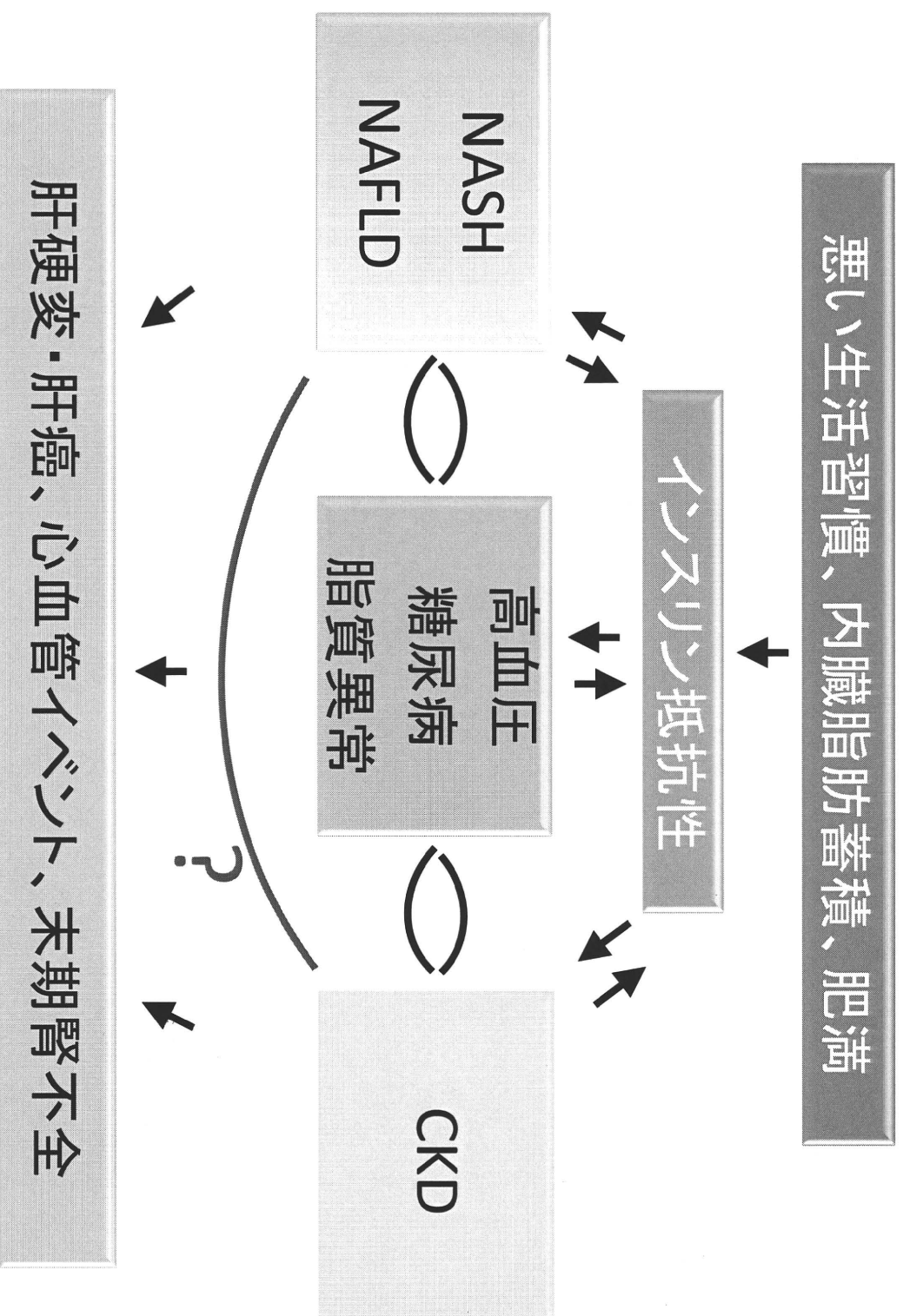


図1. 生活習慣病、NASH/NAFLDとCKD



厚生労働科学研究費補助金 肝炎等克服緊急対策研究事業  
非アルコール性脂肪性肝疾患の病態解明と診断法、治療法の開発に関する研究  
分担研究報告書

非アルコール性脂肪肝炎（NASH）進展の分子・免疫機構に関する研究

研究分担者： 竹原徹郎 大阪大学大学院医学系研究科・准教授

研究要旨：NASH 患者では肝臓内の TUNEL 陽性細胞が増加し、血清の caspase-3/7 活性の増加がみられたことから、発症に肝細胞アポトーシスが関与していることが示された。また、肝臓における p53 の活性化が肝細胞アポトーシスの亢進と肝線維化をおこすことを遺伝子改変マウスを用いて証明した。NKT 細胞を欠損したマウスでは高脂肪食負荷により肝臓の線維化が進展した。NASH の発症・進展には p53 の活性化、アポトーシスの亢進、NKT 細胞の機能低下などの要因が関与していることが示唆された。

共同研究者

宮城琢也 大阪大学消化器内科学特任  
助教

疋田隼人 大阪大学消化器内科学

小玉尚宏 大阪大学消化器内科学

#### A. 研究目的

NASH の発症・進展については Two-hit theory で語られることが多く、2<sup>nd</sup> hit としての酸化ストレスの意義については多くの研究がなされている。しかし、がん遺伝子や細胞死、免疫応答の視点からの解析は十分になされていない。

本研究では近年非腫瘍性病変の病態形成に重要な意義があると注目されている p53 と細胞死、肝臓に豊富に存在する免疫担当細胞である NKT 細胞の NASH 進展における意義について解析を行った。

#### B. 研究方法

NAFLD 患者の肝生検試料および保存血清を用いて、肝細胞アポトーシスを TUNEL 染色、caspase-3/7 活性で評価した。

肝細胞特異的 Mdm2 欠損マウスを独自に作成し、その表現型を解析した。

NKT 欠損マウスに高脂肪食を投与し、5 週後および 15 週後に犠牲させ、肝病変について評価した。

#### C. 研究成果

NAFLD 症例におけるアポトーシスの関与を評価するために、血清中の caspase-3/7 活性を測定した。健常コントロール 690 RLU/50  $\mu$ l (624-755)、単純性脂肪肝 (N = 16) 942 RLU/50  $\mu$ l (624-755)、NASH (N = 18) 1052 RLU/50  $\mu$ l (598-1377)であり、NASH

と健常者の間で有意差を認めた ( $p < 0.05$ )。NASH におけるカスパーゼ依存的細胞死の関与が示唆されたが、NASH と単純性脂肪肝の二つの病態を鑑別するには至らなかった。さらに、パラフィン切片を用いて TUNEL 染色を行ったところ、単純性脂肪肝、NASH とともに肝細胞アポトーシスの亢進が認められた。

肝細胞特異的 Mdm2 欠損マウスはメンデルの法則に従って正常に出生した。6 週齢のマウスを犠死させ評価したところ、同腹対照マウスに比し、肝臓での p53 の mRNA 発現は変化がなかったが、p53 蛋白の発現は増加していた。また、p53 の転写標的である p21、Noxa の mRNA 発現は有意に亢進していた。肝臓では門脈、肝静脈周囲を中心に線維化が亢進し、コラゲン遺伝子の発現も有意に亢進していた。血清 ALT 値は軽度の上昇を認め、TUNEL 陽性肝細胞数が増加していた。BrdU 染色では肝再生に両群間に差を認めなかった。今回作成した肝細胞特異的 Mdm2 欠損マウスでは内在性の p53 の活性化が認められ、肝細胞アポトーシスの誘導とともに、早期から肝線維化の進展を認めた。

NKT KO マウス、WT マウス共に 5 週で高脂肪食 (HFD) にてコントロール食 (ND) に比し有意な体重増加を認めた。5 週での HFD による体重増加に WT/KO 間で有意差は認めなかった。5 週での ALT 値は、WT/ND( $25.2 \pm 0.7$  IU/L)、WT/HFD( $35.8 \pm 2.0$ )、KO/ND( $36.4 \pm 7.5$ )、KO/HFD( $174.8$

$\pm 61.2$ )で、WT、KO 共に HFD にて ND に比し有意な高値を、また HFD にて WT に比し KO で有意な高値を示した。組織学的検討にて、HFD にて WT に比し KO で有意な炎症細胞浸潤を認めた。脂肪化の程度は HFD にて WT/KO 間で有意差は認めなかった。W5 での肝組織中の *Tnf- $\alpha$* 、*Ifn- $\gamma$* 、*Ccl2*、*Ccl4*、*Cxcl9*、*Cxcl10* 遺伝子発現は、いずれも HFD にて WT に比し KO で有意に高値であった。15 週でのシリウスレッド染色による組織学的検討で、HFD にて WT に比し KO で有意な線維化の増強を認めた。

#### D. 考察と結論

NAFLD では肝細胞のアポトーシスが亢進していた。肝細胞における p53 の活性化は肝細胞アポトーシスと肝臓の線維化を誘導した。肝臓における NKT 細胞の欠損は肝線維化の進展に関与していた。

#### E. 研究発表 論文発表

1. Kamada Y, Takehara T, Hayashi N. Adipocytokines and liver disease. *J Gastroenterol* 43: 811-822, 2008.
2. Hikita H, Takehara T, Shimizu S, Kodama T, Li W, Miyagi T, Hosui A, Ishida H, Ohkawa K, Kanto T, Hiramatsu N, Yin X, Hennighausen L, Tatsumi T,

Hayashi N. Mcl-1 and Bcl-xL cooperatively maintain integrity of hepatocytes in developing and adult murine liver. **Hepatology**, 50: 1217-1226, 2009.

3. Kodama T, Takehara T, Hikita H, Shimizu S, Wei Li, Miyagi T, Hosui A, Tatsumi T, Ishida H, Tadokoro S, Ido A, Tsubouchi H, Hayashi N. Thrombocytopenia exacerbates cholestasis-induced liver fibrosis in mice. **Gastroenterology** 138: 2487-2498, 2010.
4. Miyagi T, Takehara T, Uemura A, Nishio K, Shimizu S, Kodama T, Hikita H, Li W, Sasakawa A, Tatsumi T, Ohkawa K, Hayashi N. Lack of invariant natural killer cells elicits liver inflammation and predisposes to liver fibrosis in mice fed with high-fat-diet. **J Gastroenterol** 45: 1247-1254, 2010

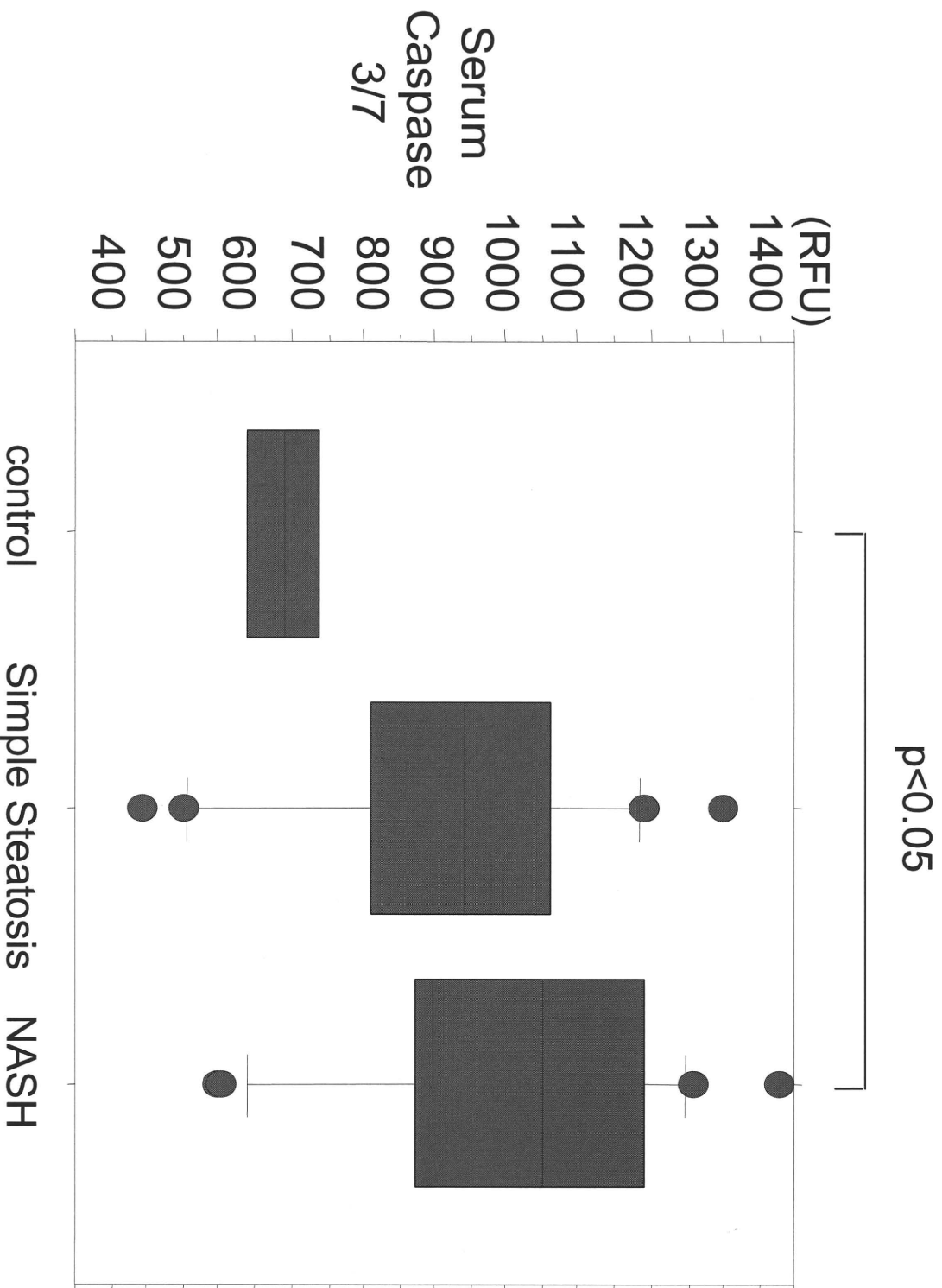
学会発表

なし

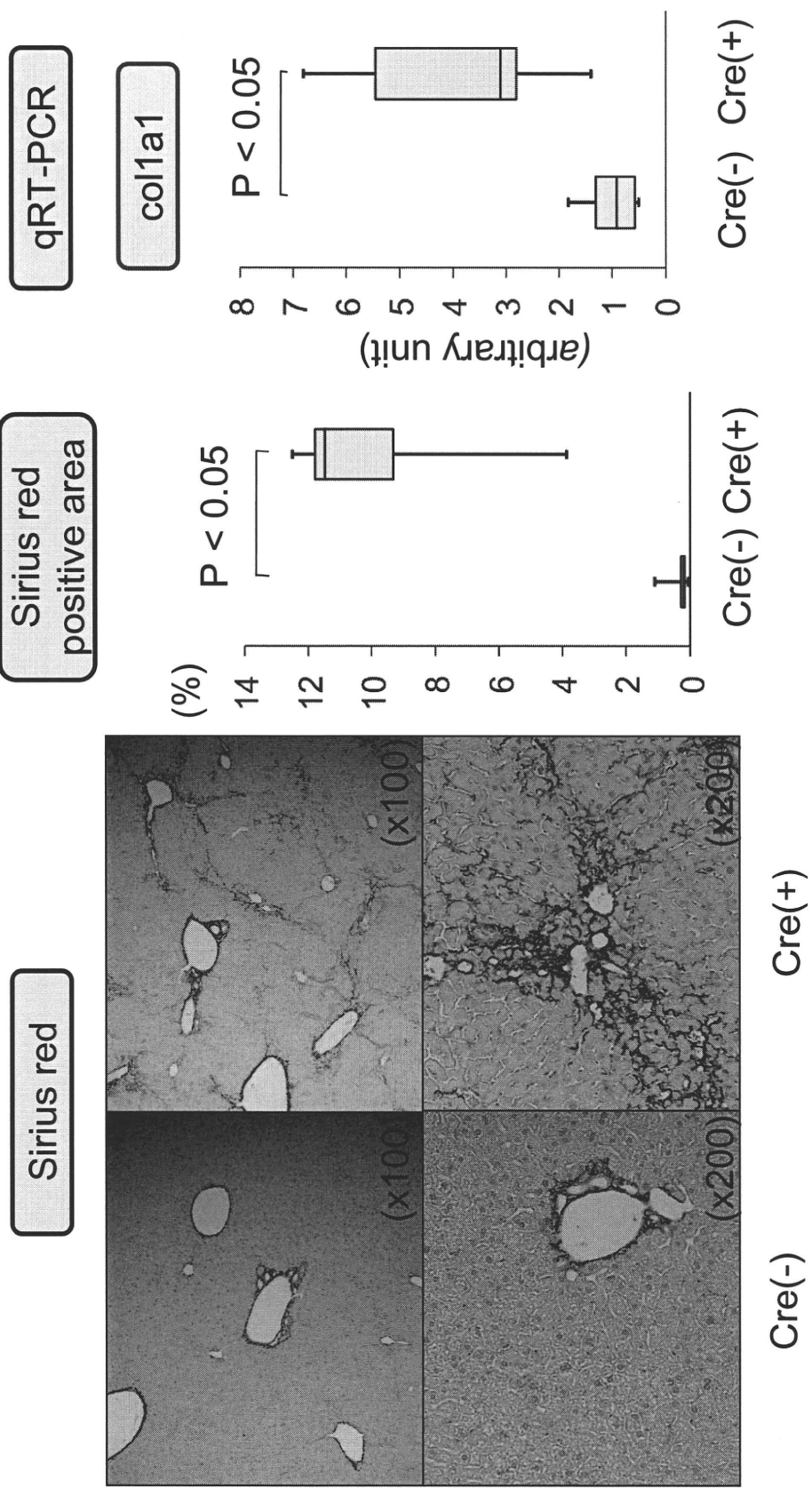
F. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

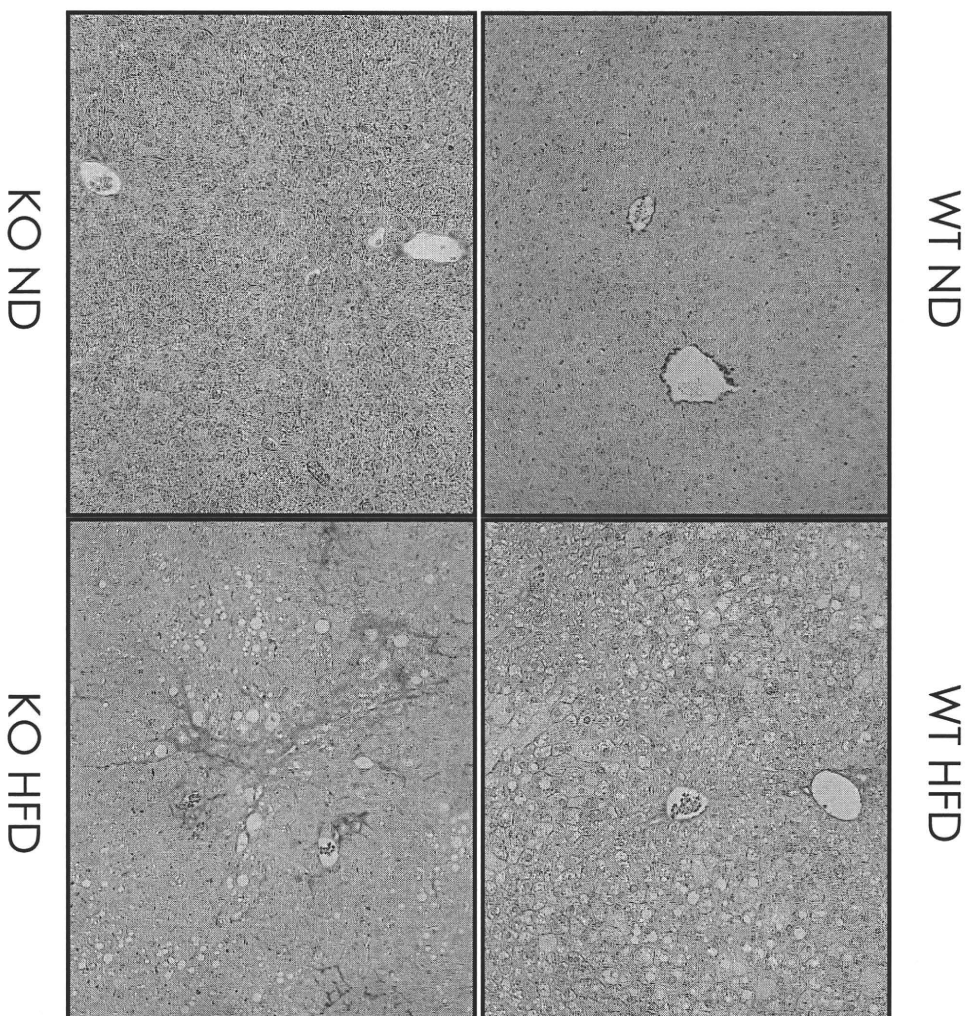
# NAFLDにおける血清caspase-3/7活性の上昇



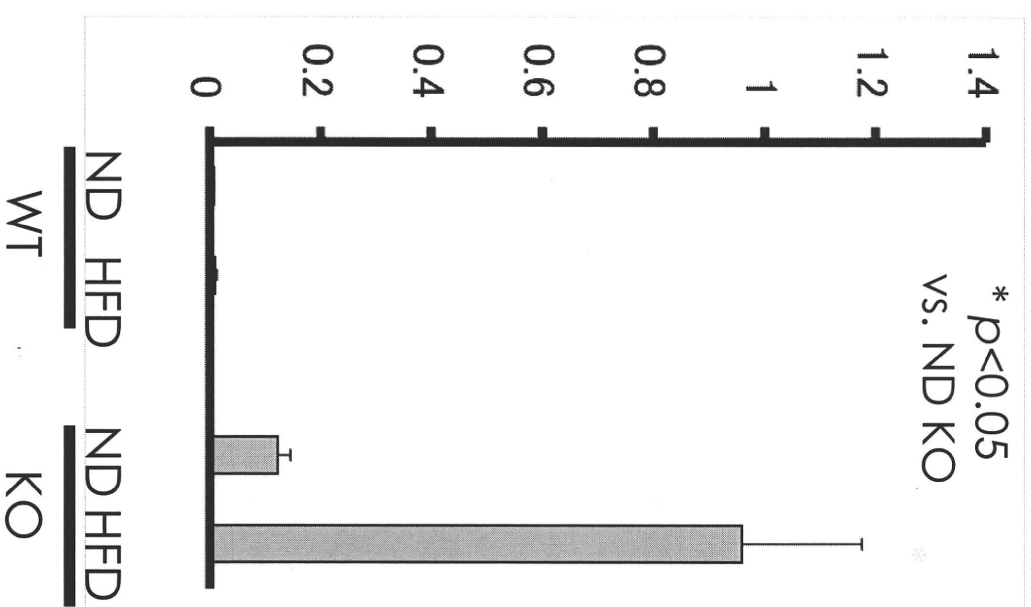
# 肝細胞特異的Mdm2欠損マウスは 肝線維化が自然発生する



# NKT KOマウスにおいて、高脂肪食負荷により有意な肝線維化の増大を認めた



Stained Area (%)



厚生労働科学研究費補助金 肝炎等克服緊急対策研究事業  
非アルコール性脂肪性肝疾患の病態解明と診断法、治療法の開発に関する研究  
分担研究報告書

非アルコール性脂肪性肝疾患の遺伝的背景と動物モデルの開発

研究分担者 西原 利治 高知大学医学部消化器内科教授

**研究要旨：** NASH は非アルコール性脂肪性肝疾患の中でも最も肝病変の進行が懸念される病態であるが、未だ治療法は確立されていない。そこで、発病に繋がる遺伝的素因を明らかにすることにより、疾患の発症機構に迫り、新たな治療法を開発したいと考えた。まず、組織学的に NASH の確診が得られた症例を対象に遺伝子多型を中心として NASH 発症に関与する遺伝的素因を検索した。他方、遺伝子改変を行わない NASH モデル動物の開発を行った。同時に、NASH モデル動物における肝内マクロファージの機能解析を行い NASH 発症における炎症性病変の関与を明らかにした。

**A. 研究目的**

NASH は非アルコール性脂肪性肝疾患の中でも最も肝病変の進行が懸念される病態であるが、未だ治療法は確立されていない。そこで我々は発病に繋がる遺伝的素因を明らかにすることにより、疾患の発症機構に迫り、新たな治療法を開発したいと考えている。

**B. 研究方法**

組織学的に NASH の確診が得られた症例を対象に遺伝子多型を中心として NASH 発症に関与する遺伝的素因を検索する一方、遺伝子改変を行わない NASH モデル動物の開発を行った。また、NASH モデル動物における肝内マクロファージの機能解析を行い NASH 発症における炎症性病変の関与を明らかにした。

平成 20 年度

遺伝的肥満に関連する遺伝子変異とゴルジ装置の機能を制御する機能性遺伝子多型の関与について検討した。

平成 21 年度

成人の NASH の病態に酷似する過食動物モデルを Gold asylthioglucose で作成し、その病態解析を行った。

平成 22 年度

NASH モデル動物の肝臓に浸潤する炎症性細胞の機能について解析し、NASH 発症との関連について検索した。

**C. 研究結果**

平成 20 年度

ゴルジ装置の機能を制御する機能性遺伝子多型が NASH 発症の危険因子



となっていることを明らかにした。

#### 平成 21 年度

Gold asylthioglucoase を用いた過食動物モデルはメタボリックシンドロームに類似する病態を呈し、肝臓の組織像は典型的な NASH の病理学的所見を示した。

#### 平成 22 年度

NASH モデル動物の肝臓に浸潤するマクロファージの食能低下と炎症性サイトカイン産生能の亢進を明らかにし、NASH 発症の機構について明らかにした。

#### D. 考察

NASH は非アルコール性脂肪性肝疾患の中でも最も肝病変の進行が懸念される病態であるが、未だ治療法は確立されていない。そこで、遺伝子改変を行うことなく過食モデルを開発し、成人 NASH のモデル動物とし、その詳細な病態解析を行い、NASH の発症の遺伝的背景と環境因子の相互作用を明らかにした。今後は、これらのモデル動物を用いて新しい治療法の開発を行う予定である。

#### E. 結論

NASH の発症は遺伝的素因と肥満などの環境因子の相互作用によることが明らかとなった。この病態の治療に重要なキーワードは下記の通りである。

1. 遺伝的素因
2. 環境因子

3. 肥満・メタボリックシンドローム

#### F. 研究発表

##### 平成 20 年度

##### 1. 論文発表

1) Hayashi Y, Toda K, Saibara T, Okamoto S, Osanai M, Enzan H, Lee GH. Expression of fascin-1, an actin-bundling protein, in migrating hepatoblasts during rat liver development. Cell Tissue Res. 2008;334:219-226.

2) Enya M, Horikawa Y, Kuroda E, Yonemaru K, Tonooka N, Tomura H, Oda N, Yokoi N, Yamagata K, Shihara N, Iizuka K, Saibara T, Seino S, Takeda J. Mutations in the small heterodimer partner gene increase morbidity risk in Japanese type 2 diabetes patients. Hum Mutat. 2008;29:E271-277.

3) Toda K, Okada T, Hayashi Y, Saibara T. Preserved tissue structure of efferent ductules in aromatase-deficient mice. J Endocrinol. 2008;199:137-146.

##### 2. 学会発表

1) Hirose A, Ono M, Saibara T, Nozaki Y, Takahashi M, Iwasaki S, Oben JA, Onishi S. Angiotensin II type 1 receptor blocker attenuates the progression of nonalcoholic steatohepatitis (NASH). European

- Association for the Study of Liver Disease, Milan, 2008
- 2) Ono M, Kubota K, Hirose A, Nozaki Y, Takahashi M, Iwasaki S, Saibara T, Ogawa Y, Onishi S, Oben JA. Super-paramagnetic iron oxide-MRI: A novel technique in experimental liver studies shows defective Kupffer cell phagocytic function in human non alcoholic fatty liver disease. European Association for the Study of Liver Disease, Milan, 2008
  - 3) Tokumitsu K, Ogasawara K, Maki M, Hirose A, Nozaki Y, Takahashi M, Ono M, Iwasaki S, Saibara T, Onishi S. Methionine-choline metabolism is involved in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. European Association for the Study of Liver Disease, Milan, 2008
  - 4) Kuratani Y, Ichikawa H, Hirose A, Nozaki Y, Takahashi M, Iwasaki S, Saibara T, Onishi S. Secondary extrahepatic portal obstruction resulted from thrombus in splenic vein aneurysma. 7<sup>th</sup> Japan Society of Hepatology Single Topic Conference, Fukuoka, 2008
  - 5) 西原利治: 非アルコール性脂肪肝炎の病態 基調発言, 第 12 回日本病態栄養学会 シンポジウムIV; 非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) の病態栄養と栄養管理、京都、2009/01/10
  - 6) 小野正文、西原利治、大西三朗： 検診受診者における NASH の高リスク群の解析, 第 51 回日本消化器病学会大会シンポジウム4 「メタボリック症候群における肝障害」 2009/10/14 京都
  - 7) 小野正文、廣瀬享、西原利治： 123I-BMIPP 肝脂肪酸代謝シンチを用いた非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) の脂肪酸  $\beta$  酸化の解析とその有用性について、第 38 回日本肝臓学会西部会 シンポジウム 「NASH 研究の最前線」2009/12/4 米子
  - 8) 越智経浩、小野正文、西原利治： メタボリックシンドロームにおける NASH 線維化進展への影響 第 13 回日本肝臓学会大会パネルディスカッション7; 消化器疾患と生活習慣病、京都、2009. 10. 15
- 平成 21 年度
1. 論文発表
    - 1) Harada N, Soejima Y, Taketomi A, Yoshizumi T, Uchiyama H, Ikegami T, Saibara T, Nishizaki T, Maehara Y. Recurrent familial hypobetalipoproteinemia-induced nonalcoholic fatty liver disease after living donor liver transplantation. Liver Transpl. 2009;15:806-809.
  2. 学会発表
    - 1) 小野正文、西原利治、大西三朗： ゴルジ装置の機能に影響を与える遺伝子の遺伝子多型は風船様肝細胞の危険因子である、第 95 回日本消化器病学会総会 ワークショップ 12: NAFLD の経時的進展、札幌、2009/05/09

2) 廣瀬 享、小野正文、野崎靖子、高橋昌也、岩崎信二、西原利治、大西三朗：NASH 肝線維化におけるアンギオテンシンⅡタイプ1レセプター活性化機序の解明，第45回日本肝臓学会総会 ワークショップ1：NASH・NAFLDの基礎、神戸、2009/06/04.

## 平成22年度

### 1. 論文発表

1) Yasui K, Hashimoto E, Komorizono Y, Koike K, Arii S, Imai Y, Shima T, Kanbara Y, Saibara T, Mori T, Kawata S, Uto H, Takami S, Sumida Y, Takamura T, Kawanaka M, Okanoue T; The Japan NASH Study Group, Characteristics of patients with nonalcoholic steatohepatitis who develop hepatocellular carcinoma. Clin Gastroenterol Hepatol. 2011 Feb 11.

2) Sumida Y, Yoneda M, Hyogo H, Yamaguchi K, Ono M, Fujii H, Eguchi Y, Suzuki Y, Imai S, Kanemasa K, Fujita K, Chayama K, Yasui K, Saibara T, Kawada N, Fujimoto K, Kohgo Y, Okanoue T; Japan Study Group of Nonalcoholic Fatty Liver Disease (JSG-NAFLD). A simple clinical scoring system using ferritin, fasting insulin, and type IV collagen 7S for predicting steatohepatitis in nonalcoholic fatty liver disease. J Gastroenterol. 2011;46:257-268.

3) Takeuchi T, Iwasaki S, Miyazaki J, Nozaki Y, Takahashi M, Ono M, Saibara T, Furihata M. Matrix

metalloproteinase-1 expression in splenic angiosarcoma metastasizing to the serous membrane. Int J Clin Exp Pathol. 2010;3:634-639.

4) Yoshioka S, Hamada A, Jobu K, Yokota J, Onogawa M, Kyotani S, Miyamura M, Saibara T, Onishi S, Nishioka Y. Effects of Eriobotrya japonica seed extract on oxidative stress in rats with non-alcoholic steatohepatitis. J Pharm Pharmacol. 2010;62:241-246.

5) Toda K, Hayashi Y, Saibara T. Deletion of tumor necrosis factor-alpha receptor type 1 exacerbates insulin resistance and hepatic steatosis in aromatase knockout mice. Biochim Biophys Acta. 2010;1801:655-664.

6) Asanuma T, Ono M, Kubota K, Hirose A, Hayashi Y, Saibara T, Inanami O, Ogawa Y, Enzan H, Onishi S, Kuwabara M, Oben JA. Super paramagnetic iron oxide MRI shows defective Kupffer cell uptake function in non-alcoholic fatty liver disease. Gut. 2010;59:258-266.

7) Hidaka M, Iwasaki S, Matsui T, Kawakita T, Inoue Y, Sakai T, Harada N, Takemoto S, Nagakura S, Kiyokawa T, Takahashi M, Saibara T, Onishi S, Kawano F. Efficacy of bezafibrate for chronic GVHD of the liver after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Bone Marrow Transplant. 2010;45:912-918.

G. 知的所有権の取得状況

今回の研究内容については特になし。

# 非アルコール性脂肪性肝疾患の 病態解明と診断法、治療法の 開発に関する研究

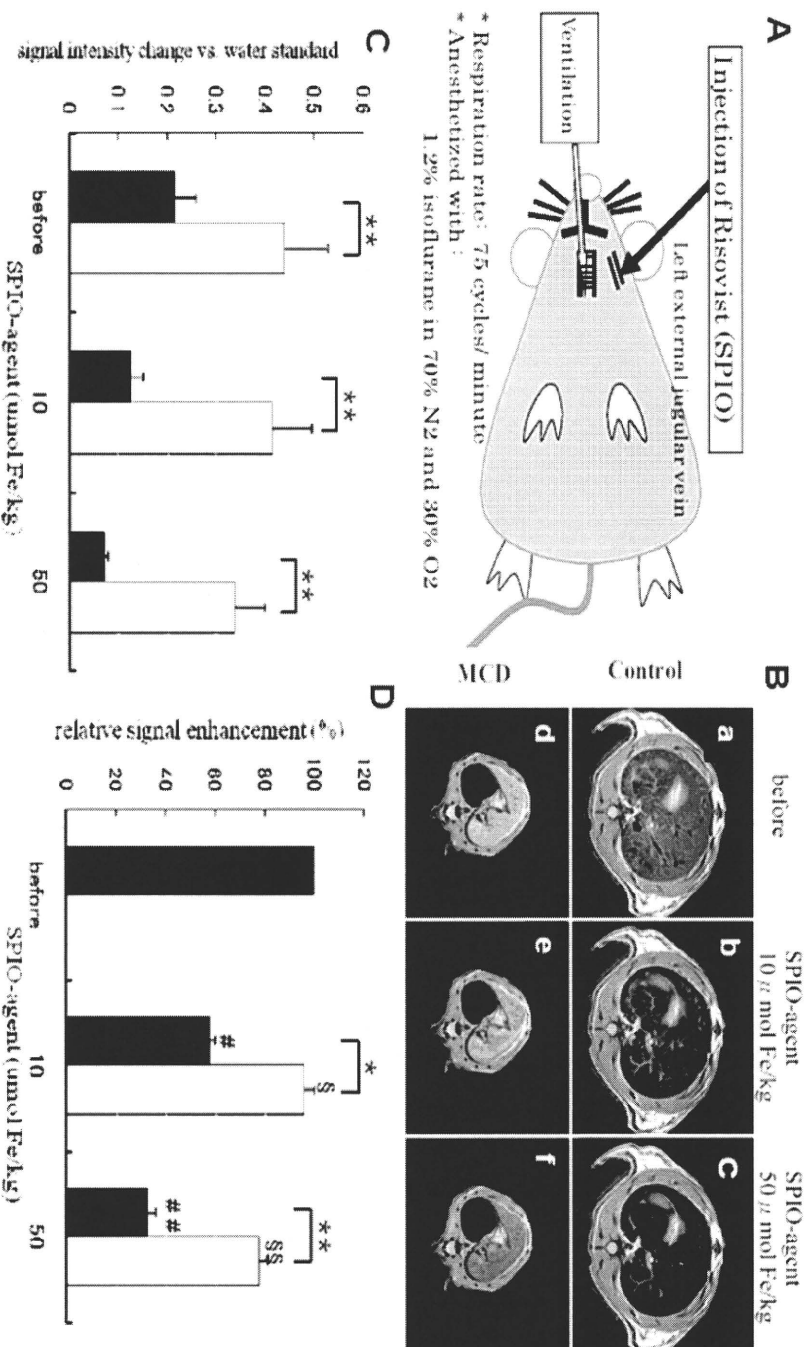
高知大学医学部消化器内科学  
西原利治

**Background:** The pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is incompletely understood. Kupffer cells (KC), phagocytic liver-resident macrophages, provide a protective barrier against egress of endotoxin from the portal to the systemic circulation. It is not known if KC phagocytic function is impaired in NAFLD. Super-paramagnetic Iron Oxide (SPIO) magnetic resonance imaging is a comparatively technology dependent on KC phagocytic function. The aim of the present study was to evaluate KC uptake function, in patients and experimental animals with NAFLD, using SPIO.

**Methods:** Abdominal CT and histological examination of liver biopsy specimens were used to estimate the degree of steatosis in patients with NAFLD and chronic hepatitis C controls. SPIO-MRI was then performed in all patients. Normal rats fed a methionine-choline deficient (MCD) diet to induce non-alcoholic steatohepatitis (NASH), the more severe stage of NAFLD, and obese, insulin resistant, Zucker *fa/fa* rats with steatohepatitis, were also studied with SPIO-MRI and analysed for hepatic uptake of fluorescent microbeads. Immuno-histochemical analysis evaluated the numbers of KC in patients and rat livers.

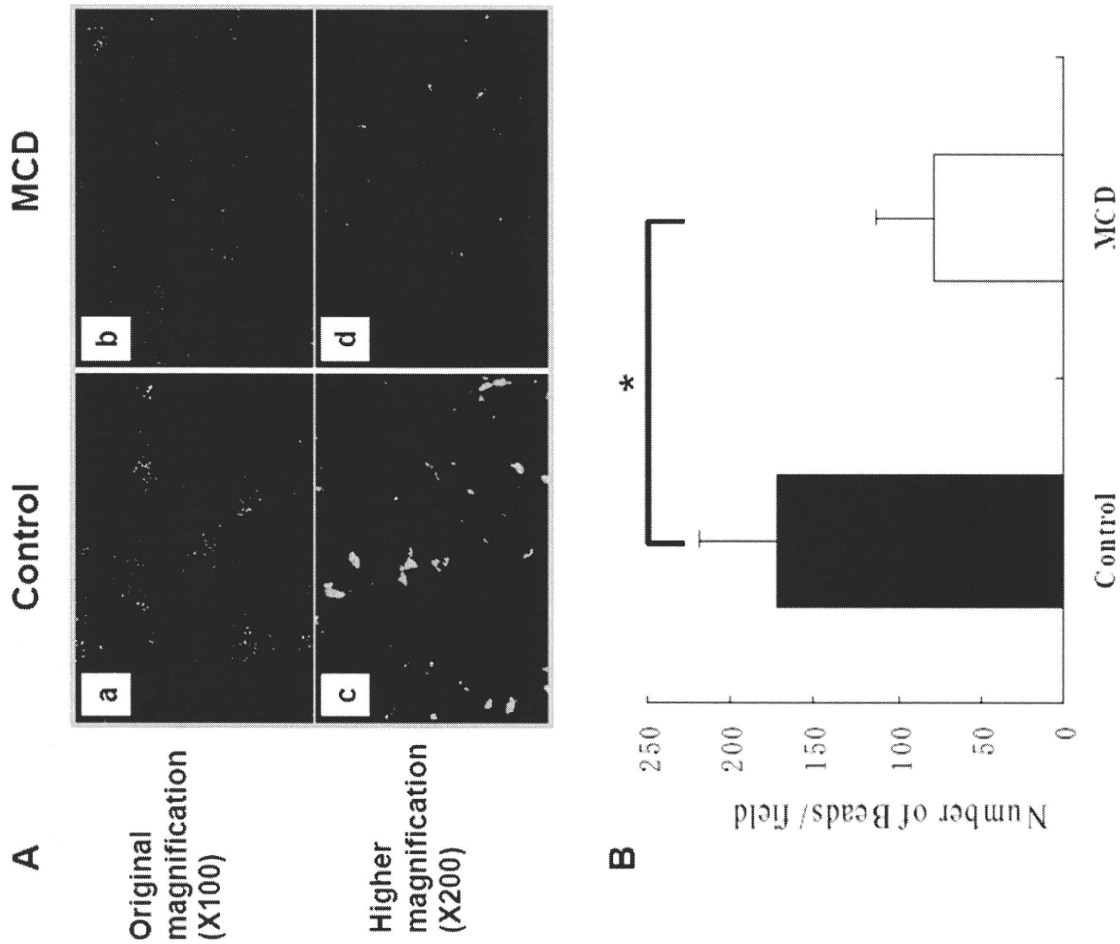
**Results:** Relative signal enhancement (RSE), inversely proportional to KC function, was higher in patients with NAFLD compared to controls and with the degree of steatosis on CT. RSE also positively correlated with the degree of steatosis on histology and was similarly higher in rats with induced severe NAFLD (NASH). On immunohistochemistry defective phagocytic function was the result of reduced phagocytic uptake and not due to reduced KC numbers in rats or patients with NAFLD. Conclusions: KC uptake function is significantly impaired in NAFLD patients and experimental animals with NASH, worsens with the degree of steatosis and is not due to a reduction of KC numbers.

Figure 1



**Figure 1 Rat SPIO-MRI studies (A)** Schema of the rats SPIO-MRI experiment. The rats were tracheotomized, intubated and anesthetized with 1.2% isoflurane in 70% N<sub>2</sub> and 30% O<sub>2</sub> during the MRI experiments. Ventilation rate was adjusted to 75 cycles/minute for synchronizing with the gating apparatus of the MRI. SPIO contrast was administered via a cannulated left external jugular vein. **(B)** Representative MR images of rats SPIO studies. After SPIO administration, the SI of control rats dramatically decreased, whereas little signal reduction was observed in MCD-fed rats. **(C)** Changes of SI in rat livers. Signal reduction occurred in control (n=4) and MCD-fed rats (n=4) respectively, after injection of SPIO (\*\*p<0.01). ■ : control rats, □ : MCD-fed rats (D) Here, SI was compared as relative signal enhancement RSE (%). After infusion of SPIO (10μmol Fe/kg), a substantial reduction of SI was observed in control rats (RSE = 100% versus 58.0 ± 2.0 %, #p<0.05), whereas there was no statistically significant reduction in RSE in the livers of MCD-fed rats (RSE = 100% versus 95.4 ± 4.7%, §p>0.05). With SPIO at 50μmol Fe/kg a more marked reduction in RSE, than was observed at 10μmol Fe/kg, was seen with control rats (100% versus 32.5 ± 3.6 %, n=4, ##p<0.05) compared with MCD-fed rats (100% versus 77.3 ± 3.7%, n=4, §§p<0.05). Furthermore, there was a clear and statistically significant difference in RSE between control and MCD-fed rats at either of the SPIO concentrations, with the RSE of the MCD-fed rats being consistently higher than controls (95.4 ± 4.7% versus 58.0 ± 2.0 %, \*p<0.05 at SPIO 10μmol Fe/kg, and 77.3 ± 3.7% versus 32.5 ± 3.6 %, \*\*p<0.05 at SPIO 50μmol Fe/kg). ■ : control rats, □ : MCD-fed rats

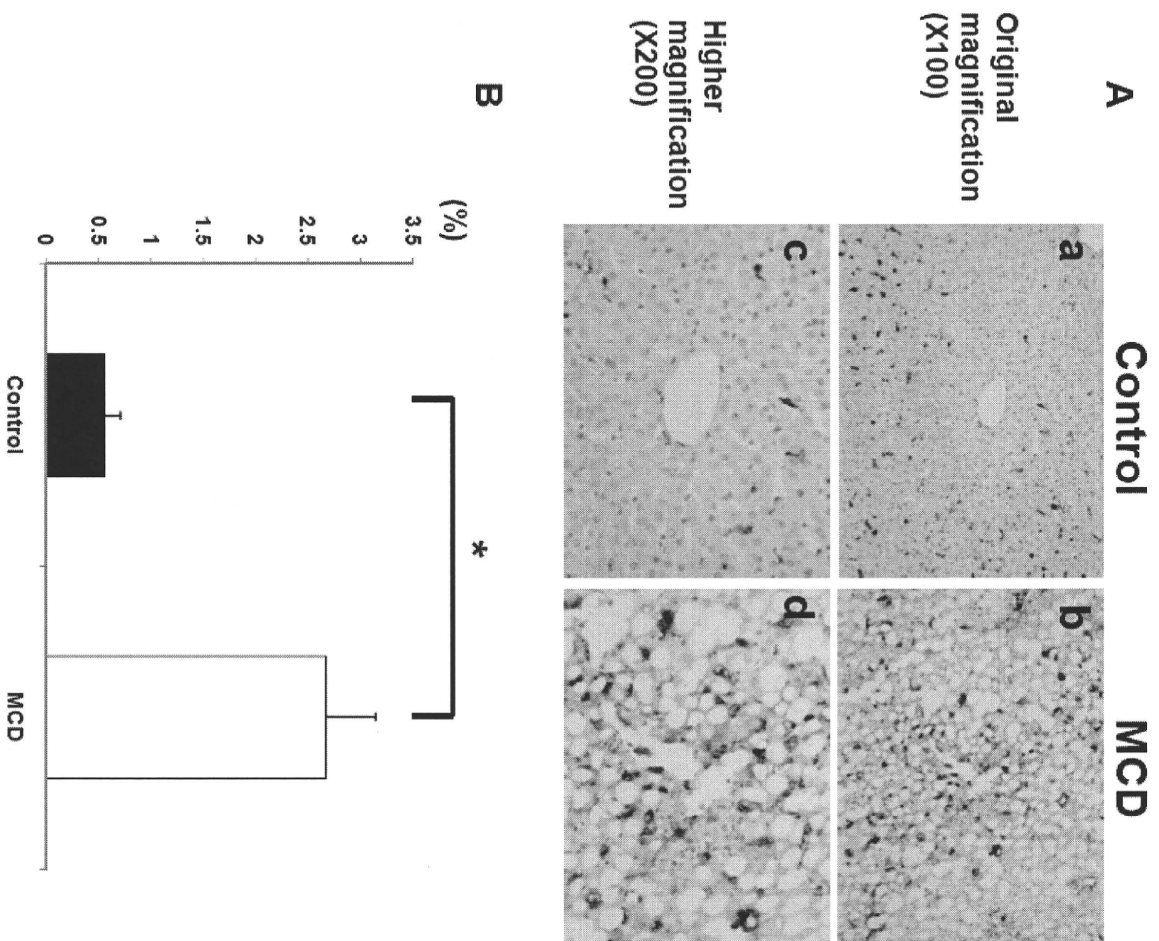
Figure 2



**Figure 2 Uptake of fluorescent microspheric beads by KCs (A)** Uptaken microbes in liver section as judged by fluorescent microscopy. Fluorescent microbes formed large aggregates in control livers, whereas the beads were disseminated in the MCD-fed rat livers. **(B)** The number of uptaken fluorescent microbes in liver sections of control and MCD-fed rats. The number of fluorescent beads in MCD-fed rat livers was fewer than that in control rat livers (171.33 ± 48.37 / field in control rats (n=6), 78.63 ± 34.8 /field in MCD-fed rats (n=6), \* p<0.005). ■ : control rats, □ : MCD-fed rats



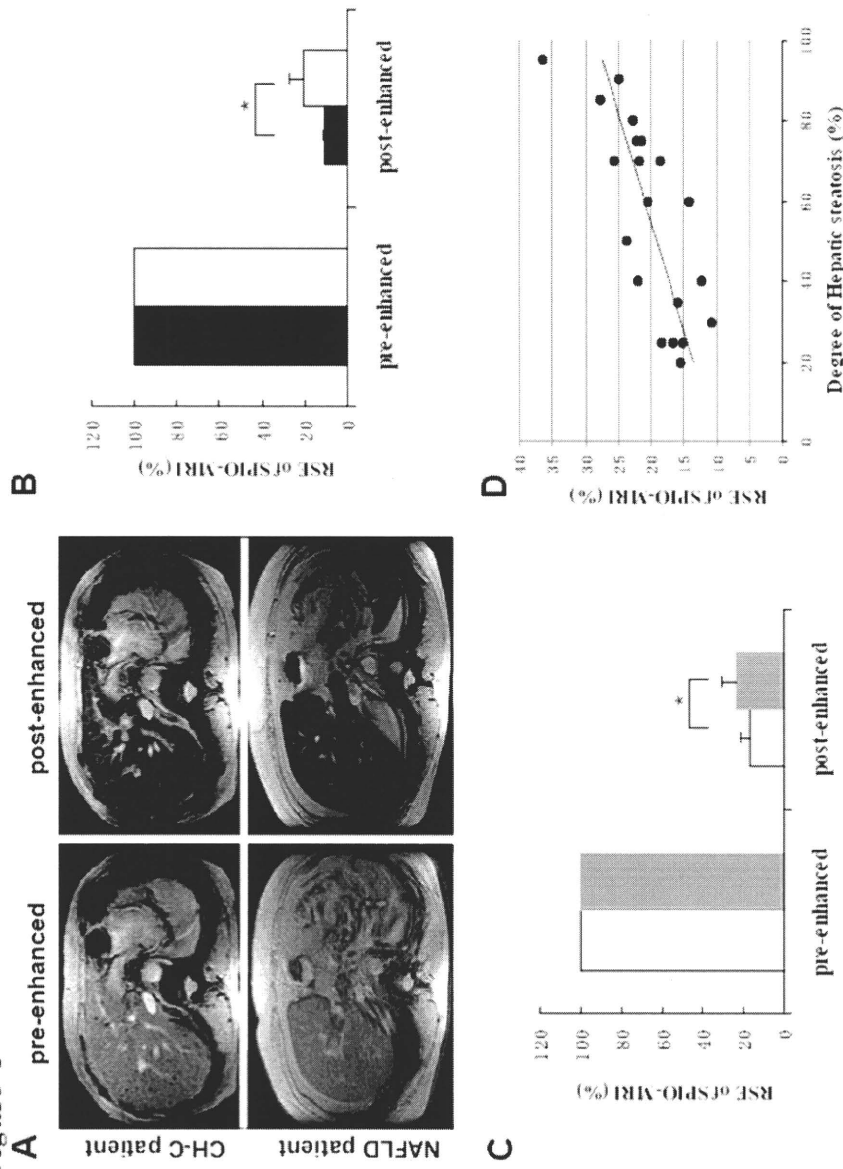
Figure 3



**Figure 3 The number of KCs in the livers of MCD-fed rats (A) Immunostaining of KCs in liver sections. The number of KCs in the livers of MCD-fed rats was increased compared to that of controls. (B) The area occupied by KCs cells estimated by image analysis in the livers of MCD-fed rats ( $2.6675 \pm 0.4795\%$ ,  $n=6$ ) is clearly shown to be increased compared to that of control rats ( $0.5606 \pm 0.1541\%$ ,  $n=6$ , \*  $p < 0.0001$ ).**

■ : control rats, □ : MCD-fed rats

Figure 4



**Figure 4 SPIO-MRI in patients with NAFLD.** (A) Representative MRI images of a patient with NAFLD and another with CH-C, pre-enhancement and post-enhancement with SPIO. (B) The RSE of the livers of patients with NAFLD and CH-C controls. RSE in the NAFLD group was statistically higher compared with the CH-C control group ( $20.87 \pm 6.23\%$  (n=26) versus  $10.13 \pm 1.31\%$  (n=10),  $*p<0.0001$ ) (■ : Chronic Hepatitis C (CH-C), □ : non-alcoholic fatty liver diseases (NAFLD))(C) The relationship between the RSE and the degree of hepatic steatosis on abdominal CT. The RSE of patients with NAFLD who had mild hepatic steatosis was remarkably lower than that in patients with NAFLD who had moderate to severe hepatic steatosis ( $16.77 \pm 4.44\%$  (n=8) versus  $23.77 \pm 6.29\%$  (n=14),  $*p<0.05$ ). □ : NAFLD with mild hepatic steatosis, ■ : NAFLD with moderate to severe hepatic steatosis (D) The relationship between degree of hepatic steatosis and the RSE of SPIO-MRI in NAFLD patients. A strong positive correlation was observed between the degree of hepatic steatosis and the RSE on SPIO-MRI in the livers of patients with NAFLD ( $r=0.757$ ,  $p<0.0005$ ,  $n=20$ ).

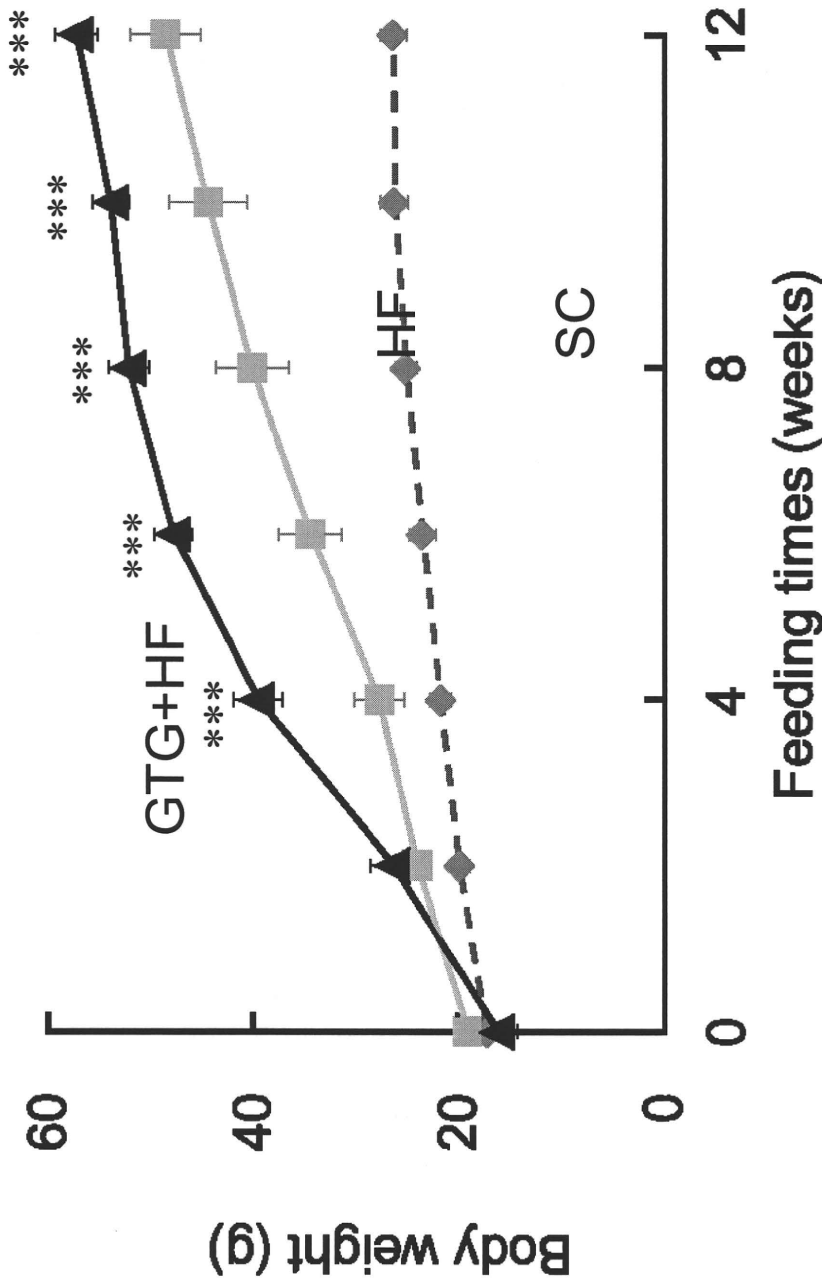
**Background:** The search for effective treatments of non-alcoholic steatohepatitis (NASH), now the most common chronic liver disease in affluent countries, is hindered by a lack of animal models having the range of anthropometric and pathophysiological features as human NASH.

**Aims:** To examine if mice treated with gold-thioglucose (GTG) - known to induce lesions in the ventromedial hypothalamus, leading to hyperphagia and obesity - and then fed a high-fat-diet (HF) had a comprehensive histological and dysmetabolic phenotype resembling human NASH. **Methods:** C57BL/6 mice were injected intra-peritoneally with GTG and then fed HF for 12 weeks (GTG+HF). The extent of abdominal adiposity was assayed by CT scanning. A glucose tolerance test (GTT) and an insulin tolerance test (ITT) were performed to evaluate insulin resistance (IR). Histological, molecular and biochemical analyses were also performed.

**Results:** GTG+HF induced dysmetabolism, with hyperphagia, obesity with increased abdominal adiposity, IR and consequent steatohepatitis, with hepatocyte ballooning, Mallory-Denk bodies, peri-venular and pericellular fibrosis as seen in adult NASH, paralleled by an increased expression of the pro-fibrogenic factors, TGF- $\beta$ 1 and TIMP-1. Plasma adiponectin and expression of adiponectin receptor 1 and 2 were decreased, while PPAR- $\gamma$  and FAS were increased in the livers of GTG+HF mice. In addition, GTG+HF mice showed glucose intolerance and severe IR.

**Conclusions:** Treatment with GTG and HF diet induce, in mice, a comprehensive model of human NASH, with the full range of dysmetabolic and histological abnormalities.

**Figure 1**



**Fig. 1. Time courses of body weight gain in GTG and HF induce obesity GTG+HF mice gained more and faster weight compared to HF or SC groups.**  
SC: Standard chow; HF: high fat diet; GTG+HF: GTG treated / HF fed. \*\*\*p<0.001 vs. HF or SC, n=6