝、肝炎細胞浸潤といった肝組織病理学的変化に対する明らかな改善も認められた。上記の改善効果に加え、ピオグリタゾン投与群ではヒト同様に顕著な体重の増加が認められた。一方、メトホルミンについては血糖値の低下効果は有意なものであったものの、その他の血液生化学パラメータに明らかな変化は認められず、また、肝線維化を含む肝臓病理所見の改善効果も部分的であった。これら 2 剤の薬効評価結果を鑑みると、ヒト NASH での臨床試験で明らかな改善効果を示しながらも体重増加効果が懸念されているピオグリタゾンと、ヒトでは組織学的な改善効果は明らかではないと報告されているメトホルミンといった関係性が本モデルでも表現されており、非常に興味深い。現在、FXR 作動薬や CCR2/5 阻害薬といった、いくつかの薬剤が NASH を適応として後期臨床試験を実施中であり、これらの薬剤がヒトでも有効であると報告されている。本モデルにおいてこれらの薬剤が改善効果を示すかどうかは非常に興味深く、本モデル動物のヒト病態との類似性を確認していくうえで価値のある実験になると思われる。

ピオグリタゾン投与群については病理評価において肝臓中の脂質蓄積が著明に改善しており、コントロール群と比較し肝 TG、肝 TC、肝 FFA、肝 FC すべてが明らかに低下

していた。ピオグリタゾン投与群での顕著な体重増加と血中インスリン値低下に表わされるように、全身におけるインスリン抵抗性改善によって、肝臓以外の臓器での代謝改善効果により肝臓での脂質蓄積が低下したものと推察できる。肝遺伝子発現変動から肝脂質蓄積への影響を考察すると、コントロール群と比較してピオグリタゾン投与群で脂質合成遺伝子には明らかな変化はなく、脂質分泌に関わる *MTP* 発現の上昇が確認できた。肝 *MTP* については、*MTP* 阻害剤を用いた臨床試験において、投与患者において低脂肪食を摂取しているにもかかわらず肝臓中の脂肪量が増加することが報告されている (Cuchel et al., 2013) ことから、ヒトにおける *MTP* の明らかな肝脂質蓄積への関与が伺える。肝 *VLDL* 放出能の低下と肝脂質蓄積亢進という関連性については、*CDA* 食 *NASH* モデルでも確認できる。以上から、肝 *VLDL* 放出能の低下が脂肪肝を惹起し、*NASH* 悪化に関与することは、ヒトにおいてもげっ歯類の他モデルにおいても確認できる重要な現象であると考えられる。ピオグリタゾン投与群においては、コントロール群と比較して肝 *MTP* 発現が有意に上昇していたことから、本剤の肝脂質蓄積改善効果にはインスリン抵抗性改善効果に加え、肝 *MTP* 発現への効果も影響している可能性が考えられた。

インスリン抵抗性は肝脂質蓄積への関与のみならず、肝線維化発症に関連する重要な因子であると考えられており、ヒト *NASH* における肝線維化の進展にインスリンシグナルの低下が関連することが報告されている (Garcia-Monzon et al., 2011)。ピオグリタゾン投与群では肝炎、肝線維化について病理評価における明らかな改善効果に加え、肝遺伝子変動において、肝炎については *TNF- α* 、*MCP-1* の発現低下、肝線維化については *Collagen Type 1 α 1*、*TGF- β* の発現低下が確認できている。ピオグリタゾン投与によるインスリン抵抗性改善効果や肝臓中 *FFA* や *FC* の蓄積低下がこれらの改善効果をもたらしたことに加え、肝星細胞では *PPAR γ* の活性化によって、*TGF- β* 刺激によるコラーゲン産生が抑制されるといった報告もあり (Galli et al., 2002)、肝星細胞への直接的な作用による寄与も考えられる。ピオグリタゾン投与群においては、これらのことが複

合的に寄与し、顕著な肝線維化改善効果につながったものと推察できる。

メトホルミン投与群においては、血糖値の低下効果は持続的でかつ有意であったものの、その他の血液生化学パラメータ、病理組織学的評価および肝遺伝子変動において、明らかな効果は確認できなかった。メトホルミン投与群では、一部の動物でのみ病理組織学的評価における脂肪肝、肝炎、線維化の改善効果が確認できたが、ピオグリタゾンと比較すると、メトホルミンの効果は不明確であった。血糖値の低下のみでは NASH の改善を達成することは難しいことが推察される。メトホルミンについては NASH 患者を対象とした臨床試験もいくつか実施されているが、メトホルミンによる病理組織学的評価における改善効果を明確に示したものはない。現時点ではメトホルミンは NASH への有効性が期待できないと結論付けられている(日本消化器病学会, 2014)。

以上、糖尿病を背景疾患とする高コレステロール食給餌雌性 SDT fatty ラットにおいて、ピオグリタゾンは明らかな NASH 様病変改善効果を示したが、メトホルミンは限定的な効果しか示すことはできなかった。この結果はヒト NASH 臨床試験で示された結論と類似したものであり、高コレステロール食給餌雌性 SDT fatty ラットは、少なくとも糖尿病を背景としたヒト NASH 病態の一部を反映したモデルであることが推察できた。

第5節 要約

3章までの結果から、肥満2型糖尿病を背景疾患として有するSDT fatty ラットは、高コレステロール食給餌によって通常食給餌条件と比較して早期に脂肪肝を伴った肝線維化を発症し、病態解析によりその病態はヒト NASH に類似している部分がある可能性が示唆された。そこで、本章では糖尿病治療薬として代表的な薬剤であるピオグリタゾンとメトホルミンを用いてその効果について検証した。ピオグリタゾン投与により、高コレステロール食給餌雌性SDT fatty ラットは血中インスリン値の低下を伴った血糖値の正常化を示し、また、血中脂質や血中AST、ALTの低下も確認できた。ただし、ピオグリタゾン投与群では顕著な体重の増加を伴っていた。また、ピオグリタゾン投与によって、肝脂質蓄積の改善効果や肝線維化関連遺伝子の低下効果、さらに肝病理組織学的評価では、脂肪肝、肝炎、肝線維化すべてにおける明らかな改善効果が確認できた。一方で、メトホルミン投与群では血糖値の低下効果は持続的に確認できたが、その他の血液生化学パラメータや脂肪肝、肝炎、肝線維化への改善効果は部分的であり、明らかな改善効果を示すまでには至らなかった。

今回の結果は、2型糖尿病を背景疾患に有するヒト NASH 患者での有効性が報告されている薬剤であるピオグリタゾンと、ヒト NASH 患者での臨床試験結果から有効性が明確ではないメトホルミンという関係性が高コレステロール食給餌雌性SDT fatty ラットでも同様に表現されており、特に糖尿病を背景疾患とするヒト NASH 患者をターゲットとした薬剤開発のための実験ツールとして、本モデルは高い価値を有する可能性が示唆された。

第5章 総括

近年 NASH は肝がんや肝移植の原因疾患としての懸念が高まっているが、現時点において NASH を適応とした薬剤は存在しておらず、その開発が急務とされている。薬剤開発のためには実験動物を用いた非臨床試験による薬効評価が非常に重要となるが、複雑なヒト NASH 病態を完全に模倣できている病態モデル動物はなく、特に肥満 2 型糖尿病を背景疾患として有し、重篤な肝線維化を発症する NASH モデル動物は存在していない。雌性 SDT fatty ラットは過食を伴う新規の肥満 2 型糖尿病モデル動物であり、32 ～ 40 週という長期飼育条件下において、通常食条件で肝線維化を発症することが確認できている (Ishii et al., 2015)。また、NASH の予後に直接的に影響を与える因子が肝線維化であることがヒト臨床研究から報告されており、肝線維化への効果を検証することが、NASH 治療薬として最重要であると考えられている (Hagstrom et al., 2017)。本研究では、雌性 SDT fatty ラットの肝線維化発症早期化のための検討を実施し、そのメカニズムの把握とともに、ヒト NASH で有効性が確認できている薬剤の薬効評価を通じて、本モデル動物がヒト NASH 治療薬開発のためのツールとなりうるかどうかを検証した。

雌性 SDT fatty ラットの肝線維化発症早期化のための検討として、食事からの脂質の過剰摂取による影響を検討した。本動物への高脂肪食、高コレステロール食負荷による肝線維化への影響を検討した結果、高コレステロール食群で肝線維化の発症は 16 週齢で認められ、通常食給餌群と比較して顕著に発症が早期化することが確認できた。高コレステロール食群では肝臓での高度な脂質蓄積が確認でき、特に肝中の FFA や FC の蓄積が顕著に亢進していた。通常食群と高コレステロール食群での肝遺伝子発現の差異を確認すると、高コレステロール食群においては肝 VLDL 放出に関与する *MTP* 遺伝子の発現が有意に低下していた。このため、高コレステロール食群では肝臓からの VLDL 放出が低下し、肝臓での TG 蓄積が引き起こされ、その結果肝臓中脂質蓄積が重篤化した

と考えられた。ヒト NASH 患者においても、*MTP* の発現が低下していることが報告されており (Fujita et al., 2009)、*MTP* は NASH に関連する重要な因子であると考えられた。一方で、高脂肪食群では 24 週齢までの検討では通常食群と明らかな差は認められなかった。高脂肪食負荷群においては通常食群と比較して肝脂質合成遺伝子群が低下していることが確認できた。脂肪肝患者では、肝臓での脂質蓄積要因の中で、健常人と比較して肝脂質合成が特に亢進していることが報告されている (Lambert et al., 2014) ことから、肝臓での脂質合成も脂肪肝発症に重要であり、SDT fatty ラットにおいても同様に肝脂質合成の関与が脂肪肝発症に重要であることが示唆された。

高コレステロール食負荷による雌性 SDT fatty ラットの病態をより詳細に解析するため、蓄積している肝臓中脂質の詳細な解析を行った。その結果、肝臓中の DAG と酸化 DAG の蓄積亢進が確認できた。これらの脂質は PKC を活性化して肝炎悪化に関与することが想定される。また、肝臓において酸化 DAG は酸化ストレスにより蓄積亢進することが知られている (Toriumi et al., 2013)。高コレステロール食負荷により、雌性 SDT fatty ラットでは肝臓中に種々の脂質が蓄積し、また酸化ストレスの惹起も伴ったうえで病態が進行していることが示唆された。

本モデルとヒト NASH との類似点を病態生理学的観点から確認するため、雌性 SDT fatty ラットの血中コリン濃度を測定した。その結果、高コレステロール食負荷によって、雌性 SDT fatty ラットの血中コリン値は上昇し、肝線維化が顕著になる 24 週齢において顕著な上昇が確認できた。ヒト NASH 患者の情報では、血中コリン濃度は肝 *MTP* 遺伝子の発現と負の相関関係を示しており、肝 VLDL 放出の低下を示唆していると考えられる (Fujita et al., 2009)。また、ヒト NASH 患者では肝臓でのコリン分布が低下していることがラジオアイソトープを用いた検証結果から示唆されており (Fujita et al., 2009)、肝臓でのコリンの利用が低下しているものと想定される。コリンは VLDL 産生に重要なホスファチジルコリン生成に必要であり、コリン利用の低下は肝臓からの VLDL

放出が低下していることを示唆する。ヒト NASH における肝 *MTP* 発現の低下は肝 VLDL 放出の低下を別の観点から支持するデータとなり、肝 VLDL 放出の低下とヒト NASH の関連性の確からしさが伺える。肝 VLDL 放出の低下によって脂肪肝、肝線維化を発症する病態は、CDAA ラットなどの他のモデル動物でも認められることから、NASH 肝線維化と関連が深い生理現象である可能性が考えられた。

各種検討を通じて、高コレステロール食給餌雌性 SDT fatty ラットでの病態は、肥満 2 型糖尿病、インスリン抵抗性に加えて、肝臓での各種脂質蓄積、血中コリン値の上昇や肝 VLDL 放出抑制といったように、ある程度ヒト NASH と類似した部分を保持している可能性が想定された。そこで、肥満 2 型糖尿病を背景とする NASH 患者に投薬されている薬剤として、有効性が確認できているピオグリタゾンと現時点では明確な有効性が報告されていないものの比較的多くの患者に処方されているメトホルミンを投薬し、その効果について検証した。

ピオグリタゾン投与群では、血中インスリン値の低下を伴った血糖値の正常化が確認でき、強力なインスリン抵抗性改善効果が発揮されていた。肝臓中脂質蓄積への効果も顕著であり、TG、TC、FFA、FC すべてがほぼ正常対照レベルとなっており、肝 VLDL 放出に関与する因子である *MTP* 遺伝子発現の低下も抑制されていた。肝臓病理組織学的評価の結果、ピオグリタゾン投与群では脂肪肝、肝炎、肝線維化のすべてが明らかに改善しており、その強力な薬理効果を確認できた。一方、ピオグリタゾン投与群ではヒトで懸念されている効果の一つである体重増加効果も極めて顕著に認められた。メトホルミン投与群では、血糖値の低下効果は有意で継続的であったが、肝脂質蓄積や肝臓病理組織学的評価においては一部の動物にのみ改善効果を認めるに留まり、明らかな効果を示すまでは至らなかった。

本モデルは、肥満 2 型糖尿病を基礎疾患とする NASH 患者に処方されるピオグリタゾンによって明らかな改善効果が確認できた。一方で、NASH 患者での臨床試験がいくつ

か実施されているものの、有効性がいまだ不明確であるメトホルミンは、部分的な効果しか示すことができなかつた。以上から本モデルは肥満 2 型糖尿病を背景とする NASH 病態をよく反映したモデルであると考えられた。肥満 2 型糖尿病やインスリン抵抗性は、NASH の基礎疾患として最も重要であると考えられており、本モデルにおける肝線維化発症メカニズムはヒト NASH での肝線維化発症を理解するうえで重要な示唆を与える可能性がある。

本研究で見出された高コレステロール食給餌雌性 SDT fatty ラットは、肥満 2 型糖尿病を背景とする NASH 患者を適応とした薬剤開発への利用のみならず、ヒト NASH 患者の肝線維化に関与する重要な因子を見出す研究ツールとしても高い価値を有すると思われる。本モデル動物については、ピオグリタゾンのみならず、今後開発が進んでいく薬剤の評価を通じて、複雑なヒト NASH 病態の解明に寄与するべく有用な研究ツールとして大いに期待したい。

謝辞

本研究を取りまとめるにあたり、終始懇切丁寧なご指導、ご鞭撻を賜りました本学 山田宜永教授に心より感謝致します。

また本論文をご精読頂き、貴重なご意見を頂戴しました本学 高田良三教授、中野優教授、杉山稔恵教授、放送大学新潟学習センター 新村末雄所長、日本たばこ産業(株)医薬総合研究所 太田毅主席研究員に深謝致します。

最後に博士号取得に向けて背中を押し、常に支えてくれた妻に深く感謝します。

引用文献

- Araujo, A. R., Rosso, N., Bedogni, G., Tiribelli, C., and Bellentani, S. (2018). Global epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease/non-alcoholic steatohepatitis: What we need in the future. *Liver Int* **38 Suppl 1**, 47-51.
- Basantani, M. K., Sitnick, M. T., Cai, L., Brenner, D. S., Gardner, N. P., Li, J. Z., Schoiswohl, G., Yang, K., Kumari, M., Gross, R. W., Zechner, R., and Kershaw, E. E. (2011). Pnpla3/Adiponutrin deficiency in mice does not contribute to fatty liver disease or metabolic syndrome. *J Lipid Res* **52**, 318-29.
- Belfort, R., Harrison, S. A., Brown, K., Darland, C., Finch, J., Hardies, J., Balas, B., Gastaldelli, A., Tio, F., Pulcini, J., Berria, R., Ma, J. Z., Dwivedi, S., Havranek, R., Fincke, C., DeFronzo, R., Bannayan, G. A., Schenker, S., and Cusi, K. (2006). A placebo-controlled trial of pioglitazone in subjects with nonalcoholic steatohepatitis. *N Engl J Med* **355**, 2297-307.
- Charlton, M. R., Burns, J. M., Pedersen, R. A., Watt, K. D., Heimbach, J. K., and Dierkhising, R. A. (2011). Frequency and outcomes of liver transplantation for nonalcoholic steatohepatitis in the United States. *Gastroenterology* **141**, 1249-53.
- Chen, J., Talwalkar, J. A., Yin, M., Glaser, K. J., Sanderson, S. O., and Ehman, R. L. (2011). Early detection of nonalcoholic steatohepatitis in patients with nonalcoholic fatty liver disease by using MR elastography. *Radiology* **259**, 749-56.
- Cuchel, M., Meagher, E. A., du Toit Theron, H., Blom, D. J., Marais, A. D., Hegele, R. A., Averna, M. R., Sirtori, C. R., Shah, P. K., Gaudet, D., Stefanutti, C., Vigna, G. B., Du Plessis, A. M., Propert, K. J., Sasiela, W. J., Bloedon, L. T., and Rader, D. J. (2013). Efficacy and safety of a microsomal triglyceride transfer protein inhibitor in patients with homozygous familial hypercholesterolaemia: a single-arm, open-label, phase 3 study. *Lancet* **381**, 40-6.
- Day, C. P., and James, O. F. (1998). Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology* **114**, 842-5.
- de Alwis, N. M., and Day, C. P. (2008). Non-alcoholic fatty liver disease: the mist gradually clears. *J Hepatol* **48 Suppl 1**, S104-12.
- Della-Morte, D., Palmirotta, R., Rehni, A. K., Pastore, D., Capuani, B., Pacifici, F., De Marchis, M. L., Dave, K. R., Bellia, A., Fogliame, G., Ferroni, P., Donadel, G., Cacciatore, F., Abete, P., Dong, C., Pileggi, A., Roselli, M., Ricordi, C., Sbraccia, P., Guadagni, F., Rundek, T., and Lauro, D. (2014). Pharmacogenomics

- and pharmacogenetics of thiazolidinediones: role in diabetes and cardiovascular risk factors. *Pharmacogenomics* **15**, 2063–82.
- Dixon, J. B., Bhathal, P. S., Hughes, N. R., and O'Brien, P. E. (2004). Nonalcoholic fatty liver disease: Improvement in liver histological analysis with weight loss. *Hepatology* **39**, 1647–54.
- El-Serag, H. B., Tran, T., and Everhart, J. E. (2004). Diabetes increases the risk of chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* **126**, 460–8.
- Fujita, K., Nozaki, Y., Wada, K., Yoneda, M., Fujimoto, Y., Fujitake, M., Endo, H., Takahashi, H., Inamori, M., Kobayashi, N., Kirikoshi, H., Kubota, K., Saito, S., and Nakajima, A. (2009). Dysfunctional very-low-density lipoprotein synthesis and release is a key factor in nonalcoholic steatohepatitis pathogenesis. *Hepatology* **50**, 772–80.
- Galli, A., Crabb, D. W., Ceni, E., Salzano, R., Mello, T., Svegliati-Baroni, G., Ridolfi, F., Trozzi, L., Surrenti, C., and Casini, A. (2002). Antidiabetic thiazolidinediones inhibit collagen synthesis and hepatic stellate cell activation in vivo and in vitro. *Gastroenterology* **122**, 1924–40.
- Garcia-Monzon, C., Lo Iacono, O., Mayoral, R., Gonzalez-Rodriguez, A., Miquilena-Colina, M. E., Lozano-Rodriguez, T., Garcia-Pozo, L., Vargas-Castrillon, J., Casado, M., Bosca, L., Valverde, A. M., and Martin-Sanz, P. (2011). Hepatic insulin resistance is associated with increased apoptosis and fibrogenesis in nonalcoholic steatohepatitis and chronic hepatitis C. *J Hepatol* **54**, 142–52.
- Ge, F., Zhou, S., Hu, C., Lobdell, H. t., and Berk, P. D. (2010). Insulin- and leptin-regulated fatty acid uptake plays a key causal role in hepatic steatosis in mice with intact leptin signaling but not in ob/ob or db/db mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **299**, G855–66.
- Hagstrom, H., Nasr, P., Ekstedt, M., Hammar, U., Stal, P., Hultcrantz, R., and Kechagias, S. (2017). Fibrosis stage but not NASH predicts mortality and time to development of severe liver disease in biopsy-proven NAFLD. *J Hepatol* **67**, 1265–1273.
- Hamaguchi, M., Kojima, T., Takeda, N., Nagata, C., Takeda, J., Sarui, H., Kawahito, Y., Yoshida, N., Suetsugu, A., Kato, T., Okuda, J., Ida, K., and Yoshikawa, T. (2007). Nonalcoholic fatty liver disease is a novel predictor of cardiovascular disease. *World J Gastroenterol* **13**, 1579–84.
- Hannah, W. N., Jr., and Harrison, S. A. (2016). Effect of Weight Loss, Diet, Exercise, and Bariatric Surgery on Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Clin Liver Dis* **20**, 339–50.
- Hatta, T., Fujinaga, Y., Kadoya, M., Ueda, H., Murayama, H., Kurozumi, M., Ueda, K., Komatsu,

- M., Nagaya, T., Joshita, S., Kodama, R., Tanaka, E., Uehara, T., Sano, K., and Tanaka, N. (2010). Accurate and simple method for quantification of hepatic fat content using magnetic resonance imaging: a prospective study in biopsy-proven nonalcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol* **45**, 1263-71.
- He, L., Liu, X., Wang, L., and Yang, Z. (2016). Thiazolidinediones for nonalcoholic steatohepatitis: A meta-analysis of randomized clinical trials. *Medicine (Baltimore)* **95**, e4947.
- Hotta, K., Yoneda, M., Hyogo, H., Ochi, H., Mizusawa, S., Ueno, T., Chayama, K., Nakajima, A., Nakao, K., and Sekine, A. (2010). Association of the rs738409 polymorphism in PNPLA3 with liver damage and the development of nonalcoholic fatty liver disease. *BMC Med Genet* **11**, 172.
- Husebye, H., Halaas, O., Stenmark, H., Tunheim, G., Sandanger, O., Bogen, B., Brech, A., Latz, E., and Espevik, T. (2006). Endocytic pathways regulate Toll-like receptor 4 signaling and link innate and adaptive immunity. *Embo j* **25**, 683-92.
- Ibrahim, S. H., Hirsova, P., Tomita, K., Bronk, S. F., Werneburg, N. W., Harrison, S. A., Goodfellow, V. S., Malhi, H., and Gores, G. J. (2016). Mixed lineage kinase 3 mediates release of C-X-C motif ligand 10-bearing chemotactic extracellular vesicles from lipotoxic hepatocytes. *Hepatology* **63**, 731-44.
- Imajo, K., Fujita, K., Yoneda, M., Shinohara, Y., Suzuki, K., Mawatari, H., Takahashi, J., Nozaki, Y., Sumida, Y., Kirikoshi, H., Saito, S., Nakamuta, M., Matsushashi, N., Wada, K., and Nakajima, A. (2012). Plasma free choline is a novel non-invasive biomarker for early-stage non-alcoholic steatohepatitis: A multi-center validation study. *Hepatol Res* **42**, 757-66.
- Imajo, K., Yoneda, M., Kessoku, T., Ogawa, Y., Maeda, S., Sumida, Y., Hyogo, H., Eguchi, Y., Wada, K., and Nakajima, A. (2013). Rodent models of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *Int J Mol Sci* **14**, 21833-57.
- Ishii, Y., Motohashi, Y., Muramatsu, M., Katsuda, Y., Miyajima, K., Sasase, T., Yamada, T., Matsui, T., Kume, S., and Ohta, T. (2015). Female spontaneously diabetic Torii fatty rats develop nonalcoholic steatohepatitis-like hepatic lesions. *World J Gastroenterol* **21**, 9067-78.
- Kawaguchi, T., Shima, T., Mizuno, M., Mitsumoto, Y., Umemura, A., Kanbara, Y., Tanaka, S., Sumida, Y., Yasui, K., Takahashi, M., Matsuo, K., Itoh, Y., Tokushige, K., Hashimoto, E., Kiyosawa, K., Kawaguchi, M., Itoh, H., Uto, H., Komorizono, Y., Shirabe, K., Takami, S., Takamura, T., Kawanaka, M., Yamada, R., Matsuda, F., and Okanoue, T. (2018). Risk estimation model for nonalcoholic fatty liver disease in the Japanese using multiple genetic markers. *PLoS One* **13**, e0185490.

- Kawaguchi, T., Sumida, Y., Umemura, A., Matsuo, K., Takahashi, M., Takamura, T., Yasui, K., Saibara, T., Hashimoto, E., Kawanaka, M., Watanabe, S., Kawata, S., Imai, Y., Kokubo, M., Shima, T., Park, H., Tanaka, H., Tajima, K., Yamada, R., Matsuda, F., and Okanoue, T. (2012). Genetic polymorphisms of the human PNPLA3 gene are strongly associated with severity of non-alcoholic fatty liver disease in Japanese. *PLoS One* **7**, e38322.
- Kawaratani, H., Tsujimoto, T., Kitazawa, T., Kitade, M., Yoshiji, H., Uemura, M., and Fukui, H. (2008). Innate immune reactivity of the liver in rats fed a choline-deficient L-amino-acid-defined diet. *World J Gastroenterol* **14**, 6655-61.
- 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., Yeh, M., McCullough, A. J., and Sanyal, A. J. (2005). Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* **41**, 1313-21.
- Koda, M., Kawakami, M., Murawaki, Y., and Senda, M. (2007). The impact of visceral fat in nonalcoholic fatty liver disease: cross-sectional and longitudinal studies. *J Gastroenterol* **42**, 897-903.
- Lambert, J. E., Ramos-Roman, M. A., Browning, J. D., and Parks, E. J. (2014). Increased de novo lipogenesis is a distinct characteristic of individuals with nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* **146**, 726-35.
- Masuyama, T., Katsuda, Y., and Shinohara, M. (2005). A novel model of obesity-related diabetes: introgression of the *Lepr(fa)* allele of the Zucker fatty rat into nonobese Spontaneously Diabetic Torii (SDT) rats. *Exp Anim* **54**, 13-20.
- Miller, E. R., 3rd, Pastor-Barriuso, R., Dalal, D., Riemersma, R. A., Appel, L. J., and Guallar, E. (2005). Meta-analysis: high-dosage vitamin E supplementation may increase all-cause mortality. *Ann Intern Med* **142**, 37-46.
- Miller, R. A., and Birnbaum, M. J. (2010). An energetic tale of AMPK-independent effects of metformin. *J Clin Invest* **120**, 2267-70.
- Musso, G., Cassader, M., Paschetta, E., and Gambino, R. (2017). Thiazolidinediones and Advanced Liver Fibrosis in Nonalcoholic Steatohepatitis: A Meta-analysis. *JAMA Intern Med* **177**, 633-640.
- Musso, G., Gambino, R., De Michieli, F., Cassader, M., Rizzetto, M., Durazzo, M., Faga, E., Silli, B., and Pagano, G. (2003). Dietary habits and their relations to insulin resistance and postprandial lipemia in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* **37**, 909-16.
- Nair, S., Diehl, A. M., Wiseman, M., Farr, G. H., Jr., and Perrillo, R. P. (2004). Metformin in the treatment of non-alcoholic steatohepatitis: a pilot open label trial.

Aliment Pharmacol Ther **20**, 23–8.

- Neuschwander-Tetri, B. A., Loomba, R., Sanyal, A. J., Lavine, J. E., Van Natta, M. L., Abdelmalek, M. F., Chalasani, N., Dasarathy, S., Diehl, A. M., Hameed, B., Kowdley, K. V., McCullough, A., Terrault, N., Clark, J. M., Tonascia, J., Brunt, E. M., Kleiner, D. E., and Doo, E. (2015). Farnesoid X nuclear receptor ligand obeticholic acid for non-cirrhotic, non-alcoholic steatohepatitis (FLINT): a multicentre, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet* **385**, 956–65.
- Ohta, T., Katsuda, Y., Miyajima, K., Sasase, T., Kimura, S., Tong, B., and Yamada, T. (2014). Gender differences in metabolic disorders and related diseases in Spontaneously Diabetic Torii-Lepr(fa) rats. *J Diabetes Res* **2014**, 841957.
- Oseini, A. M., and Sanyal, A. J. (2017). Therapies in non-alcoholic steatohepatitis (NASH). *Liver Int* **37 Suppl 1**, 97–103.
- Ratziu, V., Bellentani, S., Cortez-Pinto, H., Day, C., and Marchesini, G. (2010). A position statement on NAFLD/NASH based on the EASL 2009 special conference. *J Hepatol* **53**, 372–84.
- Ratziu, V., Harrison, S. A., Francque, S., Bedossa, P., Leheret, P., Serfaty, L., Romero-Gomez, M., Boursier, J., Abdelmalek, M., Caldwell, S., Drenth, J., Anstee, Q. M., Hum, D., Hanf, R., Roudot, A., Megnien, S., Staels, B., and Sanyal, A. (2016). Elafibranor, an Agonist of the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- α and - δ , Induces Resolution of Nonalcoholic Steatohepatitis Without Fibrosis Worsening. *Gastroenterology* **150**, 1147–1159. e5.
- Romeo, S., Kozlitina, J., Xing, C., Pertsemliadis, A., Cox, D., Pennacchio, L. A., Boerwinkle, E., Cohen, J. C., and Hobbs, H. H. (2008). Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Genet* **40**, 1461–5.
- Sanyal, A. J., Chalasani, N., Kowdley, K. V., McCullough, A., Diehl, A. M., Bass, N. M., Neuschwander-Tetri, B. A., Lavine, J. E., Tonascia, J., Unalp, A., Van Natta, M., Clark, J., Brunt, E. M., Kleiner, D. E., Hoofnagle, J. H., and Robuck, P. R. (2010). Pioglitazone, vitamin E, or placebo for nonalcoholic steatohepatitis. *N Engl J Med* **362**, 1675–85.
- Sanyal, A. J., Friedman, S. L., McCullough, A. J., Dimick-Santos, L., American Association for the Study of Liver, D., United States, F., and Drug, A. (2015). Challenges and opportunities in drug and biomarker development for nonalcoholic steatohepatitis: findings and recommendations from an American Association for the Study of Liver Diseases–U.S. Food and Drug Administration Joint Workshop. *Hepatology* **61**, 1392–405.
- Schneck, A. S., Anty, R., Patouraux, S., Bonnafous, S., Rousseau, D., Lebeaupin, C.,

- Bailly-Maitre, B., Sans, A., Tran, A., Gugenheim, J., Iannelli, A., and Gual, P. (2016). Roux-En Y Gastric Bypass Results in Long-Term Remission of Hepatocyte Apoptosis and Hepatic Histological Features of Non-alcoholic Steatohepatitis. *Front Physiol* **7**, 344.
- Shah, A. G., Lydecker, A., Murray, K., Tetri, B. N., Contos, M. J., and Sanyal, A. J. (2009). Comparison of noninvasive markers of fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* **7**, 1104-12.
- Sharifnia, T., Antoun, J., Verriere, T. G., Suarez, G., Wattacheril, J., Wilson, K. T., Peek, R. M., Jr., Abumrad, N. N., and Flynn, C. R. (2015). Hepatic TLR4 signaling in obese NAFLD. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **309**, G270-8.
- Sumida, Y., Yoneda, M., Hyogo, H., Yamaguchi, K., Ono, M., Fujii, H., Eguchi, Y., Suzuki, Y., Imai, S., Kanemasa, K., Fujita, K., Chayama, K., Yasui, K., Saibara, T., Kawada, N., Fujimoto, K., Kohgo, Y., and Okanoue, T. (2011). A simple clinical scoring system using ferritin, fasting insulin, and type IV collagen 7S for predicting steatohepatitis in nonalcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol* **46**, 257-68.
- Takaki, A., Kawai, D., and Yamamoto, K. (2013). Multiple hits, including oxidative stress, as pathogenesis and treatment target in non-alcoholic steatohepatitis (NASH). *Int J Mol Sci* **14**, 20704-28.
- Takekoshi, S., Kambayashi, Y., Nagata, H., Takagi, T., Yamamoto, Y., and Watanabe, K. (1995). Activation of protein kinase C by oxidized diacylglycerols. *Biochem Biophys Res Commun* **217**, 654-60.
- Teratani, T., Tomita, K., Suzuki, T., Oshikawa, T., Yokoyama, H., Shimamura, K., Tominaga, S., Hiroi, S., Irie, R., Okada, Y., Kurihara, C., Ebinuma, H., Saito, H., Hokari, R., Sugiyama, K., Kanai, T., Miura, S., and Hibi, T. (2012). A high-cholesterol diet exacerbates liver fibrosis in mice via accumulation of free cholesterol in hepatic stellate cells. *Gastroenterology* **142**, 152-164 e10.
- 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., Kabashima, A., Freeman, B. L., Bronk, S. F., Hirsova, P., and Ibrahim, S. H. (2017). Mixed Lineage Kinase 3 Mediates the Induction of CXCL10 by a STAT1-Dependent Mechanism During Hepatocyte Lipotoxicity. *J Cell Biochem* **118**, 3249-3259.
- Tomita, K., Teratani, T., Suzuki, T., Shimizu, M., Sato, H., Narimatsu, K., Okada, Y., Kurihara, C., Irie, R., Yokoyama, H., Shimamura, K., Usui, S., Ebinuma, H., Saito, H., Watanabe, C., Komoto, S., Kawaguchi, A., Nagao, S., Sugiyama, K., Hokari, R., Kanai, T., Miura, S., and Hibi, T. (2014). Free cholesterol accumulation in hepatic

- stellate cells: mechanism of liver fibrosis aggravation in nonalcoholic steatohepatitis in mice. *Hepatology* **59**, 154-69.
- Toriumi, K., Horikoshi, Y., Yoshiyuki Osamura, R., Yamamoto, Y., Nakamura, N., and Takekoshi, S. (2013). Carbon tetrachloride-induced hepatic injury through formation of oxidized diacylglycerol and activation of the PKC/NF-kappaB pathway. *Lab Invest* **93**, 218-29.
- Tsujimoto, T., Kawaratani, H., Kitazawa, T., Hirai, T., Ohishi, H., Kitade, M., Yoshiji, H., Uemura, M., and Fukui, H. (2008). Decreased phagocytic activity of Kupffer cells in a rat nonalcoholic steatohepatitis model. *World J Gastroenterol* **14**, 6036-43.
- Tsujimoto, T., Kawaratani, H., Kitazawa, T., Yoshiji, H., Fujimoto, M., Uemura, M., and Fukui, H. (2009). Immunotherapy for nonalcoholic steatohepatitis using the multiple cytokine production modulator Y-40138. *World J Gastroenterol* **15**, 5533-40.
- Wang, Y., Chen, T., Han, C., He, D., Liu, H., An, H., Cai, Z., and Cao, X. (2007). Lysosome-associated small Rab GTPase Rab7b negatively regulates TLR4 signaling in macrophages by promoting lysosomal degradation of TLR4. *Blood* **110**, 962-71.
- 日本消化器病学会 (2014). NAFLD/NASH 診療ガイドライン 2014.

Summary

Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) is associated with obesity, dyslipidemia, hypertension, type 2 diabetes and insulin resistance. NAFLD refers to the pathology of fatty livers ranging from simple steatosis through nonalcoholic steatohepatitis (NASH) to cirrhosis. Some of NAFLD cases lead to hepatocellular carcinoma. The pathogenesis of NASH seems to be poorly defined, and effective pharmacological therapies have not been approved all over the world.

To understand the difficult features of NAFLD/NASH, animal models offer important information. Spontaneously Diabetic Torii (SDT) fatty rats, a new obese diabetic model, reportedly presented with features of NASH. Histopathological observations revealed NASH features at 32–40 weeks of age in female SDT fatty rat liver (Ishii et al., 2015). Female SDT fatty rats may be useful for NASH research. However, a long period of time is required prior to the onset of NASH. So, we tried to accelerate the onset of NASH in female SDT fatty rats using dietary fat or cholesterol loading.

Result from our experiment, the onset of NASH in female SDT fatty rats appear to be accelerated by dietary cholesterol loading. Hepatic fibrosis was observed in female SDT fatty rats fed cholesterol-enriched diets (SDT fatty-Cho) from 16 weeks. In addition to pathophysiological analysis for female SDT fatty rat liver lesions, hepatic lipids, lipid peroxide and hepatic mRNA expression were evaluated. In the liver of female SDT fatty-Cho, hepatic triglyceride (TG), total cholesterol (TC), free fatty acid (FFA) and free cholesterol (FC) were higher than other groups.

Hepatic mRNA expression related to Very Low density lipoprotein (VLDL) output decreased in SDT fatty-Cho, and the mRNA expression related to inflammation and fibrosis increased in SDT fatty-Cho.

Furthermore, we investigated plasma choline concentrations in female SDT fatty rats. In human NASH patients, plasma choline concentrations are elevated, and it showed negative correlation with liver Microsomal triglyceride transfer protein (MTP) expression (Imajo et al., 2012). These results may be the phenotype of liver VLDL output impairment, which occurred in choline deficient diet NASH models (Kawaratani et al., 2008; Tsujimoto et al., 2008; Tsujimoto et al., 2009). SDT fatty-Cho showed increased plasma choline concentrations with decreased liver MTP expression, similar to human NASH.

In addition to pathophysiological analysis, investigating the pharmacological effects of anti-diabetic drug on NASH to elucidate the properties of SDT fatty-Cho as a NASH animal model is very important. Currently, two anti-diabetic drugs, metformin and pioglitazone are clinically used as NASH therapies. However, both are not officially approved for NASH therapies, and this use is off-label. Pioglitazone reportedly showed the improvement effect of hepatic lesions in NASH therapy (Belfort et al., 2006; Sanyal et al., 2010; He et al., 2016), there is a recommendation in usage for NASH therapy. Metformin reportedly showed controversial result for the improvement effect for hepatic lesions (Nair et al., 2004). Metformin and pioglitazone repeatedly administered to female SDT fatty-Cho, and the effects of both drugs were investigated.

From 4 weeks of age to 25 weeks of age, SDT fatty-Cho treated by pioglitazone 10 mg/kg or metformin 300 mg/kg. Pioglitazone treatment significantly reduced

blood glucose, insulin, TG, TC, Aspartate aminotransferase and Alanine aminotransferase levels. Furthermore, pioglitazone treatment significantly decreased liver TG, TC, FFA and FC accumulation. The histological findings of livers in SDT fatty rats that received pioglitazone showed dramatically improvement of liver histology including inflammation and fibrosis. In addition to histological improvement, the mRNA expression in the liver related to VLDL output, inflammation and fibrosis improved by pioglitazone treatment. However, pioglitazone treatment caused significant increase of body weight according to increased food intake. Metformin treatment significantly reduced blood glucose levels. However, there are no improvement effects in any other blood parameters. The histological findings of the livers in metformin treatment group are limited. Only two animals showed histological improvement effects in this treatment group.

In SDT fatty-Cho, pioglitazone improved hepatic lesions. However, the effects of metformin on hepatic lesions were partial. The SDT fatty-Cho showed different pharmacological responses to two anti-diabetic drugs, metformin and pioglitazone. These results in both drugs are quite similar to what is observed in human clinical trials. SDT fatty-Cho has the potential to become a valuable animal model for anti-NASH drugs that show potential to regulate glucose and lipid metabolism.