

SDT fattyラットを用いた脂肪性肝疾患に関する研究

誌名	栄養生理研究会報
ISSN	02864754
著者名	石井,幸仁 本橋,雄 村松,真 勝田,佳朋 美谷島,克宏 笹瀬,智彦 久米,新一 山田,宜永 太田,毅
発行元	家畜栄養生理研究会
巻/号	59巻2号
掲載ページ	p. 97-107
発行年月	2015年10月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



SDT fatty ラットを用いた脂肪性肝疾患に関する研究 —新規 NASH モデルの確立に向けて—

石井幸仁¹・本橋 雄¹・村松 真¹・勝田佳朋¹・美谷島克宏²・
笹瀬智彦¹・久米新一³・山田宜永⁴・太田 毅¹

(¹日本たばこ産業 医薬総合研究所、²日本たばこ産業 安全性研究所、
³京都大学大学院農学研究科、⁴新潟大学自然科学研究科)

1. はじめに

わが国では、生活習慣と社会環境の変化に伴い、肥満やメタボリック症候群の人口増加が懸念されている。また、これらの変化は、内臓脂肪蓄積やインスリン抵抗性を誘導し、肝臓においては非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD: Non-Alcoholic Fatty Liver Disease) 発症のリスクを増加させている¹⁾。NAFLD は、肝細胞に脂肪沈着のみを認める単純性脂肪肝と脂肪化に加えて肝細胞の壊死・炎症や線維化を伴う非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH: Non-Alcoholic Steatohepatitis) に大別され、NASH は発症すると肝硬変、肝がんへと進行する可能性がある²⁾。また、NASH は、高血圧、脂質異常症、糖尿病などが併発している頻度が高く、生命予後が一般人口と比較して悪いことが知られている^{3,4)}。これらから、NASH 又はその疑いを発見し、早期に治療を開始することが重要な課題となっている。全世界における NAFLD の有病率は、評価方法によっても異なるが、一般人口の 20% 前後であると推定される⁵⁾。特に、2型糖尿病を有する患者における罹患率は約 80% と報告されている⁶⁾。また、わが国における NAFLD の約 10~20% が NASH であると推定され、このうち約 5~20% が肝硬変に移行すると考えられている⁷⁾。NASH の治療法としては、食事療法、運動療法などの生活習慣の改善が行われているが、現在のところ、NASH を適応とした治療薬は承認されていない。一方、NASH 病態発症の基

盤となる分子メカニズムについても、十分に解明できておらず、依然として不明な点が多く残されている。現在、NASH の発症機序としては、肝実質細胞への中性脂肪沈着 (脂肪肝) が起こり、さらに肝細胞障害要因や遺伝素因などが加わり発症するとされている⁸⁾ (Fig.1)。脂肪肝の機序としては、過栄養・運動不足、肝への脂肪酸の動員増加、中性脂肪の合成亢進、脂肪酸の β 酸化障害などである。一方、肝細胞障害要因の機序としては、酸化ストレス、エンドトキシン、アディポサイトカイン、小胞体ストレスの関与が挙げられる。肝臓での TG 蓄積は、小胞体ストレスを惹起し、ミトコンドリアが障害されることで酸化ストレスを誘発する。また、肝臓への過剰な鉄の蓄積は酸化ストレスの発生を助長し、脂質過酸化物の生成、炎症細胞浸潤を伴う肝細胞障害や肝星細胞活性化を介した肝線維化を促進する。腸管細胞叢由来のエンドトキシンは TNF- α 、IL-6、IL-8 などの炎症性サイトカインを誘導する。また、アディポサイトカインは肝細胞アポトーシス、インスリン抵抗性の促進により肝障害を促進することが知られている。NASH の病態発症は、多くの糖脂質代謝、炎症、各種ストレス因子を巻き込み、相互に影響を及ぼしあっている。今後、複雑な病態解明や新しい治療薬の開発を行うためには、モデル動物を用いた研究が必須となってくると思われる。

現在 NASH モデル動物として研究に用いられて

Proceedings of Japanese Society for Animal Nutrition and Metabolism 59(2): 97-107, 2015.

Study on fatty liver disease in SDT fatty rats -the establishment of a new NASH model-

Yukihito Ishii¹, Yu Motohashi¹, Makoto Muramatsu¹, Yoshiaki Katsuda¹, Katsuhiko Miyajima², Tomohiko Sasase¹, Shinichi Kume³, Takahisa Yamada⁴, and Takeshi Ohta¹

(¹Japan Tobacco Inc., Central Pharmaceutical Research Institute; ²Japan Tobacco Inc., Central Pharmaceutical Research Institute, Toxicology Research Laboratories; ³Kyoto University, Graduate School of Agriculture; ⁴Niigata University, Graduate School of Science and Technology)

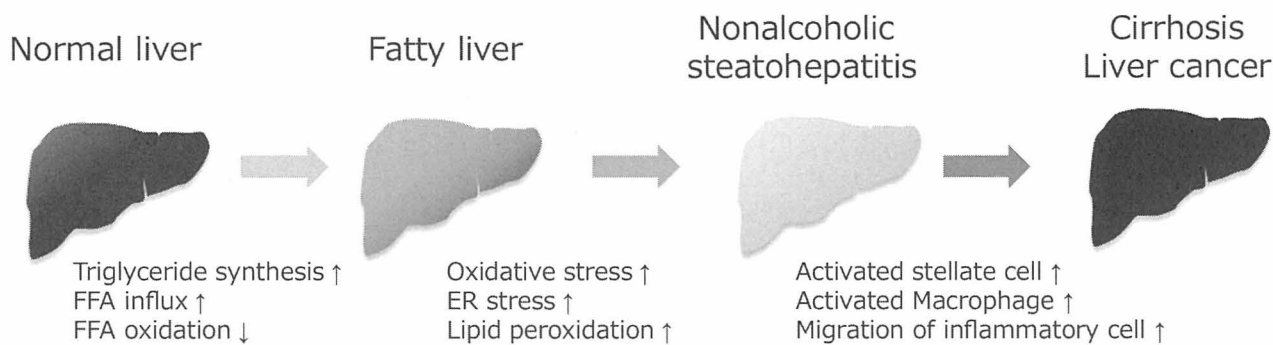


Fig. 1. Schematic representation of NAFLD pathogenic mechanisms.

いる実験動物は、主に遺伝子改変と食餌誘発性のモデル動物である⁹⁾。遺伝子改変動物としては、肝細胞特異的 PTEN 欠損マウス、メラノコルチン4受容体欠損マウスなどの単一遺伝子改変のマウスが報告されている。また、食餌誘発性のモデル動物としては、メチオニン-コリン欠乏食、コレステロール・コル酸食などを負荷した動物が報告されているが、これらのモデル動物は一部のヒト病態しか反映されておらず、ヒトと類似した病態を示すモデル動物の開発が望まれている。SDT fatty ラットは、非肥満型2型糖尿病モデル SDT ラットに Zucker fatty ラットの *Lepr^{fa}* 遺伝子をスピードコンジェニック法により導入し、確立されたコンジェニックラットである¹⁰⁾ (Fig. 2)。SDT fatty ラットは過食による肥満を呈し、糖尿病および糖尿病合併症の発症が SDT ラットに比べて早期化することが報告され、糖尿病モデルとしての有用性が示されている¹¹⁾。しかしながら、SDT fatty ラットの病態解析において肝臓についての知見は得られていない。そこで、本研究では SDT fatty ラットの肝臓に着目し、SDT fatty ラットの NASH モデルとしての可能性について検討した。

2. 実験方法

実験には雌性 SDT fatty ラット (日本たばこ産業) 及び雌性 SD ラット (日本チャールズリーバー) を用いた。両動物は、8週齢において、1群5匹の5群に群分けし、8、16、24、32及び40週齢にて各動物を解剖した。動物は個別飼育により紫外線照射された水道水及び通常飼料 (CRF-1; 日本チャールズリーバー) を自由摂取させ、12時間の明暗周期 (明期: 8~20時、暗期: 20~8時)、温度 $23 \pm 3^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 15\%$ に環境統御された飼育室で維持した。SDT fatty ラットの体重及び血液生化学パラメータ (グルコース、トリグリセライド (triglyceride; TG)、総コレステロール (total cholesterol; TC)、アラニンアミノトランスフェラーゼ (alanine aminotransferase; ALT)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (aspartate aminotransferase; AST) を8週齢から40週齢まで8週間毎に測定した。血液生化学パラメータは、非絶食下のラット尾静脈より採血後、血清中のグルコース、TG、TC、ALT 及び AST 濃度を自動分析器 (Model 7180、日立製作所) により測定した。8、16、24、32及び40週齢にて摘出した肝臓は、肝

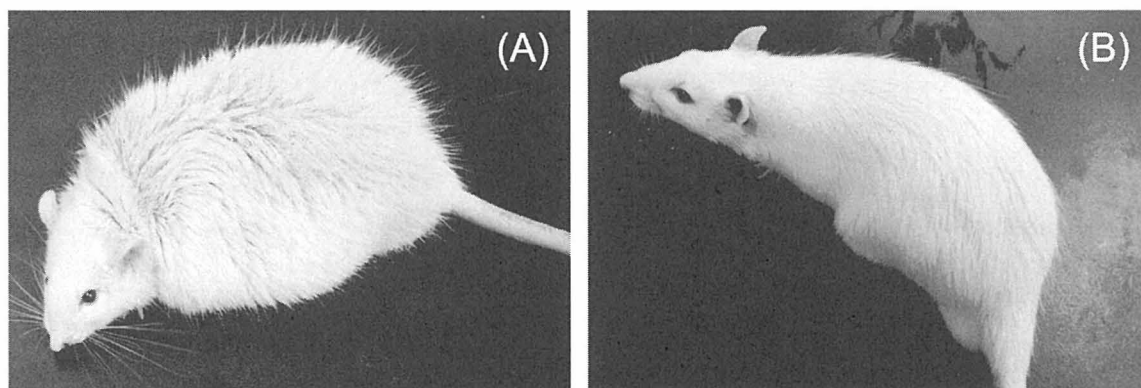


Fig. 2. SDT fatty rat and SDT rat at 16 weeks of age. A: SDT fatty rat; B: SDT rat

臓中 TG、遊離脂肪酸 (free fatty acid ; FFA) 含量、遺伝子測定及び病理組織学的検査に供した。肝臓中脂質の抽出は、肝切片 (約 100mg) にメタノール (0.5ml) を添加し、ホモジナイズ後、クロロホルム 1ml を添加することにより行い、乾固後 2-プロパノール 200 μ l に再溶解し、先の自動分析器 (Model 7180、日立製作所) にて TG 濃度を測定した。肝臓中 FFA 濃度は、NEFA-C キット (和光純薬工業) を用いて測定した。また、遺伝子測定は GenElute™ Mammalian Total RNA キット (Sigma, USA) を用いて Total RNA を抽出し、MLV reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 及び Oligo(dT) (12-18) primer を添加した後、Amp PCR system 9700 (PE Applied Biosystems, FosterCity, CA, USA) を用いて cDNA を調製した。Real time PCR 定量は、ABI PRISM 7700 serquence Detector (PE Applied Biosystems, FosterCity, CA, USA) を用いて反応させた。反応液は、cDNA サンプル (50 ng Total RNA 相当/10 μ l/well)、3.5mM MgCl₂、0.3 μ M primer、0.1 μ M Fluorescent probe 及び 1.25 U AmpliTaq Gold を加え、調製した。ステロール調節配列結合蛋白 (sterol regulatory element-binding protein 1c ; SREBP-1c)、脂肪酸合成酵素 (fatty acid synthase ; FAS) 及びミクロソームトリグリセリド輸送タンパク質 (microsomal triglyceride transfer protein ; MTP) の primer と probe は、Primer Expree Software (PE Applied Biosystems, FosterCity, CA, USA) を用いて設計した。アセチル CoA カルボキシラーゼ (Acetyl-CoA carboxylase ; ACC)、 α 平滑筋アクチン (α -smooth muscle actin ; α -SMA) 及び I 型コラーゲン (collagen type 1) は、Taqman Gene Expression Assays (PE Applied Biosystems, FosterCity, CA, USA) を使用した。内部標準は、 β -actin を用いた。残りの肝臓については 10%ホルマリン液で浸漬固定後パラフィン包埋し、薄切切片を作製した。パラフィン切片は脱パラフィン処理後、Hematoxyline-Eosin (HE) 染色及びシリウスレッド染色を施し、病理組織学的検査に供した。

3. SDT fatty ラットの体重及び血液生化学値

SDT fatty ラットの体重は 8 週齢から 24 週齢まで SD ラットと比較して高値を示し、32 週齢以降は同様の

推移を示した。8 週齢から 24 週齢の SDT fatty ラットは肥満を呈した (Fig. 3A)。血液生化学パラメータにおいて、SDT fatty ラットの血糖値は、8 週齢から SD ラットと比較して有意な上昇が認められ (SDT fatty ラット ; 377 \pm 152 mg / dl、SD ラット ; 134 \pm 15 mg / dl)、その上昇は 40 週齢まで持続した (SDT fatty ラット ; 742 \pm 108 mg / dl、SD ラット ; 134 \pm 5 mg / dl)。観察期間を通じて、SDT fatty ラットは高血糖を示した (Fig. 3B)。SDT fatty ラットの TG 値は、8 週齢から SD ラットと比較して有意に高値を示し、24 週齢以降において著明な高 TG 血症を示した (SDT fatty ラット ; 1832 \pm 768 mg / dl、SD ラット ; 192 \pm 65 mg / dl) (Fig. 3C)。SDT fatty ラットの TC 値は、TG 値と同様に SD ラットと比較して有意に高値を示し、8 週齢から 40 週齢まで経時的に上昇した (Fig. 3D)。観察期間を通じて、SDT fatty ラットは、脂質異常症を呈していることが確認された。SDT fatty ラットは肥満、高血糖及び脂質異常症を示しており、メタボリックシンドローム症の病態を呈していると考えられた。肝障害パラメータである AST 及び ALT は、SDT fatty ラットにおいて、8 週齢から高値を示し (AST : SDT fatty ラット ; 118 \pm 17 IU / l、SD ラット ; 81 \pm 9 IU / l、ALT : SDT fatty ラット ; 110 \pm 18 IU / l、SD ラット ; 39 \pm 4 IU / l)、16 週齢まで上昇した。16 週齢以降、SDT fatty ラットの AST 及び ALT は低下したが、40 週齢まで SD ラットと比較して高値を持続した (Fig. 3E、F)。SDT fatty ラットの肝臓に障害が生じていることが推測された。ヒト NASH 患者において、線維化の進展した病態では ALT/AST 比が 1 以下になることが知られているが⁷⁾、SDT fatty ラットにおいて、ALT/AST 比を検討したところ、8 週齢を除き 1 以上となった。SDT fatty ラットの ALT/AST 比は、ヒトと異なることが示唆された。

4. SDT fatty ラットの肝臓重量及び肝臓中脂質含量

肝臓の病態生理的な変化を確認するため、経時的な重量及び脂質含量を検討した。SDT fatty ラットの肝臓重量は、8 週齢から SD ラットと比較して有意な上昇が認められ、その上昇は 24 週齢まで持続した (SDT fatty ラット ; 32 \pm 17 mg / dl、SD ラット ; 14 \pm 2 mg / dl)。24 週齢以降、SDT fatty ラットの

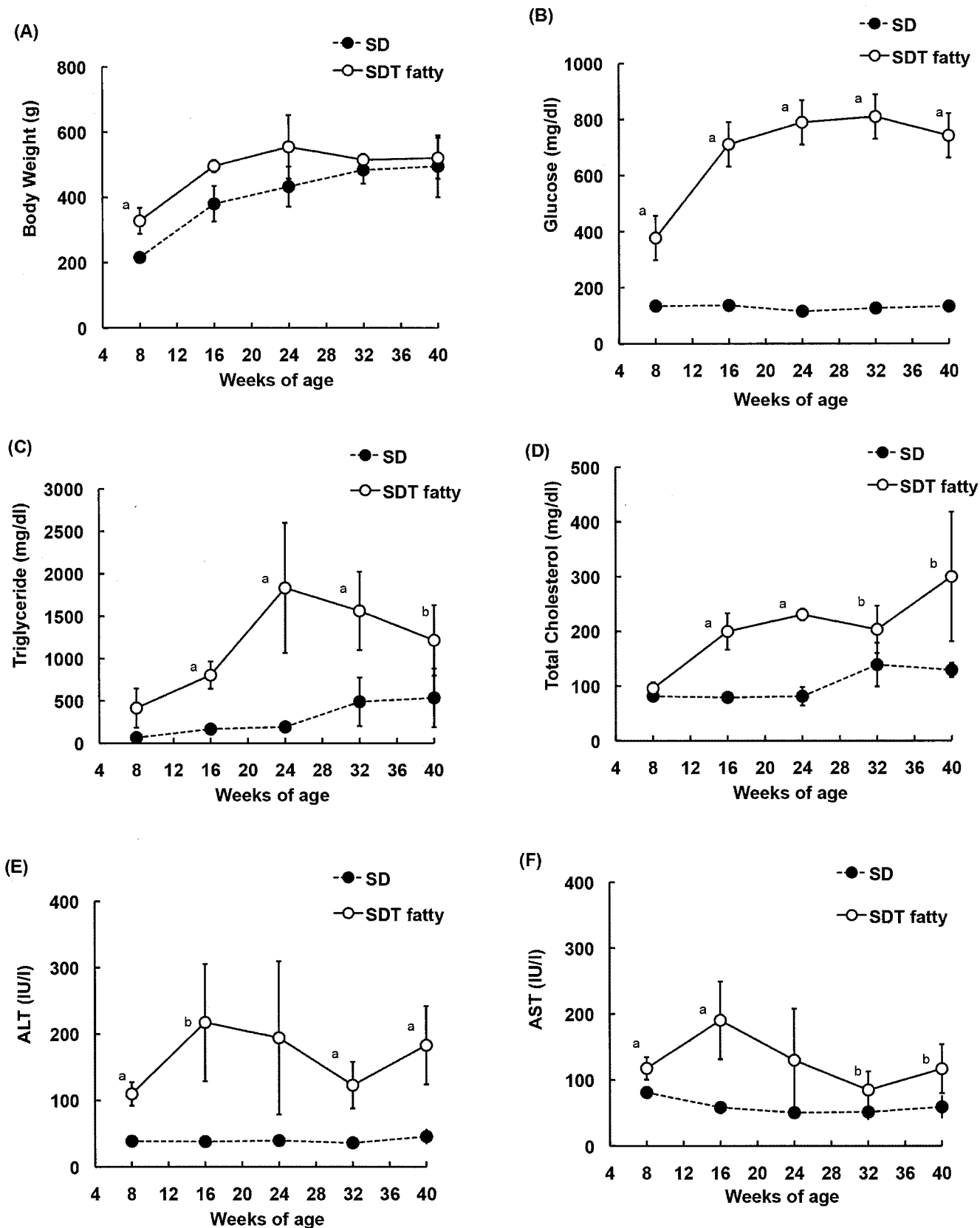


Fig. 3. Changes of body weight and biological parameters in SDT fatty rats and SD rats.

A: Body weight; B: Glucose; C: Triglyceride; D: Total cholesterol; E: ALT; F: AST. Data are shown as the mean \pm SD (n=4-5). a $p < 0.01$, b $p < 0.05$; significantly different from SD rats. (permission to use the material from a publisher [31])

肝臓重量は低下したが、40週齢までSDラットと比較して高値を示した (Fig.4A)。肝臓中TG含量は、SDT fattyラットでは16週齢まで増加し、それ以降は低下した。32週齢以降は、SDラットの肝臓中TG含量と同等に推移した (Fig.4B)。SDT fattyラットは肝臓にTGが蓄積し、脂肪肝となることが明らかとなった。肝臓中TG含量増加の要因を検討するため、TGの基質であるFFAの肝臓中濃度を測定した。SDT fattyラットの肝臓中FFA含量は、肝臓中TG含量と同様の推移を示した (Fig.4C)。つまり、

SDT fattyラットの肝臓中FFA含量は、16週齢まで増加し、それ以降低下した。これより、細胞損傷を引き起こすFFAが肝臓中で増加することが明らかとなった。他の2型糖尿病モデルである*db/db*マウスやZucker diabetic fattyラット、Otsuka Long-Evans Tokushima Fattyラットと同様に、SDT fattyラットにおいても肝臓中TG含量が上昇し、脂肪肝を発症することが確認された¹²⁻¹⁵。一方、24週齢以降に肝臓中TG含量が低下することは、*db/db*マウスやZucker diabetic fattyラットとは異なる変化であった。

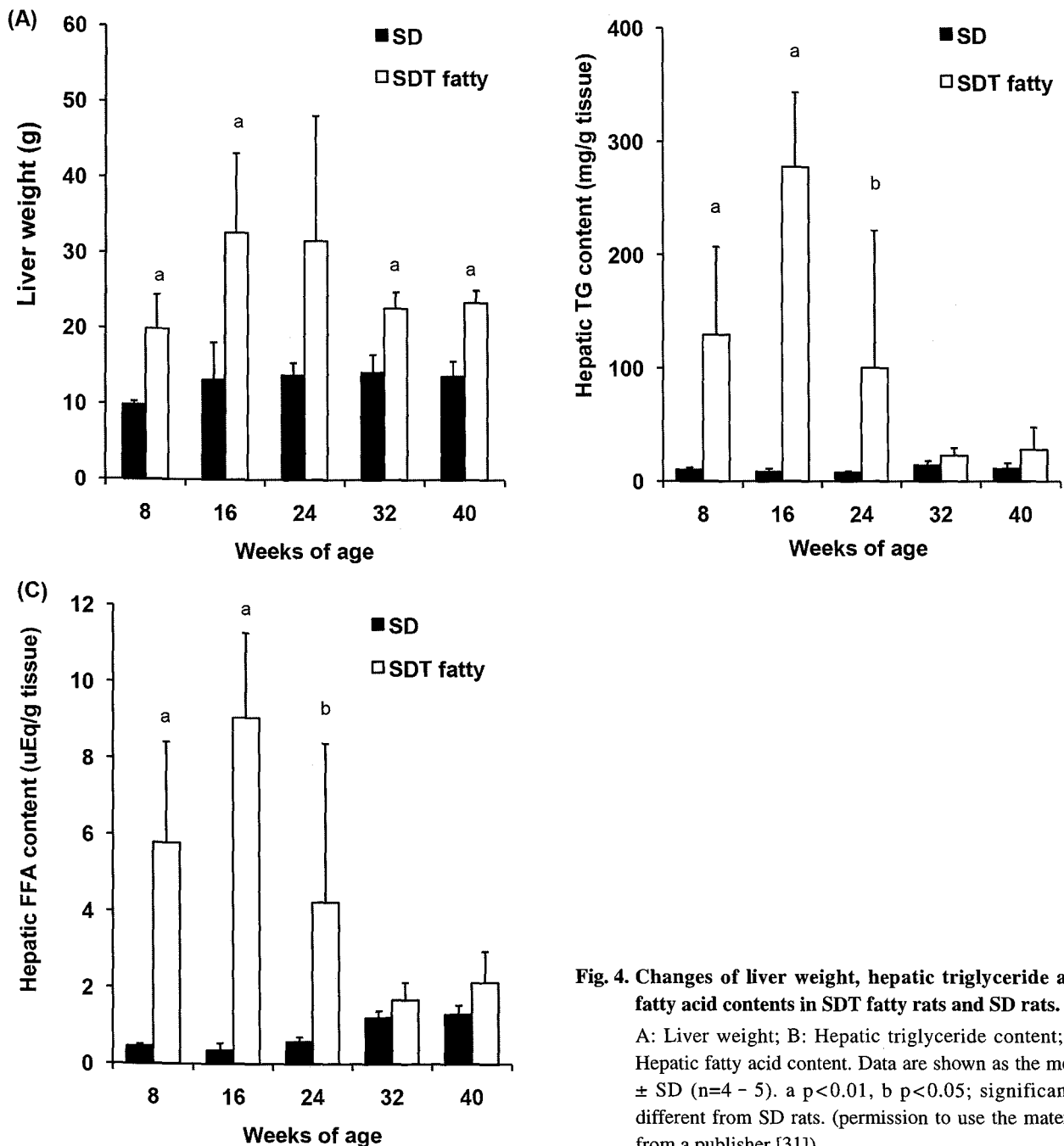


Fig. 4. Changes of liver weight, hepatic triglyceride and fatty acid contents in SDT fatty rats and SD rats.
 A: Liver weight; B: Hepatic triglyceride content; C: Hepatic fatty acid content. Data are shown as the mean \pm SD (n=4 - 5). a $p < 0.01$, b $p < 0.05$; significantly different from SD rats. (permission to use the material from a publisher [31])

5. SDT fatty ラットの肝臓病理組織

肝臓の病理学的な変化を確認するため、パラフィン切片を HE 及びシリウスレッド染色後に鏡検した。SDT fatty ラットの肝臓は、8週齢から40週齢まで重度 (3+) な空胞化及び脂肪化が確認され、病理組織学的にも肝臓に TG が蓄積されていることが示唆された (Fig.5A、B、Table1)。また、SDT fatty ラットは8週齢から NASH 病態で特徴的な ballooning 様の変化と思われる中程度 (1+ - 2+) の肝細胞の肥大化が認められた (Table1)。炎症細胞の浸潤は、SDT fatty ラットにおいて軽度に認められた。SD ラットでは、SDT fatty ラットにみられたこれらの病理組織学的な変化は認められなかった。これらの病理学的な変化、及び肝障害パラメータである ALT 値、AST 値が高値を示すことから SDT fatty ラットは、NASH を発症していると考えられた。肝臓の線維化において、SDT fatty ラットは、32週齢より中程度 (1+ - 2+) に認められた (Table1)。線維を特異的に染色するシリウスレッド染色における検討においても、同様の結果が確認された (Fig.5C、D)。これより、SDT fatty ラットでは、NASH 発症に伴い線維化が生じることが明らかとなった。自然発症的に

NASH 及び線維化が生じる機序として、肝臓中 FFA 含量の増加が関与していると思われる。肝臓における過剰な FFA は、過酸化脂質へと代謝され、肝臓中の星細胞を活性化する¹⁶⁻¹⁸⁾。活性化された星細胞は、コラーゲンを産生し、肝臓中に線維化を引き起こすことが知られている¹⁹⁾。また、過酸化脂質に加え、CYP2E1 が肝線維化の発症に関与していることが考えられる。高脂肪食負荷肥満モデルにおいて、肝臓中 FFA 含量の上昇により、CYP2E1 の遺伝子及びタンパク質の発現が上昇する²⁰⁾。発現が上昇した CYP2E1 は、肝臓において活性酸素種 (reactive oxygen species ; ROS) 産生を促進し、NASH の発症及び線維化を惹起することが知られている^{21,22)}。これらの機序を介して、SDT fatty ラットは、NASH 発症に伴い線維化が生じる可能性がある。他の2型糖尿病モデルと SDT fatty ラットの病理組織学的な違いとして、通常食飼育により SDT fatty ラットの肝臓に線維化が生じることが挙げられる。*db/db* マウスや Zucker diabetic fatty ラットでは、脂肪肝は呈するが線維化まで病態が進展しないことが報告されている^{13,14)}。肥満2型糖尿病モデルにおいて、肝臓の線維化まで進展する SDT fatty ラットと進展しない

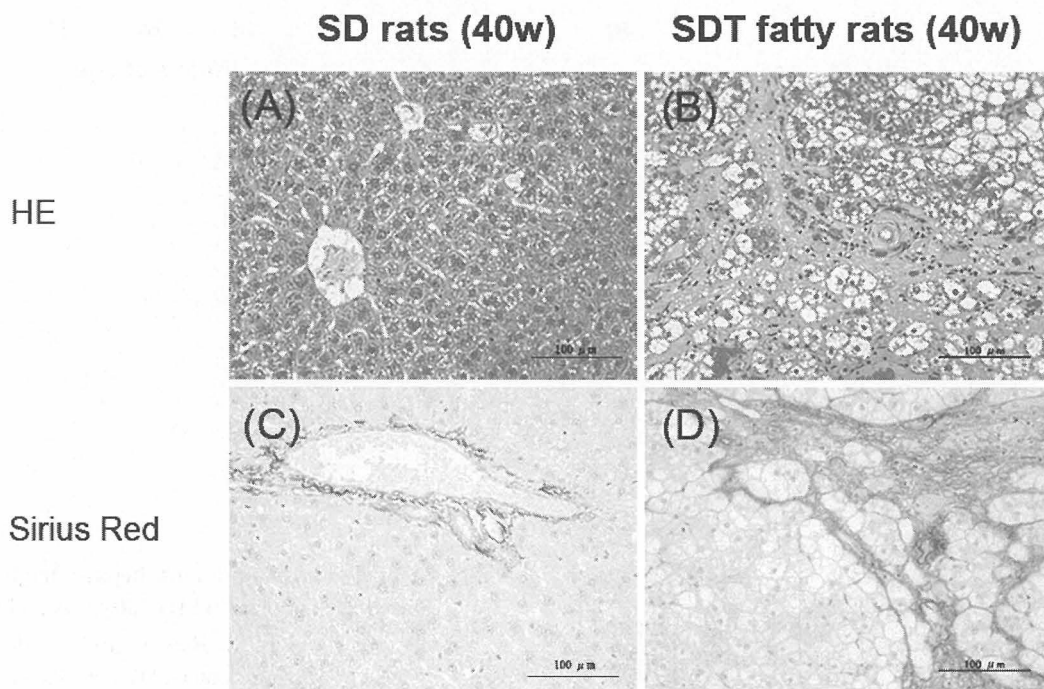


Fig. 5. Liver histopathology at 40 weeks of age.

A, C: SD rats; B, D: SDT fatty rats. A, B: Hematoxylin and eosin (HE). C, D: Sirius Red. SD rats. (permission to use the material from a publisher [31])

Table 1. Microscopy findings of the liver in female SDT fatty rats and SD rats.
(permission to use the material from a publisher [31])

		8w		16w		24w		32w		40w	
		SD	SDT fatty	SD	SDT fatty	SD	SDT fatty	SD	SDT fatty	SD	SDT fatty
Hepatosteatorsis (Vacuolar change/Fatty change)	-	5	0	5	0	5	0	5	0	5	0
	±	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2+	0	4	0	2	0	2	0	3	0	3
	3+	0	1	0	3	0	2	0	2	0	2
Hypertrophy of hepatocyte (with Vacuolation/Fatty change)	-	5	1	5	0	5	0	5	0	5	1
	±	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	+	0	2	0	2	0	2	0	1	0	2
	2+	0	2	0	3	0	2	0	3	0	1
	3+	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
Fibrosis, focal	-	5	4	5	5	5	4	5	1	5	1
	±	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	+	0	1	0	0	0	0	0	1	0	2
	2+	0	0	0	0	0	0	0	3	0	2
	3+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Infiltration, inflammatory cell, periportal	-	5	2	5	4	5	3	5	3	5	3
	±	0	3	0	1	0	1	0	0	0	1
	+	0	0	0	0	0	0	0	2	0	1
	2+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	3+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

db/db マウスや Zucker diabetic fatty ラットとの要因については明確でない。しかしながら、SDT fatty ラットは肝臓における炎症に対する感受性が高く、肝臓に線維化が生じやすい可能性が考えられる。SDT fatty ラットの起源である SDT ラットは、加齢に伴い膵臓ランゲルハンス島（膵島）が変性することによりインスリン分泌が低下し、糖尿病を発症する^{23,24)}。膵島が変性する機序として、膵島に浸潤したマクロファージよりレニン・アンジオテンシン系を介して産生された NO が、酸化ストレスを惹起し、膵島が変性することが示唆されている²⁵⁾。事実、レニン・アンジオテンシン系を抑制するテルミサルタンを SDT ラットに処置することで、糖尿病の発症が抑制される²⁶⁾。これより、SDT ラットは全身性に炎症をおこしていると考えられる。SDT fatty ラットの肝臓においても、SDT ラットの膵島と同様に炎症のマーカーである ED-1 染色された細胞が認められている（データ未掲載）。これより、SDT fatty ラットの肝臓は、恒常的に炎症をおこしている可能性がある。このような肝臓の状態に、過剰な肝臓中 FFA から代謝されて生成した過酸化脂質の刺激が加わり、線維化が惹起されると推測される。事実、SDT fatty ラット及び SDT ラットの起源である SD ラットは、Lewis 及び Wistar ラットと比較して、高脂肪

負荷により線維化及び肝細胞の障害を生じやすいことが報告されている²⁷⁾。

6. SDT fatty ラットの肝臓中の遺伝子発現

SDT fatty ラットの脂肪肝及び線維化発症の機序を解析するため、脂質代謝及び線維化関連遺伝子の発現を検討した。SDT fatty ラットの脂質合成関連遺伝子 (SREBP-1c、FAS、ACC) は、8週齢において SD ラットと比較して有意な上昇が認められた (Fig. 6A-C)。また、肝臓からのリポタンパク質分泌に参与する MTP の発現は、8週齢から40週齢まで SD ラットと比較して40%程度低下していた (Fig. 6D)。SDT fatty ラットの肝臓中 FFA 含量が上昇する一つの要因として、脂質合成関連遺伝子の発現増加に伴う脂肪酸合成の亢進が寄与している可能性がある。また、SDT fatty ラットの脂肪肝は、肝臓中 FFA 含量の上昇に加え、肝臓からのリポタンパク質分泌が抑制されることでさらに惹起されることが考えられた。一方、16週齢以降において、SDT fatty ラットの脂質合成関連遺伝子の発現は低下し、SD ラットと同様の推移を示した。SDT fatty ラットの脂質合成関連遺伝子の発現が低下する機序として、血漿中のインスリンが関与している可能性がある。インスリンは、FAS 及び ACC 遺伝子の発現を調節する

SREBP-1c 遺伝子のプロモータ活性を調節することで遺伝子発現を上昇させることが知られている²⁸⁾。SDT fatty ラットの血漿中インスリン値は6から8週齢を頂値として、それ以降徐々に低下する^{29,30)}。このインスリン値の低下により、SREBP-1c 遺伝子発現が低下し、FAS 及び ACC 遺伝子発現も低下すると思われる。また、これらの遺伝子発現の低下は、SDT fatty ラットにおける肝臓中 FFA 及び TG 含量低下の要因となっていると考えられた。事実、SREBP-

1c 遺伝子の発現を低下させることで、高脂肪食誘発の脂肪肝が改善することが報告されている^{29,30)}。線維化関連遺伝子において、SDT fatty ラットは16及び24週齢でSD ラットと比較して星細胞の活性化の指標である α -SMA 及び線維化のマーカーである Collagen type 1 遺伝子発現の上昇傾向が認められた (Fig. 6E, F)。SDT fatty ラットは、肝臓中の星細胞の活性化を介して、線維化を惹起することが示唆された。また、24週齢以降では、これらの線維化関連

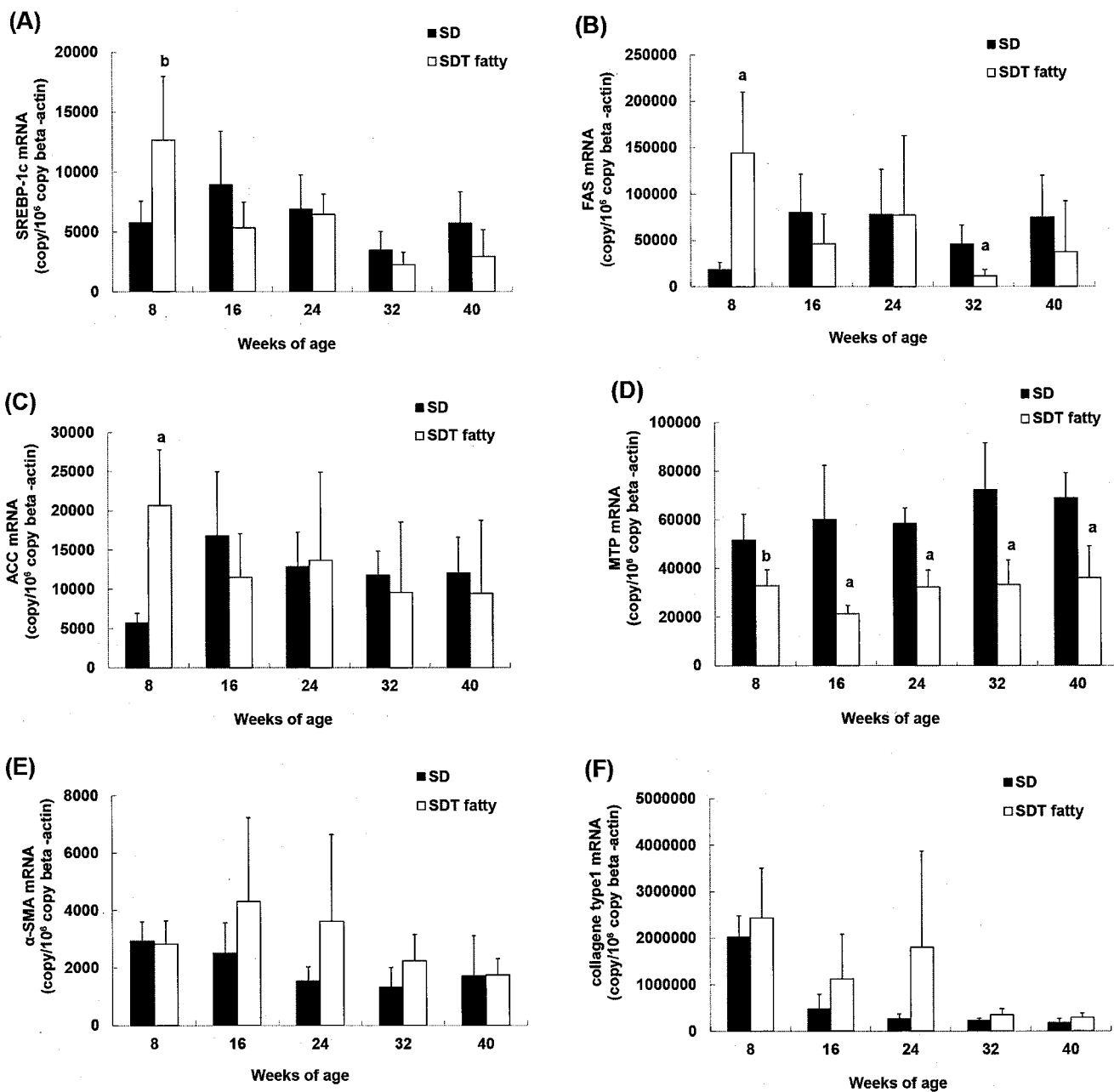


Fig. 6. Expression of genes related to triglyceride synthesis, triglyceride secretion, and fibrosis in SDT fatty rats and SD rats.

A: SREBP-1c; B: FAS; C: ACC; D: MTP; E: α -SMA; F: Collagen type 1. Data are shown as the mean \pm SD (n=4-5). a $p < 0.01$, b $p < 0.05$; significantly different from SD rats. (permission to use the material from a publisher [31])

遺伝子の発現は低下し、40週齢においてSDラットと同等となった。SDT fatty ラットで認められた線維化が32週齢以降に悪化しない結果と一致している。これより、40週齢以降において、SDT fatty ラットの線維化が進行しない可能性があり、今後これらについて確認していく予定である。

7. まとめ

本研究で、我々はSDT fatty ラットが通常食において、NASHを発症することを紹介した。これまでのNASHモデルは、単一の遺伝子改変や食餌誘発性のモデル動物が主流であるが、これらのモデルはヒトNASH病態と異なる点が知られている。具体的には、メタボリックシンドローム症を呈していないモデルや線維化を発症しないモデルなどが挙げられる。これより、これまでのNASHモデル動物はヒトのNASH病態を完全に模倣しているとはいえない。一方、SDT-fatty ラットは、通常飼育下で、ヒトと同様に肥満、脂質異常症、糖尿病を呈し、NASHから線維化に病態が進行する新しいモデル動物である。これより、SDT-fatty ラットがNASH発症の病態解析や薬剤の薬効評価に有用なモデルとなる可能性がある。また、本稿では雌SDT-fatty ラットの肝臓について報告を行ったが、雄SDT-fatty ラットについても検討をおこなっており、NASHを発症しないことを確認している。ヒトのNASH罹患率では、若年では男性が、高齢では女性が高頻度であると報告されており、雄のSDT-fatty ラットについてはヒトのNASH病態を反映していなかった。今後、雌SDT-fatty ラットが40週齢以降において肝硬変、肝がんへと病態が進行するかを検討すると共にNASH発症の時期を早期化するような工夫を行い、NASH病態解析モデルとしての有用性を高め、薬剤評価に最適化した条件を検討していきたい。

謝辞

研究を遂行するにあたり、長期間にわたりSDT-fatty ラットの繁殖、飼育など多大な御協力をいただきましたJTクリエイティブサービス稲葉信博氏並びに龍門徳彦氏に感謝を申し上げます。

【引用文献】

- 1) Watanabe S, Yaginuma R, Ikejima K, Miyazaki A. 2008. Liver diseases and metabolic syndrome. *J Gastroenterol*, 43: 509-518.
- 2) Greenfield V, Cheung O, Sanyal AJ. 2008. Recent advances in nonalcoholic fatty liver disease. *Curr Opin Gastroenterol*, 24: 320-327.
- 3) Adams LA, Lymp JF, St Sauver J, Sanderson SO, Lindor KD, Feldstein A, Angulo P. 2005. The natural history of nonalcoholic fatty liver disease: a population-based cohort study. *Gastroenterology*, 129: 113-121.
- 4) de Alwis NM, Day CP. 2008. Non-alcoholic fatty liver disease: the mist gradually clears. *J Hepatol*, 48 Suppl 1: S104-112.
- 5) Neuschwander-Tetri BA. 2005. Nonalcoholic steatohepatitis and the metabolic syndrome. *Am J Med Sci*, 330: 326-335.
- 6) Silverman JF, Pories WJ, Caro JF. 1989. Liver pathology in diabetes mellitus and morbid obesity. Clinical, pathological, and biochemical considerations. *Pathol Annu*, 24 Pt 1: 275-302.
- 7) 日本肝臓学会 2010. NASH・NAFLDの診療ガイド2010. 26-31. 文光堂. 東京.
- 8) Tilg H, Moschen AR. 2010. Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis. *Hepatology*, 52: 1836-1846.
- 9) Takahashi Y, Soejima Y, Fukusato T. 2012. Animal models of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *World J Gastroenterol*, 18: 2300-2308.
- 10) Masuyama T, Katsuda Y, Shinohara M. 2005. A novel model of obesity-related diabetes: introgression of the *Lepr*(fa) allele of the Zucker fatty rat into nonobese Spontaneously Diabetic Torii (SDT) rats. *Exp Anim*, 54: 13-20.
- 11) Matsui K, Ohta T, Oda T, Sasase T, Ueda N, Miyajima K, Masuyama T, Shinohara M, Matsushita M. 2008. Diabetes-associated complications in Spontaneously Diabetic Torii fatty rats. *Exp Anim*,

- 57: 111-121.
- 12) Forcheron F, Abdallah P, Basset A, del Carmine P, Haffar G, Beylot M. 2009. Nonalcoholic hepatic steatosis in Zucker diabetic rats: spontaneous evolution and effects of metformin and fenofibrate. *Obesity (Silver Spring)*, 17: 1381-1389.
 - 13) Ge F, Zhou S, Hu C, Lobdell Ht, Berk PD. 2010. Insulin- and leptin-regulated fatty acid uptake plays a key causal role in hepatic steatosis in mice with intact leptin signaling but not in ob/ob or db/db mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 299: G855-866.
 - 14) Xu J, Kulkarni SR, Donepudi AC, More VR, Slitt AL. 2012. Enhanced Nrf2 activity worsens insulin resistance, impairs lipid accumulation in adipose tissue, and increases hepatic steatosis in leptin-deficient mice. *Diabetes*, 61: 3208-3218.
 - 15) Song YS, Fang CH, So BI, Park JY, Lee Y, Shin JH, Jun DW, Kim H, Kim KS. 2013. Time course of the development of nonalcoholic Fatty liver disease in the Otsuka long-evans Tokushima Fatty rat. *Gastroenterol Res Pract*, 2013: 342648.
 - 16) Haot J, Michel P. 1989. [Anatomo-pathological classification of gastric tumors]. *Acta Gastroenterol Belg*, 52: 340-352.
 - 17) Zern MA, Leo MA, Giambrone MA, Lieber CS. 1985. Increased type I procollagen mRNA levels and in vitro protein synthesis in the baboon model of chronic alcoholic liver disease. *Gastroenterology*, 89: 1123-1131.
 - 18) Li SY, Liu Y, Sigmon VK, McCort A, Ren J. 2005. High-fat diet enhances visceral advanced glycation end products, nuclear O-Glc-Nac modification, p38 mitogen-activated protein kinase activation and apoptosis. *Diabetes Obes Metab*, 7: 448-454.
 - 19) Carpino G, Renzi A, Onori P, Gaudio E. 2013. Role of hepatic progenitor cells in nonalcoholic fatty liver disease development: cellular cross-talks and molecular networks. *Int J Mol Sci*, 14: 20112-20130.
 - 20) Abdelmegeed MA, Banerjee A, Yoo SH, Jang S, Gonzalez FJ, Song BJ. 2012. Critical role of cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) in the development of high fat-induced non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol*, 57: 860-866.
 - 21) Caro AA, Cederbaum AI. 2004. Oxidative stress, toxicology, and pharmacology of CYP2E1. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 44: 27-42.
 - 22) Aubert J, Begriche K, Knockaert L, Robin MA, Fromenty B. 2011. Increased expression of cytochrome P450 2E1 in nonalcoholic fatty liver disease: mechanisms and pathophysiological role. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*, 35: 630-637.
 - 23) Shinohara M, Masuyama T, Shoda T, Takahashi T, Katsuda Y, Komeda K, Kuroki M, Kakehashi A, Kanazawa Y. 2000. A new spontaneously diabetic non-obese Torii rat strain with severe ocular complications. *Int J Exp Diabetes Res*, 1: 89-100.
 - 24) Masuyama T, Komeda K, Hara A, Noda M, Shinohara M, Oikawa T, Kanazawa Y, Taniguchi K. 2004. Chronological characterization of diabetes development in male Spontaneously Diabetic Torii rats. *Biochem Biophys Res Commun*, 314: 870-877.
 - 25) Inokuchi C, Ueda H, Hamaguchi T, Miyagawa J, Shinohara M, Okamura H, Namba M. 2009. Role of macrophages in the development of pancreatic islet injury in spontaneously diabetic torii rats. *Exp Anim*, 58: 383-394.
 - 26) Hasegawa G, Fukui M, Hosoda H, Asano M, Harusato I, Tanaka M, Shiraishi E, Senmaru T, Sakabe K, Yamasaki M, Kitawaki J, Fujinami A, Ohta M, Obayashi H, Nakamura N. 2009. Telmisartan, an angiotensin II type 1 receptor blocker, prevents the development of diabetes in male Spontaneously Diabetic Torii rats. *Eur J Pharmacol*, 605: 164-169.
 - 27) Rosenstengel S, Stoeppeler S, Bahde R, Spiegel HU, Palmes D. 2011. Type of steatosis influences microcirculation and fibrogenesis in different rat strains. *J Invest Surg*, 24: 273-282.
 - 28) Musso G, Gambino R, Cassader M. 2009. Recent insights into hepatic lipid metabolism in non-

- alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Prog Lipid Res*, 48: 1-26.
- 29) Hata T, Ohta T, Ishii Y, Sasase T, Yamaguchi T, Mera Y, Miyajima K, Tanoue G, Sato E, Matsushita M. 2012. Elevated glucagon-like peptide-1 on a high-fat diet feeding prevents the incidence of diabetes mellitus in Spontaneously Diabetic Torii Leprfa rats. *J Diabetes Mellitus*, 2: 170-178.
- 30) Ishii Y, Ohta T, Sasase T, Morinaga H, Ueda N, Hata T, Kakutani M, Miyajima K, Katsuda Y, Masuyama T, Shinohara M, Matsushita M. 2010. Pathophysiological analysis of female Spontaneously Diabetic Torii fatty rats. *Exp Anim*, 59: 73-84.
- 31) Ishii Y, Motohashi Y, Muramatsu M, Katsuda Y, Miyajima K, Sasase T, Yamada T, Matsui T, Kume S, Ohta T. 2015. Female spontaneously diabetic Torii fatty rats develop nonalcoholic steatohepatitis-like hepatic lesions. *World J Gastroenterol*, 21: 9067-9078.