

200911218

(別紙 1)

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21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 塩見 雅志

平成22(2010)年 5月

(別紙 2)

目 次

I. 総括研究報告	
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	
塩見 雅志	----- 1
II. 分担研究報告	
1. 急性冠症候群急性冠症候群の誘発条件に関する研究	
塩見 雅志	----- 9
2. Matrix metalloproteinase (MMP)-9 過剰発現ウサギの 開発に関する研究	
範 江林	----- 14
3. 急性冠症候群に関連する遺伝子組換えウサギの 開発及び保存に関する研究	
北嶋 修司	----- 17
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 21
IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 22

(別紙 3)

平成21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

急性冠症候群 (ACS) のモデル動物を開発することを目的に本研究を平成 20 年度から 3 年間の研究期間で実施しており、本年度は 2 年目に当たる。平成 21 年度の実験計画に基づき、以下のとおり研究を実施した。神戸大学では、(1) ACS 誘発実験に使用する WHHLMI ウサギの増産、(2) ACS の発症を目的に冠動脈にスパズムおよび不整脈を誘発、(3) スパズムおよび不整脈が発生した WHHLMI ウサギの冠動脈病変の病理組織学的解析、(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 ウサギを開発することを目的に分担研究者 (北嶋修司准教授、佐賀大学) に WHHLMI ウサギを提供。以上の研究によって、冠動脈に重度の動脈硬化が発症する WHHLMI ウサギは、ACS の一つである不安定狭心症のモデル動物として適していることを確認した。しかし、ACS 発症において重要と考えられている冠動脈病変の破綻 (動脈硬化病変の破裂とそれに続く閉塞性血栓の形成) は認められなかった。来年度の研究課題である。山梨大学では、佐賀大学で生産した matrix metalloproteinase (MMP)-9 を過剰発現する遺伝子組換え (Tg) ウサギについて表現型解析を行い、MMP-9 遺伝子ならびに蛋白の発現を確認した。佐賀大学では、以下の実験を実施した。(1) MMP-Tg-ウサギと神戸大から提供された WHHLMI ウサギを交配し、MMP-12-Tg-WHHLMI ウサギを開発、(2) 山梨大学が作成した MMP-1 および MMP-9 の遺伝子コンストラクトを用いて、MMP-1-Tg-ウサギおよび MMP-9-Tg-ウサギを開発、(3) 開発した Tg ウサギの精子を凍結保存。

これらの成果に基づき、来年度は MMP-12-Tg-WHHLMI ウサギを用いて ACS 誘発を試みると同時に、MMP-1-Tg-WHHLMI ウサギおよび MMP-9-Tg-WHHLMI ウサギを開発し、ACS の誘発を試みる予定である。

研究分担者

範 江林・山梨大学大学院医学工学総合研究部・教授
北嶋 修司・佐賀大学総合分析実験センター・准教授

A. 研究目的

WHO 加盟国の死因の約 30%が心血管疾患であり、とくに急性冠症候群 (ACS) の克服が重要な課題となっている。ACS は急性心筋梗塞、不安定狭心症、心突然死の総称であり、これら疾患の根源に冠動脈病変の破綻 (動脈

硬化病変の破裂に基づく閉塞性血栓の形成)が重要な役割を果たしていると考えられている。ACSのモデル動物を開発することを目的に本研究を平成20年度から開始した。ACSの発症は、不安定な冠動脈病変が破裂することが発症の発端と考えられているが、不安定な冠動脈病変が必ずしも破裂するわけではないことから、不安定な冠動脈病変に物理的な力が加わることが重要と考えられ始めている。したがって、平成21年度の研究目的は、(1) スパズム等の誘発により冠動脈病変に物理的ストレスを与える条件の設定、(2) WHHLMUウサギの冠動脈病変をより不安定化するために、コラーゲン線維を分解する matrix metalloproteinase (MMP)を過剰発現する WHHLMUウサギの開発、(3) 異なる MMP を過剰発現する遺伝子組換え(Tg)ウサギの開発、を目的とする。

B. 研究方法

(1) WHHLMU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 69 ペアを交配した。

(2) スパズム等の誘発 (神戸大)

WHHLMUウサギはケタミンとミタゾラムの併用投与で麻酔を行い、実験中はケタミンの持続投与で麻酔を維持した。血管作動物質としてエルゴノビン、昇圧剤としてノルエピネフリン、アンギオテンシンII、ドブタミンを耳介周縁静脈から投与した。スパズム等の評価は血圧の変化、心電図、超音波心エコー、心筋虚血の血清マーカーの測定で実施した。血圧は、麻酔導入後、大腿

動脈にカニューレションし、血圧測定用の圧トランスデューサーを接続して計測した。心電図は、麻酔開始からスパズム等誘発実験が終了するまでの間、電極をセットし、四肢誘導および胸部誘導でWHHLMUウサギの心電図をモニターした。心エコーは、薬剤投与前、心筋虚血を示唆する心電図変化が観察された場合および、薬剤投与が終了し心電図変が正常化した場合に実施した。心筋虚血の血清マーカーは、薬剤投与前およびスパズム等誘発約4時間後に採血し、市販キットを用いてFABP、トロポニンI、ミオグロビンの濃度を計測した。

(3) MMP-12-Tg-WHHLMUウサギの開発 (佐賀大)

WHHLMUウサギの繁殖能力はきわめて低いため、WHHLMUウサギを用いてMMP-12-Tg-WHHLMUウサギホモ接合体の開発を行うことは困難かつ非効率的と考え、正常日本白色種ウサギにMMP-12 遺伝子導入し、このMMP-12-Tg-ウサギとWHHLMUウサギを交配し、得られたMMP-12-Tg-WHHLMUウサギヘテロ接合体とWHHLMUウサギを交配することにより、MMP-12-Tg-WHHLMUウサギ(ホモ接合体)を開発した。交配は人工授精法及び自然交配法で実施した。WHHLMUウサギは研究代表は肝である神戸大学から提供を受けた。また、スパズム等誘発後ウサギを安楽死し、心臓摘出してホルマリン固定し、病理組織標本を作成した。

(4) MMP-1-TgウサギおよびMMP-9-Tgウサギの開発 (佐賀大)

山梨大学で作製された遺伝子コンストラクトを用いて、MMP-1、MMP-9 遺伝子を導入した新規Tgウサギの開発

を行なった。外来遺伝子の導入は、マイクロインジェクション法で行なった。胚移植後に得られた産仔についてPCRによる遺伝子解析を行い、導入遺伝子の有無について確認した。

(5) MMP-9-Tgウサギの表現型の解析 (山梨大)

佐賀大学で開発されたMMP-9-Tgウサギについて、外貌観察、血液検査(血球数、生化学検査)、摂食量・体重測定を行い、健康状態を含む基礎的な表現型解析を行った。組換え遺伝子導入の確認のため、耳組織の一部を採取し、Southern blottingを行い、導入したMMP-9遺伝子のmRNA発現ならびに蛋白発現の有無を確認するため、Tgウサギと同腹の対照ウサギを解剖して各種臓器を採取し、Northern blottingとWestern blottingにより解析した。

(倫理的な配慮)

動物実験は、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 (神戸大)

平成21年度に179匹の産仔を得た。これらのウサギは平成22年度の実験に使用する。

(2) スパズム等の誘発 (神戸大)

エルゴノビン、ノルアドレナリン、アンギオテンシンII、ドブタミンの投与によって、血圧は30-100 mmHg上昇した。これらの薬剤の単独あるいは併用投与によって、心電図上、ST領域の低下、R波の減降、T波の逆転が生じ、一部のウサギではこれらの変化に続いて心室性不整脈が観察された。さらに、心エコーでは、心筋壁の運動度の低下が認められた。これらの変化は、薬剤投与の中止およびニトログリセリンの投与によって正常化した。さらに、心筋虚血のマーカーであるFABP、トロポニンI、ミオグロビンは、実験終了4時間後に顕著に増加した。心内膜下の虚血を示唆する心電図変化を示したウサギでは、冠動脈の横切断面で評価した狭窄率が80%以上であった。一方、心電図上明確な変化が認められなかったウサギでは、動脈硬化による冠動脈の狭窄率は極めて軽度であった。スパズム等の発生を示唆する心電図変化を示したウサギの冠動脈では、動脈硬化病変表層の血管内皮細胞の一部が消失しており、内皮下に蓄積しているマクロファージが管腔内に流出していると考えられる所見が観察された。しかし、血栓の形成は確認できなかった。

(3) MMP-12-Tg-WHHLMiウサギホモ接合体の開発 (佐賀大)

当初、効率化を図るため人工授精による繁殖を行なったが、MMP-12-Tg-WHHLMiウサギヘテロ接合体とWHHLMiウサギ(ホモ接合体)の交配では、妊娠率は15%、平均産仔数 3.6 ± 3.8 匹(交配数45回)ときわめて低値であった。また、原因は不明であるが、水頭症様所見を呈して新生仔の死亡が多発し、MMP-12-Tg-WHHLMiウサギ(ホモ接合体)を得ることがで

きなかった。しかし、繁殖方法を自然交配に変更した結果、妊娠率は71%、平均産仔数 9.8 ± 3.4 匹（交配数21回）で、離乳仔数は合計59匹、このうちMMP-12-Tg-WHHLMIウサギ（ホモ接合体）12匹（雄9匹、雌3匹）を得た。

(4) MMP-1-TgウサギおよびMMP-9-Tgウサギの開発（佐賀大）

MMP-1およびMMP-9ともに遺伝導入の確認されたファウンダーウサギを得ることに成功した。MMP-1では、マイクロインジェクション後の生存胚567個をレシピエントウサギに移植し、20匹の産仔を得た。また、MMP-9では、879個の生存胚をレシピエントウサギに移植し、26匹の産仔を得た。PCRによる遺伝子解析の結果、MMP-1およびMMP-9ともにそれぞれ2匹に遺伝子導入が確認された。さらに、ファウンダーウサギと野生型ウサギを交配し、子孫（F1）を解析したところ導入遺伝子が伝達されることも確認できた。

(5) MMP-9-Tgウサギの表現型の解析（山梨大）

本来ウサギのゲノムには含まれていないウサギMMP-9のcDNA配列に相同するプローブを用いてSouthern blottingを行ったところ、Tgウサギのみで特異的なバンドが検出され、Tgコンストラクトが正しく導入されていることを確認した。摂食量、体重、血清生化学検査に異常を認めなかった。導入したMMP-9遺伝子のmRNA量をNorthern blottingにより解析したところ、TgウサギのマクロファージにおいてMMP-9 mRNAが多量に検出された。外貌観察の結果、Tgウサギの後肢趾に肉芽腫様組織の形成が認められた。現在、詳細な病理学的解析を行っている。

D. 考察

平成21年度に神戸大学が実施した研究において、冠動脈に重度の動脈硬化を有するWHHLMIウサギに血管収縮物質および昇圧剤等を投与することによって心筋虚血を示唆する心電図変化や不整脈が生じ、心筋壁運動度の低下、血清マーカーの上昇が認められ、薬剤投与の中止およびニトログリセリンの投与によってこれらの変化が正常化した。一方、冠動脈の動脈硬化が軽度な場合にはこれらの変化が認められなかった。これらの結果は、冠状動脈に重度の動脈硬化を有するWHHLMIウサギに血管収縮物質や昇圧剤等を投与することによってスパズムを誘発できることを示唆しており、重度の心筋虚血が生じたことから、不安定狭心症を発症したと考えられる。不安定狭心症はACSの病態の一つであり、心血管疾患の重要な疾患の一つである。適切な不安定狭心症のモデル動物はまだ開発されていないことから、WHHLMIウサギは不安定狭心症の病態や発生機序の解明、治療法や予防の開発に貢献できると期待できる。

不安定狭心症を発症したWHHLMIウサギの冠動脈病変では、内皮細胞の消失と病変中のマクロファージの血管内腔への流失が認められたが、血栓の形成は認められなかった。血栓形成が認められなかった理由は不明であるが、内皮細胞の消失やマクロファージの血管内腔への流失が軽度であったことがその理由の一つかもしれない。ACSにおいては、冠動脈病変の破裂とそれに引き続いて起こる閉塞性血栓の形成、すなわち動脈硬化病変の破綻が重要とされている。冠動脈病変の不安定化をさらに亢進するために山梨大学が作製した遺伝子コンストラクトを用いて佐賀大学でMMP-12-Tg-ウサギが開発さ

れ、MMP-12-Tg-ウサギと WHHLMI ウサギとの交配により、MMP-12-Tg-WHHLMI ウサギが開発された。このことは、MMP-Tg-WHHLMI ウサギを用いてスパスム等を誘発することにより、ACS を発症するモデル動物を開発できる可能性が高まったと期待できる。さらに、さらに、MMP-1-Tg-ウサギおよび MMP-9-Tg ウサギの開発に成功したことから、MMP-1-Tg-WHHLMI ウサギおよび MMP-9-Tg-WHHLMI ウサギの開発が可能となり、MMP による冠動脈病変の不安定化および冠動脈病変の破綻との関連性について検討することが可能になると期待できる。平成 22 年度には、スパスム等誘発条件の改良、あるいは研究分担者が実施している MMP 過剰発現等による冠動脈病変の不安定化の亢進等により、冠動脈病変の破綻に基づいて ACS は発症する WHHLMI ウサギを開発できるものと期待できる。

E. 結論

本研究において、冠動脈に重度の動脈硬化を有する WHHLMI ウサギはスパスムや不整脈の誘発によって ACS の一つである不安定狭心症のモデル動物になることが確認された。また、スパスムや不安定狭心症の誘発によって、冠動脈病変に軽度の傷害を与えることができることが確認された。さらに、MMP-12-Tg-WHHLMI ウサギおよび MMP-1-Tg-ウサギや MMP-9-Tg ウサギの開発に成功したことにより、不安定化した冠動脈病変を有する WHHLMI ウサギにスパスム等を誘発し、ACS を発症するモデル動物を開発できる可能性が強く示唆された。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ohkawara H, Ishibashi T, **Shiomi M**, Sugimoto K, Uekita H, Kamioka M, Takuwa Y, Teramoto T, Maruyama Y, Takeishi Y : RhoA and Rac1 Changes in the Atherosclerotic Lesions of WHHLMI Rabbits. *J Atheroscler Thromb* 16: 846-56. (2009)
- 2) Cui X, Kushiyama A, Yoneda M, Nakatsu Y, Guo Y, Zhang J, Ono H, Kanna M, Sakoda H, Ono H, Kikuchi T, Fujishiro M, **Shiomi M**, Kamata H, Kurihara H, Kikuchi M, Kawazu S, Nishimura F, Asano T: Macrophage foam cell formation is augmented in serum from patients with diabetic angiopathy. *Diabetes Res Clin Pract* 87: 57-63. (2010)
- 3) Yoshida M, Masunaga K, Nagata T, Satoji Y, **Shiomi M**: The effects of chronic hyperlipidemia on bladder function in myocardial infarction-prone Watanabe heritable hyperlipidemic (WHHLMI) rabbits. *Neurorol Urodyn* 2010 (in press)
- 4) **Shiomi M**, Ito T: The Watanabe heritable hyperlipidemic (WHHL) rabbit, its characteristics and history of development: A tribute to the late Dr. Yoshio Watanabe. *Atherosclerosis* 207: 1-7 (2009).
- 5) **Shiomi M**: Rabbit as a Model for the Study of Human Diseases. *In*

Houdebine LM, Fan J eds. Rabbit Biotechnology: Rabbit genomics, transgenesis, cloning and models. Springer Science + Business Media.(New York, USA), 49-64 (2009)

- 6) Koike T, **Kitajima S**, Yu Y, Li Y, Nishijima K., Liu E, Sun H, Ahmed Bilal Waqar AB, Shibata N, Inoue T, Wang Y, Zhang B, Kobayashi J, Morimoto M, Saku K, Watanabe T, **Fan J**: Expression of human apoAII in transgenic rabbits leads to dyslipidemia: a new model for combined hyperlipidemia, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29: 2047-2053. (2009)
- 7) Koike T, **Kitajima S**, Yu Y, Nishijima K, Zhang J, Ozaki Y, Morimoto M, Watanabe T, Bhakdi S, Asada Y, Chen YE, **Fan J**: Human C-reactive protein does not promote atherosclerosis in transgenic rabbits. *Circulation* 120: 2088-2094. (2009)
- 8) Zhang C, Zheng H, Yu Q, Yang P, Li Y, Cheng F, **Fan J**, Liu E: A practical method for quantifying atherosclerotic lesions in rabbits. *J Comp Pathol* 142:122-128. (2010)

2. 学会発表

- 1) **Shiomi M**: WHHL rabbits, history and applications. "3rd International Meeting on Rabbit Biotechnology, June 4-5, 2009 (Xi'an, China)
- 2) Nakagawa Y, Watanabe S, Liang J, Tajiri K, Seo Y, Sato Y, Takeyasu N, Sato A, Ishizu T, Sakai S, Murakoshi N, Kawano S, Aonuma K, **Shiomi M**: Optical coherence tomography can detect the macrophages accumulation in atherosclerotic lesions. The 8th International Congress on Coronary Artery Disease, October 11-14, 2009 (Prague, Czech Republic)
- 3) Watanabe S, Liang J, Nakagawa Y, Tajiri K, Seo Y, Sato Y, Takeyasu N, Aihara H, Sato A, Ishizu T, Sakai S, Murakoshi N, Kawano S, **Shiomi M**, Aonuma K: Possibilities of intravascular optical coherence tomography in identifying plaque erosion: Some new findings in hypercholesterolemic rabbits. The 8th International Congress on Coronary Artery Disease, October 11-14, 2009 (Prague, Czech Republic)
- 4) Ito T, Yamada S, Kobayashi T, Hirayama N, **Shiomi M**: Correlation of visceral fat accumulation with plasma CRP and atherosclerosis in metabolis syndrome-prone WHHLMI rabbits. XVth International Symposium on Atherosclerosis, June 14-18, 2009 (Boston, USA)
- 5) Kobayashi T, Ito T, Hirayama N, Yamada S, **Shiomi M**: Macrophage accumulation and expression of matrix metalloproteinases (MMPs) relate to plaque vulnerability and arterial outward remodeling. XVth International Symposium on Atherosclerosis, June 14-18, 2009 (Boston, USA)
- 6) Nakagawa Y, Watanabe S, Liang J, Tajiri K, Seo Y, Sato Y, Takeyasu N, Sato A, Ishizu T, Sakai S, Murakoshi N, Kawano S, Aonuma K, **Shiomi M**: Optical coherence tomographic

- findings of macrophage accumulation in atherosclerotic lesions. American Heart Association Scientific Sessions 2009, November 15-17, 2009 (Orland, USA)
- 7) 塩見 雅志、山田 悟士、小林 努、平山 信恵、伊藤 隆: ヒト高脂血症・動脈硬化症のモデル動物 WHHLMI ウサギ. 第 56 回日本実験動物学会. 2009 年 5 月 14-16 日 (ソニックシティ, 大宮, 埼玉)
- 8) Ito T, Kobayashi T, Hirayama N, Yamada S, **Shiomi M**: Relation of macrophage localization in coronary plaques to plaque fragility or coronary outward remodeling. 第 41 回日本動脈硬化学会総会. 2009 年 7 月 17-18 日 (海峡メッセ下関, 下関, 山口)
- 9) Uekita H, Ishibashi T, **Shiomi M**, Sugimoto K, Ohkawara H, Kamioka M, Yamagishi S, Teramoto T, Koyama H, Otsuka S, Itabe H, Yasuchika T: Pivotal role of receptor for advanced glycation end products (RAGE) in hyperlipidemic-dependent atherosclerosis and molecular regulation. 第 74 回日本循環器学会総会. 2010 年 3 月 5-7 日 (京都国際会議場, 京都)
- 10) Sugimoto K, Ishibashi T, Sawamura T, Ohkawa H, Sakamoto N, Inoue N, Takuwa Y, **Shiomi M**, Teramoto T, Takeishi Y: MT1-MMP forms a complex with LOX-1 and plays a crucial role in oxidized LDL-induced endothelial dysfunction via RhoA/Rac1 activation. 第 74 回日本循環器学会総会. 2010 年 3 月 5-7 日 (京都国際会議場, 京都)
- 11) Koike T, Yu Y, **Kitajima S**, Zhang J, Bhakdi S, Chen YE, **Fan J**: Transgenic Rabbits Expressing human C-reactive Protein. Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology Annual Conference 2009, April 29-May 1 (2009), Washington DC, USA
- 12) 北嶋 修司, 西島 和俊, 森本 正敏, 渡辺 照男, 範 江林: ウサギ採卵成績に影響を及ぼす要因の検討: 過去 5 年間の採卵成績の解析. 第 56 回日本実験動物学会総会 5 月 14-16 日 (2009), 埼玉
- 13) **Fan J**: Transgenic rabbits for translational research (TRTR). 3rd International Meeting on Rabbit Biotechnology, Jun 4-5, 2009, Xian, China
- 14) Koike T, Yu Y, **Kitajima S**, Zhang J, Bhakdi S, Chen EY, **Fan J**: Transgenic rabbits expressing human C-reactive protein. 3rd International Meeting on Rabbit Biotechnology, Jun 4-5, 2009, Xian, China
- 15) Morimoto M, **Kitajima S**, Nishijima K, Koike T, **Fan J**: Immunoreactivity of neuropeptides in hypothalamus of the transgenic rabbits using immunohistochemical staining. 3rd International Meeting on Rabbit Biotechnology, Jun 4-5, 2009, Xian, China
- 16) Zhao S, **Fan J**, Wei K, Yang P, Liu E: Applications of transgenic rabbits in biomedical research – a review based on the literature search. 3rd International Meeting on Rabbit Biotechnology, Jun 4-5, 2009, Xian, China
- 17) Lin Y, Zhang C, Yu Q, **Fan J**, Yang P, Liu E: C-reactive protein is associated with experimental stroke in rabbits.

- 3rd International Meeting on Rabbit Biotechnology, Jun 4-5, 2009, Xian, China
- 18) Koike T, **Kitajima S**, Yu Y, Nishijima K, Zhang J, Ozaki Y, Morimoto M, Watanabe T, Asada Y, Chen E, **Fan J**: Transgenic rabbits expressing Human C-reactive protein. 第41回日本動脈硬化学会総会・学術集会 7月17-18日(2009) 下関
- 19) Waqar AB, Koike T, Yu Y, Shibata N, Inoue T, Aoki T, **Fan J**: High-Fat-Diet- induced metabolic disorders enhances atherosclerosis. 第41回日本動脈硬化学会総会・学術集会 7月17-18日(2009) 下関
- 20) Yu Y, Zhang J, Koike T, Ishida T, Hirata K, Chen E, **Fan J**: Molecular cloning and characterization of rabbit endothelial lipase. 第41回日本動脈硬化学会総会・学術集会 7月17-18日(2009) 下関
- 21) Yu Q, Liu E, Lin Y, Yang P, **Fan J**: C-reactive protein is associated with experimental stroke in rabbits. 第41回日本動脈硬化学会総会・学術集会 7月17-18日(2009) 下関
- 22) **Kitajima S**, Maeda T, Liu E, Nishijima K, Morimoto M, Watanabe T: Technology suitable for rabbit semen conservation. 3rd International Meeting on Rabbit Biotechnology, Jun 4-5, 2009 (Xian, China)
- 23) Szikra D, Nagy S, Bernder B, Hiripi L, **Kitajima S**, Pribenszky C, Bösze Z: Comparison of two rabbit semen cryopreservation protocol – a pilot study. 3rd International Meeting on Rabbit Biotechnology, Jun 4-5, 2009 (Xian, China)
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許出願
- ヒトC反応性蛋白遺伝子導入ウサギ (特願 2009-141742)

平成21年度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))

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
— 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 (神戸大学大学院医学研究科、准教授)

研究要旨

平成 20 年度に生産した WHHLMI ウサギ (高コレステロール血症、冠動脈の動脈硬化、心筋梗塞を自然発症する疾患モデルウサギ) を用いて、冠動脈にスパズムおよび不整脈を誘発し、冠動脈病変の破綻 (動脈硬化病変の破裂に基づく閉塞性血栓の形成) の可能性を検討した。複数の血管収縮物質および昇圧剤を投与し、心電図および超音波心エコーにて心機能の変化を観察し、スパズムおよび不整脈の評価を実施した。その結果、これらの薬剤の投与によって心筋虚血を示唆する心電図変化を観察するとともに心エコーによって心筋壁の運動度の低下を観察した。これらの所見はスパズムの発生を示唆している。さらに、心電図において心室性不整脈も観察した。また、心筋虚血の血清マーカーの上昇も観察した。病理組織学的観察において、スパズムあるいは不整脈が観察されたウサギでは、冠動脈に重度の動脈硬化病変が発生しており、血管内皮細胞の消失と病変中のマクロファージの血管内腔への流出が観察されたが、血栓形成は認められなかった。以上の結果から、平成 21 年度に実施した研究によって、冠動脈に重度の動脈硬化が発生している WHHLMI ウサギは、ヒトの不安定狭心症のモデル動物として有用であると考えられた。来年度に、スパズムおよび不整脈の誘発条件をさらに検討し、冠動脈病変の破綻に基づく急性冠症候群のモデル動物の確立することを計画している。

A. 研究目的

WHO 加盟国の死因の約 30%が心血管疾患であり、とくに急性冠症候群 (ACS) の克服が重要な課題となっている。ACS は急性心筋梗塞、不安定狭心症、心突然死の総称であり、これら疾患の根源に冠動脈病変の破綻 (動脈硬化病変の破裂に基づく閉塞性血栓の形成) が重要な役割を果たしていると

考えられている。ACS のモデル動物を開発することを目的に本研究を平成 20 年度から開始した。平成 21 年度の研究目的は、高コレステロール血症、冠動脈の動脈硬化、心筋梗塞のモデル動物である WHHLMI ウサギにスパズムおよび不整脈を誘発する条件の設定と冠動脈病変破綻の可能性について検討することである。

B. 研究方法

1) 実験に使用した動物

15-20月齢の WHHLMI ウサギを実験に使用した。ウサギは、温度20-24℃、湿度40-70%の飼育室で金属ケージ(550 mm (W) x 600 mm (D) s x 450 mm (H)) に收容して単独飼育した。照明は12時間の明暗リズムとし、飼料は実験動物用のLRC4を120 g/日給与し、水は水道水を自由摂取させた。本実験の動物実験計画書は学長の承認を得、動物実験は「神戸大学動物実験実施規則」に基づいて実施した。

2) スパズムおよび不整脈の誘発

WHHLMI ウサギはケタミンとミタゾラムの併用投与で麻酔を行い、実験中はケタミンの持続投与で麻酔を維持した。血管作動物質としてエルゴノビン、昇圧剤としてノルエピネフリン、アンギオテンシン II、ドブタミンを耳介周縁静脈から投与した。

3) 血圧の測定

麻酔導入後、大腿動脈にカニューレションし、血圧測定用の圧トランスデューサーを接続した。

4) 心電図のモニター

麻酔開始からスパズム等誘発実験が終了するまでの間、電極をセットし、四肢誘導および胸部誘導で WHHLMI ウサギの心電図をモニターした。

5) 心筋虚血の評価

超音波心エコーにより心筋壁の運動度を評価した。また、麻酔薬投与前およびスパズム等発生4時間後に採血し、Fatty acids binding protein (FABP), troponin Iおよびミオグロビン濃度をキットを用いて測定した。

6) 冠動脈病変の評価

実験終了後、ケタミンの過量投与で

動物を安楽死し、心臓を摘出してホルマリン固定し、elastic van Gieson 染色、hematoxylin and eosin 染色を実施した。

(倫理的な配慮)

動物実験は、動物実験計画書を神戸大学学長に提出し、神戸大学動物実験委員会の審査を受け、神戸大学学長の許可の下に、「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」等の関連する法規等を遵守して実施した。

C. 研究結果

1) スパズム等の誘発

エルゴノビン、ノルアドレナリン、アンギオテンシン II、ドブタミンの投与によって、血圧は30-100 mmHg 上昇した。これらの薬剤の単独あるいは併用投与によって、心電図上、ST領域の低下、R波の減降、T波の逆転が生じ、一部のウサギではこれらの変化に続いて心室性不整脈が観察された。さらに、心エコーでは、心筋壁の運動度の低下が認められた。これらの変化は、薬剤投与の中止およびニトログリセリンの投与によって正常化した。さらに、心筋虚血のマーカーである FABP, トロポニン I、ミオグロビンは、実験終了4時間後に実験開始前に比較して顕著に増加した。

2) 冠動脈病変の評価

心内膜下の虚血を示唆する心電図変化を示したウサギでは、冠動脈の横切断面で評価した狭窄率が80%以上であった。一方、心電図上明確な変化が認められなかったウサギでは、動脈硬化による冠動脈の狭窄率は極めて軽度であった。スパズム等の発生を示唆する心電図変化を示したウサギの冠動脈では、

動脈硬化病変表層の血管内皮細胞の一部が消失しており、内皮下に蓄積しているマクロファージが管腔内に流出していると考えられる所見が観察された。しかし、血栓の形成は確認できなかった。

D. 考察

本研究において、冠動脈に重度の動脈硬化を有する WHHLMi ウサギに血管収縮物質および昇圧剤等を投与することによって心筋虚血を示唆する心電図変化や不整脈が生じ、心筋壁運動度の低下、血清マーカーの上昇が認められ、薬剤投与の中止およびニトログリセリンの投与によってこれらの変化が正常化した。一方、冠動脈の動脈硬化が軽度な場合にはこれらの変化が認められなかった。これらの結果は、冠状動脈に重度の動脈硬化を有する WHHLMi ウサギに血管収縮物質や昇圧剤等を投与することによってスパズムを誘発できることを示唆しており、重度の心筋虚血が生じたことから、不安定狭心症を発症したと考えられる。不安定狭心症は ACS の病態の一つであり、心血管疾患の重要な疾患の一つである。適切な不安定狭心症のモデル動物はまだ開発されていないことから、WHHLMi ウサギは不安定狭心症の病態や発生機序の解明、治療法や予防の開発に貢献できると期待できる。

不安定狭心症を発症した WHHLMi ウサギの冠動脈病変では、内皮細胞の消失と病変中のマクロファージの血管内腔への流失が認められたが、血栓の形成は認められなかった。血栓形成が認められなかった理由は不明であるが、内皮細胞の消失やマクロファージの血管内腔への流失が軽度であったことがその理由の一つかもしれない。ACS においては、冠動脈病変の破裂とそれに

引き続いて起こる閉塞性血栓の形成、すなわち動脈硬化病変の破綻が重要とされている。平成 22 年度には、スパズム等誘発条件の改良、あるいは研究分担者が実施している MMP 過剰発現等による冠動脈病変の不安定化の亢進等により、冠動脈病変の破綻に基づいて ACS を発症する WHHLMi ウサギを開発できるものと期待できる。

E. 結論

本研究において、冠動脈に重度の動脈硬化を有する WHHLMi ウサギはスパズムや不整脈の誘発によって ACS の一つである不安定狭心症のモデル動物になることが確認された。また、スパズムや不安定狭心症の誘発によって、冠動脈病変に軽度の傷害を与えることができることが確認された。これらの研究成果より、冠動脈病変の破綻に基づいて ACS を発症するモデル動物を開発できる可能性が強く示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ohkawara H, Ishibashi T, **Shiomi M**, Sugimoto K, Uekita H, Kamioka M, Takuwa Y, Teramoto T, Maruyama Y, Takeishi Y : RhoA and Rac1 Changes in the Atherosclerotic Lesions of WHHLMi Rabbits. *J Atheroscler Thromb* 16: 846-56. (2009)
- 2) Cui X, Kushiyama A, Yoneda M, Nakatsu Y, Guo Y, Zhang J, Ono H, Kanna M, Sakoda H, Ono H, Kikuchi T, Fujishiro M, **Shiomi M**, Kamata H, Kurihara H, Kikuchi M, Kawazu S, Nishimura F, Asano T: Macrophage foam cell formation is augmented in serum from patients with diabetic

angiopathy. *Diabetes Res Clin Pract* 87: 57-63. (2010)

- 3) Yoshida M, Masunaga K, Nagata T, Satoji Y, **Shiomi M**: The effects of chronic hyperlipidemia on bladder function in myocardial infarction-prone Watanabe heritable hyperlipidemic (WHHLMI) rabbits. *Neurorol Urodyn* 2010 (in press)
 - 4) **Shiomi M**, Ito T: The Watanabe heritable hyperlipidemic (WHHL) rabbit, its characteristics and history of development: A tribute to the late Dr. Yoshio Watanabe. *Atherosclerosis* 207: 1-7 (2009).
 - 5) **Shiomi M**: Rabbit as a Model for the Study of Human Diseases. In *Houdebine LM, Fan J eds. Rabbit Biotechnology: Rabbit genomics, transgenesis, cloning and models*. Springer Science + Business Media.(New York, USA), 49-64 (2009)
2. 学会発表
- 1) **Shiomi M**: WHHL rabbits, history and applications. "3rd International Meeting on Rabbit Biotechnology, June 4-5, 2009 (Xi'an, China)
 - 2) Nakagawa Y, Watanabe S, Liang J, Tajiri K, Seo Y, Sato Y, Takeyasu N, Sato A, Ishizu T, Sakai S, Murakoshi N, Kawano S, Aonuma K, **Shiomi M**: Optical coherence tomography can detect the macrophages accumulation in atherosclerotic lesions. The 8th International Congress on Coronary Artery Disease, October 11-14, 2009 (Prague, Czech Republic)
 - 3) Watanabe S, Liang J, Nakagawa Y, Tajiri K, Seo Y, Sato Y, Takeyasu N, Aihara H, Sato A, Ishizu T, Sakai S, Murakoshi N, Kawano S, **Shiomi M**, Aonuma K: Possibilities of intravascular optical coherence tomography in identifying plaque erosion: Some new findings in hypercholesterolemic rabbits. The 8th International Congress on Coronary Artery Disease, October 11-14, 2009 (Prague, Czech Republic)
 - 4) Ito T, Yamada S, Kobayashi T, Hirayama N, **Shiomi M**: Correlation of visceral fat accumulation with plasma CRP and atherosclerosis in metabolis syndrome-prone WHHLMI rabbits. XVth International Symposium on Atherosclerosis, June 14-18, 2009 (Boston, USA)
 - 5) Kobayashi T, Ito T, Hirayama N, Yamada S, **Shiomi M**: Macrophage accumulation and expression of matrix metalloproteinases (MMPs) relate to plaque vulnerability and arterial outward remodeling. XVth International Symposium on Atherosclerosis, June 14-18, 2009 (Boston, USA)
 - 6) Nakagawa Y, Watanabe S, Liang J, Tajiri K, Seo Y, Sato Y, Takeyasu N, Sato A, Ishizu T, Sakai S, Murakoshi N, Kawano S, Aonuma K, **Shiomi M**: Optical coherence tomographic findings of macrophage accumulation in atherosclerotic lesions. American Heart Association Scientific Sessions 2009, November 15-17, 2009 (Orland, USA)
 - 7) 塩見 雅志、山田 悟士、小林 努、平山 信恵、伊藤 隆: ヒト高脂血

症・動脈硬化症のモデル動物 WHHLMI ウサギ. 第 56 回日本実験動物学会. 2009 年 5 月 14-16 日 (ソニックシティ, 大宮, 埼玉)

- 8) Ito T, Kobayashi T, Hirayama N, Yamada S, **Shiomi M**: Relation of macrophage localization in coronary plaques to plaque fragility or coronary outward remodeling. 第 41 回日本動脈硬化学会総会. 2009 年 7 月 17-18 日 (海峡メッセ下関, 下関, 山口)
- 9) Uekita H, Ishibashi T, **Shiomi M**, Sugimoto K, Ohkawara H, Kamioka M, Yamagishi S, Teramoto T, Koyama H, Otsuka S, Itabe H, Yasuchika T: Pivotal role of receptor for advanced glycation end products (RAGE) in hyperlipidemic-dependent atherosclerosis and

molecular regulation. 第 74 回日本循環器学会総会. 2010 年 3 月 5-7 日 (京都国際会議場, 京都)

- 10) Sugimoto K, Ishibashi T, Sawamura T, Ohkawa H, Sakamoto N, Inoue N, Takuwa Y, **Shiomi M**, Teramoto T, Takeishi Y: MT1-MMP forms a complex with LOX-1 and plays a crucial role in oxidized LDL-induced endothelial dysfunction via RhoA/Rac1 activation. 第 74 回日本循環器学会総会. 2010 年 3 月 5-7 日 (京都国際会議場, 京都)

- G. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし

(別紙 3)

平成21年度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))
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
— Matrix metalloproteinase (MMP)-9 過剰発現ウサギの開発に関する研究 —

研究分担者 範 江林 (山梨大学大学院医学工学総合研究部、教授)

研究要旨

平成 21 年度の実施計画に基づき、急性冠症候群の発生モデル作成に必須となる Matrix metalloproteinase (MMP)-9 過剰発現ウサギの基礎的表現型解析を行い、MMP-9 遺伝子ならびに蛋白の発現同定に成功した。

A. 研究目的

昨年度本学で作成されたコンストラクトをもとに、佐賀大学にてマイクロインジェクションを行い、PCR 法により遺伝子導入が確認されたウサギ MMP-9 過剰発現トランスジェニック (Tg)ウサギについて、導入された遺伝子が発現し、目的とする表現型のウサギモデルが作製されたかを解析する。

B. 研究方法

PCR により遺伝子導入が確認されたウサギの外貌観察、血液検査 (血球数、生化学検査)、摂食量・体重測定を行い、健康状態を含む基礎的な表現型解析を行う。組換え遺伝子導入の確認のため、耳組織の一部を採取し、Southern blotting を行う。また、導入した MMP-9 遺伝子の mRNA 発現ならびに蛋白発現の有無を確認するため、Tg ウサギと同腹の対照ウサギを解剖して各種臓器

を採取し、Northern blotting と Western blotting により解析する。

(倫理的な配慮)

遺伝子組換え動物を用いるこれらの実験は、山梨大学動物実験安全管理規則ならびに山梨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

本来ウサギのゲノムには含まれていないウサギ MMP-9 の cDNA 配列に相同するプローブを用いて Southern blotting を行ったところ、Tg ウサギのみで特異的なバンドが検出され、Tg コンストラクトが正しく導入されている

ことを確認した。摂食量ならびに体重に異常を認めなかった。血球数および血清生化学検査の結果、異常を認めなかった。導入した MMP-9 遺伝子の mRNA 量を Northern blotting により解析したところ、Tg ウサギのマクロファージにおいて MMP-9 mRNA が多量に検出された。外貌観察の結果、Tg ウサギの後肢趾に肉芽腫様組織の形成が認められた。現在、詳細な病理学的解析を行っている。

D. 考察

ウサギマクロファージへのウサギ MMP-9 の過剰発現モデル作製を目的に、ウサギ MMP-9 をスカベンジャープロモーターの下流に組み込んだ遺伝子コンストラクトを用いて、佐賀大学にてマイクロインジェクションが行われた。産子の PCR スクリーニングにより外来遺伝子が検出された個体が得られ、その一部について、今回、Southern blotting 法による遺伝子導入の確認と、Northern blotting 法による遺伝子発現を検証した。その結果、遺伝子コンストラクトがウサギゲノム内に組み込まれていることと、mRNA として転写されていることを明らかにした。また、このウサギの後肢趾に認められた肉芽腫様病変は、我々が過去に MMP-12 をマクロファージに過剰発現したウサギモデルを開発した際に認められた、マクロファージの遊走能の亢進に伴う肉芽腫形成量の増加という表現型とよく類似していた。

E. 結論

本研究の結果、MMP-9 をマクロファージで過剰発現するトランスジェニックウサギモデルの開発に成功し

た。当初計画からの遅延はあるものの、今後はこのモデルを用いて、MMP-9 を過剰発現する WHHLMI ウサギを作成することで、世界初の急性心筋梗塞自然発症ウサギモデルの開発が期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Koike, T., Kitajima, S., Yu, Y., Li, Y., Nishijima, K., Liu, E., Sun, H., Ahmed Bilal Waqar, A.B., Shibata, N., Inoue, T., Wang, Y., Zhang, B., Kobayashi, J., Morimoto, M., Saku, K., Watanabe, T., **Fan, J.**: Expression of human apoAII in transgenic rabbits leads to dyslipidemia: a new model for combined hyperlipidemia, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29: 2047-2053. (2009)
- 2) Koike, T., Kitajima, S., Yu, Y., Nishijima, K., Zhang, J., Ozaki, Y., Morimoto, M., Watanabe, T., Bhakdi, S., Asada, Y., Chen, Y.E., **Fan, J.**: Human C-reactive protein does not promote atherosclerosis in transgenic rabbits. *Circulation* 120: 2088-2094. (2009)
- 3) Zhang, C., Zheng, H., Yu, Q., Yang, P., Li, Y., Cheng, F., **Fan, J.**, Liu, E.: A practical method for quantifying atherosclerotic lesions in rabbits. *J Comp Pathol* 142:122-128. (2010)

2. 学会発表

- 1) Koike, T., Yu, Y., Kitajima, S., Zhang, J., Bhakdi, S., Chen, Y.E., **Fan, J.**: Transgenic Rabbits Expressing human C-reactive Protein.

- Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology Annual Conference 2009, April 29-May 1 (2009), Washington DC, USA
- 2) 北嶋修司, 西島和俊, 森本正敏, 渡辺照男, 範江林: ウサギ採卵成績に影響を及ぼす要因の検討: 過去5年間の採卵成績の解析. 第56回日本実験動物学会総会 5月14-16日 (2009), 埼玉
 - 3) **Fan, J.:** Transgenic rabbits for translational research (TRTR). 3rd International Meeting on Rabbit Biotechnology, Jun 4-5, 2009, Xian, China
 - 4) Koike, T., Yu, Y., Kitajima, S., Zhang, J., Bhakdi, S., Chen, E.Y. and **Fan, J.:** Transgenic rabbits expressing human C-reactive protein. 3rd International Meeting on Rabbit Biotechnology, Jun 4-5, 2009, Xian, China
 - 5) Morimoto, M., Kitajima, S., Nishijima, K., Koike, T. and **Fan, J.:** Immunoreactivity of neuropeptides in hypothalamus of the transgenic rabbits using immunohistochemical staining. 3rd International Meeting on Rabbit Biotechnology, Jun 4-5, 2009, Xian, China
 - 6) Zhao, S., **Fan, J.**, Wei, K., Yang, P., Liu, E.: Applications of transgenic rabbits in biomedical research – a review based on the literature search. 3rd International Meeting on Rabbit Biotechnology, Jun 4-5, 2009, Xian, China
 - 7) Lin, Y., Zhang, C., Yu, Q., **Fan, J.**, Yang, P., Liu, E.: C-reactive protein is associated with experimental stroke in rabbits. 3rd International Meeting on Rabbit Biotechnology, Jun 4-5, 2009, Xian, China
 - 8) Koike, T., Kitajima, S., Yu, Y., Nishijima, K., Zhang, J., Ozaki, Y., Morimoto, M., Watanabe, T., Asada, Y., Chen, E., and **Fan, J.:** Transgenic rabbits expressing Human C-reactive protein. 第41回日本動脈硬化学会総会・学術集会 7月17-18日 (2009) 下関
 - 9) Waqar, AB., Koike, T., Yu, Y., Shibata, N., Inoue, T., Aoki, T., **Fan, J.:** High-Fat-Diet-induced metabolic disorders enhances atherosclerosis. 第41回日本動脈硬化学会総会・学術集会 7月17-18日 (2009) 下関
 - 10) Yu, Y., Zhang, J., Koike, T., Ishida, T., Hirata, K., Chen, E., **Fan, J.:** Molecular cloning and characterization of rabbit endothelial lipase. 第41回日本動脈硬化学会総会・学術集会 7月17-18日 (2009) 下関
 - 11) Yu, Q., Liu, E., Lin, Y., Yang, P., **Fan, J.:** C-reactive protein is associated with experimental stroke in rabbits. 第41回日本動脈硬化学会総会・学術集会 7月17-18日 (2009) 下関
- G. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許出願
- ヒトC反応性蛋白遺伝子導入ウサギ (特願 2009-141742)

(別紙 3)

平成 21 年度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))
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
—急性冠症候群に関連する遺伝子組換えウサギの開発及び保存に関する研究—

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 21 年度の実施計画に基づき Matrix metalloproteinase (MMP)-12 トランスジェニック(Tg) Watanabe Heritable Hyperlipidemic (WHHL) MI ウサギの繁殖を行なうとともに MMP-1 および MMP-9 遺伝を導入した新規 Tg ウサギの開発を行った。MMP-12 Tg WHHL MI ウサギの繁殖は、当初、効率的な繁殖を目的に人工授精により進めたが、期待された成績が得られず、水頭症様所見を呈して新生仔の死亡が多発した。この原因については、不明であった。その後、繁殖方法を人工授精から自然交配に変更することにより、順調に産仔が得られるようになった。また、新規 Tg ウサギの開発においては、MMP-1 および MMP-9 いずれも遺伝子導入が確認されたファウンダーウサギを得ることに成功した。

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)-12 と Watanabe Heritable Hyperlipidemic (WHHL) MI ウサギを交配し、MMP-12 Tg WHHL MI ウサギを開発する。また、MMP-1 と MMP-9 を過剰発現する新規トランスジェニック(Tg)ウサギを開発する。

B. 研究方法

MMP-12 Tg WHHL MI ウサギの繁殖

MMP-12 Tg WHHL MI ウサギを作出

するためには、まず、MMP-12 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(-/-)と交配を行う 2 行程で実施する必要がある。H21 年度は、H20 年度に得た MMP-12 Tg WHHL MI ヘテロ型ウサギの雌と神戸大学より新に導入した WHHL MI ウサギの雄との交配を進めた。

交配は、人工授精もしくは自然交配で行なった。人工授精では、雌 1 匹当たり 20~150x10⁶ 個の精子を膣内へ注入後、50U のヒト絨毛性ゴナドトロピン

(hCG)を静脈内注射した。自然交配では、雌1対雄1で行なった。

MMP-1およびMMP-9 Tg ウサギの開発

H20年度の計画において、山梨大学で作製した遺伝子コンストラクトを用いて、MMP-1、MMP-9遺伝子を導入した新規Tgウサギの開発を行なった。

外来遺伝子の導入は、マイクロインジェクション法で行なった。すなわち、濾胞刺激ホルモン(FSH)もしくは妊馬血清性腺刺激ホルモン(PMSG)を注射して過排卵処置を行なった雌のドナーウサギから前核期受精卵を採取し、倒立顕微鏡下でガラスピペットを用いて外来遺伝子溶液を前核内に注入した。インジェクション後、生存している胚を別に準備したレシピエントウサギの卵管内へ胚移植を行なった。胚移植後に得られた産仔についてPCRによる遺伝子解析を行い、導入遺伝子の有無について確認した。

(倫理的な配慮)

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

MMP-12 Tg WHHL MI ウサギの繁殖

当初、効率化を図るため人工授精による繁殖を行なったが、期待した成績が得られず、妊娠率は15%、平均産仔

数 3.6 ± 3.8 匹(交配数45回)であった。また、原因は不明であるが、水頭症様所見を呈して新生仔の死亡が多発し、離乳まで生存した仔ウサギは14匹であった。しかし、繁殖方法を人工授精から自然交配に変更した結果、その後、順調に産仔が得られるようになった。現在、自然交配による妊娠率は71%、平均産仔数 9.8 ± 3.4 匹(交配数21回)で、離乳仔数は合計59匹、このうちMMP-12 Tg WHHL MIホモ型は12匹(雄9匹、雌3匹)が得られている。

MMP-1およびMMP-9 Tg ウサギの開発

MMP-1およびMMP-9ともに遺伝導入の確認されたファウンダーウサギを得ることに成功している。MMP-1では、マイクロインジェクション後の生存胚567個をレシピエントウサギに移植し、20匹の産仔を得た。また、MMP-9では、879個の生存胚をレシピエントウサギに移植し、26匹の産仔を得た。これら得られた産仔のうち離乳できた仔ウサギについてPCRによる遺伝子解析を行なったところ、MMP-1およびMMP-9ともにそれぞれ2匹ずつに遺伝子導入が確認された。さらに、ファウンダーウサギと野生型ウサギを交配し、子孫(F1)を解析したところ導入遺伝子が伝達されることも確認できた。

D. 考察

MMP-12 Tg WHHL MI ウサギの繁殖は、当初、効率的な繁殖を目的に人工授精により進めたが、期待された成績が得られず、水頭症様所見を呈して新生仔の死亡が多発した。これまで、我々は多くのウサギ系統の繁殖を人工授精で行なってきたが、このような結果は初めてであり、その原因については、