



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	高脂肪食摂取で増加する12 α 水酸化胆汁酸による脂肪肝の誘導とその発現機構 [全文の要約]
Author(s)	堀, 将太
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第14386号
Issue Date	2021-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/81202
Type	doctoral thesis
File Information	Hori_Shota_summary.pdf



学位論文内容の要約

博士の専攻分野の名称 博 士（農学）

氏名 堀 将太

学位論文題名

高脂肪食摂取で増加する 12α 水酸化胆汁酸による

脂肪肝の誘導とその発現機構

序論

非感染性疾患 (non-communicational disease、NCD) は現代人類の死因の大半を占める (Achilladelis, 1993; Cutler et al., 2006)。世界保健機関 (WHO: World Health Organization) によると、NCD は「不健康な食事や運動不足、喫煙、過度の飲酒、大気汚染などにより引き起こされる、癌・糖尿病・循環器疾患・呼吸器疾患・メンタルヘルスをはじめとする慢性疾患をまとめて総称したもの」と定義されている (Alwan, 2011)。1900 年代の後半には NCD による死亡率が感染症を上回り (Achilladelis, 1993; Cutler et al., 2006)、現代で最大の脅威となった。2008 年には死因のおよそ 3 分の 2 を NCD が占め、地域の低～中所得者ではその割合は 80% にもものぼった (Alwan, 2011)。感染症が未だ死因上位を占めるアフリカでさえ、2030 年までに NCD による死因が感染症を上回ると予測されている (Alwan, 2011)。すなわち、NCD の予防法および治療法の確立は人類が成し遂げるべき最重要課題の 1 つといっても過言ではない。

非アルコール性脂肪肝 (non-alcoholic fatty liver disease、NAFLD) は過剰な飲酒を伴わずに肝臓に脂肪が蓄積する疾患である。複雑で多様な表現型から、より包括的な疾患を表す病名として代謝性脂肪肝疾患 (metabolic associated fatty liver disease、MAFLD) とも呼称されるようになり (Eslam et al., 2020)、糖尿病や心血管系疾患等の NCD の発症リスクを上昇させる事もわかってきた (Younossi et al., 2018)。西洋における NAFLD の罹患率は 20–30% (Vernon et al., 2011)、世界中では 10 億人もの NAFLD 患者が存在し (Younossi et al., 2018)、特に幼児や青年期の若者の間でその患者数が増加している (Wiegand et al., 2010)。従来、NAFLD は単なるメタボリックシンドロームの発現型の 1 つと考えられていたが、炎症を伴った非アルコール性脂肪肝炎 (nonalcoholic steatohepatitis、

NASH) および肝硬変、肝臓癌の主要な発症要因であるだけでなく (Younossi et al., 2018)、糖尿病や心血管系疾患に先だって発症し (Lonardo et al., 2015)、肝臓局所に留まらない NCD の発症リスクを上昇させる (Younossi et al., 2018)。すなわち、NAFLD の予防および治療法の確立は NCD 発症リスク低下、ひいては人類の健康寿命延伸に直結する。

12 α 水酸化胆汁酸 (12 α -hydroxylated bile acid、12 α OH) は肝臓で合成されるコレステロールの最終異化産物の 1 つである。コレステロール 7 α 水酸化酵素 (cholesterol 7 α -hydroxylase、CYP7A1) (Myant & Mitropoulos, 1977) が胆汁酸合成の中間体である 7 α 水酸化コレステロール (7 α -hydroxylated cholesterol、7 α OH) を生成した後、12 α 水酸化酵素 (12 α -hydroxylase、CYP8B1) がステロイド骨格の 12 位が水酸化反応 (Pandak et al., 2001) を担うことで 12 α OH であるコール酸 (cholic acid、CA) を合成する。合成された CA はタウリンやグリシンによる抱合化を受けたのちに胆管を通過して管腔内へ分泌される。興味深いことに、12 位に水酸基を持たない非 12 α 水酸化胆汁酸 (non-12 α -hydroxylated bile acid、non-12 α OH) と比較すると、糖尿病 (Haeusler et al., 2013) や NAFLD (Chashmnam et al., 2019; Mouzaki et al., 2016; Puri et al., 2018) で 12 α OH の特異的な増加が観察され、肝臓脂肪蓄積に対して促進的に働く事が代謝経路に関わる遺伝子改変により示唆されている (Bertaggia et al., 2017)。しかしながら、12 α OH が選択的に増加する機構や 12 α OH が肝臓脂肪蓄積を起こす発現機構は未解明であり、12 α OH は腸内細菌による代謝を受けることで複雑に形態を変えるため、肝臓脂肪蓄積に寄与する分子種も特定されていない。

本論文は、NAFLD の中核を成す肝臓脂肪蓄積を引き起こす媒介物質として 12 α OH に着目し、食事要因により 12 α OH が特異的に増加する機構および 12 α OH が肝臓脂肪蓄積へ及ぼす影響を明らかにする事を目指した基盤研究である。全世界で 10 億人もの罹患者が存在する NAFLD の肝臓脂肪蓄積を起こす原因物質の特定は、NAFLD の予防策および治療策の策定における重要課題である。

序論では本研究遂行にあたっての基盤的背景を端的に纏め、実験内容を第 1 章から第 3 章に記載した。各章ごとに背景と目的、実験方法、結果と考察を記述した。第 1 章では、食餌脂質摂取による 12 α OH 特異的増加機構の解明および 12 α OH が肝臓脂質蓄積に及ぼす影響の評価を試みた。具体的には、高脂肪食 (high-fat diet、HFD) を与えたラットにおける腸肝循環および糞中の胆汁酸代謝を解析し、肝臓脂質代謝との関係性を評価した。

第2章では $12\alpha\text{OH}$ による肝臓脂肪蓄積へ及ぼす影響およびその機構を検討するために、肝臓で合成される $12\alpha\text{OH}$ である CA をラットに与えることで、HFD に類似した胆汁酸環境を形成し、肝臓脂質代謝を解析した。更に、腸内細菌による $12\alpha\text{OH}$ の代謝が肝臓脂肪蓄積に関与するかどうかを検証するために、CA とバンコマイシン (vancomycin、VCM) の飲水投与を組み合わせたラットの肝臓脂質代謝を解析した。第3章では、第2章および3章で観察された肝臓鉄濃度低下と肝臓脂肪蓄積の密接な相関関係の因果関係を調べた。

第1章 HFD による $12\alpha\text{OH}$ の特異的増加機構と脂肪肝への関与

【背景と目的】飽和脂肪酸および n-6 系の多価不飽和脂肪酸を比較的豊富に含むラードベースの HFD を与えると脂肪肝を発症する (Buettner et al., 2006)。一方、n-3 系の不飽和脂肪酸を豊富に含む魚油ベースの HFD の摂取では脂肪肝は発症せず (Buettner et al., 2006)、むしろ脂肪肝発症後に n-3 系の多価不飽和脂肪酸を与えると改善に向かう (Marsman et al., 2011; Nobili et al., 2011)。すなわち、n-3 系の多価不飽和脂肪酸を豊富に含む食事が脂肪肝に対して抑制的に働く一方で、飽和脂肪酸や n-6 系の多価不飽和脂肪酸リッチな食事は脂肪肝の発症に促進的に働く。興味深いことに、マウスに飽和脂肪酸を豊富に含む食事を与えた場合には胆汁中の $12\alpha\text{OH}$ が増加するが、多価不飽和脂肪酸では同様の現象は観察されない (Devkota et al., 2012)。これらの結果は $12\alpha\text{OH}$ が特異的に増加する事で食餌誘導性の脂肪肝発症を媒介する可能性を示唆するが、 $12\alpha\text{OH}$ の特異的増加機構や食餌誘導性脂肪肝の発症における $12\alpha\text{OH}$ の役割は明らかになっていない。本章では、 $12\alpha\text{OH}$ が選択的に増加する HFD 摂取モデルを用いて $12\alpha\text{OH}$ の増加機構と肝臓脂肪蓄積との関連を調べた。

【方法】5週齢の雄性 WKAH/HkmSlc ラット (日本エスエルシー、東京、日本、NBRP ラット No:0154) に AIN93G をベースにしたコントロール飼料 (Reeves et al., 1993) ($n = 6$) または糖源のうち 230 g/kg をラードに置換した HFD 食 ($n = 7$) を8週間与えた。試験期間終了後、腸肝循環に関わる組織、血液、糞を回収し、胆汁酸代謝および胆汁酸代謝に関わる遺伝子発現を調べた。また、糞中脂質排泄および肝臓脂質代謝に関わる遺伝子発現を解析する事で $12\alpha\text{OH}$ の特異的な増加と脂肪肝との関係性を分析した。

【結果と考察】HFD ラットでは、腸肝循環に関連する体液、組織において $12\alpha\text{OH}$ 濃度が選択的に上昇した。 $12\alpha\text{OH}$ 選択的な増加機構を調べるために、胆汁酸合成に関わる

酵素の遺伝子発現レベルおよび胆汁酸合成の前駆体である酸化コレステロールを評価したところ、HFD 摂取で肝臓において $12\alpha\text{OH}$ 合成を司る CYP8B1 の遺伝子発現レベルが上昇することを見出した。また、肝臓のコレステロール蓄積に伴って胆汁酸合成の律速酵素である CYP7A1 の遺伝子発現レベルと CYP7A1 が胆汁酸生合成の中間体として合成する 7α 水酸化コレステロール濃度が肝臓で上昇した。これらの結果は、HFD 摂取が胆汁酸前駆体合成の増加および CYP8B1 遺伝子発現レベルの増大を介して、 $12\alpha\text{OH}$ を選択的に増加させる経路を示唆する。さらに、 $12\alpha\text{OH}$ が混合ミセルの形成作用により食事脂質の吸収を促進する知見と一致して、腸肝循環における $12\alpha\text{OH}$ 濃度は見掛けの脂肪吸収量の増加を伴って肝臓脂肪濃度と正の相関を示した。すなわち、HFD 誘導性の $12\alpha\text{OH}$ 特異的な増大は食事脂肪吸収を促進することで脂肪肝に寄与する可能性がある。

第 2 章 12α 水酸化胆汁酸による脂肪肝発症機構の解析

【背景と目的】第 1 章より、HFD が $12\alpha\text{OH}$ 濃度を選択的に上昇させる事で食事脂肪吸収の促進を介して脂肪肝の発症に寄与する可能性が示された。この発見を支持して、*Cyp8b1*^{-/-}マウスでは $12\alpha\text{OH}$ 産生が低下するとともに食餌脂肪吸収の低下を伴って高脂肪・高コレステロール食誘導性の脂肪肝が抑制される (Bertaggia et al., 2017)。一方、肝臓における非脂質前駆体からの脂肪酸合成 (de novo lipogenesis、DNL) が NAFLD 発症において重要な役割を担うことが近年明らかになりつつあるが (Lambert et al., 2014; Sanders et al., 2018; Smith et al., 2020; Tamura & Shimomura, 2005)、 $12\alpha\text{OH}$ が DNL に及ぼす影響は未解明である。また、 $12\alpha\text{OH}$ は腸内細菌による代謝を受けることで複雑に形態を変えるため、肝臓脂肪蓄積に寄与する分子種も特定されていない。本章では、肝臓で合成される $12\alpha\text{OH}$ である CA をラットの食餌に添加する事で HFD に類似した $12\alpha\text{OH}$ 選択的な増加環境を形成し、脂肪肝発症における $12\alpha\text{OH}$ の関与、そしてヒト臨床試験により肝臓脂肪蓄積と関与することが示唆されている肝臓鉄濃度 (Britton et al., 2018) との関連性を評価した。また、VCM 投与により腸内細菌による二次胆汁酸生成を抑制した状態で、CA 摂取が肝臓脂肪蓄積に及ぼす影響も検証した。

【方法】試験 2-1 では、4 週齢の雄性 WKAH/HkmSlc ラット (日本エスエルシー) に AIN93G をベースにしたコントロール食 (Reeves et al., 1993) ($n = 12$) または CA 食 (0.5 g/kg コントロール食) ($n = 12$) を与え、13 週間飼育した。試験期間終了後、門脈血漿中の

胆汁酸組成、肝臓脂質、肝臓脂質代謝に関わる遺伝子発現、糞中脂質排泄、肝臓鉄濃度、肝臓鉄代謝に関わる遺伝子発現、そして血中鉄関連のパラメータを測定した。試験 2-2 では、試験 2-1 と同様の食餌を与えた上で、飲用水単体もしくは VCM (200 mg/L、富士フィルム和光純薬) を添加した飲み水を 6 週間与え、試験 2-1 と同様の解析を行った。

【結果と考察】CA 摂取により non-12 α OH と比較して 12 α OH が特異的に増加する事を確認した。このとき、糞中脂質排泄量の低下だけでなく、DNL を制御するステロール調節配列結合タンパク質 (sterol regulatory-element binding protein 1、SREBP1) 遺伝子発現レベルの上昇を伴って脂肪肝を発症することを見出した。また、CA 摂取により、摂食量の低下および見かけの鉄吸収量に変化がないにも関わらず肝臓鉄濃度が低下した。血漿鉄、ヘモグロビン、フェリチン濃度に変化はなく、肝臓鉄濃度の制御に関わる遺伝子のうち、細胞外への鉄輸送に関わるリポカリン 2 (lipocalin 2、LNC2) の遺伝子発現レベルおよび血漿 LCN2 濃度が上昇していた。興味深いことに、肝臓鉄濃度は肝臓脂肪蓄積と強い負の相関を示した。これらの結果は、12 α OH が LCN2 を媒介因子とした肝臓鉄濃度低下を介して、脂肪肝の発症に寄与する経路を示唆している。また、VCM 投与により腸内細菌による二次胆汁酸生成を抑制した場合にも、CA 摂取による LCN2 遺伝子発現の上昇と肝臓鉄濃度の低下、SREBP1 遺伝子発現の亢進および肝臓脂肪蓄積は解消されなかった。すなわち、肝臓で合成される 12 α OH は、腸内細菌による二次胆汁酸生成にかかわらず、肝臓鉄濃度の低下や DNL 亢進を介して脂肪肝を起こすと考えられる。

第 3 章 軽度鉄欠乏による肝臓脂肪蓄積への影響評価

【背景と目的】第 2 章の研究から、12 α OH による肝臓脂質蓄積を肝臓鉄濃度の低下が媒介する可能性が示された。CA 食を与えたラットでは摂食量や見かけの鉄吸収量に有意な変化が認められないにも関わらず肝臓鉄濃度が低下していた。興味深いことに、貧血を伴わない軽度な鉄欠乏状態であるものの、肝臓鉄濃度と肝臓脂質濃度の間には強い負の相関が観察された。すなわち、肝臓局所的な鉄濃度の低下が肝臓脂肪蓄積を促進する可能性がある。貧血を伴わない ID の患者数 (marginal iron deficiency、MID) は貧血を伴った鉄欠乏 (ID) の 4 倍にも上るとされていることから (Ioannou et al., 2002)、MID が肝臓脂肪蓄積に及ぼす影響を明らかにする意義は大きい。特筆すべきは、鉄欠乏食を与えたラットにおいて脂質合成に関連する遺伝子発現および肝臓 TG 濃度の上昇が報告されている事だ (Davis

et al., 2012)。一方、これらの ID は貧血の特徴である血中ヘモグロビン濃度の低下や摂食量・体重の減少を伴っており、肝臓鉄濃度低下以外に明確な症状が現れない CA 負荷の状態とは大きく異なり、MID が肝臓の脂質代謝に影響を及ぼすかどうかは明らかになっていない。MID でも認知機能 (Black, 2003) や運動機能 (Brownlie et al., 2002, 2004)、および心機能 (Hoes et al., 2018) に及ぼすことが臨床試験および細胞試験が報告されている事に加え、肝臓は鉄代謝および脂質代謝が盛んに行われる臓器であることから、MID による肝臓鉄濃度の低下は肝臓脂質代謝に何らかの影響を及ぼす可能性がある。本章では、食事からの鉄供給制限が肝臓脂肪蓄積に及ぼす作用を調べるために、充足量の半量の鉄を含む MID 食をラットに与える実験を実施した。

【方法】試験 3-1 では、AIN93G に準拠した鉄充足食 (iron-adequate, IA) (Reeves et al., 1993)、鉄を除いた ID 食、鉄充足食の鉄量を半分に設定した MID (IA : ID = 1/1、w/w) を与える 3 群に分け ($n = 8$)、3 週間飼育した。試験期間終了後、肝臓鉄濃度、血漿鉄関連パラメータ、肝臓脂質、肝臓脂質代謝に関わる遺伝子発現を測定した。試験 3-2 では、IA、MID、高スクロース (high-sucrose, HS) の IA 食、もしくは HS の MID 食を与えた 4 群に分け ($n = 6$)、3 週間飼育し、試験 3-1 と同様の解析を行った。

【結果と考察】ID 群では肝臓鉄および血漿鉄濃度、血中ヘモグロビン濃度の低下を伴って食餌摂取量と体重がコントロールに比べて減少した。一方で、MID 群では血中ヘモグロビン濃度や食餌摂取量、体重の減少を伴わずに CA 摂取と同程度の肝臓鉄濃度低下が観察された。この時、肝臓における DNL を亢進させやすいショ糖を多く含む食餌を与えた状態において、MID の摂取が DNL に関わる脂肪酸合成酵素の遺伝子発現レベルの上昇を伴って、肝臓脂肪蓄積を誘導することを見出した。以上の結果は、肝臓局所的な鉄濃度の低下が DNL を介して肝臓脂肪蓄積を促進する経路を示唆している。

総括

本研究により、NAFLD で観察される $12\alpha\text{OH}$ 特異的な増加機構の一端として、HFD 摂取による肝臓でのコレステロール蓄積および胆汁酸合成酵素の遺伝子発現レベルの上昇、胆汁酸合成の中間体の増大を介した経路が示唆された。また、腸内細菌による二次胆汁酸生成とは無関係に、肝臓由来の $12\alpha\text{OH}$ が食事脂肪吸収の促進や肝臓鉄濃度の低下、および肝臓 DNL 亢進等の複数の経路を介して肝臓脂質蓄積を促進する経路が示された。

参考文献

- Achilladelis, B. (1993). The dynamics of technological innovation: The sector of antibacterial medicines. *Research Policy*, 22(4), 279–308.
- Alwan, A. (2011). *Global status report on noncommunicable diseases 2010*. World Health Organization.
- Bertaggia, E., Jensen, K. K., Castro-Perez, J., Xu, Y., Di Paolo, G., Chan, R. B., Wang, L., & Haeusler, R. A. (2017). Cyp8b1 ablation prevents Western diet-induced weight gain and hepatic steatosis because of impaired fat absorption. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 313(2), E121–E133.
- Black, M. M. (2003). Micronutrient deficiencies and cognitive functioning. *The Journal of Nutrition*, 133(11), 3927S – 3931S.
- Britton, L., Bridle, K., Reiling, J., Santrampurwala, N., Wockner, L., Ching, H., Stuart, K., Subramaniam, V. N., Jeffrey, G., St Pierre, T., House, M., Gummer, J., Trengove, R., Olynyk, J., Crawford, D., & Adams, L. (2018). Hepatic iron concentration correlates with insulin sensitivity in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology Communications*, 2(6), 644–653.
- Brownlie, T., IV, Utermohlen, V., Hinton, P. S., Giordano, C., & Haas, J. D. (2002). Marginal iron deficiency without anemia impairs aerobic adaptation among previously untrained women. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 75(4), 734–742.
- Brownlie, T., IV, Utermohlen, V., Hinton, P. S., & Haas, J. D. (2004). Tissue iron deficiency without anemia impairs adaptation in endurance capacity after aerobic training in previously untrained women. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79(3), 437–443.
- Buettner, R., Parhofer, K. G., Woenckhaus, M., Wrede, C. E., Kunz-Schughart, L. A., Schölmerich, J., & Bollheimer, L. C. (2006). Defining high-fat-diet rat models: metabolic and molecular effects of different fat types. *Journal of Molecular Endocrinology*, 36(3), 485–501.
- Chashmniam, S., Ghafourpour, M., Rezaei Farimani, A., Gholami, A., & Nobakht Motlagh Ghoochani, B. F. (2019). Metabolomic biomarkers in the diagnosis of non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatitis Monthly*, 19(9).
- Cutler, D., Deaton, A., & Lleras-Muney, A. (2006). The determinants of mortality. *The Journal of Economic Perspectives*, 20(3), 97–120.
- Davis, M. R., Rendina, E., Peterson, S. K., Lucas, E. A., Smith, B. J., & Clarke, S. L. (2012). Enhanced expression of lipogenic genes may contribute to hyperglycemia and alterations in plasma lipids in response to dietary iron deficiency. *Genes & Nutrition*,

7(3), 415–425.

- Devkota, S., Wang, Y., Musch, M. W., Leone, V., Fehlner-Peach, H., Nadimpalli, A., Antonopoulos, D. A., Jabri, B., & Chang, E. B. (2012). Dietary-fat-induced taurocholic acid promotes pathobiont expansion and colitis in IL10^{-/-} mice. *Nature*, 487(7405), 104–108.
- Eslam, M., Sanyal, A. J., George, J., & International Consensus Panel. (2020). MAFLD: A consensus-driven proposed nomenclature for metabolic associated fatty liver disease. *Gastroenterology*, 158(7), 1999–2014.e1.
- Haeusler, R. A., Astiarraga, B., Camastra, S., & Accili, D. (2013). Human insulin resistance is associated with increased plasma levels of 12 α –hydroxylated bile acids. *Diabetes*, 62, 4184–4191.
- Hoes, M. F., Grote Beverborg, N., Kijlstra, J. D., Kuipers, J., Swinkels, D. W., Giepmans, B. N. G., Rodenburg, R. J., van Veldhuisen, D. J., de Boer, R. A., & van der Meer, P. (2018). Iron deficiency impairs contractility of human cardiomyocytes through decreased mitochondrial function. *European Journal of Heart Failure*, 20(5), 910–919.
- Ioannou, G. N., Rockey, D. C., Bryson, C. L., & Weiss, N. S. (2002). Iron deficiency and gastrointestinal malignancy: a population-based cohort study. *The American Journal of Medicine*, 113(4), 276–280.
- Lambert, J. E., Ramos-Roman, M. A., Browning, J. D., & Parks, E. J. (2014). Increased de novo lipogenesis is a distinct characteristic of individuals with nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*, 146(3), 726–735.
- Lonardo, A., Ballestri, S., Marchesini, G., Angulo, P., & Loria, P. (2015). Nonalcoholic fatty liver disease: a precursor of the metabolic syndrome. *Digestive and Liver Disease*, 47(3), 181–190.
- Marsman, H. A., Heger, M., Kloek, J. J., Nienhuis, S. L., van Werven, J. R., Nederveen, A. J., ten Kate, F. J. W., Stoker, J., & van Gulik, T. M. (2011). Reversal of hepatic steatosis by omega-3 fatty acids measured non-invasively by 1H-magnetic resonance spectroscopy in a rat model. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 26(2), 356–363.
- Mouzaki, M., Wang, A. Y., Bandsma, R., Comelli, E. M., Arendt, B. M., Zhang, L., Fung, S., Fischer, S. E., McGilvray, I. G., & Allard, J. P. (2016). Bile Acids and Dysbiosis in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *PloS One*, 11(5), e0151829.
- Myant, N. B., & Mitropoulos, K. A. (1977). Cholesterol 7 α -hydroxylase. *Journal of Lipid Research*, 18(2), 135–153.
- Nobili, V., Bedogni, G., Alisi, A., Pietrobattista, A., Risé, P., Galli, C., & Agostoni, C. (2011). Docosahexaenoic acid supplementation decreases liver fat content in children with non-alcoholic fatty liver disease: double-blind randomised controlled clinical trial.

- Archives of Disease in Childhood*, 96(4), 350–353.
- Pandak, W. M., Bohdan, P., Franklund, C., Mallonee, D. H., Eggertsen, G., Björkhem, I., Gil, G., Vlahcevic, Z. R., & Hylemon, P. B. (2001). Expression of sterol 12 α -hydroxylase alters bile acid pool composition in primary rat hepatocytes and in vivo. *Gastroenterology*, 120(7), 1801–1809.
- Puri, P., Daita, K., Joyce, A., Mirshahi, F., Santhekadur, P. K., Cazanave, S., Luketic, V. A., Siddiqui, M. S., Boyett, S., Min, H.-K., Kumar, D. P., Kohli, R., Zhou, H., Hylemon, P. B., Contos, M. J., Idowu, M., & Sanyal, A. J. (2018). The presence and severity of nonalcoholic steatohepatitis is associated with specific changes in circulating bile acids. *Hepatology*, 67, 534–548.
- Reeves, P. G., Nielsen, F. H., & Fahey, G. C., Jr. (1993). AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *The Journal of Nutrition*, 123(11), 1939–1951.
- Sanders, F. W. B., Acharjee, A., Walker, C., Marney, L., Roberts, L. D., Imamura, F., Jenkins, B., Case, J., Ray, S., Virtue, S., Vidal-Puig, A., Kuh, D., Hardy, R., Allison, M., Forouhi, N., Murray, A. J., Wareham, N., Vacca, M., Koulman, A., & Griffin, J. L. (2018). Hepatic steatosis risk is partly driven by increased de novo lipogenesis following carbohydrate consumption. *Genome Biology*, 19(1), 79.
- Smith, G. I., Shankaran, M., Yoshino, M., Schweitzer, G. G., Chondronikola, M., Beals, J. W., Okunade, A. L., Patterson, B. W., Nyangau, E., Field, T., Sirlin, C. B., Talukdar, S., Hellerstein, M. K., & Klein, S. (2020). Insulin resistance drives hepatic de novo lipogenesis in nonalcoholic fatty liver disease. *The Journal of Clinical Investigation*, 130(3), 1453–1460.
- Tamura, S., & Shimomura, I. (2005). Contribution of adipose tissue and de novo lipogenesis to nonalcoholic fatty liver disease [Review of *Contribution of adipose tissue and de novo lipogenesis to nonalcoholic fatty liver disease*]. *The Journal of Clinical Investigation*, 115(5), 1139–1142. Am Soc Clin Investig.
- Vernon, G., Baranova, A., & Younossi, Z. M. (2011). Systematic review: the epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 34(3), 274–285.
- Wiegand, S., Keller, K.-M., Röbl, M., L'Allemand, D., Reinehr, T., Widhalm, K., Holl, R. W., & APV-Study Group and the German Competence Network Adipositas. (2010). Obese boys at increased risk for nonalcoholic liver disease: evaluation of 16,390 overweight or obese children and adolescents. *International Journal of Obesity*, 34(10), 1468–1474.
- Younossi, Z., Anstee, Q. M., Marietti, M., Hardy, T., Henry, L., Eslam, M., George, J., & Bugianesi, E. (2018). Global burden of NAFLD and NASH: trends, predictions, risk

factors and prevention. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*, 15(1), 11–20.

Younossi, Z. M., Stepanova, M., Lawitz, E., Charlton, M., Loomba, R., Myers, R. P., Subramanian, M., McHutchison, J. G., & Goodman, Z. (2018). Improvement of hepatic fibrosis and patient-reported outcomes in non-alcoholic steatohepatitis treated with selonsertib. *Liver International*, 38(10), 1849–1859.