

C型慢性肝炎に対するIFNを基盤とする治療法が飛躍的に進歩し、持続的ウイルス排除率(sustained viral response : SVR)は難治性の1b高ウイルス量群ですら50%を超えるようになっており、現在治験が進んでいるHCVプロテアーゼ阻害薬を追加することでさらなるSVRの向上が期待されている。しかしながら、逆にみると数10%のC型慢性肝炎やSVRが極端に低い高度線維化群や高齢者ではIFNでのウイルス排除が望めないため、肝硬変の予防やさらには肝癌発症予防を目的として抗線維化薬が必要になってくる。B型慢性肝炎に関しても同様に、IFNや核酸アナログ製剤でHBVがコントロールされ、AST/ALTが正常域に保たれる症例は線維化進展が遅延するが、変異などでコントロールが困難になれば病期の進行を懸念せざるをえない。また、近年増加傾向にあるメタボリック症候群と関連する脂肪肝やNASHは日常の食生活や運動習慣と関与することが示唆されるため、早期発見と安全な薬剤による肝線維化予防を考慮しないと、非B型・非C型の肝硬変を増加させる一因になりかねない。以上の理由から、基礎的データに裏打ちされた抗肝線維化薬は必須である。

方法論としては、①星細胞の活性化自体を制御する、②星細胞のコラーゲン産生を制御する、③星細胞の増殖を制御する、④毛細血管形成を含む間質の制御、などの手法が考えられる。IFNは*in vitro*および*in vivo*で星細胞活性化を制御する。IFN- $\gamma$ は単独でsmooth muscle  $\alpha$ -actin発現とコラーゲンゲル法で観察される細胞収縮を抑制する。IFN- $\gamma$ の臨床応用は副作用の点から難しいが、すでに広く臨床使用されているIFN- $\alpha$ やIFN- $\beta$ には星細胞増殖抑制効果があり、星細胞のアポトーシスを容易にする。IFN- $\alpha$ やIFN- $\gamma$ には星細胞のコラーゲン遺伝子発現プロモーター活性を抑制することが報告されており、その効果には細胞内シグナル因子のリン酸化Stat-1やp300が関与する<sup>30)</sup>。近年使用されるようになったPEG-

IFNは長時間作用型であり、星細胞活性化抑制効果の増強が期待される。最近、著者らはIFNによるI型コラーゲン(CollA1)産生抑制にmicroRNA(miR)-29bが関与することを報告した。ヒト星細胞のcell lineであるLX-2細胞をIFN- $\alpha$ やIFN- $\beta$ で刺激するとmiR-29bが濃度依存性に誘導される。miR-29bはCollA1の3'-UTR領域に3つの結合部位をもっており、事実、LX-2細胞においてもその部位へmiR-29bが結合できることが確認された。解析の結果、miR-29bはCollA1 mRNA発現と蛋白発現を抑制し、それにはSmadシグナルは関係せず、CollA1遺伝子の転写調節因子の1つSp-1発現への影響も関与することが明らかとなった<sup>31)</sup>。

臨床に直結する話題としてアンジオテンシンIIの阻害が注目に値する。すでに高血圧の治療薬として、アンジオテンシン変換酵素阻害薬やAT1受容体拮抗薬は多数存在する。ヒトならびにげっ歯類の星細胞はレニン-アンジオテンシンシステムのすべてのコンポーネントを発現している<sup>32)</sup>。その阻害薬を用いることで星細胞の活性化制御、ならびに肝線維化制御が多数の動物モデルで実証されており、また、ヒトNASHでもその効果が報告され、カンデサルタンシレキセチルやイルベサルタンを用いた各種の臨床試験が行われている<sup>33)34)</sup>。以上に加えて、制癌剤として登場、今後も開発が続く血管新生阻害薬(ソラフェニブなど)はVEGFやFGFなど成長因子に対する受容体依存性のRaf-MEK-ERKシグナル伝達を阻害する物質で肝癌を栄養する間質構成細胞としての血管新生を抑制する<sup>35)</sup>。上述したように、線維化肝の線維性隔壁部では活性化星細胞やmyofibroblast-like cellが増殖するのみでなく、隔壁に沿って血管新生が生じている。したがって、制癌剤自体が、抗線維化作用をもつ可能性が高く、そのような観点からも今後の研究が期待される分野である。



## 肝線維化の評価

上述したように肝線維化はメカニズム解析とそれに基づく治療法開発で話題性が集まっているが、診断面において新たな方法論が確立されつつある分野でもある。ウイルス性肝炎では、肝線維化の進行がIFN治療の効果予測に反映されるし、肝癌発症リスクと相関することが知られている。そのため、肝線維化の定量的評価はきわめて重要である。現在、臨床的な肝線維化の評価には、肝生検による病理組織診断がgold standardとなっているが、肝生検で得られる標本は肝臓全体の5万分の1に過ぎず、それをもって全肝臓の状態を把握しているとはいえない。サンプリングエラーや病理医間の診断時の相違を考慮する必要があるし、stage 0~4という5段階評価では定量性に問題がある。また、侵襲的で、疼痛、感染、出血などのリスクを伴うため、反復検査は困難で、長期経過観察のモニタリングには適さない。このような肝生検のもつ問題点を克服し、さらに非侵襲的に肝線維化を診断する方法として、血液検査、超音波、MRI、CTを用いた新しい検査法が開発されている。

### 1. 肝線維化の新しい評価方法

#### 1) 血液を用いた評価

肝線維化の評価には、血小板、血清線維化マーカー(IV型コラーゲン7S, III型プロコラーゲンN末端ペプチド(P-III-P), ヒアルロン酸など)が参考にされているが、これら単独で肝線維化をstage分類させることは困難である。このような細胞外マトリックスとは異なる血清マーカーを用いた間接的診断法が多数報告されており、AAR (AST/ALT ratio), APRI (AST-to-platelet ratio index), CDS (cirrhosis discriminant score), fibrotest, HALT-Cモデルなど、複数のパラメーターを組み合わせた肝線維化予測式が含まれる。

Fibrotest は haptoglobin,  $\alpha$ 2-macroglobulin, apolipoprotein-A1,  $\gamma$ -glutamyltransferase, bilirubin,  $\gamma$ -globulin という6つのパラメーターを用いたアルゴリズム計算式であり、>F2-4の診断能はAUC 0.87と報告されている。一方、P-III-P, ヒアルロン酸, TIMP-1といった細胞外マトリックス代謝と直接的に関係する分子を用いたマーカーとしてthe European Liver Fibrosis (ELF) studyから報告があり、Scheuer3-4の診断能はAUC 0.80である。さらに両者の特徴をもつFibrometerは血小板数, プロトロンビン時間, AST, ヒアルロン酸,  $\alpha$ 2-macroglobulin, 性別, 年齢が加味された数式を用いており、F2以上の線維化をAUC 0.89で診断できると報告されている<sup>36)</sup>。

### 2) 超音波検査を基盤とする評価

#### ① FibroScan502<sup>®</sup>

体表をピストンで叩打した際に発生する弾性波の肝内進行を超音波装置で観察することによって、肝線維化を短時間に非侵襲的かつ定量的に測定できるエラストメーターFibroScan502<sup>®</sup>がエコセンズ社(フランス)により開発された<sup>37)</sup>。通常は体外超音波の要領で右肋間から肝右葉に対して振動波を共振し、弾性度を測定する。慢性肝疾患における線維化の評価に有用であることが多数報告されている。特に、C型肝炎症例においては、肝生検によるMetavir fibrosis stageや新犬山分類のF stageとよく相関することが報告されており、2005年のCasteraらの報告が先駆的である<sup>38)</sup>。彼らの論文ではFibroScan<sup>®</sup>によるliver stiffness measurement (LSM)の診断率はAUCで $0.83 \geq F2$ ,  $0.90 \geq F3$ ,  $0.95 = F4$ ときわめて良好である。当施設でも237例のC型慢性肝炎症例に対して弾性度を測定したところ、F stage 0~4の弾性度(中央値kPa)はそれぞれ4.1, 6.3, 8.8, 14.6, 22.2であり、相関が認められた( $p < 0.001$ )<sup>39)</sup>。また、LSMはNASH患者の肝線維化評価にも応用

できることが報告されている。著明な肝萎縮や腹水、肥満などの場合には測定部位の設定が困難な場合もあるが熟練度を要さず、また診断者間の差がなく、非侵襲的に反復して行うことが可能である。また、肝生検では肝全体の5万分の1しかみていないが、FibroScan502<sup>®</sup>の測定域は500分の1を反映しているといわれており、より広範囲の硬度をカバーできる。

## ② Real-time Tissue Elastography<sup>®</sup>

Real-time Tissue Elastography<sup>®</sup>は株式会社日立メディコが開発した日本発の超音波に基づく組織硬度診断法であり、技術的に transient elastography とは異なっている<sup>40)</sup>。通常の B モードによる臓器観察と同時に施行可能であり、すでに乳腺、甲状腺や前立腺の腫瘍を検出するために利用されている。この装置の特徴は組織弾性度を色調により超音波画像として捉えることができる点にある。Friedrich-Rust らはこの手法を肝臓の硬度測定に利用し、特に APRI と併用することで AUC 0.93  $\geq$  F2 が達成できたとしている<sup>41)</sup>。本手法は肥満患者や腹水の存在下でも施行できるため、今後汎用される可能性がある。

## 3) その他

Contrast-Enhanced MRI, Diffusion-Weighted MRI, MR-Spectroscopy, MR Elastography<sup>42)</sup>, FibroCT<sup>43)</sup> など新しい手法が開発されており、それぞれ肝生検での線維化 stage と関連することが示されている。

## 2. 肝癌スクリーニングへの応用

慢性肝炎における肝線維化の評価は、病態の進行のみでなく、肝細胞癌・静脈瘤など合併症を予測するうえでも有用である。Foucher らは、144 例の C 型慢性肝炎患者 (F3 あるいは F4) に対して FibroScan502<sup>®</sup> を用いて肝の弾性度 (kPa) を測定し、合併症の出現との相関を調べたところ、食道

静脈瘤 (stage 2 あるいは stage 3) の出現、腹水、肝細胞癌の出現、食道静脈瘤の破裂のカットオフ値は、それぞれ 27.5, 49.1, 53.7, 62.7 kPa であったことを報告している<sup>44)</sup>。また Masuzaki らは 866 例の C 型慢性肝炎患者を前向きに登録し、3 年間 LSM 測定で追跡したところ 77 例の肝癌発生のうち、LSM 10 kPa 以下は 0.4 % であるのに対し、LSM25 以上では 38.5 % に上るとし、LSM が肝癌発生の予測ツールとなり得ることを報告している<sup>45)</sup>。

## おわりに

肝線維化研究は星細胞の細胞生物学的側面の解明に端を発し、基礎的研究と臨床研究が同時に進行し、診断手法として非侵襲的肝線維化評価法、治療法としていくつかの候補物質の臨床治験に至るまで進展してきた。しかしながら、星細胞の新しい機能が次々と発見されて、本細胞の本質に迫るミステリーは留まることを知らないばかりでなく、星細胞にビタミン A が貯蔵される意義すら解明されていないのが現状である。星細胞に基点を置きながら当該研究分野がさらに発展することを期待したい。

## References

- 1) Haubrich WS : Kupffer of Kupffer cells. *Gastroenterology* 127 : 16, 2004
- 2) Wake K : Perisinusoidal stellate cells (fat-storing cells, interstitial cells, lipocytes), their related structure in and around the liver sinusoids, and vitamin A-storing cells in extrahepatic organs. *Int Rev Cytol* 66 : 303-353, 1980
- 3) Hepatic stellate cell nomenclature. *Hepatology* 23 : 193, 1996
- 4) Kawada N, Klein H, Decker K : Eicosanoid-mediated contractility of hepatic stellate cells. *Biochem J* 285 : 367-371, 1992
- 5) 河田則文, 井上正康 : 肝代謝 - その細胞社会学的背景. *Mebio* 11 : 20-26, 1994
- 6) Friedman SL : Molecular regulation of hepatic fibro-



- sis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem* 275 : 2247-2250, 2000
- 7) Friedman SL : Hepatic stellate cells: protean, multi-functional, and enigmatic cells of the liver. *Physiol Rev* 88 : 125-172, 2008
  - 8) Asahina K, Tsai SY, Li P, et al : Mesenchymal origin of hepatic stellate cells, submesothelial cells, and perivascular mesenchymal cells during mouse liver development. *Hepatology* 49 : 998-1011, 2009
  - 9) Iredale JP : Models of liver fibrosis: exploring the dynamic nature of inflammation and repair in a solid organ. *J Clin Invest* 117 : 539-548, 2007
  - 10) Zeisberg M, Yang C, Martino M, et al : Fibroblasts derive from hepatocytes in liver fibrosis via epithelial to mesenchymal transition. *J Biol Chem* 282 : 23337-23347, 2007
  - 11) Buchholz M, Kestler HA, Holzmann K, et al : Transcriptome analysis of human hepatic and pancreatic stellate cells : organ-specific variations of a common transcriptional phenotype. *J Mol Med* 83 : 795-805, 2005
  - 12) Kida Y, Asahina K, Inoue K, et al : Characterization of vitamin A-storing cells in mouse fibrous kidneys using *Cygb*/STAP as a marker of activated stellate cells. *Arch Histol Cytol* 70 : 95-106, 2007
  - 13) Kristensen DB, Kawada N, Imamura K, et al : Proteome analysis of rat hepatic stellate cells. *Hepatology* 32 : 268-277, 2000
  - 14) Kawada N, Kristensen DB, Asahina K, et al : Characterization of a stellate cell activation-associated protein (STAP) with peroxidase activity found in rat hepatic stellate cells. *J Biol Chem* 276 : 25318-25323, 2001
  - 15) Nakatani K, Okuyama H, Shimahara Y, et al : Cytoglobin/STAP, its unique localization in splanchnic fibroblast-like cells and function in organ fibrogenesis. *Lab Invest* 84 : 91-101, 2004
  - 16) Shaw RJ, Omar MM, Rokadiya S, et al : Cytoglobin is upregulated by tumour hypoxia and silenced by promoter hypermethylation in head and neck cancer. *Br J Cancer* 101 : 139-144, 2009
  - 17) Schwabe RF, Brenner DA : Mechanisms of Liver Injury. I. TNF-alpha-induced liver injury : role of IKK, JNK, and ROS pathways. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 290 : 583-589, 2006
  - 18) Begriche K, Igoudjil A, Pessayre D, et al : Mitochondrial dysfunction in NASH : causes, consequences and possible means to prevent it. *Mitochondrion* 6 : 1-28, 2006
  - 19) Seki E, De Minicis S, Osterreicher CH, et al : TLR4 enhances TGF-beta signaling and hepatic fibrosis. *Nat Med* 13 : 1324-1332, 2007
  - 20) Rivera CA, Bradford BU, Hunt KJ, et al : Attenuation of CCl<sub>4</sub>-induced hepatic fibrosis by GdCl<sub>3</sub> treatment or dietary glycine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 281 : G200-207, 2001
  - 21) Hézode C, Zafrani ES, Roudot-Thoraval F, et al : Daily cannabis use: a novel risk factor of steatosis severity in patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 134 : 432-439, 2008
  - 22) Mallat A, Lotersztajn S : Cannabinoid receptors as novel therapeutic targets for the management of non-alcoholic steatohepatitis. *Diabetes Metab* 34 : 680-684, 2008
  - 23) Julien B, Grenard P, Teixeira-Clerc F, et al : Antifibrogenic role of the cannabinoid receptor CB2 in the liver. *Gastroenterology* 128 : 742-755, 2005
  - 24) Teixeira-Clerc F, Julien B, Grenard P, et al : CB1 cannabinoid receptor antagonism : a new strategy for the treatment of liver fibrosis. *Nat Med* 12 : 671-676, 2006
  - 25) She H, Xiong S, Hazra S, et al : Adipogenic transcriptional regulation of hepatic stellate cells. *J Biol Chem* 280 : 4959-4967, 2005
  - 26) Taimir P, Higuchi H, Kocova E, et al : Activated stellate cells express the TRAIL receptor-2/death receptor-5 and undergo TRAIL-mediated apoptosis. *Hepatology* 37 : 87-95, 2003
  - 27) Jeong WI, Park O, Gao B : Abrogation of the antifibrotic effects of natural killer cells/interferon-gamma contributes to alcohol acceleration of liver fibrosis. *Gastroenterology* 134 : 248-258, 2008
  - 28) Radaeva S, Sun R, Jaruga B, et al : Natural killer cells ameliorate liver fibrosis by killing activated stellate cells in NKG2D-dependent and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-dependent manners. *Gastroenterology* 130 : 435-452, 2006
  - 29) Arthur MJ : Collagenases and liver fibrosis. *J Hepatol* 22 (2 Suppl) : 43-48, 1995
  - 30) Fischer R, Cariers A, Reinehr R, et al : Caspase 9-dependent killing of hepatic stellate cells by activated Kupffer cells. *Gastroenterology* 123 : 845-861, 2002
  - 31) Ogawa T, Iizuka M, Sekiya Y, et al : Suppression of type I collagen production by microRNA-29b in cultured human stellate cells. *Biochem Biophys Res Commun* : 2009 (Epub ahead of print)
  - 32) Oakley F, Teoh V, Ching-A-Sue G, et al : Angiotensin II activates I kappaB kinase phosphorylation of RelA at Ser 536 to promote myofibroblast survival and liver fibrosis. *Gastroenterology* 136 : 2334-2344, 2009

- 33) Yokohama S, Yoneda M, Haneda M, et al : Therapeutic efficacy of an angiotensin II receptor antagonist in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 40 : 1222-1225, 2004
- 34) Hirose A, Ono M, Saibara T, et al : Angiotensin II type I receptor blocker inhibits fibrosis in rat nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 45 : 1375-1381, 2007
- 35) Llovet JM, Bruix J : Molecular targeted therapies in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 48 : 1312-1327, 2008
- 36) Pinzani M, Vizzutti F, Arena U, et al : Technology Insight : noninvasive assessment of liver fibrosis by biochemical scores and elastography. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 5 : 95-106, 2008
- 37) Sandrin L, Fourquet B, Hasquenoph JM, et al : Transient elastography : a new noninvasive method for assessment of hepatic fibrosis. *Ultrasound Med Biol* 29 (12) : 1705-1713, 2003
- 38) Castéra L, Vergniol J, Foucher J, et al : Prospective comparison of transient elastography, Fibrotest, APRI, and liver biopsy for the assessment of fibrosis in chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 128 : 343-350, 2005
- 39) Takeda T, Yasuda T, Nakayama Y, et al : Usefulness of noninvasive transient elastography for assessment of liver fibrosis stage in chronic hepatitis C. *World J Gastroenterol* 12 : 7768-7773, 2006
- 40) Gheorghe L, Iacob S, Gheorghe C : Real-time sonoelastography - a new application in the field of liver disease. *J Gastrointest Liver Dis* 17 : 469-474, 2008
- 41) Friedrich-Rust M, Ong MF, Herrmann E, et al : Real-time elastography for noninvasive assessment of liver fibrosis in chronic viral hepatitis. *AJR Am J Roentgenol* 188 : 758-764, 2007
- 42) Talwalkar JA, Yin M, Fidler JL, et al : Magnetic resonance imaging of hepatic fibrosis : emerging clinical applications. *Hepatology* 47 : 332-342, 2008
- 43) Romero-Gómez M, Gómez-González E, Madrazo A, et al : Optical analysis of computed tomography images of the liver predicts fibrosis stage and distribution in chronic hepatitis C. *Hepatology* 47 : 810-816, 2008
- 44) Foucher J, Chanteloup E, Vergniol J, et al : Diagnosis of cirrhosis by transient elastography (FibroScan): a prospective study. *Gut* 55 : 403-408, 2006
- 45) Masuzaki R, Tateishi R, Yoshida H, et al : Prospective risk assessment for hepatocellular carcinoma development in patients with chronic hepatitis C by transient elastography. *Hepatology* 49 : 1954-1961, 2009

## 9. 肝臓の線維化研究の進展

大阪市立大学大学院医学研究科肝胆腸病態内科学教授 河田則文

key words stellate cell, cytokine, oxidative stress, fibrosis marker, liver stiffness measurement

### 動 向

B・C型などのウイルス性肝炎や脂肪性肝炎では慢性化とともに肝臓に線維化が生じ、進展すると肝硬変、肝癌が発症して、最終的には死に直結する。肝細胞の脱落壊死が慢性的に繰り返すと、壊死局所にI型コラーゲンを主とする細胞外マトリックス物質が蓄積して線維化が惹起される。肝障害が軽度である場合や病因が除去されると、残存肝細胞が再生増殖して、肝臓は修復される。しかし、障害が重度である場合や年単位で持続する場合には肝臓の破壊と再生のバランスが崩壊し、その代償として肝線維化が惹起される。肝線維化を惹起する因子の一つとして、肝星細胞の活性化が重要な役割を担っている。星細胞の活性化は、近隣に存在する肝細胞やKupffer細胞、類洞内皮細胞との密接な相互作用によって生じる。本稿ではまず肝線維化における星細胞の役割を概説する。一方、肝線維化研究では基礎研究で得られた情報を臨床上で活用されてきた背景がある。病理組織学的な肝臓の線維化進展度をC型慢性肝炎治療の効果予測に反映させることや、病因の除去により線維化レベルが改善することが明らかにされてきた。さらに、従来から臨床上的肝線維化判定は肝生検がゴールドスタンダードであったが、近

年、肝硬度測定法の出現で非侵襲的検査法がにわかに脚光を浴びてきた。この動向についても概説する。

### A. 肝線維化における星細胞の位置づけ

肝線維化は活性化星細胞より産生されたI型コラーゲンを主体とする細胞外マトリックス物質が肝実質に過剰蓄積することで惹起される。したがって、星細胞の活性化抑制に基づく細胞外マトリックス産生の制御が肝線維化治療に有効であると理論づけされる。

星細胞 (stellate cell, Ito cell, fat-storing cell, lipocyte, perisinusoidal cellともよばれてきた) は類洞の肝細胞側のDisse腔に配置し、細胞から伸びる枝状の突起で類洞内皮細胞を包囲し、一方で肝細胞とも接している。本細胞の主機能は正常肝では大量のビタミンAを貯蔵することである。体内の全ビタミンA量の50~80%は肝臓に存在し、その約90%が星細胞に貯えられており、必要に応じて肝細胞あるいは全身へと運搬される<sup>1)</sup>。その他の星細胞機能として、肝特異的pericyteとしての機能も有しており、星細胞が収縮・弛緩することにより類洞の微小循環を調節す

る<sup>2,3)</sup>. 本細胞は肝臓が障害を受けると、細胞の機能や形態を劇的に変化させ、性質の全く異なる筋線維芽様細胞 (myofibroblast-like cell = 活性化星細胞) へと形質を変える<sup>4)</sup>. すなわち、肝局所炎症により活性化したKupffer細胞、単球由来のマクロファージや凝集した血小板から放出されるplatelet-derived growth factor (PDGF) や transforming growth factor- $\beta$  1 (TGF- $\beta$  1) により受容体依存性に細胞内シグナルカスケードを介して活性化する。活性化星細胞では貯蔵ビタミンAが減少・消失し、細胞骨格タンパク質であるデスミンや $\alpha$ -smooth muscle actinが増加することで収縮能が増強し、I型コラーゲンを主体とする細胞外マトリックスを過剰に産生する。星細胞の活性化には転写調節因子AP-1, JunD, Sp1, KLF6, NF $\kappa$ Bなどが関与するが、それらが相互に作用して潜在型TGF- $\beta$  1を自ら産生させ、プラスミノゲンアクチベーター/プラスミンで活性化されて、オートクリン的にI型コラーゲン産生を亢進させる。この経路では細胞内のSmad, Ras, Raf-1, MEKやmitogen-activated protein (MAP) キナーゼなどの細胞内シグナル伝達物質が重要な役割を果たす。また、このループでコラーゲナーゼ阻害物質であるtissue inhibitor of matrix metalloproteinases (TIMPs) が産生されることで細胞外マトリックス物質の分解が抑制され、蓄積が進む結果となる。TIMP-1は星細胞のアポトーシスを抑制するため星細胞の持続的活性化にも貢献する<sup>5)</sup>。また、PDGF受容体、TGF- $\beta$  受容体、vascular endothelial growth factor (VEGF) 受容体をはじめとする多種多様なメディエーターに対する受容体発現が亢進しているのも活性化星細胞の特徴である。

## B. 肝線維化の発症・進展

星細胞の活性化、さらには肝線維化の発症・進展には、近隣に存在する細胞群に由来するサイトカインや酸化ストレスが関与している。障害肝細胞は過酸化脂質のソースとなり、肝細胞内ミトコンドリアなどから産生される過剰な活性酸素種 reactive oxygen species (ROS) や障害肝細胞由来の細胞膜自体や蛋白質が星細胞活性化因子となる<sup>6,7)</sup>。また、肝細胞内に2価鉄 ( $\text{Fe}^{2+}$ ) が過剰蓄積するとフェントン反応により強力な酸化作用をもつ $\cdot\text{OH}$ ラジカルを産生するため、肝細胞のアポトーシスを誘導し、星細胞の活性化を介して線維化を促進すると考えられる。肝細胞由来のサイトカインとしてはTGF- $\beta$ , TGF- $\alpha$ , insulin-like growth factorとその結合蛋白, hepatocyte growth factor (HGF), VEGF, interleukin-6 (IL-6)などが想定される。一方、肝臓のマクロファージであるKupffer細胞も多種多様な炎症性サイトカインを産生する。Kupffer細胞は類洞の内側に類洞内皮細胞に接着して存在する常在マクロファージで、主として門脈血中に含まれる消化管由来の異物や体内で生じた老廃物を貪食・処理する。肝障害が起こると、酸化ストレスや腸内細菌由来のエンドトキシン (lipopolysaccharide; LPS) によりToll-like receptor 4 (TLR4) とCD14を介してKupffer細胞は活性化される<sup>8)</sup>。Kupffer細胞由来のmacrophage chemotactic protein-1 (MCP-1) やosteopontinは炎症性細胞の肝臓への浸潤に関与する。さらに、活性化したKupffer細胞はPDGFやTGF- $\beta$  1を産生し、これらが星細胞の活性化を誘導する。動物モデルにおいてガドリニウムクロライド (gadolinium chloride) でKupffer細胞を除去すると、肝線維化抑制が生じることは、Kupffer細胞の肝線維化への関与を強く支持する<sup>9)</sup>。

## C. 肝線維化の可逆性

C型慢性肝炎に対するインターフェロン療法のウイルス排除 (SVR) 率が飛躍的に向上したこと、また、B型慢性肝炎に対して核酸アナログ製剤を用いてHBV-DNAが検出限界内に留められ血清AST/ALT値が正常範囲内で維持できるようになってきたことなどから、再肝生検を行うと線維化ステージが後退 (改善) していることが報告されるようになってきた。以前、肝硬変は「不可逆的」な肝臓病の終末期であるとされていた時期からするとエポックメイキングな概念の変遷である。肝線維化が改善することは主として次の2側面から生じると考えられる。1) 肝細胞の再生、2) 星細胞におけるmyofibroblast-like cellからビタミンA貯蔵型への逆行、あるいは、アポトーシスによる活性化星細胞の排除。肝細胞壊死が生じると残存していた肝細胞が増殖し、組織修復が開始される。この過程で星細胞由来のHGF, epidermal growth factor (EGF), epimorphin やpleiotrophinのような増殖因子が関与する可能性が示唆されている<sup>10)</sup>。さらにneurotrophineシグナルが星細胞-肝細胞間のパラクリン経路として重要であることや、さらにFoxf1 forkhead転写因子の重要性が指摘されている。

一方、活性化星細胞のビタミンA貯蔵型への逆行についてin vivoで検討することは困難であるが、培養系では活性化星細胞をMatrigel上で培養し直すと観察できること、また、insulin/dexamethasone/isobuthylmethylxanthine混合液、あるいはperoxisome proliferator-activated receptor $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) あるいはsterol regulatory element binding protein 1c (SREBP-1c) を強制発現させることで達成される<sup>11)</sup>。したがって、少なくとも培養系の情報からは星細胞活性化の可逆性は証明されている。一方、星細胞のアポトーシスについては、培養星細胞がCD95リガン

ドやNK細胞由来TRAILで誘導されるアポトーシスに敏感であることが示されている<sup>12)</sup>。肝細胞由来nerve growth factor (NGF) による星細胞アポトーシスはセロトニン受容体シグナルで抑制される。NK細胞が肝臓の線維化に関与する可能性について興味深い報告がなされており、マウスにおいて抗asialo-GM1抗体でNK細胞を枯渇させると肝線維化が増悪すること、逆にTLR3リガンドであるpoly I: CでNK細胞を活性化させると抑制されると報告されている<sup>13)</sup>。NK細胞による星細胞アポトーシス誘導は活性化星細胞に限定され、それは活性化星細胞がNK cell activating receptor NKG2Dを発現するためとされている<sup>14)</sup>。このようなNK細胞と肝線維化との関係はウイルス性肝炎患者の線維化がサイクロスポリンやコルチコステロイドで免疫抑制状態になった場合、たとえば、HCV感染者においては肝移植後、に肝線維化が加速度的に進行するという臨床上の現象を反映している。さらに、50歳以上の成人では肝線維化の進行速度が速いこともNK細胞活性が加齢とともに低下することと深く関与する可能性がある。Kupffer細胞もカスパーゼ-9やreceptor-interacting protein依存性に星細胞アポトーシスを誘導する。

## D. 肝線維化の治療

前述したように、星細胞の活性化機構の分子解析の情報を用いると肝線維化の制御は容易であると推測されてきたが、現在までのところ特異的な肝線維化制御薬剤は未開発のままである。C型慢性肝炎に対するインターフェロン interferon (IFN) を基盤とする治療法が飛躍的に進歩し、持続的ウイルス排除率 sustained viral response (SVR) は難治性の1b高ウイルス量群ですら50%を超えるようになっており、現在治験が進んでいるHCVプロテアーゼ阻害剤を追加す



ることさらなるSVRの向上が期待されている。しかしながら、逆にみると数十パーセントのC型慢性肝炎やSVRが極端に低い高度線維化群や高齢者ではIFNでのウイルス排除が望めないため、肝硬変の予防やさらには肝癌発症予防を目的として抗線維化剤が必要になってくる。B型慢性肝炎に関しても同様に、IFNや核酸アナログ製剤でHBVがコントロールされ、AST/ALTが正常域に保たれる症例は線維化進展が遅延するが、変異などでコントロールが困難になれば病期の進行を懸念せざるをえない。また、近年増加傾向にあるメタボリック症候群と関連する脂肪肝や非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）は日常の食生活や運動習慣と関与することが示唆されるため、早期発見と安全な薬剤による肝線維化予防を考慮しないと、非B非C型の肝硬変を増加させる一因になりかねない。以上の理由から、基礎的データに裏打ちされた抗肝線維化薬は必須である。

方法論としては、1) 星細胞の活性化自体を制御する、2) 星細胞のコラーゲン産生を制御する、3) 星細胞の増殖を制御する、4) 毛細血管形成を含む間質の制御、などの手法が考えられる。IFN $\gamma$ はin vitroおよびin vivoで星細胞活性化を制御する。IFN $\gamma$ は単独でsmooth muscle  $\alpha$ -actin発現とコラーゲンゲル法で観察される細胞収縮を抑制する。IFN $\gamma$ の臨床応用は副作用の点から難しいが、すでに広く臨床使用されているIFN $\alpha$ や $\beta$ には星細胞増殖抑制効果があり、星細胞のアポトーシスを容易にする。IFN $\alpha$ や $\gamma$ には星細胞のコラーゲン遺伝子発現プロモーター活性を抑制することが報告されており、その効果には細胞内シグナル因子のリン酸化Stat-1やp300が関与する<sup>15)</sup>。近年使用されるようになったペグIFNは長時間作用型であり、星細胞活性化抑制効果の増強が期待される。

臨床に直結する話題としてアンジオテンシンIIの阻害が注目に値する。すでに高血圧の治療薬と

して、アンジオテンシン変換酵素阻害剤やAT1受容体拮抗剤は多数存在する。ヒトならびにげっ歯類の星細胞はレニン-アンジオテンシンシステムの全てのコンポーネントを発現している<sup>16)</sup>。その阻害剤を用いることで星細胞の活性化制御、ならびに肝線維化制御が多数の動物モデルで実証されており、また、ヒトNASHでもその効果が報告され、各種の臨床試験が行われている<sup>17,18)</sup>。以上に加えて、制がん剤として登場、今後も開発が続く血管新生抑制剤（ソラフェニブなど）はVEGFやFGFなど成長因子に対する受容体依存性のRaf-MEK-ERKシグナル伝達を阻害する物質で肝癌を栄養する間質構成細胞としての血管新生を抑制する<sup>19)</sup>。上述したように、線維化肝の線維性隔壁部では活性化星細胞やmyofibroblast-like cellが増殖するのみでなく、隔壁にそって血管新生が生じている。したがって、制がん剤自体が、抗線維化作用をもつ可能性が高く、そのような観点からも今後の研究が期待される分野である。

## E. 肝線維化の評価

上述したように肝線維化はメカニズム解析とそれに基づく治療法開発で話題性が集まっているが、診断面において新たな方法論が確立されつつある分野でもある。ウイルス性肝炎では、肝線維化の進行がIFN治療の効果予測に反映されるし、肝癌発症リスクと関連することが知られている。そのため、肝線維化の定量的評価はきわめて重要である。現在、臨床的な肝線維化の評価には、肝生検による病理組織診断がgold standardとなっている。しかしながら、肝生検で得られる標本は肝臓全体の5万分の1にすぎず、それをもって全肝臓の状態を把握しているとはいえない。サンプリングエラーや病理医間の診断時の相違を考慮する必要があるし、ステージ0~4という5段階だ

けの評価では定量性に問題がある。また、侵襲的で、疼痛、感染、出血などのリスクを伴うため、反復検査は困難で、長期経過観察のモニタリングには適していない。このような肝生検のもつ問題を克服し、さらに非侵襲的に肝線維化を診断する方法として、血液検査、超音波、MRI、CTを用いた新しい検査法が開発されている。

## 1. 肝線維化の新しい評価方法

### a. 血液を用いた評価

肝線維化の評価には、血小板、血清線維化マーカー (IV型コラーゲン7S, III型プロコラーゲンN末端ペプチド (P-III-P), ヒアルロン酸など) が参考にされているが、これら単独で肝線維化をステージ分類させることは困難である。このような細胞外マトリックスとは異なる血清マーカーを用いた間接的診断法が多数報告されており、AAR (AST/ALT ratio), APRI (AST-to-platelet ratio index), CDS (cirrhosis discriminant score), fibrotest, HALT-Cモデルなど、複数のパラメーターを組み合わせた肝線維化予測式が含まれる。Fibrotestはhaptoglobin,  $\alpha$ 2-macroglobulin, apolipoprotein-A1,  $\gamma$ -glutamyltransferase, bilirubin,  $\gamma$ -globulinという6つのパラメーターを用いたアルゴリズム計算式であり、 $>F2-4$ の診断能はAUC 0.87と報告されている。一方、P-III-P, ヒアルロン酸, TIMP-1といった細胞外マトリックス代謝と直接的に関係する分子を用いたマーカーとしてthe European Liver Fibrosis (ELF) studyから報告があり、Scheuer 3-4の診断能はAUC 0.80である。さらに両者の特徴をもつFibrometerは血小板数, プロトロンビン時間, AST, ヒアルロン酸,  $\alpha$ 2-macroglobulin, 性別, 年齢が加味された数式を用いており、 $F2$ 以上の線維化をAUC 0.89で診断できると報告されている<sup>20)</sup>。

### b. 超音波検査を基盤とする評価

1) FibroScan502<sup>®1)</sup> 体表をピストンで叩打した際に発生する弾性波の肝内進行を超音波装置にて観察することによって、肝線維化を短時間に非侵襲的かつ定量的に測定できるエラストメーターFibroScan502<sup>®</sup>がエコセンス社 (フランス) により開発された<sup>21)</sup>。通常の体外超音波の要領で右肋間から肝右葉に対して振動波を共振し、弾性度を測定する。慢性肝疾患における線維化の評価に有用であることが多数報告されている。特に、C型肝炎例においては、肝生検によるMetavir Fibrosis stageや、新犬山分類のF stageとよく相関することが報告されており、2005年のCastéraらの報告が先駆的である<sup>22)</sup>。彼らの論文ではFibroScanによるliver stiffness measurement (LSM) の診断率はAUCで $0.83 \geq F2$ ,  $0.90 \geq F3$ ,  $0.95 = F4$ ときわめて良好である。当施設でも237例のC型慢性肝炎例に対して弾性度を測定したところ、F stage 0~4の弾性度 (中央値kPa) はそれぞれ4.1, 6.3, 8.8, 14.6, 22.2であり、相関が認められた ( $p < 0.001$ )<sup>23)</sup>。また、LSMはNASH患者の肝線維化評価にも応用できることが報告されている。著明な肝萎縮や腹水、肥満などの場合には測定部位の設定が困難な場合もあるが、熟練度を要さず、また、診断者間の差がなく、非侵襲的に反復して行うことが可能である。また、肝生検では肝全体の5万分の1しかみていないが、FibroScan502<sup>®</sup>の測定域は500分の1を反映しているといわれており、より広範囲の硬度をカバーできる。

### 2) Real-time Tissue Elastography<sup>®</sup>

Real-time Elastography<sup>®</sup>は日立メディコが開発した日本発の超音波に基づく組織硬度診断法であり、技術的にtransient elastographyとは異なっている<sup>24)</sup>。通常のBモードによる臓器観察と同時に施行可能であり、すでに乳腺、甲状腺や前立腺の腫瘍を検出するために利用されている。この

装置の特徴は組織弾性度を色調により超音波画像として捉えることができる点にある。Friedrich-Rustらはこの手法を肝臓の硬度測定に利用し、特にAPRIと併用することでAUC  $0.93 \geq F2$ が達成できたとしている<sup>25)</sup>。本手法は肥満患者や腹水の存在下でも施行できるため、今後汎用される可能性がある。

### C. その他

Contrast-Enhanced MRI, Diffusion-Weighted MRI, MR-Spectroscopy, MR Elastography<sup>26)</sup>, FibroCT<sup>27)</sup> など新しい手法が開発されており、それぞれ肝生検での線維化ステージと相関することが示されている。

## 2. 肝臓スクリーニングへの応用

慢性肝炎における肝線維化の評価は、病態の進行のみでなく、肝細胞癌・静脈瘤など合併症を予測するうえでも有用である。Foucherらは、144例のC型慢性肝炎患者 (F3あるいは4) に対してFibroscan502<sup>®</sup>を用いて肝の弾性度 (kPa) を測定し、合併症の出現との相関を調べたところ、食道静脈瘤 (stage 2あるいは3) の出現、腹水、肝細胞癌の出現、食道静脈瘤の破裂のカットオフ値は、それぞれ27.5, 49.1, 53.7, 62.7 kPaであったことを報告している<sup>28)</sup>。またMasuzakiらは866人のC型慢性肝炎患者を前向きに登録し3年間LSM測定で追跡したところ77例の肝臓発生のうち、LSM 10 kPa以下は0.4%であるのに対し、LSM25以上では38.5%に昇るとし、LSMが肝臓発生の予測ツールとなり得ることを報告している<sup>29)</sup>。

## 文献

- 1) Wake K: Perisinusoidal stellate cells (fat-storing cells, interstitial cells, lipocytes), their related structure in and around the liver sinusoids, and vitamin A-storing cells in extrahepatic organs. *Int Rev Cytol.* 1980; 66: 303-53.
- 2) Kawada N, Klein H, Decker K. Eicosanoid-mediated contractility of hepatic stellate cells. *Biochem J.* 1992; 285: 367-71.
- 3) 河田則文, 井上正康. 肝代謝-その細胞社会学的背景. *Mebio.* 1994; 11: 20-6.
- 4) Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem.* 2000; 275: 2247-50.
- 5) Friedman SL. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiol Rev.* 2008; 88: 125-72.
- 6) Schwabe RF, Brenner DA. Mechanisms of liver injury. I. TNF-alpha-induced liver injury: role of IKK, JNK, and ROS pathways. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2006; 290: 583-9.
- 7) Begriche K, Igoudjil A, Pessayre D, et al. Mitochondrial dysfunction in NASH: causes, consequences and possible means to prevent it. *Mitochondrion.* 2006; 6: 1-28.
- 8) Seki E, De Minicis S, Osterreicher CH, et al. TLR4 enhances TGF-beta signaling and hepatic fibrosis. *Nat Med.* 2007; 13: 1324-32.
- 9) Rivera CA, Bradford BU, Hunt KJ, et al. Attenuation of CCl(4)-induced hepatic fibrosis by GdCl(3) treatment or dietary glycine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2001; 281: G200-7.
- 10) Asahina K, Tsai SY, Li P, et al. Mesenchymal origin of hepatic stellate cells, submesothelial cells, and perivascular mesenchymal cells during mouse liver development. *Hepatology.* 2009; 49: 998-1011.
- 11) She H, Xiong S, Hazra S, et al. Adipogenic transcriptional regulation of hepatic stellate cells. *J Biol Chem.* 2005; 280: 4959-67.
- 12) Iredale JP. Models of liver fibrosis: exploring the dynamic nature of inflammation and repair in a solid organ. *J Clin Invest.* 2007; 117: 539-48.
- 13) Radaeva S, Sun R, Jaruga B, et al. Natural killer cells ameliorate liver fibrosis by killing activated stellate cells in NKG2D-dependent and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-dependent manners. *Gastroenterology.* 2006; 130: 435-52.
- 14) Fischer R, Cariers A, Reinehr R, et al. Caspase 9-dependent killing of hepatic stellate cells by activated Kupffer cells. *Gastroenterology.* 2002;

- 123: 845-61.
- 15) Oakley F, Teoh V, Ching-A-Sue G, et al. Angiotensin II activates I kappaB kinase phosphorylation of RelA at Ser 536 to promote myofibroblast survival and liver fibrosis. *Gastroenterology*. 2009; 136: 2334-44.
- 16) Yamamoto E, Dong YF, Kataoka K, et al. Olmesartan prevents cardiovascular injury and hepatic steatosis in obesity and diabetes, accompanied by apoptosis signal regulating kinase-1 inhibition. *Hypertension*. 2008; 52: 573-80.
- 17) Yokohama S, Yoneda M, Haneda M, et al. Therapeutic efficacy of an angiotensin II receptor antagonist in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 2004; 40: 1222-5.
- 18) Hirose A, Ono M, Saibara T, et al. Angiotensin II type 1 receptor blocker inhibits fibrosis in rat nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 2007; 45: 1375-81.
- 19) Llovet JM, Bruix J. Molecular targeted therapies in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2008; 48: 1312-27.
- 20) Pinzani M, Vizzutti F, Arena U, et al. Technology Insight: noninvasive assessment of liver fibrosis by biochemical scores and elastography. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*. 2008; 5: 95-106.
- 21) Sandrin L, Fourquet B, Hasquenoph JM, et al. Transient elastography: a new noninvasive method for assessment of hepatic fibrosis. *Ultrasound Med Biol*. 2003; 29: 1705-13.
- 22) Castéra L, Vergniol J, Foucher J, et al. Prospective comparison of transient elastography, Fibrotest, APRI, and liver biopsy for the assessment of fibrosis in chronic hepatitis C. *Gastroenterology*. 2005; 128: 343-50.
- 23) Takeda T, Yasuda T, Nakayama Y, et al. Usefulness of noninvasive transient elastography for assessment of liver fibrosis stage in chronic hepatitis C. *World J Gastroenterol*. 2006; 12: 7768-73.
- 24) Gheorghe L, Iacob S, Gheorghe C. Real-time sonoelastography – a new application in the field of liver disease. *J Gastrointest Liver Dis*. 2008; 17: 469-74.
- 25) Friedrich-Rust M, Ong MF, Herrmann E, et al. Real-time elastography for noninvasive assessment of liver fibrosis in chronic viral hepatitis. *AJR Am J Roentgenol*. 2007; 188: 758-64.
- 26) Talwalkar JA, Yin M, Fidler JL, et al. Magnetic resonance imaging of hepatic fibrosis: emerging clinical applications. *Hepatology*. 2008; 47: 332-42.
- 27) Romero-Gómez M, Gómez-González E, Madrazo A, et al. Optical analysis of computed tomography images of the liver predicts fibrosis stage and distribution in chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2008; 47: 810-6.
- 28) Foucher J, Chanteloup E, Vergniol J, et al. Diagnosis of cirrhosis by transient elastography (FibroScan): a prospective study. *Gut*. 2006; 55: 403-8.
- 29) Masuzaki R, Tateishi R, Yoshida H, et al. Prospective risk assessment for hepatocellular carcinoma development in patients with chronic hepatitis C by transient elastography. *Hepatology*. 2009; 49: 1954-61.

See related Commentary on page XXX

*The American Journal of Pathology*, Vol. 177, No. 1, July 2010  
Copyright © American Society for Investigative Pathology  
DOI: 10.2353/ajpath.2010.090895

*Gastrointestinal, Hepatobiliary and Pancreatic Pathology*

## A Human-Type Nonalcoholic Steatohepatitis Model with Advanced Fibrosis in Rabbits

Tomohiro Ogawa,\* Hideki Fujii,\*  
Katsutoshi Yoshizato,\*<sup>†</sup> and Norifumi Kawada\*

From the Department of Hepatology,\* Graduate School of Medicine, Osaka City University, Osaka; and PhoenixBio Co. Ltd.,<sup>†</sup> Hiroshima, Japan

Nonalcoholic steatohepatitis (NASH) progresses to liver fibrosis and cirrhosis, which can lead to life-threatening liver failure and the development of hepatocellular carcinoma. The aim of the present study was to create a rabbit model of NASH with advanced fibrosis (almost cirrhosis) by feeding the animals a diet supplemented with 0.75% cholesterol and 12% corn oil. After 9 months of feeding with this diet, the rabbits showed high total cholesterol levels in serum and liver tissues in the absence of insulin resistance. The livers became whitish and nodular. In addition, the number of rabbit macrophage antigen-positive cells and the expression of mRNAs for inflammatory cytokines showed a significant increase. Moreover, fibrotic septa composed of collagens and  $\alpha$ -smooth muscle actin-positive cells were found between the central and portal veins, indicating alteration of the parenchymal architecture. There was also a marked increase of mRNAs for transforming growth factor- $\beta$ 1 and collagen 1A1. Comprehensive analysis of protein and gene expression revealed an imbalance of the antioxidant system and methionine metabolism. We also found that ezetimibe attenuated steatohepatitis in this model. In conclusion, the present rabbit model of NASH features advanced fibrosis that is close to cirrhosis and may be useful for analyzing the molecular mechanisms of human NASH. Ezetimibe blunted the development of NASH in this model, suggesting its potential clinical usefulness for human steatohepatitis. (*Am J Pathol* 2010, 177:000–000; DOI: 10.2353/ajpath.2010.090895)

A high-fat diet is one of the risk factors for metabolic syndrome, which is characterized by obesity, hyperlipidemia, hyperglycemia, and hypertension, and is frequently accompanied by life-threatening arteriosclerosis.<sup>1</sup> A

high-calorie, high-fat diet is also considered to cause nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD), which covers a spectrum of disorders from simple steatosis to nonalcoholic steatohepatitis (NASH) and cirrhosis.<sup>2–5</sup> Recent clinical studies have shown that NAFLD is one of the common liver diseases that leads to cirrhosis and hepatocellular carcinoma<sup>2</sup> in a manner similar to the clinical course of chronic viral hepatitis and alcohol abuse.<sup>6</sup> However, the molecular mechanisms underlying the progression of NAFLD to an advanced stage with active inflammation and fibrosis are not fully understood. We recently reported a rabbit model of steatohepatitis that was generated by feeding the rabbit a high-fat and -cholesterol diet (HFD) supplemented with 20% corn oil and 1.25% (w/w) cholesterol for 8 weeks.<sup>7</sup> The rabbit showed insulin resistance, accumulation of lipids in hepatocytes, activation of Kupffer cells (liver macrophages), mild fibrosis, and enhanced oxidative stress. Thus, we concluded that this model was useful for analyzing the molecular mechanisms involved in the pathogenesis of human NASH. However, rabbits fed a HFD have a short lifespan attributable to heart failure accompanied by severe arteriosclerosis.<sup>8</sup> This makes it difficult to study whether advanced fibrosis or even cirrhosis can be caused solely by HFD feeding. We therefore tried to improve the model and produce NASH with advanced fibrosis, which is more similar to the disease observed in humans that gradually develops after several decades. In the present study, this was accomplished by reducing the concentrations of cholesterol and corn oil in the diet and by prolonging the feeding period from 2 to 9 months.

Supported by the Japan Society for the Promotion of Science (grant-in-aid for scientific research 18659214, 2007, to N.K.) and by a Thrust Area research grant from Osaka City University (2008) (to N.K.).

Accepted for publication March 22, 2010.

Portions of this study were presented in abstract form at the 44th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver, Copenhagen, 2009.

Supplemental material for this article can be found on <http://ajp.amjpathol.org>.

Address reprint requests to Norifumi Kawada, M.D., Ph.D., Department of Hepatology, Graduate School of Medicine, Osaka City University, 1-4-3, Asahimachi, Abeno, Osaka 545-8585, Japan. E-mail: kawadanori@med.osaka-cu.ac.jp.

NAFLD/NASH is assumed to be most effectively improved by weight control and by restricting lipid and calorie intake, thereby leading to normalized lipid metabolism.<sup>9,10</sup> Nevertheless, drug therapy would be a useful and an easy option because the modern lifestyle habits such as poor diet and lack of regular exercise are difficult to change. Ezetimibe is a relatively new and promising drug candidate for NAFLD/NASH therapy. Ezetimibe selectively inhibits cholesterol absorption via Niemann-Pick C1-like 1 (NPC1L1) protein in the brush border of the small intestine in humans, rodents, rabbits, and other species.<sup>11-15</sup> It decreases the serum levels of low-density lipoprotein cholesterol and triglycerides (TGs) in humans<sup>16</sup> and reduces plaque formation and improves lipids in a rabbit model of atherosclerosis.<sup>17</sup> Recent reports have indicated that ezetimibe improves liver steatosis and insulin resistance in Zucker obese fatty rats<sup>18</sup> and rats fed a methionine- and choline-deficient diet.<sup>19</sup> Thus, ezetimibe is a potential new therapeutic agent for human NASH.<sup>20</sup> In the present study, we also assessed the effect of ezetimibe on the development of NASH in our rabbit model.

## Materials and Methods

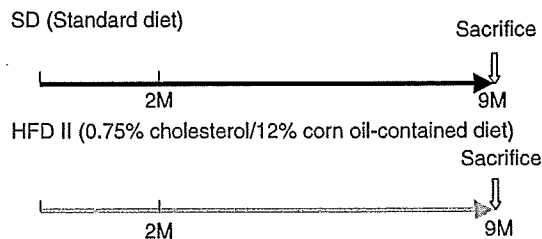
### Materials

Mouse monoclonal antibodies against  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ SMA), rabbit macrophage (clone RAM-11), and 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE) were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO), Thermo Fisher Scientific (Fremont, CA), and Nikken Seil Co., Ltd. (Shizuoka, Japan), respectively. Enhanced chemiluminescence detection reagent was obtained from Amersham Pharmacia Biotech (Little Chalfont, Buckinghamshire, UK), and Immobilon-P membranes were from Millipore Corp. (Bedford, MA). All other reagents were purchased from Sigma Chemical Co. or Wako Pure Chemical Co. (Osaka, Japan).

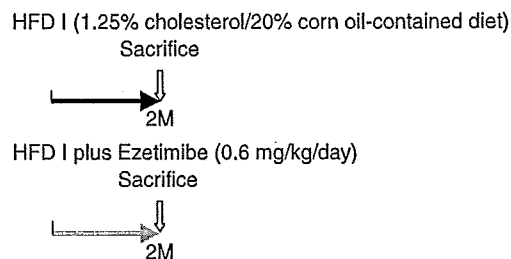
### Animals and Experimental Protocol

Pathogen-free male Japanese White rabbits, about 1-year-old and weighing 3.0 to 3.5 kg, were obtained from SLC (Shizuoka, Japan). As shown in Figure 1, we performed the following two experiments: i) rabbits were housed at a constant temperature and were given either 100 g/day of a standard diet (SD) ( $n = 5$ , CR3 obtained from CLEA Japan Inc., Tokyo, Japan) or version II of an improved high-fat and -cholesterol diet (HFD II) ( $n = 5$ ), which consisted of SD supplemented with 12% corn oil and 0.75% (w/w) cholesterol for 9 months; and ii) rabbits were given version I (100 g/day) of a previously reported HFD (HFD I), which consisted of SD supplemented with 20% corn oil and 1.25% (w/w) cholesterol for 2 months.<sup>7</sup> The treated group additionally received 0.6 mg/kg/day of ezetimibe mixed in the diet. Ezetimibe was kindly provided by Bayer AG (Leverkusen, Germany). The contents of the SD and HFD I and II are shown in Supplemental Table S1 (see <http://ajp.amjpathol.org>).

### Experiment 1 (NASH cirrhosis model):



### Experiment 2 (NASH therapy model):



**Figure 1.** Experimental schedule of the present study. Experiment 1: NASH cirrhosis was induced in rabbits by feeding HFD II for nine months. Experiment 2: during NASH therapy, rabbits were administered ezetimibe (0.6 mg/kg/day) supplemented with HFD I for two months. In the NASH therapy model, a previously reported HFD I was used to evaluate the effect of medicine during a short period.

The rabbits were fasted 24 hours before sacrifice. Then they were anesthetized and laparotomized for blood and liver sampling. The portal vein was cannulated using an 18-gauge Teflon catheter. The liver of each animal was perfused with 100 ml of PBS to remove the blood. After harvest, the liver was cut into small pieces and fixed in 4% paraformaldehyde. Each sample was either frozen or embedded in paraffin. The experiments were conducted humanely in accordance with the recommendations of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of Osaka City University School of Medicine.

### Histochemical and Immunohistochemical Studies

Paraformaldehyde-fixed specimens were sectioned into 5- $\mu$ m-thick sections and stained with H&E and 0.1% (w/v) Sirius red (Direct Red 80, Aldrich, Milwaukee, WI). Frozen sections (5- $\mu$ m-thick) were stained with Oil red O (Wako Pure Chemical Co.). The areas stained by Sirius red and Oil red O were measured to assess the areas of connective tissue and lipid deposition, respectively, using an image analyzer (Lumina Vision, Mitani Corporation, Tokyo, Japan).

Immunohistochemical analysis was performed as described elsewhere.<sup>7</sup> In brief, sections were deparaffinized, washed, and preincubated in 5% bovine serum albumin blocking solution, followed by overnight incubation at 4°C with antibodies against either  $\alpha$ SMA at a dilution of 1:100, rabbit macrophage (RAM-11)<sup>21</sup> at a dilution of 1:100, or 4-HNE at a concentration of 5  $\mu$ g/ml.<sup>22</sup> The sections were incubated with biotinylated sec-

ondary antibodies and reacted with horseradish peroxidase-conjugated streptavidin (Nichirei Biosciences Inc., Tokyo, Japan) and then treated with diaminobenzidine (DAKO, Glostrup, Denmark) for color development.

### Laboratory Tests

Serum levels of aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), total cholesterol (T-Chol), TG, free fatty acid (FFA), and fasting glucose were measured at the Special Reference Laboratories (Osaka, Japan). Fractionation of serum cholesterol was performed by high-performance liquid chromatography at Skylight Biotech (Akita, Japan). The serum and urine levels of oxidative stress markers and antioxidants were measured at Nikken Seil Co., Ltd. Fasting serum insulin levels were measured using a rat insulin enzyme-linked immunosorbent assay kit and a rabbit insulin standard solution (Shibayagi Co. Ltd., Gunma, Japan). Homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) was calculated using the formula  $HOMA-IR = [\text{fasting insulin (ng/ml)} \times 23.1] \times \text{fasting glucose (mg/dl)} / 405$ . Serum bile acid was measured using a Total Bile Acids Test Wako (Wako Pure Chemical Co.) according to the manufacturer's instructions.

### Assay of Hepatic Total Cholesterol, Triglyceride, and Free Fatty Acid Levels

Liver tissue (50 to 100 mg) was homogenized in 0.75 ml of methanol and chloroform (2:1), and lipids were extracted from the chloroform fraction. Then, the hepatic tissue levels of T-Chol and TG were determined using a Cholesterol E-Test Wako and Triglyceride E-Test Wako (Wako Pure Chemical Co.) according to the manufacturer's instructions. The data were expressed as the amount of T-Chol (mg) or TG (mg)/liver wet weight (g).

For the hepatic FFA assay, liver tissue (10 mg) was homogenized in 0.2 ml of chloroform and 1% Triton X-100. Fatty acids were extracted in the chloroform fraction and air-dried to remove the chloroform. Then, the hepatic tissue FFA levels were determined using a Free Fatty Acid Quantification Kit (BioVision, Mountain View, CA) according to the manufacturer's instructions. The data were expressed as the amount of FFA (nmol)/liver wet weight (mg).

### Quantitative Real-Time PCR

Total RNA was extracted from the liver using Isogen (Nippon Gene Co. Ltd., Tokyo, Japan). cDNAs were synthesized with 1  $\mu$ g of total RNA, ReverTra Ace (Toyobo, Osaka, Japan), and oligo(dT)<sub>12-18</sub> primers according to the manufacturer's instructions.<sup>23</sup> Gene expression was measured by real-time PCR on an Applied Biosystems Prism 7500 system (Applied Biosystems, Foster City, CA) using cDNA, real-time PCR Master Mix Reagents (Toyobo), a set of gene-specific oligonucleotide primers, and the TaqMan probes listed in Table 1.

### Immunoblotting

Protein samples (10  $\mu$ g) were subjected to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and then transferred to Immobilon-P membranes. After blocking, the membranes were treated with the primary antibodies and then with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies. Immunoreactive bands were visualized using the enhanced chemiluminescence system and documented with LAS 1000 (Fuji Photo Film, Kanagawa, Japan). The density of each band was analyzed using a GS-700 densitometer (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).<sup>23</sup>

### Assay of Hepatic 8-Hydroxy-2'-Deoxyguanosine Levels

Liver tissue (100 to 200 mg) was homogenized in lysis buffer, and hepatic DNA was extracted using the DNA Extractor TIS kit (Wako Pure Chemical Co.). After the DNA was hydrolyzed, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine levels in the liver were measured using a highly sensitive 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine enzyme-linked immunosorbent assay kit (Nikken Seil Co. Ltd.) according to the manufacturer's instructions.

### Proteome Analysis

Two-dimensional SDS-PAGE was performed by Towa Environment Science (Osaka, Japan).<sup>24</sup> Proteins (100  $\mu$ g) extracted from rabbit livers were applied to Immobiline DryStrips (pH 3 to 10). After isoelectric focusing, the proteins were separated by SDS-PAGE on 9 to 18 acrylamide gradient gels, visualized by SYPRO Ruby staining, scanned, and analyzed as described previously.<sup>25</sup> Protein spots of interest were excised from the gels, digested in trypsin solution, dialyzed, and then analyzed by electrospray ionization mass spectrometry. The proteins were identified from the obtained amino acid sequences using databases such as protein BLAST or FASTA.

### Microarray Analysis

Total RNA was extracted from liver tissues with Isogen. Rabbit microarray chips were designed on the eArray system (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) and were provided by Takara Bio Inc. (Shiga, Japan). The gene expression profile of HFD II-fed rabbits was compared with that of SD-fed rabbits. Genes showing differences in expression with an increase of more than fivefold or a decrease to <0.5-fold were recognized as up- or down-regulated genes, respectively, and were targeted for further analysis. The data are partially shown in Supplemental Table S2 (see <http://ajp.amjpathol.org>).

### Statistical Analysis

Bar graphs present data as means  $\pm$  SD of at least three independent experiments. Statistical analysis was per-

**Table 1.** List of Primer Sequences

Gene	Sequence	Accession no.
<i>PPAR<math>\gamma</math></i>	Forward	5'-CCTGGCTTTGTGAGCCTTGAC-3'
	Reverse	5'-GAGGCCAGCATGGTGTAGATGA-3'
<i>aP2</i>	Forward	5'-CAGATGACAGGAAAGGCAAGAGT-3'
	Reverse	5'-CCTCCCGTTTTCTCTTTATGGT-3'
<i>LXR<math>\alpha</math></i>	Forward	5'-GGAGACGTCTCGCAGGTACA-3'
	Reverse	5'-CCCTGCTTTGGCAAAGTCCT-3'
<i>SREBP1</i>	Forward	5'-GACACAGGAGCCACAATGAAGAC-3'
	Reverse	5'-GCAGTTTGTCTGTGTCACAAACC-3'
<i>SREBP2</i>	Forward	5'-GGCGACAAGACACAATATCA-3'
	Reverse	5'-GTCCCATGACCAAGTCTTTCA-3'
<i>HMGCR</i>	Forward	5'-TGCTGTGAGAACGTGATGGG-3'
	Reverse	5'-CTTTCCATCCAAGCAGAGAGGT-3'
<i>LDLR</i>	Forward	5'-ACAACCCGGTCTACCAGAAG-3'
	Reverse	5'-ATCTGTCTCGAGGGTAGGT-3'
<i>CYP7A1</i>	Forward	5'-CGATGCCTTGATTTCCCTCACAG-3'
	Reverse	5'-TTGGTTCAGGACGCTCAAGGTAAG-3'
<i>G6Pase</i>	Forward	5'-GCAGGTGTGTACTACGTGATGGT-3'
	Reverse	5'-GTCAAGCACCCGAAATCTGTAGGTC-3'
<i>PEPCK</i>	Forward	5'-CACATCCCAACTCTCGCTTCTG-3'
	Reverse	5'-TCCAAAGATGATGGCATCAATGGG-3'
<i>TNF<math>\alpha</math></i>	Forward	5'-GTCACCCTCAGATCAGCTTCTC-3'
	Reverse	5'-GTTTCGCACGCTGGCTCAG-3'
	Probe	5'-CCTGAGTGACAAGCCTCTAGCCCACG-3'
<i>IL-1<math>\beta</math></i>	Forward	5'-GCCTGAGAAGTTTCTTTTCCTTAATC-3'
	Reverse	5'-GATCGTACTGCATCACACTCAAG-3'
	Probe	5'-AAGAACCCTCCTCTGCAACACCTGG-3'
<i>IL-10</i>	Forward	5'-CCTTGTCCGAGATGATCCAGTT-3'
	Reverse	5'-ATGGCTGGACTGTGGTTCTCA-3'
<i>IL-18</i>	Forward	5'-GCAACCTGTGTTTGAGGATATGC-3'
	Reverse	5'-CCATGCCTCTAGTATTGCTGTCTT-3'
<i>TLR2</i>	Forward	5'-TCTGCACAAGCGGGACTTT-3'
	Reverse	5'-TTCTCGATGCAGTCGATGATGT-3'
<i>TLR4</i>	Forward	5'-AGCCATGCGGGTATCATTTT-3'
	Reverse	5'-TCCTGCTGAGAAGGCATACA-3'
<i>CD14</i>	Forward	5'-GCGCTAAACTCCCTCAATCTATC-3'
	Reverse	5'-GCCCTATTCAGCTTGTGCA-3'
<i>MD2</i>	Forward	5'-GAAGGGAGAGACTGTGAATACAACAG-3'
	Reverse	5'-GCTATGGCTTCTACAACACATCTG-3'
<i>HO-1</i>	Forward	5'-GGAGAACGCCGAGTTCATGA-3'
	Reverse	5'-GGCCATCACCAGCTTAAAACC-3'
	Probe	5'-AACTTTCAGAAGGGCCAGGTGACTGCC-3'
<i>TGFB1</i>	Forward	5'-AAGGGCTACCACGCCAACTT-3'
	Reverse	5'-CGGGTTGTGCTGGTTGTACA-3'
	Probe	5'-TGCTGGGACCCTGCCCTAC-3'
<i>Col1A1</i>	Forward	5'-ACTGGATTGACCCCAACCA-3'
	Reverse	5'-TTGCCCCAGTGTCCATGTC-3'
	Probe	5'-CTGCAACCTGGATGCCATCAAGGTC-3'

(table continues)



**Table 1.** *Continued*

Gene	Sequence	Accession no.
<i>Col3A1</i>		
Forward	5'-CATTGGCCCTGTTTGTCTTT-3'	S83371
Reverse	5'-GTTGGTCACTTGACTGGTTGACA-3'	
<i>MMP-2</i>		
Forward	5'-TCACTCCTGAGATCTGCACACA-3'	NM_001082209
Reverse	5'-CAAATGAACCGGTCTTGAAG-3'	
<i>MMP-9</i>		
Forward	5'-GCTCCGGTGGATCAGATGTT-3'	NM_001082203
Reverse	5'-AAGCGTCTTGGCAGAAGT-3'	
Probe	5'-CACACGACGTCTCCAGTACCGAGAG-3'	
<i>TIMP-1</i>		
Forward	5'-TGGAAAGTGTCTGCGGGTACT-3'	AY829730
Reverse	5'-TTGTCCAGCGATGAGAACTC-3'	
<i>TIMP-2</i>		
Forward	5'-TCACGCTCTGTCATTCATCGT-3'	AF069713
Reverse	5'-TGTGGTTCAGGCTCTTCTCTG-3'	
Probe	5'-CCCTGGGACTCCCTGAGCAGCA-3'	
<i>GPO</i>		
Forward	5'-AAGGTGCTGCTCATGAGAATG-3'	NM_001085444
Reverse	5'-TTCTCCTGATGCCCAAACATG-3'	
<i>GST</i>		
Forward	5'-CAAGTGGCTGAGTGAAGTTCA-3'	NM_001082252
Reverse	5'-TTGCTCTGCGTGAGCTTGT-3'	
<i>Cu,Zn-SOD</i>		
Forward	5'-TGGTGGTCCACGAGAAAGAAG-3'	L12405
Reverse	5'-CGTTCCCGTCTTTGTACTCT-3'	
<i>Mn-SOD</i>		
Forward	5'-ATTGCTGCGTGTGCGAATC-3'	L28808
Reverse	5'-TCAATCCCCAGCAGTGGAA-3'	
<i>MAT1A</i>		
Forward	5'-TCCACCTGGACAGAAACGAAGAGGA-3'	
Reverse	5'-TCTCGTCAGTGGCATAGCCGAACA-3'	
<i>GNMT</i>		
Forward	5'-AGGGCTTCAGTGTGACGAGTGT-3'	D13307
Reverse	5'-CGGTCCAGCGCTCTTTAA-3'	
<i>ST3A1</i>		
Forward	5'-GTGCCCTTCTTGAATACAACA-3'	NM_001082210
Reverse	5'-TGGAAGGTGGGAAGCAAAG-3'	
<i>GAPDH</i>		
Forward	5'-GCCAAAAGGGTCATCATCTCA-3'	AB231852
Reverse	5'-GTGGTTCACGCCATCACA-3'	
Probe	5'-CCTCCGCCGATGCCCCA-3'	

formed with Student's *t*-test, and differences were considered significant at  $P < 0.05$ .

**Results**

*Hepatic Lipid Deposition in Rabbits Fed High-Fat and -Cholesterol Diet II*

Rabbits fed HFD I for 2 months exhibited insulin resistance, hepatic steatosis, inflammation, oxidative stress, and mild fibrosis, thus, showing similarity to human NASH as we reported previously.<sup>7</sup> After the feeding period was increased by reducing the fat and cholesterol content in the diet to 60% of the previous level (HFD II) to prolong rabbit survival, we were able to create a model with advanced hepatic fibrosis that was close to cirrhosis. As shown in Table 2, serum T-Chol and TG levels of rabbits fed HFD II for 9 months increased significantly compared with the levels in rabbits fed SD. The serum cholesterol was mainly very low-density lipoprotein and lipoprotein

cholesterol according to the high-performance liquid chromatography analysis. However, serum AST and ALT levels in HFD II-fed rabbits did not change significantly compared with those in SD-fed rabbits. Fasting glucose and insulin values in HFD II-fed rabbits were lower than those in SD-fed rabbits, and HOMA-IR was reduced in HFD-fed rabbits.

The livers of HFD II-fed rabbits were enlarged and whitish with an irregular, partially nodular surface (Figure 2, A and B), showing an appearance that was totally different from the livers of SD-fed rabbits. H&E staining indicated degeneration of hepatocytes predominantly around the central vein area (Figure 2, C and D). At a higher magnification, H&E staining also revealed glassy degeneration of hepatocytes, which was similar to the ballooning of hepatocytes in human NASH, fibrosis, and bile duct proliferation (Figure 2, E and F), as well as atheroma in the aorta (Figure 2, G and H). The hepatocytes were strongly positive for Oil red O staining (Figure 3, A and B). Furthermore, hepatic T-Chol content in-

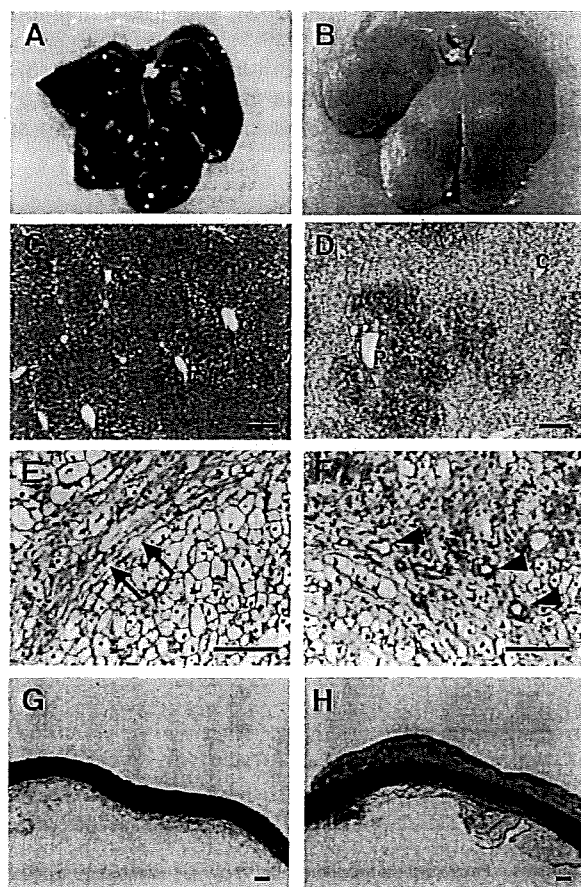
**Table 2.** Liver Enzymes and Lipid Profile in Serum

Enzymes/lipids	SD	HFD II	P value
AST (IU/L)	43.4 ± 29.9	29.3 ± 22.4	NS
ALT (IU/L)	45.6 ± 36.6	19.7 ± 18.2	NS
Cholesterol (mg/dl)			
Total	19.2 ± 3.8	1161.3 ± 406.5	<i>P</i> < 0.01
Chylomicron	0.2 ± 0.2	159.6 ± 161.8	NS
Very low-density lipoprotein	1.7 ± 0.6	733.0 ± 294.6	<i>P</i> < 0.01
Low-density lipoprotein	2.7 ± 0.8	241.6 ± 74.5	<i>P</i> < 0.01
High-density lipoprotein	14.6 ± 4.2	27.1 ± 12.5	NS
TG (mg/dl)	26.7 ± 11.9	205.5 ± 96.3	<i>P</i> < 0.01
FFA (μEq/L)	279.7 ± 150.7	168.4 ± 107.9	NS
Fasting glucose (mg/dl)	132.7 ± 11.0	98.4 ± 47.3	<i>P</i> < 0.05
Fasting insulin (ng/ml)	1.1 ± 0.2	0.7 ± 0.2	<i>P</i> < 0.05
HOMA-IR	8.4 ± 2.3	5.2 ± 2.6	<i>P</i> < 0.05
Bile acid	5.3 ± 1.3	33.7 ± 17.4	<i>P</i> < 0.05

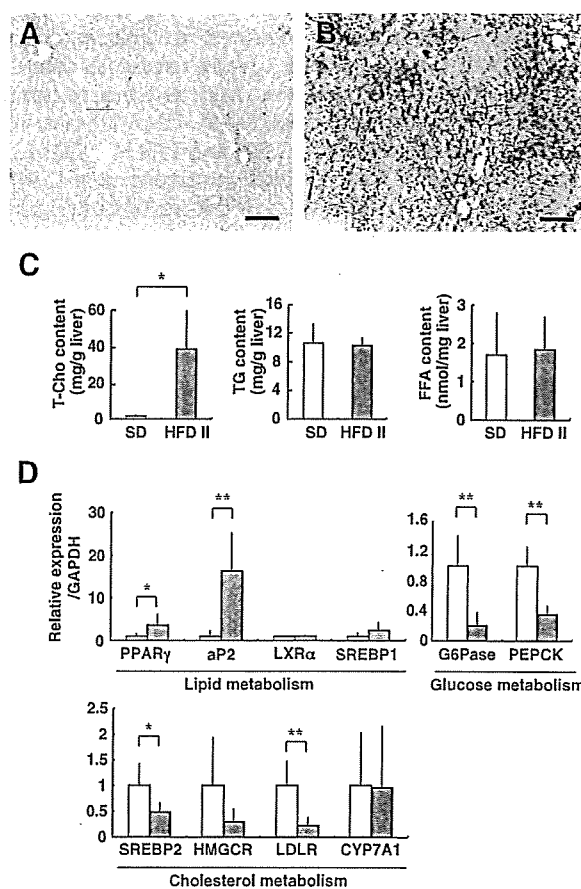
NS, not significant.

creased significantly in HFD II-fed rabbits ( $38.3 \pm 21.5 \mu\text{g}/\text{mg}$  liver weight) compared with that in SD-fed rabbits ( $1.5 \pm 0.2 \mu\text{g}/\text{mg}$  liver weight), although the hepatic TG and FFA contents were similar (Figure 3C), indicating that

mainly cholesterol had accumulated in the hepatocytes of rabbits fed HFD II. Expression of genes related to fat metabolism, such as peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  (PPAR- $\gamma$ ) and adipocyte lipid-binding protein (aP2), also known as fatty acid binding protein 4, increased



**Figure 2.** Steatosis and fibrosis in the liver of HFD II-fed rabbits. Rabbits were fed SD (A, C, and G) or HFD II (B, D, E, F, and H) for nine months. A and B: Macroscopic appearance of the livers of SD- and HFD II-fed rabbits. C–H: H&E staining of the liver (C–F) and aorta (G and H). Note that lipid-induced hepatic degeneration and liver fibrosis are predominantly seen in the livers (D–F) and that atheroma developed in the aorta (H) of HFD II-fed rabbits. Arrows in E, arrowheads in F, and asterisk in H indicate fibrotic septa, bile duct proliferation, and atheroma, respectively. P, portal vein; C, central vein. Scale bars = 100  $\mu\text{m}$ .

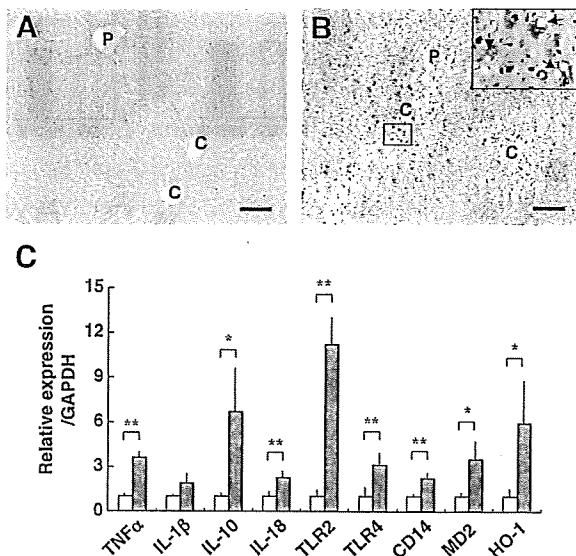


**Figure 3.** Metabolism of lipid, glucose, and cholesterol in the livers of HFD II-fed rabbits. Rabbits were fed SD (A) or HFD II (B) for nine months. A and B: Oil red O staining. Note hepatic lipid deposits in HFD II-fed rabbits. Scale bars = 100  $\mu\text{m}$ . C: Hepatic T-cholesterol (left), TG (middle), and FFA (right) contents. Note that the hepatic T-cholesterol content increased significantly in HFD II-fed rabbits. D: Expression of lipid, glucose, and cholesterol metabolism-related genes in the livers of SD-fed rabbits (white bars) and HFD II-fed rabbits (gray bars) analyzed by quantitative real-time PCR. \**P* < 0.05; \*\**P* < 0.01.

in rabbits fed HFD II, whereas glucose 6-phosphatase (G6Pase) and phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK), which are involved in glucose metabolism, were reduced in the livers of HFD II-fed rabbits (Figure 3D). Among cholesterol biosynthesis-related genes, expression of sterol regulatory element binding protein 2 (SREBP2) and low-density lipoprotein receptor (LDLR) was significantly reduced in the livers of HFD II-fed rabbits. Expression of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase (HMGCR) mRNA also tended to be reduced in livers, although not significantly. Cytochrome P450 7A1 (CYP7A1) mRNA levels remained unchanged.

### Hepatic Inflammation and Kupffer Cell Activation

RAM-11, an antibody directed against rabbit macrophages, recognizes activated Kupffer cells, the resident liver macrophages.<sup>21</sup> In contrast to the livers of SD-fed rabbits (Figure 4A), in the livers of HFD II-fed rabbits, the number of RAM-11-positive (RAM-11<sup>+</sup>) cells increased drastically around the central vein area at sites where fatty degeneration of hepatocytes was evident (Figure 4B, see also Figure 2D). At a higher magnification (Figure 4B, inset), large RAM-11<sup>+</sup> cells were localized in sinusoids, and they frequently contained vacuoles. In accordance with this observation, genes related to macrophage activation and cytokines, such as tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ); interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), -10 (IL-10), and -18 (IL-18); Toll-like receptors 2 (TLR2) and 4 (TLR4); CD14 (a coreceptor with TLR 4); and MD2 (a complex with TLR4), were all induced in the livers of HFD II-fed rabbits (Figure 4C, Supplemental Table S2, see <http://ajp.amjpathol.org>).

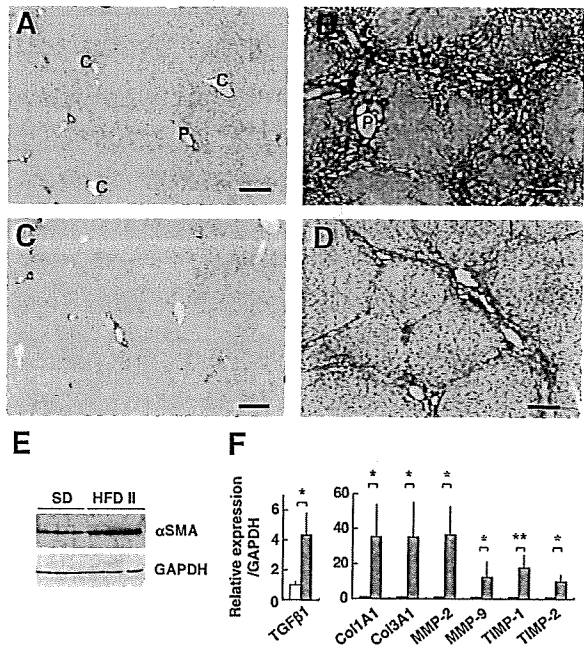


**Figure 4.** Activation of macrophages in the livers of HFD II-fed rabbits. Rabbits were fed SD (A) or HFD II (B) for nine months. A and B: Immunohistochemistry for the rabbit macrophage RAM-11 clone. Note RAM-11<sup>+</sup> cells around the central vein area in HFD II-fed rabbits, whereas these cells are absent in SD-fed rabbits. Insets: enlarged view of the box. Arrows indicate RAM-11<sup>+</sup> cells with large vacuoles. Scale bars = 100  $\mu$ m. P, portal vein; C, central vein. C: Expression of inflammatory genes in the livers of SD-fed rabbits (white bars) and HFD II-fed rabbits (gray bars) analyzed by quantitative real-time PCR. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ .

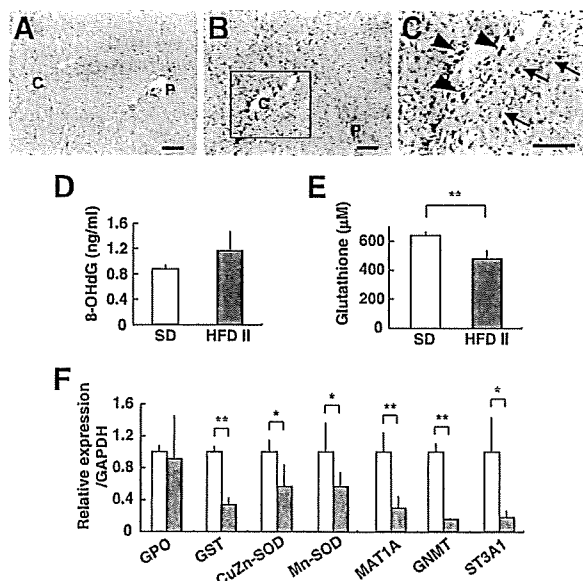
A stress protein, heme oxygenase-1 (HO-1), was also increased significantly in the livers of HFD II-fed rabbits.

### Advanced Hepatic Fibrosis in Rabbits Fed High-Fat and -Cholesterol Diet II

The livers of HFD II-fed rabbits showed evidence of advanced fibrosis. Sirius red staining showed a limited amount of red-colored collagen around portal and central veins in the control livers, whereas collagen deposition was marked in the livers of HFD II-fed rabbits (Figure 5, A and B). Fibrosis formed bridges between the central veins and central portal veins, indicating that the liver fibrosis was stage 3 (bridging fibrosis) or stage 4 (cirrhosis) according to the Brunt's staging score. The fibrotic septa were composed of cells positive for  $\alpha$ SMA, a marker of activated stellate cells and myofibroblasts (Figure 5, C and D). Up-regulated expression of  $\alpha$ SMA in HFD II-fed rabbits was confirmed by immunoblotting (Figure 5E). In addition, expression of genes associated with fibrosis, such as transforming growth factor  $\beta$  1 (TGF $\beta$ 1), collagens 1A1 (Col1A1) and 3A1 (Col3A1), matrix metalloproteinases-2 (MMP-2) and -9 (MMP-9), and tissue inhibitors of metalloproteinases-1 (TIMP-1) and -2 (TIMP-2), increased in the livers of HFD II-fed rabbits (Figure 5F, Supplemental Table S2, see <http://ajp.amjpathol.org>). Furthermore, genes for other matrix proteins such as



**Figure 5.** Progression of liver fibrosis in HFD II-fed rabbits. Rabbits were fed SD (A and C) or HFD II (B and D) for nine months. A and B: Sirius red staining. Note collagen deposits around the portal and central vein areas, as well as bridging fibrosis in HFD II-fed rabbits. P, portal vein; C, central vein. C and D: Immunohistochemistry for  $\alpha$ SMA, a marker of activated stellate cells and myofibroblasts. Note that  $\alpha$ SMA<sup>+</sup> cells are mainly seen inside fibrotic septa in the livers of HFD II-fed rabbits. Scale bar = 100  $\mu$ m. E: Immunoblotting for  $\alpha$ SMA. Note that expression of  $\alpha$ SMA was augmented in HFD II-fed rabbits. GAPDH was the internal control. F: Expression of fibrosis-related genes in the livers of SD-fed rabbits (white bars) and HFD II-fed rabbits (gray bars) analyzed by quantitative real-time PCR. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ .



**Figure 6.** Detection of oxidative stress and levels of antioxidants in the liver. Rabbits were fed SD (A) or HFD II (B and C) for nine months. A–C: Staining of 4-HNE adducts in the liver. C: A magnified image of the region enclosed within the box in B. Note 4-HNE adducts in the hepatocytes (arrows) and sinusoidal cells (arrowheads) of HFD II-fed rabbits. Scale bars = 100 μm. D: Hepatic 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine content. E: Glutathione content in the livers of SD- and HFD II-fed rabbits. F: Expression of mRNAs for antioxidant-related genes and proteome analysis of liver proteins in SD-fed rabbits (white bars) and HFD II-fed rabbits (gray bars). \**P* < 0.05; \*\**P* < 0.01.

collagen 8A1, MMP-12, TIMP-3, lumican, decorin, and biglycan showed increased expression in the livers of HFD II-fed rabbits (Supplemental Table S2, see <http://ajp.amjpathol.org>).

### Oxidative Stress and Antioxidant Imbalance in Rabbits Fed High-Fat and -Cholesterol Diet II

Immunohistochemical analysis showed that 4-HNE adduct formation was rare in SD-fed rabbits but was prom-

inent in HFD II-fed rabbits. The 4-HNE adducts were present in the cytoplasm of sinusoidal cells and hepatocytes around the central vein areas (Figure 6, A–C), indicating increased lipid peroxidation in HFD II-fed rabbit livers as in human NASH.<sup>22</sup> Moreover, the 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine level increased, although not significantly, in both liver tissue and urine of HFD II-fed rabbits (Figure 6D, Table 3). As a measure of the presence of oxidative stress, the hepatic level of glutathione was determined in SD- and HFD II-fed rabbits; HFD II significantly reduced its levels (Figure 6E). In addition, the expression of genes for glutathione S-transferase (GST) and other antioxidant molecules, such as Cu,Zn-superoxide dismutase (Cu,Zn-SOD) and Mn-superoxide dismutase (Mn-SOD), decreased significantly in HFD II-fed rabbits (Figure 6F, Supplemental Table S2, see <http://ajp.amjpathol.org>). We measured the serum or urine levels of molecules that reflect oxidative stress. The levels of copper, δ-tocopherol, and coenzyme Q10 (ubiquinol and ubiquinone) increased significantly in HFD II-fed rabbits, whereas folic acid and vitamin A decreased significantly (Table 3). Comparison of hepatic protein distribution profiles on two-dimensional SDS-PAGE gels between SD- and HFD II-fed rabbits revealed proteins that were both up- and down-regulated by HFD II (Figure 7). GST was identified as a markedly down-regulated protein in HFD II-fed rabbits. Other down-regulated proteins in HFD II-fed rabbits by proteome analysis were glycine N-methyltransferase (GNMT), methionine adenosyltransferase 1 (MAT1), and sulfotransferase 3A1 (ST3A1). These genes also showed significantly lower expression in the livers of HFD II-fed rabbits (Figure 6F).

### Effect of Ezetimibe on the Rabbit NASH Model

To further evaluate the rabbit NASH model, we investigated the effect of a known compound that suppresses the occurrence of NASH through a known mechanism.

**Table 3.** Profile of Oxidative Stress Markers and Antioxidants in Serum and Urine

	SD	HFD II	Source	P value
<b>Oxidative stress</b>				
8-OHdG (ng/mg creatinine)	43.0 ± 37.7	101.1 ± 34.6	Urine	NS
Isoprostane (ng/mg creatinine)	4.0 ± 5.3	18.2 ± 24.8	Urine	NS
Lipid peroxide (nmol/ml)	2.5 ± 1.0	3.7 ± 0.4	Serum	NS
<b>Antioxidants</b>				
Iron (μg/dl)	142.8 ± 65.7	115.9 ± 24.5	Serum	NS
Copper (μg/dl)	46.8 ± 2.9	156.3 ± 5.9	Serum	<i>P</i> < 0.01
STAS (μM)	969.0 ± 39.8	958.7 ± 143.5	Serum	NS
<b>Aqueous antioxidants</b>				
Vitamin C (μg/ml)	3.9 ± 1.3	6.3 ± 2.9	Serum	NS
Folic acid (ng/ml)	55.8 ± 11.6	21.3 ± 12.5	Serum	<i>P</i> < 0.05
<b>Liposoluble antioxidants</b>				
Vitamin A (μg/dl)	92.3 ± 5.1	37.6 ± 6.7	Serum	<i>P</i> < 0.01
Vitamin E fraction				
α-Tocopherol (μg/dl)	95.0 ± 81.4	3499.7 ± 5040.3	Serum	NS
δ-Tocopherol (μg/dl)	<2.5	31.2 ± 10.4	Serum	<i>P</i> < 0.05
γ-Tocopherol (μg/dl)	6.5 ± 2.7	706.9 ± 944.2	Serum	NS
<b>Coenzyme Q10</b>				
Ubiquinol (nmol/L)	58.0 ± 10.8	489.3 ± 151.3	Serum	<i>P</i> < 0.05
Ubiquinone (nmol/L)	N.D.	36.7 ± 23.7	Serum	<i>P</i> < 0.01

NS, not significant.