

肥満 2 型糖尿病モデル SDT fatty ラットを用いた
非アルコール性脂肪肝炎および糖尿病黄斑浮腫に関する解析

2018 年

本橋 雄

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)
- AGE (Advanced glycation end products : 終末糖化産物)
- ALT (Alanine aminotransferase : アラニンアミノトランスフェラーゼ)
- AST (Aspartate aminotransferase : アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ)
- CDAA (Choline-deficient L-amino acid-defined)
- cDNA (Complementary deoxyribonucleic acid : 相補的デオキシリボ核酸)
- DCCT (Diabetes control and complications trial)
- ERG (Electroretinogram : 網膜電図)
- FAS (Fatty acid synthase : 脂肪酸合成酵素)
- FFA (Free fatty acid : 遊離脂肪酸)
- GCL (Ganglion cell layer : 神経節細胞層)
- Hb (Hemoglobin) Alc
- HE (Hematoxylin eosin) 染色
- HFHC (High-fat and high-cholesterol) diet
- IL (Interleukin : インターロイキン)
- ILM (Internal limiting membrane : 内境界膜)
- INL (Inner nuclear layer : 内顆粒層)
- IPL (Inner plexiform layer : 内網状層)
- LPL (Lipoprotein lipase)
- MCDD (Methionine- and choline-deficient diet : メチオニン-コリン欠乏食)
- MC4R (Melanocortin 4 receptor : メラノコルチン4受容体)
- MTP (Microsomal triglyceride transfer protein : ミクロ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)
- NASH (Non-alcoholic steatohepatitis : 非アルコール性脂肪肝炎)
- OETF (Otsuka long-evans tokushima fatty) ラット
- ONL (Outer nuclear layer : 外顆粒層)
- PCR (Polymerase chain reaction : ポリメラーゼ連鎖反応)
- PKC (Protein kinase C)
- PL (Photoreceptor layer : 視細胞層)
- PPAR (Peroxisome proliferator-activated receptor : ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体)
- Pten (Phosphatase and tensin homolog deleted from chromosome 10)

RNA (Ribonucleic acid : リボ核酸)
ROS (Reactive oxygen species : 活性酸素種)
SD (Sprague-Dawley) ラット
SDT (Spontaneously Diabetic Torii) fatty ラット
SREBP (Sterol regulatory element-binding protein : ステロール調節配列結合蛋白)-1c
SGLT (Sodium glucose cotransporter)
TB (Toluidine blue)
TC (Total cholesterol : 総コレステロール)
TG (Triglyceride : トリグリセリド)
TNF (Tumor necrosis factor : 腫瘍壊死因子) - α
VEGF (Vascular endothelial growth factor : 血管内皮細胞増殖因子)
ZDF (Zucker diabetic fatty) ラット
ZF (Zucker fatty) ラット
 α -SMA (smooth muscle actin : 平滑筋アクチン)

目 次

第1章 緒 論	6
第2章 SDT fatty ラットを用いた新規 NASH モデルの確立	11
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 フェノフィブラートおよびピオグリタゾンによる雌性 SDT fatty ラットの糖脂質代謝および NASH 様病変に及ぼす影響	29
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 雄性 SDT fatty ラットを用いた新規糖尿病黄斑浮腫モデルの確立	43
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・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 58

謝辞・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 62

引用文献・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 63

SUMMARY・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 68

第1章 緒論

近年、食生活の欧米化、交通機関の発達による運動不足、さらには過剰なストレス社会で生活を営むことで、本邦のみならず世界中で糖尿病や肥満、メタボリック症候群等の生活習慣病患者数が増加している。これらの疾患・変化は、内臓脂肪蓄積やインスリン抵抗性を特徴とし、肝臓においてはNAFLD (Watanabe et al., 2008)を、眼においては糖尿病網膜症あるいは糖尿病黄斑浮腫の発症のリスクを増加させる(The Diabetes Control and Complications Trial Research Group, 1996)。

NAFLDは肝細胞に脂肪沈着のみを認める単純性脂肪肝と、脂肪化に加えて肝細胞の壊死・炎症や線維化を伴うNASHに大別され、NASHは発症すると肝硬変や肝癌へと進行する可能性がある(図1-1)(Cohen et al., 2011; Greenfield et al., 2008)。またNASHは、高血圧、高脂血症、糖尿病などが併発している頻度が高く、生命予後が一般人口と比較して悪いことも知られている(図1-2)(Adams et al., 2005; de Alwis and Day, 2008)。以上の点から、NASHまたはその疑いを発見し、早期に治療を開始することが重要である。

NASHの治療法としては、食事療法や運動療法などの生活習慣の改善が行われているのみで、現在のところ、NASHを適応とした治療薬は承認されていない。これはNASH病態発症の基盤となる分子メカニズムについて十分に解明できておらず、依然として不明な点が多く残されていることが原因の一つであると考えられる。今後、複雑な病態解明や新しい治療薬の開発を行うために、モデル動物を用いた研究が必須となってくると思われる。

糖尿病網膜症および糖尿病黄斑浮腫は糖尿病に長期間罹患することで、網膜細小血管が障害されて発症する疾患である(Chibber et al., 2007)。糖尿病黄斑浮腫は糖尿病網

膜症に合併する疾患で(Cheung et al., 2010)、血管の閉塞や障害により血管透過性が亢進し、血漿成分が網膜黄斑部に貯留し浮腫・肥厚を呈する。外部からの光シグナルを正しく受信できず、視力低下・視野障害に直結するため、早期に治療を行う必要がある(図 1-3)。

2012年の調査によれば、糖尿病網膜症患者は世界中に9260万人存在し、そのうち2060万人が糖尿病黄斑浮腫を併発していると報告されている(Yau et al., 2012)。現在、糖尿病網膜症や糖尿病黄斑浮腫治療には、抗 VEGF 薬の眼内注射、網膜へのレーザー照射あるいは硝子体内手術等の侵襲性の高い外科治療が行われている(Distefano et al., 2017)。特に抗 VEGF 薬はかなり強い効果が認められる患者もおり、近年、治療の第一選択となりつつある。その一方で、25%の糖尿病黄斑浮腫患者は抗 VEGF 薬に対してノンレスポonderであり(Singer et al., 2016)、異なるメカニズムを有する薬剤が望まれているものの、糖尿病黄斑浮腫の詳細なメカニズムについては未解明な点が数多く存在する。以上より、NASH および糖尿病黄斑浮腫ともに複雑な病態解明や新しい治療薬の開発を行うために、新規のモデル動物を用いた研究に対する期待度は高い。

SDT fatty ラットは、非肥満型2型糖尿病モデルSDT ラットにZF ラットの *Lepr fa* 遺伝子をスピードコンジェニック法により導入し、確立されたコンジェニックラットである(Masuyama et al., 2005)。過食による肥満を呈し、糖尿病および糖尿病合併症の発症がSDT ラットに比べて早期化することが報告されている(Masuyama et al., 2004) (図 1-4)。また雌雄差に関しても報告されており(Ohta et al., 2014)、雌は雄に比べ血糖値の上昇が比較的緩徐であることから、肝臓への脂肪の蓄積能が高いことが予想されたため NASH モデルの検討に用いた。逆に雄では重度の高血糖と膵疲弊によりインスリン分泌能が低下し、早期から重篤な糖尿病状態を示すことから、糖尿病黄斑浮腫モデルとしての可能性を検討した。

本博士論文では、まず第2章において、雌性SDT fatty ラットの血液および肝臓生化学

学パラメータ、病理組織学的検査および遺伝子発現変動を経時的に評価し、NASH モデルとしての特徴を有することを明らかにした。さらに第3章では、高脂血症治療薬フェノフィブラートによる予防効果と、血糖降下薬ピオグリタゾンによる治療効果を検討し、雌性 SDT fatty ラットに対してフェノフィブラートが予防効果を示すことを見出した。第4章では、雄性 SDT fatty ラットの血液生化学パラメータ評価や病理組織学的検査等を実施し、糖尿病黄斑浮腫モデルとしての特徴を示すことを明らかにした。さらに2種類の血糖降下薬フロリジンおよびピオグリタゾンを用いて、糖尿病黄斑浮腫様変化である網膜肥厚改善作用について検討し、ヒトとよく似た薬物反応性を示すことを明らかにした。これらの結果から、SDT fatty ラットは新規の NASH モデルかつ糖尿病黄斑浮腫モデルとしての可能性が示唆された。

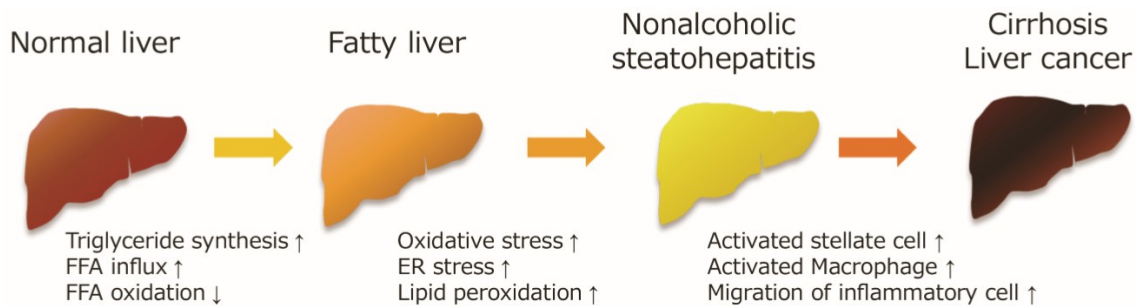


図 1-1 NAFLD、NASH の進展

糖脂質代謝異常により、脂肪沈着のみを認める単純性脂肪肝 (Simple steatosis) と、脂肪化に加えて壊死・炎症や線維化を伴う非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) を発症する。さらに肝硬変や肝癌へと進行する。

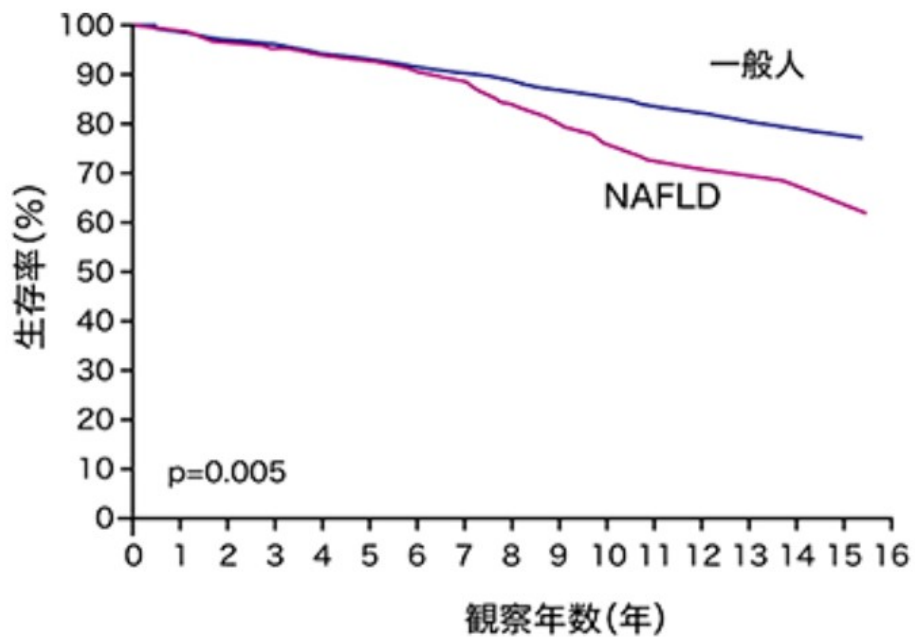


図 1-2 NAFLD の生存率

NASH を含む NAFLD 患者では、病態の進展により肝硬変や肝癌を発症するため、一般人（推定値）に比べ、生存率が低いとされる（日本消化器病学会 HP より引用）。



図 1-3 糖尿病黄斑浮腫患者の推定される視野

糖尿病黄斑浮腫患者では外界を認識するのに必要な黄斑部に浮腫を生じるため、重度の視野障害が起きる (Ellex 社 HP より引用)。

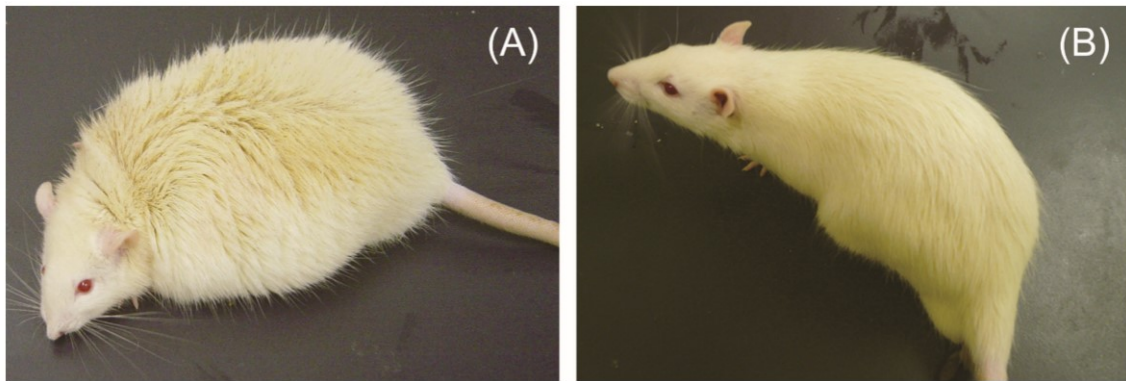


図 1-4 16 週齢における SDT fatty ラット (A) および SD ラット (B)

16 週齢の SDT fatty ラットは SD ラットに比べて、過食であり肥満を呈する。

第2章 SDT fatty ラットを用いた新規 NASH モデルの確立

第1節 緒言

NAFLD や NASH は、内臓脂肪蓄積やインスリン抵抗性等の糖脂質代謝異常に基づいて発症リスクが増加する (Watanabe et al., 2008)。NASH は発症すると肝硬変、肝癌へと進行する可能性があり (Greenfield et al., 2008)、また、高血圧、高脂血症、糖尿病などが併発している頻度が高く、生命予後が一般人口と比較して悪いことが知られている (Adams et al., 2005; de Alwis and Day, 2008)。従って、NASH またはその疑いを発見し、早期に治療を開始することが重要な課題となっている。

全世界における NAFLD の有病率は、評価方法によっても異なるが、一般人口の 20%前後であると推定される (Neuschwander-Tetri, 2005)。特に、2 型糖尿病を有する患者における罹患率は約 80%と報告されている (Silverman et al., 1989)。また、わが国における NAFLD の約 10~20%が NASH であると推定され、このうち約 5~20%が肝硬変に移行すると考えられている (日本肝臓学会, 2010)。

NASH の治療法としては、食事療法、運動療法などの生活習慣の改善が行われているが、現在のところ、NASH を適応とした治療薬は承認されていない。一方、NASH 病態発症の基盤となる分子メカニズムについても、十分に解明できておらず、依然として不明な点が多く残されている。現在、NASH の発症機序としては、肝実質細胞への中性脂肪沈着 (脂肪肝) が起こり、さらに肝細胞障害要因や遺伝素因などが加わり発症するとされている (Tilg and Moschen, 2010)。脂肪肝の機序としては、過栄養・運動不足、肝への脂肪酸の動員増加、中性脂肪の合成亢進、脂肪酸の β 酸化障害などである。一方、肝細胞障害要因の機序としては、図 2-1 に示した通り、酸化ストレス、エンドトキシン、アディポサイトカイン、小胞体ストレスの関与が挙げられる (池嶋, 2016)。肝臓でのト

リグリセリド蓄積は、小胞体ストレスを惹起し、ミトコンドリアが障害されることで酸化ストレスを誘発する。また、肝臓への過剰な鉄の蓄積は酸化ストレスの発生を助長し、脂質過酸化物の生成、炎症細胞浸潤を伴う肝細胞障害や肝星細胞活性化を介した肝線維化を促進する。腸管細胞叢由来のエンドトキシンは TNF- α 、IL-6、IL-8 などの炎症性サイトカインを誘導する(松浦, 1995)。また、アディポサイトカインは肝細胞アポトーシス、インスリン抵抗性の促進により肝障害を促進することが知られている(寺井, 2007)。NASH の病態発症は、多くの糖脂質代謝、炎症、各種ストレス因子を巻き込み、相互に影響を及ぼしあっている。今後、複雑な病態解明や新しい治療薬の開発を行うためには、モデル動物を用いた研究が必須となってくると思われる。

現在 NASH モデル動物として研究に用いられている実験動物は、主に遺伝子改変と食餌誘発性のモデル動物である(Takahashi et al., 2012)。遺伝子改変動物としては、肝細胞特異的 Pten 欠損マウス(Horie et al., 2006)、MC4R 欠損マウス (Itoh et al., 2011) などの単一遺伝子改変のマウスが報告されている。また、食餌誘発性のモデル動物としては、MCDD(Rolla et al., 2016)や HFHC 食などを負荷した動物(鈴木, 2016)が報告されているが、これらのモデル動物は一部のヒト病態しか反映していない(表 2-1)。

SDT fatty ラットは、SDT ラットに *Lepr^{fa}* 遺伝子を導入することで作製され、過食による肥満を呈し、糖尿病および糖尿病合併症の発症が SDT ラットに比べて早期化することが報告されている(Matsui et al., 2008)。しかしながら、SDT fatty ラットの病態解析において肝臓についての知見はあまり得られていない。そこで本研究では SDT fatty ラットの肝臓に着目し、SDT fatty ラットの NASH モデルとしての可能性について検討した。

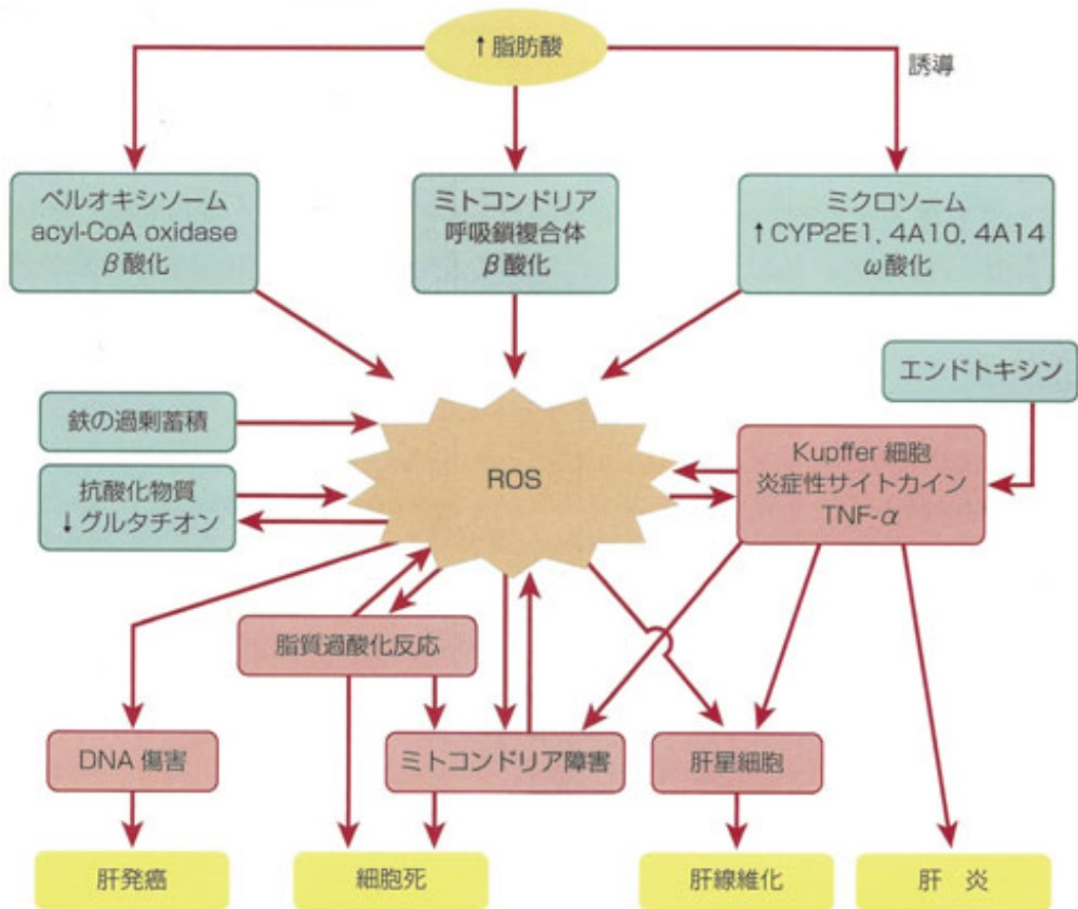


図 2-1 NASH 機序

糖尿病や高脂血症により酸化ストレス、アディポサイトカインまたはエンドトキシンが過剰産生され、肝臓の炎症・線維化・癌化を促進する。(沖縄県医師会・医師会報より引用)

表 2-1 NASH 動物モデル

NASH 動物モデル	血糖値	血中脂質	肝脂肪蓄積	炎症	線維化
PTEN KO	No change	↑	Yes	Yes	Yes
MC4R KO	↑	↑	Yes	No	No
MCD	↓	↓	Yes	Yes	Yes
HFHC	No change	↓	Yes	Yes	Yes
CDAА	No change	↑	Yes	Yes	Yes
db/db	↑	↑	Yes	No	No
ZDF	↑	↑	Yes	No	No
OLETF	↑	↑	Yes	No	No

遺伝子改変と食餌により誘発された NASH 動物モデル。ヒトと類似の症状を示す動物は、まだ知られていない。

第2節 材料および方法

実験には雌性 SDT fatty ラット（日本たばこ産業株）および雌性 SD ラット（日本チャールスリーバー株）を用いた。両動物は8週齢において、1群5匹の5群に群分けし、8、16、24、32 および 40 週齢にて検討を行った。動物は個別飼育により紫外線照射された水道水および通常飼料（CRF-1；日本チャールズリーバー株）を自由摂取させ、12時間の明暗周期（明期：8～20時、暗期：20～8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。

SDT fatty ラットの体重および血液生化学パラメータ（グルコース、TG、TC、ALT、AST）を8週齢から40週齢まで8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、 $10,000 \times g$ 、5分間遠心して血清を採取し、自動分析器（Model 7180、日立製作所）により測定した。

動物を麻酔で安楽死させた後、肝臓を摘出し、肝臓中 TG・FFA 含量、遺伝子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い、乾固後 2-プロパノール $200 \mu\text{l}$ に再溶解し、先の自動分析器（Model 7180、日立製作所）にて TG 濃度を測定した。肝臓中 FFA 濃度は、NEFA-C キット（和光純薬工業株）を用いて測定した。

また、遺伝子測定は GenElute™ 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（PE Applied Biosystems、FosterCity、CA、USA）を用いて cDNA を調製した。Real time PCR 定量は、ABI PRISM 7700 sequence Detector（PE Applied Biosystems、FosterCity、CA、USA）を用いて反応させた。反応液は、cDNA サンプル（50 ng Total RNA 相当/ $10 \mu\text{l}$ /well）、 3.5 mM MgCl_2 、 $0.3 \mu\text{M}$ primer、 $0.1 \mu\text{M}$ Fluorescent probe および 1.25 U AmpliTaq Gold

を加えて調製した。

SREBP-1c、FAS および MTP の遺伝子発現変動の確認に関して、primer および probe は、Primer Express software (PE Applied Biosystems、FosterCity、CA、USA) を用いて設計した。ACC、 α -SMA および I 型コラーゲン (collagen type 1) は、Taqman Gene Expression Assays (PE Applied Biosystems、FosterCity、CA、USA) を使用した。内部標準は、 β -actin を用いた。また残りの肝臓を用いて 10%ホルマリン液で浸漬固定後パラフィン包埋し、薄切切片を作製した。パラフィン切片は脱パラフィン処理後、HE 染色、シリウスレッド染色、または TB と ED-1 (CD68, BMA BIOMEDICALS, Switzerland) の二重染色を施し、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、正常対照動物 (SD ラット) と対照群 (SDT fatty ラット) においては、Student の t 検定を行った。

第 3 節 結 果

雌性 SDT fatty ラットの体重は 8 週齢から 24 週齢まで SD ラットと比較して高値を示し、32 週齢以降は同様の推移を示した。また 8 週齢から 24 週齢の SDT fatty ラットは肥満を呈した (図 2-2A)。血液生化学パラメータにおいて、SDT fatty ラットの血糖値は、8 週齢から SD ラットと比較して有意な上昇が認められ (SDT fatty ラット ; 377 \pm 152 mg/dl、SD ラット ; 134 \pm 15 mg/dl)、その上昇は 40 週齢まで持続した (SDT fatty ラット ; 742 \pm 108 mg/dl、SD ラット ; 134 \pm 5 mg/dl) (図 2-2B)。また SDT fatty ラットの TG 値は、8 週齢から SD ラットと比較して高値を示し、16 週齢以降では著明な高 TG 血症を示した (図 2-2C)。SDT fatty ラットの TC 値に関しては、TG 値と同様に SD ラットと比較して有意に高値を示し、8 週齢から 40 週齢まで経時的に上昇した (図 2-2D)。以上の結果から、雌性 SDT fatty ラットは、高血糖および高脂血症を呈しており、メタボリックシンドローム様の病態が観察された。

肝障害パラメータである AST および ALT は、SDT fatty ラットにおいて、8 週齢から高値を示し (AST : SDT fatty ラット ; 118 ± 17 mg/dl、SD ラット ; 81 ± 9 mg/dl、ALT : SDT fatty ラット ; 110 ± 18 mg/dl、SD ラット ; 39 ± 4 mg/dl)、16 週齢まで上昇した。16 週齢以降、SDT fatty ラットの AST および ALT は低下したが、40 週齢まで SD ラットと比較して高値を持続した (図 2-2E、 F)。

肝臓の病態生理学的な変化を観察するため、経時的な重量および脂質含量を検討した。SDT fatty ラットの肝臓重量は、8 週齢から SD ラットと比較して有意な上昇が認められ、その上昇は 24 週齢まで持続した (SDT fatty ラット ; 32 ± 17 g、SD ラット ; 14 ± 2 g)。24 週齢以降、SDT fatty ラットの肝臓重量は低下したが、40 週齢まで SD ラットと比較して高値を示した (図 2-3A)。肝臓中 TG 含量は、SDT fatty ラットでは 16 週齢まで増加し、それ以降は低下した。32 週齢以降は、SD ラットの肝臓中 TG 含量と同等に推移した (図 2-3B)。SDT fatty ラットは肝臓に TG が蓄積し、脂肪肝となることが明らかとなった。肝臓中 TG 含量増加の要因を検討するため、TG の基質である FFA の肝臓中濃度を測定したところ、SDT fatty ラットの肝臓中 FFA 含量は、肝臓中 TG 含量と同様の推移を示した (図 2-3C)。

肝臓の病理学的な変化を確認するため、パラフィン切片を HE、シリウスレッド染色または TB と ED-1 の二重染色後に鏡検した。SDT fatty ラットの肝臓は、8 週齢から 40 週齢まで 重度 (3+) な空胞化および脂肪化が確認され、病理組織学的にも肝臓に TG が蓄積されていることが示唆された (図 2-4A、 B、 表 2-2)。また、SDT fatty ラットは 8 週齢から NASH 病態で特徴的な ballooning 様の変化と思われる中等度 (1+~2+) の肝細胞の肥大化が認められた (表 2-2)。肝臓の線維化は、SDT fatty ラットにおいて、32 週齢より中等度 (1+~2+) に認められた (表 2-2)。線維を特異的に染色するシリウスレッド染色における検討においても、同様の結果が確認された (図 2-4C、 D)。また炎症細胞の浸潤は、SDT fatty ラットにおいて軽度に認められた (図 2-4E、 F)。なお SD ラッ

トでは、SDT fatty ラットにみられたこれらの病理組織学的な変化は認められなかった。

SDT fatty ラットの脂肪肝および線維化発症の機序を解析するため、脂質代謝および線維化関連遺伝子の発現を検討した。SDT fatty ラットの脂質合成関連遺伝子 (SREBP-1c、FAS、ACC) は、8 週齢において SD ラットと比較して有意な上昇が認められた (図 2-5A ~C)。また、肝臓からのリポタンパク質分泌に関与する MTP の発現は、8 週齢から 40 週齢まで SD ラットと比較して 40%程度低下していた (図 2-5D)。維化関連遺伝子において、SDT fatty ラットは 16 および 24 週齢で SD ラットと比較して星細胞の活性化の指標である α -SMA および線維化のマーカーである I 型 Collagen 遺伝子発現の上昇傾向が認められた (図 2-5E、F)。

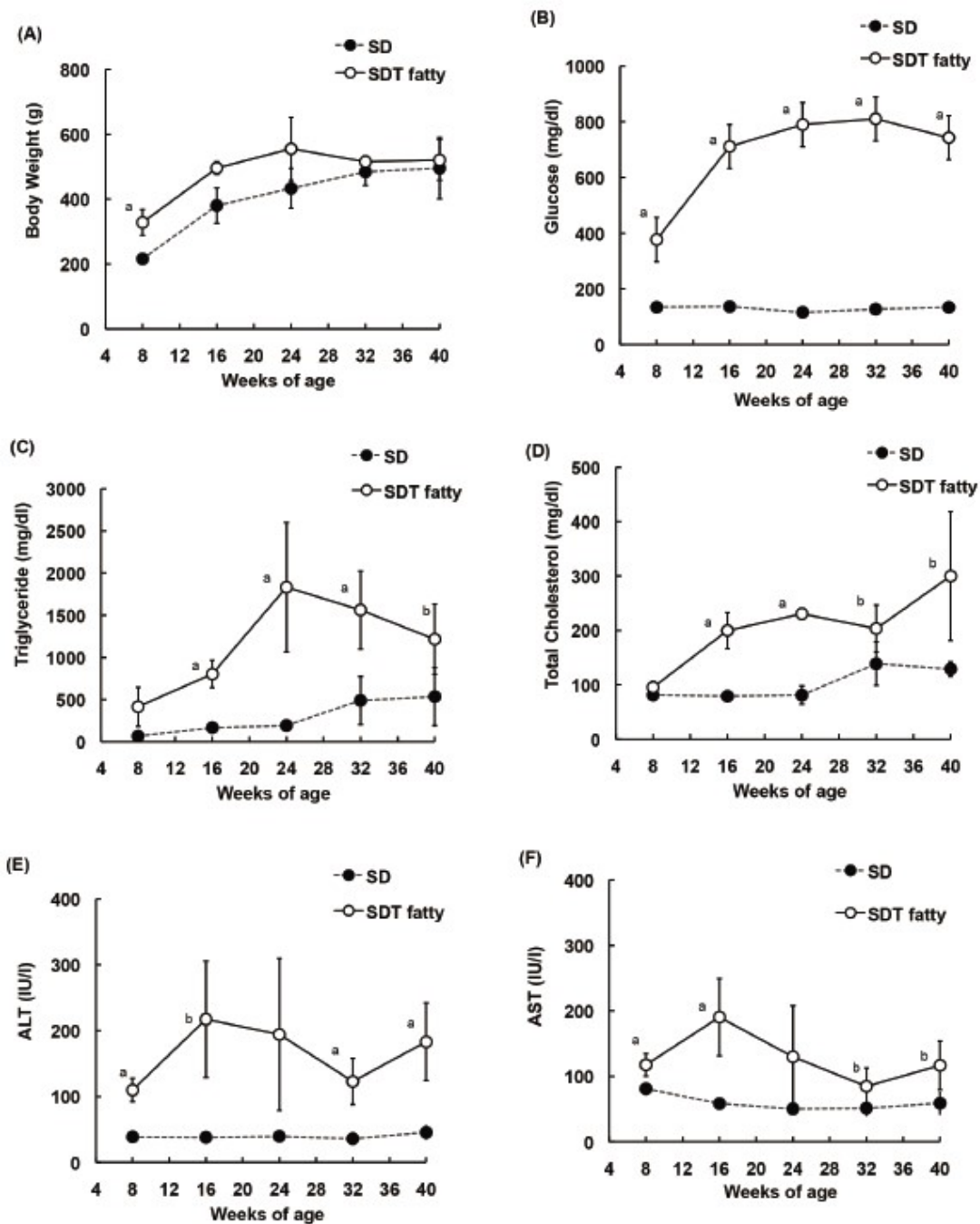


図 2-2 雌性 SD ラットおよび雌性 SDT fatty ラットの体重および血液生化学パラメータの経時変化

A : 体重 (Body Weight)、B : 血糖値 (Glucose)、C : 血中 TG 値 (Triglyceride)、D : 血中 TC 値 (Total Cholesterol)、E : 血中 ALT 値、F : 血中 AST 値

a: $p < 0.05$ 、b: $p < 0.01$ (SD ラットと比較)

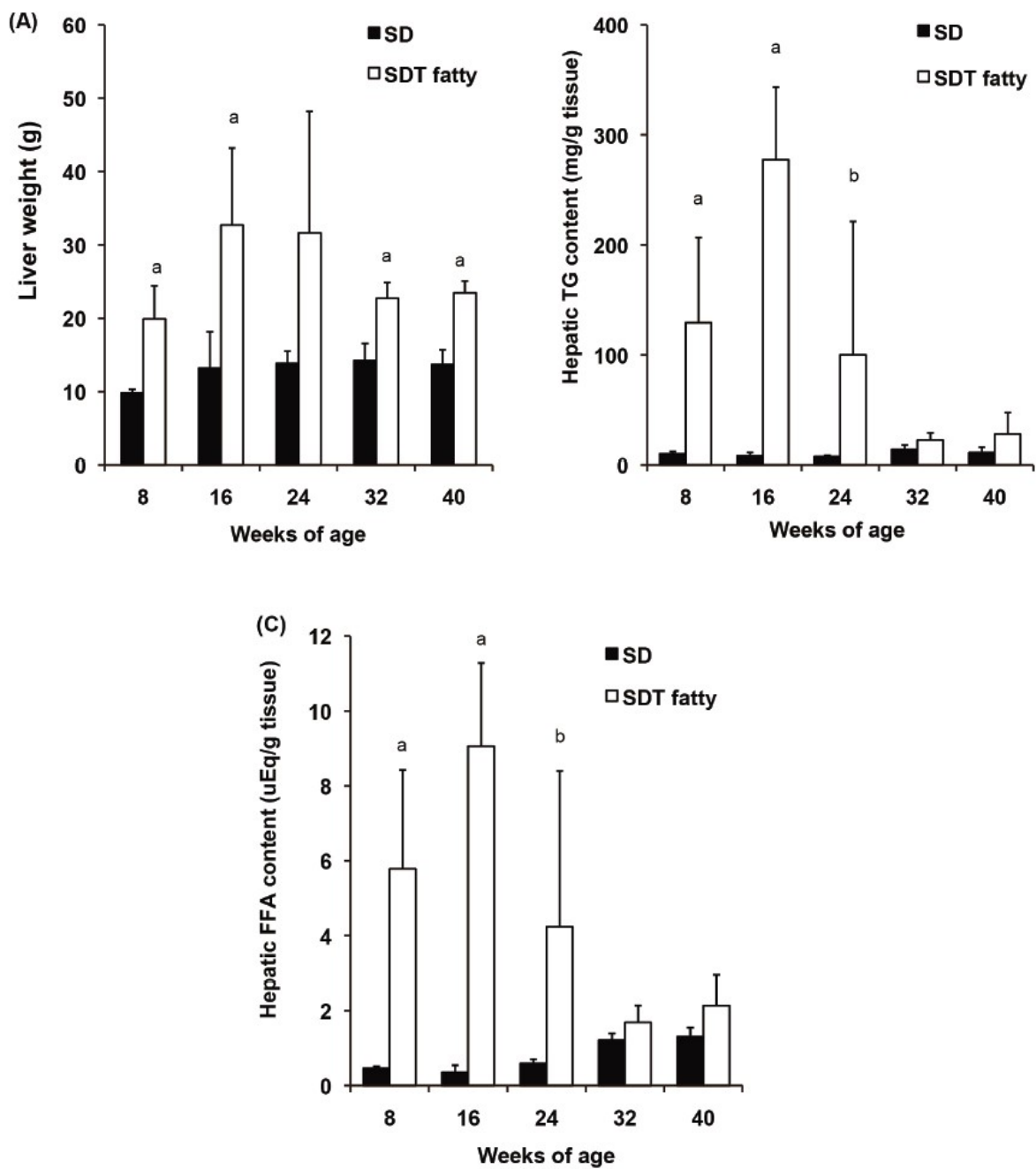


図 2-3 SD ラットおよび SDT fatty ラットの肝重量および肝中脂質含量の経時変化
 A : 肝重量 (Liver weight)、B : 肝中 TG 値 (Hepatic TG content)、C : 肝中遊離脂肪酸値 (Hepatic FFA content)
 a: $p < 0.05$ 、b: $p < 0.01$ (SD ラットと比較)

SD ラット

SDT fatty ラット

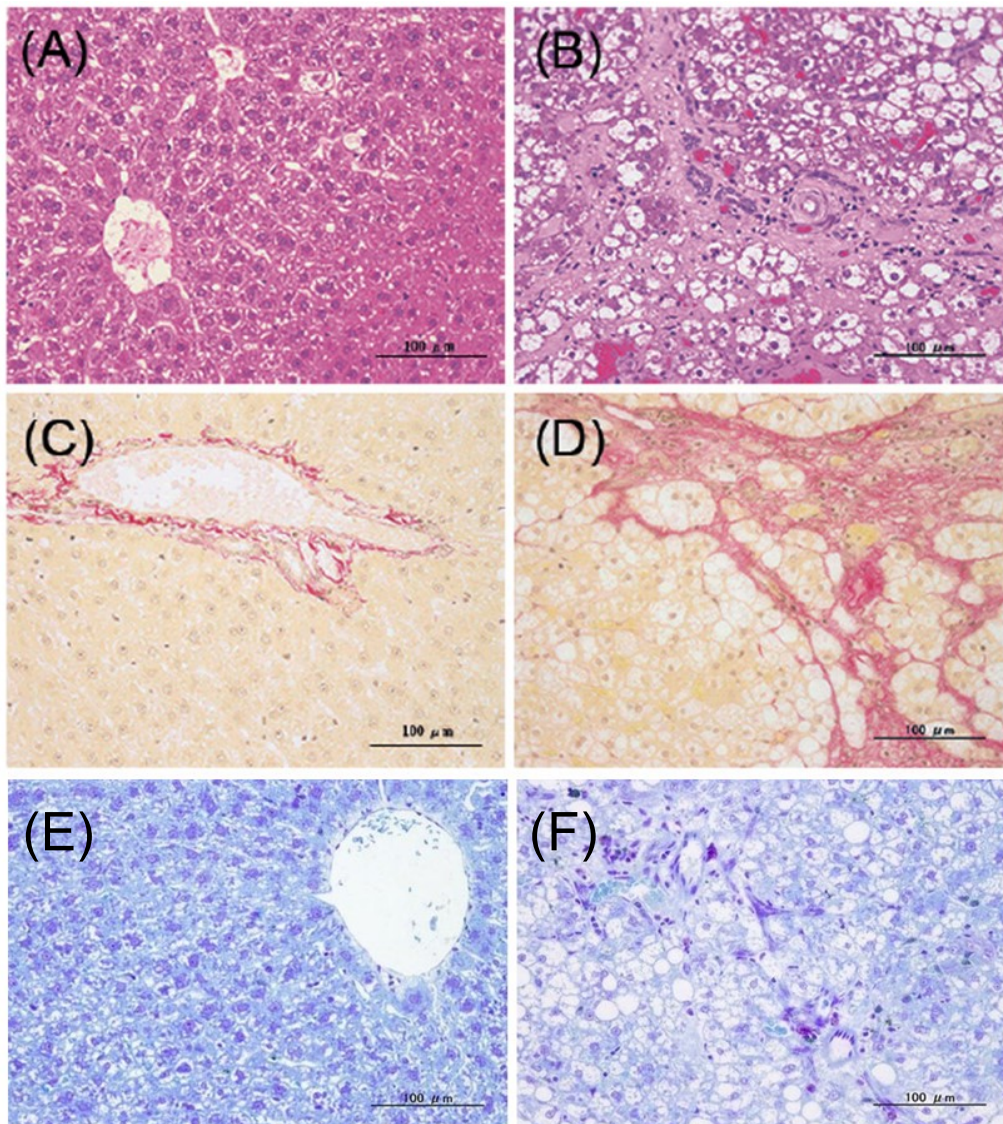


図 2-4 40 週齢における SD ラットおよび SDT fatty ラットの肝臓病理組織評価
HE 染色像 : SD ラット (A)、SDT fatty ラット (B)、シリウスレッド染色 : SD ラット
(C)、SDT fatty ラット (D)、TB と ED1 二重染色 : SD ラット (E)、SDT fatty ラット
(F)

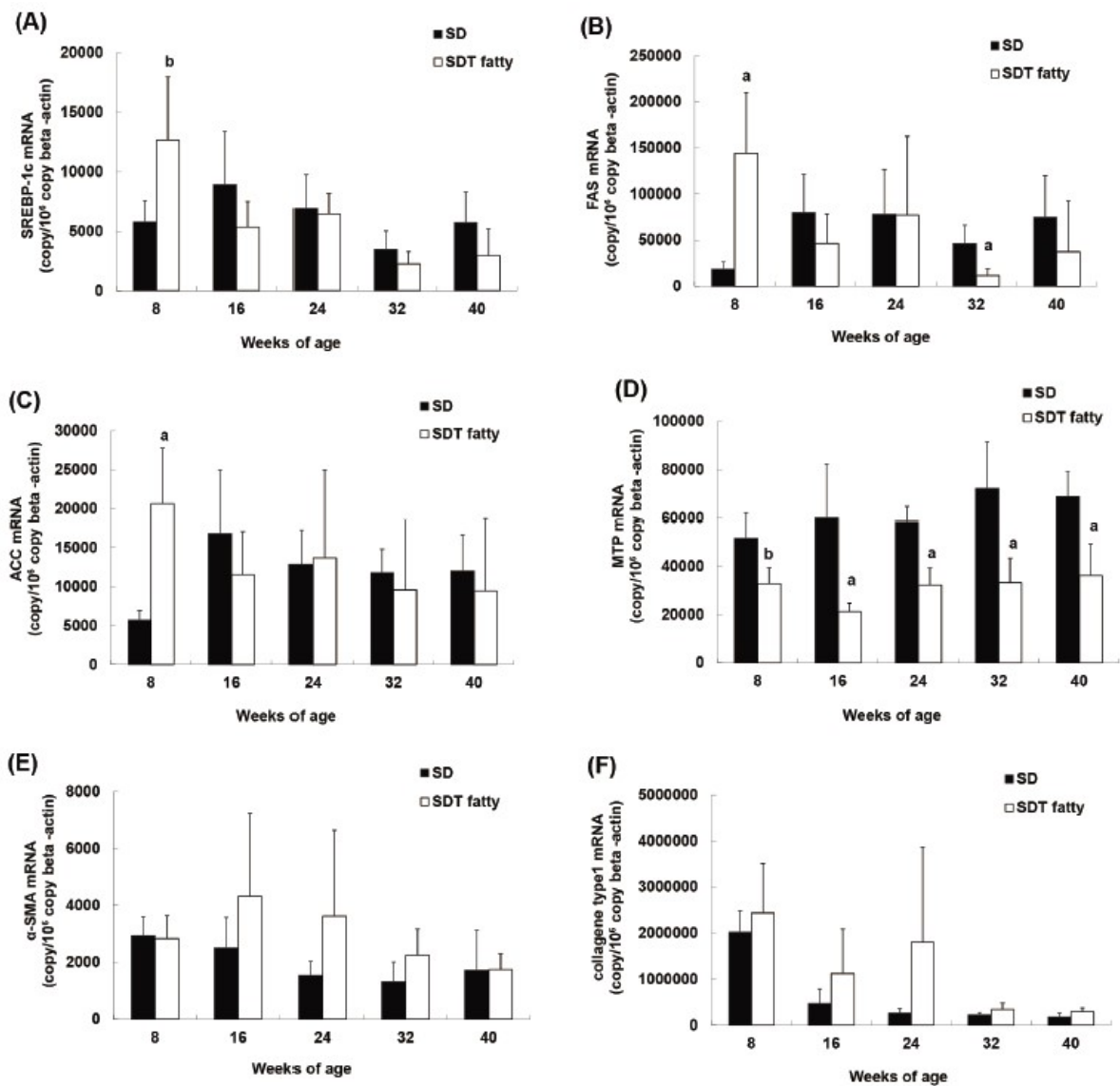


図 2-5 8、16、24、32 および 40 週齢における SD ラットおよび SDT fatty ラットの TG 合成・分泌および線維化に関連する遺伝子発現変動

A : SREBP-1c、B ; FAS、C : ACC、D : MTP、E : α-SMA、F : 1 型 collagen

a: $p < 0.05$ 、b: $p < 0.01$ (SD ラットと比較)

表 2-2 8、16、24、32 および 40 週齢における SD ラットおよび SDT fatty ラットの肝臓病理組織評価

		8w		16w		24w		32w		40w	
		SD	SDT fatty	SD	SDT fatty	SD	SDT fatty	SD	SDT fatty	SD	SDT fatty
Hepatosteatorsis (Vacuolar change/Fatty change)	-	5	0	5	0	5	0	5	0	5	0
	±	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2+	0	4	0	2	0	2	0	3	0	3
	3+	0	1	0	3	0	2	0	2	0	2
Hypertrophy of hepatocyte (with Vacuolation/Fatty change)	-	5	1	5	0	5	0	5	0	5	1
	±	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	+	0	2	0	2	0	2	0	1	0	2
	2+	0	2	0	3	0	2	0	3	0	1
	3+	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
Fibrosis, focal	-	5	4	5	5	5	4	5	1	5	1
	±	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	+	0	1	0	0	0	0	0	1	0	2
	2+	0	0	0	0	0	0	0	3	0	2
	3+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Infiltration, inflammatory cell, periportal	-	5	2	5	4	5	3	5	3	5	3
	±	0	3	0	1	0	1	0	0	0	1
	+	0	0	0	0	0	0	0	2	0	1
	2+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	3+	0	0	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

雌性 SDT fatty ラットは、8 週齢以降において高血糖、高脂血症および肥満を呈し、メタボリックシンドローム様の病態が観察された。また AST および ALT がヒトと同様に高値を示し、肝障害の可能性が疑われた。そこで肝臓中パラメータを測定した結果、肝重量、肝臓中 TG 含量および肝臓中 FFA 含量はいずれも増加あるいは増加傾向を示し、肝臓における脂肪の蓄積が観察された。また実際に、病理組織学的にも肝臓に TG が蓄積されていることが示唆された。加えて 8 週齢から NASH 病態で特徴的な ballooning 様の変化と思われる中等度 (1+~2+) の肝細胞の肥大化が認められ (表 2-2)、炎症細胞の浸潤も軽度に認められた。なお SD ラットでは、SDT fatty ラットにみられたこれらの病理組織学的な変化は認められなかった。さらに肝臓の線維化において、SDT fatty ラットは、32 週齢より中等度 (1+~2+) に認められ (表 2-2)、線維を特異的に染色するシリウスレッド染色を用いた検討においても、同様の結果が確認された (図 2-4C、D)。

8 から 24 週齢で確認された様な肝臓における過剰な FFA は、過酸化脂質へと代謝され、肝臓中の星細胞を活性化し、コラーゲンを過剰産生し、肝臓中に線維化を引き起こすことが知られている (Carpino et al., 2013)。また肝臓中 FFA 含量の上昇により、CYP2E1 の遺伝子およびタンパク質の発現が上昇し、肝臓において ROS 産生を促進し、NASH の発症および線維化を惹起することが知られている (Aubert et al., 2011; Caro and Cederbaum, 2004)。これらの機序を介して、SDT fatty ラットでは、線維化が誘導されると推定される。

次に脂肪肝および線維化発症機序を多角的に解析するため、脂質代謝および線維化関連遺伝子の発現を検討した。脂質合成関連遺伝子 (SREBP-1c、FAS、ACC) (図 2-5A~C) や、肝臓からのリポタンパク質分泌に関与する MTP 発現が低下していたことから (図 2-5D)、単に脂肪酸合成が亢進しているだけでなく、肝臓からのリポタンパク質分泌が抑制されることで、肝臓中脂質の蓄積がさらに惹起されると考えられた。一方、16 週

齢以降において、SDT fatty ラットの脂質合成関連遺伝子の発現は低下し、SD ラットと同様の推移を示した。SDT fatty ラットの脂質合成関連遺伝子の発現が低下する機序として、血漿中のインスリンが関与している可能性がある。インスリンは、FAS および ACC 遺伝子の発現を調節する SREBP-1c 遺伝子のプロモータ活性を調節することで遺伝子発現を上昇させることが知られている (Musso et al., 2009)。SDT fatty ラットの血漿中インスリン値は 6 から 8 週齢を頂値として、それ以降徐々に低下する (Ishii et al., 2010)。このインスリン値の低下により、SREBP-1c 遺伝子発現が低下し、FAS および ACC 遺伝子発現も低下すると思われる。また、これらの遺伝子発現の低下は、SDT fatty ラットにおける肝臓中 FFA および TG 含量低下の要因となっていると考えられた。事実、SREBP-1c 遺伝子の発現を低下させることで、高脂肪食誘発の脂肪肝が改善することが報告されている (Ishii et al., 2010)。

線維化関連遺伝子において、SDT fatty ラットは 16 および 24 週齢で SD ラットと比較して、星細胞の活性化の指標である α -SMA および線維化のマーカーである I 型 Collagen 遺伝子発現の上昇傾向が認められた (図 2-5E、F)。SDT fatty ラットは、肝臓中の星細胞の活性化を介して、線維化を惹起することが示唆された。これらの病理学的な変化、および肝障害パラメータである ALT 値、AST 値が高値を示すことから、SDT fatty ラットでは、NASH が発症していると考えられた。また、24 週齢以降では、これらの線維化関連遺伝子の発現は低下し、40 週齢において SD ラットと同等となった。SDT fatty ラットで認められた線維化が 32 週齢以降に悪化しない結果と一致している。これより、40 週齢以降において、SDT fatty ラットの線維化が進行しない可能性があり、今後これらについて確認していく予定である。

他の 2 型糖尿病モデルである db/db マウスや ZDF ラット、OLETF ラットと同様に、SDT fatty ラットにおいても肝臓中 TG 含量が上昇し、脂肪肝を発症することが確認された (Forcheron et al., 2009; Ge et al., 2010; Song et al., 2013; Xu et al., 2012)。

一方、24 週齢以降に肝臓中 TG 含量が低下することは、db/db マウスや ZDF ラットとは異なる変化であった。病理組織学的な違いとして、通常食飼育により SDT fatty ラットの肝臓に線維化が生じることが挙げられる。db/db マウスや ZDF ラットでは、脂肪肝は呈するが線維化まで病態が進展しないことが報告されている (Ge et al., 2010; Xu et al., 2012)。肥満 2 型糖尿病モデルにおいて、肝臓の線維化まで進展する SDT fatty ラットと進展しない db/db マウスや ZDF ラットとの要因については明確でない。しかしながら、SDT fatty ラットは肝臓における炎症に対する感受性が高く、肝臓に線維化が生じやすい可能性が考えられる。SDT fatty ラットの起源である SDT ラットは、加齢に伴い膵臓ランゲルハンス島 (膵島) が変性することによりインスリン分泌が低下し、糖尿病を発症する (Masuyama et al., 2004; Shinohara et al., 2000)。膵島が変性する機序として、膵島に浸潤したマクロファージよりレニン・アンジオテンシン系を介して産生された NO が、酸化ストレスを惹起し、膵島が変性することが示唆されている (Inokuchi et al., 2009)。事実、レニン・アンジオテンシン系を抑制するテルミサルタンを SDT ラットに処置することで、糖尿病の発症が抑制される (Hasegawa et al., 2009)。これより、SDT ラットは肝臓を含む全身で炎症をおこしていると考えられる。恒常的に炎症を起こしている肝臓に、過剰な肝臓中 FFA から代謝されて生成した過酸化脂質の刺激が加わり、線維化が惹起されると推測される。事実、SDT fatty ラットおよび SDT ラットの起源である SD ラットは、Lewis および Wistar ラットと比較して、高脂肪負荷により線維化および肝細胞の障害を生じやすいことが報告されている (Rosenstengel et al., 2011)。

本研究で、我々は SDT fatty ラットが通常食において、NASH を発症することを紹介した。これまでの NASH モデルは、単一の遺伝子改変や食餌誘発性のモデル動物が主流であるが、ヒト NASH 病態と異なる点が知られている。具体的にはメタボリックシンドロームを呈していないモデルや線維化を発症しないモデルなどが挙げられる。以上の点

から、これまでの NASH モデル動物はヒトの NASH 病態を完全に模倣しているとはいえない。一方、SDT fatty ラットは、通常飼育下でヒトと同様に肥満、高脂血症、糖尿病を呈し、NASH から線維化に病態が進行する新しいモデル動物である。従って、SDT fatty ラットが NASH 発症の病態解析や薬剤の薬効評価に有用なモデルとなる可能性がある。また、本稿では雌性 SDT fatty ラットの肝臓について報告を行ったが、雄性 SDT fatty ラットについても検討を実施し、NASH を発症しないことを確認している。これは雄性 SDT fatty ラットでは、血中インスリン値が雌に比べて早期から低下し、肝臓における脂肪蓄積を誘発できなかったためと考えられる。ヒトの NASH 罹患率では、若年では男性が、高齢では女性が高頻度であると報告されており、雄性 SDT fatty ラットについてはヒトの NASH 病態を反映していなかった。今後、雌性 SDT fatty ラットが 40 週齢以降において肝硬変、肝癌へと病態が進行するかを検討すると共に NASH 発症の時期を早期化するような工夫を行い、NASH 病態解析モデルとしての有用性を高め、薬剤評価に最適化した条件を検討していきたい。

第5節 要約

雌性 SDT fatty ラットは、8 週齢より肥満、高血糖、高脂血症を示し、糖脂質代謝異常が確認された。さらに血中 AST・ALT 値が高値を示したことから、肝臓における障害が疑われた。実際、肝臓においては TG 含量や FFA 含量が増加しており、HE およびシリウスレッド染色をした結果、重度な空胞化や脂肪化が観察され TG 蓄積が示唆された。また肝細胞の ballooning 様の変化や炎症細胞の浸潤、線維化も観察された。遺伝子解析においても脂質合成関連遺伝子（SREBP-1c、FAS、ACC）の増加、肝臓からのリポタンパク質分泌に関与する MTP の発現の低下、線維化関連遺伝子（ α -SMA、I 型 collagen）の増加傾向が観察され、多角的に SDT fatty ラットが NASH 様の病態を発症することが裏付けられた。

第3章 フェノフィブラートおよびピオグリタゾンによる雌性 SDT fatty ラットの 糖脂質代謝および NASH 様病変に及ぼす影響

第1節 緒言

NASH は、しばしばメタボリックシンドロームの肝臓における表現型といわれる。これは本症の96%が内臓脂肪型肥満を有し、48%がHOMA-IR 2.5以上のインスリン抵抗性、66%が耐糖能異常を示し、73%が収縮期血圧130 mmHg以上あるいは拡張期血圧85 mmHg以上、40%が中性脂肪150 mg以上、28%がHDL-コレステロール40 mg/dl未満、27%が空腹時高血糖を示すことによる(西原利治, 2006)。従って、糖脂質代謝を改善する既存薬のドラッグリポジショニングや新規メカニズムを有する化合物の臨床試験が、世界初のNASH治療薬としての承認を得るべく、精力的に進められている。

高脂血症治療薬であるフェノフィブラートおよび血糖降下薬であるピオグリタゾンは、いずれも患者において糖脂質代謝を改善することが知られている(図3-1、2)。フェノフィブラートはPPAR α 受容体を刺激することによりLPL活性を亢進し、血中脂質値を低下させる薬剤であり、NASH/NAFLDモデルへの効果が期待される(Gao et al., 2014)。またピオグリタゾンは核内受容体PPAR γ のアゴニストとして作用し、インスリン抵抗性を改善して血糖値を低下させる(Gastaldelli et al., 2006)。特にピオグリタゾンは、臨床試験においてNASH患者に有効性を示したという報告もあり(Musso et al., 2017)、ドラッグリポジショニングの観点から世界中の注目を集めている。

本試験ではフェノフィブラートを6週齢からSDT fatty ラットに投与し、病態の発症に対して予防効果を示すか検討した。またピオグリタゾンについては、明確に肝臓への脂肪蓄積が認められる16週齢から投与を開始し、発症した病態に対する治療効果を有するか検討を行った。

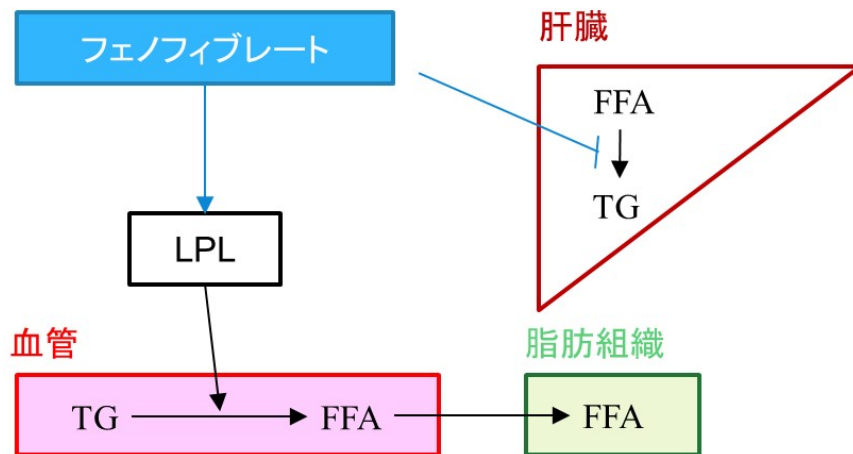


図 3-1 フェノフィbrateの作用機序

フェノフィbrateはLPLを活性化し、血管内でTGからFFAの産生を促す。一方、肝臓ではFFAからTGへの合成を阻害することで肝中脂質含量を低下させる。

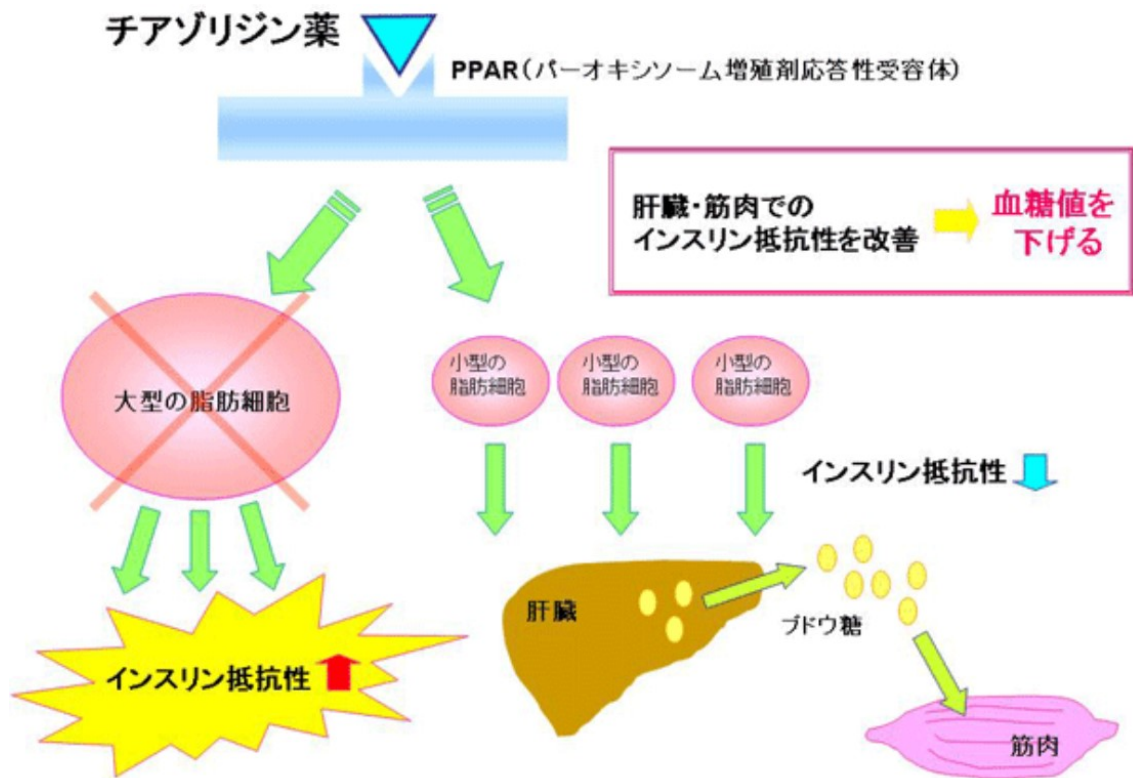


図 3-2 ピオグリタゾンの作用機序

ピオグリタゾンは PPAR γ 受容体に結合し、脂肪細胞の小型化させてアディポネクチンの分泌を促進する。また肝臓や筋肉でのインスリン抵抗性を改善し、糖脂質代謝を改善する。(藤元メディカルシステム社 HP より引用)

第2節 材料および方法

実験には雌性 SDT fatty ラット（日本たばこ産業㈱）を用い、フェノフィブラート（和光純薬工業㈱）は CRF-1 粉末飼料（オリエンタル酵母㈱）に混合し（30、100 mg/kg 相当に調製）、6 週齢から 12 週齢まで 6 週間毎日投与された。またピオグリタゾン、CRF-1 粉末飼料（オリエンタル酵母㈱）に混合し（3、10 mg/kg 相当に調製）、16 週齢から 32 週齢まで 16 週間毎日投与された。正常対照動物として、雌性 SD ラット（日本クレア㈱）を使用し、同期間 CRF-1 粉末飼料を給餌した。各動物は個別飼育により紫外線照射された水道水を自由摂取させ、12 時間の明暗周期（明期：8～20 時、暗期：20～8 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された。

SDT fatty ラットの摂餌量、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、HbA1c 値）を自動分析器（㈱日立製作所）にて測定した。血清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。肝臓中の脂質含量測定および病理学的検査は、第 2 章、第 2 節と同様の方法で行った。

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、正常対照動物（SD ラット）と対照群（SDT fatty ラット）においては、Student の t 検定を、対照群と薬剤（フェノフィブラートおよびピオグリタゾン）の比較においては、Dunnett 検定または Steel 検定を実施し、 $P < 0.05$ を有意とした。結果は、平均値 \pm 標準偏差で示した。

第3節 結果

第1項 フェノフィブラートによる予防効果

雌性 SDT fatty ラットにフェノフィブラート 30、100 mg/kg を投与した結果、体重への影響は認められなかった（図 3-3A）。フェノフィブラート 100 mg/kg 投与群の血中グルコース値は投与 2 週間後から低下傾向を示し、4 週間後には有意に低下した（図 3-3B）。

血中インスリン（図 3-3C）、TG（図 3-3D）および TC 値（図 3-3E）には明らかな変化はみられなかった。肝障害パラメータである血中 ALT（図 3-3F）および AST 値（図 3-3G）は用量依存的に低下あるいは低下する傾向にあった。

血中脂質の低下は観察されなかったが、肝臓中 TG 含量（図 3-4A）および肝臓中 TC 含量（図 3-4B）はフェノフィブラートを 6 週間投与することで用量依存的に低下し、病理組織学的検査においても 100 mg/kg 投与群において肝細胞の脂肪化が抑制された（図 3-5）。

第 2 項 ピオグリタゾンによる治療効果

16 週齢から 32 週齢の雌性 SDT fatty ラットにピオグリタゾン 3、10 mg/kg を投与した結果、対照群に比べて摂餌量（図 3-6A）、体重（図 3-6B）、血糖値（図 3-6C）、血中インスリン値（図 3-6D）および血中 TC 値（図 3-6F）への明らかな影響は認められなかった。血中 TG 値（図 3-6E）は、投与 4 週後より用量依存的に低下し、投与 12 週以降、ピオグリタゾン 10 mg/kg 投与群の血中 TG 値は、正常ラット群と同程度まで低下した（投与後 12 週の血中 TG 値、対照群：843.4±377.5 mg/dl、3 mg/kg 投与群：451.6±117.1 mg/dl、10 mg/kg 投与群：241.8±124.7 mg/dl、正常群：194.7±89.5 mg/dl）。また血中 ALT 値（図 3-6G）および AST 値（図 3-6H）に関して、ピオグリタゾン投与による低下作用は認められず、逆に投与 4 あるいは 8 週後において対照群と比較して高値を示した。

病理組織学的検査結果を表 3-1 に示した。SDT fatty ラットの肝臓では、肝細胞の脂肪化および肥大、線維化が認められたが、ピオグリタゾン投与によりそれらの変化は抑制されなかった。

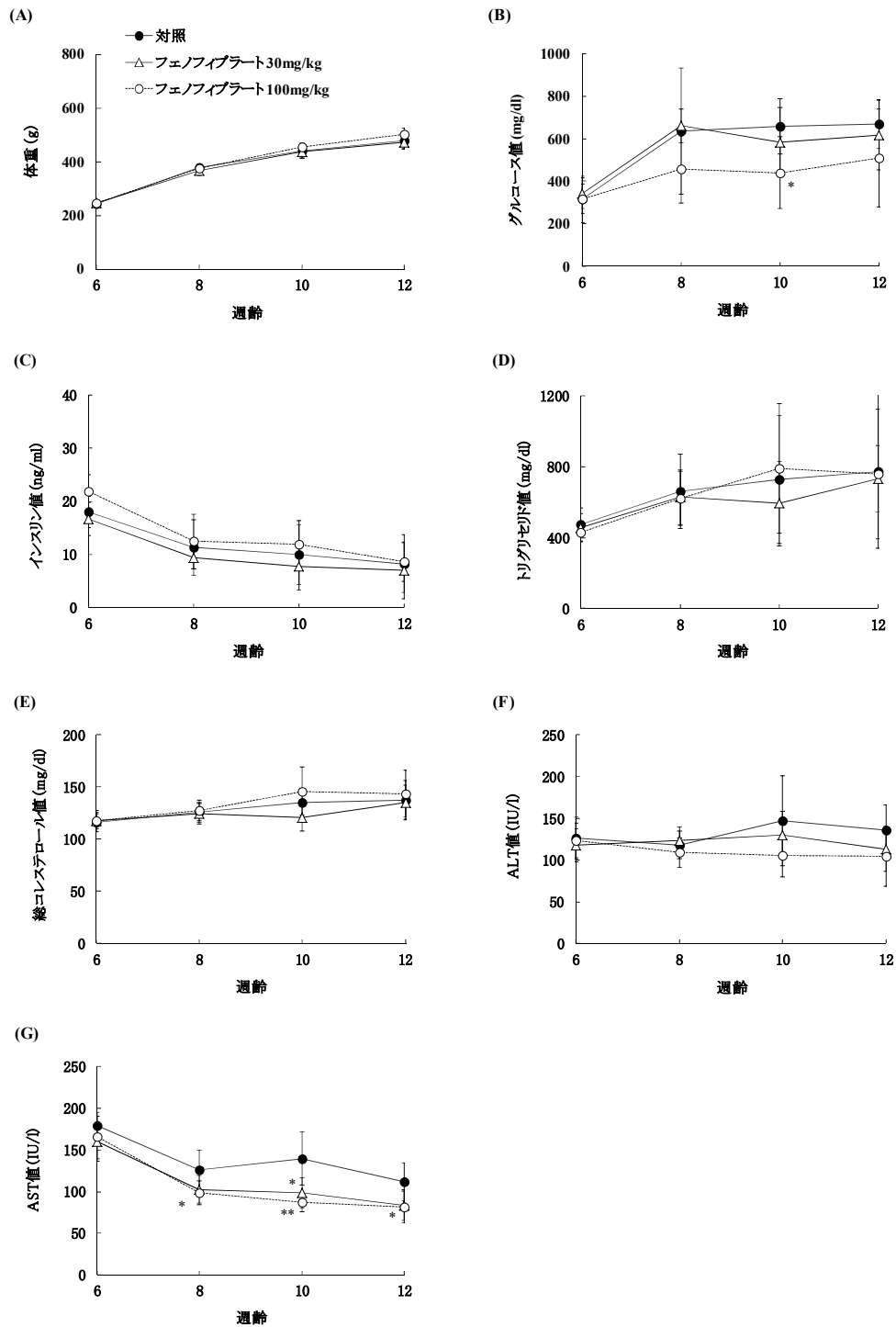


図 3-3 フェノフィブラート投与による SDT fatty ラットの体重および血液生化学パラメータの経時変化

A : 体重、B : 血中グルコース値、C : 血中インスリン値、D : 血中トリグリセライド値、E : 血中総コレステロール値、F : 血中 ALT 値、G : 血中 AST 値 (各群 6 例)

*: $p < 0.05$ 、** : $p < 0.01$ (対照群と比較)

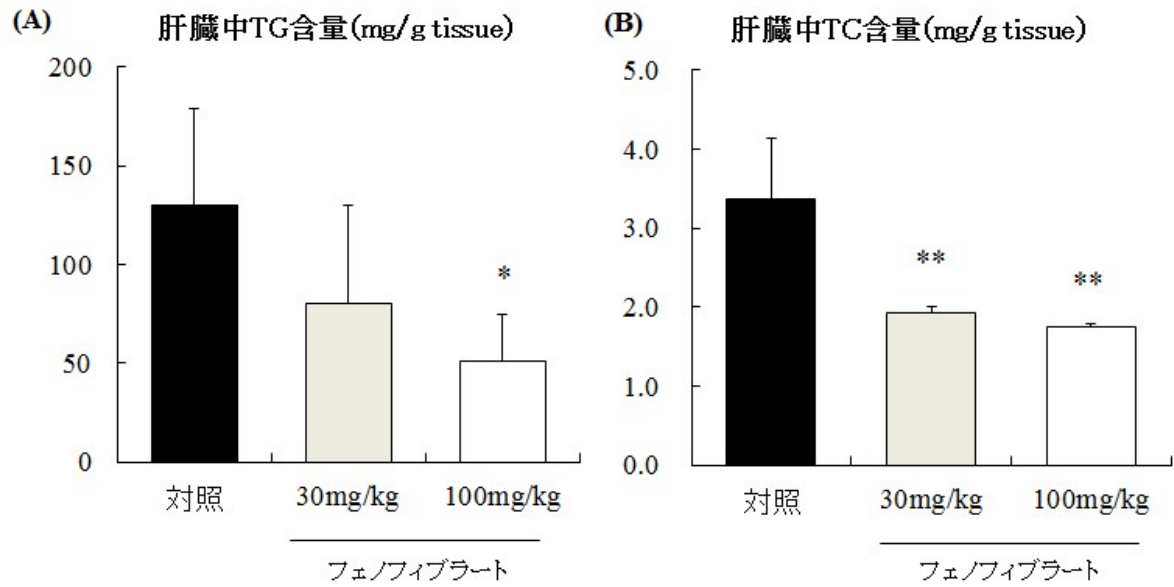


図 3-4 フェノフィブラート投与 6 週間後の SDT fatty ラットの肝臓中脂質含量

A : 肝臓中 TG 含量、B ; 肝臓中 TC 含量 (各群 6 例)

*: $p < 0.05$ 、**: $p < 0.01$ (対照群と比較)

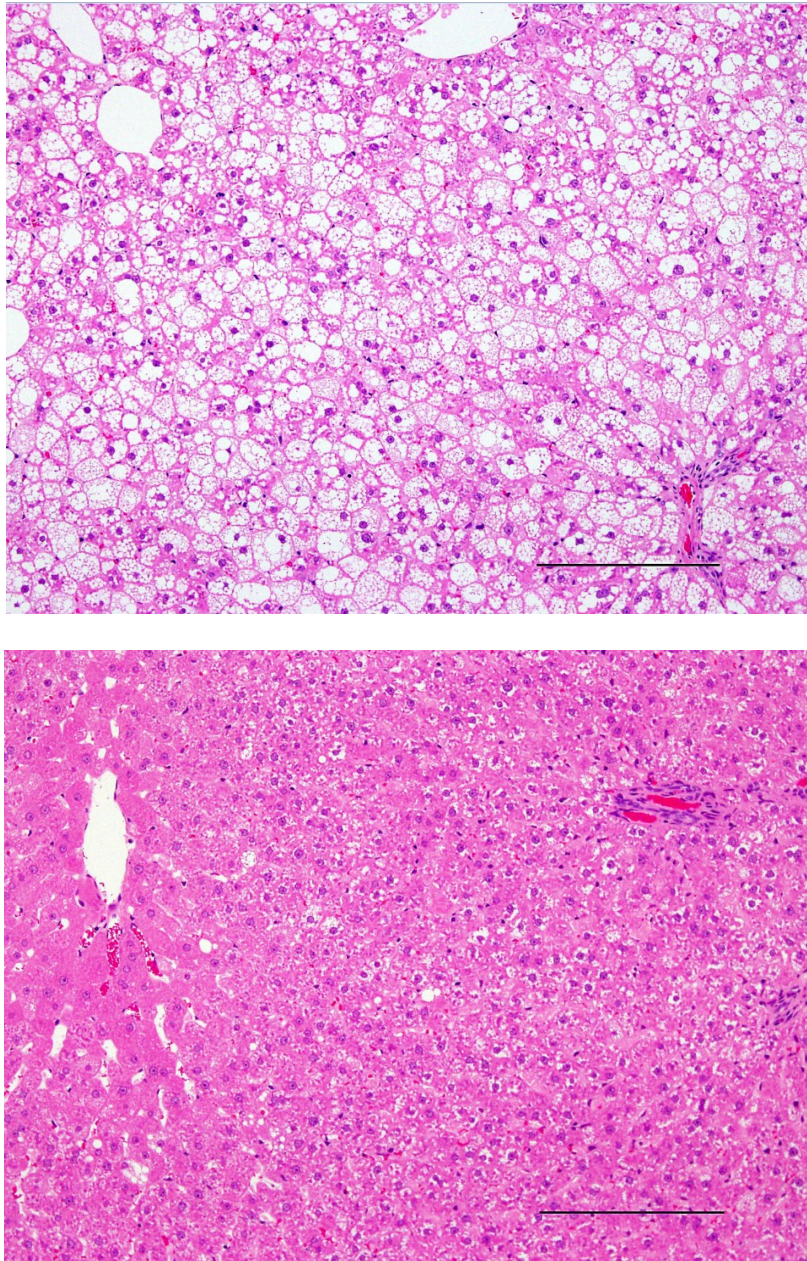


図 3-5 フェノフィブラート投与6週後のSDT fattyラットにおける肝臓病理学的組織検査

上段：対照群、下段：フェノフィブラート 100 mg/kg 投与群、HE 染色、Bar = 200 μm。

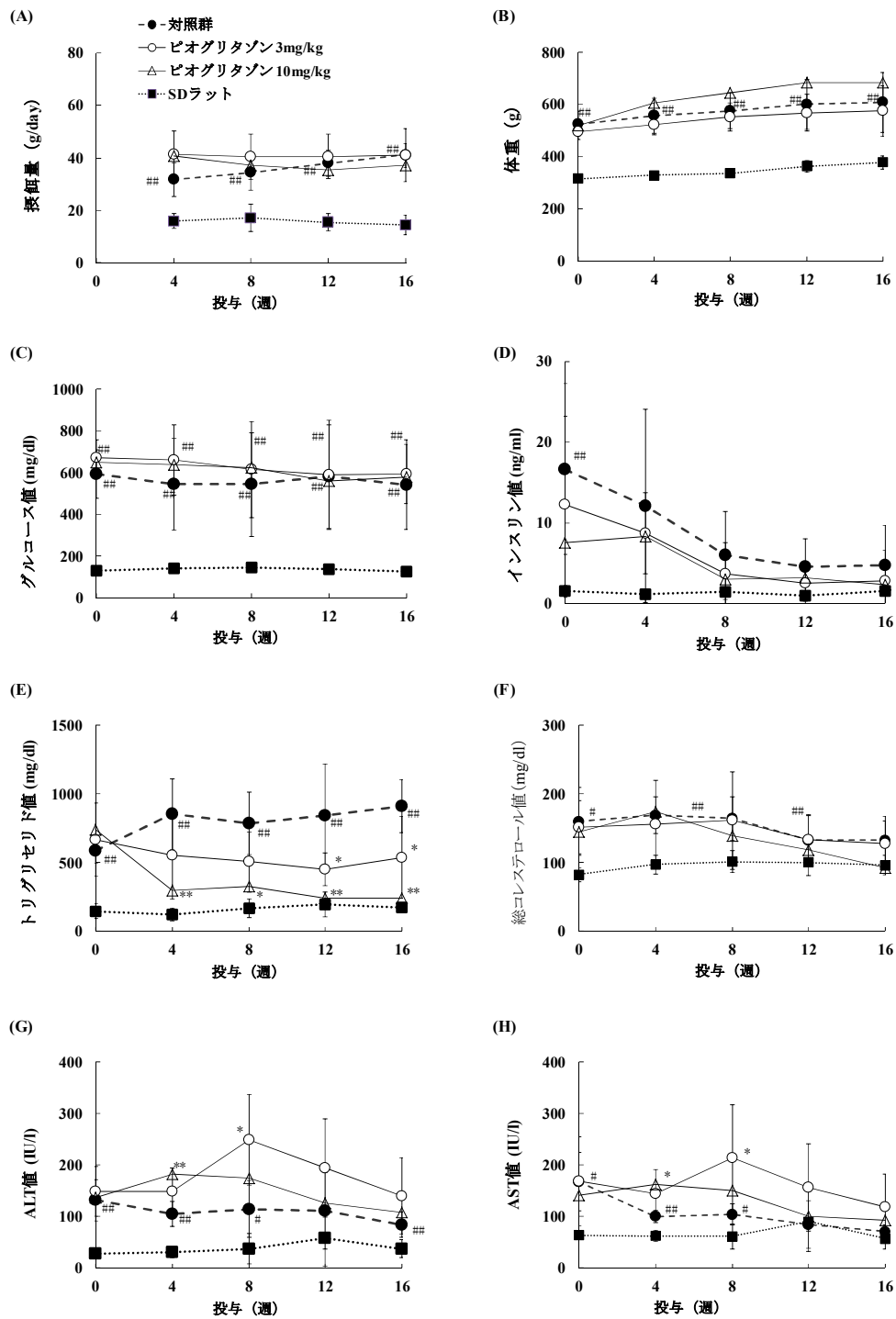


図 3-6 ピオグリタゾン投与による SDT fatty ラットおよび SD ラットの摂餌量、体重および血液生化学パラメータの経時変化

A : 摂餌量、B : 体重、C ; 血糖値、D : 血中インスリン値、 E : 血中トリグリセリド値、 F ; 血中総コレステロール値、 G : 血中 ALT 値、 H ; 血中 AST 値 (各群 5 例)

#: $p < 0.05$, ##: $p < 0.01$ (SD ラットと比較)

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ (対照群と比較)

表 3-1 ピオグリタゾン 16 週間投与後の SDT fatty ラット肝臓病理組織学的検査

Animal	SDT fatty					SDT fatty					SDT fatty					SD									
Test article											Pioglitazone					Pioglitazone									
Dose											3 mg/kg					10mg/kg									
Animal No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20					
脂肪蓄積	+	2+	2+	2+	3+	3+	±	+	±	+	3+	3+	+	+	2+	-	-	-	-	-					
肥大, 空胞化	+	+	+	+	2+	2+	±	±	±	±	2+	2+	±	±	+	-	-	-	-	-					
線維化	-	±	±	±	±	±	-	±	-	-	±	±	-	-	±	-	-	-	-	-					

-: Negative, +: Slight, 2+: Moderate, 3+: Severe

ピオグリタゾンによる NASH 様病変の改善作用は観察されなかった。(各群 5 例)

第4節 考察

高脂血症治療薬であるフェノフィブラートおよび血糖降下薬であるピオグリタゾンを用いて、SDT fatty ラットの糖脂質代謝に対する作用を検討した。フェノフィブラートの 100 mg/kg 投与群では SDT fatty ラットの血糖上昇を抑制し、長期にわたり血糖コントロールしうる可能性を示した (図 3-3B)。投与終了時の肝臓中脂質含量の低下 (図 3-4) や病理組織学的検査において脂肪肝の改善がみられたことより (図 3-5)、肝臓中の脂肪毒性の軽減が肝臓インスリン抵抗性を改善し、血糖コントロールに繋がったことが考えられる。

フィブラート系薬剤は LPL 活性亢進作用以外に PPAR α の活性化を介して、ペルオキシゾームの長鎖脂肪酸の β 酸化に関する酵素の発現を誘導し、肝臓中 β 酸化を亢進することにより脂質代謝を改善することが知られている (Tenenbaum et al., 2004)。そのため本研究においてもフェノフィブラートの反復投与により SDT fatty ラットの肝臓中脂質代謝が改善し、脂肪肝の軽減がみられたと考えられる。他の動物モデルにおいても、高脂肪食負荷 ZDF ラットにおけるフェノフィブラートによる脂肪肝抑制効果 (Forcheron et al., 2009) やメチオニン・コリン欠乏食負荷モデルでのベザフィブラートによる脂肪性肝炎の進行抑制効果 (Nagasawa et al., 2006) 等が報告されており、ヒトにおいてもフィブラート系薬剤による NASH の予防効果が期待される。

糖尿病治療薬ピオグリタゾンは、その強い血糖降下作用とインスリン抵抗性改善作用から NASH 治療薬として期待されているが、長期の有効性、安全性に関するエビデンスはなく、まだ NASH 治療薬としては承認されていない。本研究では、脂肪肝を明らかに呈する 16 週齢の雌性 SDT fatty ラットにピオグリタゾンを 16 週間投与し、NASH 様病変に対するピオグリタゾンの治療効果を検討した。

ピオグリタゾン投与により SDT fatty ラットの高血糖は抑制されなかったが、高 TG 血症を明らかに抑制し、SDT fatty ラットの脂質異常を改善した。ピオグリタゾンは、

PPAR γ 受容体を活性化し、小型の脂肪細胞を増加させ、またアディポネクチン分泌を介して、インスリン抵抗性を改善することが知られている (Yang et al., 2006)。また PPAR α 受容体活性化作用も有しており、 β 酸化亢進等の機序を介して脂質代謝改善作用をしめす (Kawaguchi et al., 2004)。これらの作用により、SDT fatty ラットの high TG 血症は抑制されたと考えられる。一方で、SDT fatty ラットの high 血糖発症は、インスリン抵抗性のみならず、インスリン分泌不全の要因も大きいと考えられ、インスリン抵抗性改善作用を有するピオグリタゾンの血糖降下作用が十分に発揮されなかったと考えられる。

ピオグリタゾン投与は、SDT fatty ラットの脂質異常を改善したが、肝臓の組織学的検査において NASH 様病変の改善は認められなかった。NASH の発症・進展には Day の two hit theory が支持されており、メタボリックシンドロームなどを背景とし、1st hit として肝臓への脂肪沈着、さらに代謝変化に伴う酸化ストレスや炎症反応の増大などが 2nd hit として考えられている (Day and James, 1998)。血清 ALT、AST 値の増加が、ピオグリタゾン投与で認められており、本実験においてピオグリタゾンは、SDT fatty ラット肝臓の炎症反応を抑制できなかったことが、NASH 様病変に効果を示さなかった要因の 1 つと考えられる。PPAR γ 受容体活性化剤であるチアゾリジン誘導体は、肝障害をきたすことが知られており、重篤な肝障害により販売中止に至ったトログリタゾンよりは弱いものの、ピオグリタゾンも肝障害作用を有するため (Arundel and Lewis, 2007)、改善作用を示さなかった可能性も考えられる。

本実験では、脂肪肝が明らかに形成された 16 週齢よりピオグリタゾン投与を開始したため改善作用は認められなかったが、フェノフィブラートと同様に 6 週齢から試験を開始すれば異なる結果となったかもしれない。実際に CDAA 食負荷モデルにおいて、ピオグリタゾンの予防的投与は、NASH 病変の発症・進展を抑制することが報告されている (Kawaguchi et al., 2004)。臨床においては、NASH 患者にピオグリタゾンを投与す

ると、脂肪肝、炎症は抑制されるが、線維化は抑制されず、その治療効果が不十分であることも報告されており (Sanyal et al., 2010; Schwenger and Allard, 2014)、本実験の結果も同様であった。NASH 患者の罹病期間、病態背景、肝障害に対する反応性等様々な要因が、ピオグリタゾンの治療効果に影響すると考えられる。

以上、新規 NASH モデルとして期待される雌性 SDT fatty ラットを用いて、フェノフィブラートによる予防効果とピオグリタゾンによる改善作用を検討した結果、フェノフィブラートにより明らかな薬効が確認されたことは本モデルをヒトに外挿する点においても意義が大きいと考える。またピオグリタゾンによる改善効果は認められなかったものの、実際の NASH 治療に対する臨床成績を反映している可能性も示唆され、今後、本モデルを用いた新規 NASH 治療薬の創製が期待される。

第5節 要約

雌性 SDT fatty ラットに、病態発症前の6週齢からフェノフィブラート 30、100 mg/kg を6週間反復投与した結果、血中グルコース値は投与2週間後から低下傾向を示し、4週間後には有意に低下した。またヘモグロビン A1c 値も用量依存的に低下する傾向があった。さらにフェノフィブラート投与群では血中 ALT および AST 値が低下あるいは低下する傾向にあった。血中脂質の低下は観察されなかったものの、肝臓中脂質含量が低下し、組織学的検査においては脂肪肝の改善が認められた。

NASH 治療薬としての可能性が期待される糖尿病治療薬ピオグリタゾン 3、10 mg/kg を病態発症後の16週齢から16週間反復投与した結果、投与4週後より血中トリグリセリド値が用量依存的に低下したが、血糖値や血中インスリン値等に対する改善作用は認められなかった。病理組織学的検査において、SDT fatty ラットの肝臓では、肝細胞の脂肪化および肥大、線維化が認められたが、ピオグリタゾン投与によりそれらの変化は抑制されなかった。

第4章 雄性 SDT fatty ラットを用いた新規糖尿病黄斑浮腫モデルの確立

第1節 緒言

糖尿病黄斑浮腫は糖尿病網膜症でよく観察される所見であり、糖尿病患者における重度の視力障害の主要な要因である (Cheung et al., 2010)。2012 年の調査によれば、9260 万人の糖尿病網膜症患者のうち、2060 万人が糖尿病黄斑浮腫を併発していると報告されている (Yau et al., 2012)。糖尿病網膜症と約 1~2 カ月間の平均血糖値の指標である HbA1c の関連性は、大規模臨床研究である DCCT 試験によって示されており、糖尿病患者の血糖値を低下させることは糖尿病網膜症やその他の合併症の発症リスクを低下させることから、様々な血糖降下薬が開発されてきた。現在ではスルフォニルウレア、ビグアナイド、 α -グルコシダーゼ、グリニド、チアゾリジンジオン、インクレチン製剤、SGLT2 阻害薬の 7 種類が開発・販売されている (Chen et al., 2016; Takamoto and Kadowaki, 2011)。このように複数の薬剤が販売され、患者病状に合わせて個別に薬剤を選択できる状況にあるにも関わらず、血糖コントロール不良例はあまり減らず、糖尿病性合併症を発症し、生命の危機を脅かす問題となっている。

長期間糖尿病に罹患すると、AGE や ROS の過剰産生、あるいは PKC やサイトカインが活性化され、VEGF やケモカインが網膜や網膜血管にて過剰に産生・分泌される (Das, 2016) (図 4-1)。透過性因子として知られる VEGF は、細胞間接着に関与するタイトジャンクション蛋白を変化させ、血液網膜関門の破綻に関与する。その結果、網膜血管の透過性が亢進し、網膜において浮腫を引き起こす (Kim et al., 2009; Murakami et al., 2009)。従って、糖尿病黄斑浮腫の治療のために VEGF 中和抗体が開発されており、ラニズマブや VEGF-trap といった製品はここ 10 年間で治療の中心となりつつある。その一方で、糖尿病黄斑浮腫患者のうち 25%は VEGF 中和抗体に対してノンレスポonderであり (Singer et al., 2016)、糖

尿病黄斑浮腫の詳細なメカニズム解明が待ち望まれている状況である。そのため動物モデルを用いた研究が数多く行われてきたが、ストレプトゾシン誘発モデル(Anand-Apte et al., 2010; Yu et al., 2010)、OLETF ラット(Lu et al., 2003)、ZDF ラット(Johnson et al., 2013)は糖尿病黄斑浮腫患者の所見とは異なり、いずれのモデルにおいても網膜肥厚が認められず、モデルとして十分であるとは言い難い。

雄性 SDT fatty ラットは6 週齢から糖尿病を呈し(Masuyama et al., 2005)、近年、糖尿病性合併症に類似の所見 (Katsuda et al., 2015)を示すことが報告された。網膜に関しては、16 週齢において網膜電位図検査においてピーク遅延が観察されており、何らかの障害が起きていることが示唆されている(Matsui et al., 2008)。そこで本研究では、SDT fatty ラットに VEGF 蛋白質の蓄積、網膜血管の透過性亢進あるいは網膜肥厚といった所見が観察されるか検討を行った。さらに、糖脂質代謝改善薬であるフロリジンとピオグリタゾンを用いて、その血液生化学パラメータと網膜肥厚に対する効果を解析した。

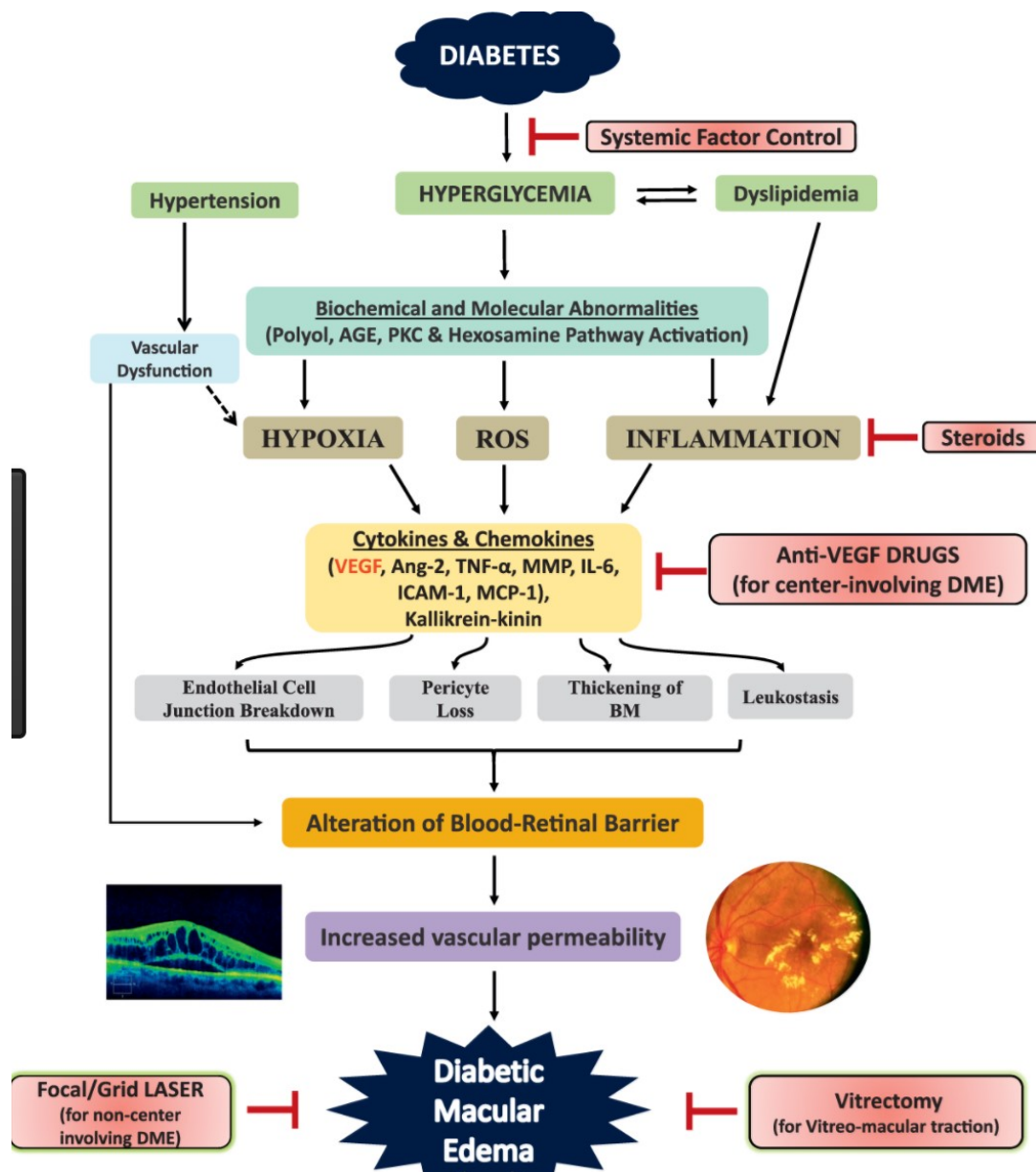


図 4-1 糖尿病黄斑浮腫の発症機序

長期間糖尿病に罹患すると、虚血、酸化ストレス、炎症を介してサイトカインやケモカインが過剰産生され、血管障害を引き起こし、血液網膜関門を破綻させる。その結果、網膜血管透過性が亢進し、血漿成分が黄斑部に貯留して糖尿病黄斑浮腫を発症する (Investigative Ophthalmology & Visual Science December 2016, Vol. 57, 6669-6682 より引用)。

第2節 材料および方法

実験には雄性 SDT fatty ラットおよび SD ラット（日本クレア(株)）を用いた。動物は個別飼育により紫外線照射された水道水および通常飼料（CRF-1；日本チャールズリーバー(株)）を自由摂取させ、12時間の明暗周期（明期：8～20時、暗期：20～8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。

SDT fatty ラットの体重および血液生化学パラメータを8および16週齢において測定した。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、血清中のグルコース、TG、TC、およびHbA1c濃度を自動分析器（Model 7180、(株)日立製作所）により測定した。血清中インスリン濃度はインスリン測定 ELISA キット（(株)森永生化学研究所）を用いて測定した。

硝子体液中の VEGF 濃度測定は、まず動物をイソフルラン麻酔下で安楽殺した後に眼球を摘出し、PBS でよく洗浄後、乾綿で表面の水分をよく拭き取り、27G 針を視神経乳頭付近に穿刺し、硝子体液を回収した。その後 4°C 、 $10,000 \times g$ で5分間遠心し、上清中の VEGF 濃度を測定した。測定には、Rat VEGF Quantikine ELISA Kit (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, U.S.A.) を使用した。

フルオレセイン注射液を 10 mg/kg の用量で動物の尾静脈より静脈内投与し、1時間後に硝子体液および血液を採取した。硝子体液および血液ともに 4°C 、 $10,000 \times g$ で5分間遠心した後、上清中のフルオレセイン濃度を、励起波長 485 nm および蛍光波長 535 nm の条件にて、マイクロプレートリーダー（ARVO-X5 2030, Multilabel Reader; Perkin-Elmer）で測定した。網膜血管透過性の算出は、硝子体液中のフルオレセイン濃度を血中フルオレセイン濃度で除して算出した。

眼球は1%ホルマリン液と1.5%グルタルアルデヒドの混合液で浸漬固定後パラフィン包埋し、薄切切片を作製した。パラフィン切片は脱パラフィン処理後、HE染色を施した。網膜厚は、豊田らの報告(Toyoda et al., 2016)を参考に、視神経乳頭より $500 \mu\text{m}$

の位置における ILM から PL までの厚さを測定した。また内境界膜、GCL、IPL、INL、ONL および PL の厚さを個別に測定した。

次にピオグリタゾンおよびフロリジンによる作用を検討するために、4 週齢の雄性 SD ラットおよび SDT fatty ラットの体重および血液生化学パラメータを指標に、以下の 4 群に群分けし、試験を実施した。群 1 (正常対照) : SD ラットに CRF-1 粉末を給餌し、20%ポリエチレングリコール (PEG) を毎日皮下注射した。群 2 (病態+vehicle) : SDT fatty ラットに CRF-1 粉末を給餌し、20% PEG を毎日皮下注射した。群 3 (病態+ピオグリタゾン) : SDT fatty ラットに、10 mg/kg/day となるように調製したピオグリタゾンを含む CRF-1 粉末を給餌し、20% PEG を毎日皮下注射した。群 4 (病態+フロリジン) : SDT fatty ラットに CRF-1 粉末を給餌し、20% PEG で懸濁したフロリジンを 150 mg/kg/day の用量で毎日皮下注射した。統計学的解析は、第 3 章、第 2 節と同様の方法で行った。

第 3 節 結 果

体重および血液生化学パラメータを表 4-1 にまとめた。8 週齢において、SDT fatty ラットは SD ラットに比べて、肥満、高血糖、高インスリン血症および高脂血症を呈した。16 週齢においても、血糖値は高値を示したが、体重、血中インスリンおよび TG 値は低値を示した。

SDT fatty ラット硝子体液の VEGF 濃度は、8 および 16 週齢において、SD ラットに比べて高値を示した (図 4-2A)。また 16 週齢においてフルオレセインを尾静脈より静脈内投与し、網膜血管から硝子体液中に漏出したフルオレセイン量を測定した結果、SD ラットに比べて SDT fatty ラットでは増加傾向を示し、網膜血管透過性が亢進していることが明らかとなった (図 4-2B)。

動物より眼球を摘出し標本作製して HE 染色して、視神経乳頭より 500 μ m における網膜厚および網膜各層の厚さを測定した (図 4-3A, B, C)。結果、網膜厚は SD ラットに比

べて SDT fatty ラットのほうが厚かった (SD ラット ; $157.5 \pm 19.8 \mu\text{m}$ 、SDT fatty ラット : $218.4 \pm 16.9 \mu\text{m}$)。また層ごとに解析した結果、ILM、GCL、IPL、INL および ONL において肥厚が認められた (図 4-3D)。

次に血糖降下薬であるピオグリタゾン (10 mg/kg/day) およびフロリジン (150 mg/kg/day) を用いて、SDT fatty ラットに 4 週齢から 16 週齢の間に反復投与した際の体重および血液生化学的パラメータに及ぼす影響を検討した (図 4-4)。まず体重に関しては、ピオグリタゾンでは顕著な増加が観察された。血糖値、HbA1c 値、血中 TG 値は両薬剤ともに有意な低下が認められた。Vehicle 群において血中インスリン値は 8 から 16 週齢にかけて低下したのに対し、両薬剤は高値を保持した。高血糖を是正し、インスリンの過剰な分泌を抑制したことで膵臓の β 細胞の機能が保持され、血中インスリン値が低下しなかったと考えられる。これにより、16 週齢においてフロリジン群においても体重低下の抑制が観察されたと考えられる。フロリジン投与により血中 TC 値は 16 週齢において低下し、ピオグリタゾンにおいても低下傾向が観察された。

SDT fatty ラットの網膜厚は SD ラットに比べ厚く、両薬剤処置により肥厚の改善が観察された (図 4-5A)。また SDT fatty ラットの内境界膜から神経節細胞層、内網状層、内顆粒層および外顆粒層においても肥厚が観察され、両薬剤により改善傾向が観察された (図 4-5B)。

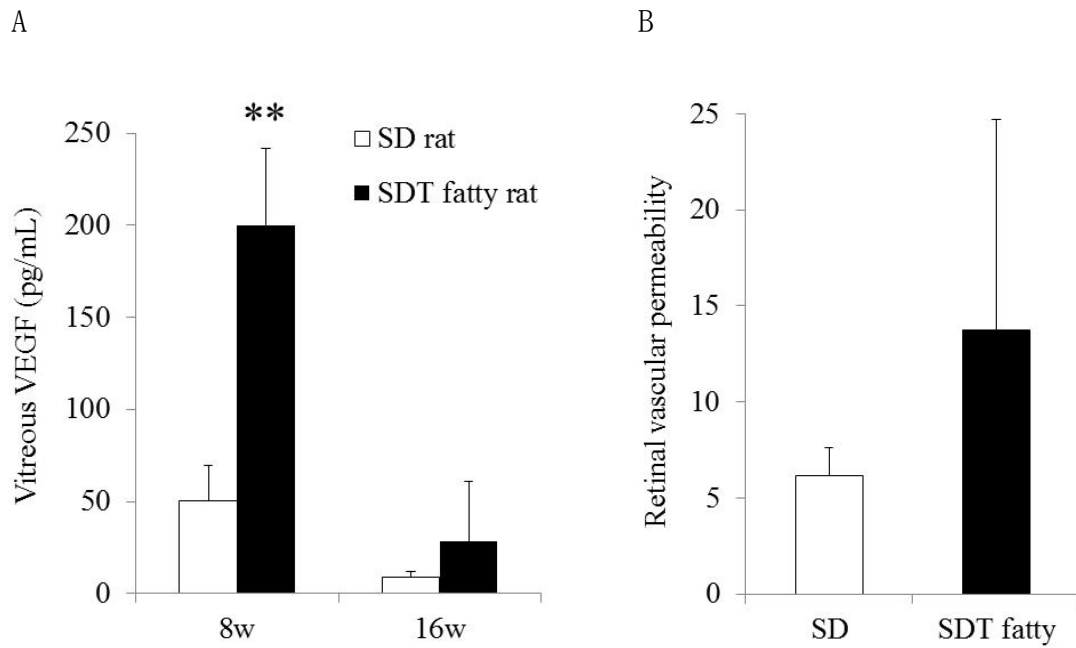


図 4-2 SDT fatty ラットおよびSD ラットの硝子体中 VEGF 濃度と網膜血管透過性
 8 および 16 週齢における硝子体中 VEGF 濃度 (A) (各群 4 例)、16 週齢における網膜
 血管透過性 (B) を示した (各群 8 例)。
 **: $p < 0.01$ (SD ラットと比較)

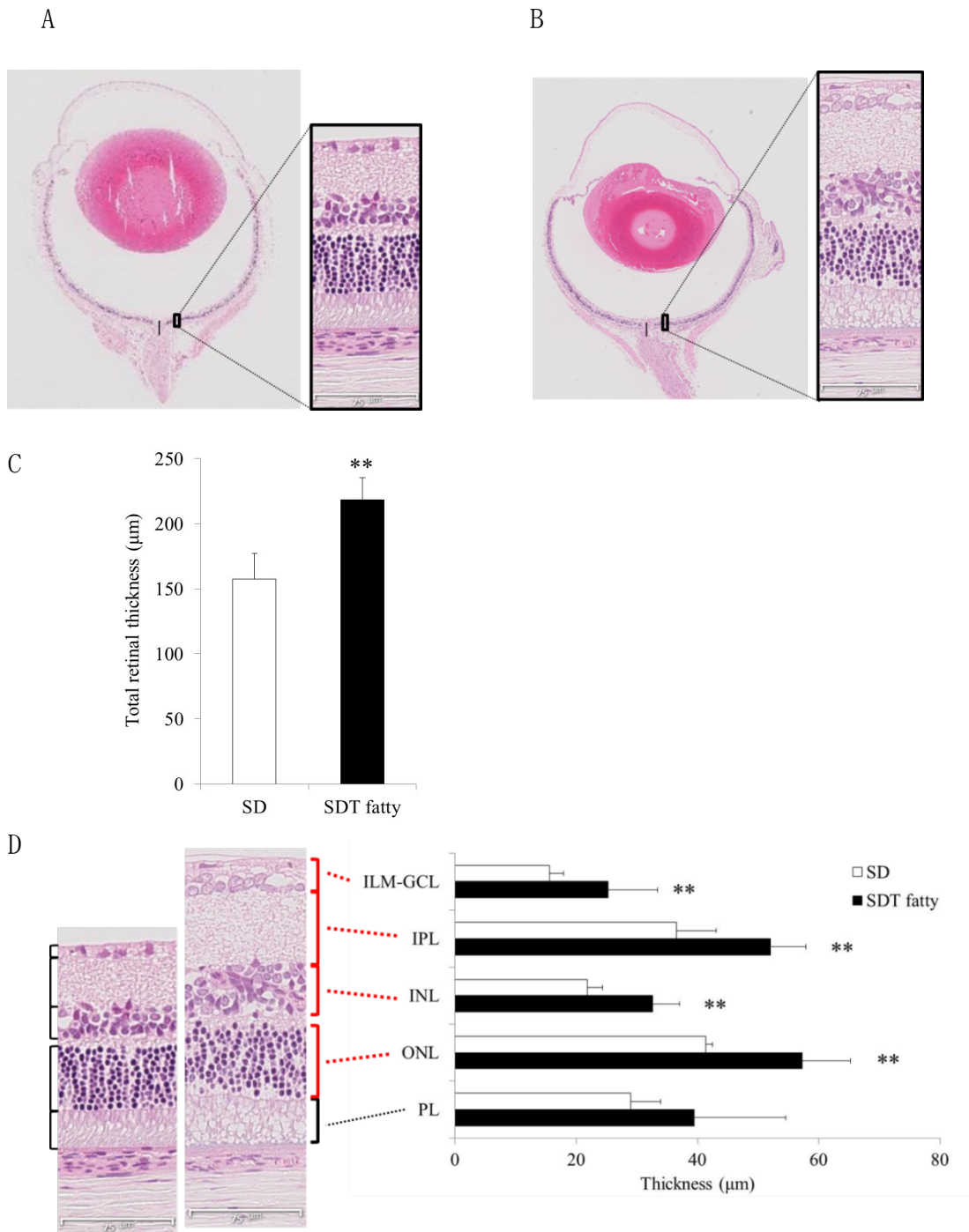


図 4-3 SDT fatty ラットおよびSD ラットの病理学的検査

16 週齢におけるSD ラット (A) とSDT fatty ラット (B) のHE 染色した眼球標本、網膜厚 (C)、ILM-GCL、IPL、INL、ONL、PL の厚さ (D) (各群 4 例)

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ (SD ラットと比較)

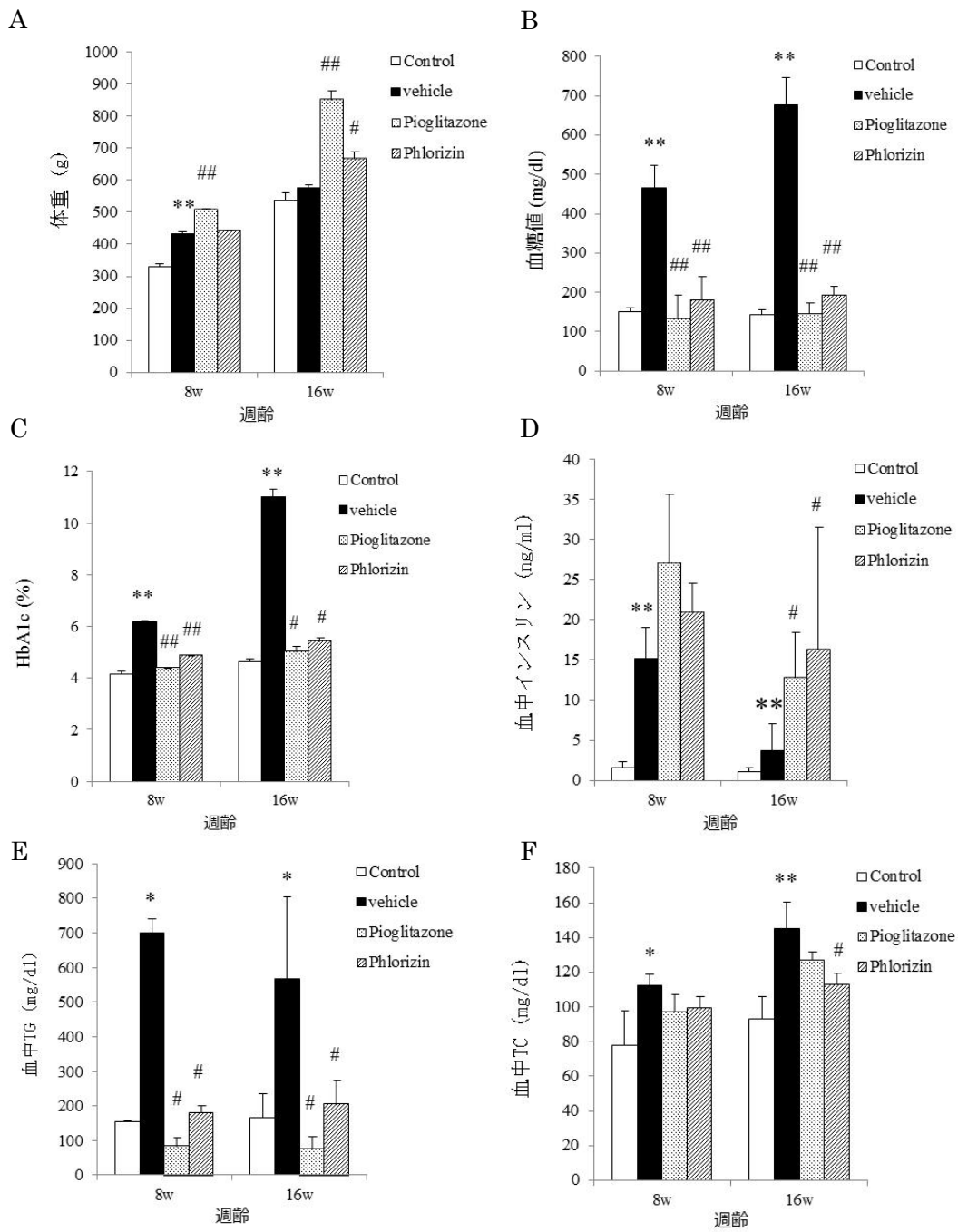


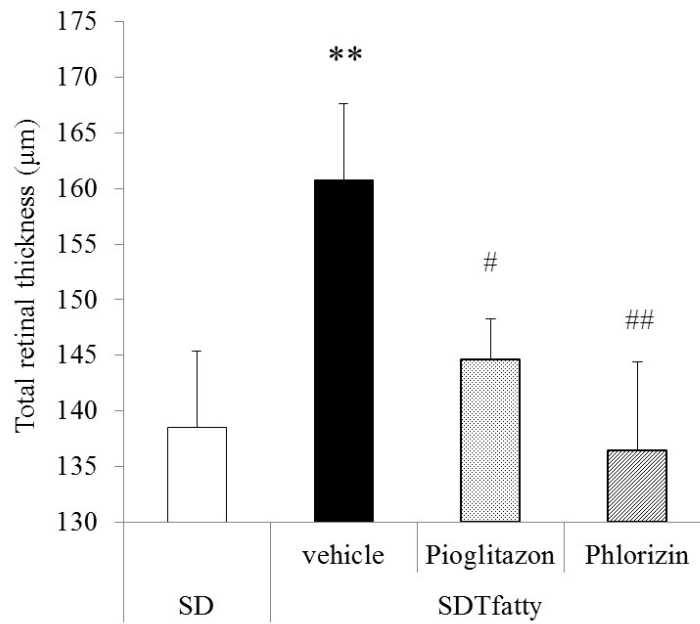
図 4-4 ピオグリタゾンおよびフロリジン投与による SDT fatty ラットの体重および血液生化学パラメータ (各群 4 例)

A : 体重、B ; 血糖値、 C : HbA1c 値、 D : 血中インスリン値、 E : 血中 TG 値、 F ; 血中 TC 値

*: $p < 0.05$ 、 **: $p < 0.01$ (Control 群と比較)

#: $p < 0.05$ 、 ##: $p < 0.01$ (vehicle 群と比較)

A



B

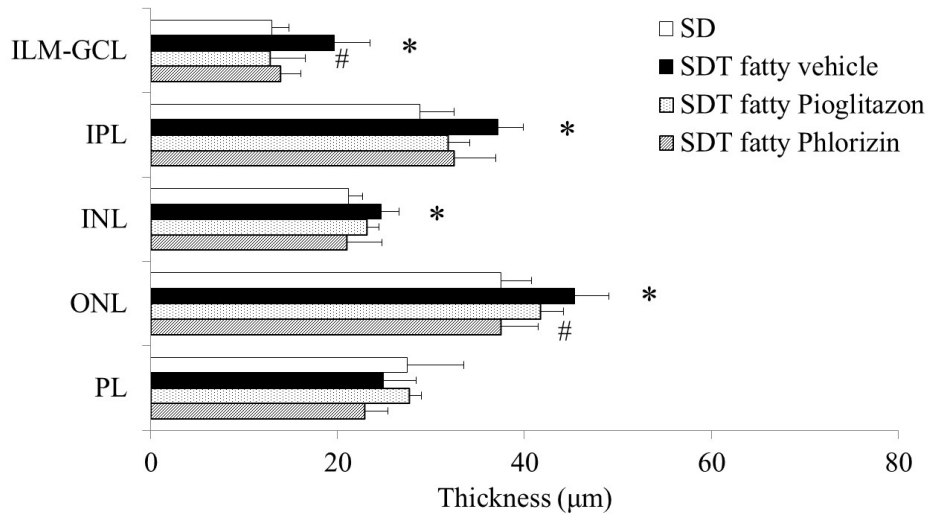


図 4-5 ピオグリタゾンおよびフロリジン投与による SDT fatty ラットの網膜厚評価
16 週齢における SDT fatty ラットの網膜厚 (A) および ILM-GCL、IPL、IN、ONL、PL
の各層の厚さ (B) (各群 4 例)

*: $p < 0.05$ 、**: $p < 0.01$ (SD ラットと比較)

#: $p < 0.05$ 、##: $p < 0.01$ (SDT fatty ラットの vehicle 群と比較)

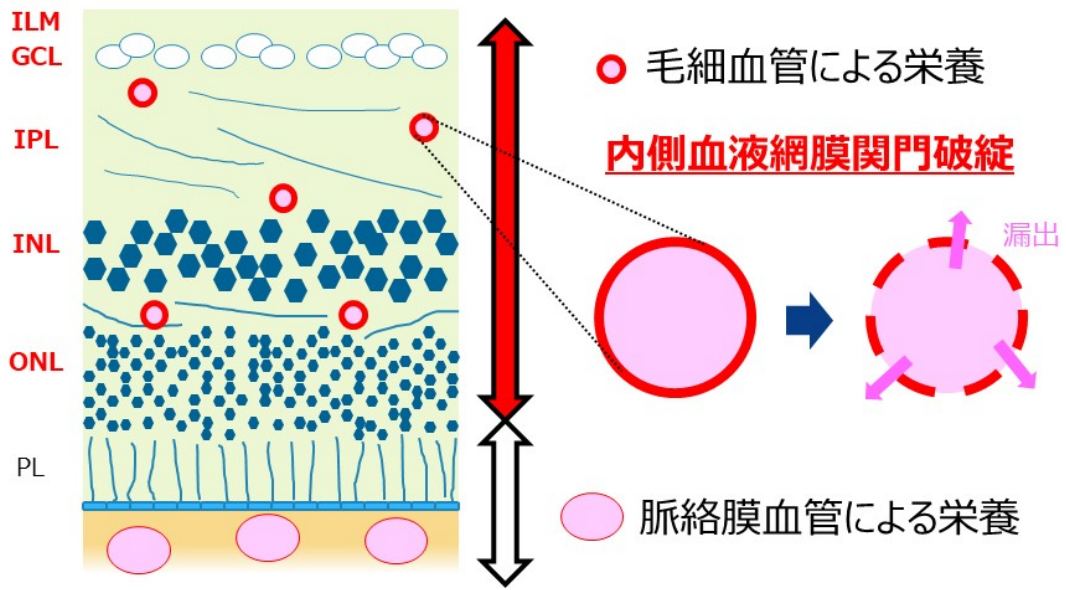


図 4-6 血液網膜関門の破綻

網膜最小血管によって ILM から ONL へ栄養が供給される。通常、血管内から網膜組織へ運ばれる物質は厳密に制限されているが、血液網膜関門が破綻すると、血漿成分が網膜へ漏出し、網膜における浮腫・肥厚が起こる。

表 4-1 雄性 SD ラットおよび SDT fatty ラットの体重および血液生化学パラメータ

	SDラット		SDT fattyラット	
	8週齢	16週齢	8週齢	16週齢
体重 (g)	342.5±8.6	625.8±40.3 ^{##}	390.6±27.4 [*]	510.4±36.7 ^{**} , ^{##}
血糖値 (mg/dl)	148.8±10.5	196.2±14.0 ^{##}	520.8±162.4 ^{**}	741.6±76.9 ^{**} , [#]
血中インスリン値 (ng/ml)	0.73±0.17	0.84±0.17	8.3±5.4 [*]	1.1±0.2 [#]
TG (mg/dl)	154.6±58.1	215.3±72.8	764.0±150.8 ^{**}	330.5±86.7 ^{##}
TC (mg/dl)	77.2±8.9	64.7±4.8 [#]	106.9±7.1 ^{**}	136.5±27.7 ^{**}

8 および 16 週齢の SD ラットおよび SDT fatty ラットの体重、血糖値、血中インスリン値、血中 TG 値、血中 TC 値を示した。表記は平均 ±標準偏差で示した（各群 5 例）。有意差検定は、同一週齢の SD rats に対しては*：p < 0.05、**：p < 0.01 で示し、8 週齢に対する 16 週齢の有意性は #：p < 0.05、##：p < 0.01 で記載した。

第4節 考 察

糖尿病黄斑浮腫の新たな治療法の開発に向けて、動物モデルを用いた検討が行われてきた。ストレプトゾシン誘発モデルは網膜血管透過性亢進モデルとしてよく用いられるが、ヒト患者の病態とは異なり、浮腫に基づく網膜肥厚が観察されない(Zhang et al., 2008)。同様に OLETF ラットや ZDF ラットにおいても、網膜細小血管の変性やペリサイト脱落といった初期の病理変化は認められるが、網膜肥厚は観察されない(Johnson et al., 2013; Lai and Lo, 2013; Lu et al., 2003)。

SDT ラットは非肥満型の2型糖尿病モデル動物として知られ、VEGF 過剰産生、ペリサイト脱落、網膜血管透過性の亢進、網膜肥厚、血管新生、牽引性網膜剥離などが60週齢付近で観察されることが報告されている(Kakehashi et al., 2006; Sasase et al., 2013; Shinohara et al., 2000; Toyoda et al., 2016)。しかしながら、これらの変化の出現には1年以上の期間が必要であるため、加齢性変化の影響は無視できない。実際にSD ラットにおいても角膜や水晶体の混濁、網膜や脈絡膜の萎縮、網膜皺壁あるいは出血等が週齢の増加とともに報告されている(Ban et al., 2008; Tomomi, 2008)。従って、眼病変の発症を早期化することは、加齢による影響を除くことができ、純粋に糖尿病誘発性の眼病変を評価することができるため意義が大きい。なお雌性SDT fatty ラットでは29週齢で網膜肥厚が観察されるが(Katsuda et al., 2015)、16週齢における検討は未実施である。雌性SDT fatty ラットは雄に比べて糖尿病の発症が遅く、血糖値の上昇も緩徐であるため、16週齢では網膜肥厚が観察されないか、観察されたとしても網膜肥厚は軽微であると推察される。

SDT fatty ラットは糖尿病モデル動物として知られている。実際に本研究においても8週齢から高血糖を呈し、硝子体液中のVEGFの過剰蓄積、網膜血管透過性亢進、網膜肥厚が観察されたことから、通常、血管から網膜組織への物質輸送を厳密に制御している血液網膜関門が破綻していると考えられる(図4-6)。一般的に急激な血糖値の上昇

は解糖系とジアシルグリセロール経路を活性化させて PKC を活性化し、VEGF 産生を引き起こすと報告されている (Xia et al., 2007)。また高血糖により酸化ストレスが誘導され、VEGF 産生やマトリックスメタロプロテアーゼが活性化し、網膜血液関門の破綻を引き起こすとの報告もある (El-Remessy et al., 2013)。これらの変化が 2008 年に松井らによって報告された 16 週齢の SDT fatty ラットの ERG におけるピーク遅延 (Matsui et al., 2008) の一つの要因である可能性が考えられる。

次に入手が容易であるフロリジンおよびピオグリタゾンを用いて、血糖コントロールした際の網膜肥厚に対する効果を検討した。両薬剤を投薬することで網膜肥厚が改善したことから、SDT fatty ラットにおける網膜肥厚は遺伝的な変性に基づくものではなく、糖尿病に依存した変化と考えられる。さらに面白いことに、両薬剤間で血糖低下作用に違いは認められなかったが、フロリジンとは異なり、ピオグリタゾンは網膜厚の改善作用が弱かった。ストレプトゾシン処置ラットにおいて、フロリジンは網膜中の VEGF 濃度を正常化するとデニスらが報告していることから (Dennis et al., 2015)、本動物においても網膜および硝子体中 VEGF 濃度は低下し、網膜肥厚を正常化したと推測される。

一般的にチアゾリジン系化合物では、副作用として Na⁺の貯留を介する血漿量増加により浮腫を誘発すると言われており (Horita et al., 2015)、実際の糖尿病黄斑浮腫患者においても浮腫を悪化させると報告されている (Idris et al., 2012; Oshitari et al., 2008)。従って、本試験においてピオグリタゾンが血糖値を概ね正常化させたにも関わらず、網膜肥厚の改善効果が限定的であったのは、その副作用に基づくものかもしれない。有効性のみならず副作用の評価も可能であるという点においても、SDT fatty ラットは人と類似の挙動を示し、有用なモデル動物であると考えられる。

第5節 要約

雄性 SDT fatty ラットは糖尿病モデル動物として知られ、近年、糖尿病性合併症に関する報告が増えつつある。本試験においても、16 週齢において、高血糖、硝子体液中 VEGF 濃度の増加、網膜血管透過性の亢進、網膜特に内境界膜から外顆粒層間における肥厚が確認された。これは血液網膜関門の破綻に由来すると考えられ、以前報告された ERG におけるピーク遅延の要因の一つと推測される。次に糖脂質代謝改善薬であるピオグリタゾンおよびフロリジンを 4 週齢から投与し血糖値をコントロールした結果、網膜の肥厚が抑制された。興味深いことに、ピオグリタゾンはフロリジンよりも血糖降下作用が強く、ほぼ正常化させたにも関わらず、その網膜肥厚の抑制効果はフロリジンよりも弱かった。これはピオグリタゾンの副作用として知られる浮腫が影響したものと推測される。これらの変化は糖尿病黄斑浮腫患者においても報告されており、SDT fatty ラットはヒトと類似の特徴を示す優れた動物モデルあることが明らかとなった。

第5章 総括

以前より高血糖、肥満、高血圧等が多数重積すると、心血管疾患の発症リスクが高まることがよく知られていたが、1998年にWHOより「メタボリック症候群」という名称と診断基準が発表され、全世界の注目を集めた。本邦においても2008年より「特定健診・特定保健指導」いわゆる「メタボ検診」が始まったことで、その認知度は飛躍的に上昇した。国内では1000万人、米国では5000万人程度の有病者が存在するとされ、今後も患者数の増加が懸念されている。メタボリック症候群についての詳細な研究を行うにあたり、様々な動物モデルが報告されてきたが、どのモデルにも一長一短があり、病態解明に非常に時間を要した。本研究で用いたSDT fatty ラットは、早期から高血糖や肥満等のメタボリック症候群様症状を呈することで、様々な合併症を発症することから、近年注目を集めているモデルである。さらに雌雄で所見が異なり、雄では食餌量が極めて過剰なため重篤な高血糖状態となり、インスリン分泌不全とインスリン抵抗性を誘発し、糖尿病性合併症に関連する症状を示すと考えられる。一方、雌では雄に比べて血糖値の上昇が緩徐であることから、高インスリン血症を呈し、組織・細胞における脂肪の蓄積を誘発する。これらの特徴を利用して、肝細胞の脂肪蓄積を特徴とするNAFLD/NASHの解析には雌性SDT fatty ラットを、糖尿病性合併症の一つである糖尿病黄斑浮腫は雄性SDT fatty ラットを用いて検討を行った。

NAFLD/NASHは肝細胞への脂肪沈着を起点として、炎症、線維化を伴い、最終的に肝硬変や肝癌へと進行する疾患であるため、雌性SDT fatty ラットにおいても同様の所見が認められるか検討した結果、8週齢から肝臓における脂肪の蓄積が認められ、NAFLDと類似の所見を示した。さらに32週齢からは、炎症細胞の浸潤や線維化も観察され、NASHモデルとしての特徴を示すことが明らかとなった。本研究では肝硬変や肝癌は観

察されなかったが、おそらくその発症にはさらに時間を要すると考えられるため、今後は40週齢以降の動物を用いて検討したい。

現在、NASH に対する治療薬は無いため、糖脂質代謝を改善する薬剤のドラッグリポジショニングに期待が集まっている。脂質代謝改善薬であるフェノフィブラートは、人において強力なトリグリセリド低下作用とインスリン抵抗性改善作用を併せ持ち、NASH 治療薬としての可能性が期待される。本論文では、病態発症前の6週齢からフェノフィブラートを6週間反復投与した結果、糖代謝パラメータの改善が認められた。さらに血中ALTおよびAST値が低下傾向にあり、肝臓に対する保護作用が示された。また肝臓中脂質含量が低下し、組織学的検査においては脂肪肝の改善が認められた。同様にNASH 治療薬として期待される糖尿病治療薬ピオグリタゾンについては、発症した病態に対する改善作用を検討するために、16週齢から16週間反復投与した。結果、投与4週後より血中トリグリセリド値が用量依存的に低下したが、血糖値や血中インスリン値等に対する改善作用は認められなかった。また肝細胞の脂肪化および肥大、線維化に対して改善作用は認められなかった。本実験では、脂肪肝が明らかに形成された16週齢よりピオグリタゾン投与を開始した結果、NASH 様病変に対する改善効果は観察されなかったが、脂肪肝形成以前の若週齢よりピオグリタゾンを処置すれば、今回とは異なる結果となった可能性が考えられる。

人は外部情報の取得に関して、8割を視覚に頼っているとも言われるが、糖尿病黄斑浮腫はまさにその視覚を脅かす疾患である。現行の治療では一時的に症状は改善しても、再発を繰り返す例が多数報告されており、VEGF 中和抗体やステロイドの長期間にわたる眼内投与が必要となる。その結果、出血や感染症等の副作用リスクが高まるだけでなく、医療費負担も大きな問題となっている。本疾患のメカニズムは高血糖に基づく血管障害を起点として、VEGF の過剰産生、血液網膜関門の破綻および網膜血管の透過性亢進により、血漿成分が蓄積し黄斑部に浮腫を形成する。

網膜症に関しては、ERG のピーク遅延と網膜構造の異常が 2008 年に報告されていたが、この病変の由来が何であるかは明らかにされなかった。その後ストレプトゾシン誘発モデルにおいて、1~2 カ月程度であっても高血糖が持続すれば、網膜血管透過性が亢進することが相次いで報告され (Anand-Apte et al., 2010; Yu et al., 2010)、その詳細なメカニズムも少しずつ明らかになりつつある。このことから、SDT fatty ラットにおいても網膜血管透過性が亢進しているのではないかと仮説を立て、ストレプトゾシン誘発モデルや糖尿病黄斑浮腫患者の遺伝子解析や病理所見を参考にして検討を行った。その結果、硝子体液中 VEGF 濃度の増加、網膜血管透過性の亢進、網膜の肥厚が認められた。特に血管が豊富な内境界膜から外顆粒層間で肥厚が認められ、血液網膜関門の破綻が推測された。一方でストレプトゾシン誘発モデルや ZDF ラット等の既存の動物モデルでは網膜が肥厚せず、むしろ委縮してしまうとの報告もある。これは網膜神経節細胞層でアポトーシスが誘導されること等が報告されているが、異なる結果となった理由は不明である。SDT fatty ラットのベースとなった SDT ラットにおいても、60 週齢付近では網膜が肥厚するとの報告もあることから、おそらく SDT ラットに特徴的な変化であると推察される。

他の動物モデルと異なり、網膜が明らかに肥厚したことから、次に糖脂質代謝改善薬による作用を検討することにした。ナトリウム依存性グルコーストランスポーターである SGLT1 および SGLT2 を阻害するフロリジンは、古くから知られる入手が容易な薬剤で尿糖の排泄を促す作用を持つ。またピオグリタゾン は国内の製薬メーカーが開発したため、薬剤そのものや情報の入手が容易であることから検討に用いた。特にピオグリタゾンについては、強力な血糖降下作用とインスリン抵抗性改善作用が認められる一方で、体重増加や浮腫といった副作用も人で報告されており、これらの変化が本モデル動物で観察されるかについても着目した。結果として、ピオグリタゾンは強力な血糖低下作用と体重増加を示し、人と類似の挙動を示した。またフロリジンよりも血糖低下作用は強

かったにも関わらず、網膜肥厚の改善効果が弱かったのは、おそらく副作用の浮腫の影響であると推察される。薬効に限らず、副作用についても SDT fatty ラットはヒトと類似の特徴を示し、優れた動物モデルあることが明らかとなった。

以上、雌性 SDT fatty ラットは新規の NAFLD/NASH モデルとして、また、雄性 SDT fatty ラットは新規の糖尿病黄斑浮腫モデルとしての特徴を有し、病態解明と新規の薬剤開発に大変有用な動物モデルであることが明らかとなった。今後、多様な薬剤を用いた解析や遺伝子の網羅的解析、さらなる病理学的検査を行うことで、本モデル動物と疾患に対する理解を一層深めたい。

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、杉山稔恵准教授、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

- Adams, L. A., Lymp, J. F., St Sauver, J., Sanderson, S. O., Lindor, K. D., Feldstein, A., and Angulo, P. (2005). The natural history of nonalcoholic fatty liver disease: a population-based cohort study. *Gastroenterology* **129**, 113-21.
- Anand-Apte, B., Ebrahim, Q., Cutler, A., Farage, E., Sugimoto, M., Hollyfield, J., and Folkman, J. (2010). Betacellulin induces increased retinal vascular permeability in mice. *PLoS One* **5**, e13444.
- Arundel, C., and Lewis, J. H. (2007). Drug-induced liver disease in 2006. *Curr Opin Gastroenterol* **23**, 244-54.
- Aubert, J., Begriche, K., Knockaert, L., Robin, M. A., and Fromenty, B. (2011). Increased expression of cytochrome P450 2E1 in nonalcoholic fatty liver disease: mechanisms and pathophysiological role. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* **35**, 630-7.
- Ban, Y., Tomohiro, M., Inagaki, S., and Kuno, H. (2008). Spontaneous ocular abnormalities in Crl:CD(SD) rats. *Anim Eye Res* **27**, 9-15.
- Caro, A. A., and Cederbaum, A. I. (2004). Oxidative stress, toxicology, and pharmacology of CYP2E1. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **44**, 27-42.
- Carpino, G., Renzi, A., Onori, P., and Gaudio, E. (2013). Role of hepatic progenitor cells in nonalcoholic fatty liver disease development: cellular cross-talks and molecular networks. *Int J Mol Sci* **14**, 20112-30.
- Chen, M., Xie, C. G., Gao, H., Zheng, H., Chen, Q., and Fang, J. Q. (2016). Comparative effectiveness of sodium-glucose co-transporter 2 inhibitors for controlling hyperglycaemia in patients with type 2 diabetes: protocol for a systematic review and network meta-analysis. *BMJ Open* **6**, e010252.
- Cheung, N., Mitchell, P., and Wong, T. Y. (2010). Diabetic retinopathy. *Lancet* **376**, 124-36.
- Chibber, R., Ben-Mahmud, B. M., Chibber, S., and Kohner, E. M. (2007). Leukocytes in diabetic retinopathy. *Curr Diabetes Rev* **3**, 3-14.
- Cohen, J. C., Horton, J. D., and Hobbs, H. H. (2011). Human fatty liver disease: old questions and new insights. *Science* **332**, 1519-23.
- Das, A. (2016). Diabetic Retinopathy: Battling the Global Epidemic. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **57**, 6669-6682.
- 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.

- Dennis, M. D., Kimball, S. R., Fort, P. E., and Jefferson, L. S. (2015). Regulated in development and DNA damage 1 is necessary for hyperglycemia-induced vascular endothelial growth factor expression in the retina of diabetic rodents. *J Biol Chem* **290**, 3865-74.
- Distefano, L. N., Garcia-Arumi, J., Martinez-Castillo, V., and Boixadera, A. (2017). Combination of Anti-VEGF and Laser Photocoagulation for Diabetic Macular Edema: A Review. *J Ophthalmol* **2017**, 2407037.
- El-Remessy, A. B., Franklin, T., Ghaley, N., Yang, J., Brands, M. W., Caldwell, R. B., and Behzadian, M. A. (2013). Diabetes-induced superoxide anion and breakdown of the blood-retinal barrier: role of the VEGF/uPAR pathway. *PLoS One* **8**, e71868.
- Forcheron, F., Abdallah, P., Basset, A., del Carmine, P., Haffar, G., and Beylot, M. (2009). Nonalcoholic hepatic steatosis in Zucker diabetic rats: spontaneous evolution and effects of metformin and fenofibrate. *Obesity (Silver Spring)* **17**, 1381-9.
- Gao, Y., Shen, W., Lu, B., Zhang, Q., Hu, Y., and Chen, Y. (2014). Upregulation of hepatic VLDLR via PPARalpha is required for the triglyceride-lowering effect of fenofibrate. *J Lipid Res* **55**, 1622-33.
- Gastaldelli, A., Miyazaki, Y., Mahankali, A., Berria, R., Pettiti, M., Buzzigoli, E., Ferrannini, E., and DeFronzo, R. A. (2006). The effect of pioglitazone on the liver: role of adiponectin. *Diabetes Care* **29**, 2275-81.
- 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.
- Greenfield, V., Cheung, O., and Sanyal, A. J. (2008). Recent advances in nonalcoholic fatty liver disease. *Curr Opin Gastroenterol* **24**, 320-7.
- Hasegawa, G., Fukui, M., Hosoda, H., Asano, M., Harusato, I., Tanaka, M., Shiraishi, E., Senmaru, T., Sakabe, K., Yamasaki, M., Kitawaki, J., Fujinami, A., Ohta, M., Obayashi, H., and Nakamura, N. (2009). Telmisartan, an angiotensin II type 1 receptor blocker, prevents the development of diabetes in male Spontaneously Diabetic Torii rats. *Eur J Pharmacol* **605**, 164-9.
- Horie, Y., Ohshima, S., Sato, W., Suzuki, A., and Watanabe, S. (2006). [Hepatocyte-specific Pten deficient mice]. *Nihon Rinsho* **64**, 1033-42.
- Horita, S., Nakamura, M., Satoh, N., Suzuki, M., and Seki, G. (2015). Thiazolidinediones and Edema: Recent Advances in the Pathogenesis of Thiazolidinediones-Induced Renal Sodium Retention. *PPAR Res* **2015**, 646423.
- Idris, I., Warren, G., and Donnelly, R. (2012). Association between thiazolidinedione

- treatment and risk of macular edema among patients with type 2 diabetes. *Arch Intern Med* **172**, 1005-11.
- Inokuchi, C., Ueda, H., Hamaguchi, T., Miyagawa, J., Shinohara, M., Okamura, H., and Namba, M. (2009). Role of macrophages in the development of pancreatic islet injury in spontaneously diabetic torii rats. *Exp Anim* **58**, 383-94.
- Ishii, Y., Ohta, T., Sasase, T., Morinaga, H., Ueda, N., Hata, T., Kakutani, M., Miyajima, K., Katsuda, Y., Masuyama, T., Shinohara, M., and Matsushita, M. (2010). Pathophysiological analysis of female Spontaneously Diabetic Torii fatty rats. *Exp Anim* **59**, 73-84.
- Itoh, M., Suganami, T., Nakagawa, N., Tanaka, M., Yamamoto, Y., Kamei, Y., Terai, S., Sakaida, I., and Ogawa, Y. (2011). Melanocortin 4 receptor-deficient mice as a novel mouse model of nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Pathol* **179**, 2454-63.
- Johnson, L. E., Larsen, M., and Perez, M. T. (2013). Retinal adaptation to changing glycemic levels in a rat model of type 2 diabetes. *PLoS One* **8**, e55456.
- Takehashi, A., Saito, Y., Mori, K., Sugi, N., Ono, R., Yamagami, H., Shinohara, M., Tamemoto, H., Ishikawa, S. E., Kawakami, M., and Kanazawa, Y. (2006). Characteristics of diabetic retinopathy in SDT rats. *Diabetes Metab Res Rev* **22**, 455-61.
- Katsuda, Y., Sasase, T., Tadaki, H., Mera, Y., Motohashi, Y., Kemmochi, Y., Toyoda, K., Kakimoto, K., Kume, S., and Ohta, T. (2015). Contribution of hyperglycemia on diabetic complications in obese type 2 diabetic SDT fatty rats: effects of SGLT inhibitor phlorizin. *Exp Anim* **64**, 161-9.
- Kawaguchi, K., Sakaida, I., Tsuchiya, M., Omori, K., Takami, T., and Okita, K. (2004). Pioglitazone prevents hepatic steatosis, fibrosis, and enzyme-altered lesions in rat liver cirrhosis induced by a choline-deficient L-amino acid-defined diet. *Biochem Biophys Res Commun* **315**, 187-95.
- Kim, J. H., Kim, J. H., Lee, Y. M., Ahn, E. M., Kim, K. W., and Yu, Y. S. (2009). Decursin inhibits VEGF-mediated inner blood-retinal barrier breakdown by suppression of VEGFR-2 activation. *J Cereb Blood Flow Metab* **29**, 1559-67.
- Lai, A. K., and Lo, A. C. (2013). Animal models of diabetic retinopathy: summary and comparison. *J Diabetes Res* **2013**, 106594.
- Lu, Z. Y., Bhutto, I. A., and Amemiya, T. (2003). Retinal changes in Otsuka long-evans Tokushima Fatty rats (spontaneously diabetic rat)--possibility of a new experimental model for diabetic retinopathy. *Jpn J Ophthalmol* **47**, 28-35.
- 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.
- Masuyama, T., Komeda, K., Hara, A., Noda, M., Shinohara, M., Oikawa, T., Kanazawa, Y., and Taniguchi, K. (2004). Chronological characterization of diabetes development in male Spontaneously Diabetic Torii rats. *Biochem Biophys Res Commun* **314**, 870-7.
- Matsui, K., Ohta, T., Oda, T., Sasase, T., Ueda, N., Miyajima, K., Masuyama, T., Shinohara, M., and Matsushita, M. (2008). Diabetes-associated complications in Spontaneously Diabetic Torii fatty rats. *Exp Anim* **57**, 111-21.
- Murakami, T., Felinski, E. A., and Antonetti, D. A. (2009). Occludin phosphorylation and ubiquitination regulate tight junction trafficking and vascular endothelial growth factor-induced permeability. *J Biol Chem* **284**, 21036-46.
- 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., and Cassader, M. (2009). Recent insights into hepatic lipid metabolism in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Prog Lipid Res* **48**, 1-26.
- Nagasawa, T., Inada, Y., Nakano, S., Tamura, T., Takahashi, T., Maruyama, K., Yamazaki, Y., Kuroda, J., and Shibata, N. (2006). Effects of bezafibrate, PPAR pan-agonist, and GW501516, PPARdelta agonist, on development of steatohepatitis in mice fed a methionine- and choline-deficient diet. *Eur J Pharmacol* **536**, 182-91.
- Neuschwander-Tetri, B. A. (2005). Nonalcoholic steatohepatitis and the metabolic syndrome. *Am J Med Sci* **330**, 326-35.
- 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.
- Oshitari, T., Asami, N., Watanabe, M., Kumagai, K., and Mitamura, Y. (2008). Severe macular edema induced by pioglitazone in a patient with diabetic retinopathy: a case study. *Vasc Health Risk Manag* **4**, 1137-40.
- Rolla, S., Alchera, E., Imarisio, C., Bardina, V., Valente, G., Cappello, P., Mombello, C., Follenzi, A., Novelli, F., and Carini, R. (2016). The balance between IL-17 and IL-22 produced by liver-infiltrating T-helper cells critically controls NASH development in mice. *Clin Sci (Lond)* **130**, 193-203.
- Rosenstengel, S., Stoeppler, S., Bahde, R., Spiegel, H. U., and Palmes, D. (2011). Type of steatosis influences microcirculation and fibrogenesis in different rat strains. *J Invest Surg* **24**, 273-82.
- 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., Robuck, P. R., and Nash, C. R. N. (2010). Pioglitazone, vitamin E, or placebo for nonalcoholic steatohepatitis. *N Engl J Med* **362**, 1675-85.
- Sasase, T., Ohta, T., Masuyama, T., Yokoi, N., Kakehashi, A., and Shinohara, M. (2013). The spontaneously diabetic torii rat: an animal model of nonobese type 2 diabetes with severe diabetic complications. *J Diabetes Res* **2013**, 976209.
- Schwenger, K. J., and Allard, J. P. (2014). Clinical approaches to non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* **20**, 1712-23.
- Shinohara, M., Masuyama, T., Shoda, T., Takahashi, T., Katsuda, Y., Komeda, K., Kuroki, M., Kakehashi, A., and Kanazawa, Y. (2000). A new spontaneously diabetic non-obese Torii rat strain with severe ocular complications. *Int J Exp Diabetes Res* **1**, 89-100.
- Silverman, J. F., Pories, W. J., and Caro, J. F. (1989). Liver pathology in diabetes mellitus and morbid obesity. Clinical, pathological, and biochemical considerations. *Pathol Annu* **24 Pt 1**, 275-302.
- Singer, M. A., Kermany, D. S., Waters, J., Jansen, M. E., and Tyler, L. (2016). Diabetic macular edema: it is more than just VEGF. *F1000Res* **5**.
- Song, Y. S., Fang, C. H., So, B. I., Park, J. Y., Lee, Y., Shin, J. H., Jun, D. W., Kim, H., and Kim, K. S. (2013). Time course of the development of nonalcoholic Fatty liver disease in the Otsuka long-evans Tokushima Fatty rat. *Gastroenterol Res Pract* **2013**, 342648.
- Takahashi, Y., Soejima, Y., and Fukusato, T. (2012). Animal models of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *World J Gastroenterol* **18**, 2300-8.
- Takamoto, I., and Kadowaki, T. (2011). Treatment of diabetes mellitus with oral hypoglycemic agents. *Nihon Rinsho* **69**, 563-72.
- Tenenbaum, A., Motro, M., Fisman, E. Z., Schwammenthal, E., Adler, Y., Goldenberg, I., Leor, J., Boyko, V., Mandelzweig, L., and Behar, S. (2004). Peroxisome proliferator-activated receptor ligand bezafibrate for prevention of type 2 diabetes mellitus in patients with coronary artery disease. *Circulation* **109**, 2197-202.
- The Diabetes Control and Complications Trial Research Group (1996). The absence of a glycemic threshold for the development of long-term complications: the perspective of the Diabetes Control and Complications Trial. *Diabetes* **45**, 1289-98.
- Tilg, H., and Moschen, A. R. (2010). Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis. *Hepatology* **52**, 1836-46.
- Tomomi, M. (2008). Spontaneous hemorrhagic findings in fundus of sprague-dawley and fischer rats. *Anim Eye Res* **27**, 31-37.
- Toyoda, F., Tanaka, Y., Shimmura, M., Kinoshita, N., Takano, H., and Kakehashi, A. (2016).

- Diabetic Retinal and Choroidal Edema in SDT Rats. *J Diabetes Res* **2016**, 2345141.
- Watanabe, S., Yaginuma, R., Ikejima, K., and Miyazaki, A. (2008). Liver diseases and metabolic syndrome. *J Gastroenterol* **43**, 509-18.
- Xia, L., Wang, H., Munk, S., Frecker, H., Goldberg, H. J., Fantus, I. G., and Whiteside, C. I. (2007). Reactive oxygen species, PKC-beta1, and PKC-zeta mediate high-glucose-induced vascular endothelial growth factor expression in mesangial cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **293**, E1280-8.
- Xu, J., Kulkarni, S. R., Donepudi, A. C., More, V. R., and Slitt, A. L. (2012). Enhanced Nrf2 activity worsens insulin resistance, impairs lipid accumulation in adipose tissue, and increases hepatic steatosis in leptin-deficient mice. *Diabetes* **61**, 3208-18.
- Yang, G., Li, L., Tang, Y., and Boden, G. (2006). Short-term pioglitazone treatment prevents free fatty acid-induced hepatic insulin resistance in normal rats: possible role of the resistin and adiponectin. *Biochem Biophys Res Commun* **339**, 1190-6.
- Yau, J. W., Rogers, S. L., Kawasaki, R., Lamoureux, E. L., Kowalski, J. W., Bek, T., Chen, S. J., Dekker, J. M., Fletcher, A., Grauslund, J., Haffner, S., Hamman, R. F., Ikram, M. K., Kayama, T., Klein, B. E., Klein, R., Krishniah, S., Mayurasakorn, K., O'Hare, J. P., Orchard, T. J., Porta, M., Rema, M., Roy, M. S., Sharma, T., Shaw, J., Taylor, H., Tielsch, J. M., Varma, R., Wang, J. J., Wang, N., West, S., Xu, L., Yasuda, M., Zhang, X., Mitchell, P., Wong, T. Y., and Meta-Analysis for Eye Disease Study, G. (2012). Global prevalence and major risk factors of diabetic retinopathy. *Diabetes Care* **35**, 556-64.
- Yu, H., Chen, L., and Jiang, J. (2010). Administration of pigment epithelium-derived factor delivered by adeno-associated virus inhibits blood-retinal barrier breakdown in diabetic rats. *Mol Vis* **16**, 2384-94.
- Zhang, J., Wu, Y., Jin, Y., Ji, F., Sinclair, S. H., Luo, Y., Xu, G., Lu, L., Dai, W., Yanoff, M., Li, W., and Xu, G. T. (2008). Intravitreal injection of erythropoietin protects both retinal vascular and neuronal cells in early diabetes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **49**, 732-42.
- 寺井崇二, 松本俊彦, 坂井田功 (2007). 非アルコール性脂肪性肝疾患, 肝炎に対する薬物療法について. *日本薬理学雑誌* **129**, 271-275.
- 松浦基博 (1995). エンドトキシンとサイトカイン. *日本細菌学雑誌* **50**, 435-449.
- 西原利治, 小野正文, 大西三朗 (2006). インスリン抵抗性と NASH. *日本内科学会雑誌* **95**, 46-50.
- 池嶋健一 (2016). NAFLD の複雑な病因と病態. *日本内科学会雑誌* **105**, 15-24.
- 日本肝臓学会 (2010). NASH・NAFLD の診療ガイド. 文光堂, 26-31.
- 鈴木祥菜, 佐藤陽子, 梅垣敬三, 千葉剛 (2016). 高脂肪・高コレステロール食負荷による肝臓薬物代謝酵素への影響. *Yakugaku Zasshi* **136**, 1297-1305.

Summary

The prevalence of diabetes, obesity and metabolic syndrome is dramatically increasing in Western and developing countries. These metabolic diseases feature the visceral fat accumulation and the insulin resistance, which cause nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) in the liver. Furthermore, some NAFLD patients develop nonalcoholic steatohepatitis (NASH) featuring inflammation and fibrosis, cirrhosis and finally life-threatening hepatocellular carcinoma (Greenfield et al., 2008).

In the eye, diabetic macular edema (DME) is a frequent finding associated with diabetic retinopathy and is a major factor contributing to visual disabilities. Many years of diabetes can cause damage to retinal blood vessels via some cytokines and chemokines including vascular endothelial growth factor (VEGF), retinal hyper-permeability and retinal thickening (Das, 2016). Although an intravitreal injection of anti-VEGF drugs has become standard of care for DME in the past 10 years, many patients must continue treatment, and 25% of DME patients do not respond to anti-VEGF treatment.

To understand the complicated mechanism of NAFLD/NASH and DME, animal models can offer a source of important information. However, there are few animal models similar to human patients. Spontaneously diabetic torii Leprfa (SDT fatty) rat, established by introducing the *fa* allele of the Zucker fatty rat into SDT rat genome, is a new model of obese type 2 diabetes (Masuyama et al., 2004; Shinohara et al., 2000). The animals exhibit hyperphagia that leads to obesity associated with hyperglycemia, hyperinsulinemia, and hyperlipidemia at a young age compared with SDT rats. In the present study, we investigated whether SDT fatty rats had the

biochemical parameters, and genetical and histological features as the NASH/NAFLD and DME models.

[NASH/NAFLD]

The female SDT fatty rats showed significantly increased body weight, serum glucose, triglyceride (TG), and total cholesterol (TC) levels compared with SD rats. The serum aspartate transaminase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) levels in SDT fatty rats were significantly elevated at 8 weeks of age. Hepatic TG and free fatty acid contents were marked in SDT fatty rats from 8 to 32 weeks of age.

The expression of lipogenic genes, such as sterol regulatory element binding protein (SREBP)-1c, fatty acid synthesis (FAS), and acetyl-CoA carboxylase (ACC) increased in SDT fatty rats at 8 weeks of age. The microsomal triglyceride transfer protein (MTP) mRNA levels, which were related to secretion of very low-density lipoprotein (VLDL), were decreased from 8 to 40 weeks of age. The mRNA levels of fibrotic genes, namely collagen type 1 and α -smooth muscle actin (SMA), tended to increase in SDT fatty rats compared with SD rats at 16 and 24 weeks of age.

The liver histopathology was examined by Hematoxylin and eosin (HE) staining. Severe changes (3+) of the liver, including fatty and vacuolar changes, were observed in SDT fatty rats at 8 weeks of age. Moderate changes (1+–2+) of hypertrophy and very slight or slight changes in inflammation were also observed at 8 weeks of age. Moreover, moderate changes (2+) indicating fibrosis were observed at 32 weeks of age. Fibrosis was also confirmed by Sirius Red staining. Consistent with the HE staining, similar findings of fibrosis were observed in SDT fatty rats and no changes were observed in SD rats. Furthermore, ED1 and

toluidin blue (TB) staining indicated increased macrophage and mast cell counts. Thus, blood parameters, gene analysis and histopathological analysis demonstrated the female SDT fatty rats were novel NAFLD/NASH animal models.

We investigated pharmacological effects of fenofibrate on glucose and lipid metabolism in female SDT fatty rats. SDT fatty rats were given a regular powder diet or diets containing fenofibrate (30, 100 mg/kg) for 6 weeks, from 6 to 12 weeks of age. Fenofibrate treatment significantly reduced a blood glucose level at a dose of 100 mg/kg and tended to decrease hemoglobin A1c levels dose-dependently. Fenofibrate did not affect blood lipid levels, but blood ALT and AST concentrations decreased. Lipid contents in liver in fenofibrate treated group were significantly reduced and fenofibrate also ameliorated fatty liver in SDT fatty rats.

To determine whether pioglitazone had the therapeutic effect on the female SDT fatty rats, the drug was given at 3, 10 mg/kg for 16 weeks, from 16 to 32 weeks of age. Although blood TG levels were decreased from 20 weeks of age, blood glucose and insulin levels did not improve. Pathological examination demonstrated pioglitazone could not improve fat accumulation in liver followed by inflammation and fibrosis.

[DME]

The male SDT fatty rats are known as severe diabetes animal models. In this study, the SDT fatty rats exhibited hyperglycemia, VEGF increase in vitreous humor, retinal vascular hyper-permeability and retinal thickening at 16 weeks of age. In particular, the layers between the retinal internal limiting membrane and the outer nuclear layer were thickened. These results imply the breakdown of the

blood-retinal-barrier, which may be associated with the peak latencies of oscillatory potentials in electroretinograms (ERGs) at 16 weeks (Matsui et al., 2008).

We evaluated the effects of phlorizin and pioglitazone known as glucose-lowering drugs on retinal lesions. Phlorizin treatment from 4 to 16 weeks of age improved hyperglycemia and normalized retinal thickness; however, the effect of pioglitazone on retinal thickness was not strong despite the normalization of hyperglycemia. Because edema, which is likely caused by renal sodium retention, is well recognized as a side effect of pioglitazone (Horita et al., 2015), the phenomenon that pioglitazone could not normalize the retinal thickness of SDT fatty rats despite plasma glucose normalization may have been derived from the deterioration of retinal edema similar to human DME patients.

In summary, we confirmed that the female SDT fatty rats are suitable preclinical models for testing new therapeutic approaches in NASH/NAFLD and the male SDT fatty rats in DME.