

筑波大学

博士（医学）学位論文

p62:Nrf2 二重欠損マウスは
非アルコール性脂肪性肝炎を自然発症する

2 0 1 7

筑波大学大学院博士課程人間総合科学研究科

秋山 健太郎

目次

略語	1
要旨	4
第 1 章 序文.....	5
非アルコール性脂肪性肝炎.....	5
既存 NASH モデルマウス	6
過食肥満マウス <i>p62</i> -KO.....	8
転写因子 <i>Nrf2</i>	9
新たな NASH モデルマウスの作製.....	10
第 2 章 実験方法	15
第 3 章 結果.....	29
DKO マウスは通常食飼育下で過食肥満となり インスリン抵抗性およびアディポカインの不均衡を呈する.....	29
DKO マウスは脂肪性肝炎と肝腫瘍を発症する.....	34
DKO マウスは腸内細菌叢が変化し，血清中 LPS 濃度が増大する	41
腸管上皮における <i>Nrf2</i> の欠損は タイトジャンクションタンパク質 <i>Zo-1</i> の発現を低下させ，腸管透過性を亢進させる.....	43
DKO マウスの Kupffer 細胞は，若齢時より炎症が惹起され，食食能が低下している.....	49
マクロファージにおける <i>Nrf2</i> の欠損は LPS の感受性を増大させる.....	54
摂餌制限による体重コントロールは腸内細菌叢の変化を抑制し，脂肪性肝炎を改善させる	56
第 4 章 考察.....	59
第 5 章 結語.....	75
謝辞	76

引用文献.....	78
-----------	----

略語

本文中には以下の略語を用いた.

4-HNE	4-hydroxy-2-nonenal
Ab	antibody
ACC	acetyl-CoA carboxylase
ALT	alanine aminotransferase
ANOVA	analysis of variance
AOX	acyl-CoA oxidase
AST	aspartate aminotransferase
ARE/EpRE	antioxidant/electrophile responsive element
CNC	Cap'n'collar
DKO	double-knockout
EU	endotoxin units
Elovl 6	ELOVL fatty acid elongase 6
FAS	fatty acid synthase
FITC	fluorescein isothiocyanate
GAPDH	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
H&E	hematoxylin-eosin
HCC	Hepatocellular carcinoma
HOMA-IR	homeostatic model assessment for insulin resistance
Il	interleukin
Keap1	Kelch-like ECH-associated protein1
KO	knockout

LIR	LC3-interacting region
LPS	lipopolysaccharide
LXR	liver X receptor
MARCO	macrophage receptor with collagenous structure
Mcp-1	monocyte chemoattractant protein-1
MRI	magnetic resonance imaging
MCD	methionine-and choline- deficient
NAFLD	nonalcoholic fatty liver disease
NASH	nonalcoholic steatohepatitis
NF- κ B	nuclear factor-kappa B
NK	natural killer
Nrf2	nuclear factor erythroid 2-related factor 2
PB1	Phox and Bem1p
Pten	phosphatase and tensin homolog
PPAR	peroxisome proliferator activated receptor
qRT-PCR	quantitative real-time polymerase chain reaction
ROS	reactive oxygen species
SCD	stearoyl-CoA desaturase
SPIO	superparamagnetic iron oxide
SQSTM1	sequestosome 1
SR-A	class A macrophage scavenger receptor
SREBBP	sterol regulatory element-binding protein
TER	transepithelial electrical resistance
Tgf- β 1	transforming Growth Factor- β 1

TLR	toll-like receptor
Tnf- α	tumor necrosis factor- α
UBA	ubiquitin-associated
WT	wild-type
Zo-1	zona occludens-1

要旨

過食肥満や運動不足による生活習慣病の罹患率の上昇とともに増加の一途をたどるのが非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）である。NASHは、生活習慣病を基礎に発症し、肝硬変さらには肝臓まで進行するため世界中で強く問題視されている。しかしながら、過食肥満を呈する適切なモデルマウスがおらず、発症機序の解明や治療標的の同定が困難となっている。そこで本研究では、過食肥満を呈する *p62* 欠損マウスと炎症が増悪する *Nrf2* 欠損マウスを掛け合わせ、新たな NASH モデルとして *p62:Nrf2* 遺伝子二重欠損 (DKO) マウスを作製した。DKO マウスは、過食肥満、インスリン抵抗性を認め、NASH を自然発症した。また、50 週齢以降の DKO マウスの約 12% に肝腫瘍が認められた。DKO マウスの NASH 発症機序は、*Nrf2* 欠損による腸管のバリア機能低下、Kupffer 細胞の LPS に対する過剰な炎症反応、さらに、*p62* 欠損によるアディポカインのアンバランス、腸内細菌叢の変化によるエンドトキシン (lipopolysaccharide, LPS) 産生の増大が同時に進行することで NASH へと進展することを示した。さらに、DKO マウスの最大の特徴である過食肥満と NASH 発症の関連を調べるために、Pair-feeding による摂餌制限を行ったところ、糞便および血清 LPS の低下に関連して、NASH の肝臓状態を改善することが見出された。以上のことから、*p62:Nrf2* 遺伝子二重欠損マウスでは、過食肥満を介して肝臓内外で起こる腸からの過剰な LPS の流入による先天性免疫活性化が NASH の肝臓損傷の発生の主要な原因であることが示唆された。DKO マウスは、ヒト NASH の病原性および治療標的を同定するためのユニークな動物モデルである。

第1章 序文

非アルコール性脂肪性肝炎

近年、運動不足と食生活の欧米化によって日本の肥満人口が増加しており、メタボリックシンドロームに罹患する患者数も増加している。人間ドックを受診した4人に1人は肥満を呈し、高血圧、高コレステロール、耐糖能異常も増加し、さらに顕著な増加を示すのが肝機能異常である。この増加の背景には、肝臓に脂肪が蓄積することによって生じる脂肪性肝疾患の増加が考えられる。脂肪性肝疾患の病因は、過剰飲酒、過食肥満や糖尿病などのインスリン抵抗性、内分泌疾患、極度の低栄養、薬物などがあげられ、大きくアルコール性と非アルコール性脂肪性肝疾患（NAFLD）に分類される。NAFLDは、非アルコール性脂肪肝（NAFL）と非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）からなる。NASHは生活習慣病を基礎に発症する進行性の肝障害であり、肝臓におけるメタボリックシンドロームの表現型として考えられている。NASHは、飲酒歴がなく脂肪変性、炎症性細胞浸潤、肝細胞傷害を特徴とする肝炎で、肝硬変さらには肝癌まで進行する可能性があることから強く問題視されている（1）（図A）。今後、NASHは慢性肝疾患における最大の問題となることが予測される。

NASHの発症は、肝脂肪沈着の病態に炎症を誘導する因子（酸化ストレスや炎症性サイトカイン等）が加わることにより引き起こされるという「Two-hit theory」が提唱されてきた（2）。しかし、肝脂肪沈着と炎症が同時あるいは炎症が肝脂肪化に先行することも想定される様になり、NASHの発症と進展においてこの「Two-hit theory」では説明しきれない病態があることが明らかになってきた（3, 4）。そこで近年、肝臓だけではなく脂肪組織や腸管由来の様々な因子（アディポサイトカインや酸化ストレス、食事因子、エンドトキシン、先天性免疫異常）が

並行して肝臓に作用し NASH の病態進展に関与しているという「Multiple parallel hits hypothesis」が提唱されている (5) (図 B). 「Multiple parallel hits hypothesis」では、腸管細菌叢の菌体成分である lipopolysaccharide (LPS) が腸管粘膜バリアを越え肝臓に到達し、肝臓類洞壁細胞の Kupffer 細胞に作用することが肝炎、肝線維化へ進行する重要な因子とみなされている。また、過食肥満は NASH の基本的病因とされており、マウスおよびヒトの先行研究において、過食肥満は腸内細菌叢を変化させることが報告されている。以上より過食肥満および腸肝連関は、NASH 進展と密接に関連していると考えられる。

既存 NASH モデルマウス

従来、NAFLD/NASH モデル動物としてマウスやラットを合わせ、約 40 種類知られている。その発症機序から、1. 肝臓への脂肪酸送達量を増加させたモデル、2. *De novo lipogenesis* を増加させたモデル、3. β 酸化を減少させたモデル、4. 超低密度リポタンパク質 (VLDL) の分泌を抑制させたモデル、5. 肝臓のコレステロールを増加させたモデル、6. LPS 誘発肝臓炎症モデルの 6 種類に大別される (6)。1. 肝臓への脂肪酸送達量を増加させたモデルには、主に高脂肪食を投与したモデルやレプチン欠損マウス (*ob/ob* マウス) が含まれるが、これらのマウスは重篤な線維化、や肝細胞癌 (HCC) は現れないという問題点がある (6)。2. *De novo lipogenesis* を増加させたモデルには、主に肝特異的 *phosphatase and tensin homolog (Pten)* 欠損マウスが含まれる。肝特異的 *Pten* 欠損マウスは、ヒト NASH の特徴である大滴性脂肪肝、小葉炎症性細胞浸潤、類洞周囲の線維化、HCC を示す。しかし、肝特異的 *Pten* 欠損マウスはインスリン抵抗性を示すにもかかわらず、肥満と脂肪酸の上昇を示さないことが問題点としてあげられる (7)。3. β 酸化を減少させたモデルには、主に肝特異的レチノイン酸受容体

α 機能阻害トランスジェニックマウスやアセチル CoA 酸化酵素 1 欠損マウスがあげられる (8, 9). 肝特異的 RAR α 機能阻害トランスジェニックマウスは, 早期に脂肪性肝炎が起き, 16 月齢で肝腫瘍が生じる. しかし, 線維化は起きない

(8). 一方, acyl-CoA oxidase (AOX) 欠損マウスは, 激しい肝の脂肪変性とペルオキシソームの増殖がおき, ペルオキシソームにおける脂肪酸酸化が増加する. さらに, 肝臓の炎症, 細胞増殖, 発がんが起きる. しかし, 肝特異的 RAR α 機能阻害トランスジェニックマウスと同様に線維化を示さない (9).

4. 超低密度リポタンパク質の分泌を抑制させたモデルには, メチオニン・コリン欠乏 (MCD) 食投与による食餌誘発性マウスがあげられる. MCD 食誘発性 NASH モデルマウスは頻繁に使用されるモデルマウスである. このモデルマウスは, アラントランスアミナーゼ (ALT) とアスパラギン酸トランスアミナーゼ (AST) の上昇, 脂肪肝, 限局的な炎症, 線維化を特徴とする病理学的変化を生じる. しかし, このモデルは脂肪酸の増加, 肥満, インスリン抵抗性を示さない (10).

5. 肝臓のコレステロールを増加させたモデルには, インターロイキン 1 (IL-1) 受容体アンタゴニスト欠損マウスがあげられる. IL-1 は炎症で重要な役割を演じるサイトカインであるが, コレステロール代謝にかかわる内分泌を通して, 末梢のエネルギーホメオスタシスにも関与している. IL-1 受容体アンタゴニストは, IL-1 の効果を妨げる役割があり, その欠損マウスは, アテローム生成食の 20 週間の投与により, 激しい脂肪肝, 細胞周囲の線維化, 炎症性細胞浸潤などの病態を示す (11).

6. LPS 誘発肝臓炎症モデルは, 高脂肪食を投与したマウスに, 低用量 LPS を腹腔内に注射し炎症を引き起こすモデルである. 腸管由来の LPS は, 単純性脂肪肝から脂肪性肝炎への病気の進行に重要な役割を演じると報告されている. 低量 LPS 誘発性 NASH モデルマウスは, 脂肪酸の増加, 肥満, インスリン抵抗性, 炎症, 線維化を呈するが, 腫瘍は生じない.

上記のモデル動物は、肥満やインスリン抵抗性を示さず、不自然な体重の減少や急激な症状の進行を認めるモデルや NASH の病態形成に重要な肝の線維化や腫瘍形成を伴わないモデルなどがあり、生活習慣病を基礎に発症するヒト NASH とは乖離している可能性がある。また、NASH の病態形成に重要な過食肥満を呈するモデル動物の報告は少なく、線維化および腫瘍形成を伴うモデルの報告はない。したがって、ヒト NASH において観察される基本的病態である過食肥満、インスリン抵抗性、炎症、線維化および腫瘍形成を伴うモデルマウスの開発が望まれる。そこで本研究では、過食肥満およびインスリン抵抗性を呈する *p62* 遺伝子欠損 (*p62*-KO) マウスに注目した。

過食肥満マウス *p62*-KO

p62/Sequestosome 1/A170/ZIP (p62) はマウス腹腔マクロファージからジエチルマレイン酸、パラコートなどの親電子性物質や活性酸素種 (ROS) により誘導される機能未知のストレス応答タンパク質として発見され (12)、ヒトを含む高等生物で広く保存されている。*p62* タンパク質は 442 個のアミノ酸からなり、その構造中には Phox and Bem 1p (PB1) ドメイン、Zn-finger ドメイン、LC3-interacting region (LIR) モチーフ、ubiquitin-associated (UBA) ドメインなどを有し、細胞内シグナル伝達系に関与するとともにタンパク質分解経路に関与する因子であることが示唆されている (13, 14)。また、*p62* は C 末端側近傍に非共有結合性のユビキチン結合ドメイン UBA を有しており、ユビキチン-プロテアソーム系のタンパク質分解経路に関与する。さらに、*p62* はオートファゴソーム膜の形成因子である LC3 と相互作用する因子であり、ユビキチンや LC3 との相互作用を介して選択的オートファジー (自食作用) に関与し、オートファジー活性欠損に伴う肝細胞、脳神経細胞内のタンパク質封入体の形成に深く関わっている (14)。

しかし、*p62-KO* マウスの表現型の最大の特徴は、過食肥満を呈することである。当研究室における解析では *p62-KO* マウスは過食となり、加齢とともに肥満症を呈することが確認されている。*p62-KO* マウスの視床下部神経細胞において、摂食抑制に中心的な役割を果たすホルモンであるレプチンの作用に必須である転写因子 Stat3 の核移行の効率が低下しているため、過食肥満となる (15)。また、*p62-KO* マウスはインスリン抵抗性および2型糖尿病を発症し、ヒト NASH と同様にインスリン抵抗性を示すモデルマウスである。スペインの研究チームの解析においても同様に加齢に伴う肥満症、耐糖能異常、インスリン抵抗性、レプチン抵抗性が報告されているが、肥満症の原因は基礎代謝の低下、脂肪細胞の分化亢進であると示唆されている (16)。しかし、*p62-KO* マウスは過食肥満および脂肪肝を呈するが、肝臓の激しい線維化が起きず、NASH とならない問題点がある。つまり *p62* 欠損に加え、さらに炎症および線維化を増悪させる因子が必要であると考えられる。そこで、酸化ストレスや炎症に密接に関わりのある Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) に着目した。

転写因子 Nrf2

Nrf2 は抗酸化剤や酸化ストレス剤により活性化する転写因子であり、多くの抗酸化ストレスタンパク質の発現を正に制御している (17)。Nrf2 は塩基性領域/ロイシンジッパー構造を持ち、発生およびホメオスタシス上の重要な機能をもつ Cap'n'collar 転写因子群に属している (18)。非ストレス状態下における Nrf2 は Kelch-like ECH-associated protein1 (Keap1) と結合しており、Keap1 による抑制を受け、プロテアソームによって分解される。この Nrf2 分解作用は Keap1 が Cullin3 型ユビキチン E3 ライゲースのアダプターとして機能し、Nrf2 のユビキチン化を促進することによる (19)。一方、細胞が親電子性物質、活性酸素、小胞体スト

レスなどの刺激を受けると、Nrf2 は Keap1 の抑制から開放されて活性化する。活性化して核内へと移行した Nrf2 は、small Maf 群因子とヘテロ二量体を形成し、抗酸化剤/親電子性物質応答配列 (ARE/EpRE) と結合することで抗酸化/解毒代謝遺伝子群の発現を増強する (17)。文献上、Nrf2 と p62 の両遺伝子については p62 遺伝子の発現が Nrf2 により正に制御されている点 (20)、および p62 タンパク質が Nrf2 の機能抑制タンパク質である Keap1 と結合することで Nrf2 の活性化調節因子となっている点の関係性が報告されている (21)。また、Nrf2 は主に炎症を増悪させるサイトカインであるインターロイキン 6 (Il-6) や Il-1 β の遺伝子の発現を阻害することで、炎症を抑えていることが報告されている (22)。Nrf2 遺伝子欠損 (Nrf2-KO) マウスは種々の薬剤投与に対し易感受性であり、アセトアミノフェン投与により著明な急性肝障害が生じる (23)。また、当研究室の解析では MCD 食投与によって Nrf2-KO マウスは NASH がより早期に重篤な病態となることを見出している (24)。しかし、通常食飼育下での病態発症は全くみられない。さらに、Nrf2 過剰発現マウス (Keap1^{flox/-}) に MCD 食を投与した場合、肝脂肪化、炎症、肝線維化といった NASH 病態が抑制される (25)。以上のことから、Nrf2 欠損は NASH 進展における炎症および線維化を増悪させると考えられる。

新たな NASH モデルマウスの作製

「Two-hit theory」や「Multiple parallel hits hypothesis」の概念から過食肥満および炎症増悪因子 (炎症性サイトカイン、腸管由来の LPS、先天性免疫異常) が NASH の発症および進展に重要な役割を演じていることは明らかである。また、p62-KO マウスは、過食肥満となり脂肪肝を呈し、Nrf2-KO マウスは炎症および線維化を増悪する。以上のことから、p62-KO マウスと Nrf2-KO マウスを掛け合

わせた *p62:Nrf2* 遺伝子二重欠損 (DKO) マウスは, NASH を自然発症するのではないかと考えた.

過食肥満マウスには他に *ob/ob* マウスや *db/db* マウスが知られている. *ob/ob* マウスはレプチンの欠損により, *db/db* マウスはレプチン受容体の欠損により, 過食による著明な肥満と高血糖を呈すると報告されている (6). しかし, レプチンは摂食抑制に寄与しているが, 炎症の増悪にも関与しているが知られている. NASH において炎症は最も重要な因子の一つであるため, これらのマウスは適していない. 炎症を増悪させるモデルマウスとして, 他に Heme oxygenase 1 (*HO-1*) 遺伝子欠損マウスや *Il-10* 遺伝子欠損マウスがあげられる (26, 27). しかし, *HO-1* は *Nrf2* の下流遺伝子であり, *Nrf2-KO* マウスは当研究室の先行研究にて NASH における炎症や線維化が増悪すると報告していることから, 本研究では *Nrf2-KO* マウスを採用した.

NASH 発症進展において過食肥満は重要であるといわれている. しかし, 過食肥満を呈し NASH を発症するモデル動物は未だ報告はない. そこで本研究では, *p62:Nrf2-DKO* マウスを作製および解析し, 過食肥満を呈する新たな NASH モデルマウスとして適しているかを検討した. また, *p62:Nrf2-DKO* マウスが過食肥満を呈する NASH モデルマウスであった場合, 過食肥満および腸肝連関を中心に解析し, DKO マウスの NASH 発症機序における両者の関連性に迫った (図 C).

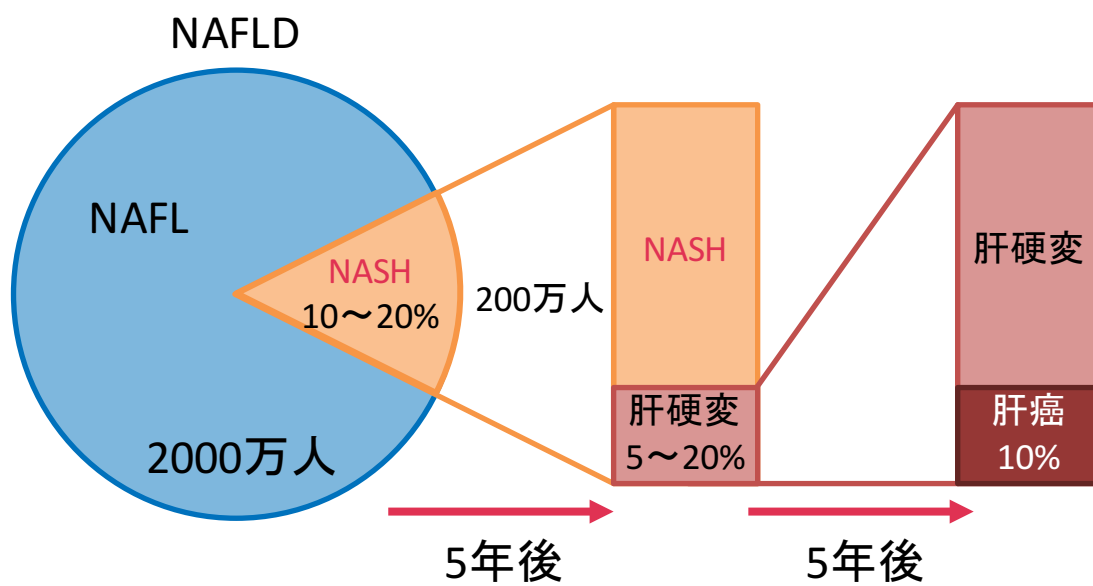


図 A. NASH は進行性の慢性肝疾患である

日本肝臓学会編, NASH・NAFLD の診療ガイド : 26, 2015 より改変

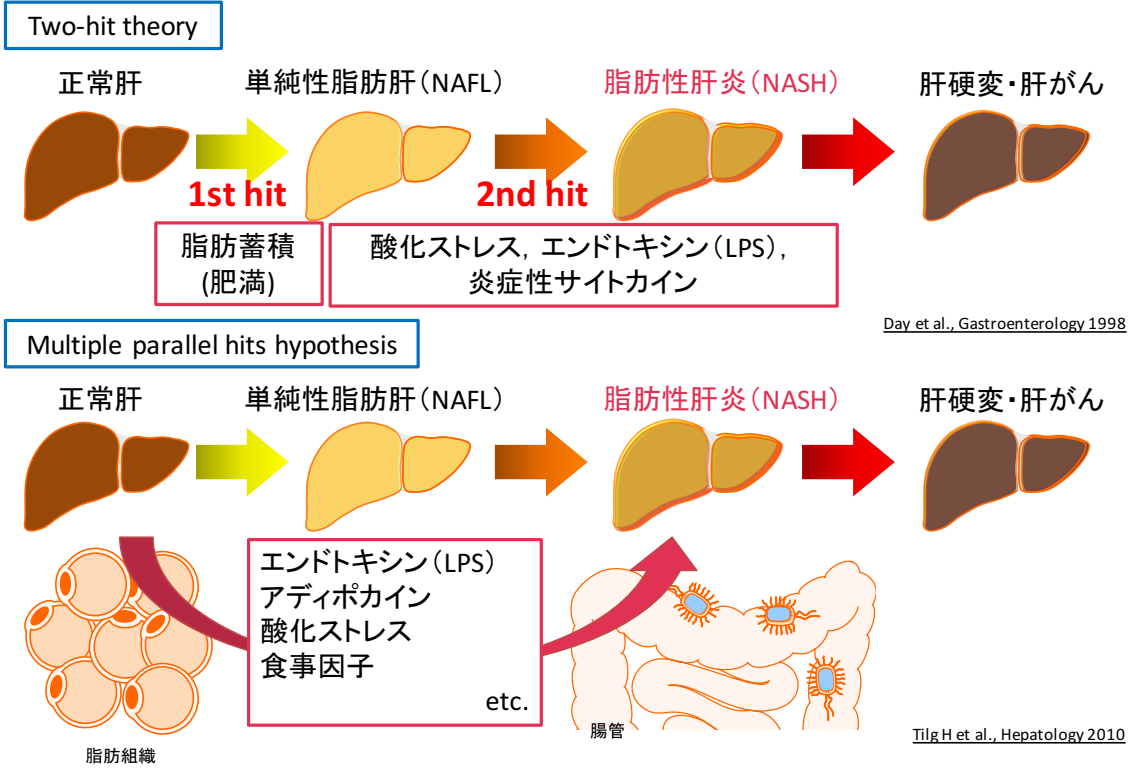


図 B. 「Two-hit theory」 および 「Multiple parallel hits hypothesis」

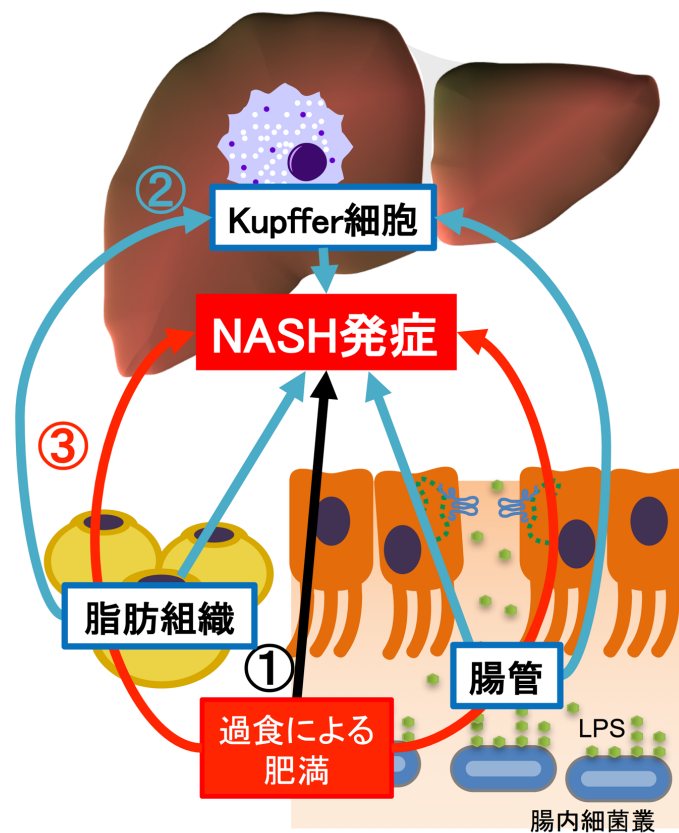


図 C. 本研究におけるリサーチクエスチョン

- ① 臨床研究により過食による肥満と NASH 発症との関連が示唆されているが、過食肥満が NASH 発症の原因か否かの因果関係は示されていない。
- ② ヒト NASH において Kupffer 細胞，脂肪組織，腸管による臓器連関が「Multiple parallel hits hypothesis」にて唱えられているが，それぞれの臓器連関を同時に示すモデルはない。
- ③ 臨床研究により過食肥満はアディポカインのアンバランスと腸内細菌叢の異常に関与していると示唆されている。しかし，過食肥満によって引き起こされるそれぞれの異常と NASH 発症との因果関係は示されていない。

第 2 章 実験方法

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 MΩ-cm 以上の超純水を用いた。

Bio-Rad 社 (USA)

- ニトロセルロース膜
- ミニプロテイン TGX ゲル

Agilent 社 (Dako 社, USA)

- EnVision キット/HRP

VSL Pharmaceuticals 社

- VSL#3

R&D システムズ社

- マウスアディポネクチン/Acrp30 ELISA キット

Sigma-Aldrich 社

- フルオレセインイソチオシアネート (FITC) -デキストラン

Thermo Fisher Scientific 社

- Fast SYBR® Green Master Mix
- FluoSpheres® Carboxylate-Modified Microspheres, 0.1 μm, Yellow-Green Fluorescent
- Hepatocyte wash medium
- Liver perfusion medium

Worthington biochemical 社

- コラゲナーゼ Type4

ナカライテスク社 (京都)

- 0.25%トリプシン-EDTA
- 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
- HistroVT One
- N-2-ヒドロキソエチルピペラジン-N'-2-エタンスルホン酸 (HEPES)
- 過酸化水素
- キシレン
- グルコース
- クロロホルム
- セパゾール RNA I Super G
- ダルベッコ改変イーグル液体培養液 (DMEM)
- ペニシリン-ストレプトマイシン混合溶液
- メタノール

生化学工業株式会社

- LAL 試験用水
- Pyrochrome® with Glucashield® Buffer

タカラバイオ社

- TaKaRa Prime Script ® RT reagent Kit

ニチレイバイオサイエンス社

- ウシ胎児血清 (FBS)

富士フイルム RI ファーマ社（東京）

- リゾビスト®注

森永生科学研究所

- マウスインスリン測定キット
- マウス/ラットレプチン測定キット

和光純薬工業社（大阪）

- グルコース CII-テストワコー
- トリプシンインヒビター

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。標準飼料の組成は 5.1%脂肪，23.1%タンパク質，360 kcal/100 g であり，オリエンタル酵母より購入した。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制御された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。野生型（WT）C57BL/6J マウスを Charles River から入手し，筑波大学実験動物資源センターで飼育した。p62-KO および Nrf2-KO マウスを作製し，以前に記載されたように遺伝子型を決定した（14, 17）。p62:Nrf2 二重ノックアウトマウスは，これらの突然変異マウスを交配することによって産生され，再解析された。分析前に，これらのマウスを C57BL/6J マウスと 10 代以上交配させ，正常に生育した繁殖可能な子孫を産生した。全ての実験において雄のマウスを使用した。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。

摂餌制限

DKO マウスについて、離乳時の4週齢から30週齢まで、食餌量を1日 3.0 ± 0.1 g (WT が1日に摂食する量) に制限して飼育した。

Probiotics 投与

DKO マウスについて、10週齢から25週齢まで、Probiotics として用いられている VSL#3 を溶解し (4.5 億 colonies/mL)、給水瓶による自由摂取で与えた。週2回給水瓶を交換した。

生化学的解析

グルコース CII 試験ワコーキットを用いて血清グルコースを検出した。血清インスリンは、マウスインスリン ELISA キットを用いて測定した。血清レプチンは、マウス/ラットレプチン ELISA キットを用いて測定した。マウスアディポネクチン/Acrp30 Quantikine ELISA キットを用いて血清中のアディポネクチンを測定した。

糖負荷試験

マウスを前日から絶食を行い、グルコース 2 g/kg を腹腔投与した。投与前、投与 15, 30, 60, 120 分後に尾静脈より採血した。グルコース濃度はグルコース CII-テストワコーキットを用いて測定した。

病理学的解析

通常条件下で飼育した，WT，*Nrf2*-KO，*p62*-KO，DKO の 4 系統のマウスから肝臓，腸管，内臓脂肪を摘出し，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，ヘマトキシリン-エオジン（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性細胞の浸潤，Sirius red 染色にて肝臓の線維化の評価を行った．包埋および染色は，ジェノスタッフ社に委託した．NASH の組織学的評価を定量的に行うために，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（28）．腸管の組織学的変化を H&E 染色にてスコア化した．（0（正常）損傷なし；1（軽度），わずかな粘膜下固有層の分離；2（中等度），中等度の粘膜下固有層の分離および筋層における浮腫；3（重症），重度の粘膜下固有層の分離および絨毛の脱落を伴う筋層における激しい浮腫；4（壊死），絨毛喪失および壊死）（29）．

また，マクロファージ系細胞マーカーである F4/80，酸化ストレスの指標である 4-ヒドロキシノネナール（4-HNE）の免疫染色を行った．さらに，腫瘍部に関してグルタチオン S-トランスフェラーゼ P1（GST-P1）の免疫染色を行った．パラフィン切片をキシレンと 100%エタノール，50%エタノールにて脱パラフィンし，HistoVT One にて抗原賦活化を行った．その後，0.3% H₂O₂/メタノール溶液に 30 分間浸し，内因性ペルオキシダーゼを阻害させ，EnVision キット/HRP を用いて DAB 染色を行った．使用した抗体は，表にまとめた．

血清中，糞便中 LPS 含量の測定

各種マウスより血清を採取し，70°C で 10 分間加温した後，Pyrochrome with Glucashield Buffer キット，プレートリーダー Varioskan（Thermo）を用いて測定

した。希釈用の LAL 試験用水，マイクロピペット用のチップは LPS フリーのものを用いた。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) により超音波破碎した。糞便溶液 1 mL を PBS (-) 9 mL に加え，計 10 mL とした後， $400 \times g$ ，15 分遠心した。上清 6 mL を $0.45 \mu\text{m}$ フィルター (Merck Millipore 社) でろ過した後， $0.22 \mu\text{m}$ 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，Pyrochrome with Glucashield Buffer キットを用いて測定した。

腸内細菌叢解析

便試料をマウスから採取し，急速冷凍し，使用するまで -80°C で保存した。糞便試料からの DNA 抽出および 16S リボソーム DNA ライブラリーおよび末端制限断片長多型 (T-RFLP) を用いた糞便微生物叢の分析を TechnoSuruga Laboratory 社に委託した。また，16S rRNA 遺伝子アンプリコンライブラリーを使用し 16S rRNA 遺伝子アンプリコンシーケンシングの分析を FASMAC 社に委託した。

腸管透過性試験

マウスを 16 時間の絶食後に 0.5 mg/g の 4kDa FITC-デキストランを経口投与した。投与後 0, 1, 2, 3, 6 時間に眼底から 50 μL 血清を採取した。iMark プレートリーダー (Bio-Rad 社) を用いて励起波長 488 nm で FITC の血清強度を測定した。測定値は FITC-デキストランの段階希釈液の標準曲線に対してプロットした。

体組成分析

体脂肪組成のコンピュータ断層撮影 (CT) 分析のために、マウスをイソフルランで麻酔し、Latheta (LCT-200, Hitachi Aloka Medical 社) を用いてスキャンした。肝臓と尾根との間の連続 5 mm スライス画像を取得し、Latheta ソフトウェアを用いた定量的評価に使用した。内臓脂肪および皮下脂肪を区別し、定量的に評価した。

Kupffer 細胞単離

肝臓より Kupffer 細胞を単離するため、麻酔下で Liver perfusion medium にて 4 分間、コラゲナーゼ Type4, トリプシンインヒビター, HEPES を含んだ DMEM にて 10 分間灌流した。生体から肝臓を摘出し、Hepatocyte wash medium で細胞を懸濁した。肝実質細胞を取り除くため $30 \times g$, 2 分間の遠心分離を 2 回行った。得られた上清に対してさらに $400 \times g$ で 8 分間の遠心分離を行い、Kupffer 細胞が含まれている沈殿物を非肝実質細胞とした。その後、Kupffer 細胞の表面マーカーである F4/80 を APC-conjugated anti-F4/80 (eBioscience) で標識し、分取した。

フローサイトメトリー

ラテックスビーズ (FluoSpheres®, 1.0 μm beads diameter, Carboxylate-modified) を $0.57 \mu\text{l/g body weight}$ 量で尾静脈から投与し、5 分後に Kupffer 細胞の単離を行った。フローサイトメトリーにて F4/80 陽性細胞におけるラテックスビーズを貪食した Kupffer 細胞の割合を測定した。

Kupffer 細胞の異物貪食に関与するスカベンジャー受容体である macrophage receptor with collagenous structure (MARCO) と macrophage class A scavenger

receptors (SR-A) の発現レベルをフローサイトメトリーにて解析した。さらに、Kupffer 細胞の表現型の解析として、M1 型（炎症型）および M2 型（抗炎症型）を評価した。解析に用いた抗体は表に示す。測定には Gallios フローサイトメーター（Beckman Coulter 社）を用いた。データ解析には Kaluza 解析ソフト（ver 1.2, Beckman Coulter 社）を使用した。

SPIO-MRI

MRI は 1 T/90 mm 磁石のものを使用し、SPIO（リゾビスト®注）3.33 $\mu\text{L}/\text{mL}$ をマウス 20 g につき 0.1 mL を尾静脈から投与し、測定を行った。測定中は気化麻酔（0.5-3.0% イソフルラン）でマウスを眠らせ、バルーン式呼吸検出装置で呼吸同期を行いながら撮像を行った。撮像点は、3D-グラジエントエコーで横隔膜より尾側 6 mm 程度の位置に定め、その後 2D-マルチエコーで T2 値を測定した。WT, *Nrf2*-KO, *p62*-KO, DKO の 4 系統のマウスそれぞれ 8 週齢、30 週齢で MRI を行い、SPIO 投与前後での T2 値の低下量を 4 系統のマウス間で比較した。

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 μL 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 μL 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、懸濁した。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 μL 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。

定量的 real-time PCR (qRT-PCR)

Prime Script[®] RT reagent Kit, T100[™] サーマルサイクラー (Bio-Rad 社) を用いて逆転写を行った。Fast SYBR[®] Green Master Mix, CFX384 Touch[™] リアルタイム PCR 増幅システム (Bio-Rad 社) を用いて qRT-PCR を行った。使用した Primer は表 2 にまとめた。また, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) を内部標準とした。

イムノブロット解析

組織および細胞を SDS サンプル緩衝液 (1%グリセロール, 0.2%SDS, 50 mM Tris-HCl) 中でホモジナイズし, イムノブロット分析によるタンパク質発現を解析した。組織を溶解緩衝液 (2.2 M スクロース, 5 mM Tris-HCl, 0.5 mM EDTA) 中でホモジナイズし, 40,000 × g で 60 分間遠心分離した後, 0.25 mM スクロース緩衝液中でホモジナイズした。ニトロセルロース膜への電気泳動移動の後, ブロットを特定の一次 Ab でプローブした。マウスの p62 および Nrf2 遺伝子欠損の確認に使用した抗体は以前に記載された通りである (20, 30)。この研究で使用されたすべての抗体は表 1 に列挙した。

In vitro 組織培養研究および細胞系

8-10 週齢の雄性 WT, *Nrf2*-KO, *p62*-KO および DKO マウスの Kupffer 細胞を, 門脈からのコラゲナーゼ処理によって懸濁し, 遠心分離および細胞選別を行った。Kupffer 細胞選別のために, 細胞を APC-F4/80 抗体 (eBioscience, CA, USA) と共に 30 分間インキュベートした。Beckman Coulter MoFlo XDP セルソーターを用いて, F4/80⁺細胞を分取した。マクロファージ細胞系 RAW264.7 は, ATCC から入手した。グルコース 4.5 g/L, ペニシリン-ストレプト

トマイシン 1%，および FBS 10% を含有する DMEM を用いて，37°C，5% CO₂ 下で培養した．RAW264.7 細胞を 6 ウェルプレートに播種し，10 EU/mL の LPS と共にインキュベートした．ヒト結腸癌細胞株 Caco-2 は，RIKEN BRC（茨城，日本）から購入した．10% FBS，1% ペニシリン-ストレプトマイシン，および 1% 非必須アミノ酸を含む高グルコース DMEM を用いて，37°C，5% CO₂ 下で培養した．培地は 1 または 2 日ごとに交換した．Caco-2 細胞を，0.4 μm の孔（Merck Millipore 社）を有する Transwell に $5 \times 10^4/\text{cm}^2$ の密度で播種し，実験の前に単層として増殖させた．

CRISPR-Cas9 系を用いた *p62* および *Nrf2* 遺伝子の欠損

この操作は，公表されたプロトコルの詳細な指示に従った (31)．簡潔に述べると，CRISPR Design オンラインソフトウェア (<http://crispr.mit.edu/>) を用いて *p62* および *Nrf2* の mRNA 配列からスクリーニングすることにより，20bp のガイド RNA 配列を得た (表 3)．設計したガイド DNA を，BbsI 制限酵素で処理し，pX330 プラスミドと連結した．RAW264.7 および Caco-2 細胞に対して Neon システムを用いてそれぞれの pX330 gDNA を導入した．

経上皮電気抵抗 (TER) の測定

Caco-2 細胞を，0.4 μm の孔を有するポリエチレンテレフタレート膜に播種した．完全に分化するまで培地を 1 日おきに交換した．TER は，Millicell-ERS 電気抵抗システム (Merck Millipore 社) を用いて測定した．TER 値は $\Omega \cdot \text{cm}^2$ で表した．LPS 添加実験では，培養した細胞単層を 100 EU/mL LPS で 3 および 6 時間処理し，TER を測定した．

統計解析

全てのデータは平均値±標準誤差 (mean ± SE) で示した。有意差検定には統計ソフト SPSS にて 1 元配置分散分析を用い、 $P < 0.05$ を有意とした。

表 1. 抗体一覽表

Antibodies	Manufacturer	Cat No.
Rabbit Polyclonal anti-p62	Ishii et al., 2000	N/A
Rabbit Polyclonal anti-Nrf2	Proteintech	16396-1-AP
Rabbit Polyclonal anti-Actin	Sigma-Aldrich	A5060
Rabbit Polyclonal anti-LaminA/C	Cell Signaling Technology	2032
Rabbit Monoclonal anti-NF-KappaB p65 phospho	Cell Signaling Technology	3033
Rabbit Monoclonal anti-NF-KappaB p65	Cell Signaling Technology	4764
Rabbit Polyclonal anti-Keap1	Cell Signaling Technology	4617S
Rabbit Polyclonal anti-Zo-1	Thermo Fisher Scientific	61-7300
Mouse Monoclonal anti-Claudin 1	Thermo Fisher Scientific	37-4900
Mouse Monoclonal anti-Claudin 2	Thermo Fisher Scientific	32-5600
Mouse Monoclonal anti-4-hydroxy-2-nonenal	JaiCA	MHN-100P
Rabbit Polyclonal anti-glutathione S-transferase P1	MBL	311
Sheep anti-Mouse IgG, HRP-Linked Whole Ab	GE Healthcare	NA931
Donkey anti-Rabbit IgG, HRP-Linked Whole Ab	GE Healthcare	NA934
Rat Monoclonal APC-conjugated anti-F4/80	eBioscience	17-4801-82
PerCP/Cy5.5 anti-mouse CD206	BioLegend	141715
PE anti-mouse CD11c	BioLegend	117307
Rat Monoclonal anti-Mouse MARCO	BIORAD	MCA1849
Goat Polyclonal anti-Mouse SR-A1	R&D Systems	AF1797
Goat anti-Rat IgG, Alexa Fluor 488	Thermo Fisher Scientific	A-11006
Donkey anti-Goat IgG, Alexa Fluor 488	Thermo Fisher Scientific	A-11055

表 2. qRT-PCR に用いた Primer 一覧表

Genes	Primer sequences (5'-3')	
	Forward	Reverse
<i>Tnf-α</i>	AAGCCTGTAGCCCACGTCGTA	GGCACCAGTAGTTGGTTGTCTTTG
<i>Il-1β</i>	TCCAGGATGAGGACATGAGCAC	GAACGTACACACCAGCAGGTTA
<i>Il-6</i>	GAGGATACTACTCCCAACAGACC	AAGTGCATCATCGTTGTTTCATACA
<i>Tlr-4</i>	GCAGCAGGTGGAATTGTATCG	TGTGCCTCCCCAGAGGATT
<i>Tgf-β1</i>	GTGTGGAGCAACATGTGGAACCTA	TTGGTTCAGCCACTGCCGTA
<i>Procollagen-α1</i>	GCACGAGTCACACCGGAACT	AAGGGAGCCACATCGATGAT
<i>Mcp-1</i>	TTCCTCCACCACCATGCAG	CCAGCCGGCAACTGTGA
<i>Cd14</i>	CCTGCCCTCTCCACCTTAGAC	TCAGTCCTCTCTCGCCCAAT
<i>Lxr</i>	CCCCACAAGTTCTCTGGACACT	TGACGTGGCGGAGGTACTG
<i>Srebp-1c</i>	CGGCGCGGAAGCTGT	AGTCACTGTCTTGGTTGTTGATGAG
<i>Fas</i>	ATCCTGGAACGAGAACACGATCT	AGAGACGTGTCACTCCTGGACTT
<i>Acc-1</i>	TGTCCGCACTGACTGTAACCA	TGCTCCGCACAGATTCTTCA
<i>Scd-1</i>	TGCCCTGCGGATCTTC	GGCCCATTCGTACACGTCAT
<i>Elovl6</i>	TGACTATGAACTATGGCGTGCAT	CCGGGAGACTCGGAAACC
<i>Ppara</i>	TGGGGATGAAGAGGGCTGAG	GGGGACTGCCGTTGTCTGT
<i>Pparγ</i>	TGTCGGTTTCAGAAGTGCCTTG	TTCAGCTGGTCGATATCACTGGAG
<i>Zo-1</i>	GCTAAGAGCACAGCAATGGA	GCATGTTCAACGTTATCCAT
<i>Claudin1</i>	CGGGCAGATACAGTGCAAAG	ACTTCATGCCAATGGTGGAC
<i>Claudin2</i>	CAACTGGTGGGCTACATCCTA	CCCTTGAAAAGCCAACCG
<i>Zo-1</i> (Human)	GAATGATGGTTGGTATGGTGCG	TCAGAAGTGTGTCTACTGTCCG
<i>Claudin1</i> (Human)	GCACATACCTTCATGTGGCTCAG	TGGAACAGAGCACAAACATGTCA

表 3. CRISPR Cas9 系にて設計した gRNA

Cells	Genes	Sequences (5'-3')
RAW264.7	<i>Nrf2</i>	GATGTGCTGGGCCGGCTGAAT
	<i>p62</i>	GTTGGGGTGCACCATGTTTCG
Caco-2	<i>Nrf2</i>	GCGACGGAAAGAGTATGAGC
	<i>p62</i>	GAGCCATCGCAGATCACATTG

第3章 結果

DKO マウスは通常食飼育下で過食肥満となりインスリン抵抗性およびアディポカインの不均衡を呈する

NASH の形成に大きく関与する要因として、過栄養状態を基盤とした全身性の肥満があげられる。脂肪組織における中性脂肪の過剰蓄積はアディポカイン分泌異常やインスリン抵抗性が生じ、NASH における肝線維化の進展や肝発癌にも関与している可能性が示唆される (32, 33)。そこで、WT, *Nrf2*-KO, *p62*-KO, DKO マウスにおける肥満やインスリン抵抗性の病態を比較した。

まず、DKO マウスにおける遺伝子欠損の確認を行った。DKO マウスは肝臓における *p62* および *Nrf2* のタンパク質の発現を失っていた (図 1A)。次に、各種マウスにおける体重変化、摂餌量、体組成の比較を行った。WT, *Nrf2*-KO, *p62*-KO, DKO マウスは、通常食飼育で 8-50 週齢の 42 週間飼育した。出生時の DKO マウスは、WT と同様な体重であった。その後、*p62*-KO と DKO マウスは、WT および *Nrf2*-KO マウスよりもはるかに速く体重が増加した (図 1B)。30 週齢の各遺伝子型マウスの体重は、WT が 37.8 ± 1.3 g, *Nrf2*-KO が 37.6 ± 1.0 g, *p62*-KO が 49.7 ± 1.3 g, DKO が 46.5 ± 0.6 g であった。WT と *Nrf2*-KO マウスの摂餌量は、年齢とともにわずかにしか増加せず、8 週齢での平均摂取量は 3.0 g/d/mouse であった。対照的に、*p62*-KO および DKO マウスの摂餌量は、8 週齢の 3.3 g/day/mouse から 30 週齢の 4.0 g/d/mouse に増加した (図 1C)。CT 分析では、*p62*-KO および DKO マウスにおいて、体脂肪率および内臓脂肪量が増加した (図 1D)。

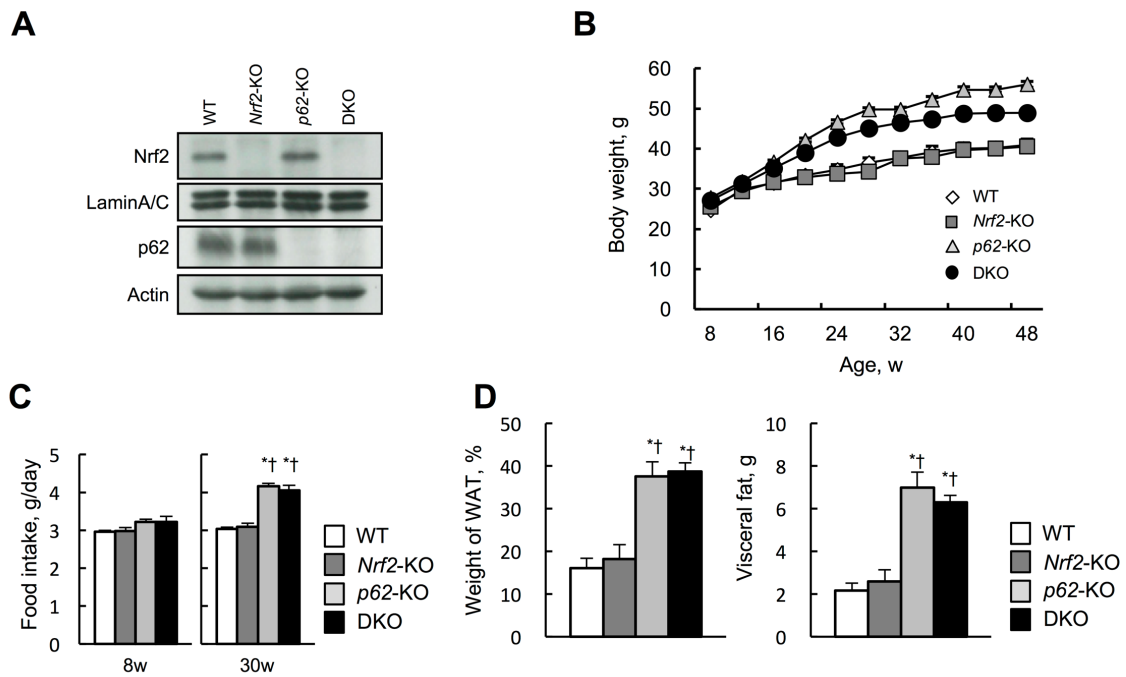


図 1. DKO マウスは通常食飼育下で過食肥満となる

(A) 8 週齢の WT, *Nrf2*-KO, *p62*-KO, DKO マウスの肝臓における Nrf2 と p62 のウエスタンブロットを行い, 各遺伝子の欠損を確認した.

(B) WT, *Nrf2*-KO, *p62*-KO, DKO マウスの体重変化を示す (n = 10-15).

(C) 8, 30 週齢時における WT, *Nrf2*-KO, *p62*-KO, DKO マウスの摂餌量を示す (n = 8).

(D) 30 週齢における WT, *Nrf2*-KO, *p62*-KO, DKO マウスのコンピュータ断層撮影分析を行い, 体脂肪率および内臓脂肪含有量を測定した (n = 8).

すべての結果は平均 ± 標準誤差で示す. * $P < 0.05$, vs WT; † $P < 0.05$, vs *Nrf2*-KO.

また、血清生化学的解析を行ったところ、30週齢のDKOマウスはWTマウスと比較し、血糖、血清中インスリンおよびHOMA-IRが増加した。注目すべきことに、DKOマウスは8週間においてもインスリン抵抗性を示した（図2A-C）。また、*p62*-KOとDKOマウスは、腹腔内グルコース耐性試験によって耐糖能異常を示した（図2D）。さらに、8週齢および30週齢の*p62*-KOとDKOマウスの血清中レプチンは、WTと*Nrf2*-KOマウスに比べ有意に増加した（図2E）。一方、アディポネクチン濃度は30週齢の*p62*-KO、DKOマウスにおいて低下していた（図2F）。これらの結果は、DKOマウスは通常食飼育下で過食肥満となり高血糖およびインスリン抵抗性、アディポカインの不均衡を呈すること示している。

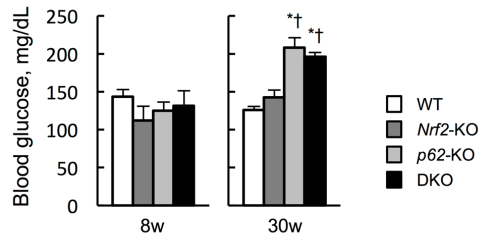
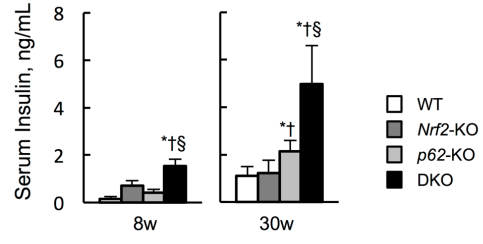
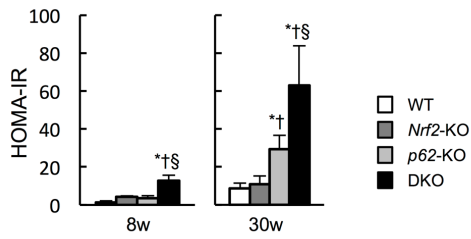
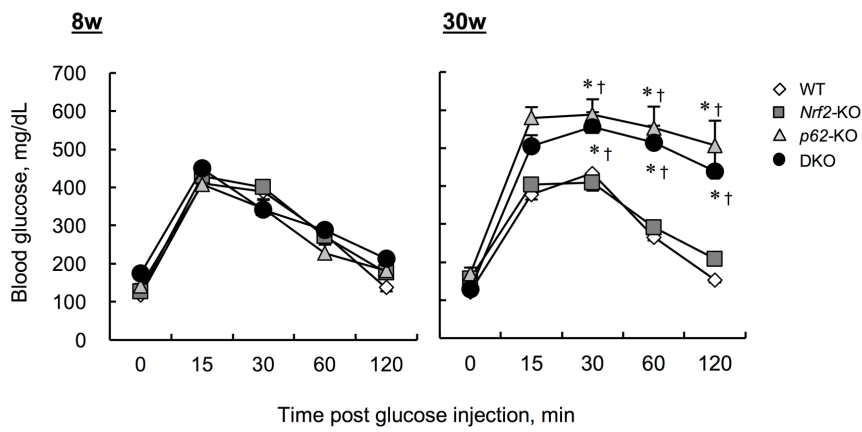
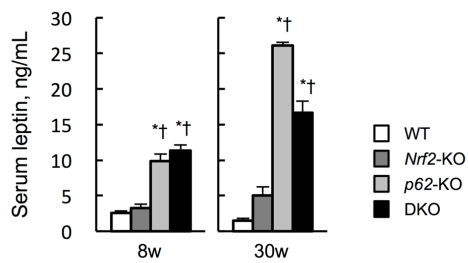
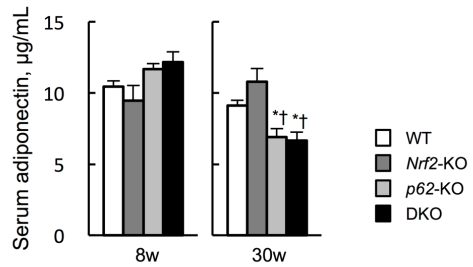
A**B****C****D****E****F**

図 2. DKO マウスはインスリン抵抗性および高血糖を呈する

(A-C) 8, 30 週齢時における WT, *Nrf2*-KO, *p62*-KO, DKO マウスの空腹時血糖値, 空腹時血清インスリン値, HOMA-IR を示す (n = 8).

(D) 糖負荷試験は 8, 30 週齢の WT, *Nrf2*-KO, *p62*-KO, DKO マウスを用いて, 13 時間絶食後に行った. マウスの体重 1 g あたりグルコース 0.5 mg を投与した (n = 7-9).

(E-F) 8, 30 週齢の WT, *Nrf2*-KO, *p62*-KO, DKO マウスの空腹時血清レプチン値, 空腹時血清アディポネクチン値を示す (n = 8).

すべての結果は平均 ± 標準誤差で示す. * $P < 0.05$, vs WT; † $P < 0.05$, vs *Nrf2*-KO; § $P < 0.05$, vs *p62*-KO.

DKO マウスは脂肪性肝炎と肝腫瘍を発症する

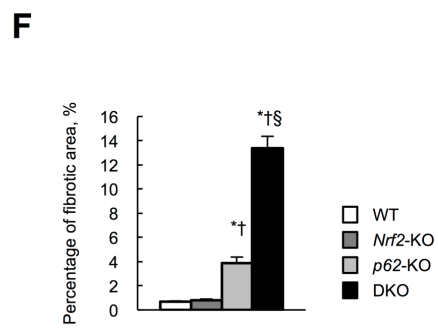
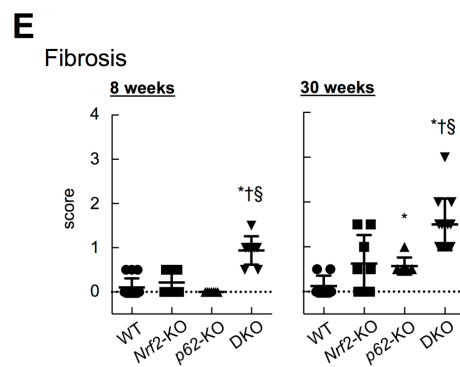
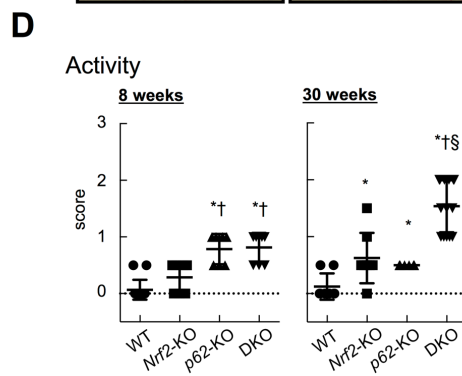
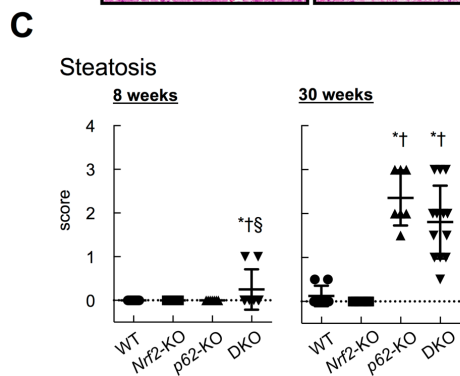
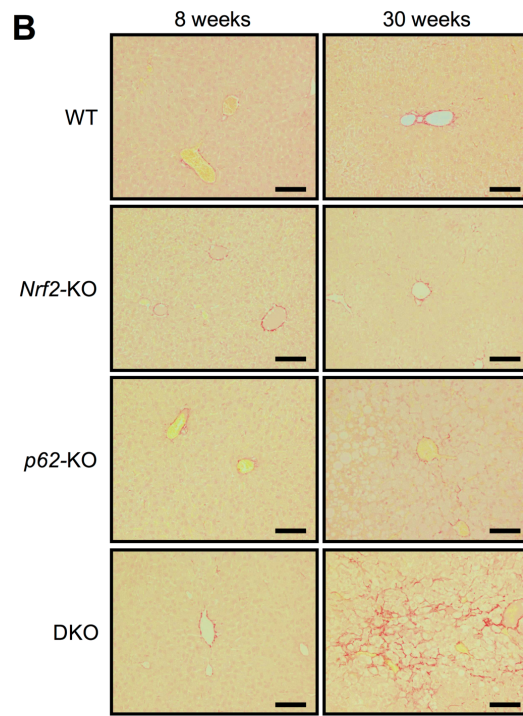
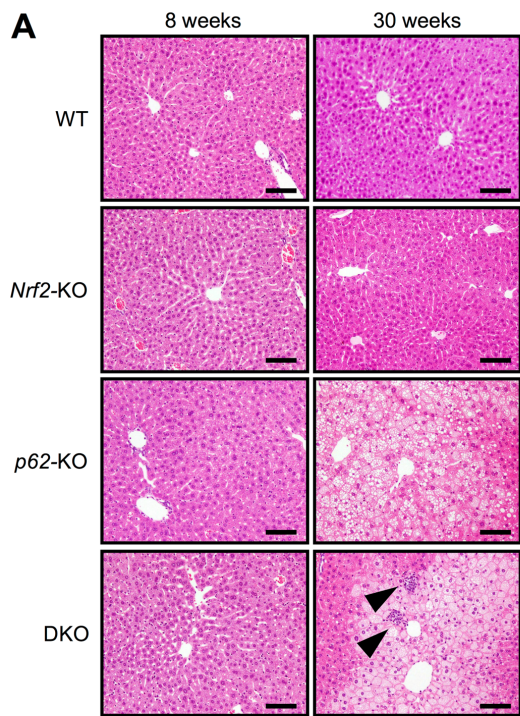
次に WT, *Nrf2*-KO, *p62*-KO, DKO の肝臓における経時的な組織学的変化を図 3A および 3B に示した。マウスにおける *p62* 欠損は、加齢に伴う肥満が脂肪肝を誘導した (図 3C)。また、WT マウスと比較し DKO マウスの肝臓における炎症細胞浸潤の顕著な増加を示した。*Nrf2*-KO および *p62*-KO マウスにおいて SAF (Activity) スコアが増加したが、DKO マウスではさらに増加した (図 3D)。肝臓の炎症に加えて、肝線維化をシリウスレッド染色で評価したところ、DKO マウスにおいて有意に増加した (図 3E)。対照的に、*Nrf2*-KO および *p62*-KO マウスでは、肝線維化の著しい拡張は観察されなかった (図 3E)。線維化の陽性面積を測定し比較したところ、DKO マウスの有意な増加を示した (図 3F)。過酸化脂質の存在を観察するために、4-HNE による免疫染色を行った。50 週齢の DKO マウスの肝臓で染色が増強されたが、*Nrf2*-KO および *p62*-KO マウスの肝臓では増強されなかった (図 3G)。さらに、DKO マウスの肝臓における腫瘍形成が観察された。肉眼的な肝腫瘍は、50 週齢以降の 12% (8/66 匹) の DKO マウスで観察された (図 3H)。結節性病変は *Nrf2*-KO および *p62*-KO マウスでは観察されなかった。病理学的な解析では、腫瘍部には核異型を伴う細胞が密集し一部には脂肪滴を含んでおり、非腫瘍部との境界には一部線維性被膜を伴っていた。腫瘍部は、周囲の非腫瘍性肝実質を圧迫しており、GST-P1 染色において増強された (図 3H)。これらの結果は、DKO マウスは加齢とともに脂肪性肝炎と肝腫瘍を発症することを示している。

炎症および線維化の評価として、組織から mRNA を抽出し、発現レベルを比較した。肝臓 Tumor necrosis factor- α (*Tnf- α*), *Il-1 β* , *Il-6* および Toll-like receptor 4 (*Tlr4*) の mRNA 発現レベルは、8 週齢の DKO マウスにおいて WT マウスよ

り有意に増加し、30 週齢ではさらに増悪した。肝線維化と密接に関連する Transforming growth factor- β 1 (*Tgf- β 1*) および *Procollagen- α 1* の mRNA 発現は、30 週齢の DKO マウスにおいて有意に増加した (表 4)。これらの結果は、DKO マウスの肝臓の炎症が早い時期から引き起こされることを示している。さらに、肝臓の脂質代謝に関して mRNA レベルを評価したところ、過食となる 30 週齢の *p62*-KO と DKO マウスで Sterol regulatory element binding protein-1c (*Srebp-1c*), Acetyl-CoA carboxylase-1 (*Acc-1*), Stearoyl-CoA desaturase-1 (*Scd-1*), Peroxisome proliferator activated receptor γ (*Ppar γ*) が有意に増加した。DKO マウスは若齢時においても *Srebp-1c* の発現が有意に増加した (表 5)。

内臓脂肪に関しては、*p62* 欠損により炎症性細胞の王冠様構造を認め、DKO マウスではさらに激しい炎症性細胞浸潤を認めた (図 3I)。内臓脂肪の *Il-1 β* の mRNA 発現レベルは、8 週齢の DKO マウスにおいて有意に増加した。また、DKO マウスの 30 週齢の *Tnf- α* , *Il-1 β* , *Tlr4*, Monocyte chemoattractant protein 1 (*Mcp-1*), *CD14*, *Tgf- β 1* レベルは、WT マウスより有意に高かった (表 4)。これらの結果は、DKO マウスの内臓脂肪の炎症は肝臓より後に引き起こされたことを示している。

以上の結果から、DKO マウスは過食肥満を呈する新たな NASH モデルマウスであると考えられる。



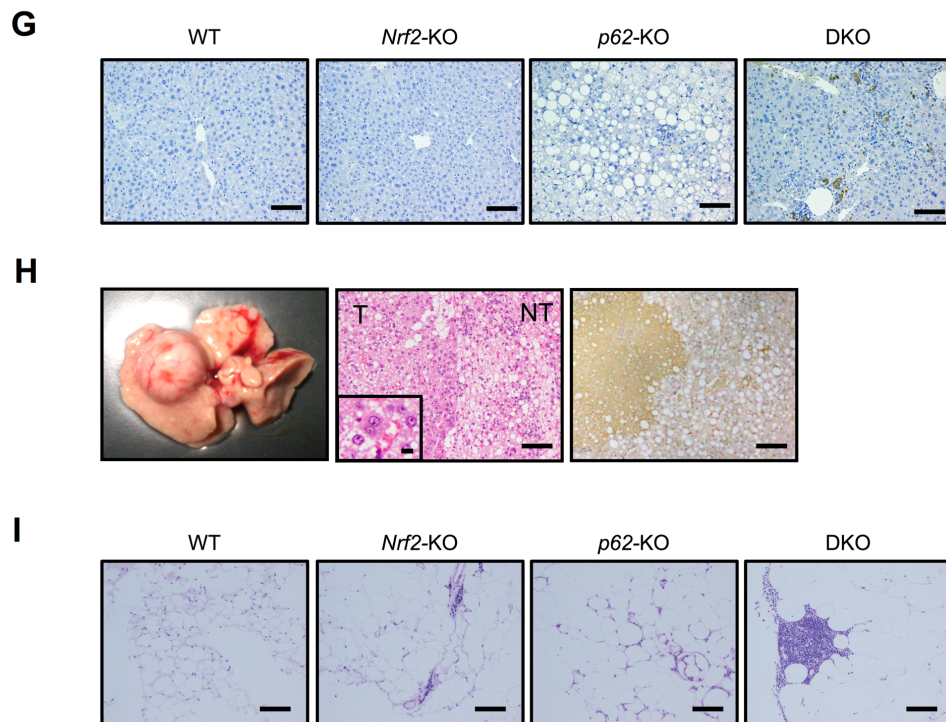


図 3. DKO マウスは脂肪性肝炎と肝腫瘍を発症する

(A, B) 8, 30 週齢の WT, *Nrf2*-KO, *p62*-KO, DKO マウスの肝臓の H&E 染色および Sirius red 染色像を示す. 矢印は, 炎症性細胞浸潤を示す. スケールバーは, 100 μm である.

(C-E) 病理専門医指導のもと SAF (Steatosis, Activity, Fibrosis) スコアを用いて, 病理学的評価を行った. ($n = 8$).

(F) 肝臓の線維化をより詳細に評価するため, 線維化陽性面積を算出し評価した ($n = 8$).

(G) 30 週齢の WT, *Nrf2*-KO, *p62*-KO, DKO マウスの肝臓の酸化ストレスを評価するため, 4-HNE 免疫染色を行った.

(H) DKO マウスにおける代表的な肝腫瘍を示す. 肉眼的所見 (左), H&E 染色像 (中段. T: 腫瘍部, NT: 非腫瘍部), GST-P1 染色を示す (右). スケールバ

一は 100 μm , 拡大図は 10 μm である.

(I) WT, *Nrf2*-KO, *p62*-KO, DKO マウスの内臓脂肪の H&E 染色像を示す. スケールバーは, 100 μm である.

すべての結果は平均 \pm 標準誤差で示す. * $P < 0.05$, vs WT; † $P < 0.05$, vs *Nrf2*-KO; § $P < 0.05$, vs *p62*-KO.

表 4. 肝臓と内臓脂肪の mRNA 発現レベル

Age	Genes	8 weeks				30 weeks			
		WT	<i>Nrf2</i> -KO	<i>p62</i> -KO	DKO	WT	<i>Nrf2</i> -KO	<i>p62</i> -KO	DKO
Liver	<i>Tnf-α</i>	1.00 ± 0.10	1.11 ± 0.17	1.60 ± 0.07 ^a	3.09 ± 0.84 ^{ab}	2.47 ± 0.79	3.02 ± 0.70	4.25 ± 0.37 ^{ab}	5.43 ± 1.01 ^{ab}
	<i>Il-1β</i>	1.00 ± 0.17	0.85 ± 0.08	2.69 ± 0.31 ^{ab}	3.52 ± 0.41 ^{ab}	1.68 ± 0.26	2.02 ± 0.15	3.19 ± 0.36 ^{ab}	4.18 ± 0.32 ^{ab}
	<i>Il-6</i>	1.00 ± 0.25	1.27 ± 0.07	2.99 ± 0.32 ^{ab}	2.49 ± 0.28 ^{ab}	1.39 ± 0.57	0.97 ± 0.32	2.66 ± 0.77 ^{ab}	4.14 ± 0.96 ^{ab}
	<i>Tlr-4</i>	1.00 ± 0.17	1.16 ± 0.06	1.09 ± 0.09	1.43 ± 0.12 ^{abc}	1.69 ± 0.23	1.82 ± 0.29	4.02 ± 0.35 ^{ab}	3.84 ± 0.43 ^{ab}
	<i>Tgf-β1</i>	1.00 ± 0.15	1.07 ± 0.08	0.86 ± 0.05	1.35 ± 0.15	0.97 ± 0.71	0.98 ± 0.36	1.49 ± 0.61	1.82 ± 0.72 ^{ab}
	<i>Procollagen-α1</i>	1.00 ± 0.16	1.26 ± 0.23	0.83 ± 0.13	1.24 ± 0.19	1.14 ± 0.73	1.30 ± 0.65	1.88 ± 0.39	2.27 ± 0.79 ^a
Visceral fat	<i>Tnf-α</i>	1.00 ± 0.10	1.17 ± 0.27	0.80 ± 0.10	1.30 ± 0.30	1.15 ± 0.26	1.23 ± 0.45	2.48 ± 0.22	5.72 ± 0.78 ^{abc}
	<i>Il-1β</i>	1.00 ± 0.16	1.47 ± 0.61	1.60 ± 0.34	4.10 ± 0.86 ^{abc}	1.92 ± 0.52	6.92 ± 2.14	4.20 ± 1.22	32.26 ± 12.83 ^{abc}
	<i>Tlr-4</i>	1.00 ± 0.06	0.93 ± 0.16	0.88 ± 0.11	0.81 ± 0.02	0.90 ± 0.08	0.98 ± 0.15	0.89 ± 0.08	1.66 ± 0.18 ^{abc}
	<i>Mcp-1</i>	1.00 ± 0.11	2.26 ± 0.54	1.40 ± 0.20	1.75 ± 0.46	1.09 ± 0.12	1.31 ± 0.38	3.70 ± 1.11	15.55 ± 4.84 ^{abc}
	<i>Cd14</i>	1.00 ± 0.18	0.64 ± 0.17	0.65 ± 0.13	0.48 ± 0.06	0.63 ± 0.04	0.70 ± 0.10	0.99 ± 0.27	3.29 ± 0.99 ^{abc}
	<i>Tgf-β1</i>	1.00 ± 0.12	0.91 ± 0.13	0.85 ± 0.06	0.79 ± 0.07	0.65 ± 0.04	0.81 ± 0.14	0.82 ± 0.12	1.68 ± 0.15 ^{abc}

mRNA 発現レベルは、8 週齢 WT マウスとの比として計算した。

すべての結果は平均 ± 標準誤差で示す。 ^a*P* < 0.05, vs WT; ^b*P* < 0.05, vs *Nrf2*-KO; ^c*P* < 0.05, vs *p62*-KO.

表 5. 肝臓における脂質代謝関連遺伝子 mRNA 発現レベル

Age	8 weeks				30 weeks			
	WT	<i>Nrf2</i> -KO	<i>p62</i> -KO	DKO	WT	<i>Nrf2</i> -KO	<i>p62</i> -KO	DKO
<i>Lxr</i>	1.00 ± 0.06	0.77 ± 0.04 ^a	0.83 ± 0.03 ^a	0.75 ± 0.03 ^a	1.10 ± 0.09	0.96 ± 0.07	0.94 ± 0.06	0.88 ± 0.03
<i>Srebp-1c</i>	1.00 ± 0.09	2.91 ± 0.26 ^a	1.49 ± 0.20	5.10 ± 0.68 ^{ac}	1.84 ± 0.51	1.51 ± 0.21	6.25 ± 0.36 ^{ab}	9.07 ± 0.92 ^{ab}
<i>Fas</i>	1.00 ± 0.05	1.06 ± 0.05	1.10 ± 0.04	1.30 ± 0.08 ^{ab}	1.30 ± 0.11	1.41 ± 0.09	1.78 ± 0.07	2.02 ± 0.27
<i>Acc-1</i>	1.00 ± 0.20	1.73 ± 0.25 ^a	1.55 ± 0.06 ^a	2.21 ± 0.10 ^{ac}	1.10 ± 0.22	1.70 ± 0.22	3.13 ± 0.15 ^a	3.76 ± 0.94 ^a
<i>Scd-1</i>	1.00 ± 0.09	1.15 ± 0.18	0.89 ± 0.12	0.93 ± 0.15	1.21 ± 0.25	2.57 ± 0.27 ^a	3.79 ± 0.36 ^a	3.09 ± 0.35 ^a
<i>Elovl6</i>	1.00 ± 0.18	1.78 ± 0.15 ^a	1.38 ± 0.08	1.38 ± 0.08	0.70 ± 0.06	0.71 ± 0.05	0.91 ± 0.06	1.80 ± 0.18 ^{abc}
<i>Ppara</i>	1.00 ± 0.18	1.19 ± 0.10	1.07 ± 0.07	1.20 ± 0.06	0.95 ± 0.07	0.93 ± 0.06	0.96 ± 0.10	1.04 ± 0.08
<i>Pparγ</i>	1.00 ± 0.19	0.72 ± 0.10	1.24 ± 0.13 ^b	1.23 ± 0.07 ^b	1.44 ± 0.16	0.83 ± 0.06	3.94 ± 0.24 ^{ab}	3.40 ± 0.35 ^{ab}

mRNA 発現レベルは、8 週齢 WT マウスとの比として計算した。

すべての結果は平均 ± 標準誤差で示す。 ^a $P < 0.05$, vs WT; ^b $P < 0.05$, vs *Nrf2*-KO; ^c $P < 0.05$, vs *p62*-KO.

DKO マウスは腸内細菌叢が変化し、血清中 LPS 濃度が増大する

近年の腸内細菌叢の研究の進歩により、メタボリックシンドロームを含む代謝性病態と腸内細菌との関連が注目されている。肥満者では腸内細菌叢のバランスが異なっており、腸内細菌の遺伝子パターンが変化していることが明らかとなっている。腸内細菌の菌体成分およびその代謝性産物による自然免疫系の活性化や腸内細菌の代謝機構調節などが肥満関連の様々な病態に関与していると考えられている (34)。そこで、WT および DKO マウスにおいて 30 週にわたり遺伝子の欠損が糞便微生物の組成にどのように影響するかを調査した。主要座標分析 (PCoA) において、Nrf2 と p62 の二重欠損が微生物組成に大きな影響を与えたことを明らかにした (図 4A)。また、詳しい菌叢解析を行ったところ、p62-KO および DKO マウスは、グラム陰性菌の割合が増加した (図 4B)。また、DKO マウスでは *Porphyromonadaceae* および *Paraprevotellaceae* の割合が増加し、*Lachnospiraceae* および *Ruminococcaceae* の割合が低下した (図 4C)。これらの結果は、DKO マウスは腸内細菌叢が変化し、グラム陰性菌の割合が増大することを示している。

また、NASH ではアルコール性肝障害と同様に腸内細菌由来のエンドトキシン (LPS) の門脈血中への流入に伴う肝常在マクロファージ (Kupffer 細胞) の活性化が生じ、肝障害進展に寄与している可能性がある (35, 36)。そこで、DKO マウスの糞便中および血清中 LPS 濃度を測定した。糞便中 LPS 濃度は、p62-KO, DKO マウスで WT に比べ有意に高かった (図 4D)。一方、血清 LPS 濃度は DKO マウスでのみ有意に高かった (図 4E)。以上のことから、DKO マウスは腸内細菌叢が変化し、血清中 LPS 濃度が増大することが明らかとなった。

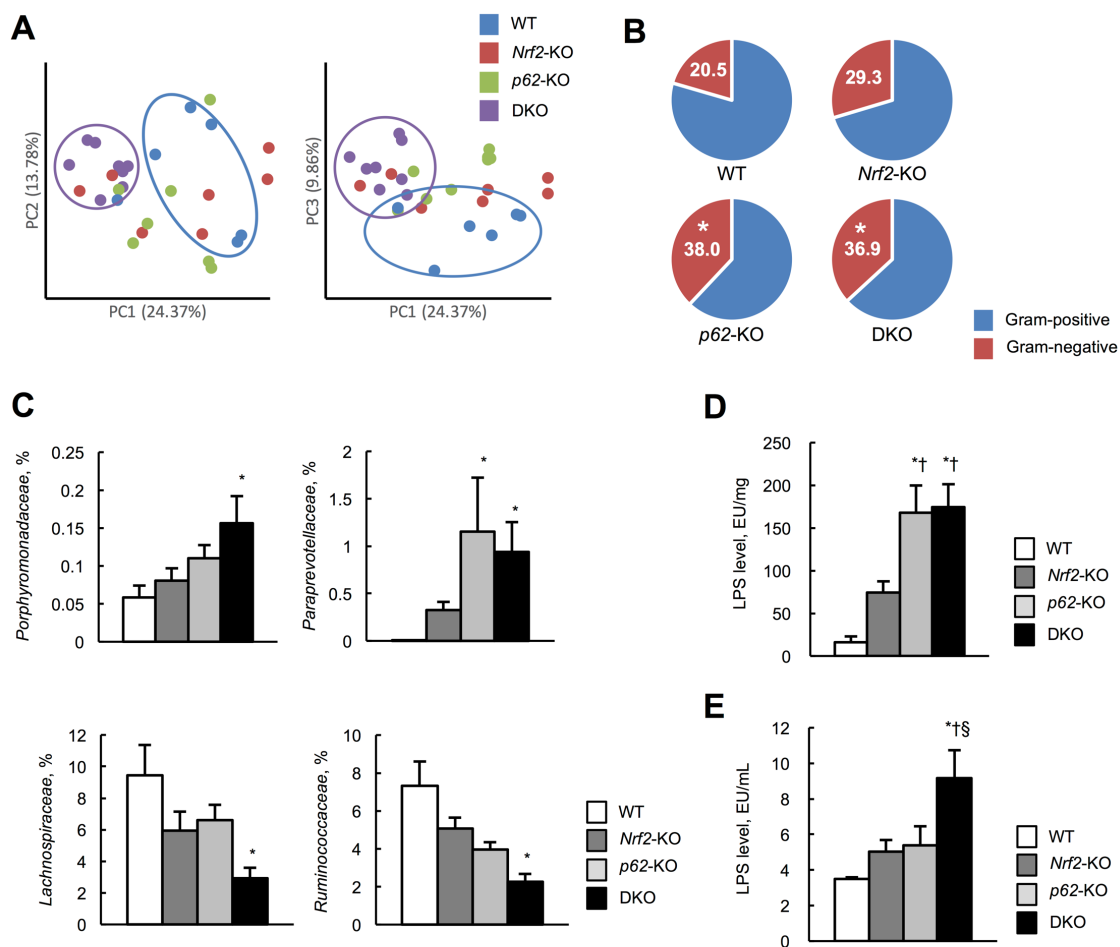


図 4. DKO マウスは腸内細菌叢が変化し、血清中 LPS 濃度が増大する

(A) 30 週齢の WT, *Nrf2*-KO, *p62*-KO, DKO マウスの糞便を採取し、次世代シーケンサーを用いて微生物の主要座標分析を行った。

(B) 次世代シーケンサーによりグラム陰性菌の割合を測定した (n = 8)。

(C) 次世代シーケンサーにより科レベルの腸内細菌叢解析を行った (n = 10)。

(D-E) 30 週齢の WT, *Nrf2*-KO, *p62*-KO, DKO の糞便中および血清中 LPS 濃度を示す (n = 8)。

すべての結果は平均 ± 標準誤差で示す。**P* < 0.05, vs WT; †*P* < 0.05, vs *Nrf2*-KO;

§*P* < 0.05, vs *p62*-KO。

腸管上皮における *Nrf2* の欠損はタイトジャンクションタンパク質の *Zo-1* の発現を低下させ、腸管透過性を亢進させる

先行の研究では、NAFLD 患者では腸内透過性の亢進が高い頻度で見られており、NAFLD の病因における役割が示唆されている (37-39)。そこで、DKO マウスにおける腸管透過性を調べた。まず、腸管の組織学的所見を評価した。WT、*Nrf2*-KO、*p62*-KO および DKO マウスの腸切片を H&E 染色し、方法に記載したように採点した。腸管組織学解析では、DKO マウスにおける WT マウスと比較して、腸の形態の著しい損傷を示した。また 30 週において、*Nrf2*-KO および *p62*-KO マウスでスコアが増加し、DKO マウスではさらに増加した (図 5A)。FITC-デキストランを経口より投与し、その吸収量を測定し腸管透過性を評価したところ、8 週齢の WT に比べ、*Nrf2*-KO、DKO マウスで有意に亢進した。DKO マウスの透過性は 30 週齢でさらに増悪した (図 5B)。腸管透過性は、腸上皮細胞間に形成されたタイトジャンクションによって調節される。タイトジャンクション *Zo-1* の発現を、DKO マウスからの腸溶解物のイムノブロットによって評価した。*Zo-1* の発現が WT と比較して *Nrf2*-KO および DKO マウスの腸において明らかに減少した (図 5C)。しかし、腸管 *Zo-1*、*Claudin1* および *Claudin2* の mRNA 発現レベルは有意な差は認められなかった (図 5D)。

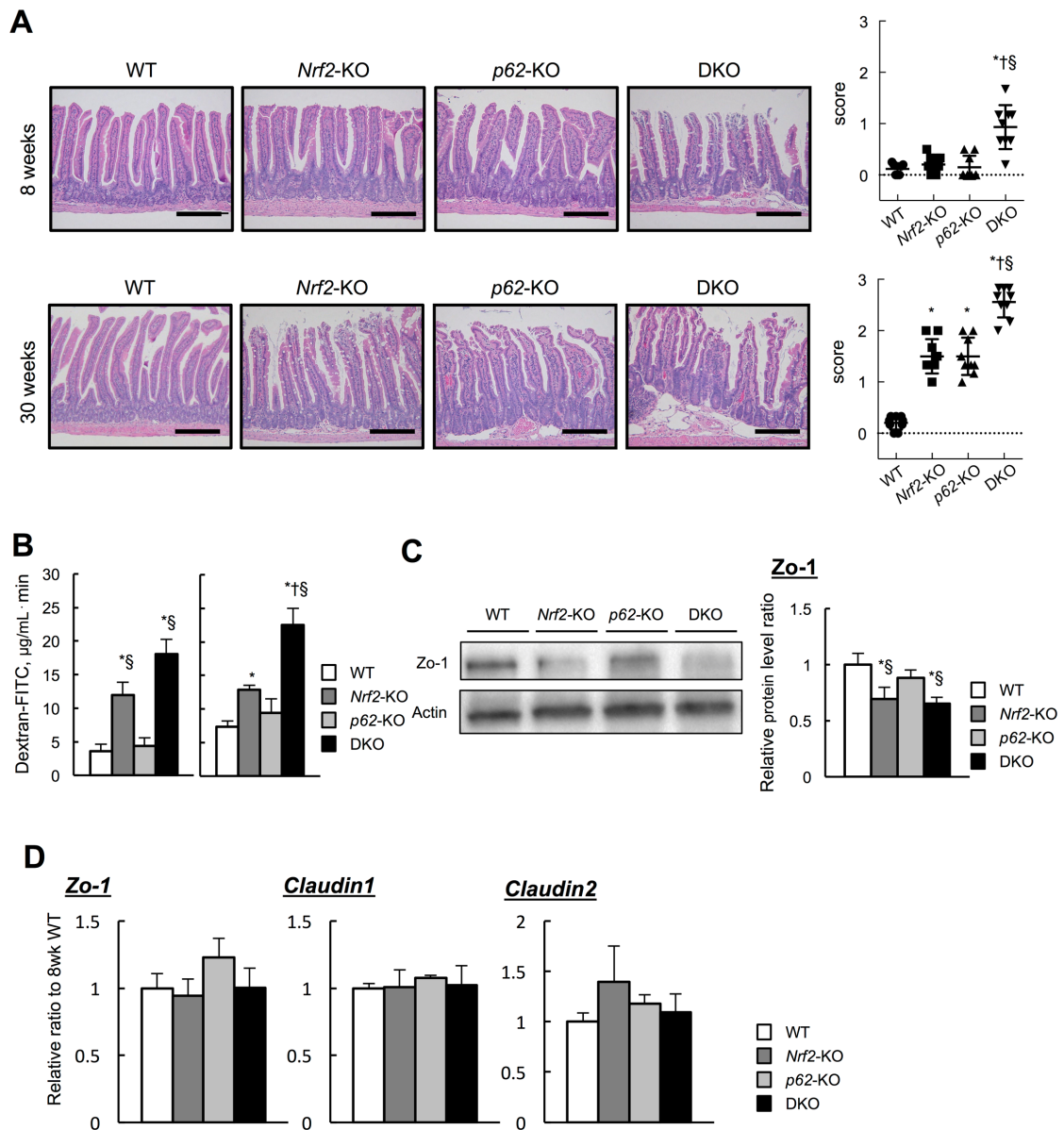


図 5. 腸管上皮における *Nrf2* の欠損はタイトジャンクションタンパク質の *Zo-1* の発現が低下し，腸管透過性が亢進する

(A) 8, 30 週齢の WT, *Nrf2*-KO, *p62*-KO, DKO マウスの空腸の H&E 染色像を示す。スケールバーは，200 μm である。

(B) FITC-デキストランを経口投与し，その血中濃度を測定，曲線下面積を算出し，腸管透過性を評価した ($n = 8$)。

(C) イムノブロッティングにて空腸におけるタイトジャンクションタンパク質 Zo-1 の定量を行った (n = 5). WT マウスとの比として計算した.

(D) 空腸におけるタイトジャンクションタンパク質 *Zo-1*, *Claudin1*, *Claudin2* の mRNA の相対発現レベルを qRT-PCR にて測定した (n = 5). mRNA 発現レベルは, WT マウスとの比として計算した.

すべての結果は平均 ± 標準誤差で示す. * $P < 0.05$, vs WT; † $P < 0.05$, vs *Nrf2*-KO; § $P < 0.05$, vs *p62*-KO.

次に *Nrf2* 欠損が腸管バリア機能に及ぼす影響を調べるために、CRISPR-Cas9 システムを用い、各遺伝子を欠損した Caco-2 細胞（ヒト結腸癌由来の細胞株）を作製した。各遺伝子欠損細胞の p62 および *Nrf2* のタンパク質の発現を確認した（図 6A）。TER にて腸管バリア機能を評価したところ、*Nrf2* 欠損により TER は WT に比べ有意に低下した（図 6B）。また、タイトジャンクションタンパク質である *Zo-1* の発現量が、*Nrf2* 欠損により有意に低下していた（図 6C）。さらに、Caco-2 細胞の *Zo-1* の mRNA 発現レベルは WT に比べ有意に低下したが、*Claudin1* の mRNA 発現レベルは有意な差は認められなかった（図 6D）。

また、LPS が腸障壁障害を引き起こし、腸管透過性が亢進することが知られている。そこで LPS 添加時における各欠損細胞の腸管バリア機能を評価した。すべての細胞において処理前細胞と比較して、TER は 3 時間、6 時間で LPS 誘発細胞において一貫して減少した。さらに、*Nrf2* 欠損細胞は、上記のすべての時点で LPS 処理による TER の低下が増悪した（図 6B）。これらの結果は、腸管上皮における *Nrf2* の欠損はタイトジャンクションタンパク質の *Zo-1* の発現を低下させ、腸管透過性を亢進させることを示している。

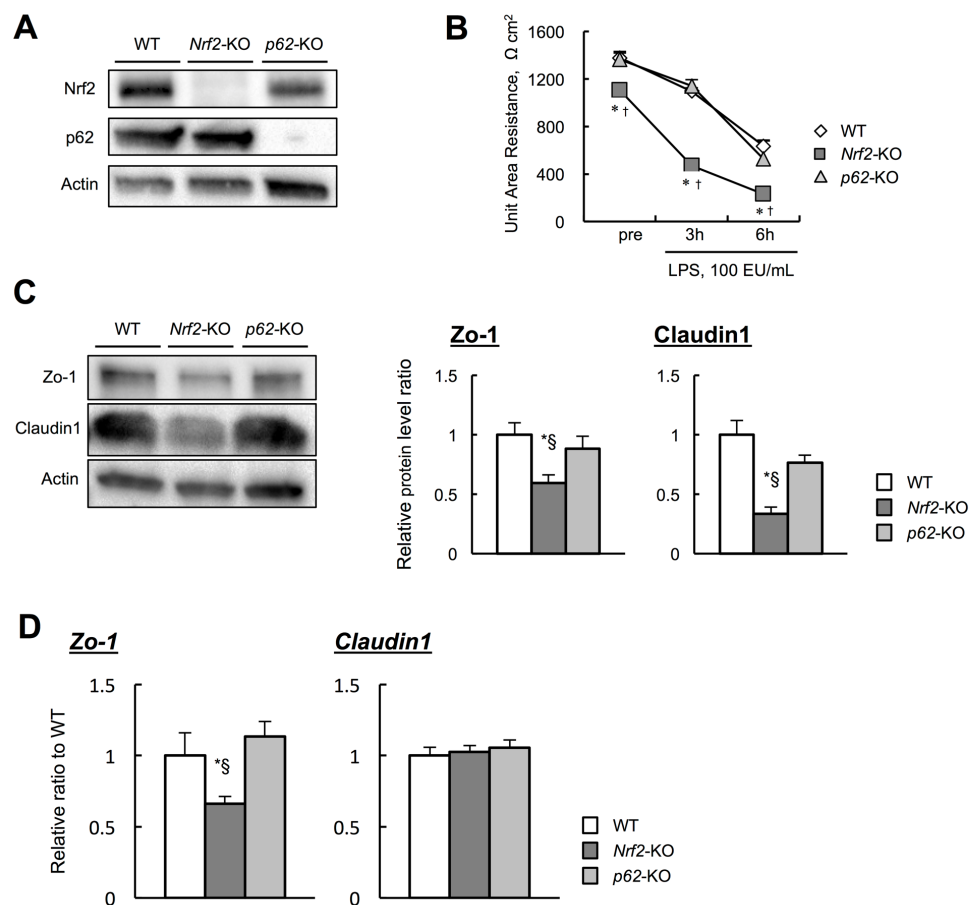


図 6. Caco-2 細胞における *Nrf2* の欠損は腸管透過性が亢進し、LPS 添加によりさらに増悪する

(A) CRISPR-Cas9 システムを用いて *Nrf2*-KO, *p62*-KO Caco-2 細胞を作製した。WT, *Nrf2*-KO, *p62*-KO Caco-2 細胞における Nrf2 と p62 のウェスタンブロットを示す。

(B) WT, *Nrf2*-KO, *p62*-KO Caco-2 細胞をトランスウェルにて 21 日間培養し、分化させた。その後、100 EU/mL の LPS を添加し、0, 3, 6 時間後の経上皮電気抵抗 (TER) を測定し、透過性を評価した (n = 5)。

(C) イムノブロッティングにて WT, *Nrf2*-KO, *p62*-KO Caco-2 細胞におけるタイトジャンクションタンパク質 Zo-1, Claudin1 の定量を行った (n = 5)。WT 細

胞との比として計算した。

(D) WT, *Nrf2*-KO, *p62*-KO Caco-2 細胞におけるタイトジャンクションタンパク質 *Zo-1*, *Claudin1* の mRNA の相対発現レベルを qRT-PCR にて測定した (n = 5)。mRNA 発現レベルは, WT 細胞との比として計算した。

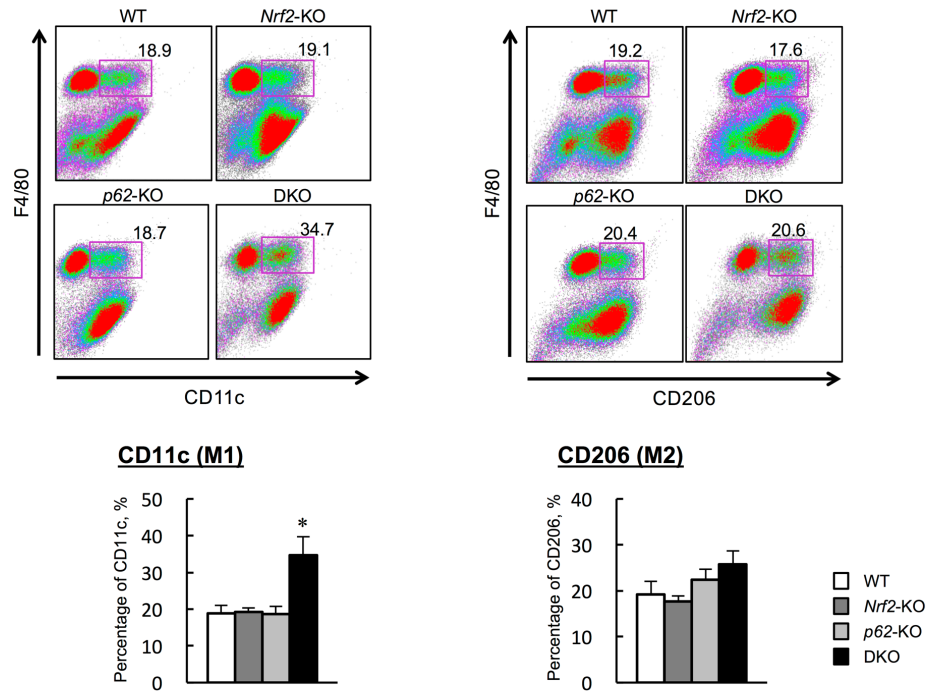
すべての結果は平均 ± 標準誤差で示す。* $P < 0.05$, vs WT; † $P < 0.05$, vs *Nrf2*-KO;

§ $P < 0.05$, vs *p62*-KO.

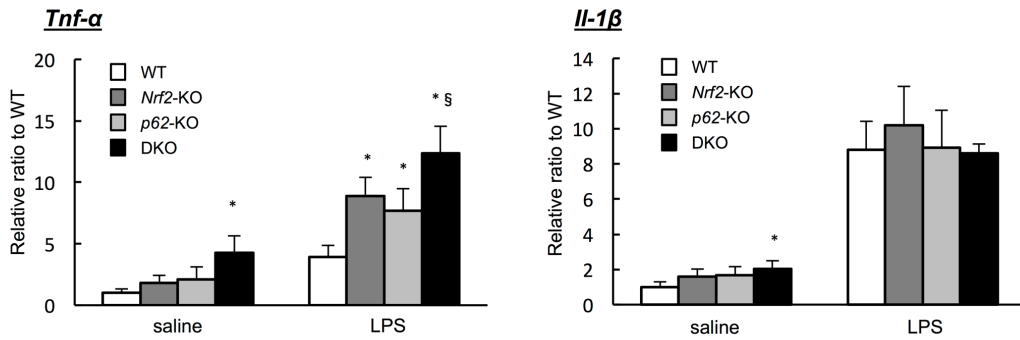
DKO マウスの Kupffer 細胞は、若齢時より炎症が惹起され、貪食能が低下している

次に、NAFLD の進行に寄与していることが明らかにされている肝常在マクロファージである Kupffer 細胞の形質変化を調べた。マクロファージは機能的な表現型である M1/M2 型に分類することができる。CD11c (M1 マクロファージのマーカ―) および CD206 (M2 マクロファージのマーカ―) の表現形をフローサイトメトリーによって解析したところ、M1 表現型 Kupffer 細胞のみが増加し、M2 表現型 Kupffer 細胞は増加しなかった (図 7A)。Kupffer 細胞における炎症反応を直接試験するために、WT, *Nrf2*-KO, *p62*-KO, DKO 由来の Kupffer 細胞を単離し、LPS で刺激した。*Tnf- α* の mRNA レベルは、生理食塩水処理後に増加を示し、LPS 処理によってさらに増加した (図 7B)。一方、LPS 処理により *Il-1 β* のレベルの差は消失した。また、Kupffer 細胞の表面マーカ―である F4/80 陽性細胞の数は、有意な差はみられなかった (図 7C)。これらの結果は、DKO マウスの Kupffer 細胞は若齢時より M1 型へシフトし、炎症が惹起されていることを示している。

A



B



C

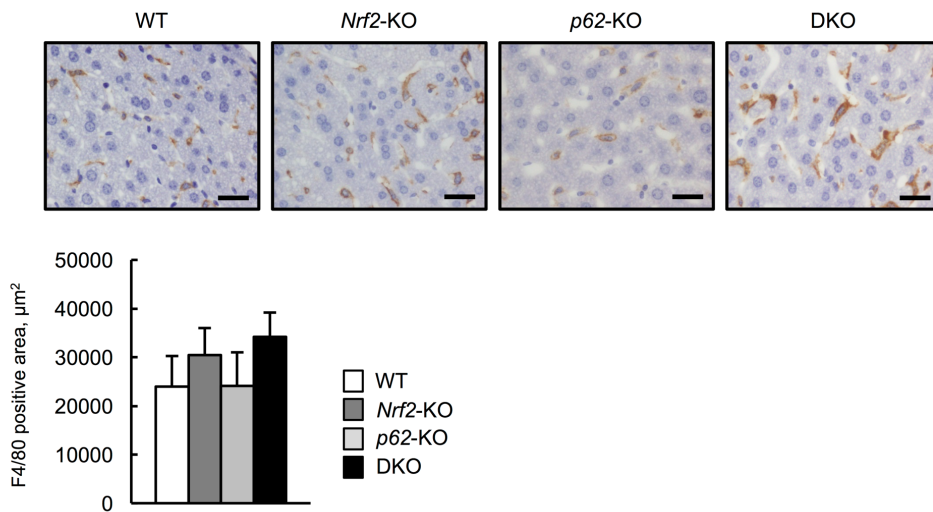


図 7. DKO マウスの Kupffer 細胞は、若齢時より炎症が惹起されている

(A) 8 週齢の WT, *Nrf2*-KO, *p62*-KO, DKO マウスの肝臓より Kupffer 細胞 (F4/80 陽性細胞) を単離し, M1 型 (CD11c), M2 型 (CD206) の表現型を解析した (n = 8).

(B) 肝臓より単離した Kupffer 細胞における *Tnf- α* , *Il-1 β* の mRNA の相対発現レベルを qRT-PCR にて測定した (n = 5). mRNA 発現レベルは, WT マウスとの比として計算した.

(C) F4/80 に対する免疫染色を行って, Kupffer 細胞の存在を判定した. WT, *Nrf2*-KO, *p62*-KO, DKO マウスの肝臓における F4/80 陽性領域を示す (n = 8). すべての結果は平均 \pm 標準誤差で示す. * $P < 0.05$, vs WT; † $P < 0.05$, vs *Nrf2*-KO; § $P < 0.05$, vs *p62*-KO.

肝臓の Kupffer 細胞の貪食機能の低下は、NASH の進展に関与する可能性がある。そこで、SPIO-MRI の肝実質相における造影効果を調べ、Kupffer 細胞の貪食活性を評価した。Nrf2-KO, p62-KO, DKO マウスの T2 値の変化量は、WT マウスと比較し、有意に高値であった (図 8A)。また、フローサイトメトリーにて F4/80 陽性細胞のラテックスビーズの取り込み能を調べたところ、Nrf2-KO および DKO マウスは WT と p62-KO に比べ有意に低値であった (図 8B)。さらに、Nrf2-KO, DKO マウスはスカベンジャー受容体である macrophage receptor with collagenous structure (MARCO) 陽性分画が低下していた (図 8C)。一方、class A macrophage scavenger receptor (SR-A) の陽性分画には有意な差は認められなかった (図 8C)。これらの結果は、DKO マウスの Kupffer 細胞は MARCO の発現が抑制され、貪食能が低下していることを示している。

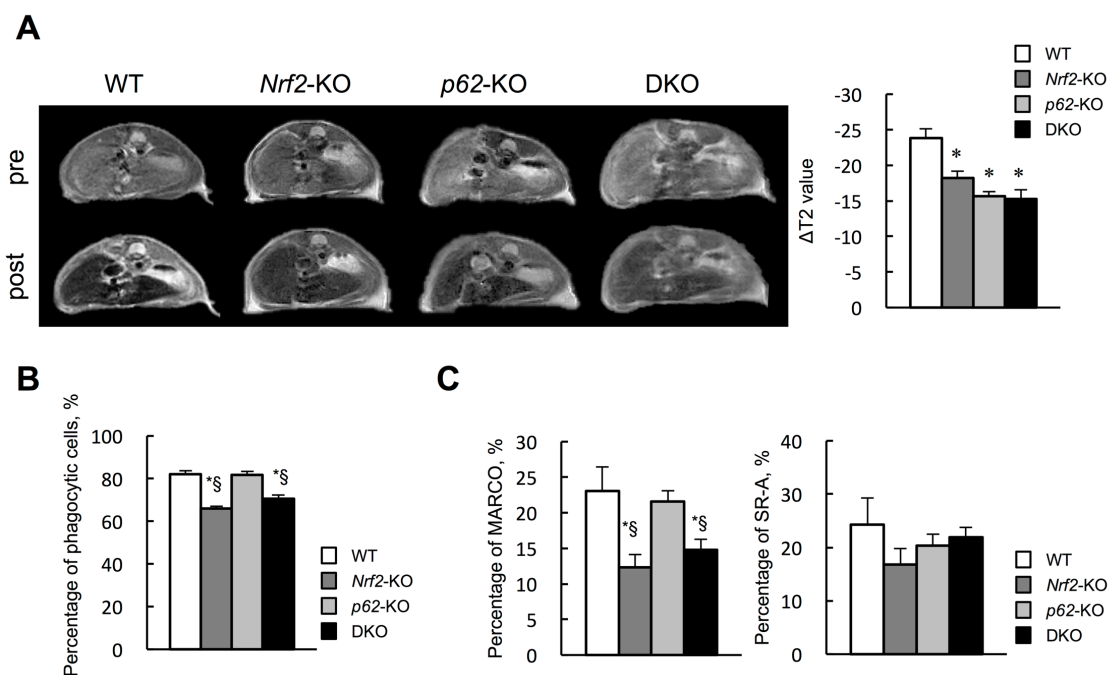


図 8. DKO マウスの Kupffer 細胞は、若齢時より食食能が低下している

(A) 8 週齢の WT, *Nrf2*-KO, *p62*-KO, DKO マウスに造影剤である SPIO を投与し, MRI にて投与前後の T2 値を測定し, Kupffer 細胞の食食機能を評価した (n = 8).

(B) 8 週齢の WT, *Nrf2*-KO, *p62*-KO, DKO マウスに蛍光標識されたラテックスビーズを投与し, フローサイトメトリーにて Kupffer 細胞 (F4/80 陽性細胞) のラテックスビーズ食食陽性率を測定し, Kupffer 細胞の食食機能を評価した (n = 8).

(C) フローサイトメトリーにて Kupffer 細胞 (F4/80 陽性細胞) を単離し, スカベンジャー受容体 (MARCO, SR-A) 陽性率を測定した (n = 8).

すべての結果は平均 \pm 標準誤差で示す. * $P < 0.05$, vs WT; [†] $P < 0.05$, vs *Nrf2*-KO; [§] $P < 0.05$, vs *p62*-KO.

マクロファージにおける *Nrf2* の欠損は LPS の感受性を増大させる

若齢時から DKO マウスの Kupffer 細胞は炎症が惹起されていることから、遺伝的背景より LPS の感受性が増大していることが予想される。そこで、CRISPR-Cas9 システムを用い、各遺伝子を欠損した RAW264.7 (マウスマクロファージ細胞株) を作製し、LPS による炎症反応を評価した。各遺伝子欠損細胞の p62 および *Nrf2* のタンパク質の発現を確認した (図 9A)。RAW264.7 細胞に 10 EU/mL の LPS を添加したところ、*Nrf2* 欠損で WT に比べ Nuclear factor-kappa B p65 のリン酸化が増加した (図 9B)。また、炎症性サイトカインである *Tnf- α* 、*Il-1 β* の mRNA レベルの増悪がみられた (図 9C)。これらの結果は、マクロファージにおける *Nrf2* の欠損は LPS の感受性を増大させることを示している。

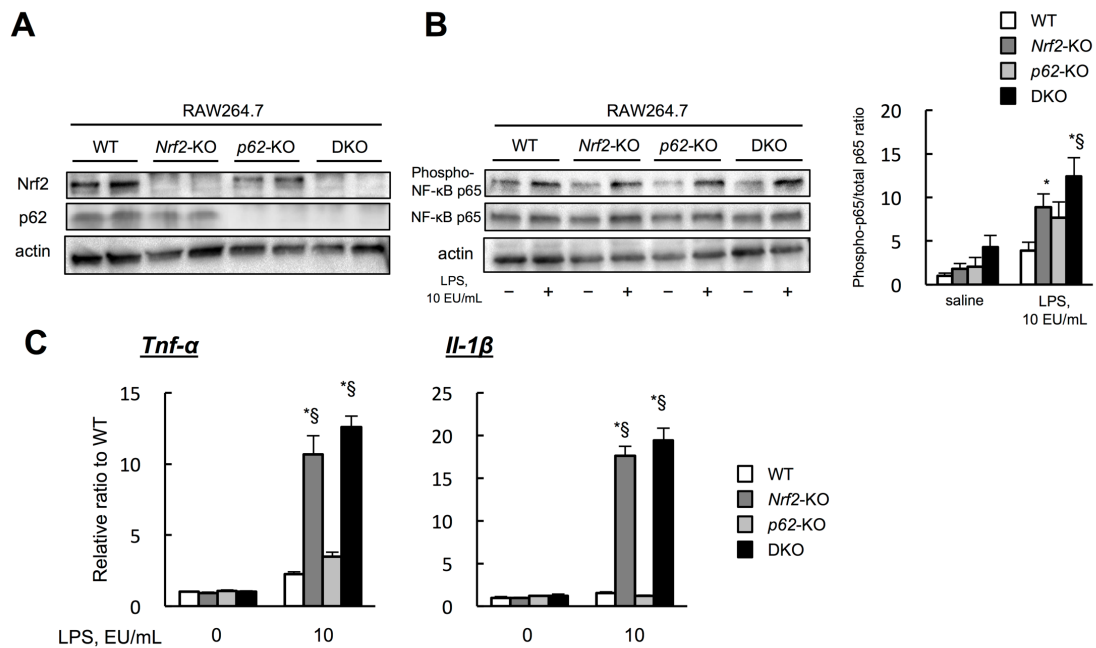


図 9. マクロファージにおける *Nrf2* の欠損は LPS の感受性を増大させる

(A) CRISPR-Cas9 システムを用いて *Nrf2*-KO, *p62*-KO, DKO RAW264.7 細胞を作製した. WT, *Nrf2*-KO, *p62*-KO, DKO RAW264.7 細胞における *Nrf2* と *p62* のウエスタンブロットを示す.

(B) WT, *Nrf2*-KO, *p62*-KO, DKO RAW264.7 細胞を 10 EU/ml の LPS で刺激し, イムノブロッティングにて総 NF-κB p65 に対するリン酸化 NF-κB p65 (p-NF-κB p65) の相対的定量を行った (n = 5). WT マウスとの比として計算した.

(C) LPS で刺激した RAW264.7 細胞における炎症性サイトカイン *Tnf-α*, *Il-1β* の mRNA の相対発現レベルを qRT-PCR にて測定した (n = 5). mRNA 発現レベルは, WT 細胞との比として計算した.

すべての結果は平均 ± 標準誤差で示す. * $P < 0.05$, vs WT; † $P < 0.05$, vs *Nrf2*-KO; § $P < 0.05$, vs *p62*-KO.

摂餌制限による体重コントロールは腸内細菌叢の変化を抑制し、脂肪性肝炎を改善させる

次に、我々は、DKO マウスの病態発症には過食が重要であると考え、摂餌制限を行った。摂餌量は 3.0 ± 0.1 g/day/mouse に制限したところ、DKO マウスは WT と同等な体重経過を示した (図 10A)。自由摂食 DKO マウスは、肝の脂肪化、炎症、線維化がみられたが、摂餌制限 DKO マウスは劇的に改善した (図 10B, C)。また、腸管透過性においても改善を認めた (図 10D)。さらに、グラム陰性菌の割合および糞便中 LPS 濃度が低下し、血清中 LPS 濃度が改善した (図 10D-F)。さらに、過食による腸内細菌叢の変化が原因であると考えられたため、DKO マウスに probiotics を投与したところ、糞便中および血清中 LPS 濃度が低下し、NASH が改善した (図 10G, H)。これらの結果は、摂餌制限による体重コントロールは腸内細菌叢の変化を抑制し、脂肪性肝炎を改善させることを示している。

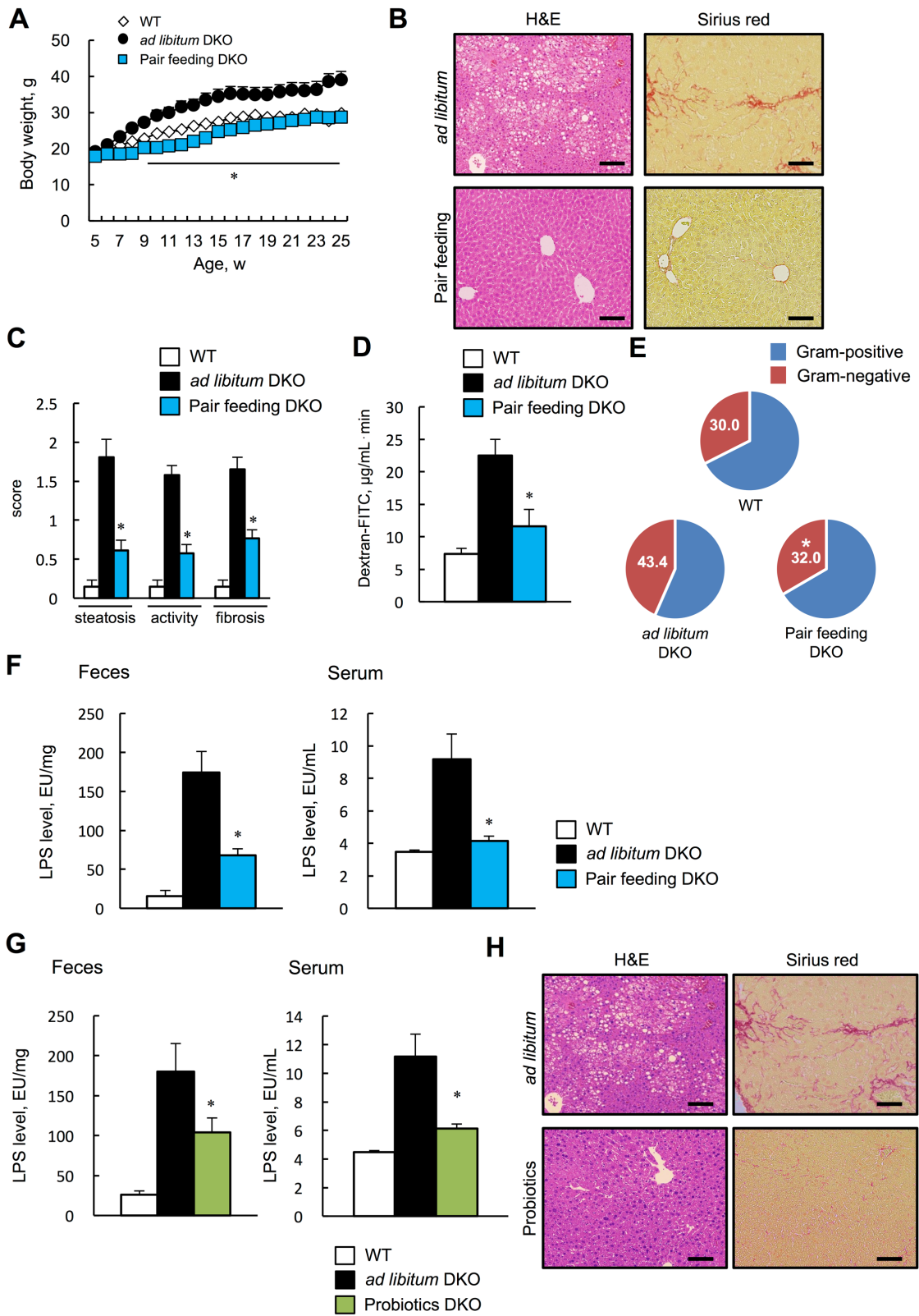


図 10. 摂餌制限による体重コントロールは腸内細菌叢の変化を抑制し，脂肪性肝炎を改善させる

(A) WT, *ad libitum* DKO, pair-feeding DKO マウスの体重変化を示す (n = 10-15).

(B) 30 週齢の *ad libitum* DKO, pair-feeding DKO マウスの肝臓の H&E 染色および Sirius red 染色像を示す. スケールバーは, 100 μ m である.

(C) 病理専門医指導のもと SAF (Steatosis, Activity, Fibrosis) スコアを用いて, 病理学的評価を行った. (n = 8).

(D) FITC-デキストランを経口投与し, その血中濃度を測定, 曲線下面積を算出し, 腸管透過性を評価した (n = 8).

(E) 30 週齢の WT, *ad libitum* DKO, pair-feeding DKO マウスの糞便を採取し, 次世代シーケンサーにグラム陰性菌の割合を測定した (n = 8).

(F) 30 週齢の WT, *ad libitum* DKO, pair-feeding DKO の糞便中および血清中 LPS 濃度を示す (n = 8).

(G) 25 週齢の WT, *ad libitum* DKO, probiotics DKO の糞便中および血清中 LPS 濃度を示す (n = 8).

(H) 25 週齢の *ad libitum* DKO, probiotics DKO マウスの肝臓の H&E 染色および Sirius red 染色像を示す. スケールバーは, 100 μ m である.

すべての結果は平均 \pm 標準誤差で示す. * $P < 0.05$, vs *ad libitum* DKO.

第4章 考察

本研究では、過食肥満を呈する新たな NASH モデルの作製を行った。作製した *p62:Nrf2* 遺伝子二重欠損マウスは、過食肥満、インスリン抵抗性を認め、NASH を自然発症した。*p62:Nrf2* 遺伝子二重欠損マウスは、*Nrf2* 欠損による腸管のバリア機能低下、Kupffer 細胞の LPS に対する過剰な炎症反応、さらに、*p62* 欠損によるアディポカインのアンバランス、腸内細菌叢の変化による LPS 産生の増大が同時に進行することで NASH へと進展することを示した。

病理学的解析と qPCR による NASH 病態の評価 (図 11)

DKO マウスが NASH モデルマウスとして適当であるか確認するために、まずは NASH 病変が認められるかを検討した。NASH の確定診断には、肝生検組織診断が必要とされている。NASH の病理学的所見は、肝細胞の脂肪変性、炎症性細胞浸潤、肝線維化が特徴である。本研究では包括的に組織病理診断を行うために、病理専門医指導のもと SAF (Steatosis, Activity, Fibrosis) スコアを用いた (28)。DKO マウスは通常食飼育下において、加齢とともに肝臓の脂肪化、炎症性細胞の浸潤、線維化を示した (図 3)。一方、*Nrf2*-KO および *p62*-KO は激しい線維化は認められなかった。以上のことから、*Nrf2* および *p62* の両遺伝子を欠損させると NASH を発症することが明らかとなった。つまり、NASH モデルマウスであるということが示された。さらに、DKO マウスの 12% (8/66) において 50 週齢まで肝腫瘍が観察された (図 3)。腫瘍部において GST-P1 染色の濃染を認めるため、癌病変であると考えられるが、今後さらなる検討が必要である。

また、肝臓の脂肪化、炎症、線維化の評価として、組織から mRNA を抽出し、発現レベルを比較した。30 週齢の *p62-KO* と *DKO* マウスで *Srebp-1c*, *Acc-1*, *Scd-1*, *Ppar γ* が有意に増加した。*DKO* マウスは若齢時においても *Srebp-1c* の発現が有意に増加した (表 5)。これらの結果は、後述の過食肥満およびインスリン抵抗性によって引き起こされていると考えられる。肝臓の *Tnf- α* , *Il-1 β* , *Il-6* および *Tlr4* の mRNA 発現レベルは、8 週齢の *DKO* マウスにおいて *WT* マウスより有意に増加し、30 週齢ではさらに増悪した。肝線維症と密接に関連する *Tgf- β 1* および *Procollagen- α 1* の mRNA 発現は、30 週齢の *DKO* マウスにおいて有意に増加した (表 4)。内臓脂肪においても炎症が認められたが、肝臓の炎症はより早期に起きていると考えられる。これらの結果は、*DKO* マウスの肝臓の炎症が早い時期から引き起こされることを示している。

病理学的解析および qPCR の結果から、*DKO* マウスは *NASH* モデルマウスであると示唆される。また、*DKO* マウスは肝臓の脂肪変性および炎症、線維化が同時に生じていたため (図 3)、「Multiple parallel hits hypothesis」に則ったモデルマウスであると考えられる。

インスリン抵抗性とアディポカインのアンバランス

次に *DKO* マウスが過食肥満およびインスリン抵抗性を呈する *NASH* モデルマウスであるか検討した。*NASH* の形成に大きく関与する要因として、過栄養状態を基盤とした全身性の肥満があげられる。肥満は皮下脂肪型と内臓脂肪型に大別され、後者はメタボリックシンドロームとの関連が示唆されている。過剰に摂取された糖質は中性脂肪に変換され、主に脂肪組織に蓄積する。脂肪組織における中性脂肪の過剰蓄積はアディポカイン分泌異常やインスリン抵抗性が生じる (32, 33)。インスリン抵抗性は、2 型糖尿病またはその前段階である

耐糖能異常の根幹を形成する病態であり、高血糖に対するインスリンの血糖降下作用が減弱している状態である。肝臓におけるインスリン抵抗性の形成には、慢性炎症に伴うマクロファージ活性化と炎症性サイトカイン産生が寄与している。*p62-KO* マウスと *DKO* マウスは、通常食飼育下において過食肥満を呈し、空腹時における血清インスリン値および *HOMA-IR* の上昇を認め、インスリン抵抗性が生じていた。また、*DKO* マウスは8週齢から血清インスリン値および *HOMA-IR* の上昇を認め、若齢時からインスリン抵抗性が生じていると示唆された (図 1, 2)。つまり、*DKO* マウスはインスリン抵抗性が増悪していると考えられる。これは、*DKO* マウスでは若齢時から炎症が惹起されているためであると考えられる。

また、肥満症の病態の一つであるアディポカインも測定した。アディポカインは脂肪組織から産生される生理活性物質の総称であり、レプチンやアディポネクチン、炎症性サイトカインである *TNF- α* などがある。これらの因子は単独での生理活性に加え、複数の因子のバランスの変化によって病態に影響を及ぼしていると考えられている。肝臓においてレプチンは *Kupffer* 細胞の活性化増強や肝線維化促進因子が明らかにされている一方、アディポネクチンは保護的に作用することが報告されている (32, 33, 40)。また、肥満に伴うレプチン産生亢進やアディポネクチン産生低下などのアディポカインの発現バランスの異常もインスリン抵抗性を増強する (41)。*p62-KO* マウスと *DKO* マウスは、若齢時からの血清レプチン値の増加および肥満時における血清アディポネクチン値の低下を認め、アディポカインのアンバランスが生じていると考えられる。しかし、両マウスで差は認められなかった (図 2)。

以上のことから、*DKO* マウスは過食肥満およびインスリン抵抗性を呈する *NASH* モデルマウスであると示された。

次に、作製した新たなモデルマウスである DKO マウスの発症機序を追求した。「Multiple parallel hits hypothesis」では、腸管細菌叢の菌体成分である LPS が腸管粘膜バリアを越え肝臓に到達し、肝臓類洞壁細胞の Kupffer 細胞に作用することが肝炎、肝線維化へ進行する重要な因子とみなされている。そこで、DKO マウスの腸内細菌叢、腸管バリア機能、Kupffer 細胞に着目し、解析した。また、DKO マウスの NASH 発症機序における過食肥満および腸肝連関の関連性に迫った。

腸内細菌叢の異常 (図 12)

近年の腸内細菌研究の進歩により、メタボリックシンドロームを含む代謝性疾患と腸内細菌叢との関連が注目を集めている。腸内細菌が腸管上皮に作用し、腸管からの糖の吸収を促進させ、脂肪細胞を肥大させると報告されている (42)。また、肥満患者の腸内細菌叢は特徴的な系統組成の変化が見られること、さらに肥満患者の腸管粘膜は慢性的に低レベルの炎症状態にあることなどが報告されており、代謝性疾患と腸内細菌叢との密接な相互作用の詳細が明らかになってきている (43, 44)。腸内微生物叢は NASH の病因にも関与していると考えられている。NASH 患者を対象とした 16S rRNA gene Pyrosequencing を用いた臨床研究では、*Porphyromonadaceae* が増加、*Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae* が低下していた (45, 46)。また、腸由来の LPS は、NASH の単純脂肪症から脂肪性肝炎への疾患の進行に役割を果たしていることが示されている (47, 48)。実際、*p62-KO* マウスと DKO マウスにおいてグラム陰性菌の割合が増加していた。菌叢解析を行ったところ、DKO マウスにおいて *Porphyromonadaceae*, *Paraprevotellaceae* が増加し、*Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae* が低下していた。また、糞便中 LPS 濃度は、*p62-KO* マウスと DKO マウスにおいて増加していたが、血清中 LPS 濃

度は DKO マウスのみ増加していた (図 4). つまり, *p62* 欠損によって糞便中 LPS 濃度が増加し, NASH が進行する二重欠損ではさらに血清中 LPS 濃度が増加することがわかった. 従って, 腸内細菌叢の変化と血清中 LPS の増加が DKO の NASH 発症に重要な役割を演じていると考えられる.

マウスおよびヒトの先行研究において, 過食肥満は腸内細菌叢を変化させることが報告されていることから, DKO マウスの腸内細菌叢の異常は過食が原因ではないかと考えた. そこで, DKO マウスに摂餌制限を行い, 肝病変および腸内細菌叢を調べた. 摂餌制限を行った DKO マウスは NASH 病変が劇的に改善し, 腸内細菌叢の変化および LPS 濃度の増加も改善した (図 10). さらに, DKO マウスに Probiotics を投与したところ NASH 病変が改善した (図 10). 従って, DKO マウスは過食肥満によって, 腸内細菌叢が変化し, 糞便中および血清中 LPS 濃度が増大し, NASH が発症したと考えられる.

DKO マウスの NASH 発症は, 過食肥満による腸内細菌叢の変化が一因であると考えられた.

腸管透過性の亢進 (図 13)

NASH 患者において, 腸内細菌叢の変化に加え, 腸管透過性が亢進していることが知られている (37). ラットを対象とした研究において, タイトジャンクションタンパク質である *Zo-1* の発現量が低下し, 腸管透過性が有意に亢進していることが明らかとなっている (49). 我々のデータでは, マウスおよび Caco-2 細胞において *Nrf2* 欠損によりタイトジャンクションタンパク質である *Zo-1* の発現が低下し, 透過性の亢進がみられた (図 5). また, マウスの腸管の透過性の亢進は, 腸管組織の障害が軽度の *Nrf2*-KO マウスでも認められた. これらの結果は, *Nrf2* が腸管バリア機能と密接に関連していることを示している. また,

LPS による iNOS の活性化はタイトジャンクションタンパク質の発現を低下させ、透過性を亢進させると報告されている (50)。また、Nrf2 は iNOS の発現を抑制していることが知られている (51)。実際、DKO マウスは糞便中 LPS 濃度が増加している 30 週齢ではさらに腸管透過性が亢進し、摂餌制限により Nrf2-KO と同等まで改善した (図 5, 10)。Caco-2 細胞に LPS 添加すると細胞膜の抵抗値がさらに低下した (図 6)。従って、DKO マウスは Nrf2 欠損により LPS 誘発性の iNOS の活性化が起き、腸管透過性が亢進したと考えられる。

以上のことから、DKO マウスの NASH 発症には、p62 欠損の糞便中 LPS 濃度の増大および Nrf2 欠損の腸管透過性の亢進による血清中 LPS 濃度の増大が重要な役割を演じていると考えられる。

Kupffer 細胞の LPS 感受性の増大 (図 14)

NASH の病態形成において Kupffer 細胞の活性化による炎症性サイトカインの過剰産生が重要であることが知られている。Kupffer 細胞は、自然免疫の中心的役割を果たし、生体内に侵入してきた有害物質や病原物質を認識し、活性化する (22)。活性化した Kupffer 細胞は、肝実質細胞や他の肝細胞との相互作用により、サイトカイン、ケモカインなどを含む生物学的に活性な様々なメディエーターを放出する。(41, 52, 53)。また、NASH における Kupffer 細胞の炎症は肝の脂肪蓄積と同時に起こるまたは先行するといわれている (5)。実際、本研究の結果は、肥満症を発症していない 8 週齢の DKO マウスにおいて、Kupffer 細胞の M1 型へのシフトおよび炎症性サイトカインの発現が増加し、若齢時より炎症が惹起されていることを示す (図 7, 表 4)。従って、DKO マウスの NASH における肝臓の炎症は、脂肪蓄積に先行して起きていると考えられる。また、RAW264.7 における LPS の応答性は、Nrf2 欠損により増強した (図 9)。Nrf2 は炎症を増悪

させるサイトカインである *Il-1 β* や *Il-6* の遺伝子の発現を阻害することで、炎症を抑えていることが報告されている (22). 従って, *Nrf2* 欠損は, DKO マウスの若齢時の炎症惹起に密接に関わりがあると考えられる. 加えて, DKO マウスでは若齢時から *p62* 欠損による高レプチン血症が生じていた (図 2). 肥満にともなう高レプチン血症は肝臓において少量の LPS に過剰な反応をきたし非アルコール性脂肪肝炎の進展に関与することが報告されている (32).

DKO マウスの NASH 発症には, *Nrf2* および *p62* 欠損による LPS に対する炎症反応の増強が重要な因子であると考えられる.

Kupffer 細胞の貪食能 (図 15)

また, ヒトまたはラットを対象とした研究において, NASH では Kupffer 細胞の貪食能が低下していることが明らかとなっている (54, 55). Kupffer 細胞の貪食能が低下すると LPS などの異物が処理できず, 炎症の増悪につながるといわれている. 当研究室の先行研究にて, 筑波大学附属病院消化器内科を受診している NASH 患者において造影超音波検査を行ったところ, NASH の重症度と貪食能の低下とに関連が示唆された (55). マクロファージの貪食に関与するスカベンジャー受容体 MARCO は病原体に対する TLR4 応答を制限すること, LPS を投与すると発現量が増加することが報告されている (56, 57). また, スカベンジャー受容体 SR-A および MARCO の発現の低下が LPS の TLR4 応答を増強すると報告されている (56). 本研究において DKO マウスでは, Kupffer 細胞の貪食能が低下していることが明らかになった (図 8). 貪食能の低下の一因として, *Nrf2* 欠損により MARCO の発現量の低下が考えられた. 以上のことから, DKO マウスでは *Nrf2* 欠損により MARCO の発現量および貪食能が低下しており, LPS の TLR4 応答が増強していると考えられる. しかし, 貪食能低下と NASH 発

症との因果関係は示せていない．今後さらなる研究が必要である．

既存の NASH モデルとの比較 (図 16)

以前の研究では、NASHモデル動物としてはMCD食誘発性マウスモデル(58)や肝細胞特異的 *Pten* 欠損 (7) などのマウスが使われている．しかし、これらのモデル動物は過剰な高脂肪食の投与を必要としたり、不自然な体重の減少や急激な症状の進行を認めたりと生活習慣病を基礎に発症するヒト NASH とは乖離している可能性がある．また、高脂肪食投与モデルや *ob/ob* マウスは、肥満やインスリン抵抗性、肝臓の脂肪蓄積を認めるが、肝臓の激しい線維化は示さないなどの問題点がある (6)．腸内細菌叢に関しては、MCD 食誘発性マウスモデル、高脂肪食投与モデル、*ob/ob* マウスにおいて WT マウスと比較し、変化していると報告されている (59)．腸管透過性に関しては、MCD 食誘発性マウスモデルおよび高脂肪食投与モデルでは亢進すると報告されている (49, 60)．しかし、過食肥満を呈する *ob/ob* マウスは腸管透過性は亢進しない (61)．Kupffer 細胞貪食能は、MCD 食誘発性マウスモデルにおいて低下していると報告されている (62, 63)．*ob/ob* マウスに高脂肪食投与したモデルにおいて Kupffer 細胞貪食能の低下が報告されているが、それぞれ単独モデルの報告はない (64)．一方、本研究で使用した *p62:Nrf2* 遺伝子二重欠損マウスは、通常食飼育下で過食による肥満、インスリン抵抗性、2型糖尿病、アディポカインのアンバランスを呈し、加齢とともに肝臓の脂肪化、炎症性細胞の浸潤、線維化を示し、約 12%に腫瘍が認められた．さらに、腸内細菌叢の異常、腸管透過性亢進、Kupffer 細胞の機能異常を認めた．この結果から、DKO マウスはヒト NASH と非常に類似したモデルであると考えられる．

ヒト NASH における p62 と Nrf2

ヒト NASH において、p62 および Nrf2 に関して幾つか報告されている。p62 は NASH における損傷肝細胞の細胞質に蓄積するタンパク質凝集体である Mallory-Denk Bodies の成分である (65)。NASH が進行すると肝細胞において ER ストレスによるオートファジー障害が起き、p62 の発現が健常人に比べ NASH 患者で有意に増加している (66)。一方、NASH 患者の肝星細胞において p62 の発現は低下しており、p62 の発現低下は星細胞を活性化させ肝臓の炎症や線維化を増悪させる (67)。Nrf2 はヒトの NASH および NASH-HCC において発現が増強すると報告されているが、これは Nrf2 が酸化ストレスへの適応において重要な役割を果たすことを示している (68, 69)。本研究は、臨床の先行研究をもとに欠損させる遺伝子を選択していない。ヒト NASH における両遺伝子の発現の挙動は DKO マウスと異なっており、ヒト NASH を反映していない可能性がある。

DKO マウスは、過食肥満を呈する新たな NASH モデルである。DKO マウスの NASH 発症機序は、過食肥満により腸内細菌叢が変化し、腸管透過性が亢進していることにより腸由来の LPS が肝臓に流入してくる。そして、Kupffer 細胞における TLR4 シグナル伝達の活性化を介した腸由来の LPS に対する肝臓の過炎症反応の結果、脂肪性肝炎および線維症が進行する (図 17)。これらの結果は、過食肥満、腸内細菌叢、腸管バリア機能および Kupffer 細胞の TLR4 シグナル伝達を標的とすることによって、画期的な NASH の治療的アプローチの開発につながる可能性がある。

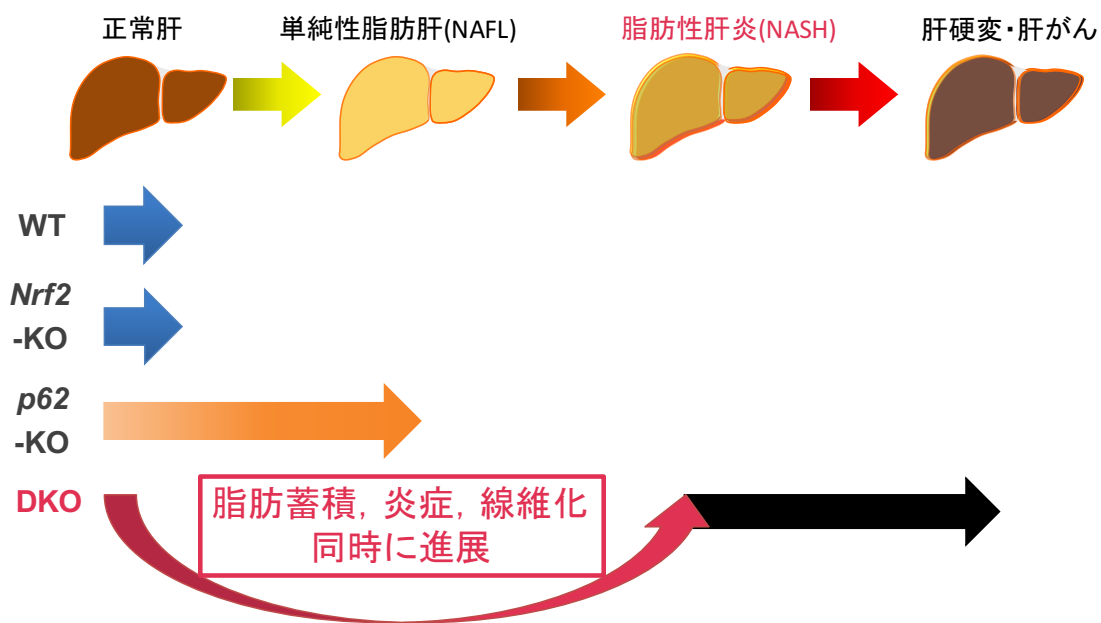


図 11. *p62:Nrf2* 遺伝子二重欠損 (DKO) マウスの肝病態の推移

WT マウスと *Nrf2*-KO マウスは正常肝である. *p62*-KO マウスは脂肪肝へ進展するが, 炎症線維化は認められない. DKO マウスは, 肝臓の脂肪化, 炎症, 線維化を呈し, 肝腫瘍を認める.

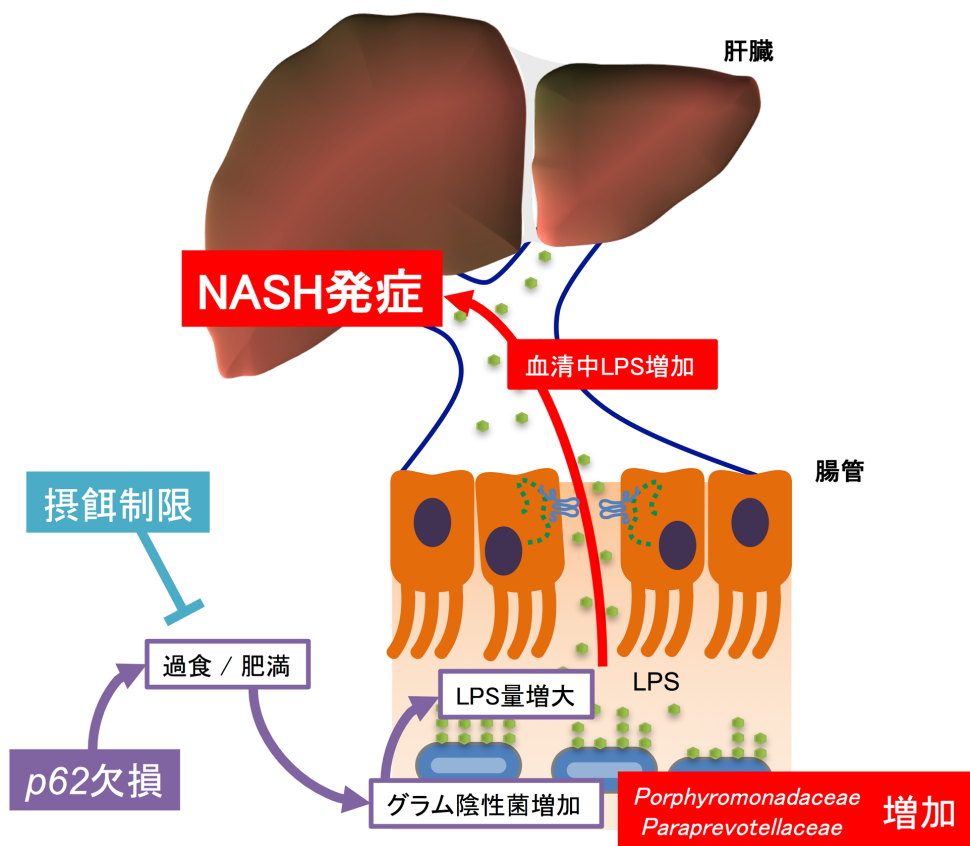


図 12. *p62:Nrf2* 遺伝子二重欠損 (DKO) マウスにおける腸内細菌叢の異常

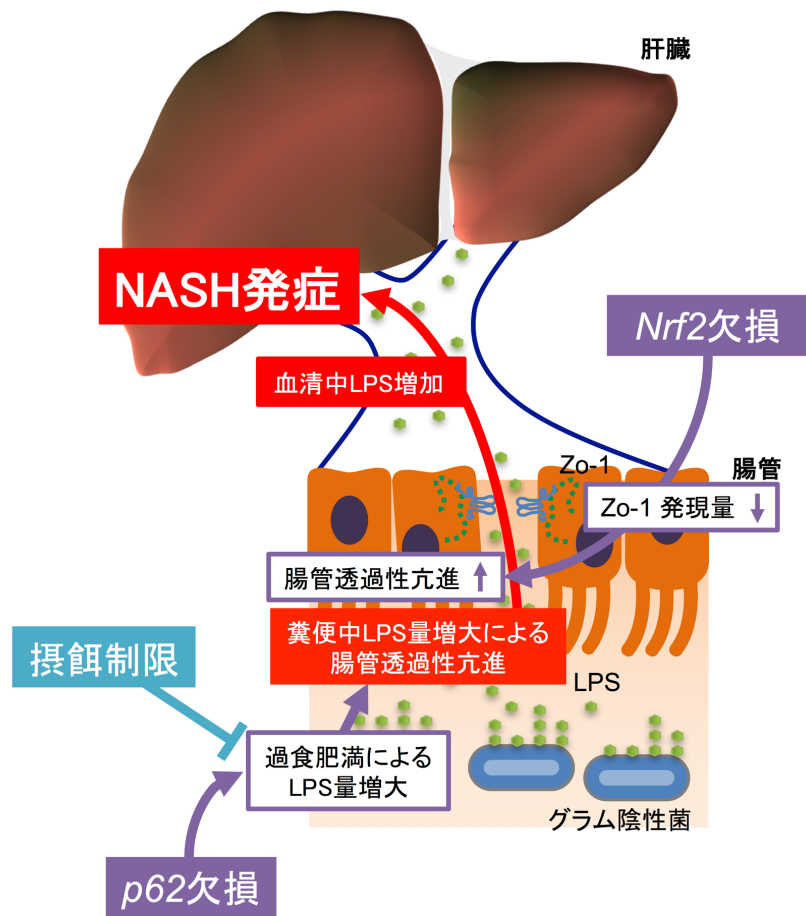


図 13. *p62:Nrf2* 遺伝子二重欠損 (DKO) マウスの腸管透過性亢進機序

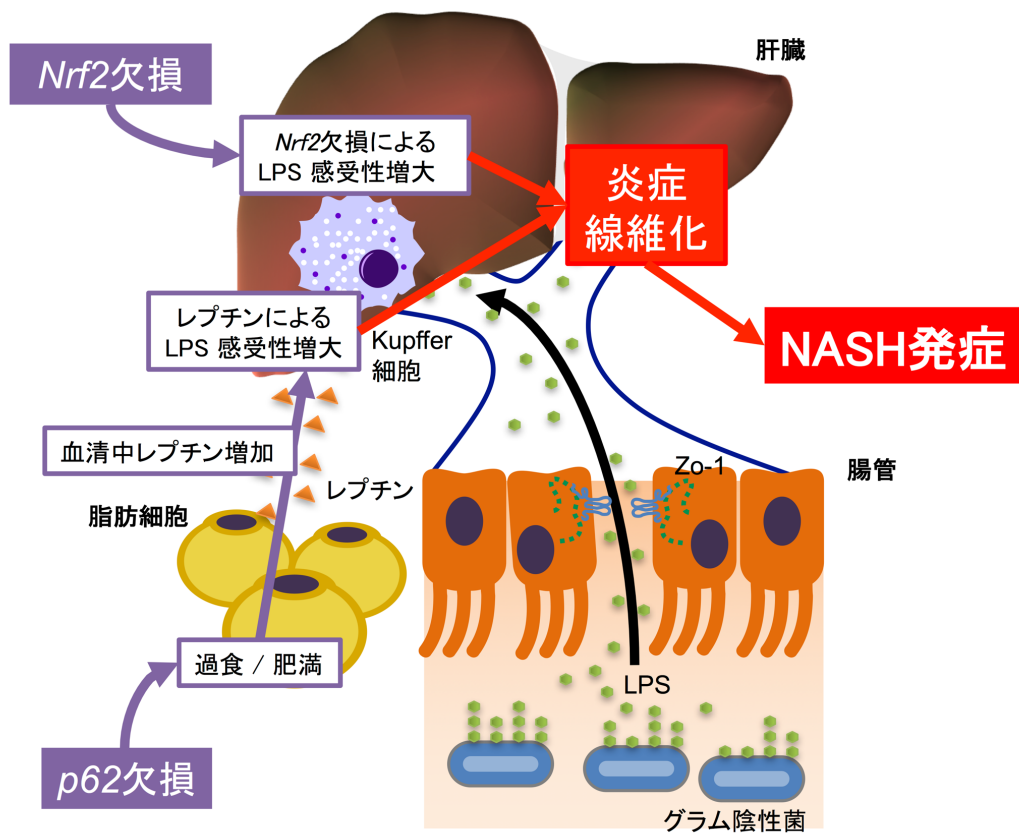


図 14. *p62:Nrf2* 遺伝子二重欠損 (DKO) マウスの炎症増悪

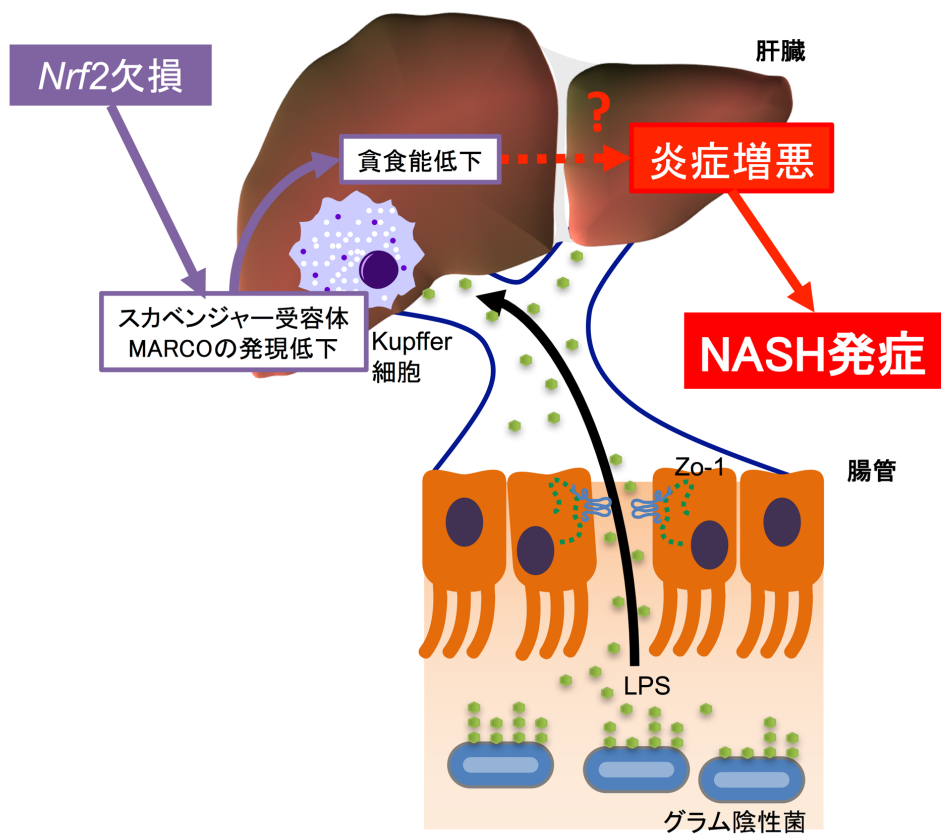


図 15. *p62:Nrf2* 遺伝子二重欠損マウスの Kupffer 細胞貪食能の低下

Y: Yes, N: No	肥満	インスリン 抵抗性	肝臓			腸内細菌叢 の異常	腸管透過性 の亢進	Kupffer細胞 貪食能低下
			炎症	線維化	腫瘍形成			
MCD食誘発性 NASHモデルマウス	N	N	Y	Y	Y	Y	Y	Y
肝細胞特異的 <i>Pten</i> 欠損マウス	N	Y	Y	Y	Y	—	—	—
High-Fat High-Sugar食 肥満モデルマウス	Y	Y	Y	Y/N	N	Y	Y	—
<i>ob/ob</i> マウス 過食肥満モデル	Y	Y	N	N	N	Y	N	—
<i>p62:Nrf2</i> 二重欠損マウス	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y

図 16. *p62:Nrf2* 遺伝子二重欠損マウスと既存 NASH モデルとの比較

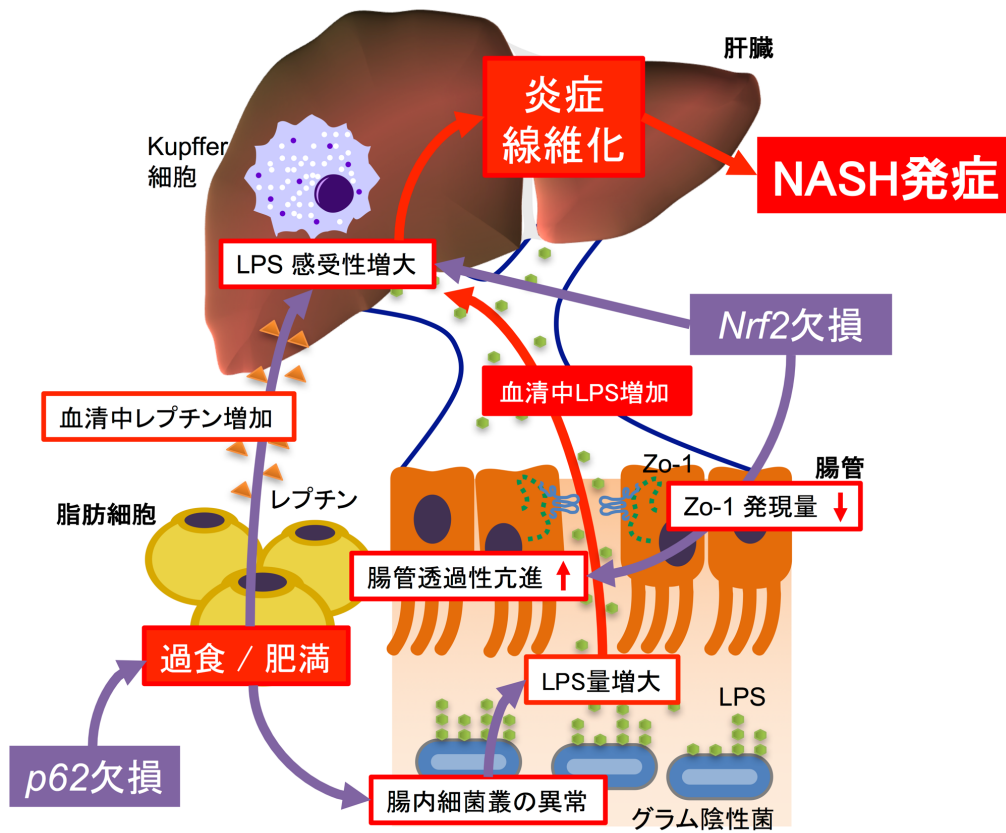


図 17. *p62:Nrf2* 遺伝子二重欠損マウスの NASH 発症機序

第5章 結語

p62:Nrf2 遺伝子二重欠損マウスでは、過食肥満を背景に肝臓内外で起こる腸からの過剰な LPS の流入による先天性免疫活性化が NASH の肝臓損傷の発生の主要な原因であることが示唆された。*p62:Nrf2* 遺伝子二重欠損マウスは、過食肥満を呈するユニークな NASH 動物モデルである。

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 医学医療系 正田純一教授，筑波大学 医学医療系 蕨栄治講師，筑波大学附属病院 岡田浩介病院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 千葉滋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 松坂賢准教授，古川宏准教授，金子剛講師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 環境分子生物学研究室 石井哲郎教授，筑波大学 医学医療系 歯科口腔外科 柳川徹准教授に深謝いたします。病理解析におきまして適切なお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病センター 消化器内科 講座主任 徳重克年教授，東京女子医科大学 消化器内科 川本徹博士に深謝いたします。血清分析におきまして適切なお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，株式会社 LSI メディエンス 医薬品分析部 上田哲也様に深謝いたします。小動物用 MRI に関して適切なお助言と多大なるご協力をいただきました筑波大学 数理物質系 巨瀬勝美教授，株式会社エム・アール・テクノロジー 拝師智之様に深謝いたします。

また、当研究室において苦楽を共にしてきた疾患制御医学専攻 小峰昇一氏，志田隆史氏，筑波大学附属病院 歯科口腔外科 内田文彦病院講師に心より御礼申し上げます。共に研究・実験を行い，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，卒業生および修了生 池田

瑛氏，池内美穂氏，青山希氏，長岡亜実氏，須上まどか氏，平松未有氏に心より御礼申し上げます。研究の糧となったすべての実験動物に対し，深い感謝と哀悼の意を表します。

最後に大学院生活を支えてくださいました家族に心から謝意を表します。

本研究は JSPS 科研費（No. 25282212, 26282191, 26293284, 26293297, 15K15037, 15K15488, 16J00793, 16K15188, 17H02174, 17K19887, 17K19888）の助成を受けたものです。

本学位論文の原著論文は，*Experimental Animals* 本誌 67 巻 2 号に掲載されました。*Experimental Animals* の規定により博士論文に該当し，適切に引用されている場合は二重投稿となりません。

引用文献

- 1 Ludwig, J., Viggiano, T. R., McGill, D. B. & Oh, B. J. Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clin. Proc.* 55, 434-438 (1980).
- 2 Day, C. P. & James, O. F. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology* 114, 842-845 (1998).
- 3 Lin, H. Z. *et al.* Metformin reverses fatty liver disease in obese, leptin-deficient mice. *Nat. Med.* 6, 998-1003, doi:10.1038/79697 (2000).
- 4 Li, Z. *et al.* Probiotics and antibodies to TNF inhibit inflammatory activity and improve nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 37, 343-350, doi:10.1053/jhep.2003.50048 (2003).
- 5 Tilg, H. & Moschen, A. R. Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis. *Hepatology* 52, 1836-1846, doi:10.1002/hep.24001 (2010).
- 6 Imajo, K. *et al.* Rodent models of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 21833-21857, doi:10.3390/ijms141121833 (2013).
- 7 Horie, Y. *et al.* Hepatocyte-specific Pten deficiency results in steatohepatitis and hepatocellular carcinomas. *J. Clin. Invest.* 113, 1774-1783, doi:10.1172/jci20513 (2004).
- 8 Yanagitani, A. *et al.* Retinoic acid receptor alpha dominant negative form causes steatohepatitis and liver tumors in transgenic mice. *Hepatology* 40, 366-375,

- doi:10.1002/hep.20335 (2004).
- 9 Fan, C. Y. *et al.* Steatohepatitis, spontaneous peroxisome proliferation and liver tumors in mice lacking peroxisomal fatty acyl-CoA oxidase. Implications for peroxisome proliferator-activated receptor alpha natural ligand metabolism. *J. Biol. Chem.* 273, 15639-15645 (1998).
 - 10 Rinella, M. E. *et al.* Mechanisms of hepatic steatosis in mice fed a lipogenic methionine choline-deficient diet. *J. Lipid Res.* 49, 1068-1076, doi:10.1194/jlr.M800042-JLR200 (2008).
 - 11 Isoda, K. *et al.* Deficiency of interleukin-1 receptor antagonist deteriorates fatty liver and cholesterol metabolism in hypercholesterolemic mice. *J. Biol. Chem.* 280, 7002-7009, doi:10.1074/jbc.M412220200 (2005).
 - 12 Ishii, T. *et al.* Murine peritoneal macrophages induce a novel 60-kDa protein with structural similarity to a tyrosine kinase p56lck-associated protein in response to oxidative stress. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 226, 456-460, doi:10.1006/bbrc.1996.1377 (1996).
 - 13 Moscat, J., Diaz-Meco, M. T. & Wooten, M. W. Signal integration and diversification through the p62 scaffold protein. *Trends Biochem. Sci.* 32, 95-100, doi:10.1016/j.tibs.2006.12.002 (2007).
 - 14 Komatsu, M. *et al.* Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice. *Cell* 131, 1149-1163, doi:10.1016/j.cell.2007.10.035 (2007).
 - 15 Harada, H. *et al.* Deficiency of p62/Sequestosome 1 causes hyperphagia due to leptin resistance in the brain. *J. Neurosci.* 33, 14767-14777, doi:10.1523/jneurosci.2954-12.2013 (2013).

- 16 Rodriguez, A. *et al.* Mature-onset obesity and insulin resistance in mice deficient in the signaling adapter p62. *Cell Metab.* 3, 211-222, doi:10.1016/j.cmet.2006.01.011 (2006).
- 17 Itoh, K. *et al.* An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 236, 313-322 (1997).
- 18 Motohashi, H., O'Connor, T., Katsuoka, F., Engel, J. D. & Yamamoto, M. Integration and diversity of the regulatory network composed of Maf and CNC families of transcription factors. *Gene* 294, 1-12 (2002).
- 19 Kobayashi, M. & Yamamoto, M. Nrf2-Keap1 regulation of cellular defense mechanisms against electrophiles and reactive oxygen species. *Adv. Enzyme Regul.* 46, 113-140, doi:10.1016/j.advenzreg.2006.01.007 (2006).
- 20 Ishii, T. *et al.* Transcription factor Nrf2 coordinately regulates a group of oxidative stress-inducible genes in macrophages. *J. Biol. Chem.* 275, 16023-16029 (2000).
- 21 Komatsu, M. *et al.* The selective autophagy substrate p62 activates the stress responsive transcription factor Nrf2 through inactivation of Keap1. *Nat. Cell Biol.* 12, 213-223, doi:10.1038/ncb2021 (2010).
- 22 Kobayashi, E. H. *et al.* Nrf2 suppresses macrophage inflammatory response by blocking proinflammatory cytokine transcription. *Nat Commun* 7, 11624, doi:10.1038/ncomms11624 (2016).
- 23 Enomoto, A. *et al.* High sensitivity of Nrf2 knockout mice to acetaminophen hepatotoxicity associated with decreased expression of ARE-regulated drug metabolizing enzymes and antioxidant genes. *Toxicol. Sci.* 59, 169-177 (2001).
- 24 Sugimoto, H. *et al.* Deletion of nuclear factor-E2-related factor-2 leads to rapid

- onset and progression of nutritional steatohepatitis in mice. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 298, G283-294, doi:10.1152/ajpgi.00296.2009 (2010).
- 25 Okada, K. *et al.* Nrf2 inhibits hepatic iron accumulation and counteracts oxidative stress-induced liver injury in nutritional steatohepatitis. *J. Gastroenterol.* 47, 924-935, doi:10.1007/s00535-012-0552-9 (2012).
- 26 Poss, K. D. & Tonegawa, S. Reduced stress defense in heme oxygenase 1-deficient cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 10925-10930 (1997).
- 27 Berg, D. J. *et al.* Enterocolitis and colon cancer in interleukin-10-deficient mice are associated with aberrant cytokine production and CD4(+) TH1-like responses. *J. Clin. Invest.* 98, 1010-1020, doi:10.1172/jci118861 (1996).
- 28 Bedossa, P. Pathology of non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int* 37 Suppl 1, 85-89, doi:10.1111/liv.13301 (2017).
- 29 Ling, X., Linglong, P., Weixia, D. & Hong, W. Protective Effects of Bifidobacterium on Intestinal Barrier Function in LPS-Induced Enterocyte Barrier Injury of Caco-2 Monolayers and in a Rat NEC Model. *PLoS One* 11, e0161635, doi:10.1371/journal.pone.0161635 (2016).
- 30 Okada, K. *et al.* Deletion of Nrf2 leads to rapid progression of steatohepatitis in mice fed atherogenic plus high-fat diet. *J. Gastroenterol.* 48, 620-632, doi:10.1007/s00535-012-0659-z (2013).
- 31 Cong, L. *et al.* Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* 339, 819-823, doi:10.1126/science.1231143 (2013).
- 32 Imajo, K. *et al.* Hyperresponsivity to low-dose endotoxin during progression to nonalcoholic steatohepatitis is regulated by leptin-mediated signaling. *Cell Metab.* 16, 44-54, doi:10.1016/j.cmet.2012.05.012 (2012).

- 33 Ikejima, K. *et al.* Leptin receptor-mediated signaling regulates hepatic fibrogenesis and remodeling of extracellular matrix in the rat. *Gastroenterology* 122, 1399-1410 (2002).
- 34 Ley, R. E., Turnbaugh, P. J., Klein, S. & Gordon, J. I. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature* 444, 1022-1023, doi:10.1038/4441022a (2006).
- 35 Chitturi, S. & Farrell, G. C. Etiopathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Semin. Liver Dis.* 21, 27-41 (2001).
- 36 Zhao, L. F., Jia, J. M. & Han, D. W. [The role of enterogenous endotoxemia in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis]. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 12, 632 (2004).
- 37 Miele, L. *et al.* Increased intestinal permeability and tight junction alterations in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 49, 1877-1887, doi:10.1002/hep.22848 (2009).
- 38 Wigg, A. J. *et al.* The role of small intestinal bacterial overgrowth, intestinal permeability, endotoxaemia, and tumour necrosis factor alpha in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *Gut* 48, 206-211 (2001).
- 39 Scarpellini, E. *et al.* Intestinal permeability in non-alcoholic fatty liver disease: the gut-liver axis. *Rev. Recent Clin. Trials* 9, 141-147 (2014).
- 40 Kamada, Y. *et al.* Enhanced carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in mice lacking adiponectin. *Gastroenterology* 125, 1796-1807 (2003).
- 41 Maher, J. J., Leon, P. & Ryan, J. C. Beyond insulin resistance: Innate immunity in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 48, 670-678, doi:10.1002/hep.22399 (2008).

- 42 Backhed, F. *et al.* The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 15718-15723, doi:10.1073/pnas.0407076101 (2004).
- 43 Cani, P. D. *et al.* Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes* 57, 1470-1481, doi:10.2337/db07-1403 (2008).
- 44 Clemente, J. C., Ursell, L. K., Parfrey, L. W. & Knight, R. The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view. *Cell* 148, 1258-1270, doi:10.1016/j.cell.2012.01.035 (2012).
- 45 Wong, V. W. *et al.* Molecular characterization of the fecal microbiota in patients with nonalcoholic steatohepatitis--a longitudinal study. *PLoS One* 8, e62885, doi:10.1371/journal.pone.0062885 (2013).
- 46 Zhu, L. *et al.* Characterization of gut microbiomes in nonalcoholic steatohepatitis (NASH) patients: a connection between endogenous alcohol and NASH. *Hepatology* 57, 601-609, doi:10.1002/hep.26093 (2013).
- 47 Harte, A. L. *et al.* Elevated endotoxin levels in non-alcoholic fatty liver disease. *J Inflamm (Lond)* 7, 15, doi:10.1186/1476-9255-7-15 (2010).
- 48 Kudo, H. *et al.* Lipopolysaccharide triggered TNF-alpha-induced hepatocyte apoptosis in a murine non-alcoholic steatohepatitis model. *J. Hepatol.* 51, 168-175, doi:10.1016/j.jhep.2009.02.032 (2009).
- 49 Douhara, A. *et al.* Reduction of endotoxin attenuates liver fibrosis through suppression of hepatic stellate cell activation and remission of intestinal permeability in a rat non-alcoholic steatohepatitis model. *Mol Med Rep*, doi:10.3892/mmr.2014.2995 (2014).

- 50 Han, X., Fink, M. P., Yang, R. & Delude, R. L. Increased iNOS activity is essential for intestinal epithelial tight junction dysfunction in endotoxemic mice. *Shock* 21, 261-270, doi:10.1097/01.shk.0000112346.38599.10 (2004).
- 51 Lin, W. *et al.* Sulforaphane suppressed LPS-induced inflammation in mouse peritoneal macrophages through Nrf2 dependent pathway. *Biochem. Pharmacol.* 76, 967-973, doi:10.1016/j.bcp.2008.07.036 (2008).
- 52 Racanelli, V. & Rehermann, B. The liver as an immunological organ. *Hepatology* 43, S54-62, doi:10.1002/hep.21060 (2006).
- 53 Gao, B., Jeong, W. I. & Tian, Z. Liver: An organ with predominant innate immunity. *Hepatology* 47, 729-736, doi:10.1002/hep.22034 (2008).
- 54 Tonan, T. *et al.* CD14 expression and Kupffer cell dysfunction in non-alcoholic steatohepatitis: superparamagnetic iron oxide-magnetic resonance image and pathologic correlation. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 27, 789-796, doi:10.1111/j.1440-1746.2011.07057.x (2012).
- 55 Shida, T. *et al.* Skeletal muscle mass to visceral fat area ratio is an important determinant affecting hepatic conditions of non-alcoholic fatty liver disease. *J. Gastroenterol.*, doi:10.1007/s00535-017-1377-3 (2017).
- 56 Mukhopadhyay, S. *et al.* SR-A/MARCO-mediated ligand delivery enhances intracellular TLR and NLR function, but ligand scavenging from cell surface limits TLR4 response to pathogens. *Blood* 117, 1319-1328, doi:10.1182/blood-2010-03-276733 (2011).
- 57 Yoshimatsu, M. *et al.* Induction of macrophage scavenger receptor MARCO in nonalcoholic steatohepatitis indicates possible involvement of endotoxin in its pathogenic process. *Int. J. Exp. Pathol.* 85, 335-343, doi:10.1111/j.0959-

- 9673.2004.00401.x (2004).
- 58 Zhang, B. H., Weltman, M. & Farrell, G. C. Does steatohepatitis impair liver regeneration? A study in a dietary model of non-alcoholic steatohepatitis in rats. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 14, 133-137 (1999).
- 59 Ishioka, M., Miura, K., Minami, S., Shimura, Y. & Ohnishi, H. Altered Gut Microbiota Composition and Immune Response in Experimental Steatohepatitis Mouse Models. *Dig. Dis. Sci.* 62, 396-406, doi:10.1007/s10620-016-4393-x (2017).
- 60 Moreira, A. P., Texeira, T. F., Ferreira, A. B., Peluzio Mdo, C. & Alfnas Rde, C. Influence of a high-fat diet on gut microbiota, intestinal permeability and metabolic endotoxaemia. *Br. J. Nutr.* 108, 801-809, doi:10.1017/s0007114512001213 (2012).
- 61 Stenman, L. K., Holma, R., Gylling, H. & Korpela, R. Genetically obese mice do not show increased gut permeability or faecal bile acid hydrophobicity. *Br. J. Nutr.* 110, 1157-1164, doi:10.1017/s000711451300024x (2013).
- 62 Tsujimoto, T. *et al.* Decreased phagocytic activity of Kupffer cells in a rat nonalcoholic steatohepatitis model. *World J. Gastroenterol.* 14, 6036-6043 (2008).
- 63 Asanuma, T. *et al.* Super paramagnetic iron oxide MRI shows defective Kupffer cell uptake function in non-alcoholic fatty liver disease. *Gut* 59, 258-266, doi:10.1136/gut.2009.176651 (2010).
- 64 Cheong, H. *et al.* Phagocytic function of Kupffer cells in mouse nonalcoholic fatty liver disease models: Evaluation with superparamagnetic iron oxide. *J. Magn. Reson. Imaging* 41, 1218-1227, doi:10.1002/jmri.24674 (2015).
- 65 Stumptner, C., Fuchsbichler, A., Zatloukal, K. & Denk, H. In vitro production of

- Mallory bodies and intracellular hyaline bodies: the central role of sequestosome 1/p62. *Hepatology* 46, 851-860, doi:10.1002/hep.21744 (2007).
- 66 Gonzalez-Rodriguez, A. *et al.* Impaired autophagic flux is associated with increased endoplasmic reticulum stress during the development of NAFLD. *Cell Death Dis.* 5, e1179, doi:10.1038/cddis.2014.162 (2014).
- 67 Duran, A. *et al.* p62/SQSTM1 by Binding to Vitamin D Receptor Inhibits Hepatic Stellate Cell Activity, Fibrosis, and Liver Cancer. *Cancer Cell* 30, 595-609, doi:10.1016/j.ccell.2016.09.004 (2016).
- 68 Hardwick, R. N., Fisher, C. D., Canet, M. J., Lake, A. D. & Cherrington, N. J. Diversity in antioxidant response enzymes in progressive stages of human nonalcoholic fatty liver disease. *Drug Metab. Dispos.* 38, 2293-2301, doi:10.1124/dmd.110.035006 (2010).
- 69 Kakehashi, A. *et al.* Proteome Characteristics of Non-Alcoholic Steatohepatitis Liver Tissue and Associated Hepatocellular Carcinomas. *Int. J. Mol. Sci.* 18, doi:10.3390/ijms18020434 (2017).