

博士論文

論文題目 食餌誘発ラットNASHモデルを用いた肝線維化の
発現機序及びバイオマーカーに関する研究

氏名 竹内文乃(戸籍名:頼本文乃)

博士論文

食餌誘発ラットNASHモデルを用いた肝線維化の
発現機序及びバイオマーカーに関する研究

東京大学大学院 薬学系研究科 薬科学専攻

竹内 文乃 (戸籍名: 頼本 文乃)

目次

1. 諸言	1
2. 目的	2
3. 方法	4
3-1. 動物実験	4
3-2. 病理組織検査	5
3-3. 免疫組織化学	5
3-4. Western blot 解析	6
3-5. qRT-PCR 解析	7
3-5-1. 肝臓からの mRNA 抽出	7
3-5-2. 肝臓からの mRNA による種々の mRNA 測定	7
3-5-3. 肝臓あるいは血漿からの total RNA 抽出	8
3-5-4. 肝臓からの total RNA による miR-21, MMP-9 及び TIMP-1 測定	8
3-5-5. 血漿からの total RNA による miR-21 測定	9
3-6. 遺伝子網羅解析	9
3-6-1. TaqMan array-card による microRNA 解析	10
3-6-2. GeneChip による mRNA 解析	10
3-6-3. microRNA と mRNA の相互作用解析	11
3-7. 統計解析	11
4. 結果及び考察	12
4-1. NASH 病態の進展と回復性の検討	12
4-2. 肝線維化の発現及び回復性のメカニズムの検討	17
4-3. 肝線維化バイオマーカーの検討	25
5. 総括	33
6. 謝辞	34
7. 参考文献	35
8. 論文目録	42

略語

AP	alkaline phosphatase	アルカリホスファターゼ
APRI	AST to platelet ratio index	
α -SMA	α -smooth muscle actin	
BMI	body mass index	
CDAА diet	choline-deficient and iron-supplemented L-amino acid-defined diet	
CSAA diet	choline-sufficient and iron-supplemented L-amino acid-defined diet	
DEN	diethylnitrosamine	
DMN	dimethylnitrosamine	
ELF score	enhanced liver fibrosis score	
FGF	fibroblast growth factor	線維芽細胞増殖因子
HE	Hematoxylin-Eosin	ヘマトキシリン-エオジン
HF diet	high fat diet	高脂肪食
HRP	horseradish peroxidase	ホースラディッシュペルオキシダーゼ
HSC	hepatic stellate cell	伊東細胞/肝星細胞
iNOS	inducible nitric oxide synthase	
IPA	Ingenuity pathway analysis	
MCD diet	methionine and choline deficient diet	
MMP	matrix metalloproteinase	
NA	not applicable	該当なし
NAFLD	nonalcoholic fatty liver disease	非アルコール性脂肪性肝疾患
NASH	nonalcoholic steatohepatitis	非アルコール性脂肪性肝炎
PIIINP	procollagen type III amino-terminal peptide	
PBS	phosphate-buffered saline	リン酸緩衝生理食塩水
qRT-PCR	quantitative Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction	定量逆転写ポリメラーゼ連鎖反応
SOD	superoxide dismutase	
TGF- β	transforming growth factor- β	
TIMP	tissue inhibitor of matrix metalloproteinase	
VEGF	vascular endothelial growth factor	血管内皮細胞増殖因子
VLDL	very low density lipoprotein	超低比重リポタンパク

1. 諸言

非アルコール性脂肪性肝炎 (Nonalcoholic steatohepatitis: NASH) はアルコール性肝炎と類似の病態を示すが、アルコールの摂取なしで起こり、近年増加しつつあると言われている疾患である。NASH の有病率は 3-5% と報告されているが、より包括的な疾患として、画像診断での脂肪肝を元に診断される非アルコール性脂肪性肝疾患 (nonalcoholic fatty liver disease: NAFLD) があり、NAFLD の有病率は日本では 9-30%、欧米で 20-40% を占める (日本消化器病学会 NAFLD/NASH 診療ガイドライン 2014)。NASH の診断基準は、画像診断等で脂肪肝を認め、アルコール性肝障害など他の肝疾患を除外した病態のうち、病理組織学的に脂肪変性、炎症細胞浸潤、肝細胞傷害像 (ballooning, acidophil bodies, Mallory 小体等) 及び線維化の特徴を示すことである (Brunt et al., 1999; 日本消化器病学会 NAFLD/NASH 診療ガイドライン 2014)。このうち線維化については肝硬変や肝細胞がんという更に重篤な疾患の素因となるため最も懸念される症状のひとつであるが、その確定診断は侵襲性の高い肝生検に頼らざるを得ないのが現状である。具体的には、NAFLD の 3 分の 1 が NASH へと進行し、NASH 患者の 9-20% が 5-10 年の間に肝硬変に進行すると言われている (Wang et al., 2015)。また、肝生検で NASH と診断された患者の 31.8% で平均 4.3 年の間に線維化の進行が確認され、さらに NASH 患者の 7-13% で後に肝細胞がんを発症しているという報告がある (Fassio et al., 2004)。

NASH の病理進展メカニズムとしては、“Two-hit model”が受け入れられている。第一段階では高脂血症などを素因として肝細胞への脂肪の蓄積が起こり、第二段階ではこれに脂質過酸化、炎症性サイトカインや肝細胞 ATP 産生の低下などが関与し、さらに炎症や線維化などの病理変化に進展すると考えられている (Rolo et al., 2012)。NASH のリスクファクターとしては肥満、糖尿病、高血圧、高脂血症等のメタボリックシンドローム、いくつかの薬物 (アミオダロン、グルココルチコイド、イソニアジド) が知られている (Hübscher 2006; Reid 2001)。これらのリスクファクターのうち肥満との関連が最も高く、NASH 患者の 40-100% は肥満を示す (Raid et al., 2001)。脂肪蓄積と NAFLD あるいは NASH の病理組織像との関連について、内臓脂肪量は肝細胞脂肪化と相関していたが、肝線維化との関連はみられなかった (Fracanzani et al., 2011)。一方、皮下脂肪あるいは全身総脂肪量は NAFLD activity score (肝細胞脂肪化、ballooning、炎症、線維化の総合評価) と正の相関を示した (Choudhary et al., 2012)。しかしその詳細な病態発生メカニズムは不明である。

2. 目的

肝線維化は上述の通り肝硬変や肝細胞がんの病因となるが、肝生検でしか確認できないため、確定診断された際には既に進展していることが多い。さらに回復性も悪く、病理発現機序も不明である。これらの状況から、食餌誘発ラット NASH モデルを用いて、肝線維化の発現機序及びバイオマーカーを研究した。具体的には以下の検討を行った。

1. NASH 病態の進展と回復性を経時的に確認
2. 肝線維化の発現及び回復性のメカニズムに関し、いくつかの因子の発現を検証
3. 肝線維化のバイオマーカーを検討

動物モデルとして、ヒト NASH 病態との類似性、実験の簡便さなどを考慮し、choline-deficient and iron-supplemented L-amino acid-defined (CDAA) 食誘発モデルを用いた。対照群にはコリンを添加した choline-sufficient and iron-supplemented L-amino acid-defined (CSAA) 食を与えた。他のモデルとの比較は表 1 に示す通りである。CDAA 食ではコリンが欠乏しており、コリン欠乏状態では脂肪酸の β 酸化で生じるケトン体の排泄抑制、あるいは脂肪酸運搬を担っている超低比重リポタンパク (very low density lipoprotein: VLDL) の産生障害が生じて肝細胞に脂肪が沈着する (Corbin et al., 2012; Nakae, 1999)。ヒトでは、肝細胞の脂肪化は吸収 (消化管からの吸収、脂肪組織からの輸送、あるいは de novo 合成) 及び排出 (酸化による排泄、あるいは VLDL による搬出) のバランス変化により引き起こされると報告されているため (Duwaerts et al., 2014)、CDAA 食誘発の肝障害メカニズムはヒトと類似と考えられる。さらにヒトでも、輸液等でコリンが欠乏すると ALT の増加や肝細胞の脂肪化が引き起こされることが報告されている (Buchman et al., 1995; Zeisel et al., 1991)。CDAA 食モデルではこれまでも NASH や肝発がんに関する研究が行われているが、肝線維化を経時的に確認した報告、回復性を検討した報告はない。

表 1 種々の NASH あるいは肝線維化動物モデルとその特徴

モデル	方法	線維化	脂肪化	炎症	その他特徴
CDA 食	摂餌	○	○	○	<u>△インスリン抵抗性を示さない</u>
MCD 食	摂餌	○	○	○	<u>×体重減少、血中トリグリセリド・レプチンレベルが下がる。</u> <u>肝ではインスリン抵抗性</u>
SREBP-1c 過剰発現	トランスジェニック動物	○	○	○	脂肪酸・トリグリセリド合成を制御する転写因子で、過剰発現により肝細胞では脂肪酸合成が促進する。 <u>×体脂肪が減少する</u>
四塩化炭素誘発	反復投与	○回復性早い	<u>△小葉中心性壊死</u>	○	<u>×投与経路、投与量や媒体によって結果が異なり、肝細胞傷害が強い</u>
チオアセタミド誘発	反復投与	○回復性遅い	<u>×小葉中心性壊死</u>	○	肝細胞がんあるいは胆管細胞がん ^に 進展
胆管結紮	手術	<u>△辺縁性線維化</u>	<u>×</u>	<u>△胆汁誘発</u>	<u>×侵襲性の方法で手術による合併症を伴う。胆汁うっ滞に伴う肝細胞障害を示す</u>
DEN/DMN 誘発	反復投与	○	<u>×小葉中心性壊死</u>	○	<u>×線維化も発現するが、変異原性化合物のため肝細胞がんの研究に用いられる</u>
アルコール誘発	カニキュレーションで胃内投与	○/× <u>個体差あり</u>	<u>△一部は壊死を伴う</u>	○/× <u>個体差あり</u>	<u>×手技的に長期試験に不向き</u>
HF 食	摂餌	<u>△弱い</u>	○	<u>△弱い</u>	○肥満やインスリン耐性を示すなど代謝性病態は近い
ob/ob, db/db	トランスジェニック動物	<u>×</u>	○	<u>×</u>	<u>ob/ob はレプチン、db/db はレプチン受容体を欠損している。肥満及びインスリン抵抗性を示す。×炎症系も欠損しているため NASH 病態を示さない</u>
PTEN ノックアウト	トランスジェニック動物	<u>△マイルドな細胞周囲線維化</u>	○	○	がん抑制遺伝子。 <u>×体重・脂肪が減少し、インスリン感受性増加し、血糖値が低下する</u>

下線 (△/×) : モデルとしての欠点

参考資料 : Aparicio-Bautista et al., 2013; Crespo Yanguas et al., 2016; Delire et al., 2015; Ibrahim et al., 2016; Lau et al., 2016; Tsukamoto et al., 1986

3. 方法

3-1. 動物実験

Charles River Laboratories Japan, Inc. (茨城)より 5 週齢の specific pathogen-free Crlj:WI (Wistar) 雄ラットを入手し、室温 23±3℃の動物室で飼育した。1 週間の検疫期間中は通常の餌 (CRF-1; オリエンタル酵母株式会社、東京) を与え、自由に摂水させた。その後餌は CSAA 食 (#518811; Dyets Inc., Bethlehem, PA, USA) あるいは CDAA 食 (#518753; Dyets Inc.) に切替えて 24 週間与え、3 日、1 週、4 週、12 週、19 週、24 週時点で各群 5 例について血液検査及び剖検を行った。回復性の検討のため、CDAA 食を 12 週間、その後 CSAA 食に切り替えた群を設定し(回復群)、試験開始 19 週及び 24 週時点で剖検した。群構成及び剖検ポイントを図 1 に示す。

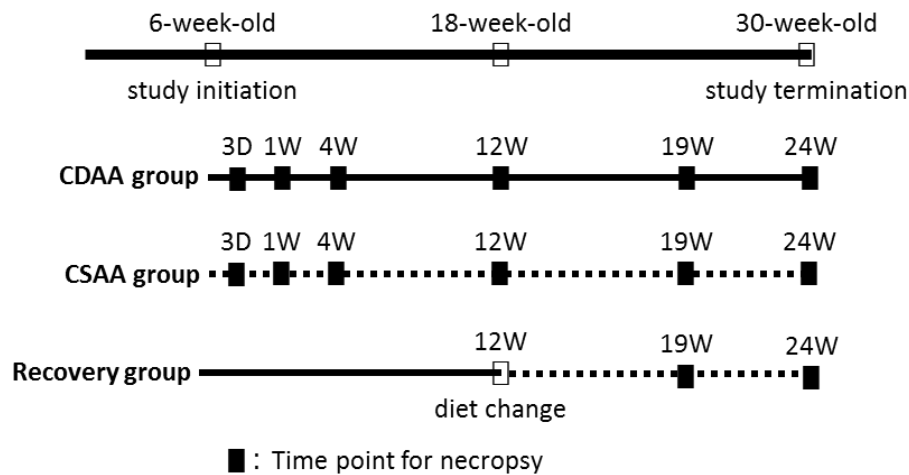


図 1 群構成

CDAA 群、CSAA 群、回復群の 3 群構成である。6 週齢から試験を開始し、CDAA 群と CSAA 群は、試験期間中それぞれ CDAA、CSAA 食を与えた。回復群は CDAA 食を 12 週間与え、その後 CSAA 食を与えた。

剖検時、血液を採取して生化学検査及び定量逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (quantitative Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction: qRT-PCR) に供した。採取した血液を室温放置後に 3000 rpm、4℃で 10 分間遠心分離し、得られた血清につき自動分析装置 (7170S 形; 株式会社日立ハイテクノロジーズ、東京) を用いて AST、ALT 活性を測定した。残りの血液には抗凝固剤として EDTA-2K を添加して氷冷後、3000 rpm、4℃で 10 分間遠心分離し、得られた血漿を -80℃に保管した。肝臓を採取して重量を測定後、病理組織検査、免疫組織化学、Western blot 解析、microRNA 及び mRNA の qRT-PCR 解析、遺伝子網羅解析に供した。肝臓の一部及び全身の主要な臓器は中性緩衝 10%ホルマリン液で固定し病理組織検査及び免疫組織化学に使用、残りは RNeasy lysis solution (Qiagen, Crawley, UK) 中で -80℃に保管しその他の検討に用いた。

全ての動物実験はアステラス製薬株式会社の動物実験委員会により承認された。委員会は AAALAC International の認証を受けている。

3-2. 病理組織検査

固定された組織をパラフィンに包埋後に薄切し、ヘマトキシリン-エオジン (Hematoxylin-Eosin: HE) 染色を施した切片について病理組織検査を実施した。NASH の組織診断基準は、ヒトについて Brunt が確立した分類 (Brunt et al., 1999) を、げっ歯類についてモディファイしたもの (Behari et al., 2010; Kohli et al., 2010; Ota et al., 2007; Wang et al., 2009) に従い、次の通り実施した。

脂肪化: 0 (5% 以下の肝細胞が脂肪化)、1 (>5-30%)、2 (>30-60%)、3 (>60%)

小葉性炎症: 0 (炎症細胞浸潤なし)、1 (炎症細胞が認められるが、局在は小葉中心性でまばら)、2 (小葉中心性に軽度限局性)、3 (小葉中心性に軽度から重度)

線維化: 0 (なし)、1 (細胞周囲に限局性に線維化)、2 (類洞及び細胞周囲)、3 (bridging fibrosis)、4 (肝硬変)

線維化の定量評価はシリウスレッド染色 (Sigma-Aldrich Corporation, Milwaukee, WI, USA) の陽性面積を Aperio Genie System (Leica Microsystems Inc., Buffalo Grove, IL, USA) で測定することにより実施した。脂肪の沈着を確認するため、中性脂肪を赤色に染色するオイルレッド O 染色 (Direct Red 80; Sigma-Aldrich Corporation) を実施した。

3-3. 免疫組織化学

各種タンパクの発現を確認して細胞を特定するため、免疫染色を実施した。方法は一般に用いられている方法に従った。概略として、パラフィン包埋切片を脱パラフィンし、洗浄、ブロッキング液 (1% bovine serum albumin in 0.05 M Tris-buffered saline) で前処理後に一次抗体で処理した。条件を表 2 に示す。二次抗体は一次抗体のホスト種にマッチしたものをを用いた (ChemMate EnVision™; Dako A/S, Glostrup, Denmark)。その後切片を洗浄、ジアミノベンジンで可視化、核をヘマトキシリンで対比染色した。

表 2 免疫組織化学及び Western blot 解析の条件

Primary antibody	Host species (Clonality)	Catalog code (Clone)	Immunohistochemistry		Western blot	Manufacturer (city, state, country)
			Antigen retrieval	Dilution	Dilution	
α -SMA	mouse (monoclonal)	ab49481 (1A4)	none	1:100	1:100	Abcam (Cambridge, Cambridgeshire, UK)
CD34	rabbit (polyclonal)	AF4117	Microwave in immunosaver 100°C 15 min	1:800	NA	R&D systems Inc. (Minneapolis, MN, USA)
CD68	mouse (monoclonal)	MCA341P E (ED1)	Microwave in immunosaver 100°C 15 min	1:100	NA	Serotec (Kidlington, Oxford, UK)
CYP2E1	goat (polyclonal)	299216	none	1:45000	1:5000	Daiichi Pure Chemicals Co. Ltd. (Chuo-ku, Tokyo)
HIF-1 α	rabbit (polyclonal)	NB100-479	NA	NA	1:1000	Novus Biologicals (Littleton, CO, USA)
4-HNE	rabbit (polyclonal)	ALX-210-767-R100	none	1:1000	1:1000	Alexis Biochemicals (San Diego, CA, USA)
Hypoxyprome-1	rabbit (polyclonal)	PAb2627	none	1:500	NA	Hypoxyprome Inc. (Burlington, MA, USA)
Nitrotyrosine	rabbit (polyclonal)	06-284	Microwave in immunosaver 100°C 15 min	1:1000	NA	Upstate cell signal solutions (Lake Placid, NY, USA)
Synaptophysin	rabbit (polyclonal)	ab14692	Microwave in immunosaver 100°C 15 min	1:500	NA	Abcam
GAPDH	mouse (monoclonal)	AM4300 (6C5)	NA	NA	1:20000	Life Technologies Corporation (Carlsbad, CA, USA)

NA : not applicable

3-4. Western blot 解析

肝臓中のタンパクの発現量を検討するため、Western blot 解析を行った。Protease Inhibitor Cocktail for General Use 100x (ナカライテスク株式会社、京都)を混合した Tissue Protein Extraction Reagent (T-PER[®]; Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) 中に、RNAlater[®] solution で保存した凍結肝組織を入れてホモジナイズした。これを 4°C、1000 x g で 5 分間遠心分離をして細胞残渣を除いた。上清のタンパク濃度は Pierce[®] 660 nm Protein Assay kit (Thermo Scientific) を用いて測定した。ポリアクリルアミドゲル電気泳動は NuPAGE Novex Bis-Tris gel system (Life Technologies Corporation) を用い、タンパク量は 1 レーンに 10 あるいは 20 μ g (CYP2E1 と 4-HNE は 10 μ g、 α -SMA と HIF-1 α は 20 μ g) とした。その後 polyvinylidene fluoride ブロットニング膜 (Life Technologies Corporation) に転写した。

Western blot 解析について、CYP2E1 と 4-HNE はアルカリホスファターゼ (alkaline phosphatase: AP) 標識 (WesternBreeze[®]; Life Technologies Corporation)、 α -SMA と HIF-1 α は

ホースラディッシュペルオキシダーゼ (horseradish peroxidase: HRP) 標識 (ECL Plus Western Blotting Detection Reagent; GE ヘルスケア・ジャパン、東京) の化学発光検出キットを用いた。いずれの方法でも、ブロットイング膜はブロッキング緩衝液で 1 時間インキュベート、リン酸緩衝生理食塩水 (phosphate-buffered saline: PBS) で洗浄、一次抗体を 1 時間処理し、PBS で再度洗浄した。条件を表 2 に示す。続いて AP 標識については、ブロットイング膜は宿主種の一致した AP 標識二次抗体で 30 分間インキュベート、化学発光は AP-activated CDP-star substrate を 5 分間処理した。HRP 標識については、ブロットイング膜は宿主種の一致した HRP 標識二次抗体 (HRP-conjugated anti-mouse IgG, 1:10,000 dilution, Cell Signaling Technology Inc., Danvers, MA, USA; HRP-conjugated anti-rabbit IgG, 1:10,000 dilution, Bethyl Laboratories Inc., Montgomery, TX, USA) で 1 時間インキュベート、化学発光は 20 分間実施した。いずれの標識についても、タンパク発現量は charge-coupled device camera (アイシン精機株式会社、愛知) で測定した。タンパク発現量の測定及び GAPDH 発現量での調整は個別に実施した。

3-5. qRT-PCR 解析

メカニズム検討の目的で、肝臓から mRNA を抽出し、 α -smooth muscle actin (SMA), CYP2E1, catalase, inducible nitric oxide synthase (iNOS), matrix metalloproteinase (MMP)-2, MMP-9, superoxide dismutase (SOD) 1, transforming growth factor- β (TGF- β), tissue inhibitor of matrix metalloproteinase (TIMP)-1 及び TIMP-2 の qRT-PCR 解析を実施した。一方、バイオマーカー解析の目的で肝臓あるいは血漿から total RNA を抽出し、肝臓中の miR-21, MMP-9 及び TIMP-1、血漿中の miR-21 の qRT-PCR 解析を実施した。肝臓から抽出した total RNA は 3-6 項に示す遺伝子網羅解析にも使用した。

3-5-1. 肝臓からの mRNA 抽出

RLT lysis buffer (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) を RNeasy lysis buffer 中に保存した肝臓に添加してホモジネートを調製し、RNeasy spin column (QIAGEN GmbH) を用いて mRNA を抽出した。RNA 量は spectrophotometer (ND-1000; NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA) を用いて定量した。

3-5-2. 肝臓からの mRNA による種々の mRNA 測定

mRNA 量を調整後、high capacity RNA-to-cDNA master mix (Life Technologies Corporation) を用いて cDNA を合成した。Universal ProbeLibrary Assay Design (ロシュ・ダイアグノスティクス株式会社、東京) で表 3 に示すプライマーとオリゴヌクレオチドをデザインした。cDNA サンプルに TaqMan[®] fast universal PCR master mix 2x (Life Technologies Corporation) を添加し、ABI Prism 7900 Sequence Detection System (TaqMan, Life Technologies Corporation) により real-time qRT-PCR を実施した。mRNA 量の測定及び GAPDH 発現量での調整は個別に実施した。

表 3 メカニズム解明の qRT-PCR に用いたプライマーとプローブ

Target RNA	Primer/probe	Sequence (catalogue No. for probe of Universal ProbeLibrary)
α-SMA	Forward primer	tgccatgtatggctattca
	Reverse primer	accagttgtacgtccagaagc
	Probe	#56 tgctgtcc (04688538001)
CYP2E1	Forward primer	ctgactgtctcctcatagagatgg
	Reverse primer	tcacagaaacatttccattgtgt
	Probe	#76 cacagcca (04688996001)
Catalase	Forward primer	atcagggatgccatgttgt
	Reverse primer	gggtccttcaggtagatttg
	Probe	#129 agccagaa (4693655001)
iNOS	Forward primer	aaaatggttccccagctc
	Reverse primer	cagctgtccagggtattctg
	Probe	#95 ctgggact (04692128001)
MMP-2	Forward primer	caccaccgaggattatgacc
	Reverse primer	caccacagtgacatagca
	Probe	#113 tcgtgccca (04693477001)
MMP-9	Forward primer	cctctgcatgaagacgacataa
	Reverse primer	ggtcaggtttagagccacga
	Probe	#42 catccagc (04688015001)
SOD1	Forward primer	agaaacatggcgggccag
	Reverse primer	atggacacattggccacac
	Probe	#5 tgtgxtg (4685024001)
TGF-β	Forward primer	gtcaactgtggagcaacacg
	Reverse primer	gacagccactcaggcgtatc
	Probe	#66 (04688651001)
TIMP-1	Forward primer	cagcaaaaggcctctgtaaa
	Reverse primer	tggtgacagggaaacact
	Probe	#76 tggctgtg (04688996001)
TIMP-2	Forward primer	cgtttgcaatgcagacgta
	Reverse primer	gatggggtgccatagatgt
	Probe	#10 ggaggtgg (04985091001)
GAPDH	Primer mix & Probe	Universal ProbeLibrary Rat GAPD Gene Assay, gene-specific probes and primer for GAPD for quantification (05046220001)

3-5-3. 肝臓あるいは血漿からの total RNA 抽出

RNeasy® Mini Kit (QIAGEN GmbH; 3-6-2 項に記載する GeneChip 解析のため)あるいは miRNeasy® Mini Kit (QIAGEN GmbH; 3-5-4、3-5-5、3-6-1 項のため)を用い、RNeasy Lysis Solution 中に保存した肝臓から total RNA を抽出した。血漿サンプルには、スパイクコントロールとして合成 Cel-miR-39 を 0.5 nM 添加した。RNA 量は spectrophotometer を用いて定量した。

3-5-4. 肝臓からの total RNA による miR-21, MMP-9 及び TIMP-1 測定

肝臓中の miR-21 発現量を検討するため、TaqMan® microRNA RT Kit (Life Technologies Corporation)を用い、2 µg の total RNA から cDNA を合成した。cDNA サンプルに TaqMan® Universal PCR Master Mix II, No AmpErase1 UNG 及び TaqMan® MicroRNA Assays (Life

Technologies Corporation)を添加し、QuantStudio™ 12K Flex Real-Time PCR System (Life Technologies Corporation)により real-time qRT-PCR を実施した。

肝臓中の MMP-9, TIMP-1 発現量を検討するため、SuperScript® VILO™ cDNA Synthesis Kit (Life Technologies Corporation)を用い、1 µg の total RNA から cDNA を合成した。cDNA サンプルに TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix and TaqMan1 Gene Expression Assays (Life Technologies Corporation)を添加し、QuantStudio™ 12K Flex Real-Time PCR System で real-time qRT-PCR を実施した。

miRNA と mRNA の assay ID を表 4 に示す。Threshold cycle (Ct) 値を算出するのに RQ Manager 1.2 (Life Technologies Corporation)を用いた。ベースライン値はソフトウェアにより自動的に決定され、閾値を 0.2 と設定した。デルタ Ct (ΔCt)は U6 あるいは GAPDH の量から算出した。各サンプルについて個別に $2^{-\Delta Ct}$ を算出し、統計処理は各群について行った。

表 4 qRT-PCR に用いた miRNA と mRNA の assay ID

miRNA			mRNA		
Title	Name	Assay ID	Symbol	Name	Assay ID
miR-21	hsa-miR-21	397	MMP-9	matrix metalloproteinase 9	Rn00579162_m1
miR-39	cel-miR-39	200	TIMP-1	metalloproteinase inhibitor 1	Rn01430873_g1
U6	U6 snRNA	1973	GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Rn99999916_s1

3-5-5. 血漿からの total RNA による miR-21 測定

血漿中の miR-21 発現量を検討するため、TaqMan® microRNA RT Kit (Life Technologies Corporation)を用い、3 µg の total RNA から cDNA を合成した。次に TaqMan® PreAmp Master Mix Kit (Life Technologies Corporation)を用いて前増幅を行った。これに TaqMan® Universal PCR Master Mix II, No AmpErase® UNG 及び TaqMan® MicroRNA Assay (Life Technologies Corporation)を加え、real-time qRT-PCR を実施した。発現量の解析は肝臓に記載したものと同様である。

3-6. 遺伝子網羅解析

qRT-PCR 解析以外の遺伝子発現変動を解析するため、図 2 に示した要領で網羅解析を実施した。用いたサンプルは、線維化が病理組織検査で確認できた最初の時点である摂餌 4 週とし、CSAA 群と CDAA 群の発現量を比較した。

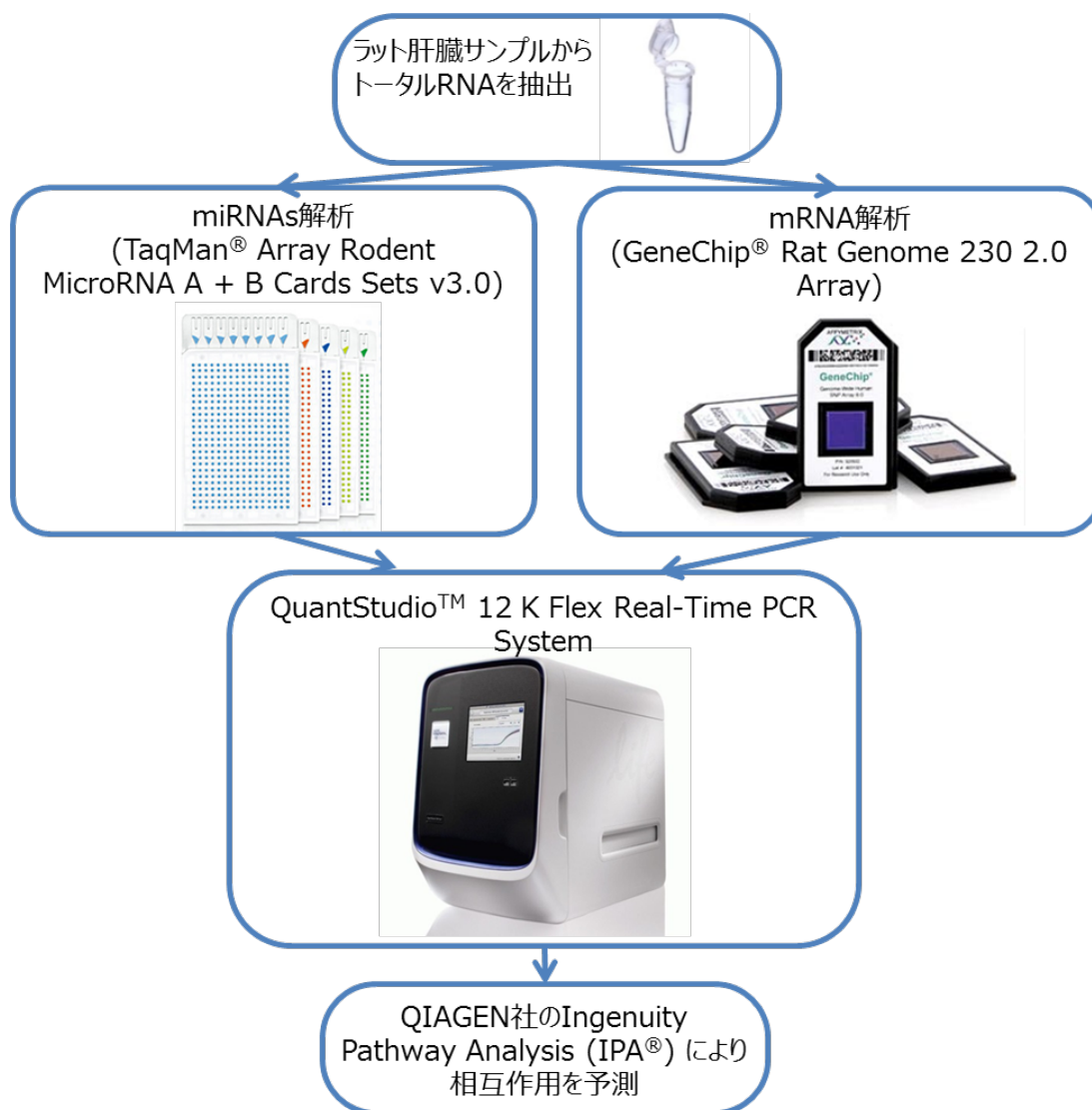


図 2 遺伝子の網羅的アレイ解析の概要

3-6-1. TaqMan array-card による microRNA 解析

Megaplex™ Pools Protocol (Life Technologies Corporation) を用いて cDNA を合成した。これに TaqMan 2x Universal PCR Master Mix (No AmpErase UNG) を加え、750 のプローブを含む TaqMan® Array Rodent MicroRNA A + B Cards Sets v3.0 (Life Technologies Corporation) による解析に供した。35 未満の Ct 値が 4 つ以上ある miRNA について統計解析を実施した。 ΔCt [$\Delta Ct = Ct \text{ miRNA} - Ct \text{ U6}$] を算出し、次に $\Delta \Delta Ct$ [$\Delta \Delta Ct = \Delta Ct \text{ CDA} - \Delta Ct \text{ CSAA}$] を $2^{-\Delta \Delta Ct}$ として算出し、2 より大あるいは 0.5 未満のものについて解析を行った。

3-6-2. GeneChip による mRNA 解析

GeneChip® 30 IVT Express Kit (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) を用いて cDNA を合成した。解析は 31099 のプローブを含む GeneChip® Rat Genome 230 2.0 Array (Affymetrix) を

用いた。シグナルは 75%に調整され、統計解析に供した。2 より大あるいは 0.5 未満のものについて解析を行った。

3-6-3. microRNA と mRNA の相互作用解析

miRNA と mRNA の相互作用の予測は QIAGEN 社の Ingenuity Pathway Analysis (IPA; QIAGEN) を用い、microRNA Target Filter で実施した。カテゴリーは Tox list にある canonical pathway により、肝線維化と HSC 活性化を選択した。

3-7. 統計解析

摂餌 12 週までのデータについては、CSAA 群と CDAA 群の有意差を検討した。まずは F 検定で分散を検討し、その後 Student の t 検定を行った。摂餌 19 及び 24 週のデータについては、CSAA、CDAA、回復群について有意差を検討した。まずは Bartlett 検定で分散を検討し、その後 Turkey 検定で 3 群の検定を行った。カットオフ値は p 値が 0.05 以下とした。

4. 結果及び考察

4-1. NASH 病態の進展と回復性の検討

【CDAA 群における NASH 病態の進展】

肝臓重量の結果を表 5 に示す。CDAA 群では摂餌 1 週以降で CSAA 群より有意に高値であった。

表 5 肝重量

Parameter	Group	Feeding period					
		3D	1W	4W	12W	19W	24W
Relative weight (% to body weight)	CSAA	3.61	4.31	3.97	3.13	2.72	2.78
	CDAA	4.03	6.68 **	7.55 **	5.41 *	4.84 **	5.02 **
	Recovery	NA	NA	NA	NA	3.13 * ##	2.81 ##
Comparison with CSAA group value	CDAA	112%	155%	190%	173%	178%	181%
	Recovery	NA	NA	NA	NA	115%	101%

体重比重量について、CSAA 群と CDAA 群あるいは回復群の有意差を* ($p < 0.05$) あるいは** ($p < 0.01$)、CDAA 群と回復群の有意差を## ($p < 0.01$) で示した。

肝臓の病理学的評価結果を図 3 に示す。CDAA 群において、NASH の典型的な病理組織変化のうち、脂肪化及び小葉性炎症は摂餌 1 週から、線維化は 4 週から認められた。脂肪化のスコアは 1 週から 3 (60%以上の肝細胞に所見あり)であり、24 週まで同等であった。脂肪化に関しては、オイルレッド O 染色を実施し HE 染色で認められた空胞が中性脂肪であることを特定している(図 4)。小葉性炎症については、1 週から 12 週にかけてスコアが上昇し、24 週まで継続していた。線維化に関しては、シリウスレッド染色で 4 週に初めて細胞あるいは類洞周囲にコラーゲン線維の増生像が認められた(図 3C 右側図の矢印)。シリウスレッドの陽性面積を測定したところ、12 週から CSAA 群と比較して有意に高値で、その後も 24 週まで経時的に増加した。なお、NASH 患者の線維化面積は 5-7%程度であることが報告されており (Goodman et al., 2007; Ishak et al., 1995)、CDAA 群の 12 週以降の線維化の程度はこれに相応するものである。

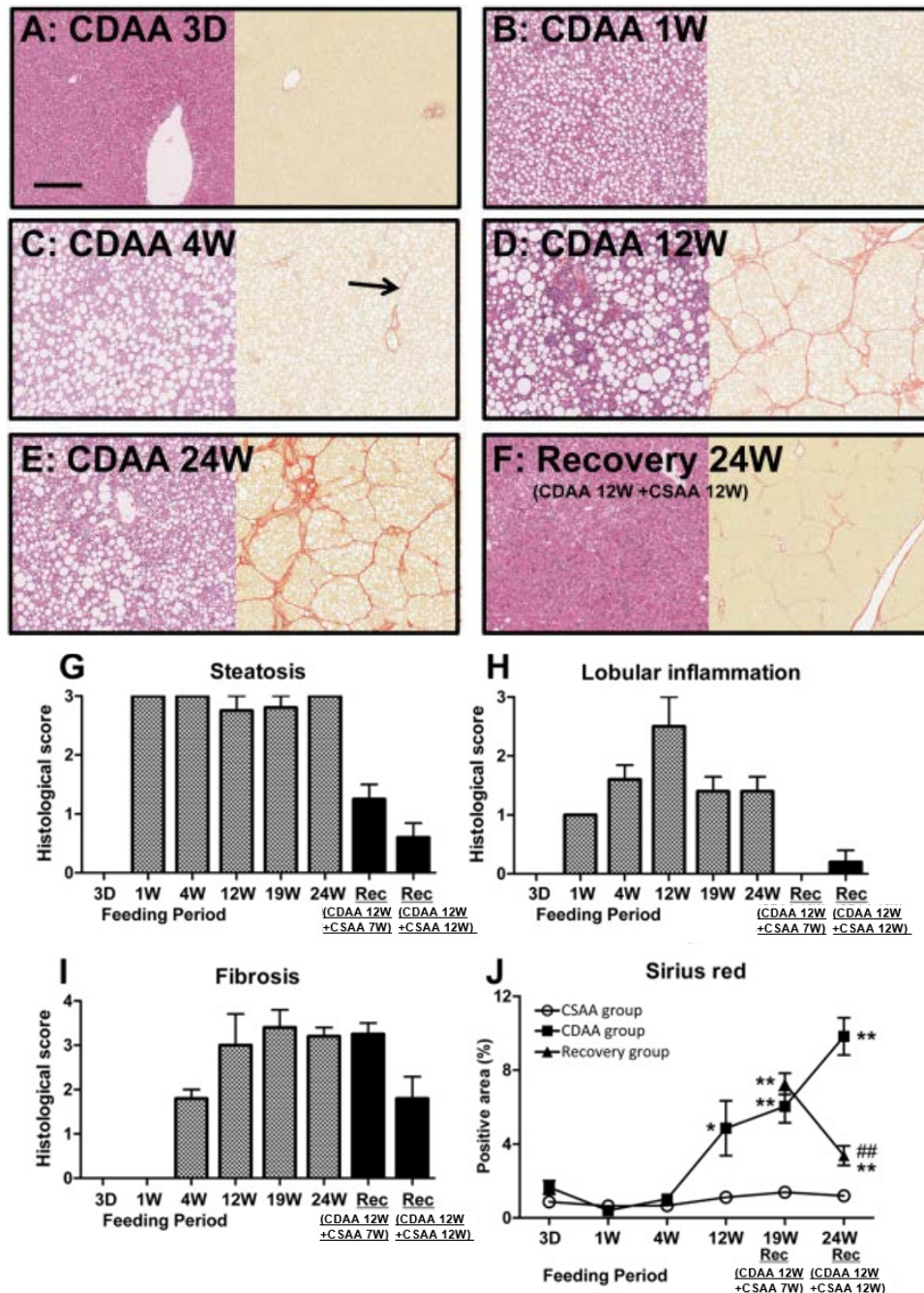


図3 肝臓の病理学的評価結果

図 A-F の左側が HE 染色、右側がシリウスレッド染色像であり、CDAA 群の摂餌 3 日 (A)、1 週 (B)、4 週 (C)、12 週 (D)、24 週 (E)、回復群の 24 週 (F) を示す。スケールバーは 200 μ m。CDAA 食摂餌 3 日にはいかなる病変も観察されないが (A)、1 週ではグレード 3 の脂肪化 (B)、4 週ではグレード 3 の脂肪化及びグレード 2 の線維化 (C、矢印は類洞周囲の線維化を示す)、12 週ではグレード 3 の脂肪化及びグレード 3 の線維化 (D)、24 週ではグレード 3 の脂肪化及びグレード 4 の線維化 (E) が確認される。回復群 24 週では、グレード 2 の線維化が確認される (F)。図 G-I は組織スコアリングの成績を示す。G が脂肪化、H が小葉性炎症、I が線維化である。スコアリング方法については 3-2 項に記載した。図 J にシリウスレッドの陽性面積を示す。CSAA 群と CDAA 群あるいは回復群の有意差を* ($p < 0.05$) あるいは** ($p < 0.01$)、CDAA 群と回復群の有意差を## ($p < 0.01$) で示した。

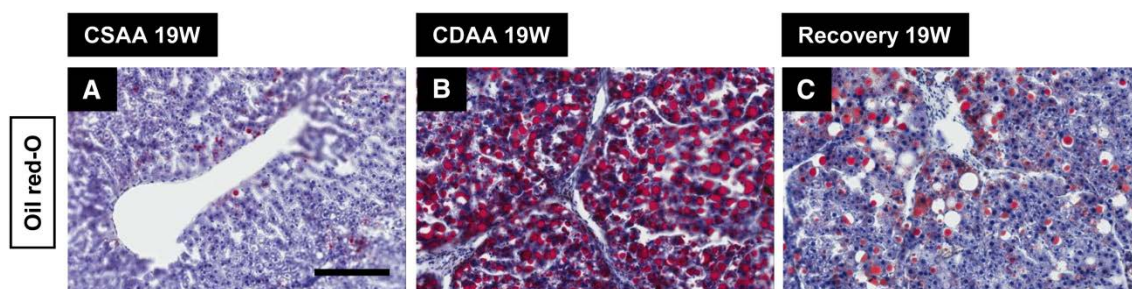


図4 オイルレッドO染色像

CSAA群(A)、CDAA群(B)、回復群(C)の19週時点のオイルレッドO染色像を示す。スケールバーは200 μm。

肝臓におけるその他の病理組織像としては、肝細胞の単細胞壊死及び分裂像は1週以降に認められ、変異細胞巣及び胆管増生は12週から経時的に増加した(表6)。一方、ヒトにおけるNASHの病理組織学的特徴の一つであるballooningなどの肝細胞傷害像については、一般的に動物モデルでは確認できないと言われているが、我々のモデルでも認められなかった。変異細胞巣はげっ歯類で加齢性あるいは化学物質で増加し、必ずしも腫瘍に繋がるわけではないが、発がん物質で誘発されることが知られている(Thoolen et al., 2010)。胆管の増生についても種々の化学物質での誘発が報告されており、肝障害あるいは胆汁の流出障害に関連することが知られている(Thoolen et al., 2010)。今回の試験系では胆汁うっ滞は認められていないので、胆管増生は肝障害に起因している可能性があった。

表6 肝臓の脂肪化、小葉性炎症、線維化以外の病理所見

Findings	Group	Feeding period					
		3D	1W	4W	12W	19W	24W
Single cell necrosis	CDAA	0	0.8	0.2	0.4	1.0	1.0
	Recovery	NA	NA	NA	NA	0	0
Mitotic figure	CDAA	0	1.0	0.8	0.4	1.0	1.0
	Recovery	NA	NA	NA	NA	0	0
Altered cell foci	CDAA	0	0	0.2	2.4	3.8	3.8
	Recovery	NA	NA	NA	NA	2.2	2.8
Bile ductal, proliferation	CDAA	0	0	0.2	1.0	1.6	1.8
	Recovery	NA	NA	NA	NA	0	0

組織所見の評価は0：特記すべき所見なし、1：軽微な変化、2：軽度な変化、3：中等度の変化、4：重度の変化、の4段階で行った。各群の各剖検時点について平均のスコアを算出した(n=5)。

肝逸脱酵素であるAST及びALT活性は血清中で1週から有意に増加し、4週でピークを示した(図5)。その後低下したものの、CSAA群と比較すると有意に高値であった。これらの逸脱酵素が4週以降に低下した原因は不明だが、肝細胞障害としては減少していた可能性がある。同様の報告として、四塩化炭素誘発肝障害モデルにおいても、連投12あるいは16週において、組織所見は増悪したが、AST及びALT活性は8週以降低下が認められた(Xing et al., 2011)。

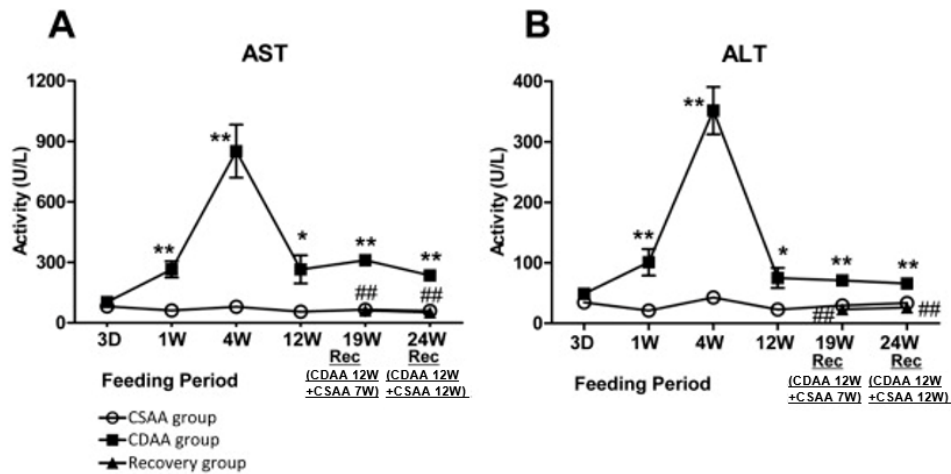


図5 肝障害パラメータの結果

各剖検ポイントのAST (A) 及びALT (B) 活性を示す。○、■、▲はそれぞれCSAA群、CDAA群、回復群を示す。値は平均値±SEを示し、CSAA群とCDAA群あるいは回復群の有意差を* ($p < 0.05$) あるいは** ($p < 0.01$)、CDAA群と回復群の有意差を## ($p < 0.01$) で示した。

なお、体重は試験期間中順調に増加した。摂餌量はCSAA群と比較し差は認められなかった (data not shown)。肝臓以外の全身組織に対しても病理検査を実施しており、CDAA群では骨格筋の壊死、再生が認められたが、発現機序は不明であった。その他の組織にはCDAA食誘発の病変は認められていない。

【回復性】

19週時点(CDAA食12週摂餌後、CSAA食7週摂餌)で肝臓の体重比重量はCDAA群と比較し有意に低値で、CSAA群とほぼ同等であった(表5)。これは、病理組織検査における脂肪化と小葉性炎症の明らかな回復性を反映していると考えられた(図3、図4)。一方線維化は19週時点ではスコアリング、シリウスレッド陽性面積ともにCDAA群の19週と同程度であり、回復性は認められなかった。いずれの評価項目も24週時点で回復傾向を示した(図3)。その他の肝臓の病理所見に関しては、単細胞壊死、分裂像及び胆管増生は19週時点で消失し、変異細胞巣についても12週時点から増悪しなかった(表6)。血清中のAST及びALTの活性は19週時点からCSAA群と同程度まで低下した(図5)。

肝線維化あるいは肝硬変の回復性については論争がある(Friedman et al., 2006)。NASH患者に関していうと、脂肪化と炎症はピオグリタゾンの6あるいは22ヵ月投与、またはビタミンEの22ヵ月投与で回復したが、いずれの薬物投与でも線維化は回復しなかった(Belfort et al., 2006; Sanyal et al., 2010)。一方でB型肝炎に伴う肝線維化はテノボビル5年投与で退縮(Marcellin et al., 2013)、C型肝炎に伴う肝線維化もインターフェロン α -2bとリバビリンの4年投与で進行を抑制した例が報告されている(Polynard et al., 2002)。自己免疫疾患に伴う肝線

維化は、プレドニゾロンの 2~8 年投与で効果があった例が報告されている (Dufour et al., 1997)。なお、現在のところ NASH 治療薬として承認されている薬物は日本においても欧米においてもなく (Townsend et al., 2017)、薬物治療はリスクファクターである糖尿病、高血圧、高脂血症からの改善効果を狙っている (日本消化器病学会 NAFLD/NASH 診療ガイドライン 2014)。このうちのいくつか、例えばピオグリタゾン は糖尿病の治療薬として承認を受けているが、NASH への適応拡大のための臨床試験が進行中である。一方、動物モデルに関しては、次に示す通り迅速な回復が報告されている。MCD 食誘発の肝障害モデルでは、10 週間摂餌で形成された bridging fibrosis (スコア 3) は、正常食に戻して 2 週間でコラーゲン線維の顕著な減少がみられた (Mu et al., 2010)。四塩化炭素誘発の肝障害の自然回復モデルでは、4 週投与で形成された bridging fibrosis (スコア 3) は、投与終了 3 日後から回復性が見られた (Iredale et al., 1998)。胆管結紮による線維化モデルでは、術後 21 日に線維化がピークに認められるが (スコア 3)、その 7 日後にはコラーゲン線維の減少傾向がみられた (Issa et al., 2001)。これらの知見と異なり、我々の CDAA 誘発モデルでは回復性が迅速でなく、この点からもヒトの病態により近いと考えられた。一方、動物モデルでも薬物治療の報告があり、四塩化炭素誘発の肝障害ラットにおいて、2 週間で形成された線維化は PPAR- α/δ アゴニストである Elafibranor の 1 週間投与で回復性が認められた (Staels et al., 2013)。ホスファチジルエタノールアミン N-メチルトランスフェラーゼノックアウトマウスに HF 食を 10 週間与えると NASH の病理組織変化が誘発されるが、HF 食にピオグリタゾンを混入すると線維化の発生を抑制した (van der Veen et al., 2016)。

【小括】

CDAA 食の摂餌により典型的な NASH 病変である脂肪化、小葉性炎症、線維化が確認された。特に線維化は 4 週から認められ、24 週まで進展が認められた。回復性に関しては、脂肪化及び炎症は 19 週時点 (CDAA 食 12 週摂餌後、CSAA 食 7 週摂餌) で回復したが、線維化は 19 週では変化なく、24 週時点 (CDAA 食 12 週摂餌後、CSAA 食 12 週摂餌) で回復傾向を示した。このモデルでの肝線維化の病理発生及び回復性のメカニズムを研究することは、ヒトの病態を理解する上で有用であると考えられた。

4-2. 肝線維化の発現及び回復性のメカニズムの検討

【線維形成因子】

線維化は肝臓においては、伊東細胞(肝星細胞 hepatic stellate cell:HSC)が種々の因子で活性化することにより引き起こされると考えられている。また HSC を活性化させる因子としては、T 細胞から産生される IL-6、肝細胞、胆管上皮及びクッパー細胞から産生される TGF- β 、TNF- α 、PDGF などが報告されている(Bataller et al., 2005)。形成されたコラーゲン線維に対しては、MMP がこれを融解し、TIMP は MMP を抑制あるいはコラーゲン線維合成を促進することが知られている。MMP 及び TIMP には種々の分子種があるが、MMP-2 及び 9 は NASH における肝線維化あるいは肝細胞がんとの関与が報告されており、それぞれに対し TIMP-2 及び 1 が抑制することが知られている(Brew 2010; Ries 2014)。

活性化した HSC は α -SMA、休止期及び活性化 HSC はシナプトフィジン陽性になることが知られている(Schmitt-Gräff et al., 1991; Cassiman et al., 1999)。休止期の HSC では脂肪の沈着で識別される。近年では、 α -SMA に弱陽性を示す HSC 由来ではない myofibroblast も線維化を担っていることが報告されている(Cassiman et al., 2002; Hinz et al., 2007)。肝線維化を引き起こす疾患としては、NASH 以外にもアルコール性肝炎、B 型あるいは C 型肝炎、自己免疫性肝炎などが知られているが、病理発現機序として HSC の活性化を起点とし、類洞の障害、血管新生等を示すことは共通している(Tsochatzis et al., 2014)。

線維化のメカニズムを検討するため、種々の因子の発現を免疫組織化学あるいは qRT-PCR で検出した。CDAA 群における HSC 活性化因子の mRNA 発現量を検討したところ、TGF- β 、MMP-2 及び 9、TIMP-1 及び 2 のいずれについても、CSAA 群と比較して有意な上昇が認められた(図 7F-J)。免疫組織化学において HSC の特染を行ったところ、CDAA 群では抗 α -SMA 染色で活性型 HSC が確認された(図 6Q 矢印)。抗シナプトフィジン染色では、活性型 HSC に加え(図 6T 矢印)、脂肪滴を蓄積した休止期 HSC が認められた(図 6T 矢頭)。なお、休止期 HSC は CSAA 群でも確認された(図 6S 矢頭)。 α -SMA については肝臓の mRNA 及びタンパク発現量を確認し、mRNA は CDAA 食摂餌 12 及び 19 週で CSAA 食と比較し有意に高値(図 7E)、タンパクは 19 週で CSAA 群と比較し有意に高値であった(図 8D)。

回復群については、免疫組織化学の抗シナプトフィジン染色で活性型 HSC が認められたが(図 6U 矢印)、抗 α -SMA 染色では陽性ではなかった(図 6R)。病理組織検査では 19 週時点でスコアリング、シリウスレッド陽性面積ともに CDAA 群の 19 週と同程度であり、線維化に回復性は認められなかったが(図 3)、前述の HSC 由来ではない myofibroblast が線維化を担っていた可能性がある。活性化因子に関しては、TGF- β 、MMP-2 及び 9、TIMP-1 及び 2 のいずれについても、CDAA 群と比較して肝臓の mRNA 発現量の有意な減少が認められた(図 7F-J)。肝臓における α -SMA の発現は、mRNA 及びタンパクともに、CDAA 群と比較し有意に低値であった(図 7E 及び図 8D)。

線維形成因子が減少していたにも関わらず、回復群 19 週時点で線維化が持続していたため、その原因を更に検討することにした。

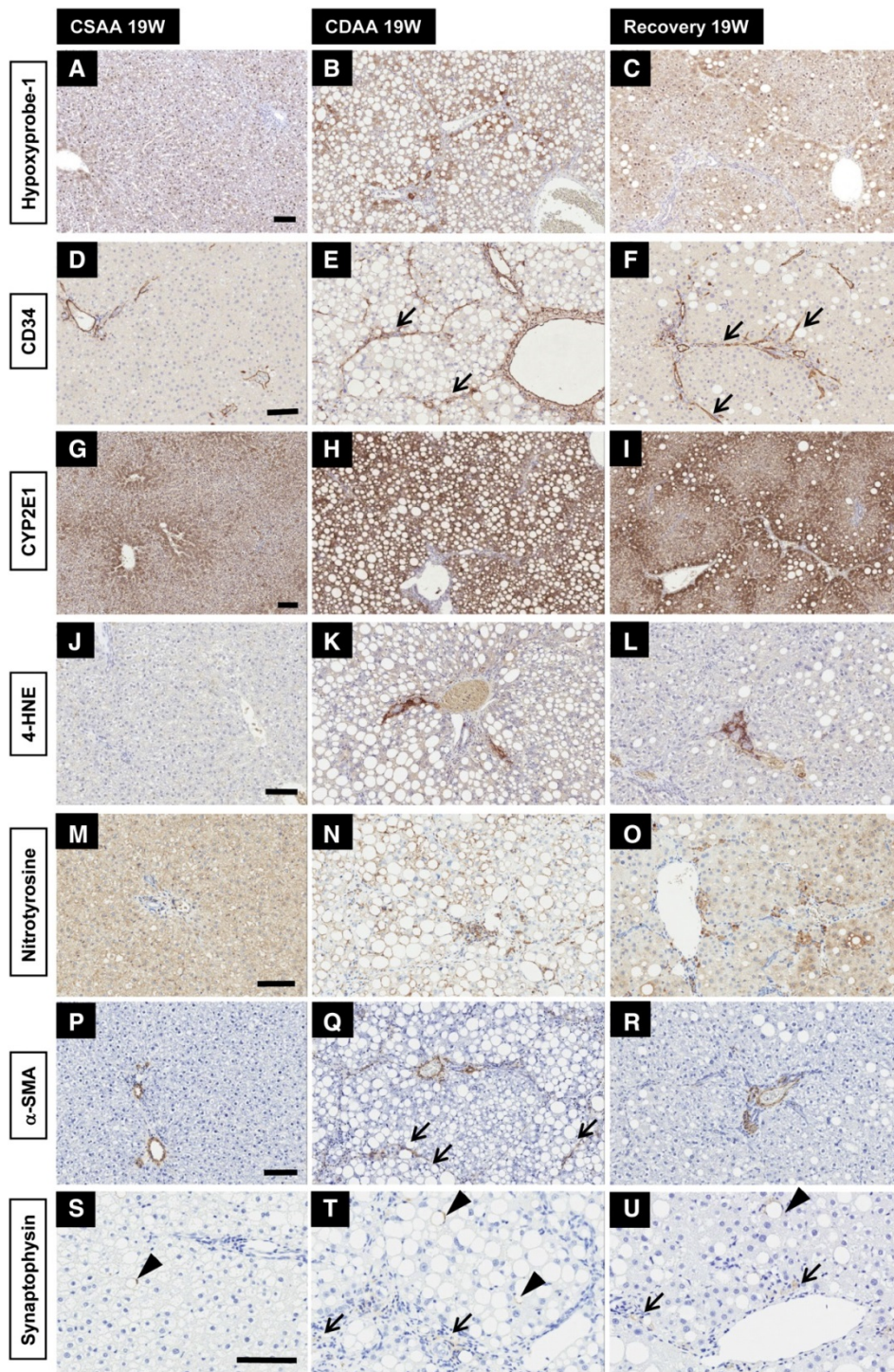


図 6 肝臓の免疫組織化学

抗 hypoxyprobe-1 (A-C)、抗 CD34 (D-F)、抗 CYP2E1 (G-I)、抗 4-HNE (J-L)、抗 ニトロチロシン (M-O)、抗 α -SMA (P-R)、抗シナプトフィジン (S-U) の代表的な染色像を示す。いずれも 19 週時点で CSAA 群を左、CDA 群を中央、回復群を右のカラムに示す。スケールバーは 100 μ m。図 E 及び F の矢印は血管新生を示す。図 Q、T 及び U の矢印は活性化 HSC、図 S-U の矢頭は脂肪を蓄積した休止期の HSC を示す。

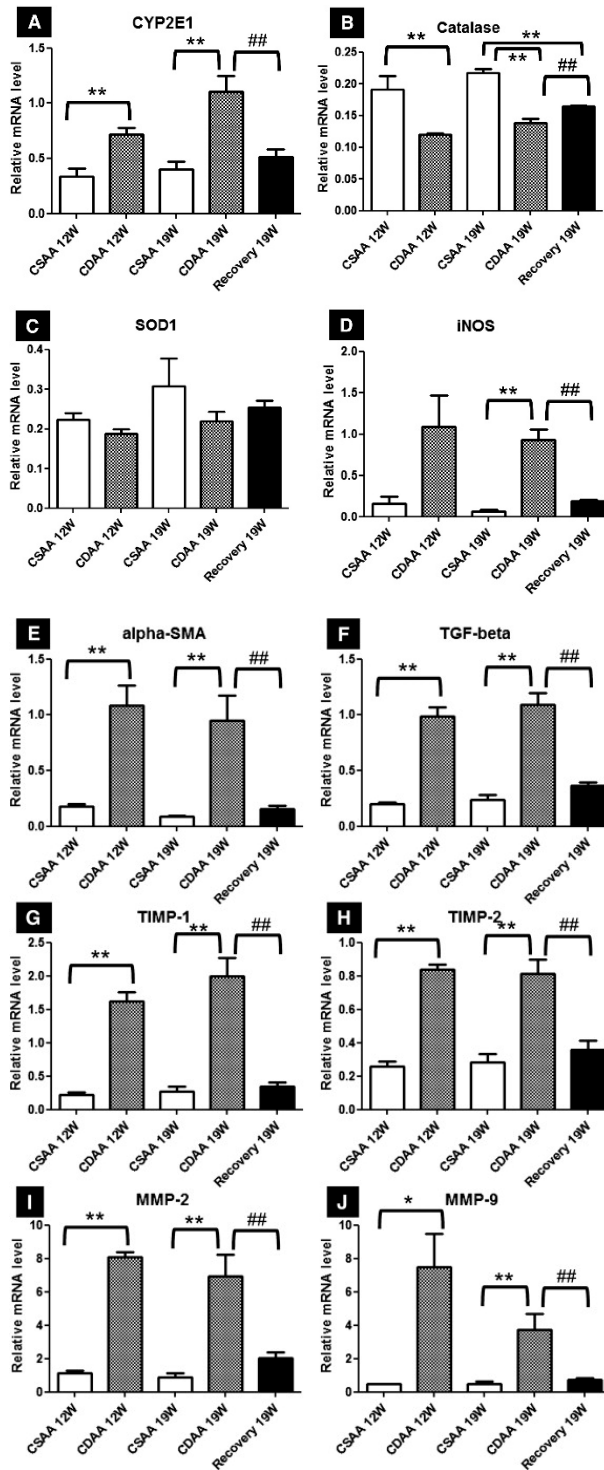


図7 肝臓の mRNA 発現量

12 あるいは 19 週時点の各群の CYP2E1 (A)、catalase (B)、SOD1 (C)、iNOS (D)、 α -SMA (E)、TGF- β (F)、TIMP-1 (G)、TIMP-2 (H)、MMP-2 (I) 及び MMP-9 (J) の GAPDH に対する発現量を示す。値は平均値 \pm SE を示し、CSAA 群と CDAA 群あるいは回復群の有意差を* ($p < 0.05$) あるいは** ($p < 0.01$)、CDAA 群と回復群の有意差を## ($p < 0.01$) で示した。

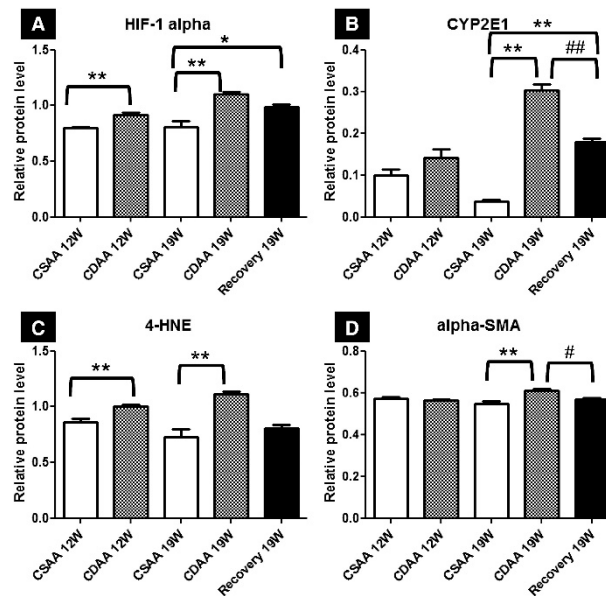


図 8 肝臓のタンパク発現量

12 あるいは 19 週時点の各群の HIF-1 α (A)、CYP2E1 (B)、4-HNE (C) 及び α -SMA (D) の GAPDH に対する発現量を示す。値は平均値 \pm SE を示し、CSAA 群と CDAA 群あるいは回復群の有意差を* ($p < 0.05$) あるいは** ($p < 0.01$)、CDAA 群と回復群の有意差を# ($p < 0.05$) あるいは## ($p < 0.01$) で示した。

【酸化ストレス】

酸化ストレスは線維化あるいは炎症を引き起こす要因として知られるため (Parola et al., 2001; Richter et al., 2016)、これらの関与を検討した。検討した因子は以下の通り(ABC 順)。

- ✓ Catalase: ペルオキシソームに存在し、過酸化水素を酸素と水に変える反応を触媒する酵素。カタラーゼの活性は肝細胞中の過酸化水素濃度と反比例することが知られている (Angermüller et al., 2009)。
- ✓ CD34: 既存の血管内皮細胞及び新生血管で発現する膜貫通型糖タンパク (Ito et al., 1995)。
- ✓ CYP2E1: 肝細胞内では小胞体に存在し、エタノールあるいは脂質の酸化に関与するチトクロム酵素 (Jimenez-Lopez et al., 2005)。酸化物はより反応性が高く、酸化ストレスをはじめとする種々の毒性反応に関連すると考えられている。
- ✓ HIF-1 α : 低酸素状態で誘導あるいは活性化される転写因子で、血管内皮細胞増殖因子 (vascular endothelial growth factor: VEGF)、線維芽細胞増殖因子 (fibroblast growth factor: FGF) 等の産生を介して血管新生を促す (Coppole et al., 2009)。
- ✓ 4-HNE: 不飽和脂肪酸の過酸化アルデヒド物の一つであり、酸化ストレスの産物として知られている (Saeki et al., 2006)。消失に関して、ラットへ 1,2-ジクロロベンゼン投与で引き起こされた酸化ストレスの 24 時間後に染色性がピーク、48 時間後には消失したと

いう報告がある(Hoglen et al., 1998)。

- ✓ Hypoxyprobe-1: 化学物質名は 2-ニトロイミダゾールで、酸素濃度が低いときに還元され細胞内タンパクと付加体を形成し、これが免疫組織化学で検出される(Arteel et al., 1995; Ghafar et al., 2002)。消失に関して、ラットを 20 分間の還流の後に 50 分間順流あるいは逆流で還流処理して肝臓を染色したところ、順流では小葉中心部、逆流では小葉辺縁帯に染色が認められたため、数分で消失するものと考えられた(Arteel et al., 1995)。
- ✓ iNOS: 誘導型の NO 合成酵素で、マクロファージや血管で産生される。炎症反応で産生が亢進する(Wihastuti et al., 2014)。ニトロチロシンとの共存も報告されている(Halliwell et al., 1999)。
- ✓ Nitrotyrosine: 生体内のスーパーオキシドラジカルと一酸化窒素が存在すると、酸化力の強いペルオキシナイトライト(ONOO⁻)が産生されるが、これがタンパクのチロシン残基に結合してニトロチロシンとなる(Halliwell et al., 1999)。
- ✓ SOD1: O₂を H₂O₂に変換する酵素であり、スーパーオキシドの除去に働く(Bomzon et al., 2001)。SOD 活性は酸化ストレスに伴い低下することが知られており、四塩化炭素誘発の肝障害での報告がある(Chu et al., 2016)。

CDAА 群の変化は以下の通りであった。

低酸素関連の因子として、Hypoxyprobe-1 の染色性を検討したところ、CDAА 群の肝臓では小葉全域に強い陽性像が認められた(図 6B)。CSAA 群では小葉中心性のみ陽性像が確認された(図 6A)。正常の肝臓では、辺縁部に存在する小葉間動脈から酸素を含む血液が供給され、最後に小葉中心部に至るため、小葉中心部の酸素濃度が低いことが知られているが、これと一致した結果となっていた。

低酸素状態で誘導あるいは活性化される HIF-1 α の肝臓中のタンパク発現量は、CDAА 群で CSAA 群より有意に高値であった(図 8A)。

酸素濃度が低いと、血液供給を補うため血管が新生されることが知られているが、CDAА 群では小葉間を結ぶように CD34 陽性の新生血管が認められた(図 6E 矢印)。

次に、細胞内の酸化ストレスを示す因子である CYP2E1 は、免疫染色では CDAА 群において小葉全域に強い陽性像が認められた(図 6H)。CSAA 群では小葉中心性に陽性像が見られ、低酸素が検出された部位と類似していた(図 6G)。肝臓の mRNA 量では 12 週及び 19 週(図 7A)、タンパク量では 19 週において(図 8B)、CDAА 群で CSAA 群と比較し有意に発現亢進が確認された。

カタラーゼは CDAА 群において肝臓中の mRNA 発現が CSAA 群より有意に低値であった(図 7B)。

SOD1 の肝臓中の mRNA 発現量は、カタラーゼと類似の傾向を示し、CDAА 群で CSAA 群と比較して低値であった(図 7C)。

4-HNE は免疫染色で CDAА 群では炎症巣あるいはその周囲に陽性像が確認された(図 6K)。CSAA 群には陽性像は認められなかった(図 6J)。肝臓中のタンパク発現量は、12 及び 19 週時点で CDAА 群の有意な発現亢進が認められた(図 8C)。

iNOS の肝臓中 mRNA 発現量は、CDAА 群で CSAA 群と比較し有意に高値あるいは高値の傾向があった(図 7D)。

ニトロチロシンの免疫染色では、CSAA 群において陽性像はみられず(図 6M)、CDAА 群では炎症巣あるいはその周囲に陽性像が確認された(図 6N)。

回復群の 19 週時点では、上記のうち CD34、CYP2E1、カタラーゼ、4-HNE、ニトロチロシンの免疫染色の陽性像が継続して認められた(図 6F 矢印、I、L、O)。CYP2E1 の mRNA 発現量は CSAA 群と同程度まで低下し回復性がみられたが(図 7A)、タンパク量としては CSAA 群より有意に高値であった(図 8B)。カタラーゼの mRNA 発現量は CSAA 群より有意に低値(図 7B)、HIF-1 α のタンパク発現量は CSAA 群と比較して有意に高値を保っていた(図 8A)。つまり、多くの因子で回復していないという結果が得られた。

低酸素とそれに伴う血管新生は、線維化の上流のシグナル伝達系にあることが報告されている(Copple et al., 2009; Lee et al., 2011)。まず低酸素に伴い活性酸素種が放出され、Ras/ERK や JNK シグナル伝達系が活性化される。次により長期の反応として、HIF-1 α の活性化に伴い VEGF や FGF 受容体発現が亢進して血管新生が起こる(Novo et al., 2012; Coulon et al., 2011)。CD34 陽性の“arterialized sinusoid”はヒトの肝硬変でも認められ、多孔性/有窓性や scavenger 作用を失っていて病変治癒の主な障害となっていることが報告されている(DeLeve, 2007; Wanless et al., 2000)。回復群 19 週時点で HIF-1 α の発現量が高値を保ち、CD34 陽性の血管新生が認められ低酸素の継続と血管構築の変化がみられたことは、回復性の遅延に関連している可能性が高い。

酸化ストレスも NASH の病理発生に重要な因子であり、NASH 患者においてカタラーゼや SOD1 のスカベンジャー機能の低下が報告されている(Baskol et al., 2007; Rolo et al., 2012)。iNOS は四塩化炭素誘発を含む種々の肝障害モデルでも発現亢進が認められ、病理発生及び回復性の中心的な役割を担っていると考えられている(Li et al., 1999; Muriel, 1998)。我々の試験系では CYP2E1 及び 4-HNE も CDAА 群で発現が亢進しており、回復群でも残存した線維化に沿って発現が持続していたことから、酸化ストレスの関与が示唆された。

この酸化ストレスを惹起する活性酸素の産生源としては、酸化型の遊離脂肪酸が知られている(Gambino et al., 2011; Liu et al., 2015)。肝細胞における遊離脂肪酸の分解過程としては、ミトコンドリアあるいはペルオキシソームでの β 酸化、ミクロソームでの ω 酸化があるが、NASH においてはミトコンドリアの機能低下や ATP 合成能の低下が報告されているため、遊離脂肪酸の酸化はミトコンドリアの β 酸化からペルオキシソームの β 酸化及びミクロソームの ω 酸化にシフトしており、活性酸素の産生が増している。CYP2E1 はミクロソームにおける ω 酸化に関与しており、この発現亢進も活性酸素産生を示唆している。肝細胞は脂肪酸を蓄積するための

細胞ではないため、脂肪化は代謝経路の異常及びそれに続く障害性変化があることを示す。ヒトの NASH 治療として提案されているピオグリタゾン等のチオアオリジン誘導体あるいはビタミン E の作用機序は、脂質代謝の改善、酸化ストレスの軽減であり(日本消化器病学会 NAFLD/NASH 診療ガイドライン 2014)、これらが NASH の病態に重要であることが分かる。

回復期間においては、脂肪化は消失していたが酸化ストレスが継続していた。その原因としては、CD38 で検出される血管構築の変化が認められていることから、これに伴う低酸素の継続の可能性が高い。また、19 週時点で線維形成因子の発現は減少していたにも関わらず、組織学的には線維化に回復傾向が認められなかった。細胞外基質の沈着は障害により失われた肝実質(肝細胞)の間を埋める役割があるが、この構造は正常の有窓類洞細胞の機能を有さない瘢痕であり、細胞間ネットワークも正常に行われなことが報告されている(Natarajan et al, 2017)。これらのことから、19 週時点では線維化が進展しているわけではなく、ヒトで報告のある瘢痕あるいは治癒過程であると考えられた。

【小括】

肝線維化のメカニズムに関し、CDAA 群では HSC を活性化させる TGF- β 、線維融解因子である MMP-2 及び 9、MMP の阻害因子である TIMP-1 及び 2 の発現亢進が認められた。回復群においては、全ての因子で CDAA 群と比較すると有意に低値であった。更に CDAA 群では小葉全域が低酸素状態であり、酸化ストレスの亢進が確認された。酸化ストレス因子は回復群 19 週時点でも発現亢進が持続していた。これらの結果から、酸化ストレスが肝線維化の病理発生及び回復性の遅延に重要な役割を担っていると考えられた。

4-3. 肝線維化バイオマーカーの検討

【肝線維化バイオマーカーの現状】

肝線維化の確定診断は肝生検が基本であるが、最近では以下に示す新たな血中マーカー、組み合わせの評価、画像診断が報告されている。ただしそれぞれ下線で示す欠点があり、特に軽度の線維化を診断するのは難しい。

血中マーカーとしてはヒアルロン酸、Procollagen type III amino-terminal peptide (PIIINP)、IあるいはIV型コラーゲン、ラミニン、MMP-9、YKL-40等がある(Manning et al., 2008)。

- ✓ ヒアルロン酸:HSCにより合成されるグルコサミノグリカンで、ECMの構成成分でもある。線維化マーカーのうちでは組織病変と最も良好な相関を示すが、食後に上昇してしまうという欠点がある。
- ✓ PIIINP:III型コラーゲンのプロペプチドN末端。慢性化すると線維化と比例しない。
- ✓ I型あるいはIV型コラーゲン:血中 mRNA あるいはタンパクの局在は小葉辺縁部のみである。
- ✓ ラミニン:非コラーゲンの糖タンパク。線維化との関連はIV型コラーゲンより劣る。
- ✓ YKL-40:線維合成の促進因子としても機能する糖タンパクで、線維化領域で発現が上昇するとされるが、線維化の予測性は高くない(Tao et al., 2014)。

上記血中マーカーと年齢などを組み合わせた評価もあるが、いずれも軽度な線維化の予測性は低い(Ebrahimi et al., 2016)。

- ✓ AST to Platelet Ratio Index (APRI):AST÷血小板数で算出される。特異性は81%だが、感度は46%と低い(Rath et al., 2016)。
- ✓ BARD score:Body Mass Index (BMI)、AST/ALT比、糖尿病罹患でスコア化する方法。BMIが28以上であれば1ポイント、AST/ALT比が0.8以上であれば2ポイント、II型糖尿病に罹患していたら1ポイントで、合計ポイントが2以上で線維化が疑われる。特異度は81%、感度は46%と低い(Rath et al., 2016)。
- ✓ Enhanced Liver Fibrosis (ELF)スコア:TIMP-1、ヒアルロン酸、PIIINPを組み合わせた評価で、臨床適応されている。中等度以上の線維化には予測性高い(Dyson et al., 2014)。
- ✓ FibroTest: α 2-マクログロブリン、ハプトグロビン、アポリポタンパク A1、 γ GT及びビリルビンを年齢、性と組み合わせるもので、グレード2以上の線維化にはある程度の予測性が得られている(Shaheen et al., 2007)。

画像診断でも感度あるいは特異度が低く、軽度な線維化の予測は難しい。

- ✓ 肝硬変に対しては、超音波診断で感度79%及び特異度80%、CTは感度77%及び特異度68%、MRIは感度85%及び特異度100%(Sharma et al., 2014)。
- ✓ MR Elastography:新しい技術で、通常のMRIに加え、肝実質の硬度を評価したものである。グレード2以上の線維化に対して感度は94%と高いが、特異度は68%と低い(Yoon et al., 2014)。

このような状況から、我々は特に初期の軽度な線維化に対し良好な相関を示すバイオマーカーの探索を試みた。小型、内因性の noncoding RNA で、mRNA の転写あるいは翻訳調節機能を有す microRNA に注目した (Ambros, 2001)。microRNA は種々の生理的作用あるいは病態に重要な役割を担っていることが報告されつつある。また microRNA は血中及び体液中で安定に存在し、かつ種により保存されていることから (Mitchell et al., 2008)、バイオマーカー候補として適していると考えた。

【qRT-PCR 解析による miR-21, MMP-9, TIMP-1 の経時変化】

我々は肝線維化を促進するという報告のある miR-21 に注目した (Teng et al., 2015)。miR-21 は TMEM49 というタンパクをコードする遺伝子のイントロン部分から発生し、TMEM49 の mRNA の発現はほとんどの組織で認められる (Teng et al., 2015)。miR-21 はヒトの肝線維化患者において上昇が認められる他、動物モデルでも肝線維化で発現亢進が報告されている (Marquez et al., 2010; Wang et al., 2015)。ヒトでは C 型肝炎においてだが肝線維化のグレードと健常人との比較が検討されており、特にグレード 3 以上では、重篤度に応じて miR-21 の発現量も高いという成績が得られている (Marquez et al., 2010)。miR-21 はチオアセタミドあるいは四塩化炭素で線維化が誘発されたマウスの肝臓で発現が誘導され (Zheng et al., 2013)、住血吸虫症誘発の肝線維化でも発現誘導が確認されている (Cai et al., 2015; He et al., 2015)。さらに HSC の培養細胞系でも、血小板由来増殖因子処理による活性化で miR-21 が誘導されることが報告されている (Wei et al., 2013)。

また、肝臓中の miR-21 が他の因子に与える影響を検討するため、miR-21 と相補配列があり抑制関係が報告されている MMP-9 と、これを抑制する TIMP-1 の mRNA 発現量を検討した。MMP-9 と TIMP-1 は、組織リモデリング、細胞増殖、血管新生、細胞生存に関して相互作用することが知られており (Abraham et al., 2005; Ries, 2014)、両者の複合体が細胞外基質の産生を促進することも報告されている (Iredale et al., 1996; Ries, 2014)。また、TIMP-1 は肝線維化を示すヒトにおいて発現が亢進 (Benyon et al., 1996)、あるいは四塩化炭素あるいはアルコール誘発の肝線維化モデルラットの HSC においてコラーゲン線維増生に先立って発現亢進する (Iredale et al., 1996; Herbst et al., 1997; Xu et al., 2004)。糖尿病を示す kk-ay マウスによる腎線維化モデルにおいて、miR-21 の発現亢進、MMP-9 の発現低下及び TIMP-1 の発現亢進が報告されている (Wang et al., 2013)。

CDAА 群の変化は以下の通りであった。

肝臓中 miR-21 は摂餌 3 日から CSAA 群と比較して有意に高値となり、4 週でピークとなった (図 9A)。その後低下傾向を示したが、24 週まで CSAA 群と比較すると有意に高値であった。肝臓中の miR-21 が、いかなる病理変化も認められなかった 3 日から上昇していたことは、これが障害された肝細胞から逸脱した因子ではなく、病理発生機序に関与していることを示唆していた。

血中 miR-21 は 1 週から CSAA 群と比較して有意に高値となり、肝臓中とパラレルな変動を

示した(図 9B)。なお、miR-21 は正常マウスにおいて心臓, 脾臓, 小腸, 結腸に発現しているが、発現量は低いことが報告されている(Lagos-Quintana et al., 2002)。そのため、血中での発現は肝臓中の発現亢進を反映していると考えられた。一方、miR-21 以外に肝線維化との関連が報告される miRNA 等(miR-17, 19b, 26a, 30c, 92a, 103, 122, 148a, 188, 192, 194, 203, 355)についても、CDAA 群の 1 及び 4 週の発現量を 3 日の発現量と比較したが、一定の傾向は認められなかった(data not shown)。

肝臓中の MMP-9 の mRNA 発現量は、摂餌 4 週から CSAA 群と比較し有意に高値となり、その後低下傾向を示したものの 24 週まで有意に高値を保っていた(図 9C)。

肝臓中の TIMP-1 の mRNA 発現量については、摂餌 1 週から CSAA 群と比較し有意に高値であった(図 9D)。

回復群では、肝臓中及び血漿中 miR-21、肝臓中の MMP-9 及び TIMP-1 の mRNA いずれも CDAA 群と比較し有意に低値であり、CSAA 群と同等であった(図 9A、B、C、D)。

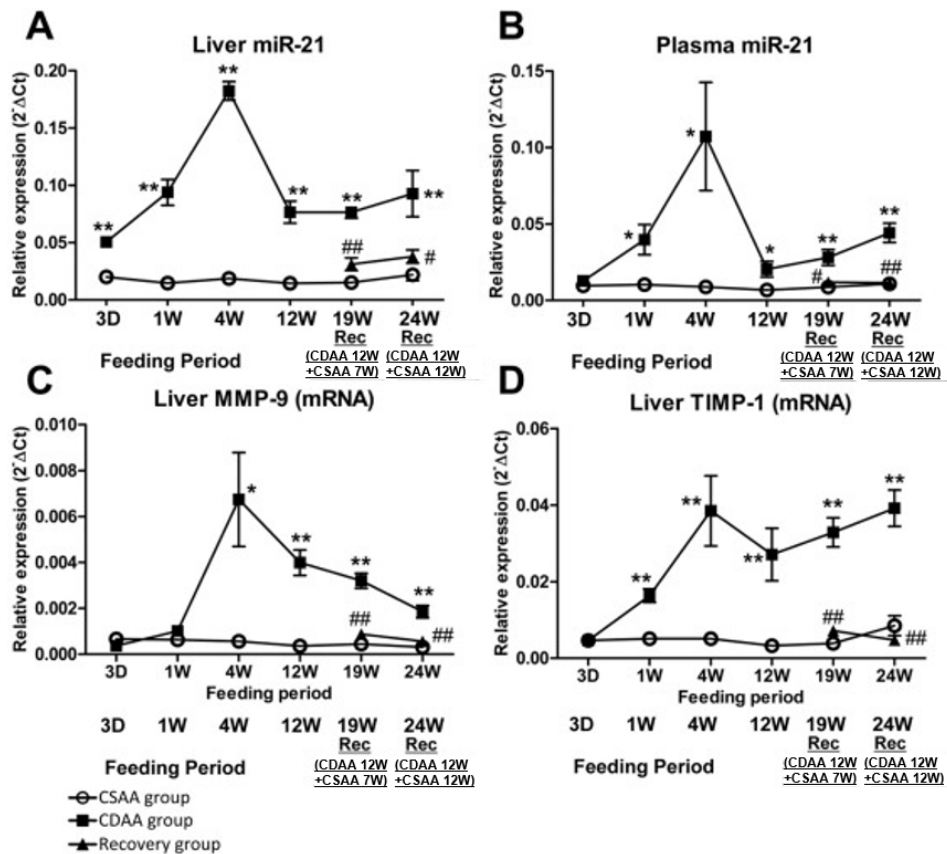


図9 肝臓あるいは血漿中 miR-21、肝臓中 MMP-9 及び TIMP-1 の mRNA の経時変化。全剖検時点における肝臓中 miR-21 (A)、血漿中 miR-21 (B)、肝臓中 MMP-9 の mRNA (C)、肝臓中 TIMP-1 の mRNA (D) の発現量を示す。○、■、▲がそれぞれ CSAA 群、CDAA 群、回復群を示す。値は平均値±SEを示し、CSAA 群と CDAA 群あるいは回復群の有意差を* ($p < 0.05$) あるいは** ($p < 0.01$)、CDAA 群と回復群の有意差を## ($p < 0.01$) で示した。

我々の試験系で、肝線維化に伴って miR-21、MMP-9 及び TIMP-1 の発現が亢進したことは、これらが線維化と密接に関わっていることを示唆していた。CDAA 群の肝臓で発現亢進が初めて認められた時点は、miR-21 が摂餌3日、TIMP-1 が1週、MMP-9 が4週であり、病理組織学的検査で肝線維化が認められた時点は4週であったことから、miR-21 及び TIMP-1 は初期の線維形成のメカニズムに関与している可能性が考えられた。Wang らの報告では miR-21 と MMP-9 の発現の逆相関が認められ、直接の抑制関係が示されていたが、今回我々の実験では、4週以降はどちらも発現が亢進しており、miR-21 の直接の遺伝子制御が示されなかった。miR-21 をはじめとする遺伝子の制御関係については、更なる検討が必要である。

線維化と miR-21 の関連を更に検討するため、miR-21 と相補配列を示す合成オリゴヌクレオチドである antagomir-21 を投与した報告もある。LDL 受容体ノックアウトマウスに MCD 食を14週間与えると、肝臓で脂肪化、炎症、線維化が引き起こされるが、antagomir-21 の静脈内投与でこれらは抑制された(Loyer et al., 2016)。前述の糖尿病を示す kk-ay マウスによる腎線維

化モデルにおいても、antagomir-21 の腹腔内投与で糸球体線維化や基底膜肥厚の抑制が報告されている (Wang et al., 2013)。腎のコラーゲン線維合成は、糸球体のメサンギウム細胞あるいは線維芽細胞が担っており、線維化は合成と分解のインバランスで生じると考えられている。心臓についても報告があり、 $\beta 1$ アドレナリン受容体過剰発現トランスジェニックによるマウス心障害・線維化モデルで miR-21 の上昇が認められ、antagomir-21 投与で抑制された (Thum et al., 2008)。心臓で線維化を担う細胞はまだ分かっていない部分が多いが、胎児性心内膜細胞、あるいは線維芽細胞であると考えられている (Travers et al., 2016)。これらの成績は、miR-21 がいずれの組織においても線維形成に関わっており、antagomir-21 が治療に働くかもしれない可能性を示唆している。

miR-21 の産生元としては、チオアセタミド誘発線維化マウスの肝臓で HSC での発現が見られたこと、この動物から抽出した活性化 HSC において miR-21 の顕著な上昇が認められたことから (Zhang et al., 2013)、本試験系においても肝臓中の活性化 HSC と考えられた。一方 microRNA は核内で転写された後、多くは細胞質に存在するが、一部は径 50-100 nm の exosomes、あるいは径 100-1000 nm の microvesicles の形態で全身循環に廻ることが報告されており (Calnopina et al., 2016; Zanberga et al., 2013)、血中 miR-21 の上昇は肝臓からの漏出が主な原因であると考えられた。一方で、細胞外に放出された microRNA は、何らかのソーティングに基づき標的臓器に達して、細胞間コミュニケーションに関与しているという報告もある (Calnopina et al., 2016)。現時点で miR-21 の肝臓以外の臓器での機能と NASH の病態についての報告はなく、今後明らかにしていく必要がある。

回復群での結果を見ると、19 週時点では組織学的な回復性は見られなかったのにも関わらず、肝臓中及び血中 miR-21、肝臓中 MMP-9 及び TIMP-1 の mRNA は CSAA 群と同程度にまで低下していた。これは上記の因子が線維形成 (HSC が活性化し細胞外基質を産生している) 時期にのみ発現亢進する可能性を示唆していた。

【網羅解析の結果】

miRNA だけでなく mRNA を含めた線維化のカスケードを理解するため、網羅的アレイ解析を実施した。用いたサンプルは、線維化が組織学的に確認できた最初の時点である 4 週とし、CDAА 群と CSAA 群の発現量を比較した。方法は 3-6 項に記載した通りである。

絞り込みの概略及びそれぞれの段階でピックアップされた遺伝子の数を図 10A に、変化の認められた 16 の miRNA 及び 11 の mRNA を表 7 に示す。これらは ET-1 系、PDGF 系、TGF- β 系及び LPS 系の発現亢進、VEGF 系、IL-6 系及び IFN α 系の発現低下であった (図 10B)。これらは線維化の初期に働く因子と考えられた。

表 7 網羅解析で有意な変化が認められた miRNA 及び mRNA

miRNA		mRNA			
Name	Ratio (2 ⁿ)	Symbol	Name	Probe set ID	Ratio (2 ⁿ)
rno-miR-1	7.13	VEGFA	vascular endothelial growth factor A	1373807_at	-5.359
mmu-let-7i	2.183	COL24A1	collagen type 24A1	1384969_at	-3.374
		IL6R	Interleukin-6 receptor	1386987_at	-3.334
mmu-miR-10b	3.158	IL6R		1386987_at	-3.334
mmu-miR-15b	3.244	COL24A1		1384969_at	-3.374
		IFNAR1	interferon (alpha, beta and omega) receptor 1	1398055_at	-2.314
		VEGFA		1373807_at	-5.359
mmu-miR-27a	2.164	IL6R		1386987_at	-3.334
mmu-miR-34a	16.004	IL6R		1386987_at	-3.334
		VEGFA		1373807_at	-5.359
mmu-miR-142-3p	2.622	COL24A1		1384969_at	-3.374
mmu-miR-155	7.045	IL6R		1386987_at	-3.334
mmu-miR-181a	2.143	AGT	angiotensinogen	1387811_at	-2.004
mmu-miR-196b	24.028	COL24A1		1384969_at	-3.374
mmu-miR-203	-2.435	ET-BR	endothelin receptor typeB	1383641_at	2.395
		PDGFR α	platelet-derived growth factor receptor, alpha polypeptide	1370941_at	2.091
		TLR4	Toll-like receptor 4	1387982_at	2.571
mmu-miR-214	7.726	IFNAR1		1398055_at	-2.314
		IL6R		1386987_at	-3.334
mmu-miR-342-3p	3.022	IL6R		1386987_at	-3.334
		VEGFA		1373807_at	-5.359
mmu-miR-410	6.48	VEGFA		1373807_at	-5.359
mmu-miR-721	-23.741	COL6A3	collagen type 6A3	1389966_at	2.204
		PDGFR α		1370941_at	2.091
		PAI-1	serpin peptidase inhibitor, member 1	1368519_at	2.059
		TIMP2	tissue inhibitor of metalloproteinase 2	1386940_at	4.392
hsa-miR-455	-2.18	PDGFR α		1370941_at	2.091

miRNA は TaqMan array card、mRNA は GeneChip 解析を行い、Ratio (2ⁿ)は CDAA 群 4 週及び CSAA 群 4 週の発現量の比較を示す。mRNA は線維化あるいは HSC 活性化に関するものである。

線維化に關与する遺伝子カスケードの報告として、チオアセタミド誘発の肝線維化マウスから抽出した活性化 HSC において、miR-21 の顕著な上昇が認められているが、これらは AP-1、PDCD4、Smad7/PTEN の double negative feedback loop の關与が確認されている (Zhang et al., 2013)。その他、肝細胞がんでは miR-21 の発現亢進は IL-6/Stat3 系の活性化を伴っており、miR-21 が炎症及び発がん性に重要な役割を担っていると考えられている (Chen et al., 2015)。我々の網羅解析の成績からは、qRT-PCR で検討した miR-21、MMP-9、TIMP-1 に關連したカスケードはピックアップされなかったが、これは相互作用解析の手法として IPA が miRNA と mRNA の変動が逆向きであるものに絞っているためである。つまり、miR-21 の増加から MMP-9 の減少が想定されるが、実際は増加していたため、網羅解析の絞り込みから除外された。MMP-9 は線維化以外にも血管新生、炎症や肝細胞がんでも増加するため (Chen et al., 2009; Coulon et al., 2011; Jiang et al., 2010)、影響がマスクされていた可能性がある。今後は転写後のイベントも含め、詳細な遺伝子の制御關係を検討していく必要がある。また、直接の因果關係を調べるため、肝臓全体ではなく細胞レベルでの発現を調べることも有用かもしれない。

【小括】

血中 miR-21 は肝臓中とパラレルに変動しており、1 週から有意な増加が捉えられた。miR-21、MMP-9 及び TIMP-1 は線維形成に關与している可能性が考えられた。

網羅的アレイ解析から、線維化あるいは HSC 活性化に寄与する 16 の miRNA 及び 11 の mRNA に有意な変動が認められた。これらは ET-1 系、PDGF 系、TGF- β 系及び LPS 系の発現亢進、VEGF 系、IL-6 系及び IFN α 系の発現低下であった。

5. 総括

食餌誘発ラット NASH モデルを用い、肝線維化に関して以下のことを示した。

1. CDAA 食摂餌 1 週から脂肪化及び炎症が引き起こされ、線維化は 4 週から認められることを確認した。
2. 回復性に関しての詳細な検討を行い、19 週時点 (CDAA 食 12 週摂餌後、CSAA 食 7 週摂餌) で脂肪化及び炎症が回復したのに対し、線維化は 24 週時点 (CDAA 食 12 週摂餌後、CSAA 食 12 週摂餌) で回復傾向を示すことを見出した。
3. 病理発現機序として、TGF- β 、TIMP-1/2 の発現亢進が HSC の活性化に関与していることが確認された。回復性の遅延は酸化ストレスの持続が原因と考えられることが新たに分かった。
4. miR-21 は血中において肝臓中と平行に変動し、線維化のバイオマーカーとして有用であると考えられた。本研究は miR-21 を組織変化と対応させて継時的に検討した初めての報告である。

本研究は、肝線維化の病理発生机序解明及び診断に有用と考える。

6. 謝辞

本論文の発表および作成に関しまして、有益なご助言ならびにご指導を賜りました東京大学大学院薬学系研究科 富田泰輔教授に深く感謝いたします。また、有益なご助言を賜りました東京大学大学院薬学系研究科 楠原洋之教授、堅田利明前教授、山口良文准教授、名黒功准教授、前田和哉講師に深謝いたします。

本研究に関し、直接のご指導ならびにご鞭撻を賜りましたアステラス製薬株式会社 松本正博博士、旧アステラス製薬株式会社 中川壯一博士、現株式会社新日本科学 宮前陽一博士、現大阪市立大学 大石裕司博士、現参天製薬株式会社 能登貴久博士に心から感謝いたしますとともに、本研究の機会を与えられ、また過分のご便宜とご配慮を賜りましたアステラス製薬株式会社 宇波明博士、廣田里香博士に深く感謝申し上げます。更に、本研究に多大なるご協力を頂きましたアステラス製薬株式会社 田村幸太郎博士、神吉将之博士、井手鉄哉博士、山浦優修士、アステラスリサーチテクノロジー株式会社安全性研究部 山田篤さん、中田あゆ美さん、村田真由美さんに感謝いたします。

最後に、本研究にご協力頂きました共著者の皆様をはじめ、アステラス製薬株式会社安全性研究所、アステラスリサーチテクノロジー株式会社安全性研究部の皆様に心より感謝申し上げます。

7. 参考文献

- Abraham D, Ponticos M, Nagase H. Connective tissue remodeling: cross-talk between endothelins and matrix metalloproteinases. *Curr Vasc Pharmacol*. 2005;3(4):369-79.
- Ambros V. microRNAs: tiny regulators with great potential. *Cell*. 2001;107(7):823-6.
- Angermüller S, Islinger M, Völkl A. Peroxisomes and reactive oxygen species, a lasting challenge. *Histochem Cell Biol*. 2009 Apr;131(4):459-63. doi: 10.1007/s00418-009-0563-7. Epub 2009 Feb 18.
- Aparicio-Bautista DI, Pérez-Carreón JI, Gutiérrez-Nájera N, Reyes-Grajeda JP, Arellanes-Robledo J, Vásquez-Garzón VR, Jiménez-García MN, Villa-Treviño S. Comparative proteomic analysis of thiol proteins in the liver after oxidative stress induced by diethylnitrosamine. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1834(12):2528-38.
- Arteel GE, Thurman RG, Yates JM, Raleigh JA. Evidence that hypoxia markers detect oxygen gradients in liver: pimonidazole and retrograde perfusion of rat liver. *Br J Cancer*. 1995;72(4):889-95.
- Baskol G, Baskol M, Kocer D. Oxidative stress and antioxidant defenses in serum of patients with non-alcoholic steatohepatitis. *Clin Biochem*. 2007;40(11):776-80.
- Battaller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest*. 2005 Feb;115(2):209-18. Review. Erratum in: *J Clin Invest*. 2005;115(4):1100.
- Behari J, Yeh TH, Krauland L, Otruba W, Ciepły B, Hauth B, Apte U, Wu T, Evans R, Monga SP. Liver-specific beta-catenin knockout mice exhibit defective bile acid and cholesterol homeostasis and increased susceptibility to diet-induced steatohepatitis. *Am J Pathol*. 2010;176(2):744-53.
- Belfort R, Harrison SA, Brown K, Darland C, Finch J, Hardies J, Balas B, Gastaldelli A, Tio F, Pulcini J, Berria R, Ma JZ, Dwivedi S, Havranek R, Fincke C, DeFronzo R, Bannayan GA, Schenker S, Cusi K. A placebo-controlled trial of pioglitazone in subjects with nonalcoholic steatohepatitis. *N Engl J Med*. 2006;355(22):2297-307.
- Benyon RC, Iredale JP, Goddard S, Winwood PJ, Arthur MJ. Expression of tissue inhibitor of metalloproteinases 1 and 2 is increased in fibrotic human liver. *Gastroenterology*. 1996;110(3):821-31.
- Bomzon A, Ljubuncic P. Oxidative stress and vascular smooth muscle cell function in liver disease. *Pharmacol Ther*. 2001;89(3):295-308.
- Brew K, Nagase H. The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): an ancient family with structural and functional diversity. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1803(1):55-71.
- Brunt EM, Janney CG, Di Bisceglie AM, Neuschwander-Tetri BA, Bacon BR. Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. *Am J Gastroenterol*. 1999;94(9):2467-74.
- Buchman AL, Dubin MD, Moukarzel AA, Jenden DJ, Roch M, Rice KM, Gornbein J, Ament ME. Choline deficiency: a cause of hepatic steatosis during parenteral nutrition that can be reversed with intravenous choline supplementation. *Hepatology*. 1995;22(5):1399-403.
- Cai P, Gobert GN, You H, Duke M, McManus DP. Circulating miRNAs: Potential Novel Biomarkers for Hepatopathology Progression and Diagnosis of Schistosomiasis Japonica in Two Murine Models. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9(7):e0003965.
- Calvopina DA, Coleman MA, Lewindon PJ, Ramm GA. Function and Regulation of MicroRNAs and Their Potential as Biomarkers in Paediatric Liver Disease. *Int J Mol Sci*. 2016;17(11). pii:

E1795.

Cassiman D, van Pelt J, De Vos R, Van Lommel F, Desmet V, Yap SH, Roskams T. Synaptophysin: A novel marker for human and rat hepatic stellate cells. *Am J Pathol*. 1999;155(6):1831-9.

Cassiman D, Libbrecht L, Desmet V, Denef C, Roskams T. Hepatic stellate cell/myofibroblast subpopulations in fibrotic human and rat livers. *J Hepatol*. 2002;36(2):200-9.

Chen JS, Wang Q, Fu XH, Huang XH, Chen XL, Cao LQ, Chen LZ, Tan HX, Li W, Bi J, Zhang LJ. Involvement of PI3K/PTEN/AKT/mTOR pathway in invasion and metastasis in hepatocellular carcinoma: Association with MMP-9. *Hepatol Res*. 2009;39(2):177-86.

Chen M, Liu Y, Varley P, Chang Y, He XX, Huang H, Tang D, Lotze MT, Lin J, Tsung A. High-Mobility Group Box 1 Promotes Hepatocellular Carcinoma Progression through miR-21-Mediated Matrix Metalloproteinase Activity. *Cancer Res*. 2015;75(8):1645-56.

Choudhary NS, Duseja A, Kalra N, Das A, Dhiman RK, Chawla YK. Correlation of adipose tissue with liver histology in Asian Indian patients with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Ann Hepatol*. 2012;11(4):478-86.

Chu X, Wang H, Jiang YM, Zhang YY, Bao YF, Zhang X, Zhang JP, Guo H, Yang F, Luan YC, Dong YS. Ameliorative effects of tannic acid on carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in vivo and in vitro. *J Pharmacol Sci*. 2016;130(1):15-23.

Copple BL, Bustamante JJ, Welch TP, Kim ND, Moon JO. Hypoxia-inducible factor-dependent production of profibrotic mediators by hypoxic hepatocytes. *Liver Int*. 2009;29(7):1010-21.

Corbin KD, Zeisel SH. Choline metabolism provides novel insights into nonalcoholic fatty liver disease and its progression. *Curr Opin Gastroenterol*. 2012;28(2):159-65.

Coulon S, Heindryckx F, Geerts A, Van Steenkiste C, Colle I, Van Vlierberghe H. Angiogenesis in chronic liver disease and its complications. *Liver Int*. 2011;31(2):146-62.

Crespo Yanguas S, Cogliati B, Willebrords J, Maes M, Colle I, van den Bossche B, de Oliveira CP, Andraus W, Alves VA, Leclercq I, Vinken M. Experimental models of liver fibrosis. *Arch Toxicol*. 2016;90(5):1025-48.

DeLeve LD. Hepatic microvasculature in liver injury. *Semin Liver Dis*. 2007;27(4):390-400.

Delire B, Stärkel P, Leclercq I. Animal Models for Fibrotic Liver Diseases: What We Have, What We Need, and What Is under Development. *J Clin Transl Hepatol*. 2015;3(1):53-66.

Dufour JF, DeLellis R, Kaplan MM. Reversibility of hepatic fibrosis in autoimmune hepatitis. *Ann Intern Med*. 1997;127(11):981-5.

Duwaerts CC, Maher JJ. Mechanisms of liver injury in non-alcoholic steatohepatitis. *Curr Hepatol Rep*. 2014;13(2):119-129.

Dyson JK, Anstee QM, McPherson S. Non-alcoholic fatty liver disease: a practical approach to diagnosis and staging. *Frontline Gastroenterol*. 2014;5(3):211-218.

Ebrahimi H, Naderian M, Sohrabpour AA. New Concepts on Pathogenesis and Diagnosis of Liver Fibrosis; A Review Article. *Middle East J Dig Dis*. 2016;8(3):166-178.

Fassio E, Alvarez E, Domínguez N, Landeira G, Longo C. Natural history of nonalcoholic steatohepatitis: a longitudinal study of repeat liver biopsies. *Hepatology*. 2004;40(4):820-6.

Fracanzani AL, Valenti L, Bugianesi E, Vanni E, Grieco A, Miele L, Consonni D, Fatta E, Lombardi R, Marchesini G, Fargion S. Risk of nonalcoholic steatohepatitis and fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease and low visceral adiposity. *J Hepatol*. 2011;54(6):1244-9.

Friedman SL, Bansal MB. Reversal of hepatic fibrosis -- fact or fantasy? *Hepatology*. 2006;43(2

Suppl 1):S82-8.

Gambino R, Musso G, Cassader M. Redox balance in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease: mechanisms and therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal*. 2011;15(5):1325-65.

Ghafari MA, Anastasiadis AG, Olsson LE, Chichester P, Kaplan SA, Buttyan R, Levin RM. Hypoxia and an angiogenic response in the partially obstructed rat bladder. *Lab Invest*. 2002;82(7):903-9.

Goodman ZD, Becker RL Jr, Pockros PJ, Afdhal NH. Progression of fibrosis in advanced chronic hepatitis C: evaluation by morphometric image analysis. *Hepatology*. 2007;45(4):886-94.

Halliwell B, Zhao K, Whiteman M. Nitric oxide and peroxynitrite. The ugly, the uglier and the not so good: a personal view of recent controversies. *Free Radic Res*. 1999;31(6):651-69.

He X, Xie J, Zhang D, Su Q, Sai X, Bai R, Chen C, Luo X, Gao G, Pan W. Recombinant adeno-associated virus-mediated inhibition of microRNA-21 protects mice against the lethal schistosome infection by repressing both IL-13 and transforming growth factor beta 1 pathways. *Hepatology*. 2015;61(6):2008-17.

Herbst H, Wege T, Milani S, Pellegrini G, Orzechowski HD, Bechstein WO, Neuhaus P, Gressner AM, Schuppan D. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and -2 RNA expression in rat and human liver fibrosis. *Am J Pathol*. 1997;150(5):1647-59.

Hinz B, Phan SH, Thannickal VJ, Galli A, Bochaton-Piallat ML, Gabbiani G. The myofibroblast: one function, multiple origins. *Am J Pathol*. 2007;170(6):1807-16.

Hoglen NC, Younis HS, Hartley DP, Gunawardhana L, Lantz RC, Sipes IG. 1,2-Dichlorobenzene-induced lipid peroxidation in male Fischer 344 rats is Kupffer cell dependent. *Toxicol Sci*. 1998;46(2):376-85.

Hübscher SG. Histological assessment of non-alcoholic fatty liver disease. *Histopathology*. 2006;49(5):450-65.

Ibrahim SH, Hirsova P, Malhi H, Gores GJ. Animal Models of Nonalcoholic Steatohepatitis: Eat, Delete, and Inflammation. *Dig Dis Sci*. 2016;61(5):1325-36.

Iredale JP, Benyon RC, Arthur MJ, Ferris WF, Alcolado R, Winwood PJ, Clark N, Murphy G. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 messenger RNA expression is enhanced relative to interstitial collagenase messenger RNA in experimental liver injury and fibrosis. *Hepatology*. 1996;24(1):176-84.

Iredale JP, Benyon RC, Pickering J, McCullen M, Northrop M, Pawley S, Hovell C, Arthur MJ. Mechanisms of spontaneous resolution of rat liver fibrosis. Hepatic stellate cell apoptosis and reduced hepatic expression of metalloproteinase inhibitors. *J Clin Invest*. 1998;102(3):538-49.

Ishak K, Baptista A, Bianchi L, Callea F, De Groote J, Gudat F, Denk H, Desmet V, Korb G, MacSween RN. Histological grading and staging of chronic hepatitis. *J Hepatol*. 1995;22(6):696-9.

Issa R, Williams E, Trim N, Kendall T, Arthur MJ, Reichen J, Benyon RC, Iredale JP. Apoptosis of hepatic stellate cells: involvement in resolution of biliary fibrosis and regulation by soluble growth factors. *Gut*. 2001;48(4):548-57.

Ito A, Nomura S, Hirota S, Suda J, Suda T, Kitamura Y. Enhanced expression of CD34 messenger RNA by developing endothelial cells of mice. *Lab Invest*. 1995;72(5):532-8.

Jiang Z, Sui T, Wang B. Relationships between MMP-2, MMP-9, TIMP-1 and TIMP-2 levels and their pathogenesis in patients with lupus nephritis. *Rheumatol Int*. 2010;30(9):1219-26.

Jimenez-Lopez JM, Cederbaum AI. CYP2E1-dependent oxidative stress and toxicity: role in ethanol-induced liver injury. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2005;1(4):671-85.

- Kohli R, Kirby M, Xanthakos SA, Softic S, Feldstein AE, Saxena V, Tang PH, Miles L, Miles MV, Balistreri WF, Woods SC, Seeley RJ. High-fructose, medium chain trans fat diet induces liver fibrosis and elevates plasma coenzyme Q9 in a novel murine model of obesity and nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 2010;52(3):934-44.
- Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, Meyer J, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr Biol*. 2002;12(9):735-9.
- Lau JK, Zhang X, Yu J. Animal models of non-alcoholic fatty liver disease: current perspectives and recent advances. *J Pathol*. 2017;241(1):36-44.
- Lee UE, Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2011;25(2):195-206.
- Li J, Billiar TR. Nitric Oxide. IV. Determinants of nitric oxide protection and toxicity in liver. *Am J Physiol*. 1999;276(5 Pt 1):G1069-73.
- Liu W, Baker SS, Baker RD, Zhu L. Antioxidant Mechanisms in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Curr Drug Targets*. 2015;16(12):1301-14.
- Loyer X, Paradis V, Héniqne C, Vion AC, Colnot N, Guerin CL, Devue C, On S, Scetbun J, Romain M, Paul JL, Rothenberg ME, Marcellin P, Durand F, Bedossa P, Prip-Buus C, Baugé E, Staels B, Boulanger CM, Tedgui A, Rautou PE1. Liver microRNA-21 is overexpressed in non-alcoholic steatohepatitis and contributes to the disease in experimental models by inhibiting PPAR α expression. *Gut*. 2016;65(11):1882-1894.
- Manning DS, Afdhal NH. Diagnosis and quantitation of fibrosis. *Gastroenterology*. 2008;134(6):1670-81.
- Marcellin P, Gane E, Buti M, Afdhal N, Sievert W, Jacobson IM, Washington MK, Germanidis G, Flaherty JF, Aguilar Schall R, Bornstein JD, Kitrinis KM, Subramanian GM, McHutchison JG, Heathcote EJ. Regression of cirrhosis during treatment with tenofovir disoproxil fumarate for chronic hepatitis B: a 5-year open-label follow-up study. *Lancet*. 2013;381(9865):468-75.
- Marquez RT, Bandyopadhyay S, Wendlandt EB, Keck K, Hoffer BA, Icardi MS, Christensen RN, Schmidt WN, McCaffrey AP. Correlation between microRNA expression levels and clinical parameters associated with chronic hepatitis C viral infection in humans. *Lab Invest*. 2010;90(12):1727-36.
- Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, Peterson A, Noteboom J, O'Briant KC, Allen A, Lin DW, Urban N, Drescher CW, Knudsen BS, Stirewalt DL, Gentleman R, Vessella RL, Nelson PS, Martin DB, Tewari M. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(30):10513-8.
- Mu YP, Ogawa T, Kawada N. Reversibility of fibrosis, inflammation, and endoplasmic reticulum stress in the liver of rats fed a methionine-choline-deficient diet. *Lab Invest*. 2010;90(2):245-56.
- Muriel P. Nitric oxide protection of rat liver from lipid peroxidation, collagen accumulation, and liver damage induced by carbon tetrachloride. *Biochem Pharmacol*. 1998;56(6):773-9.
- Nakae D. Endogenous liver carcinogenesis in the rat. *Pathol Int*. 1999;49(12):1028-42.
- Natarajan V, Harris EN, Kidambi S. SECs (Sinusoidal Endothelial Cells), Liver Microenvironment, and Fibrosis. *Biomed Res Int*. 2017;2017:4097205.
- Novo E, Povero D, Busletta C, Paternostro C, di Bonzo LV, Cannito S, Compagnone A, Bandino A, Marra F, Colombatto S, David E, Pinzani M, Parola M. The biphasic nature of hypoxia-induced directional migration of activated human hepatic stellate cells. *J Pathol*. 2012;226(4):588-97.
- Ota T, Takamura T, Kurita S, Matsuzawa N, Kita Y, Uno M, Akahori H, Misu H, Sakurai M, Zen

- Y, Nakanuma Y, Kaneko S. Insulin resistance accelerates a dietary rat model of nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology*. 2007;132(1):282-93.
- Parola M, Robino G. Oxidative stress-related molecules and liver fibrosis. *J Hepatol*. 2001;35(2):297-306.
- Poynard T, McHutchison J, Manns M, Trepo C, Lindsay K, Goodman Z, Ling MH, Albrecht J. Impact of pegylated interferon alfa-2b and ribavirin on liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology*. 2002;122(5):1303-13.
- Rath MM, Panigrahi MK, Pattnaik K, Bhuyan P, Kar SK, Misra B, Misra D, Meher C, Agrawal O, Rath J, Singh SP. Histological Evaluation of Non-alcoholic Fatty Liver Disease and Its Correlation with Different Noninvasive Scoring Systems with Special Reference to Fibrosis: A Single Center Experience. *J Clin Exp Hepatol*. 2016;6(4):291-296.
- Reid AE. Nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology*. 2001;121(3):710-23.
- Ries C. Cytokine functions of TIMP-1. *Cell Mol Life Sci*. 2014;71(4):659-72.
- Richter K, Kietzmann T. Reactive oxygen species and fibrosis: further evidence of a significant liaison. *Cell Tissue Res*. 2016;365(3):591-605.
- Rolo AP, Teodoro JS, Palmeira CM. Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Free Radic Biol Med*. 2012;52(1):59-69.
- Saeki T, Ichiba M, Tanabe N, Ueki M, Okamoto K, Matsunaga Y, Hosho K, Kanbe T, Tsuchiya H, Kurimasa A, Yamada S, Hirooka Y, Hisatome I, Kishimoto Y, Suou T, Murawaki Y, Kawasaki H, Yodoi J, Shiota G. Expression of oxidative stress-related molecules in circulating leukocytes and urine in patients with chronic viral hepatitis. *Liver Int*. 2006;26(2):157-65.
- Sanyal AJ, Chalasani N, Kowdley KV, McCullough A, Diehl AM, Bass NM, Neuschwander-Tetri BA, Lavine JE, Tonascia J, Unalp A, Van Natta M, Clark J, Brunt EM, Kleiner DE, Hoofnagle JH, Robuck PR; NASH CRN. Pioglitazone, vitamin E, or placebo for nonalcoholic steatohepatitis. *N Engl J Med*. 2010;362(18):1675-85.
- Schmitt-Gräff A, Krüger S, Bochar F, Gabbiani G, Denk H. Modulation of alpha smooth muscle actin and desmin expression in perisinusoidal cells of normal and diseased human livers. *Am J Pathol*. 1991;138(5):1233-42.
- Shaheen AA, Wan AF, Myers RP. FibroTest and FibroScan for the prediction of hepatitis C-related fibrosis: a systematic review of diagnostic test accuracy. *Am J Gastroenterol*. 2007;102(11):2589-600.
- Sharma S, Khalili K, Nguyen GC. Non-invasive diagnosis of advanced fibrosis and cirrhosis. *World J Gastroenterol*. 2014;20(45):16820-30.
- Staels B, Rubenstrunk A, Noel B, Rigou G, Delataille P, Millatt LJ, Baron M, Lucas A, Tailleux A, Hum DW, Ratziu V, Cariou B, Hanf R. Hepatoprotective effects of the dual peroxisome proliferator-activated receptor alpha/delta agonist, GFT505, in rodent models of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 2013;58(6):1941-52.
- Tao H, Yang JJ, Shi KH, Huang C, Zhang L, Lv XW, Li J. The significance of YKL-40 protein in liver fibrosis. *Inflamm Res*. 2014;63(4):249-54.
- Teng KY, Ghoshal K. Role of Noncoding RNAs as Biomarker and Therapeutic Targets for Liver Fibrosis. *Gene Expr*. 2015;16(4):155-62.
- Thoolen B, Maronpot RR, Harada T, Nyska A, Rousseaux C, Nolte T, Malarkey DE, Kaufmann W, Küttler K, Deschl U, Nakae D, Gregson R, Vinlove MP, Brix AE, Singh B, Belpoggi F, Ward JM. Proliferative and nonproliferative lesions of the rat and mouse hepatobiliary system. *Toxicol Pathol*. 2010;38(7 Suppl):5S-81S.

Thum T, Gross C, Fiedler J, Fischer T, Kissler S, Bussen M, Galuppo P, Just S, Rottbauer W, Frantz S, Castoldi M, Soutschek J, Koteliensky V, Rosenwald A, Basson MA, Licht JD, Pena JT, Rouhanifard SH, Muckenthaler MU, Tuschl T, Martin GR, Bauersachs J, Engelhardt S. MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts. *Nature*. 2008;456(7224):980-4.

Townsend SA, Newsome PN. Review article: new treatments in non-alcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2017 [Epub ahead of print]

Travers JG, Kamal FA, Robbins J, Yutzey KE, Blaxall BC. Cardiac fibrosis: The fibroblast awakens. *Circ Res*. 2016;118(6):1021-40.

Tsochatzis EA, Bosch J, Burroughs AK. Liver cirrhosis. *Lancet*. 2014;383(9930):1749-61.

Tsukamoto H, Towner SJ, Ciofalo LM, French SW. Ethanol-induced liver fibrosis in rats fed high fat diet. *Hepatology*. 1986;6(5):814-22.

van der Veen JN, Lingrell S, Gao X, Quiroga AD, Takawale A, Armstrong EA, Yager JY, Kassiri Z, Lehner R, Vance DE, Jacobs RL. Pioglitazone attenuates hepatic inflammation and fibrosis in phosphatidylethanolamine N-methyltransferase-deficient mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2016;310(7):G526-38.

Wang J, Gao Y, Ma M, Li M, Zou D, Yang J, Zhu Z, Zhao X. Effect of miR-21 on renal fibrosis by regulating MMP-9 and TIMP1 in kk-ay diabetic nephropathy mice. *Cell Biochem Biophys*. 2013;67(2):537-46.

Wang Y, Ausman LM, Greenberg AS, Russell RM, Wang XD. Nonalcoholic steatohepatitis induced by a high-fat diet promotes diethylnitrosamine-initiated early hepatocarcinogenesis in rats. *Int J Cancer*. 2009;124(3):540-6.

Wang Y, Liu Z, Zou W, Hong H, Fang H, Tong W. Molecular regulation of miRNAs and potential biomarkers in the progression of hepatic steatosis to NASH. *Biomark Med*. 2015;9(11):1189-200.

Wanless IR, Nakashima E, Sherman M. Regression of human cirrhosis. Morphologic features and the genesis of incomplete septal cirrhosis. *Arch Pathol Lab Med*. 2000;124(11):1599-607.

Wei J, Feng L, Li Z, Xu G, Fan X. MicroRNA-21 activates hepatic stellate cells via PTEN/Akt signaling. *Biomed Pharmacother*. 2013;67(5):387-92.

Wihastuti TA, Sargowo D, Tjokroprawiro A, Permatasari N, Widodo MA, Soeharto S. Vasa vasorum anti-angiogenesis through H₂O₂, HIF-1 α , NF- κ B, and iNOS inhibition by mangosteen pericarp ethanolic extract (*Garcinia mangostana* Linn) in hypercholesterol-diet-given *Rattus norvegicus* Wistar strain. *Vasc Health Risk Manag*. 2014;10:523-31.

Xing XY, Zhao YL, Kong WJ, Wang JB, Jia L, Zhang P, Yan D, Zhong YW, Li RS, Xiao XH. Investigation of the "dose-time-response" relationships of rhubarb on carbon tetrachloride-induced liver injury in rats. *J Ethnopharmacol*. 2011;135(2):575-81.

Xu GF, Li PT, Wang XY, Jia X, Tian DL, Jiang LD, Yang JX. Dynamic changes in the expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors, TIMPs, during hepatic fibrosis induced by alcohol in rats. *World J Gastroenterol*. 2004;10(24):3621-7.

Yoon JH, Lee JM, Joo I, Lee ES, Sohn JY, Jang SK, Lee KB, Han JK, Choi BI. Hepatic fibrosis: prospective comparison of MR elastography and US shear-wave elastography for evaluation. *Radiology*. 2014;273(3):772-82.

Zandberga E, Kozirovskis V, Ābols A, Andrējeva D, Purkalne G, Linē A. Cell-free microRNAs as diagnostic, prognostic, and predictive biomarkers for lung cancer. *Genes Chromosomes Cancer*. 2013;52(4):356-69.

Zeisel SH, Da Costa KA, Franklin PD, Alexander EA, Lamont JT, Sheard NF, Beiser A. Choline,

an essential nutrient for humans. FASEB J. 1991;5(7):2093-8.

Zhang Z, Zha Y, Hu W, Huang Z, Gao Z, Zang Y, Chen J, Dong L, Zhang J. The autoregulatory feedback loop of microRNA-21/programmed cell death protein 4/activation protein-1 (MiR-21/PDCD4/AP-1) as a driving force for hepatic fibrosis development. J Biol Chem. 2013;288(52):37082-93.

日本消化器病学会 NAFLD/NASH 診療ガイドライン 2014.

8. 論文目録

本学位論文は以下の投稿論文に基づいている。

Takeuchi-Yorimoto A, Noto T, Yamada A, Miyamae Y, Oishi Y, Matsumoto M. Persistent fibrosis in the liver of choline-deficient and iron-supplemented l-amino acid-defined diet-induced nonalcoholic steatohepatitis rat due to continuing oxidative stress after choline supplementation. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2013; 268(3): 264-277.

Takeuchi-Yorimoto A, Yamaura Y, Kanki M, Ide T, Nakata A, Noto T, Matsumoto M. MicroRNA-21 is associated with fibrosis in a rat model of nonalcoholic steatohepatitis and serves as a plasma biomarker for fibrotic liver disease. *Toxicol Lett.* 2016;258:159-167.