

201008005A

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22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 塩見 雅志

平成23(2011)年 5月

(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22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 塩見 雅志

平成23(2011)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. 急性冠症候群の疾患モデルウサギの開発及びバイオリソースの樹立	
塩見 雅志	----- 8
2. MMP遺伝子組換えウサギの遺伝子発現および病態解析	
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	----- 23

(別紙 3)

平成22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、本年度は 3 年目に当たる。平成 21 年度までの研究成果をさらに発展させ、平成 22 年度の実験計画に基づき、以下のとおり研究を実施した。佐賀大学では、以下の成果を得た。(1)山梨大学が開発した **MMP-1** および **MMP-9** の遺伝子コンストラクを用いて、**MMP-1** を過剰発現するトランスジェニック (**Tg**) ウサギおよび **MMP-9-Tg**-ウサギを開発、(2) 開発した **Tg** ウサギの精子を凍結保存、(3) **MMP-9-Tg-WHHLMI** ウサギヘテロ接合体の開発、(4) 平成 21 年度に開発した **MMP-12-Tg-WHHLMI** ウサギ (ホモ接合体) の増産。山梨大学では、佐賀大学で生産した **MMP-9-Tg-WHHLMI** ヘテロウサギの遺伝子発現を確認し、**MMP-12-Tg-WHHLMI** ウサギの大動脈病変の解析を実施した。神戸大学では、以下の成果を得た。(1) ノルエピネフリンとエルゴノビンの併用投与、ドブタミンとエルゴノビンの併用投与、シメチジンとヒスタミンの併用投与により冠動脈スパズムを誘発、(2) 冠動脈スパズムが 10 分以上継続したウサギで心機能が低下、(3) 冠動脈スパズムで心機能が低下した **WHHLMI** ウサギの冠動脈病変の病理組織解析では、1 匹で冠動脈病変の破裂、14 匹 (48%) で冠動脈病変の内皮細胞剥離部位からのマクロファージの流出、(4) 佐賀大学で開発した **MMP-12-Tg-WHHLMI** ウサギへの冠動脈スパズムの誘発。以上の研究によって、冠動脈に病変がある病態では、冠動脈スパズムは冠攣縮性狭心症 (ACS の一つである不安定狭心症の一つ) 一因となることが示唆され、冠動脈に動脈硬化が発生する **WHHLMI** ウサギ及び **MMP-12-Tg-WHHLMI** ウサギは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。

研究分担者

範 江林・山梨大学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

本研究では、急性冠症候群 (ACS、急性心筋梗塞、不安定狭心症、心突然死の総称) のモデル動物の開発が目的である。平成 20 年度から **WHHLMI** ウサギに冠動脈スパズムを誘発し、ACS の発症を試みた。平成 22 年度は、心電図解析に加えて冠動脈造影により、**WHHLMI** ウサギでの冠動脈スパズ

A. 研究目的

ム発生の確認、冠動脈スパズムが発生したウサギにおける心機能の低下に関するデータを補強するとともに、冠動脈病変に対する影響を検討する。また、**matrix metalloproteinase (MMP)-12** 遺伝子組換え (Tg) WHHLMi ウサギ (ホモ接合体) の増産、MMP-1-Tg ウサギ、MMP-9-Tg ウサギ、MMP-9-Tg-WHHLMi ウサギヘテロ接合体の開発およびこれらウサギの系統維持を実施した。

B. 研究方法

1. 遺伝子組換えWHHLMiウサギの開発 (山梨大学、佐賀大学)

1) MMP-12 Tg WHHLMi ウサギの生産

平成 21 年度に開発した MMP-12-Tg-WHHLMi ウサギヘテロ接合体もしくはホモ接合体のメスと WHHLMi ウサギ (ホモ接合体) のオスを自然交配し、MMP-12-Tg-WHHLMi ウサギ (ホモ接合体) を生産した。

2) MMP-1 および MMP-9 Tg ウサギの開発

H21 年度に得られた MMP-1-Tg、MMP-9-Tg ウサギについて、導入遺伝子の発現解析のために必要な Tg ウサギの繁殖を行った。繁殖は人工授精および自然交配で行った。人工授精では、メス 1 匹当たり 10~20x10⁶ 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。

3) ウサギ精子の凍結保存

人工膈を用いてオスウサギから精液を採取後、精子数、運動率等を確認し、凍害防止剤 (卵黄アセトアミド溶液) で希釈した。希釈後、精子を-0.2°C/min

の速度で室温から 5°Cまで冷却した。その後、液体窒素蒸気中に 15 分間静置して凍結を行った。凍結精子は液体窒素中に浸漬して保管した。

2. 遺伝子組換えウサギの遺伝子発現および病態解析 (山梨大学)

1) MMP-9-Tg ウサギの遺伝子発現

開発した MMP-9 Tg ウサギならびに対照の non-Tg ウサギより肺胞ならびに腹腔に常在するマクロファージをリン酸緩衝液による洗浄によって採取し、培養した。24 時間培養後、Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)を添加した後、培養上清を採取して、分泌された蛋白の western blotting による定量ならびに Zymography により酵素活性の解析を行った。また、MMP-9 Tg ウサギ開発によって得られた 2 系統のうち、足部の肉芽腫様病変の発生頻度が高い系統を用いて、肉芽腫様病変の生検を行い、病理組織学的解析を行った

2) MMP-12-Tg-WHHLMi ウサギ (ホモ接合体) の大動脈病変に関する病組織学的解析

MMP-12-Tg-WHHLMi ウサギより採取した大動脈を 10%中性緩衝ホルマリンにより固定後、SudanIVにより動脈硬化病変の脂肪成分を染色した。常法に従い、大動脈硬化病変を切り出し、病理組織標本を作製した。

3. WHHLMiウサギおよびMMP-12-Tg-WHHLMiウサギ (ホモ接合体) へのACSの誘発 (神戸大)

1) WHHLMiウサギへのACS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。ノルエピネフリンあるいはドブタミンの耳介周縁静脈からの持続注入下にエルゴノビンをボラス投与した。また、シメチデンとヒスタミンの併用投与による冠動脈スパズムの誘発を試みた。冠動脈スパズムは心電図（標準12誘導）の変化（ST低下、陰性T波）で確認した。冠動脈スパズムで誘発されるACSの評価は、超音波心エコー、心筋虚血の血清マーカー（トロポニンI、Fatty acid binding protein, FABP、ミオグロビン）の測定で実施した。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化の正常化後に実施した。心筋虚血の血清マーカーは、薬剤投与前および冠動脈スパズム等発生約4時間後に採血し、市販のELISAキットを用いて計測した。実験終了後、ウサギを安楽死して心臓を摘出し、冠動脈の病理組織標本を作製した。

2) MMP-12-Tg-WHHLMIウサギ（ホモ接合体）への冠動脈スパズムの誘発

MMP-Tg-WHHLMIウサギが14-15月齢に達した後、WHHLMIウサギと同様に冠動脈スパズムの誘発を実施し、心電図の変化を記録した。また、血清心筋虚血マーカー測定用に採血を実施し、冠動脈病変への影響を調べるために心臓を摘出した。

C. 研究結果

1. 遺伝子組換えWHHLMIウサギの開発（山梨大学、佐賀大学）

1) MMP-12-Tg-WHHLMIウサギ（ホモ接合体）の繁殖
自然交配での妊娠率は、80.6%（交配

数31回）であった。MMP-12-Tg-WHHLMIウサギ18匹（オス10匹、メス8匹）を得た。このうち、オス9匹を実験に使用するため神戸大学へ輸送した。

2) MMP-1-TgおよびMMP-9 Tgウサギの開発

MMP-9については、2匹のファウンダーが得られており（オス1匹、メス1匹）、PCRによる遺伝子解析でF1への導入遺伝子の伝達を確認された。2匹のファウンダーから得られたF1ウサギを遺伝子の発現解析のためにそれぞれ山梨大学へ輸送した。Northan blottingおよびWestern blottingにより、導入遺伝子の発現ならびにMMP-9蛋白の発現を確認した。そこで、MMP-9-TgウサギとWHHLMIウサギとの交配を実施し、MMP-9-Tg-WHHLMIヘテロ接合体のオス2匹、メス3匹を得た。

MMP-1についても2匹のファウンダーを得（メス2匹）、PCRによる遺伝子解析でF1への導入遺伝子の伝達を確認した。現在、遺伝子発現解析に必要な個体数を得るための繁殖を実施している。

3) ウサギ精子の凍結保存

MMP-12-Tg-WHHLMIウサギについては、凍結ストローで92本（融解後の精子運動率で平均30.1%）を保存した。MMP-9-Tgウサギについては、120本（融解後の精子運動率で平均34.6%）を保存した。MMP-1-Tgウサギについては、26本（融解後の精子運動率で平均33.8%）を保存した。

2. 遺伝子組換えウサギの形質発現および病態解析（山梨大学）

1) MMP-9-Tgウサギの遺伝子発現

Western blottingの結果、PMA刺激後の両群の上清においてMMP-9蛋白が検出され、同腹対照のnon-Tgウサギと比べ、Tgウサギで多くのMMP-9蛋白が認められた。同検体を用いてZymographyを行った結果、MMP-9 Tg由来マクロファージでより強いゼラチナーゼ活性が検出された。また、後足指に肉芽腫様病変が高頻度に認められた1系統のMMP-9 Tgウサギでは、マクロファージの集族ならびに線維芽細胞からなる病変であり、MMP-9免疫染色により肉芽腫病変内に著明なMMP-9蛋白陽性像が認められた。

3. WHHLMIウサギおよびMMP-12-Tg-WHHLMIウサギ (ホモ接合体) へのACSの誘発 (神戸大)

1) WHHLMIウサギへのACSの誘発

ノルアドレナリンあるいはドブタミンの耳介周縁静脈への持続注入下でのエルゴノビンの耳介周縁静脈へのボラス投与あるいはシメチジンとヒスタミンの併用投与によって、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期外収縮が観察された。これらの変化はWHHLMIウサギおよびMMP-12-Tg-WHHLMIウサギの両者で観察された。さらに、冠動脈造影では、薬剤投与前に開通していた左冠動脈前下向枝および回旋枝が薬剤投与で血流が遮断し、ニトログリセリンの静注で再開通した。心電図で心筋虚血を示唆する変化が10分以上継続したウサギでは、心エコーで左心室壁の運動度 (Fractional shortening rate) の低下が認められ、心筋虚血のマーカである血清中のFABP、トロポニンI、ミ

オグロビンが、冠動脈スパズム発生4時間後に顕著に上昇した。これらのウサギの冠動脈では、1匹で冠動脈病変の破裂が、14匹 (48%) で動脈硬化病変の内皮細胞の剥離と剥離部位からのマクロファージの流出が観察された。

D. 考察

平成 22 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心室性期外収縮が生じ、左心室壁運動度の低下、血清心筋虚血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心電図及び左心室壁運動度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の頻度は低かった。これらの結果は、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や昇圧剤等を投与することによって冠動脈スパズムを誘発できることを示唆しており、心電図変化が 10 分以上継続したウサギにおいては重度の心筋虚血が生じたことが示唆されたことから、冠攣縮性狭心症が発症したと考えられた。冠攣縮性狭心症は不安定狭心症の一つであり、不安定狭心症は ACS の病態の一つである。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。

冠攣縮性狭心症を発症した WHHLMI ウサギ 14 匹の冠動脈病変では、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、1 匹においては冠動脈病変の破

裂が観察された。しかし、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、動脈病変の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。閉塞性血栓の形成は今後の課題である。

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⁻ウサギを開発し、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（ホモ接合体）を開発した。MMP-12-Tg⁻WHHLMIウサギを用いて冠動脈病変を誘発した結果、WHHLMIウサギと同様の結果が得られた。しかし、1匹のウサギで、ノルエピネフリンとエルゴノビンを併用投与した直後に、心電図においてST上昇およびT波の上昇が認められた。この心電図変化は急性心筋梗塞発症時の変化と同様である。現在、本ウサギの冠動脈病変の解析を継続しているが、本心電図変化は臨床的には急性心筋梗塞の発症と判断でき、急性冠症候群のモデルとなる可能性が期待できる。

これらの結果は、冠動脈に動脈硬化が発生するWHHLMIウサギおよびMMP-Tg⁻WHHLMIウサギは、冠動脈スパズムを誘発することにより、冠攣縮性狭心症および急性心筋梗塞を発症することを示唆しており、ACSの発症に冠動脈スパズムが関与していることを示唆している。さらに、MMP-1-Tg⁻WHHLMIウサギおよびMMP-9-Tg⁻WHHLMIウサギの開発が進行しており、これらの遺伝子組換えWHHLMI

ウサギに冠動脈スパズムを誘発することにより、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。

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心室性期外収縮の誘発によって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ウサギにおいては、スパズム誘発後にACSの一つである急性心筋梗塞を発症したと推察されることから、MMPによる冠動脈病変の不安定化と冠動脈スパズムの誘発がACSの発症に関連していることが示唆された。さらに、MMP-1-Tg⁻WHHLMIウサギやMMP-9-Tg⁻WHHLMIウサギの開発が進行していることにより、冠動脈病変の不安定化および冠動脈スパズムがACS発症に及ぼす影響をさらに詳細に検討できると期待できる。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kuge Y, Takai N, Ogawa Y, Temma T, Zhao Y, Nishigori K, Ishino S, Kamihashi J, Kiyono Y, **Shiomi M**, Saji H: Imaging with radiolabelled anti-membrane

- type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) antibody: potentials for characterizing atherosclerotic plaques. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 37(11):2093-2104 (2010).
- 2) Kobayashi T, Ito T, **Shiomi M**: Role of the WHLMI rabbits in translational Research on Hypercholesterolemia and Cardiovascular diseases. *J Biomed Biotech* 2011: 1-10 (2011).
 - 3) Matsuda S, Yamashita A, Sato Y, **Kitajima S**, Koike T, Sugita C, Moriguchi-Goto S, Hatakeyama K, Takahashi M, Koshimoto C, Matsuura Y, Iwakiri T, Chen Y.E, **Fan J**, Asada Y: Human C-reactive protein enhances thrombus formation after neointimal balloon injury in transgenic rabbits. *J Thromb Haemost* 9: 201-208 (2011).
 - 4) **Kitajima S**, Maeda T, Liu E, Nishijima K, Morimoto M, Watanabe T, **Fan J**: Age is an important factor influence on the number of recovered eggs in superovulated rabbits: Analysis of our past 5 years data of 509 rabbits superovulated by FSH or PMSG. *Scand J Lab Anim Sci*, 2011, in press.
 - 5) **塩見 雅志**, 伊藤 隆: 高コレステロール血症、心血管疾患に関するトランスレーショナルリサーチにおけるWHLMIウサギの有用性。アニテックス 22:5-10 (2010)
 - 6) **範 江林**, 小池 智也, 西島 和俊, **北嶋 修司**: 医学研究における遺伝子改変ウサギの応用とその展望。アニテックス. 22(3): 11-15 (2010).
 - 7) **北嶋 修司**, 西島 和俊: ウサギ精子・胚の凍結保存とバイオリソース。アニテックス. 22(3): 32-37 (2010).
 - 8) 西島 和俊, 山口 慎二, 森本 正敏, 渡辺 照男, **北嶋 修司**: 遺伝子改変ウサギの系統維持のための精子凍結保存の有用性に関する検討: 約5.6年間凍結保存された遺伝子組換えウサギ由来精子を用いた人工授精成績。九州実験動物雑誌. 19: 35-39 (2010).
- ## 2. 学会発表
- 1) Kobayashi T, Ito T, Yamada T, Hirayama N, Hirata K, Ishida T, **Shiomi M**: WHLMI rabbit is an animal model for angina and/or coronary spasms. 78th European Atherosclerosis Society Congress, June 20-23, 2010 (Hamburg, Germany)
 - 2) Kobayashi T, Ishida T, Nitta N, Sonoda A, Ito T, Hirayama N, Yamada S, Kobayashi S, Miyagawa K, Murata K, Hirata K, **Shiomi M**: The WHLMI Rabbit as a Model Animal for Coronary Spastic Angina. "4th Congress of Asian Federation of Laboratory Animal Science (AFLAS), November 9-11, 2010 (Taipei, Taiwan)
 - 3) **Shiomi M**: The Role of WHLMI rabbits in translational researches for Human Hypercholesterolemia and Atherosclerosis "4th Congress of Asian Federation of Laboratory Animal Science (AFLAS), November 9-11, 2010 (Taipei, Taiwan)
 - 4) **範 江林**, 小池 智也, **北嶋 修司**, 浅田 祐士郎, 渡辺 照男. 動脈硬化の

- 発生における C 反応性蛋白の役割：遺伝子改変ウサギ・モデルによる解析。第 99 回日本病理学会総会、2010 年 4 月 27-29 日（東京）
- 5) 小林 努、石田 達郎、平山 信恵、山田 悟士、伊藤 隆、平田 健一、**塩見 雅志**：心電図による WHHLMI ウサギにおける心筋虚血の観察。第 57 回日本実験動物学会総会。2010 年 5 月 12-14 日（京都）
- 6) **北嶋 修司**、西島 和俊、劉 恩岐、小池 智也、森本 正敏、渡辺 照男、**範 江林**：佐賀大学におけるヒト疾患モデルとしての遺伝子改変ウサギの開発と保存状況について。第 57 回日本実験動物学会総会 2010 年 5 月 14-16 日（京都）
- 7) Kobayashi T, Ishida T, Miyagawa K, Hirayama N, Yamada S, Ito T, Hirata K, **Shiomi M**: The WHHLMI Rabbit Is a Suitable Animal Model for Human Unstable Angina. 第 42 回日本動脈硬化学会総会。2010 年 7 月 15-16 日（岐阜）
- 8) Matsuda S, **Kitajima S**, Koike T, **Fan J**, Asada Y: Human C-reactive protein enhances thrombus formation in transgenic rabbits. 第 42 回日本動脈硬化学会総会・学術集会、2010 年 7 月 15-16 日（岐阜市）
- 9) 小林 努、石田 達郎、新田 哲久、園田 明永、伊藤 隆、平山 信恵、山田 悟士、小林 成美、宮川 和也、村田 喜代史、平田 健一、**塩見 雅志**：不安定狭心症のモデル動物としての WHHLMI ウサギの有用性。第 4 回ウサギフォーラム。2010 年 7 月 24 日（秋田）
- 10) 松田 俊太郎、山下 篤、**北嶋 修司**、小池 智也、**範 江林**、浅田 祐士郎：ヒト C 反応性蛋白は心血管疾患における血栓形成に影響を与えるか？ 遺伝子改変ウサギを用いた動脈硬化性血栓形成の検討。第 4 回ウサギフォーラム 2010 年 7 月 24 日（秋田）
- 11) 西島 和俊、山口 慎二、森本 正敏、渡辺 照男、**北嶋 修司**：長期保存された遺伝子改変ウサギ凍結精子の受精能の検討。第 4 回ウサギフォーラム 2010 年 7 月 24 日（秋田）
- 12) 松田 幸久、稲垣 秀晃、柴田 淑子、**北嶋 修司**、西島 和俊：受精卵移植による秋田大型ウサギの SPF 化。第 4 回ウサギフォーラム 2010 年 7 月 24 日（秋田）
- 13) 山口 慎二、前田 達弘、西島 和俊、森本 正敏、**北嶋 修司**：ウサギ凍結精子を用いた人工授精成績の向上に関する検討。第 28 回九州実験動物研究会総会 2010 年 10 月 23 日（福岡）
- 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）
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
該当なし

(別紙3)

平成22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

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：

虚血性心疾患は世界の死因の第一位であり、わが国の死因の第二である。虚血性心疾患の中でも注目されているのが急性冠症候群であるが、その発症機序の解明、発生予防や発生後の治療法の開発については、不明な点が多い。適切なモデル動物が開発されていないことがその原因の一つである。本研究の目的は、急性冠症候群のモデル動物の開発である。平成20年度および21年度に神戸大学で生産した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)および山梨大学で作成した遺伝子コンストラクトを用いて平成21年度に佐賀大学で作出したヒトMMP-12遺伝子組換えWHHLウサギを用いて、冠動脈スパズム誘発実験を実施した。冠動脈スパズムの誘発にはエルゴノビン、ノルエピネフリン、アンギオテンシン、ドブタミン等を使用し、冠動脈スパズムの確認は心電図、心エコー、冠動脈造影、血清心筋虚血マーカー(Fatty Acid Binding Protein (FABP), Troponin-I, Myoglobin)の測定で実施した。実験終了後、ウサギを安楽死して心臓を摘出し、冠動脈について病理組織標本を作製した。その結果、これら薬剤の併用投与によって冠動脈スパズムが発生し、10分以上継続する心電図異常、心エコーによる心機能の低下、血清心筋虚血マーカーの上昇が認められ、不安定狭心症の一つである冠攣縮性狭心症を発症した。冠動脈造影による観察では、スパズムは冠動脈に動脈硬化病変が発生している部位で発生しており、動脈硬化の進行とともに冠動脈スパズムの発生率が上昇した。冠攣縮性狭心症を発症したウサギでは、冠動脈病変の表層で内皮細胞が剥離し、マクロファージが冠動脈内腔に流出した。これらの結果は、冠動脈に動脈硬化が発生するWHHLMIウサギは、急性冠症候群の一つである不安定狭心症のモデルとして有用であることを示唆している。

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年度には、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ウサギに冠動脈スパズムを誘発する条件を設定し、

山梨大学(分担研究者)が作製した冠動脈病変の不安定化を推進すると考えられるヒトMMP(matrix metalloproteinase)-12遺伝子コンストラクトを用いて佐賀大学(分担研究者)でヒトMMP-12を過剰発現するMMP-12-遺伝子組換え(Tg)-WHHLMIウサギを開発した。平成22年度には、平成21年度に設定した条件に基づいて、神戸大学で生産したWHHLMIウサギと山梨大学・佐賀大学で開発したMMP-12-Tg-WHHLMIウサギを用いて、冠動脈にスパズムを誘発し、急性冠症候群の発症を確認する。

B. 研究方法

1. 冠動脈スパズムの誘発

14-36月齢のWHHLMIウサギ30匹および14-15月齢のオスのMMP-12-Tg-WHHLMIウサギ8匹を実験に使用した。冠動脈スパズムの誘発は、麻酔下（ケタミン+ミタゾラム）に耳介周縁静脈からノルエピネフリン、ドブタミン、あるいはアンギオテンシンIIの持続注入下にエルゴノビン、ヒスタミン+シメチジンを投与した。

2. 冠動脈スパズム発生の確認

冠動脈スパズムの確認は、心電図（標準肢誘導+胸部誘導）および冠動脈造影で実施した。心電図は、スパズム誘発薬剤投与前から記録し、ST低下/増高、T波の逆転/増高、R波の減高、Q波の出現、心室性期外収縮の出現を冠動脈スパズムの指標とし、冠動脈造影においては、スパズム誘発薬剤投与前、投与直後、ニトログリセリン投与後に実施し、造影後にウサギを安楽死して冠動脈の病理組織標本を作製し、造影で血流が途絶えた部位と冠動脈病変の発生部位との関係を調べた。

3. 心機能の評価

心機能は、超音波エコー（心エコー）および血清心筋虚血マーカー（Fatty Acid Binding Protein (FABP), Troponin-I, Myoglobin)の濃度をELISA法で測定し、評価した。心エコーでは、スパズム誘発薬剤投与前、投与後に心電図異常が認められた時点、ニトログリセリン投与後に収縮時と弛緩時の左心室内腔の直径を計測し、収縮率（Fractional Shortening Rate, FSR）を算出して心機能（左室壁運動度）を評価した。血中心筋虚血マーカーの測定は、冠動脈スパズム誘発薬剤投与前および冠動脈スパズム発生4時間後に採血し、実施した。心電図異常が10分以上継続し、心機能が低下した場合に冠攣縮性狭心症の発症とした。

4. 動脈硬化病変の特性の解析

冠動脈スパズム誘発実験に使用した

WHHLMIウサギは実験終了後に安楽死して生理食塩水で灌流し、心臓を摘出し、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。心臓は摘出後、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）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、MMP-1抗体、MMP-9抗体、MMP-12抗体）を実施した。実験中に死亡したウサギについても心臓を摘出し、病理組織標本を作製して冠動脈病変の評価を実施した。

（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。遺伝子組換えウサギを用いた実験は、遺伝子組換え実験計画書を神戸大学学長に提出し、神戸大学遺伝子組換え実験安全委員会の審査を受け、「神戸大学遺伝子組換え実験実施規則」、「遺伝子組換え生物等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」等の関連法規等を遵守して実施した。

C. 研究結果

平成22年度は、平成21年度の追加実験を含むため、実験結果は、平成21年度の実験経過と合わせて示す。

1. WHHLMIウサギを用いた実験

1) 冠動脈スパズム発症に関する心電図解析

ノルエピネフリン持続注入下にエルゴノビンを投与する実験（n=21）では、心筋虚

血に由来すると考えられる10分以上継続する心電図変化を示したウサギの頻度は次のとおりであった。T波逆転(12/21)、ST低下(12/21)、心室性期外収縮(10/21)、R波減高(4/21)、Q波出現(1/21)。ドブタミン持続注入下にエルゴノビンを投与する実験(n=18)では、心筋虚血に由来すると考えられる10分以上継続する心電図変化を示したウサギの頻度は次のとおりであった。T波逆転(16/18)、ST低下(8/18)、心室性期外収縮(3/18)、R波減高(1/18)、Q波出現(0/18)。アンギオテンシンII持続注入下にエルゴノビンを投与する実験(n=15)では、心筋虚血に由来すると考えられる10分以上継続する心電図変化を示したウサギの頻度は次のとおりであった。T波逆転(3/15)、ST低下(2/15)、心室性期外収縮(0/15)、R波減高(0/15)、Q波出現(0/15)。ヒスタミン投与(n=9)では、シメチジンとの併用(n=7)によってST低下、T波の逆転が86%(6/7)で観察された。これらの虚血に由来すると考える心電図変化の発生頻度は冠動脈狭窄率の上昇に伴って上昇する傾向が認められたが、高度の狭窄病変を示すウサギであっても冠動脈病変が全周性で中膜が菲薄化している場合には、冠動脈スパズムは発生しなかった。なお、アンギオテンシンIIの持続注入によって実験中に鼻腔から出血して死亡したウサギがあり、病理組織検査の結果、肺の毛細血管からの出血が認められた。したがって、以後の実験ではアンギオテンシンIIの使用を中止した。

2) 冠動脈スパズム発症に関する冠動脈造影による解析

冠動脈造影は、ノルエピネフリン持続注入下にエルゴノビンを投与したウサギで実施した。薬剤投与後に心電図でST低下が認められ、左冠動脈前下行枝と回旋枝でスパズムの発生が確認された。しかし、ニトログリセリンの投与で冠動脈の血流が再開し、心電図も正常化した。

3) 冠縮性不安定狭心症発生に関する心エコー解析

ノルエピネフリン持続注入下にエルゴノビンを投与したウサギでは、左心室の壁運動度を示すFSRはノルエピネフリンの持続注入によって11%低下し、エルゴノビンを追加投与することによって35%低下し、ニトログリセリンの投与で回復した。ドブタミンの持続注入では、FSRが上昇するウサギと低下するウサギがあったが、エルゴノビンの投与でいずれも低下した。

4) 血清心筋虚血マーカーの測定による心筋の虚血性変化に関する解析

血清心筋虚血マーカーは、心筋虚血を示唆する心電図変化を示したノルエピネフリン持続注入下にエルゴノビンを投与したウサギ(n=9)およびドブタミン持続注入下にエルゴノビンを投与したウサギ(n=9)について測定した。いずれのウサギについても冠動脈スパズム誘発薬剤投与前はFABP、Troponin-I、Myoglobinともヒトの正常範囲内であったが、冠動脈スパズム発生4時間後には顕著に上昇し、心筋が虚血変性したことが示唆された。

5) スパズム誘発が冠動脈病変に及ぼす影響に関する病理組織学的解析

冠動脈の灌流固定が実施できた12-36月齢のウサギについて29匹について冠動脈病変の病理組織標本を作成した。冠動脈の最大管腔狭窄率の平均は79%(5-95%)であり、fibromuscular lesion、fibroatheroma、lipid coreと菲薄化した線維性皮膜を特徴とする不安定プラークがそれぞれ、90%、69%、34%のウサギに認められた。また、冠動脈の破裂が1匹(3%)で認められ、内皮細胞の消失/剥離/浮き上がりが15匹(52%)、マクロファージの動脈硬化病変から内腔への噴出/流出が14匹(48%)で認められた。これらの変化は、ノルエピネフリン+エルゴノビンのみならず、他の薬剤による冠動

脈の spasms の誘発においても認められた。しかし、閉塞性血栓は認められなかった。

2. MMP-12-Tg-WHHLMI ウサギを用いた実験

1) 冠動脈 spasm 発症に関する心電図解析

ST 低下 / 上昇、T 波逆転 / 上昇、心室性不整脈などの心筋虚血に関連する変化がノルエピネフリン持続注入下にエルゴノピンを投与したウサギの 88% (7/8) で認められた。15 月齢の 1 匹においては ST および T 波の顕著な上昇が認められ、急性心筋梗塞発症時の心電図変化に類似していた。

2) その他の解析

現在、病理組織標本の作製を行っており、血清心筋虚血マーカーの測定の準備を進めている。とくに、ST および T 波の顕著な上昇を示したウサギについて、冠動脈病変に破綻（冠動脈病変の破裂に伴う閉塞性血栓の形成）の有無の確認が待たれる。

D. 考察

急性冠症候群は、急性心筋梗塞、不安定狭心症、冠疾患に基づく心突然死の総称である。本研究において、WHHLMI ウサギおよびヒト MMP-12 遺伝子を導入した WHHLMI ウサギ (MMP-12-Tg-WHHLMI ウサギ) に冠動脈 spasm を誘発することによって冠攣縮性狭心症が発生した。冠攣縮性狭心症は臨床定義に基づく不安定狭心症の一つであることから、WHHLMI ウサギおよび MMP-12-Tg-WHHLMI ウサギは不安定狭心症のモデル動物として有用であることが示唆された。

1) WHHLMI ウサギを用いた実験

本年度の研究においては、平成 21 年度に引き続き、ノルエピネフリン、ドブタミンあるいはアンジオテンシン持続注入下にエルゴノピンを投与して spasm を誘発する実

験を継続し、データの蓄積（とくに心エコー、血清心筋虚血マーカー、冠動脈の病理組織評価）を実施するとともに、シメチジンとヒスタミンの併用投与を実施した。

ノルエピネフリンあるいはドブタミン持続注入下にエルゴノピンを投与する実験の追加によって、統計処理が可能となり、心筋虚血を示唆する心電図変化、心エコーによる左心室壁運動の低下、心電図変化が認められた 4 時間後の血清心筋虚血マーカーの上昇が統計的に有意となった。さらに、冠動脈造影を実施したことにより、ノルエピネフリン+エルゴノピンの投与による ST 低下、T 波の逆転が認められた場合に、冠動脈の血流が途絶え、ニトログリセリン投与によって再開通することを確認した。冠動脈 spasm 発生時の特徴的な心電図変化は、ST 低下および T 波の逆転であることから、これらの結果は、ノルエピネフリンあるいはドブタミンの持続注入下にエルゴノピンを投与することによって、WHHLMI ウサギでは容易に冠動脈 spasm を誘発することが可能であることを示している。冠動脈病変を有する WHHLMI ウサギでは、冠動脈 spasm の誘発により、ST 低下、T 波の逆転、心室性期外収縮が 10 分以上継続し、血圧が低下し、心エコーにおいて左室壁の運動度が低下し、血清心筋虚血マーカーが上昇したことから、狭心症を併発したことが示唆される。冠攣縮性狭心症は不安定狭心症の一つであり、不安定狭心症は本研究の目的である急性冠症候群の一つである。したがって、冠動脈 spasm を誘発できる WHHLMI ウサギは冠攣縮性狭心症、不安定狭心症のモデル動物として有用であることが示唆された。

アンジオテンシンを持続注入する実験では、エルゴノピンを併用することによって冠動脈 spasm を誘発できたが、血圧の上昇および血管透過性の亢進が原因と思われる肺毛細血管からの血液の漏出が認められた。肺出血は心機能低下に影響を及ぼす可能性があるため、冠攣縮性狭心症の解析に

は適さないと考え、アンジオテンシン II を用いた実験は以後の解析から除外した。

ヒスタミンはシメチジンとの併用によって高頻度で ST 低下、T 波の逆転などの心筋虚血を示唆する心電図変化を示した。これらの心電図変化は長時間持続し、血圧の低下、左心室壁運動の低下を伴ったことから、ヒスタミンも WHHLM I ウサギにおいて冠攣縮性狭心症を誘発すると考えられた。

冠攣縮性狭心症を発症したウサギの冠動脈病変では、内皮細胞の消失/剥離/浮き上がり、マクロファージの動脈硬化病変から内腔への噴出/流出が高頻度に観察された。これらの所見は、以前に調べた WHHLM I ウサギの冠動脈では認められておらず、冠攣縮性不整脈の発症の影響を受けていると考えられた。しかし、閉塞性血栓は認められなかった。その原因は不明であるが、冠動脈の損傷の程度がごく僅かであったこと、粥腫と血液成分が接しなかったことが要因であるかもしれない。新たな研究戦略が必要である。

2) MMP-12-Tg-WHHLM I ウサギを用いた実験

ヒト MMP-12 遺伝子を過剰発現させた WHHLM I ウサギ (n=8) では、ノルエピネフリン持続注入下にエルゴノビンを投与することによって、88% (7/8) が冠動脈スパズムの発生を示唆する心電図異常を示し、その心電図異常が10分以上継続したことから冠攣縮性狭心症を発症したことが示唆された。冠動脈スパズム発生時の特徴的な心電図変化は、ST 低下および T 波の逆転であるが、心電図において ST 上昇および T 波増高を示したウサギが 1 匹おり、冠動脈病変の破綻が原因の急性心筋梗塞の発症が疑われた。本ウサギについては、冠動脈病変 冠動脈および左心室壁の病理組織標本の解析を急ぐ必要がある。

本研究によって、冠動脈に重度の動脈硬化が発生している WHHLM I ウサギおよび

MMP-12-Tg-WHHLM I ウサギは冠攣縮性狭心症（急性冠症候群一つである不安定狭心症の一つ）のモデル動物として有用であることが示唆された。現在、冠動脈病変の病理組織学的解析を継続中であるが、冠動脈病変からのマクロファージの噴出/流出が多数のウサギに認められるものの、管腔閉塞につながる動脈硬化病変の破綻に続く血栓形成は現在のところ観察されていない。今後は、より破綻しやすい動脈硬化病変が冠動脈に発生する WHHLM I ウサギを開発すること、および動脈硬化病変の破綻を誘発する方法の改良、血栓形成に関わる因子の解析を行うことにより、冠動脈病変の破綻に基づいて急性心筋梗塞を発症するモデル動物を開発する必要がある。

E. 結論

冠動脈に重度の動脈硬化が発生している WHHLM I ウサギおよび MMP-12-Tg-WHHLM I ウサギは、薬剤投与によって冠動脈スパズムを容易に誘発でき、冠攣縮性狭心症（急性冠症候群一つである不安定狭心症の一つ）のモデル動物として有用であることが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Temma T, Ogawa Y, Kuge Y, Ishino S, Takai N, Nishigori K, **Shiomi M**, Ono M, Saji H : Tissue factor detection for selectively discriminating unstable plaques in an atherosclerotic rabbit model. *J Nucl Med* 2010; 51: 1979-86 (2010).
- 2) Kobayashi T, Ito T, **Shiomi M**: Role of the WHHLM I rabbits in translational Research on Hypercholesterolemia and Cardiovascular diseases. *J Biomed Biotech* 2011: 1-10 (2011).

2. 学会発表

- 1) Kobayashi T, Ito T, Yamada T, Hirayama N, Hirata K, Ishida T, **Shiomi M**: WHHLMi rabbit is an animal model for angina and/or coronary spasms. 78th European Atherosclerosis Society Congress, June 20-23, 2010 (Hamburg, Germany)
- 2) Kobayashi T, Ishida T, Nitta N, Sonoda A, Ito T, Hirayama N, Yamada S, Kobayashi S, Miyagawa K, Murata K, Hirata K, **Shiomi M**: The WHHLMi Rabbit as a Model Animal for Coronary Spastic Angina. "4th Congress of Asian Federation of Laboratory Animal Science (AFLAS), November 9-11, 2010 (Taipei, Taiwan)
- 3) **Shiomi M**: The Role of WHHLMi rabbits in translational researches for Human Hypercholesterolemia and Atherosclerosis "4th Congress of Asian Federation of Laboratory Animal Science (AFLAS), November 9-11, 2010 (Taipei, Taiwan)
- 4) 小林 努、石田 達郎、平山 信恵、山田 悟士、伊藤 隆、平田 健一、**塩見 雅志**: 心電図によるWHHLMiウサギにおける心筋虚血の観察. 第57回日本実験動物学会総会. 2010年5月12-14日(京都テルサ, 京都)
- 5) Kobayashi T, Ishida T, Miyagawa K, Hirayama N, Yamada S, Ito T, Hirata K, **Shiomi M**: The WHHLMi Rabbit Is a Suitable Animal Model for Human Unstable Angina. 第42回日本動脈硬化学会総会. 2010年7月15-16日(長良川国際会議場, 岐阜)
- 6) 小林 努, 石田 達郎, 新田 哲久, 園田 明永, 伊藤 隆, 平山 信恵, 山田 悟士, 小林 成美, 宮川 和也, 村田 喜代史, 平田 健一, **塩見 雅志**: 不安定狭心症のモデル動物としてのWHHLMiウサギの有用性. 第4回ウサギフォーラム. 2010年7月24日(秋田大学, 秋田)

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

(別紙 3)

平成22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
—MMP 遺伝子組換えウサギの遺伝子発現および病態解析に関する研究—

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

昨年度、開発に成功した **MMP-9** トランスジェニック (**Tg**) ウサギについて、正常な活性を有する **MMP-9** 酵素発現の有無を解析するとともに、このウサギで想定外に認められた肉芽腫様病変の病理組織学的解析を行った。また、昨年度開発に成功した **MMP-12-Tg-WHHLMI** ウサギの大動脈硬化病変の病理組織学的解析を行った。

A. 研究目的

昨年度、遺伝子導入ならびに **mRNA** 発現を解析した **MMP-9** 過剰発現 **Tg** ウサギの、蛋白発現量ならびに酵素活性の有無の同定を行うとともに、表現型解析の際発見された、後足の肉芽腫様病変について病理組織学的解析を行い、本 **Tg** ウサギの急性冠症候群モデルとしての適性に関する検討を行った。また、**MMP-12-Tg-WHHLMI** ウサギと同腹の対照ウサギ 12 匹の大動脈硬化病変の病理組織学的解析を行った。

B. 研究方法

1. **MMP-9-Tg** ウサギの遺伝子発現

MMP-9 Tg ウサギは、**MMP-9** をマクロファージ特異的に発現させるモデ

ルのため、このウサギの肺胞ならびに腹腔に常在するマクロファージを、リン酸緩衝液による洗浄によって採取し、培養した。24 時間培養後、**Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)** を添加した後、培養上清を採取して、分泌された蛋白の **western blotting** による定量ならびに **Zymography** による酵素活性の解析を行った。また、**MMP-9 Tg** ウサギ開発によって得られた 2 系統のうち、足部の肉芽腫様病変の発生頻度が高い系統を用いて、肉芽腫様病変の生検を行い、病理組織学的解析を行った。

2. **MMP-12-Tg-WHH+MI** ウサギ (ホモ接合体) の病態解析

MMP-12-Tg-WHHLMI ウサギより

採取した大動脈を 10%中性緩衝ホルマリンにより固定後、SudanIVにより動脈硬化病変の脂肪成分を染色した。本講座での常法に従い、大動脈硬化病変を切り出し、病理組織標本を作製した。

(倫理面への配慮)

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

1. MMP-9 Tg ウサギの遺伝子発現

MMP-9 Tg ウサギならびに対照の non-Tg ウサギより採取したマクロファージの PMA 刺激前後の培養上清を用いて、MMP-9 特異抗体により western blotting を行ったところ、PMA 刺激後の両群の上清において MMP-9 蛋白が検出され、対照の non-Tg ウサギと比べ、Tg ウサギで多くの MMP-9 蛋白が認められた。同検体を用いてゼラチンゲルを用いた Zymography を行い、MMP-9 Tg 由来マクロファージでより強いゼラチナーゼ活性が検出された。また、後足指に肉芽腫様病変が高頻度に認められた 1 系統の MMP-9 Tg ウサギにおいて、生検採取と病理組織標本の作製により観察した結果、多くのマクロファージならびに線維芽細胞からなる病変であることが判明し、MMP-9 特異抗体による免疫染色を行った結果、肉芽腫病変内に著明な MMP-9 蛋白陽性像が認められた。

2. MMP-12-Tg-WHHLMI ウサギ (ホモ接合体) の病態解析

MMP-12-Tg-WHHLMI ウサギの大動脈弓部における動脈硬化病変は、線維化が強く、MMP-9 を産生するマクロファージの病変内集簇が認められなかった。

D. 考察

MMP-9 Tg ウサギのマクロファージにおいて、充分量の MMP-9 蛋白ならびにコラゲナーゼ活性があることが判明した。1 系統の足指に高頻度に認められた病変がマクロファージに富む肉芽腫病変であり、病変内に著明な MMP-9 沈着が認められたことから、病変内のマクロファージが多量の MMP-9 蛋白を産生していることが推察された。金属製ケージにウサギを飼育する際、足底の出血が散見されるが、ほとんどが自然治癒する。一方この MMP-9 Tg ウサギでは、病理組織学的観察所見から、創傷治癒の遅延に伴う肉芽腫形成が推察され、MMP-9 のマクロファージにおける強発現が組織修復過程に悪影響を及ぼす可能性が示唆された。MMP-12-Tg-WHHLMI ウサギの大動脈硬化病変は、マクロファージの集簇が認められない線維化病変であったが、病変採取月齢が 12 ヶ月超であったことおよび血清総コレステロール値がやや低値であったことが主因と考えられる。

E. 結論

本研究の結果、酵素活性のある MMP-9 をマクロファージで過剰発現する Tg ウサギモデルが確立された。さらにこのモデルで認められた足病変か

ら、MMP-9 の創傷治癒への関与が新たに見出されたことで、今後、循環器疾患研究への応用はもちろんのこと、さらにより多方面の研究（褥瘡などの難治病変）への応用の可能性が広がった。また、MMP-12-Tg-WHHLMI ウサギの大動脈ならびに冠状動脈硬化解析を、線維化形成前の若齢検体を用いて、今後より詳細に進めていく。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Matsuda S, Yamashita A, Sato Y, Kitajima S, Koike T, Sugita C, Moriguchi-Goto S, Hatakeyama K, Takahashi M, Koshimoto C, Matsuura Y, Iwakiri T, Chen Y.E, **Fan J**, Asada Y: Human C-reactive protein enhances thrombus formation after neointimal balloon injury in transgenic rabbits. *J Thromb Haemost* 9: 201-208 (2011).
- 2) Waqar AB, Koike T, Yu Y, Inoue T, Aoki T, Liu E, **Fan J**: High-fat diet without excess calories induces metabolic disorders and enhances atherosclerosis in rabbits. *Atherosclerosis* 213: 148-155 (2010).
- 3) Kitajima S, Maeda T, Liu E, Nishijima K, Morimoto M, Watanabe T, **Fan J**: Age is an important factor influence on the number of recovered eggs in

superovulated rabbits: Analysis of our past 5 years data of 509 rabbits superovulated by FSH or PMSG. *Scand J Lab Anim Sci*, 2010, in press.

2. 学会発表

- 1) **範江林**, 小池 智也, 北嶋 修司, 浅田 祐士郎, 渡辺 照男. 動脈硬化の発生におけるC反応性蛋白の役割：遺伝子改変ウサギ・モデルによる解析. 第 99 回日本病理学会総会、2010 年 4 月 27-29 日（東京）
- 2) Matsuda S, Kitajima S, Koike T, **Fan J**, Asada Y: Human C-reactive protein enhances thrombus formation in transgenic rabbits. 第 42 回日本動脈硬化学会総会・学術集会、2010 年 7 月 15-16 日（岐阜）

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
(特開 2010-284125)

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

(別紙 3)

平成 22 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 22 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 ウサギの繁殖を行った。H21 年度に作出した MMP-1 および MMP-9 Tg ウサギについて、導入遺伝子の発現解析に必要な Tg ウサギの繁殖を行うとともに、MMP-9 Tg ウサギと WHHL MI ウサギを交配し、MMP-9 Tg WHHL MI ウサギの繁殖も開始した。また、MMP-12 Tg WHHL MI ウサギ、MMP-1 ならびに MMP-9 Tg ウサギの系統保存として凍結精子による保存を実施した。

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 ウサギの開発、MMP-1 と MMP-9 を過剰発現する新規トランスジェニック(Tg)ウサギの開発と系統保存を実施する。

B. 研究方法

1. MMP-12 Tg WHHL MI ウサギの繁殖

これまでに得られた MMP-12 Tg WHHL MI ヘテロ型もしくはホモ型ウサギの雌と WHHL MI ホモ型ウサギの

雄を用いて交配を進めた。交配は、自然交配で行なった。

2. MMP-1 および MMP-9 Tg ウサギの開発

H21 年度に得られた MMP-1、MMP-9 Tg ウサギについて、導入遺伝子の発現解析のために必要な Tg ウサギの繁殖を行った。繁殖は人工授精および自然交配で行った。人工授精では、雌 1 匹当たり 10~20x10⁶ 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。

3. ウサギ精子の凍結保存

人工膈を用いて雄ウサギから精液を採取後、精子数、運動率等を確認し、凍害防止剤 (卵黄アセトアミド溶液) で希釈した。希釈後、精子を 0.2 ml/min