

2022 年度

神戸女学院大学審査、学位論文（博士）

人間科学研究科人間科学専攻

# メタボリックシンドロームに關与する バイオマーカー測定系の確立

山田 みのり

主査： 塩見 尚史 教授

副査： 野寄 玲児 教授

西海 信 准教授

# 目次

要旨	5
1. はじめに	5
2. TNF $\alpha$ と Leptin の高感度測定系の開発	5
3. 白色脂肪細胞の脂肪蓄積と TNF $\alpha$ の産生を抑制する化合物の探索	5
4. NASH バイオマーカーの fCK18 高感度測定系の開発	6
5. fCK18 高感度測定系を用いた検体中 fCK18 の臨床的有用性	6
6. 結論	6
第 1 章 序章	8
1.1 メタボリックシンドローム	8
1.2 アディポサイトカイン	9
1.3 メタボリックシンドロームと非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD)	10
1.4 NAFLD/NASH 診断基準とスコアリング	11
1.5 NAFLD の非侵襲性バイオマーカー	13
1.6 本研究の目的	13
第 2 章 アディポサイトカインの高感度測定系の構築	14
2.1 緒言	14
2.2 方法	15
2.2.1 比色法を用いた TNF $\alpha$ の ELISA	15
2.2.2 比色法を用いた Leptin の ELISA	15
2.2.3 蛍光法を用いた TNF $\alpha$ の ELISA	15
2.2.4 蛍光法を用いた Leptin の ELISA	16
2.2.5 成熟脂肪細胞への分化	16
2.2.6 アディポサイトカインと TG 蓄積量の評価	16
2.2.7 PPAR $\gamma$ と C/EBP ファミリーの遺伝子発現	16
2.3 結果	18

2.3.1 比色法を用いた TNF $\alpha$ または Leptin の ELISA.....	18
2.3.2 蛍光法を用いた TNF $\alpha$ または Leptin の ELISA.....	18
2.3.3 脂肪細胞の遺伝子発現とアディポサイトカインの産生量.....	19
2.4 考察.....	21
2.5 結論.....	21
第 3 章 脂肪細胞における脂肪の蓄積およびアディポサイトカインの分泌特性の解析.....	23
3.1 緒言.....	23
3.2 方法.....	23
3.2.1 細胞株および培養条件.....	23
3.2.2 脂肪細胞への分化と成熟脂肪細胞株の作製.....	23
3.2.3 遺伝子発現の解析.....	23
3.2.4 Triglyceride 蓄積モデルの作製.....	24
3.2.5 Triglyceride 蓄積モデルにおける抑制物質のスクリーニング.....	24
3.2.6 TNF $\alpha$ 濃度と TG 蓄積量の測定.....	25
3.3 結果.....	25
3.3.1 新規脂肪細胞株の作製と遺伝子発現解析.....	25
3.3.2 Triglyceride 蓄積モデルの作製.....	26
3.3.3 TG 蓄積モデルにおける抑制物質スクリーニング.....	27
3.4 考察.....	29
3.5 結論.....	29
第 4 章 新規モノクローナル抗体によるフラグメント化サイトケラチン 18 の高感度測定法の確立.....	31
4.1 緒言.....	31
4.2 方法.....	31
4.2.1 モノクローナル抗体の作製.....	31
4.2.2 リコンビナントタンパク質の作製.....	31
4.2.3 ウェスタンブロットティング、免疫沈降.....	32
4.2.4 エピトープ解析.....	32

4.2.5 高感度測定系の確立 .....	33
4.2.6 血清サンプル.....	33
4.2.7 統計解析.....	33
4.3 結果 .....	33
4.3.1 抗体の反応性.....	33
4.3.2 エピトープ解析.....	35
4.3.3 リコンビナント fCK18 の作製 .....	35
4.3.4 高感度化学発光酵素免疫測定法 (CLEIA) の確立.....	36
4.3.5 ヒト血清の fCK18 測定 .....	37
4.4 考察 .....	38
4.5 結論 .....	39
第 5 章 フラグメント化サイトケラチン 18 の臨床有用性.....	40
5.1 緒言 .....	40
5.2 方法 .....	40
5.2.1 ヒト血清サンプル.....	40
5.2.2 肝生検.....	41
5.2.3 血清サンプルの測定.....	41
5.2.4 統計分析.....	41
5.3 結果 .....	41
5.3.1 患者データ.....	41
5.3.2 血清中の fCK18 値と肝機能マーカー .....	43
5.3.3 NAS と血清中の fCK18 値 .....	44
5.3.4 NASH 診断スコアリングシステムと血清中の fCK18 値 .....	45
5.3.5 病理組織診断と血清中の fCK18 値との相関.....	47
5.3.6 NAFL/NASH の診断.....	47
5.3.7 バリデーションコホート.....	50
5.3.8 fCK18 と肝機能マーカーの変化量 .....	54

5.4 考察 .....	55
5.5 結論 .....	56
第 6 章 総括と今後の展望.....	57
謝辞 .....	58
略語表 .....	59
References.....	60

## 要旨

### 1. はじめに

メタボリックシンドロームでは、過剰な内臓脂肪蓄積により、脂肪細胞からのアディポサイトカイン分泌異常を認め、高血圧、糖代謝異常、脂質代謝異常を引き起こしている。さらに病態の進行により、糖尿病、動脈硬化症（心筋梗塞・脳梗塞）、非アルコール性脂肪肝炎（NASH）のような生活習慣病を発症する。これら生活習慣病の予防もしくは早期治療を行うために、メタボリックシンドロームでの中心となる脂肪組織と肝臓の病態を正確に把握するバイオマーカーが求められてきた。

そこで、本研究では、メタボリックシンドロームに関与するバイオマーカーとして、白色脂肪細胞から分泌されるアディポサイトカインの TNF $\alpha$  と Leptin、NASH バイオマーカー候補であるフラグメント化サイトケラチン 18（fCK18）の高感度測定系を確立した。

### 2. TNF $\alpha$ と Leptin の高感度測定系の開発

内臓脂肪が蓄積された状態で、白色脂肪組織の慢性的な炎症と、その脂肪蓄積能やアディポサイトカイン分泌調節機能の破綻により、インスリン抵抗性を引き起こし、メタボリックシンドロームとなる。TNF $\alpha$  は、インスリン抵抗性を引き起こす最も主たるアディポサイトカインであり、白色脂肪組織あるいは浸潤したマクロファージから分泌される。レプチンは、白色脂肪組織から分泌され、肥満を抑制する代表的なアディポサイトカインとして知られている。脂肪組織の病態を正確に把握するために、まずは脂肪蓄積とこれらアディポサイトカイン分泌との関係性を明らかにしたいと考えた。

そこで、本研究では、マウス白色脂肪細胞モデル系を使い検証を進めるため、マウスアディポサイトカインに対する高感度測定の開発を試みた。サンドイッチ ELISA は、1 次抗体としてヤギ抗マウス TNF $\alpha$  抗体（あるいはヤギ抗マウスレプチン抗体）、2 次抗体はウサギ抗マウス TNF $\alpha$  抗体（あるいはウサギ抗マウスレプチン抗体）、3 次抗体に  $\beta$  ガラクトシダーゼ標識抗ウサギ IgG、そして基質には 4-methylumbelliferyl- $\beta$ -D-galactopyranoside（MUG）を用い、蛍光強度を測定した。HRP を標識体に用いた比色検出系の感度 10 ng/mL と比較して、 $\beta$  ガラクトシダーゼ/MUG の蛍光検出系を用いることにより、1 pg/mL まで感度を向上させることに成功した。これにより、白色脂肪細胞の形態変化とアディポサイトカインの関係性を明らかにした。

### 3. 白色脂肪細胞の脂肪蓄積と TNF $\alpha$ の産生を抑制する化合物の探索

TNF $\alpha$  はインスリン抵抗性の要因であり、白色脂肪細胞からの TNF $\alpha$  分泌異常の抑制は、生活習慣病やその予備軍であるメタボリックシンドロームの予防につながる。そこで、脂肪蓄積モデルと高感度測定法により、白色脂肪細胞の脂肪蓄積量と TNF $\alpha$  の分泌量を減少させる物質の探索を行った。

脂肪細胞株（3T3-L24）は、前駆脂肪細胞 3T3-L1 を IBMX、DEX、インスリンにより分化誘導し、転写因子の発現を確認した。内臓脂肪蓄積モデルは、3T3-L24 にオレイン酸を添加し作製した。このモデルを使って、サプリメントを評価したところ、有機酸（酢酸、クエン酸）、カルニチン、タウリンにおいて、TG 蓄積量及び TNF $\alpha$  分泌量の減少が認められた。

本結果より、これらの物質がインスリン抵抗性を改善し、メタボリックシンドロームを予防する可能性が

示唆された。

#### 4. NASH バイオマーカーの fCK18 高感度測定系の開発

NASH の確定診断には、肝生検による病理組織診断が用いられているが、侵襲的な検査であり診断のばらつきが問題となっており、非侵襲性のバイオマーカーによる診断法の開発が強く求められてきた。そこで、本研究では、NASH 診断のバイオマーカー候補として、肝細胞のアポトーシス誘導により放出される fCK18 に注目し、新たな抗体を用いて高感度 fCK18 CLEIA を確立した。

fCK18 CLEIA は、新規モノクローナル抗体とリコンビナントタンパク質を用いて構築し、全自動免疫測定装置へ適用させた。モノクローナル抗体は、rCK18 または合成ペプチドをマウスへ免疫し、最終的に 2 種のクローン (K18-328 と K18-624) を選択した。リコンビナントタンパク質は、N 末端側を切断させた 261-397aa を大腸菌で発現させ、アフィニティーカラムクロマトグラフィーにより精製し、スタンダードとして用いた。高感度 CLEIA により、NASH 患者血清と健常者血清を測定した。

エピトープ解析の結果、K18-328 は CK18 の 323G-340S を認識し、CK18 と fCK18 の両方と反応した。K18-624 は fCK18 の C 末端側を認識し、fCK18 のみとの反応性を示した。IP-WB にて、比較対照の市販抗体は 1.5 ng の rfCK18 を検出したが、K18-624 は約 1/8 の 0.2 ng の rfCK18 を検出し、高親和性を示した。K18-624 結合磁性粒子と ALP 標識 K18-328、そしてリコンビナントタンパク質により、高感度 CLEIA を確立した。Standard Range は 0.465-46.5 ng/mL で検出感度 0.056 ng/mL、同時再現性及び日差再現性は CV10%以下であった。健常者血清中 fCK18 (平均 0.483 ng/mL) と比較して、NASH 患者 (平均 5.190 ng/mL) は有意に高値を示した。

#### 5. fCK18 高感度測定系を用いた検体中 fCK18 の臨床的有用性

非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) は、メタボリックシンドロームの肝臓における表現型であり、非アルコール性脂肪肝 (NAFL) と NASH に分類される。NASH の病理組織像として肝細胞の ballooning が特徴的であり、これと強い相関を持ち、尚且つ NAFL と区別できるバイオマーカーの発見が期待されている。そこで、fCK18 CLEIA を用い、肝機能マーカーや肝組織との相関関係を解析し、NASH 診断バイオマーカーとしての有用性について検討した。

NAFLD 患者血清の fCK18 値は、肝逸脱酵素や NAFLD activity score (NAS) の構成要素と相関するとともに、Brunt stage ( $p < 0.05$ )、Matteoni 分類 ( $p < 0.001$ ) と強い相関を示した。健常者の fCK18 値と比較して NAFLD で顕著に上昇し (AUC 0.96,  $p < 0.0001$ )、NAS 0-2 と NAS 3-8 (AUC 0.81,  $p < 0.05$ ) や Matteoni type 1+2 と 3+4 の分別、すなわち NAFL と NASH の鑑別が可能であった。NAS の構成要素に fibrosis を加えた多変量解析では、ballooning のみが fCK18 値と関連する因子として抽出された。

#### 6. 結論

生活習慣病の予防もしくは早期治療を目的として、メタボリックシンドロームに関与するバイオマーカー測定系の開発を行った。

TNF $\alpha$ と Leptin それぞれの高感度測定系は、マウス脂肪細胞内のアディポサイトカインの分泌量、蓄積量を測定するのに十分な感度であり、脂肪細胞のアディポサイトカインの挙動を把握し、更に、カルニチンが TNF $\alpha$  の産生抑制に有効であることを見いだした。

新規 K18-624 抗体は、fCK18 への高い親和性を示し、その抗体を用いた高感度 CLEIA は、全ての健常者血清中の fCK18 を測定可能な感度を有した。fCK18 値は、NASH 患者における肝機能や病理組織所見、特に hepatocyte ballooning と強い相関を示し、高い NASH 診断能を認め、肝生検に代わる診断法として大きく期待された。

## 第1章 序章

### 1.1 メタボリックシンドローム

近年、我が国において食生活の欧米化や運動不足により肥満の人が増加している。肥満とは、体重が多い状態、あるいは体脂肪が過剰に蓄積した状態のことを言い、内臓脂肪型肥満と皮下脂肪型肥満に分類される。内臓脂肪型肥満による慢性炎症や線維化は、インスリン抵抗性を呈する。これが引き金となり、高血圧、耐糖能異常、脂質代謝異常など全身の様々な代謝障害を引き起こし、さらには動脈硬化症、糖尿病、NASHのような生活習慣病を発症する（Fig.1-1）。

1999年 WHO は、生活習慣病の危険因子が組み合わさった病態を、インスリン抵抗性の観点から、メタボリックシンドロームの概念と診断基準を提唱した。日本においても、2005年に日本内科学会が中心となり、メタボリックシンドロームの診断基準が作成された（Fig.1-2）。2020年度の厚生労働省が行った国民健康・栄養調査結果によると40~74歳については、男性の2人に1人、女性の5人に1人が、メタボリックシンドロームを強く疑われるものまたはその予備軍と考えられており、該当者数は、約960万人、予備群者数約980万人で、合わせて約1940万人と推定された。このうち約10%が生活習慣病を発症すると言われている。

## メタボリックシンドロームの病態メカニズム

### メタボリックシンドローム

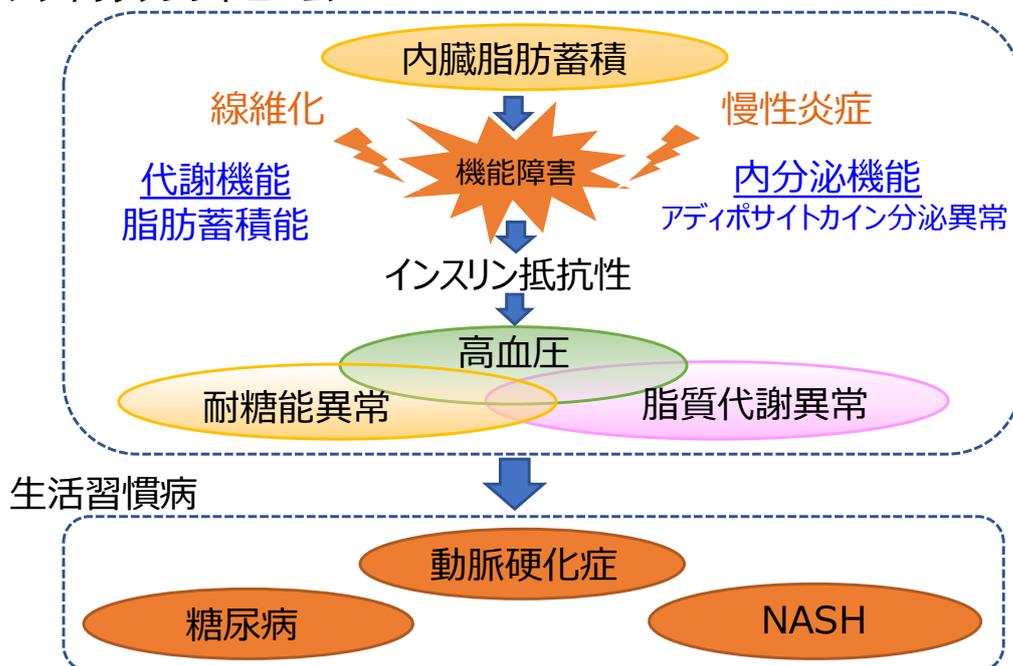


Fig.1-1 メタボリックシンドロームの病態メカニズム

## メタボリックシンドロームの診断基準



厚生労働省ホームページを参考に一部改変

Fig.1-2 メタボリックシンドロームの診断基準

### 1.2 アディポサイトカイン

脂肪細胞は、中性脂肪を蓄積する単なるエネルギー貯蔵庫として考えられてきた。しかし、1990年代以降脂肪細胞は、アディポサイトカインと総称される生理活性物質を分泌する内分泌臓器として機能していることが明らかになり、最近ではパラクラインとしての働きが注目されている。アディポサイトカインはTNF $\alpha$ 、Leptin アディポネクチン、IL-6、など20種類近いものが報告されており、免疫細胞、神経細胞、肝細胞などの細胞に作用し、食欲のコントロールや脂質代謝、糖代謝など代謝調節を行っている。内臓脂肪蓄積により、脂肪細胞が肥大化し、アディポサイトカインの分泌異常が起きますと、炎症性サイトカインの過剰分泌および抗炎症性サイトカインの分泌抑制が生じて弱い慢性炎症を引き起こす。その結果、インスリン抵抗性を惹起し、メタボリックシンドロームを呈する。我々は、炎症性サイトカインとしてTNF $\alpha$ を抗炎症性サイトカインとしてLeptinを例にとり、脂肪細胞の形態変化とアディポサイトカインの分泌挙動について検討を行った。

#### TNF $\alpha$

TNF- $\alpha$ は腫瘍壊死因子として1975年にCarswellら<sup>1</sup>により単離され、1984年に遺伝子がクローニング<sup>2</sup>された。TNF $\alpha$ は炎症性メディエーターとして全身に炎症反応を誘導する一方、アポトーシス誘導や免疫制御、血管新生、細胞保護などさまざまな生理活性を有することが証明され、最近では炎症による生体防御機構に広く関与するサイトカインとされている。TNF- $\alpha$ はマクロファージなどの免疫細胞や脂肪細胞で、25kDaの前駆体タンパク質である膜結合型TNF- $\alpha$ (mTNF $\alpha$ )として産生される。

mTNF $\alpha$ は、TNF- $\alpha$ 変換酵素（TACE）により細胞外に存在するC末端側が切断され、17kDaの可溶性TNF- $\alpha$ （sTNF $\alpha$ ）タンパク質（157アミノ酸残基）となる。mTNF- $\alpha$ とsTNF- $\alpha$ のいずれも活性を有する。<sup>3</sup> 血中では、51kDaのホモ3量体を形成し循環する<sup>4</sup>。

TNF $\alpha$ の受容体は、全身の組織に存在するTNFR1（CD120a；p55/60）と主に免疫系の細胞に発現しているTNFR2（CD120b；p75/80）の2種類の受容体が同定されており<sup>5</sup>、TNF $\alpha$ の生理活性作用の大部分はTNFR1を介していると考えられている。TNF- $\alpha$ によりTNFR1が刺激され、IRS-1のチロシン残基リン酸化によるPI3-キナーゼの活性化が抑制され、GLUT4を介するインスリンのグルコースの細胞内取り込み作用が抑制され、インスリン抵抗性を引き起こす。

## Leptin

Leptinは1994年にFriedmanら<sup>6</sup>によるポジショナル・クローニング法によって遺伝性肥満マウス（ob/ob）の病因遺伝子産物として発見され、アミノ末端部に21アミノ酸からなるシグナル配列を含む167アミノ酸から構成される。Leptinは主に成熟脂肪細胞で分泌され、末梢の脂肪貯蓄量を視床下部に伝達し、摂食・代謝調節因子をコントロールし、体重を一定に保つ働きを有している。Leptinの発見により食欲調節分子メカニズムに関する研究が急速に加速し、肥満の成因から治療へ展開されてきた。Leptinが欠損しているob/obマウスにLeptinを投与すると体重が減少するが、その機序は視床下部を介した食欲抑制と交感神経を介したエネルギー消費亢進量、さらには脂肪細胞への直接脂肪分解作用によることが知られている。またLeptin発見後視床下部領域からLeptin受容体がクローニングされ<sup>7</sup>、本受容体が遺伝性肥満マウス（db/db）の病因遺伝子であることが判明した。Leptinは視床下部に存在するLeptin受容体に作用することによって強力な飽食シグナルを伝達する。このシグナルと同時にLeptinは交感神経活性化を介してエネルギー消費を促進し、体重調節に重要な役割を果たしている。さらにLeptinは栄養状態を感知し、接触促進分子（NPY、AgRP、MCHなど）や、接触抑制分子（POMC-MC、CRH、CARTなど）に作用することによって食欲を調節している。このことから、Leptinは脳の視床下部、特に弓状核において栄養状態を探知する伝達物質であり、接触量やエネルギー収支を調節すると考えられている。

血中レプチン値は体脂肪量や血中インスリン値に相関して上昇するため、肥満やインスリン抵抗性状態を呈する症例では高レプチン血症を認める。しかし、これらの症例では高レプチン血症であるにもかかわらず、レプチンによる接触抑制は起こらず、インスリン分泌も抑制されない作用不全の状態にあり、いわゆるレプチン抵抗性を呈している。<sup>8</sup> レプチン抵抗性により生じた高レプチン血症は血圧上昇作用や、肝の炎症線維化を誘発することも報告されている。<sup>9,10</sup>

### 1.3 メタボリックシンドロームと非アルコール性脂肪性肝疾患（NAFLD）

NAFLD発症の重要な因子は肥満であり、NAFLD患者の内臓脂肪量と肝細胞内脂肪量には正の相関がある。NAFLDの主な背景としてインスリン抵抗性の増悪、およびメタボリックシンドロームとその関連疾患の2型糖尿病、脂質異常症、高血圧症があり、中でも2型糖尿病はNAFLDの発症・病態進展との関連性が強い。NAFLDの病態進展には“two hit theory”という2段階のメカニズムが支持

されてきた。1<sup>nd</sup> hitとして肝臓の脂肪沈着、2<sup>nd</sup> hitとして酸化ストレス、脂質過酸化、エンドトキシンにより惹起されるサイトカインの放出、インスリン抵抗性などが肝機能障害をさらに進展させ非アルコール性脂肪肝炎（NASH）にいたると考えられていた<sup>11</sup>。しかし、必ずしもすべての症例がNAFL（非アルコール性脂肪肝）を経由しないことから“multiple parallel hits hypothesis”という概念が提唱されている<sup>12</sup>。これは肝の脂肪化と炎症・線維化進展に関与する様々な要因が並行して肝臓に作用し、NASHを発症するという考え方である。肝臓と脂肪細胞、腸管など多臓器との相互作用がNAFLDの病態進展に寄与しており、脂質の肝細胞への流入増加による酸化ストレス亢進、インスリン抵抗性増加、脂肪細胞からのアディポサイトカイン分泌異常、腸管からのエンドトキシン流入などが挙げられ、これらが同時進行的にNAFLD発症及び病態進展に関与している。

日本のNAFLD患者は約25%と推定され、2016年時点で2300万人、うちNASHは400万人であり、今後2030年に向けて緩やかに増加すると予想される。現在F3以上の高度線維化群は60万人おり、2030年には100万人、米国においては800万人に達する。米国では肝線維化の進行による肝移植が増加しており、NASHは、その原疾患の上位を占めている（女性第1位、男性第2位）。肝細胞癌（HCC）においても、NASHはその原疾患の1/3を占め、NAFLDからの肝発癌率は10年で0.4%、NASHで5%と推定され、10年で9万人が肝癌を発病すると予想される。NAFLDからのHCCは進行した状態で発見されるケースが多く、予後不良となるため、HCC予備群の絞り込みや早期スクリーニング等対策が必要である。

#### 1.4 NAFLD/NASH診断基準とスコアリング

1980年にMayo Clinicの肝臓病理医Ludwigら<sup>13</sup>が、飲酒歴がないにもかかわらず肝組織がアルコール性肝障害に類似し、steatohepatitisの変化をきたした20例をまとめ、その疾患概念をNASHとして提唱した。また、1985年にSchaffner<sup>14</sup>らはNASHを含めた非飲酒者の脂肪肝関連の病態をNAFLDとして命名し、現在に至っている（table1-1）。NAFLDは組織学的にNAFLとNASHに分類されるが、NAFLは肝細胞の5%以上に脂肪蓄積を認め、肝細胞障害がないものとされ、NASHは肝細胞の5%以上に脂肪蓄積を認め、肝細胞障害および炎症を伴うものと定義される<sup>15-17</sup>。NASHの病理所見として、大滴性脂肪変性、好中球を中心とした炎症性細胞浸潤、肝細胞の風船様変性、Mallory-Denk体、巨大ミトコンドリア、好酸性壊死、核の空洞化、大小の脂肪肉芽種、線維化としては肝細胞周辺の線維化、類洞に沿った線維化が特徴的とされている。NASHの病理分類に関しては1999年のMatteoniら<sup>17</sup>によって提唱された分類同年のBruntら<sup>18</sup>によるstaging（線維化の重症度）、grading（壊死炎症性変化の重症度）の分類、2005年にNASH Clinical Research Networkから発表されたNAS、2012年Bedossaら<sup>19</sup>が報告したアルゴリズム（FLIP）アルゴリズムが用いられている（Fig.1-3）。

Table1-1

## NAFLD（非アルコール性脂肪性肝疾患）の定義

主に**メタボリックシンドローム**に関連する諸因子とともに、**組織診断**、あるいは**画像解析**にて**脂肪肝**を認めた病態である。アルコール性肝炎、ウイルス性肝疾患、薬物性肝障害など他の肝疾患は除外する。

NAFLDは、病態がほとんど進行しない**NAFL**（非アルコール性脂肪肝）と進行性で肝硬変や肝癌の発症母地にもなる**NASH**（非アルコール性脂肪肝炎）に分類される。

1. 肝臓の**脂肪沈着**は、組織学的に**5%以上**を有意とする
2. NASHは、病理診断による**脂肪変性**、**炎症**、**肝細胞傷害（風船様変性）**が特徴である。
3. NAFLとNASHは**交互作用**がある。NAFLの一部は、進行速度が遅いが**線維化**が進行することもある。
4. 飲酒の上限はエタノール換算**男性30 g/日**、**女性20 g/日**が基準である。
5. 薬物に起因する脂肪性肝疾患は、基本的に薬物性肝障害として取り扱う。
6. いわゆる小滴性脂肪変性を呈するライ症候群、急性妊娠性脂肪肝などは、NAFLDからは除外する。
7. NASH肝硬変の中に、進行とともに脂肪変性や風船様変性などNASHの特徴が焼失し、**Burned-out NASH**を呈するものがある

NAFLD NASH 治療ガイドライン2020より

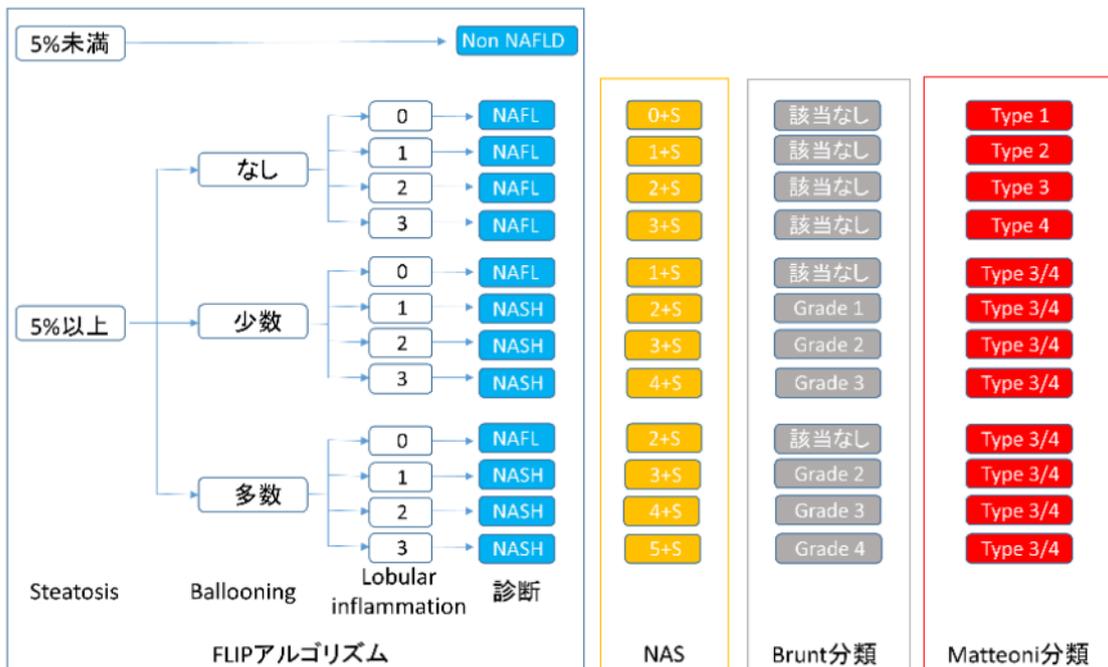


Fig.1-3 NAFLD の定義とスコアリングシステム

### 1.5 NAFLD の非侵襲性バイオマーカー

NAFLD の非侵襲性バイオマーカーとして、世界においては、血小板数、ヒアルロン酸、4 型コラーゲン 7s が有用とされている。日本においては、M2BPGi、オートタキシンなどが肝線維化マーカーとして保険適用されており、線維化進行診断の有用性が報告されている。高度線維化（肝線維化ステージ 3、4）での診断能は M2BPGi が AUC : 0.876、オートタキシンが AUC : 0.75 である。線維化を予測するスコアリングシステムは、FIB-4 Index、NFS、APRI、BARD score があり、高度線維化例の診断能については、FIB-4 Index と NFS が AUC : 0.84 であり、APRI の 0.77、BARD score の 0.76 より高値であった<sup>20</sup>。そのため、ガイドラインでは FIB-4 Index および NFS の使用が推奨されている。しかし、いずれのバイオマーカーも肝線維化を反映するものであり、炎症を反映するバイオマーカーは存在しない。非侵襲的な診断法として、バイオマーカー以外に画像診断も行われているが、脂肪肝は確認できるものの風船様変性（Ballooning）は検出できないため、今もなお NASH の診断には肝生検が必要とされている。Ballooning が非侵襲的に診断できるようになれば、肝生検を施行する必要がなくなり、患者への負担が軽減される。

### 1.6 本研究の目的

メタボリックシンドロームでは、過剰な内臓脂肪蓄積により、脂肪細胞からのアディポサイトカイン分泌異常を認め、高血圧、糖代謝異常、脂質代謝異常を引き起こしている。さらに病態の進行により、糖尿病、動脈硬化症（心筋梗塞・脳梗塞）、NASH のような生活習慣病を発症する。これら生活習慣病の予防もしくは早期治療を行うために、メタボリックシンドロームでの中心となる脂肪組織と肝臓の病態を正確に把握するバイオマーカーが求められてきた。

そこで、本研究では、メタボリックシンドロームに関与するバイオマーカーとして、白色脂肪細胞から分泌されるアディポサイトカインの TNF $\alpha$  と Leptin、NASH バイオマーカー候補であるフラグメント化サイトケラチン 18 の高感度測定系を確立することを目的に研究を行った。

第 2 章では、白色脂肪細胞から分泌されるアディポサイトカインとして TNF $\alpha$  と Leptin の高感度測定系を立ち上げ、脂肪細胞から産生されるアディポサイトカインの測定を行った。そして、第 3 章では、TG 蓄積モデル系を作製し、第 2 章で得られた測定法を利用してメタボリックシンドロームを抑制する化合物の探索を行った。一方、第 4 章では、NASH バイオマーカー測定系を構築するため、新たに fCK18 のモノクローナル抗体、リコンビナントタンパク質を作製し、これらを組み合わせて高感度 fCK18 CLEIA を構築した。そして、第 5 章では、派生コホートとして三重大学で肝生検を施行した臨床検体 54 例、バリデーションコホートとして東京大学で肝生検を施行した 67 例を用いて、高感度 fCK18 CLEIA の臨床有用性を評価した。

## 第 2 章 アディポサイトカインの高感度測定系の構築

### 2.1 緒言

メタボリックシンドロームは、内臓脂肪蓄積を背景としたインスリン抵抗性により、糖尿病、高血圧症、高脂血症など様々な病態を引き起こす。内臓脂肪の蓄積は、運動・食事など生活習慣が大きく関係しており、摂取量と代謝量のアンバランスにより引き起こされる。白色脂肪組織（WAT）は、トリグリセリドを蓄積するエネルギー貯蔵組織としてのみ機能すると考えられてきた。しかし、1990 年代に脂肪細胞によって産生されたアディポサイトカインが発見されて以来、WAT は内分泌組織としてさらに重要な役割を果たすことが分かってきた<sup>21</sup>。腫瘍壊死因子  $\alpha$  (TNF $\alpha$ )、レプチン、アディポネクチンなどアディポサイトカインの分泌異常は、脂肪細胞への脂質の蓄積を伴い、インスリン抵抗性とグルコース消費の減少をもたらす、メタボリックシンドロームを誘発する<sup>22</sup>。

アディポサイトカインの産生量の調節は、肥満関連疾患の制御に重要である。アディポサイトカインの一つであるレプチンは、ニューロンに作用することで食欲を抑制する<sup>23,24</sup>。レプチン投与は、先天性脂肪萎縮症マウスのインスリン抵抗性に効果が認められた<sup>25</sup>。

脂肪細胞で大量に産生されるアディポネクチン<sup>26</sup>とインスリン抵抗性<sup>26-28</sup>の関係では、2 型グリコーゲン合成と虚血性心疾患患者でアディポネクチンの血中濃度が減少しているという報告がある。これらの患者は血中アディポネクチン濃度を高めるような治療戦略が行われている<sup>29</sup>。

TNF $\alpha$ はインスリン受容体であるチロシンキナーゼ活性を阻害することにより、インスリン抵抗性を引き起こす<sup>30</sup>。インスリン抵抗性に関与するマクロファージ輸送阻害因子（MIF）の濃度は TNF $\alpha$ とともに上昇する<sup>31</sup>。白色脂肪細胞により活性化されたマクロファージも TNF $\alpha$ を分泌し、インスリン抵抗性に関与する<sup>32</sup>。

したがって、インスリン抵抗性は TNF $\alpha$ の誘導とレプチン抑制、白色脂肪細胞による脂肪沈着によって引き起こされる。ただし、インスリン抵抗性のメカニズムの詳細は明らかになっていないため、脂肪細胞、マクロファージ、肝細胞など細胞間のクロストークの関与を精査する必要がある。このメカニズムを解明しメタボリックシンドロームを予防するためにはアディポサイトカインの定量的な分析が必要である。

マウス前駆脂肪細胞 3T3-L1 は、Green and Kehinde<sup>33</sup>によってスイスアルビノマウス線維芽細胞株 3T3 から単離され、前駆脂肪細胞から脂肪細胞への分化が容易であるため<sup>34</sup>脂肪細胞とアディポサイトカインの特性を調べるための最も有用な細胞株として用いられてきた。アディポサイトカインの mRNA およびアディポサイトカインの発現に関しては、RT-PCR 法やウエスタンブロットング法により報告されている<sup>35-37</sup>。しかし、アディポネクチンを除くほとんどのアディポサイトカインは分泌量が低く、モノクローナル抗体を取得することが困難であるため、ELISA 法を用いた TNF $\alpha$ やレプチンの定量的研究は行われていない。本研究では、3T3-L1 細胞から分泌されたアディポサイトカインを定量するために、1 pg/mL まで測定できる、高感度 ELISA 法の開発を行うことを目的とした。

## 2.2 方法

### 2.2.1 比色法を用いた TNFa の ELISA

ヤギ抗マウス TNFa ポリクローナル抗体 (R&D Systems) を PBS (-) (pH7.4) で 10 µg/mL に希釈し、96 well プレート (COSTER) に 100 µL/well 添加後、4°C で 12 時間反応させた。PBS で 4 回洗浄後、5% カゼイン-PBS を 380 µL 添加し、室温で 2 時間ブロッキングした。PBS で洗浄後、マウス TNFa (Techene Technol Corp.) またはサンプルを 100 µL 添加し、室温で 1 時間反応させた。PBS で 6 回洗浄したのち、希釈溶液 (Blocking one (ナカライ) : PBS, pH7.4 = 1 : 9) で 4 µg/mL に調製したウサギ抗マウス TNFa ポリクローナル抗体 (Pierce Biotechnology) を 100 µL 添加後、室温で 1 時間反応させた。PBS で 6 回洗浄し、希釈溶液で 4 µg/mL に調製した HRP 標識抗ウサギ IgG 抗体 (American Qualex Manufacturers) を 100 µL 添加後、1 時間反応させた。PBS で 6 回洗浄後、200 µL の基質液 (0.3 mg/mL ABTS, 0.03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 125 mM クエン酸 Buffer, pH4.0) を添加し、マイクロプレートリーダー (Bio-Rad) で 420 nm の吸収を測定した。

### 2.2.2 比色法を用いた Leptin の ELISA

ヤギ抗マウス Leptin ポリクローナル抗体 (R&D Systems) を PBS (-) (pH7.4) で 4 µg/mL に希釈し、96 well プレート (COSTER) に 100 µL/well 添加後、4°C で 12 時間反応させた。PBS で 4 回洗浄後、0.5% カゼイン-PBS を 380 µL 添加し、室温で 2 時間ブロッキングした。PBS で洗浄後、マウス Leptin (Calbiochem-Novabiochem) またはサンプルを 100 µL 添加し、室温で 1 時間反応させた。PBS で 6 回洗浄したのち、希釈溶液 (Blocking one (ナカライ) : PBS = 1 : 9) で 4 µg/mL に希釈したウサギ抗 Leptin ポリクローナル抗体 (PeproTech EC) を 100 µL 添加し、室温で 1 時間反応させた。PBS で 6 回洗浄し、希釈溶液で 4 µg/mL に調製した HRP 標識抗ウサギ IgG 抗体 (American Qualex Manufacturers) を 100 µL ずつ添加後、1 時間反応させた。PBS で 6 回洗浄し、200 µL の基質液 (0.3 mg/mL ABTS, 0.03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 125 mM クエン酸 Buffer, pH4.0) を添加後、マイクロプレートリーダー (Bio-Rad) で 420 nm の吸収を測定した。

### 2.2.3 蛍光法を用いた TNFa の ELISA

ヤギ抗マウス TNFa ポリクローナル抗体 (R&D Systems) を PBS (-) (pH7.4) で 10 µg/mL に希釈し、96 well プレート (Greiner・黒) に 100 µL/well 添加し、4°C で 12 時間反応させた。PBS で 4 回洗浄し、0.5% カゼイン-PBS を 380 µL 添加後、室温で 2 時間ブロッキングした。PBS で洗浄後、マウス TNFa (Techene Technol Corp.) またはサンプルを 100 µL 添加し、室温で 1 時間反応させた。PBS で 6 回洗浄したのち、希釈溶液 (Blocking one (ナカライ) : PBS = 1 : 9) で 4 µg/mL に希釈したウサギ抗 TNFa ポリクローナル抗体 (Pierce Biotechnology) を 100 µL 添加し、室温で 1 時間反応させた。PBS で 6 回洗浄し、希釈溶液で 200 倍希釈した β-galactosidase 標識抗ウサギ IgG 抗体 (American Qualex Manufacturers) を 100 µL 添加

し、1 時間反応させた。PBS で 6 回洗浄したのち、200  $\mu$ L の基質溶液 (1 mM  $MgCl_2$ , 10 mM NaCl, 100 mM リン酸ナトリウム緩衝液 pH7.0, 0.1 g/L BSA, 0.1 mg/L 4-Methylumbelliferyl  $\beta$ -D-glucoside (MUG)) を添加し、マイクロプレートリーダーで励起波長 360 nm、蛍光波長 460 nm を測定した。

#### 2.2.4 蛍光法を用いた Leptin の ELISA

ヤギ抗マウス Leptin ポリクローナル抗体 (R&D Systems) を PBS (-) (pH7.4) で 4  $\mu$ g/mL に希釈し、96 well plate (Greiner・黒) に 100  $\mu$ L/well 添加し、4 $^{\circ}$ C で 12 時間反応させた。PBS で 4 回洗浄後、0.5% casein-PBS を 380  $\mu$ L 添加し、室温で 2 時間ブロッキングした。洗浄後、マウス Leptin (Calbiochem-Novabiochem) またはサンプルを 100 $\mu$ L 添加し、室温で 1 時間反応させた。PBS で 6 回洗浄したのち、希釈溶液 (Blocking one (ナカライ) : PBS = 1 : 9) で 4  $\mu$ g/mL に希釈したウサギ抗 Leptin ポリクローナル抗体 (PeproTech EC) を 100  $\mu$ L 添加し、室温で 1 時間反応させた。PBS で 6 回洗浄し、希釈溶液で 200 倍希釈した  $\beta$ -galactosidase 標識抗ウサギ IgG 抗体 (American Qualex Manufacturers) を 100  $\mu$ L ずつ添加し、1 時間反応させた。PBS で 6 回洗浄した後、200  $\mu$ L の基質溶液 (1 mM  $MgCl_2$ , 10 mM NaCl, 100 mM リン酸ナトリウム緩衝液 pH7.0, 0.1 g/L BSA, 0.1 mg/L MUG) を添加し、マイクロプレートリーダーで励起波長 360 nm、蛍光波長 460 nm を測定した。

#### 2.2.5 成熟脂肪細胞への分化

マウス前駆脂肪細胞株 3T3-L1 を  $2 \times 10^6$  個/75  $cm^2$  フラスコに播種し、基本培地 (DMEM+10%FBS) で 2 日間培養し、さらに誘導培地 (DMEM+10% FBS+0.5 mM 3-isobutyl-methylxanthine (IBMX) + 4  $\mu$ M dexamethasone (DEX) 10  $\mu$ g/mL Insulin) で 4 日間 (対照群は基本培地で 4 日間) 培養後、培養上清と細胞ライセートを回収した。培養上清は、遠心分離 (12,000  $\times$ g, 5 分) で細胞の残骸断片を除いたものをサンプルとした。細胞ライセートは、細胞を 0.25%トリプシン処理後 0.02 mM EDTA-PBS に懸濁し、超音波破碎、遠心分離 (12,000  $\times$ g, 5 分) 後の上澄み液をサンプルとした。

#### 2.2.6 アディポサイトカインと TG 蓄積量の評価

TNF $\alpha$ と Leptin の濃度は、比色法と蛍光法の ELISA で測定した。細胞ライセートの総タンパク量は、Bradford 法を用い、プロテインアッセイキット (Bio-Rad) で測定した。トリグリセライド (TG) 量はジエチルエーテルで抽出した後、ジエチルエーテルを乾燥し、トリグリセライド E-テストワコー (Wako) を用いて測定した。

#### 2.2.7 PPAR $\alpha$ と C/EBP ファミリーの遺伝子発現

前述の方法 (2.2.5) で分化誘導した前駆脂肪細胞 3T3-L1 を、0.25%トリプシン処理により細胞を剥がし、PBS に懸濁後、遠心分離 (500 rpm, 3 min) により細胞を回収し、RNeasy Lipid

Tissue Mini Kit (QIAGEN) の添付文書に従い RNA 抽出を実施した。次に、Omniscript Reverse Transcription Kit で cDNA を合成し、PCR 法 (Hot Start PCR キット、Qiagen) により、PPAR $\gamma$ 、C/EBP $\alpha$ 、C/EBP $\beta$ 、C/EBP $\delta$ 、GAPDH の遺伝子発現を確認した (Table 2-1) 。プライマーは Table 2-2 に示すものを合成して用いた。

Table 2-1 PCR の条件

(1) 反応液組成

10×PCR Buffer	5.0 $\mu$ L
5 x Q solution	10.0 $\mu$ L
dNTP mix	4.0 $\mu$ L
Primer F	4.0 $\mu$ L
Primer R	4.0 $\mu$ L
Hot Start Taq	0.5 $\mu$ L
Template DNA	3.0 $\mu$ L
Distilled Water	19.5 $\mu$ L
	<hr/> 50.0 $\mu$ L

(2) PCR 反応

Initial activation step	15 min	95 °C	
Denaturation	30 sec	95 °C	} 35 cycles
Annealing	30 sec	55 °C	
Extension	1 min	72 °C	
Final extension	10 min	72 °C	

Table 2-2 RT-PCR に用いたプライマー

Transcriptional factors	Primers	
	backward	forward
PPAR $\gamma$	5'-gagattctctgttgacctt-3'	5'-agcttcaatcggatgggttc-3'
C/EBP $\alpha$	5'-tggacaagaacagcaacgag-3'	5'-aatctcctagtcctggcttg-3'
C/EBP $\beta$	5'-actacggttacgtgagcctc-3'	5'-cagctgttgacaagtcc-3'
C/EBP $\delta$	5'-acctctcaacagcaaccac-3'	5'-ttctgctcatctctggtt-3'

## 2.3 結果

### 2.3.1 比色法を用いた TNF $\alpha$ または Leptin の ELISA

HRP で標識した抗体を ABTS で発色し、比色法により検出した結果を Fig.2-1 に示す。TNF $\alpha$ の Standard range は 1~100 ng/mL、Leptin は 200~1000 ng/mL であった。3T3-L1 が分泌するアディポサイトカインの濃度は 10 pg/mL といわれており、さらなる感度向上が必要であることが分かった。

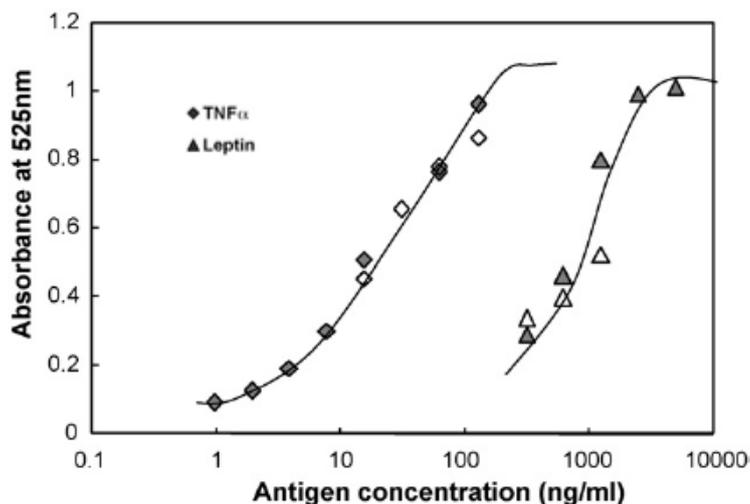


Fig.2-1 比色法を用いた TNF $\alpha$ または Leptin の Standard curve

### 2.3.2 蛍光法を用いた TNF $\alpha$ または Leptin の ELISA

感度を向上させるため、酵素を HRP から  $\beta$ -gal へ、基質を ABTS から MUG に変え、再度検討を行った。蛍光法の反応時間を検討した結果を Fig.2-2 に示す。比色法は過酸化水素を用いているため、反応開始後 2 時間で閾値に達するが、蛍光法では反応開始後 21 時間を超えても蛍光強度上昇が認められた。TNF $\alpha$ の反応時間は 130 分、Leptin の反応時間 15 時間とし、蛍光法により測定した Standard curve の結果を Fig.2-3 に示す。

この方法を用いることで Standard Range が 1~100 pg/mL となり、マウス前駆脂肪細胞株 3T3-L1 から分泌されるアディポサイトカインの測定に必要な感度 1 pg/mL 以下を達成した。

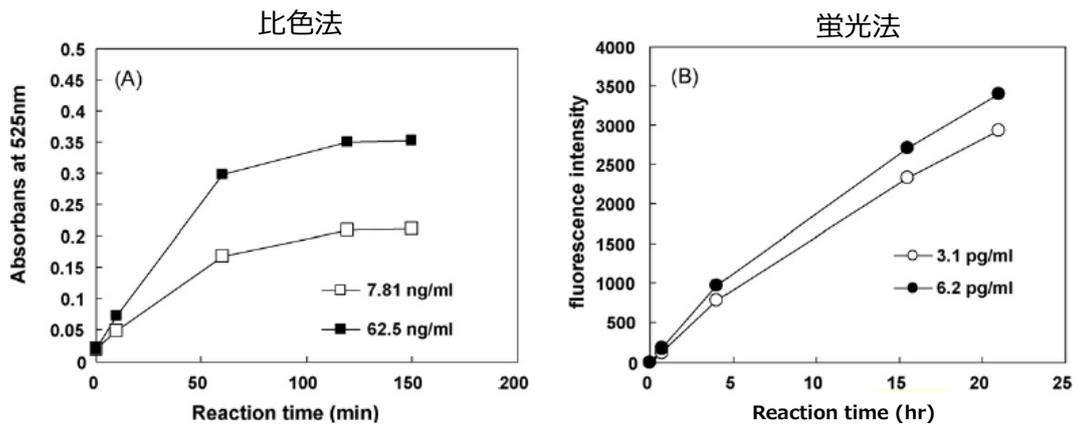


Fig.2-2 TNFαの蛍光法の反応時間の検討

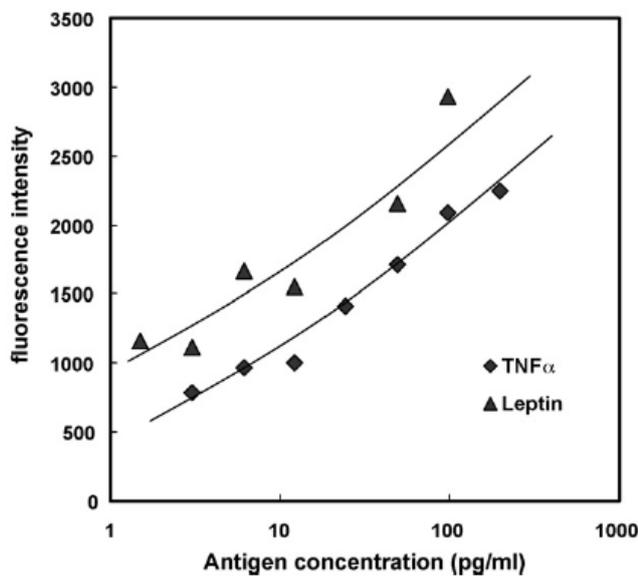


Fig.2-3 蛍光法を用いた TNFαと Leptin の Standard curve

### 2.3.3 脂肪細胞の遺伝子発現とアディポサイトカインの産生量

次に、得られた高感度法を用いて細胞内に産生されたアディポサイトカインの測定を行った。マウス前駆脂肪細胞株 3T3-L1 を、IBMX と DEX、Insulin を含む培地で培養し、分化誘導して得られた脂肪細胞を 3T3-L2 とした。

3T3-L1 と 3T3-L2 それぞれの細胞について、脂肪細胞に関連する転写因子である C/EBPα、C/EBPβ、C/EBPδ、PPARγ の遺伝子発現を PCR 法で解析した。その結果、3T3-L1 では、C/EBPβ、C/EBPδ、PPARγ の発現が認められず、C/EBPαでのみわずかに発現が認められた。一方で 3T3-L2 は、C/EBPα、C/EBPβ、C/EBPδ、PPARγ いずれも発現が認められた。(Fig.2-4) この結果は既報<sup>38-40</sup>の結果と一致していることから、3T3-L2 は成熟脂肪細胞に分化していることを確認した。

次に、3T3-L1と3T3-L2のTNF $\alpha$ とLeptinの産生量を測定した。細胞に含まれるタンパク量当たりのTNF $\alpha$ とLeptinの量を算出した結果をFig.2-5に示す。TNF $\alpha$ の産生量は、3T3-L1から3T3-L2への脂肪細胞分化に伴い上昇が認められた。Leptinの産生量は、分化に伴いわずかに減少し、TNF $\alpha$ の約1/500であった。

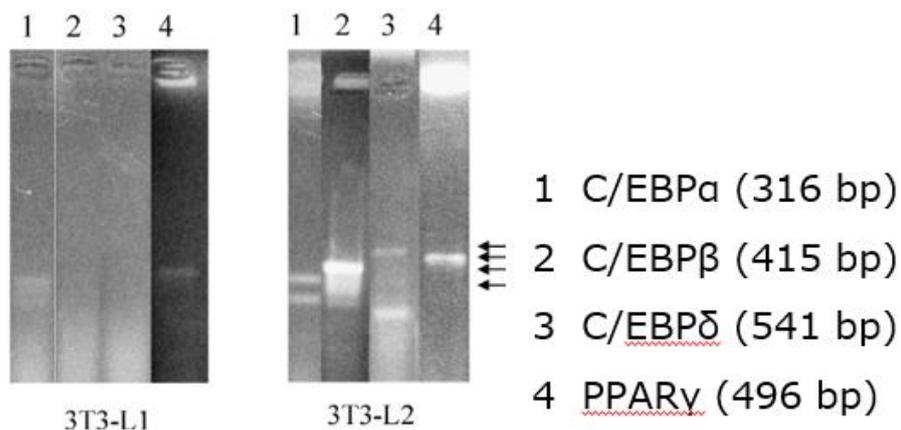


Fig.2-4 3T3-L1と3T3-L2の転写因子の遺伝子発現

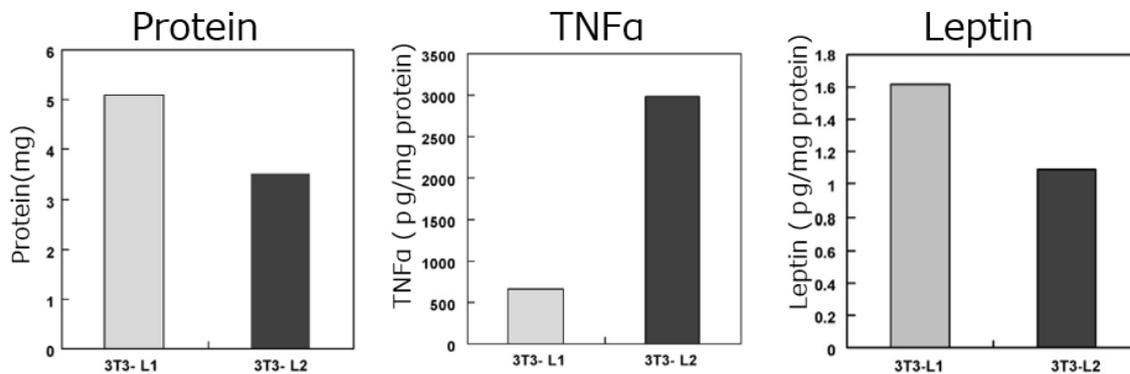


Fig.2-5 TNF $\alpha$ とLeptinの産生量の比較

## 2.4 考察

脂肪細胞から分泌されるアディポサイトカインを定量するため、TNF $\alpha$ と Leptin の高感度測定系を構築した。本測定系には 2 つの特徴がある。一つは、1 次抗体、2 次抗体、検出抗体すべてにおいてポリクローナル抗体を用いたことである。ポリクローナル抗体を使うことで、1 分子の抗原に対し、複数の抗体を結合させることができ、さらに検出抗体を用いることにより、感度を増強させることができた。二つ目は、基質と酵素の組み合わせ、および反応時間を最適化させたことである。HRP を用いた ELISA 法の反応時間は 1~2 時間<sup>41-43</sup>であるが、 $\beta$ -galactosidase の安定性を確認した結果、少なくとも 21 時間活性が安定であり、反応時間を最適化することにより、感度を 0.1~1 pg/mL まで上げることに成功した。蛍光法では、長時間反応させることにより、低濃度まで検出が可能であることを示唆している。

本研究を進めた当時は、TNF $\alpha$ や Leptin のモノクローナル抗体を入手することは困難であり、市販の TNF $\alpha$ や Leptin の ELISA Kit はほとんど存在しなかった。本測定系は、市販のポリクローナル抗体を用いているため、抗体の入手が可能であり、安価で汎用性の高く、アディポネクチンや PAI-1 など他のサイトカインにも応用可能である。このことが本測定の最大の長所である。

また、前駆脂肪細胞から脂肪細胞に分化すると、TNF $\alpha$ の産生量が増加し、Leptin の産生量がわずかに減少した。本測定系を構築することにより、脂肪細胞から産生されるアディポサイトカインの挙動を明らかにすることができた。TNF $\alpha$ 、Leptin アディポネクチンは、メタボリックシンドロームの原因となるインスリン抵抗性に関連する重要な因子と考えられている。これまでの研究により、肥満によりインスリン抵抗性が惹起し TNF $\alpha$ が上昇、Leptin、アディポネクチンが減少することが明らかになっており<sup>35-40</sup>、Fig.2-5 はこれらの知見を支持するものであった。

白色脂肪細胞の肥大化は、アディポサイトカインの異常な産生をもたらすと考えられていたので、分化の過程とアディポサイトカインの分泌挙動を調べるのが重要である。これまでに前駆脂肪細胞 3T3-L1 を用いたアディポサイトカインの研究は行われていたが、RT-PCR 法や Western Blotting 法のような定性的であり、定量的な報告はなかった。成熟脂肪細胞の TNF $\alpha$ および Leptin の産生量は、それぞれ約 15000 pg/mL と約 5.5 pg/mL であり、本測定法で十分に検出可能であったが、Leptin は検出限界に近かった。さらなる Leptin の感度上昇には、親和性の高い抗体が必要であると考えられる。

インスリン抵抗性の複雑なメカニズムを解明するためには、脂肪細胞と肝細胞、神経細胞とのクロストークを調べる必要がある<sup>44,45</sup>。そのためには定量的な解析が重要であり、蛍光法を用いた測定系はこれらの解明に大きく貢献できるツールとなると考えられる。

## 2.5 結論

抗原をヤギとウサギのポリクローナル抗体でサンドイッチし、MUG と  $\beta$ -galactosidase の反応により生成される蛍光シグナルを測定することで、TNF $\alpha$ または Leptin の新規高感度測定系を構築した。反応時間を検討することにより、高感度（約 1 pg/mL）まで測定できる系を構築することができた。アディポサイトカインの分泌挙動を調べるために 3T3-L1 と 3T3-L2 の濃度を測定した結果、前駆脂肪細胞から脂肪細胞への分化に伴い、TNF $\alpha$ の産生量が増加し、レプチンの産生量はわずかに減少した。脂肪細胞で産生された TNF $\alpha$  は 3 ng/mg protein で、Leptin の 500 倍近く高かった。

本結果より、アディポサイトカインの分泌量を定量的に測定でき、インスリン抵抗性の複雑なメカニズム解明のための大きな一助になると考えられる。

## 第3章 脂肪細胞における脂肪の蓄積およびアディポサイトカインの分泌特性の解析

### 3.1 緒言

肥満は、体内に脂肪が過剰に蓄積した状態のことをいい、皮下脂肪型肥満と内臓脂肪型肥満に分類される。特に内臓脂肪型肥満は、メタボリックシンドロームの原因になると言われている。

脂肪細胞は、TNF $\alpha$ や Leptin、Adiponectin などアディポサイトカインと呼ばれる様々な生理活性物質を分泌する内分泌臓器としての機能<sup>26,46-48</sup>と、血中に存在する遊離脂肪酸やグルコースを取り込み中性脂肪としてエネルギーを貯蔵する機能を持つ。過栄養状態では、脂肪細胞が肥大化し、アディポサイトカインが分泌異常となり、脂質代謝やグルコース取り込みが低下し、インスリン抵抗性を呈し、メタボリックシンドロームを引き起こす。

肥満者のメタボリックシンドローム予防には、脂肪細胞の形態変化とアディポサイトカインの関係性を知ることが重要である。しかし、脂肪細胞において、完全に分化した脂肪細胞株はほとんど単離されていないため、これらについては、十分な研究が行われていない。

本研究では、細胞の形態変化とアディポサイトカインの関係性を明らかにするために、脂肪細胞株を単離、TG 蓄積モデルを作製し、アディポサイトカインである TNF $\alpha$ の分泌挙動を検討した。さらに、本モデルを使って、TG 蓄積を抑制する物質のスクリーニングを行った。

### 3.2 方法

#### 3.2.1 細胞株および培養条件

マウス前駆脂肪細胞株 3T3-L1 は、大日本住友製薬より購入した。細胞は、DMEM+10%FBS に懸濁し、 $2 \times 10^6$  cells/75 cm<sup>2</sup> フラスコに播種した。

#### 3.2.2. 脂肪細胞への分化と成熟脂肪細胞株の作製

脂肪細胞への分化は、Gregoire らの文献<sup>49</sup>に従って実施した。マウス前駆脂肪細胞株 3T3-L1 を  $2 \times 10^6$  個/75 cm<sup>2</sup> フラスコに播種し、基本培地 (DMEM+10%FBS) で 2 日間培養し、誘導培地 (DMEM+10% FBS + 0.5 mM IBMX+ 4  $\mu$ M DEX) で 2 日間、さらに分化誘導培地 (DMEM+10% FBS + 10  $\mu$ g/mL Insulin) で 2 日間、最後に基本培地で 2 日間培養を 1 サイクルとした。分化効率を向上させるため、この一連の操作を 3 回繰り返した。成熟脂肪細胞株を単離するため、分化誘導した細胞を 10 cm<sup>2</sup> dish に播種し、顕微鏡観察にて脂肪を多く蓄積したいくつかの細胞株をピックアップした。その後、3 cm<sup>2</sup> dish に播種し、さらに拡大培養後、ピックアップした細胞株の中から、脂肪の蓄積量の多い細胞株を選択し、新規脂肪細胞株 3T3-L24 と命名した。

#### 3.2.3 遺伝子発現の解析

脂肪細胞への分化誘導は、下記の方法で実施した。マウス前駆脂肪細胞株 3T3-L1 を  $5 \times 10^5$  cells/25 cm<sup>2</sup> フラスコに播種し、基本培地 (DMEM+10%FBS) で 2 日間培養し、誘導培地 (DMEM+10% FBS + 0.5 mM IBMX+ 4  $\mu$ M DEX) で 2 日間、さらに分化誘導培地 (DMEM+10% FBS + 10  $\mu$ g/mL Insulin) で 2 日間、最後に基本培地で 2 日間培養し、本細

胞を脂肪細胞 3T3-L2 とした。前駆脂肪細胞 3T3-L1、または単離した脂肪細胞株 3T3-L24 は、 $5 \times 10^5$  cells/25 cm<sup>2</sup> フラスコに播種し、基本培地 (DMEM+10%FBS) で 6 日間培養した。各細胞を、0.25%トリプシン処理後 PBS に懸濁し、遠心分離 (500 rpm 3 min) にて細胞を回収、RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (QIAGEN) の添付文書に従い total RNA を抽出した。次に、逆転写反応(Omniscript Reverse Transcription Kit) により cDNA を合成し、その後リアルタイム PCR (Rotor-GeneCYBR Green PCR Kit, Qiagen) にて遺伝子発現量を測定した。 $\beta$ -actin、AP2、C/EBP $\alpha$ 、C/EBP $\beta$ 、PPAR $\gamma$ のプライマーは、QuanTech Orimer Assay (Qiagen) に付属のものを用いた。PCR は、Rotor-Gene (Qiagen) を使い、95°C 5 sec, 65°C 10 sec で 70 サイクル行った。閾値線と Ct 値の解析は、Potter-Gene 6000 シリーズソフトウェアで行った。遺伝子発現量の比較は、 $\beta$ -actin で補正した 3T3-L1 に対する 3T3-L2 もしくは、3T3-L24 の  $\Delta\Delta Ct$  値で行った。有意差検定は T 検定を用いた。

### 3.2.4 Triglyceride 蓄積モデルの作製

前駆脂肪細胞 3T3-L1 と新規脂肪細胞株 3T3-L24 を、それぞれ  $5 \times 10^6$  cells/75 cm<sup>2</sup> 播種した。24 時間後、以下の条件で 3 日間培養し、培養上清のグルコース濃度の測定により 90%以上のグルコース消費が行われたのを確認し、培養上清と細胞ライセートを回収した。添加濃度は予備検討により決定した。

#### ①3T3-L1

- ・ コントロール ; DMEM+10%FBS (基本培地)
- ・ オレイン酸 ; 0.28 mM オレイン酸 + 基本培地

#### ②3T3-L24

- ・ コントロール ; 基本培地
- ・ オレイン酸 ; 0.28 mM オレイン酸 + 基本培地
- ・ オレイン酸ナトリウム ; 0.28 mM オレイン酸ナトリウム + 基本培地
- ・ リノレン酸 ; 0.28 mM リノレン酸 + 基本培地
- ・ グリセロール ; 22 mM グリセロール + 基本培地

細胞内の油滴染色は、上記と同様に 3T3-L24 をそれぞれ  $5 \times 10^6$  cells/75 cm<sup>2</sup> 播種し、24 時間後にオレイン酸を添加、3 日後、オイルレッド染色 (Adipogenesis Assay Kit、Chemicon International Inc.) し、顕微鏡観察を行った。

### 3.2.5 Triglyceride 蓄積モデルにおける抑制物質のスクリーニング

前駆脂肪細胞 3T3-L1 と新規脂肪細胞株 3T3-L24 を、それぞれ  $5 \times 10^6$  cells/75 cm<sup>2</sup> 播種した。24 時間後、以下の条件で 3 日間培養し、90%以上のグルコース消費が行われたのを確認し、培養上清と細胞ライセートを回収した。添加濃度は予備検討により決定した。

- ・ コントロール ; DMEM+10%FBS (基本培地)
- ・ アセチレン酸 ; 0.5 mM アセチレン酸 + 基本培地

- ・ クエン酸 ; 0.5 mM クエン酸 + 基本培地
- ・ カルニチン ; 0.5 mM カルニチン + 基本培地
- ・ タウリン ; 0.5 mM タウリン + 基本培地
- ・ オレイン酸ナトリウム ; 0.28 mM オレイン酸ナトリウム + 基本培地
- ・ オレイン酸ナトリウム + クエン酸 ; 0.28 mM オレイン酸ナトリウム + 0.5 mM クエン酸 + 基本培地、
- ・ オレイン酸ナトリウム + カルニチン ; 0.28 mM オレイン酸ナトリウム + 0.5 mM カルニチン + 基本培地
- ・ オレイン酸ナトリウム + タウリン ; 0.28 mM オレイン酸ナトリウム + 0.5 mM タウリン + 基本培地

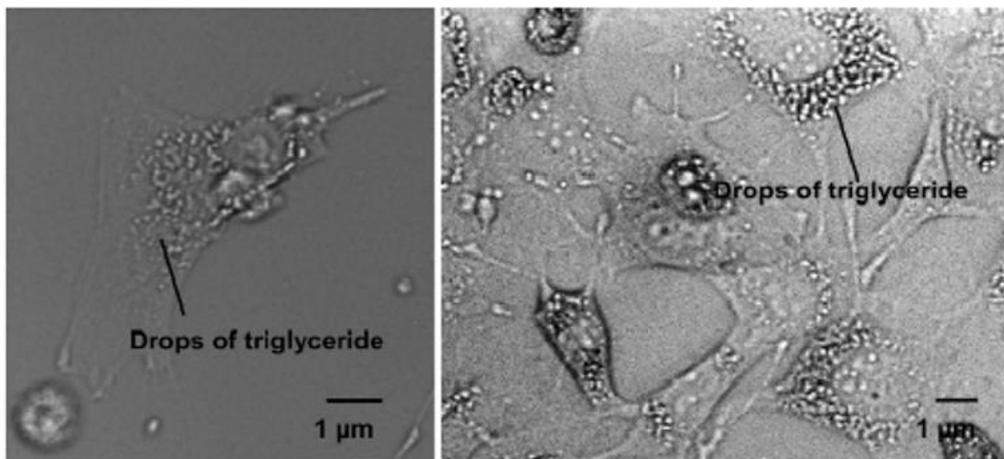
### 3.2.6 TNF $\alpha$ 濃度とTG蓄積量の測定

TNF $\alpha$ は、培養上清を遠心分離 (12,000  $\times$ g, 5分) により細胞の残骸断片を除いた上澄み液を蛍光法の ELISA で測定した。細胞ライセートは、75  $\text{cm}^2$ のフラスコで培養した細胞を 0.25%トリプシン処理後 0.02 mM EDTA-PBS に懸濁し、超音波破碎 (強度 8 で 30 sec、TOMY)、その後タンパク定量 (Protein assay kit : Bio-rad) と TG 測定 (トリグリセライド E-テストワコー、Wako) を行った。細胞ライセート中の TG 量は、総タンパク量に基づいて算出した。有意差検定は T 検定を用いた。

## 3.3 結果

### 3.3.1 新規脂肪細胞株の作製と遺伝子発現解析

完全に分化した脂肪細胞を取得するため、分化誘導した細胞の中から脂肪を多く含む細胞を単離し、脂肪細胞株 (3T3-L24) を得た。3T3-L24 の脂肪蓄積は、オイルレッド染色により、脂肪滴が観察され、オレイン酸を添加すると脂肪滴の増加が認められた (Fig.3-1)。



添加無し

0.28 mM オレイン酸添加

Fig.3-1 3T3-L24 のオイルレッド染色

3T3-L1、3T3-L2、3T3-L24 それぞれにおいて、脂肪細胞の分化に関連する遺伝子発現をリアルタイム PCR で解析した (Fig.3-2) 。3T3-L1 と比較し、3T3-L2 も 3T3-L24 も遺伝子発現の増加が認められ、脂肪細胞への分化が認められた。3T3-L24 は、3T3-L2 と比較し、脂肪細胞分化時に一過性発現する C/EBPβ は約 1.6 倍、分化後期に発現する C/EBPα、PPARγ は、23.2 倍、5.0 倍、成熟脂肪細胞に発現する AP2 は 8.8 倍であり、成熟脂肪細胞株の単離に成功した。

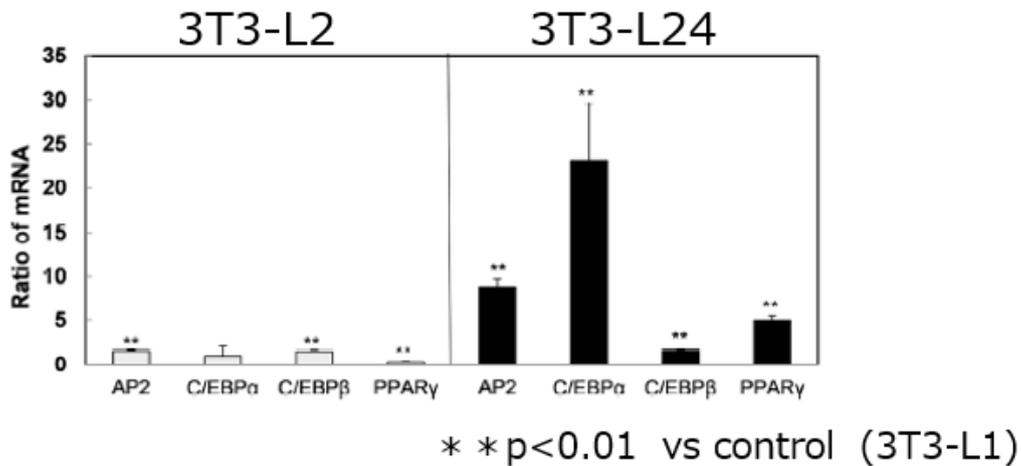
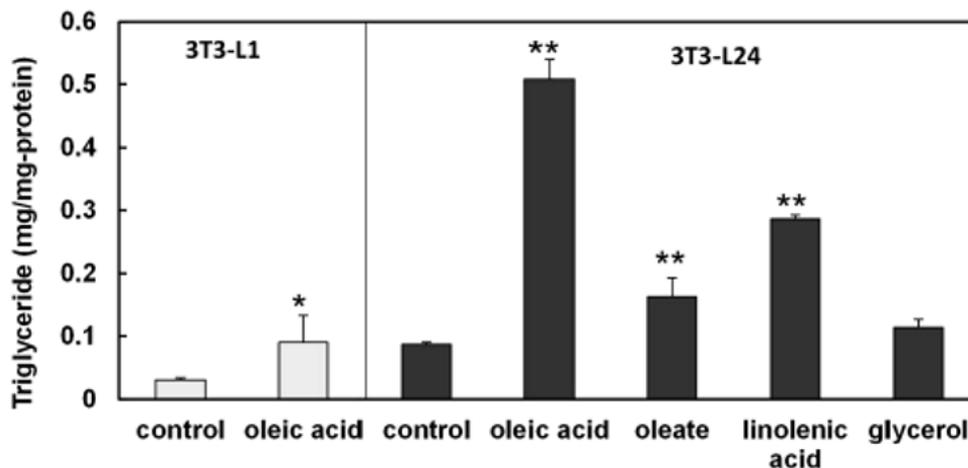


Fig.3-2 3T3-L1 に対する 3T3-L2、3T3-L24 の脂肪細胞分化に関連する遺伝子発現

### 3.3.2 Triglyceride 蓄積モデルの作製

TG 蓄積モデルを作製するため、3T3-24 に添加する化合物のスクリーニングを行った。TG は脂肪酸とグリセロールにより構成されるため、各種脂肪酸 (0.28mM オレイン酸、0.28mM オレイン酸ナトリウム、0.28mM リン酸) と 22mM グリセロールを添加し、それぞれの TG 蓄積量を比較した。Fig.3-3 より、3T3-L1 においては、オレイン酸添加 (添加あり : 0.090 mg/mg protein vs 添加なし : 0.031 mg/mg protein) となり、TG 蓄積量の増加はわずかであった。これに対して、3T3-L24 では、オレイン酸を添加した時の TG 蓄積量は非常に高く、0.51 mg/mg protein であり、添加無し (0.086 mg/mg protein) の約 5 倍になった。また、脂肪酸とグリセロールの比較では、グリセロール 0.12 mg/mg protein に対し、リノール酸 0.29 mg/mg protein、オレイン酸ナトリウム 0.16 mg/mg protein であり、脂肪酸の方が TG 蓄積量の増加が認められた。



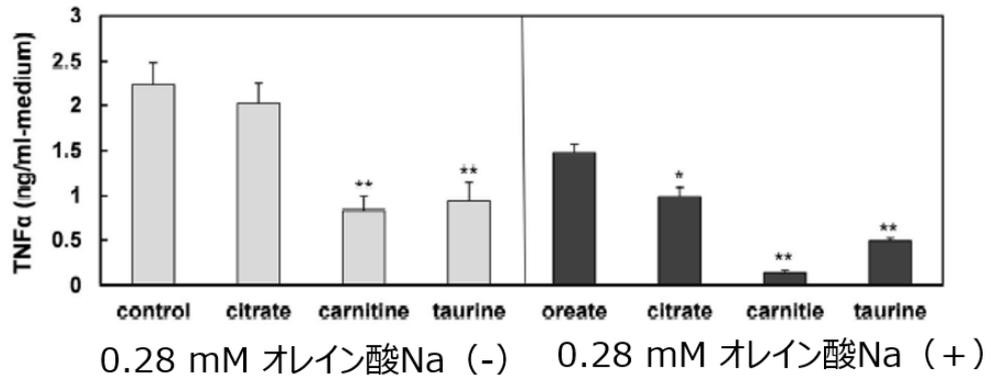
3T3-L1または3T3-L24に0.28 mMのオレイン酸、オレイン酸ナトリウム、リルン酸、22 mMのグリセロールを添加した時の TG蓄積量  
 \* p<0.05 vs. control, \* \* p<0.01 vs. control

Fig.3-3 3 T3-L1 および 3 T3-L24 の TG 蓄積量の比較

### 3.3.3 TG 蓄積モデルにおける抑制物質スクリーニング

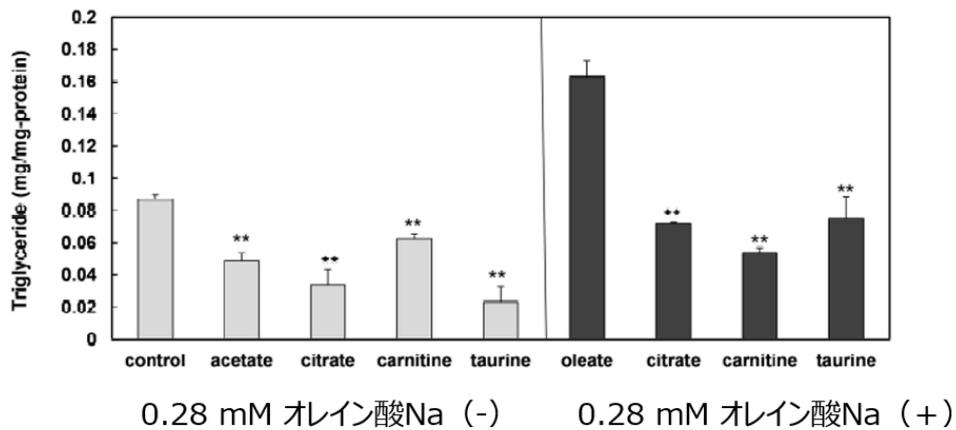
次にTG蓄積を抑制する物質のスクリーニングを行った (Fig.3-4)。TG蓄積モデルに対する抑制効果を確認するため、0.28 mM オレイン酸ナトリウム、0.5 mM クエン酸、0.5 mM カルニチン、0.5 mM タウリンを組み合わせて培養した時の TG蓄積量の変化を調べた。その結果、0.28 mM オレイン酸ナトリウム添加のみ (TG蓄積モデル: 対照) に対し、クエン酸 44%、カルニチン 33%、タウリン 46%のTG蓄積量へと減少した (p<0.01)。3T3-L24においても、0.5 mM 酢酸ナトリウム (57%)、0.5 mM クエン酸 (39%)、0.5 mM カルニチン (79%)、0.5 mM タウリン (26%) を添加した際、内在性のTG蓄積量の減少が認められた (p<0.01)。本結果より、スクリーニングに用いたこれらの物質は、TG蓄積を抑制する効果があることが分かった。

TG蓄積モデルを用いて、TG蓄積抑制効果とTNFα分泌量の関係について検討を行った (Fig.3-5)。クエン酸、カルニチン、タウリンのいずれを添加した場合でも、TG蓄積が抑制された際にTNFα分泌量が減少し、特にカルニチン (9%)、タウリン (33%) で顕著な分泌抑制効果を示した (p<0.01)。



オレイン酸Na添加ありまたはなしの条件で培養し、  
 0.5 mM クエン酸、カルニチン、タウリンを添加した時のTNFαの変化  
 \* p<0.05 vs. control or oleate, \*\* p<0.01 vs. control or oleate

Fig.3-4 TGの蓄積を抑制する化合物のスクリーニング



オレイン酸Na添加あり、またはなしの条件で培養した時の  
 0.5 mM 酢酸ナトリウム、クエン酸、カルニチン、タウリン添加時のTG蓄積量の変化  
 \* p<0.05 vs. control or oleate, \*\* p<0.01 vs. control or oleate

Fig.3-5 TG蓄積における抑制物質とTNFαの関係

### 3.4 考察

メタボリックシンドロームは内臓脂肪蓄積により、脂肪細胞から分泌されるアディポサイトカインの分泌異常を生じ、インスリン抵抗性が惹起し、様々な疾患を引き起こす症候群である。メタボリックシンドロームの予防には、脂肪組織における TG 蓄積とアディポサイトカインの関係を明らかにすることが重要であるが、アディポサイトカインが低濃度であること、完全に分化した脂肪細胞がないことから、詳細な研究が行われていなかった。本研究では、第 2 章でアディポサイトカインの TNF $\alpha$ と Leptin において、1 pg/mL まで検出できる高感度測定系を確立し、培地中および細胞内のアディポサイトカインを測定可能であることを示した。第 3 章では、この測定系を利用し、細胞の形態変化とアディポサイトカインの関係性を明らかにした。

まず、単離した脂肪細胞の転写因子の発現を確認したところ、未分化細胞と比較し、脂肪細胞分化後期に発現する C/EBP $\alpha$ および PPAR $\gamma$ 、成熟脂肪細胞に発現する aP2 の発現上昇が認められた。オイルレッド染色では、TG 蓄積量は、未分化細胞よりも増加していた。一方で、単離前の細胞は、転写因子の発現や TG 蓄積量が 3T3-L24 よりも低く、未分化細胞が残っており、純粋な脂肪細胞の特徴を示さないと考えられる。本研究で新たに単離した 3T3-L24 は、前駆脂肪細胞をほとんど含まず、脂肪細胞に関する in vitro 研究の最適なモデルとなった (Fig.3-2)。

さらに、TG 蓄積モデルを作製において、TG 蓄積量と TNF $\alpha$ 分泌量の関係について調べた。TG は脂肪酸とグリセリンで構成されるため、脂肪酸としてオレイン酸、オレイン酸ナトリウム、リノール酸を 3T3-L24 の培地に添加し、TG 蓄積量を比較したところ、オレイン酸が最も多かった。このモデルにおいて、肥満防止効果が報告されている有機酸（酢酸、クエン酸）、カルニチン、タウリンは、白色脂肪細胞の TG 蓄積量と TNF $\alpha$  の分泌量を抑制する効果が認められた。特に、カルニチン、タウリンが TG 蓄積と TNF $\alpha$  分泌を抑制したことから、メタボリックシンドロームを予防するサプリメントとして大きな期待が寄せられた。カルニチンは骨格筋や心筋に多く存在し、長鎖脂肪酸をミトコンドリア内に運搬し、酸化することでエネルギーを産生している。カルニチンを培地に添加することで、オレイン酸ナトリウムがミトコンドリア内に取り込まれ、TG の蓄積を抑制したと考えられる。タウリンはアミノ酸類似物質といわれており、炎症性サイトカインの分泌を抑制し、インスリン抵抗性を改善すると報告されていた。本研究結果においても TNF $\alpha$ の分泌抑制が認められ、既報を支持するものであった。

### 3.5 結論

細胞の形態変化とアディポサイトカインの関係性を明らかにするために、脂肪細胞株を単離、TG 蓄積モデルを作製し、アディポサイトカインである TNF $\alpha$ の分泌挙動を検討した。

3T3-L1 を IBMX、DEX、Insulin を用いて脂肪細胞に分化させ、単離することにより成熟脂肪細胞 (3T3-L24) の獲得に成功した。3T3-L24 は、メタボリックシンドローム研究の重要なツールとして期待される。

3T3-L24 を用いて、脂肪酸添加により TG 蓄積モデルを作製した。TG 蓄積抑制物質のスクリーニングを行った結果、カルニチン、タウリンで TG の蓄積抑制効果が認められた。本モデルにおいて、TG 蓄積量の減少に伴い、TNF $\alpha$ 分泌量が抑制され、脂肪細胞の形態変化とアディポサイトカインの関係性を示

した。本研究で見出した TG 蓄積抑制物質は、脂肪細胞から分泌される TNF $\alpha$ 量を抑制することから、インスリン感受性を向上させ、メタボリックシンドロームを予防する可能性が示唆された。

## 第4章 新規モノクローナル抗体によるフラグメント化サイトケラチン18の高感度測定法の確立

### 4.1 緒言

サイトケラチン18 (CK18) は、430 アミノ酸残基 (MW 48028.50) の Type1 ケラチンで、上皮細胞の中間径フィラメント (IF) の構成要素である。報告では、CK18 はアポトーシスにより、細胞内プロテアーゼのファミリーの1つであるカスパーゼ-6によって237Dで切断され、26kDのN末端フラグメントと22kDのC末端フラグメントになる。更に、22kDのC末端フラグメントは、カスパーゼ-3および-7によって396Dで切断され、19kDのフラグメントとなる<sup>50</sup>。Cell Lineを用いた実験ではアポトーシス誘導により、これらのフラグメントが細胞外へ放出されることが確認されており、体内においても血中へ放出され循環する<sup>51</sup>。市販のM30抗体は396D<sup>50</sup>で切断されたCK18fと反応し、この抗体を用いたM30 ELISA Kitにより、様々な患者血中CK18f濃度が測定され、乳がん<sup>52</sup>、結腸直腸がん<sup>53</sup>、虚血性脳卒中<sup>54</sup>、外傷性脳損傷<sup>55</sup>、移植片対宿主病、<sup>56</sup>、特にNASHや急性肝不全などのさまざまな肝疾患と関連することが報告されてきた<sup>57</sup>。NAFLDは、NAFLとNASHの2種に分類され、肝硬変や肝細胞がんへ進行することもあり、世界中の子供から大人まで発症する慢性肝疾患である。CK18fは、NAFLDの活動性をモニターする非侵襲的バイオマーカーとして有用であると報告されている<sup>58,59</sup>。しかし、NASH患者とNAFL患者もしくはNASH患者と健常者を鑑別できるが、NAFL患者と健常者間を区別することができない<sup>51</sup>。更に、NASH病理組織特有である肝細胞のバルーニングと相関せず、臨床で採用されていない<sup>16,60</sup>。従って、これら2つの課題を解決するためには感度を向上させる必要があり、新たな高感度測定系の開発が求められていた<sup>61</sup>。

本研究では、新たにK18-624およびK18-328モノクローナル抗体を作製し、CK18フラグメントの高感度CLEIAを確立することを目的とした。

なお、既存キットの測定対象はCK18フラグメント (CK18f) (238A-396D) であるのに対し、本キットの測定対象はフラグメント化CK18 (fCK18) (239A-397D、開始メチオニンを追加) とした。

### 4.2 方法

#### 4.2.1 モノクローナル抗体の作製

モノクローナル抗体は、合成ペプチド (381RRLLEDGEDFNLGDALD397) もしくはリコンビナントCK18 (Prospec, Israel) を免疫原に用い、マウスに免疫し作製した。免疫マウスから摘出した脾臓細胞とミエロマ細胞 (X63) を融合させ、ハイブリドーマを作製した。合成ペプチドとリコンビナントCK18を用いたDirect ELISAにより、陽性クローンを選抜した。陽性クローンの中から2クローンを選択し、fCK18のみと反応したK18-624抗体、CK18とfCK18の両方と反応したK18-328抗体とした。

#### 4.2.2 リコンビナントタンパク質の作製

fCK18のN末端側を切断した2種類のリコンビナントタンパク質を作製した。CK18の241R-397D、261R-397Dを遺伝子合成した。制限酵素 (Nde I、EcoR I) (Takara) で処理し、発現ベクター-pBLC (Inhouse) に組み込んだ。得られたベクター-pBLC (241R-397D) と pBLC (261R-

397D) を JM109 に形質転換し、組換え体を作製した。

組換え体は、アンピシリンを含む LB 培地を用い、37°C で培養した。600nm の OD が 0.6 に到達したときに、IPTG を終濃度 500  $\mu$ M になるように添加し、さらに 12 時間培養した。その後、10,000xg 15 min 遠心分離し、沈殿を-80°C で保管した。

大腸菌を Lysis Buffer (5 mM Tris-HCl, pH 8.0, inhibitor cocktail, 0.2 mg/mL lysozyme) に懸濁し、超音波破碎後、10,000xg 15 min で遠心分離して可溶性画分を抽出した。

fCK18 (241R-397D) と rfCK18 (261R-397D) の発現量は、SDS-PAGE とウエスタンブロットティング (WB) で確認した。

その後、K18-624 抗体結合カラム (HiTrap NHS-activated HP column) を作製し、アフィニティーカラムクロマトグラフィー法により精製を行った。結合 Buffer は PBS (pH 7.4)、溶出 Buffer は 0.1 M Glycine-HCl (pH 2.8) を用いた。最後に、PD-10 (Cytiva) で TBS (pH 7.5) に置換し、精製品 rfCK18 とした。fCK18 (261R-397D) の純度は、SDS-PAGE 後、オリオール染色 (Bio-Rad) で確認した。

#### 4.2.3 ウエスタンブロットティング、免疫沈降

WB は、20 ng の rCK18 または rfCK18 を 4-20% のグラジエントゲルにアプライし、SDS-PAGE 後、PVDF 膜に転写し、PVDF Blocking Reagent (TOYOBO) で室温、2 時間ブロッキングを行った。TBS-T で膜を 3 回洗浄し、2  $\mu$ g/mL の K18-624 抗体または K18-328 抗体を室温 1 時間反応させた。さらに、HRP 標識したヤギ抗マウス IgG ポリクローナル抗体 (MBL) を TBS-T で 10,000 倍希釈し、室温で 1 時間反応させた。基質溶液 (HRP substrate reagents : nakarai) を加え、Amersham™ Imager 600 (Cytiva) で検出した。

免疫沈降 (IP) の抗体結合磁性粒子は、K18-624 抗体または M30 抗体 (VLVbio) を磁性粒子 Magosphere MS300/Carboxyl (JSR) に結合させたものを用いた。検出抗体は、K18-328 抗体を Fab' 化させたものにアルカリフォスファターゼ (ALP) を 1:1 で結合させたものを使用した。免疫沈降-ウエスタンブロットティング (IP-WB) は、rfCK18 または血清サンプルと抗体結合磁性粒子を室温で 1 時間反応させた。洗浄した後、反応液を 4-20% Ready GEL (Bio-Rad) にアプライし、SDS-PAGE 後 PVDF 膜に転写し、PVDF Blocking Reagent (TOYOBO) で室温 2 時間ブロッキングを行った。TBS-T で 3 回洗浄し、0.1  $\mu$ g/mL の検出抗体と反応させた。TBS-T で 3 回洗浄後、基質 (colorimetric alkaline phosphatase substrate reagents : Roche) を加え、Amersham™ Imager 600 (Cytiva) で検出した。

#### 4.2.4 エピトープ解析

K18-328 抗体について、合成ペプチドを用いたエピトープマッピング解析を行った。25 種の合成ペプチド (ペプチド鎖長 : 16AA) は、fCK18 の 158 アミノ酸残基に基づいて設計した。設計したペプチドに対する反応性は ELISA で解析した。ストレプトアビジンが固相化されたプレートに、PBS-T で 1  $\mu$ g/mL に希釈した 100  $\mu$ L のビオチン化ペプチドを室温で 1 時間静置して固相化させた。PBS-T で 3 回洗浄

し、Buffer I (Inhouse) を 200  $\mu$ L 加え、4 $^{\circ}$ C O/N ブロッキングした。PBS-T で 3 回洗浄した後、2  $\mu$ g/mL に調製した K18-328 抗体を 50  $\mu$ L 添加し、室温で 1 時間振とうした。PBS-T で 3 回洗浄し、5000 倍希釈した 50  $\mu$ L の HRP 標識 Anti-Mouse IgG (Jackson Immuno Research) を加え、室温で 1 時間振とうした。PBS-T で 3 回洗浄後、TMB Mix (Thermo) を 100  $\mu$ L 加えて 10 分間反応させたのち、2 N  $H_2SO_4$  を 100  $\mu$ L 加えて反応を停止させた。反応液の 450nm 吸光度をプレートリーダーで測定した。

#### 4.2.5 高感度測定系の確立

IP-WB で用いた抗体結合磁性粒子と検出抗体、キャリアプレートは rfCK18 を HISCL-5000 CLEIA system (Sysmex) に適応させ、ヒト血清サンプルを測定した。性能評価として、再現性試験、検出限界 (LoD)、定量下限 (LoQ) を求めた。再現性試験は、ヒト血清を含む Low (0.7 ng/mL)、Middle (4.0 ng/mL)、High (27.6 ng/mL) の 3 ポイントをそれぞれ 10 回測定し、変動係数 (CV) (%) を算出した。LoD は、Blank の平均値 + 3 SD と任意のサンプルの平均値 - 3 SD が重ならない最も低い濃度と定義した。LoQ は、任意のサンプルの CV が 5% 以下となる最も低い濃度と定義した。

#### 4.2.6 血清サンプル

健常者 100 例と NASH 患者 11 例は、Discovery Life Sciences (CA, USA) からインフォームドコンセントを得たものを購入した。

#### 4.2.7 統計解析

2 群間の比較は、Manny-Whitney U test 検定を使用した。統計解析は、Prism (GraphPad Software, Inc. La Jolla, CA) を用いた。P<0.05 で有意差ありとした。

### 4.3 結果

#### 4.3.1 抗体の反応性

CK18 または fCK18 に対する 2 種抗体 (K18-328 抗体、K18-624 抗体) の反応性を確認するため、リコンビナントタンパク質を用いて、WB を行った。K18-328 抗体は、CK18 と fCK18 の両方と反応性を示したのに対し、K18-624 は、fCK18 のみ反応性が認められた (Fig.4-1A)。大腸菌で作製した rfCK18 を用い、IP-WB にて、市販抗体 (M30 抗体) と K18-624 抗体の fCK18 への親和性を比較した。M30 抗体は 16 ng の rfCK18 をわずかに検出したが、K18-624 はその 1/10 量である 1.6 ng を十分に捕捉し、更に 0.2 ng まで検出された (Fig.4-1B)。さらに、高い親和性を示した K18-624 抗体は、健常者血清、NASH 患者血清中の fCK18 を捉えることができ、その分子サイズは健常者、NASH 患者ともに約 24 kDa であった (Fig.4-1C)。以上より、K18-624 抗体は、fCK18 へ特異的な反応性を示し、かつ高いアフィニティーを認めたことから、固相抗体として用いることにした。

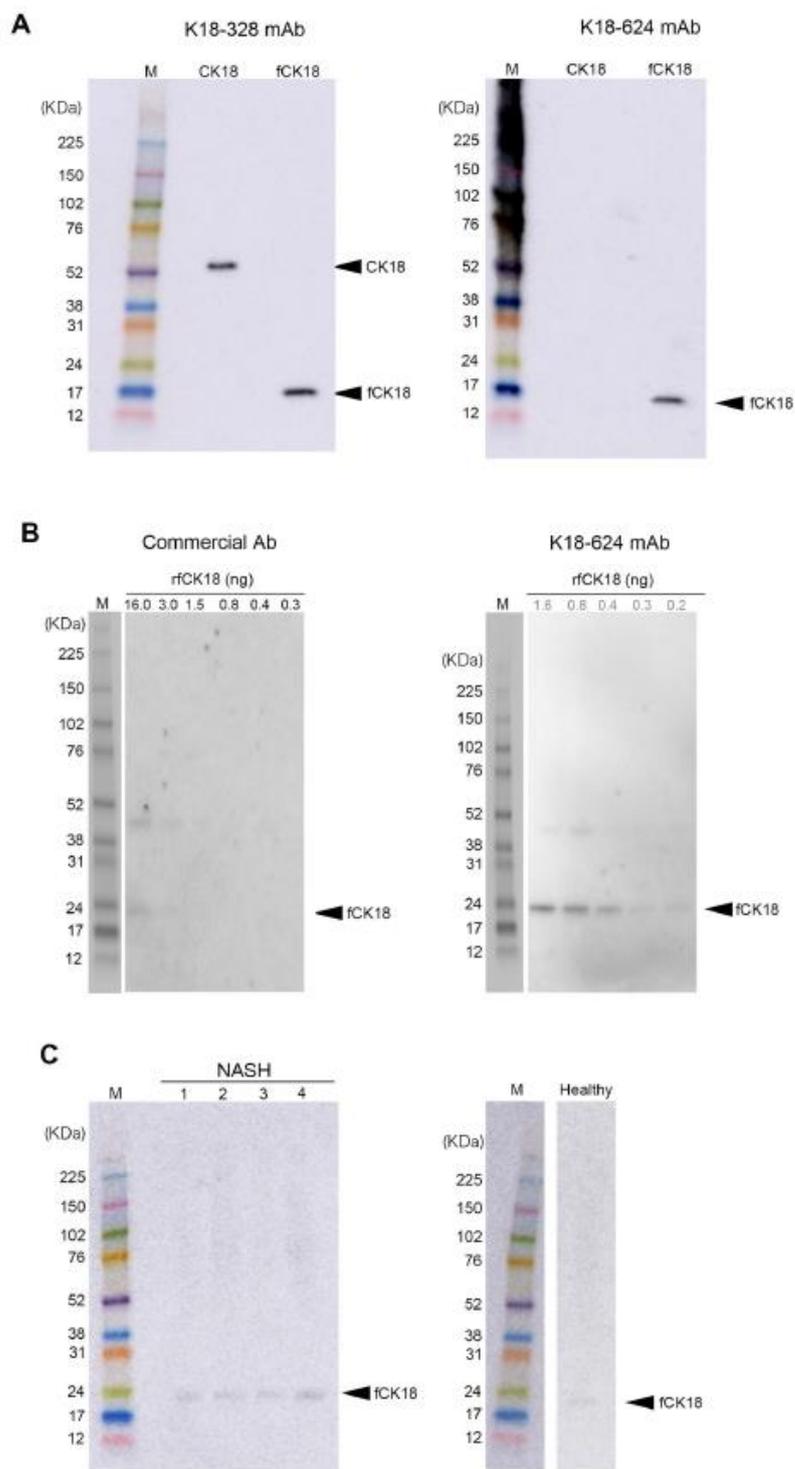


Fig.4-1 K18-624 抗体および K18-328 抗体の反応性

A : WB における rCK18 または rfCK18 に対する K18-624 抗体、K18-328 抗体の反応性

B : 市販抗体と K18-624 抗体の反応性の比較

C : NASH 患者血清および健常者血清の IP-WB

### 4.3.2 エピトープ解析

K18-328 抗体の認識エピトープを明らかにするために、合成ペプチドを用いたエピトープマッピング解析を行った。ELISA 法により、合成ペプチドとの反応性を確認したところ、323-340 の合成ペプチドのみとの反応を認めた (Fig.4-2)。

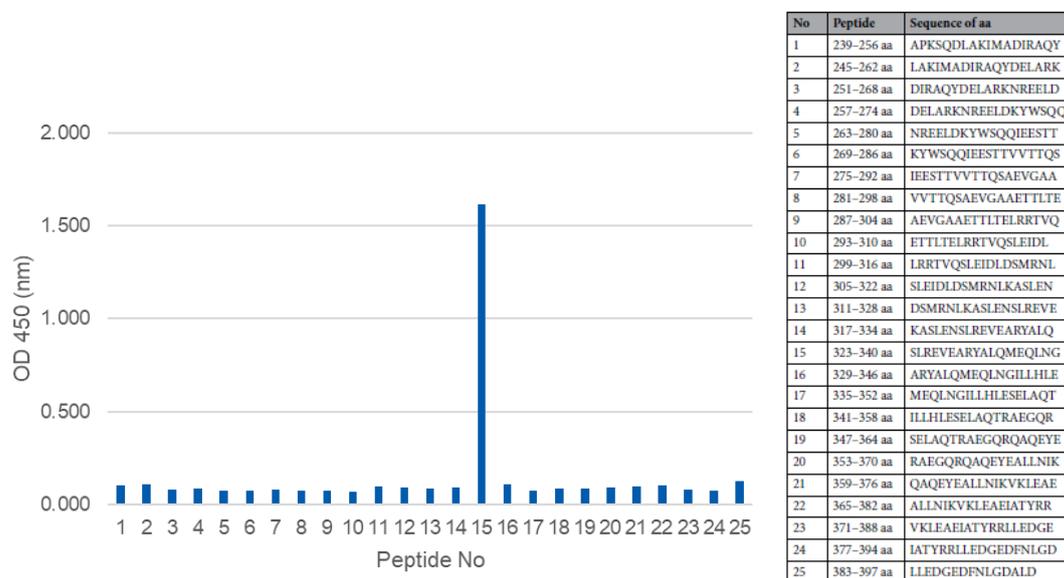


Fig.4-2 K18-328 抗体のエピトープマッピング

### 4.3.3 リコンビナント fCK18 の作製

rfCK18 (239-397 アミノ酸 (aa)) を大腸菌で発現させると封入体として発現したため、N 末端側のアラニンとプロリンを除いた 241-397aa と、更に疎水領域を除いた 261-397aa を発現させた。rfCK18 (241-397aa) の一部は可溶性画分に発現したが、大部分は封入体であった。rfCK18 (261-397aa) は rfCK18 (241-397aa) と比較し、可溶性分画への発現割合が高かった。したがって、こちらをスタンダードとして採用した (Fig.4-3 A)。

rfCK18 (261-397aa) の可溶性画分を、K18-624 抗体結合カラムを用いて、アフィニティーカラムクロマトグラフィー精製した結果、高純度の rfCK18 が得られた (Fig.4-3 B)。

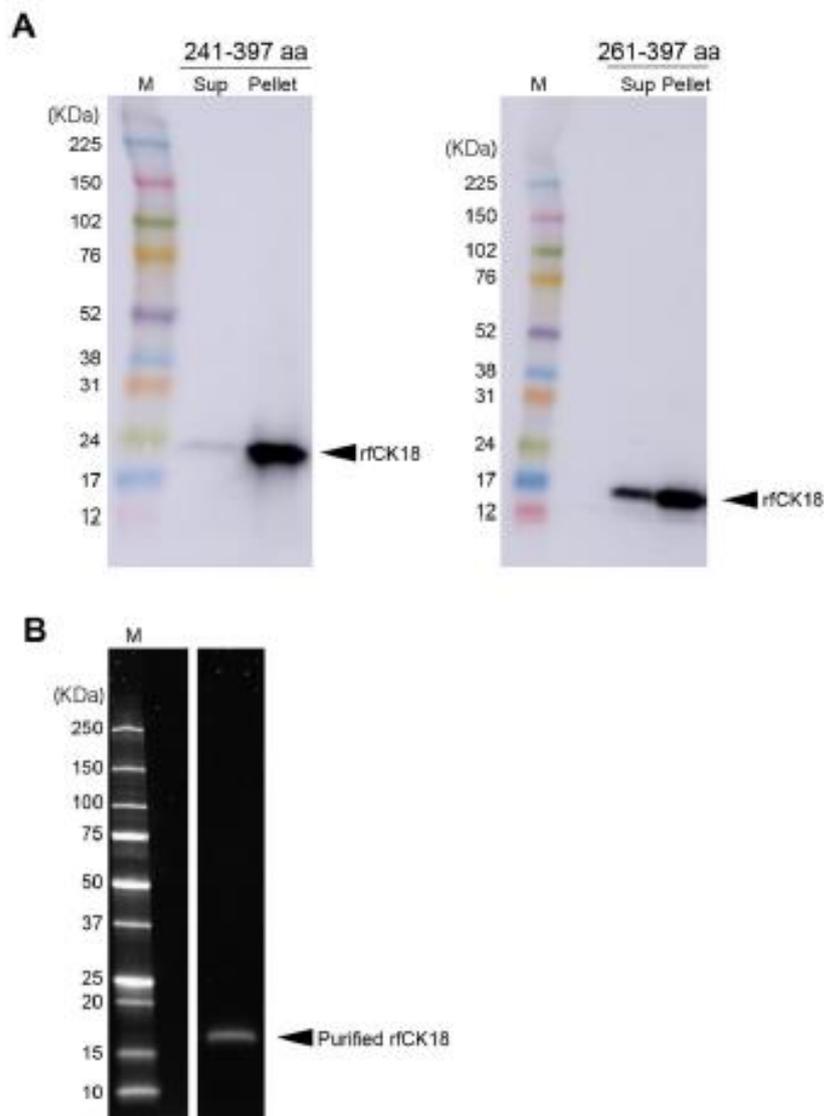


Fig.4-3 キャリブレーター作製の作製

A : WBによるrfCK18 (241-397aa) とrfCK18 (261-397aa) の発現確認

B : アフィニティー精製したrfCK18 (261-397aa) のSDS-PAGE

#### 4.3.4 高感度化学発光酵素免疫測定法 (CLEIA) の確立

K18-624 抗体結合磁性粒子と ALP 標識 K18-328 抗体 (Fab') を用いて高感度 CLEIA を構築し、全自動免疫測定装置 HISCL-5000 に適用させた。

rfCK18 (261-397aa) をキャリブレーターとして用い、検量線範囲を 0.465-46.5 ng/mL と設定した (Fig.4-4) 。

また、試薬性能評価は、日差再現性は n=5 で測定した結果 CV5%以下 (Low : 1.7%、Middle : 3.4%、High : 4.2%) であった。LoQ と LoD はどちらも 0.056 ng/mL であった。また、全

長の CK18 と反応しないことも確認した。

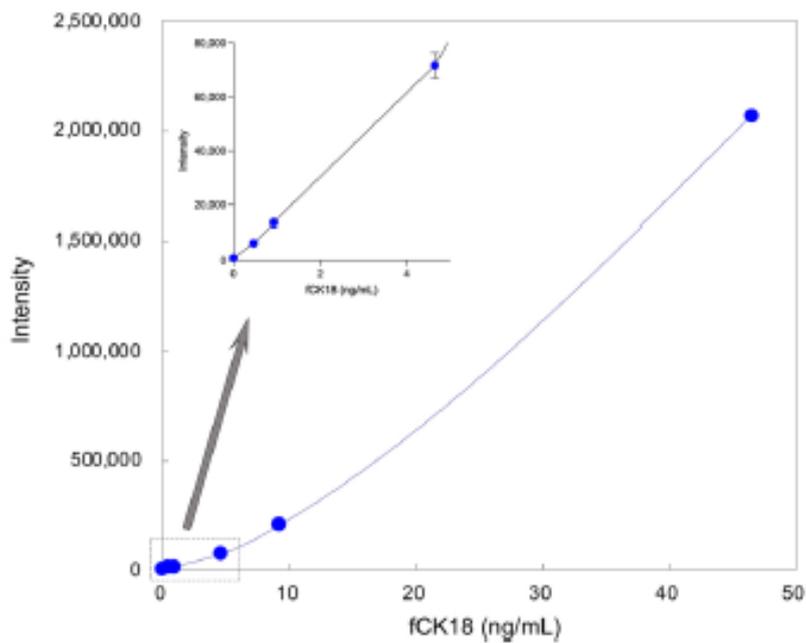


Fig.4-4 fCK18 高感度 CLEIA の検量線

#### 4.3.5 ヒト血清の fCK18 測定

高感度 CLEIA でヒト血清中の fCK18 を測定した結果、健常者は 0.085~2.501 ng/mL で、NASH 患者は 0.460~15.331 ng/mL であり、NASH 患者血清中の fCK18 値は、健常者よりも高値を示した ( $P < 0.0001$ ) (Fig.4- 5)。本結果より、全血清中の fCK18 レンジは、0.085~15.531 ng/mL であり、本測定系は、血清サンプルを測定するのに十分な感度と測定範囲を有することが示された。

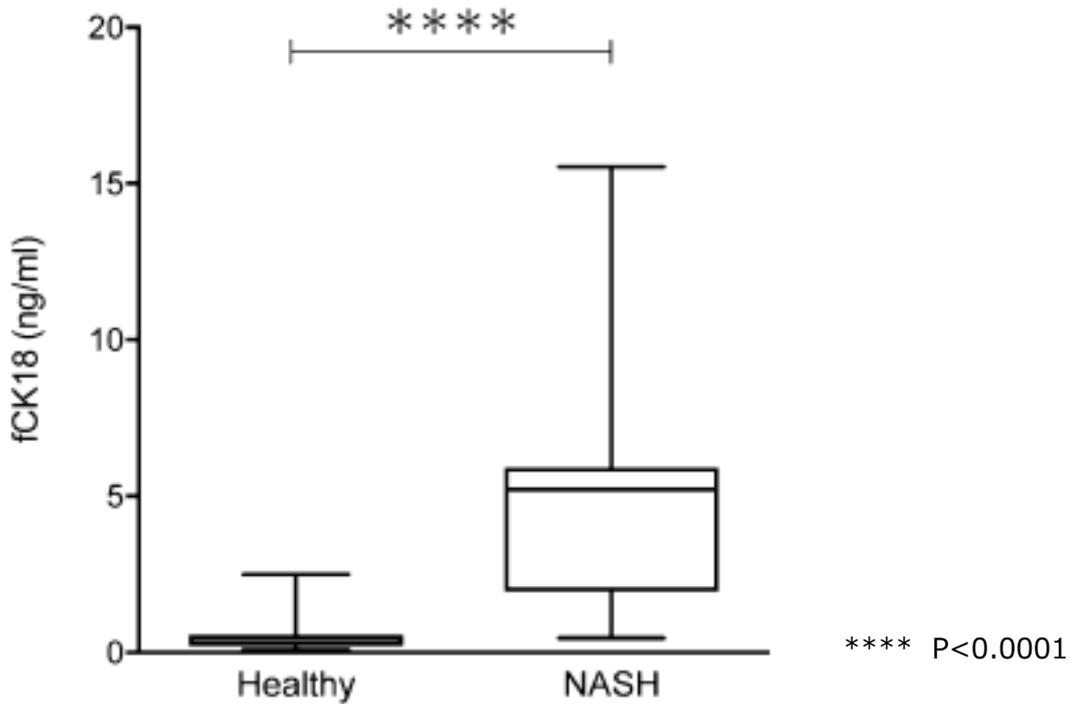


Fig.4- 5 健常者および NASH 患者血清の fCK18 測定結果

#### 4.4 考察

本研究では、新たに fCK18 に対するモノクローナル抗体を作製した。K18-624 抗体は、市販されている抗体よりも、fCK18 への親和性が高いことから、高感度 CLEIA 法を構築することができた。市販抗体は、抗原としてアポトーシス誘導した細胞から精製したものをを用いており、fCK18 の 387E-396D がエピトープである。一方 K18-624 抗体は、免疫原として合成ペプチドを用いており、381R-397D にエピトープがある。実際に、WB にて rfCK18 と反応することを確認し、IP-WB より健常者および NASH 患者血清中の fCK18 を認識することを確認した。市販抗体では、健常者および NASH 患者血清中の fCK18 を検出できず、過去に市販抗体以外の抗体を用いて検出したという報告事例もない。市販抗体と比較し、K18-624 抗体の親和性が高い理由として、免疫原に使用した立体構造の相違も考えられるが、純度の高い免疫原を用いたことにより抗原性が向上した可能性が考えられた。検出抗体に用いた K18-328 抗体は、CK18 の 323S-340G の中にエピトープがあり、全長とフラグメントの CK18 と反応する。市販の CK18f ELISA キットに使用される M5 抗体は、文献情報では 300L-380T にエピトープがあると記載があり、抗体が認識するエピトープは限定されていない。本研究では、エピトープが既知の K18-624 抗体と K18-328 抗体を用いて fCK18 の高感度測定系を構築した。rfCK18 は、CK18 の 239-397aa を大腸菌で発現させると封入体になるため、他の手段を検討した。N 末端側の疎水性アミノ酸であるアラニンとプロリンを除いて 241-397aa を発現させたが、依然として大

部分が封入体として発現した。そこで、N 末端側の疎水性領域を除いた 261-397aa で発現させた結果、可溶性画分に発現した。一方、可溶性の fCK18 を取得するために、239aa-397aa を哺乳細胞での発現を試みたが、SDS-PAGE で凝集体が認められた。この結果から、哺乳細胞の fCK18 は血清中ではキャリアタンパク質が存在し、それにより凝集していないことが予想される。今回使用した疎水性アミノ酸や疎水性領域を除いてリコンビナントタンパク質を発現させる戦略は他のタンパク質にも応用できる。

fCK18 の測定において、市販 Kit での LoQ は 0.04 U/mL であるのに対して、我々の測定系である高感度 CLEIA は 0.056 ng/mL (約 0.006 U/mL) であり、約 7 倍感度上昇を認めた。高感度化が実現できたのは、新規抗体 K18-624 の親和性が高いこと、HISCL システムで感度の高い発光基質を使用し、B/F 分離の精度が高いことが要因である<sup>62,63</sup>。それだけではなく、高感度 CLEIA は、同時再現性や日差再現性も既存キットより精度が高く、健常者血清、及び NASH 患者血清においても希釈なしに測定することが可能であった。過去に報告された健常者血清の中央値は 0.090-0.145 U/mL であったが<sup>58,63</sup>、本測定系では、さらに低い濃度まで測定できる。

Fig.4-5 の fCK18 測定結果より、過去に報告されている通り<sup>58,59</sup> NASH 患者で fCK18 が上昇することを確認した。より信頼度を高めるには今後症例数を増やし、臨床検体により有用性を判断する必要がある。既存キットでの CK18f 測定では、NASH のバイオマーカーとして有用性が報告<sup>64-66</sup>されてきたが、健常者と NAFL 患者間を分けられないこと、肝細胞のバルーンと相関しないため、臨床では採用されていないという問題があった<sup>16,60,67</sup>。これに対して、親和性の高い抗体を登用したことや、それによって低濃度検体の検出を可能とした高感度 CLEIA は、既存キットの課題を克服し、カットオフ値の設定が実現化する。

#### 4.5 結論

新規 K18-624 抗体と K18-328 抗体を作製し、これらの抗体を用いて高感度 CLEIA を確立した。本測定系は、既存の測定キットの課題を克服し、全ての健常者の fCK18 を検出可能とする感度を有することにより、カットオフ値の設定を実現化する。よって、この高感度 CLEIA は、NASH 診断に有用と思われる。

## 第 5 章 フラグメント化サイトケラチン 18 の臨床有用性

### 5.1 緒言

非アルコール性脂肪性肝疾患（NAFLD）は、現在、世界中で最も一般的な慢性肝疾患で、大人も子供も罹る疾患である<sup>68,69</sup>。NAFLD は肥満と密接に関連しており、脂肪肝、NASH、肝硬変など、肝臓での脂肪の過剰蓄積に関連するさまざまな病態のことを言う。NASH は、患者の約 5%～25% が門脈圧亢進症、肝不全、肝細胞癌（HCC）などの合併症を伴う肝線維症および肝硬変に進行する<sup>70</sup>。NASH 患者の中には、肝硬変にならずに肝細胞癌を発症する患者がいる。これは、B 型肝炎ウイルス（HBV）または C 型肝炎ウイルスに感染した患者とは異なる点である。

肝生検は、脂肪肝と NASH を鑑別し、疾患のステージや治療効果をモニタリングできる唯一の信頼できる方法で、NAFLD 診断のゴールドスタンダードとなっている<sup>71</sup>。しかし肝生検は、重大な合併症を引き起こす可能性のある侵襲的な方法で、サンプリングエラーも問題となっている<sup>72,73</sup>。したがって、NAFLD の診断における非侵襲的な方法が求められている。また、NASH と肝線維症の診断において、フィブロスキャン検査や磁気共鳴エラストグラフィなどのイメージング技術は、線維症の診断に有用であるが、脂肪性肝炎の診断には不十分である<sup>74,75</sup>。

アポトーシスによる肝細胞死は、脂肪肝から NASH、結果としての線維症に進行にする重要なイベントである<sup>76</sup>。アポトーシスの過程で、活性化された caspase が上皮細胞の中間径フィラメント成分である cytokeratin 18（CK18）を含む多くの細胞質タンパク質を切断する<sup>50,77</sup>。報告によると、CK18 は caspase-6 で切断されると、26kD の N 末端フラグメントと 22kD の C 末端フラグメントになる。次に、C 末端側の 22kD のフラグメントが caspase-3 または caspase-7 によって切断され、19kD のフラグメントになる<sup>50</sup>。

*In vitro* では、アポトーシスを受けた細胞が CK18 を細胞外に放出し、血液を循環することが示されている<sup>51</sup>。実際、カスパーゼで切断された CK18 フラグメントは、NAFLD の進行、特に NAFL から NASH への移行を診断する非侵襲的なバイオマーカーとして有用性が報告されている。しかし、既存の ELISA キットは、臨床で NASH 診断には採用されていない。その理由は、健常者と NAFL 患者間を分けられないこと、肝細胞のバルーニングと相関しないため、NASH の診断が難しいことである<sup>60,63,78,79</sup>。

本研究では第 4 章で、CK18 または fCK18 に対する新規モノクローナル抗体を使用した fCK18 高感度 CLEIA を開発した<sup>80</sup>。そこで、第 5 章では、高感度 CLEIA を使用し、NASH 診断における fCK18 測定の有用性評価および生活介入指導による治療効果を検証することを目的とした。

### 5.2 方法

#### 5.2.1 ヒト血清サンプル

派生コホート研究用に、肝生検にて NAFLD と診断された 54 人の患者のサンプルが集められ、2 人の病理医（Y.H.と A.H.）が病理診断を行った。バリデーションコホート研究では、東京大学より 67 人の NAFLD と診断された診断患者の血清が集められた。肝生検は臨床診断基準によって実施された。NAFLD の診断は、肝細胞の 5%以上に脂肪肝が存在するもの、アルコールの摂取量が 1 日に男性 30 g 未満、女性 20 g 未満と定義した。糖尿病、高血圧、高脂血症の有無について医師が診断を行

った。

### 5.2.2 肝生検

NAFLD の組織学的診断は、Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research Network Scoring System<sup>81</sup>に基づいて、疾患の重症度段階を評価した。NAFLD Activity Score (NAS) は、脂肪肝、肝障害、および炎症活動の程度を 8 段階 (脂肪肝:0~3、小葉の炎症:0~3、肝細胞のバルーニング変性:0~2) で評価し、合計スコアで算出した。NAS 2 以下は NAFL、NAS 3、4、は borderline NASH、NAS 5~8 は NASH とした<sup>81,82</sup>。さらに、NAFLD は、Matteoni 分類<sup>17</sup> および Brunt's grade/stage に従って定義した<sup>83</sup>。Matteoni 3~4 に分類したケースは、NASH とした。

### 5.2.3 血清サンプルの測定

血液サンプルは、肝生検の 24 時間以内に採取し、ALT、AST、 $\gamma$ -TG、T-bil、Na、BUN、Cr を測定した。血清サンプルは、肝生検から 14 日以内に採取され、fCK18 CLEIA system (HISCL-5000, sysmex)<sup>80</sup>での測定まで-80℃保存した。生活習慣指導を受けた 25 サンプルに関しては、治療期間中に 2 回測定を行った。線維化の指標は、(Fibrosis-4) FIB-4 Index に従って算出した。

### 5.2.4 統計分析

すべてのデータは、平均値±SEM もしくは、連続因子の 25、75 パーセンタイルで示した。2 つのグループ間のデータは、Mann-Whitney U test を、3 つのグループ間のデータは、Kruskal-Wallis Test または chi-square test、fCK18 と臨床パラメーターは Spearman rank-sum test を行った。多変量回帰分析においては、fCK18 と病理学的パラメーターの関係を算出した。多変量線形分析で計算された独立変数は、バルーニング、脂肪肝、小葉の炎症、線維症を用いた。各連続変数について、感度と特異度の合計を最大化する最適なカットオフ値を設定し、ROC 曲線分析を行った。統計分析は、Prism (GraphPad Software Inc., USA) と SPSS Statistics 27.0 (IBM Armonk, USA) を使用し、 $p < 0.05$  で有意差ありとした。

## 5.3 結果

### 5.3.1 患者データ

患者データを Table 5-1 に、肝生検の組織学的診断結果を Table 5-2 に示す。患者の 44.4% が男性で、年齢の中央値 62.5 歳、BMI 中央値 26.1 kg/m<sup>2</sup>であり、NAFL、borderline NASH、NASH の 3 つのグループ間で統計学的な有意差はなかった。糖尿病、脂質異常症、高血圧症の有病率に関する有意差は認められなかった。一方で、ALT および AST は、3 つのグループ間で有意差が認められた (AST 中央値 : NAFL 28.0 U/L, Borderline NASH 41.0 U/L NASH 67.0 U/L、 $p = 0.00257$ 、ALT 中央値 : NAFL 24.0 U/L, Borderline NASH 45.0 U/L NASH: 72.5 U/L、 $p = 0.0087$ )。FIB-4 Index に関しては、NAFL から borderline NASH、NASH へと進

行するにつれて、増加傾向を示した（中央値 NAFL 1.53、Borderline NASH 1.92、NASH 2.75）が、有意差は認められなかった。ALB、T-bil、 $\gamma$ -GT、Na、BUN、Cr は、3つのグループ間で有意差を示さなかった。

Parameter	All (n = 54)	NAFL (n = 5)	Borderline NASH (n = 19)	NASH (n = 30)	p value <sup>a</sup>
Age (years)	62.5 (55.3, 70.3)	68.0 (50.0, 75.0)	64.0 (56.0, 72.0)	61.5 (53.0, 70.0)	0.7639
Sex (M/F)	24/30	1/4	7/12	16/14	0.2705
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	26.1 (24.2, 29.4)	26.1 (22.0, 26.9)	25.1 (23.2, 29.5)	26.1 (24.9, 31.0)	0.3018
AST (U/L)	52.5 (33.0, 79.0)	28.0 (22.0, 72.5)	41.0 (23.0, 66.0)	67.0 (48.0, 101.3)	0.0087
ALT (U/L)	54.5 (32.0, 91.0)	24.0(20.5, 89.5)	45.0 (18.0, 69.0)	72.5 (47.8, 118.0)	0.0257
ALB (g/dl)	4.35 (4.10, 4.60)	4.40 (4.20, 4.40)	4.30 (4.10, 4.60)	4.35 (4.00, 4.60)	0.9276
T-bil (mg/dl)	0.70 (0.58, 1.00)	0.60 (0.50, 0.85)	0.80 (0.60, 1.30)	0.70 (0.50, 1.00)	0.3009
$\gamma$ -GT (U/L)	55.0 (27.0, 89.5)	160.0 (38.0, 206.0)	39.0 (27.0, 87.0)	55.5 (38.0, 86.8)	0.2783
FIB-4 index	2.47 (1.52, 3.58)	1.53 (1.24, 2.19)	1.92 (1.50, 3.23)	2.75 (1.65, 5.14)	0.1002
Na (mEq/L)	141.0 (140.0, 142.0)	142.0 (140.0, 143.0)	141.0 (140.0, 142.0)	141.0 (140.0, 142.8)	0.8268
BUN (mg/dl)	13.4 (10.9, 16.1)	16.2 (12.5, 17.8)	13.8 (10.0, 15.7)	12.8 (10.9, 16.0)	0.4130
Cr (mg/dl)	0.65 (0.58, 0.80)	0.72 (0.54, 0.96)	0.63 (0.56, 0.81)	0.65 (0.59, 0.81)	0.9369
Diabetes (no/yes)	33/20	3/2	13/6	17/12	0.7861
Dyslipidemia (no/yes)	36/17	3/2	11/8	22/7	0.3945
Hypertension (no/yes)	25/28	2/3	9/10	14/15	0.9429

Table 5-1 派生コホートの NAFLD 患者情報

Factor	Number (%)	
<b>Steatosis</b>		
0 (<5%)	3 (5.6)	
1 (5-33%)	14 (25.9)	
2 (>33-66%)	26 (48.1)	
3 (>66%)	11 (20.4)	
<b>Lobular Inflammation</b>		
0-1(<2 foci/20× field)	28 (51.8)	
2 (2-4foci/20× field)	23 (42.6)	
3 (>4 foci/20× field)	3 (5.6)	
<b>Ballooning</b>		
0 (None)	11 (20.4)	
1 (Few)	25 (46.3)	
2 (Many)	18 (33.3)	
<b>NAS</b>		
0	1 (1.9)	
1	2 (3.7)	NAFL
2	2 (3.7)	
3	9 (16.6)	
4	10 (18.5)	Borderline NASH
5	15 (27.8)	
6	12 (22.2)	
7	1 (1.9)	NASH
8	2 (3.7)	
<b>Fibrosis</b>		
	Number (%)	
1	20 (37.0)	
2	18 (33.3)	
3	15 (27.8)	
4	1 (1.9)	

Table 5-2 派生コホートの組織学的診断

### 5.3.2 血清中の fCK18 値と肝機能マーカー

CLEIA で測定した血清中の fCK18 と肝機能マーカーの値の相関を検討した。血清中の fCK18 値は、肝障害マーカーである ALT ( $r = 0.722$ ,  $p < 0.0001$ )、AST ( $r = 0.737$ ,  $p < 0.0001$ )、 $\gamma$ -GT ( $r = 0.518$ ,  $p < 0.0001$ )、それぞれと相関が認められた (Fig.5-1 A-C)。FIB-4 Index とは弱い相関を示した ( $r = 0.250$ ,  $p = 0.068$ )。一方、年齢 ( $r = -0.233$ ,  $p = 0.089$ )、BMI ( $r = 0.234$ ,  $p = 0.091$ )、ALB ( $r = 0.152$ ,  $p = 0.274$ )、T-bil ( $r = 0.240$ ,  $p = 0.081$ )、Na ( $r = -0.097$ ,  $p = 0.504$ )、BUN ( $r = -0.262$ ,  $p = 0.056$ )、Cr ( $r = -0.009$ ,  $p = 0.950$ ) とは相関が認められなかった。これらの結果から、血清中の fCK18 値が肝臓の障害を反映することが示唆された。

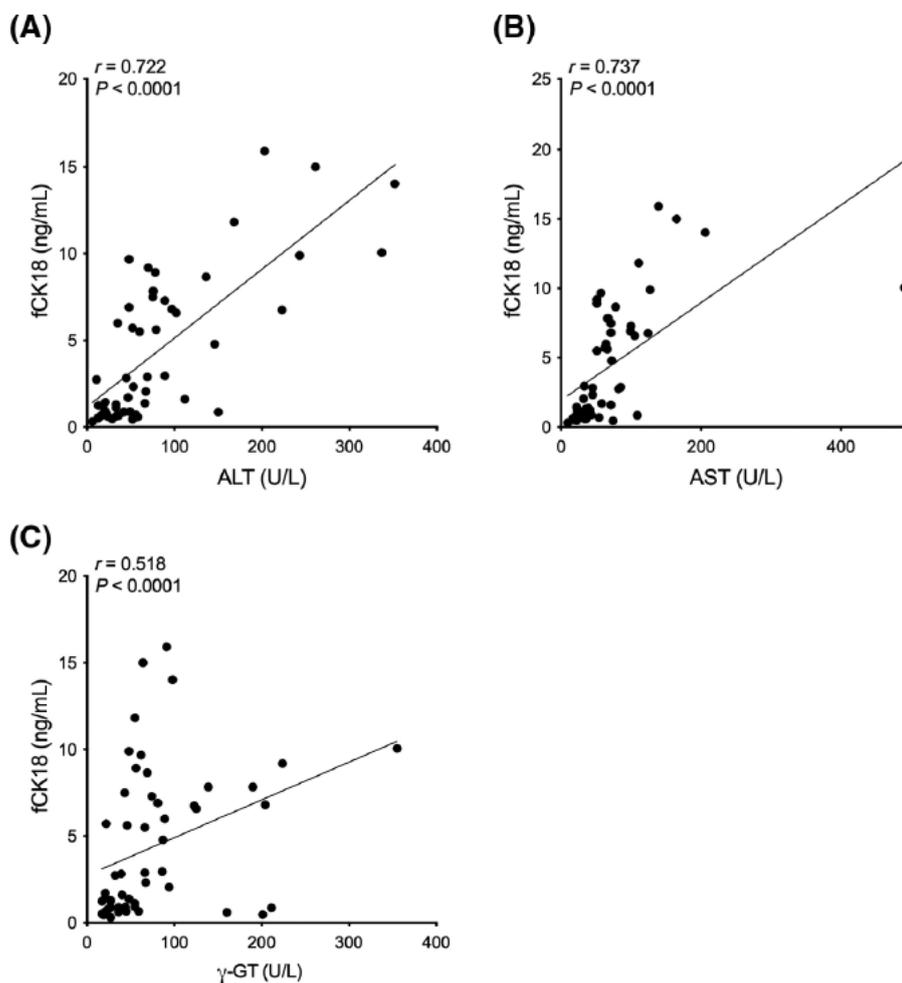


Fig.5-1 血清中の fCK18 値と肝機能マーカーの相関

### 5.3.3 NASと血清中のfCK18値

NASと血清中のfCK18値の関連性を検討した。NASの上昇に連れ、fCK18値の上昇が示された [NAFL (NAS 0-2) 中央値 0.864 ng/ml、Borderline NASH (NAS 3-4) 中央値 1.242 ng/ml、NASH (NAS 5-8) 中央値 6.290 ng/ml]。特に、NAFLまたはBorderline NASHに対し、NASHで有意な上昇が認められた (NAFL or borderline NASH vs. NASH  $p < 0.01$ ) (Fig.5-2 A)。

NASは、脂肪肝、風船様変性、小葉炎症で構成される。NASを構成するこの3要素についても解析した。脂肪肝 (Steatosis) のステージにおいて、脂肪肝なし (Stage 0) 中央値 0.596 ng/mlに対し、中程度の脂肪肝 (Stage 2) 中央値 5.857 ng/mlと重度の脂肪肝 (Stage 3) 中央値 2.876 ng/mlは有意に上昇した (Stage 0 vs. 2 or 3,  $p < 0.05$ )。また、脂肪肝なし (Stage 0)と比較して、軽度の脂肪肝 (Stage 1) 中央値 1.272 ng/mlでは、緩やかに上昇した (Fig.5-2 B)。

バルーニングスコアでの比較では、Stage 1 (中央値 2.950 ng/ml) よりも Stage 2 (中央値 6.663 ng/ml)の方が高値であった (Stage 0 vs. 1  $p < 0.01$ 、0 vs. 2  $p < 0.001$ ) (Fig.5-2 C)。

小葉炎症 (lobular inflammation) で比較したところ、小葉炎症のない患者 (Stage 0-1) 中央値 1.182 ng/mlに対し、軽度の小葉炎症 (Stage 2) 中央値 5.709 ng/mlもしくは中程度の小葉炎症 (Stage 3) 中央値 10.05 ng/mlの方が、fCK18は高値を示した (Fig.5-2 D)。以上の結果より、NAFLDの診断に最も使用されているNASの上昇に伴い、血清中のfCK18値も上昇した。

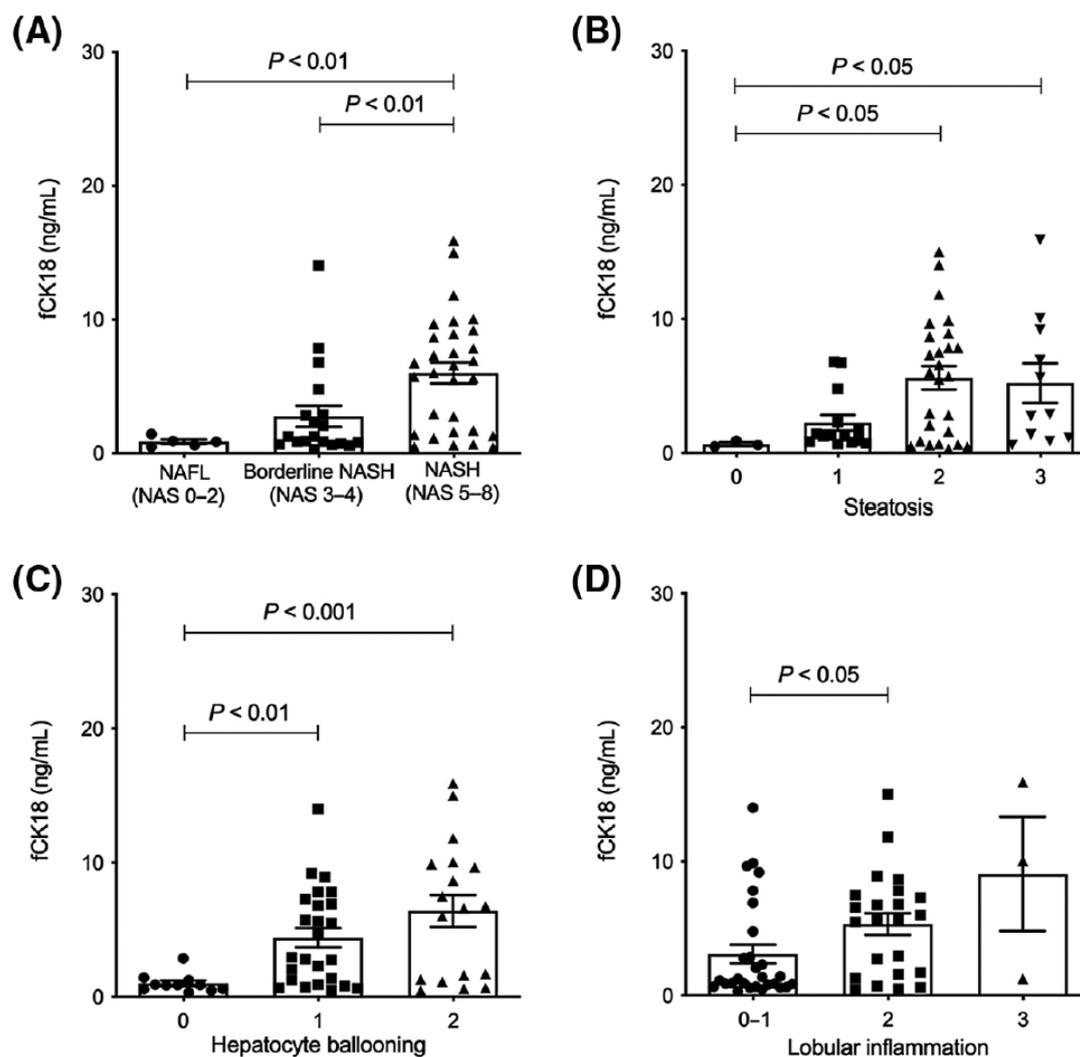


Fig.5-2 NASとfCK18値(平均値±標準誤差)

(A) NAS、(B) 脂肪肝、(C) 風船様変性、(D) 小葉炎症

### 5.3.4 NASH 診断スコアリングシステムと血清中の fCK18 値

NASH は脂肪肝、小葉炎症、風船様変性の 3 つの因子で構成されるが、肝線維症は含まれない。肝線維症を含む Brunt's grade/stage や Matteoni 分類のような他の NASH スコアリングシステムの関係性についても検討を行った。その結果 fCK18 値は、Brunt grade と関連した (なし (Grade 0) 中央値 0.869 ng/ml、軽度 (Grade 1) 中央値 2.818 ng/ml、中程度 (Grade 2) 中央値 5.857 ng/ml)、重度 (Grade 3) 中央値 12.98 ng/ml (Grade 0 vs. 1 and 1 vs. 3,  $p < 0.05$ 、0 vs. 2 or 3,  $p < 0.01$ ) (Fig.5-3 A)。中心静脈および門脈領域で認められる線維症を指標とした Brunt Stage においても、NAFLD 患者の fCK18 値の上昇が認められた

( Stage 1) 中央値 1.076 ng/ml、( Stage 2) 中央値 5.558 ng/ml、( Stage 3-4) 中央値 5.857 ng/ml、( Stage 1 vs. 2 or 3-4,  $p < 0.05$  ) ( Fig.5-3 B )。

Matteoni分類では、脂肪肝 (Type 1) 中央値 1.893 ng / ml と炎症を伴う脂肪肝 (Type 2) 中央値 0.866 ng / ml では違いが認められなかったが、肝細胞バルーンを伴う (Type 3) で中央値 2.567 ng/ml、肝線維化と浸潤性炎症細胞を伴う (Type 4) で中央値 6.663 ng / ml であり有意に上昇した (Type 2 vs. 3  $p < 0.01$ 、2 vs. 4  $p < 0.001$ ) ( Fig.5-3 C )。本結果より、CLEIAによるfCK18測定値は、肝細胞のバルーン化のステージを反映していることが示された。

一方、Brunt grade における門脈炎症では、fCK18 値は軽度の門脈炎症 (中央値 1.242 ng/ml) よりも中程度の門脈炎症の NAFLD 患者が高く (中央値 5.709 ng/ml) ( $p < 0.05$ ) ( Fig.5-3 D )、脂肪形成においても (中央値 5.709 ng/ml) 0%-30%の脂肪量 (中央値 1.243 ng/ml) よりも、40%-90%の脂肪量 (中央値 5.558 ng/ml) の方が高値であった ( $p < 0.05$ ) ( Fig.5-3 E )。

これらの結果より、fCK18 値は NAS 以外の NAFLD 診断におけるスコアリングシステムとも相関していることが示された。

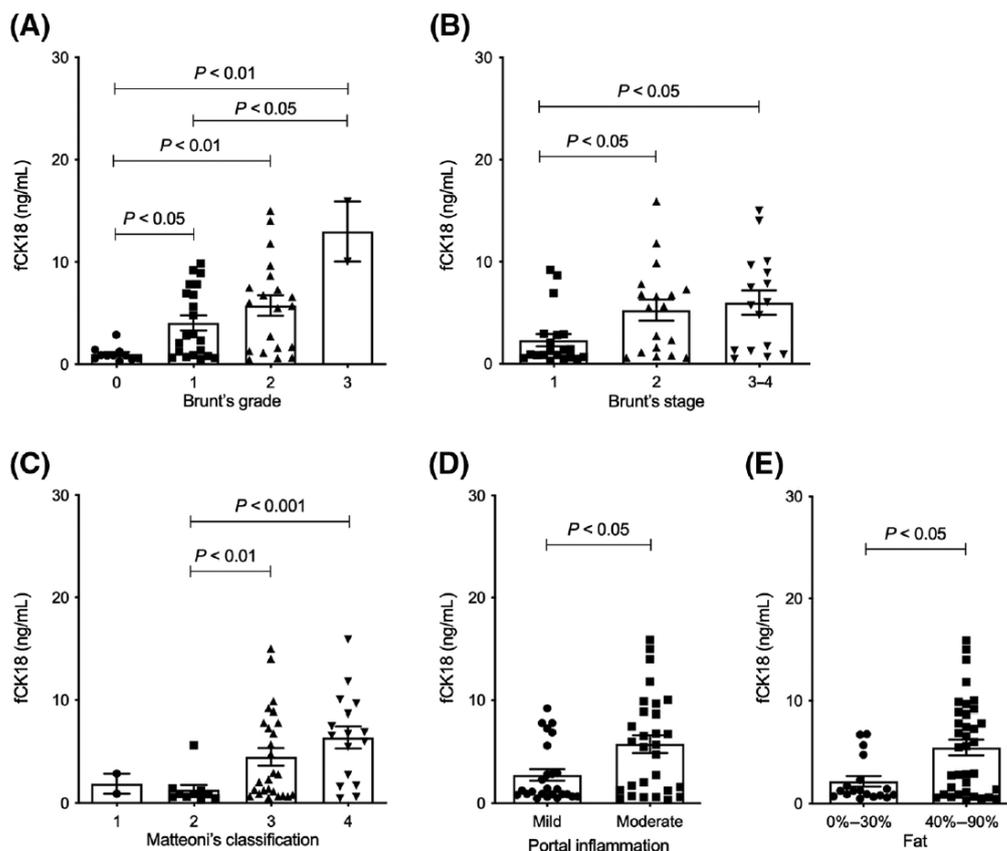


Fig.5-3 NASH 診断スコアリングシステムと fCK18 値 (平均値±標準誤差)

- (A) Brunt's grade、(B) Brunt's stage、(C) Matteoni's classification、  
(D) 門脈炎症、(E) 脂肪量

### 5.3.5 病理組織診断と血清中の fCK18 値との相関

病理組織診断パラメーターの中で、fCK18 と最も影響が大きい因子を解析した。独立変数として、バルーニング、脂肪肝、小葉炎症、線維症を用い、多変量回帰分析を行った。その結果、バルーニングが fCK18 値と相関する唯一のパラメーターであった (Standard  $\beta$  = 0.452、 $p < 0.001$ )。一方で、脂肪肝、小葉炎症、線維症などのほかの変数は fCK18 値と相関を示さなかった (Table 5-3)。本結果より、fCK18 値は、バルーニングと強く相関することが示された。

Table 5-3 病理組織診断のパラメーターと fCK18 値の多変量回帰分析

Independent variables	Standard $\beta$	p value <sup>a</sup>
Ballooning	0.452	<0.001
Steatosis	0.222	0.086
Lobular inflammation	0.222	0.131
Fibrosis	0.167	0.254

注) 多変量解析における決定係数 (R<sup>2</sup>) = 0.204、 $P < 0.001$

$P < 0.05$  を統計的に有意とする。

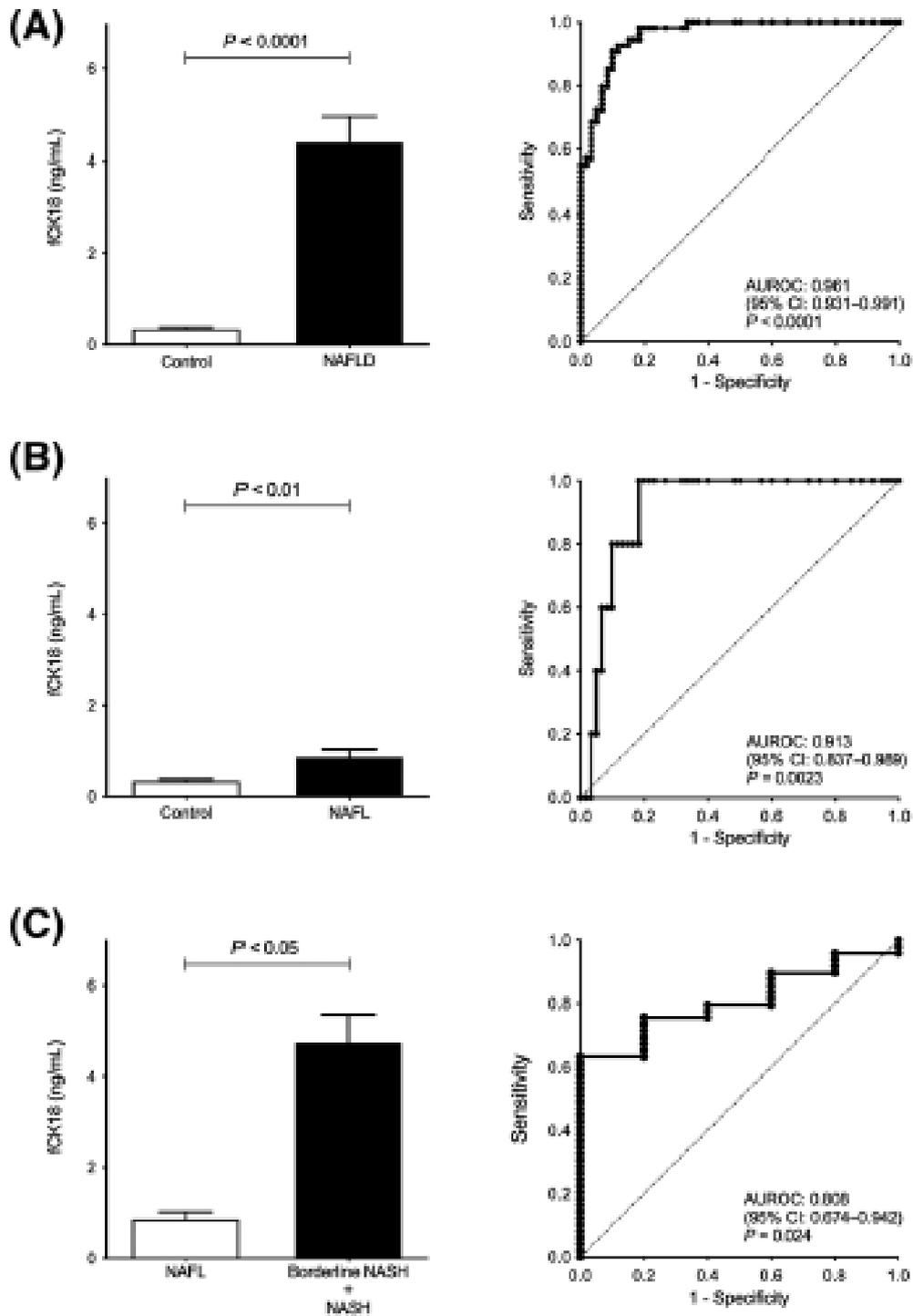
### 5.3.6 NAFL/NASH の診断

高感度 CLEIA で測定した血清中の fCK18 値が、NAFL 及び NASH の診断の可能性について、健常者、NAFLD (NAFL + NASH)、NAFL、NASH 間それぞれについて fCK18 値の比較と ROC 解析を行った。健常者と比較し、NAFLD 患者の fCK18 値は有意に高く (NAFLD 中央値 2.528 vs. Healthy 中央値 0.250 ng/ml、 $p < 0.0001$ ) (Fig.5-4 A)、ROC 解析における AUC は 0.961 であった (Fig.5-4 A、Table 5-4)。健常者と NAFL 患者 (NAFL 中央値 0.864 vs. healthy 中央値 0.250 ng/ml、 $p = 0.0023$ ) では、AUC は 0.913 であり、これらを識別できた (Fig.5-4 B、Table 5-4)。本結果から、カットオフ値は、0.46 ng/mL (健常者と NAFLD)、0.57 ng/mL (健常者と NAFL) と定めた。

NAFL と borderline NASH & NASH を比較すると、fCK18 値は有意に上昇し (NAFL 中央値 0.864 vs. borderline NASH & NASH 中央値 2.876 ng/mL、 $p = 0.022$ ) (Fig.5-4 C)、AUC は 0.808、カットオフ値は 1.0 ng/mL であった (Fig.5-4 C、Table 5-4)。NAFL と NASH の比較では、NAFL (NAS 0-2) に対し NASH (NAS 5-8) は、fCK18 値が有意に上昇し (NAFL & borderline NASH 中央値 0.910 ng/mL vs. NASH 中央値 6.290 ng/mL、 $p = 0.0008$ ) (Fig.5-4 D)、AUC は 0.763、カットオフ値は 5.2 ng/mL (Fig.5-4 D、Table 5-4) であった。

NASH と NAFL を分類できるもう 1 つのスコアリングシステムである Matteoni 分類では、NAFL に対し NASH で fCK18 値は高値を示し (NAFL type 1-2 vs. NASH type 3-4: 中央値 0.873 vs. 中央値 5.138 ng/ml、 $p = 0.0014$ ) (Fig.5-4 E)、AUC 0.796、カットオフ値 1.6 ng/mL であった (Fig.5-4 E、Table 5-4)。

これらの結果より、新規高感度 CLEIA は、健常者と NAFL 患者、健常者と NASH 患者、NAFL 患者と NASH 患者をそれぞれ鑑別できることが示された。



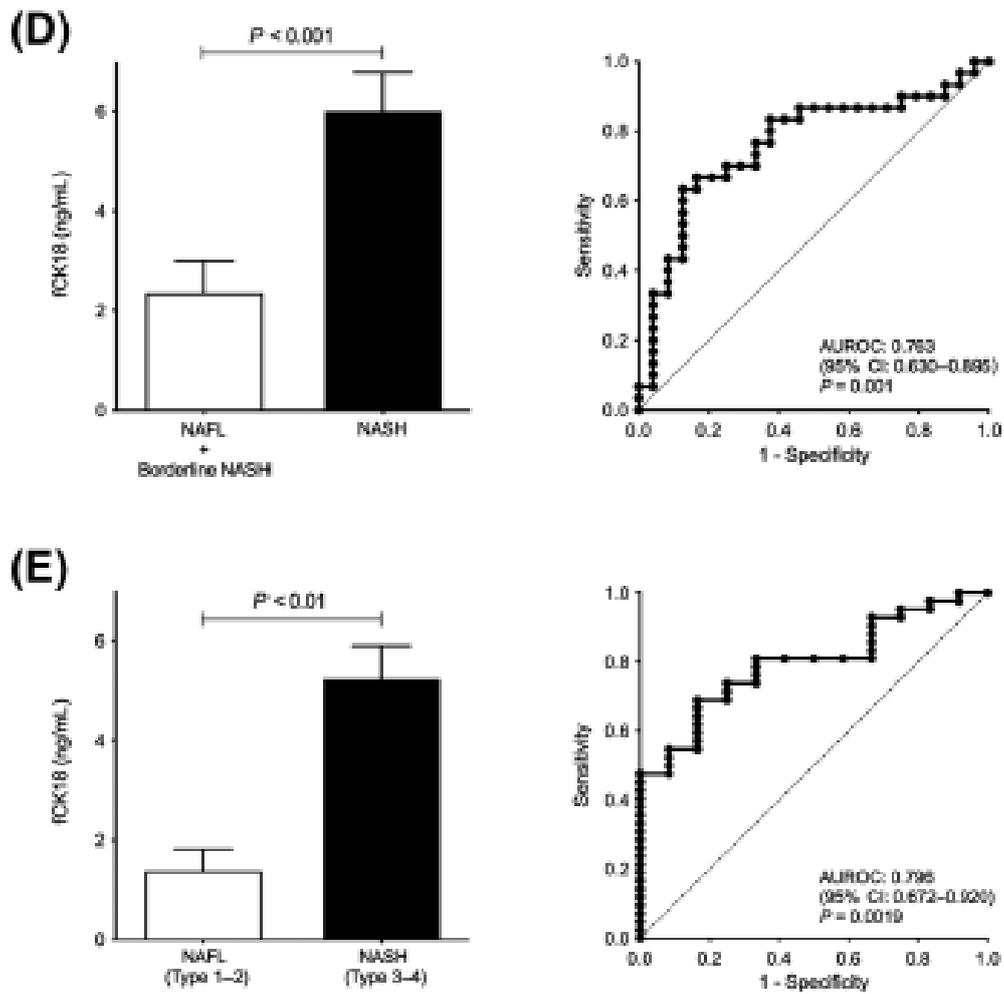


Fig.5-4 NAFL/NASH 診断（血清中の CK18 値の比較と AUROC 解析）

(A) 健常者 対 NAFLD 患者、(B) 健常者 対 NAFL 患者、(C) NAFL 対 Borderline NASH 患者と NASH 患者、(D) NAFL 患者と Borderline NASH 患者 対 NASH 患者、(E) NAFL 患者 対 NASH 患者、fCK18 値は平均値±標準誤差

Table 5-4 ROC 解析

Comparison	AUC	95% CI	Sensitivity	Specificity	Cutoff	p value <sup>a</sup>
Control						
vs. NAFLD	0.961	0.931–0.991	92.6%	88.3%	0.57 ng/mL	<0.0001
vs. NAFL	0.913	0.837–0.989	100%	81.7%	0.46 ng/mL	<0.0001
NAFL						
vs. Borderline NASH+NASH	0.808	0.674–0.992	75.5%	80.0%	1.0 ng/mL	0.024
NASH						
vs. NAFL + borderline NASH	0.763	0.630–0.895	63.3%	87.5%	5.2 ng/mL	0.001
NASH (type 3–4)						
vs. NAFL (type 1–2)	0.796	0.672–0.920	69.1%	83.3%	1.6 ng/mL	0.0019

注) Type1-2 : Matteoni' s 分類 type1-2、Type3-4 Matteoni' s 分類 type3-4

Area Under the curve (AUC)、Confidence interval (CI)、 $P < 0.05$  を統計的に有意とする。

### 5.3.7 バリデーショコホート

バリデーショコホートとして 67 人の患者に対し、血清中の fCK18 値と肝組織学検査との関連を検証した。コホートに用いた患者データを Table 5-5 に、組織学的診断結果を Table 5-6 に示した。

NAFLD 患者を NAS に従い、NAFL、Borderline NASH、NASH の 3 つのグループに分け、血清中の fCK18 値と患者データとの相関を求めた結果、派生コホートと同様に ALT、AST で相関が認められた (Table 5-5)。

fCK18 値と NAS の関係では、NAS の上昇につれて、fCK18 値が増加した (NAFL vs. borderline NASH、 $p < 0.05$ ) (NAFL or borderline NASH vs. NASH、 $p < 0.0001$  or  $p < 0.01$ ) (Fig.5- 5 A)。

また、NAS の構成要素である脂肪肝、バルーニング、小葉炎症について、それぞれ解析を行った。脂肪肝のステージについて、脂肪肝なし (Stage 0) と比較し、軽度 (Stage 1)、中等度 (Stage 2)、重度 (Stage 3) の脂肪肝で fCK18 値が上昇した (Fig.5- 5 B)。バルーニングスコアの比較では、Stage 0 に対し、Stage 1 ( $p < 0.001$ ) または Stage 2 ( $p < 0.01$ ) において fCK18 は高値を示した (Fig.5- 5 C)。小葉炎症においては、Stage 0-1 と比較し、Stage 2 で fCK18 値が有意に高かった ( $p < 0.001$ ) (Fig.5- 5 D)。

さらに、Brunt scoring system を基準とした線維症を伴う NAFLD 患者において、線維化が認められない患者よりも fCK18 値が有意に高いことが示された (Stage 0 vs 1 または 3-4、 $p < 0.05$ ) (Fig.5- 5 E)。

Matteoni 分類では、Type 上昇に伴い fCK18 値が上昇し、Type 2 と Type 4 との間で有意差が認められた ( $p < 0.01$ ) (Fig.5- 5 F)。

ROC 解析の結果、NAFL (NAS 0-2) に対する borderline NASH (NAS 3-4) + NASH (NAS 5-8) では、AUC 0.818 ( $p = 0.0023$ ) (Fig.5- 5 G) であった。NAFL+borderline NASH に対する NASH の比較では、AUC 0.769 ( $p = 0.0004$ ) (Fig.5- 5 G) であった。

Matteoni 分類の NAFL (Type 1-2) と NASH (Type 3-4) においては、AUC 0.787 ( $p = 0.0008$ ) (Fig.5- 5 G) であった。

これらのバリデーショコホートの結果は、派生コホートの結果を再現していた。このことは、CLEIA で測

定した血清中の fCK18 値が NASH 診断に有用であり、肝細胞バラーニングの有無、NASH 患者と NAFL 患者の識別も可能であることが示された。

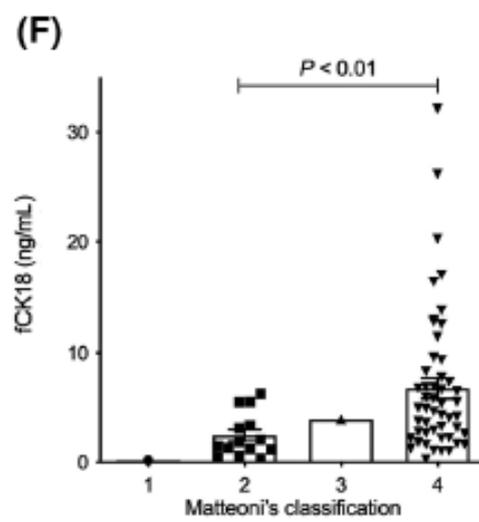
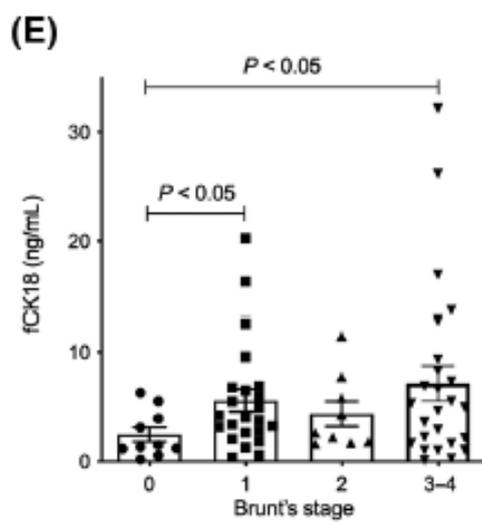
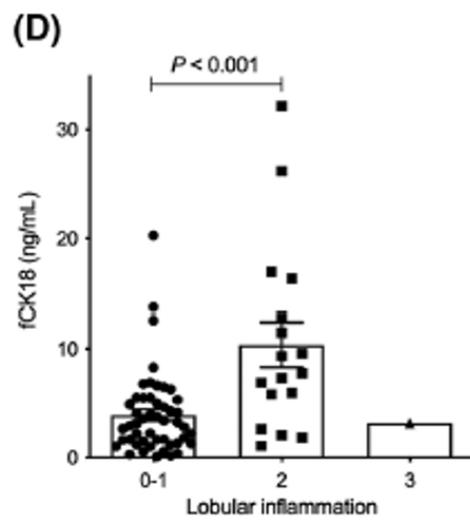
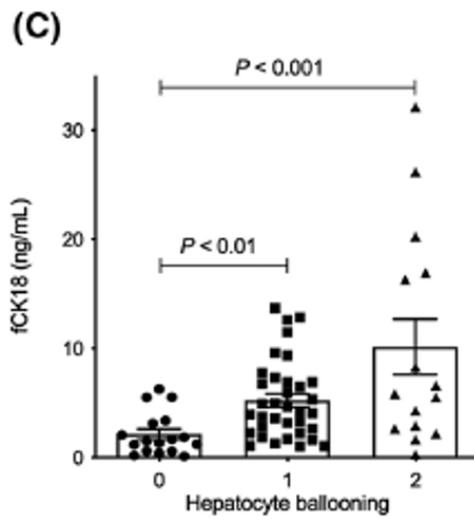
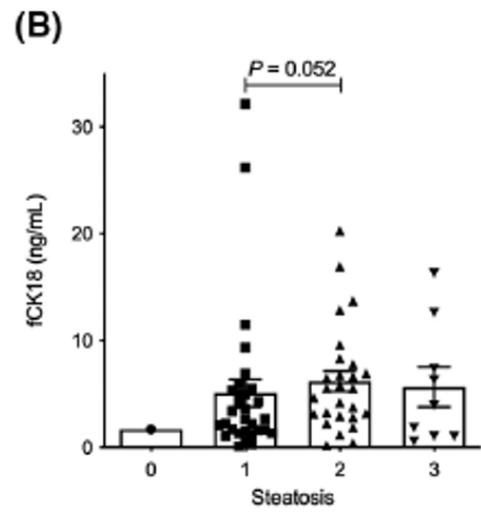
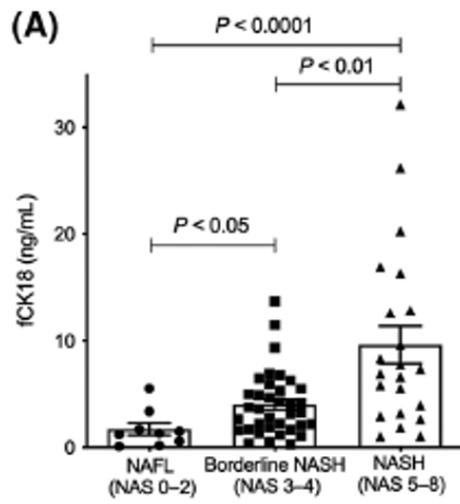
Table 5-5 バリデーションコホートの NAFLD 患者データ

Parameter	All (n = 67)	NAFL (n = 9)	Borderline NASH (n = 36)	NASH (n = 22)	p value <sup>a</sup>
Age (years)	53.8 (43.3, 65.0)	60.8 (31.5, 70.9)	54.2 (46.0, 63.2)	51.8 (40.5, 66.9)	0.9745
Sex (M/F)	36/31	6/3	18/18	12/10	0.6659
AST (U/L)	47.0 (30.0, 72.0)	25.0 (22.0, 32.5)	44.5 (29.3, 59.0)	64.5 (48.0, 109.3)	<0.0001
ALT (U/L)	69.0 (43.0, 103.0)	43.0(22.0, 65.0)	59.5 (39.5, 82.5)	104.0 (78.0, 158.3)	<0.0001
ALB (g/dl)	4.00 (3.70, 4.20)	4.10 (3.45, 4.45)	3.85 (3.60, 4.20)	4.00 (3.70, 4.13)	0.8818
T-bil (mg/dl)	0.80 (0.70, 1.10)	0.80 (0.70, 0.90)	0.80 (0.60, 1.18)	0.80 (0.70, 1.10)	0.9778
γ-GT (U/L)	82.0 (43.0, 131.0)	48.0 (31.5, 97.5)	63.5 (44.0, 100.0)	116.5 (78.8, 191.0)	0.0095 <sup>a</sup>
FIB-4 index	1.15 (0.82, 1.49)	0.85 (0.35, 1.51)	1.02 (0.83, 1.34)	1.37 (0.80, 2.00)	0.0772
Na (mEq/L)	142.0 (140.0, 143.0)	142.0 (140.0, 143.5)	141.5 (140.0, 142.0)	141.5 (140.0, 143.0)	0.6308
BUN (mg/dl)	12.6 (10.8, 15.1)	12.9 (11.3, 15.6)	12.0 (10.4, 14.4)	13.1 (11.2, 16.0)	0.3424
Cr (mg/dl)	0.69 (0.58, 0.85)	0.82 (0.73, 0.99)	0.69 (0.58, 0.83)	0.65 (0.58, 0.84)	0.0657
Diabetes (no/yes)	38/29	5/4	17/19	8/14	0.5656
Dyslipidemia (no/yes)	43/24	3/6	13/23	8/14	0.9859
Hypertension (no/yes)	41/26	2/7	12/24	12/10	0.1502

注) 数値は、(%) または中央値 (25%tile-75%tile)、糖尿病・高脂血症・高血圧症の患者数は Kruskal Wallis test、性別・糖尿病・高脂血症・高血圧症は Chi-square test で実施、P<0.05 で有意差ありとした。

Table 5-6 バリデーションコホートの組織学的診断

Factor	Number (%)	
<b>Steatosis</b>		
0 (<5%)	1(1.5)	
1 (5-33%)	30(44.8)	
2 (>33-66%)	27(40.3)	
3 (>66%)	9(13.4)	
<b>Lobular Inflammation</b>		
0-1(<2 foci/20× field)	49(73.1)	
2 (2-4foci/20× field)	17(25.4)	
3 (>4 foci/20× field)	1(1.5)	
<b>Ballooning</b>		
0 (None)	17(25.4)	
1 (Few)	35(52.2)	
2 (Many)	15(22.4)	
<b>NAS</b>		
0	0(0.0)	
1	2(3.0)	NAFL
2	7(10.4)	
3	17(25.4)	
4	19(28.3)	Borderline NASH
5	16(23.9)	
6	5(7.5)	
7	1(1.5)	NASH
8	0(0.0)	
<b>Fibrosis</b>		
	Number (%)	
0	10(14.9)	
1	23(34.3)	
2	9(13.4)	
3	22(32.9)	
4	3(4.5)	



(G)

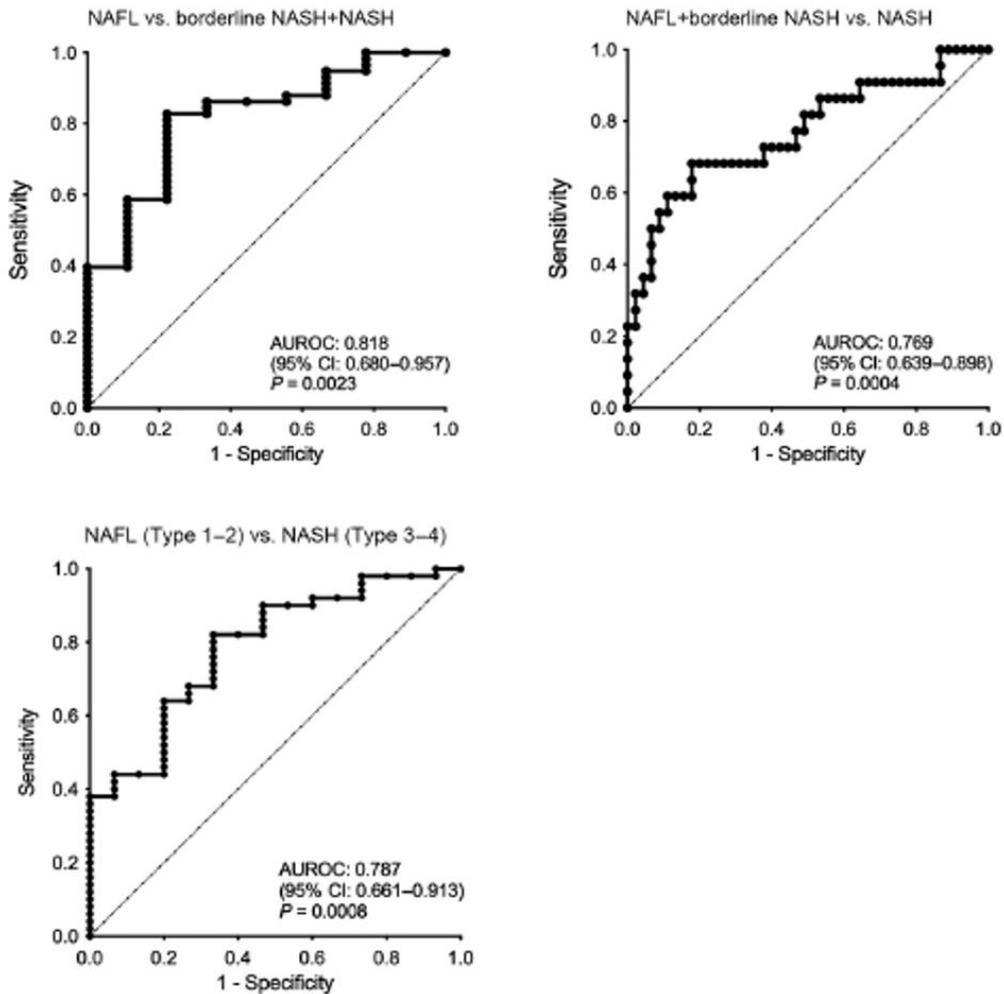


Fig.5-5 バリデーショコホートの病理組織診断と血清中の fCK18 値の関係

(A) NAS、(B) 脂肪肝、(C) 風船様変性、(D) 小葉炎症、(E) Brunt's stage、  
(F) Matteoni's classification、(G) fCK18 の ROC カーブ、左上：NAFL 患者 対  
Borderline NASH 患者と NASH 患者、右上：NAFL 患者と Borderline NASH 患者 対  
NASH 患者、左下：NAFL 患者 (Type1-2) 対 NASH 患者 (Type 3-4)

Receiver operating characteristic (ROC)、Area Under the receiver operating  
characteristic curve (AUROC)

Type1-2 : Matteoni's 分類 type1-2、Type3-4 Matteoni's 分類 type3-4

Confidence interval (CI)、 $P < 0.05$  を統計的に有意とする。

### 5.3.8 fCK18 と肝機能マーカーの変化量

生活指導による治療効果とfCK18値の変化を調べた。その結果、生活指導を受けたNAFLDの25人の患者に対し、治療前後のfCK18値は、25人のうち、8人(32%)は上昇し、16人(64%)は減少、1人(4%)は変化しなかった。さらに、fCK18と肝機能マーカーのそれぞれの変化量(デルタ)を算出し、相関を調べた(Fig.5-6 A)。ALTとASTの変化量は、FIB-4 Indexの変化量と相関し、ALB、T-bilの変化量とも弱い相関を示した。一方で、fCK18の変化量は、AST、ALT、FIB-4 Indexと相関を認め、ALB、T-bilと相関を示さなかった。

以上の結果から、fCK18は、肝逸脱酵素が指標となる肝障害を反映していることが示唆された(ALT変化量との相関( $r = 0.648$ ,  $p = 0.0005$ )(Fig.5-6 B)、ASTの変化量との相関( $r = 0.585$ ,  $p = 0.002$ )(Fig.5-6 C)、FIB-4 Index変化量との相関( $r = 0.424$ ,  $p = 0.035$ )(Fig.5-6 D))。したがって、CLEIAで測定したfCK18値は、肝細胞障害程度を反映することから、治療効果などのモニターに活用できることが示された。

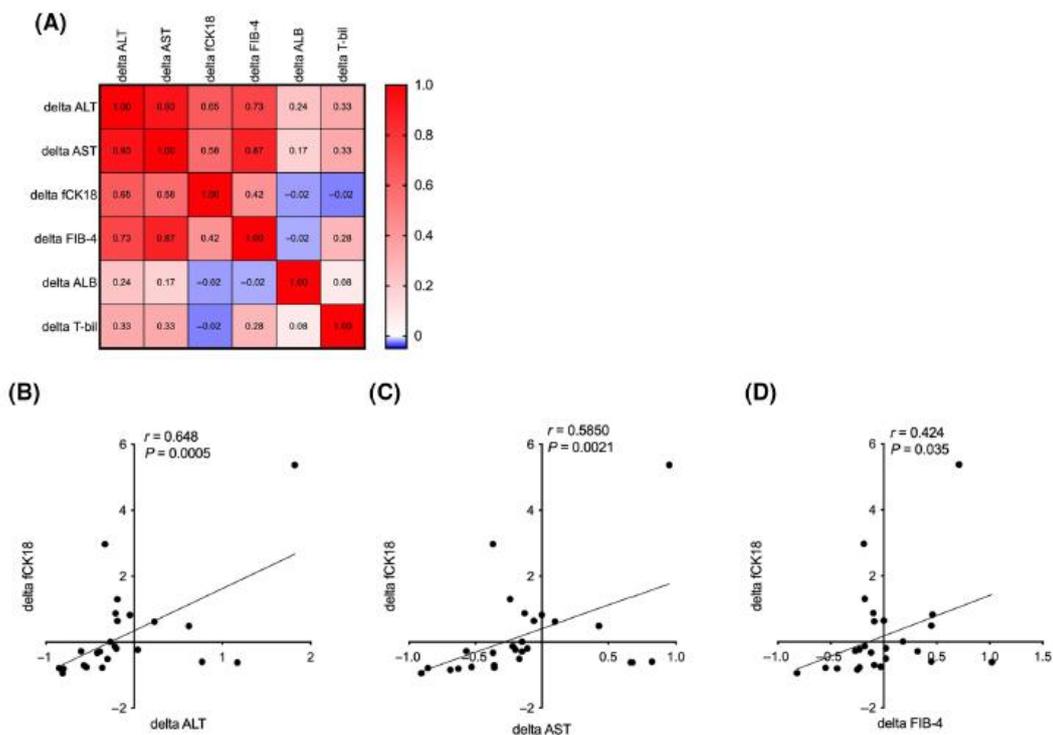


Fig.5-6 肝機能マーカーとの相関

(A) 各因子それぞれの変化率(デルタ)の相関、(B) fCK18変化量に対するALTの変化量の相関、(C) fCK18変化量に対するASTの変化量、(D) fCK18変化量に対するFIB-4の変化量

## 5.4 考察

本研究よりfCK18値は、肝逸脱酵素と相関し、NASで定義されたNASH患者で上昇した。NAS、BruntやMatteoni分類のようなNASHスコアリングシステムとの相関を示した。高感度fCK18CLEIAは、fCK18の産生メカニズムであるアポトーシスによる、肝細胞バルーニングを含む肝細胞障害のモニタリングが可能であった。実際に多くの研究において、fCK18値は肝臓の病理組織診断結果と相関しており、NAFLD診断の有用な非侵襲性バイオマーカーと報告されていた<sup>50,58,84</sup>。しかしながら、既存のELISAキットでは、健常者とNAFLを鑑別できず、肝細胞のバルーニングスコアとも一致しないため臨床で採用されていない<sup>18,22</sup>。これらの課題を解決するためには、独自の検出システムを開発する必要がある。

本研究で用いたCLEIAプラットフォームは、CK18/fCK18に対するモノクローナル抗体を使用し、K18-624抗体は、市販の抗CK18f抗体(M30)と比較して親和性が高かった。高感度CLEIAで測定したfCK18値は、肝細胞バルーニングStage0と比較するとStage1やStage2で高く、Matteoni分類においても、Stage1と2に対し、Stage3および4で有意に増加した。肝細胞バルーニングは、多変量回帰分析で示された唯一の独立変数であった。これらの結果は、M30ELISAKitが成しえなかった肝細胞バルーニングスコアを強く反映し、高感度したことにより早期のNASHを捉えることができる可能性が高い<sup>63</sup>。

Fibro scanや磁気共鳴画像システムのような非侵襲性画像プラットフォームは、肝線維症の診断には有用であるが、肝細胞の障害は、腹水や皮下脂肪組織で干渉を受け、診断できていない。それゆえ、初期を含むNASH診断において、肝細胞の障害やバルーニングの診断は重要である<sup>16,85</sup>。fCK18値は、Brunt Stage 2-4で高値を示し、結果的に線維化を検出したが、これは、肝臓全体の状態を反映したものと考えられる。

肝細胞の損傷は、NAFLDの進行に寄与する重要なイベントである。したがってNASHの初期段階である肝臓、肝細胞の障害全体をモニタリングするには非侵襲性バイオマーカーが必要である。高感度CLEIAで測定したfCK18値は、肝逸脱酵素の値と有意に相関しており、これまでの報告とも一致する<sup>58,63</sup>。これらの結果は、fCK18の測定が、患者の短期および長期間における肝細胞障害のモニタリングに重要なインパクトを持ち、確定診断である肝生検の代わりになるかもしれない。NASH治療薬の臨床試験では、薬物の有効性を示すため、脂肪肝、線維化、炎症などの肝臓の障害を評価するために、肝生検とALTのような一般血液検査が用いられている。肝細胞の少ない障害や、回復が、肝病理像の変化の前に起こるため、fCK18を用いた肝細胞障害のモニタリングは、現在使われている診断システムに代わり、NASH治療薬の有効性を判断するうえでも有意性がある。

健常者に対し、NAFL、Borderline NASH、NASHを区別する方法として、fCK18のカットオフ値が段々と上昇することが分かった。死亡率の高い<sup>17</sup>Matteoni分類Type 3、4および肝線維症を持つBrunt Stage 3、4に分類されたNASH患者において、fCK18値の上昇が認められた。

CK18は、NAFL(NAS 0-2)とBorderline NAS & NASH(NAS 3-8)を鑑別することができた。特にNASH患者と健常者を識別するためのカットオフ値におけるAUC、感度、特異度は、M30ELISAKitに勝っている。本測定系は、臨床での採用が今後大いに期待される。

これらの結果は、新しいCLEIAシステムで測定されたfCK18値が、肝線維化を診断し、NAFLD患者の予後を予測するのに強力な非侵襲的ツールとなる可能性が示された。

本研究は、レトロスペクティブに2つのセンターからのみサンプルを収集したもので、今後、他施設共同研究により、多数のNAFLD患者、特にNAFL患者検体を使用して、カットオフ値を含むこれらの結果を検証する必要がある。

## 5.5 結論

高感度CLEIAで測定したfCK18値は、肝逸脱酵素（ALT、AST、 $\gamma$ -GT）と相関し、NASHスコアリングシステム（NAS、Brunt's grade/stage、Matteoni分類）と相関した。新しく確立したfCK18 CLEIAは、NAFLおよびNASH診断において、肝生検に代わり、幅広く臨床で採用されることが期待される。

## 第 6 章 総括と今後の展望

生活習慣病の予防もしくは早期治療を目的として、メタボリックシンドロームに關与するバイオマーカー測定系の開発を行った。

TNF $\alpha$  と Leptin それぞれの高感度測定系は、マウス脂肪細胞内のアディポサイトカインの分泌量、蓄積量を測定するのに十分な感度であり、脂肪細胞のアディポサイトカインの挙動を把握し、更に、カルニチンが TNF $\alpha$  の産生抑制に有効であることを見いだした。

新規 K18-624 抗体は、fCK18 への高い親和性を示し、その抗体を用いた高感度 CLEIA は、全ての健常者血清中の fCK18 を測定可能な感度を有した。fCK18 値は、NASH 患者における肝機能や病理組織所見、特に hepatocyte ballooning と強い相関を示し、高い NASH 診断能を認め、肝生検に代わる診断法として大きく期待された。

今後、本研究で構築したメタボリックシンドロームに關与するバイオマーカー、TNF $\alpha$ 、Leptin そして fCK18 を用いて、メタボリックシンドロームでの中心となる脂肪細胞と肝臓の病態を把握することにより、糖尿病、動脈硬化症（心筋梗塞・脳梗塞）、非アルコール性脂肪肝炎（NASH）のような生活習慣病の予防もしくは早期治療の一助になることを期待したい。

## 謝辞

本論文作成にあたり、神戸女学院大学大学院 人間科学研究科 応用生命科学研究室 塩見尚史 教授には、指導教官として終始適切なお指導を賜りました。ここに深謝の意を表します。同大学大学院 植物生態学研究室 野寄 玲児 教授、代謝生化学研究室 西海 信 准教授には副査として適切なお助言を賜り、感謝申し上げます。

本研究の第 2 章、第 3 章の共同研究者である西谷 理咲子氏、前田 美和子氏には、データの取得にご協力頂き、厚く御礼申し上げます。

第 4 章、5 章の共同研究者である山口 哲司 博士、シスメックス株式会社 坂口 晃司 博士、奥野 晃司 氏には、測定系確立にご尽力頂き、感謝します。三重大学 竹井 謙之 名誉教授、消化器内科 中川 勇人 教授、岩佐 元雄 准教授、江口 暁子 特任准教授、重福 隆太 助教、玉井 康将 博士、保健管理センター 小林 由直 教授、消化器肝臓内科 長谷川 浩司 講師、基礎医学系講座 広川 佳史 准教授、病理診断科 渡辺 昌俊 教授、林 昭伸 助教、東京大学 消化器内科 中塚 拓馬 助教、松下 祐紀 博士、榎奥 健一郎 博士には、検体収集、病理組織診断、データ解析結果を提供頂き、感謝の意を表します。

## 略語表

AUC	Area Under the Curve
BMI	body mass index
C/EBP	CCAT/enhancer binding protein
CK18	cytokeratin 18
CK18f	cytokeratin 18 fragment (238A-396D)
DEX	dexamethasone
FBS	Fetal Bovine Serum
fCK18	fragmented Cytokeratin 18 (CK18 のアミノ酸配列の開始メチオニンを付加し、239A-397D とした)
FLIP	the fatty liver inhibition of progression
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GLUT 4	glucose transporter 4
IBMX	3-isobutyl-1-methylxanthine
IP	Immunoprecipitation
IRS-1	insulin receptor substrate-1
LoD	Limit of quantitation
LoQ	Limit of detection
NAFL	nonalcoholic fatty liver
NAFLD	nonalcoholic fatty liver diseases
NAS	NAFLD activity score
NASH	non-alcoholic steatohepatitis
MUG	4-Methylumbelliferyl $\beta$ -D-glucoside
M2BPGi	Mac-2 binding protein glycosylation isomer
TG	triglyceride
PPAR	peroxisome proliferator activated receptor
rCK18	recombinant cytokeratin 18
rfCK18	recombinant fragmented cytokeratin 18
SD	standard deviation
WB	Western blotting
WHO	world health organization

## References

1. Carswell, E. A. *et al.* An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors (activated macrophage) Zymosan (from *Saccharomyces cervisiae*) from Nutritional Biochemical Corporation; endotoxin (lipopolysaccharide W. vol. 72 <https://www.pnas.org> (1975).
2. Pennica, D. *et al.* Human tumour necrosis factor: Precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. *Nature* **312**, (1984).
3. Black, R. A. *et al.* A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor- $\alpha$  from cells. *Nature* **385**, 729–733 (1997).
4. Kriegler, M., Perez, C., DeFay, K., Albert, I. & Lu, S. D. A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF. *Cell* **53**, 45–53 (1988).
5. Theiss, A. L., Simmons, J. G., Jobin, C. & Lund, P. K. Tumor necrosis factor (TNF)  $\alpha$  increases collagen accumulation and proliferation in intestinal myofibroblasts via TNF receptor 2. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 36099–36109 (2005).
6. Nagel, M. *et al.* Tumor Biology. 1–8 (2018) doi:10.1177/1010428318764007.
7. Tartaglia, L. A. *et al.* Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell* **83**, 1263–1271 (1995).
8. Enriori, P. J. *et al.* Diet-induced obesity causes severe but reversible leptin resistance in arcuate melanocortin neurons. *Cell Metab* **5**, 181–194 (2007).
9. Ikejima, K. *et al.* Leptin augments inflammatory and profibrogenic responses in the murine liver induced by hepatotoxic chemicals. *Hepatology* **34**, 288–297 (2001).
10. Ikejima, K. *et al.* Leptin receptor-mediated signaling regulates hepatic fibrogenesis and remodeling of extracellular matrix in the rat. *Gastroenterology* **122**, 1399–1410 (2002).
11. Day, C. P. & James, O. F. W. Steatohepatitis: A tale of two “hits”? *Gastroenterology* **114**, 842–845 (1998).
12. Tilg, H. & Moschen, A. R. Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis. *Hepatology* **52**, 1836–1846 (2010).
13. Ludwig, J. T. R. V. D. B. M. B. J. O. Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clin Proc.* **55**, 434–438 (1980).
14. Schaffner, F. & Thaler, H. Nonalcoholic fatty liver disease. *Prog Liver Dis* **8**,

- 283–298 (1986).
15. *Evidence-based Clinical Practice Guidelines for Nonalcoholic Fatty Liver Disease/Nonalcoholic Steatohepatitis*. (2014).
  16. Chalasani, N. *et al.* The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: Practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology* **67**, 328–357 (2018).
  17. Matteoni, C. A. *et al.* Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. *Gastroenterology* **116**, 1413–1419 (1999).
  18. Brunt, E. M., Janney, C. G., di Bisceglie, A. M., Neuschwander-Tetri, B. A. & Bacon, B. R. Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. *Am J Gastroenterol* **94**, 2467–2474 (1999).
  19. Bedossa, P. *et al.* Utility and appropriateness of the fatty liver inhibition of progression (FLIP) algorithm and steatosis, activity, and fibrosis (SAF) score in the evaluation of biopsies of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* **60**, 565–575 (2014).
  20. Lewis, J. D. *et al.* Pioglitazone Use and Risk of Bladder Cancer and Other Common Cancers in Persons With Diabetes. *JAMA* **314**, 265–277 (2015).
  21. Ahima, R. S. Adipose tissue as an endocrine organ. *Obesity (Silver Spring)* **14 Suppl 5**, (2006).
  22. Matsuzawa, Y. The metabolic syndrome and adipocytokines. (2006) doi:10.1016/j.febslet.2006.04.028.
  23. Zhang, Y. *et al.* Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 1994 372:6505 **372**, 425–432 (1994).
  24. Szkudelski, T. Intracellular Mediators in Regulation of Leptin Secretion from Adipocytes. *Physiol. Res* **56**, 503–512 (2007).
  25. Shimomura, I., Hammer, R. E., Ikemoto, S., Brown, M. S. & Goldstein, J. L. Leptin reverses insulin resistance and diabetes mellitus in mice with congenital lipodystrophy. *Nature* **401**, 73–76 (1999).
  26. Maeda, K. *et al.* cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (AdiPose Most abundant Gene transcript 1). *Biochem Biophys Res Commun* **221**, 286–289 (1996).
  27. Hu, E., Liang, P. & Spiegelman, B. M. AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 10697–10703 (1996).
  28. Bueno, A. A. *et al.* Effects of different fatty acids and dietary lipids on adiponectin gene expression in 3T3-L1 cells and C57BL/6J mice adipose

- tissue. *Pflugers Arch* **455**, 701–709 (2008).
29. Yamauchi, T. *et al.* The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity. *nature.com*.
  30. Hotamisligil, G. S. *et al.* IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF- $\alpha$ - and obesity-induced insulin resistance. *Science (1979)* **271**, 665–668 (1996).
  31. Hotamisligil, G. S., Shargill, N. S. & Spiegelman, B. M. Adipose expression of tumor necrosis factor- $\alpha$ : Direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science (1979)* **259**, 87–91 (1993).
  32. Reusch, J. E. B., Colton, L. A. & Klemm, D. J. CREB Activation Induces Adipogenesis in 3T3-L1 Cells. *Mol Cell Biol* **20**, 1008–1020 (2000).
  33. Green, H. & Kehinde, O. An established preadipose cell line and its differentiation in culture II. Factors affecting the adipose conversion. *Cell* **5**, 19–27 (1975).
  34. Gregoire, F. M., Smas, C. M. & Sul, H. S. Understanding adipocyte differentiation. *Physiol Rev* **78**, 783–809 (1998).
  35. Noon, L. A., Clark, A. J. L. & King, P. J. A peroxisome proliferator-response element in the murine mc2-r promoter regulates its transcriptional activation during differentiation of 3T3-L1 adipocytes. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 22803–22808 (2004).
  36. Tanabe, Y., Koga, M., Saito, M., Matsunaga, Y. & Nakayama, K. Inhibition of adipocyte differentiation by mechanical stretching through ERK-mediated downregulation of PPAR $\gamma$ 2. *J Cell Sci* **117**, 3605–3614 (2004).
  37. Aoyagi, T., Shimba, S. & Tezuka, M. Characteristics of Circadian Gene Expressions in Mice White Adipose Tissue and 3T3-L1 Adipocytes. *Journal of Health Science* **51**, 21–32 (2005).
  38. Rosen, E. D. & Spiegelman, B. M. Molecular Regulation of Adipogenesis. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.cellbio.16.1.145> **16**, 145–171 (2003).
  39. Wu, Z. *et al.* Cross-Regulation of C/EBP $\alpha$  and PPAR $\gamma$  Controls the Transcriptional Pathway of Adipogenesis and Insulin Sensitivity. *Mol Cell* **3**, 151–158 (1999).
  40. Porse, B. T. *et al.* E2F Repression by C/EBP $\alpha$  Is Required for Adipogenesis and Granulopoiesis In Vivo. *Cell* **107**, 247–258 (2001).
  41. Fluorometric Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Measurement of IgE Antibody to Mite *Dermatophagoides farinae*. [https://www.jstage.jst.go.jp/article/mandi1977/31/7/31\\_7\\_711/\\_article/](https://www.jstage.jst.go.jp/article/mandi1977/31/7/31_7_711/_article/)-

- char/ja/.
42. KATO, K., HAMAGUCHI, Y., FUKUI, H. & ISHIKAWA, E. Enzyme-Linked Immunoassay: Conjugation of Rabbit Anti-(Human Immunoglobulin G) Antibody with  $\beta$ -d-Galactosidase from *Escherichia coli* and Its Use for Human Immunoglobulin G Assay. *Eur J Biochem* **62**, 285–292 (1976).
  43. Kitamura, K., Matsuda, K., Ide, M., Tokunaga, T. & Honda, M. A fluorescence sandwich ELISA for detecting soluble and cell-associated human interleukin-2. *J Immunol Methods* **121**, 281–288 (1989).
  44. Wang, Z. *et al.* Co-culture with fat cells induces cellular insulin resistance in primary hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **345**, 976–983 (2006).
  45. Dietze, D. *et al.* Impairment of insulin signaling in human skeletal muscle cells by co-culture with human adipocytes. *Diabetes* **51**, 2369–2376 (2002).
  46. Rosen, E. D. & Spiegelman, B. M. Molecular Regulation of Adipogenesis. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.cellbio.16.1.145> **16**, 145–171 (2003).
  47. Szkudelski, T. Intracellular mediators in regulation of leptin secretion from adipocytes. *Physiol Res* **56**, 503–512 (2007).
  48. Hotamisligil, G. S. *et al.* IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF- $\alpha$ - and obesity-induced insulin resistance. *Science* **271**, 665–668 (1996).
  49. Gregoire, F. M., Smas, C. M. & Sul, H. S. Understanding adipocyte differentiation. *Physiol Rev* **78**, 783–809 (1998).
  50. Caulín, C., Salvesen, G. S. & Oshima, R. G. Caspase cleavage of keratin 18 and reorganization of intermediate filaments during epithelial cell apoptosis. *J Cell Biol* **138**, 1379–1394 (1997).
  51. Kramer, G. *et al.* Differentiation between cell death modes using measurements of different soluble forms of extracellular cytokeratin 18. *Cancer Res* **64**, 1751–1756 (2004).
  52. Ueno, T. *et al.* Measurement of an apoptotic product in the sera of breast cancer patients. *Eur J Cancer* **39**, 769–774 (2003).
  53. Sirniö, P. *et al.* Systemic inflammation is associated with circulating cell death released keratin 18 fragments in colorectal cancer. *Oncoimmunology* **9**, (2020).
  54. Molnar, T. *et al.* Subacute Elevation of Plasma Level of Caspase-Cleaved Cytokeratin-18 is Associated with Hemorrhagic Transformation and Functional Outcome in Ischemic Stroke. *J Stroke Cerebrovasc Dis* **28**, 719–727 (2019).

55. Lorente, L. New Prognostic Biomarkers in Patients With Traumatic Brain Injury. *Arch Trauma Res* **4**, (2015).
56. Luft, T. *et al.* Serum cytokeratin-18 fragments as quantitative markers of epithelial apoptosis in liver and intestinal graft-versus-host disease. *Blood* **110**, 4535–4542 (2007).
57. Eguchi, A., Wree, A. & Feldstein, A. E. Biomarkers of liver cell death. *J Hepatol* **60**, 1063–1074 (2014).
58. Feldstein, A. E. *et al.* Cytokeratin-18 fragment levels as noninvasive biomarkers for nonalcoholic steatohepatitis: a multicenter validation study. *Hepatology* **50**, 1072–1078 (2009).
59. Tsutsui, M. *et al.* Serum fragmented cytokeratin 18 levels reflect the histologic activity score of nonalcoholic fatty liver disease more accurately than serum alanine aminotransferase levels. *J Clin Gastroenterol* **44**, 440–447 (2010).
60. Lee, J. *et al.* Accuracy of cytokeratin 18 (M30 and M65) in detecting non-alcoholic steatohepatitis and fibrosis: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One* **15**, (2020).
61. Bantel, H., John, K. & Schulze-Osthoff, K. Robust detection of liver steatosis and staging of NAFLD by an improved ELISA for serum cytokeratin-18 fragments. *Am J Gastroenterol* **109**, 140–141 (2014).
62. Liu, J. *et al.* Serum Levels of M2BPGi as Short-Term Predictors of Hepatocellular Carcinoma in Untreated Chronic Hepatitis B Patients. *Sci Rep* **7**, (2017).
63. Cusi, K. *et al.* Limited value of plasma cytokeratin-18 as a biomarker for NASH and fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* **60**, 167–174 (2014).
64. Harrison, S. A. *et al.* Selonsertib for patients with bridging fibrosis or compensated cirrhosis due to NASH: Results from randomized phase III STELLAR trials. *J Hepatol* **73**, 26–39 (2020).
65. Shiffman, M. *et al.* Randomised clinical trial: emricasan versus placebo significantly decreases ALT and caspase 3/7 activation in subjects with non-alcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther* **49**, 64–73 (2019).
66. Friedman, S. L. *et al.* A randomized, placebo-controlled trial of cenicriviroc for treatment of nonalcoholic steatohepatitis with fibrosis. *Hepatology* **67**, 1754–1767 (2018).
67. Chalasani, N. *et al.* The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: Practice guidance from the American Association for the Study of

- Liver Diseases. *Hepatology* **67**, 328–357 (2018).
68. Ivanics, T., Abreu, P., de Martin, E. & Sapisochin, G. Changing Trends in Liver Transplantation: Challenges and Solutions. *Transplantation* **105**, 743–756 (2021).
  69. Estes, C. *et al.* Modeling NAFLD disease burden in China, France, Germany, Italy, Japan, Spain, United Kingdom, and United States for the period 2016–2030. *J Hepatol* **69**, 896–904 (2018).
  70. Loomba, R., Lim, J. K., Patton, H. & El-Serag, H. B. AGA Clinical Practice Update on Screening and Surveillance for Hepatocellular Carcinoma in Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Expert Review. *Gastroenterology* **158**, 1822–1830 (2020).
  71. Rinella, M. E., Tacke, F., Sanyal, A. J., Anstee, Q. M. & participants of the AASLD/EASL Workshop. Report on the AASLD/EASL joint workshop on clinical trial endpoints in NAFLD. *J Hepatol* **71**, 823–833 (2019).
  72. Seen, T. K. *et al.* Clinical indicators for progression of nonalcoholic steatohepatitis to cirrhosis. *World J Gastroenterol* **27**, 3238–3248 (2021).
  73. Kaswala, D. H., Lai, M. & Afdhal, N. H. Fibrosis Assessment in Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) in 2016. *Dig Dis Sci* **61**, 1356–1364 (2016).
  74. Selvaraj, E. A. *et al.* Diagnostic accuracy of elastography and magnetic resonance imaging in patients with NAFLD: A systematic review and meta-analysis. *J Hepatol* **75**, 770–785 (2021).
  75. Eddowes, P. J. *et al.* Accuracy of FibroScan Controlled Attenuation Parameter and Liver Stiffness Measurement in Assessing Steatosis and Fibrosis in Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology* **156**, 1717–1730 (2019).
  76. Feldstein, A. E. & Gores, G. J. Apoptosis in alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis. *Front Biosci* **10**, 3093–3099 (2005).
  77. Riedl, S. J. & Shi, Y. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 897–907 (2004).
  78. Joka, D. *et al.* Prospective biopsy-controlled evaluation of cell death biomarkers for prediction of liver fibrosis and nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* **55**, 455–464 (2012).
  79. Wieckowska, A. *et al.* In vivo assessment of liver cell apoptosis as a novel biomarker of disease severity in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* **44**, 27–33 (2006).
  80. Yamada, M., Eguchi, A., Okuno, K., Sakaguchi, K. & Yamaguchi, T.

- Development of a highly sensitive chemiluminescent enzyme immunoassay for fragmented cytokeratin 18 using new antibodies. *Sci Rep* **11**, (2021).
81. Kleiner, D. E. *et al.* Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* **41**, 1313–1321 (2005).
  82. Brunt, E. M., Kleiner, D. E., Wilson, L. A., Belt, P. & Neuschwander-Tetri, B. A. Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) activity score and the histopathologic diagnosis in NAFLD: distinct clinicopathologic meanings. *Hepatology* **53**, 810–820 (2011).
  83. Brunt, E. M., Janney, C. G., di Bisceglie, A. M., Neuschwander-Tetri, B. A. & Bacon, B. R. Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. *Am J Gastroenterol* **94**, 2467–2474 (1999).
  84. Diab, D. L. *et al.* Cytokeratin 18 fragment levels as a noninvasive biomarker for nonalcoholic steatohepatitis in bariatric surgery patients. *Clin Gastroenterol Hepatol* **6**, 1249–1254 (2008).
  85. Tokushige, K. *et al.* Evidence-based clinical practice guidelines for nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis 2020. *J Gastroenterol* **56**, 951–963 (2021).