

筑波大学

博士（医学）学位論文

脂肪性肝炎モデル “*p62* および *Nrf2* 二重欠失マウス
(DKO) ” に対するレドックスナノ粒子 (SMAP^oTN)
の肝線維化, 肝発癌抑制効果の検証と機序の解明

2 0 2 2

筑波大学大学院博士課程人間総合科学研究科

綿引 隆久

原典論文の再利用 (Re-use) について

この学位論文は,

題名 Antioxidative Self-assembling Nanoparticles Attenuate the Development of Steatohepatitis and Inhibit Hepatocarcinogenesis in Mice

著者 Takahisa Watahiki, Kosuke Okada, Ikuru Miura, Keii To, Seiya Tanaka, Eiji Warabi, Naomi Kanno, Kenji Yamagata, Naohiro Gotoh, Hideo Suzuki, Shunichi Ariizumi, Kiichiro Tsuchiya, Yukio Nagasaki, Junichi Shoda. *Antioxidants*. 11(10), 1939, 2022.

DOI: 10.3390/antiox11101939

の内容を MDPI 社の規定に従って再利用している

目次

| | |
|--|----|
| 略語 | 6 |
| 第1章 背景 | 10 |
| 1.1. 生活習慣病と非アルコール性脂肪性肝炎 | |
| 1.2. NASH と NASH 関連肝癌の疫学 | |
| 1.3. Antioxidative self-assembling nanoparticle (SMAP _o ^{TN}) | |
| 1.4. 新たな NASH モデルマウスの作製 | |
| 第2章 目的 | 16 |
| 第3章 実験方法 | 17 |
| 3.1. 試薬 | |
| 3.2. 実験動物 | |
| 3.3. SMAP _o ^{TN} の調製と薬物動態 | |
| 3.4. 生化学的解析 | |
| 3.5. 病理学的解析 | |
| 3.6. イムのプロット解析 | |
| 3.7. RNA の抽出 | |
| 3.8. 定量的 real-time PCR (qRT-PCR) | |
| 3.9. RNA sequence (RNA-seq 解析) | |
| 3.10. 肝組織における TG および FFA 濃度と FA 組成 | |
| 3.11. 血清, 糞便 LPS 濃度の測定 | |
| 3.12. 腸内細菌叢解析 | |
| 3.13. 統計解析 | |
| 第4章 結果 | 27 |
| 4.1. SMAP _o ^{TN} は消化管を介して肝臓に滞留する | |
| 4.2. SMAP _o ^{TN} は肝線維化と肝癌発症を抑制する | |
| 4.3. SMAP _o ^{TN} は, 肝臓の酸化ストレス, 炎症シグナル伝達, 肝線維化関連因子を抑制する | |
| 4.4. 脂肪性肝炎の肝における中性脂肪と脂肪酸 | |

| | |
|---|-----------|
| 4.5. NASH, HCC の発症に対する SMAP ₀ ^{TN} の有効性を評価するための肝組織を用いた RNA-seq 解析 | |
| 4.6. SMAP ₀ ^{TN} は ER ストレス pathway 関連遺伝子の発現を抑制する | |
| 4.7. SMAP ₀ ^{TN} は Cancer driver gene と PI3K-Akt シグナリングを含む Cancer pathway gene の発現を抑制する | |
| 4.8. SMAP ₀ ^{TN} は腸内細菌叢の種多様性を改善し, 腸内細菌叢の組成を変化させることにより, LPS 減少させる | |
| 第 5 章 考察 | 48 |
| 5.1. DKO マウスの NASH モデル, HCC モデルとしての特性 | |
| 5.2. 抗酸化剤 SMAP ₀ ^{TN} の特性 | |
| 5.3. SMAP ₀ ^{TN} の ER ストレスに対する作用 | |
| 5.4. 肝臓に対する SMAP ₀ ^{TN} の効果 | |
| 5.5. SMAP ₀ ^{TN} は PI 3K -Akt signaling pathway 関連遺伝子を抑制する | |
| 5.6. SMAP ₀ ^{TN} の腸内細菌叢に対する作用 | |
| 第 6 章 結語 | 53 |
| 謝辞 | 54 |
| 引用文献 | 56 |

略語

本文中には以下の略語を用いた.

| | |
|--------------|--|
| Ab | antibody |
| ALT | alanine aminotransferase |
| ANOVA | analysis of variance |
| AST | aspartate aminotransferase |
| α Sma | Alpha-smooth muscle actin |
| DEN | diethylnitrosamine |
| DKO | double-knockout |
| EU | endotoxin units |
| FA | fatty acid |
| FFA | free fatty acid |
| GAPDH | glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase |
| GSH | Glutathione-SH |
| GSSG | Glutathione-S-S-Glutathione |
| H&E | hematoxylin-eosin |
| HCC | Hepatocellular carcinoma |
| HDL-CHO | high-density lipoprotein-cholesterol |
| HEL | hexanoyl-lysine |
| HFD | high fat diet |
| Il | interleukin |
| IVIS | in vivo imaging system |
| JNK | C-Jun-NH ₂ -terminal kinase |

| | |
|---------------------------------|--|
| Keap1 | Kelch-like ECH-associated protein1 |
| KO | knockout |
| LBP | LPS-binding protein |
| LDL-CHO | low-density lipoprotein-cholesterol |
| LPS | lipopolysaccharide |
| MDA | Malondialdehyde |
| MW | Molecular weight |
| NAFLD | nonalcoholic fatty liver disease |
| NASH | nonalcoholic steatohepatitis |
| NC | normal chow |
| NEFA | non esterified fatty acid |
| NF- κ B | nuclear factor-kappa B |
| Nrf2 | nuclear factor erythroid 2-related factor 2 |
| OS | Oxidative stress |
| OTU | Operational Taxonomic |
| PB1 | Phox and Bem1p |
| PSMA | poly (styrene-co-maleic acid) co polymer |
| QIIME | Quantitative Insights Into Microbial Ecology |
| Pten | phosphatase and tensin homolog |
| qRT-PCR | quantitative real-time polymerase chain reaction |
| ROS | reactive oxygen species |
| SMAP ₀ ^{TN} | antioxidative self-assembling nanoparticles |
| SOD | Superoxide dismutase |
| SQSTM1 | sequestosome 1 |

| | |
|----------------|--|
| TBARS | thiobarbituric acid reactive substances |
| TEMPOL | 1-Oxyl-2,2,6,6-tetramethyl-4-hydroxypiperidine |
| Tgf- β 1 | transforming Growth Factor- β 1 |
| THF | tetrahydrofuran anhydrous |
| Tlr | toll-like receptor |
| Tnf- α | tumor necrosis factor- α |
| TPM | Transcripts per million |
| UPR | unfolded protein response |
| WT | wild type |

■ 要旨

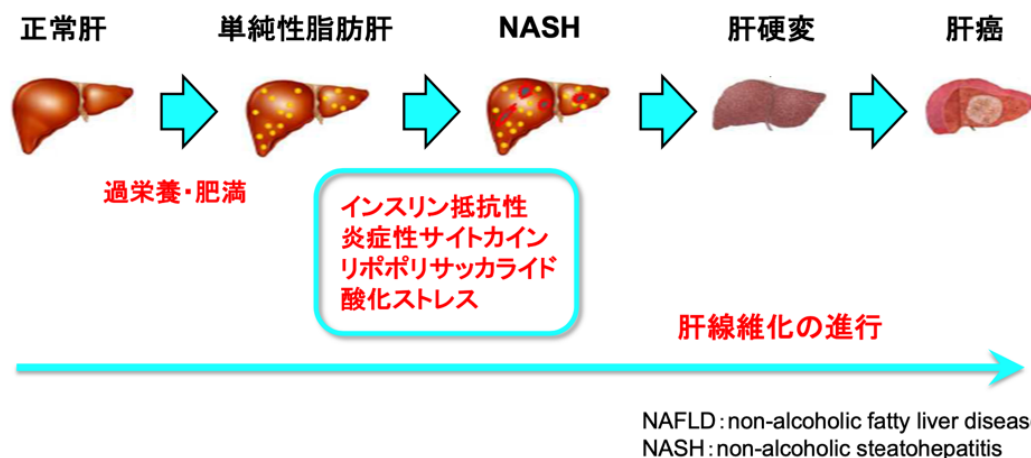
酸化ストレス (OS) は, 非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) の発症と肝発癌に寄与する. レドックスナノ粒子 (SMAP₀^{TN}) が *p62/Sqstm1* および *Nrf2* 遺伝子二重欠失 (DKO) マウスの NASH および肝細胞癌 (HCC) の発症を減少させるかどうかを検討し, NASH および HCC に対する SMAP₀^{TN} の作用機序の解明を目的として研究を行なった. 通常食 (NASH モデル) または 60%高脂肪食 (HCC モデル) を摂餌させた雄性 DKO マウスに対して 26 週間 SMAP₀^{TN} を自由飲水投与し, NASH および HCC の発症について解析した. SMAP₀^{TN} は, 通常食群, 高脂肪食群の両群において肝硬変を抑制し, さらに SMAP₀^{TN} は高脂肪食群で HCC の発症を抑制した (0%対 33%, $p < 0.05$). SMAP₀^{TN} は酸化ストレス, 炎症性サイトカインのシグナル伝達, および肝線維化を抑制した. さらに肝組織を用いた RNA sequence 解析において, SMAP₀^{TN} は, 通常食群および高脂肪食群の ER stress pathway gene の発現を抑制し, 高脂肪食群において HCC driver gene, および Cancer pathway gene の発現を抑制した. さらに高脂肪食群では, SMAP₀^{TN} は PI3K-Akt signaling pathway gene の発現を抑制した. 高脂肪食を摂餌させた SMAP₀^{TN} 投与群において, 肝臓における血清リポ多糖 (LPS) 濃度と LPS 結合タンパク質 (LBP) のタンパク質発現は, SMAP₀^{TN} 非投与群と比較して有意に低値であった. 腸内細菌叢解析では, LPS 産生菌やプロバイオティクス関連菌を含む腸内細菌叢の組成を変化させ, 高脂肪食群において, 腸内細菌叢の種多様性を改善させた. SMAP₀^{TN} の経口投与は, NASH の進展を抑制し, DKO マウスの肝癌発症を抑制した. SMAP₀^{TN} が肝臓における ER ストレスと腸内細菌叢の双方を改善させる効果が示された. SMAP₀^{TN} は NASH だけでなく, NASH-肝癌の高リスク群に対して予防効果を発揮する新規薬物となり得ると考えられた.

第1章 背景

1.1. 生活習慣病と非アルコール性脂肪性肝炎

肥満は、循環器疾患, 2 型糖尿病 (DM), 非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) など, 様々な代謝障害や合併症を引き起こす[1, 2]. 非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) は, 脂肪肝, 炎症, 肝線維化を特徴とする, 肝硬変と肝細胞癌 (HCC) に至る進行性の肝疾患である[2, 3]. NASH と HCC の発症, 進展には複数の因子が同時に関連しており, この理論は「Multiple parallel hits theory」と呼ばれる[4] (図 A). 酸化ストレス (OS) [5, 6], 小胞体 (ER) ストレス [7], 腸内細菌由来のリポ多糖 (LPS) [8, 9], インスリン抵抗性 [3]は, 多くの Cancer driver gene と Cancer pathway gene を変化させ[10, 11], 肝癌発症と関連していることが報告されている. しかしその作用機序は未解明のままであり, NASH の肝線維化に対する治療薬として開発された薬剤は, 依然臨床応用に至っておらず[12, 13], NASH の予防法も確立されていない.

NASH では, 特定の脂質の蓄積が脂肪毒性によって肝細胞を損傷し[14], これにより活性酸素種, すなわち OS が生成され, 肝細胞の細胞死, 肝炎症, 肝線維化が誘発され, さらに肝癌発症に寄与する[15, 16]. OS は NASH の進展に関連する重要な因子であり, 複数の抗酸化剤の臨床試験が行われており, 様々な結果が報告されている[17, 18]. さらに, NASH は腸内エンドトキシン血症や腸管バリア機能異常を伴う「腸-肝連関」の悪化によって引き起こされることが多いため [19], NASH に対しては「腸-肝連関」の観点に基づいた治療戦略が必要である.

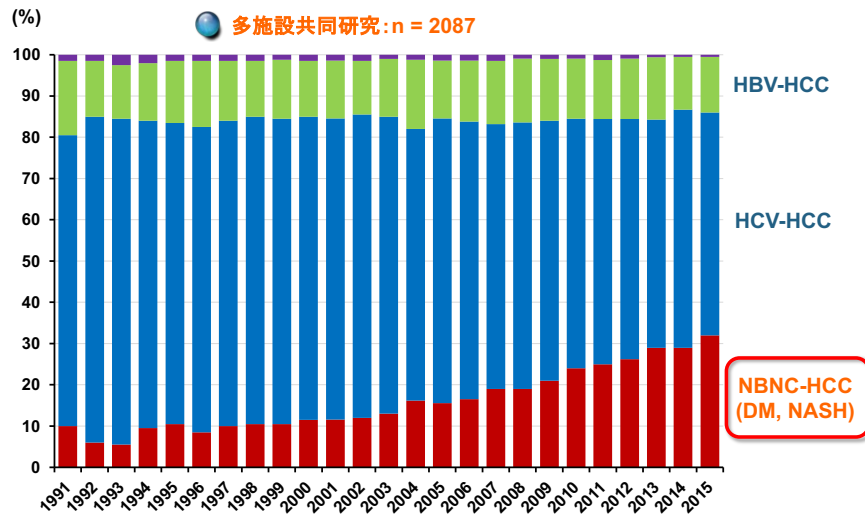


Tilg H, et al, *Hepatology*. 2010, 52, 1836-1846 より

図 A. 「Multiple parallel hits theory」に基づいた非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) の発症と進展

1.2. NASH と NASH 関連肝癌の疫学

近年本邦では、C 型肝炎の克服と肥満の増加により、ウイルス性肝炎が原因で生じる肝癌が減少傾向にあり、NASH などの生活習慣病が原因で生じる肝癌が増加傾向にある (図 B)。また近年、欧米諸国、中国、日本において NASH の罹患者が増加しており、肝癌を発症し得る NASH の線維化進行例 (F3 期, F4 期) の患者数が増加し、2030 年には日本では約 100 万人に増加すると予測されている [20]。さらに、非ウイルス性疾患が原因の肝癌患者の割合は、日本では 1991 年の 10.0% から 2015 年には 32.5% と著しく増加し続けている [21]。NASH を含む NAFLD は、non-B, non-C 肝癌の背景肝疾患の 15.1% を占める。また近年、日本では糖尿病、肥満、脂質異常症、高血圧、脂肪肝の罹患者の割合が増加しており、NASH 関連肝癌は今後さらに増加すると予測される [21]。NASH および NASH 関連肝癌に対する新しい治療戦略の構築は緊急の課題であると言える。



Tateishi R, et al, J Hepatol. 2019, 54, 367-376 より

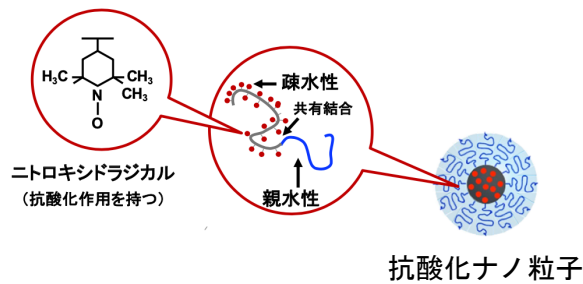
図 B. わが国の肝臓における背景疾患の割合

1.3. Antioxidative self-assembling nanoparticles (SMAP_O^{TN})

活性酸素種 (ROS) の産生増加によって生成される酸化ストレスおよび脂質過酸化は、腸管由来のエンドトキシン、または腫瘍壊死因子 (TNF α) やアディポサイトカインなどの多数のサイトカインが肝臓に作用し NASH を発症する[22]. これらの要因は、肝障害、肝線維化の進行をもたらす[23]. 抗酸化物質は、NAFLD, NASH, および HCC の OS を改善させる治療選択肢の 1 つである. しかし、4-hydroxy-2, 2, 6, 6-tetramethylpiperidine-1-oxyl (TEMPOL) などの低分子量を持つ従来の抗酸化剤のほとんどは、治療効果を示すことができなかった[24]. TEMPOL は、スーパーオキシドと過酸化物を細胞実験において直接分解する能力があると報告されている[25]. これらの従来の抗酸化物質は全身に拡散し、急速に除去されてしまう[26]. さらに、これらの抗酸化物質は、電子伝達系を含む正常な細胞の酸化還元反応を阻害することによって、ミトコンドリアの機能不

全とアポトーシスを引き起こす [27, 28].

したがって、これらの抗酸化物質の「治療ウィンドウ」は非常に低いか、まったくもないものがほとんどであった。共同研究者である当大学数理物質系、長崎らは、近年、経口投与後に腸粘膜に長期間滞留するナノ粒子型の自己組織化抗酸化物質を開発した。数十 nm のサイズであることから、正常な細胞への内在化を抑制し、細胞内の酸化還元反応の機能不全を回避し、副作用を減少させる。その結果、これらのナノ粒子型の抗酸化物質は、治療域を大幅に拡大することが可能となった。これらのナノ粒子型抗酸化物質の 1 つである RNP^o は、pH 変化に関係なく崩壊せず、ROS を除去して炎症を抑制することにより、大腸炎マウスモデルの結腸粘膜における腸内細菌叢を改善した (図 C) [29]。酸性環境下で崩壊するタイプの抗酸化ナノ粒子である RNP^N は、腸管から吸収され、肝臓に滞留し、抗炎症および抗線維化活性を発揮し、コリン欠乏 1-アミノ酸食の摂餌によって誘発される軽症の NASH に対して抗酸化ストレス効果を発揮する[30]。しかし、これまでの RNP は、重合中に再結合が起こり、トリブロック共重合体が混入することが避けられず、これが血中滞留性等の性能を低下させる原因につながるという欠点があった。そこで PEG にさらなる機能を付与した共重合体を容易に製造できるプロセスを開発し、この方法にてトリブロック共重合体の精製を防ぎ、分子量分布の狭い PEG-b-PCMS の合成が可能となった。この材料から調製したナノ粒子 (SMAPo^{TN}) は旧来型の RNP に比較して高い血中滞留性を示した。しかし、SMAPo^{TN} が NASH 関連肝癌を予防するかどうかはこれまで実証されていない。



Nagasaki Y, et al, *J Gastroenterol.* 2014, 49, 806-813 より

図 C. 抗酸化ナノ粒子の設計

1.4. 新たな NASH モデルマウスの作製

これまでの研究では, phosphatase and tensin homolog (PTEN) 欠損マウス [31], または Diethylnitrosamine (DEN) によって肝癌を誘発されたマウス[32] などの発がん物質誘発モデルが HCC モデルとして使用された. 我々は, *p62/Sqstm1* (*p62*) および *Nrf2* 遺伝子二重欠失 (DKO) マウスを作製した. 雄性 DKO マウスは, 通常食 (NC) の摂餌により, 全例に NASH を自然発症し, さらに NASH 関連肝癌を発症する[33]. これらの経過より, DKO マウスはヒト NASH に類似した表現型を示す[33]. メタボリックシンドローム, インスリン抵抗性, アディポカインの不均衡と相まって, 内臓脂肪の蓄積を伴う肥満など, ヒト NASH の臨床的特徴と表現型が類似しているため DKO マウスは, NASH の予防および治療のための新しい治療戦略を構築するためのこれまでにない動物モデルである. DKO マウスは, グラム陰性菌が産生するエンドトキシンを増加させ, それによって糞便中の LPS 濃度が増加する. つまり, DKO マウスでは, 肝臓の内外で発生する腸からの過剰な LPS フラックスによる自然免疫応答の活性化が, NASH による肝障

害の発症の主要因となる。DKO マウスは, NASH および NASH 関連肝癌に対する SMAP^o^{TN} の治療効果を比較検討するための適切なモデルであると言える。

第2章 目的

本研究の目的は, SMAP₀^{TN} が NASH の発症と NASH に関連する肝癌に対して予防効果を発揮するかどうかを解明し, DKO マウスにおいて SMAP₀^{TN} の経口投与が NASH の進展を抑制し, 「腸-肝連関」を介した肝癌抑制を示す作用機序を明らかにすることである.

第3章 実験方法

3.1. 試薬

本研究で用いた主な試薬は、下記の会社より購入した。特に記載のない試薬については特級試薬を用いた。実験に使用する水は、特に記載のない限り超純水装置 Direct-Q UV 8 (Merck Millipore 社, USA) から得た比抵抗 18.2 M Ω -cm 以上の超純水を用いた。

Bio-Rad 社 (USA)

- ミニプロティアン TGX ゲル
- PVDF メンブレン
- 4X Laemmli サンプルバッファー

Thermo Fisher Scientific 社

- Fast SYBR® Green Master Mix
- BCA protein assay kit

ナカライテスク社 (京都)

- 100%エタノールメタノール
- 2-プロパノール
- 4%パラホルムアルデヒド・りん酸緩衝液
- N-2-ヒドロキエチルピペラジン-N'-2-エタンスルホン酸 (HEPES)
- キシレン
- クロロホルム
- セパゾール RNA I Super G
- メタノール
- Blocking one

生化学工業株式会社ジェンスクリプトジャパン株式会社

- Toxin Sensor Chromogenic LAL Endotoxin Assay Kit

タカラバイオ社

- TaKaRa Prime Script® RT reagent Kit

ケイマン ケミカル社

- TBARS Assay Kit

FUJIFILM Wako Pure Chemical 社

- GSSG/GSH Quantification Kit
- SOD Assay Kit
- イソフルラン
- RIPAbuffer

SIGMA-Aldrich 社

- Supelco 37 Component FAME Mix

3.2. 実験動物

全ての動物実験は筑波大学動物実験委員会の承諾を得、筑波大学動物実験取扱規定、動物の愛護および管理に関する法律（法律第 68 号）、実験動物の飼育および保管ならびに苦痛の軽減に関する基準（環境省告示第 88 号）に準拠して行った。*p62:Nrf2* 二重欠失マウスは、*p62-KO* マウスと *Nrf2-KO* マウスを交配することによって作製された[33]。全ての実験において雄のマウスを使用した。標準飼料（通常食：脂肪 5.1%，タンパク質 23.1%，360 kcal/100 g），または 60%高脂肪食（高脂肪食：脂肪 60%，タンパク質 24.5%，640 kcal/100 g）をオリエンタル酵母（東京，日本）より購入し、マウスに摂餌させた。6 週齢から 32 週齢までの

26 週間、高脂肪食摂餌させた期間と同じ期間に、マウスに SMAP₀^{TN} (10 mg / 日) を自由飲水投与させた (図 D) . マウスは湿度 30-70%, 20-23°C の周囲温度, 水および食餌は自由摂取下で飼育し, 3-4 週齢の間に母親から離乳させた. すべてのマウスは, 筑波大学実験動物資源センターの環境下, クリーンルーム内で, 特定の病原体のない条件下で飼育した. 組織および血漿を採取するために, イソフルラン (和光純薬工業社) を用いてマウスを安楽死させた. 試料を液体窒素中で急速冷凍し, -80°C で保存した.

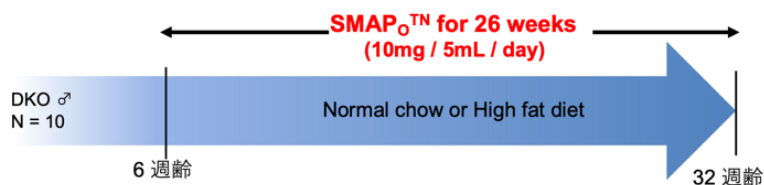


図 D. 方法

3.3. SMAP₀^{TN} の調製と薬物動態

ポリ (スチレン-co-マレイン酸) 共重合体 (PSMA, 分子量 (MW) = 7500, スチレン : 無水マレイン酸単位比 = 2 : 1) を無水テトラヒドロフラン (THF) に溶解した. 片末端メトキシ, 他末端ヒドロキシポリ (エチレングリコール) (MW=5000, MeO-PEG-OH) を乾燥 THF に溶解し, ブチルリチウム (1.6M ヘキサン溶液) を加えて PEG 末端をアルコラートに変換した. この溶液を調製した PSMA の THF 溶液に加えて 1 時間攪拌した. 反応溶液をイソプロピルアルコールに注ぎ, 沈殿物を得た. 沈殿物をヘキサンに分散させ, 濾過により精製し,

真空乾燥させ SMAPo が生成された. 合成した SMAPo を無水 THF に溶解した. SMAPo 中の無水マレイン酸に対して過剰モル量の NH₂-TEMPO を無水 THF に溶解し, 上記溶液に加え, 反応溶液をエーテルに注ぎ, 沈殿物を収集し SMAPo^{TN}を得た. この作業では, 1つの PEG 鎖がエステル結合を介して PSMA 繰り返しユニットに導入され, NH₂-TEMPO が残りの無水マレイン酸環に導入された (PSMA 繰り返しユニットあたり 18-TEMPO 分子). MeO-PEG-b-PMOT ブロック共重合体を自己組織化することによって調製された. 簡潔にまとめると, メトキシ-ポリ (エチレングリコール) -b-ポリ (クロロメチルスチレン) (MeOPEG-b-PCMS) は, テロゲンとしてメトキシ-ポリ-スルホン (MW = 5000) を使用したクロロメチルスチレンのラジカルテロメリゼーションによって合成された. クロロメチル基は, TEMPOL のアルコキシドを含む MeO-PEG-b-PCMS ブロック共重合体中の塩化ベンジルのウィリアムソンエーテル合成を介してニトロキシドラジカルに変換された. 経口投与後のマウス体内における SMAPo^{TN}の薬物動態は, 蛍光 Rhodamine 標識 SMAPo^{TN} を使用して観察した. Rhodamine 標識 SMAPo^{TN}は, ゾンデを用いて経口投与した 1.5 時間から 48 時間の経口投与後, In vivo imaging system 分析 (IVIS; Perkin Elmer, マサチューセッツ州, USA) を使用して標識された SMAPo^{TN}を観察した. イソフルランを用いた吸入麻酔 (Perkin Elmer, マサチューセッツ州, USA) によってマウスに麻酔をかけ, 腹部を切開した. すべての IVIS 画像は, 励起/発光波長 535/580 nm, 露光時間 1 秒で撮影した. 撮影した IVIS 画像は, Living Image Software (Perkin Elmer, マサチューセッツ州, USA) によって, カラースケールの同じ最小値と最大値に調整された. カラースケールは, IVIS による Rhodamine 標識 SMAPo^{TN}の放射効率を示す (p/sec/cm²/sr/μ W/cm²).

3.4. 生化学的解析

各種マウスより血清を採取し, aspartate aminotransferase (AST) , alanine aminotransferase (ALT) , triglyceride (TG) , high-density lipoprotein-cholesterol (HDL-CHO) , low-density lipoprotein-cholesterol (LDL-CHO) , および free fatty acid (FFA) の血清濃度を, Hitachi 7180 Auto Analyzer を使用して Oriental Yeast (東京, 日本) によって測定された. AST と ALT は, L 型和光 AST または ALT-J2 キット (FUJIFILM, 東京, 日本) を使用して JSCC transferable 法によって測定された. TG および FFA は, L タイプ Wako TG-M または NEFA HF (FUJIFILM, 東京, 日本) を使用した酵素法によって測定された. HDL-CHO および LDL-CHO は, CHOLESTEST N LDL または HDL (SEKISUI MEDICAL, 東京, 日本) を使用した直接法によって測定された. 肝臓組織標本中のグルタチオン (GSH および GSSG) 濃度とスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) 活性は, GSSG/GSH Quantification Kit (FUJIFILM, 東京, 日本) および SOD Assay kit-WST (FUJIFILM, 東京, 日本) を使用して測定された. 肝臓組織標本の Malondialdehyde (MDA) 濃度は, TBARS アッセイキット (Cayman, Chemical, Ann Arbor, MI, USA) を使用して測定された.

3.5. 病理学的解析

通常食摂餌, または高脂肪食摂餌させた DKO マウスを SMAP₀^{TN} 投与群と非投与群に分けた計 4 群のマウスから肝臓を摘出し, 4%パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液で固定し, パラフィンにて包埋した. 薄切片を作製し, Hematoxylin-eosin (H&E) 染色と Sirius red 染色を行い, 病理標本を作製した. H&E 染色にて肝臓の脂肪沈着と炎症細胞の浸潤, Sirius red 染色にて肝臓の線

維化の評価を行った。NASH を組織学的、定量的に評価するために、SAF スコアを用いた。脂肪化 (S0 から S3)、活動性 (A0 から A4)、線維化 (F0 から F4) をスコア化した[34]。大型の核を有する異型細胞の割合は 100 倍の倍率で観察し、6-7 視野で 1300-1600 個の細胞を数えることによって定量化を行なった。肝癌は肝臓全体の総量で解析され、肝結節の切片を用いて組織学的診断を行なった。高脂肪食群では、非腫瘍肝組織 (non-tumor areas) を用いて解析した。組織学的解析は、システム生物顕微鏡 (BX43, オリンパス, 東京, 日本) を使用して施行された。すべての病理写真は、顕微鏡用のデジタルカメライメージングシステム (DP21, オリンパス, 東京, 日本) によって撮影された。接眼レンズは倍率 10 倍に設定し、対物レンズは倍率 10 倍に設定して撮影した。

3.6. イムノブロット解析

肝組織を RIPAbuffer (FUJIFIRM Wako Pure Chemical Corporation, 大阪, 日本) を使用してホモジナイズを行なった。BCA protein assay kit (Thermo Fisher Scientific) を使用してそれぞれの総タンパク質濃度を測定した[35]。タンパク質ライセートを Laemmli サンプルローディング buffer (BioRad, CA, USA) と混合し、等量のタンパク質サンプルを SDS/PAGE で分離した。分離されたタンパク質を PVDF メンブレン (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) に転写した。Blocking One (nacali tesque) を使用してブロックした後、対応する一次抗体と二次抗体をインキュベートしてタンパク質を可視化した。hexanoyl-lysine (HEL) に対する抗体は JaICA (MHL-021P) から入手し、リポ多糖結合タンパク質 (LBP) に対する抗体は Proteintech (23559-1-AP) から入手した。β-アクチンに対する抗体は SCB (sc-47778) より入手した。免疫反応性バンドをデンシトメトリーで定量化し、各検体に存在する actin の量に正規化後に平均化した。

3.7. RNA の抽出

肝臓の組織，または細胞にセパゾール 1 mL を加えてホモジナイズした後，クロロホルム 200 μ L を加え転倒混和し，12,000 rpm，15 分遠心した．3 層に分離した上層を回収し，2-プロパノール 500 μ L を加えて混和した．12,000 rpm，10 分遠心した後，上清を捨て，沈殿物に 75% (v/v) エタノール 1 mL を加えて攪拌，懸濁させた．12,000 rpm，5 分遠心し，上清を捨ててエタノールを乾燥させた後，RNase free dH₂O 50 μ L に溶出した．微量サンプル分光光度計 NanoVue Plus (GEヘルスケア・ジャパン社) で濃度定量を行った．

3.8. 定量的 real-time PCR (qRT-PCR)

肝組織検体から total RNA を抽出し，cDNA を合成した．qRT-PCR は，Fast SYBR Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) ，CFX384 TouchTM リアルタイム PCR 増幅システム (Bio-Rad 社) を使用して実施した．データは，各サンプルに存在する Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) と Cyclophilin の平均量に対して正規化され，平均化された．使用した Primer は表 1 にまとめた．

3.9. RNA Sequencing (RNA-seq) 解析

NucleoSpin RNA XS キット (Macherey-nagal, Duren, Deutschland) を使用して，肝臓から全 RNA を抽出した．シーケンスは，Smart-Seq StrandedKit を使用してタカラバイオ株式会社 (Kusatsu, Japan) に委託し測定された．核酸の定量化は，TapeStation または BioAnalyzer (Agilent Technologies, California, USA) を使用した電気泳動によって実施された．マッピングにより得られた位置情報と遺伝子

定義ファイルに基づいて、遺伝子ユニットとトランスクリプトユニットの発現レベルを計算した。遺伝子 ontology 解析と KEGG pathway 解析は、DAVID (The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) ソフトウェアを使用して実施した。ヒートマップは ClustVis (<https://biit.cs.ut.ee/clustvis/>) を使用して実施した。各群 8 匹のマウスを用いて RNA-seq 解析を行なった。

3.10. 肝組織における TG および FFA 濃度と FA 組成

肝組織標本中の TG および FFA 濃度は、試薬キット (FUJIFILM Wako Chemicals, Osaka, Japan) を使用して測定した。肝組織の脂肪酸組成は、ガスクロマトグラフィーシステムによって測定された。3 フッ化ホウ素メタノール溶液を使用して、抽出した脂質のメチルエステル化を行なった[36]。メチルエステル化脂肪酸をガスクロマトグラフィーフレームイオン化検出器 (GC-FID) にかけた。脂肪酸を分析するためのキャピラリーカラム (Omegawax320, 30m, 0.25mm ID, SIGMA-Aldrich JAPAN K.K, 東京, 日本) およびクロマトパックインテグレーターシステム (GC14B, 島津, 東京, 日本) を使用して組成と相対比率を分析した。脂肪酸メチルエステル標準溶液 (Supelco 37 Component FAME Mix, SIGMA-Aldrich JAPAN K.K, 東京, 日本) を用いて脂肪酸種を同定した。それぞれの脂肪酸の相対含有量は、GC-FID クロマトグラムを使用して計算した。

3.11. 血清中, 糞便中 LPS 濃度の測定

各種マウスより血清を採取し, Toxin Sensor 発色性 LAL エンドトキシンアッセイキット (Genscript, Piscataway, NJ, USA) を用いて測定した。マウスより新鮮便を採取し, 液体窒素により直ちに凍結した。1.5 mL チューブに凍結糞便と PBS (-) 1 mL を入れ, バイオラプタ UCW-201 (コスモ・バイオ) により超音波破

砕を行なった。糞便溶液 1 mL を PBS (-) 9 mL に加え、計 10 mL とした後、400 × g, 15 分遠心した。上清 6 mL を 0.45 μm フィルター (Merck Millipore 社) でろ過した後、0.22 μm フィルター (Merck Millipore 社) で再度ろ過した。70°C で 10 分間加温した後、Toxin Sensor 発色性 LAL エンドトキシンアッセイキット (Genscript, Piscataway, NJ, USA) を用いて製造元の指示に従って測定した。

3.12. 腸内細菌叢解析

マウスの便試料を採取し、-80 度にて保存した。16SrRNA 遺伝子配列ライブラリーを用いて、腸内細菌叢解析をタカラバイオ株式会社 (草津, 滋賀, 日本) に委託した。イルミナプラットフォームからの生のシーケンスデータは、FASTQ プロセッサを使用して順方向および逆方向の読み取りファイルに変換し、さらに分析するために、オープンソースの腸内細菌叢解析プラットフォームである Quantitative Insights Into Microbial Ecology (QIIME) にインポートした。ペアエンドシーケンスは逆多重化し、ノイズ除去、複製を解除し、QIIME の Tolerance Operational Taxonomic Unit (CD-HITOTU) 品質管理パッケージを備えた High Identity のクラスターデータベースとして統合した。シーケンスデータ処理、Operational Taxonomic Unit (OTU) の定義、および分類学的割り当ては、単純ベイズ分類器を利用した QIIME を使用して実行した。腸内細菌叢の組成解析 (ANCOM) を使用して、さまざまな分類学的レベル、門、クラス、科、目、属、および種での OTU の存在量の差異を分析した。α 多様性 (observed species) は、Wilcoxon's rank sum test を使用して解析した。

3.13. 統計解析

全てのデータは平均値±標準誤差 (mean ± SE) で示した. 有意差検定には, IBM SPSS Statistics 26.0 (IBM, Armonk, NY, USA) にて 1 元配置分散分析を用い, $P < 0.05$ を有意とした. 2 群を比較する場合, データ解析には対応のない t 検定を用いた. カイ二乗検定を使用して, 肝癌発生率の群間の差異を評価した. 高脂肪食群では, 肝癌発症に対する SMAP₀^{TN} の効果を明らかにするために, SMAP₀^{TN} 治療群 (非腫瘍群) と肝癌が発生した非治療群 (腫瘍群) を比較した. α 多様性指数(Observed Species)に基づき, 対応のない 2 群間についてモンテカルロ法 two-sample t-test を行った. 検定に用いる多様性指数は, すべての検体について多様性指数を算出できた最大リード数を用いた. P 値は FDR 法で補正した. 3 群以上ある場合には, すべての 2 群の組み合わせに対して検定を行った. 補正後の P 値が 0.05 以下の場合に, 比較した群の多様性に有意な差があると定義した.

表 1. qRT-PCR に用いた Primer 一覧表

| Genes | Primer sequences (5'-3') | |
|--------------------------------------|--------------------------|-------------------------|
| | Forward | Reverse |
| <i>Tnf-α</i> | AAGCCTGTAGCCCACGTCGTA | GGCACCCTAGTTGGTTGTCTTTG |
| <i>Il-1β</i> | TCCAGGATGAGGACATGAGCAC | GAACGTCACACACCAGCAGGTTA |
| <i>Tlr-4</i> | GCAGCAGGTGGAATTGTATCG | TGTGCCTCCCCAGAGGATT |
| <i>Tlr-6</i> | GTGAGGATGCTGTGTCAGTGGA | CCAGGCAGAATCATGCTCACTG |
| <i>Tlr-9</i> | TATCCACCACCTGCACAACCT | TTCAGCTCCTCCAGTGTACG |
| <i>Tgf-β1</i> | GTGTGGAGCAACATGTGGAACCTA | TTGGTTCAGCCACTGCCGTA |
| <i>Collagen-α1</i> | GCACGAGTCACACCGGAACT | AAGGGAGCCACATCGATGAT |
| <i>αSma</i> | GTCCCAGACATCAGGGAGTAA | TCGGATACTTCAGCGTCAGGA |

第4章 結果

4.1. SMAP₀^{TN}は消化管より吸収され、肝臓に滞留する

IVIS イメージング解析から、Rhodamine 標識 SMAP₀^{TN} は経口投与後 1.5 時間後に消化管に局在し、その後全身に分布することがわかり、経口投与によっても SMAP₀^{TN} が血流に取り込まれることがわかった。Rhodamine 標識 SMAP₀^{TN} は 48 時間後も肝臓に滞留したが、他の臓器ではほとんど除去されていた。これは、SMAP₀^{TN} が消化管から血液中に取り込まれ、主に門脈を介して肝臓に蓄積し、その後拡散し投与後 1 日または 2 日間経過後、徐々に他の臓器に排泄されたことを示す (図 1A)。

通常食または高脂肪食を摂餌させた DKO マウスを、SMAP₀^{TN} 投与群と非投与群に分け、体重経過を 6 週齢から 32 週齢まで観察した。すべてのマウスの出生時の体重は同等であった。10 週齢後、高脂肪食を摂餌させた DKO マウスは、通常食を摂餌させた DKO マウスよりも早期に体重が増加し、高度の肥満を示したが、SMAP₀^{TN} 投与の有無にかかわらず体重経過に差は見られなかった (32 週齢の時点で、SMAP₀^{TN} 非投与群で通常食を摂餌させた群の体重は $44.1 \pm 0.9\text{g}$ 、SMAP₀^{TN} 投与群で通常食を摂餌させた群は $46.4 \pm 0.4\text{g}$ 、SMAP₀^{TN} 非投与群で高脂肪食を摂餌させた群の体重は $54.7 \pm 0.4\text{g}$ 、SMAP₀^{TN} 投与群で高脂肪食群を摂餌させた群の体重は $52.9 \pm 2.2\text{g}$; 図 1B)。高脂肪食群は、通常食群と比較して肝重量と肝臓/体重比を有意に増加させたが、SMAP₀^{TN} 投与の有無は、肝重量と肝臓/体重比に影響を与えなかった (図 1B)。

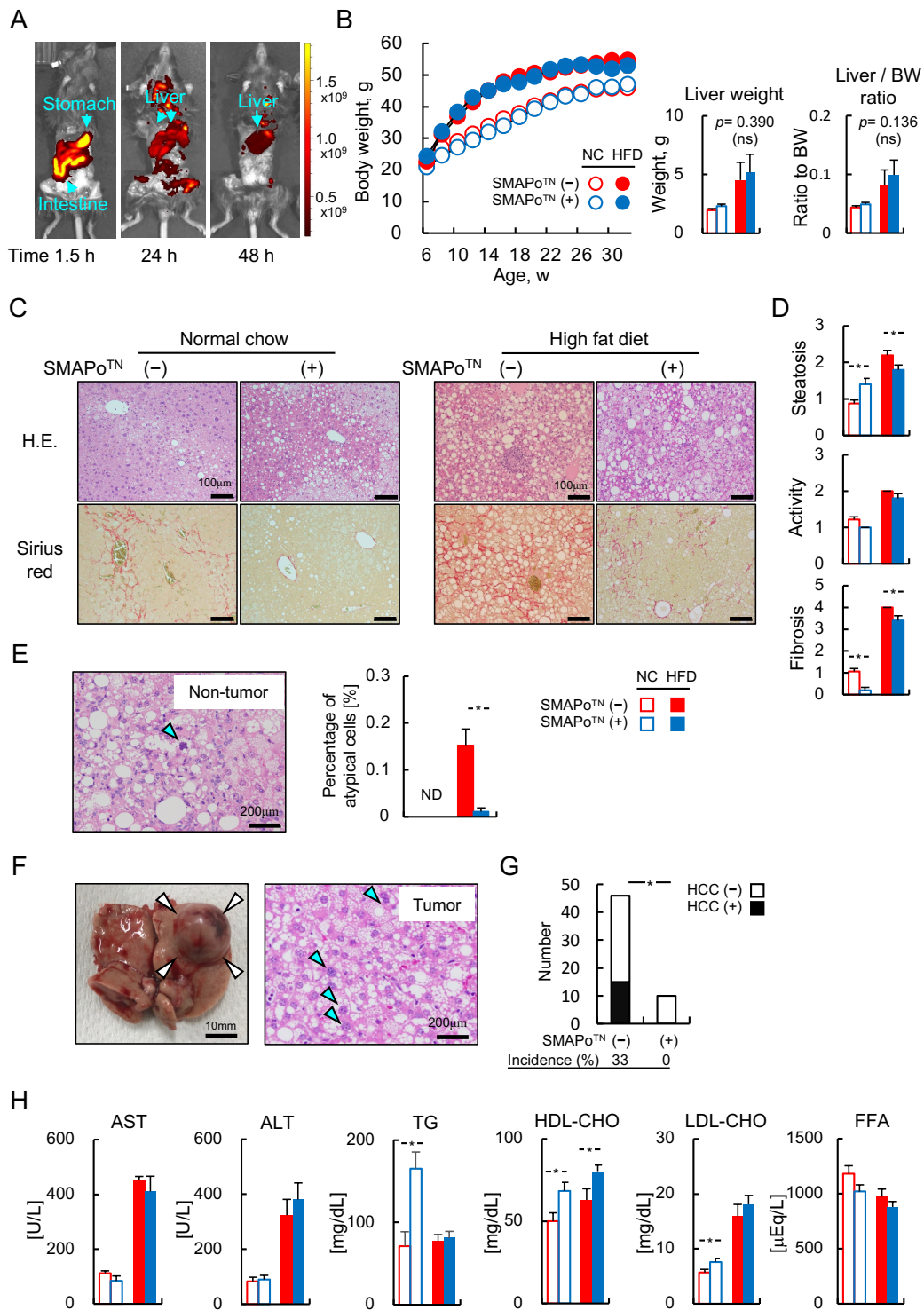


図 1. SMAPo^{TN} は、体重経過と組織重量に影響を与えずに、肝に滞留する

(A) 蛍光標識 SMAP₀^{TN} は、投与後 1.5 時間から 48 時間まで、インテリジェント視覚情報システム (IVIS) にて解析された。カラースケールは、IVIS による Rhodamine 標識 SMAP₀^{TN} の放射効率を示す (p/sec/cm²/sr/μ W/cm²) 。

(B) 6 週齢から 32 週齢までの期間中の体重変化の時間経過 (左パネル) , および実験終了時の肝重量, 肝重量/体重比 (n = 10-13 /群) 。

(C) 通常食または高脂肪食群 32 週齢の DKO マウスにおける SMAP₀^{TN} 投与群と非投与群の比較. 脂肪性肝炎の肝組織病理標本のヘマトキシリンおよびエオシン (HE) 染色切片 (上のパネル) , および Sirius red 染色切片 (下のパネル) 。

(D) 脂肪化, 活動性, および線維化 (SAF) スコア (n = 10-13 /群) 。

(E) 高脂肪食を摂餌させた DKO マウスの SMAP₀^{TN} 非投与群における非腫瘍領域に大型の核を持つ異型細胞の HE 染色切片 (左パネル, 青い矢印) および異型細胞の割合 (右パネル, n = 10-13/群) 。

(F) SMAP₀^{TN} 非投与群で高脂肪食を摂餌させた DKO マウスに発生した肝細胞癌の肉眼像 (左パネル, 白矢印は腫瘍部を示す) および HE 染色切片 (右パネル, 青矢印は癌細胞を示す) 。

(G) SMAP₀^{TN} 投与群と非投与群の腫瘍数の比較. SMAP₀^{TN} 非投与群で高脂肪食を摂餌させた計 45 匹のマウスのうち 16 匹のマウスが HCC を発症したが, 対照的に, SMAP₀^{TN} 投与群では計 10 匹のマウスのうち HCC を発症したマウスは見られなかった。

(H) 血液生化学検査結果 (Aspartate aminotransferase [AST], alanine aminotransferase [ALT], triglyceride [TG], high-density lipoprotein-cholesterol [HDL-CHO], low-density lipoprotein-cholesterol [LDL-CHO], free fatty acid [FFA]) (n = 10-13 /群) 。エラーバーは標準誤差を示す. ND; not determined; * P <0.05, DKO マ

ウスの SMAPo^{TN} 投与群と非投与群の間に有意差があることを示す。† P < 0.05, DKO マウスの通常食群と高脂肪食群の間に有意差があることを示す。

4.2. SMAPo^{TN} は肝線維化と肝癌発症を抑制する

通常食または高脂肪食を摂餌させた DKO マウスの肝臓組織学における SMAPo^{TN} 投与による変化を図 1C に示す。脂肪性肝炎の組織病理学的評価を、SAF スコアを用いて行なった (図 1D)。通常食群では、病理組織上の脂肪化において、SMAPo^{TN} 投与群の脂肪化スコアは、SMAPo^{TN} 非投与群の脂肪化スコアと比較してより高値であったが、SMAPo^{TN} 投与群の線維化スコアは、SMAPo^{TN} 非投与群の線維化スコアと比較して低値であった。高脂肪食群においては、通常食群と比較して脂肪化スコアは高値であり、活動性および線維化スコアも高値を示したが、SMAPo^{TN} 投与群は、非投与群と比較して肝臓の脂肪化および線維化を抑制した (図 1C および 1D)。高脂肪食を摂餌させた群では、非腫瘍領域に大きな核を持つ異型細胞が観察された (図 1E, 左パネル)。通常食を摂餌させた群では、異型細胞は観察されなかった。一方、高脂肪食を摂餌させた群における異型細胞の割合は、SMAPo^{TN} 投与によって大幅に減少した (図 1E, 右パネル)。図 1F に示すように、26 週間高脂肪食を摂餌させた群では、脂肪を伴い、N/C 比の大きな異型細胞を伴う高分化型肝癌を発症した (図 1F, 青矢印)。SMAPo^{TN} 非投与群で高脂肪食を摂餌させた計 45 匹のマウスのうち 16 匹の DKO マウスが HCC を発症したが、対照的に、SMAPo^{TN} を投与した計 10 匹の DKO マウスは HCC を発症しなかった (16/45, 33% 対 0/10, 0%; p = 0.035, 図 1G)。これらの結果と合わせて、SMAPo^{TN} 投与が DKO マウスの肝発癌を抑制することが示唆された。血液生化学検査結果の比較では、高脂肪食群では、

SMAPo^{TN} 投与群と非投与群の両群において通常食群よりも AST および ALT 値が増加していたが, SMAPo^{TN} 投与群と非投与群の間に差は見られなかった (図 1H, 左パネル) . TG, HDL-CHO, LDL-CHO などの血清脂質項目は, 通常食群において SMAPo^{TN} 非投与群よりも, SMAPo^{TN} 投与群では有意に高値であったが, この変化は高脂肪食群の SMAPo^{TN} 投与群と非投与群の間では見られなかった (図 1H, 右パネル) .

4.3. SMAPo^{TN} は, 肝臓の酸化ストレス, 炎症シグナル伝達, 肝線維化関連因子を抑制する

次に, OS に対する SMAPo^{TN} の有効性について解析した. 図 2A に示すように, グルタチオンにおいて高脂肪食群では, SMAPo^{TN} 投与群と非投与群の両方で通常食群と比較して GSH 濃度を低下させたが, SMAPo^{TN} 投与群と非投与群の間に差はみられなかった. GSSG 濃度は通常食群と高脂肪食群の間で差はなく, 高脂肪食群では SMAPo^{TN} 投与群と比較して非投与群の GSSG 濃度が増加傾向であったが有意な変化は見られなかった. SOD は, 通常食群では SMAPo^{TN} 投与群と非投与群の間で差が見られなかった. 高脂肪食群においては, 通常食群と比較して SOD が大幅に低下した. しかし, SMAPo^{TN} 投与は SOD を有意に増加させた (図 2B) . SMAPo^{TN} 投与群は, 通常食群の肝における MDA と HEL の発現を有意に減少させたが, 高脂肪食群では, SMAPo^{TN} 投与群と非投与群の間で MDA と HEL の発現に変化は見られなかった (図 2C と 2D) . さらに RNA-seq 解析を行い, 肝臓の酸化ストレス関連遺伝子の RNA レベルを評価した. Heatmap では, SMAPo^{TN} 投与群において通常食群および高脂肪食群の両方で肝臓の酸化ストレス関連遺伝子の発現が抑制される傾向が見られた (図 2E) . 個別の遺伝子を比較すると, 酸化ストレス関連遺伝子である Als2, Gpx7, Hmx1, Ad11, Pdx4, Prnp, Ncf1, Pdx6, および Txd1 は, 主に 通常食群において SMAPo^{TN}

投与によって有意に抑制された (図 2F) .

炎症性サイトカイン (Tnf- α および Il-1 β) , toll like receptor (Tlr) 4, 6, 9 および線維化関連因子 (Tgf- β 1, Colla1, および α Sma) の肝臓における mRNA 発現を qPCR (図 3A の通常食群および図 3B の高脂肪食群) にて解析した. 通常食群において, SMAPo^{TN} 投与群は非投与群と比較して炎症性サイトカインおよび線維化関連因子の mRNA 発現は減少する傾向があり, 特に Tlr 4 および 9 は SMAPo^{TN} 投与群において有意に抑制された (図 3A) . 高脂肪食群では, Colla1 の mRNA は SMAPo^{TN} 投与群において有意に抑制された (図 3B) .

また, 肝組織を用いた RNA-seq 解析を施行し, 肝臓の炎症に関連する遺伝子および線維化に関連する遺伝子の RNA レベルを評価した. Heatmap では, 通常食群と高脂肪食群の両群において, SMAPo^{TN} 投与によって肝の炎症に関連する遺伝子 (図 3C) と線維化に関連する遺伝子 (図 3D) の発現が抑制される傾向が見られた. これらの結果より, SMAPo^{TN} は NASH および肝癌発症の早期の段階で OS を低下させることにより, 肝炎症および肝線維化を抑制し得ることが示唆された.

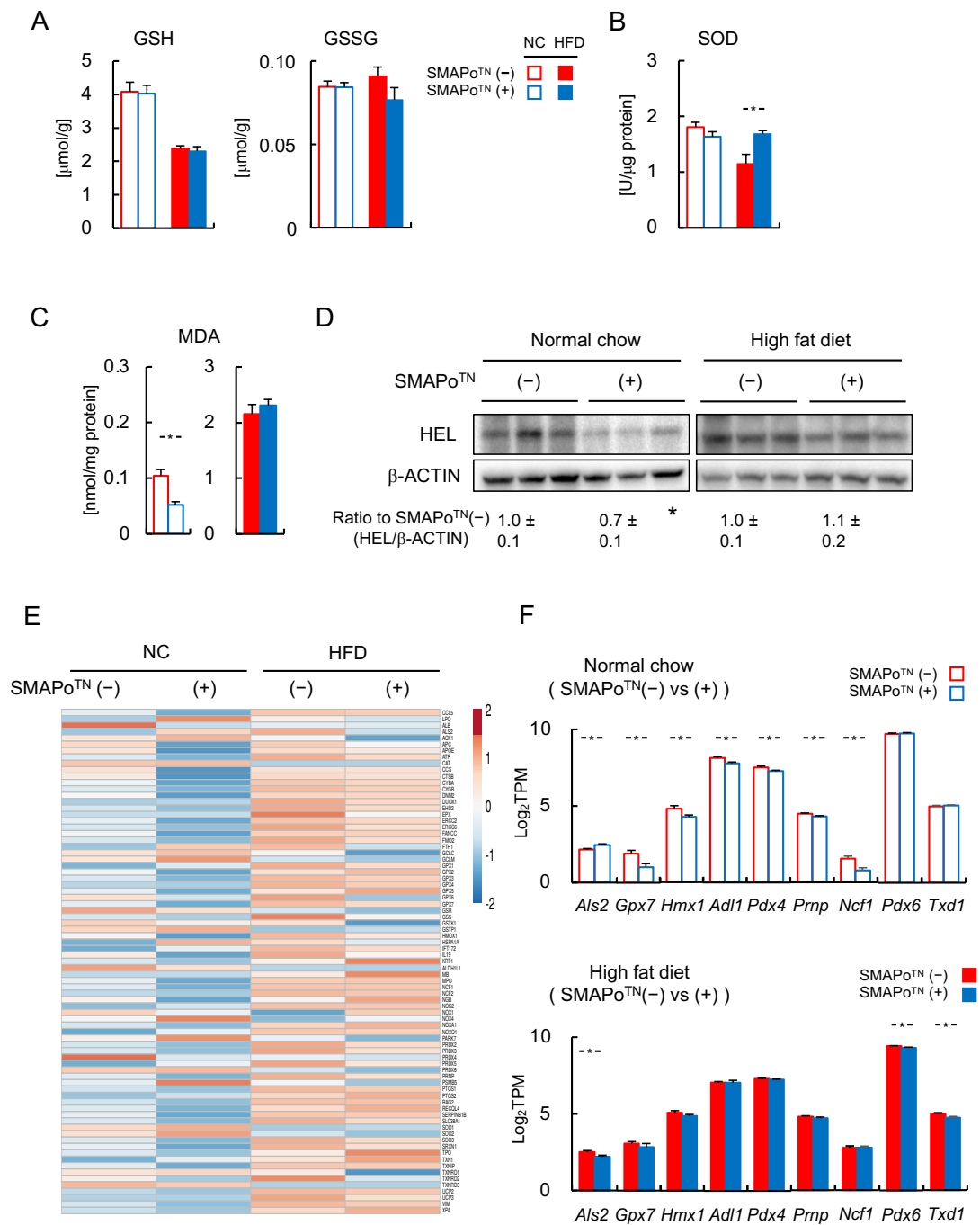


図 2. SMAPo^{TN} は、酸化ストレスの発生を抑制する

(A) 32 週齢における通常食または高脂肪食を摂餌させた DKO マウスの肝組織における GSSG/GSH 濃度の SMAP₀^{TN} 投与群と SMAP₀^{TN} 非投与群との比較 (n = 10/群) .

(B) 32 週齢における通常食または高脂肪食を摂餌させた DKO マウスの肝組織における SOD の SMAP₀^{TN} 投与群と SMAP₀^{TN} 非投与群との比較 (n = 10/群) .

(C) 32 週齢における通常食または高脂肪食を摂餌させた DKO マウスの肝組織における Malondyaldehyde (MDA) 濃度の SMAP₀^{TN} 投与群と SMAP₀^{TN} 非投与群との比較 (n = 10 / 群) .

(D) 32 週齢における通常食または高脂肪食を摂餌させた DKO マウスの肝組織における hexanoyl-lysine (HEL) のイムノブロット解析による SMAP₀^{TN} 投与群と SMAP₀^{TN} 非投与群との比較. β -actin band をローディングコントロールとして使用した. バンドの下の数値は, 通常食群または高脂肪食群における SMAP₀^{TN} 非投与群との相対比率を示す.

(E) 肝組織を用いた RNA-seq 解析結果における酸化ストレスに関連する遺伝子の Heatmap (n = 8 /群) .

(F) 通常食群または高脂肪食群 (n = 8/群) において SMAP₀^{TN} 投与により有意に抑制された酸化ストレス関連遺伝子の発現を示すヒストグラム.

エラーバーは標準誤差を示す. * P < 0.05, DKO マウスの SMAP₀^{TN} 投与群と非投与群の間に有意差があることを示す.

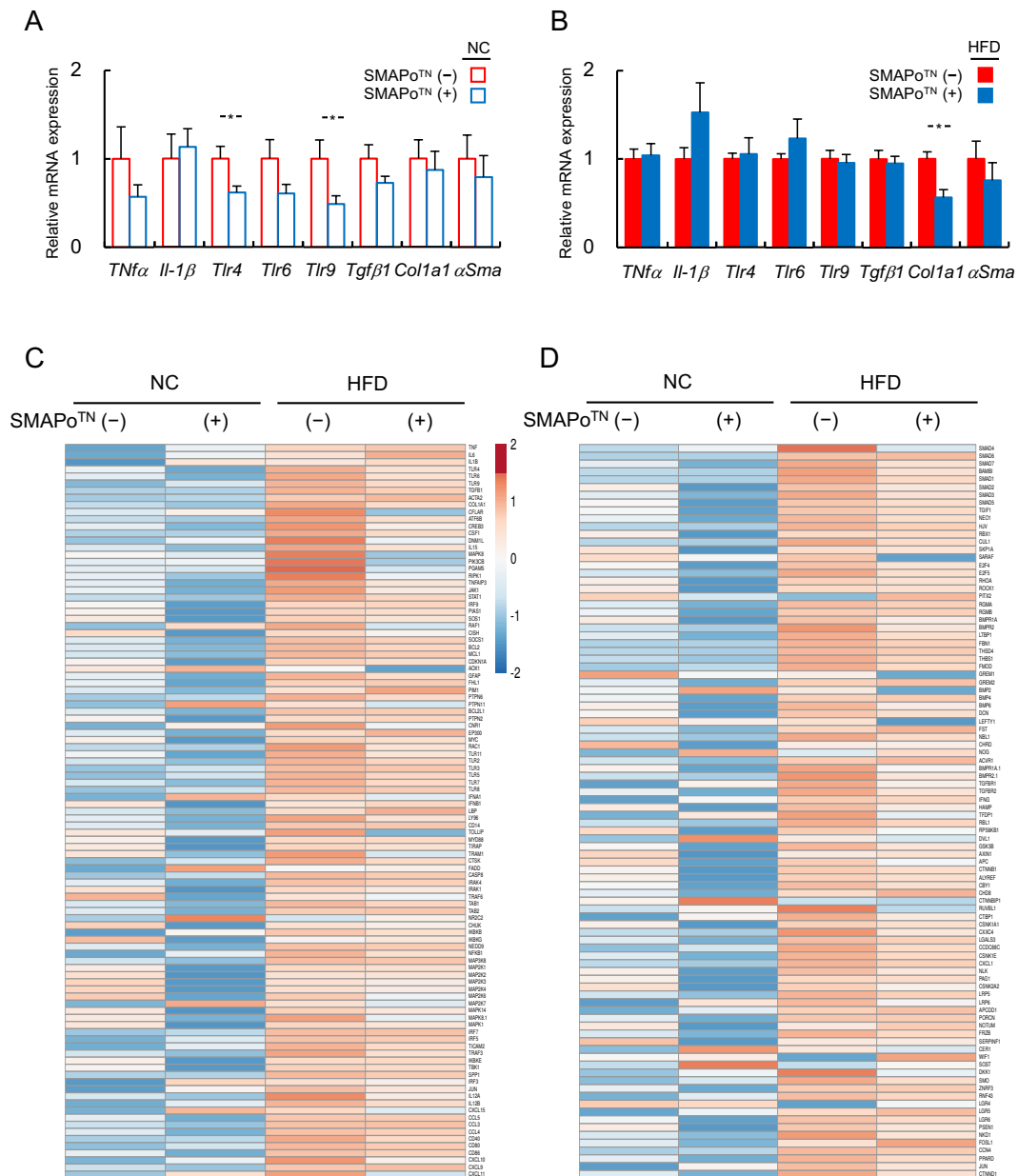


図 3. SMAPo^{TN} は、肝の炎症および線維化関連因子の活性化を抑制する

(A) (B) 32 週齢における通常食または高脂肪食を摂餌させた DKO マウスの肝臓における炎症性サイトカイン (Tnf- α , Il-1 β) , toll like receptor (Tlr) 4, 6,

および 9, および線維化関連因子 (Tgf β -1, Colla1, α Sma) の qPCR 解析結果 (n = 10/群) .

(C) 肝組織を用いた RNA-seq 解析結果における炎症に関連する遺伝子の Heatmap (n = 8/群) .

(D) 肝組織を用いた RNA-seq 解析結果における線維化に関連する遺伝子の Heatmap (n = 8/群) . エラーバーは標準誤差を示す.

* P < 0.05, DKO マウスの SMAP₀^{TN} 投与群と非投与群の間に有意差があることを示す.

4.4. 脂肪性肝炎における肝組織中の中性脂肪と脂肪酸

肝組織中の脂質含有量および脂肪酸組成において, SMAP₀^{TN} 投与による変化を表 2 に示す. 肝病理組織結果 (図 1C および 1D) と相関して, SMAP₀^{TN} 投与を行った通常食群の TG 含有量は, 非投与群と比較して増加する傾向が見られた. 一方, 高脂肪食群では, SMAP₀^{TN} 投与群の TG 含有量は非投与群と比較して減少する傾向があったが, 有意差は見られなかった (表 2 の上部) . FA 含有量においては, 通常食群, 高脂肪食群の両群において SMAP₀^{TN} 投与による変化は見られなかった (表 2 の上部) . さらに, 脂肪酸組成の測定を行なった (表 2 の下部) . アラキドン酸 (C20 : 0) は, 高脂肪食群において SMAP₀^{TN} 投与によって有意に増加したが, エイコサジエン酸 (C20 : 2) は, 高脂肪食群において SPAM₀^{TN} 投与によって有意に減少した. その他の FFA 組成では, 通常食群と高脂肪食群の両群で SMAP₀^{TN} 投与の有無で変化は認められなかった.

表 2. 肝組織中の脂質含有量と脂肪酸組成

| | Normal chow | | | | | | High fat diet | | | | | |
|--|-------------------------|-------|-------|-------------------------|-------|-------|-------------------------|-------|-------|-------------------------|-------|--------|
| | SMAPo ^{TN} (-) | | | SMAPo ^{TN} (+) | | | SMAPo ^{TN} (-) | | | SMAPo ^{TN} (+) | | |
| | (n = 8) | | | (n = 8) | | | (n = 8) | | | (n = 8) | | |
| TG content ($\mu\text{mol/g liver}$) | 94.93 | \pm | 18.31 | 117.13 | \pm | 8.71 | 137.57 | \pm | 7.39 | 112.75 | \pm | 10.88 |
| FFA content ($\mu\text{mol/g liver}$) | 8.51 | \pm | 1.16 | 10.60 | \pm | 1.14 | 10.44 | \pm | 0.50 | 9.65 | \pm | 0.91 |
| FFA composition (mg/g liver) | | | | | | | | | | | | |
| C6:0 | | | ND | | | ND | | | ND | | | ND |
| C8:0 | | | ND | | | ND | | | ND | | | ND |
| C10:0 | | | ND | | | ND | | | ND | | | ND |
| C11:0 | | | ND | | | ND | | | ND | | | ND |
| C12:0 | | | ND | | | ND | 0.03 | \pm | 0.01 | 0.04 | \pm | 0.01 |
| C13:0 | | | ND | | | ND | | | ND | | | ND |
| C14:0 | 0.64 | \pm | 0.14 | 0.73 | \pm | 0.11 | 0.64 | \pm | 0.07 | 0.74 | \pm | 0.10 |
| C14:1 | 0.04 | \pm | 0.00 | 0.05 | \pm | 0.01 | 0.04 | \pm | 0.01 | 0.06 | \pm | 0.01 |
| C15:0 | 0.09 | \pm | 0.02 | 0.10 | \pm | 0.01 | 0.10 | \pm | 0.01 | 0.11 | \pm | 0.02 |
| C15:1 | | | ND | | | ND | | | ND | | | ND |
| C16:0 | 29.12 | \pm | 5.84 | 30.23 | \pm | 3.95 | 28.82 | \pm | 2.95 | 25.65 | \pm | 3.90 |
| C16:1 | 6.66 | \pm | 1.75 | 7.75 | \pm | 1.45 | 5.16 | \pm | 0.67 | 5.11 | \pm | 0.86 |
| C17:0 | 1.43 | \pm | 1.34 | 0.10 | \pm | 0.01 | 0.11 | \pm | 0.02 | 0.14 | \pm | 0.02 |
| C17:1 | | | ND | | | ND | | | ND | | | ND |
| C18:0 | | | ND | | | ND | | | ND | | | ND |
| C18:1n9 | 49.04 | \pm | 12.75 | 45.02 | \pm | 13.05 | 57.16 | \pm | 10.46 | 29.43 | \pm | 10.22 |
| C18:2n6 | 12.68 | \pm | 3.43 | 17.69 | \pm | 2.44 | 6.54 | \pm | 0.55 | 7.92 | \pm | 0.87 |
| C18:3n6 | 0.21 | \pm | 0.05 | 0.21 | \pm | 0.03 | 0.16 | \pm | 0.02 | 0.13 | \pm | 0.02 |
| C18:3n3 | 0.53 | \pm | 0.10 | 0.53 | \pm | 0.06 | 0.25 | \pm | 0.02 | 0.27 | \pm | 0.04 |
| C20:0 | 0.26 | \pm | 0.07 | 0.20 | \pm | 0.03 | 0.06 | \pm | 0.00 | 0.15 | \pm | 0.05 * |
| C20:1n9 | 1.41 | \pm | 0.26 | 1.34 | \pm | 0.21 | 2.00 | \pm | 0.25 | 1.80 | \pm | 0.28 |
| C20:2 | 0.23 | \pm | 0.03 | 0.24 | \pm | 0.02 | 1.05 | \pm | 0.10 | 0.77 | \pm | 0.08 * |
| C20:3n6 | 0.46 | \pm | 0.09 | 0.45 | \pm | 0.06 | 0.41 | \pm | 0.04 | 0.40 | \pm | 0.03 |
| C20:4n6 | | | ND | | | ND | | | ND | | | ND |
| C20:3n3 | | | ND | | | ND | | | ND | | | ND |
| C20:5n3 | 0.26 | \pm | 0.06 | 0.26 | \pm | 0.04 | 0.09 | \pm | 0.01 | 0.09 | \pm | 0.01 |
| C21:0 | 1.45 | \pm | 0.12 | 1.40 | \pm | 0.11 | 1.80 | \pm | 0.17 | 2.04 | \pm | 0.08 |
| C22:0 | | | ND | | | ND | | | ND | | | ND |
| C22:1n9 | | | ND | | | ND | | | ND | | | ND |
| C22:2 | | | ND | | | ND | 0.35 | \pm | 0.04 | 0.24 | \pm | 0.03 |
| C22:6n3 | 2.47 | \pm | 0.36 | 2.36 | \pm | 0.17 | 0.88 | \pm | 0.13 | 0.98 | \pm | 0.12 |
| C23:0 | | | ND | | | ND | | | ND | | | ND |
| C24:0 | | | ND | | | ND | | | ND | | | ND |
| C24:1n9 | | | ND | | | ND | | | ND | | | ND |

32 週齢における通常食または高脂肪食を摂餌させた DKO マウスの肝組織における TG および FFA 濃度, および FFA 組成の SMAPo^{TN} 投与群と SMAPo^{TN} 非投与群との比較. (n = 8 /群) . * P < 0.05, DKO マウスの SMAPo^{TN} 投与群と非投与群の間に有意差があることを示す.

4.5. NASH, 肝癌の発症に対する SMAPo^{TN} の有効性を評価するための肝組織を用いた RNA-seq 解析

肝組織を用いた RNA-seq 解析を行うことにより, SMAPo^{TN} 投与による遺伝子発現における変化のメカニズムを解析した. 抽出基準として 100 万あたりの平均転写産物 (TPM) 値が 1 以上である遺伝子を抽出したところ, 通常食群で 11529 遺伝子, 高脂肪食群で 13072 遺伝子がそれぞれ抽出された (表 3A). SMAPo^{TN} 投与群と非投与群の間で発現に変化があった遺伝子の割合は, 通常食群で 10.3%, と高脂肪食群で 8.2%であった (表 3A). 続いて, NASH および肝癌発症における SMAPo^{TN} の作用機序をさらに解析するために, KEGG pathway 解析を行なった. KEGG pathway のうち, 有意差が見られた上位 3 経路を表 3B に示す. 通常食群では Metabolic pathways (138 遺伝子, 11.6%), Biosynthesis (35 遺伝子, 3.0%), および Endoplasmic reticulum (ER) stress pathway (33 遺伝子, 2.8%) が抽出され, 高脂肪食群では ER stress pathway (41 遺伝子, 3.8%), Splicesome pathway (33 遺伝子, 3.1%), および Cancer pathway (32 遺伝子, 3.0%) が抽出された (表 3B). 興味深いことに, ER stress pathway は, 通常食群と高脂肪食群の両群において SMAPo^{TN} 投与によって変化した共通の pathway として検出された.

表 3. RNA-seq 解析による SMAPo^{TN} 投与による遺伝子発現の変化

A

| Group | Normal chow | | | | High fat diet | | | |
|--------------------------------|-------------|------|-------|------|---------------|------|-------|-----|
| | Up | Down | Total | % | Up | Down | Total | % |
| Gene number (TPM ≥ 1) | 11529 | | | | 13072 | | | |
| Differentially expressed | | | | | | | | |
| SMAPo ^{TN} (-) vs (+) | 167 | 1019 | 1186 | 10.3 | 40 | 1037 | 1077 | 8.2 |

B

| Group | Normal chow (SMAP ₀ ^{TN} (-) vs (+)) | | High fat diet (SMAP ₀ ^{TN} (-) vs(+)) | | |
|----------------------------|---|------|--|-----------|-----|
| Variable number of pathway | 42 | | 28 | | |
| Pathway (KEGG, top 3) | Genes (n) | % | Pathway (KEGG, top 3) | Genes (n) | % |
| Metabolic pathways | 138 | 11.6 | Endoplasmic reticulum | 41 | 3.8 |
| Biosynthesis | 35 | 3.0 | Spliceosome | 33 | 3.1 |
| Endoplasmic reticulum | 33 | 2.8 | Cancer pathway | 32 | 3.0 |

(A) TPM が 1 を超え、通常食群または高脂肪食群 (n = 10 / 群) において SMAP₀^{TN} 投与によって発現が増加または抑制が見られた (P < 0.05) 遺伝子数.

(B) KEGG pathway 解析において SMAP₀^{TN} 投与によって変化した pathway 中上位の pathway.

4.6. SMAP₀^{TN} は ER stress pathway 関連遺伝子を抑制させる

図 4 は、RNA-seq 解析における SMAP₀^{TN} 投与による ER stress pathway の変化した遺伝子の割合を示す。SMAP₀^{TN} 投与は通常食群と高脂肪食群の両群において変化のあったほとんどの ER stress pathway 関連遺伝子を抑制し (図 4A), ER stress pathway の Heatmap でも、SMAP₀^{TN} 投与によって RNA 発現が抑制傾向であることも示された (図 4B)。また、個別の遺伝子を比較すると、ER stress sensor として機能する ER stress 関連遺伝子である Atf6, Perk や、Jnk, Edem, Vip36 は、主に高脂肪食群において SMAP₀^{TN} 投与により有意に抑制された (図 4C)。対照的に、肝の TG と非エステル化脂肪酸 (NEFA) の含有量は、通常食群と高脂肪食群の両群で SMAP₀^{TN} 投与によって変化は見られず (表 2 の上部), 肝臓の脂肪酸組成も一部の脂肪酸を除いて SMAP₀^{TN} 投与によって変化は見られなかった。(表 2 の下部)。これらの結果から、肝臓における FA および TG の蓄積を大きく変化させることなく、SMAP₀^{TN} が OS だけでなく ER ストレ

スも軽減し、NASH に対する保護効果を発揮し得ることが示唆された。

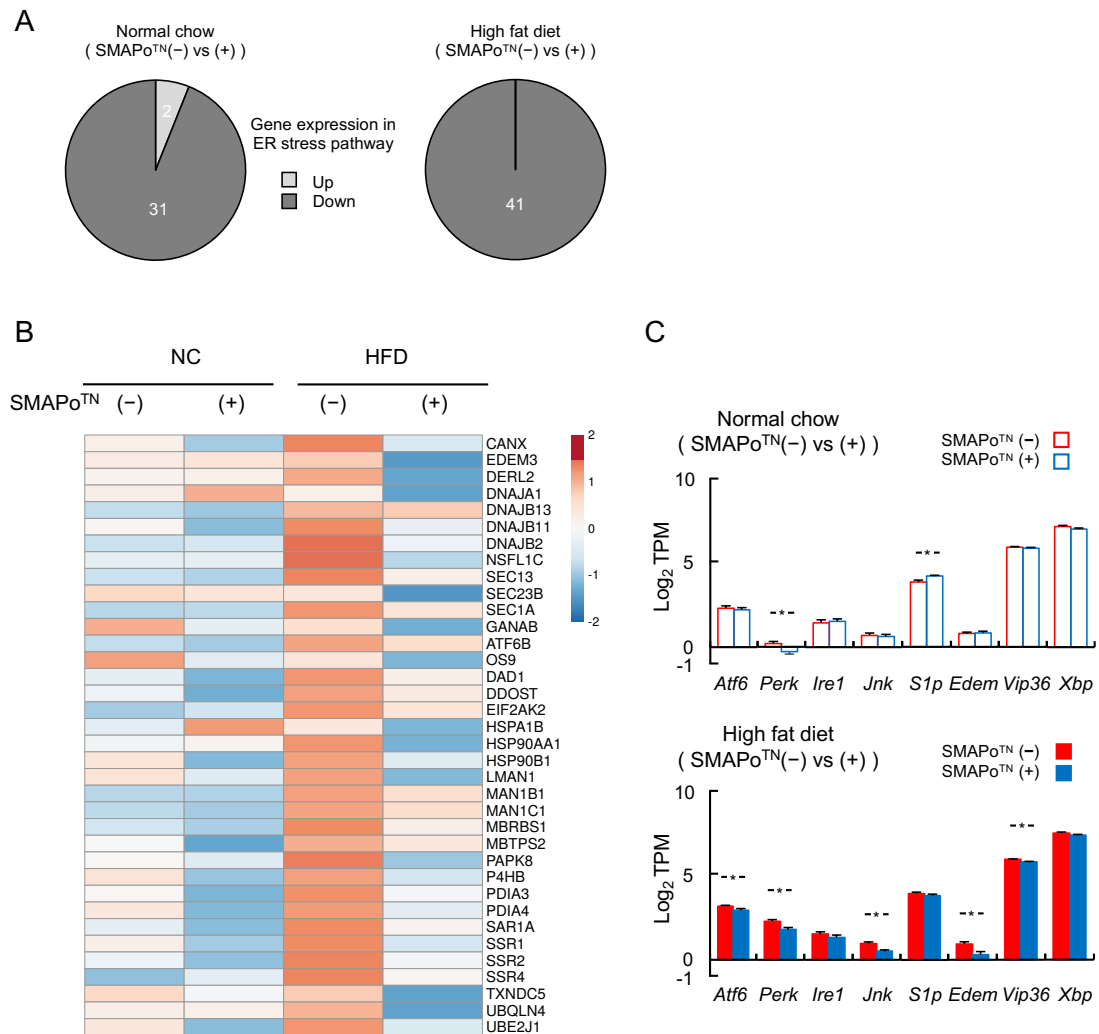


図 4. SMAPo^{TN} は、ER ストレス応答関連遺伝子の発現を低下させる

(A) RNA-seq によって分析された ER stress pathway における SMAPo^{TN} による RNA 発現の増加または抑制が見られた遺伝子数。

(B) 肝組織を用いた RNA-seq 解析による ER stress pathway に関連する遺伝子の Heatmap.

(C) RNA-seq 解析による肝の代表的な ER stress pathway における遺伝子発現

レベルのヒストグラム (n = 8 /群) . 遺伝子発現レベルは, 100 万あたりの平均転写産物 (TPM) によって示された.

エラーバーは標準誤差を示す. * P < 0.05, DKO マウスの SMAP₀^{TN} 治療群と非治療群の間に有意差があることを示す.

4.7. SMAP₀^{TN} は Cancer driver gene と PI3K-Akt シグナリングを含む Cancer pathway gene を抑制させる

NASH 関連肝癌の発症は, 発癌関連遺伝子である Cancer driver gene と Cancer pathway gene に深く関連することがすでに報告されている[10, 11]. 図 5A は, 肝組織を用いた RNA-seq 解析において SMAP₀^{TN} 投与によって変化した Cancer driver gene の Heatmap を示す. 高脂肪食群の SMAP₀^{TN} 非投与群において Cancer driver gene の発現が強かったが, SMAP 投与群ではこれらの遺伝子の RNA 発現が抑制される傾向が見られた. さらに個別の遺伝子を比較すると SMAP₀^{TN} 投与は, 高脂肪食群において Smd1, Mpk3, Hpb1, Scrp, Ad1b, Km6a などの Cancer driver gene の RNA 発現を有意に抑制した (図 5B) . さらに, KEGG の Cancer pathway 関連遺伝子について作成した Heatmap では, 高脂肪食群の SMAP₀^{TN} 非投与群では RNA 発現が強かったが, SMAP₀^{TN} 投与群ではこれらの RNA 発現が抑制される傾向が見られた. (図 5C および表 3) 抑制された遺伝子には PI3K-Akt シグナル伝達関連遺伝子が含まれていた (図 5C, 下の赤枠内の列) . 特に Pik3cb, Kras, Jak1, Pdk1, Rbl2, Cl4a2, Ccnd3, Fgfr3 などの PI3K-Akt シグナル伝達遺伝子の RNA 発現は, 高脂肪食群において SMAP₀^{TN} 投与によって有意に減少した (図 5D, 下のパネル) .

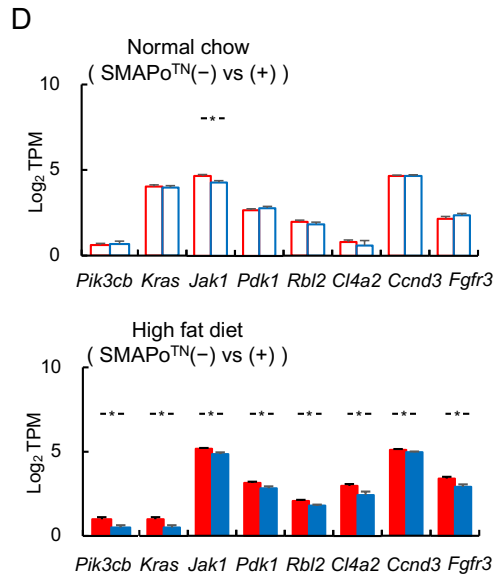
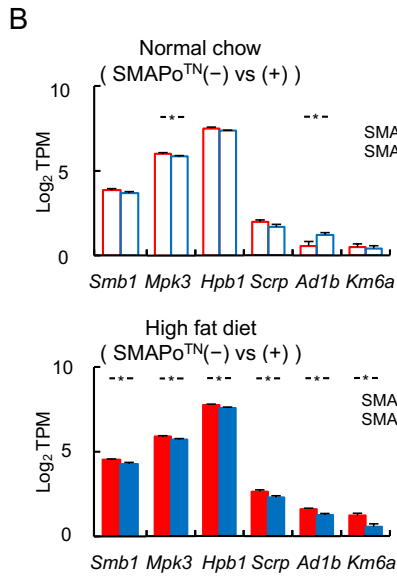
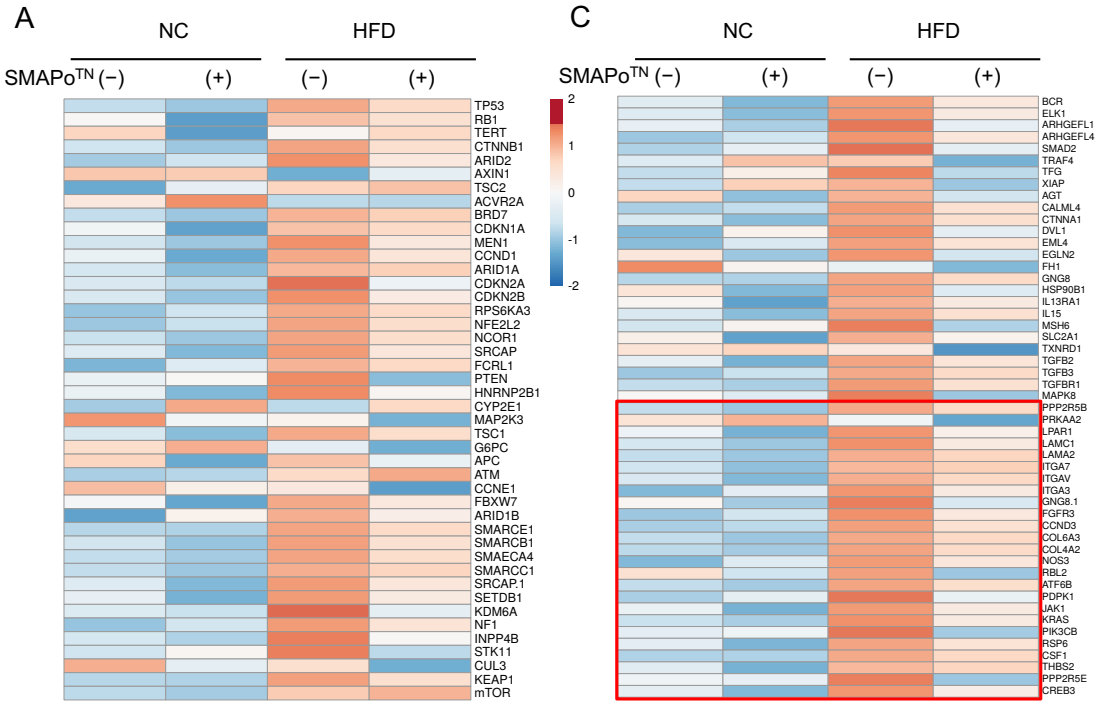


図 5. SMAP₀^{TN} は、肝組織の RNA-seq 解析における Cancer driver gene および Cancer pathway gene の発現を減少させる

(A) RNA-seq 解析された Cancer driver gene の Heatmap.

(B) 高脂肪食における SMAP₀^{TN} 投与によって有意に RNA 発現が抑制された Cancer driver gene のヒストグラム.

(C) Cancer pathway gene の Heatmap. 下の赤枠内は、PI3K-Akt signaling pathway 関連遺伝子を示す.

(D) 高脂肪食群において SMAP₀^{TN} 投与によって RNA 発現が有意に抑制された Cancer pathway 関連遺伝子発現のヒストグラム.

エラーバーは標準誤差を示す. * P < 0.05, DKO マウスの SMAP₀^{TN} 投与群と非投与群の間に有意差があることを示す.

4.8. SMAP₀^{TN} は腸内細菌叢の種多様性を改善し、腸内細菌叢の組成を変化させることにより、LPS 減少させる

LPS は、ヒトおよび DKO マウスの NASH の発症および肝癌発症に影響を与え得る[8, 9, 33]. したがって、血清および糞便の LPS 濃度を測定し、図 5A に示した. SMAP₀^{TN} 投与は、通常食群において血清と糞便、双方の LPS 濃度を低下させる傾向が見られた. 高脂肪食群では、通常食群と比較して血清と糞便の LPS 濃度が上昇したが、SMAP₀^{TN} 投与は LPS 濃度を有意に抑制した (図 6A) . 肝に流入する LPS 量を反映する、LPS 結合タンパク質 (LBP) のタンパク質発現レベルは、通常食群では、SMAP₀^{TN} 投与による変化は見られなかったが、高脂肪食群では SMAP₀^{TN} 投与によって LBP 発現の有意な抑制が見られた (図 6B) .

LPS 産生における SMAP₀^{TN} の効果を解析するために、腸内細菌叢解析を行なった. 腸内細菌叢の種多様性は高脂肪食摂餌によって減少したが、SMAP₀^{TN} 投

与は高脂肪食群において種多様性を有意に改善させた (図 6C) . Phylum level では, SMAP₀^{TN} 投与は, 通常食群と高脂肪食群の両群において, Bacteroidetes と Firmicutes の割合を増加させる傾向が見られた (図 6D, 左パネル) . Family level では, *Ruminococcaceae*, *Porphyrimonadaceae*, *Desulfovibrionaceae* などの LPS 産生菌の割合が, 通常食群と比較すると高脂肪食群において増加傾向を示したが, *Paraprevotallaceae* は高脂肪食群において減少傾向が見られた. プロバイオティクス関連菌においては, 高脂肪食群では *Lachnospiraceae* の割合が増加傾向を示し, *Lactobacillaceae* の割合が減少傾向を示した (図 6D, 右パネル) . LPS 産生菌である *Enterobacteriaceae* とプロバイオティクス関連菌である *Streptococcaceae* の割合は, 通常食群と比較すると高脂肪食群において減少傾向を示した (図 6D, 右パネル) .

図 6E に, SMAP₀^{TN} 投与によって変化した family level の各腸内細菌の変化量を示す. 通常食群では, LPS 産生菌とプロバイオティクス関連菌は, SMAP₀^{TN} 投与群と非投与群の間で有意な変化は見られなかった. 高脂肪食群では, SMAP₀^{TN} 投与により, LPS 産生菌である *Paraprevotellaceae* (-46.8%, $p = 0.089$) , *Ruminococcaceae* (-6.0%, $p = 0.781$) , *Enterobacteriaceae* (-67.2%, $p = 0.194$) の割合が減少する傾向が見られた (図 6E, 左パネル) が, 有意な変化は見られなかった. 対照的に, 高脂肪食群において SMAP₀^{TN} 投与はプロバイオティクス関連菌の *Lactobacillaceae* (+ 61.6%, $p = 0.226$) , *Lachnospiraceae* (+ 9.6%, $p = 0.586$) , および *Lactobacillus* (+ 61.5%, $p = 0.230$) の割合を増加させる傾向が見られた (図 6E, 右パネル) . これらの結果より, SMAP₀^{TN} は LPS 産生菌やプロバイオティクス関連菌などの腸内細菌叢を変化させ, 糞便の LPS 産生と肝に流入する LPS を減少させ, NASH と肝癌の発症を抑制し得ることが示唆された.

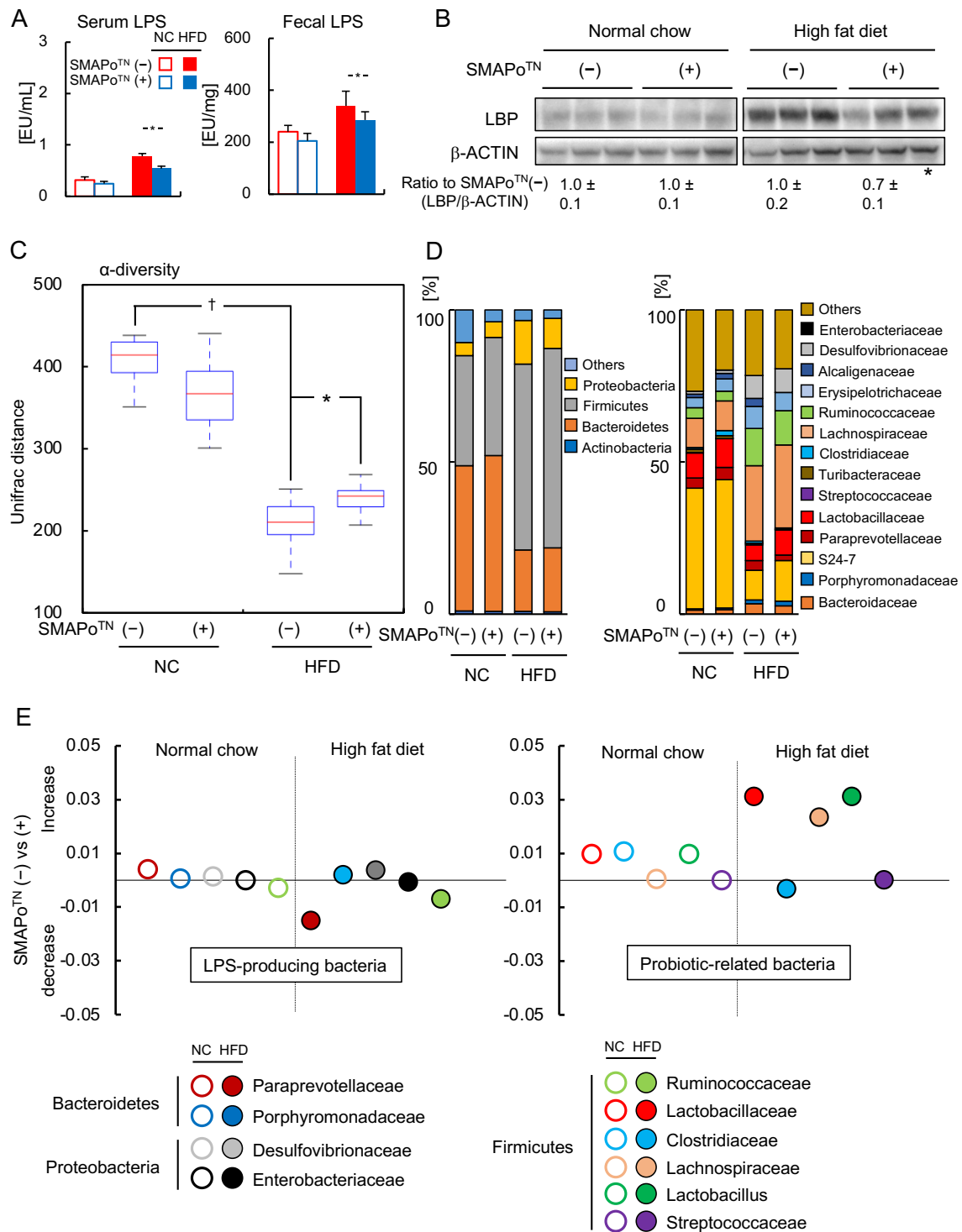


図 6. DKO マウスのリポ多糖 (LPS) と腸内細菌叢に対する SMAPo^{TN} の効果

(A) 32 週齢での通常食または高脂肪食を摂餌させた DKO マウス各々におけ

る血清（左パネル）および糞便 LPS 濃度（n = 10-13 /群）の SMAP₀^{TN} 投与群と SMAP₀^{TN} 非投与群との比較.

(B) 通常食または高脂肪食を摂餌させた DKO マウスの肝臓における LPS 結合タンパク質 (LBP) のイムノブロット分析による SMAP₀^{TN} 投与群と SMAP₀^{TN} 非投与群との比較. β -actin band をローディングコントロールとして使用した. バンドの下の数値は, 通常食群または高脂肪食群における SMAP₀^{TN} 非投与群の DKO マウスとの相対比率を示す.

(C) 腸内細菌叢における α -多様性の変化.

(D) phylum level (左パネル) および family level (右パネル) での腸内細菌の相対的組成を示す積み立て棒グラフ.

(E) family level および, 以深の level での腸内細菌叢の分類学的組成の比較解析. 左のパネルは LPS 産生菌を示し, 右のパネルはプロバイオティクス関連菌を示す.

エラーバーは標準誤差を示す. * P < 0.05, DKO マウスの SMAP₀^{TN} 投与群と非投与群の間に有意差があることを示す. † P < 0.05, 通常食を摂餌させた DKO マウスと高脂肪食を摂餌させたマウスとの間に有意差があることを示す.

第5章 考察

本研究では, SMAP₀^{TN}が通常食を摂餌させた DKO マウス (NASH モデル) の NASH の進展を抑制すること, さらに, SMAP₀^{TN}が高脂肪食を摂餌させた DKO マウス (HCC モデル) の肝癌の発症を予防することを示した. 抗酸化剤を含むレドックスポリマーとして開発された SMAP₀^{TN}は, ROS の低下に関連する機序を通じて, 肝の炎症と線維化を抑制し, さらに SMAP₀^{TN}が ER stress 関連遺伝子, Cancer driver gene, および Cancer pathway gene の発現を低下させることを示した.

5.1. DKO マウスの NASH モデル, HCC モデルとしての特性

重要な点として, 本研究で使用されたマウスモデルは, 「the multiple parallel hits theory」 [4]と一致した, ヒトの代謝性肥満, NASH, および肝癌に深く関連する代謝プロファイルを持っていることである. 雄性 DKO マウスは通常食摂餌により NASH を全例自然発症し, 50 週齢で 10%の DKO マウスが HCC を発症する[33]. さらに高脂肪食摂餌により DKO マウスは高度の肥満を伴って, 重症の NASH を発症し, 33%の DKO マウスが高分化型肝癌を発症する (図 1) . DKO マウスは, これまでの NASH モデルマウスよりもヒトの NASH に類似した表現型を示す.

5.2. 抗酸化剤 SMAP₀^{TN} の特性

NASH の発症において OS は重要な関連因子であるため, ビタミン C, ビタミン E, グルタチオンなどの抗酸化剤が NASH の治療薬候補として試験が行われてきたが, 肝臓の炎症や線維化は改善されず, NASH 発症に対する治療効果を臨床的に示すことができなかった[17, 18]. 過去の多くの抗酸化化合物は, 低分子

量であるため標的臓器である肝臓に到達する前に代謝されてしまうという問題があり NASH に対する治療効果を示すことができなかった。一方で、レドックスポリマーで構成される SMAP₀^{TN} は、高 pH 域でイオン化され、崩壊後に血中に取り込まれ、最終的に肝臓に長時間滞留し、NASH に対する治療効果を示すことができる[23].

5.3. SMAP₀^{TN} の ER stress に対する作用

これまでの研究では、SMAP₀^{TN} とは異なるタイプの抗酸化ナノ粒子である RNP^N により、肥満、肝臓を伴わないコリン欠乏アミノ酸 (CDAA) 食を摂餌させた NASH モデルマウスの肝の炎症と線維化を改善したことが報告されている [30]. 本研究では、ヒトの NASH と同様の表現型を持つマウスモデルを用いて SMAP₀^{TN} が持つ肝炎症と肝線維化に対する改善効果を示した。さらに、ER stress pathway は、NASH だけでなく肝臓の発症、進展に対する SMAP₀^{TN} の新しい作用機序として検出された。近年、ER ストレスにおける unfolded protein response (UPR) の反応を感知する遺伝子である PERK, IRE1 α , ATF6 が転写因子 NF- κ B と cross talk し、TNF α を含む炎症性シグナル伝達経路を活性化し、さらに c-Jun N 末端キナーゼ (JNK) 細胞アポトーシスを活性化することにより [37], ER ストレスは肝臓発症に深く関与することが報告されている [7]. 本研究では、SMAP₀^{TN} は通常食群において Perk の発現を減少させ、高脂肪食群において Atf6, Perk, Jnk, Edem, Vip36 の発現を減少させた。これらの結果は、SMAP₀^{TN} 投与が ER ストレスと OS を抑制し、NASH の進展抑制と肝臓の予防につながることを示している。

5.4. 肝臓における SMAP₀^{TN} の効果

肝臓は NASH の肝臓炎症と肝臓線維化によって誘発され [3], 多くの Cancer driver

gene と Cancer pathway gene が肝癌発症に関連していることが報告されている [10, 11]. 本研究での重要な知見として, SMAP₀^{TN} が複数の Cancer driver gene と Cancer pathway gene の発現を抑制したことが挙げられる (図 5). これらの遺伝子の抑制は主に高脂肪食群において観察されたため, 肝癌に対する SMAP₀^{TN} の抑制効果は直接的ではなく, 肝の炎症と線維化の抑制による可能性がある. しかし, 抗酸化剤としての SMAP₀^{TN} が肝癌の発症を実験的に抑制したという本研究での結果は, 肝癌を臨床的に予防する治療法がない現状において, 非常に興味深い結果である.

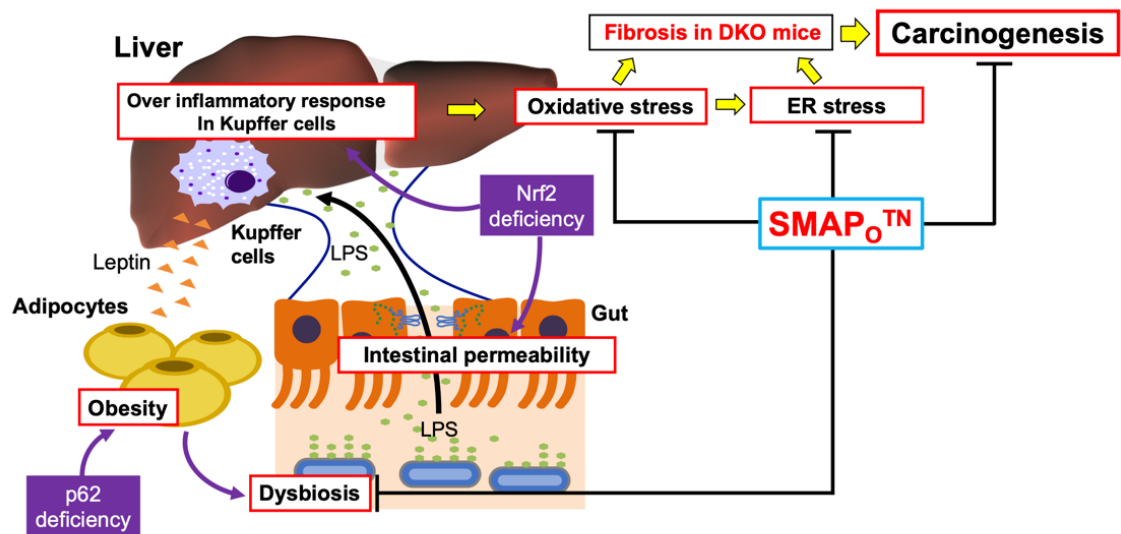
5.5. SMAP₀^{TN}はPI3K-Akt signaling pathway関連遺伝子を抑制する

さらに Cancer pathway の PI3K-Akt-mTOR シグナル伝達関連遺伝子は, 高脂肪食群において SMAP₀^{TN} 投与によって有意に減少した. β -カテニン, p53-Rb, および PI3K-Akt-mTOR 経路は, 肝癌の遺伝的変化を伴う主要なシグナル伝達経路である [10, 38]. PI3K は Akt シグナル伝達カスケードを活性化し, Akt シグナル伝達は, 癌細胞と正常細胞の両方において代謝, 成長, 増殖, 転写, タンパク質合成などの多様な機能を制御する上で重要な役割を果たす [39]. 高脂肪食群で観察された PI3K-Akt-mTOR シグナル伝達における SMAP₀^{TN} の有効性は, SMAP₀^{TN} が PI3K シグナル伝達に対する直接的な効果ではない可能性があり, SMAP₀^{TN} は, PI3K-Akt シグナル伝達に密接に関連するインスリンシグナル伝達を含む代謝経路を改善することにより, NASH 関連肝癌の発症を抑制した可能性がある.

5.6. SMAP₀^{TN}の腸内細菌叢に対する作用

本研究では, SMAP₀^{TN} 投与により高脂肪食群において血清および糞便の LPS 濃度と, 肝に流入する LPS が減少し得ることを示した (図 5A および 5B). 腸内細

菌叢由来の LPS は NASH と肝癌の発症を加速させ[4, 6, 8], LPS を阻害することにより NASH の発症を抑制することが報告されている[40]. 一部の LPS 産生菌は SMAP^o™ 投与により減少する傾向があるため, 結果として血中 LPS および便中 LPS が減少し, 肝保護に寄与した可能性がある. 腸内細菌叢異常は, 腸内細菌叢の種多様性を減少させ, 腸管からの LPS フラックスを増加させることにより, 肝の線維化に寄与する[41]. SMAP^o™ 投与は, 種多様性を改善し, LPS 産生およびプロバイオティクス関連菌を含む腸内細菌叢の組成を変化させ得る (図 5C-5D). これまでの研究では, pH 非依存性の RNP^o は ROS を除去することによって腸内細菌叢を改善することが報告されている[29]. また SMAP^o™ 投与により, 腸管のバリア機能を保護することが認められている *Lactobacillaceae* などのプロバイオティクス関連菌[42]が増加する可能性があることも本研究で示された. さらに *Lactobacillus* や *Bifidobacterium* などのプロバイオティクス関連菌が腸内細菌叢の種多様性を高め, LPS を減少させ, 肝の炎症を軽減させる可能性があることも報告されている[43, 44]. 本研究の結果は, SMAP^o™ が腸内細菌叢の種多様性を改善し, 腸管から流入する LPS を減少させることにより, 「腸-肝連関」の観点から, NASH だけでなく肝癌に対しても保護効果があることを示唆した.



Akiyama K, et al, *Exp. Anim.* 2018, 67, 201-218 より一部引用

図 6. DKO マウスに対する SMAP_O^{TN} の作用機序

高脂肪食を摂餌させた DKO マウスでは、炎症・酸化ストレスの病態下に ER ストレスが蓄積しており、一方、Nrf2 欠失の環境下において、SMAP_O^{TN} は蓄積した ER ストレス、酸化ストレスを緩和し、NASH による肝線維化や肝癌発症を抑制すると推測される。

第6章 結語

SMAP₀^{TN} は, NASH の進展を抑制し, DKO マウスの肝癌発症を抑制した. SMAP₀^{TN} は肝臓における酸化ストレス, ER ストレスの緩和, 発癌関連遺伝子発現の低下, 腸内細菌叢の種多様性の回復を導き, NASH 肝病変の進展と肝発癌に対して予防効果を発揮する新規薬物となり得ると考えられた.

謝辞

本研究の遂行にあたり，懇切なるご指導・ご鞭撻を賜りました筑波大学 医療科学類 正田純一教授，筑波大学 数理物質系 長崎幸夫教授，筑波大学 医学医療系 土屋輝一郎教授，筑波大学 医学医療系 医療科学類 岡田浩介准教授，筑波大学 医学医療系 環境分子生物学研究室 蕨栄治講師に厚く御礼申し上げます。

博士学位論文を提出するにあたって，主査を引き受けていただきました筑波大学 医学医療系 竹越一博教授に厚く御礼申し上げます。また，副査を引き受けていただきました筑波大学 医学医療系 大原信教授，長谷川直之講師，濱田 理人助教に厚く御礼申し上げます。

本研究にて用いたマウスをご供与くださいました東北大学大学院 医学系研究科 山本雅之教授，筑波大学 医学医療系 歯科口腔外科 柳川徹教授に深謝いたします。また本研究に用いた SMAP₀^{TN}をご供与くださいました筑波大学 数理物質系 長崎幸夫教授に深謝いたします。また適切なご助言と多大なるご協力をいただきました東京女子医科大学 消化器外科 有泉俊一准教授に深謝いたします。脂肪酸分析におきまして適切なご助言と多大なるご協力をいただきました東京海洋大学 食品生産科学部門 後藤直宏教授，田中誠也助教に深謝いたします。腸内細菌叢解析におきまして適切なご助言と多大なるご協力をいただきました筑波大学 歯科口腔外科 内田文彦講師に深謝いたします。

また，当研究室において苦楽を共にしてきた筑波大学 消化器内科 陶経緯先生，筑波大学 歯科口腔外科 千原佳菜子先生，修了生 三浦征氏に心より御礼申し上げます。研究・実験の器具の準備，整備などで研究生活を支えてくださっ

た筑波大学 医学医療系技術室 技術専門職員 木内美紀氏に心より御礼申し上げます。

本研究は JSPS 科研費 (No. JP21K07933, JP20K08275, JP22K08072, JP21H03372, JP21K11668, JP21K07860, 19H05458) , The Japanese Society of Gastroenterology (JSGE) Grant の助成を受けたものです。

本学位論文の原著論文は, **Antioxidants** に掲載されました。

引用文献

1. Malecka-Tendera, E.; Mazur, A. Childhood obesity: a pandemic of the twenty-first century. *Int. J. Obes (Lond)*. 2006, 30, S1-3.
2. Farrell, G, C.; Larter, C, Z. Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to cirrhosis. *Hepatology*. 2006, 43, 99-112.
3. Bugianesi, E.; Leone, N. Expanding the natural history of nonalcoholic steatohepatitis: from cryptogenic cirrhosis to hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 2002, 123, 134-140.
4. Tilg, H.; Moschen, A, R. Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: The multiple parallel hits hypothesis. *Hepatology*. 2010, 52, 1836-46.
5. Brahma, M, K.; Gilgioni, E, H. Oxidative stress in obesity-associated hepatocellular carcinoma: sources, signaling and therapeutic challenges. *Oncogene*. 2021, 40, 5155-5167.
6. Borrelli, A.; Bonelli, P. Role of gut microbiota and oxidative stress in the progression of non-alcoholic fatty liver disease to hepatocarcinoma: Current and innovative therapeutic approaches. *Redox Biol*. 2018, 15, 467-79.
7. Lebeaupin, C.; Vallee, D. Endoplasmic reticulum stress signaling and the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. *J. Hepatol*. 2018, 69, 927-947.
8. Dapito, H.; Mencin, A. Promotion of Hepatocellular Carcinoma by the Intestinal Microbiota and TLR4. *Cancer Cell*. 2012, 21, 504–516.
9. Zhou, A.; Tang, L. Gut microbiota: A new piece in understanding hepatocarcinogenesis. *Cancer Lett*. 2020, 474, 15-22.
10. Totoki, Y.; Tatsuno, K. Trans-ancestry mutational landscape of hepatocellular carcinoma genomes. *Nature genomics*. 2014, 46, 1267-1276.

11. Schulze, K.; Imbeaud, S. Exome sequencing of hepatocellular carcinoma identifies new mutational signatures and potential therapeutic targets. *Nature Genetics*. 2015, 47, 505-11.
12. Defour, J, E.; Caussy, C. Combination Therapy for Non-Alcoholic Steatohepatitis: Rationale, Opportunities and Challenges. *Gut*. 2020, 69, 1877-1884.
13. Cardoso, A, C.; Sanyal, A, J. New Drugs for Non-Alcoholic Steatohepatitis. *Liver Int*. 2020, 40, 96-101.
14. Cusi, K. Role of obesity and lipotoxicity in the development of nonalcoholic steatohepatitis: pathophysiology and clinical implications. *Gastroenterology*. 2012, 142, 711-725.
15. Margini, C.; Dufour, J, F. The story of HCC in NAFLD: from epidemiology, across pathogenesis, to prevention and treatment. *Liver Int*. 2016, 36, 317-324.
16. Farazi, P, A.; DePinho, R, A. Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment. *Nat. Rev. Cancer*. 2006, 6, 674-687.
17. Sanyal, A, J.; Chalasani, N. Pioglitazone, vitamin E, or placebo for nonalcoholic steatohepatitis. *N. Engl. J. Med*. 2010, 362, 1675-1685.
18. Lavine, J, E.; Schwimmer, J, B. Effect of vitamin E or metformin for treatment of nonalcoholic fatty liver disease in children and adolescents: the TONIC randomized controlled trial. *JAMA*. 2011, 305, 1659-1668.
19. Italian Association for the Study of the Liver (AISF). AISF Position Paper on Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD): Updates and Future Directions. *Dig Liver Dis*. 2017, 49, 471-483.
20. Estes, C.; Anstee, Q, M. Modeling NAFLD disease burden in China, France, Germany, Italy, Japan, Spain, United Kingdom, and United States for the period

- 2016-2030. *J. Hepatol.* 2013, 69, 896-904.
21. Tateishi, R.; Uchino, K. A Nationwide survey on non-B, non-C hepatocellular Carcinoma in Japan: 2011-1015 update. *J. Gastroenterol.* 2019, 54, 367-376.
 22. Reddy, J, K.; Rao, M, S. Lipid metabolism and liver inflammation. II. Fatty liver diseases and fatty acid oxidation. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Pysiol.* 2006, 29, G852-G858.
 23. Neuschwander-Tetri, B, A.; Caldwell, S, H. Nonalcoholic steatohepatitis: summary of an AASLD Single Topic Conference. *Hepatology.* 2003, 37, 1202-1219.
 24. Yuksel, B, C.; Serdar, S, E.; Tuncel, A. Effect of tempol, a membrane-permeable radical scavenger, on mesenteric blood flow and organ injury in a murine cecal ligation and puncture model of septic shock. *Eur. Surg. Res.* 2009, 43, 219–227.
 25. Soule, B, P.; Hyodo, F.; Matsumoto, K. The chemistry and biology of nitroxide compounds. *Free Radic Biol Med.* 2007, 42, 1632-1650.
 26. Nagasaki, Y. Nitroxide radicals and nanoparticles: a partnership for nanomedicine radical delivery. *Ther. Deliv.* 2012, 3, 165–179.
 27. Shimizu, M.; Yoshitomi, T.; Nagasaki, Y. The behavior of ROS-scavenging nanoparticles in blood. *J. Clin. Biochem Nutr.* 2014, 54, 166–173.
 28. Monti, E.; Supino, R.; Colleoni, M. Nitroxide TEMPOL impairs mitochondrial function and induces apoptosis in HL60 cells. *J. Cell. Biochem.* 2001, 82, 271–276.
 29. Vong, L, B.; Nagasaki, Y. Oral nanotherapeutics: effect of redox nanoparticle on microflora in mice with dextran sodium sulfate-induced colitis. *J. Gastroenterol.* 2014, 49, 806–813.
 30. Eguchi, A.; Ngasaki, Y. Redox nanoparticles as a novel treatment approach for inflammation and fibrosis associated with nonalcoholic steatohepatitis. *Nanomedicine.* 2015, 10, 2697-2708.
 31. Piguet, A, C.; Saran, U. Regular exercise decreases liver tumors development in hepatocyte-specific PTEN-deficient mice independently of steatosis. *J. Hepatol.* 2015, 62, 1296-1303.
 32. Arfianti, A.; Pok, S. Exercise retards hepatocarcinogenesis in obese mice

- independently of weight control. *J. Hepatol.* 2020, 73, 140–148.
33. Akiyama, K.; Warabi, E. Deletion of both p62 and Nrf2 spontaneously results in the development of nonalcoholic steatohepatitis. *Exp. Anim.* 2018, 67, 201-218.
 34. Bedossa, P.; Poitou, C. Histopathological algorithm and scoring system for evaluation of liver lesions in morbidly obese patients. *Hepatology.* 2012, 56, 1751-1759.
 35. Okada, K.; Shoda, J. Nrf2 inhibits hepatic iron accumulation and counteracts oxidative stress-induced liver injury in nutritional steatohepatitis. *J. Gastroenterol.* 2012, 47, 924-935.
 36. Gotoh, N.; Nagao, K. Effects of three different highly purified n-3 series highly unsaturated fatty acids on lipid metabolism in C57BL/KsJ-db/db mice. *J. Agric. Food. Chem.* 2009, 57, 11047–11054.
 37. Lin, Y.; Jiang, M. Cancer and ER stress: Mutual crosstalk between autophagy, oxidative stress and inflammatory response. *Biomed. Pharmacother.* 2019, 118, 109249.
 38. Bidkhorji, G.; Benfeitas, R. Metabolic network-based stratification of hepatocellular carcinoma reveals three distinct tumor subtypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2018, 115, 11874-11883.
 39. Haddadi, N.; Lin, Y. PTEN/PTENP1: Regulating the regulator of RTK-dependent PI3K/Akt signaling, new targets for cancer therapy. *Molecular Cancer.* 2018, 17:37.
 40. Tsuji, Y.; Yoshiji, H. Bile Acid Sequestrant, Sevelamer Ameliorates Hepatic Fibrosis with Reduced Overload of Endogenous Lipopolysaccharide in Experimental Nonalcoholic Steatohepatitis. *Microorganisms.* 2020, 8, 925-943.
 41. Minicis, D, S.; Rychlicki, C. Dysbiosis Contributes to Fibrogenesis in Course of

- Chronic Liver Injury in Mice. *Hepatology*. 2014, 59, 1738-1749
42. Li, S.; Qi, C. Lactobacillus reuteri improves gut barrier function and affects diurnal variation of the gut microbiota in mice fed a high-fat diet. *Food Funct*. 2019, 10, 4705-4715.
43. Hutchinson, N, A.; Tingo, L. The Potentials Effects of Probiotics and ω -3 Fatty Acids on Chronic Low-Grade Inflammation. *Nutrients*. 2020, 12, 2402.
44. Rodes, L.; Khan, A. Effect of Probiotics *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* on Gut-Derived Lipopolysaccharides and Inflammatory Cytokines: An In Vitro Study Using a Human Colonic Microbiota Model. *J. Microbiol. Biotechnol*. 2013, 23, 518-526.