

亜硫酸水素ナトリウムを添加し、メタノールを減圧留去後、逆相HPLCを用いて精製を行った。逆相HPLCはCosmosil 5C₁₈-AR-II (4.6 x 150 mm ナカライテスク社)を用い、移動層は水:メタノール(90:10 [0 min]→10:90 [20min])とし、流速1.0 mL/min、検出波長254 nmとした。放射化学的純度は逆相HPLC、またはTLC(酢酸エチル:エタノール=9:1)にて測定した。

体内分布実験

Balb/c系統マウス(♀、7週齢)に[¹²⁵I]FIAU(37 kBq)を尾静脈より投与し、2, 4, 6時間後に屠殺し、血中放射能と正常肢筋肉に集積した放射能を測定した。

プラナー画像撮像

Balb/c系統マウス(♀、7週齢)に[¹²³I]FIAU(33.7 MBq)を尾静脈より投与した。2.5%イソフルラン麻酔下、低エネルギー高分解コリメータ(ウインドウ幅20%、エネルギーピーク160 keV、フォーマット128 x 128)を装着したガンマカメラ(SPECT-2000H スキャナ、日立メディコ社)にて平面画像を10分間収集することによりシンチグラムを得た。

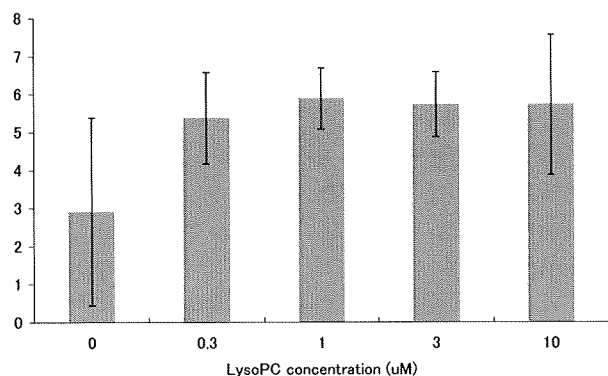
(倫理面への配慮)

動物実験は事前に京都大学動物実験委員会の承認を受けた計画に従い、「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」および「京都大学における動物実験の実施に関する規程」を遵守して実施した。

C. 研究結果

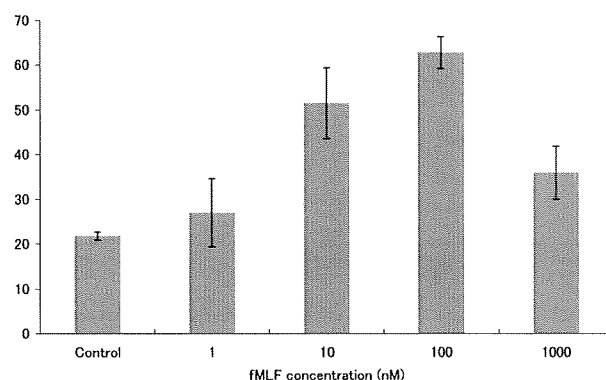
細胞走化性

単球THP-1はLysoPC濃度(0.3~1 μM)に依存した走化性を示した。さらにLysoPC濃度を上げて走化性は上昇しなかった。

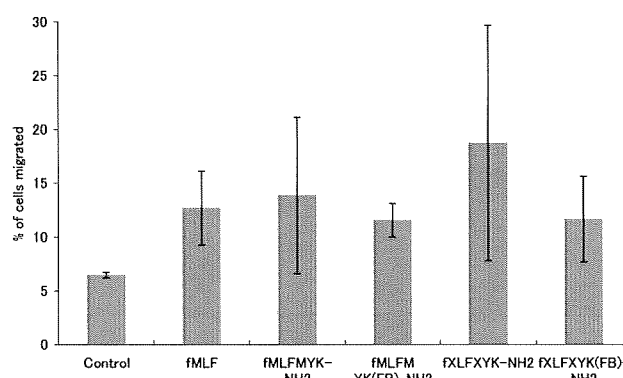


好中球THP-1は細菌由来の好中球走化活性ペプチドであるN-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLF)濃度(1~100 nM)に依存した走化性を示した。fMLF濃度をさらに上げると走化性は逆に低下し

た。



好中球THP-1は、本プロジェクト分担研究において合成されたFormyl Peptide類のうち4化合物に対する走化性を示し、これらの物質がFPRアゴニスト活性を持つことが確認された。

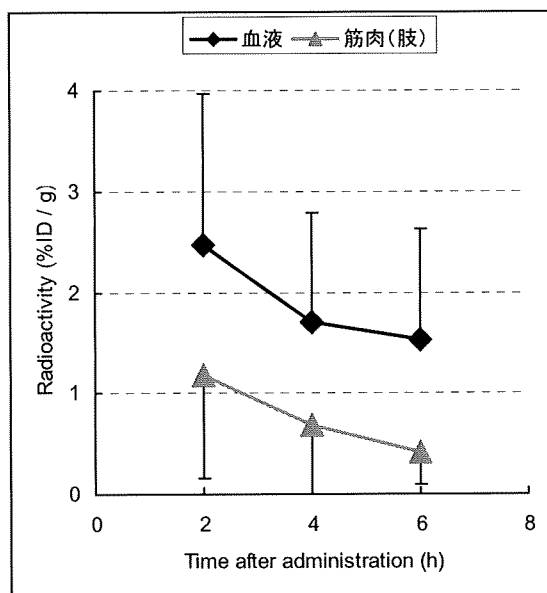


[¹²³/¹²⁵I]FIAUの合成

[¹²³I]FIAUを放射化学的収率:36.5%、放射化学的純度:94%以上、[¹²⁵I]FIAUを放射化学的収率:93.6%、放射化学的純度:99%以上で得た。

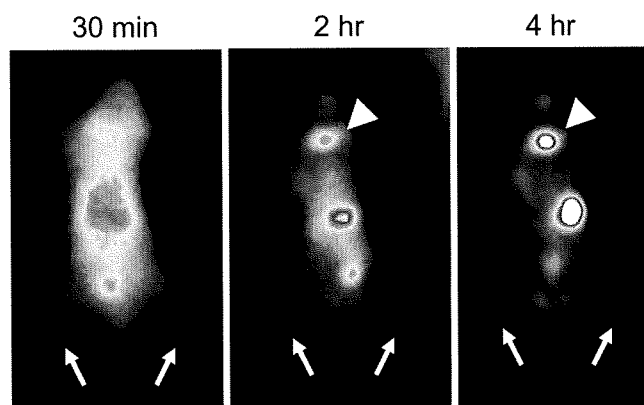
体内分布

血液および肢筋肉の放射能の経時変化を次ページ図に示す。検討したすべてのタイムポイントにおいて、正常肢へ集積した放射能は血中放射能よりも低く、[¹²⁵I]FIAUは正常肢への集積性を示さなかった。また血中放射能は投与2時間後で2.5%ID/g、6時間後で1.5%ID/gであった。



プラナー画像撮像

経時的に撮像したプラナー画像を下図に示す。体内分布実験の結果と同様、矢印で示した正常肢への放射能集積は低かった。また、矢じりで示した甲状腺への放射能集積が時間とともに増大する結果となった。



D. 考察

G2A、FPRを含むGPCRにはシグナリング機能に共役して細胞内へ内在化する一般的な性質がある。この性質は放射性イメージングの用途には必ずしも適さない場合がある。本分担研究において構築したようなin vitroバイオアッセイ系によるアゴニスト活性の評価法がある場合には、受容体結合試験によるアフィニティー評価との併用によりアンタゴニストとしての活性評価も可能となり状況に応じた評価基準の設定が可能となる。

$[^{125}\text{I}]\text{FIAU}$ の体内分布実験の結果、投与2時間後の血中放射能が2.5%ID/gであり、4時間経過しても1.5%ID/gであったことから、血中からの消失半減期は4時間以上と推測され、血液クリアランスが遅いことが明らかとなった。また、経時的なプラナー撮像

の結果、甲状腺への放射能集積が次第に増加したことから、 $[^{125}\text{I}]\text{FIAU}$ が体内で代謝され、脱ヨウ素していることが示された。一方、研究代表者および他分担研究者によって本年度開発されたプローブでは、代謝・分解後に放射能が集積する甲状腺(首)、胃、骨といった臓器に集積した放射能は低く、既存プローブである $[^{125}\text{I}]\text{FIAU}$ よりも生体内で安定であることが明らかとなった。次年度以降、病態モデルを用いて病変部への集積量を $[^{125}\text{I}]\text{FIAU}$ と比較することで、本プロジェクトで開発されるプローブの有効性を明らかにする。

E. 結論

本年度の検討により、G2AおよびFRP結合性化合物のインビトロスクリーニング系の確立に成功した。また、比較対照用の既存プローブとして $[^{125}\text{I}]\text{FIAU}$ の合成・体内分布評価を行い、血液クリアランス・代謝安定性に問題があることを見出した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Ueda M, Kudo T, Kuge Y, Mukai T, Tanaka S, Konishi H, Miyano A, Ono M, Kizaka-Kondoh S, Hiraoka M, Saji H. Rapid detection of hypoxia-inducible factor-1-active tumours: pretargeted imaging with a protein degrading in a mechanism similar to hypoxia-inducible factor-1alpha. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* (in press).
- Ueda M, Iida Y, Tominaga A, Yoneyama T, Ogawa M, Magata Y, Nishimura H, Kuge Y, Saji H. Nicotinic acetylcholine receptors expressed in the ventralposterolateral thalamic nucleus play an important role in anti-allodynic effects. *Br J Pharmacol.* 2010 Mar;159(6):1201-10.
- Kudo T, Ueda M, Kuge Y, Mukai T, Tanaka S, Masutani M, Kiyono Y, Kizaka-Kondoh S, Hiraoka M, Saji H. Imaging of HIF-1-active tumor hypoxia using a protein effectively delivered to and specifically stabilized in HIF-1-active tumor cells. *J Nucl Med.* 2009 Jun;50(6):942-9.

2. 学会発表

- Ueda M, Kudo T, Kizaka-Kondoh S, Miyano A, Ono M, Mukai T, Kuge Y, Hiraoka M, Saji H. Characterization of a cell-penetrating, oxygen-dependent degradable streptavidin as a hypoxia-inducible factor-1-active tumor imaging agent. 2009 World Molecular Imaging Congress. September 23-26, 2009, Montreal, Canada.
- 上田真史、工藤喬、宮野梓、小川京、小野正博、近藤科江、向高弘、久下裕司、平岡眞寛、佐治英郎. 酸素依存的分解タンパク質のプレターゲットイングによる腫瘍内HIF-1存在領域イメージングの妥当性評価. 日本薬学会第130年会. 2010年3月28-30日 (岡山コンベンションセンター他、岡山)
- 上田真史、工藤喬、近藤科江、宮野梓、小川京、小野正博、向高弘、久下裕司、平岡眞寛、佐治英郎. ストレプトアビジン融合酸素依存的分解タンパク質のHIF-1存在領域イメージング剤としての評価. 第49回日本核医学会学術総会. 2009年10月1-3日 (旭川市民文化会館・旭川グランドホテル、旭川)
- 宮野梓、上田真史、工藤喬、小野正博、近藤科江、平岡眞寛、佐治英郎. 腫瘍内HIF-1存在領域のイメージング剤の開発：チミンキナーゼ融合酸素依存的分解プローブに関する検討. 第49回日本核医学会学術総会. 2009年10月1-3日 (旭川市民文化会館・旭川グランドホテル、旭川)

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

モデル動物の作製に関する研究

研究分担者 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：神戸大学は、研究分担者として動脈硬化病変の分子イメージングプローブ開発における疾患モデル動物（WHHLMI ウサギ）の生産およびその動脈病変の解析を担当した。WHHLMI ウサギは、低比重リポ蛋白（LDL）を細胞内に取り込む LDL 受容体が遺伝的にほとんど機能していないことに由来して高コレステロール血症を発症し、高コレステロール血症が原因となって大動脈や冠動脈などに動脈硬化が発生する。本年度の研究では、WHHLMI ウサギを用いて選抜交配を実施し、研究代表者が開発する分子イメージングプローブの有用性を検討するためのウサギ疾患モデルを生産するとともに、動脈硬化病変の特性を解析した。その結果、WHHLMI ウサギを 244 匹生産し、WHHLMI ウサギの動脈硬化病変がヒトの動脈硬化病変に類似していることを明らかにした。今年度の研究成果より、京都大学（研究代表者）が開発した動脈硬化病変の分子イメージングプローブの有用性について、来年度に WHHLMI ウサギを用いて解析することが可能となった。

A. 研究目的

本研究プロジェクトでは、不安定動脈硬化病変を高感度で検出・評価できる分子イメージングプローブの開発を目的にしている。神戸大学では、研究代表者が開発した分子イメージングプローブを *in vivo* で評価するための疾患モデル動物の生産とその動脈硬化病変の病理組織学的ならびに免疫組織学的特性の解析を実施した。現在までの研究により、血中でコレステロールを運搬している低比重リポ蛋白（LDL）を細胞内に取り込む LDL 受容体が遺伝的にほとんど機能していないことに由来して高コレステロール血症を発症し、この高コレステロール血症が原因となって大動脈や冠動脈などに動脈硬化を自然発症する WHHLMI ウサギを開発維持してきた。WHHLMI ウサギにおいて不安定な動脈硬化病変は成熟齢以降に形成されるため、平成 21 年度に開発した分子イメージングプローブの評価を平成 22 年度に実施するために、今年度は、1) WHHLMI ウサギを増産するとともに、2) 動脈硬化病変の特性について病理組織学および免疫組織学的に解析した。

B. 研究方法

1. WHHLMI ウサギの増産

冠動脈に不安定な動脈硬化病変が発生した WHHLMI ウサギの次世代で、12 月齢における血清総コレステロール値が 700 mg/dl 以上の WHHLMI ウサギを用いて自然交配によって WHHLMI ウサギの生産を実施した。

2. 動脈硬化病変の特性の解析

6 月齢～24 月齢の WHHLMI ウサギを用いて冠動脈の動脈硬化病変を病理組織学的、免疫組織学的に解析した。死亡した WHHLMI ウサギおよび安楽死（ペントバルタールの静脈内投与で深麻酔下に放血）した WHHLMI ウサギから組織を切り出し、中性緩衝ホルマリン固定後、パラフィン包埋し、500 μ m 間隔で 4 μ m 厚の切片を連続 20 枚薄切した。薄切切片は病理組織染色（ヘマトキシリンエオジン染色、エラスチックワンギーソン染色、アザンマロリー染色、ピクロシリウスレッド染色）および免疫組織染色（ウサギマクロファージを認識する RAM-11 抗体、平滑筋細胞の α アクチンを認識する 1A4 抗体）を実施した。

（倫理面への配慮）

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. WHHLMI ウサギの増産

93 ペアの交配を実施し、76 匹が出産（妊娠率 81.7%）し、産仔数 440 匹（平均同腹産仔数 5.8）、離乳仔 244 匹（平均 3.2 匹）を得た（離乳率 53.5%）。

2. 動脈硬化病変の特性の解析

冠動脈には、ヒトの動脈硬化病変に類似して、マクロファージに富む初期病変、平滑筋細胞の増殖に基づく肥厚病変、平滑筋細胞とコラーゲン線維に富む線維性病変、マクロファージや細胞外脂質の蓄積部位（リピッドコア）を被う線維性皮膜が認められる病変（不安定病変）、さらに病変中にカルシウムの蓄積・粥腫内血管形成・粥腫内出血などが認められる複雑病変が認められた。一部の冠動脈病変ではリピッドコアを被う線維性皮膜が部分的に菲薄化し、血液成分の流入も認められた。しかし、動脈硬化病変の破裂は認められなかった。不安定病変は12月齢以上のWHHLMIウサギで観察され、加齢に従って細胞成分が減少した。

D. 考察

WHHLMIウサギの繁殖能力は正常ウサギに比較して著しく低下していた。WHHLMIウサギの低い繁殖能力は、心筋梗塞を発症しない改良以前のWHHLウサギと同程度であった。また、神戸大学では一定の形質を維持するため選抜したウサギを用いて自然交配で継代しているが、人工授精を行った場合より繁殖成績が良好であることから、今後とも自然交配法で系統維持を継続する。今年度生産した244匹の一部を用いて、来年度の本研究課題「糖尿病関連血管病（動脈硬化・足病変）の早期診断・治療のための高感度分子イメージングプローブの開発（H32・ナノ・一般・003）」において、京都大学（研究代表者）が開発したプローブの有用性を検討することが可能になると期待できる。

冠動脈病変については、病理組織学的ならびに免疫組織学的染色によって、ヒトの冠動脈病変と同じく、脂質に富む病変から線維性の病変まで様々なタイプの病変が認められた。このことは、WHHLMIウサギがヒトの動脈硬化のモデル動物として適していることを強く示唆している。とくに、ヒトの急性冠症候群の原因になると考えられているマクロファージや細胞外脂質の蓄積部位（リピッドコア）を被う線維性皮膜が認められる病変（不安定病変）や病変中にカルシウムの蓄積・粥腫内血管形成・粥腫内出血などが認められる複雑病変が認められたことは、急性冠症候群の発症機序の解明、診断法や予防法の開発、さらに、治療方法の開発に貢献できると期待できる。

E. 結論

WHHLMIウサギは正常ウサギに比較して繁殖能力が低い、選抜交配により一定の形質を維持したWHHLMIウサギを年間244匹生産することができ、来年度の本研究課題「糖尿病関連血管病（動脈

硬化・足病変）の早期診断・治療のための高感度分子イメージングプローブの開発（H32・ナノ・一般・003）」を遂行するために京都大学（研究代表者）にWHHLMIウサギを供給することができる。また、動脈病変の解析結果から、京都大学（研究代表者）が開発した高感度分子イメージングプローブの有効性の解析に、WHHLMIウサギが有用であることが強く示唆された。

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, Kushiya 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 (予定を含む)
1. 特許取得
該当なし
 2. 実用新案登録
該当なし
 3. その他
該当なし

分子プローブの製剤開発に関わる情報提供

研究分担者 関 育也 日本メジフィジックス株式会社 アシスタントマネジャー

研究要旨：日本メジフィジックス社は、研究分担者として糖尿病足病変に関連する分子である走化性ペプチド FMLP に関する情報、不安定プラークにおいて病態の中心的分子とされる酸化 LDL に関する情報、製剤開発における一般的な技術情報の提供を行った。

FMLP に関する情報調査により、FMLP の標的細胞の一つである好中球は、糖尿病では非糖尿病と比べて炎症部位への浸潤数が多いとする報告を見出し、糖尿病足病変を画像化する目的に、FMLP を利用した分子プローブが有効であることが考えられた。さらにこの FMLP を利用した分子プローブは、先行技術として Tc-99m などの SPECT 核種を用いた炎症のイメージングへの検討がなされているものの、糖尿病足病変に対する PET 用分子プローブとして開発した前例が無く、新規性がある技術であると考えられた。また不安定プラークに対する酸化 LDL に関する情報調査では、酸化 LDL を検出するためのペプチドが、先行技術として報告されているものの、不安定プラークを画像化するための分子プローブとして開発されていないため、本研究で見出されたペプチドを用いた分子プローブは新規の技術であると考えられた。

A. 研究目的

わが国の糖尿病患者数は、年々増加傾向にあるとされている。またその合併症は、患者のQOL低下や生命予後を悪化させ、特に動脈硬化による心筋梗塞や心不全は突然死に至らしめ、また糖尿病足病変は足切断に至る例も少なくない。糖尿病足病変では合併症の神経障害のため、足に感染が起きても痛みが無く、また血液中の高濃度の糖は、細菌の栄養となるため、治りづらくなり、重症化して潰瘍・壊疽、そして足切断に至る。現在の診療において、感染が深部まで達しているか（骨髄炎）否かが足切断の是非を決めるため、この判断に画像診断が必要である。一方プラークの不安定性評価には、不安定性に大きく影響を与えているとされる炎症反応（マクロファージの浸潤）を画像化することが求められている。

この研究では、こうした要求を満たす分子イメージング剤の開発を進めるために必要な、関連する文献調査および開発に必要な技術情報の提供を行った。具体的には、糖尿病足病変では感染症に関連する分子である走化性ペプチドFMLPに関する情報、不安定プラークでは病態の中心的分子とされる酸化LDLに関する情報、製剤開発における一般的な技術情報の提供を行った。

B. 研究方法

走化性ペプチドFMLPに関する情報は、京都大学における化合物デザインや、薬効評価検討の参考と

なる情報を見出すため、糖尿病足病変におけるFMLPの関与を示す文献調査を、MEDLINEおよびPubMedを利用して実施した。また、動物実験を行うにあたり、感染症動物モデルの作製手技、および動物PETによるイメージング撮像条件に関する技術情報の提供を行った。さらに特許申請を行うにあたり、先行技術の調査を行い、その情報提供を行った。

酸化LDLに関する情報においても同じように、京都大学における化合物デザインや、薬効評価検討の参考となる情報を見出すため、MEDLINEおよびPubMedを利用したオンライン調査を実施した。さらに特許申請を行うにあたり、先行技術の調査を行い、その情報提供を行った。

C. 研究結果

走化性ペプチドFMLPに関する情報は、下記文献を抽出し情報の提供を行った。

1. 白血球浸潤による糖尿病足病変の核医学診断

1-1. Newman LG et al.; Leukocyte scanning with ¹¹¹In is superior to magnetic resonance imaging in diagnosis of clinically unsuspected osteomyelitis in diabetic foot ulcers.: *Diabetes Care*. 1992 Nov;15(11):1527-30.

1-2. Simon WH et al.; Clinical imaging with

indium 111 oxine-labeled leukocyte scan: review and case report.: *Clin Podiatr Med Surg*. 1988 Apr;5(2):329-40.

1-3. 酒井直彦ら；慢性骨髓炎の診断における白血球シンチグラフィの臨床的有用性の検討.: 日本形成外科学会誌, 21: 5~13, 2000.

1-4. Filippi L et al.; Diabetic foot infection: usefulness of SPECT/CT for ^{99m}Tc-HMPAO-labeled leukocyte imaging.: *J Nucl Med*. 2009 Jul;50(7):1042-6. Epub 2009 Jun 12.

1-5. Sella EJ et al.; Imaging modalities of the diabetic foot.: *Clin Podiatr Med Surg*. 2003 Oct;20(4):729-40.

1-6. Palestro CJ et al.; Nuclear medicine and diabetic foot infections.: *Semin Nucl Med*. 2009 Jan;39(1):52-65.

1-7. Strobel K et al.; PET/CT in musculoskeletal infection.: *Semin Musculoskelet Radiol*. 2007 Dec;11(4):353-64.

2. 血中ブドウ糖は好中球活性酸素生成を抑制する

2-1. Ortmeyer J et al.; Glucose suppresses superoxide generation in normal neutrophils.: *Am J Physiol*. 1993 Feb;264(2 Pt 1):C402-10.

2-2. Fóris G et al.; Altered postreceptor signal transduction of formyl-Met-Leu-Phe receptors in polymorphonuclear leukocytes of patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus.: *Clin Immunol Immunopathol*. 1998 Jan;86(1):95-101.

3. 糖尿病炎症モデルマウスにおいて、好中球浸潤は野生種よりも多いが、抗菌能力が低い

3-1. Park S et al.; Defects in innate immunity predispose C57BL/6J-Leprdb/Leprdb mice to infection by *Staphylococcus aureus*.: *Infect Immun*. 2009 Mar;77(3):1008-14. Epub 2008 Dec 22.

4. 糖尿病足病変患者好中球の活性酸素産生は、血中亜鉛濃度に相関（炎症悪化の理由）

4-1. Larijani B et al.; Polymorphonuclear leukocyte respiratory burst activity correlates with serum zinc level in type 2 diabetic patients with foot ulcers.: *Br J Biomed Sci*. 2007;64(1):13-7.

5. 健常人ボランティア血液におけるFMLP受容体発現レベルの確認(恒常的な発現)

5-1. Allen CA I.; Flow cytometry analysis of the expression of neutrophil FMLP receptors.: *J Immunol Methods*. 1992 May 18;149(2):159-64.

また、特許申請に関する先行技術情報として下記を抽出し情報提供した。

【特許文献】

- 【特許文献 1】 特許第2931097号明細書
- 【特許文献 2】 米国特許第4,986,979号明細書
- 【特許文献 3】 米国特許第5,792,444号明細書
- 【特許文献 4】 国際公開第2004/029080号パンフレット

【非特許文献】

- 【非特許文献 1】 Day, AR. Et al. , FEBS Lett. 77,291-294 (1977)
- 【非特許文献 2】 Jiang, MS. Et al. , Nuklearmedizin, 21,110-113 (1982)
- 【非特許文献 3】 Verbeke, K. et al. , Nuclear Medicine & Biology , 27,769-779 (2000)
- 【非特許文献 4】 Baidoo, K. E. et al. , Bioconjugate Chemistry , 9,208-217 (1998)

また動物実験に必要な感染症モデルの作製に関し、Splague-Dowley (SD)ラットを用いた感染症モデルの作製法として、黄色ブドウ球菌である *Staphylococcus aureus* を大腿部筋肉内に注入することによって作製する手技の情報提供を行った。さらに、京都大学においても同型機を所有するため、日本メジフィジックス社が所有するGE社製動物PET機であるVista eXploreによるイメージングを検討し、京都大学において実施するために必要な撮像条件等の情報提供を行った。

さらに不安定プラークに関する情報では、下記文献を抽出し情報の提供を行った。

1. 酸化LDL結合性を示すたんぱく質

1-1. Kumagai T et al.; [Effects of low density lipoprotein and oxidized low density lipoprotein on the cytotoxic activity of Asp-hemolysin to murine macrophages] *Yakugaku Zasshi*. 2001 Apr;121(4):277-81.

また、特許申請に関する先行技術情報として下記を抽出し情報提供した。

【特許文献】

- 【特許文献 1】 特開2002-53598号公報

なし

D. 考察

走化性ペプチドFMLPに関する文献調査を行った結果、FMLPの標的分子であるFPRを多数発現する好中球の炎症部位への浸潤能は、糖尿病でも非糖尿病と同等かそれ以上であるものの、活性酸素放出能は低下しており、抗菌能力が低下していることが、動物レベルながら報告されていた。このことは糖尿病足病変が難治性でかつ重症化しやすい理由を示していると共に、糖尿病においても、FMLPを利用した分子プローブにて炎症を画像化することが可能であることが推察される。つまりFMLPを利用した分子プローブが多く炎症部位に集積するためには、その分子プローブが結合する好中球等の白血球が炎症部位に多く存在しなければいけないが、糖尿病のマウスモデルで野生種よりも多く好中球が浸潤していることが報告されていることは、FMLPを利用した分子プローブが糖尿病足病変の診断に有効であることが考えられる。またFMLPを利用した分子プローブの開発は、先行技術としてTc-99mなどのSPECT核種を用いた技術が報告されているものの、これまでF-18などのPET核種を用いた糖尿病足病変に対する分子プローブの技術は見出せなかったため、本研究の分子プローブは新規な技術であると考えられた。

不安定プラークに対する分子プローブの開発においては、本研究の成果を元にした特許の出願に必要な先行技術情報を調査した結果、酸化LDLを検出するためのペプチドの情報を見出した（特開2002-53598号公報）。しかしながらこの技術は不安定プラークを画像化するための分子プローブとして開発されていないため、本研究で見出されたペプチドを用いた分子プローブは新規の技術であると考えられた。

E. 結論

糖尿病足病変に対する分子プローブとして、走化性ペプチドFMLPは適切な対象分子であると判断された。また先行技術においても、糖尿病足病変のイメージングを念頭に置いた検討は無く新規な技術と考えられた。また不安定プラークに対する分子プローブとして、酸化LDLに結合性を示す分子が適切な対象分子であり、新規な技術と判断された。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

- 佐治英郎、天満 敬、小野正博、関 育也：動脈硬化診断用分子イメージングプローブ、特許出願済み（整理番号1004-J）
- 佐治英郎、木村寛之、小野正博、関 育也：炎症性部位集積性化合物の合成と評価、特許出願予定

2. 実用新案登録

なし

3. その他

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
Shiomi M	Rabbit Biotechnology: Rabbit genomics, transgenesis, cloning and models	Houdebine LM, Fan J	Rabbit as a Model for the Study of Human Diseases	Springer Science + Business Media	New York, USA	2009	49-64

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
Ono M, Watanabe R, Kawashima H, Kawai T, Watanabe H, Haratake M, Saji H, Nakayama M.	¹⁸ F-labeled flavones for in vivo imaging of β -amyloid plaques in Alzheimer's brains.	Bioorganic and Medicinal Chemistry	17	2069-2076	2009
Watanabe H, Ono M, Ikeoka R, Haratake M, Saji H, Nakayama M.	Synthesis and biological evaluation of radioiodinated 2,5-diphenyl-1,3,4-oxadiazoles for detecting β -amyloid plaques in the brain.	Bioorganic and Medicinal Chemistry	17	6402-6406	2009
Ono M, Hayashi S, Kimura H, Kawashima H, Nakayama M, Saji H.	Push-pull benzothiazole derivatives as probes for detecting β -amyloid plaques in Alzheimer's brains.	Bioorganic and Medicinal Chemistry	17	7002-7009	2009
Ono M, Watanabe R, Kawashima H, Cheng Y, Kimura H, Watanabe H, Haratake M, Saji H, Nakayama M.	Fluoro-pegylated chalcones as positron emission tomography probes for in vivo imaging of β -amyloid plaques in Alzheimer's disease.	Journal of Medicinal Chemistry	52	6394-6401	2009
Kuge Y, Obokata N, Kimura H, Katada Y, Temma T, Sugimoto Y, Aita K, Seki K, Tamaki N, Saji H.	Synthesis and evaluation of a radioiodinated lumiracoxib derivative for the imaging of cyclooxygenase-2 expression.	Nucl Med Biol.	36(8)	869-76	2009

Temma T, Iida H, Hayashi T, Teramoto N, Ohta Y, Kudomi N, Watabe H, Saji H, Magata Y.	Quantification of regional myocardial oxygen metabolism in normal pigs using positron emission tomography with injectable $^{15}\text{O-O}_2$.	Eur J Nucl Med Mol Imaging	37(2)	377-85	2010
Aita K, Temma T, Shimizu Y, Kuge Y, Seki K, Saji H.	Synthesis of a new NIR fluorescent Nd complex labeling agent.	J Fluoresc	20(1)	225-34	2010
Aita K, Temma T, Kuge Y, Seki K, Saji H.	NIR fluorescent ytterbium compound for in vivo fluorescence molecular imaging.	Luminescence	25(1)	19-24	2010
天満敬, 佐治英郎.	不安定性動脈硬化プラークイメージングのための分子プローブ開発研究.	PET journal	7	10-1	2009
Temma T, Sano K, Kuge Y, Kamihashi J, Takai N, Ogawa Y, Saji H.	Development of a radiolabeled probe for detecting membrane type-1 matrix metalloproteinase on malignant tumors.	Biol Pharm Bull.	32(7)	1272-7	2009
Mukai E, Toyoda K, Kimura H, Kawashima H, Fujimoto H, Ueda M, Temma T, Hirao K, Nagakawa K, Saji H, Inagaki N.	GLP-1 receptor antagonist as a potential probe for pancreatic beta-cell imaging.	Biochem Biophys Res Commun	389(3)	523-6	2009
Ogawa K, Kawashima H, Kinuya S, Shiba K, Onoguchi M, Kimura H, Hashimoto K, Odani A, Saji H.	Preparation and evaluation of $^{186/188}\text{Re}$ -labeled antibody (A7) for radioimmunotherapy with rhenium(I) tricarbonyl core as a chelate site.	Ann Nucl Med	23	843-8	2009
Ueda M, Kudo T, Kuge Y, Mukai T, Tanaka S, Konishi H, Miyano A, Ono M, Kizaka-Kondoh S, Hiraoka M, Saji H.	Rapid detection of hypoxia-inducible factor-1-active tumours: pretargeted imaging with a protein degrading in a mechanism similar to hypoxia-inducible factor-1alpha.	Eur J Nucl Med Mol Imaging			印刷中

Ueda M, Iida Y, Tominaga A, Yoneyama T, Ogawa M, Magata Y, Nishimura H, Kuge Y, Saji H.	Nicotinic acetylcholine receptors expressed in the ventralposterolateral thalamic nucleus play an important role in anti-allodynic effects.	Br J Pharmacol	159(6)	1201-10	2010
Kudo T, Ueda M, Kuge Y, Mukai T, Tanaka S, Masutani M, Kiyono Y, Kizaka-Kondoh S, Hiraoka M, Saji H.	Imaging of HIF-1-active tumor hypoxia using a protein effectively delivered to and specifically stabilized in HIF-1-active tumor cells.	J Nucl Med	50(6)	942-9	2009
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
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
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			印刷中

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
天満敬.	PETと静脈内投与型O-15標識O ₂ 剤による脳酸素代謝率の測定.	分子脳血管病	9(1)	51-7	2010
Higashi T, Hatano E, Ikai I, Nishii R, Nakamoto Y, Ishizu K, Suga T, Kawashima H, Togashi K, Seo S, Kitamura K, Takada Y, Uemoto S.	FDG PET as a prognostic predictor in the early post-therapeutic evaluation for unresectable hepatocellular carcinom.	Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.	37	468-82	2010
河嶋秀和	post-FDG : 放射性薬剤の未来	核医学分科会誌	58	34-44	2009

Louis-Marie Houdebine
Jianglin Fan
Editors

Rabbit Biotechnology

*Rabbit Genomics, Transgenesis,
Cloning and Models*

神戸大学医学分館



0502009005390

 Springer

Chapter 7

Rabbit as a Model for the Study of Human Diseases

Masashi Shiomi

Abstract Although genetically modified mice are playing an essential role in the study of the expression and functions of individual genes, rabbits are useful animal models to extrapolate animal studies to humans. It is necessary that key gene expression and function are equivalent and close to human rather than the outward features or phenotype. For example, to study human hypercholesterolemia, the only hypercholesterolemia is insufficient, the lipoprotein profiles and enzymes in the lipoprotein metabolism of animal models are important for translational medicine. Lipoprotein metabolism of rabbits resembles humans closely. In addition, histopathological and/or immunohistochemical features of the tissues of disease similar to humans are important. In this field, spontaneous hypercholesterolemic rabbits (WHHL and WHHLMI rabbits) have contributed to the elucidation of lipoprotein metabolism, atherogenesis, and to the development of therapeutic compounds, such as statins. Recently, a number of transgenic rabbits have been developed and they also contribute to the study of cardiac function and infectious diseases. Furthermore, rabbits are useful for studies of orthopedic surgery, cardiovascular surgery, and neoplastic diseases. Rabbit models have contributed not only to the mechanistic studies of human diseases but also to the development of therapeutic compounds, devices, or techniques for therapeutics. Applying these animal models in translational researches promotes the elucidations of human diseases.

Keywords animal models for human diseases, translational research, transgenic rabbits, WHHL/WHHLMI rabbits

7.1 Introduction

After the genomes of human and mouse were fully deciphered, it has been recognized that the analyses of gene expression and functions are important to understand the pathogenesis and the mechanisms of diseases. It is critical for researchers to choose

M. Shiomi (✉)

Institute for Experimental Animals, Kobe University School of Medicine, 7-5-1,
Kusunoki-cho, Chuo-ku, Kobe 650-0017, Japan
e-mail: ieakusm@med.kobe-u.ac.jp

L.-M. Houdebine and J. Fan (eds.), *Rabbit Biotechnology: Rabbit Genomics, Transgenesis, Cloning and Models*,
© Springer Science + Business Media B.V. 2009

49

defect in LDL receptors which is characterized by the deletion of 12 base pairs of nucleotide in the LDL receptor gene (Yamamoto et al. 1986), which explained why there was marked accumulation of LDL in the plasma of WHHL rabbits (Tanzawa et al. 1980; Kita et al. 1981). In addition, WHHL rabbits, had tenfold higher levels of plasma triglycerides than normal rabbits. The CETP activity was high in the plasma (Son and Zilversmit 1986) and expression of apoB-editing enzyme was not detected in liver (Kozarsky et al. 1996). Therefore, lipoprotein metabolism of WHHL rabbits resembles that of human familial hypercholesterolemia patients. Because of these features, WHHL rabbits contributed to studies aiming at elucidating human lipoprotein metabolism, especially the LDL receptor pathway (Goldstein et al. 1983). In addition, WHHL rabbits have been used to screen the lipid-lowering effects of many compounds (Table 7.2). The best example of these studies examined in WHHL rabbits is statin (Watanabe et al. 1981; Tsujita 1986; Watanabe et al. 1988; Shiomi et al. 1995, 2005; Shiomi and Ito 1999a), which is one of the most effective hypocholesterolemic drugs prescribed right now for more than 30 million patients in the world each year.

WHHL rabbits have also contributed to studies of atherosclerosis and examination of anti-atherosclerotic effects of several compounds (Table 7.2). Due to the LDL receptor deficiency and hypercholesterolemia, atherosclerotic lesions developed spontaneously in WHHL rabbits under a normal standard chow. Therefore, WHHL rabbits can be used for the study of atherosclerosis initiation and the characterization of atherosclerotic pathology (Shiomi 2008). Atherosclerotic lesions of the aorta of WHHL rabbits were fatty streak at weaning, became macrophage-rich lesions at young age, established lesion (fibro-atheroma) at mature age, and complicated lesions (accumulation extracellular lipids, thin fibrous cap, calcification, and intra-

Table 7.2 Hypolipidemic and anti-atherosclerotic studies using WHHL or WHHLM1 rabbits

Compounds	Hyperlipidemia	Aortic lesion	Coronary lesion
Statin	○	×, ○	○
Resin	○	○	n.d.
Statin + Resin	○	○	○
Squalene synthase inhibitor	○	○	○
MTP inhibitor	○	n.d.	n.d.
ACAT inhibitor	×, ○	×, ○	×, ○
Probucol	○	○	n.d.
M-CSF or GM-CSF	○	○	n.d.
ApoE	○	○	n.d.
Fibrate	×	n.d.	n.d.
Fish oil	×, ○	×, ○	n.d.
Thiazolidinedione	×	Δ	Δ
Ca ²⁺ antagonist	×	×	×
β-blocker	×	×	×
ACE inhibitor	×	○	n.d.
A-II receptor antagonist	×	○	n.d.
Gene therapy	○	n.d.	n.d.

○, effective; ×, not effective; n.d., not determined

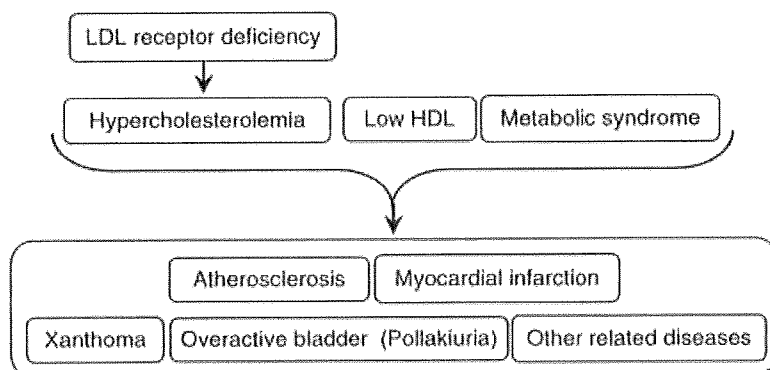
plaque hemorrhage) at old age. These histological features resemble many respects of human atherosclerotic lesions. Using WHHL rabbits, Watanabe et al. demonstrated that plasma cholesterol reduction by pravastatin, an inhibitor of cholesterol synthesis, can delay development of atherosclerosis (Watanabe et al. 1988).

7.3.2 WHHLMi Rabbits

Although atherosclerotic lesions developed in aorta of every WHHL rabbit, the incidence of coronary atherosclerosis was very low and myocardial infarction did not occur. To develop coronary atherosclerosis in WHHL rabbits, Watanabe et al. (Watanabe et al. 1985) started to develop coronary atherosclerosis-prone WHHL rabbits by selective breeding in 1995. Studies using the coronary atherosclerosis-prone WHHL rabbits demonstrated that reduction of plasma cholesterol levels by statins improved composition of coronary plaques from unstable lesions to stable lesions (Shiomi et al. 1995, 2005; Shiomi and Ito 1999a). However, the incidence of myocardial infarction was still very low due to macrophage-poor lesions. In quantitative analyses of atherosclerotic lesions using imaging techniques (Shiomi et al. 1994), the composition of coronary atherosclerosis differed from the aortic ones. Thereafter, Shiomi et al. (Shiomi et al. 2003) started selective breeding from 1993 using indices of macrophage-rich coronary lesions, severe coronary stenosis, higher plasma cholesterol levels, and development of myocardial infarction. Seven years after, the incidence and severity of coronary lesions increased. The cumulated incidence of myocardial infarction in 30 months old animals was increased from 23% of the original WHHL rabbits to 97% in WHHLMi rabbits by the selective breeding (Shiomi et al. 2003). The degree of coronary stenosis (cross-sectional narrowing) at the age of 10–14 months also increased from 38% in the original WHHL rabbits to 82% in the WHHLMi rabbits (Ito et al. 2004). Myocardial infarction of WHHLMi rabbits is classified into four types: subendocardial infarction, intramural infarction, transmural infarction, and subepicardial infarction. In WHHLMi rabbits, fresh myocardial lesions consisted of hyperemia, eosinophilic degeneration of myocardial cells and infiltration of inflammatory cells was observed in the vicinity of old myocardial lesions consisting of myocardial fibrosis, scar, and dissolution of myocardial cells. The electrocardiograms from a WHHLMi rabbit monitored immediately before sudden decease showed an elevation of ST-segment and deep Q-wave which are the typical changes of acute myocardial infarction in humans. The coronary lesions of WHHLMi rabbits show various types, vulnerable plaque (large lipid core covered with thin fibrous cap), macrophage-rich plaque, complicated plaque and fibrous plaque, all similar to human coronary plaques. However, rupture of coronary plaque and/or formation of thrombosis were not observed. The next theme is the development of acute coronary syndrome in WHHLMi rabbits, with the coronary plaque rupture and the generation of thrombosis.

Figure 7.1 summarizes the characteristics of WHHLMi rabbits and their implementation in translational researches. LDL accumulates in the plasma due to LDL receptor deficiency, the low HDL-cholesterol and the metabolic syndrome-like

Characteristics of WHHLM1 rabbits



Application for studies of diagnosis, therapeutics, and development of drugs for hypercholesterolemia, atherosclerosis, and other related diseases

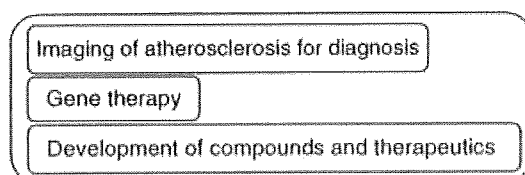


Fig. 7.1 Characteristics of WHHLM1 rabbits and the application

feature (accumulation of visceral fats and hyperinsulinemia) which cause the development of atherosclerotic lesions in aorta, coronary arteries, pulmonary arteries, carotid arteries, cerebral arteries and other arteries. Myocardial infarction occurs due to coronary occlusion by atherosclerotic lesions. In addition, xanthoma, overactive bladder and other diseases appeared related to hypercholesterolemia and atherosclerosis.

Ideally, it is essential that animal models should contribute not only to the mechanistic study of human diseases but also to the development of new drugs, devices, or techniques for therapeutics. As mentioned above, several hypocholesterolemic drugs have been developed and the anti-atherosclerotic effects of some of them could be proved. Statin is an inhibitor of HMG-CoA reductase, a rate-limiting enzyme in the cholesterol biosynthesis pathway. Lipid-lowering effect of statin was initially detected in WHHL rabbits and it is the most potent drugs to prevent acute coronary syndromes (Naghavi et al. 2003). Studies using WHHL rabbits contributed to understand how the reduction of the serum cholesterol levels stabilized atherosclerotic lesions (Shiomi et al. 1995). Recently, WHHLM1 rabbits have been

used in studies based on imaging of atherosclerotic lesions by MRI (Meding et al. 2007; Steen et al. 2007), PET (Ogawa et al. 2006; Ishino et al. 2007) and intravascular ultrasound (IVUS) (Iwata et al. 2007). These techniques are promising for the identification of patients with coronary atherosclerosis to prevent acute coronary syndromes. In addition, WHHL (Kobe colony) and WHHLMI rabbits also showed metabolic syndrome-like metabolic disorders, including the accumulation of visceral fats (Shiomi et al. 1999b), insulin resistance (Zhang et al. 1991; Shiomi et al. 1999b) and mildly hyperglycemia. Some WHHLMI rabbits also showed overactive bladder and keratopathy (Garibaldi and Goad 1988).

7.3.3 Other Rabbit Models for Human Lipid Disorders

In 1987, La Ville et al. (La Ville et al. 1987) developed a rabbit strain characterized by hypercholesterolemia (394 ± 100 mg/dl) with moderately increased or normal triglyceride levels. This rabbit strain showed elevated endogenous lipoproteins (very low-density lipoprotein (VLDL), intermediate density lipoprotein (IDL), and low-density lipoprotein (LDL)) cholesterol and LDL triglyceride levels due to over-secretion of VLDL from the liver. The LDL receptors functioned normally. Atherosclerosis developed in the aorta of these animals. These rabbits resemble human familial combined hyperlipidemia, which is one of the most common discrete hyperlipidemic disorders. Later on, this rabbit strain was bred into a new colony, the St. Thomas' mixed hyperlipidemic (SMHL) rabbit (Ardern et al. 1999). In SMHL rabbits, the serum cholesterol levels were 264 ± 68 mg/dl, and the triglyceride levels were 290 ± 55 mg/dl in feeding of very low cholesterol containing diet (0.08% cholesterol enriched diet) (De Roos et al. 2005). SMHL rabbits also showed insulin resistance (De Roos et al. 2001).

Ito and coworkers developed postprandial hypertriglyceridemic (PHT) rabbits (Kawai et al. 2006), which showed postprandial hypertriglyceridemia and metabolic syndrome-like feature. In PHT rabbits, the preprandial plasma triglyceride levels (4.55 ± 1.32 mmol/l) were about tenfold higher than in normal JW rabbits. After 15 h of continuously available feed of normal standard chow, the plasma triglyceride levels were markedly increased (15.9 ± 2.7 mmol/l) compared with the normal Japanese white rabbits (0.71 ± 0.01 mmol/l). In PHT rabbits, accumulation of visceral fat was prominent and insulin resistance was observed. These rabbits may also be important for the study of hyperlipidemia and metabolic syndrome.

7.4 Rabbit Models for Other Human Diseases

Rabbits also contributed to studies of cardiac function, infectious diseases, orthopedic surgery, cardiovascular surgery, and neoplastic diseases.

7.4.1 Transgenic Rabbit Models for Prolonged QT and Sudden Cardiac Death in Human

Recently, Brunner et al. (Brunner et al. 2008) reported that the expression of pore mutants of the human genes *KCNQ1* and *KCNH2* in rabbit hearts led to the generation of transgenic rabbits (LQT1 and LQT2) with a long QT phenotype. *KCNQ1* and *KCNH2* are genes encoding repolarizing K⁺ channels. The human long-QT syndrome is characterized by delayed ventricular repolarization, prolonged QT-interval, ventricular arrhythmia and sudden cardiac death. Current murine transgenic animal models of long-QT syndrome are limited by substantial differences in cardiac electrophysiology. LQT2 rabbits showed a high incidence of spontaneous sudden cardiac death (>50% at 1 year) due to polymorphic ventricular tachycardia. Optical mapping revealed increased spatial dispersion of repolarization underlying arrhythmia. These transgenic rabbits have been used as a model to detect the channel-blocking properties of some anesthetic agents (Odening et al. 2008). The transgenic LQT1 and LQT2 rabbits are thus suitable animal models for studying the human prolonged QT syndrome.

7.4.2 Rabbit Models for Thrombogenesis

An important event after plaque rupture is thrombogenesis. Development of thrombus under physiological conditions is rare in animal models. Recently, Yamashita et al (Yamashita et al. 2004) reported that a blood flow reduction after thrombus propagation related to arterial thrombogenicity in rabbit model after single and repeated balloon injuries. In their study, after balloon injury of the normal femoral artery of normal rabbits, the blood flow was reduced. As a result, increased vascular wall thrombogenicity together with a substantial blood flow reduction are crucial for occlusive thrombus formation and the von Willebrand factor plays an important role in thrombus propagation. Finally, they speculated that reduced blood flow at plaque disruption sites might contribute to thrombus propagation leading to acute coronary syndromes. In coronary thrombi obtained by an aspiration device from patients with acute myocardial infarction, Hoshiba et al. (2006) observed co-localization of the von Willebrand factor with platelet thrombi, the tissue factor, platelets with fibrin and the consistent presence of inflammatory cells (CD16-positive neutrophils, CD45-positive mononuclear cells and CD34-positive blood progenitor cells). These studies suggest that, to propagate an arterial thrombus after a plaque rupture, a reduction of blood flow is important as well as the growing of the thrombus with inflammatory cells and erythrocytes. Therefore, rabbits are useful models for studies of thrombogenesis. Development of transgenic rabbits for factors of thrombogenesis may also play an important role.