

学位論文（博士）

Bardoxolone methyl prevents metabolic  
dysfunction-associated steatohepatitis by  
inhibiting macrophage infiltration

(Bardoxolone methyl はマクロファージの肝臓への  
浸潤を阻害することで非アルコール性脂肪肝炎を改  
善)

氏名 大沼 和弘

所属 山口大学大学院医学系研究科  
医学専攻

令和6年4月

## 目 次

1. 要旨	3
2. 背景	4
3. 材料と方法	6
4. 結果	12
5. 考察	16
6. 謝辞	18
7. 参考文献	19
8. 図表	25

## 【要旨】

Bardoxolone methyl (2-Cyano-3,12-dioxooleana-1,9 (11) -dien-28-oic acid methyl ester, CDDO-Me)は、転写因子である Nuclear factor erythroid 2-related factor (Nrf) 2 の強力な活性化剤であり、抗酸化関連遺伝子を誘導し、腎臓や肺の慢性炎症性疾患に対する保護作用を示す。しかし Metabolic dysfunction-associated steatohepatitis, MASH に対する薬理作用は知られていない。本研究では CDDO-Me の食餌誘発性 MASH マウスモデルにおける肝保護効果を検討し、RNA-seq 解析を用いてその薬理的メカニズムを明らかにすることを目的とした。CDDO-Me をコリン欠乏メチオニン減量高脂肪食 (a choline-deficient, L-amino-acid defined, high-fat diet, CDAHFD) を与えたマウスに経口投与し、肝臓の組織学的、生化学的、トランスクリプトーム解析を行った。CDDO-Me は肝臓中マクロファージ数の減少と共に、MASH の症状を有意に改善した。トランスクリプトーム解析により、CDDO-Me は CC Chemokine ligand (CCL) 4 及び CCL3L3 を介した貪食細胞の浸潤に関与する炎症系経路を阻害し、同時に Nrf2 を介した抗酸化経路の活性化を誘導することが明らかとなった。CDDO-Me はマウスマクロファージ細胞株において細胞走化性に関与する CCL3-CC Chemokine receptor (CCR) 1 及び CCL4-CCR5 軸の発現を用量依存的に抑制した。これらの結果から、CDDO-Me は Nrf2 活性化による抗酸化作用に加え、CCL3-CCR1 及び CCL4-CCR5 軸を阻害し、単球由来マクロファージの肝臓への浸潤抑制を介して MASH の炎症病態を改善させることが示された。

## 【背景】

Metabolic dysfunction-associated fatty liver disease, MAFLD はアルコールをほとんど摂取しない方の肝臓に脂肪が蓄積して生じる脂肪肝で、国内で約 1000 万人の罹患者がいると推定される、最も一般的な慢性肝疾患である。NAFLD は肥満、糖代謝・脂質異常や高血圧を伴うことが多く、メタボリック症候群と強く関わることが知られている (Tessari et al., 2009)。MAFLD の一部は、慢性的な肝障害に起因する炎症や線維化を伴う Metabolic dysfunction-associated steatohepatitis, MASH へと進行する。MASH は肝硬変や肝がんへ進行する可能性があるため (Bellentani., 2017)、MASH に対する治療薬のメディカルアンメットニーズは大きい、いまだ根本的な治療薬は開発されていないのが現状である。

MAFLD/MASH の進行過程において、過剰に蓄積した脂質が、肝臓中のマクロファージや星細胞を活性化し、活性酸素や様々なサイトカインやケモカイン産生を誘導し、肝臓における炎症や線維化を亢進させることで MASH 病態をより一層増悪させる。最近、MASH マウスモデルの肝臓中の細胞を用いたシングルセル RNA シーケンシング (single cell RNA-sequencing, scRNA-seq) の報告から、MASH 病態進行において、肝臓の常駐マクロファージである Kupffer 細胞が MASH 様 Kupffer 細胞に変化し、その後アポトーシスにより減少し、その代わりに骨髄由来のマクロファージが、肝臓外から浸潤してきて、新たな Kupffer 細胞や脂質関連マクロファージ (Lipid-associated macrophages, LAM) に分化し、重要な役割を果たすことが明らかになっている (Seidman et al., 2020, Remmerie et al., 2020, Daemen et al., 2021)。これらの報告から MASH 病態進展におけるマクロファージの寄与は大きいと考えられる。

酸化ストレス下で抗酸化関連遺伝子の発現を誘導する転写因子である核内因子エリスロイド 2 関連因子 (Nuclear factor erythroid 2-related factor, Nrf) 2 は、MASH の治療標的となる可能性がある (Bataille et al., 2012)。Kelch-like ECH-associated protein (Keap) 1 は、細胞質で Nrf2 の Neh2 ドメインと結合し、Nrf2 の核への移行を阻害する (Itoh et al., 2013)。炎症時に産生される活性酸素は、Nrf2 の Keap1 からの解離を誘導し、Nrf2 の核内移行と抗酸化遺伝子発現のための転写活性化をもたらす。メチオニン及びコリン欠乏食による MASH は、Nrf2 欠損マウスで増悪することが知られている (Chowdhry et al., 2010)。対照的に、Keap1 ノックダウンによる Nrf2 活性化は、MASH における脂肪蓄積を抑制する (Zhang et al., 2010)。また Nrf2 活性化剤を用いた薬理的なアプローチも、MASH の進行を減弱させることが知られている (Sharma et al., 2018, Shimozono et al., 2013)。Nrf2 の強力な薬理的活性化剤であるバルドキシロン (CDDO) は、マウスの腹膜マクロファージやラットの脳ミクログリアにおいて、TNF や Interleukin-1 等の様々なサイトカインの誘導を抑制することが報告されており (Tran et al., 2008)、さらに骨髄性白血病細胞からの単球分化を誘導することが報告されている (Suh et al., 1999)。またバルドキシロンメチル (CDDO-Me) は骨髄性白血病細胞からの単球分化を介してアポトーシスを誘導する (Konopleva et al., 2002) これらの知見は、CDDO がマクロファージに関連した炎症を抑

制する可能性を示唆している。CDDO-Me は腎臓と心臓における肥満誘発性炎症性疾患を顕著に改善し、慢性腎臓病と肺動脈性肺高血圧症の治療のため臨床試験でも使用されている (Chin et al., 2018)。MASH マウスにおいて CCL3 はマクロファージの浸潤と脂肪肝炎の進行を促進し (Xu et al., 2021)、CCL3 の受容体である CCR1 と CCR5 は、2つの異なるマウスモデルにおいて肝線維化を促進する (Seki et al., 2009)。CDDO-Me のアナログ体であるジヒドロ-CDDO-トリフルオロメチルアミド (dh404) は、CCL2 や CCL4 などのサイトカインやケモカインを発現するマクロファージによって引き起こされる炎症を予防する (Li et al., 2014)。従って CDDO-Me は、単球の浸潤を抑制することにより、炎症の進行を防ぐ可能性がある。しかしながら、MASH に対する CDDO-Me の肝保護作用は未知のままである。そこで本研究では、RNA-seq による全トランスクリプトーム解析を用いて、食餌誘発 MASH マウスモデルにおける CDDO-Me の肝保護作用とその薬理的機序を検討した。

## 【材料と方法】

### <動物>

性周期の影響を避けるため5週齢の雄C57BL/6Jマウスを日本エスエルシー株式会社(静岡、日本)より購入した。使用マウスの種、週齢、性別は全て過去の報告(Matsumoto et al., 2013)に基づいて選択した。全ての動物は入荷後、1週間の検疫期間を経て、実験使用に際し、一般状態観察にて問題がないことを確認してから使用した。マウスはSPF (Specific pathogen free) 下、室温 $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $50\pm 10\%$ 、12時間の明暗サイクルで、換気しながら、環境条件を制御して飼育した。全ての実験プロトコルは、UBE株式会社 医薬研究所の動物実験委員会の審査と承認を受けた(承認番号P-18175及びP-23095)。

### <材料>

バルドキシロンメチル(CDDO-Me(図1A))はShanghai Heat-biochem, Inc. (Shanghai, China)から購入し、メチルセルロースは富士フィルム和光純薬株式会社(大阪、日本)から購入した。コリン欠乏メチオニン減量高脂肪食高脂肪食飼料(a choline-deficient, L-amino-acid defined, high-fat diet, CDAHFD)はResearch Diets, Inc. (New Brunswick, NJ)から購入した。

### <CDAHFD食餌誘導性MASHモデルマウス>

C57BL/6Jマウスを体重を元に各群8匹ずつ4つの群に群分けを実施した。マウスには、通常の $\gamma$ 線滅菌食(CE-2, 日本クレア株式会社、東京、日本)(Ota et al., 2019)もしくはCDAHFDを与え、同時にCDDO-Meもしくは0.5w/v%メチルセルロースを溶媒として8週間、1日1回経口投与した。全てのマウスの体重を1週間に1回測定し、実験期間最終日に小動物用麻酔器Model TK7(Bio Machinery Co. Ltd., 千葉、日本)を用いて2から3 vol%のイソフルラン麻酔下にて腹部大静脈より採血後、頸椎脱臼により安楽死させ、肝臓重量を測定後、肝臓の一部をそれぞれ10%リン酸緩衝ホルマリン液で固定、液体窒素で凍結、又はRNAlater溶液(Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA)に入れて保存した。血清は全血を採取後分離し、解析まで $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。なお採血時のマウスは非絶食であり、栄養状態に配慮して試験を行った。

### <生化学分析>

血清中のアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(AST)、アラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT)、総ビリルビン(T-Bil)、トリグリセリド(TG)、低密度リポ蛋白コレステロール(LDL-C)及び高密度リポ蛋白コレステロール(HDL-C)を7180生化学自動分析装置(日立製作所、東京、日本)により測定した。肝臓中のTGはLabAssay™ Triglyceride Kit(富士フィルム和光純薬株式会社)を用いて、製造元のプロトコルに従って実施した。

#### < *in vitro* 細胞培養と化合物処理 >

Hepalcl7 細胞 (RRID:CVCL\_0328) は DS ファーマバイオメディカル株式会社 (大阪、日本) より購入した。10%牛胎児血清 (FBS) 及び 1%ペニシリン/ストレプトマイシン/アンフォテリシン B (Thermo Fisher Scientific Inc.) を含む MEM $\alpha$  で培養した。Hepalcl7 細胞を播種し 24 時間培養後、各濃度の CDDO-Me で 6、24、48 時間処理した。RAW264.7 細胞 (RRID:CVCL\_0493) は ECACC General Collection から入手し、10%牛胎児血清 (FBS) 及び 1%ペニシリン/ストレプトマイシン/アンフォテリシン B (Thermo Fisher Scientific Inc.) を含む DMEM で培養した。RAW264.7 細胞を播種し 24 時間培養後、各濃度の CDDO-Me で 6 時間もしくは 24 時間処理した。CDDO-Me 処理後、各細胞を定量 RT-PCR のために、また培養上清を Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) のために回収した。ウエスタンブロッティングの試料として、RAW264.7 細胞を所定の濃度の CDDO-Me で無血清条件で 6 時間前処理を行った後、10%血清と所定の濃度の CDDO-Me を含む培地に交換し、15 分後に細胞を回収した。

#### < *in vitro* NAD (P) H quinone dehydrogenase 1 酵素活性誘導試験 >

NAD (P) H quinone dehydrogenase 1 (NQO1) 酵素活性は、参考文献 (Park et al., 2011) の条件を少し改変して測定した。具体的には Hepalcl7 細胞を 96 ウェルプレートに播種し 24 時間培養後、各濃度の CDDO-Me で 48 時間処理した。その後、Hepalcl7 細胞を 50  $\mu$ L の Cell Lysis Buffer (Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA) で 20 分間振とうし、200  $\mu$ L の Reaction buffer (25 mM Tris-HCl ; 0.07% Albumin ; 0.01% Tween-20 ; 2 U $\cdot$ mL<sup>-1</sup> Glucose-6-phosphate dehydrogenase ; 5  $\mu$ M flavin adenine dinucleotide ; 1  $\mu$ M Glucose-6-phosphate ; 30  $\mu$ M nicotinamide adenine dinucleotide phosphate ; 0.03 % MTT ; 50  $\mu$ M Menadione) と 5 分間反応させた。50  $\mu$ L Stop solution (0.3 mM dicumarol / 5 mM potassium dihydrogenphosphate) を添加後、540 nm で吸光度を測定した。上記と同じ条件で播種した別のプレートを用いて CellTiter-Glo assay (Promega Corp., Madison, WI) により生細胞数を測定し、NQO1 活性の吸光度の値を補正した。溶媒処理のコントロールに比べて NQO1 酵素活性が 1.5 倍増加する濃度 EC<sub>150</sub> 値を算出した。

#### < *in vivo* 薬物動態及び薬力学試験 >

非絶食状態の C57BL/6J マウスに CDDO-Me を 3 及び 10 mg $\cdot$ kg<sup>-1</sup> の用量で 0.5 w/v%メチルセルロース (富士フイルム和光純薬株式会社、大阪、日本) に懸濁して経口投与し、投与後 1、4、6、24 時間に麻酔下で腹部大静脈から EDTA-2K を含む採血管 (テルモ株式会社、東京、日本) に血液を採取した。同時に投与 1、4、6、24 時間後の肝臓も採取し、定量 RT-PCR により *Nqo1* の mRNA 発現を解析した。血漿は、血液を 990g、4°C で 5 分間遠心分離することによって得た。血漿中の CDDO-Me の定量分析はエレクトロスプレーイオン化 (ESI) 源を備えた API 3200 トリプル四重極質量分析計 (AB Sciex LLC., Redwood City, CA) を、C18 カ

ラム逆相 Kinetex C18 (Phenomenex Inc., Torrance, CA, 50 x 2.1 mm i.d. 2.6  $\mu$ m) を備えた島津 HPLC システムと結合し、カラム温度を 40°C で維持 (ランタイム : 5 min) した状態で実施した。移動相は, (A) 0.1% ギ酸-蒸留水及び (B) 0.1% ギ酸-アセトニトリル-メタノール混合溶液 (50:50, v/v) から成り、流速 0.4 ml/分で、以下のグラジエントプログラムで送液した (0 分; A/B=90/10、 1 分; A/B=10/90、 1-3 分; A/B=10/90、 3.01 分; A/B=90/10)。CDDO-Me は、Resham らの文献 (2015) を参考に、ニフルミン酸を内部標準とした多重反応モニタリングにより、負イオン化モードで定量した。データは Analyst software 1.7 version (AB Sciex LLC.) で取得・統合した。

### <定量 RT-PCR>

Total RNA は NucleoSpin RNA kit (タカラバイオ株式会社、滋賀、日本) を用いて RNase free の条件で単離した。RNA は PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser (タカラバイオ株式会社) を用いて逆転写した。得られた cDNA は TB Green Premix Ex Taq II kit (タカラバイオ株式会社) を用いて、サーマルサイクラーダイスリアルタイムシステム (タカラバイオ株式会社) で増幅し、*Actb* を内因性コントロールとして使用した。使用したプライマーはすべてタカラバイオ株式会社より購入した。使用した全てのプライマー配列は補足表 1 に示した。

### <組織染色及び NAS 評価>

パラフィン包埋した肝サンプルを約 4  $\mu$ m の切片に切り出し、病理学的・形態学的解析のためにヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を、線維化の解析のためにシリウスレッドで染色した。シリウスレッド染色は、脱パラフィンした切片を、1%シリウスレッド溶液 (武藤化学、東京、日本) 5 mL と飽和ピクリン酸溶液 (富士フィルム和光純薬株式会社) 100mL を混合して調製したピクロシリウスレッド溶液で 15 分間インキュベートして実施した。各スライドの NAFLD 活性スコア (NAS) は、Kleiner DE らの文献 (2005) を参考に行った。凍結肝サンプルを約 5  $\mu$ m の切片に切り出し、オイルレッド O (ナカライテスク株式会社、京都、日本) で染色した。オイルレッド O 染色では、凍結切片を 60%イソプロピルアルコールで 1 分間、オイルレッド O 溶液で 15 分間、37°C でインキュベートした。その後、切片を 60%イソプロピルアルコールで 2 分間インキュベートし HE で染色した。オイルレッド O 陽性領域は ImageJ ソフトウェア (RRID: SCR\_003070) を用いて定量した。各切片の脂肪滴の直径と、直径 20  $\mu$ m 以上の大きな脂肪滴の割合は、BZ-X アナライザー (株式会社キーエンス、大阪、日本) を用いて算出した。

### <ウエスタンブロット>

RAW264.7 細胞用に M-PER (Thermo Fisher Scientific Inc.) を、肝サンプル用に T-PER (Thermo Fisher Scientific Inc.) を準備し、それぞれと Halt protease & phosphatase



inhibitor cocktail (Thermo Fisher Scientific Inc.) を 99 : 1 の割合で混合し、lysis buffer を調製した。肝サンプルを lysis buffer 中でホモジナイズし、10,000 xg で 10 分間遠心分離し、上清をライセートとして回収した。核画分と細胞質画分の単離には NE-PER (Thermo Fisher Scientific Inc.) を用い、製造元のプロトコルに従って実施した。抽出したライセート中のタンパク質濃度は、DC™ protein assay kit (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA) を用いて、製造元のプロトコルに従って測定し、各サンプルを Lane Marker Reducing Sample Buffer (Thermo Fisher Scientific Inc.) と 4 : 1 の割合で混合し、95°C で 5 分間加熱し、ブロットイングサンプルを調製した。調製した試料を SDS-PAGE で分離した。この時、肝サンプルは 40 µg/レーン、肝核画分は 4 µg/レーン、RAW264.7 細胞サンプルは 10 µg/レーンでアプライした。iBlot® (Thermo Fisher Scientific Inc.) を用いてゲルから PVDF メンブレンに転写し、各種一次抗体 (抗 Vinculin 抗体 (13901S, RRID: AB\_2728768)、抗 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) 抗体 (Cat# 2118S, RRID: AB\_561053)、抗 IκBα 抗体 (Cat# 9242S, RRID: AB\_331623) 及び抗 phospho IκBα (Ser32) 抗体 (Cat# 2859T, RRID: AB\_561111) : Cell Signaling Technology Inc.、抗 NQO-1 抗体 (ab34173, RRID: AB\_2251526)、抗 Glutamate-cysteine ligase catalytic subunit (GCLC) 抗体 (ab207777, RRID: なし)、抗 NF-κB p105/p50 抗体 (Cat# ab32360, RRID: AB\_776748)、抗 TATA binding protein (TBP) 抗体 (Cat# ab63766, RRID: AB\_1281140) 及び抗 alpha smooth muscle actin (αSMA) 抗体 (ab32575, RRID: AB\_722538) : Abcam Inc. (Cambridge, UK) との反応を iBind™ Western Device (Thermo Fisher Scientific Inc.) を用いて実施し、結合した一次抗体は、HRP 標識ヤギ抗ウサギ IgG 二次抗体 (HAF008, RRID: AB\_357235; R&D Systems Inc., Minneapolis, MN) と反応させ、Amershan™ ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare Inc., Chicago, IL) 及び ChemiDoc™ XRS Plus (Bio-Rad laboratories Inc., Hercules, CA) を使用して、各タンパク質のバンドを確認、定量化した。

#### <Malondialdehyde 定量>

肝臓中 Malondialdehyde (MDA) 量は、市販の lipid peroxidation assay kit (Abcam Inc., ab118970) を用いて、製造元のプロトコルに従って測定した。具体的には肝臓ホモジネートをチオバルビツール酸 (TBA) と混合し、MDA-TBA 付加物を生成させ、MDA-TBA 付加物を比色的に定量した。

#### <Hydroxyproline 定量>

肝臓中 Hydroxyproline 量を、過去の文献で報告された (Matsumoto et al., 2013) 方法を一部改変して測定した。具体的にはホモジナイズした肝臓サンプルを 6N HCl 中 105°C で一晩加水分解し、6N NaOH で中和した後、0.2 µm PFTE フィルター (アドバンテック東洋株式会社、東京、日本) でろ過した。水酸化物のアリコートにクエン酸緩衝液で希釈し、クエン

酸緩衝液に溶解したクロラミン T で酸化し、25°Cで 20 分間インキュベートした。反応は 20%過塩素酸で停止させた。インキュベーション後、エチレングリコールモノメチルエーテルに溶解した p-ジメチルアミノベンズアルデヒドを加え、60°Cで 1 時間インキュベートし、96 ウェルプレートに移して 570nm の吸光度を測定した。Hydroxyproline 量は、標準曲線から求めた。試薬は全て富士フイルム和光純薬株式会社より購入した。

#### <Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) >

CC chemokine ligand (CCL) 3 及び CCL4 タンパク質の血清中もしくは培養上清中濃度は、市販の ELISA キット (R&D systems Inc., CCL3 ; MMA00、CCL4 ; MMB00) を用いて、製造元のプロトコルに従って測定した。

#### <免疫組織化学>

パラフィン包埋肝サンプルを約 4  $\mu$ m の切片に切り出し、プロテインナーゼ K (Agilent tech. Inc., Santa Clara, CA) で 6 分間インキュベートするか、0.01 M クエン酸緩衝液中で 10 分間オートクレーブ加熱して抗原賦活化を行った。切片を PBS で 3 回洗浄し、3%BSA/PBS で 30 分間、もしくはブロッキング試薬 (Cat #414321 ; ニチレイバイオサイエンス株式会社、東京、日本) で室温で 60 分間インキュベートしてブロックした。 $\alpha$ SMA, F4/80, Lymphocyte antigen 6 complex, locus G (Ly-6G) の発現量は、それぞれ抗 $\alpha$ SMA (Agilent tech. Inc., Cat# M0851, RRID: なし), 抗 F4/80 (Bio-Rad Laboratories Inc., Cat# MCA497R, RRID: AB\_323279), 抗 Ly-6G (BioLegend Inc., San Diego, CA, Cat# 127602, RRID: AB\_1089180) 抗体を用いて測定した。洗浄後、F4/80 及び Ly-6G 検出に用いた切片を、ビオチン化抗ラット IgG 抗体 (Vector laboratories Inc., Newark, CA, Cat# BA-9400, RRID: AB\_2336202) とインキュベートし、3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB-4HCl) solution (Agilent tech. Inc., Cat# K3468) を用いて形成されたストレプトアビジン-ビオチン複合体 (Vector lab. Inc.) を検出した、 $\alpha$ SMA 検出に使用した切片は、Simple stain MAX PO (ニチレイバイオサイエンス株式会社、Cat# 414321) を用いてインキュベートし、DAB-4HCL 溶液を用いて検出した。切片はヘマトキシリンで対比染色した。40 倍の高倍率視野あたりの F4/80 陽性細胞または Ly-6G 陽性細胞の数をカウントした。1 匹のマウスあたり、10 視野をカウントした。

C-type lectin domain family 4 member F (CLEC4F)、Glycoprotein nonmetastatic melanoma protein B (GPNMB)、CC chemokine receptor (CCR) 2、Sialoporphin (SPN)、CCR1 及び CCR5 の発現は、Ruo discovery universal (ver. 0.00.0394) のプロトコルに従って、Ventana discovery ultra (Roche Diagnostics K.K., Basel, Switzerland) を用いて測定した。具体的には、免疫組織化学では、CC1 緩衝液 (ロシュ・ダイアグノスティック株式会社、Cat# 518-108939) を用いて 95°Cで 64 分間、抗原賦活化を行った。Chromomap kit (Roche Diag. K.K., Cat# 518-100803) に含まれる Inhibitor CM を用い、37°Cで 4 分

間インキュベートした。切片を、CCR1 (Abcam Inc., Cat# ab140756, RRID:なし) 及び CCR5 (Bioss Inc., Woburn, MA, Cat# bs-2514R, RRID: AB\_10857802) に対するそれぞれの一次抗体で、37°Cで 32 分間、染色した。次に、二次抗体 Omnimap anti-rabbit HRP (Roche Diag. K. K., Cat# 518-102135) と共に 37°Cで 16 分間、インキュベートした。次に、Chromomap kit (Roche Diag. K. K., Cat# 518-100803) に含まれる Discovery DAB CM と Discovery H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> CM を 37°Cで 12 分間、Discovery Copper CM を 37°Cで 4 分間インキュベートし、シグナルを検出した。切片はヘマトキシリンで対比染色した。免疫蛍光については、免疫組織化学と同様の方法で抗原賦活化と内因性ペルオキシダーゼ活性阻害処理を行った。CLEC4F 検出用の切片は、Goat F (ab) anti-mouse IgG H&L (Abcam Inc., Cat# ab6668) で 37°Cで 16 分間、ブロックした。切片に GPNMB (Abcam Inc., Cat# ab188222, RRID:なし)、CCR2 (Abcam Inc., Cat# ab273050, RRID: AB\_2893307)、CLEC4F (R&D systems Inc., Cat# MAB2784, RRID: AB\_2081338)、SPN (Thermo Fisher Scientific Inc., Cat# PA5-96540, RRID: AB\_2808342) に対するそれぞれの一次抗体を添加した。その後、抗 GPNMB、抗 CCR2、抗 SPN 一次抗体には二次抗体 Omnimap 抗ウサギ HRP (ロシュ・ダイアグ株式会社, Cat# 518-102135)、抗 CLEC4F 一次抗体には Omnimap 抗ラット HRP (ロシュ・ダイアグ株式会社, Cat# 518-110932) を用いて 37°Cで 16 分間、インキュベートした。その後、Discovery Cy5 (Roche Diag. K. K., Cat# 518-113667) を用いて切片を 37°Cで 32 分間インキュベートし、シグナルを検出した。多重染色では、抗原賦活化、内因性ペルオキシダーゼ活性阻害、一次抗体及び二次抗体反応は、各染色手順の間に 95°Cで 4~8 分間のインキュベーションを加えて残存抗体を変性させた点以外は、それぞれの免疫組織化学または免疫蛍光染色の方法と同様に行った。シグナル検出のために、各染色ステップの最後に、切片を Discovery Cy5 (Roche Diag. K. K., Cat# 518-113667), Discovery rhodamine (Roche Diag. K. K., Cat# 518-111861), Discovery FITC (Roche Diag. K. K., Cat# 518-111878), Discovery DCC (Roche Diag. K. K., Cat# 518-113988) と共に 37°Cで 32 分間、インキュベートした。切片の陽性領域は、BZ-X810 顕微鏡と Hybrid cell count software (株式会社キーエンス) を用いて、過去の方法を参考に定量した (Yoshimoto et al., 2022)。

### <RNA-seq 解析>

肝臓から RNeasy Mini Kit (Qiagen Inc., Hilden, Germany) を用いて Total RNA を抽出し、既報文献 (Kohno M et al., 2020, Muto et al., 2023) と同様の方法でライブラリーを作成し、その品質と濃度を Agilent 2200 TapeStation (Agilent Thermo Fisher., D1000) を用いて評価した。作成したライブラリーを Illumina NextSeq DNA sequencer で 75-bp paired-end cycle sequencing kit (Illumina Inc., San Diego, CA) を用いてシーケンシングを行った。その後、データをトリミングし、CLC Genomics Workbench ソフトウェアプログラム (ver. 12.0.3; Qiagen Inc., RRID: SCR\_011853) を用いて、マウスリファレンスゲノム GRCh38 release-95 上にマッピングした。マッピングされたリード数は、

Transcripts per million (TPM) に正規化し 1 を加えて  $\log_2$  に変換した。p-value < 0.05、fold change > |1.2| を満たす群間発現に差のある遺伝子群を Ingenuity Pathway Analysis (Qiagen Inc., RRID:SCR\_008653) を使用し解析した。ベン図は、Calculate and draw custom venn diagrams ソフトウェア (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>) を用いて作成した。全てのヒートマップは、GraphPad Prism ソフトウェア (バージョン 9.0; GraphPad Software, RRID:SCR\_002798) を用いて、RNA-seq データ中の各遺伝子の TPM から計算した z スコアとしてプロットした。scRNA-seq のマーカー遺伝子は、マウス MAFLD 骨髄系細胞アトラスデータセット (Guilliams et al., 2022) を参照した。参照したデータセットに記載されている遺伝子と公開データベース (<https://www.livercellatlas.org/>) を用いてマウス MAFLD 肝細胞のうち単球及びマクロファージクラスターにおける特異性を確認し、より特異性の高い遺伝子を選択した。マウス MAFLD 肝細胞または MAFLD 骨髄系細胞の UMAP 可視化を公開データセット (<https://www.livercellatlas.org/>) を用いて行った。

#### <統計解析>

全ての結果は平均±標準偏差で示した。統計解析は、GraphPad Prism ソフトウェア (バージョン 9.0; GraphPad Software, RRID:SCR\_002798) を用いて、一元配置分散分析 (one-way ANOVA) と Dunnett の多重比較検定、もしくはノンパラメトリックの Kruskal-Wallis 検定と Dunn-Bonferroni post-hoc 解析によって行った。P<0.05 を統計的に有意とみなした。

## 【結果】

### CDDO-Me 経口投与量の決定

定常状態において細胞質内の Nrf2 は、Cullin 3 (Cul3) と相互作用する Keap1 ホモダイマーと結合、ユビキチン E3 リガーゼ複合体を形成し、ユビキチン-プロテアソーム系を介して分解される。CDDO-Me は Keap1 配列内の Cys-151 に共有結合し、最終的に Nrf2 の核移行及び転写を誘導する (Cleasby A et al., 2014, Suzuki T et al., 2017) (図 1a)。CDDO-Me による薬理的な Nrf2 活性化を確認するため、CDDO-Me 処理下の Hepa1c1c7 細胞における *Nqo1* mRNA の発現量を検討した結果、CDDO-Me は 0.1 nM から 3 nM の範囲で用量依存的に *Nqo1* mRNA 発現を亢進させ、3 nM での発現上昇は 10 nM まで維持された (図 1b)。CDDO-Me 処理下の Hepa1c1c7 細胞において、*Nqo1* mRNA と同様、NQO1 酵素活性も上昇し、EC<sub>150</sub> 値は 0.62 nM であった (図 1c)。健常マウスに 3 及び 10 mg・kg<sup>-1</sup> の CDDO-Me を単回経口投与したところ、24 時間後の肝臓で *Nqo1* mRNA 発現量がコントロールに比べてそれぞれ約 3 倍及び 6 倍に増加した (図 1d)。3 及び 10 mg・kg<sup>-1</sup> 投与後の CDDO-Me の最大血漿中濃度はそれぞれ 10.2±1.6 及び 32.9±0.6 nM であった (図 1e)。CDDO-Me は投与 24 時間後に血漿から消失した (図 1e)。これらの結果から、CDDO-Me の生体内における肝保護効果を検討するための投与量として、3 mg・kg<sup>-1</sup> 及び 10 mg・kg<sup>-1</sup> を選択した。

### CDDO-Me 投与による CDAHFD 食餌マウスの肝脂肪変性改善作用

CDDO-Me の CDAHFD 食餌マウスにおける肝保護効果を調べるために、CDAHFD 食餌マウスに 3 及び 10 mg・kg<sup>-1</sup> の CDDO-Me を 6 週齢から 8 週間にわたって 1 日 1 回経口投与し、試験最終日に血清と肝臓を採取した (図 2a)。CDAHFD 食餌マウスの肝臓の HE 染色では、白血球浸潤に加えて、大きな脂肪滴と線維化を伴う MASH の顕著な病態を確認した (図 2b)。HE 染色における脂肪滴、小葉の炎症、バルーニングから算出される NAFLD 活性スコア (NAFLD activity score, NAS) は 5 以上であり (補足図 2、補足表 2)、CDAHFD を 8 週間投与した時点で肝臓に MASH が発生していることが示された。この MASH モデルマウスに CDDO-Me を投与したところ、用量依存的に NAS が改善された (図 2c)。NAS と同様に、aspartate aminotransferase (AST)、alanine aminotransferase (ALT) 及び肝臓中 TG を含む生化学的パラメータの増加は、10 mg・kg<sup>-1</sup> の CDDO-Me で有意に減少した (表 1)。CDAHFD 食餌マウスで上昇した炎症性サイトカイン、*Tnfa*、*Ifng*、*IL6*、*IL1B* の肝発現レベルは、CDDO-Me により用量依存的に有意に減少した (図 2d, e、補足図 3a, b)。一方で炎症性サイトカイン TNF $\alpha$ 、IL6 及び IL1 $\beta$  は血中で測定限界以下であった。また、コレステロールの胆汁中への排泄に関与するトランスポーターである ATP Binding Cassette Subfamily G Member 5 (*Abcg5*) (Berge et al., 2000, Tian et al., 2019) 及び脂質生成の抑制酵素である Carboxylesterase 2c (*Ces2c*) 及び *Ces1g* (Lian J et al., 2018) の発現が CDDO-Me の投与により有意に上昇した (図 2f, g、補足図 3c)。オイルレッド O 染色を実施したところ、CDDO-Me は CDAHFD 食餌マウスで著しく増加した脂肪滴の数、及び 20  $\mu$ m 以上の大きな脂肪滴の割合を有意に

抑制した（補足図 4）。これらの結果から、CDDO-ME は、CDAHFD 食餌マウスの肝臓に生じた MASH 病態を顕著に改善することが明らかとなった。

#### **CDDO-Me 投与による MASH マウスの肝臓における抗酸化ストレス作用**

酸化ストレスが MASH への進行に関与することから (Friedman et al., 2018)、CDDO-Me 投与後の CDAHFD 食餌マウスの肝臓におけるマロンジアルデヒド (malondialdehyde, MDA) 量を検討した。CDAHFD 食餌マウスで有意に上昇した MDA は、CDDO-Me の投与によりほぼコントロールレベルに回復した (図 3a)。抗酸化作用に関与する *Nqo1* 及び *Gclc* は、Nrf2 の標的遺伝子として働くことが報告されており、CDDO-Me 投与後の CDAHFD 食餌マウスの肝臓では、*Nqo1* 及び *Gclc* の発現が用量依存的に亢進し (図 3b、c)、タンパク質発現レベルとも一致した (図 3d-f)。これらの観察結果は、CDDO-Me によって発現誘導される抗酸化ストレス関連遺伝子及びタンパク質が、MASH への進行を少なくとも部分的に抑制する可能性があることを示している。

#### **CDDO-Me 投与による MASH マウスの肝線維化阻害作用**

Nrf2 の活性化は、TGF/Smad 経路の抑制を通じて、肝線維化形成と肝星細胞の活性化を抑制することが報告されている (Oh et al., 2012, Prestigiacomo et al., 2018)。CDAHFD 食餌マウスの肝臓は、コントロールと比較して、シリウスレッド染色で検出される線維化の著しい増加、及び  $\alpha$ SMA 染色による肝星細胞の活性化を示し (図 4a)、CDDO-Me 投与はシリウスレッド及び  $\alpha$ SMA 陽性領域の両方を顕著に阻害した (図 4a)。MASH におけるコラーゲンの主要成分である Hydroxyproline の蓄積は、CDDO-Me 投与により、溶媒投与した CDAHFD 食餌マウスと比較して強く抑制された (図 4b)。 *Tgfb* 及び他の線維化マーカー、*Acta2*、*Col1a1*、*Mmp2*、*Mmp9*、*Mmp14* 及び *Timp1* の発現レベルは、CDDO-Me を投与したマウスで用量依存的に抑制された (図 4c-e 及び補足図 5)。  $\alpha$ SMA のタンパク質発現レベルをウエスタンブロットで検討したところ、免疫組織化学データと同様の傾向であった (図 4f、g)。これらの結果から、CDDO-Me は肝線維化形成及び  $\alpha$ SMA の活性化に対して抑制的な作用を有することが示唆された。なおウエスタンブロットの full-length 像は全て補足図 6 に示している。

#### **CDDO-Me を投与した MASH マウスの肝臓を用いた全トランスクリプトーム解析**

CDDO-Me は Nrf2 活性化のみならず、NF- $\kappa$ B や Akt 阻害等、多様なシグナルの制御に関わることから、CDAHFD 誘発 MASH マウスにおける CDDO-Me による肝保護作用のメカニズムを明らかにするために、肝臓における RNA 発現を網羅的に解析した。RNA-seq 解析により検出された 41,326 個の転写産物のうち、2,625 個の遺伝子がコントロールマウスと比較して 1.2 倍以上、有意に MASH マウスで発現上昇していた (図 5a)。CDDO-Me 投与によってアップレギュレートされた 130 遺伝子を用いたパスウェイ解析では、Nrf2 (遺伝子名 *NFE2L2*) を介した酸化ストレス経路及び異種物質代謝関連経路の活性化が示された (補足図 7)。MASH マウス

の発現上昇遺伝子のうち、195 遺伝子の発現が CDD0-Me 投与により 80%以下に有意に低下し (図 5a-c)、CDD0-Me で発現が低下した遺伝子には、補足表 3 に示すように、*C5ar1*、*Cc13*、*Cc14*、*Fcgr1*、*Lilra5*などの白血球関連遺伝子が多く含まれていた。ダウンレギュレートされた 196 遺伝子を用いたパスウェイ解析では、NF- $\kappa$ B 系阻害を介したサイトカインの産生阻害により、白血球のリクルートメントと細胞移動 (図 5d) 及び免疫細胞のトラフィックング (図 5e) のような炎症経路が減少することが示された。CDAHFD 投与マウスはコントロールマウスに対して 167 遺伝子の発現を低下させ (fold change <0.8、p-value<0.05)、167 遺伝子のうち 17 遺伝子の発現のみが CDD0-Me 投与により有意に上昇した (図 5b)。この結果は、炎症細胞におけるリクルートメントの阻害が CDD0-Me の肝保護効果に重要な役割を果たしている可能性を示唆した。

### CDD0-Me を投与した MASH マウスの肝臓におけるマクロファージ浸潤の抑制

CDD0-Me によって制御される炎症細胞を同定するために、白血球サブタイプのマーカー遺伝子の発現をヒートマップで可視化した。マクロファージの代表的なマーカーである *Adgre1* 及び *Cd86* は、MASH マウスで顕著に上昇し、その発現の増加は CDD0-Me 処理によって有意に抑制された (図 6a)。好中球のマーカーである *Ptprc*、*Cxcr4*、*Itgb2* はマクロファージと同様に MASH マウスで上昇したが、CDD0-Me 処理による抑制は弱かった。T 細胞と B 細胞のマーカーはほとんど変化しなかった (図 6a、補足図 8)。肝臓における白血球のサブタイプを確認するために、CDD0-Me で処置した MASH マウスの肝切片を用いて、マクロファージのマーカーである F4/80 及び好中球のマーカーである LY6G 抗体による免疫染色を行った。CDD0-Me の投与により、MASH マウスの肝臓で観察されたマクロファージの数が減少した (図 6b、c)。MASH マウスの肝臓に浸潤した好中球細胞数は比較的少なく、CDD0-Me 存在下では浸潤は半分に減少した (図 6b、d)。M1 及び M2 マクロファージのマーカーは共に MASH マウスで増加したが、CDD0-Me 投与により M1 マクロファージのマーカーの方がより顕著に抑制されており、CDD0-Me による M1 及び M2 マクロファージに対する作用は M1 マクロファージの方がより大きい可能性が示唆された (補足図 9)。CDD0-Me の標的肝マクロファージサブタイプは、以前の報告 (Guilliams et al., 2022) の MASH における scRNA-seq の解析結果に基づくマーカー遺伝子について解析した。単球由来 Kupffer 細胞やパトロール単球等の単球及び単球由来マクロファージのマーカー遺伝子の発現は、MASH 中の肝臓で有意に増加し、この増加は CDD0-Me 投与により抑制された (図 7a、b)。常在 Kupffer 細胞や腹膜マクロファージ等の肝臓組織局在性マクロファージのマーカー遺伝子は、CDD0-Me 投与とは無関係に、MASH 群ではほぼ一定であった (図 7a、b)。代表的なマクロファージサブタイプの局在性を、マーカー遺伝子に対する特異抗体を用いた免疫染色で調べた。脂質関連マクロファージのマーカーである GPNNB はコントロール肝切片では検出されなかったが、MASH では GPNNB 陽性細胞が脂肪滴周辺に存在した (図 7c、d)。CDD0-Me は MASH における脂質関連マクロファージの染色を強く抑制した。単球及びパトロール単球のマーカーである CCR2 及び SPN でそれ

ぞれ染色された細胞数は、MASH で有意に増加し、CDD0-Me 投与により減少した (図 7c、e、f)。これらの細胞は周囲の血管で頻繁に観察された。CLEC4F 陽性細胞は、常在クッパー細胞が正常肝臓全体に広く存在することを示し、その染色性は CDD0-Me 投与とは無関係に、MASH によってわずかに低下した (図 7c、g)。これらの観察結果は、単球由来のマクロファージが血管を通じて肝臓に浸潤していることを示したが、CDD0-Me はその浸潤を効果的に阻害した。

### マクロファージにおける CDD0-Me 処理により制御される遺伝子発現

MASH 病態時に CDD0-Me によって制御されるマクロファージの浸潤に関与する分子を解明するために、CDD0-Me によって制御された遺伝子を用いてネットワーク解析を行った。その結果、CDD0-Me が NF- $\kappa$ B 経路を阻害し (補足図 10)、ケモカインリガンドである CCL4 及びマウス CCL3 に対応するヒト CCL3L3 を介した細胞浸潤の阻害につながることを示唆された (図 8a)。マクロファージの浸潤に関連するケモカイン及びその受容体の発現レベルをヒートマップで可視化した (図 8b)。CDD0-Me は、MASH マウスで増加したケモカインリガンドである *Ccl13*、*Ccl14*、及びそのケモカイン受容体である *Ccr1*、*Ccr5* の発現を顕著に阻害した。代表的なケモカインとその受容体の発現レベルは、定量的 RT-PCR を用いて確認した (補足図 11)。MASH マウスで発現が上昇した CCL3 及び CCL4 の血清中蛋白質量は、CDD0-Me 処理により用量依存的に抑制された (図 8c、d)。このことは、血中に放出されたケモカインリガンドが単球由来マクロファージの遊走因子として機能している可能性を示している。NF- $\kappa$ B サブユニット p50 の核移行は CCL3 及び CCL4 タンパク質の結果と相関し、MASH モデルで亢進し、CDD0-Me 投与により抑制されていた (補足図 12)。CCR1 及び CCR5 陽性細胞数は、MASH 病態では血管周囲で増加し、CDD0-Me 存在下ではほとんど消失した (図 8e-g)。公開されているデータセット (<https://www.livercellatlas.org/>) の scRNA-seq データを用いた解析から、*Ccl13* とその受容体 *Ccr1* は単球/マクロファージと好中球で発現し、*Ccl14* とその受容体 *Ccr5* はマクロファージ/単球とクッパー細胞で検出されることが示唆された (補足図 13)。CCR1 及び CCR5 を発現する細胞は、単球マーカーである CCR2 を発現する細胞と一致し (図 8h)、単球由来のマクロファージで発現する CCR1 及び CCR5 が CDD0-Me によって制御されていることが示された。免疫染色で得られた結果を確認するため、フローサイトメトリーにより肝マクロファージを分析した。CCR1 又は CCR5 を発現する CCR2 陽性単球が MASH マウスの肝臓中で検出され、それらの単球浸潤は CDD0-Me 投与で有意に阻害された。脂質関連マクロファージとパトロール単球の小分画が MASH マウスの肝臓で検出され、これらの細胞の浸潤も CDD0-Me 投与で阻害された。CLEC4F を高発現するクッパー細胞の数はサンプル間で変化しなかったが、CLEC4F を低発現するクッパー細胞の数は MASH マウスで増加した。(未発表の観察結果)。これらの観察結果は、免疫染色の結果とほぼ一致していた。CDD0-Me がケモカイン受容体及びリガンドの発現制御に直接関与しているかどうかを調べるために、CDD0-Me 処理後の RAW264.7 マウスマクロファージ細胞株におけるそれらの発現レベルを測定した。



CDDO-Me は RAW264.7 細胞において *Ccr1* と *Ccr5* の発現を阻害し、同時にこれらの受容体のリガンドである *Cc13* と *Cc14* も用量依存的に阻害した (図 8i-1)。RAW264.7 細胞からの CCL3 及び CCL4 の産生は、濃度依存的に CDDO-Me 処理により有意に阻害された (補足図 14a、b)。CCR5 及び CCR1 タンパク質発現は、CDDO-Me 処理 24 時間後にわずかに阻害されただけであったことから、CCR1 及び CCR5 タンパク質レベルを低下させるには 24 時間以上の処理が必要であることが示唆された。NF- $\kappa$ B 活性化につながる I $\kappa$ B $\alpha$  リン酸化は、CDDO-Me 処理により阻害され、これは CCR1 及び CCR5 の mRNA 発現の結果と相関した (補足図 14c-g)。以上のことから、CDDO-Me は、MASH マウスのマクロファージにおける CCL3-CCR1 及び CCL4-CCR5 軸を直接阻害し、単球由来マクロファージの遊走阻止を介して MASH の病態改善に寄与することが示唆された。

## 【考察】

我々は、Nrf2 の強力な活性化剤である CDDO-Me が、Nrf2 依存性経路を活性化することに加えて、CDAHFD 食餌マウスの脂肪蓄積と線維化を伴う MASH を劇的に改善し、血管からの単球由来マクロファージの浸潤を顕著に抑制することを示した。本研究において、MASH モデルマウスにおいて制御された遺伝子から、マクロファージの浸潤誘導に関与する CCL3-CCR1 及び CCL4-CCR5 軸が、CDDO-Me の新規ターゲットとして同定された。CDAHFD 食餌マウスで MAFLD が発症し、投与後 8 週間で炎症と肝障害を伴う MASH に進行した。MASH マウスに CDDO-Me を投与すると、脂肪蓄積、炎症、肝細胞障害から算出される NAS が改善した。MASH の進行を制御する CDDO-Me の分子標的を同定するために、MASH マウスの肝臓を用いて全トランスクリプトーム解析を行った。CDDO-Me で処理した MASH マウスで発現上昇した遺伝子は、NFE2L2 (Nrf2 の遺伝子名) に由来する Nrf2 関連の酸化ストレス応答の活性化を示し、CDDO-Me で制御された遺伝子は Nrf2 の活性化によって媒介されたことが示された。この結果は、我々の定量的 RT-PCR データ及び Nrf2 活性化の下流因子を分析した先行研究 (Tonelli et al., 2018) と一致していた。MASH 肝臓における CDDO-Me 存在下での発現遺伝子を用いたパルスウェイ解析により、CDDO-Me が免疫細胞の浸潤を制御していることが示され、これは免疫組織化学的観察により確認された。免疫細胞の内、MASH では多数のマクロファージ/単球が検出され、CDDO-Me 処理によって著しく減少したが、リンパ球の浸潤には影響しなかった。ケモカインとサイトカインを放出する肝マクロファージは、MAFLD から MASH の進行に重要であり、炎症と線維化を引き起こすことが知られている (Tacke et al., 2023)。MASH のマクロファージ/単球には、異なる機能を持つサブタイプが存在し、これらのサブタイプの分類は、マクロファージにおける遺伝子発現の多様性に基づいている (Daemen et al., 2021)。過去の報告で、scRNA-seq を用いて分類された MASH モデルの肝マクロファージには 7 つのサブタイプがあり、すなわち脂質関連マクロファージ、単球、パトロール単球、中心静脈とカプセルマクロファージ、単球由来 Kupffer 細胞、常在 Kupffer 細胞、腹膜マクロファージである (Guilliams et al., 2022)。これらのサブタイプの局在を調べるために、肝臓内の他の細胞では発現しないサブタイプ特異的の遺伝子をマーカー遺伝子として選択した。単球及び単球由来マクロファージ、すなわち脂質関連マクロファージ、単球、パトロール単球、中心静脈とカプセルマクロファージ、単球由来 Kupffer 細胞は MASH 中に増加し、CDDO-Me によって抑制されたが、組織内に局在する常在 Kupffer 細胞及び腹膜マクロファージは不変か、わずかな増加であった。マクロファージサブタイプ特異的なマーカーの抗体による染色では、脂質関連マクロファージ、単球、パトロール単球が MASH 肝臓において血管内腔からディッセの空間に浸潤しており、CDDO-Me 投与後には血管を取り囲んでいたマクロファージが消失していた。これらの所見は、CDDO-Me の主要な標的が骨髄からのマクロファージ/単球の浸潤であることを示している。常在 kupffer 細胞のマーカーは肝臓全体で散在して検出され、CDDO-Me 処理に影響されなかった。Krenkel らは、単球由来マクロファージが MASH の線維化進行に関与する様々な成長因子やサイトカインを特異的に活性化することを示した

(Krenkel et al., 2018)。CDD0-Me によるマクロファージの浸潤阻害は、以下の観点から主に CCL3-CCR1 及び CCL4-CCR5 軸によって媒介されると考えられた。一つ目は、CDD0-Me によってダウンレギュレートされた遺伝子を用いたパスウェイ解析では、CCL3 と CCL4 がネットワークに含まれる食細胞浸潤の減少が示されたことである。二つ目は、CCL3 と CCL4 は MASH 病態時において血中に放出され、血清 CCL3 と CCL4 レベルは CDD0-Me 存在下でコントロールと同じ量に戻っていたことである。三つ目は、CCL3 の受容体である CCR1 と CCL4 の受容体である CCR5 は、MASH 中に浸潤した単球に局在していたことである。そして最後に、CDD0-Me はマウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 において、*Ccl3-Ccr1* 及び *Ccl4-Ccr5* の発現を用量依存的に直接阻害したことである。MAFLD モデルマウスにおいて、CCL3 欠損は M2 マクロファージに関連した脂肪症と線維症を減弱させることが報告されている (Xu et al., 2021)。また CCR5 は、CCR5 欠損マウスにおいて、脂肪組織へのマクロファージ浸潤とそれに続くインスリン抵抗性を決定的に減少させることが知られている (Kitade et al., 2012)。さらに CCL2、CCL3、CCL4、及び CCL5 は、MAFLD/MASH に関連するケモカインとして過去に同定されている (Marra et al., 2014)。我々は CDD0-Me が CCL2 を除くこれらのケモカインの発現を阻害することを見出した。CCL2 を欠失させたマウスは、高脂肪食によって生じる肝脂肪症と脂肪組織へのマクロファージ蓄積を広範囲に抑制するが (Kanda et al., 2006)、CCL2 欠損マウスは肥満におけるマクロファージの浸潤には影響を示さない (Inouye et al., 2007)。CCL2 の受容体である CCR2 を欠失させた肥満マウスは、脂肪症の改善とグルコースホメオスタシスの改善を示し (Weisberg et al., 2006)、CCR2 拮抗薬を用いた試験結果 (Tamura et al., 2010) と一致することから、MASH の進行の治療には、CCL2 よりもむしろ CCR2 を阻害することがより効果的であることが示された。CCR2 の発現は CDD0-Me の存在下で有意に低下し、MASH におけるマクロファージ浸潤を効率的に抑制した。上流の経路の解析から、CCL3 と CCL4 は CDD0-Me の標的でもある NF- $\kappa$ B によって制御されていることが示された。Ahmad らは、CDD0-Me が IKK $\beta$  上の Cys-179 と直接結合し、U937 骨髄性白血病細胞において NF- $\kappa$ B 経路の阻害を引き起こすことを報告した (Ahmad et al., 2006)。IKK $\beta$  阻害は下流の I $\kappa$ B $\alpha$  のリン酸化の阻害、すなわち NF- $\kappa$ B 経路の阻害に繋がる。マクロファージ特異的な NF- $\kappa$ B 活性化は多くの炎症性疾患に関与していることから (Mussbacher, Derler, Basilio, & Schmid., 2023)、NF- $\kappa$ B 経路に対する CDD0-Me の阻害作用は主に骨髄系細胞で働くと考えられる。血液と骨髄中の CCR2 陽性単球は CCR1 と CCR5 を発現している。CDD0-Me を投与すると、血液及び骨髄中の CCR2 陽性単球数が減少したことから、CDD0-Me が骨髄における単球の分化とアポトーシスを制御している可能性が示唆された (未発表の観察結果)。公開されている MAFLD モデルの scRNA-seq データから、CCR5 は主にマクロファージ/単球で発現し、CCR1 は好中球と単球で発現することが示された (補足図 13)。好中球の浸潤は MAFLD から MASH の初期段階でしばしば観察され (Herero-Cervera et al., 2022)、CCL3-CCR1 軸は好中球や単球を介して疾患の初期段階の進行に関与している可能性がある。CDD0-Me は、MASH の初期には CCR1 を介して好中球の浸潤を抑制し、MASH の後期には CCR5 を発現

するマクロファージ/単球の浸潤を調節する可能性があり、これにより疾患の進行を効率的に抑制できると考えられる。ケモカイン CCL3 及び CCL4 は MASH 肝マクロファージで増加し、食細胞のケモカインレセプター CCR1 及び CCR5 を刺激し、オートクライン/パラクライン機構を介してマクロファージからの CCL3 及び CCL4 の放出を増強する (Fahey et al., 1992)。CDDO-Me によるケモカインとそのレセプターの阻害は、様々な組織のマクロファージにおける慢性炎症性疾患の阻止に役立つ可能性があり、例えば、臨床試験において CDDO-Me は 2 型糖尿病を伴う慢性腎臓病を有意に改善した。CDDO-Me はまた、マウスにおける高脂肪食誘発結腸炎症及び放射線誘発肺炎を改善する。CCR1 又は CCR5 に対する抗体の MASH 発症に対する効果を予備的に検討したが、抗 CCR1 抗体は NAS に影響を与えなかったが、抗 CCR5 抗体投与で MASH に対する弱い予防効果が観察された。これらの抗体の MASH に対する治療効果については、投与量を含む実験条件についてさらなる検討を行う必要がある (未発表の観察結果)。CDDO-Me の新規な薬理作用としてケモカインとその受容体が関与するオートクライン/パラクライン機構を介したマクロファージの浸潤阻害が示唆された。様々な医薬品の薬理的標的を解明するために、全トランスクリプトーム解析が有用であると考えられた。なお本研究では CDAHFD 食餌と CDDO-Me 投与を同時に開始しており、予防効果の検証に留まっている。今後、CDAHFD 食餌により MASH がある程度進展したマウスへの CDDO-Me 投与による治療効果の検証が必要と考えられた。本研究により上記 Nrf2 を介する肝保護効果に加え、CCL3-CCR1 及び CCL4-CCR5 軸の阻害を介したマクロファージ浸潤の減少というメカニズムにより MASH マウスモデルにおける CDDO-Me 予防投与の強力な肝保護効果が実証された。

## 【謝辞】

本研究にあたり、指導教官として終始熱心にご指導賜りました山口大学大学院医学系研究科大学研究推進機構遺伝子実験施設 水上 洋一教授に深甚なる謝意を表します。また同施設にてご指導を賜りました渡邊 健司先生、諫山 慧士朗先生に心より拝謝申し上げます。また技術的支援をして頂いた中谷 祐子氏、中川 真喜子氏、近藤 紀子氏、栗原 小百合氏及び有益な議論を頂いた米田 健治氏に深謝いたします。本研究の一部は、文部科学省最先端研究基盤共用促進事業 (基盤施設整備支援プログラム)、助成番号 JPMXS0440400021-23 の研究設備を使用しました。RNA-seq 及び免疫組織化学的解析は、山口大学学術研究センター遺伝子実験施設のサポートを受けました。

## 【参考文献】

- Ahmad, R., Raina, D., Meyer, C., Kharbanda, S., & Kufe, D. (2006) . Triterpenoid CDDO-Me blocks the NF-kappaB pathway by direct inhibition of IKKbeta on Cys-179. *J Biol Chem*, 281 (47) , 35764-35769. doi:10.1074/jbc.M607160200
- Bataille, A. M., & Manautou, J. E. (2012) . Nrf2: a potential target for new therapeutics in liver disease. *Clin Pharmacol Ther*, 92 ( 3 ) , 340-348. doi:10.1038/clpt.2012.110
- Bellentani, S. (2017) . The epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int*, 37 Suppl 1, 81-84. doi:10.1111/liv.13299
- Berge, K. E., Tian, H., Graf, G. A., Yu, L., Grishin, N. V., Schultz, J., ... Hobbs, H. H. (2000) . Accumulation of dietary cholesterol in sitosterolemia caused by mutations in adjacent ABC transporters. *Science*, 591 290 (5497) , 1771-1775. doi:10.1126/science.290.5497.1771
- Chin, M. P., Bakris, G. L., Block, G. A., Chertow, G. M., Goldsberry, A., Inker, L. A., ... Meyer, C. J. (2018) . Bardoxolone Methyl Improves Kidney Function in Patients with Chronic Kidney Disease Stage 4 and Type 2 Diabetes: Post-Hoc Analyses from Bardoxolone Methyl Evaluation in Patients with Chronic Kidney Disease and Type 2 Diabetes Study. *Am J Nephrol*, 47 (1) , 40-47. doi:10.1159/00048639832
- Chowdhry, S., Nazmy, M. H., Meakin, P. J., Dinkova-Kostova, A. T., Walsh, S. V., Tsujita, T., ... Hayes, J. D. (2010) . Loss of Nrf2 markedly exacerbates nonalcoholic steatohepatitis. *Free Radic Biol Med*, 48 ( 2 ) , 357-371. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2009.11.007
- Cleasby, A., Yon, J., Day, P. J., Richardson, C., Tickle, I. J., Williams, P. A., ... Davies, T. G. (2014) . Structure of the BTB domain of Keap1 and its interaction with the triterpenoid antagonist CDDO. *PLoS One*, 9 ( 6 ) , e98896. doi:10.1371/journal.pone.0098896
- Daemen, S., Gainullina, A., Kalugotla, G., He, L., Chan, M. M., Beals, J. W., ... Schilling, J. D. (2021) . Dynamic Shifts in the Composition of Resident and Recruited Macrophages Influence Tissue Remodeling in MASH. *Cell Rep*, 34 (2) , 108626.

doi:10.1016/j.celrep.2020.108626

Fahey, T. J., 3rd, Tracey, K. J., Tekamp-Olson, P., Cousens, L. S., Jones, W. G., Shires, G. T., ... Sherry, B. (1992) . Macrophage inflammatory protein 1 modulates macrophage function. *J Immunol*, 148 (9) , 2764-2769.

Friedman, S. L., Neuschwander-Tetri, B. A., Rinella, M., & Sanyal, A. J. (2018) . Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies. *Nat Med*, 24 (7) , 908-922. doi:10.1038/s41591-018-0104-9

Guilliams, M., Bonnardel, J., Haest, B., Vanderborght, B., Wagner, C., Remmerie, A., ... Scott, C. L. (2022) . Spatial proteogenomics reveals distinct and evolutionarily conserved hepatic macrophage niches. *Cell*, 185 (2) , 379-396.e338. doi:10.1016/j.cell.2021.12.018

Herrero-Cervera, A., Soehnlein, O., & Kenne, E. (2022) . Neutrophils in chronic inflammatory diseases. *Cell Mol Immunol*, 19 (2) , 177-191. doi:10.1038/s41423-021-00832-3

Inouye, K. E., Shi, H., Howard, J. K., Daly, C. H., Lord, G. M., Rollins, B. J., & Flier, J. S. (2007) . Absence of CC chemokine ligand 2 does not limit obesity-associated infiltration of macrophages into adipose tissue. *Diabetes*, 56 (9) , 2242-2250. doi:10.2337/db07-0425

Itoh, M., Kato, H., Suganami, T., Konuma, K., Marumoto, Y., Terai, S., ... Ogawa, Y. (2013) . Hepatic crown-like structure: a unique histological feature in non-alcoholic steatohepatitis in mice and humans. *PLoS One*, 8 (12) , e82163. doi:10.1371/journal.pone.0082163

Kanda, H., Tateya, S., Tamori, Y., Kotani, K., Hiasa, K., Kitazawa, R., ... Kasuga, M. (2006) . MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J Clin Invest*, 116 (6) , 1494-1505. doi:10.1172/JCI26498

Kitade, H., Sawamoto, K., Nagashimada, M., Inoue, H., Yamamoto, Y., Sai, Y., ... Ota, T. (2012) . CCR5 plays a critical role in obesity-induced adipose tissue

inflammation and insulin resistance by regulating both macrophage recruitment and M1/M2 status. *Diabetes*, 61 (7) , 1680-1690. doi:10.2337/db11-1506

Kleiner, D. E., Brunt, E. M., Van Natta, M., Behling, C., Contos, M. J., Cummings, O. W., ... Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research, N. (2005) . Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, 41 (6) , 1313-1321. doi:10.1002/hep.20701

Kohno, M., Kobayashi, S., Yamamoto, T., Yoshitomi, R., Kajii, T., Fujii, S., ... Yano, M. (2020) . Enhancing calmodulin binding to cardiac ryanodine receptor completely inhibits pressure-overload induced hypertrophic signaling. *Commun Biol*, 3 (1) , 714. doi:10.1038/s42003-020-01443-w

Konopleva, M., Tsao, T., Ruvolo, P., Stiouf, I., Estrov, Z., Leysath, C. E., ... Andreeff, M. (2002) . Novel triterpenoid CDDO-Me is a potent inducer of apoptosis and differentiation in acute myelogenous leukemia. *Blood*, 99 (1) , 326-335. doi:10.1182/blood.v99.1.326

Krenkel, O., Puengel, T., Govaere, O., Abdallah, A. T., Mossanen, J. C., Kohlhepp, M., ... Tacke, F. (2018) . Therapeutic inhibition of inflammatory monocyte recruitment reduces steatohepatitis and liver fibrosis. *Hepatology*, 67 (4) , 1270-1283. doi:10.1002/hep.29544

Lian, J., Nelson, R., & Lehner, R. (2018) . Carboxylesterases in lipid metabolism: from mouse to human. *Protein Cell*, 9 (2) , 178-195. doi:10.1007/s13238-017-0437-z

Marra, F., & Tacke, F. (2014) . Roles for chemokines in liver disease. *Gastroenterology*, 147 (3) , 577-594. e571. doi:10.1053/j.gastro.2014.06.043

Matsumoto, M., Hada, N., Sakamaki, Y., Uno, A., Shiga, T., Tanaka, C., ... Sudoh, M. (2013) . An improved mouse model that rapidly develops fibrosis in non-alcoholic steatohepatitis. *Int J Exp Pathol*, 94 (2) , 93-103. doi:10.1111/iep.12008

Mussbacher, M., Derler, M., Basílio, J., & Schmid, J. A. (2023) . NF- $\kappa$ B in monocytes and macrophages - an inflammatory master regulator in multitasking immune cells. *Front Immunol*, 14, 1134661.

doi:10.3389/fimmu.2023.1134661

Muto, J., Fukuda, S., Watanabe, K., Dai, X., Tsuda, T., Kiyoi, T., ... Sayama, K. (2023). Highly concentrated trehalose induces prohealing senescence-like state in fibroblasts via CDKN1A/p21. *Commun Biol*, 6 (1), 13. doi:10.1038/s42003-022-04408-3

Oh, C. J., Kim, J. Y., Min, A. K., Park, K. G., Harris, R. A., Kim, H. J., & Lee, I. K. (2012). Sulforaphane attenuates hepatic fibrosis via NF-E2-related factor 2-mediated inhibition of transforming growth factor  $\beta$ /Smad signaling. *Free Radic Biol Med*, 52 (3), 671-682. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2011.11.012

Ota, K., Komuro, A., Amano, H., Kanai, A., Ge, K., Ueda, T., & Okada, H. (2019). High Fat Diet Triggers a Reduction in Body Fat Mass in Female Mice Deficient for Utx demethylase. *Sci Rep*, 9 (1), 10036. doi:10.1038/s41598-019-46445-9

Park, E. J., Min, H. Y., Park, H. J., Chung, H. J., Ahn, Y. H., Pyee, J. H., & Lee, S. K. (2011). Nuclear factor E2 related factor 2-mediated induction of NAD (P) H:quinone oxidoreductase 1 by 3,5-dimethoxy-trans-stilbene. *J Pharmacol Sci*, 116 (1), 89-96. doi:10.1254/jphs.11024fp

Prestigiaco, V., & Suter-Dick, L. (2018). Nrf2 protects stellate cells from Smad-dependent cell activation. *PLoS One*, 13 (7), e0201044. doi:10.1371/journal.pone.0201044

Remmerie, A., Martens, L., Thone, T., Castoldi, A., Seurinck, R., Pavie, B., ... Scott, C. L. (2020). Osteopontin Expression Identifies a Subset of Recruited Macrophages Distinct from Kupffer Cells in the Fatty Liver. *Immunity*, 53 (3), 641-657 e614. doi:10.1016/j.immuni.2020.08.004

Resham, K., Patel, P. N., Thummuri, D., Guntuku, L., Shah, V., Bambal, R. B., & Naidu, V. G. (2015). Preclinical drug metabolism and pharmacokinetics of salinomycin, a potential candidate for targeting human cancer stem cells. *Chem Biol Interact*, 240, 146-152. doi:10.1016/j.cbi.2015.08.007

Seidman, J. S., Troutman, T. D., Sakai, M., Gola, A., Spann, N. J., Bennett, H.,



... Glass, C. K. (2020) . Niche-Specific Reprogramming of Epigenetic Landscapes Drives Myeloid Cell Diversity in Nonalcoholic Steatohepatitis. *Immunity*, 52 (6) , 1057-1074 e1057. doi:10.1016/j.immuni.2020.04.001

Seki, E., De Minicis, S., Gwak, G. Y., Kluwe, J., Inokuchi, S., Bursill, C. A., ... Schwabe, R. F. (2009) . CCR1 and CCR5 promote hepatic fibrosis in mice. *J Clin Invest*, 119 (7) , 1858-1870. doi:10.1172/jci37444

Sharma, R. S., Harrison, D. J., Kisielewski, D., Cassidy, D. M., McNeilly, A. D., Gallagher, J. R., ... Hayes, J. D. (2018). Experimental Nonalcoholic Steatohepatitis and Liver Fibrosis Are Ameliorated by Pharmacologic Activation of Nrf2 (NF-E2 p45-Related Factor 2) . *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 5 (3) , 367-398. 41678 doi:10.1016/j.jcmgh.2017.11.016

Shimozono, R., Asaoka, Y., Yoshizawa, Y., Aoki, T., Noda, H., Yamada, M., ... Mochizuki, H. (2013) . Nrf2 activators attenuate the progression of nonalcoholic steatohepatitis-related fibrosis in a dietary rat model. *Mol Pharmacol*, 84 (1) , 62-70. doi:10.1124/mol.112.084269

Suh, N., Wang, Y., Honda, T., Gribble, G. W., Dmitrovsky, E., Hickey, W. F., ... Sporn, M. B. (1999) . A novel synthetic oleanane triterpenoid, 2-cyano-3,12-dioxolean-1,9-dien-28-oic acid, with potent differentiating, antiproliferative, and anti-inflammatory activity. *Cancer Res*, 59 (2) , 336-341.

Suzuki, T., & Yamamoto, M. (2017) . Stress-sensing mechanisms and the physiological roles of the Keap1-Nrf2 system during cellular stress. *J Biol Chem*, 292 (41) , 16817-16824. doi:10.1074/jbc.R117.800169

Tacke, F., Puengel, T., Loomba, R., & Friedman, S. L. (2023) . An integrated view of anti-inflammatory and antifibrotic targets for the treatment of MASH. *J Hepatol*, 79 (2) , 552-566. doi:10.1016/j.jhep.2023.03.038

Tamura, Y., Sugimoto, M., Murayama, T., Minami, M., Nishikaze, Y., Ariyasu, H., ... Arai, H. (2010) . C-C chemokine receptor 2 inhibitor improves diet-induced development of insulin resistance and hepatic steatosis in mice. *J Atheroscler Thromb*, 17 (3) , 219-228. doi:10.5551/jat.3368

- Tessari, P., Coracina, A., Cosma, A., & Tiengo, A. (2009). Hepatic lipid metabolism and non-alcoholic fatty liver disease. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 19 (4) , 291-302. doi:10.1016/j.numecd.2008.12.015
- Tian, C., Gao, L., Zhang, A., Hackfort, B. T., & Zucker, I. H. (2019). Therapeutic Effects of Nrf2 Activation by Bardoxolone Methyl in Chronic Heart Failure. *J Pharmacol Exp Ther*, 371 (3) , 642-651. doi:10.1124/jpet.119.261792
- Tonelli, C., Chio, I. I. C., & Tuveson, D. A. (2018). Transcriptional Regulation by Nrf2. *Antioxid Redox Signal*, 29 (17) , 1727-1745. doi:10.1089/ars.2017.7342
- Tran, T. A., McCoy, M. K., Sporn, M. B., & Tansey, M. G. (2008). The synthetic triterpenoid CDDO-methyl ester modulates microglial activities, inhibits TNF production, and provides dopaminergic neuroprotection. *J Neuroinflammation*, 5, 14. doi:10.1186/1742-2094-5-14
- Weisberg, S. P., Hunter, D., Huber, R., Lemieux, J., Slaymaker, S., Vaddi, K., ... Ferrante, A. W., Jr. (2006). CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding. *J Clin Invest*, 116 (1) , 115-124. doi:10.1172/jci24335
- Xu, L., Chen, Y., Nagashimada, M., Ni, Y., Zhuge, F., Chen, G., ... Nagata, N. (2021). CC chemokine ligand 3 deficiency ameliorates diet-induced steatohepatitis by regulating liver macrophage recruitment and M1/M2 status in mice. *Metabolism*, 125, 154914. doi:10.1016/j.metabol.2021.154914
- Yoshimoto, K., & Shinya, M. (2022). Use of the Azure Kinect to measure foot clearance during obstacle crossing: A validation study. *PLoS One*, 17 (3) , e0265215. doi:10.1371/journal.pone.0265215
- Zhang, Y. K., Yeager, R. L., Tanaka, Y., & Klaassen, C. D. (2010). Enhanced expression of Nrf2 in mice attenuates the fatty liver produced by a methionine- and choline-deficient diet. *Toxicol Appl Pharmacol*, 245 (3) , 326-334. doi:10.1016/j.taap.2010.03.016

【図表】

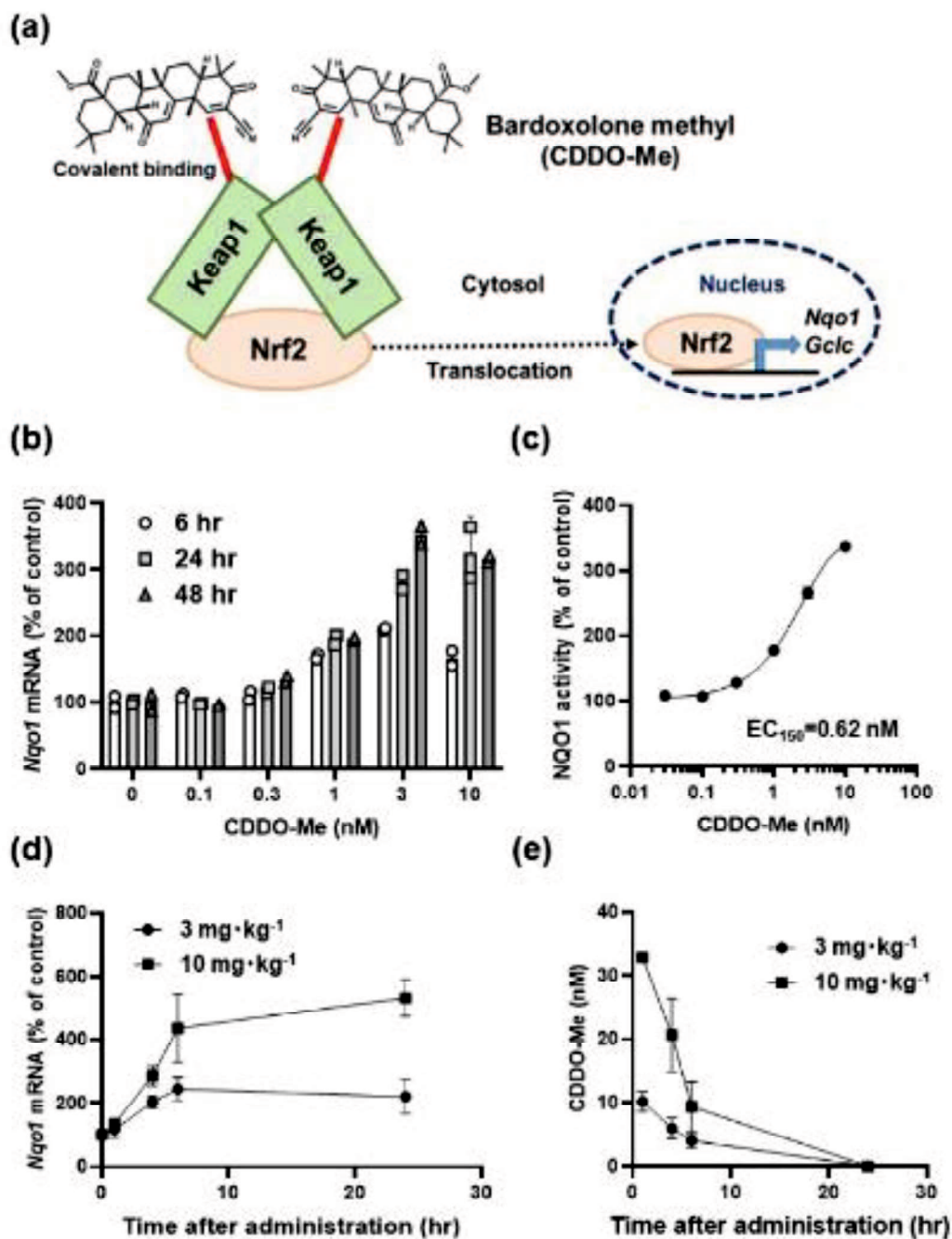


図 1. CDDO-Me は肝臓における Nqo1 の発現及び活性を誘導する。

(a) CDDO-Me による Nrf2 活性化メカニズム。(b) マウス肝細胞株 Hepa1c1c7 における CDDO-Me 処理 6、24、48 時間後における *Nqo1* mRNA 発現 (mean±S.D., duplicate)。(c) マウス肝細胞株 Hepa1c1c7 における CDDO-Me 処理 48 時間後における NQO1 酵素活性 (mean±S.D., triplicate)。(d, e) C57BL/6J マウスへ CDDO-Me を 3、10 mg/kg 経口投与後の肝臓中における *Nqo1* mRNA 発現の経時変化及びその時の血中濃度 (mean±S.D., triplicate)。

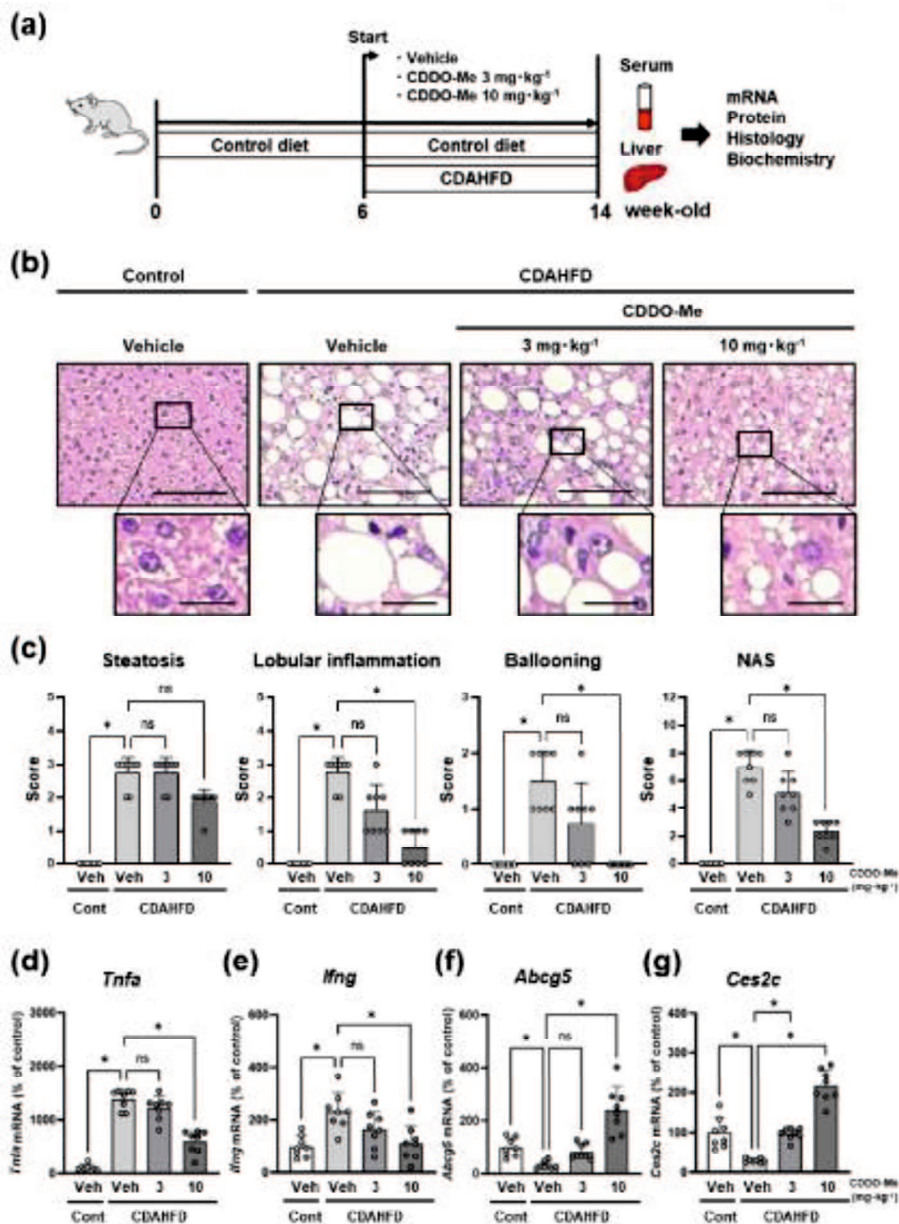


図2. CDDO-Me は CDAHFD 食餌 MASH マウスモデルの MASH 病態を改善する。

(a) CDAHFD 食餌 MASH マウスモデルを用いた CDDO-Me の予防効果試験の概要。(b) 肝切片の代表的な HE 染色像。スケールバーは低倍率では 100 μm、高倍率では 20 μm を示す。(c) HE 染色像からの脂肪滴、炎症、バルーニングの各定量スコアとそれらを合計した MASH activity score (NAS) (mean+S.D., n=8)。有意差検定はノンパラメトリック Kruskal-Wallis 検定及び Dunn-Bonferroni 多重比較検定により実施した (\*P<0.05; versus vehicle-treated CDAHFD-fed mice, mean+S.D., n=8)。(d-g) 肝臓中の *Tnfa* (d)、*Ifng* (e)、*Abcg5* (f)、*Ces2c* (g) の mRNA 発現 (mean+S.D., n=8)。有意差検定は Dunnett の多重比較検定により実施した (\*P<0.05; versus vehicle-treated CDAHFD-fed mice)。ns は not significant、Con は Control、Veh は vehicle を示す。

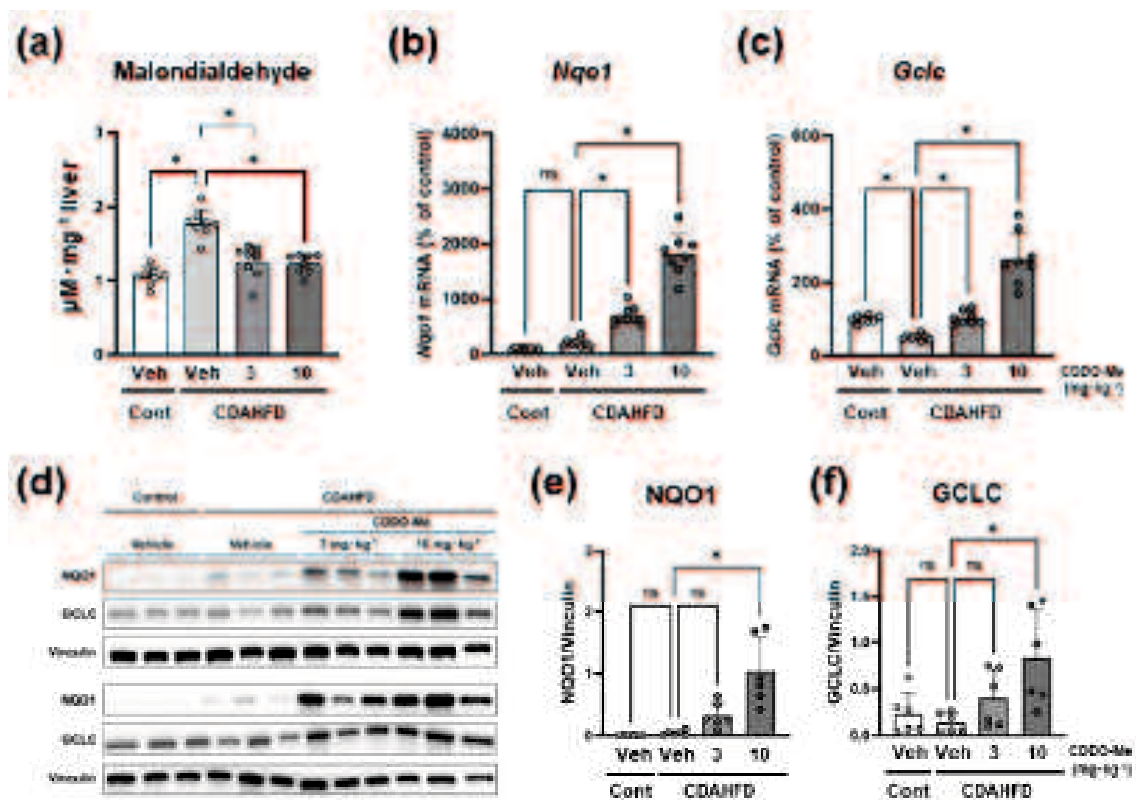


図3. CDDO-MeはCDAHFD食餌MASHマウスモデルの酸化ストレスを抑制する。

(a) 肝ホモジェネート中の Malondialdehyde 量 (mean+S.D., n=8)。 (b, c) 肝臓中の *Nqo1* (b) 及び *Gclc* (c) の mRNA 発現 (mean+S.D., n=8)。 (d) 肝ホモジェネートを用いた抗 NQO1 抗体、抗 GCLC 抗体及び抗 Vinculin 抗体によるウエスタンブロッティング像。 (e, f) (d) の各バンドを Vinculin のバンドで補正後の定量結果 (mean+S.D., n=6)。有意差検定は Dunnett の多重比較検定により実施した (\* $P < 0.05$ ; versus vehicle-treated CDAHFD-fed mice)。ns は not significant、Con は Control、Veh は vehicle を示す。

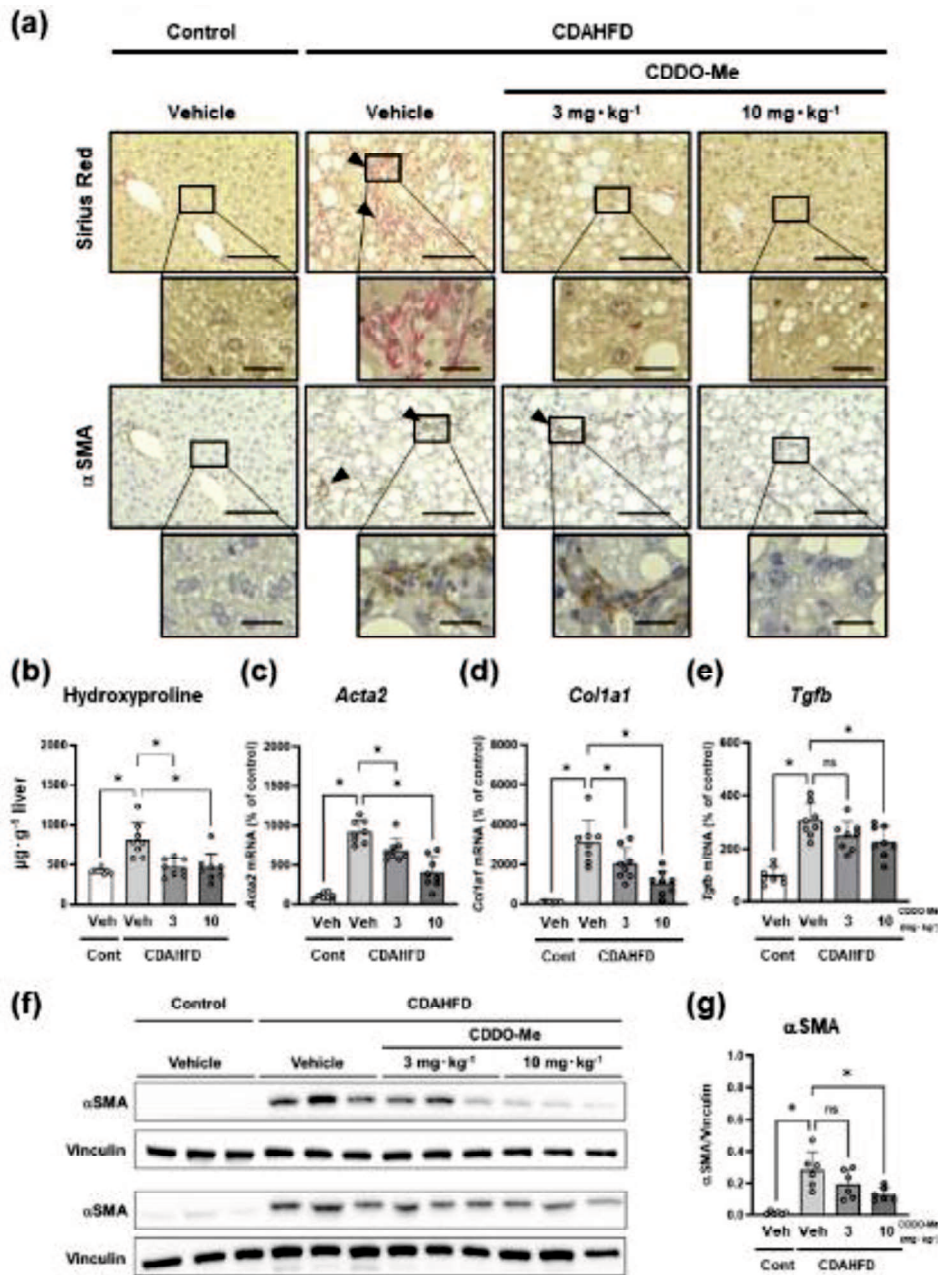


図4. CDDO-MeはCDAHFD食餌MASHマウスモデルの肝線維化を抑制する。

(a) 肝切片の代表的なシリウスレッド染色及び抗 $\alpha$ SMA抗体による免疫染色像。スケールバーは低倍率では100 $\mu$ m、高倍率では20 $\mu$ mを示す。(b) 肝臓中Hydroxyproline量(mean+S.D., n=8)。(c-e) 肝臓中のActa2(c)、Col1a1(d)及びTgfb(e)のmRNA発現(mean+S.D., n=8)。(f) 肝ホモジェネートを用いた抗 $\alpha$ SMA抗体及び抗Vinculin抗体によるウエスタンブロットティング像。(g) (f)の $\alpha$ SMAのバンドをVinculinのバンドで補正後の定量結果(mean+S.D., n=6)。有意差検定はDunnettの多重比較検定により実施した(\* $P$ <0.05; versus vehicle-treated CDAHFD-fed mice)。nsはnot significant、ConはControl、Vehはvehicleを示す。

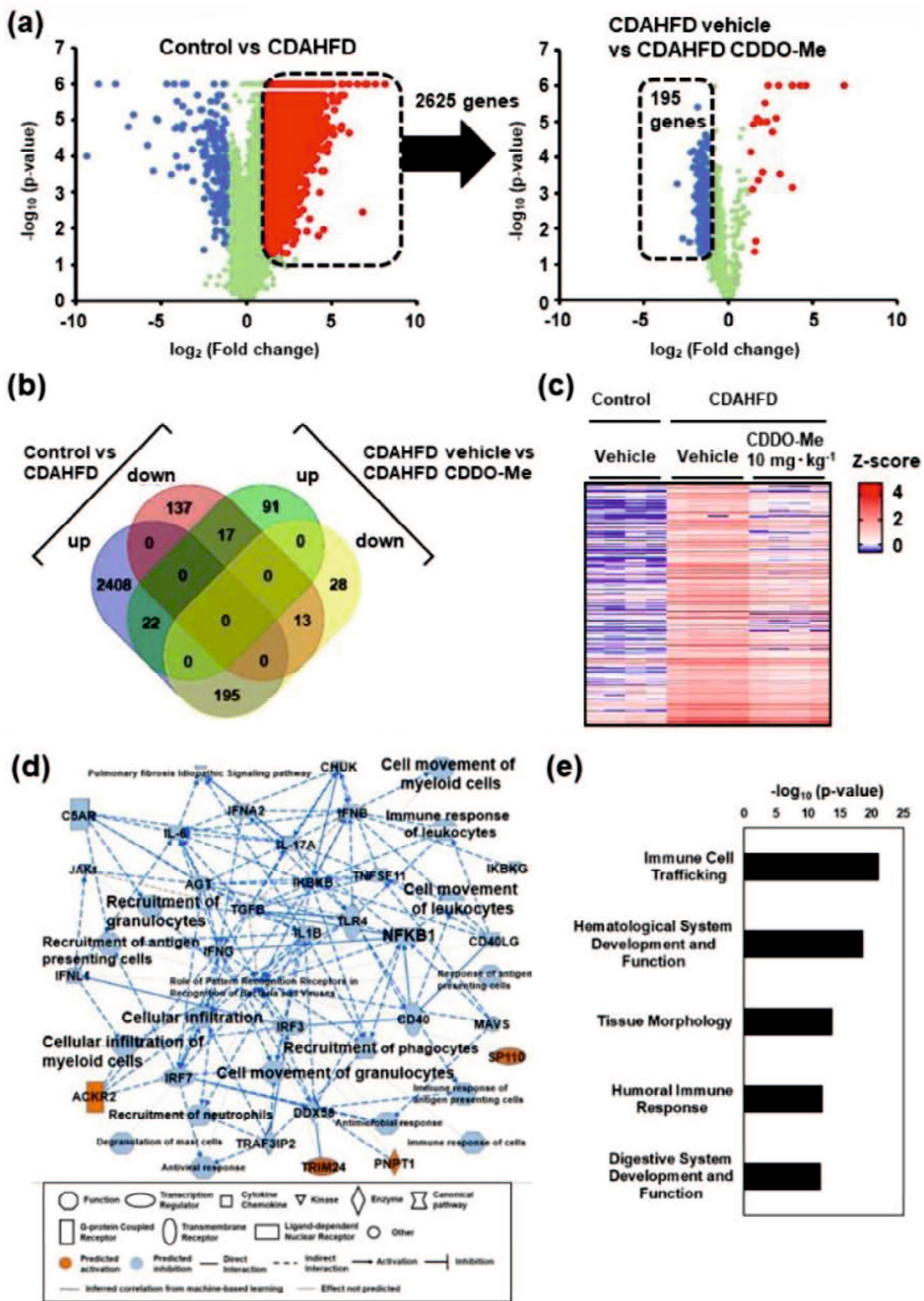


図5. トランスクリプトーム解析により CDDO-Me の MASH 病態改善作用には、炎症性細胞のリクルートメントが関与している可能性が示唆される。

(a) 左のボルケーノプロットの内、赤色で示した 2625 遺伝子及び青色で示した 167 遺伝子は Control マウスに比べて溶媒投与 CDAHFD 食餌マウスで  $p < 0.05$ 、 $\text{Fold change} > |1.2|$  でそれぞれ増加もしくは低下した遺伝子群を示している。右のボルケーノプロットでは、左のボルケーノプロットの赤色の 2625 遺伝子の内、CDDO-Me を投与した CDAHFD 食餌マウスで溶媒投与 CDAHFD 食餌マウスに比べて、 $p < 0.05$ 、 $\text{Fold change} > |1.2|$  で増加した 22 遺伝子群を赤色で、低下した 195 遺伝子群を青色で示している。(b) Control マウスに比べて溶媒投与 CDAHFD 食餌マウスで  $p < 0.05$ 、 $\text{Fold change} > |1.2|$  で増加もしくは低下した遺伝子群と CDDO-Me を投与した CDAHFD 食餌マウスで溶媒投与 CDAHFD 食餌マウスに比べて、 $p < 0.05$ 、 $\text{Fold change} > |1.2|$  で増加もしくは低下した遺伝子群のベン図。(c) CDDO-Me を投与した CDAHFD 食餌マウスで溶媒投与 CDAHFD 食餌マウスに比べて、 $p < 0.05$ 、 $\text{Fold change} > |1.2|$  で低下した 195 遺伝子の発現ヒートマップ。(d) (c) で示した 195 遺伝子を ingenuity pathway analysis (IPA) ソフトウェアにて解析した Graphical summary。(e) (c) で示した 195 遺伝子を ingenuity pathway analysis (IPA) ソフトウェアにて解析した Physiological System Development and Function の上位 5 つのパスウェイ。



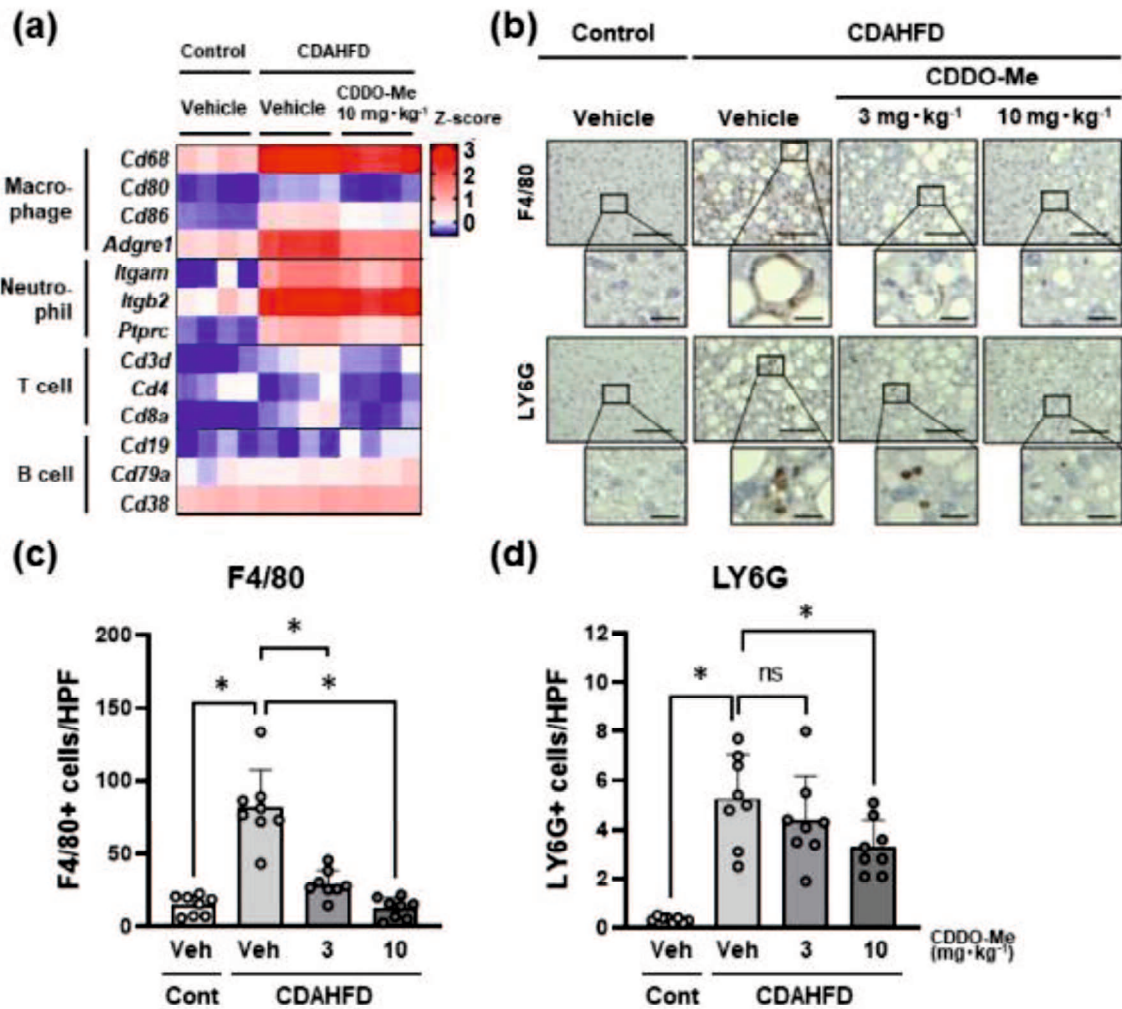


図 6. CDDO-Me は CDAHFD 食餌 MASH マウスモデルの肝臓へのマクロファージ浸潤を抑制する。

(a) 肝臓中マクロファージ、好中球、T 及び B 細胞マーカー遺伝子発現ヒートマップ。(b) 肝切片の代表的な抗 F4/80 抗体及び抗 LY6G 抗体による免疫染色像。スケールバーは低倍率では 100µm、高倍率では 20µm を示す。(c, d) (b) の各切片中における染色陽性細胞数 (mean+S.D., n=8)。有意差検定は Dunnett の多重比較検定により実施した (\*P<0.05; versus vehicle-treated CDAHFD-fed mice)。ns は not significant、Con は Control、Veh は vehicle を示す。

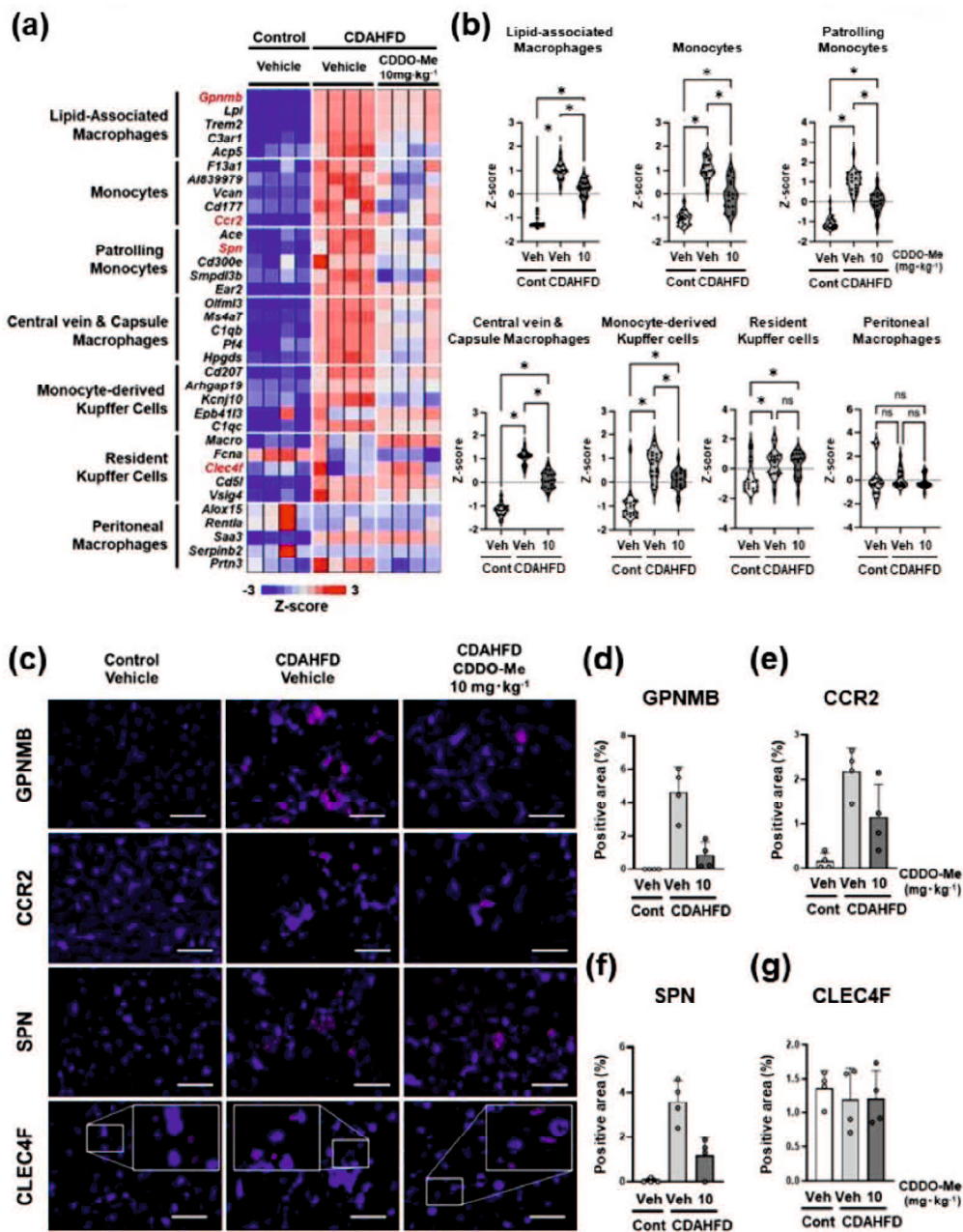


図 7. CDDO-Me は CDAHFD 食餌 MASH マウスモデルの肝臓への単球由来マクローファージ浸潤を抑制する。

(a) 肝臓中のマクローファージサブタイプ別マーカー遺伝子発現ヒートマップ。(b) 肝臓中のマクローファージサブタイプクラスター別マーカー遺伝子発現 z-score のバイオリンプロット。有意差検定は Dunnett の多重比較検定により実施した (\* $P < 0.05$ ; versus vehicle-treated CDAHFD-fed mice)。ns は not significant、Con は Control、Veh は vehicle を示す。(c) 肝切片の代表的な抗 GPNMB 抗体、抗 CCR2 抗体、抗 SPN 抗体及び抗 CLEC4F 抗体による免疫染色像。スケールバーは 50 μm を示す。(d-g) (c) の各切片中における染色陽性領域割合 (mean+S.D.,  $n=4$ )。

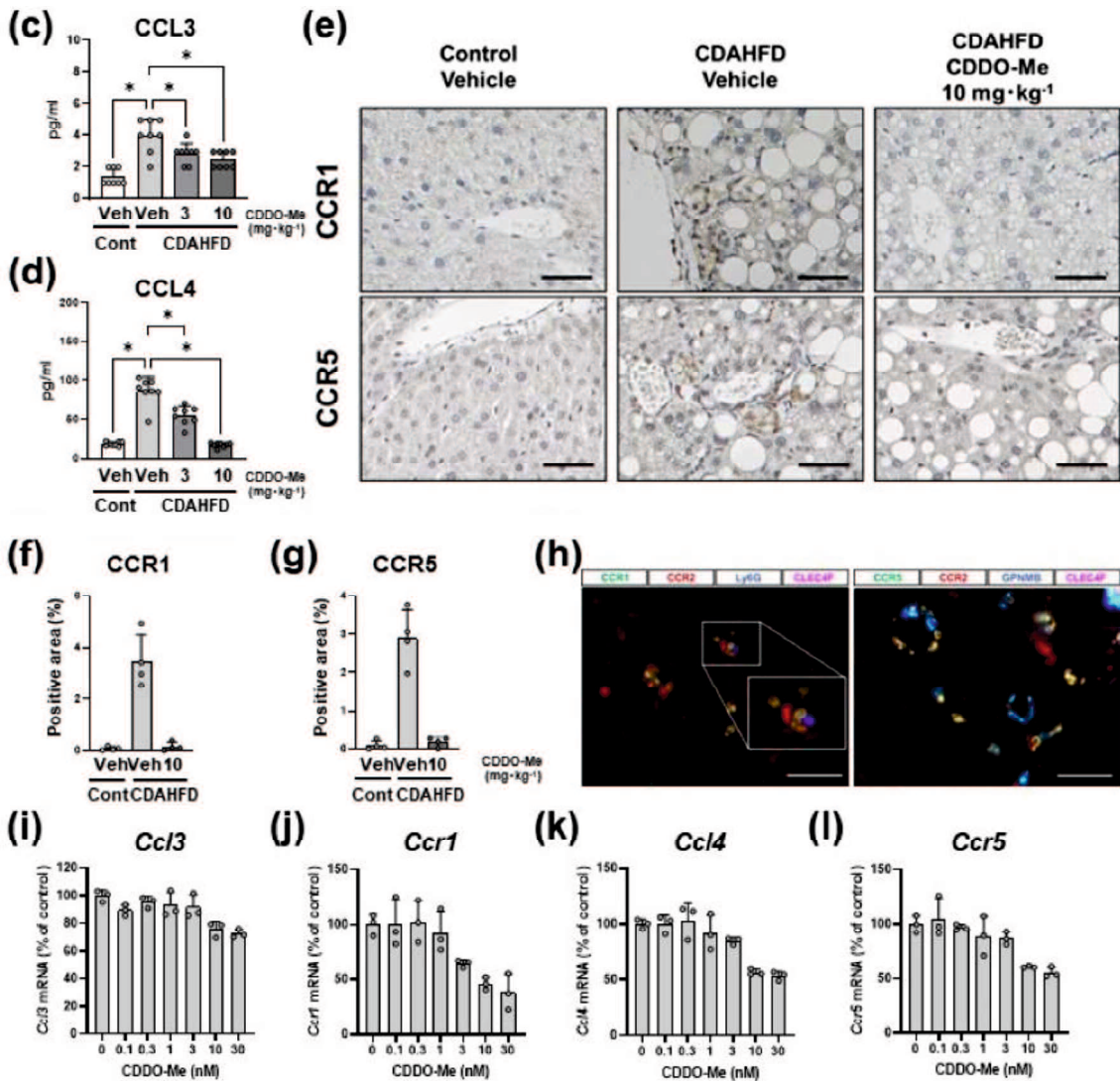
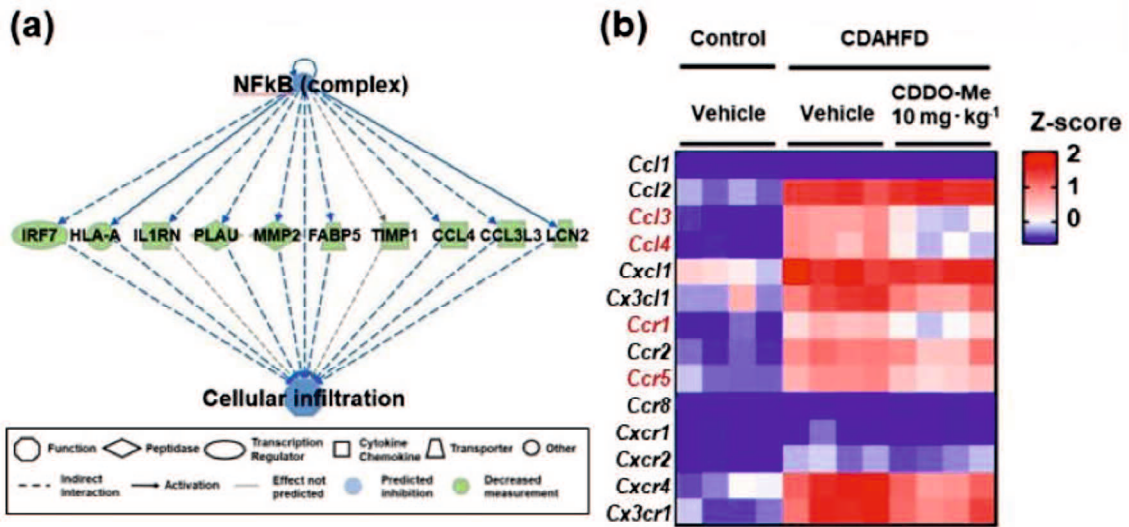
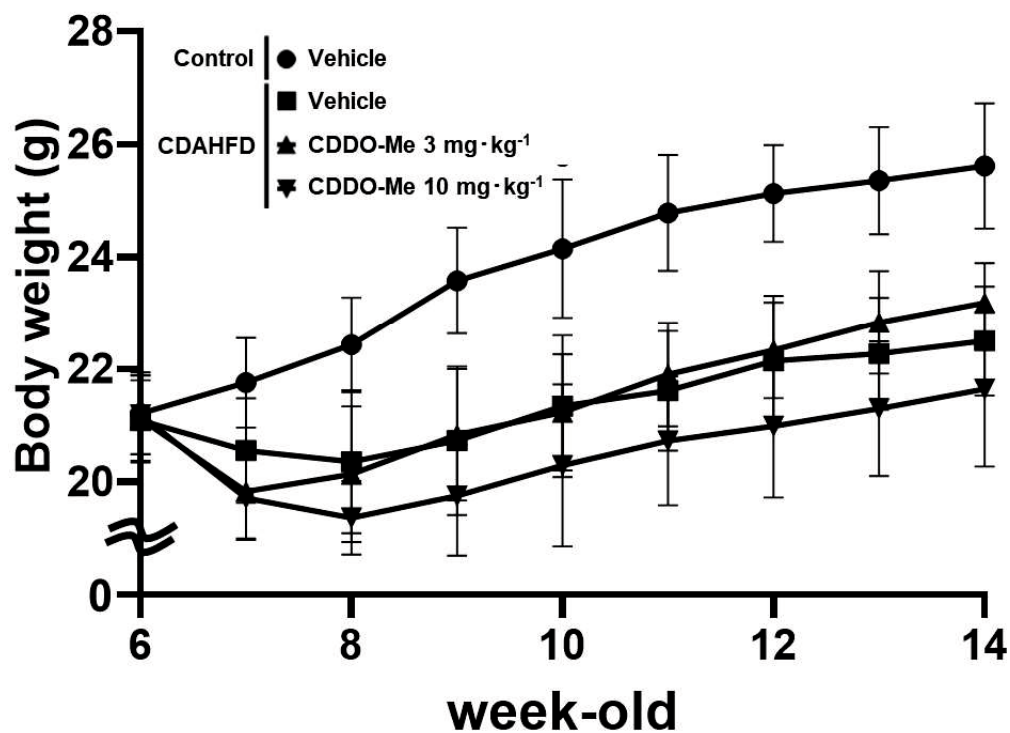


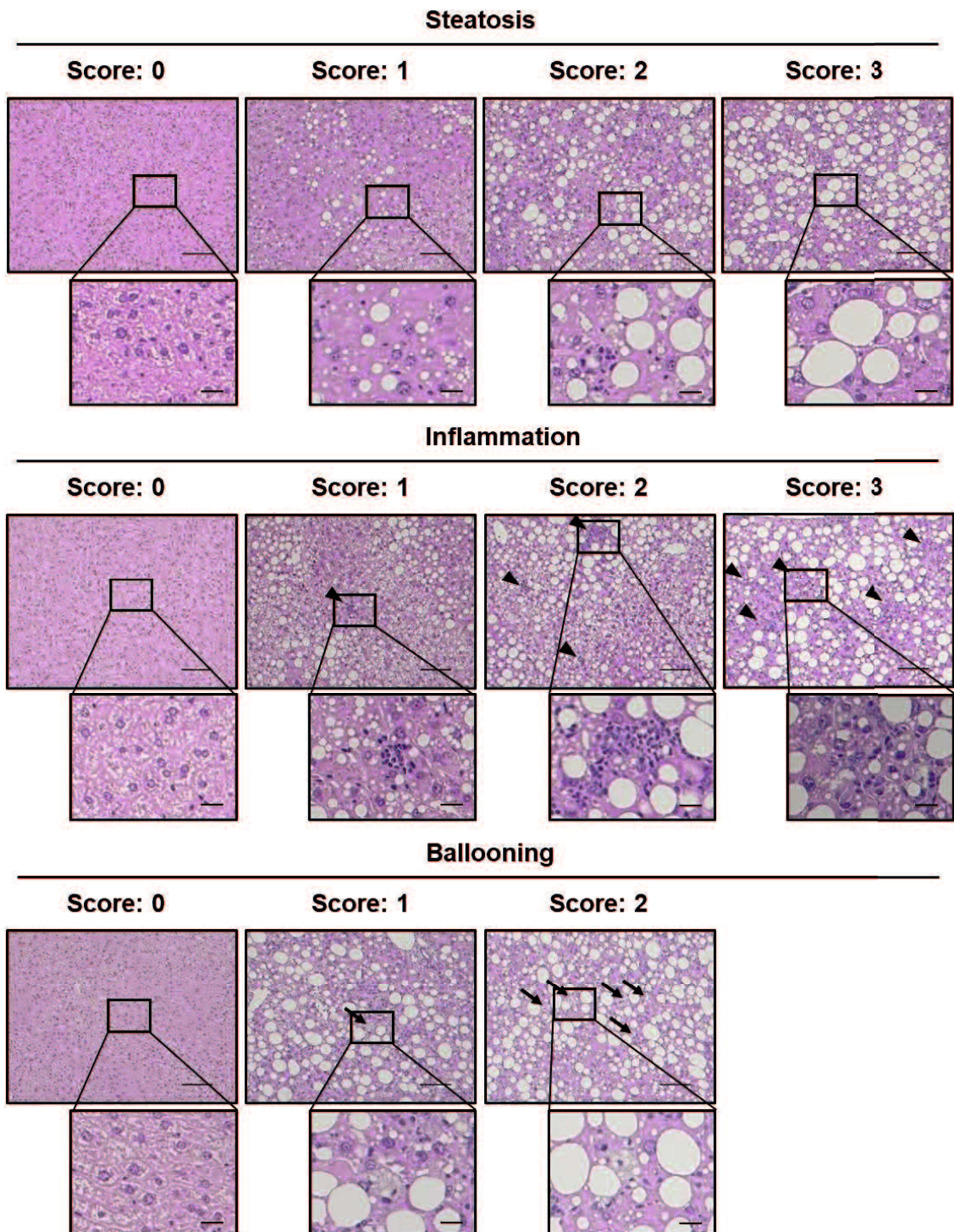
図 8. CDD0-Me はマクロファージにおける CCL3-CCR5 及び CCL4-CCR3 軸の発現を減少させる。

(a) Control マウスに比べて溶媒投与 CDAHFD 食餌マウスで  $p < 0.05$ 、Fold change  $> |1.2|$  で増加し、かつ CDD0-Me を投与した CDAHFD 食餌マウスで溶媒投与 CDAHFD 食餌マウスに比べて、 $p < 0.05$ 、Fold change  $> |1.2|$  で低下した 195 遺伝子を用いて IPA ソフトウェアにて解析した Regulatory Effects のパスウェイ。(b) 肝臓中のケモタキシスに関わる遺伝子発現ヒートマップ。(c, d) ELISA により測定した血清中 CCL3 (c) 及び CCL4 (d) 量。有意差検定は Dunnett の多重比較検定により実施した (\* $P < 0.05$ ; versus vehicle-treated CDAHFD-fed mice)。Con は Control、Veh は vehicle を示す。(e) 肝切片の代表的な抗 CCR1 抗体及び抗 CCR5 抗体による免疫染色像。スケールバーは  $50\mu\text{m}$  を示す。(f, g) (e) の各切片中における染色陽性領域割合 (mean+S. D.,  $n=4$ )。 (h) 溶媒投与 CDAHFD 食餌マウスの肝切片の抗 CCR1、抗 CCR2、抗 LY6G 及び抗 CLEC4F (左側) 及び抗 CCR5、抗 CCR2、抗 GPNMB 及び抗 CLEC4F (右側) を用いた免疫多重染色像。スケールバーは  $50\mu\text{m}$  を示す。(i-1) CDD0-Me で 6 時間処理した RAW264.7 細胞における *Cc13* (i)、*Cc14* (k)、及びそれらの受容体である *Ccr1* (j)、*Ccr5* (l) の遺伝子発現。(mean+S. D.,  $n=3$ )。Con は Control、Veh は vehicle を示す。



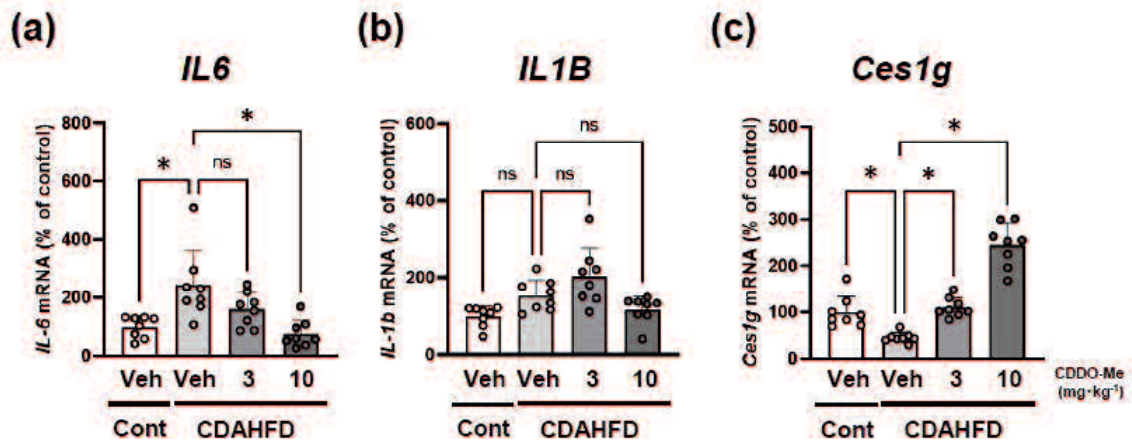
補足図 1. CDDO-Me を 10 mg/kg まで 8 週間投与しても CDAHFD 食餌 MASH マウスモデルの体重に影響を与えない。

C57BL/6J マウス (6 週齢) に対照飼料または CDAHFD を 8 週間与えた。その期間中、毎日 CDDO-Me 又は溶媒である 0.5%メチルセルロースを経口投与した。体重は試験期間中 1 週間ごとに測定した (mean+S.D., n=8)。



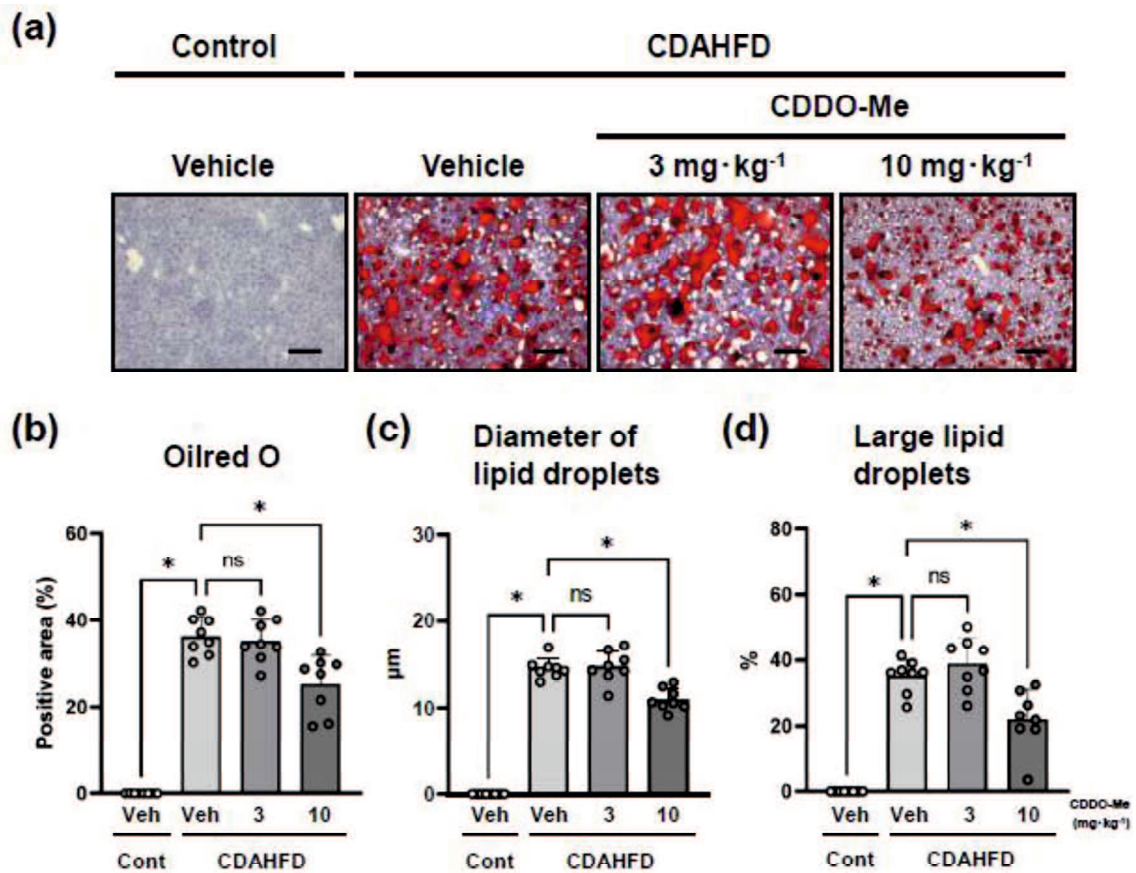
補足図 2. NAS の各指標スコア毎の代表的な病理像。

肝切片の HE 染色像。脂肪滴の大きさで脂肪症を、アローヘッドで示した炎症巣の数で炎症を、矢印で示した肝細胞障害を反映したバルーン細胞の数でバルーン細胞を分類した。NAS は各スコアの合計から算出した。スケールバーは、低倍率（上段）で 100  $\mu\text{m}$ 、高倍率（下段）で 20  $\mu\text{m}$  を示す。



補足図 3. 肝臓中の炎症及び脂質代謝関連遺伝子 mRNA 発現。

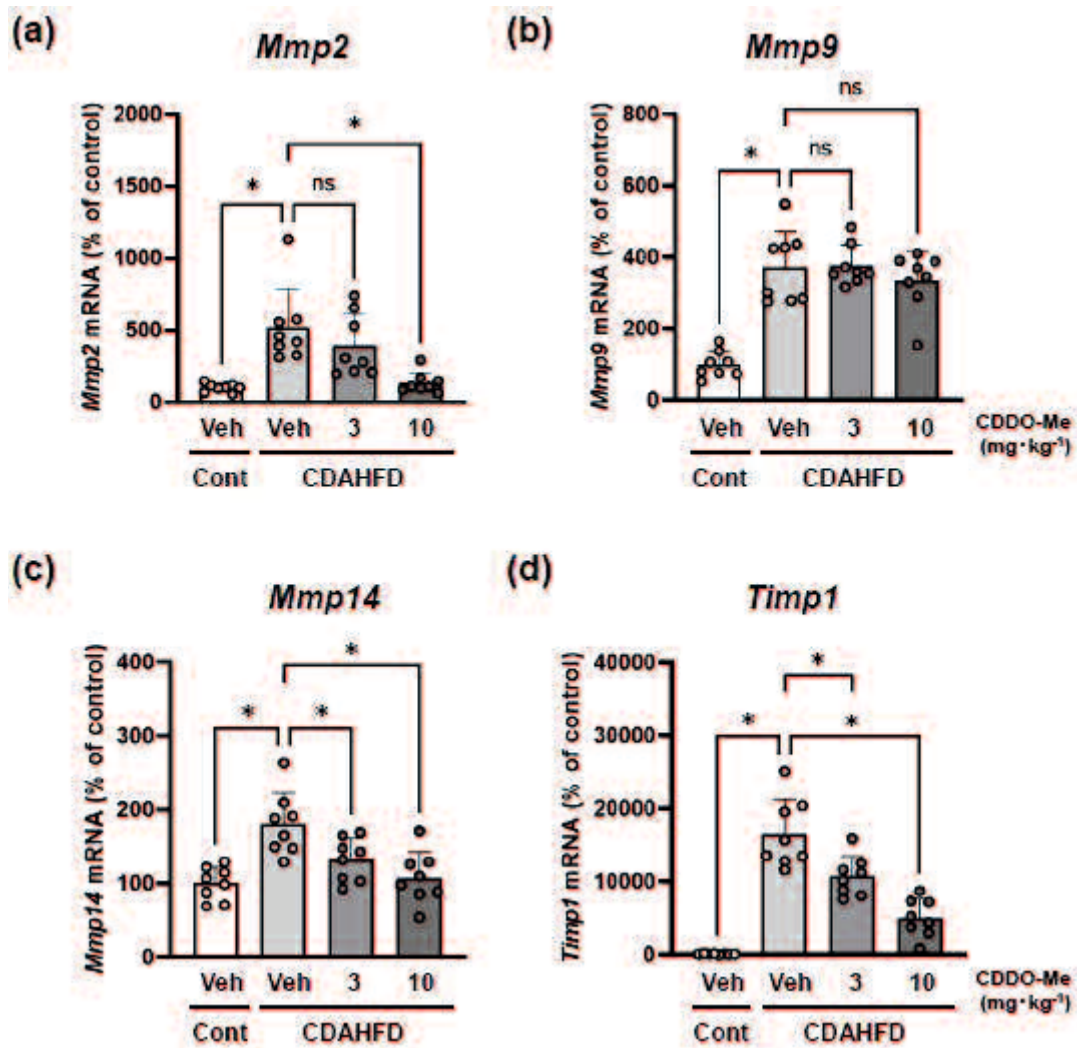
(a-c) 肝臓中の *IL6* (a)、*IL1B* (b) 及び *Ces1g* (c) の mRNA 発現 (mean+S. D., n=8)。有意差検定は Dunnett の多重比較検定により実施した (\* $P < 0.05$ ; versus vehicle-treated CDAHFD-fed mice)。ns は not significant、Con は Control、Veh は vehicle を示す。



補足図 4. CDDO-Me は肝臓の脂肪滴の数とサイズを減少させる。

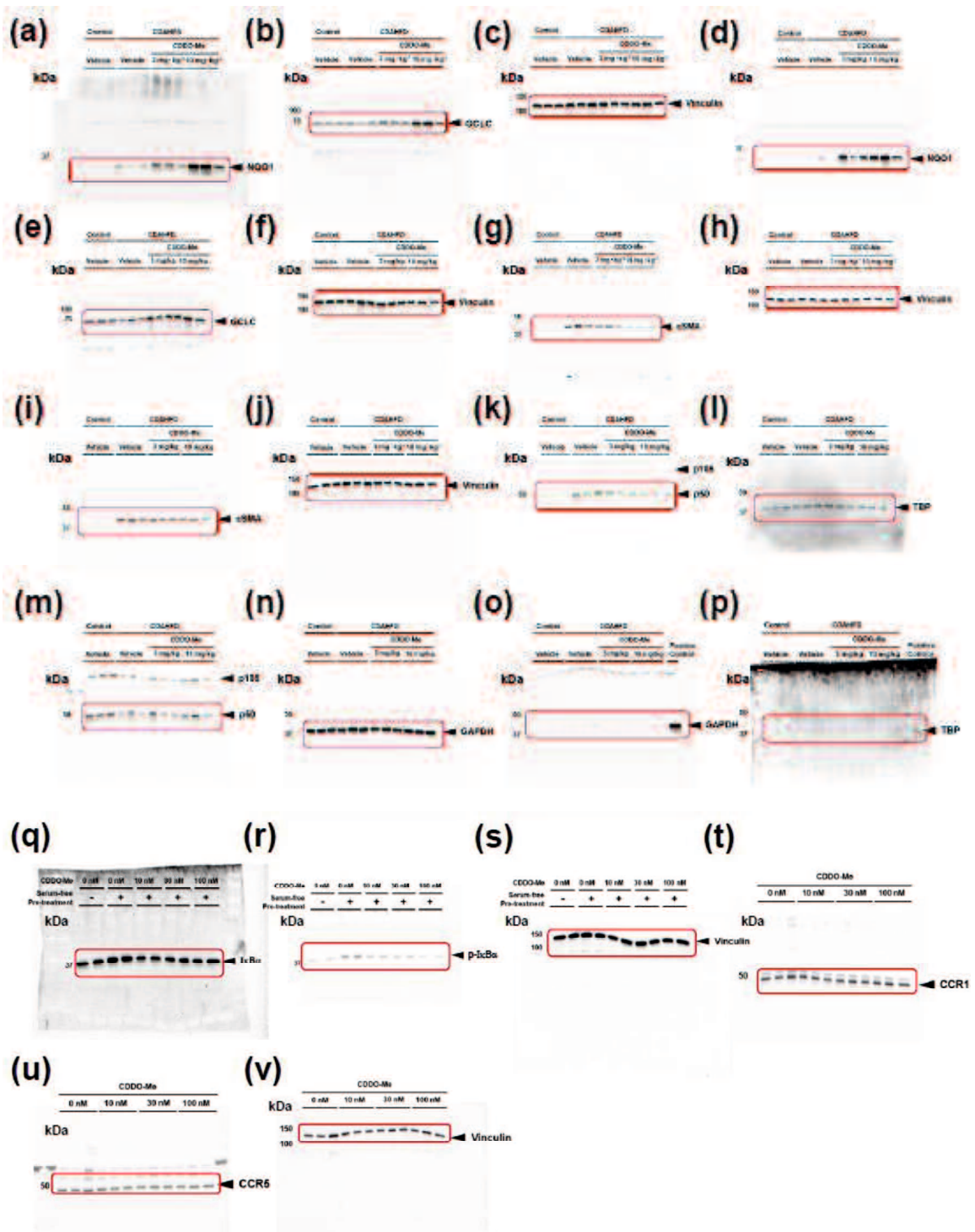
(a-c) (a) Oil red O で染色した肝切片。スケールバーは 100  $\mu$ m を示す。(b) 補足図 3a の肝切片から定量した陽性面積 (平均+S.D., n=8)。(c, d) HE 染色した肝切片で、脂肪滴の直径 (c) 及び大きな脂肪滴の数 (d) を測定した (平均+S.D., n=8)。マウス 1 匹につき 100 個以上の脂肪滴を数えた。有意差検定は Dunnett の多重比較検定により実施した (\* $P$ <0.05; versus vehicle-treated CDAHFD-fed mice)。ns は not significant、Con は Control、Veh は vehicle を示す。





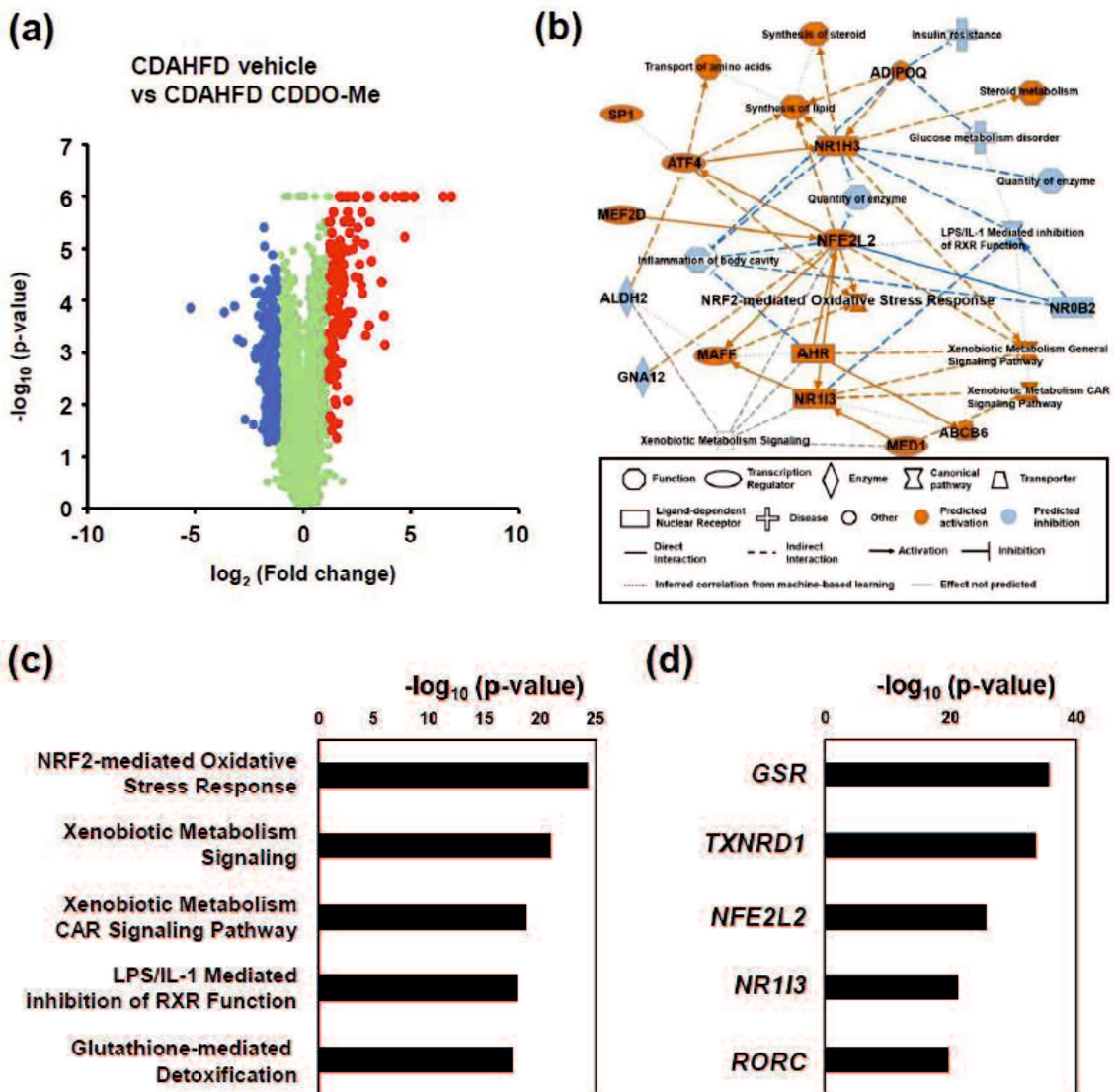
補足図 5. 肝臓中の線維化関連遺伝子 mRNA 発現。

(a-d) 肝臓中の *Mmp2* (a)、*Mmp9* (b)、*Mmp14* (c) 及び *Timp1* (d) の mRNA 発現 (mean+S. D., n=8)。有意差検定は Dunnett の多重比較検定により実施した (\* $P < 0.05$ ; versus vehicle-treated CDAHFD-fed mice)。ns は not significant、Con は Control、Veh は vehicle を示す。



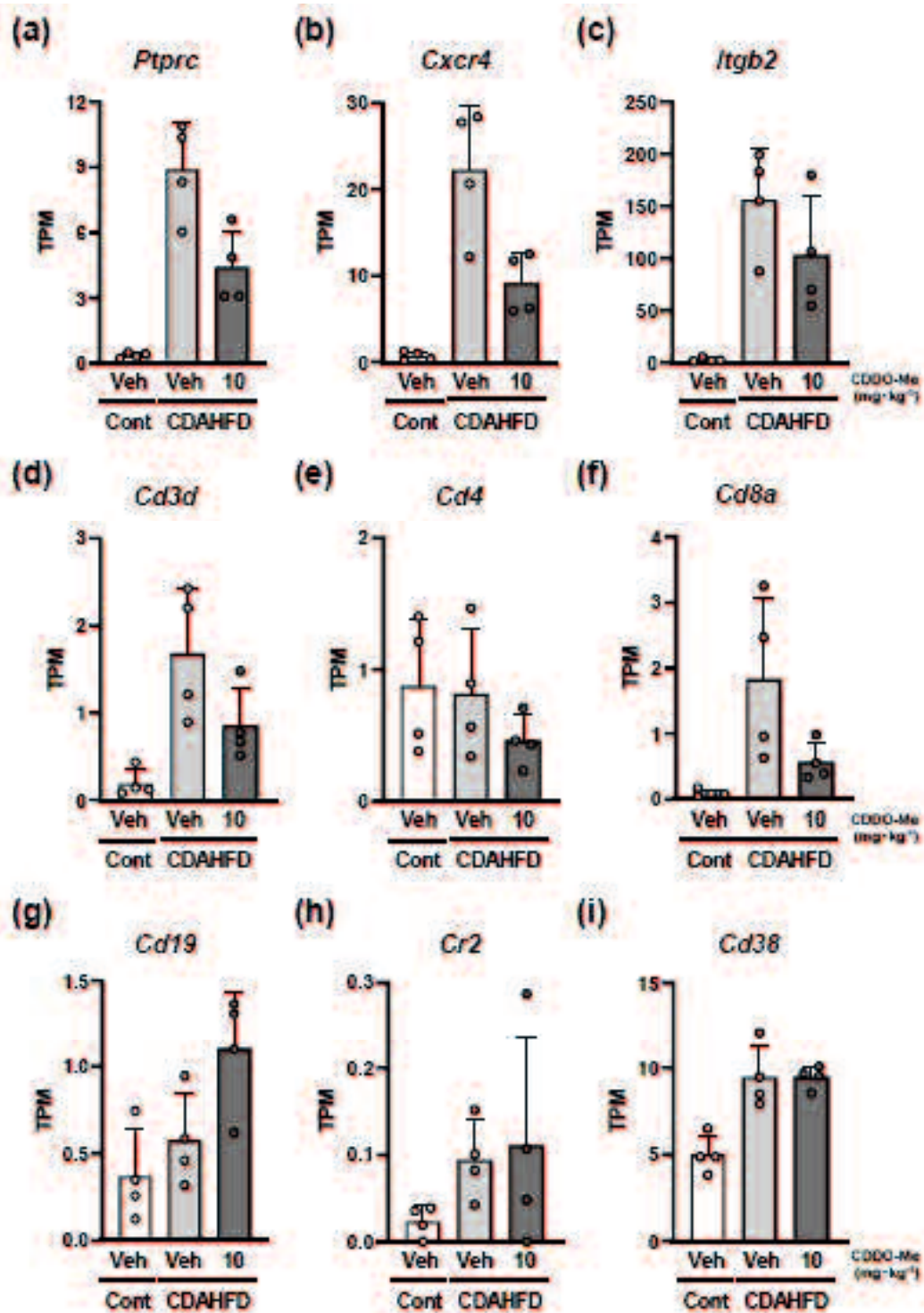
補足図 6. 図 3d、図 4f、補足図 12a 及び補足図 14a, e のそれぞれの抗原特異的なウエスタンブロットティング全体像

(a-v) 図 3d (a-f)、図 4f (g-j)、補足図 12a (k-p) 及び補足図 14a, e (q-v) のウエスタンブロットティング全体像。



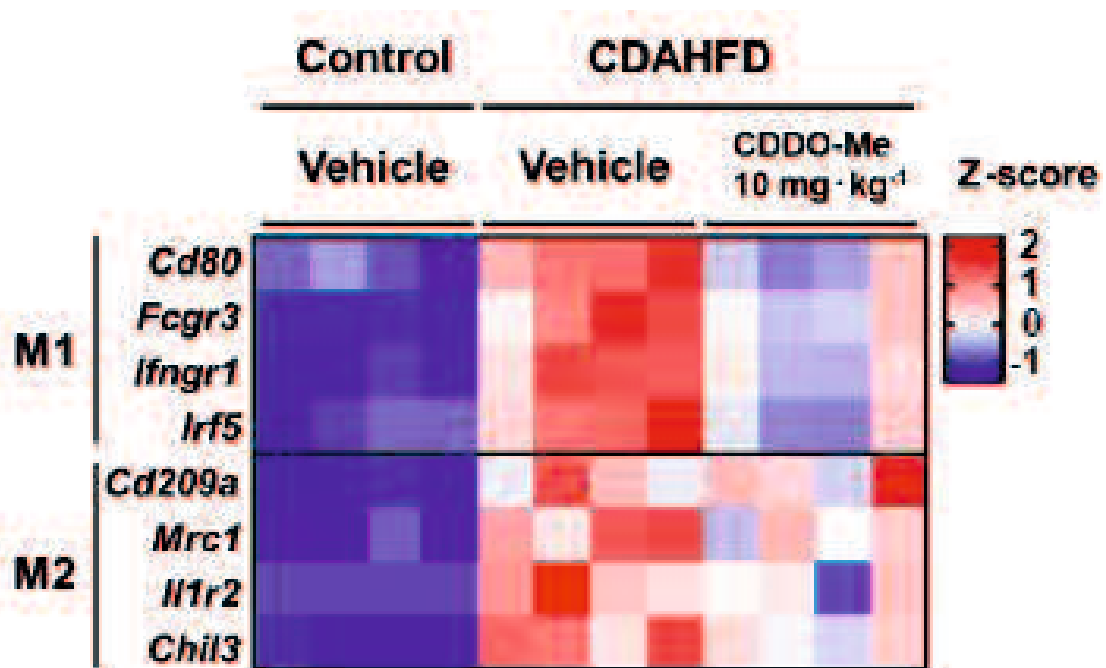
補足図7. トランスクリプトーム解析により CDDO-Me の MASH 病態改善作用には、Nrf2 活性化作用が関与している可能性が示唆される。

(a) CDDO-Me を投与した CDAHFD 食餌マウスで溶媒投与 CDAHFD 食餌マウスに比べて、 $p < 0.05$ 、 $\text{Fold change} > |1.2|$  で増加した 130 遺伝子群を赤色で、低下した 236 遺伝子群を青色で示したボルケーノプロット。(b) (a) で赤色で示した 130 遺伝子を ingenuity pathway analysis ソフトウェアにて解析した Graphical summary。(c) (a) で赤色で示した 130 遺伝子を ingenuity pathway analysis ソフトウェアにて解析した上位 5 つのパスウェイ。(d) (a) で赤色で示した 130 遺伝子を ingenuity pathway analysis (IPA) ソフトウェアにて解析した上位 5 つの上流制御因子。

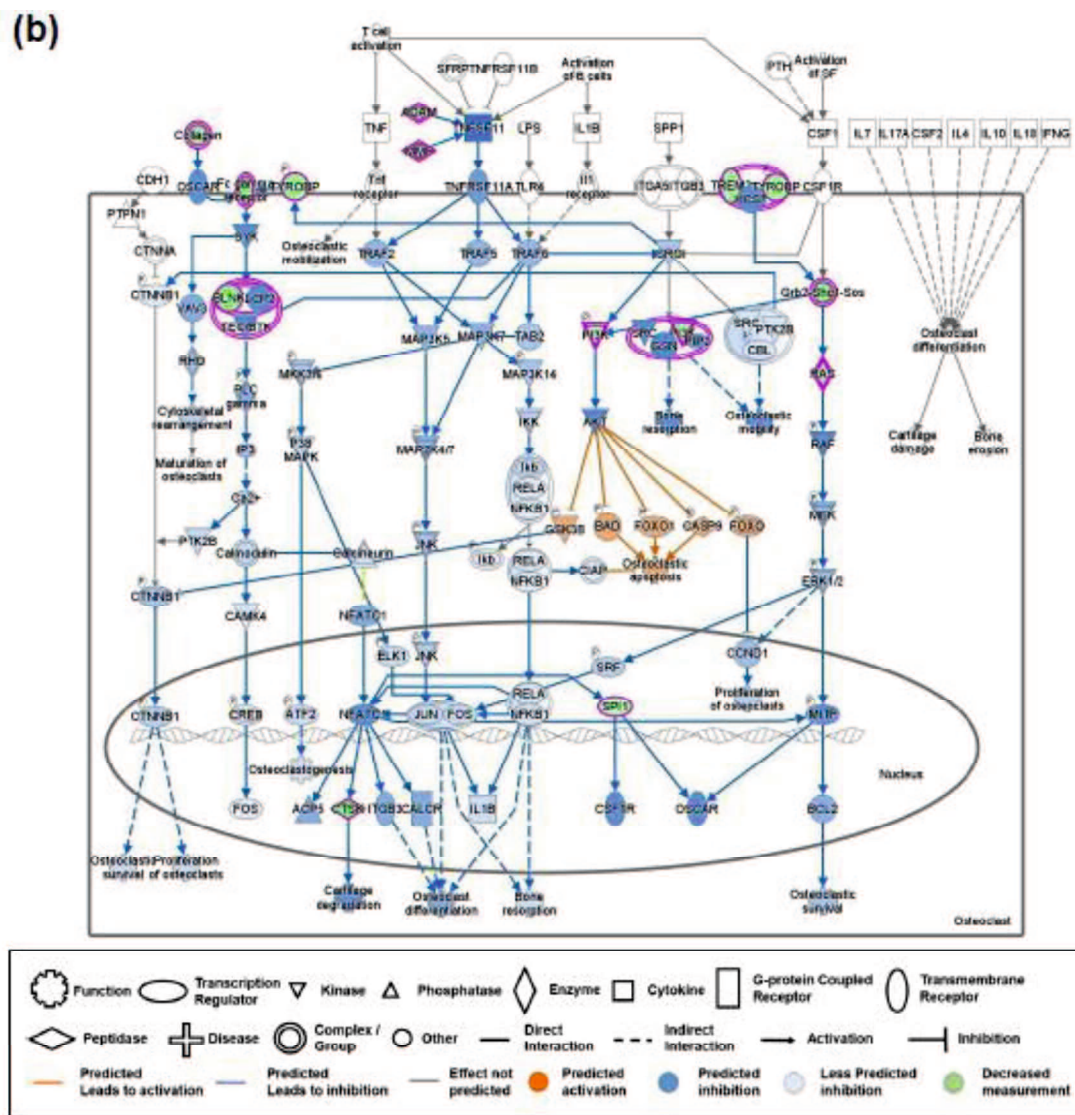
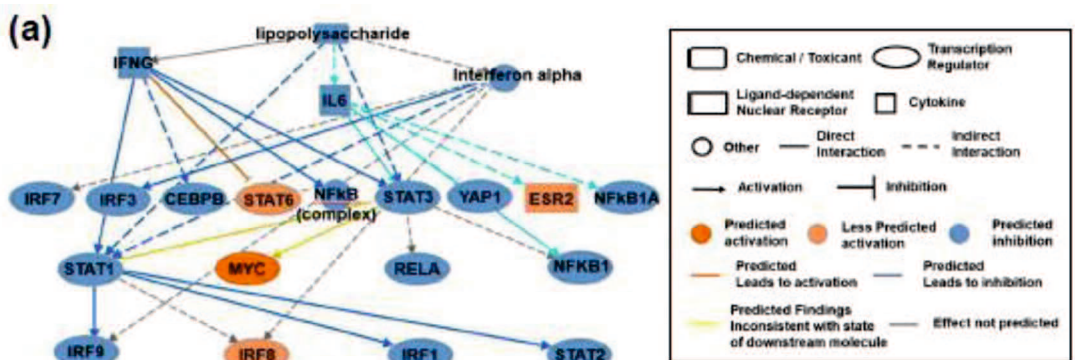


補足図 8. 肝臓中の好中球、T 及び B 細胞各マーカー遺伝子 mRNA 発現。

(a-i) 肝臓中の好中球 (a-c)、T 細胞 (d-f) 及び B 細胞 (g-i) の各マーカー遺伝子 mRNA 発現 (mean±S.D., n=4)。RNA-seq の TPM を使用した。Con は Control、Veh は vehicle を示す。

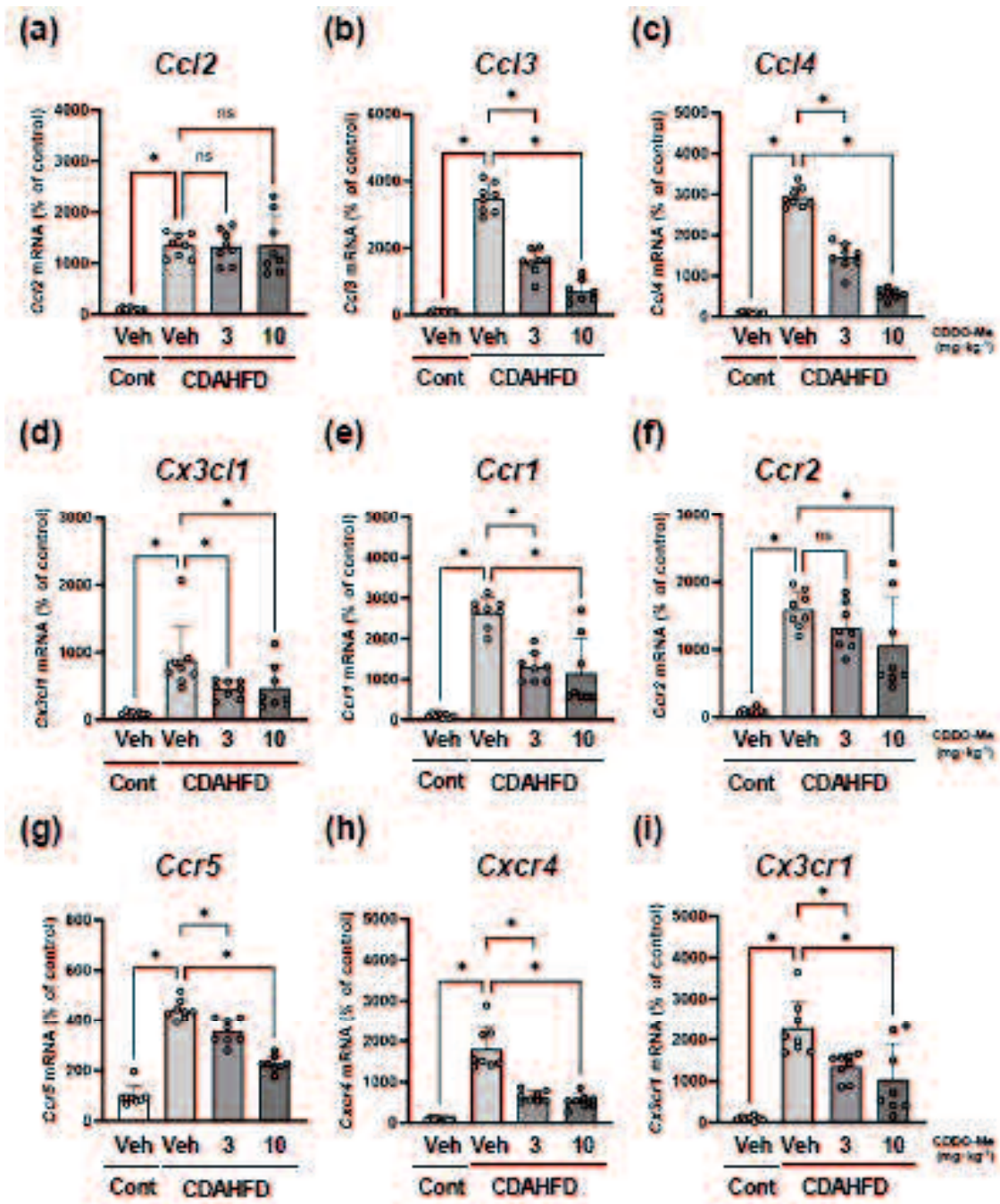


補足図 9. 肝臓中の M1 及び M2 マクロファージ各マーカー遺伝子発現のヒートマップ。  
肝臓中 M1 及び M2 マクロファージのマーカー遺伝子の発現。



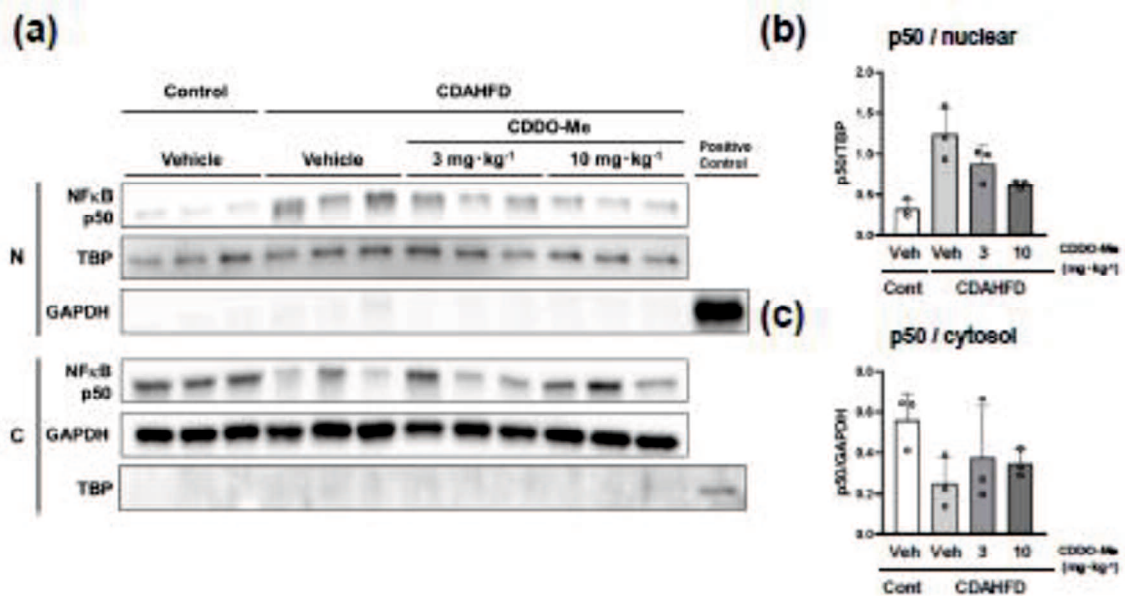
補足図 10. トランスクリプトーム解析により示唆される CDD0-Me の NF- $\kappa$ B 阻害作用。

(a) 図 5c の 195 遺伝子を ingenuity pathway analysis ソフトウェアにて解析した上流のパスウェイ。(b) 図 5c の 195 遺伝子を ingenuity pathway analysis ソフトウェアにて解析したパスウェイ。



補足図 11. 肝臓中のケモタキシス関連遺伝子 mRNA 発現。

(a-i) 肝臓中の *Ccl2* (a)、*Ccl3* (b)、*Ccl4* (c)、*Cx3cl1* (d)、*Ccr1* (e)、*Ccr2* (f)、*Ccr5* (g)、*Cxcr4* (h) 及び *Cx3cr1* (i) の mRNA 発現 (mean+S.D., n=8)。有意差検定は Dunnett の多重比較検定により実施した (\* $P < 0.05$ ; versus vehicle-treated CDAHFD-fed mice)。ns は not significant、Con は Control、Veh は vehicle を示す。

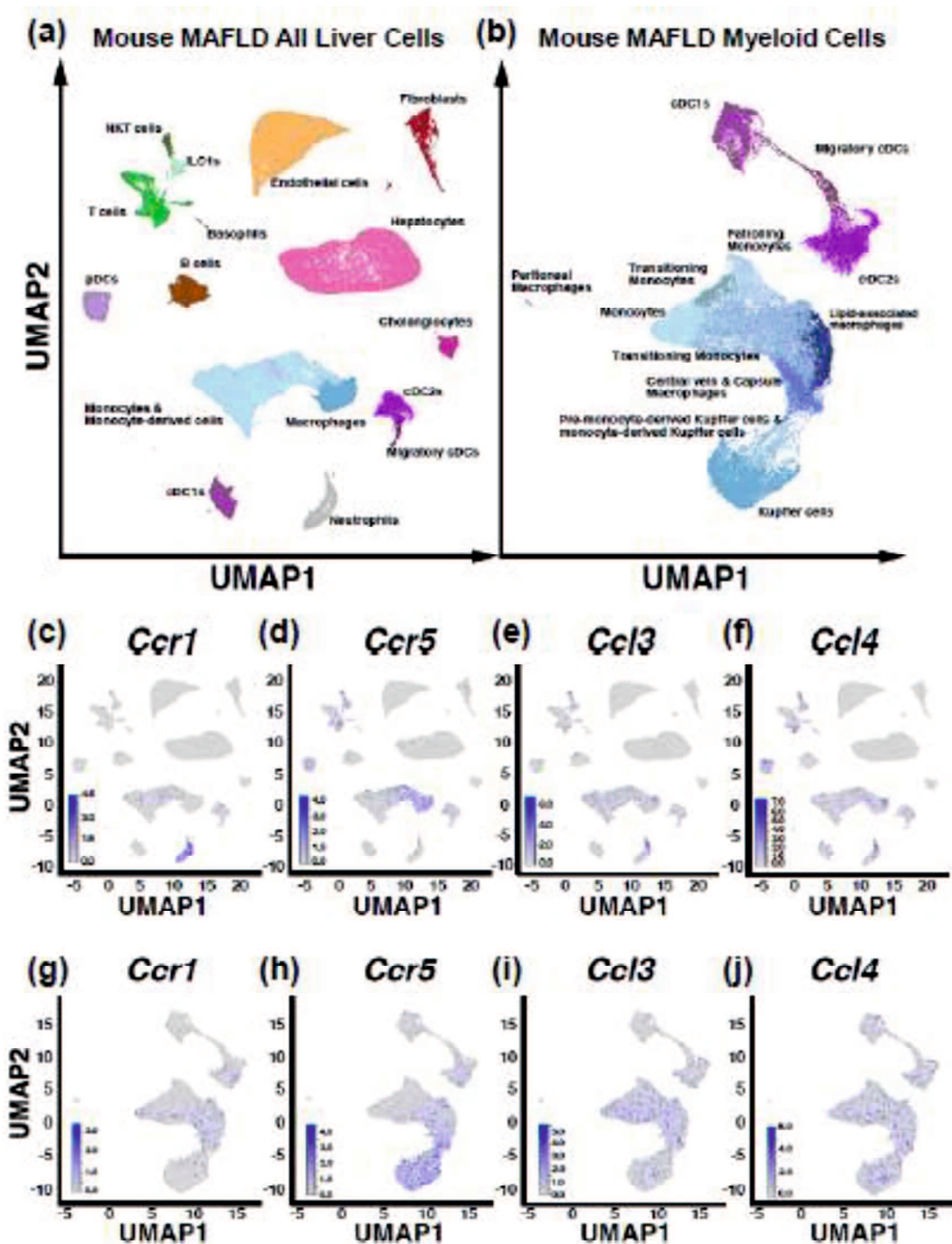


補足図 12. CDDO-Me は肝臓中の NF-κB 活性化を抑制する。

(a) 肝ホモジェネートの核及び細胞質画分中の p50、TBP、GAPDH タンパク質発現。(b) 補足図 12a の核画分中の p50 のバンドを TBP のバンドで補正後の定量結果(mean+S. D., n=3)。

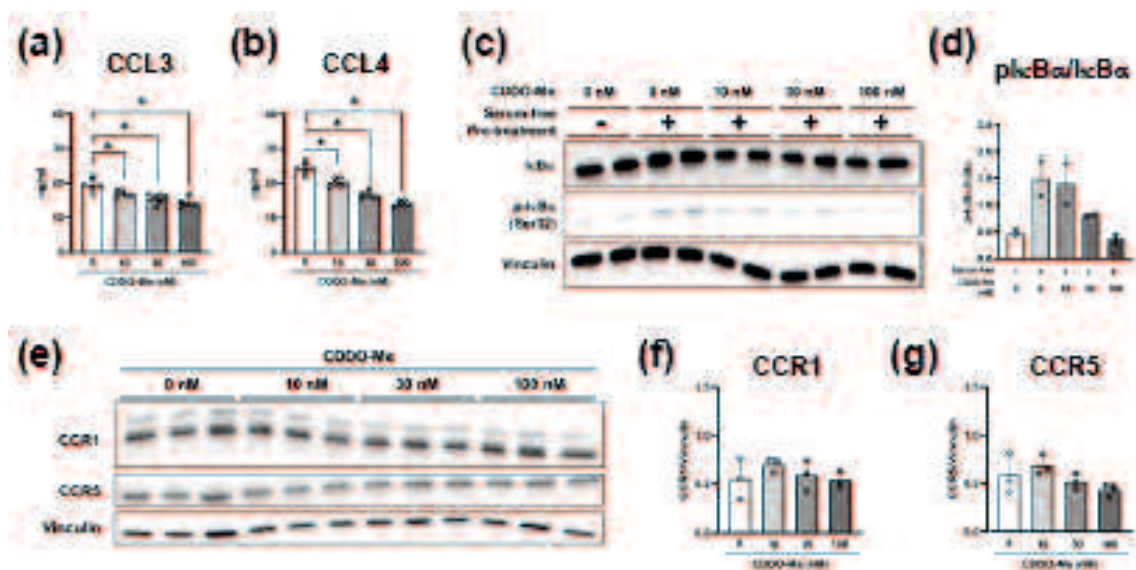
(c) 図 S12a の細胞質画分の p50 のバンドを GAPDH のバンドで補正後の定量結果 (mean+S. D., n=3)。Con は Control、Veh は vehicle を示す。





補足図 13. 公開されている scRNA-seq データベース上のマウス MAFLD 肝臓及び骨髄系細胞の UMAP における *Ccr1*, *Ccr5*, *Ccl3*, 及び *Ccl4* 発現細胞の分布。

(a, b) 公開されている scRNA-seq データベース (<https://www.livercellatlas.org/>) 上のマウス MAFLD 肝臓及び骨髄系細胞の UMAP。(c-f) マウス MAFLD 肝臓の UMAP における *Ccr1*, *Ccr5*, *Ccl3*, 及び *Ccl4* 発現細胞の分布。(g-j) マウス MAFLD 骨髄系細胞の UMAP における *Ccr1*, *Ccr5*, *Ccl3*, 及び *Ccl4* 発現細胞の分布。



補足図 14. CDDO-Me はマクロファージの IκBα のリン酸化を抑制する。

(a, b) 培地中の CCL3 (a) 及び CCL4 (b) 量 (mean+S.D., n=6)。有意差検定は Dunnett の多重比較検定により実施した (\*P<0.05; versus vehicle-treated RAW264.7 cells)。(c) IκBα の発現及びそのリン酸化。(d) 補足図 14c のリン酸化 IκBα のバンドを IκBα のバンドで補正後の定量結果 (mean+S.D., n=2)。(e) CCR1 及び CCR5 のタンパク質発現。(f, g) 補足図 14e の CCR1 (f) 及び CCR5 (g) それぞれのバンドを Vinculin のバンドで補正後の定量結果 (mean+S.D., n=3)。

Group	n	Age (weeks)	Body weight (g)	Liver wet weight (g)	Serum AST (IU/L)	Serum ALT (IU/L)	Serum T-BIL (mg/dL)	Liver TG (mg/g)	Serum TG (mg/dL)	Serum LDL-C (mg/dL)	Serum HDL-C (mg/dL)
Control + Vehicle	8	14	25.6 ± 1.11 <sup>a</sup>	1.16 ± 0.05 <sup>a</sup>	34.3 ± 1.58 <sup>a</sup>	19.3 ± 3.06 <sup>a</sup>	0.1 ± 0.02 <sup>a</sup>	10.1 ± 2.11 <sup>a</sup>	61.5 ± 15.9 <sup>a</sup>	5.10 ± 0.99 <sup>a</sup>	46.1 ± 3.23 <sup>a</sup>
CDAHFD + Vehicle	8	14	22.5 ± 0.97	1.67 ± 0.29	439 ± 189	467 ± 86.4	0.4 ± 0.26	329 ± 42.2	37.8 ± 10.6	12.3 ± 5.31	7.00 ± 1.91
CDAHFD + CDDO-Me 3 mg·kg <sup>-1</sup>	8	14	23.2 ± 0.71	2.11 ± 0.23 <sup>a</sup>	285 ± 82.0 <sup>a</sup>	395 ± 90.0	0.1 ± 0.04 <sup>a</sup>	339 ± 44.0	56.4 ± 12.4 <sup>a</sup>	5.90 ± 0.99 <sup>a</sup>	40.1 ± 9.37 <sup>a</sup>
CDAHFD + CDDO-Me 10 mg·kg <sup>-1</sup>	8	14	21.6 ± 1.38	1.77 ± 0.24	234 ± 58.5 <sup>a</sup>	295 ± 77.1 <sup>a</sup>	0.1 ± 0.01 <sup>a</sup>	282 ± 60.6	36.9 ± 7.62	8.10 ± 0.83 <sup>a</sup>	61.0 ± 6.23 <sup>a</sup>

表 1. 体重、肝臓重量及び各種生化学指標値。

平均±SD で示し、CDAHFD+Vehicle 群との Dunnett の多重比較検定により、<sup>a</sup>P<0.05 を示す。

Gene	Species	Primer Sequence	
		Forward	Reverse
<i>Acrb</i>	Mouse	5'-CATCCGTAAGACCTCTATGCCAAC-3'	5'-ATGGAGCCACCGATCCACA-3'
<i>Nqo1</i>	Mouse	5'-CAGCCAATCAGCGTTCGGTA-3'	5'-CTTCATGGCGTAGTTGAATGATGC-3'
<i>Gclc</i>	Mouse	5'-AATGACTGTTGCCAGGTGGATG-3'	5'-GGTTGCACTTCCAAATGAGGCTA-3'
<i>Il-6</i>	Mouse	5'-CCACTTCACAAGTCGGAGGCTTA-3'	5'-CCAGTTTGGTAGCATCCATCATTTC-3'
<i>Tnfa</i>	Mouse	5'-TATGGCCCAGACCCTCACA-3'	5'-GGAGTAGACAAGGTACAACCCATC-3'
<i>Irf3</i>	Mouse	5'-CGGCACAGTCATTGAAAGCCTA-3'	5'-GTTGCTGATGGCCTGATTGTC-3'
<i>Il-1b</i>	Mouse	5'-TCCAGGATGAGGACATGAGCAC-3'	5'-GAACGTCACACACCAGCAGGTTA-3'
<i>Abcg5</i>	Mouse	5'-AGCATCTCTGGGCTGCTTATTG-3'	5'-AACTCATTGACCACGAGAATCTCAC-3'
<i>Ces1g</i>	Mouse	5'-GGTGATGAAATTCTGGGCCAAC-3'	5'-TCTGGTCATATTCTGGCCAATGAG-3'
<i>Ces2c</i>	Mouse	5'-CTGATCATGACACGGAACCAACTA-3'	5'-GCTGCCTTGGATCTGTCTGTGA-3'
<i>Acta2</i>	Mouse	5'-CAGATGTGGATCAGCAAACAGGA-3'	5'-GACTTAGAAGCATTTCGGTGGA-3'
<i>Col1a1</i>	Mouse	5'-GACATGTTCAAGCTTTGTGGACCTC-3'	5'-GGGACCCTTAGGCCATTGTGTA-3'
<i>Timp1</i>	Mouse	5'-GGAACGGAAATTTGCACATCAG-3'	5'-CTGATCCGTCCACAAACAGTGAG-3'
<i>Tgfb</i>	Mouse	5'-TACGGCAGTGGCTGAACCAA-3'	5'-CGGTTTCATGTCATGGATGGTG-3'
<i>Mmp2</i>	Mouse	5'-AGAACTTCCGATTATCCCATGATGA-3'	5'-TGACAGGTCCCAGTGTGGTG-3'
<i>Mmp9</i>	Mouse	5'-GCCCTGGAACCTCACACGACA-3'	5'-TTGAAACTCACACGCCAGAAG-3'
<i>Mmp14</i>	Mouse	5'-CTCCACAAAGATCTGCCTCTATCCA-3'	5'-CGGGTTTGCCAAGGGTTTC-3'
<i>Col2</i>	Mouse	5'-GGCTTATCCAAGCATGGTGATTTAG-3'	5'-ACCACTTGCATGCACACATGA-3'
<i>Col3</i>	Mouse	5'-CATGACACTCTGCAACCAAGTCTTC-3'	5'-GAGCAAAGGCTGCTGGTTTCA-3'
<i>Col4</i>	Mouse	5'-GAGACCAGCAGTCTTTGCTCCA-3'	5'-GGAGCTGCTCAGTTCAACTCCA-3'
<i>Cor1</i>	Mouse	5'-TGGGTGAACGGTCTGGAAGTA-3'	5'-TCCTTGGTTGACACCTATGGTCTG-3'
<i>Cor2</i>	Mouse	5'-AGCAGCAGGTGTCCCAAAGA-3'	5'-GTGCTGAAGACCTTAGGGCAGA-3'
<i>Ccr3</i>	Mouse	5'-TGCCTTCAGACCTAAATCTACCAC-3'	5'-TCAAATATGAAACAGCCCTCATC-3'
<i>Cxcr4</i>	Mouse	5'-GCCATGGCTGACTGGTACTTTG-3'	5'-CAGGATGAGAACGCTGCTGTAGA-3'
<i>Cx3cl1</i>	Mouse	5'-ACCTATGGCCCTGACATCATCAC-3'	5'-CTTGCCAGCCCTCAGAATCAC-3'
<i>Cx3ev1</i>	Mouse	5'-TCTACAAAGCCATTCCCATGTCC-3'	5'-CAATGTAAGCCTGCAAATGAGACC-3'

補足表 1. 本研究の定量 RT-PCR で使用したプライマー配列一覧。

Group	Sample No.	Score			NAS
		Steatosis	Lobular Inflammation	Ballooning	
Control	1	0	0	0	0
Vehicle	2	0	0	0	0
	3	0	0	0	0
	4	0	0	0	0
	5	0	0	0	0
	6	0	0	0	0
	7	0	0	0	0
	8	0	0	0	0
CDAHFD	9	2	3	1	6
Vehicle	10	3	3	1	7
	11	3	2	1	6
	12	3	3	2	8
	13	3	3	2	8
	14	3	3	2	8
	15	2	2	1	5
	16	3	3	2	8
CDAHFD	17	2	2	0	4
CDDO-Me 3mg·kg <sup>-1</sup>	18	2	1	0	3
	19	3	1	1	5
	20	3	1	0	4
	21	3	2	1	6
	22	3	3	2	8
	23	3	2	1	6
	24	3	1	1	5
CDAHFD	25	2	1	0	3
CDDO-Me 10mg·kg <sup>-1</sup>	26	2	0	0	2
	27	2	1	0	3
	28	1	0	0	1
	29	2	1	0	3
	30	2	0	0	2
	31	2	1	0	3
	32	2	0	0	2

補足表 2. 各個体別の NAFLD activity score (NAS) 一覧。

Gene name
<p> <i>4930430E12Rik, Ace, Adam3, Adamts12, Adgre1, Apol9a, Areg, Arhgap19, Arhgef2, Atp6v0d2, BC016579, Bel2a1a, Bel2a1b, Bel2a1d, Blnk, Big2, Clqa, Clqb, Clqc, Clqny2, C3ar1, C5ar1, Calhm6, Cede80, Cel3, Cel4, Cd180, Cd200r4, Cd300ld3, Cd63, Cd68, Cd72, Cd83, Cib3, Clec12a, Clec4b1, Clec7a, Coll3a1, Colla1, Colla2, Col3a1, Col4a2, Col5a2, Col6a2, Col6a3, Cotl1, Cpxn1, Crisp1d2, Ctsk, Cts, Ddr1, Dkk3, Dppa3, Dpt, Ebi3, Egr1, Elf3, Emp1, Epha2, Evi2a, Fabp4, Fabp5, Fblim1, Fbn1, Fogr1, Fogr4, Forls, Fhl2, Fxyd6, G530011006Rik, Gdf10, Gdf3, Gdf6, Gldn, Gm13889, Gm20634, Gm21188, Gm30692, Gm36161, Gm4070, Gm42047, Gm44002, Gm48275, Gm49369, Gpnmb, Gpr137b, Gpr65, Gvin1, H19, H2-Q5, H2-Q6, Hck, Hexb, Hist1h4n, Hist2h3c2, Hk3, Hpgds, Htra1, Ifi211, Ifi27, Ifi2712a, Ifi1, Ifi2, Ifi3, Il1rn, Inzyn1, Irf7, Irgb1, Kibra2, Lamc3, Len2, Lfn3, Lgals3, Litra5, Lpxn, Lst1, Libp2, Lum, Ly86, Lyz2, Metnl, Mmp2, Mmp7, Mrc2, Ms4a4c, Ms4a6c, Ms4a7, Msmp, Mnr1a, Mybl1, Myo1f, Nab2, Nrk2, Oas1a, Oas1g, Oas3, Oas12, Orm2, Pagr1a, Parp16, Pfd, Phf11b, Phlda3, Pianp, Pik3r5, Plac8, Plau, Pld3, Plek, Pltp, Praqr, Rap2b, Rbp1, Rnu2-10, Rtp4, Scara3, Scara5, Scub1, Sectm1a, Sftpd, Shc2, Siglec1, Sirpa, Slamf9, Slc15a3, Slc37a2, Slc5a1, Slc7a8, Sft1, Sft2, Sft8, Smoc2, Spil, Srx, Steap4, Svep1, Syng1, Tgtp2, Thbs1, Themis2, Timp1, Tlr7, Th8, Tmem119, Tmem132a, Tmem200b, Tmem45a, Tmem86a, Tnc, Trem2, Tyrobp, Ubd, Vav1, Wfdc17, Wisp2.</i> </p>

補足表 3. CDAHFD 食餌マウスでコントロールマウスと比較して発現が増加した遺伝子の内、CDDO-ME 投与により発現が減少した 195 遺伝子の一覧。