

201008005B

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

急性冠症候群の疾患モデルウサギの開発及び
バイオリソースの樹立に関する研究

平成20年度～22年度 総合研究報告書

研究代表者 塩見 雅志

平成23（2011）年5月

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

急性冠症候群の疾患モデルウサギの開発及び
バイオリソースの樹立に関する研究

平成20年度～22年度 総合研究報告書

研究代表者 塩見 雅志

平成23（2011）年5月

目 次

I. 総合研究報告	
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	1
塩見 雅志	
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	14
III. 研究成果の刊行物・別刷	17

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
（総合）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 神戸大学医学研究科・准教授

研究要旨

本研究では、Matrix metalloproteinase (MMP)-1 および MMP-9 を過剰発現する遺伝子組換え (Tg)ウサギを開発し、さらに冠動脈硬化病変と心筋梗塞を自然発症する WHHLM1 ウサギに MMP-12 遺伝子を導入した MMP-12-Tg-WHHLM1 ウサギを開発した。また、WHHLM1 ウサギの冠動脈病変を病理組織学的および免疫組織学的に解析し、12 月齢以降に不安定な冠動脈病変が発生することを確認した。12 月齢以上の WHHLM1 ウサギにノルピネフリン等とエルゴノピンを併用投与等することにより冠動脈スパズムが誘発され、冠攣縮性狭心症を発症することを確認した。冠攣縮性狭心症を発症したウサギの 48%で、冠動脈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噴出が観察され、1 匹では冠動脈病変の破裂も観察された。冠動脈スパズムを誘発した MMP-12-Tg-WHHLM1 ウサギの 1 匹では、心電図上 ST 上昇、T 波の増高が観察され、急性心筋梗塞の発症が示唆された。これらの結果は、冠動脈スパズムは不安定狭心症の発症に関与していることを示唆しており、冠動脈に動脈硬化が発症する WHHLM1 ウサギおよび MMP-12-Tg-WHHLM1 ウサギは、急性心筋梗塞のモデル動物として有用であることが示唆された。

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

の不安定化のみでは動脈硬化プラークが破綻しないことが示唆されており、不安定化したプラークに物理的な力が加わることがプラーク破綻には重要であると考え、本研究では、WHHLM1 ウサギおよび MMP を過剰発現する遺伝子組換え (MMP-Tg) WHHLM1 ウサギ (ホモ接合体) に冠動脈スパズムを誘発し、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) を発症させることを試みた。

A. 研究目的

申請者らは、ヒト家族性高コレステロール血症のモデル動物であり高脂血症、動脈硬化、心筋梗塞を自然発症する WHHLM1 ウサギを開発し、系統維持及び供給を行い、日本のみならず世界の循環器疾患研究の発展に大きく貢献してきた。また、冠動脈プラークの不安定化や破綻の惹起に関わる血管壁の炎症因子である Matrix metalloproteinase (MMP)などを導入した遺伝子組換え(Tg)ウサギを開発してきた。従来の研究から、動脈硬化プラーク

B. 研究方法

本研究では、ACS の発症には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、冠動脈に動脈硬化が自然発症する WHHLM1 ウサギおよび新たに開発した遺伝子組換え (Tg) WHHLM1 ウサギに冠動脈

スパズムを誘発し、その影響を検討した。

1. WHHLMI ウサギの増産 (神戸大学)

実験に使用する WHHLMI ウサギは神戸大学で生産した。WHHLMI ウサギの生産では、血清コレステロール値、マクロファージに富む冠動脈病変、重度の冠動脈狭窄、心筋梗塞の発症を指標として、選抜交配を実施した。平成 20 年度には 128 ペア、平成 21 年度には 93 ペア、平成 22 年度には 68 ペアの交配を実施した。

2. WHHLMI ウサギ冠動脈病変の解析 (神戸大学)

8-30 月齢の WHHLMI ウサギの冠動脈病変について、病理組織染色および免疫組織染色 (マクロファージ、平滑筋細胞、内皮細胞、MMP-1, MMP-9, MMP-12) を実施し、動脈硬化病変の特性を光学顕微鏡下で観察した。

3. 遺伝子組換え WHHLMI ウサギ開発のための MMP-1 ならびに MMP-9 遺伝子コンストラクトの開発 (山梨大学)

ACS の発症機転として、マクロファージの病変局所への集簇と細胞外基質分解酵素の発現が重要と推測されている。そのため、マクロファージ特異的に MMPs を発現する Tg ウサギを作製した。この目的のために、スカベンジャーリセプタープロモーターを選択し、その下流に MMP-1 または MMP-9 cDNA を連結させた。さらにこの両端にインスレーターと呼ばれる特殊な配列を組み込んだ。これにより、マイクロインジェクション後、ランダムに組み込まれる染色体上の位置に影響を受けず、安定した発現が実現できる。

4. 遺伝子組換え WHHLMI ウサギ (ホモ接合体) の開発および保存 (佐賀大学)

遺伝子組換え WHHLMI ウサギの作出および作出したウサギの保存は佐賀大学で実施した。

1) 遺伝子組換えウサギの開発

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。過排卵処置を行なった日本白色種メスのドナーウサギから前核期受精卵を採取し、外来遺伝子をマイクロインジェクション法で注入した。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 (日本白色種) の卵管内へ移植した。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った。

2) 遺伝子組換え WHHLMI ウサギの開発

遺伝子組換え WHHLMI ウサギの開発は、各種遺伝子を過剰発現する Tg ウサギと WHHLMI ウサギ (ホモ接合体) を交配し、Low density lipoprotein (LDL) レセプター遺伝子型がヘテロ接合体となる Tg-WHHLMI (+/-) ウサギを得た上で、もう一度 WHHLMI ウサギを交配し、LDL レセプターについてホモ欠損型 (-/-) の遺伝子背景をもつ Tg-WHHLMI ウサギ (ホモ接合体) を作出する。そのため、神戸大学で維持している WHHLMI ウサギの精子を用いて、平成 21 年度に佐賀大学で作出した MMP-12-Tg ウサギを人工受精 (凍結精子および新鮮精子を使用) した。使用した精子の運動率は、凍結保存精子が 76.3-74.1%、新鮮精子が 83.5-89.9% であった。人工授精は、雌 1 匹当たり $20-55 \times 10^6$ 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。人工授精後、得られた産仔は 4 週齢で離乳し、導入遺伝子 (MMP-12) の伝達について PCR 法により確認した。得られた MMP-12-Tg-WHHLMI ヘテロ接合体ウサギのメスと神戸大学より新に導入した WHHLMI ウサギ (ホモ接合体) のオスとの交配を行った。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、メス 1 匹当たり $20-150 \times 10^6$ 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。自然交配では、メス 1 対オス 1 で行なった。

3) 遺伝子組換えウサギの保存

人工臍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 $-0.2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 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。

5. 開発した遺伝子組換えウサギの遺伝子解析ならびに表現型解析（山梨大学）

1) MMP-9 Tg ウサギの遺伝子解析ならびに表現型解析

マイクロインジェクションにより作製に成功したMMP-9 Tg ウサギについて、詳細な発現解析を行った。まず、Tg ウサギの耳組織の一部を採取し、ゲノムDNAを抽出した。これを用いて、Southern blottingを行い、遺伝子コンストラクトの導入の有無を確認した。また、Tg ウサギより、常在マクロファージを肺および腹腔の洗浄により採取するとともに、体内の主要臓器を網羅的に採取し、それぞれからmRNAを抽出して、Northern blottingを行い、マクロファージ特異的な導入遺伝子のmRNA発現が実現しているかを検討した。これを証明した後、Tg ウサギより採取した肺胞および腹腔マクロファージを24時間培養後、Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) 添加により活性化し、培養上清を採取してWestern blottingを行い、マクロファージからのMMP-9蛋白の分泌を確認した。また、同上清をゼラチンゲルに泳動しZymographyを行うことで、MMP-9蛋白にコラゲナーゼ活性があるかどうかを検証した。また、Tg ウサギの体重・摂餌量計測と血液生化学検査を行い、Tg ウサギの基本的特徴を同定した。

2) MMP-12-Tg-WHHLMI ウサギの動脈硬化病変解析

本研究で新規に開発したMMP-12-Tg-WHHLMI ウサギの動脈硬化病変を病理組織学的に解析した。ウサギより採取した大動脈を10%中性緩衝ホルマリンにて固定し、

SudanIVによって脂肪染色して動脈硬化病変を顕在化させた。動脈硬化病変を山梨大学分子病理学講座にて常法に従い薄切し、病理組織標本を作製した。

6. 野生型 WHHLMI ウサギ（ホモ接合体）及び遺伝子組換え WHHLMI ウサギ（ホモ接合体）への冠動脈スパズムの誘発（神戸大学）

冠動脈スパズムの誘発は神戸大学で実施した。ケタミン+ミタゾラムで麻酔したウサギに、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を持続注入し、エルゴノビンをボラス投与、あるいは、シメチジンとヒスチミンの併用投与により、冠動脈スパズムの誘発を試みた。冠動脈スパズムの発生は、心電図（標準12誘導でST低下および陰性T波）で確認し、典型例について冠動脈造影で確認した。麻酔の継続はケタミンの静脈内持続注入で行い、麻酔中はウサギに酸素吸入（マスク）を実施し、覚醒までヒートパットを使用して保温を実施した。平成18年度にWHHLMI ウサギ10匹を使用してスパズム誘発の条件設定を実施し、平成21年度にはWHHLMI ウサギ36匹、平成22年度にはWHHLMI ウサギ30匹とMMP-12-Tg-WHHLMI ウサギ8匹を使用してスパズムの誘発を行った。

7. 急性冠症候群発症の確認（神戸大学）

急性冠症候群の確認は、10分以上継続する心電図変化（ST低下、陰性T波、心室性期外収縮）、心エコーによる左心室壁運動度（FSR、fractional shortening rate、収縮期と拡張期の左室内径の比から計算）の低下、心電図異常を示した後4時間後の血清心筋虚血マーカー（Fatty acid binding protein (FABP)、トロポニン-I、ミオグロビン、各ELISAキットで測定）で評価した。なお、一部のウサギについてはホルター心電計を装着して、心電図異常の持続時間を調べた。

8. 冠動脈病理組織標本の作製 (神戸大学)

冠動脈スパズム誘発実験に使用した WHHLM1 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および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し、パラフィン包埋し、250 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、マルティウススカーレットブルー染色)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(アクチンを認識する 1A4 抗体、MMP-1, MMP-9, MMP-12)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、動物実験計画書をそれぞれの所属する大学の学長に提出し、それぞれの大学の動物実験委員会の審査を受け、それぞれの大学の学長の許可の下に、それぞれの大学の「動物実験実施規則」、文部科学省の「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それぞれが所属する大学の学長に提出し、それぞれの大学の遺伝子組換え実験安全委員会の審査を受け、それぞれの大学の「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. 研究成果

1. WHHLM1 ウサギの増産 (神戸大学)

選抜交配により、平成 20 年度に 131 匹、平成 21 年度に 244 匹、平成 22 年度に 116 匹

を生産した。生産したウサギの一部を用いて ACS 誘発実験を実施した。

2. WHHLM1 ウサギ冠動脈病変の組織学的解析 (神戸大学)

動脈硬化による冠動脈の狭窄率は 5% (初期病変) から 95% であった。冠動脈には、不安定病変 (多量の脂質蓄積とそれを被う薄い線維性皮膜)、fibroatheroma, 線維性肥厚、多量のマクロファージが蓄積した病変、カルシウム蓄積、病変表層へのマクロファージの集簇、粥腫内出血等のさまざまな病変が認められた。不安定病変あるいは fibroatheroma は 10 月齢以降の WHHLM1 ウサギで認められた。マクロファージは、病変の表層、深層あるいは全域に認められ、MMP の発現が認められた。冠動脈病変は、若齢ではマクロファージに富む病変であり、加齢により細胞成分が減少し、動脈病変の不安定化が亢進した。

3. 遺伝子組換え WHHLM1 ウサギ開発のための遺伝子コンストラクトの開発 (山梨大学)

スカベンジャーリセプタープロモーターの下流に MMP-1 および MMP-9 の cDNA を連結させ、両端にインスレーター配列を挿入した遺伝子コンストラクトを作製し、プラスミドに組み込んだ。これを大腸菌にて複製させた後回収し、制限酵素 SalI による切断を行い、約 10kb の遺伝子コンストラクト断片を得た。

4. MMP-1 および MMP-9 Tg ウサギの開発 (佐賀大学)

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を PCR による遺伝子解析を行なったところ、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)に導入遺伝子が伝達されることも確認した。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し、MMP-9 Tg ウサギと WHHLMI ウサギとの交配を開始した。現在までに、MMP-9-Tg-WHHLMI ウサギヘテロ接合体のオス 2 匹、メス 3 匹が得られている。

MMP-1 については、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継続して実施している。

5. 開発した MMP-9 Tg ウサギの遺伝子解析 (山梨大学)

佐賀大学で作製した MMP-9 Tg ウサギの遺伝子導入と mRNA 発現の解析のため、耳組織から抽出したゲノム DNA ならびに、各種臓器から抽出した mRNA を用いて、それぞれ、Southern blotting ならびに Northern blotting を行った。その結果、MMP-9 の Tg コンストラクトのゲノム内への挿入を確認するとともに、マクロファージ特異的な MMP-9 mRNA を検出した。このウサギより採取した肺胞ならびに腹腔マクロファージの培養上清を採取し、Western blotting を行ったところ、Tg ウサギのマクロファージは、同腹の non-Tg に比較して多量の MMP-9 の蛋白を発現・分泌していた。この蛋白の酵素活性の有無を、ゼラチンゲルを用いた Zymography で解析した結果、Tg ウサギのゼラチナーゼ活性は、同腹の non-Tg ウサギの数倍であった。このウサギの表現型解析のため、体重ならびに摂餌量を測定したところ、正常対照との間に大きな違いは認められなかった。また、血液生化学検査を行ったが、特に異常は認められなかった。しかしながら、作製した 2 系統の MMP-9 Tg ウサギのうち、1 系統の後足指において、肉芽腫様病変が高頻度に認められたため、一部を生検により採取し、病理組織標本作製して観察した。その結果、この肉芽腫はマクロファージに富み、MMP-9 の特異抗体にて染色した結果、MMP-9 蛋白が著明に検出された。

6. 遺伝子組換え WHHLMI ウサギ (ホモ接合体) の開発 (佐賀大学)

WHHLMI ウサギの凍結精子を用いて実施した MMP-12-Tg-WHHLMI ウサギヘテロ接合体の作出では、MMP-12-Tg ウサギのメス 6 匹のうち 1 匹が出産した(妊娠率: 16.7%)。合計 3 匹の産仔を得たが、いずれも死産であった。一方、新鮮精子を用いて実施した人工授精では、MMP-12 Tg ウサギのメス延べ 11 匹のうち 9 匹が出産し(妊娠率: 81.8%)、合計 46 匹の産仔を得た。このうち、離乳後の PCR による遺伝子解析の結果、13 匹(オス 5 匹、メス 8 匹)において MMP-12 遺伝子が伝達されていることを確認した。MMP-12-Tg-WHHLMI ウサギ(ホモ接合体)の作出では、当初、新鮮精子を用いて人工授精を実施したが、妊娠率(15%, 7/45)、離乳率とも低値であった。一方、自然交配では、妊娠率は 80.6%(交配数 31 回)であり、MMP-12-Tg-WHHLMI ウサギホモ接合体 18 匹(オス 10 匹、メス 8 匹)を得ることができた。

7. MMP-12-Tg-WHHLMI ウサギ (ホモ接合体) の大動脈病変の解析 (山梨大学)

急性冠症候群発症実験に用いた MMP-12-Tg-WHHLMI ウサギより大動脈を採取し、脂肪染色ならびに病理組織標本作製した。その結果、大動脈弓部において、非常に線維化が強く、マクロファージなどの細胞成分に乏しい進行病変が認められた。

8. 開発した遺伝子組換えウサギの保存 (佐賀大学)

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。

9. 野生型 WHHLM I ウサギへの冠動脈スパ スムの誘発 (神戸大学)

1) 冠動脈スパスム発症に関する心電図解析

平成18年度に冠動脈スパスム誘発の条件を設定し、その条件設定に基づいて冠動脈スパスムの誘発を実施した。ノルエピネフリン持続注入下にエルゴノビンを投与する実験 (n=21) では、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、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、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。これらの心筋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、冠動脈スパス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。当該ウサギでは血圧が180mmHgまで上昇し、血管の透過性が亢進したことが原因と推測された。従って、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) 冠動脈スパスム

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、冠動脈造影にて左冠動脈前下行枝と回旋枝でスパスムの発生を確認した。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。実験後に採取した心臓の病理組織標本とあわせて検討した結果、冠動脈の病変発生部位近傍でスパスムが発生していることが確認でき、冠動脈スパスムの発生に動脈硬化病変が関与していることが推察された。

10. 野生型WHHLM I ウサギにおける急性冠症 候群発症の確認 (神戸大学)

1) 心エコーによる心機能 (左室壁運動度) の 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、FSR (fractional shortening rate, 収縮期と拡張期の心室内径の比から計算) 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。

2) 血清心筋虚血マーカーの測定による解析

血清虚血マーカーは、虚血性の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スパス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、冠動脈スパスム発生4時間後には顕著に上昇し、冠動脈スパスムによって心筋が虚血変性したことが示唆された。

3) ホルター心電計による解析

WHHLMIウサギ2匹にホルター心電計を装着し、冠動脈スパズム誘発後に麻酔から覚醒させ、通常飼育を行った。冠動脈スパズム誘発時から継続していた胸部誘導V1におけるSTの変化および胸部誘導V3における陰性T波は、スパズム誘発後約12時間および20時間継続した。

11. スパズムが冠動脈病変に及ぼす影響に関する病理組織学的解析 (神戸大学)

冠動脈の灌流固定が実施できた12-36月齢のウサギ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スパズム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。冠動脈の最大狭窄病変 (管腔狭窄率) と冠動脈スパズムの発生との相関解析では、冠動脈狭窄の進行に伴ってスパズムの発生率が上昇した。しかし、全周性の動脈硬化病変による高度の管腔狭窄を示し、中膜が菲薄化しているウサギでは、冠動脈スパズムは発生しなかった。

12. MMP-12-Tg-WHHLMIウサギへの冠動脈スパズム発症に関する心電図解析 (神戸大学)

ST低下/上昇、T波逆転/上昇、心室性期外収縮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ビ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。

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。

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) に冠動脈スパズム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、冠動脈に動脈硬化が発生した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。さらに、冠攣縮性狭心症を発症したWHHLMIウサギの1匹で冠動脈病変の破裂が認められたことは、冠動脈スパズムがACS発症に関与していることを示唆している。

1. MMP遺伝子組換えウサギの開発

MMP-9 Tgコンストラクトの作製に成功し、MMP-9 Tgウサギを開発した。このMMP-9 Tgウサギを新たなモデルウサギとして確立するための、各種発現解析、基礎解析の結果、マクロファージ特異的にゼラチナーゼ活性を有するMMP-9蛋白が発現されていることが明らかになった。一方、このTgウサギの後足指で病変が認められ、病理組織学的解析の結果、MMP-9に富む肉芽腫であることが判明した。この所見から、MMP-9 Tgウサギにおいて、金属製ケージによると思われる後足指の創傷に対する治癒過程の異常が推察され、MMP-9が創傷治癒にも何らかの重要な関与を持つ可能性が示された。本研究にて開発されたMMP-12-Tg-WHHLMIウサギの大動脈病変では線維化が非常に強い病変が認められたが、

この理由として、大動脈採取時の月齢が12ヵ月を超えていたことが考えられる。**MMP-12-Tg-WHHLMI**ウサギでは、野生型**WHHLMI**ウサギに比較して動脈硬化病変で繊維化が亢進していることから、今後は、ACSの発症機転となる冠状動脈硬化の不安定性解析を、線維化の進行していない若齢個体を用いて詳細に進め、この貴重なモデル動物を急性冠症候群モデルとして確立できるか検証を継続していく。

また、**MMP-12 Tg WHHL MI**ウサギおよび作出した**Tg**ウサギの系統維持として凍結精子による保存を実施した。実験動物の系統保存には、個体による維持、凍結精子もしくは凍結胚による保存方法があるが、ウサギでは射出精液の採取ならびに人工授精が容易であることから、凍結精子による保存を進めた。これまでの我々の検討から、少なくとも液体窒素中に5.6年保存された凍結精子から産子が得られている。今後、さらに長期保存による影響について検討を進めてゆきたい。しかし、凍結精子による系統保存を行なう場合、ウサギコロニーの再構築の際には人工授精は必須の技術となることから、**MMP-12-Tg-WHHLMI**ウサギの繁殖で人工授精の成績が好ましくなかった原因について検討が必要であると考えられる。

2. **WHHLMI**ウサギを用いた**ACS**誘発実験 実験

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II持続注入下にエルゴノビンを投与してスパズム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。その結果、統計処理が可能となり、虚血性の心電図変化、心エコーによる心室壁運動の低下、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増加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

+エルゴノビンの投与による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ビンを投与することによって、**WHHLMI**ウサギでは容易に冠動脈スパズム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、冠動脈スパズムの誘発により、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することから、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。これらの結果は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。したがって、冠動脈スパズムを誘発できる**WHHLMI**ウサギは冠攣縮性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、エルゴノビンを併用することによって冠動脈スパズムを誘発できたが、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、左室壁運動の低下を伴ったことから、ヒスタミンも**WHHLMI**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WHHLMIウサギの冠動脈では認められておらず、冠動脈スパズム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。

3. MMP-12-Tg-WHHLMIウサギを用いた実験

ヒトMMP-12遺伝子を過剰発現させたWHHLMI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WHHLMIウサギおよびMMP-12-Tg-WHHLMI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で認められるものの、管腔閉塞につながる動脈硬化病変の破裂やそれに続く血栓形成は観察されていない。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WHHLMI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。

A. 結論

動脈硬化病変の不安定化に関連するMMP-1あるいはMMP-9を過剰発現するウサギ、ならびにMMP-12を過剰発現するWHHLMIウサギ (ホモ接合体) の開発に成功した。これらのウサギは、動脈硬化病変の不安定化に関する研究およびACSに関する研究に貢献することが期待できる。冠動脈に動脈硬化が発生するWHHLMIウサギおよびMMP-12-Tg-WHHLMI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。また、これらのウサギに冠動脈スパズムを誘発することにより、冠動脈硬化病変の内皮細胞の薄利とマクロファージの内腔への噴出が認められ、1匹で冠動脈病変の破裂が認められた。また、心電図変化で急性心筋梗塞を示唆するST上昇とT波の上昇（先鋭化）が認められ、冠動脈病変が発生しているWHHLMIウサギあるいはMMP-12-Tg-WHHLMIウサギはACSのモデル動物として期待できることが示唆された。しかし、発症頻度が低いため、発症頻度の上昇が今後の課題である。また、これらの結果は冠動脈スパズムがACSの発症に関係することを示している。

B. 研究発表

1. 論文発表

- 1) **Shiomi M, Fan J**: Unstable coronary plaques and cardiac events in myocardial infarction-prone Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits: questions and quandaries. *Curr Opin Lipidol* 19:631-636 (2008).
- 2) Yu Y, Koike T, **Kitajima S**, Liu E, Morimoto M, **Shiomi M**, Hatakeyama K,

- Asada Y, Wang K-Y, Sasaguri Y, Watanabe T, **Fan J**: Temporal and quantitative analysis of expression of metalloproteinases (MMPs) and their endogenous inhibitors in atherosclerotic lesions. *Histol Histopathol* 23: 1503-1516 (2008).
- 3) Yamada S, Wang KY, Tanimoto A, **Fan J**, Shimajiri S, **Kitajima S**, Norimoto M, Tsutsui M, Watanabe T, Yasumoto K, Sasaguri Y: Matrix metalloproteinase 12 accelerates the initiation of atherosclerosis and stimulates the progression of fatty streaks to fibrous plaques in transgenic rabbits. *Am J Pathol* 172: 1419-1429 (2008).
- 4) 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: 846-856. (2009)
- 5) **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).
- 6) **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)
- 7) 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)
- 8) 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).
- 9) Kobayashi T, Ito T, **Shiomi M**: Role of the WHHLMI rabbits in translational Research on Hypercholesterolemia and Cardiovascular diseases. *J Biomed Biotech* 2011: 1-10 (2011).
- 10) **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
- 11) **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シヨナルリサーチにおけるWHHLMIウサギの有用性。 *アニテックス* 22:5-10 (2010)
- 12) **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).
- 13) **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).
- 14) 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) **Shiomi M**, Yamada S, Hirayama N, and

- Ito T: WHLMI rabbits, a suitable animal model for human cardiovascular diseases. Symposium on "Animal models", 3rd Congress of Asian Federation of Laboratory Animal Science, Sept 27-30, 2008 (Beijing, China)
- 2) 塩見 雅志: 循環器病の研究を支える生物資源—ウサギモデル (WHLMIウサギ). 厚生労働省生物資源研究セミナー「循環器病の研究を支える生物資源」. 2008年11月19日 (豊中、大阪)
- 3) 範江林. 動脈硬化の研究のための新たな遺伝子改変ウサギモデルの開発と応用. 日本動脈硬化学会、2008年7月11日、(つくば)
- 4) 山田 壮亮, 王 克鏞, 谷本 昭英, 範江林, 島尻 正平, 北嶋 修司, 森本 正敏, 渡邊 照男, 笹栗 靖之. 細胞外基質分解酵素 MMP-12 は、初期動脈硬化巣の形成から進展に重要な促進因子である. 第三回ウサギフォーラム、2008年7月26日、(神戸)
- 5) 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)
- 6) Shiomi M: WHHL rabbits, history and applications. "3rd International Meeting on Rabbit Biotechnology, June 4-5, 2009 (Xi'an, China)
- 7) Fan J: Transgenic rabbits for translational research (TRTR). 3rd International Meeting on Rabbit Biotechnology, Jun 4-5, 2009 (Xian, China)
- 8) Koike T, Yu Y, Kitajima S, Zhang J, Bhakd, S, Chen EY, Fan J: Transgenic rabbits expressing human C-reactive protein. 3rd International Meeting on Rabbit Biotechnology, Jun 4-5, 2009 (Xian, China)
- 9) 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)
- 10) 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)
- 11) 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)
- 12) 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)
- 13) 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)
- 14) 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)
- 15) 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)
- 16) 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)
- 17) **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 (さいたま, 埼玉)
- 18) **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 2009年5月14-16日 (さいたま)
- 19) 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 (下関)
- 20) 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 2009年7月17-18日 (下関)
- 21) 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 2009年7月17-18日 (下関)
- 22) 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 2009年7月17-18日 (下関)
- 23) 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 2009年7月17-18日 (下関)
- 24) 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)
- 25) 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)

- 26) 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)
- 27) 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)
- 28) **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)
- 29) 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)
- 30) 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)
- 31) 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)
- 32) 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)
- 33) 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)

G 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許出願・登録

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

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
<u>Shiomi M</u>	Rabbit as a Model for the Study of Human Diseases.	<i>Houdebine LM, Fan J</i>	<i>Rabbit Biotechnology: Rabbit genomics, transgenesis, cloning and models</i>	Springer Science + Buisness 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
<u>Shiomi M, Fan J</u>	Unstable coronary plaques and cardiac events in myocardial infarction-prone Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits: questions and quandaries.	<i>Curr Opin Lipidol</i>	19	631-636	2008
Yu Y, Koike T, <u>Kitajima S</u> , Liu E, Morimoto M, <u>Shiomi M</u> , Hatakeyama K, Asada Y, Wang K-Y, Sasaguri Y, Watanabe T, <u>Fan J</u>	Temporal and quantitative analysis of expression of metalloproteinases (MMPs) and their endogenous inhibitors in atherosclerotic lesions.	<i>Histol Histopathol</i>	23	1503-1516	2008
Yamada S, Wang KY, Tanimoto A, <u>Fan J</u> , Shimajiri S, <u>Kitajima S</u> , Norimoto M, Tsutsui M, Watanabe T, Yasumoto K, Sasaguri Y	Matrix metalloproteinase 12 accelates the initiation of atherosclerosis and stimulates the progression of fatty streats to fibrous plaques in transgenic rabbits.	<i>Am J Pathol</i>	172	1419-1429	2008
<u>Shiomi M</u> , Ito T	The Watanabe heritable hyperlipidemic (WHHL) rabbit, its characteristics and history of development: A tribute to the late Dr. Yoshio Watanabe.	<i>Atherosclerosis</i>	207	1-7	2009

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ohkawara H, Ishibashi T, <u>Shiomi M</u> , 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.	<i>J Atheroscler Thromb</i>	16	846-856	2009
Koike T, <u>Kitajima S</u> , Yu Y, Nishijima K, Zhang J, Ozaki Y, Morimoto M, Watanabe T, Bhakdi S, Asada Y, Chen YE, <u>Fan J</u>	Human C-reactive protein does not promote atherosclerosis in transgenic rabbits.	<i>Circulation</i>	120	2088-2094	2009
Zhang C, Zheng H, Yu Q, Yang P, Li Y, Cheng F, <u>Fan J</u> , Liu E	A practical method for quantifying atherosclerotic lesions in rabbits.	<i>J Comp Pathol</i>	142	122-128	2010
Kuge Y, Takai N, Ogawa Y, Temma T, Zhao Y, Nishigori K, Ishino S, Kamihashi J, Kiyono Y, <u>Shiomi M</u> , Saji H	Imaging with radiolabelled anti-membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) antibody: potentials for characterizing atherosclerotic plaques.	<i>Eur J Nucl Med Mol Imaging</i>	37	2093-2104	2010
Temma T, Ogawa Y, Kuge Y, Ishino S, Takai N, Nishigori K, <u>Shiomi M</u> , Ono M, Saji H	Tissue factor detection for selectively discriminating unstable plaques in an atherosclerotic rabbit model.	<i>J Nucl Med</i>	51	1979-1986	2010
<u>塩見 雅志</u> 、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WHHLMIウサギの有用性	アニテックス	22	5-10	2010
<u>範 江林</u> 、小池 智也、西島 和俊、 <u>北嶋 修司</u>	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	11-15	2010
<u>北嶋 修司</u> 、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	32-37	2010
西島 和俊、山口 慎二、森本 正敏、渡辺 照男、 <u>北嶋 修司</u>	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

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Matsuda S, Yamashita A, Sato Y, <u>Kitajima S</u> , Koike T, Sugita C, Moriguchi-Goto S, Hatakeyama K, Takahashi M, Koshimoto C, Matsuura Y, Iwakiri T, Chen Y.E, <u>Fan J</u> , Asada Y	Human C-reactive protein enhances thrombus formation after neointimal balloon injury in transgenic rabbits.	<i>J Thromb Haemost</i>	9	201-208	2011
Kobayashi T, Ito T, <u>Shiomi M</u>	Role of the WHHLMI rabbits in translational Research on Hypercholesterolemia and Cardiovascular diseases.	<i>J Biomed Biotech</i>	2011	1-10	2011

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.kone-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