

筑波大学

博士（医学）学位論文

酸化ストレスと **LXR** アゴニストに高脂肪食を
併用することで **NASH** 動物モデルにおいて
肝細胞癌が誘発される

2021

筑波大学大学院博士課程 人間総合科学研究科

清水 義夫

目次

1. 緒言

- 1-1. NASH とその臨床的課題
- 1-2. 既存の NASH モデル動物
- 1-3. 先行研究における NASH モデルの特徴
- 1-4. LXR のシグナル伝達系
- 1-5. 抗高脂血症薬 T0901317 の構造, 作用機序
- 1-6. 本実験で明らかにすること

2. 方法

- 2-1. 実験に用いた動物
- 2-2. 組織学的評価
- 2-3. 血液生化学的評価
- 2-4. インスリン抵抗性の評価
- 2-5. タンパク質発現解析
- 2-6. リアルタイム PCR 法による遺伝子発現解析
- 2-7. DNA マイクロアレイ 法による遺伝子発現解析
- 2-8. 統計学的解析

3. 結果

- 3-1. 肝体重比及び体重変化
- 3-2. 肝臓における腫瘍形成
- 3-3. 背景肝における NASH 病理評価所見
- 3-4. 脂質代謝異常とインスリン抵抗性
- 3-5. 腫瘍組織における病理評価所見
- 3-6. 腫瘍形成に関わるタンパク質発現解析
- 3-7. マイクロアレイによる腫瘍組織及び非腫瘍組織の網羅的解析
- 3-8. リアルタイム PCR による NASH 発癌に関連する遺伝子発現解析

4. 考察
5. 総括
6. 結論
7. 謝辞
8. 利益相反
9. 引用文献

略語集

本文中及び図中で使用した略語は以下の通りである.

| | |
|--------|--|
| 4HNE | 4-hydroxy-2-nonenal |
| ABCA1 | adenosine triphosphate binding cassette transporter A1 |
| ABCG1 | adenosine triphosphate binding cassette transporter G1 |
| ABCG5 | adenosine triphosphate binding cassette transporter G5 |
| ABCG8 | adenosine triphosphate binding cassette transporter G8 |
| AF1 | activation function-1 |
| AFP | α -fetoprotein |
| AST | aspartate aminotransferase |
| AUC | area under the curve |
| CAR | constitutive androstane receptor |
| cDNA | complementary deoxyribonucleic acid |
| CYP7a1 | cytochrome P7a1 |
| DBD | deoxyribo nucleic acid binding domein |
| DEN | diethylnitrosoamine |
| DMSO | dimethyl sulfoxide |
| ERK | extracellularsignal regulated kinase |
| Fam83e | family with sequence similarity 83 member E |

| | |
|---------|---|
| FASN | fatty acid synthase |
| Fgr | Gardner-Rasheed feline sarcoma viral (v-fgr) oncogene homolog |
| FXR | farnesoid X receptor |
| GAPDH | glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase |
| HE | hematoxylin eosin |
| HCC | hepatocellular carcinoma |
| HDL | high density lipoprotein |
| HF | high fat |
| HOMA-R | homeostasis model assessment insulin resistance |
| IPA | ingenuity pathway analysis |
| ITT | insulin tolerance test |
| LBD | ligand binding domein |
| Lpl | lipoprotein lipase |
| LXR | liver X receptor |
| LXRE | liver X receptor response element |
| MC4R | melanocortin 4 receptor |
| MCD | methionine and choline deficient |
| MT | masson trichrome |
| NASH | nonalcoholic steatohepatitis |
| NAFLD | nonalcoholic fatty liver disease |
| p38MAPK | p38 mitogen-activated protein kinase |
| PBS | phosphate buffered saline |
| PCR | polymerase chain reaction |
| GSK-3 | glycogen synthase kinase 3 |
| PTEN | phosphatase and tensin homolog deleted from chromosome 10 |
| PXR | pregnane X receptor |
| RNA | ribonucleic acid |
| ROR | retinoic acid receptor |

| | |
|--------|--|
| RXR | retinoid X receptor |
| Src | proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src |
| SREBPs | sterol regulatory element binding proteins |
| STZ | streptozotosin |
| TG | triglyceride |
| Ucp2 | uncoupling protein 2 |
| WD | western diet |

1. 緒言

1-1. NASH とその臨床的課題

本研究でのテーマである NASH は、非アルコール性脂肪肝炎 (Nonalcoholic steatohepatitis) の略語であり、アルコール性肝炎と類似の病態を示すが、アルコール摂取を伴わずに発症する。肝臓内に大滴性脂肪を有し、肝炎を伴わない Nonalcoholic fatty liver (NAFL)を含めたより包括的な疾患である非アルコール性脂肪性肝疾患 (Nonalcoholic fatty liver disease : NAFLD) の 25%程度を占める疾患である。また、NASH は経過とともに、25%程度が肝硬変となり、さらに 10 年で 25%程度が肝細胞癌 (Hepatocellular carcinoma : HCC) を発症する進行性の疾患である。¹ NAFLD / NASH は肥満を基盤として発症するメタボリックシンドロームの肝表現型として考えられており、食生活の欧米化と運動不足による肥満症の患者数に伴い、NAFLD / NASH の患者も増加の一途を辿っている。² 肥満症では、肥満の進行に伴い全身性の慢性炎症が誘導されることで、全身性に代謝障害や炎症性変化が生じることで、メタボリックシンドロームが発症する。メタボリックシンドロームの概念としては、内臓脂肪型の肥満を背景として耐糖能異常、脂質代謝異常や動脈硬化に伴う血圧上昇などの病態が並行して進展することであり、糖尿病、高脂血症や高血圧症などの生活習慣病を発症するという病態を含んでいる。診断や治療に際しては、肥満を基礎として全身に発症する疾患である為、糖尿病や脂質代謝異常、高血圧症の各疾患に個々に対応するだけではなく、内臓脂肪肥満に伴う複合的な疾患として捉えることが重要とされている。メタボリックシンドロームの肝病変である NASFLD / NASH についても同様に扱い、検査や診断することの重要性が高まっている。2005 年に「メタボリックシンドロームの定義と診断基準」が発表され、その中で NASH を含めた NAFLD が成人の 20~40%が罹患する国民病として定義されている。さらに、NAFLD はメタボリックシンドロームが病因であるとともに、代謝の中心的な役割を果たす肝臓機能の障害によりメタボリックシンドローム自体を増悪させることで悪循環をきたす要因となっている。

これまで肝細胞癌における原因疾患は、ウイルス性慢性肝炎によるものであった。ウイルス性肝炎は直接型抗ウイルス薬などの肝炎治療が進展している昨今の状況下で、本邦では今後、NASH が肝硬変や HCC の主な病因になると考えられている。これまで肝細胞癌の原因疾患としてはウイルス性慢性肝炎が 85%程度を占めてきたが、近年ではウイルス性慢性肝炎に起因しない非 B 型非 C 型 HCC の割合が増えており、その増加は、NASH を原因とする HCC の増加に起因している。³ 実際に NASH に関連する HCC 症例の割合も指数関数的に増加しており、今後本邦を含めた先進国では NASH が HCC の主要な病因となることも予想される。NASH に起因する肝硬変から発癌率については、5 年で約 10-15%と言われており、そのリスク因子として重要なものが、高齢男性、線維化の進展やインスリン抵抗性と言われている。^{4,5} しかし、NASH から HCC 発癌に至るメカニズムについては不明な点が多く、その解明が急務となっている。^{6,7}

当研究室では過去に、肝臓が様々なストレスを受けることでどのような障害を受けるかについての詳細なメカニズム解析を行ってきた。また、肝臓へのストレスをどのように防ぎ、改善するにはどのような方法があるかについての研究を行ってきた。特に、血小板による独自の肝臓に対する作用を解明し、難治性肝疾患の治療に応用した研究では多くの新しい知見をもたらすこととなった。具体的な研究内容としては、大量切除肝においては肝再生促進作用があること、劇症肝炎モデルにおいて肝細胞増殖効果があることや慢性肝炎モデルにおいて肝線維化抑制作用があることについてである。^{8,9,10} 肝臓が受けるストレスについて種々の研究を行ってきた本研究室であるが、これからの臨床現場において重要視すべきことは、高エネルギー摂取や運動習慣の低下が招く代謝ストレスであると認識した。これまでの肝臓基礎実験における結果から、近年臨床現場でも問題になってきている NASH に対しての研究を開始するに至った。

1-2. 既存の NASH モデル動物

これまでの NAFLD / NASH 研究において様々なモデル動物が報告され、ヒトにおける NAFLD / NASH の病態や発症機序の研究が行われてきた。しかしながら、現在までに NASH 発症や肝細胞癌の発癌に至るメカニズムの詳細は解明されていない。その原因として、NASH の病態機序の解明や薬物治療のために使用される動物モデルがヒト NASH と大きく異なることが挙げられる。そのため、NASH 研究のための理想的な動物モデルの条件としては、ヒト NASH における臨床経過と同じように、肥満やインスリン抵抗性を背景として、脂肪肝炎、肝線維化から肝硬変や HCC を発症する動物モデルである。さらに NASH の診断基準として重要な病理学的所見が的確に表現されていることが大切である。しかしながら、これまでに用いられてきた高脂肪および高糖質成分飼料の給餌モデル動物では、肥満やインスリン抵抗性を欠いているものや肝線維化や肝細胞癌に至らないものが多かった。例えば、NASH 研究で汎用されるメチオニン/コリン欠乏食 (MCD) の給餌モデルでは、体重減少を示し、メタボリックシンドロームを基礎とするヒト NASH の病態とは大きくかけ離れている。また、CDAA 食の給餌モデルでは線維化や炎症なども伴うもののインスリン抵抗性を示さない欠点がある。(表 1)

表 1: これまでの NASH モデル動物とその特徴

| NASHモデル | 作成方法 | 脂肪変性 | 炎症細胞浸潤 | 線維化 | インスリン抵抗性 | 特記事項 |
|----------------|-----------|------|--------|-----|----------|--------|
| MCDモデル | 給餌 | ○ | ○ | ○ | ○ | 体重減少 |
| CDAAモデル | 給餌 | ○ | ○ | ○ | × | |
| HF-CC14モデル | 反復投与 | ○ | ○ | △ | △ | |
| Ob/obモデル | トランスジェニック | ○ | × | × | ○ | |
| Db/dbモデル | トランスジェニック | ○ | × | × | ○ | |
| PTENノックアウトモデル | トランスジェニック | △ | ○ | ○ | × | 体重減少 |
| DEN誘発モデル | 反復投与 | × | ○ | ○ | × | 発癌物質投与 |
| HF-T09-CC14モデル | 反復投与 | ○ | ○ | ○ | ○ | |

また、NASH 肝発癌研究における理想的なモデル動物の条件としては、NASH の病態を模倣するものであって、比較的短期間に腫瘍形成がされるという点である。また、早期 HCC については、熟練した病理医でも難しいという点から病理診断が適切にされていることが重要である。表 2 は既存の NASH 肝発癌モデル動物であり、肝臓に腫瘍を呈するモデ

ル動物となっている。既存のモデル動物では、病態を適切に模倣されていないことや、モデル作成に長期間を要する点や適切な病理評価がなされていない、などの問題点がある(表 2)。具体的には、ストレプトゾシン (streptozotosin : STZ) を 4 週齢において投与し、その後高脂肪食を投与する STZ-HF モデルでは脂肪肝炎と線維化を伴うが、インスリン抵抗性を欠いている。また、フルクトースやグルコース高脂肪食を混ぜた western diet (WD) モデルでは、脂肪肝炎や線維化を伴うものの、作成までに 52 週を要し、研究成果が出るまでに時間がかかる点がある。このように今までのモデル動物では、NASH 成因として重要で発癌にも関与するインスリン抵抗性がないことや発癌に至るまでに長期間を要するなどの欠点があった為、新たにモデル動物を作成し、NASH 肝発癌に関わるメカニズムの解明を図ることとなった。

表 2: これまでの NASH 肝発癌モデル動物とその特徴

| NASH肝発癌モデル | 作成方法 | 脂肪変性 | 炎症細胞浸潤 | 線維化 | インスリン抵抗性 | 発癌期間 |
|----------------|-----------------|------|--------|-----|----------|------|
| DEN-HFモデル | 反復投与 | ○ | ○ | × | ○ | 30週 |
| STZ-HFモデル | 腹腔内投与(給餌併用) | ○ | ○ | ○ | × | 16週 |
| Ptenモデル | トランスジェニック | ○ | ○ | ○ | × | 48週 |
| HFモデル | 給餌 | ○ | ○ | ○ | ○ | 52週 |
| WDモデル | 給餌 | ○ | ○ | ○ | ○ | 53週 |
| MC4Rノックアウトモデル | トランスジェニック(給餌併用) | ○ | ○ | ○ | ○ | 54週 |
| HF-T09-CC14モデル | 反復投与 | ○ | ○ | ○ | ○ | 24週 |

HF : High Fat diet
 STZ : streptozotosin
 WD : Western diet
 MC4R : melanocortin 4 receptor

1-3. 先行研究における NASH モデルの特徴

これまでの NASH 研究における適切なモデル動物が存在していないという現況を踏まえて、まず先行研究では NASH 診断基準として重要な脂肪性肝炎と線維化を有し、病理学的に診断基準を満たすモデル動物の作成に着手した。臨床において NASH の確定診断を行う為に必要なことは、生検した肝組織が NASH に特徴的な病理学的所見を満たすこ

とである。この点を最優先として、さらに NASH 成因として重要なインスリン抵抗性を併せ持つ病態を模倣することを目指した。これまでに NASH の病態として報告されていたこととして、1998 年に Day CP らが “Two hit theory” を提唱していた。“First hit” として肥満や糖尿病、脂質代謝異常を背景として肝臓へのトリグリセリド (TG) 沈着が起これ、 “second hit” として酸化ストレスや腸内細菌に由来するエンドトキシンなどの肝細胞障害が加わることで NASH を発症するというものであった。¹¹ この考え方は明快で広く支持を集めたが、実際のヒト NASH における病態とは異なる点があった。NASH の背景にあるメタボリックシンドロームにより過剰な脂肪組織が存在し、それによる脂質代謝異常の結果生じた活性酸素などの酸化ストレスが生じる。代謝異常に伴う酸化ストレスは、同時にインスリン抵抗性を含む異常な糖代謝とともに免疫系の賦活化から慢性的な炎症を惹起し、全身性に脂肪組織や肝臓の炎症や動脈硬化をもたらし、全身性に parallel に病態が進行していく。このように NASH の病態進行に、脂質代謝や糖代謝の異常や脂肪組織や腸内細菌が関与することが重要であることを説明した “multiple parallel hit theory” が Tilg らによって提唱され、広く受け入れられるに至っている。¹² 先行研究を開始するにあたってこの multiple な負荷が重要な因子と捉え、高脂肪食、酸化ストレスとして CCl₄、肝臓内での脂質代謝異常の再現として T0901317 (Cayman Chemical Co., Ann Arbor, MI, USA) という LXR アゴニストを選択した。CCl₄ は肝臓の薬物代謝酵素である CYP2E1, CYP2B1 や CYP2B2 などと反応して、トリクロロメチルラジカル CCl₃* を発生し、広範なラジカル反応を誘発し、それ単独で酸化ストレスとなりうる。¹³ T0901317 は高脂血症治療薬である肝臓 X 受容体 (Liver X receptor: LXR) のアゴニストであるが、LXR α 作用により SERBP1c を介して FASN の発現上昇から結果的に TG の増加により肝臓に重度の脂肪肝を呈することが副作用として挙げられ、肝臓内での脂質代謝異常を再現する因子となる。¹⁴ 先行研究での NASH モデル動物作成に際して、高脂肪食は自由摂取とし、CCl₄ と T0901317 を腹腔内投与し、1 ヶ月間の作成期間とした。NASH 診断で重要となる病理組織については病理医による盲検化評価を行った。肝臓組織には線維化を伴い、NASH で

特徴的な肝細胞風船様変性, マロリーデング小体, 炎症性細胞浸潤, 大滴性脂肪沈着を備えていた. インスリン抵抗性は ITT により評価し, NASH 成因として重要なインスリン抵抗性を有しており, 糖代謝異常を再現するものとなっていた. NASH 研究で汎用されている MCD モデルのような飢餓モデルではなく, 肥満モデルであることも確認された. 以上より高脂肪食, CCl₄, T0901317 の 3 つの負荷を投与することで, 1 ヶ月という非常に早期に NASH の病理組織像を備え, インスリン抵抗性と肥満を備えた理想的な NASH モデル動物作成が可能となった.¹⁵ (図 1) この実験の結果から, T0901317 のみを除いた高脂肪食-CCL₄ 単独投与群では線維化や脂肪肝炎の所見が比較的軽度であったことから LXR アゴニストが NASH を模倣する上で重要な key factor であると考えた.

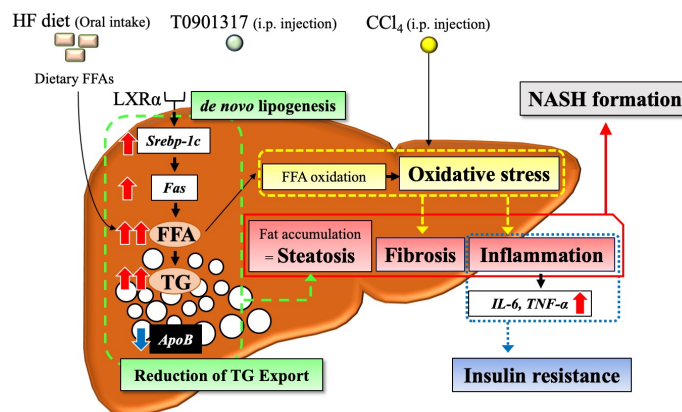


図 1 : 先行研究の NASH モデル動物における模式図¹⁵

先行研究の NASH モデル動物は, 高脂肪食, T0901317, CCl₄ の 3 つの負荷を与えることにより 1 ヶ月で作成可能である. 病理組織像である steatosis, fibrosis, inflammation とインスリン抵抗性を兼ね備えるモデルとなっている.

1-4. LXR のシグナル伝達系

本研究で使用した LXR アゴニストが作用する LXR は細胞内コレステロールの調節機構の重要な役割を果たしている. LXR は N 末端から順に activation function-1 (AF-1), DNA 結合ドメイン (DNA binding domein; DBD), リガンド結合ドメイン (ligand binding

domein; LBD) である activation function-2 (AF-2) から構成される.^{16,17} (図 2) AF-2 は, LBD にリガンドが結合すると構造を変化させて転写活性を起こす仕組みとなっており, リガンドが結合する前には co-repressor により不活性化しており, リガンドが結合することにより co-activator により活性化状態となる. それに伴いレチノイド X 受容体 (retinoid X receptor; RXR) とヘテロダイマーを作成し, DNA 上の LXR 応答配列 (LXR response element; LXRE) に結合して標的遺伝子の転写を誘導する.^{16,17} コレステロールは細胞膜を構成する生体に必須となる脂質であり, 細胞膜の形態保持や, 細胞増殖や分化などのシグナル伝達に重要な役割を果たしている.¹⁸ さらに, シグナル伝達の間として重要な細胞膜は液体の細胞膜上に, スフィンゴミエリンやコレステロールなどの特定の脂質と GPI アンカー型受容体であるタンパク質が集合した領域であるラフトが浮かんでいる構造をしているとされ, コレステロールが構成の中心となり, ラフトの安定性と流動性の維持に関わっている.^{19,20} コレステロールは食事により摂取される他に, 肝臓内で大部分が生合成されている. 生体内では, ステロイドの前駆体となり, ビタミン D, 胆汁酸や性ホルモンなどの生合成原料として使用され, 生体の恒常性維持に必須である.²¹ このように重要な役割を果たす細胞内コレステロールは厳密かつ複雑に管理されているが, その調節機構として主に作用するのが, sterol regulatory element binding proteins (SREBPs) と LXR である. SREBPs の中で SREBP1c は脂肪酸合成関連遺伝子の発現を制御する転写因子となり, 摂食により得たエネルギーを脂肪酸, TG に変換して貯蔵する役割を果たす.²²

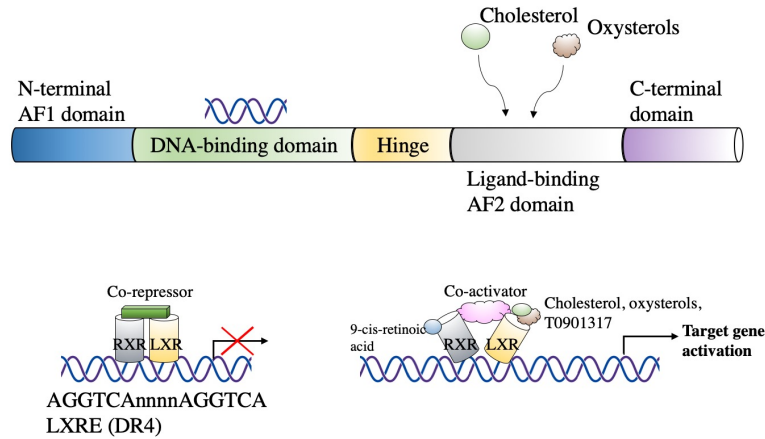


図 2 : LXR の転写活性化機構

レチノイド X 受容体 (retinoid X receptor; RXR) とヘテロダイマーを作成し, DNA 上の LXR 応答配列 (LXR response element; LXRE) に結合して標的遺伝子の転写を誘導する構造となっている。

LXR の活性化は, 小腸においては ATP-binding cassette transporter G5 (ABCG5) 及び ABCG8 の発現上昇によるコレステロール排泄を促進させ, 末梢血管のマクロファージでは ABCA1 や ABCG1 の発現上昇によりコレステロール逆転送作用 (reverse cholesterol transport; RCT) を介して余分なコレステロールを肝臓に戻す働きをする.²³ また, 肝臓において胆汁酸合成の律速酵素の発現を促進し, ABCA1 の発現を介して HDL 産生の調節を行う。また LXR はコレステロール異化経路の律速酵素である CYP7a1 の発現を亢進し, 胆汁酸の生成を促進する。LXR は α と β の 2 つのサブタイプを持ち, LXR α 遺伝子は 11 番染色体短腕 11.2 バンド, LXR β 遺伝子は 19 番染色体長腕 13.3 バンドに位置している。²⁴ LXR α は肝臓, 脂肪組織などの脂質代謝が活発に行われている組織や小腸, マクロファージ内に多く発現し, LXR β は全身臓器に発現しており, LXR はコレステロールの取り込み貯蔵, 分解排出に関わる遺伝子の発現や, 脂肪合成に関わる遺伝子の発現を制御することで, コレステロール代謝及び脂質代謝の調節を行っている。²⁵ 本研究で着

目したのが LXR α の作用であり, SREBP1c や脂肪酸合成酵素 (FASN) など脂肪酸合成に関与する酵素の転写促進を介して TG の増加をもたらす効果である. (図 3)

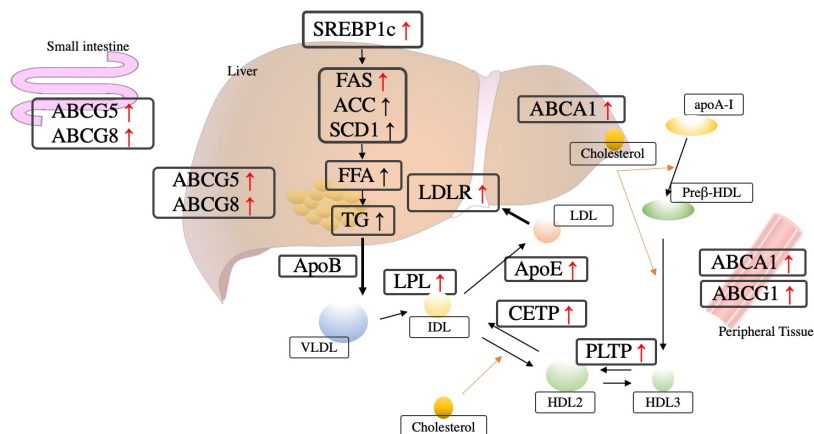


図 3 : LXR 活性化に伴う機能変化

肝臓においては SREBP-1c や FASN などの脂肪酸合成に関与する酵素を転写促進し, TG 増加に繋がる.

1-5. 抗高脂血症薬 T0901317 の構造, 作用機序

本研究で使用した T0901317 は, LXR β 作用による血中コレステロール低下を利用した高脂血症薬として開発された. LXR の内因性リガンドは, コレステロール代謝産物であるオキシステロール類 (22(R)-hydroxycholesterol, 24(S)-hydroxycholesterol, 27-hydroxycholesterol) であり, その骨格を基として合成アゴニストが作られる.²⁶ (図 4) 代表的なものとして T0901317 があるが, LXR α の作用も強いために副作用として脂肪肝となってしまう点が特徴的である.^{27,28} また, T0901317 は LXR のみではなく, 複数の標的に対する作用することが知られており, farnesoid X receptor (FXR) や pregnane X receptor (PXR) にアゴニストとして, constitutive androstane receptor (CAR) や retinoic acid receptor (ROR) に対してインバーサアゴニストとして作用する.^{29,30,31} FXR は, 胆汁酸の生理的受容体であり, 胆汁酸の輸送と合成に関わり, 脂質代謝における付加的な機能を調節してい

る. PXR や CAR は異物認識受容体として細胞代謝や薬物代謝により刻々と変化する環境に対応している.^{32,33} また, ROR は, レチノイン酸受容体関連のオーファン受容体であり, 肝性グルコーン新生や脂質代謝, 概日リズムや免疫学的機能など様々な役割を果たしている.^{29,30} このように, 様々な標的に対して作用する T0901317 が他の LXR agonist に比べて肝臓に対する脂質沈着の程度が強い理由としては, LXR α の働き以外にも種々の受容体の活性変化により脂質代謝や糖代謝に変化がおき, 脂肪肝という結果を招いているとされる.³¹

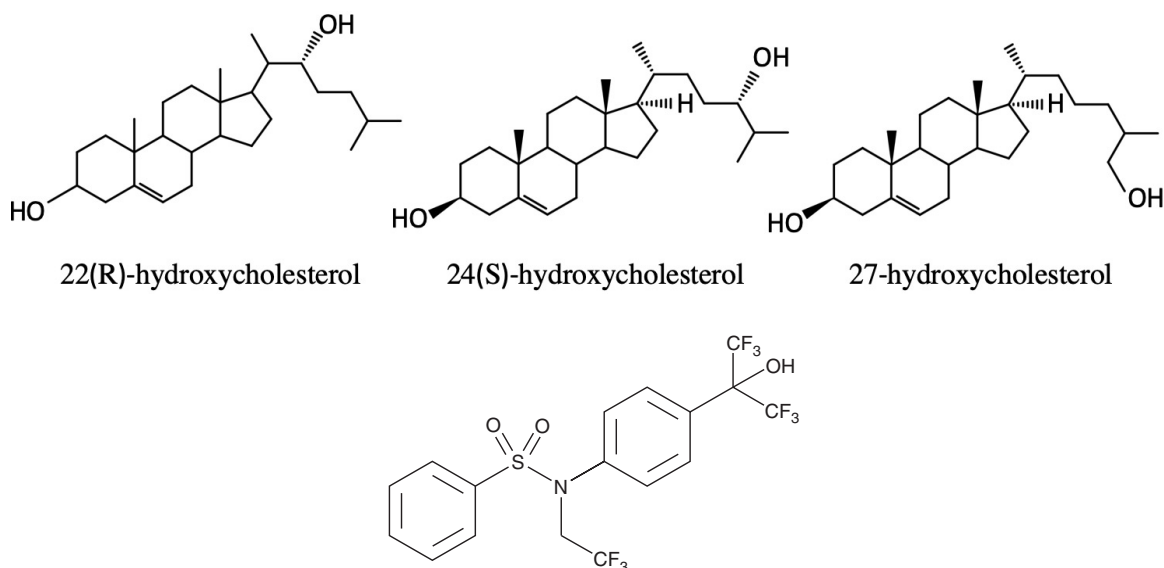


図 4 : LXR の内因性リガンドと T0901317 の化学構造式^{26,34,35,36}

22(R)-ヒドロキシコレステロール, 24(S)-ヒドロキシコレステロールおよび27-ヒドロキシコレステロールなどが生体内リガンドとして報告されている.

1-6. 本実験で明らかにすること

前述の先行実験では, 高脂肪食, 酸化ストレスとして CCl₄ 及び脂質代謝異常の再現のため LXR アゴニストである T0901317 を用いてヒト NASH の病態に類似するモデル動物が作成可能となった. 肝病理組織の再現性は高く, ヒト NASH 病態も適切に模倣

するものであったが、モデル作成のための3つの刺激を継続することで、本当にヒト NASH の臨床経過と同様に HCC の発症が再現できるかが、新たな研究テーマとして立ち上がった。また、この先行実験の中で、高脂肪食-CCl₄ 単独群で、線維化や脂肪肝炎の所見が比較的軽度であったことから、脂質代謝異常を再現する LXR アゴニストがモデル動物作成の key factor となっていると判断した為、LXR が NASH の発症や NASH からの肝発癌に対して、どの程度影響しているかについても評価を行うこととした。

臨床研究においてもヒト NASH 患者を対象とした研究では、LXR の発現は脂肪沈着や炎症細胞浸潤、線維化の程度と相関していたという報告があり、脂質代謝異常が NASH の成因や進展に影響している可能性があるとの報告もある。³⁷ さらに肝臓への脂肪沈着と線維化の両方が HCC 発症の独立した危険因子であるとの報告もあり、LXR アゴニストがもたらす肝臓細胞内への脂質沈着や肝臓内での脂質代謝異常が HCC 発症に及ぼす影響も評価することとした。^{38,39} また脂質代謝異常により発生した大量の脂肪酸による脂肪毒性は炎症性サイトカインを惹起するが、炎症性サイトカインが増加した肝細胞は、AKT シグナル伝達経路といった種々のシグナル伝達経路を活性化することで肝臓における発癌に寄与し、HCC の予後を予測するとの報告があること。^{40,41} このことから、LXR アゴニスト投与による肝発癌再現に際して、どのようなシグナル伝達経路の変化が起こっているかについても評価することとした。^{37,38}

2. 方法

2-1. NASH 肝発癌モデル動物と実験系

6 週齢の雄 C57BL/6 マウスを Charles River Laboratories から購入し, 実験開始の 1 週間前から順応させた. 飼育環境は温度・湿度・換気が制御された飼育室内で, 特定の病原体のない条件で 12 時間の明暗サイクルの環境下とした. 水と高脂肪食 (5.24kcal/g, 60kcal% 脂肪, 20kcal% 炭水化物; D12492, Research Diets, NJ) は自由摂食とした. マウスを各 12 匹 2 つのグループに分けた.

(i) T09 + CCl₄ 群 : DMSO 及び PBS で可溶化した T0901317 (Cayman Chemical Co.) およびコーン油に可溶化した CCl₄ (和光純薬工業株式会社, 大阪市) を腹腔内投与した.

(ii) CCl₄ 群 : コーン油に可溶化した CCl₄ を単独で腹腔内投与した.

両群のマウスには週 2 回腹腔内注射を行った. CCl₄ 投与量は 0.1mL/kg (CCl₄: コーン油 = 1 : 39) とし, T0901317 投与量は 2.5mg/kg (T0901317 : DMSO, PBS = 1:99) とした. マウスの体重は週 2 回測定し, 疾患または病的状態の徴候について定期的に評価した. マウスは, イソフルラン麻酔下で放血によって犠死させた. 血液サンプルは下大静脈から採取し, 血清を単離するために 3,000 rpm で 10 分間遠心分離した. 各サンプルは分析まで -80°C で保存した. 肝臓は速やかに単離し, 直ちに組織学的検査のため 10%ホルマリンで浸漬固定した. 動物実験は, 筑波大学の動物実験委員会の承認を得て, 本学の動物実験規則および文部科学省所管の学術研究機関における動物実験等の適正な実施のための基本的な指針に基づき, 人道的に実施した.

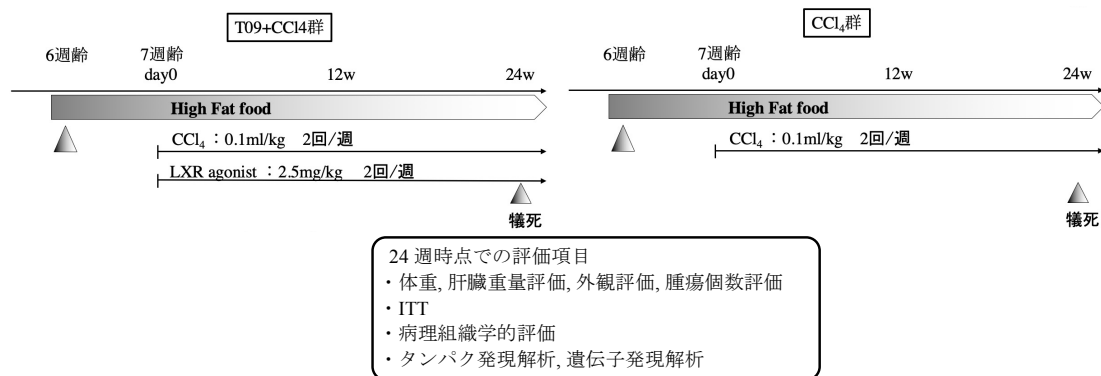


図 5 : NASH 肝発癌モデル動物の作成プロトコール

高脂肪摂食下において CCl₄ と LXR agonist として T0901317 を 24 週間腹腔内投与する。24 週目で犠死させ、腫瘍の有無や NASH としての病理組織像を備えているかを評価する。

2-2. 組織学的評価

10%ホルマリンで固定した肝臓組織をパラフィンに包埋した。脂肪沈着, 炎症細胞浸潤, 肝細胞風船様変性および核異型度を評価するために, ヘマトキシリン-エオジン (H E) で染色した 2 μ m のパラフィン切片を評価した。線維化は Masson's trichrome (MT) 染色で評価した。肝細胞中の脂肪沈着は, オイルレッド O 染色により評価した。F4/80 (ab100790; Abcam, Cambridge, MA), 4HNE (ab46545), CD34 (ab81289), AFP (ab46799) および Glypican3 (ab66596) の免疫組織化学染色を行った。NASH の経過や治療効果判定に使用する NAFLD activity score を用いて, 肝ステアトーシス, 炎症性細胞浸潤および肝細胞風船様変性の程度を経験豊富な病理医の判定によりスコアリングした。肝臓における脂肪沈着を評価するために, 大滴性脂肪沈着によって占められた肝実質の割合によってグレード 0~3 に分類した (グレード 0 : 5%未満, グレード 1 : 6~33%, グレード 2 : 34~66%, グレード 3 : 66%以上)。炎症性細胞浸潤の評価では, 標本を倍率 200 での視野あたりにおける炎症細胞浸潤の程度によってグレード 0~3 に分類した (グレード 0 : 0, グレード 1 : 1~2, グレード 2 : 3~4, グレード 3 : 4 以上)。肝細胞風船様変性を評価では, 検体をグレー

ド 0~2 に分類した (グレード 0 : 風船様細胞変性なし, グレード 1 : 風船様細胞変性が少ない, グレード 2 : 風船様細胞変性が多い / 顕著な風船様細胞変性) に分類した. オイルレッド O 染色の陽性面積を Image J software (U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) を用いて測定した.⁴²

2-3. 血液生化学的評価

血清中のアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST) および TG 濃度は, FUJI DRI-CHEM7000V 血清多重生化学分析装置 (富士フイルム株式会社, 東京, 日本) を用いて測定した.

2-4. インスリン抵抗性の評価

インスリン抵抗性を評価するためインスリン負荷試験 (ITT) を行い, インスリン抵抗性指数 (HOMA-R) スコアを算出した.⁴³

ITT : マウスに速効型インスリン (Humarin R Eli Lilly Co. IN, USA) を 0.75 U/kg で腹腔内投与し, インスリン注射後 0, 30, 60, 90, 120 分後に尾静脈血中の血糖値を測定した.

もう一つのインスリン抵抗性の指標として, HOMA-R スコアを以下のように算出した.

$$\text{HOMA-R score} = (\text{空腹時血糖値} \times \text{空腹時血清インスリン値}) / 405$$

血清インスリン値は, 超感受性マウスインスリン ELISA キット (森永生物科学研究所, 神奈川県, 日本) を用いて測定した.

2-5. タンパク質発現解析

肝臓組織を採取後に使用するまで-30°Cで直ちに凍結保存した. 肝臓組織から Minute Total Protein Extraction Kit for Animal Cultured Cells and Tissues (#SD-001/SN-002; Invent Biotechnologies, Inc. MN, USA) を用いてタンパク質を抽出した. タンパク質濃度は分光濃度計を用いて推定した. サンプルを 95°C で 3 分間煮沸し, 各サンプルの 15 μ l を 10% および 12% SDS-PAGE ゲルに入れ, ニトロセルロース膜 (Millipore, Bedford, MA,

USA) に移した. FASN (#3180), pGSK-3b (#9336), ERK (#9102), Cyclin D1 (#2922), p38 MAPK (#9211) および GAPDH (#2118) (いずれも Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA) の一次抗体を使用した. 二次抗体は, Zymed Laboratories (San Francisco, CA, USA) 製のものを使用した.

2-6. リアルタイム PCR 法による遺伝子発現解析

肝臓サンプルは採取後直ちに-30°Cで凍結保存した. 凍結した肝臓サンプルをホモジナイズし, NucleoSpin RNA Kit (Takara Bio, Inc., Otsu, Japan) を用いて total RNA を単離した. RNA 濃度は, nano drop 分光光度計 (Thermo Fisher Scientific, Inc., Wilmington, DE, USA) を用いて測定した. cDNA の合成は, PrimeScript RT Master Mix (Takara Bio) を用いて行った. RT-PCR 用プライマーは, GeneBank に収載されている配列を元とした Primer Express software for Real-Time PCR ver. 3.0 (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA, USA) を用いて設定した. *Gapdh* を内因性コントロールとして使用した. 400nM のプライマー及び 25 ng の cDNA テンプレートから TB Green Premix Ex Taq II (Takara Bio) を使用し, Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR system (Applied Biosystems) でリアルタイム PCR を施行した. 使用したプライマーについては以下の表に記載した.

表 3 : qPCR による遺伝子発現解析において使用したプライマー

| | qPCR primer F | qPCR primer R |
|--------------|---------------------------|------------------------|
| <i>Lpl</i> | AGAGGCTATAGCTGGGAGCAGAAAC | GCAAGGGCTAACATTCCAGCA |
| <i>Lepr</i> | TCATGTGCCGGTACCCAGAG | ACCTAAGGGTGGATCGGGTTTC |
| <i>Src</i> | CAGCGGCGGTTTCTACATCA | GCTTGGATGTGGGACATACGG |
| <i>Gapdh</i> | TGTGTCCGTCGTGGATCTGA | TTGCTGTTGAAGTCGCAGGAG |

2-7. DNA マイクロアレイ 法による遺伝子発現解析

凍結した肝臓サンプルをホモジナイズし, NucleoSpin RNA キット (Takara Bio) を用いて total RNA を単離した. RNA 濃度は, NanoDrop Spectrophotometer (Thermo Fisher

Scientific) で 260/280nm の吸光波長を測定した. cDNA の合成は AMV Reverse Transcriptase (Promega Corp., Madison, WI, USA) と random primers (Takara Bio) を用いた. 1mM dNTPs (Fermentas Life Sciences, Inc., Burlington, ON, Canada), 0.025 μ g/mL ランダムプライマー, 0.25 U/mL 逆転写酵素, および 500 ng の total RNA の混合物を 30°C で 10 分間, 37°C で 60 分間, 95°C で 5 分間, および 4°C として作成した. 作成した cDNA は -80°C で保存した. 両群から単離した RNA サンプルを用いて DNA マイクロアレイ解析を行った. 100ng の total RNA から合成した標識 cDNA は推奨プロトコルに従って使用し, GeneChip 3' IVT Plus Reagent Kit (Affymetrix, Inc., Santa Clara, CA, USA) を用いて, フラグメント化して標識した 600ng の cDNA を SurePrint G3 Mouse GE microarray 8 \times 60K Ver. 2.0 (Agilent, Inc., Santa Clara, CA, USA) に 65°C で 17 時間ハイブリダイズしてマイクロアレイ解析を施行した. Low Input Quick Amp Labeling Kit (Agilent) を使用して染色し, DNA microarray scanner (Agilent) を使用してスキャンした. 生データの解析は GeneSpring GX 14.5 (Agilent) を用い正規化を施行した. T09 + CCl₄ 群の遺伝子発現プロファイルを CCl₄ 群と比較した. 発現変化が 2 倍以上の遺伝子を発現増加として, 発現変化が 0.5 倍未満の遺伝子を発現低下として分類した.

2-8. 統計学的解析

すべてのデータは平均値 \pm 標準偏差で記載した. 統計解析は Graph Pad Prism 8 (Graphpad Software, Inc., San Diego, CA) を用いて行った. 2 群間の比較には, Mann-Whitney U 検定を用いた. *p* 値は 0.05 未満を有意とした. 群間比較は, one-way analysis of variance (ANOVA) での解析後に Tukey's post hoc test で比較した.

3. 結果

3-1. 肝体重比及び体重変化

図 6 は、マウスの肝体重比と週数におけるマウスの体重を示している。T09 + CCl₄ 群では、CCl₄ 群に比べて肝重量及び肝体重比が有意に高かった。(図 20 : 24 週における肝臓重量)。24 週におけるマウス体重は両群とも初期体重に対して増加していたが、T09 + CCl₄ 群のマウスは 20 週目以降、体重増加が緩やかに減少していた。

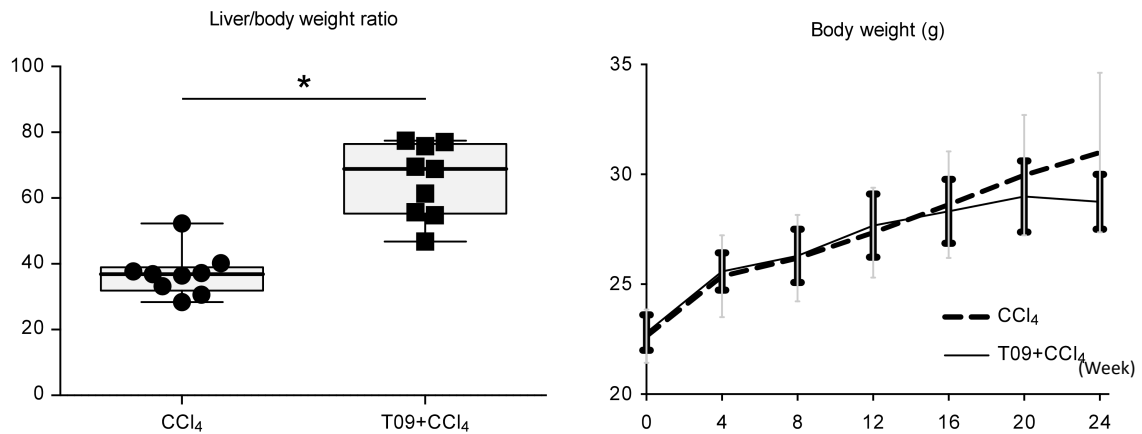


図 6 : 肝体重比 (左図, n = 9) 及び 体重変化 (右図, n = 6).

3-2. 肝臓における腫瘍形成

図 7 は、両群の腫瘍外観を示しており、両群のマウスに腫瘍が発生した。図 8 は、腫瘍の最大径と腫瘍個数を示している。T09 + CCl₄ 群の全てのマウスで腫瘍が発生しており、CCl₄ 群では形成した腫瘍個数が有意に少なく、また小さかった。

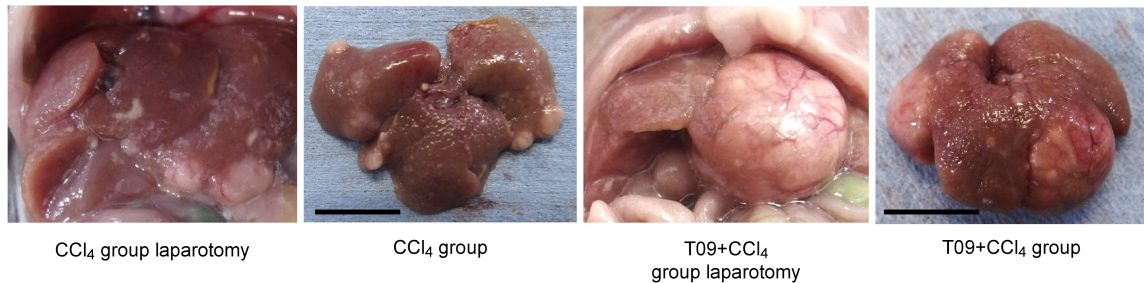


図 7 : CCl₄ 群及び T09 + CCl₄ 群の肝臓肉眼所見.

左は開腹時, 右は肝臓摘出後の所見. Bars : 1cm

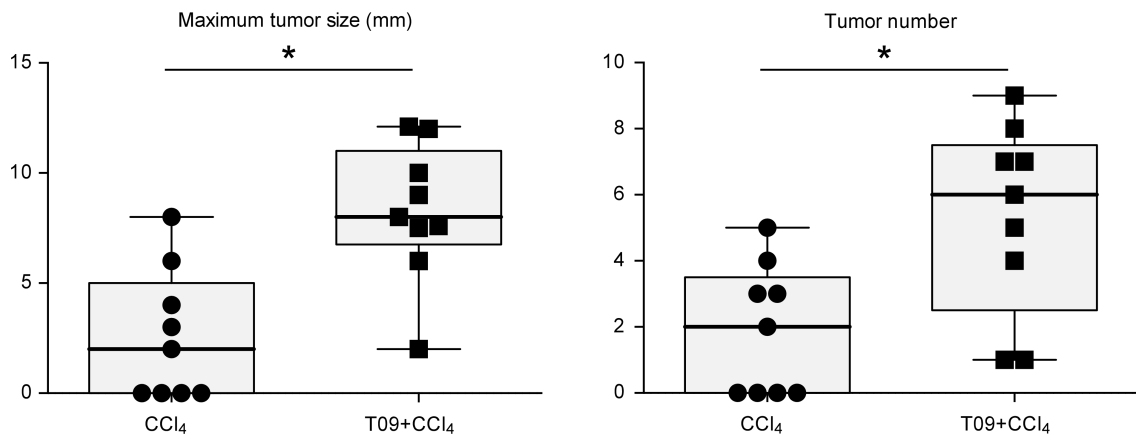


図 8 : 最大腫瘍径 (左図) と腫瘍個数 (右図)

Mean ± SD, n = 9, Mann-Whitney U test. $p < 0.05$ vs the CCl₄ group.

3-3. 背景肝における NASH 病理評価所見

図 9 に両群の肝臓組織学的所見を示す. T09 + CCl₄ 群では正常な肝小葉構造が破壊されていた. オイルレッド O 染色および MT 染色から, T09 + CCl₄ 群の方が CCl₄ 群よりも広い範囲の脂肪沈着および強い線維化が観察された. (図 9) T09 + CCl₄ 群のマウスでは, 大滴性脂肪沈着, マロリーデンク小体を持つ風船様細胞浸潤, 小葉の炎症細胞浸潤, 線維化が認められた. (図 10) また, オイルレッド O 染色では, ImageJ ソフトウェアで算出

した脂肪沈着を示すオイルレッドO染色陽性となる領域は、T09 + CCl₄群の方がCCl₄群よりも有意に多かった。(図 11) また、MT染色上の青染色面積を算出して線維化の重症度を評価したところ、T09 + CCl₄群ではCCl₄群に比べて線維化面積が有意に多いことがわかった。臨床的にNASHの重症度はNAFLD activity scoreで評価されるが、NAFLD activity scoreは、T09 + CCl₄群の方がCCl₄群よりも有意に高かった。(図 11) 酸化ストレスの評価は、脂質過酸化のマーカである4HNEの免疫染色により測定した。CCl₄群では門脈周囲領域(zone 1)に4HNE陽性領域が確認された。一方、T09 + CCl₄群では、中心静脈領域(zone 3)に4HNE陽性領域が認められ、酸化ストレスの領域が異なることが観察された。(図 12)

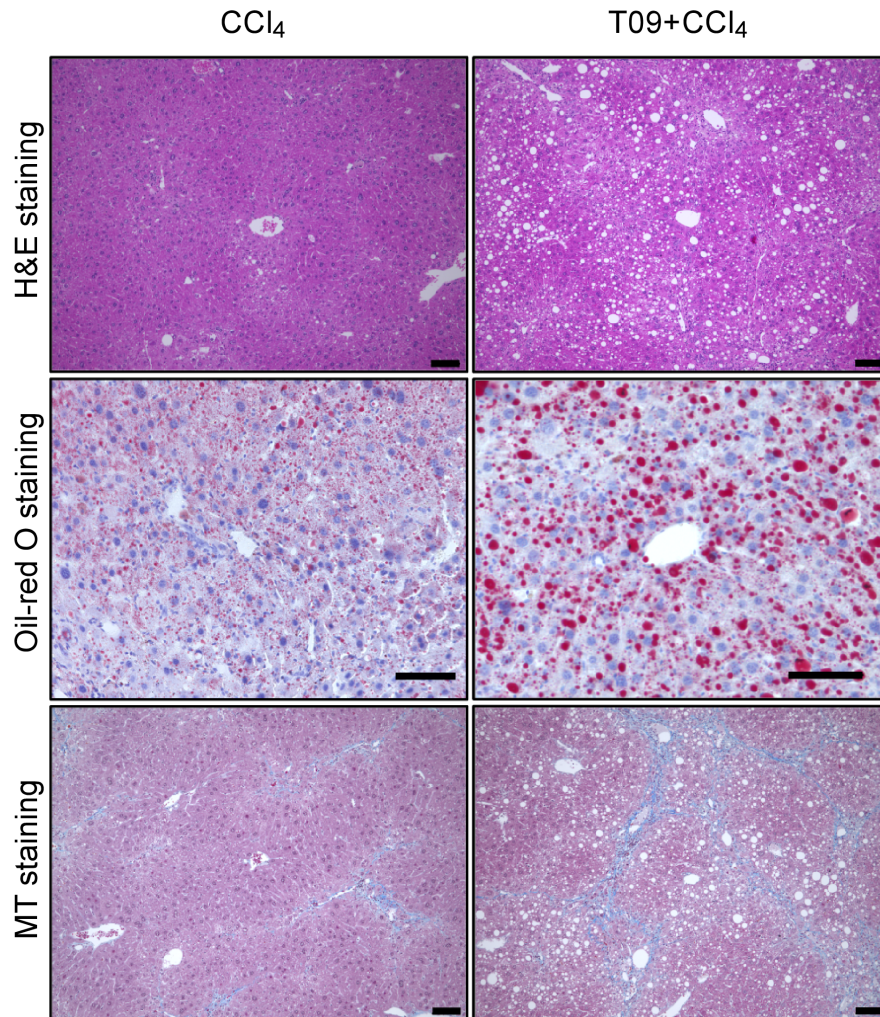


図 9 : T09 + CCl₄ 群及び CCl₄ 群の肝臓病理所見像.

T09 + CCl₄ 群では CCl₄ 群に比べて肝小葉構造が破壊され, より強い線維化や脂肪沈着が確認される. 上から HE 染色, オイルレッド O 染色, MT 染色. Bars : 100 μm.

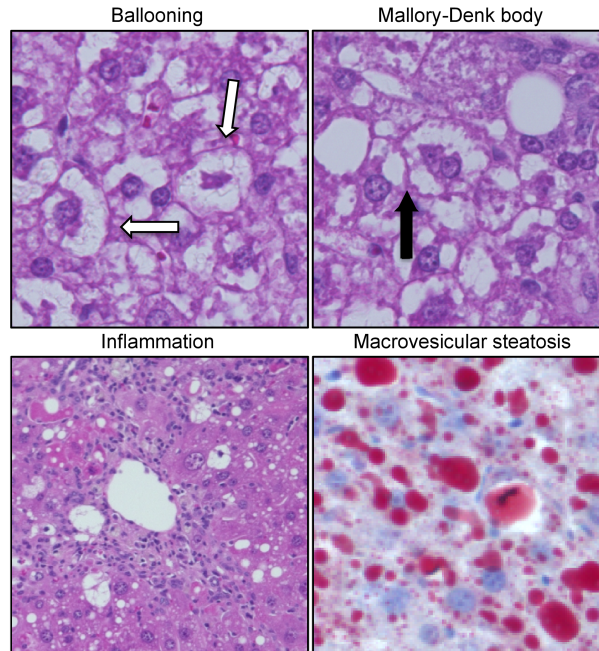


図 10 : T09 + CCl₄群における NASH で特徴的な肝臓病理所見像.

肝細胞風船様変性, マロリーデング小体, 炎症性細胞浸潤, 大滴性脂肪沈着が確認される.
 白矢印: 肝細胞風船様変性を呈している肝細胞. 黒矢印: マロリーデング小体.

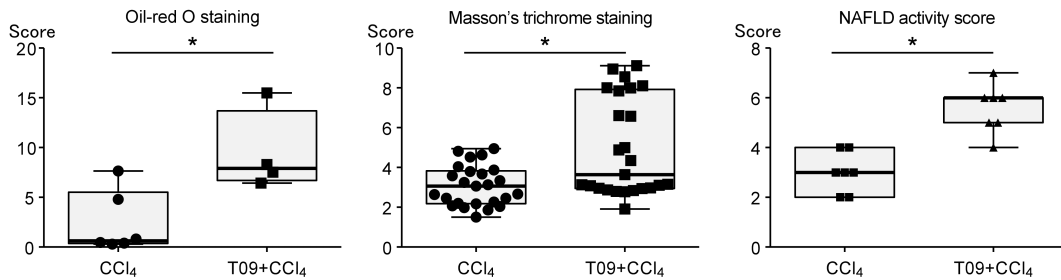


図 11 : オイルレッド O 染色及び MT 染色における定量評価と NAFLD activity score.

オイルレッド O 染色は赤色染色部分, MT 染色は青色染色部分を Image J software を用いて定量評価を行った. Mean ± SD, n = 5, Mann-Whitney U test. $p < 0.05$ vs the CCl₄ group.

NAFLD activity score は病理医に盲検定化した上でスコア化した. Mean ± SD, n = 7, Mann-Whitney U test. $p < 0.05$ vs the CCl₄ group.

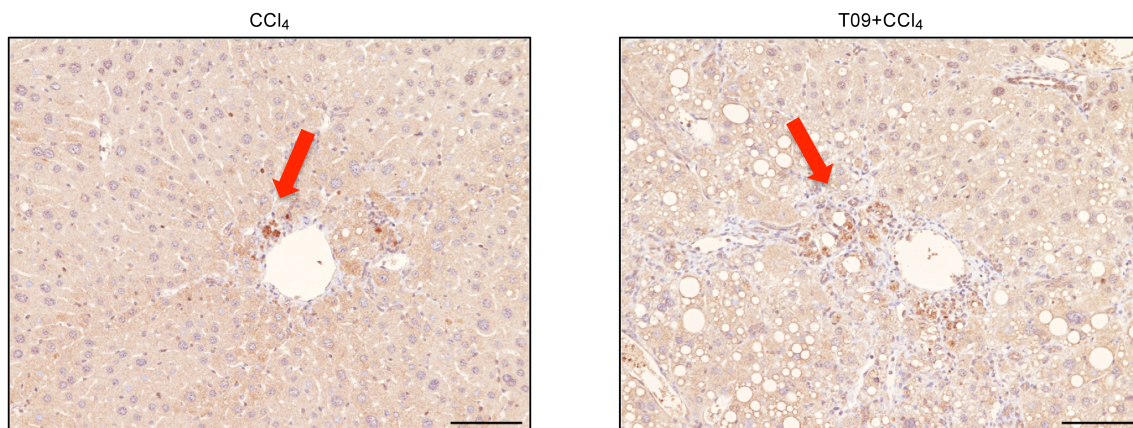


図 12 : 酸化ストレスの局在の偏向.

酸化ストレスマーカーである 4HNE は, CCl₄ 群では門脈周囲領域 (zone 1) に, T09 + CCl₄ 群では中心静脈領域 (zone 3) に認められ, 酸化ストレスの領域が異なることが観察された. Bars : 100 μm.

3-4. 脂質代謝異常とインスリン抵抗性

T09 + CCl₄ 群における脂質代謝異常の重症度を評価するために, F4/80 の免疫染色及びウエスタンブロット法により FASN 発現を評価した. インスリン抵抗性については ITT と HOMA-R で評価した. さらにウエスタンブロット法によりインスリンシグナルにより制御を受ける pGSK-3 の評価を行った. 図 13 は, 腹部脂肪組織および肝臓組織における crown-like structure を示す. 脂質代謝の調節因子として重要な FASN はウエスタンブロットによるタンパク質発現分析を行った. (図 14) CCl₄ 群の FASN 発現と比較して, T09 + CCl₄ 群では有意に FASN の発現が増加していた. インスリン抵抗性は ITT と HOMA-R スコアを用いて 3 群 (T09 + CCl₄ 群, CCl₄ 群, 通常食群) で比較した. インスリンを腹腔内投与 30 分後, 60 分後, 90 分後, 120 分後の血中血糖値は, T09 + CCl₄ 群の方が通常食群よりも有意に高かった. (図 15) さらに T09 + CCl₄ 群の AUC (Area under the curve : 曲線下面積) は, 通常食群よりも有意に高かった. また, インスリン抵抗性を HOMA-R ス

コアで評価した結果, T09 + CCl₄ 群の HOMA-R スコアは通常食群よりも有意に高かった. さらに, pGSK-3 タンパク質発現解析を行ったところ, 群間で有意な差が認められた. (図 16)

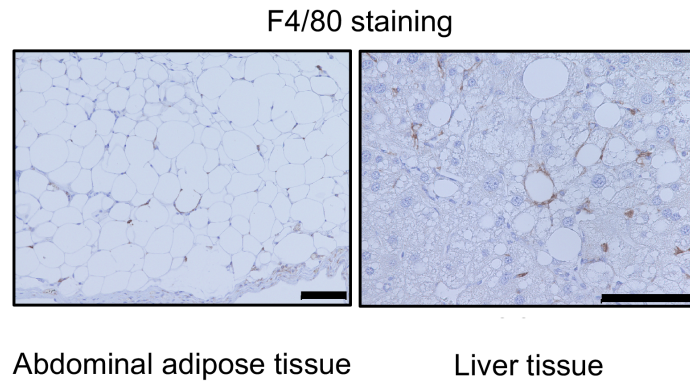


図 13 : F4/80 免疫染色による脂質代謝異常の評価.

T09 + CCl₄ 群における腹腔内脂肪組織と肝臓非腫瘍組織における crown like cell の評価.

Bars: 100 μm.

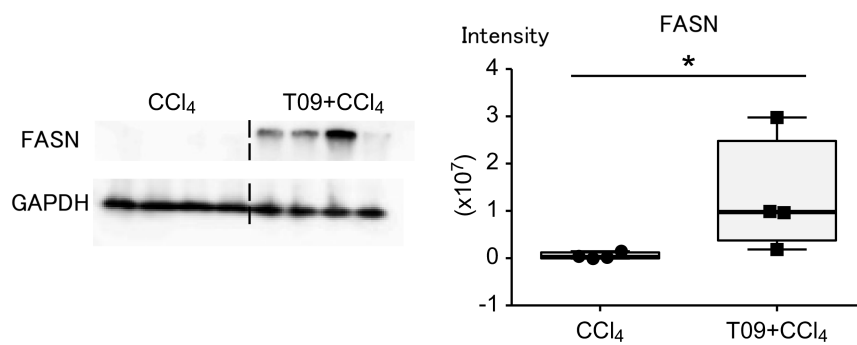


図 14 : 脂肪酸合成酵素である FASN タンパク質の解析による脂質代謝異常の評価.

T09 + CCl₄ 群及び CCl₄ 群の非腫瘍組織における FASN タンパク質の発現解析. Mean ± SD, n = 4, Mann-Whitney U test. $p < 0.05$ vs CCl₄ 群.

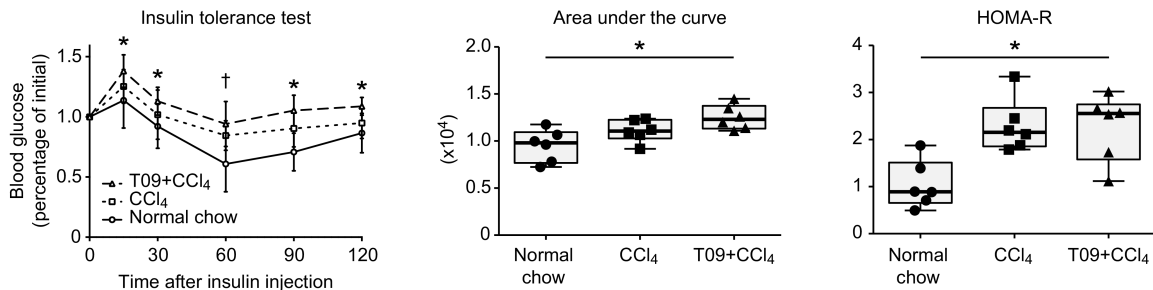


図 15 : ITT, AUC (曲線下面積) 及び HOMA-R によるインスリン抵抗性の評価。

T09 + CCl₄ 群, CCl₄ 群及び通常食群におけるインスリン抵抗性評価. Mean ± SD, n = 6, one-way analysis of variance (ANOVA) with Tukey's post hoc test. $p < 0.05$. Mann-Whitney U test. $p < 0.05$. T09 + CCl₄ 群 vs Normal chow 群. * : T09+CCl₄ 群 vs Normal chow 群. † : T09+CCl₄ 群, CCl₄ 群 vs Normal chow 群.

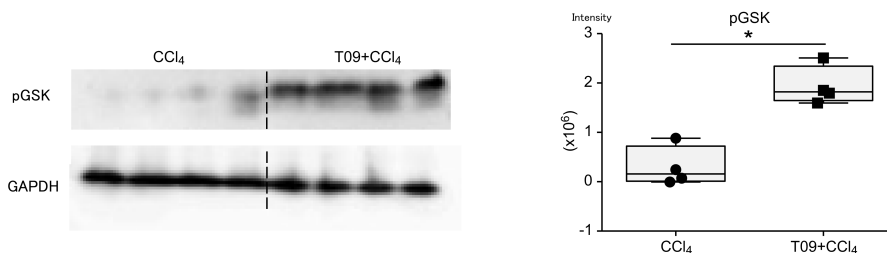


図 16 : インスリンシグナル及びグルコース恒常性に関連する pGSK-3 タンパク質の発現解析。

T09 + CCl₄ 群及び CCl₄ 群の非腫瘍組織における pGSK タンパク質の発現解析. Mean ± SD, n = 4, Mann-Whitney U test. $p < 0.05$ vs the CCl₄ group.

3-5. 腫瘍組織における病理評価所見

図 17 は, T09 + CCl₄ 群の腫瘍部分における HE 染色及び CD34, AFP, glypican3 の免疫染色の病理学的所見を示す. 腫瘍の HE 染色により大滴性脂肪変性, 細胞および核の多形性, および核の異型性を認めた. CD34 染色では, 類洞の毛細血管化が確認された. さらに, T09 + CCl₄ 群の腫瘍は AFP および glypican3 が陽性染色となった.

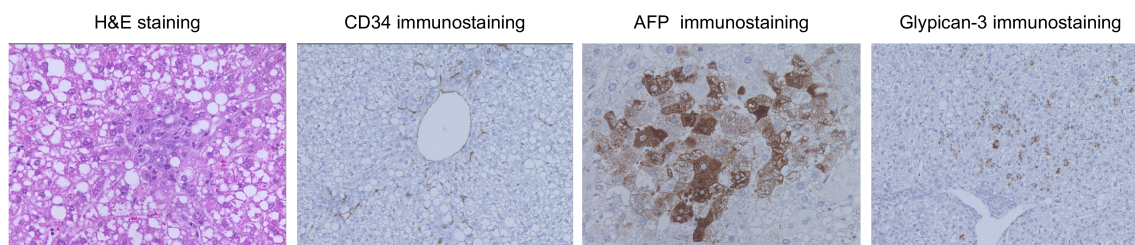


図 17 : T09 + CCl₄ 群における腫瘍組織の病理学的評価.

左から HE 染色, CD34 免疫染色, AFP 免疫染色, Glypican3 免疫染色. Bars: 100 μ m.

3-6. 腫瘍形成に関わるタンパク質発現解析

図 18 は, T09 + CCl₄ 群の非腫瘍組織および腫瘍組織における細胞増殖, 細胞周期関連タンパク質及びストレス応答関連タンパク質である pERK, tERK, Cyclin D1 及び p38MAPK のウエスタンブロットの結果を示す. 腫瘍組織は非腫瘍組織に比べて細胞増殖および細胞周期関連タンパク質のレベルが増加していた. さらに, 腫瘍組織ではストレス応答関連タンパク質の発現が抑制されていた.

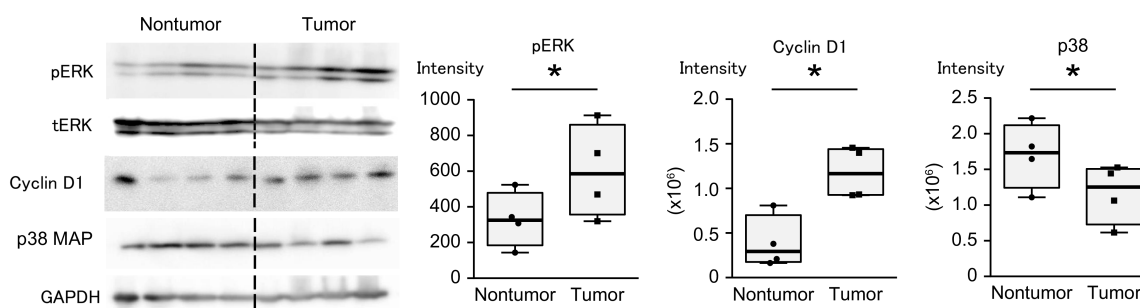


図 18 : pERK, Cyclin D1 及び p38 MAP タンパク質解析による腫瘍組織における細胞増殖, 細胞周期関連タンパク質及びストレス応答関連タンパク質の発現解析.

左 : ウエスタンブロットのゲル画像. GAPDH : 内因性コントロール

右 : タンパク質発現のゲル濃度を数値化し, 比較評価. Mean \pm SD, n = 4, Mann-Whitney U test. $p < 0.05$ vs 非腫瘍組織.

3-7. マイクロアレイによる腫瘍組織及び非腫瘍組織の網羅的解析

マイクロアレイ解析と Ingenuity Pathway Analysis (IPA) の結果を表 4~7 に示す. 表 4 は T09 + CCl₄ 群と CCl₄ 群の背景肝における IPA 解析による disease and disorders 分類の結果である. 肝臓の線維化に関連した炎症性および結合組織の障害が示唆された. また, top toxicity function analysis における肝毒性の結果は, 全ての指標が NASH の病態との関連を示唆していた. 表 5 は, T09 + CCl₄ 群と CCl₄ 群の背景肝における発現遺伝子の解析結果を示す. 表 6 は, T09 + CCl₄ 群の腫瘍組織と非腫瘍組織における発現遺伝子の解析結果を示す. ヒト NASH と関連があると考えられている遊離脂肪酸代謝のメディエーターである *Lpl* とエネルギー代謝の調節因子である *Ucp2* は, T09 + CCl₄ 群で遺伝子発現が増加していた. また発癌に関連する遺伝子群として *Src* や *Fgr* などのアポトーシス抑制遺伝子は発現が増加し, ヒト HCC のプロモーター遺伝子として報告されている *Cd51* は腫瘍組織で発現が増加していた. 表 7 は T09 + CCl₄ 群と CCl₄ 群の腫瘍組織における発現遺伝子の解析結果を示す. 肝発癌に関連する *Fam83e* や *Src* の発現増加と *Lpl* の発現増加を認めた.

表 4 : 非腫瘍組織における Disease and disorders 及び Top tox functions (Hepatotoxicity) による肝臓の線維化に関連した炎症性および結合組織の障害に関係する遺伝子群の評価. vs CCl₄ 群

| Disease and disorders | P-value range | # of molecules |
|-------------------------------------|--|----------------|
| Inflammatory response | 3.02×10 ⁻⁶ – 3.93×10 ⁻²⁷ | 278 |
| Immunological disease | 1.95×10 ⁻⁶ – 1.94×10 ⁻²² | 270 |
| Organismal injury and abnormalities | 2.37×10 ⁻⁶ – 4.18×10 ⁻²⁰ | 517 |
| Connective tissue disorders | 9.50×10 ⁻⁷ – 3.38×10 ⁻¹⁶ | 126 |
| Inflammatory disease | 1.11×10 ⁻⁶ – 3.38×10 ⁻¹⁶ | 199 |
| Top tox functions:hepatotoxicity | | |
| Liver inflammation/hepatitis | 1.00×10 ⁰ – 5.92×10 ⁻⁸ | 39 |
| Liver damage | 1.00×10 ⁰ – 3.67×10 ⁻⁶ | 33 |
| Liver steatosis | 6.18×10 ⁻¹ – 7.62×10 ⁻⁵ | 28 |
| Liver necrosis/cell death | 5.51×10 ⁻¹ – 2.23×10 ⁻⁴ | 25 |
| Glutathione depletion in liver | 4.52×10 ⁻¹ – 9.06×10 ⁻⁴ | 8 |

表 5 : 非腫瘍組織において有意な発現変化を認めた NASH に関連した遺伝子群. $P < 0.05$ vs CCl₄ 群.

| Relation | Gene symbol | Gene name (description) | Fold change | P-value | Regulation | reference |
|-------------------|---------------|---|-------------|---------|------------|-----------|
| Oxidative stress | <i>Cd14</i> | CD14 antigen | 2.525 | 0.042 | Up | 44 |
| | <i>Dnmt3b</i> | DNA methyltransferase 3B | 2.043 | 0.014 | Up | 45 |
| | <i>Gstm2</i> | Glutathione S-transferase, mu 2 | 2.101 | 0.044 | Up | 46 |
| | <i>Pil3cd</i> | Phosphatidylinositol 3-kinase catalytic delta polypeptide | 2.088 | 0.011 | Up | 47 |
| Hepatic steatosis | <i>Acot1</i> | Acyl-CoA thioesterase 1 | 2.124 | 0.014 | Up | 48 |
| | <i>Lpl</i> | Lipoprotein lipase | 6.301 | 0.005 | Up | 49 |
| Hepatic fibrosis | <i>Trib3</i> | tribbles homolog 3 (Drosophila) | 0.395 | 0.044 | Down | 50 |
| | <i>Lepr</i> | Leptin receptor | 6.455 | 0.038 | Up | 51 |
| | <i>Lgals3</i> | Lectin, galactose binding, soluble 3 | 2.049 | 0.038 | Up | 52 |
| Inflammation | <i>Tfrc</i> | Transferrin receptor | 2.725 | 0.005 | Up | 53 |
| | <i>Fcgr4</i> | Fc receptor, IgG, low affinity IV | 2.379 | 0.004 | Up | 54 |

表 6 : T09 + CCl₄ 群の腫瘍組織において有意な発現変化を認めた NASH 肝発癌に関連した遺伝子群. $p < 0.05$ vs 非腫瘍組織群.

| Relation | Gene symbol | Gene name (description) | Fold change | P-value | Regulation | reference |
|--------------------------|--------------|---|-------------|---------|------------|-----------|
| Hepatocellular carcinoma | <i>Cd5l</i> | CD5 antigen-like | 2.371 | 0.003 | Up | 55 |
| | <i>Vsig4</i> | V-set and immunoglobulin domain containing 4 | 2.346 | 0.014 | Up | 56 |
| NAFLD | <i>Sirt3</i> | Sirtuin 3 | 0.487 | 0.036 | Down | 57 |
| | <i>Lpl</i> | Lipoprotein lipase | 5.12 | 0.009 | Up | 49 |
| Anti-Apoptotic function | <i>Ucp2</i> | Uncoupling protein 2 | 2.121 | 0.042 | Up | 58 |
| | <i>Src</i> | Rous sarcoma oncogene | 3.755 | 0.025 | Up | 59 |
| | <i>Fgr</i> | Gardner-Rasheed feline sarcoma viral (Fgr) oncogene homolog | 3.142 | 0.004 | Up | 60 |

表 7 : 腫瘍組織に有意な発現変化を認めた NASH 肝発癌に関連した遺伝子群. $p < 0.05$ vs CCl₄ 群

| Relation | Gene symbol | Gene name (description) | Fold change | P-value | Regulation | reference |
|--------------------------|---------------|--|-------------|---------|------------|-----------|
| Hepatocellular carcinoma | <i>Fam83e</i> | Family with sequence similarity 83, member E | 9.419 | 0.004 | Up | 61 |
| | <i>Src</i> | Rous sarcoma oncogene | 3.755 | 0.003 | Up | 62 |
| NAFLD | <i>Lpl</i> | Lipoprotein lipase | 3.790 | 0.048 | Up | 49 |
| Hepatic fibrosis | <i>Lepr</i> | Leptin receptor | 2.455 | 0.033 | Up | 51 |

3-8. リアルタイム PCR による NASH 発癌に関連する遺伝子発現解析

図 19 は, リアルタイム PCR 解析の結果を示す. マイクロアレイ解析により検出された 3 つの遺伝子 (*Lpl*, *Lepr*, *Src*) をリアルタイム PCR による解析では, CCl₄ 群と比較して T09 + CCl₄ 群は遺伝子発現が有意に増加していた.

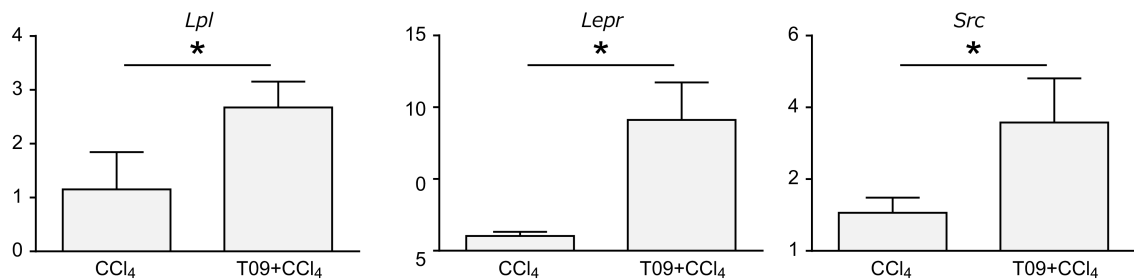


図 19 : 腫瘍組織におけるマイクロアレイ解析で有意な発現変化を認めた *Lpl*, *Lepr*, *Src* の遺伝子についての qPCR での発現変化.

Mean ± SD, n = 5, $p < 0.05$ vs the CCl₄ group.

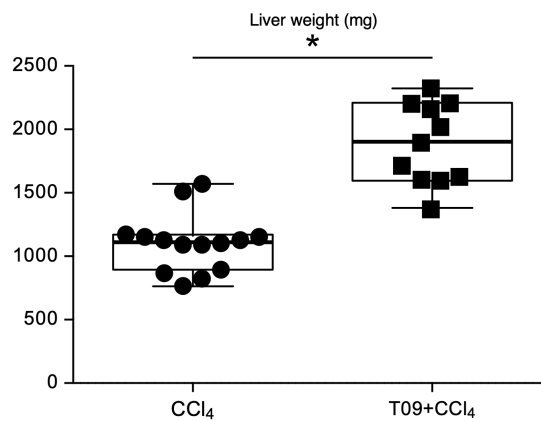


図 20 : 24 週時点における肝臓重量

CCl₄ 群と T09 + CCl₄ 群における肝臓重量の評価. Mean ± SD, n = 9, Mann-Whitney U test, $p < 0.05$ vs the CCl₄ group.

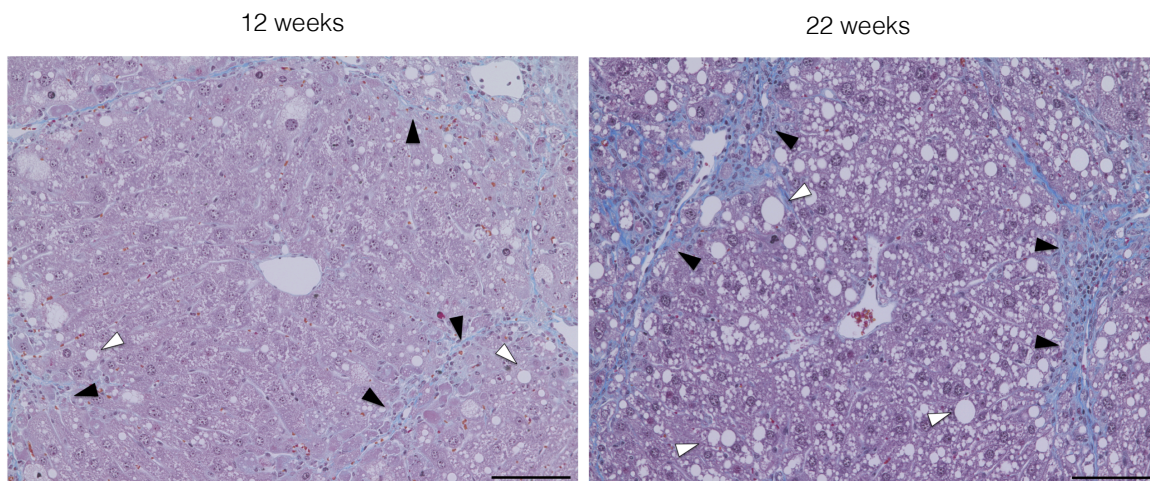


図 21 : T09 + CCl₄群の 12 週及び 22 週における肝臓組織評価.

MT 染色による評価では 12 週では線維化の程度が低い. 白矢頭 : 脂肪変性, 黒矢頭 : 線維化. Bars: 100 μm.

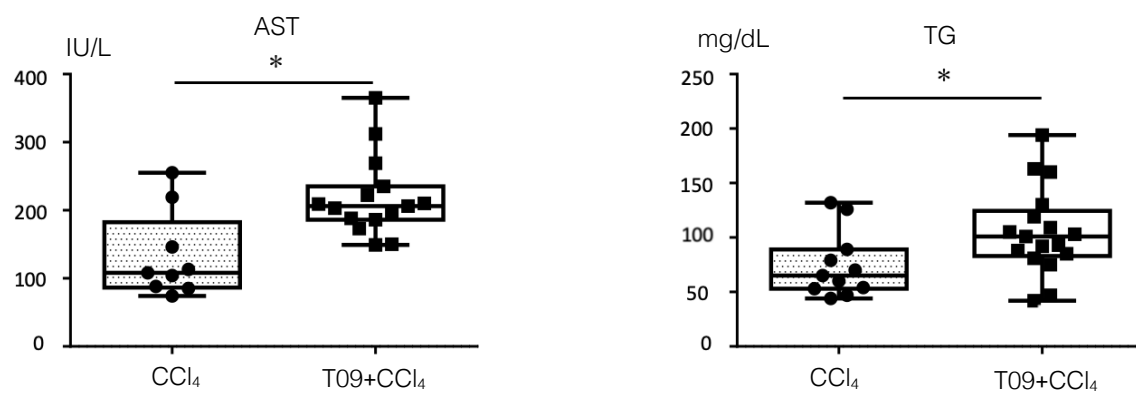


図 22 : AST 及び TG の生化学評価.

CCl₄ 群と T09 + CCl₄ 群における AST と TG の評価. Mean ± SD, n = 9, Mann-Whitney U test, $p < 0.05$ vs CCl₄ group.

4. 考察

本研究では, NASH がメタボリックシンドロームの肝臓における表現型であるという点から, その代謝異常を反映し, NASH の肝臓病理組織診断を満たした肝発癌モデル動物の作成を目指した. 着目したのは, NASH 患者で認められる脂肪肝炎の所見についてである. 特徴的な肝臓の病理所見である大滴性脂肪沈着は, TG が細胞内に過剰に取り込まれることにより生じる. この大滴性脂肪沈着は NASH の病態進行に重要な役割を果たしていると考えられており, FXR や PPAR および LXR などのいくつかの核内受容体の活性化によって引き起こされるとされている.^{63,64} 実際の臨床でも NASH 患者において, LXR が脂質生成の誘導を介して大滴性脂肪沈着に影響を与えているという報告がある.^{37,65} そこで, 高脂肪食摂食下において LXR アゴニストと酸化ストレスとして CCl₄ を 24 週間投与することで, NASH に関連した肝発癌を再現できるかについて評価した.

本研究において作成された T09 + CCl₄ 群のマウスは体重減少を示さず, NASH 研究で汎用されている MCD マウスの様な飢餓モデルではないことが分かった. また, 肝体重比が高く, 正常な肝臓の外観と比べて, 肝臓表面は粗造白色調となっており, 肝臓の線維化を伴う脂肪肝炎を反映した肉眼所見となっていた. 肝表面には, 肉眼的に多数の腫瘤形成を認めたが, CCl₄ 群では投与されていなかった LXR アゴニストが肝臓における腫瘍形成に影響していると考えた. しかし, LXR アゴニストには発癌抑制効果を有するとの報告もある. Xiong らは, T0901317 が HCC 細胞株由来の異種移植片において HCC の発生を抑制することを報告しているが, T0901317 の使用量は 25mg/kg/日であり, 本研究で使用した量の 10 倍であった.⁶⁶ つまり, T09 + CCl₄ 群で腫瘤が多発した原因としては, T0901317 による抗腫瘍効果に比べて, LXR アゴニストと高脂肪食負荷による脂質代謝異常と CCl₄ 投与による酸化ストレスによる負荷が強かったことが一因であると考えた.

臨床において NASH を診断する際に肝生検標本の組織学的所見が重視される. NAFLD activity score と線維化の程度を 2 群間で比較し, LXR 投与による影響を評価した. T09 + CCl₄ 群では, ヒト NASH において特異的な組織学的所見である肝細胞風船様変性

とマロリーデンク小体が観察され, 有意に NAFLD activity score が高かった. Ahn らは, NASH 患者において LXR 発現の程度が小葉の炎症, 肝細胞風船様変性, NAFLD activity score, 線維化の程度と正の相関があることを報告している.³⁷ 強制的に LXR アゴニストを投与し, LXR を刺激したことで NASH 患者に同様に病理所見が認められた本研究の結果と矛盾しない結果であり, NASH における LXR の重要性を示唆するものであった. さらに, 酸化ストレスマーカーである 4HNE の免疫染色の結果では, T09 + CCl₄ 群では中心静脈領域 (zone 3) に観察された. ヒト NASH における線維化は, 中心静脈領域 (zone 3) から拡大していくという特徴があるが, 同じ zone 3 に酸化ストレスの局在があることから, 酸化ストレスが線維化に関係している可能性がある.⁶⁷ また, 線維化の程度については LXR アゴニストの投与されている T09 + CCl₄ 群でより強い線維化が確認された. その理由としては, 高脂肪食と LXR アゴニストが継続的に投与されたことに伴う脂質代謝異常と酸化ストレスの増大が影響していることが原因と考えられた. そのメカニズムとして非生理的な LXR の活性化が異常な脂質代謝をもたらし, 遊離脂肪酸がマクロファージに作用するという機序が考えられる. LXR アゴニストが SREBP1c, ChREBP, およびそれらの標的である FASN や SCD1 の発現を誘導することにより, 脂肪酸合成が促進され, その過程で発生する遊離脂肪酸は肝内マクロファージを炎症性 M1 型に変化させる. そして, 炎症による肝細胞障害に伴うサイトカインの放出を介して肝星細胞が活性化し, 結果として線維化が生じたという報告があり, この機序により線維化が生じている可能性がある.⁶⁸ 以上より LXR アゴニストによる脂質代謝異常を介して, より強い炎症を惹起することにより, 肝臓病理所見がヒト NASH に類似した可能性が考えられた.

NASH を含む NAFLD はメタボリックシンドロームと密接に関連していることから, 各種の代謝異常が生じている.^{69,70} そこで, 肝臓における脂質代謝異常を評価するために, 肝臓内のマクロファージ遊走を F4/80 染色で評価した. 脂質代謝に異常がある条件下では, 肝臓内に過剰な脂質流入を引き起こし, 直接的な脂質毒性や活性酸素の発生を引き起こすことで crown like cell という脂肪組織の周囲にマクロファージが取り囲む特徴的

な所見が観察される。^{71,72} 本研究においても, T09 + CCl₄ 群で肝臓に crown like cell が観察され, ヒト NASH 患者でも観察される異常な脂質代謝が生じていることが想定された。また, ウェスタンブロッティングによるタンパク発現解析では, 脂肪酸の de novo 合成を行う FASN とグリコーゲン合成の主要な酵素である GSK-3 の発現増加を認めた。大量に脂肪酸の de novo 合成が行われることで, 脂肪組織の慢性炎症やインスリン抵抗性が生じ^{73,74}, 脂肪の in / out balance の喪失をもたらすことで, 脂質及び糖質のホメオスタシスを乱した可能性がある。^{75,76,77} ITT ではインスリン抵抗性の上昇が認められ, 実際に糖質ホメオスタシスの異常が生じていることが確認された。これらの結果は, LXR アゴニストと高脂肪食により糖質及び脂質のホメオスタシスが破綻し, NASH の病因を再現する重要な因子となった可能性がある。

NASH 患者は脂肪肝患者と比較して, HCC を発症するリスクが高い。⁷⁸ 臨床的に, NASH に関連した HCC は中等度または高分化型と診断されることが多く, その診断は習熟した病理医であっても困難な場合も多い。⁷ 本研究では, 腫瘍を正確に評価するために, CD34, AFP および Glypican3 による免疫染色を行った。HCC は多血性腫瘍であり血管内皮を多く含むため, 血管内皮細胞で陽性となる CD34 免疫染色を行うことで, 高分化型 HCC の評価が可能である。⁷⁹ さらに, Glypican3 と AFP を組み合わせることで高分化型 HCC と腺腫を正確に区別するのに有用である。T09 + CCl₄ 群の肝臓に発生した多発腫瘍は CD34, AFP および Glypican3 の免疫染色により, 良性腫瘍ではなく高分化型 HCC に相当すると評価した。

臨床において NASH に関連した HCC の報告では, 癌組織における ERK シグナル伝達が亢進していることが指摘されている。⁸⁰ ERK シグナル伝達経路は通常, 細胞外シグナルを伝達し, 増殖, 分化および細胞生存を含む基本的な細胞プロセスを制御する。⁸¹ 一方で ERK シグナル伝達異常は, 細胞周期の調節を担う Cyclin D1 などの癌遺伝子の過剰発現を介して肝臓における発癌を誘導する可能性がある。⁸² 本研究では, ウェスタンブロット法により, ERK と Cyclin D1 の両方のタンパク質発現が増加していることを確認し

た. さらにストレス応答反応に重要な役割を果たす p38 MAPK のタンパク質発現の低下を認めた. p38 MAPK によるストレス応答が正常に行われない条件下では, 腫瘍の増殖を促進するという報告もある.^{83,84} タンパク質発現解析からは ERK, Cyclin D1 及び p38 MAPK の異常な発現変化に伴い, T09 + CCl₄ 群のマウスにおける異常な細胞外シグナル及び不適切なストレス応答が肝臓における発癌に寄与していると推測された.

T09 + CCl₄ 群と CCl₄ 群における非腫瘍組織を比較したマイクロアレイによる網羅的解析では, 酸化ストレス, 線維化や炎症といった NASH の病因や病態に関連する遺伝子群の発現が有意に上昇していた (表 4). また T09 + CCl₄ 群と CCl₄ 群の腫瘍組織のマイクロアレイ解析では, Raf1 / Ampk シグナル伝達に関与する *Src* と *Fam83e* の発現が増加していた (表 5). また, 癌抑制遺伝子の *Bcl2*, *Wt1* や *integrin* の低下と癌遺伝子の *sox9* や *ras* の上昇があることから異常な細胞増殖が起こっている可能性がある. 実際に, これらの変化は臨床における HCC の遺伝子解析でも報告されている.⁸⁵ また, 腫瘍組織では, *Lpl* や *Ucp2* などの NASH 関連遺伝子の発現が増加しており, 腫瘍組織でも NASH 組織における遺伝子変化を有していた. さらに, T09 + CCl₄ 群では, NASH に関連した発癌に関係する 3 つの遺伝子 (*Lpl*, *Lepr*, *Src*) の発現が有意に上昇していることを確認した (図 19). *Lpl* は脂質代謝に関連しており, その過剰発現は肝臓特異的なインスリン抵抗性を引き起こし, 肝臓における TG の蓄積を引き起こす.⁸⁶ また, レプチンは食欲および体重を調節し, その受容体である *Lepr* は, NASH における肝線維化およびインスリン抵抗性と正の相関があることが報告されている.⁵¹ *Src* は RAS / RAF / MEK / ERK シグナルに関連する重要なメッセンジャーであり, 増殖や分化, 癌における浸潤, 転移, 血管新生に重要な役割を果たしている.⁸⁷ 本研究でも ERK タンパク質発現上昇も認められていることから, RAS / RAF / MEK / ERK 経路が肝発癌での重要な役割を果たしている可能性がある. このように, NASH や肝癌の発生に関連するいくつかの遺伝子の発現が増加しており, ヒト NASH に関連した HCC における遺伝子と類似した発現が認められた.

今回作成されたモデル動物は、ヒト NASH の発症機序として提唱されている multiple hit theory に矛盾しないものと考えている。本研究において、高脂肪食と酸化ストレス及び LXR アゴニストにより代謝異常に伴う酸化ストレスが全身性に脂肪組織や肝臓に炎症を惹起し、全身性に parallel に病態を進行させたと考えられる。Two-hit theory における過食などにより first-hit として脂肪肝が形成された後に second-hit として酸化ストレスなどの影響が加わった訳ではなく、最初から脂質過酸化、酸化ストレスやインスリン抵抗性といった種々の因子の影響が加わっている。複数の刺激が同時に投与され、同時進行で病態が進んでいく parallel な状態であり、近年提唱されている multiple hit theory に病態が近いと考えられた。

本研究の主な限界点として3点が挙げられる。第一に、肝臓での発癌がいつ始まったかを評価できなかった点である。肝発癌がいつから始まったかを調べるために、12週齢と22週齢において肝臓を評価した。22週齢のマウスと比較して、12週齢のマウスは比較的正常な肝細胞と類洞構造を示していたが、22週齢のマウスにおいては正常構造が破壊され、線維化が高度であった。(図21)さらに、67%のマウスに肝臓に腫瘍が認められた。しかし、これらの腫瘍はCD34免疫染色で染色されず、良性腫瘍であると考えられた。つまり、22週齢の時点におけるマウスの肝臓は病理学的にNASHの特徴を示したが、肝発癌は起こしておらず、実際の癌化がいつ始まったのかは不明であった。第二に、肝発癌のきっかけは不明という点である。今回確認されたデータから肝発癌に至る機序がいくつか想定されるが、明確な発症機序については不明であった。その1つの機序として考えられるのは、インスリン抵抗性と酸化ストレスから発癌に至る機序である。インスリン抵抗性がERKの異常な増加を起し、癌細胞への形質転化を招き、アポトーシスの抑制をもたらす。またCCl₄投与に加えて脂質代謝異常に伴う強い酸化ストレスがDNA障害を起し肝臓に発癌を起こす要因となる。実際にERKが発癌のkey factorとなっているかについては、今後ERK阻害剤を投与したモデルによる検討が必要である。第三に、ヒトNASHの病態において発癌後は転移や腫瘍の進展に伴う死亡という結果を招くが、30週

まで T09 + CCl₄ 群の観察を継続しても転移や腫瘍の進展に伴う生存率の低下は認められなかったという点である。理由として考えられるのは、出来た腫瘍は高分化型であることに加えて、T0901317 自体にも抗腫瘍効果があるためである。T0901317 を含めた LXR アゴニストには、樹状細胞や腫瘍細胞そのものに作用し、免疫システムと癌の微小環境に影響を与え、発癌を抑える可能性が指摘されている。⁸⁸ 肝臓においては、脂質代謝異常と酸化ストレスの過剰な刺激により異常な細胞増殖が起こり、肝細胞癌が発生したと考えられるが、抗腫瘍効果のある LXR アゴニストが全身に投与されているために他臓器への転移は起こらなかった可能性がある。抗腫瘍効果の詳細なメカニズムが解明されれば、それを減らす薬剤を投与することにより、臨床と同様の癌死などを起こす可能性があるが、未だ LXR アゴニストの抗腫瘍効果については不明な点が多い。今回の研究では、NASH に関連する肝発癌がいつ、どのようにして始まるのか、またなぜ転移や腫瘍死が発生しなかったかは不明であり、今後の研究課題である。

5. 総括

- 高脂肪食摂食下に、LXR アゴニストである T0901317 と酸化ストレスとして CCl₄ を投与することにより、24 週間で肝臓内に発癌を起こすことが分かった。
- 肝臓の背景組織は、NASH の確定診断に必要な病理所見像を満たすものであった。
- NASH の病因として考えられているインスリン抵抗性や脂質代謝異常が確認された。
- 腫瘍組織のタンパク発現解析では、ERK と Cyclin D1 シグナルの発現上昇が確認され、増殖シグナルに異常が認められた。
- マイクロアレイでの網羅的な遺伝子解析により、癌遺伝子や NASH で確認される遺伝子群の変動が認められた。

6. 結論

24 週間の LXR アゴニストと酸化ストレス, 高脂肪食を組み合わせることで, ヒト NASH と同様の肝臓病理所見をマウスで再現し, ヒト NASH 患者で認められる高分化型 HCC への進行を再現することに成功した. これらの知見は, 酸化ストレスによる脂質代謝異常や炎症が NASH に関連した肝発癌の病因と密接に関係していることを示唆していると考えられる. また, NASH における肝発癌を誘導するために 3 つの刺激を同時に 24 週間使用したが, NASH の病因として広く受け入れられている multiple hit theory の考え方に反しないものであった. ヒトにおける NASH からの肝発癌を, 病理所見, 遺伝子発現, タンパク質発現の観点からも模倣するこの NASH 発癌動物モデルは, まだ知られていない. NASH からの肝発癌に関して, 病態解明や治療薬開発の一助となる可能性がある. また HCC の進行と治療について新しい知見の発見に繋がる端緒となることを期待している.

7. 謝辞

稿を終えるにあたり, 本研究の機会を与えて頂いた, 筑波大学大学院 消化器外科学教室の前教授 大河内信弘先生, 並びに現教授 小田竜也先生に深く感謝の意を表します. そして, 本研究全般にわたり直接のご指導ご鞭撻を賜りました元講師で現筑波胃腸病院 院長 田村孝史先生に深く感謝いたします.

筑波大学大学院 糖尿病・代謝内科教授 島野先生ならび松坂先生に実験に対する温かい励ましとご助言を賜りました. ここに深謝の意を表します. 筑波大学病理学教室 前准教授で現国立がんセンター 臨床腫瘍病理分野 ユニット長 坂下慎悟先生ならびに筑波大学病理学教室 中野雅之先生には, 実験に対して適切なお助言を賜りました. 深く謝意を表します.

本教室講師 大和田洋平先生並びに本教室医局員小澤佑介先生には, 終始適切なお指導, お助言を賜りました. ここに深く感謝の意を表します.

実験助手の高橋亜子さん, ならびに本教室 医局員の釧持明先生のご協力なしに実験を遂行することは不可能でした. 感謝を申し上げます. この他にも, この論文作成にあたり, 多くの諸先輩方よりご協力, お助言, ご支援をいただきましたことに, 心より感謝を申し上げます.

最後に, 本研究を陰になり支えていただきました, 消化器外科学教室の全ての皆様に心より御礼を申し上げます.

本研究は, 日本学術振興会 (Grant Numbers 19K09162 及び 26861059) より研究助成を得たものである.

8. 利益相反

本研究に関して, 著者全員に開示すべき利益相反はない.

9. 引用文献

1. 角田圭雄. NAFLD/NASH 診療戦略 2020 ~ガイドラインからパイプラインまで~ 明日の臨床, 2020, 31(1), 1-12.
2. Ministry of Health, Labour and Welfare: National Health and Nutrition Survey (2012)
3. Ascha, M. S.; Hanouneh, I. A.; Lopez, R., The incidence and risk factors of hepatocellular carcinoma in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2010, 51 (6), 1972-8.
4. Tokushige, K.; Hashimoto, E.; Yatsuji, S., Prospective study of hepatocellular carcinoma in nonalcoholic steatohepatitis in comparison with hepatocellular carcinoma caused by chronic hepatitis C. *Journal of gastroenterology* 2010, 45 (9), 960-967.)
5. Kawamura, Y.; Arase, Y.; Ikeda, K., Large-scale long-term follow-up study of Japanese patients with non-alcoholic Fatty liver disease for the onset of hepatocellular carcinoma. *Am J Gastroenterol* 2012, 107 (2), 253-61.
6. Cholaneril G, Patel R, Khurana S, Satapathy SK. Hepatocellular carcinoma in non-alcoholic steatohepatitis: current knowledge and implications for management. *World J Hepatol* 2017; 9: 533-543.
7. Baffy G, Brunt EM, Caldwell SH. Hepatocellular carcinoma in non-alcoholic fatty liver disease: an emerging menace. *J Hepatol* 2012; 56: 1384-1391.
8. Murata S, Ohkohchi N, Matsuo R, Ikeda O, Myronovych A, Hoshi R. Platelets promote liver regeneration in early period after hepatectomy in mice. *World J Surg.* 2007 Apr;31(4):808-16.
9. Hisakura K, Murata S, Takahashi K, Matsuo R, Pak S, Ikeda N, Kawasaki T, Kohno K, Myronovych A, Nakano Y, Ikeda O, Watanabe M, Ohkohchi N. Platelets prevent acute hepatitis induced by anti-fas antibody. *J Gastroenterol Hepatol.* 2011 Feb;26(2):348-55.
10. Watanabe M, Murata S, Hashimoto I, Nakano Y, Ikeda O, Aoyagi Y, Matsuo R, Fukunaga K, Yasue H, Ohkohchi N. Platelets contribute to the reduction of liver fibrosis in mice. *J Gastroenterol Hepatol.* 2009 Jan;24(1):78-89.
11. Day CP, James OF. Steatohepatitis : a tale of two “hits”? *Gastroenterology* 1998; 114: 842-845.

12. Tilg H Evolution of inflammation in nonalcoholic steatohepatitis: the multiple parallel hits hypothesis. *Hepatology* 52:1836-1846,2010
13. Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: carbon tetrachloride as a toxicological model. Lutz WD. *Crit Rev Toxicol.* 2003;33:105-36.
14. Kirchgessner TG, Sleph P, Ostrowski J, et al. Beneficial and adverse effects of an LXR agonist on human lipid and lipoprotein metabolism and circulating neutrophils. *Cell Metab* 2016; 24: 223-233.
15. Owada Y, Tamura T, Tanoi T, et al. Novel non-alcoholic steatohepatitis model with histopathological and insulin-resistant features. *Pathol Int* 2018; 68: 12-22.
16. Calkin AC, Tontonoz P. Transcriptional integration of metabolism by the nuclear sterol-activated receptors LXR and FXR. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012 Mar 14;13(4):213-24.
17. Illy PJ, Umehono K, Ong ES, Evans RM, Heyman RA, Mangelsdorf DJ. LXR, a nuclear receptor that defines a distinct retinoid response pathway. *Genes & development.* 1995;9:1033-45.
18. Silvente-Poirot S, Poirot M. Cholesterol epoxide hydrolase and cancer. *Current opinion in pharmacology.* 2012;12:696-703.
19. Edidin M. The state of lipid rafts: from model membranes to cells. *Annual review of biophysics and biomolecular structure.* 2003;32:257-83.
20. Zhuang L, Lin J, Lu ML, Solomon KR, Freeman MR. Cholesterol-rich lipid rafts mediate akt-regulated survival in prostate cancer cells. *Cancer research.* 2002;62:2227-31.
21. Edwards PA, Ericsson J. Sterols and isoprenoids: signaling molecules derived from the cholesterol biosynthetic pathway. *Annual review of biochemistry.* 1999;68:157-85.
22. 脂質代謝調節の分子機構 佐藤隆一郎. *化学と生物* 42.5.2004. 300-308
23. Tall AR, Yvan-Charvet L, Terasaka N, Pagler T, Wang N (2008) HDL, ABC transporters, and cholesterol efflux: implications for the treatment of atherosclerosis. *Cell Metab* 7: 365-375
24. Parikh M, Patel K, Soni S, Gandhi T. Liver X receptor: a cardinal target for atherosclerosis and beyond. *Journal of atherosclerosis and thrombosis.* 2014;21:519-31.

25. Repa JJ, Mangelsdorf DJ. The liver X receptor gene team: potential new players in atherosclerosis. *Nature medicine*. 2002;8:1243-8.
26. Yasuda T, Grillot D, Billheimer JT, Briand F, Delerive P, Huet S, et al. Tissue-specific liver X receptor activation promotes macrophage reverse cholesterol transport in vivo. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2010;30:781-6.
27. Joseph SB, McKilligin E, Pei L, Watson MA, Collins AR, Laffitte BA, et al. Synthetic LXR ligand inhibits the development of atherosclerosis in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002;99:7604-9.
28. Peng D, Hiipakka RA, Xie JT, Dai Q, Kokontis JM, Reardon CA, et al. A novel potent synthetic steroidal liver X receptor agonist lowers plasma cholesterol and triglycerides and reduces atherosclerosis in LDLR(-/-) mice. *British journal of pharmacology*. 2011;162:1792-804.
29. Schultz J R, Tu H, Luk A, et al. Role of LXRs in control of lipogenesis[J]. *Genes & development*, 2000, 14(22): 2831-2838.
30. Kumar N, Solt L A, Conkright J J, et al. The benzenesulfoamide T0901317 [N-(2, 2, 2-trifluoroethyl)-N-[4-[2, 2, 2-trifluoro-1-hydroxy-1-(trifluoromethyl) ethyl] phenyl]-benzenesulfonamide] is a novel retinoic acid receptor-related orphan receptor- α/γ inverse agonist[J]. *Molecular pharmacology*, 2010, 77(2): 228-236.
31. Mitro N, Vargas L, Romeo R, et al. T0901317 is a potent PXR ligand: Implications for the biology ascribed to LXR. *FEBS Lett*. 2007 May 1;581(9):1721-6.
32. Willson TM, Kliewer SA. PXR, CAR and drug metabolism. *Nat Rev Drug Discov*. 2002; 1:259– 266.
33. Tolson AH, Wang H. Regulation of drug-metabolizing enzymes by xenobiotic receptors: PXR and CAR. *Adv Drug Deliv Rev*. 2010; 62:1238–1249.
34. Griffiths WJ, Wang Y. Oxysterols as lipid mediators: Their biosynthetic genes, enzymes and metabolites. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2020 Apr;147:106381.
35. Janowski BA, Willy PJ, Devi TR, et al. An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR alpha. *Nature*. 1996 Oct 24;383(6602):728-31.

36. Cayman Chemical Co., Product Information of T0901317.
37. Ahn SB, Jang K, Jun DW, Lee BH, Shin KJ. Expression of liver X receptor correlates with intrahepatic inflammation and fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Dig Dis Sci* 2014; 59: 2975-2982.
38. Pekow JR, Bhan AK, Zheng H, Chung RT. Hepatic steatosis is associated with increased frequency of hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis C-related cirrhosis. *Cancer* 2007; 109: 2490-2496.
39. Baud V, Karin M. Is NF-kappaB a good target for cancer therapy? Hopes and pitfalls. *Nat Rev Drug Discov* 2009; 8: 33-40.
40. Wang SN, Yang SF, Tsai HH, Lee KT, Yeh YT. Increased adiponectin associated with poor survival in hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol* 2014; 49: 1342-1351.
41. Chen MJ, Yeh YT, Lee KT, Tsai CJ, Lee HH, Wang SN. The promoting effect of adiponectin in hepatocellular carcinoma. *J Surg Oncol* 2012; 106: 181-187.
42. Rasband WS. ImageJ. Bethesda, Maryland: National Institutes of Health, 1997-2015.
43. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and β -cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985; 28: 412-419.
44. Ogawa Y, Imajo K, Yoneda M, et al. Soluble CD14 levels reflect liver inflammation in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *PLoS One*. 2013 Jun 7;8(6):e65211.
45. Iguchi E, Takai A, Takeda H, et al. DNA methyltransferase 3B plays a protective role against hepatocarcinogenesis caused by chronic inflammation via maintaining mitochondrial homeostasis. *Sci Rep* 10, 21268 (2020).
46. Zhou SG, Wang P, Pi RB, et al. Reduced expression of GSTM2 and increased oxidative stress in spontaneously hypertensive rat. *Mol Cell Biochem* 309, 99–107 (2008).
47. Xu G, Han X, Yuan G, et al. Screening for the protective effect target of deproteinized extract of calf blood and its mechanisms in mice with CCl4-induced acute liver injury. *PLoS One*. 2017 Jul 10;12(7)
48. Tillander V, Alexson SEH, Cohen DE. Deactivating Fatty Acids: Acyl-CoA Thioesterase-

- Mediated Control of Lipid Metabolism. *Trends Endocrinol Metab.* 2017 Jul;28(7):473-484.
49. Teratani T, Tomita K, Furuhashi H, et al. Lipoprotein Lipase Up-regulation in Hepatic Stellate Cells Exacerbates Liver Fibrosis in Nonalcoholic Steatohepatitis in Mice. *Hepatology Commun.* 2019 Jun 6;3(8):1098-1112.
 50. Zhang XW, Zhou JC, Peng D, et al. Disrupting the TRIB3-SQSTM1 interaction reduces liver fibrosis by restoring autophagy and suppressing exosome-mediated HSC activation. *Autophagy.* 2020 May;16(5):782-796.
 51. Medici V, Ali MR, Seo S et al. Increased soluble leptin receptor levels in morbidly obese patients with insulin resistance and nonalcoholic fatty liver disease. *Obesity* 2010; 18: 2268–73.
 52. Pejnovic N, Jeftic I, Jovicic N, et al. Galectin-3 and IL-33/ST2 axis roles and interplay in diet-induced steatohepatitis. *World J Gastroenterol.* 2016 Nov 28;22(44):9706-9717.
 53. Takeo M, Kobayashi Y, Fujita N, et al. Upregulation of transferrin receptor 2 and ferroportin 1 mRNA in the liver of patients with chronic hepatitis C. *J Gastroenterol Hepatol.* 2005 Apr;20(4):562-9.
 54. Mancardi DA, Iannascoli B, Hoos S, et al. FcγRIIb is a mouse IgE receptor that resembles macrophage FcεRI in humans and promotes IgE-induced lung inflammation. *J Clin Invest.* 2008 Nov;118(11):3738-50.
 55. Aran G, Sanjurjo L, Bárcena C, et al. CD5L is upregulated in hepatocellular carcinoma and promotes liver cancer cell proliferation and antiapoptotic responses by binding to HSPA5 (GRP78). *FASEB J.* 2018 Jul;32(7):3878-3891.
 56. Udali S, Guarini P, Ruzzenente A, et al. DNA methylation and gene expression profiles show novel regulatory pathways in hepatocellular carcinoma. *Clin Epigenet* 7, 43 (2015).
 57. Zhang B, Qin L, Zhou CJ, et al. SIRT3 expression in hepatocellular carcinoma and its impact on proliferation and invasion of hepatoma cells. *Asian Pac J Trop Med.* 2013 Aug;6(8):649-52.
 58. Jiang Y, Zhang H, Dong LY, et al. Increased hepatic UCP2 expression in rats with nonalcoholic steatohepatitis is associated with upregulation of Sp1 binding to its motif

- within the proximal promoter region. *J Cell Biochem.* 2008 Sep 1;105(1):277-89.
59. Park SS, Eom YW, Kim EH, et al. Involvement of c-Src kinase in the regulation of TGF-beta1-induced apoptosis. *Oncogene.* 2004 Aug 19;23(37):6272-81.
 60. Kim HS, Han HD, Armaiz-Pena GN, et al. Functional roles of Src and Fgr in ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2011 Apr 1;17(7):1713-21.
 61. Cipriano R, Miskimen KL, Bryson BL, Foy CR, Bartel CA, Jackson MW. Conserved oncogenic behavior of the FAM83 family regulates MAPK signaling in human cancer. *Mol Cancer Res.* 2014;12(8):1156-1165. doi:10.1158/1541-7786.MCR-13-0289
 62. Walker S, Wankell M, Ho V, et al. Targeting mTOR and Src restricts hepatocellular carcinoma growth in a novel murine liver cancer model. *PLoS One.* 2019 Feb 22;14(2)
 63. Singh S, Allen AM, Wang Z, Prokop LJ, Murad MH, Loomba R. Fibrosis progression in nonalcoholic fatty liver vs nonalcoholic steatohepatitis: a systematic review and meta-analysis of paired-biopsy studies. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2015; 13: 643-654.e641-649; quiz e639-640.
 64. Cave MC, Clair HB, Hardesty JE, et al. Nuclear receptors and nonalcoholic fatty liver disease. *Biochim Biophys Acta* 2016; 1859: 1083-1099.
 65. Zhou J, Febbraio M, Wada T, et al. Hepatic fatty acid transporter Cd36 is a common target of LXR, PXR, and PPARgamma in promoting steatosis. *Gastroenterology* 2008; 134: 556-567.
 66. Xiong T, Li Z, Huang X, et al. TO901317 inhibits the development of hepatocellular carcinoma by LXRalpha/Glut1 decreasing glycometabolism. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2019; 316: G598-G607.
 67. Takahashi Y, Fukusato T. Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *World J Gastroenterol* 2014; 20: 15539-15548.
 68. Nada P, Llija J, Nemanja J, et al. Galectin-3 and IL-33/ST2 axis roles and interplay in diet-induced steatohepatitis. *World J Gastroenterol* 2016; 22: 9706-9717.
 69. Liu W, Baker RD, Bhatia T, Zhu L, Baker SS. Pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Cell Mol Life Sci* 2016; 73: 1969-1987.
 70. Marchesini G, Bugianesi E, Forlani G, et al. Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis, and the

- metabolic syndrome. *Hepatology* 2003; 37: 917-923.
71. McClain CJ, Barve S, Deaciuc I. Good fat/bad fat. *Hepatology* 2007; 45: 1343-1346.
 72. Itoh M, Suganami T, Nakagawa N, et al. Melanocortin 4 receptor-deficient mice as a novel mouse model of nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Pathol* 2011; 179: 2454-2463.
 73. Kadowaki T, Yamauchi T, Kubota N, Hara K, Ueki K, Tobe K. Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. *J Clin Invest* 2006; 116: 1784-1792.
 74. Sanyal AJ, Campbell-Sargent C, Mirshahi F, et al. Nonalcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. *Gastroenterology* 2001; 120: 1183-1192.
 75. Bessone F, Razori MV, Roma MG. Molecular pathways of nonalcoholic fatty liver disease development and progression. *Cell Mol Life Sci* 2019; 76: 99-128.
 76. Muscat GE, Wagner BL, Hou J, et al. Regulation of cholesterol homeostasis and lipid metabolism in skeletal muscle by liver X receptors. *J Biol Chem* 2002; 277: 40722-40728.
 77. Lee J, Kim MS. The role of GSK3 in glucose homeostasis and the development of insulin resistance. *Diabetes Res Clin Pract* 2007; 77: S49-S57.
 78. Sun B, Karin M. Obesity, inflammation, and liver cancer. *J Hepatol* 2012; 56: 704-713.
 79. Wang F, Jing X, Wang T, et al. Differential diagnostic value of GPC3-CD34 combined staining in small liver nodules with diameter less than 3 cm. *Am J Clin Pathol* 2012; 137: 937-945.
 80. Tsuboi Y, Ichida T, Sugitani S, et al. Overexpression of extracellular signal-regulated protein kinase and its correlation with proliferation in human hepatocellular carcinoma. *Liver Int* 2004; 24: 432-436.
 81. Kolch W. Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem J* 2000; 351 Pt 2: 289-305.
 82. Patil MA, Lee SA, Macias E, et al. Role of cyclin D1 as a mediator of c-Met- and beta-catenin-induced hepatocarcinogenesis. *Cancer Res* 2009; 69: 253-261.
 83. Gutierrez-Uzquiza A, Arechederra M, Bragado P, Aguirre-Ghiso JA, Porras A. p38alpha

mediates cell survival in response to oxidative stress via induction of antioxidant genes: effect on the p70S6K pathway. *J Biol Chem* 2012; 287: 2632-2642.

84. Igea A, Nebreda AR. The stress kinase p38alpha as a target for cancer therapy. *Cancer Res* 2015; 75: 3997-4002.
85. Cipriano R, Miskimen KL, Bryson BL, Foy CR, Bartel CA, Jackson MW. Conserved oncogenic behavior of the FAM83 family regulates MAPK signaling in human cancer. *Mol Cancer Res* 2014; 12: 1156-1165.
86. Kim JK, Fillmore JJ, Chen Y, et al. Tissue-specific overexpression of lipoprotein lipase causes tissue-specific insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 7522-7527.
87. Wheeler DL, Iida M, Dunn EF. The role of Src in solid tumors. *Oncologist* 2009; 14: 667-678.
88. Lin CY, Gustafsson JA. Targeting liver X receptors in cancer therapeutics. *Nat Rev Cancer* 2015; 15: 216-224.