

with 4% formaldehyde for 10 min and then stained with Oil Red O for 1 h followed by washing with 60% methanol and PBS. Cells were photographed by using a phase-contrast microscope equipped with a digital sight camera system (DS-5M-L1, Nikon, Japan).

Statistical analysis. Morphometrical and densitometric analyses were performed with Scion Image (version Beta 4.0.2, Scion, Fredrick, MD). Data were expressed as means \pm SE. Statistical differences between means were determined by Student's *t*-test, one-way analysis of variance (ANOVA), or Kruskal-Wallis ANOVA on ranks followed by an all-pairwise multiple-comparison procedure (Student-Newman-Keuls method) as appropriate. *P* < 0.05 was selected before the study to reflect significance.

RESULTS

Acetaminophen causes severe liver injury in KK-A^y mice. At first, we evaluated the sensitivity to acetaminophen-induced hepatotoxicity in KK-A^y mice by injecting two different doses (300 or 600 mg/kg) of this drug intraperitoneally. Mild liver steatosis was observed in 12-wk-old KK-A^y mice without administration of acetaminophen as expected (Fig. 1B). A single injection of the lower dose of acetaminophen (300 mg/kg), which did not affect liver histology in C57Bl/6 mice (Fig. 1C), caused mild necrotic liver injury with infiltration of inflammatory cells predominantly in pericentral area at 6 h

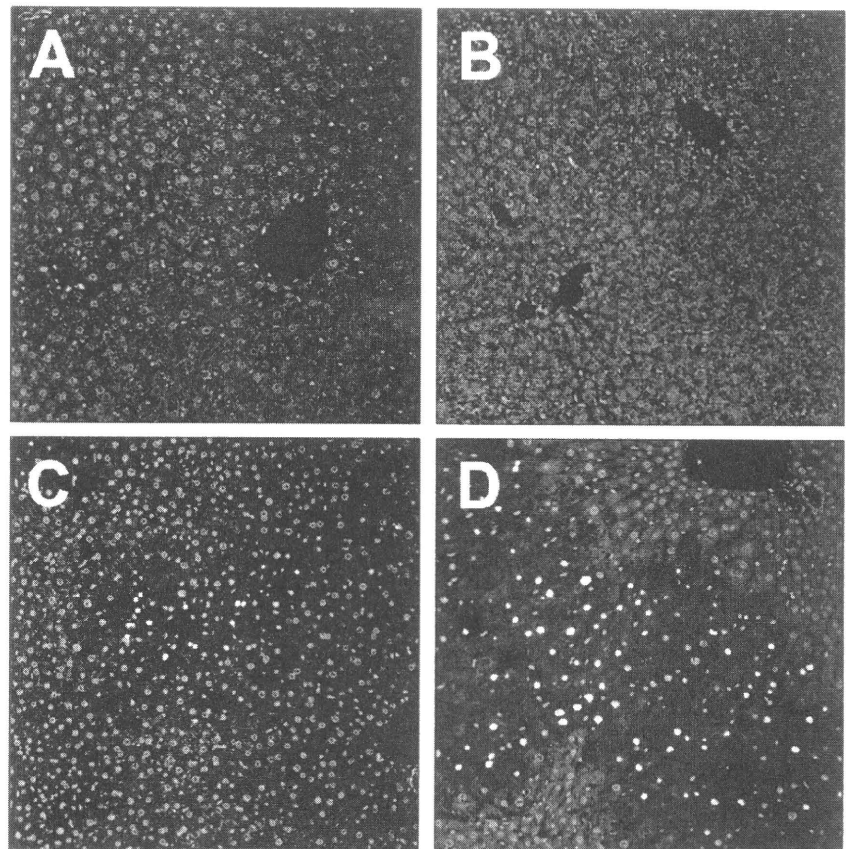


Fig. 3. Effect of acetaminophen on apoptotic cells death in the liver in KK-A^y mice. Apoptotic cells in the liver 6 h after a single injection of 600 mg/kg acetaminophen were detected by terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL) staining. Representative photomicrographs of the liver from C57Bl/6 mice saline controls (A), KK-A^y mice saline controls (B), C57Bl/6 mice treated with acetaminophen (C), and KK-A^y mice treated with acetaminophen (D) are shown (original magnification \times 100). Number of TUNEL-positive hepatocytes was counted, and average percentages of TUNEL-positive cells from 5 different animals are plotted. More than 500 cells per 1 animal were counted (E). **P* < 0.05 vs. C57Bl/6+acetaminophen by ANOVA on ranks and Student-Newman-Keuls post hoc test.

(Fig. 1D). A higher dose of acetaminophen (600 mg/kg), which induced mild liver injury even in C57Bl/6 mice (Fig. 1E), caused extremely severe necrosis in the liver in KK-A^y mice (Fig. 1F).

Serum ALT levels were not changed in C57Bl/6 mice 6 h after treatment with 300 mg/kg acetaminophen (24 ± 1 IU/l) and increased significantly to 47 ± 4 IU/l in KK-A^y mice (Fig. 2A, left, $P < 0.05$). A higher dose of acetaminophen (600 mg/kg) elevated serum ALT levels to $3,281 \pm 513$ IU/l in C57Bl/6 mice, whereas the levels were increased significantly to $8,707 \pm 1,400$ IU/l in KK-A^y mice (Fig. 2B, left, $P < 0.05$) as expected. Furthermore, the ratio of acetaminophen-induced increases in ALT levels vs. control values in each strain was

plotted (Fig. 2, A and B, right). Elevations in serum ALT levels were potentiated significantly in KK-A^y mice by both lower and higher doses of acetaminophen, indicating that KK-A^y mice are more susceptible to acetaminophen-induced liver injury.

To determine whether apoptotic cell death is involved in hepatocyte injury caused by acetaminophen, TUNEL staining was performed (Fig. 3). A few TUNEL-positive cells were observed in the liver in C57Bl/6 mice 6 h after treatment with 600 mg/kg acetaminophen (Fig. 3C), where the percentage of TUNEL-positive hepatocytes were $5.7 \pm 0.7\%$ (Fig. 3E). In KK-A^y mice after acetaminophen, the percentage of TUNEL-positive cells and necrotic cell death increased in the area

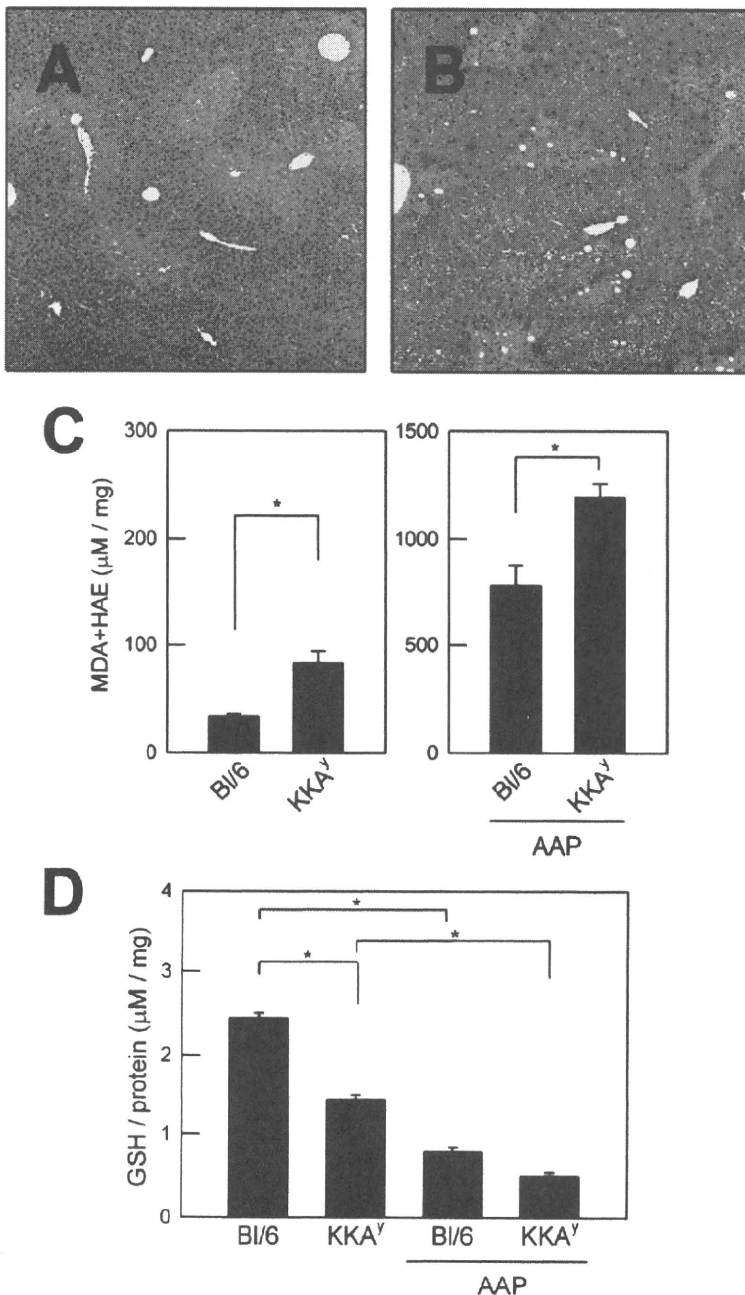


Fig. 4. Effect of acetaminophen on lipid peroxidation and glutathione content in the liver in KK-A^y mice. Hepatic expression of 4-HNE was detected by immunohistochemistry. Representative photomicrographs from C57Bl/6 mice (A) and KK-A^y mice (B) treated with 6 h after a single injection of 600 mg/kg acetaminophen are shown. Malondialdehyde (MDA)/4-hydroxyalkenals (4-HAE) levels in liver homogenates were measured colorimetrically (C); $n = 5$, $*P < 0.05$ by ANOVA on ranks and Student-Newman-Keuls post hoc test. Glutathione (GSH) levels in liver homogenates were measured colorimetrically (D); $n = 5$, $*P < 0.05$ by ANOVA on ranks and Student-Newman-Keuls post hoc test. Values are normalized by total protein concentrations in the homogenates.

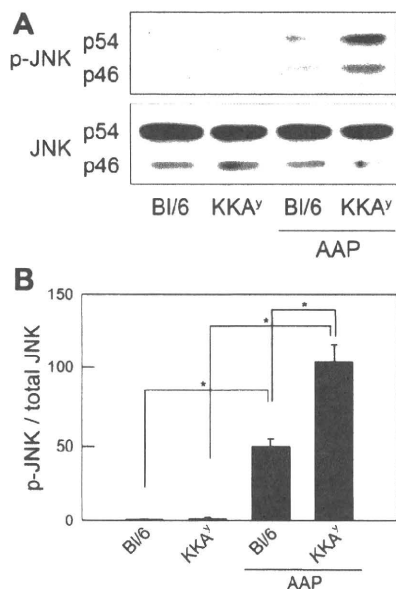


Fig. 5. Effect of acetaminophen on activation of JNK in the liver in KK-A^y mice. Expression of JNK and phospho-JNK (p-JNK) in hepatic tissue 6 h after injection of 600 mg/kg acetaminophen was detected by Western blotting. Representative photographs of 46 kDa and 54 kDa bands for p-JNK and JNK are shown (A). The ratio of densitometrical values of specific bands for p-JNK to JNK are plotted (B); $n = 5$, $*P < 0.05$ vs. C57BI/6+acetaminophen by ANOVA on ranks and Student-Newman-Keuls post hoc test.

around central vein (Fig. 3D) and the percentage of TUNEL-positive cells was increased significantly to $16.9 \pm 2.4\%$ ($P < 0.05$).

Oxidative stress following acetaminophen treatment is potentiated in KK-A^y mice. Next, we evaluated lipid peroxidation in liver tissue of both strains after treatment with acetaminophen. Immunohistological staining revealed that 600 mg/kg acetaminophen induced a much higher amount of 4-HNE in liver tissue of KK-A^y mice compared with C57BI/6 mice (Fig. 4B). The localization of 4-HNE expression denoted the same tendency of localization as the area of necrotic and apoptotic cell death. To further evaluate oxidative stress in the liver quantitatively, the amount of MDA plus HAE was measured colorimetrically. Interestingly, the amount of MDA plus HAE in the liver from KK-A^y mice was significantly higher than C57BI/6 mice consistent with higher basal levels prior to acetaminophen treatment in KK-A^y mice. Although hepatic expression of MDA plus HAE was increased in both strains after treatment with acetaminophen, it was further enhanced in KK-A^y mice as expected (Fig. 4C). These findings indicated that the levels of lipid peroxide following acetaminophen treatment were higher in KK-A^y mice than in C57BI/6 mice.

Interestingly, the hepatic content of reduced GSH, one of the most important physiological radical scavenger, before and 6 h after administration of acetaminophen was measured. Reduced GSH was decreased significantly in the liver of KK-A^y mice compared with C57BI/6 mice in basal levels before administration of acetaminophen ($P < 0.05$). Reduced GSH in the liver was dramatically decreased after treatment with acetaminophen in both strains (Fig. 4D).

Acetaminophen-induced activation of JNK is enhanced in KK-A^y mice. Since previous studies indicated that activation of JNK is involved in acetaminophen-induced liver injury (10, 39), we measured phosphorylation of JNK in liver tissue after treatment with acetaminophen by Western blotting. Although acetaminophen treatment increased significantly expression of hepatic phospho-JNK, expression was enhanced more than twice in KK-A^y mice compared with C57BI/6 mice (Fig. 5).

Hepatocytes from KK-A^y mice are more susceptible to oxidative stress-mediated cell death. To evaluate the direct effect of acetaminophen on hepatocytes, hepatocytes were isolated from liver of both strains, cultured, and exposed to 10 mM acetaminophen. The viability of isolated hepatocytes was not different between both strains and was more than 87%. In hepatocytes isolated from C57BI/6 mice, basal levels of dichlorofluorescein diacetate (DCF) fluorescence after 5 h were $624 \pm 19\%$ over the initial levels, whereas DCF fluorescence was increased to $1,017 \pm 104\%$ in the presence of 10 mM acetaminophen after 5 h as expected. In contrast, cells from KK-A^y mice, which contained obvious lipid droplets in cytoplasm (Fig. 6A), demonstrated higher basal increment ($1,135 \pm 21\%$) as well as enhanced elevation in DCF fluorescence to

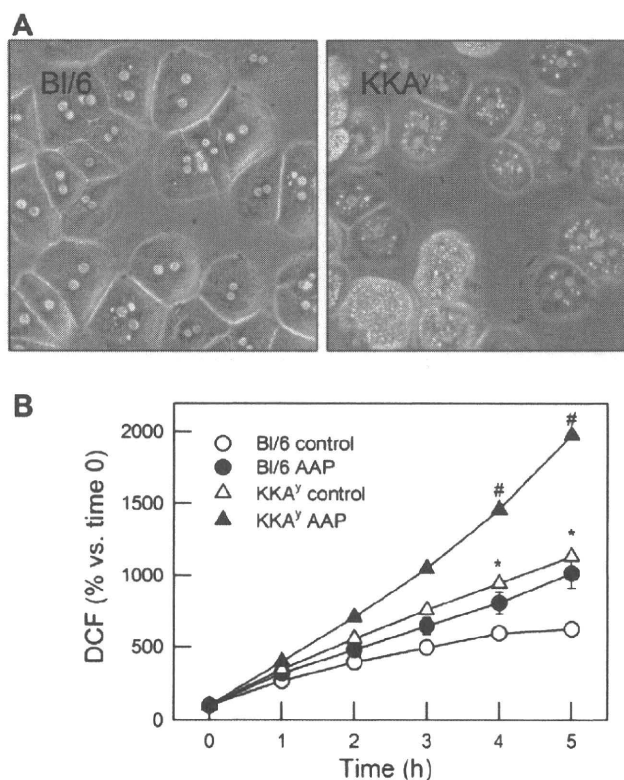


Fig. 6. Effect of acetaminophen on oxidative stress in primary-cultured hepatocytes from KK-A^y mice. Viability of hepatocytes isolated from both strains was confirmed by Trypan blue staining (A) (original magnification $\times 100$). Overnight-cultured hepatocytes were incubated in Krebs-Ringer-HEPES buffer supplemented with $10 \mu\text{M}$ CMH₂DCFDA for 30 min, and then exposed to 10 mM acetaminophen. Oxidative stress was evaluated by the increment of dichlorofluorescein diacetate (DCF) fluorescence. Values represent the average of total cell fluorescence expressed as the percentage of basal fluorescence before addition of acetaminophen (B); $n = 4$, $*P < 0.05$ vs. C57BI/6 control, $\#P < 0.05$ vs. C57BI/6+acetaminophen by ANOVA on ranks and Student-Newman-Keuls post hoc test.

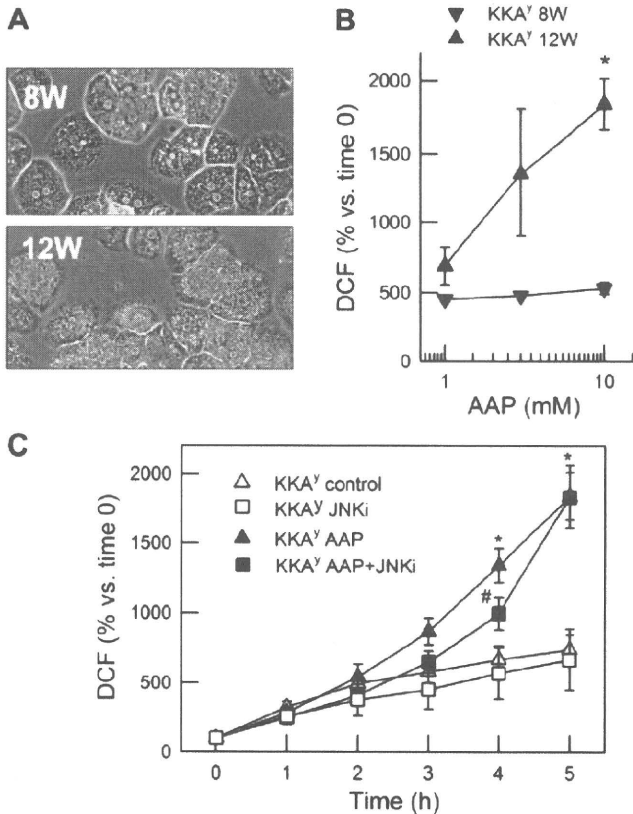


Fig. 7. Dose dependency of acetaminophen and effect of JNK inhibitor on acetaminophen-induced oxidative stress in primary-cultured hepatocytes from KK-A^y mice. To determine the effect of fatty accumulation on acetaminophen toxicity, hepatocytes were isolated from KK-A^y mice 8 and 12 wk old (8W and 12W, respectively). Fatty accumulation was visualized by Oil Red O staining (A) (original magnification $\times 100$). Dose-response curve of acetaminophen on oxidative stress after 5 h of acetaminophen in isolated hepatocytes from C57Bl/6 mice 12 wk old and KK-A^y mice 8 or 12 wk old (C); $n = 4$, $*P < 0.05$ vs. C57Bl/6+acetaminophen by ANOVA on ranks and Student-Newman-Keuls post hoc test. Some cells were treated with 20 μM JNK inhibitor (JNK inhibitor II, Calbiochem, San Diego, CA) for 30 min before acetaminophen. The oxidative stress after 5 h of acetaminophen in isolated hepatocytes from KK-A^y mice 12 wk old was measured by increment of DCF fluorescence (D); $n = 4$, $*P < 0.05$ vs. KK-A^y control by ANOVA on ranks and Student-Newman-Keuls post hoc test.

$1,974 \pm 19\%$ 5 h after addition of acetaminophen (Fig. 6B). Acetaminophen induced oxidative stress in hepatocytes from KK-A^y mice in dose-dependent manner whereas acetaminophen did not increase oxidative stress to hepatocytes isolated from KK-A^y mice as young as 8 wk old (Fig. 7B). The treatment with a JNK inhibitor transiently prevented acetaminophen-induced oxidative stress in hepatocytes from KK-A^y mice in earlier time points up to 4 h but finally lost inhibitory effects at 5 h (Fig. 7C).

Exposure to 20 μM *tert*-butyl hydroperoxide (*t*-BuOOH), which induces NAD(P)H oxidation and mitochondrial reactive oxygen species (ROS) generation (4), led to cell death in 52% of primary cultured hepatocytes from KK-A^y mice, whereas it did not cause any cell death in cells from C57Bl/6 mice (Fig. 8A). Exposure to *t*-BuOOH (20 μM) for 30 min induced a 1.4 times higher oxidative stress response in hepatocytes from KK-A^y mice compared with cells from C57Bl/6 mice (Fig. 8B). These

findings indicated that hepatocytes from KK-A^y mice are more susceptible to *t*-BuOOH-induced oxidative stress and subsequent necrotic cell death than cells from C57Bl/6 mice.

DISCUSSION

KK-A^y mice spontaneously develop steatohepatitis due to insulin resistance, which resembles the pathophysiological features of human NASH (32). Our data in the present study demonstrated that KK-A^y mice are more susceptible to acetaminophen-induced liver injury involving both necrosis and apoptosis of hepatocytes (Figs. 1–3) compared with C57Bl/6 mice. These findings clearly indicated that steatohepatitis associated with insulin resistance increases the susceptibility to acetaminophen hepatotoxicity.

In acetaminophen-induced liver injury, the sequence of events leading to injury in hepatocytes is based on metabolism of acetaminophen, which precedes an inflammatory response involving the activation of the innate immune system and subsequent regenerative response of the liver (3, 10, 23). Oxidative stress caused by the reactive metabolite NAPQI is a key element in the early phase of acetaminophen-induced liver injury (16, 17). In the present study, after treatment with acetaminophen lipid peroxides content in the liver was higher in KK-A^y mice than in C57Bl/6 mice (Fig. 4, A–C), indicating that increased oxidative stress caused severe necrosis in the liver of KK-A^y mice. Recently,

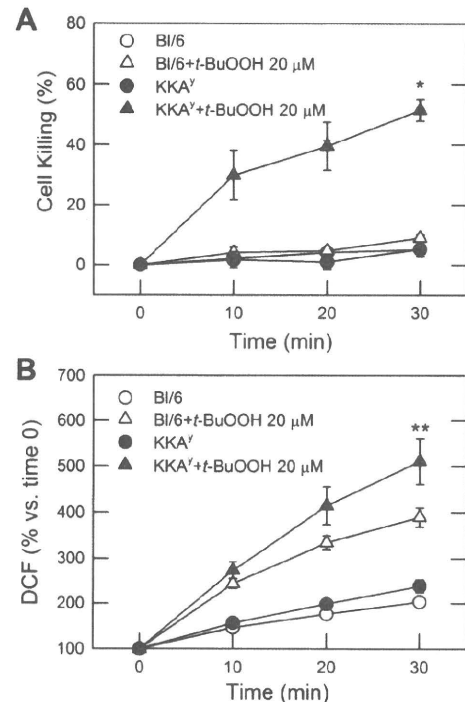


Fig. 8. Effect of *tert*-butyl hydroperoxide (*t*-BuOOH) on necrotic cell death and oxidative stress in primary-cultured hepatocytes from KK-A^y mice. Overnight-cultured hepatocytes isolated from both strains were incubated in KRH-buffer supplemented with 30 μM propidium iodide for 30 min and exposed to 20 μM *t*-BuOOH. Necrotic cell death was detected by the increment of PI fluorescence (A); $n = 4$, $*P < 0.05$ vs. C57Bl/6+*t*-BuOOH by ANOVA on ranks and Student-Newman-Keuls post hoc test. Hepatocytes were exposed to 20 μM *t*-BuOOH, and oxidative stress was evaluated by the increment of DCF fluorescence (B); $n = 4$, $**P = 0.01$ vs. C57Bl/6+*t*-BuOOH by 1-way ANOVA and Student-Newman-Keuls post hoc test.

increasing attention has been suggested for the role of phosphorylation of JNK in the pathogenesis of acetaminophen-induced liver injury (10). JNK in hepatocytes is thought to be activated by oxidative stress and stimulates the cell death pathway (5, 12). It has been reported that a JNK inhibitor blocks acetaminophen-induced Bax translocation from cytosol to mitochondria and prevents death of mouse hepatocytes (10). In the present study, phosphorylation of JNK in the liver was more enhanced in KK-A^y mice than in C57Bl/6 mice (Fig. 5). Next, we examined the direct effect of acetaminophen on isolated hepatocytes from both strains. As expected, acetaminophen induced greater oxidative stress in primary-cultured hepatocytes from KK-A^y mice, which shows a close similarity to results *in vivo* (Fig. 6B). Collectively, the results demonstrated that enhanced oxidative stress followed by phosphorylation of JNK in hepatocytes causes exacerbation of acetaminophen-induced liver injury in KK-A^y mice. Acetaminophen did not induce oxidative stress in hepatocytes with few lipid droplets from younger (8 wk old) KK-A^y mice (Fig. 7, A and B). This finding suggests that fatty accumulation in hepatocytes contributes to the increment of oxidative stress in hepatocytes in KK-A^y mice. Furthermore, a JNK inhibitor transiently prevented acetaminophen-induced oxidative stress in hepatocytes from KK-A^y mice (Fig. 7C), supporting the hypothesis that JNK plays a role in acetaminophen-induced oxidative stress in the early, regulated phase, whereas the latter phase of enhanced oxidative stress is independent of JNK.

Interestingly, basal expression levels of hepatic MDA plus HAE were higher in KK-A^y mice compared with C57Bl/6 prior to acetaminophen exposure (Fig. 4C). Furthermore, isolated hepatocytes from KK-A^y mice showed a greater increase in DCF fluorescence intensity during incubation without acetaminophen compared with cells from C57Bl/6 mice (Fig. 6B), which reflects increased ROS generation in hepatocytes (37). Taken together, these data indicate that constitutive ROS generation in the untreated state is potentiated in steatotic hepatocytes in KK-A^y mice. Importantly, KK-A^y mice showed a significantly lower content of reduced GSH in the liver. This lower level in the untreated state sets the stage for susceptibility for injury since it is well known that GSH is one of the most potent natural ROS scavengers (21) (Fig. 4D). Thus the mechanisms underlying basal increases in hepatic ROS in KK-A^y mice most likely involve both enhanced production of ROS and impairment of ROS scavenger system. These findings are consistent with recent studies showing that ROS generation is increased in the liver of NASH patients (34, 36). It has also been reported that the livers of NASH patients contain less GSH compared with healthy persons (24) or have an alteration in GSH metabolism (2). These findings indicate that increased generation of ROS on a routine basis and decreased GSH content contribute to the enhanced oxidative stress in the liver of KK-A^y mice.

Although acetaminophen is oxidized by CYP2E1 in particular and is changed to a reactive metabolite, we previously confirmed that the basal expression levels of CYP2E1 mRNA are not different between C57Bl/6 and KK-A^y mice (32). Therefore, we hypothesized that hepatocytes of KK-A^y mice are more sensitive to oxidative stimuli. To test this hypothesis, we evaluated the effect of *t*-BuOOH, an oxidant chemical, on hepatocytes isolated from KK-A^y mice. In general, *t*-BuOOH

at concentrations over 100 μ M induce NAD(P)H oxidation, increase mitochondrial Ca²⁺ uptake, and elicit mitochondrial ROS production (4, 30), which subsequently cause the mitochondrial permeability transition, thus leading to cell death in isolated rat hepatocytes (14). In the present study, we used concentrations as low as 20 μ M *t*-BuOOH to induce minimal generation of mitochondrial ROS in hepatocytes isolated from C57Bl/6 mice. In contrast, the same amount of *t*-BuOOH induced severe oxidative stress and necrotic cell death in hepatocytes from KK-A^y mice (Fig. 8). These findings indicate that hepatocytes from KK-A^y mice produce more oxidative stress by ROS-inducing stimulation (i.e., *t*-BuOOH) compared with those from C57Bl/6 mice. Recently, increasing lines of evidence have indicated that oxidative stress is involved in progression from simple steatosis to NASH (8, 9, 27). Therefore, it is hypothesized that enhanced sensitivity to ROS-inducing chemicals such as acetaminophen in steatotic hepatocytes participates in the pathophysiology of NASH as one of the second hits (7).

In conclusion, acetaminophen causes enhanced oxidative stress and phosphorylation of JNK, thereby inducing more severe liver injury in diabetic KK-A^y mice. Steatotic hepatocytes in these mice appear to be more susceptible to ROS-generating stimuli including acetaminophen and *t*-BuOOH, in part through significant decreases in reduced GSH. Our experimental data suggest that metabolic syndrome-related hepatic steatosis is a potential risk factor for acetaminophen-induced liver injury.

ACKNOWLEDGMENT

The authors thank Professor Ko Okumura MD, PhD, and colleagues (Department of Immunology, Juntendo University School of Medicine) for collaboration on *in vitro* analyses.

GRANTS

This work was supported in part by Grant-in-Aid (Nos. 18790474 and 20790508 to K. Kon; 16590633, 19590791, and 21590859 to K. Ikejima; and 18390213 and 21390234 to S. Watanabe); and High Technology Research Center Grant from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan, Health and Labour Science Research Grant from the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan (to S. Watanabe); and grants from Liver Forum in Kyoto (cosponsored by Viral Hepatitis Research Foundation in Japan and Dainippon Sumitomo Pharma, to K. Ikejima), Takeda Science Foundation (to K. Ikejima), and Research Conference on Alcohol and Health (sponsored by Suntory, to K. Ikejima).

DISCLOSURES

No conflicts of interest, financial or otherwise, are declared by the author(s).

REFERENCES

1. Aoyama T, Ikejima K, Kon K, Okumura K, Arai K, Watanabe S. Pioglitazone promotes survival and prevents hepatic regeneration failure after partial hepatectomy in obese and diabetic KK-A^y mice. *Hepatology* 49: 1636–1644, 2009.
2. Baskol G, Baskol M, Kocer D. Oxidative stress and antioxidant defenses in serum of patients with non-alcoholic steatohepatitis. *Clin Biochem* 40: 776–780, 2007.
3. Bourdi M, Masubuchi Y, Reilly TP, Amouzadeh HR, Martin JL, George JW, Shah AG, Pohl LR. Protection against acetaminophen-induced liver injury and lethality by interleukin 10: role of inducible nitric oxide synthase. *Hepatology* 35: 289–298, 2002.
4. Byrne AM, Lemasters JJ, Nieminen AL. Contribution of increased mitochondrial free Ca²⁺ to the mitochondrial permeability transition induced by tert-butylhydroperoxide in rat hepatocytes. *Hepatology* 29: 1523–1531, 1999.

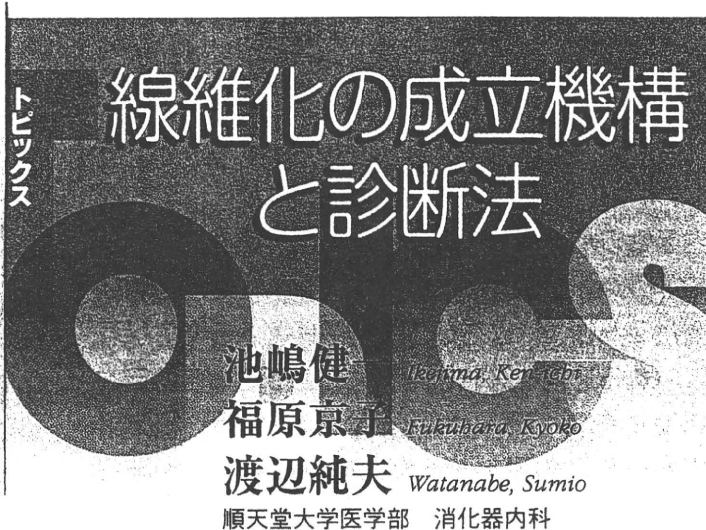
5. Czaja MJ, Liu H, Wang Y. Oxidant-induced hepatocyte injury from menadione is regulated by ERK and AP-1 signaling. *Hepatology* 37: 1405–1413, 2003.
6. Dahlin DC, Miwa GT, Lu AY, Nelson SD. N-acetyl-p-benzoquinone imine: a cytochrome P-450-mediated oxidation product of acetaminophen. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 1327–1331, 1984.
7. Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two “hits”? *Gastroenterology* 114: 842–845, 1998.
8. Diehl AM. Lessons from animal models of NASH. *Hepatol Res* 33: 138–144, 2005.
9. Farrell GC, Larter CZ. Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to cirrhosis. *Hepatology* 43: S99–S112, 2006.
10. Gunawan BK, Liu ZX, Han D, Hanawa N, Gaarde WA, Kaplowitz N. c-Jun N-terminal kinase plays a major role in murine acetaminophen hepatotoxicity. *Gastroenterology* 131: 165–178, 2006.
11. Halaas JL, Boozer C, Blair-West J, Fidahusein N, Denton DA, Friedman JM. Physiological response to long-term peripheral and central leptin infusion in lean and obese mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 8878–8883, 1997.
12. Hanawa N, Shinohara M, Saberi B, Gaarde WA, Han D, Kaplowitz N. Role of JNK translocation to mitochondria leading to inhibition of mitochondria bioenergetics in acetaminophen-induced liver injury. *J Biol Chem* 283: 13565–13577, 2008.
13. Ikeda H. KK mouse. *Diabetes Res Clin Pract* 24 Suppl: S313–S316, 1994.
14. Imberti R, Nieminen AL, Herman B, Lemasters JJ. Mitochondrial and glycolytic dysfunction in lethal injury to hepatocytes by t-butylhydroperoxide: protection by fructose, cyclosporin A and trifluoperazine. *J Pharmacol Exp Ther* 265: 392–400, 1993.
15. Iwatsuka H, Shino A, Suzuoki Z. General survey of diabetic features of yellow KK mice. *Endocrinol Jpn* 17: 23–35, 1970.
16. Jaeschke H, Bajt ML. Intracellular signaling mechanisms of acetaminophen-induced liver cell death. *Toxicol Sci* 89: 31–41, 2006.
17. James LP, Mayeux PR, Hinson JA. Acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Drug Metab Dispos* 31: 1499–1506, 2003.
18. Kamada Y, Takehara T, Hayashi N. Adipocytokines and liver disease. *J Gastroenterol* 43: 811–822, 2008.
19. Kim JS, Ohshima S, Pedititakis P, Lemasters JJ. Nitric oxide protects rat hepatocytes against reperfusion injury mediated by the mitochondrial permeability transition. *Hepatology* 39: 1533–1543, 2004.
20. Knight TR, Ho YS, Farhood A, Jaeschke H. Peroxynitrite is a critical mediator of acetaminophen hepatotoxicity in murine livers: protection by glutathione. *J Pharmacol Exp Ther* 303: 468–475, 2002.
21. Kon K, Kim JS, Jaeschke H, Lemasters JJ. Mitochondrial permeability transition in acetaminophen-induced necrosis and apoptosis of cultured mouse hepatocytes. *Hepatology* 40: 1170–1179, 2004.
22. Lee WM. Acetaminophen toxicity: changing perceptions on a social/medical issue. *Hepatology* 46: 966–970, 2007.
23. Liu ZX, Govindarajan S, Kaplowitz N. Innate immune system plays a critical role in determining the progression and severity of acetaminophen hepatotoxicity. *Gastroenterology* 127: 1760–1774, 2004.
24. Machado MV, Ravasco P, Jesus L, Marques-Vidal P, Oliveira CR, Proenca T, Baldeiras I, Camilo ME, Cortez-Pinto H. Blood oxidative stress markers in non-alcoholic steatohepatitis and how it correlates with diet. *Scand J Gastroenterol*: 1–8, 2007.
25. Manyike PT, Kharasch ED, Kalthorn TF, Slattery JT. Contribution of CYP2E1 and CYP3A to acetaminophen reactive metabolite formation. *Clin Pharmacol Ther* 67: 275–282, 2000.
26. Marchesini G, Bugianesi E, Forlani G, Cerrelli F, Lenzi M, Manini R, Natale S, Vanni E, Villanova N, Melchionda N, Rizzetto M. Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis, and the metabolic syndrome. *Hepatology* 37: 917–923, 2003.
27. McClain CJ, Mokshagundam SP, Barve SS, Song Z, Hill DB, Chen T, Deaciuc I. Mechanisms of non-alcoholic steatohepatitis. *Alcohol* 34: 67–79, 2004.
28. Miller MW, Duhl DM, Vrieling H, Cordes SP, Ollmann MM, Winkes BM, Barsh GS. Cloning of the mouse agouti gene predicts a secreted protein ubiquitously expressed in mice carrying the lethal yellow mutation. *Genes Dev* 7: 454–467, 1993.
29. Mitchell JR, Jollow DJ, Potter WZ, Gillette JR, Brodie BB. Acetaminophen-induced hepatic necrosis. IV. Protective role of glutathione. *J Pharmacol Exp Ther* 187: 211–217, 1973.
30. Nieminen AL, Byrne AM, Herman B, Lemasters JJ. Mitochondrial permeability transition in hepatocytes induced by t-BuOOH: NAD(P)H and reactive oxygen species. *Am J Physiol Cell Physiol* 272: C1286–C1294, 1997.
31. Nieminen AL, Gores GJ, Bond JM, Imberti R, Herman B, Lemasters JJ. A novel cytotoxicity screening assay using a multiwell fluorescence scanner. *Toxicol Appl Pharmacol* 115: 147–155, 1992.
32. Okumura K, Ikejima K, Kon K, Abe W, Yamashina S, Enomoto N, Takei Y, Sato N. Exacerbation of dietary steatohepatitis and fibrosis in obese, diabetic KK-A^Y mice. *Hepatol Res* 36: 217–228, 2006.
33. Olsson R. Increased hepatic sensitivity to paracetamol. *Lancet* 2: 152–153, 1978.
34. Ono M, Saibara T. Clinical features of nonalcoholic steatohepatitis in Japan: evidence from the literature. *J Gastroenterol* 41: 725–732, 2006.
35. Ostapowicz G, Fontana RJ, Schiodt FV, Larson A, Davern TJ, Han SH, McCashland TM, Shakil AO, Hay JE, Hynan L, Crippin JS, Blei AT, Samuel G, Reisch J, Lee WM. Results of a prospective study of acute liver failure at 17 tertiary care centers in the United States. *Ann Intern Med* 137: 947–954, 2002.
36. Pessayre D. Role of mitochondria in non-alcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol Hepatol* 22, Suppl 1: S20–S27, 2007.
37. Reinehr R, Sommerfeld A, Keitel V, Grether-Beck S, Haussinger D. Amplification of CD95 activation by caspase 8-induced endosomal acidification in rat hepatocytes. *J Biol Chem* 283: 2211–2222, 2008.
38. Sakurai M, Takamura T, Ota T, Ando H, Akahori H, Kaji K, Sasaki M, Nakanuma Y, Miura K, Kaneko S. Liver steatosis, but not fibrosis, is associated with insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol* 42: 312–317, 2007.
39. Schwabe RF. Cell death in the liver—all roads lead to JNK. *Gastroenterology* 131: 314–316, 2006.
40. Siracusa LD, Russell LB, Eicher EM, Corrow DJ, Copeland NG, Jenkins NA. Genetic organization of the agouti region of the mouse. *Genetics* 117: 93–100, 1987.
41. Tarantino G, Conca P, Basile V, Gentile A, Capone D, Polichetti G, Leo E. A prospective study of acute drug-induced liver injury in patients suffering from non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatol Res* 37: 410–415, 2007.
42. Watanabe S, Yaginuma R, Ikejima K, Miyazaki A. Liver diseases and metabolic syndrome. *J Gastroenterol* 43: 509–518, 2008.
43. Zakhari S, Li TK. Determinants of alcohol use and abuse: impact of quantity and frequency patterns on liver disease. *Hepatology* 46: 2032–2039, 2007.

はじめに

肝線維化は原因のいかんを問わずほとんどすべての慢性肝疾患に共通する問題であるが、NASHの病態を考えるうえでも、いかに線維化の進行を予測して肝硬変への進展を阻止するかが重要である。本稿では、NASHの病態に即した線維化進展のメカニズムおよび肝線維化の評価法、とくに最近の非侵襲的線維化評価法の進歩について概説したい。

展のみならず治療抵抗性にも関与していると考えられる(図1)。

メタボリックシンドロームにともなうNASHで肝星細胞の活性化を惹起するメカニズムとしては、まず肝細胞における糖・脂質代謝亢進にともなう酸化ストレス増大があげられる。活性酸素種(reactive oxygen species; ROS)や一酸化窒素(NO)由来のペルオキシナイトライドなどのフリーラジカルは生体防御機構をはじめとする種々の生理的現象において重要な役割を果たしているが、過剰な酸化ストレスは細胞・組織傷害性に作用する。NASHでは、エネルギー過負荷や自然免疫系賦活にともない、さまざまな形で酸化ストレスが生じて病態進展に深く関与している。ミトコンドリア機能異常にともなう電子伝達系からの電子漏出や、ミクロソーム代謝系のチトクロームP450(CYP)発現誘導による肝細胞内でのROS過剰産生に加えて、Kupffer細胞や浸潤してきた好中球などの炎症細胞からはNADPHオキシダーゼ由来のヒドロキシラジカルが産生・放出され、細胞障害性に作用している。その際に生じるmalondialdehyde(MDA)や4-hydroxy-nonenal(4-HNE)などの過酸化脂質は、星細胞のコラーゲン産生を増加させることが知られている。また、活性化星細胞もNADPHオキシダーゼを発現してROSを産生しており、外因性ラジカルとともにオートクリン作用も相まって、細胞増殖やマトリックス産生を亢進させる刺激になっている。



KEY WORD

肝星細胞, 酸化ストレス, 自然免疫系,
アディポカイン, 線維化マーカー,
エラストグラフィ

NASHにおける肝線維化のメカニズム

●酸化ストレスによる肝星細胞活性化の制御

一般的に肝線維化の過程では、肝星細胞が活性化にともない増殖し、細胞外マトリックスを過剰産生することが重要なイベントであると考えられている。また、活性化した星細胞は細胞外マトリックス分子や増殖因子などの支持を受けてアポトーシス耐性を獲得していることが、線維化の進

●肝線維化進展における肝内自然免疫系の役割

NASHはその病理学的特徴のみならず、病態生理の観点からもアルコール性肝障害との共通性が示唆されている。アルコール性肝障害の病態には、腸内細菌由来のエンドトキシン(lipopolysaccharide; LPS)の門脈血中への流入にともなうKupffer細胞活性化がきわめて重要な役割を果たしているが、近年NASHでも同様のメカニズムが想定されている。活性化したKupffer細胞はTNF- α やROSを産生して類洞内皮や肝

図1 肝線維化の過程における肝星細胞活性化とアポトーシス

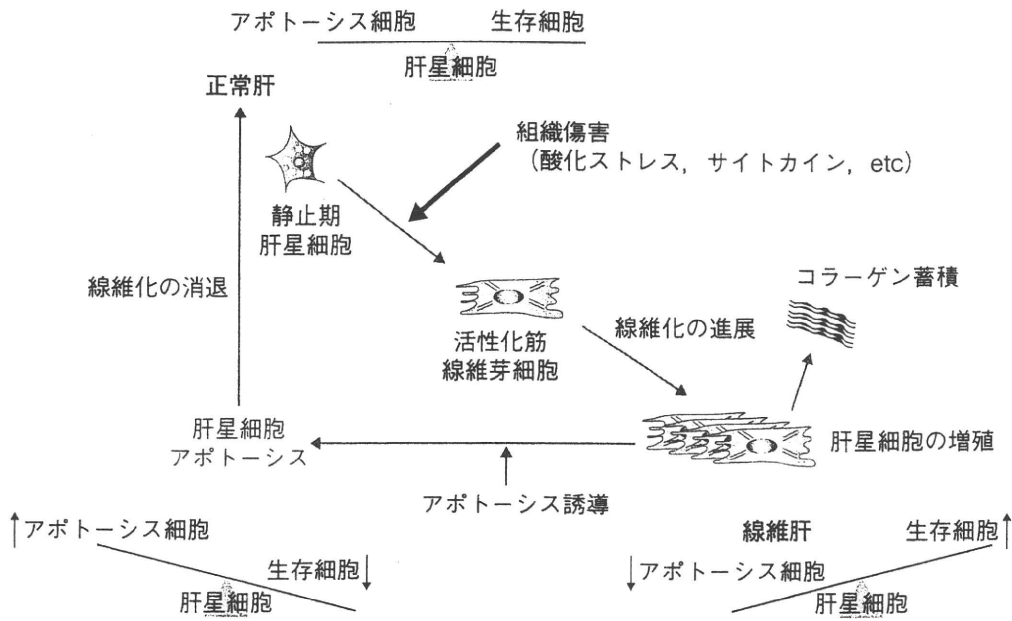
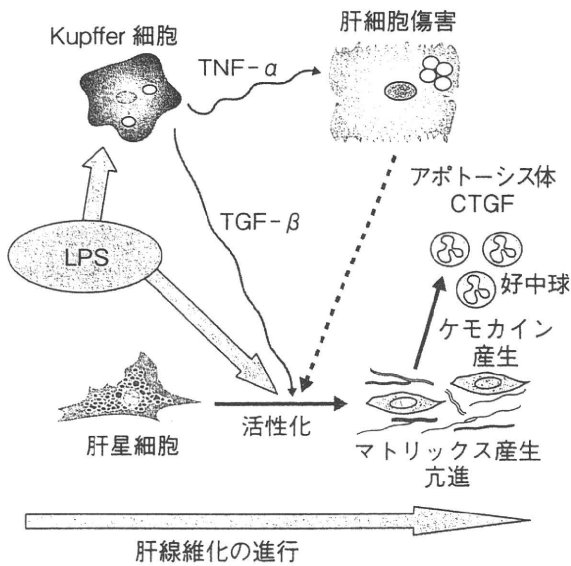


図2 自然免疫系と肝線維化

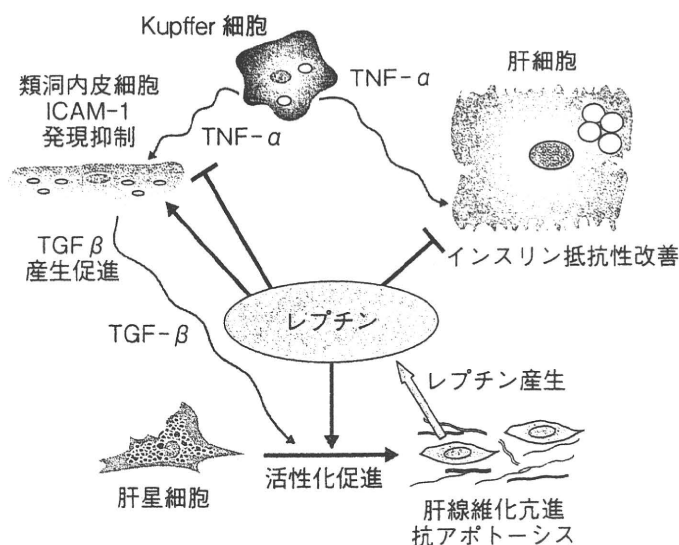


実質細胞を傷害するとともに、TGF-βを産生して肝星細胞を活性化し肝線維化を促進すると考えられる(図2)。自然免疫系の賦活には種々の toll 様受容体 (TLR) が中心的役割を演じているが、TLR は細菌やウイルスなどの構成成分を認識するのみならず、障害を受けた自己の変性した細胞成分 (DNA, RNA, 脂質系分子など) をリガンドとして活性化する。このように病原体によらず

内因性の細胞傷害で惹起される自然免疫賦活にともなう炎症 (sterile inflammation) は、過剰な酸化ストレスにともなう肝細胞傷害から炎症が惹起される過程を説明し得るものとして大変注目される。また、TNF-αなどで惹起される肝細胞アポトーシスもアポトーシス小体の Kupffer 細胞や肝星細胞への取り込み (engulfment) などを介して線維化誘導に関与する(図2)。一方、肝星細胞にも TLR の発現が認められ、LPS が TLR4 を介して肝星細胞の細胞膜上に発現している偽 TGF-β 受容体 banbi の発現を抑制し、その結果 TGF-β に対する感受性が亢進して線維化促進に寄与することが報告されている¹⁾。

また、肝臓の自然免疫系としては、NK 細胞および NKT 細胞も重要な役割を担っているが、NK 細胞は肝星細胞のアポトーシス誘導を介して線維化の抑制ないし改善に寄与することが示されている。NKT 細胞の肝線維化に対する作用についてはいまだ不明の点が多いが、最近われわれは NKT 細胞が全身性に欠損している CD1d ノックアウトマウスでチオアセタミドによる肝線維化が生じ難いことを見出しており、NKT 細胞が肝の炎症および線維化進展に促進的に作用している可

図3 肝線維化におけるレプチンの作用



能性が示唆される。

●アディポカインによる肝線維化進展の制御

NASHでは肥満との関連から、脂肪組織が分泌する種々のアディポカインが病態形成に深く関与していることが解明されつつある。レプチンは摂食や代謝系の調節作用以外にも種々の生理活性を発揮することが知られており、肝臓ではTGF- β 発現誘導や肝星細胞の増殖促進などを介して肝線維化促進的に作用することが明らかにされている(図3)^{2,3)}。

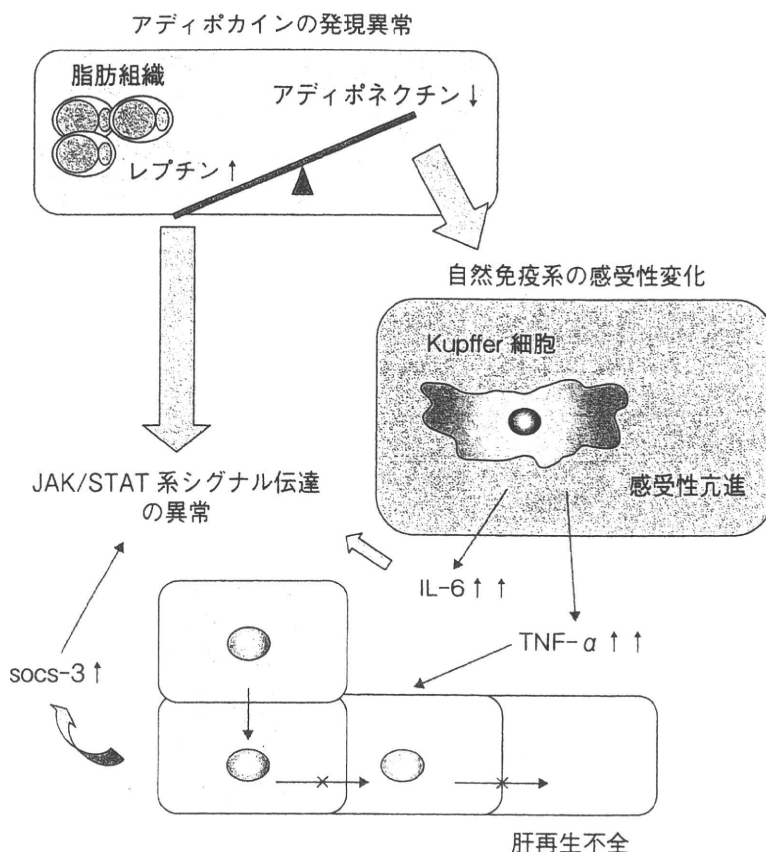
一方、アディポネクチンが肝の炎症や線維化を直接制御する可能性が示唆されており注目されている。アディポネクチンのノックアウトマウスでは四塩化炭素による肝線維化が増強することが報告された⁴⁾。われわれは、肥満、耐糖能異常を自然発症するKK-Ayマウスでは低アディポネクチン血症にともないコリン・メチオニン欠乏(MCD)食負荷による脂肪性肝炎が増悪し、肝線維化反応も増強していることを明らかにした⁵⁾。またKK-Ayマウスでは重度の肝再生不全が認められ、その背景には低アディポネクチン血症にともなうTNF- α 発現亢進や、高レプチン血症にともなうJAK-STAT系シグナル伝達の異常が関与している可能性が示唆された(図4)⁶⁾。こ

のようにNASHの病態進展メカニズムには肝再生不全を含む組織損傷修復機転の異常が関与しており、線維化の進展もその一環として位置付けることができる。また、アディポネクチンによる線維化抑制は炎症調節作用以外に肝星細胞への直接作用も関与している。実際、肝星細胞にもアディポネクチン受容体が発現しており、*in vitro*の系でもアディポネクチンが肝星細胞の増殖反応を抑制することなどが明らかにされている⁷⁾。これらの知見から、低アディポネクチン血症もNASHの肝線維化進展の危険因子として重要な役割を果たしている可能性が高い。

●自律神経系およびレニン・アンジオテンシン系とNASHの肝線維化

自律神経系は肝線維化に密接な関連があり、交感神経刺激がNASHの増悪因子になっている可能性が示唆される。肝星細胞にはアドレナリン作動性受容体が発現しており、肝星細胞の活性化や*in vivo*での肝線維化が α 1-ブロッカーで抑制されることから、交感神経系の賦活化により肝線維化が増悪することが推測される。また、肝星細胞はアンジオテンシンII(ATII) type 1受容体を発現しており、ATIIが肝星細胞の活性化を促進して肝線維化の増悪因子になる。実際、アンジオ

図4 脂肪性肝炎における肝再生不全



テンシン受容体拮抗薬 (ARB) でメチオニン・コリン欠乏食による脂肪性肝炎での線維化進行が抑制されることが示されている⁸⁾。さらに、アルドステロン阻害薬であるカンレノンが肝星細胞のPI3K および Na^+/H^+ exchanger 活性を抑制することにより肝線維化を抑制することが報告されている⁹⁾。

NASHにおける肝線維化の評価法

●病理組織学的評価

NASHの診断には臨床情報と病理組織診断の双方が不可欠であることはいうまでもない。とくに単純性脂肪肝とNASHの区別は、現時点では病理組織像の評価以外に確立した方法はない。NASHの病理学的診断には、肝細胞の膨化(バルーンリング)や肝細胞壊死・アポトーシスおよび炎症細胞浸潤に加えて、Zone 3にみられる肝細胞周囲(pericellular)および傍静脈性(peri-

表1 NASH線維化の病理学的スコア

Stage	所見
0	線維化なし
1	類洞ないし門脈周囲の線維化
2	類洞周囲および門脈域/門脈周囲の線維化
3	線維隔壁ないし架橋線維化
4	肝硬変

venular) 線維化などの特徴的な線維化像がきわめて重要な所見としてあげられる。線維化の段階的評価については、Bruntの分類を基盤とした5段階のスコアリング・システム(表1)が広く用いられる。

●血小板数および血清線維化マーカー

慢性肝疾患の線維化進行度の評価として、血小板数および各種線維化マーカーが有用であることは周知の事実である。肝線維化進行にともなう血

表2 線維化の非侵襲的スコアリング

	評価項目	計算式
FibroTest-FibroSURE	$\alpha 2$ マクログロブリン ハプトグロビン γ -GTP 総ビリルビン アポリポ蛋白 A1 年齢 性別	$f = 4.467 \times \log_{10}[\alpha 2 \text{ マクログロブリン (g/l)}] - 1.357 \times \log_{10}[\text{ハプトグロビン (g/l)}] + 1.017 \times \log_{10}[\gamma\text{-GTP (IU/l)}] + 0.0281 \times [\text{年齢 (歳)}] + 1.737 \times \log_{10}[\text{ビリルビン } (\mu\text{mol/l)}] - 1.184 \times [\text{ApoA1 (g/l)}] + 0.301 \times \text{性別 (女性 = 0, 男性 = 1)} - 5.54$
NAFLD Fibrosis Score (Angulo P, et al., Hepatology 2007)	年齢 BMI 高血糖/糖尿病の有無 AST/ALT 比 血小板数 アルブミン	$\text{NALFD fibrosis score} = -1.675 + 0.037 \times \text{年齢 (歳)} + 0.094 \times \text{BMI (kg/m}^2) + 1.13 \times \text{IFG/糖尿病 (有 = 1, 無 = 0)} + 0.99 \times \text{AST/ALT 比} - 0.013 \times \text{血小板数 } (\times 109/l) - 0.66 \times \text{アルブミン (g/dl)}$

血小板数の低下は、門脈圧亢進による脾機能亢進、肝機能低下にともなうトロンボポイエチン産生低下、抗血小板抗体出現にともなう血小板崩壊などにより生じ、血小板数が $10 \text{ 万}/\mu\text{l}$ 以下で肝硬変への移行が示唆される。また、血清IV型コラーゲン、ヒアルロン酸、タイプ3プロコラーゲン-N-ペプチド (P3P) などの線維化マーカーが日常臨床でも測定可能である。これらの血液検査に加え、血清アルブミン値やコリンエステラーゼ値の低下、プロトロンビン時間延長など肝機能低下の兆候を認めれば、肝硬変に近い、ないしはすでに肝硬変に至っているかどうかの予測は比較的容易である。問題は初期ないし中期の肝線維化が診断可能かどうかという点で、Stage 1~2 の症例ではこれらの血液マーカー単独では検出感が低い。したがって肝線維化初期の検出に関しては、現時点ではインスリン抵抗性 (HOMA-IR)、フェリチン値、高感度 CRP などを目安にして、最終的には病理組織診断に委ねざるをえない。近年欧米では、複数の血清マーカーの組み合わせで肝線維化の程度を予測する FibroTest-FibroSURE (表2) が用いられ、NAFLD/NASH でも有用性が報告されている¹⁰⁾。また、Angulo らは年齢、BMI、空腹時血糖/糖尿病の有無、AST/ALT 比、血小板数およびアルブミンをパラメータとした NAFLD Fibrosis Score (表2) を提唱している¹¹⁾。

●画像診断

従来、腹部 US、CT、MRI などの画像診断は、肝硬変の典型的所見を有するもの以外、び慢性肝線維化の検出には有用性が乏しいと考えられていたが、近年、各種画像診断を応用した非侵襲的な肝線維化評価の試みがなされている。なかでも、線維化の評価に特化したものの1つとして、トランジエント・エラストグラフィー (Fibroscan, EchoSens 社) があげられる。本法はプローブから発生される可聴振動の伝播速度の違いによって組織の硬さを評価する方法である。振動波は、肝線維化が進行して硬度が増すほど速く伝播されるので、肝内の伝播を超音波で追跡して速度の変化を解析することにより、肝線維化の程度を推測できる。NAFLD における本法の有用性については、いくつかの報告がある^{12,13)}。また、MRI を用いた磁気共鳴 (MR) エラストグラフィーも開発されている。

おわりに

NAFLD/NASH の診療において、肝線維化の的確な評価はきわめて重要であるにもかかわらず、いまだその評価法は十分に確立していない。また、メカニズムに立脚した肝線維化の予防・治療に関しても、動物実験での良好な成績に比し臨床データの蓄積はいまだ不十分であり、決め手に欠くというのが現状である。非侵襲的な肝線維化

の評価がより高精度で行えるようになれば、治療介入効果の検証にも有力な手段になりうる。今後の当該分野における基礎的・臨床的研究のさらなる進展に期待したい。

文献

- 1) Seki E, De Minicis S, Osterreicher CH, et al. TLR4 enhances TGF- β signaling and hepatic fibrosis. *Nature Med* 2007 ; 13(11) : 1324-1332.
- 2) Ikejima K, Takei Y, Honda H, et al. Leptin receptor-mediated signaling regulates hepatic fibrogenesis and remodeling of extracellular matrix in the rat. *Gastroenterology* 2002 ; 122(5) : 1399-1410.
- 3) Lang T, Ikejima K, Yoshikawa M, et al. Leptin facilitates proliferation of hepatic stellate cells through up-regulation of platelet-derived growth factor receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 2004 ; 323(3) : 1091-1095.
- 4) Kamada Y, Tamura S, Kiso S, et al. Enhanced carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in mice lacking adiponectin. *Gastroenterology* 2003 ; 125 : 1796-1807.
- 5) Okumura K, Ikejima K, Kon K, et al. Exacerbation of dietary steatohepatitis and fibrosis in obese diabetic KK-Ay mice. *Hepatol Res* 2006 ; 36(3) : 217-228.
- 6) Aoyama T, Ikejima K, Kon K, et al. Pioglitazone promotes survival and prevents hepatic regeneration failure after partial hepatectomy in obese and diabetic KK-Ay mice. *Hepatology* 2009 ; 49(5) : 1636-1644.
- 7) Adachi M, Brenner DA. High molecular weight adiponectin inhibits proliferation of hepatic stellate cells via activation of adenosine monophosphate-activated protein kinase. *Hepatology* 2008 ; 47 : 677-685.
- 8) Hirose A, Ono M, Saibara T, et al. Angiotensin II type 1 receptor blocker inhibits fibrosis in rat nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2007 ; 45 : 1375-1381.
- 9) Caligiuri A, De Franco RM, Romanelli RG, et al. Antifibrogenic effects of canrenone, an antialdosteronic drug, on human hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 2003 ; 124 : 504-520.
- 10) Ratziu V, Massard J, Charlotte F, et al. Diagnostic value of biochemical markers (FibroTest-FibroSURE) for the prediction of liver fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *BMC Gastroenterol* 2006 ; 6 : 6.
- 11) Angulo P, Hui JM, Marchesini G, et al. The NAFLD fibrosis score: a noninvasive system that identifies liver fibrosis in patients with NAFLD. *Hepatology* 2007 ; 45 : 846-854.
- 12) Yoneda M, Fujita K, Inamori M, et al. Transient elastography in patients with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Gut* 2007 ; 56 : 1330-1331.
- 13) Wong VW, Vergniol J, Wong GL, et al. Diagnosis of fibrosis and cirrhosis using liver stiffness measurement in non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2010 ; 51 : 454-462.

*

*

*

Ⅱ. 基礎的メカニズムの解明

1. NASHモデル

順天堂大学医学部消化器内科 准教授
池嶋 健一

順天堂大学医学部消化器内科、自衛隊中央病院
消化器内科
宮地 隆史

順天堂大学医学部消化器内科 教授
渡辺 純夫

[Summary]

非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) の詳細な病態解明や新規治療法の確立にはモデル動物を用いた解析が不可欠である。脂肪性肝炎をきたすモデルとしては、食餌負荷、自然発症の遺伝子異常を有する動物に加え、数種のノックアウトやトランスジェニックマウスが報告されている。しかしながら、ヒトのNASHに完全に合致するモデルは存在せず、それぞれのモデルの利点と短所を把握した上で結果を検証することが重要である。

Key Words:

脂肪性肝炎 □ 酸化ストレス □ アディポカイン □
肝線維化 □ 肝発癌

はじめに

非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) を含む非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) が、とりわけメタボリックシンドロームとの関連から脚光を浴びている。肝臓への脂肪蓄積そのものは、栄養素の備蓄という肝臓が本来有する機能の一環として生じるが、過剰な脂肪沈着は酸化ストレスの増大や自然免疫系を介した炎症反応の惹起ときわめて密接な関連があり、脂肪性肝炎として進行性の肝疾患を惹起する。NASHは、その病理組織学的特徴からアルコール性肝障害と共通の病態基盤が存在する可能性が示唆されているが、その病態メカニズムにはいまだ不明の点も多く、また有効な治療法も確立されていない。これらの問題を解決するためには、疾患モデル動物を用いた解析が欠かせない。本稿では、NASHの疾患モデル動物を用いた基礎研究の最近の動向について概説する。

食餌負荷モデル

1. 高脂肪食負荷モデル

高脂肪食の摂食は肥満に伴う代謝性障害を惹起するが、通常実験に供されるマウスやラットへの高脂肪食の自由摂食では軽度の脂肪肝しか生じない。Tsukamotoらのグルー

表 NASHの疾患モデル動物

自然発症モデル	Papers	Insulin resistance	Inflammation	Fibrosis	Carcinogenesis
ob/ob マウス	Zhang et al Nature 1994	○	○	×	×
db/db マウス	Vaisse et al Nat Genet 1996	○	○	×	×
Zucker (fa/fa) ラット	Takaya et al Biochem Biophys Res Commun 1996	○	○	×	×
KK-A ^y マウス	Klebig et al Proc Natl Acad Sci USA 1995	○	○	△	×
OLETF ラット	Kawano et al Diabetes 1992	○	○	×	×
FLS マウス	Soga et al Cancer Lett 2003	○	○	×	○
食餌負荷モデル	Papers	Insulin resistance	Inflammation	Fibrosis	Carcinogenesis
高脂肪食負荷 C57Bl/6 マウス	Deng et al Hepatology 2005	○	○	×	×
動脈硬化食負荷 IL-1 Ra KO マウス	Isoda et al J Biol Chem 2005	?	○	○	×
コリンメチオニン欠乏食負荷 ラット	Weltman et al Gastroenterology 1996	×	○	○	○
コリンメチオニン欠乏食負荷 KK-A ^y マウス	Okumura et al Hepatology 2006	○	○	○	?
遺伝子改変モデル	Papers	Insulin resistance	Inflammation	Fibrosis	Carcinogenesis
RARα Tg マウス	Yanagitani et al Hepatology 2004	?	○	×	○
PTEN KO マウス	Horie et al J Clin Invest 2004	×	○	○	○
AOX KO マウス	Fan et al J Biol Chem 1998	?	○	×	○
その他のモデル	Papers	Insulin resistance	Inflammation	Fibrosis	Carcinogenesis
C57Bl/6N-NASH マウス	—	?	○	○	○
高脂肪・高コレステロール食 投与ウサギ	Otokawa et al Am J Pathol 2007	○	○	○	×
メダカNASHモデル	Matsumoto et al Dis Model Mech 2010	○	○	?	×

ブは、C57Bl/6マウスに経胃管的に高脂肪食を9週間投与すると、71%の体重増加および耐糖能異常、インスリン抵抗性が惹起されることに加え、約半数の個体に好中球浸潤と肝細胞周囲線維化を伴う脂肪性肝炎を認められることを報告した¹⁾。一方、peroxisome proliferator activated receptor γ (PPAR γ) は核内ホルモン受容体スーパーファ

ミリーに属するリガンド活性型転写因子であるが、脂肪肝を呈する多くのマウス肥満モデルや糖尿病モデルにおいてその発現レベルの上昇が報告されていることから、脂肪肝の病態生理におけるPPAR γ の関与の可能性が推測される。Yuらはアデノウイルスを用いてマウス肝臓のPPAR γ を過剰発現させることによって脂肪肝が誘導されることを示し

ている²⁾。このことから、高脂肪食は肝細胞のPPAR γ 発現亢進を介して脂肪肝を発生させる可能性が示唆される。

2. メチオニン・コリン欠乏食負荷モデル

マウスやラットにメチオニン・コリン欠乏 (MCD) 食を与えると脂肪肝、炎症および肝線維化が惹起される。げっ歯類はコリン合成系の酵素を保有しないため、コリンが食餌性に要求される必須栄養素であるが、ヒトは体内でコリンを合成することができるため、コリン欠乏に伴うこのような現象はヒトでは生じない。コリンは肝細胞内でのリン脂質合成に必須であるため、コリン欠乏条件下ではリン脂質合成が障害されることによりVLDL分泌障害をきたし、肝細胞内に脂質が貯留する^{3,4)}。また、リン脂質は生体内の膜構造を構成する主要な物質であるため、膜障害や細胞内小器官の機能異常をきたすことにより細胞傷害を惹起する。コリンのみの欠乏でも脂肪性肝炎が惹起されるが、これらの変化はメチオニンと共に欠乏すると増強される。メチオニンとATPからつくられるS-アデノシルメチオニン (SAM) は生体内でメチル供与体として作用し、リン脂質やグルタチオンの合成および小胞体ストレスに深く関与しているため、メチオニン欠乏は酸化ストレスや小胞体ストレスの増大を介して肝細胞傷害を増強すると考えられる。また、MCD食負荷によって肝への脂肪酸の取り込みが増加することが示されており、これもMCD食による脂肪性肝炎の重要な機序のひとつと考えられる⁵⁾。

MCD食負荷により病理学的にはヒトのNASHに類似した脂肪性肝炎の像を呈し、線維化進展から肝発癌に至る過程までが観察可能なため、確立された非アルコール性の脂肪性肝炎モデルとして頻用されている⁶⁻⁸⁾。一方、MCD食負荷条件下では摂食量減少や基礎代謝亢進などにより体重が減少することや、インスリン抵抗性が形成されずむしろ改善傾向になることなど、メタボリックシンドロームを背景とするヒトのNASHの病態とは本質的に異なる。

自然発生の遺伝子異常を有するモデル動物

1. *ob/ob*マウスおよびZucker (*fa/fa*)ラット

レプチンおよびレプチン受容体 (ObR) の遺伝子変異は、過食による肥満、耐糖能異常および、著明な脂肪肝をきたすことが知られている。*ob/ob*マウスは、レプチン発見の契機となった遺伝性肥満マウスであり、本マウスでは*ob*遺伝子の変異に伴いレプチンが欠損している⁹⁾。また、ObR欠損動物としては、*db/db*マウスおよびZucker (*fa/fa*)ラットが知られている^{10,11)}。ObRにはスプライシングの違いによる数種のアイソフォームがあり、*db/db*マウスはlong formの機能性受容体であるObRbの細胞内ドメインに変異を有するがshort formのObRaは正常に発現しているのに対し、ZuckerラットではObRのアイソフォームすべてに共通する細胞外ドメインに変異を有する。

われわれはチオアセタミド (TAA) 誘発ラット肝線維化モデルを用いて、活性化肝星細胞が*in vivo*でレプチンを産生することを明らかにした¹²⁾。また、*ob/ob*マウスではTAA投与によっても肝線維化は誘起されないが、レプチン補充投与下にTAA処置を行うと線維化が認められ¹³⁾、ZuckerラットでもTAA投与による肝線維化が惹起されにくいことなどから¹²⁾、肝星細胞から産生されるレプチンが肝線維化に促進的に作用することが判明した。また、レプチンは肝類洞内皮細胞やクッパー細胞のTGF- β 1の発現増強に加え、直接的に肝星細胞活性化を促進することが明らかになった (図①)¹⁴⁾。このように*ob/ob*マウスおよびZuckerラットは通常食の摂食のみで高度の脂肪肝をきたし炎症が惹起されやすいことに加え、レプチンとObRの機能解析に有用であり、NASHのモデル動物として頻用されてきた。一方、肝線維化が生じ難いことおよび、ヒトではレプチンないしObRを欠損しているケースはきわめて稀であり、アディポカインの発現バランスが異なることなどが問題点でもある。

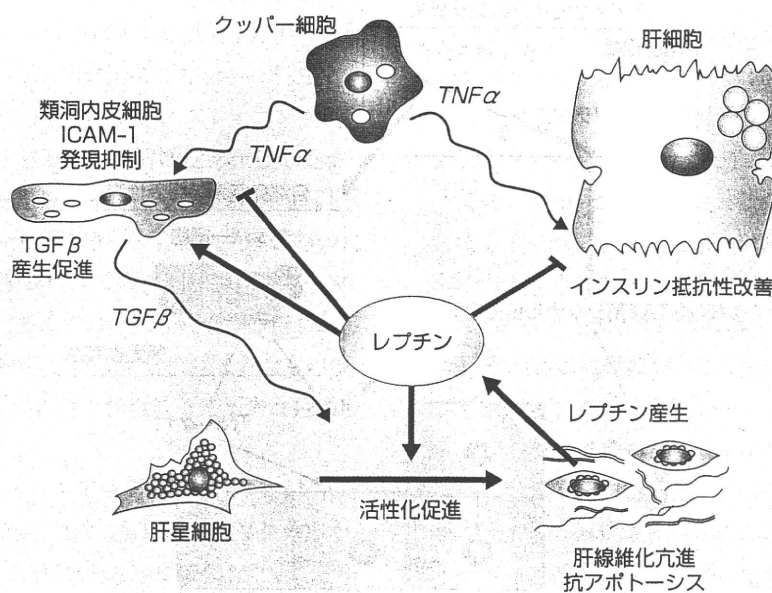


図1 肝臓におけるレプチンの作用

2. KK-A^yマウスとOLETFラット

KK-A^yマウスは、耐糖能異常・インスリン抵抗性を示し従来から2型糖尿病モデルとして用いられてきたKKマウスに肥満遺伝子A^yを導入して、より早期から肥満と糖尿病を発症するよう改良されたものである。インスリン抵抗性に加えてレプチン抵抗性や低アディポネクチン血症など、ヒトのメタボリックシンドロームにきわめて類似した病態を呈することから、われわれは最近このマウスを用いてNASHの病態について種々の検討を行っている。KK-A^yマウスは通常の食餌を用いて飼育しても軽度の脂肪性肝炎を呈するが、高脂肪食負荷では高度の肝脂肪化と炎症が惹起され、MCD食負荷では脂肪性肝炎から線維化を生じる進行性の肝病変が誘起できることを明らかにしてきた¹⁵⁾。また、KK-A^yマウスに70%肝切除を行うとその再生機転において重度の肝再生不全が認められるが、それと同時に低アディポネクチン血症に伴うTNF α 発現亢進や、高レプチン血症に伴うJAK-STAT系シグナル伝達の異常が観察さ

れた¹⁶⁾。このことから、これらがメタボリックシンドローム下の肝再生機転の変化に関与している可能性が示唆された(図2)。さらに、KK-A^yマウスでは脂肪性肝炎の病態進展に伴って肝NKT細胞が枯渇し、 α -ガラクトシルセラミドによるNKT細胞由来サイトカイン(IL-4, IFN γ)の誘導が減弱していることを明らかにした。興味深いことに、インスリン抵抗性改善薬であるチアゾリジン誘導体のピオグリタゾン投与することによって脂肪性肝炎が改善するとともに、肝再生不全やNKT細胞の低下も改善することが判明し、NASHに対する治療効果の検証にも有用なモデルと考えられる。

Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) ラットは、クローズドコロニーのLong-Evansラットから、2型糖尿病発症系統として樹立されたものである。第14番染色体上のコレシストキニンA受容体の遺伝子変異が報告されており、原因遺伝子のひとつと考えられている。2型糖尿病モデルとして頻用されるほか、脂肪肝と中等度の炎症

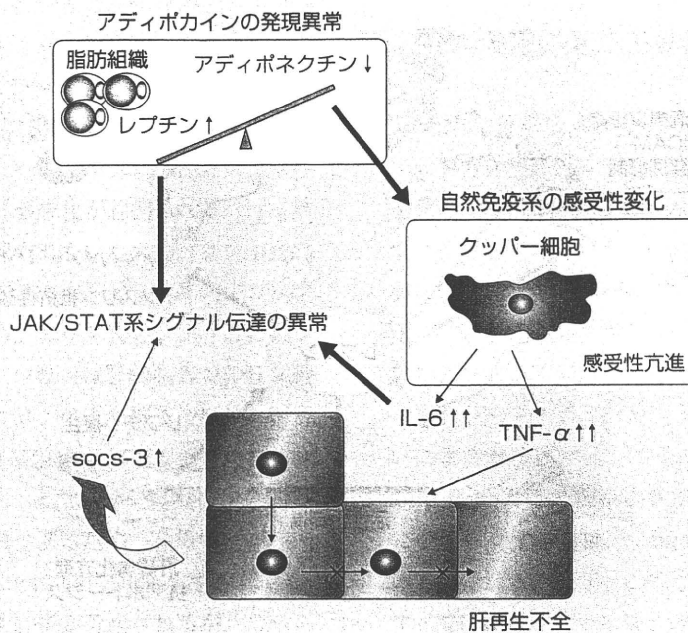


図2 脂肪性肝炎における肝再生不全

を呈し、MCD食負荷で炎症の増強や線維化を生じることからNASHモデルとしても使用されている^{17,18)}。

3. FLS-ob マウス

Fatty Liver Shiongi (FLS) マウスは、非近交系のddN マウスコロニーから近交系のラインを確立する過程で偶然発見された脂肪肝を呈する系統である¹⁹⁾。生育初期には体重も正常で糖尿病の発症も認めないが、出生後すでに肝細胞内には微細な脂質(トリグリセリド)の異常沈着が認められ、その後、中心静脈周囲から大型の脂肪滴が出現して4ヵ月齢前後には肝全体の細胞が脂肪滴で充満するようになる。24週齢頃をピークに耐糖能障害が悪化して糖尿病型を示すようになるが、その後は代償的なインスリン分泌の増加によって48週齢頃までに自然寛解する。48週齢頃からリンパ球浸潤や血清GPT値の上昇を認めるようになるが、FLSマウスでは肝硬変の発症はみられない。FLSマウ

スのもうひとつの特徴は肝腫瘍の自然発症であり、生後1年前後からhepatocellular adenoma (HCA), hepatocellular carcinoma (HCC), hemangiosarcoma (HeS), hemangioma (He) が出現する。このFLSマウスにC57BL-obマウスのob遺伝子を導入して作成されたのがFLS-obマウスであり、FLSマウスと異なり肥満、過食、高脂血症、糖尿病を伴い、肝組織では著明な脂肪化のみならず肝細胞壊死、肝細胞周囲線維化を認め、肝発癌もより高率に認められることから、特にNASH発癌モデルとしての有用性が期待されている²⁰⁾。

遺伝子改変マウスモデル

1. 肝細胞特異的PTENノックアウトマウス

Phosphatase and tensin homolog (PTEN) はほとんど

すべての細胞に発現する癌抑制遺伝子である。Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PIP3) を基質とするホスファターゼであり、phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) の働きを負に制御している。PIP3はセリン-スレオニンキナーゼprotein kinase B (PKB/Akt) の活性化を介して増殖・アポトーシス抵抗性、癌化や代謝に関与しており、PTENの欠損は増殖・生存、癌化、代謝など多彩な生理応答の亢進をきたす。PTENの変異はすでにグリオブラストーマ、子宮体癌、前立腺癌など多くのヒト悪性腫瘍で報告されており、肝細胞癌ではDNAレベルでの変異はまれなものの、蛋白レベルではその50%の患者で発現低下や消失が認められると報告されている²¹⁾。

肝細胞特異的PTENノックアウト (KO) マウスは75週齢で全例に腺腫を、そのうち2/3に肝細胞癌が発生するが、癌化に至る過程でヒトNASHにきわめて類似した変化を呈することから、NASHからの肝発癌モデルとしての有用性が示唆される。すなわち10週齢ごろから肝の腫大と白色化、組織学的には中心静脈周囲の肝細胞に小さな脂肪滴の沈着を認め、40週齢ごろには大滴性脂肪肝の像を呈するほかに、マロリー小体や肝細胞周囲の線維化、リンパ球・好中球を主体とした小葉内炎症性細胞浸潤を認めるようになり、約半数のマウスに腺腫の発生が認められる。75週齢で認められる肝細胞癌はすべて腺腫の中から発生することが指摘されている²²⁾。このように、PTEN-KOマウスは脂肪性肝炎の進展から肝発癌がみられる点で、ヒトのNASHの病理学的変化に近似するモデルといえる。しかし、PTEN-KOマウスではインスリン感受性はむしろ亢進しており、肥満や高脂血症もみられない点で、メタボリックシンドロームの病態とはやや趣を異にする。

2. RAR α -DN トランスジェニックマウス

一ビタミンAおよび類縁化合物であるレチノイドは再生・線維化・発癌などの肝病態に関与しており、特に肝細胞癌の治療後に合成レチノイドを投与することにより肝癌の再発が有意に抑制されたとする報告²³⁾や肝星細胞の活性化に

関与するという報告²⁴⁾はレチノイドの肝病態における重要性を示している。レチノイドは体内でレチノイン酸に代謝されるが、その受容体であるRARの機能をドミナントネガティブ (DN) 蛋白発現により不活性化したAlb-RAR α -DNトランスジェニック (Tg) マウスの肝組織は、月齢4ヵ月ごろには小滴性脂肪変性と散在性、多発性の巣状壊死を示し、その後月齢が進むにつれて肝癌の発生を認めるようになり、ヒトNASHとの類似性が指摘されている²⁵⁾。Alb-RAR α -DN Tgマウスは肥満を伴わずに脂肪肝を呈するが、その脂質代謝においてミトコンドリアにおける β 酸化活性の低下、ペルオキシソームの β 酸化活性の亢進ならびにミクロソームでの ω 酸化の亢進などの異常が認められ、これらによる活性酸素産生およびDNA酸化障害が発癌に関与している可能性が示されている。またこれらの変化はレチノイン酸大量投与によって消失することが確認されており²⁵⁾、NASH発癌の機序におけるレチノイン酸の関与の重要性を示唆している。

げっ歯類以外の脂肪性肝炎モデル

マウスやラットは生育が早く、省スペースで飼育が可能などのメリットがある。一方でNASHモデルの作成にあたっては、自然発生的とはいえ特殊な系統の動物を用いたり非生理的な食餌を与えたりといった操作が必要となり、必ずしもヒトNASHと同様の病態を呈していると信頼するに十分なモデルとはいえないのが現状である。Otokawaらは以前から動脈硬化症モデルとして用いられてきた高脂肪・高コレステロール食投与ウサギがより至適なヒトNASHモデルであるとしてその病態を検証している²⁶⁾。高脂肪・高コレステロール食投与ウサギは高脂血症やインスリン抵抗性を有するとともに粥状化した脂肪沈着を伴う動脈硬化性病変を呈し、メタボリックシンドロームと類似の病態を呈するモデルである。12ヵ月齢の日本白ウサギに高脂肪・高コレステロール食を8週間投与したところ、肝組織にお

いては肝細胞への小脂肪滴の沈着，多数の大型化したクッパー細胞浸潤，門脈域周囲の線維化が認められているが，やはりヒトNASHとある程度の組織学的相違はある．血清・肝組織中の過酸化脂質（LPO）の増加や肝組織におけるヘムオキシゲナーゼ1の発現亢進から，全身性の酸化ストレスが誘起されている可能性が示され，その原因のひとつとしてクッパー細胞への著明な鉄沈着が示されている．

さらにユニークなものとしては，メダカを用いたNASHモデルの作成があげられる（詳細は他稿参照）．Matsumotoらは8週齢のCabメダカに高脂肪食を12週間投与すると，高血糖，高TG血症，高ALT値とともに脂肪肝が観察され，肝細胞の風船様変化や炎症細胞浸潤などヒトNASHに類似した病理像を呈することを報告している²⁷⁾．このモデルは多産であることに加えて省スペースでの飼育が可能であり，さらに投与薬剤量の調整が容易であることから，特にNASHに対する各種薬物のスクリーニングへの有用性が期待されている．

おわりに

以上，現在NASHの基礎研究に用いられている代表的な動物モデルについて概説した．ヒトNASHの病態を完全に再現する動物モデルは今のところ存在せず，現行のモデル動物にはそれぞれメリットとデメリットがある．したがって，モデル動物を用いたNASHの病態解析には，それぞれの動物モデルの特性や背景をよく理解した上での計画立案と結果の解釈が肝要である．

■ 文 献

- 1) Deng QG, She H, Cheng JH et al: Steatohepatitis induced by intragastric overfeeding in mice. *Hepatology* **42** (4): 905-914, 2005
- 2) Yu S, Matsusue K, Kashireddy P et al: Adipocyte-specific gene expression and adipogenic steatosis in the mouse liver due to peroxisome proliferator-activated receptor gamma1 (PPARgamma1) overexpression. *J Biol Chem* **278** (1): 498-505, 2003
- 3) Yao ZM, Vance DE: The active synthesis of phosphatidylcholine is required for very low density lipoprotein secretion from rat hepatocytes. *J Biol Chem* **263** (6): 2998-3004, 1988
- 4) Rinella ME, Elias MS, Smolak RR et al: Mechanisms of hepatic steatosis in mice fed a lipogenic methionine choline-deficient diet. *J Lipid Res* **49** (5): 1068-1076, 2008
- 5) Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ et al: Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest* **115** (5): 1343-1351, 2005
- 6) Rinella ME, Elias MS, Smolak RR et al: Mechanisms of hepatic steatosis in mice fed a lipogenic methionine choline-deficient diet. *J Lipid Res* **49** (5): 1068-1076, 2008
- 7) Ip E, Farrell G, Hall P et al: Administration of the potent PPARalpha agonist, Wy-14,643, reverses nutritional fibrosis and steatohepatitis in mice. *Hepatology* **39** (5): 1286-1296, 2004
- 8) Yamaguchi K, Yang L, McCall S et al: Inhibiting triglyceride synthesis improves hepatic steatosis but exacerbates liver damage and fibrosis in obese mice with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* **45** (6): 1366-1374, 2007
- 9) Zhang Y, Proenca R, Maffei M et al: Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* **372** (6505): 425-432, 1994
- 10) Tartaglia LA, Dembski M, Weng X et al: Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell* **83** (7): 1263-1271, 1995
- 11) Takaya K, Ogawa Y, Isse N et al: Molecular cloning of rat leptin receptor isoform complementary DNAs--identification of a missense mutation in Zucker fatty (fa/fa) rats. *Biochem Biophys Res Commun* **225** (1): 75-83, 1996
- 12) Ikejima K, Takei Y, Honda H et al: Leptin receptor-mediated signaling regulates hepatic fibrogenesis and remodeling of extracellular matrix in the rat. *Gastroenterology* **122** (5): 1399-1410, 2002
- 13) Honda H, Ikejima K, Hirose M et al: Leptin is requi-

- red for fibrogenic responses induced by thioacetamide in the murine liver. *Hepatology* **36** (1) : 12-21, 2002
- 14) Lang T, Ikejima K, Yoshikawa M et al: Leptin facilitates proliferation of hepatic stellate cells through up-regulation of platelet-derived growth factor receptor. *Biochem Biophys Res Commun* **323** (3) : 1091-1095, 2004
 - 15) Okumura K, Ikejima K, Kon K et al: Exacerbation of dietary steatohepatitis and fibrosis in obese, diabetic KK-A (y) mice. *Hepatology* **36** (3) : 217-228, 2006
 - 16) Aoyama T, Ikejima K, Kon K et al: Pioglitazone promotes survival and prevents hepatic regeneration failure after partial hepatectomy in obese and diabetic KK-A (y) mice. *Hepatology* **49** (5) : 1636-1644, 2009
 - 17) Kurita S, Takamura T, Ota T et al: Olmesartan ameliorates a dietary rat model of non-alcoholic steatohepatitis through its pleiotropic effects. *Eur J Pharmacol* **588** (2-3) : 316-324, 2008
 - 18) Uno M, Kurita S, Misu H et al: Tranilast, an antifibrogenic agent, ameliorates a dietary rat model of nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* **48** (1) : 109-118, 2008
 - 19) Soga M, Kishimoto Y, Kawamura Y et al: Spontaneous development of hepatocellular carcinomas in the FLS mice with hereditary fatty liver. *Cancer Lett* **196** (1) : 43-48, 2003
 - 20) 山田真善, 川原 弘, 高瀬修二郎: 肝細胞癌を発生した非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) モデルマウス肝における酸化ストレスと抗酸化酵素の発現. 金沢医科大学雑誌 **31** (4) : 223-232, 2006
 - 21) Rahman MA, Kyriazanos ID, Ono T et al: Impact of PTEN expression on the outcome of hepatitis C virus-positive cirrhotic hepatocellular carcinoma patients: possible relationship with COX II and inducible nitric oxide synthase. *Int J Cancer* **100** (2) : 152-157, 2002
 - 22) Horie Y, Suzuki A, Kataoka E et al: Hepatocyte-specific Pten deficiency results in steatohepatitis and hepatocellular carcinomas. *J Clin Invest* **113** (12) : 1774-1783, 2004
 - 23) Muto Y, Moriwaki H, Ninomiya M et al: Prevention of second primary tumors by an acyclic retinoid, polyphenolic acid, in patients with hepatocellular carcinoma. Hepatoma Prevention Study Group. *N Engl J Med* **334** (24) : 1561-1567, 1996
 - 24) Uchio K, Tuchweber B, Manabe N et al: Cellular retinol-binding protein-1 expression and modulation during in vivo and in vitro myofibroblastic differentiation of rat hepatic stellate cells and portal fibroblasts. *Lab Invest* **82** (5) : 619-628, 2002
 - 25) Yanagitani A, Yamada S, Yasui S et al: Retinoic acid receptor alpha dominant negative form causes steatohepatitis and liver tumors in transgenic mice. *Hepatology* **40** (2) : 366-375, 2004
 - 26) Otagawa K, Kinoshita K, Fujii H et al: Erythrophagocytosis by liver macrophages (Kupffer cells) promotes oxidative stress, inflammation, and fibrosis in a rabbit model of steatohepatitis: implications for the pathogenesis of human nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Pathol* **170** (3) : 967-980, 2007
 - 27) Matsumoto T, Terai S, Oishi T et al: Medaka as a model for human nonalcoholic steatohepatitis. *Dis Model Mech*, 2010 (in press)