

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業（生物資源・創薬モデル動物研究事業）

急性冠症候群の疾患モデルウサギの開発及びバイオリソースの樹立
に関する研究

平成20年度 総括・分担研究年度終了報告書

研究代表者 塩見 雅志

平成21（2009）年 4月

目 次

I. 総括研究年度終了報告	
急性冠症候群の疾患モデルウサギの開発及びバイオリソースの樹立に関する研究	----- 1
塩見 雅志	
II. 分担研究年度終了報告	
1. 急性冠症候群の誘発条件に関する研究	----- 4
塩見 雅志	
2. 急性冠症候発に関連する遺伝子コンストラクトの作成に関する研究	
範 江林	----- 6
3. 急性冠症候群に関連する遺伝子組換えウサギの開発に関する研究	
北嶋 修司	----- 8
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 12

平成 20 年度厚生労働省科学研究費補助金
(創薬基盤推進研究事業 (生物資源・創薬モデル動物研究事業))

総括研究報告書

急性冠症候群の疾患モデルウサギの開発及びバイオリソースの樹立に関する研究

研究代表者 塩見 雅志 (神戸大学医学部附属動物実験施設 准教授)

研究要旨

平成 20 年度の実施計画に基づき、神戸大学では、(1) 急性冠症候群誘発実験に使用する WHHLMI ウサギの増産、(2) 急性冠症候群誘発実験に適した冠動脈病変を有する月齢を確認するための病変構成成分の解析、(3) 冠動脈にスパズムを誘発するための条件設定を実施し、(4) 急性冠症候群誘発実験に使用するトランスジェニック(Tg)-WHHLMI ウサギを開発するために、分担研究者 (北嶋修司准教授、佐賀大学) に WHHLMI ウサギを提供した。山梨大学では、急性冠症候群に関与すると考えられている脂質成分に富み線維性被膜が薄い不安定な動脈硬化病変に関与すると考えられる遺伝子コンストラクトを作成した。この遺伝子コンストラクトを用いて、平成 21 年度に遺伝子組換えウサギを佐賀大学で作成する。佐賀大学では、すでに開発されている細胞外基質分解酵素(MMP-12)及び C 反応性蛋白(CRP)を過剰発現する遺伝子組換えウサギと WHHLMI ウサギを交配し、遺伝子組換え WHHLMI ウサギヘテロ接合体を開発した。

A. 研究目的

不安定な動脈硬化病変が冠動脈に発生により急性冠症候群を発症する疾患モデルウサギを開発し、バイオリソースの拠点構築を研究の最終目的として、平成 20 年度は実験に使用する WHHLMI ウサギ及び遺伝子組換えウサギを開発し、冠動脈スパズム等による冠動脈硬化病変の破綻を誘発する条件設定を実施する。

B. 研究方法

- (1) WHHLMI ウサギの増産 (神戸大)
不安定動脈硬化病変が冠動脈に発生している可能性が高いと推測できるホモ接合体 46 ペアを交配した。
- (2) 冠動脈病変の構成成分の解析 (神戸大)
8-18 月齢の WHHLMI ウサギの冠動脈病変について、動脈硬化病変の特性を学顕微鏡下で観察した。

(3) 冠動脈スパズムの誘発 (神戸大)

麻酔下で、セロトニン、エルゴノビン、アンギオテンシン、ドブタミン等を静脈内投与し、心電図及び血圧をモニターした。

(4) 遺伝子組換えウサギ作製のための

コンストラクトの作成 (山梨大)

マクロファージ特異的に遺伝子を発現できるスカベンジャーリセプターのプロモーター配列を含むプラスミドに MMP-1 および MMP-9 を組み込む。

(5) 遺伝子組換え WHHLMI ウサギの作成 (佐賀大)

神戸大から提供された WHHLMI ウサギを MMP-12 あるいは CRP 過剰発現ウサギと交配し、MMP-12 過剰発現 WHHLMI ウサギあるいは CRP 過剰発現 WHHLMI ウサギを人工授精法で作製する。

(倫理的な配慮)

各所属大学の動物実験委員会あるいは遺伝子組換え実験安全委員会の許可の下、各大学の動物実験実施規則、遺伝子組換え実験実施規則、「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」、「遺伝子組換え生物の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」等の関連する法規等を遵守して実施した。

C. 研究結果

(1) WHHLMI ウサギの増産

平成 20 年度に 152 匹の産仔を得た。これらのウサギは平成 21 年度の実験に使用する。

(2) 冠動脈病変の構成成分の解析

冠動脈に初期から後期の病変が認められ、マクロファージは、病変の表層、深層あるいは全域に認められ、MMP の発現が認められた。また、加齢により線維化が亢進した。

(3) 冠動脈スパズムの誘発

アンギオテンシン、ドブタミン、エルゴノビンでスパズムの発生を推測できる心電図変化及び血圧の上昇が認められた。また、高月齢と若齢のウサギでスパズムが発生する濃度に差異が認められた。

(4) 遺伝子コンストラクトの作製

インスレーターを含む MMP-1 および MMP-9 発現コンストラクトを作成した。

(5) 遺伝子組換えウサギの作製

MMP-12 過剰発現ウサギとの交配で 46 匹の産仔を得、12 匹に MMP-12 遺伝子が伝達された。しかし、CRP 過剰発現ウサギとの交配では産仔を得ることはできなかった。

D. 考察

WHHLMI ウサギの生産体制が整い、分担研究者への供給を含めて、来年度以降の研究を推進する基礎を構築した。WHHLMI ウサギの冠動脈病変は加齢

によって細胞成分が減少し、線維化が亢進することが確認できたことにより、動脈硬化の進行を考慮してスパズムを誘発する条件を検討する必要性があると考えられる。

遺伝子組換えウサギを WHHLMI ウサギの精子を用いて人工授精することにより MMP-12 過剰発現 WHHLMI ウサギヘテロ接合体を得ることができた。平成 21 年度には、これらのヘテロ接合体と WHHLMI ウサギを再度交配し、MMP-12 を過剰発現する WHHLMI ウサギホモ接合体を開発し、冠動脈病変の不安定化の確認と急性冠症候群の誘発実験を実施する。

さらに、山梨大学で MMP-1 及び MMP-9 の遺伝子コンストラクトを作成することができたので、平成 21 年度にはこれらの遺伝子コンストラクトを用いて過剰発現ウサギを開発する。

E. 結論

今年度の研究により本研究計画を遂行する基礎を確立できた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Shiomi M, Fan J: Unstable coronary plaques and cardiac events in myocardial infarction-prone Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits: questions and quandaries. *Curr Opin Lipidol* 19:631-636, 2008.

2. 学会発表

- 1) Shiomi M, Yamada S, Hirayama N, and Ito T: WHHLMI rabbits, a suitable animal model for human cardiovascular diseases. 3rd Congress of Asian Federation of Laboratory Animal Science, Sep 27-30, 2008 (Beijing, China)
- 2) 塩見 雅志: 循環器病の研究を支える生物資源 - ウサギモデル (WHHLMI ウサギ). 厚生労働省生物資源研究セミナー「循環器病の研究を支える生物資源」. 2008 年 11 月 19 日 (豊中、大阪)
- 3) 範 江林. 動脈硬化の研究のための新たな遺伝子改変ウサギモデルの開発と応用. 日本動脈硬化学会、2008 年 7 月 11 日、(つくば市)
- 4) 山田 壮亮, 王 克鏞, 谷本 昭英, 範江林, 島尻 正平, 北嶋 修司, 森本 正敏, 渡邊 照男, 笹栗 靖之. 細胞外基質分解酵素 MMP-12 は、初期動脈硬化巣の形成から進展に重要な促進因子である. 第三回ウサギフォーラム、2008 年 7 月 26 日、(神戸市)

G. 健康危険情報

該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし。

平成 20 年度厚生労働省科学研究費補助金
(創薬基盤推進研究事業 (生物資源・創薬モデル動物研究事業))

分担研究報告書

急性冠症候群の疾患モデルウサギの開発及びバイオリソースの樹立に関する研究
—急性冠症候群の誘発条件に関する研究—

研究代表者 塩見 雅志 (神戸大学医学部附属動物実験施設 准教授)

研究要旨

平成 20 年度の実施計画に基づき、(1) 急性冠症候群誘発実験に使用する WHHLMI ウサギの増産、(2)冠動脈病変の病変構成成分の解析、(3)冠動脈にスパズムを誘発するための条件設定を実施した。また、トランスジェニック (Tg)-WHHLMI ウサギを開発するために、分担研究者 (北嶋修司准教授、佐賀大学) に WHHLMI ウサギを提供した。

A. 研究目的

不安定な動脈硬化病変が冠動脈に発生し、急性冠症候群を発症する疾患モデルウサギを開発し、バイオリソースの拠点構築を目的として、平成 20 年度は冠動脈スパズム等による冠動脈硬化病変の破綻を誘発する条件設定を実施する。

B. 研究方法

(1) WHHLMI ウサギの増産

不安定動脈硬化病変が冠動脈に発生している可能性が高いと推測できるホモ接合体 46 ペアを交配した。

(2) 冠動脈病変の構成成分の解析

8-18 月齢の WHHLMI ウサギの冠動脈病変について、免疫組織染色等

を実施し、マクロファージの局在、MMP の発現、コラーゲン線維等について光学顕微鏡下で観察した。

(3) 冠動脈スパズムの誘発

麻酔下で、セロトニン、エルゴノビン、アンギオテンシン、ドブタミン等を静脈内投与し、心電図及び血圧をモニターした。

(4) 倫理的な配慮

神戸大学動物実験委員会の許可の下、「神戸大学動物実験実施規則」、「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」、関連する法規等を遵守して実験を実施した。

C. 研究結果

(1) WHHLMI ウサギの増産

平成 20 年度に 152 匹の産仔を得た。これらのウサギは平成 21 年度の実験に使用する。

(2) 冠動脈病変の構成成分の解析

冠動脈に初期から後期の病変が認められ、マクロファージは、病変の表層、深層あるいは全域に認められ、MMP の発現が認められた。また、加齢により線維化が亢進した。

(3) 冠動脈スパズムの誘発

アンギオテンシン、ドブタミン、エルゴノビンでスパズムの発生を推測できる心電図変化 (ST 下降、冠性 T 波、T 波の増高等) 及び血圧の上昇が認められた。また、高月齢と若齢のウサギでスパズムが発生する濃度に差異が認められた。

D. 考察

WHHLMI ウサギの生産体制が整い、分担研究者への供給を含めて、来年度以降の研究を推進する基礎を構築した。WHHLMI ウサギの冠動脈病変は加齢によって細胞成分が減少し、線維化が亢進することが確認できたことにより、動脈硬化の進行を考慮してスパズムを誘発する条件を検討する必要があると考えられる。

E. 結論

今年度の研究により本研究計画を遂行する基礎を確立できた。冠動脈病変の構成およびウサギの月齢がスパズム

の誘発に關与する可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Shiomi M, Fan J: Unstable coronary plaques and cardiac events in myocardial infarction-prone Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits: questions and quandaries. *Curr Opin Lipidol* 19:631-636, 2008.

2. 学会発表

1) Shiomi M, Yamada S, Hirayama N, and Ito T: WHHLMI rabbits, a suitable animal model for human cardiovascular diseases. 3rd Congress of Asian Federation of Laboratory Animal Science, Sep 27-30, 2008 (Beijing, China)

2) 塩見 雅志: 循環器病の研究を支える生物資源 - ウサギモデル (WHHLMI ウサギ). 厚生労働省生物資源研究セミナー「循環器病の研究を支える生物資源」. 2008年11月19日 (豊中、大阪)

G. 健康危険情報

該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし。

平成 20 年度厚生労働省科学研究費補助金
(創薬基盤推進研究事業 (生物資源・創薬モデル動物研究事業))

研究分担報告書

急性冠症候群の疾患モデルウサギの開発及びバイオリソースの樹立に関する研究
—急性冠症候発に関連する遺伝子コンストラクトの作成に関する研究—

研究分担者 範 江林 山梨大学大学院医学工学総合研究部

研究要旨

急性冠症候群の発生機序を究明できる疾患モデルとしての遺伝子組換え MMP 過剰発現 WHHLMI ウサギ開発に必要となる、MMP-1 および MMP-9 のトランスジェニックコンストラクトの作成を試み、これに成功した。

A. 研究目的

不安定冠動脈疾患及び心筋梗塞を発症できるウサギを作製するため、動脈硬化病変の不安定化、脆弱化を誘導する酵素(マトリックスメタロプロテアーゼ, MMP) を過剰発現できる遺伝子コンストラクトを作成する。

B. 研究方法

マクロファージ特異的に遺伝子を発現できるスカベンジャーリセプター D. 1 のプロモーター配列を含むプラスミドに MMP-1 および MMP-9 の遺伝子を組み込む。このコンストラクトの両端に 2 対のインスレーター配列を挿入する。

(倫理面への配慮)

これらの実験は山梨大学遺伝子組

換え実験安全管理規則に従い、「遺伝子組換え生物の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」を遵守して実施した。

C. 研究結果

インスレーターを含む MMP-1 および MMP-9 発現コンストラクトの作成に成功した。

考察

本研究により作成したコンストラクトには、インスレーター配列が存在するため、従来のマイクロインジェクション法での欠点であったポジションエフェクトをなくすることができる。そのため、このコンストラクトを用いることで、組み込まれる染色体の位置に影響を受けない安定した MMP 発現を

示すトランスジェニックウサギが作成できる。

E. 結論

当初の計画通り、MMP-1、MMP-9 のトランスジェニックコンストラクトの作成に成功した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Shiomi M, Fan J: Unstable coronary plaques and cardiac events in myocardial infarction-prone Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits: questions and quandaries. *Curr Opin Lipidol* 19: 631-636, 2008

2. 学会発表

- 1) 範 江林. 動脈硬化の研究のための新たな遺伝子改変ウサギモデルの開発と応用. 日本動脈硬化学会、2008年7月11日、(つくば市)
- 2) 山田 壮亮, 王 克鏞, 谷本 昭英, 範 江林, 島尻 正平, 北嶋 修司, 森本 正敏, 渡邊 照男, 笹栗 靖之. 細胞外基質分解酵素 MMP-12 は、初期動脈硬化巣の形成から進展に重要な促進因子である. 第三回ウサギフォーラム、2008年7月26日、(神戸市)

G. 健康危険情報

該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

平成20年度厚生労働省科学研究費補助金
(創薬基盤推進研究事業(生物資源・創薬モデル動物研究事業))

分担研究報告書

急性冠症候群の疾患モデルウサギの開発及びバイオリソースの樹立に関する研究
—急性冠症候群に関連する遺伝子組換えウサギの開発に関する研究—

研究分担者 北嶋修司(佐賀大学総合分析実験センター 生物資源開発部門 准教授)

研究要旨

平成20年度は、実施計画に基づき Matrix metalloproteinase (MMP)-12 トランスジェニック(Tg) Watanabe Heritable Hyperlipidemic (WHHL) MI ウサギならびに C-reactive protein (CRP) Tg WHHL MI ウサギの開発を中心に研究を進めた。すなわち、神戸大学で維持されている WHHL MI ウサギの精子もしくは WHHL MI ウサギの雄を佐賀大学へ導入し、佐賀大学で維持している MMP-12 Tg ウサギならびに CRP Tg ウサギの雌と人工授精による交配を行なった。その結果、MMP-12 については、(+/-), Low density lipoprotein (LDL)レセプターについては+/-の遺伝子型となる MMP-12 Tg WHHL MI(+/-) ウサギを13匹(雄5匹,雌8匹)得ることに成功した。CRP Tg ウサギと WHHL MI ウサギとの交配についても進めているが、まだ産仔は得られていない。平成21年度は、LDLレセプターの遺伝子型を(-/-)とした Tg WHHL MI(-/-)ウサギを開発すべく、さらに交配実験を進めるとともに MMP-9 および MMP-1 遺伝子を導入した新たな Tg ウサギの作製実験を行なう予定である。

A. 研究目的

急性冠症候群を発症する疾患モデルウサギの開発、発症機序の解明、バイオリソース拠点の構築を目的に、Matrix metalloproteinase (MMP)-9 と MMP-1 を過剰発現するトランスジェニック(Tg)ウサギの新規作製、MMP-12 および C-reactive protein (CRP) Tg ウサギと Watanabe Heritable Hyperlipidemic (WHHL)

MI ウサギを交配し、MMP-12 Tg WHHL MI ウサギならびに CRP Tg WHHL MI ウサギを開発する。

B. 研究方法

平成20年度は、実施計画に基づき MMP-12 Tg WHHL MI ウサギならびに CRP Tg WHHL MI ウサギの作製を中心に研究を進めた。

各種遺伝子を過剰発現する Tg ウサ

ギと WHHL MI ウサギを交配し, Tg WHHL MI ウサギを作出するためには, まず, Tg ウサギと WHHL MI ウサギを交配し, Low density lipoprotein (LDL)レセプター遺伝子型がヘテロ型となる Tg-WHHL MI (+/-) ウサギを得た上で, これらのヘテロ型同士もしくはヘテロ型ともう一度 WHHL MI ウサギを交配し, 最終的には LDL レセプターについてホモ欠損型 (-/-)の遺伝子背景をもつ Tg-WHHL MI ウサギを作出する必要がある。そのため, 神戸大学で維持されている WHHL MI ウサギの精子および WHHL MI ウサギの雄 2 匹を佐賀大学へ導入し, 佐賀大学で維持している MMP-12 Tg ウサギと CRP Tg ウサギの雌と人工受精による交配を行なった。

神戸大学から輸送した精子を用いた人工受精

神戸大学で WHHL MI ウサギの雄 2 匹から採取した精子を佐賀へ輸送し, 佐賀で継代・維持していた MMP-12 Tg ウサギの雌 6 匹に人工受精を実施した。使用した精子の運動率は 76.3~74.1%であった。人工受精は, 雌 1 匹当り 30~55x10⁶個の精子を膈内へ注入後, 50U のヒト絨毛性ゴナドトロピン(hCG)を静脈内注射した。

神戸大学から WHHL MI ウサギを佐

賀に導入後, 新鮮精子を用いた人工受精

神戸大学から導入した WHHL MI ウサギの雄 2 匹から採取した新鮮精子を用いて直ちに人工受精を実施した。MMP-12 Tg ウサギでは, 6 匹の雌にのべ 11 回の人工受精を行なった。人工受精に使用した精子の運動率は 83.5~89.9%であった。いっぽう, CRP Tg ウサギでは, 2 匹の雌にのべ 6 回の人工受精を行なった。使用した精子の運動率は 85.0~95.2%であった。人工受精は, 雌 1 匹当り 20x10⁶個の精子を膈内へ注入後, 50U の hCG を静脈内注射した。

人工受精後, 得られた産仔は 4 週齢で離乳し, 導入遺伝子 (MMP-12) の伝達について PCR 法により確認した。

これらの実験は, 佐賀大学動物実験安全管理規則ならびに佐賀大学遺伝子組換え実験安全管理規則にしたがい, 関連する法令・規則(「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針・文科省」, 「遺伝子組換え生物の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」)を遵守して実施した。

C. 研究結果

神戸大学から輸送した精子を用いた人工受精

人工受精を行なった MMP-12 Tg ウサギの雌 6 匹のうち 1 匹が出産した(妊娠率: 16.7%)。全部で 3 匹の産仔を得

たが、いずれも死産であった。

神戸大学から WHHL MI ウサギを佐賀に導入後、新鮮精子を用いた人工授精

人工授精を行なった MMP-12 Tg ウサギの雌、のべ 11 匹のうち 9 匹が出産し (妊娠率: 81.8%), 全部で 46 匹の産仔を得た。このうち、離乳後の PCR による遺伝子解析の結果、13 匹 (雄 5 匹, 雌 8 匹) において MMP-12 遺伝子が伝達されていることが確認できた。いっぽう、CRP Tg ウサギでは、6 匹中 1 匹が出産 (妊娠率: 16.7%) し、1 匹の産仔を得たが、死産であった。

D. 考察

Tg ウサギと WHHL MI ウサギの交配において、新鮮精子を用いた場合、MMP-12 Tg ウサギでは良好な成績が得られたが、CRP Tg ウサギで良好な成績が得られていない。この原因として、交配に使用した雌がやや若齢であったこと、人工授精に用いた精子の性状が悪かった点が挙げられるかもしれない。特に、人工授精に用いた精子の運動率は高かったものの、動き自体はあまり活発でなく、総精子数も少なく、精液中への夾雑物の混入が非常に多かったことが観察されている。現在も継続して人工授精による交配を実施しているが、精子性状はほとんど改善されていない。このまま成績が向上しない場合は、もう一度、神戸大学から新た

に別の WHHL MI ウサギの雄を導入することを検討する必要があると考えられる。

E. 結論

MMP-12 Tg ウサギについては、LDL レセプターの遺伝子型がヘテロ型となる MMP-12 Tg WHHL MI (+/-)ウサギを 13 匹 (雄 5 匹, 雌 8 匹) 得ることに成功した。これらのウサギが性成熟に達するのを待って、引き続き交配を行い、MMP-12 Tg WHHL MI (-/-)ウサギを作製する。また、CRP Tg ウサギについても、まずは CRP Tg WHHL MI (+/-)が得られるよう引き続き交配を継続する。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 山田 壮亮, 王 克鏞, 谷本 昭英, 範 江林, 島尻 正平, 北嶋 修司, 森本 正敏, 渡邊 照男, 笹栗 靖之: 細胞外基質分解酵素 MMP-12 は、初期動脈硬化巣の形成から進展に重要な促進因子である. 第 3 回フォーラム「医療に貢献する実験用ウサギの新しい展開」7 月 26 日 (2008), 神戸

G. 健康危険情報

該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし。

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
	該当なし						

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Shiomi M, Fan J	Unstable coronary plaques and cardiac events in myocardial infarction-prone Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits: questions and quandaries.	Curr Opin Lipidol	19	631-636	2008