

の検出が可能となり、虚血性心疾患の発生予防が可能になると期待できる。

7. 今後の展望

脂質低下剤の開発や診断技術の開発研究が精力的に進められているが、心血管疾患の克服には未だ解決すべき様々な課題が残されている。とくに重要な課題として、冠動脈病変の破綻（動脈病変の破裂に伴う血栓の形成）による急性冠症候群の発生機序と予防法の解明、治療法の確立が待たれている。未だ、ヒトの急性冠症候群に対応したモデル動物は開発されていない。急性冠症候群のモデル動物の開発のために、WHHLMIウサギを用いて冠動脈病変の不安定化の亢進、冠動脈病変への物理的ストレス負荷などが試みられており^{2,3)}、その実験結果が期待されている。冠動脈病変の不安定化においては、選抜交配による系統開発と共に遺伝子組換えWHHLMIウサギの開発が進められている^{2,3)}。また、血清総コレステロール値が同程度であっても冠動脈病変の程度や発生する病変の質がウサギごとに異なることから、メタボロミクス解析によるマーカーや危険因子の解析も重要な課題となる。WHHLMIウサギを用いたメタボロミクス解析によって、心血管イベントに関係するマーカーや危険因子が明らかになれば、臨床における診断や発症予防に貢献できると期待できる。

8. まとめ

高コレステロール血症、動脈硬化、心血管イベントの治療、診断、予防に関するトランスレーショナルリサーチにWHHLウサギおよび心筋梗塞を発症するWHHLMIウサギは貢献してきた。心血管疾患による死亡が世界の死因の第一であることから、現在なお心血管疾患に関する研究は人類が克服すべき重要な疾患の一つであり、WHHLMI

ウサギは今後ともこの分野の研究に貢献するであろう。WHHLウサギは故渡辺嘉雄先生のご尽力と製薬会社のご支援で系統維持が行なわれ、世界各国の研究者に分与され、脂質代謝、動脈硬化、治療薬の開発等の研究に貢献してきた。神戸大学は現在なお年間100匹余のWHHLMIウサギの分与を継続している。バイオリソースとして30年余の歴史があるが、一研究機関の努力と民間支援のみで継続することには限界がある。日本で開発され、ノーベル賞研究に貢献し、心血管疾患のトランスレーショナルリサーチに活用されているWHHLMIウサギを次世代に引き継ぐためには、バイオリソース体制の確立が今後の課題である。

謝辞

本研究の一部は、厚生労働省科学研究費補助金創薬基盤推進研究事業（H20-生物資源-一般-002）により実施した。現在までにWHHLウサギあるいはWHHLMIウサギの系統維持を支援して戴いた旧三共株式会社、武田薬品工業株式会社、バイエル薬品株式会社、塩野義製薬株式会社、大正製薬株式会社、第一三共株式会社、大塚製薬株式会社、日本新薬株式会社、萬有製薬株式会社に深謝します。

参考文献

- 1) Watanabe Y. *Atherosclerosis* 1980; **36**: 261-268.
- 2) Shiomi M, Ito T. *Atherosclerosis* 2009; **207**: 1-7.
- 3) Shiomi M, Fun J. *Curr Opin Lipidol* 2008; **19**: 631-636.
- 4) Shiomi M, et al. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; **23**: 1239-1244.
- 5) Watanabe Y, et al. *Biochim Biophys Acta* 1988; **960**: 294-302.
- 6) Shiomi M, et al. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995; **15**: 1938-1944.
- 7) Shiomi M, et al. *Atherosclerosis* 2008; **198**: 287-293.
- 8) Ogawa M, et al. *J Nucl Med.* 2006; **47**: 1845-1850.

特集

トランスレショナルリサーチに
貢献するウサギ医学研究における遺伝子改変ウサギの
応用とその展望

1 範 江林, 1 小池 智也, 2 西島 和俊, 2 北嶋 修司

1 山梨大学大学院医学工学総合研究部・分子病理学講座

2 佐賀大学総合分析実験センター, 生物資源開発部門

1. はじめに

Hammerらが1985年¹⁾に世界で初めてマイクロインジェクション法による遺伝子改変 (Tg) ウサギの作製に成功して以来, 25年を経た現在までに, Tgウサギの応用は先端的医学研究の, とくに心血管疾患や腫瘍, 感染症などの研究分野において大きな役割を果たしてきた。しかし, 汎用されているTgマウスと比し, Tgウサギの作製は世界で未だ, 数箇所の研究施設に限られ, その応用もTgマウス程幅広く普及していないのが現状である。わが国においては, 筆者らが1995年からスタートしたTgウサギの研究が各大学と実験動物業者らとの連携により, 数多くの研究成果を発表すると共に, Tgウサギの作製, 繁殖, 系統維持, 精子保存などのインフラ整備が世界に先駆けて確立されつつある²⁾。さらに, 2年毎に国内ウサギフォーラムや国際Tgウサギシンポジウムを主催しており, この研究分野においてすでに世界をリードしていると言える。本稿では, 現在までに推進されているTgウサギの応用についてoverviewし, 当面の問題点及び今後の展望についての持論を述べたい。

2. 現在までのTgウサギの作製と応用の状況

図1に示すように1985年に初めてTgウサギが

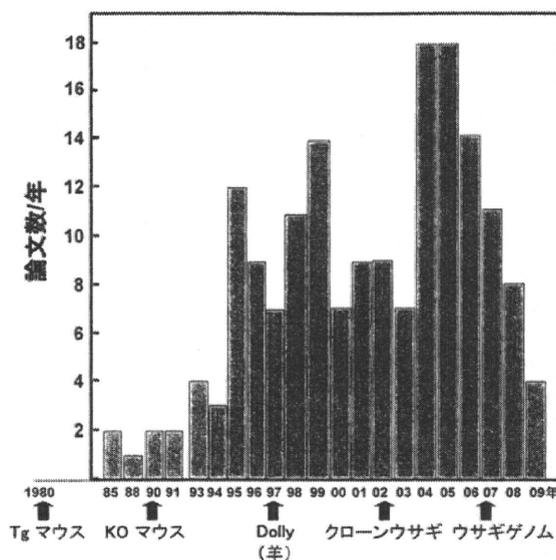


図1 これまでに発表されたTgウサギに関する英文論文 (Pubmedより)

報告されてから, 現在までにTgウサギに関する英文論文が約170編発表されている。90年代初頭, アメリカでは心臓血管病とりわけ動脈硬化及び脂質代謝研究のための新たな病態モデルとして, マウス以外の中型 (ウサギ) 並びに大型 (ブタ) 遺伝子改変動物の開発を推奨していた。当時は, 筆者が所属していたカリフォルニア大学やペーラー医科大学, ペンシルベニア大学, シンシナティ大学及びNIH国立衛生研究所で同時にTgウサギの

表1 2010年3月までに100回以上引用されたTgウサギに関する論文 (Google Scholarより)

論文名	引用回数
Hammer RE, et al. Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection. <i>Nature</i> . 1985; 315 :680-683.	518
Patel R, et al. Simvastatin induces regression of cardiac hypertrophy and fibrosis and improves cardiac function in a transgenic rabbit model of human hypertrophic cardiomyopathy. <i>Circulation</i> . 2001; 104 :317-324.	258
Fan J, et al. Overexpression of hepatic lipase in transgenic rabbits leads to a marked reduction of plasma high density lipoproteins and intermediate density lipoproteins. <i>Proc Natl Acad Sci USA</i> . 1994; 91 :8724-8728.	181
Duverger N, et al. Inhibition of atherosclerosis development in cholesterol-fed human apolipoprotein A-I-transgenic rabbits. <i>Circulation</i> . 1996; 94 :713-717.	171
Hoeg JM, et al. Overexpression of lecithin:cholesterol acyltransferase in transgenic rabbits prevents diet-induced atherosclerosis. <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> . 1996; 93 :11448-11453.	157
Yamanaka S, et al. Apolipoprotein B mRNA-editing protein induces hepatocellular carcinoma and dysplasia in transgenic animals. <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> . 1995; 92 :8483-8487.	151
Shen J, et al. Macrophage-mediated 15-lipoxygenase expression protects against atherosclerosis development. <i>J Clin Invest</i> . 1996; 98 :2201-2208.	140
Nagueh SF, et al. Tissue Doppler imaging consistently detects myocardial contraction and relaxation abnormalities, irrespective of cardiac hypertrophy, in a transgenic rabbit model of human hypertrophic cardiomyopathy. <i>Circulation</i> . 2000; 102 :1346-1350.	131
Marian AJ, et al. A transgenic rabbit model for human hypertrophic cardiomyopathy. <i>J Clin Invest</i> . 1999; 104 :1683-1692.	128
Serhan CN, et al. Reduced inflammation and tissue damage in transgenic rabbits overexpressing 15-lipoxygenase and endogenous anti-inflammatory lipid mediators. <i>J Immunol</i> . 2003; 171 :6856-6865.	121
Van den Hout JM, et al. Enzyme therapy for pompe disease with recombinant human alpha-glucosidase from rabbit milk. <i>J Inherit Metab Dis</i> . 2001; 24 :266-274.	110

開発が行なわれた。それ故、90年代半ば頃、Tgウサギ論文の発表数が急増している。現在までに発表されたTgウサギの論文数は決して多いとはいえないが、100回以上引用された論文を検索すると、計11編あり(表1)、ほとんどが一流雑誌に掲載されている。また、その研究内容を見ると、Tgウサギの使用目的は、脂質代謝や動脈硬化、心臓病の研究が大半であった。しかし、2003年のイラク戦争以降は、アメリカ政府からの研究経費が大幅に減額されたため、アメリカでのTgウサギ研究が縮小されつつあり、現在、Tgウサギが作製できる施設はペンシルベニア大学のみとなっている。幸いに、わが国とヨーロッパ諸国(ハンガリー、フランス、ドイツ、スロバキア)においてはこの研究を継続できる環境にあったため、現

在では牽引的な役割を果たしている。とくに筆者らは主導的な立場として国内外のウサギフォーラムを企画し、実行してきた。国内においては2003年に初めて、佐賀大学で開催した第1回「医療に貢献する実験用ウサギの新しい展開」を皮切りに、第2回(2006年、山梨大学)、第3回(2008年、神戸大学)、第4回(2010年、秋田大学・予定)と継続して開催している。同時に、2005年に第1回遺伝子改変ウサギ国際シンポジウムを筑波大学で開催し、続いて、2007年第2回(Jouy en Josas, France)、2009年第3回(西安、中国)と行ない、次回第4回(2011年ブダペスト、ハンガリー)も現在準備中である。また、2007年12月には、アメリカハーバード大学にあるBroad研究所で、初めてのウサギゲノム共同体会議も開催された。

上述のごとく、Tgウサギを開発する主な目的はヒトの病態モデルとしての応用である³⁾。とくに高脂血症や動脈硬化、糖尿病、心筋症、不整脈などの研究におけるTgウサギの役割が極めて重要なポイントである。なぜマウスではなく、ウサギを使うかという大きな理由は、ウサギが、ヒトと類似している独特の生理機能を有していることと、遺伝子の導入によりヒトの病態を忠実に再現できることが挙げられる。例えば、ウサギの主要な血清リポ蛋白はLDLであり、リポ蛋白代謝に必要な転送蛋白CETPも有しているために、動脈硬化になりやすい特徴がある。ちなみに、マウスはヒトと違って、血清リポ蛋白がHDLであり、CETPも欠損している。また、心筋細胞の特徴においても、ウサギの心筋繊維のmyosin heavy

chainはヒトと同様β型であり、心筋症や不整脈のモデルとして最適であることが報告されている。一方で心筋繊維がα型のマウスは心筋症や不整脈が発生できないとされている。しかし、疾患モデルによる動物実験の最終目的は、その研究成果をいかに人間の病気の治療及び診断法の開発へと発展させられるかがもっとも重要である。その意味で、どのようなモデルを使い、どういった研究成果を出し、その研究成果がトランスレーショナル（実用的な臨床への橋渡し研究、from bench to bedside研究）かどうか最大の課題となり、その点において、Tgウサギの貢献が大いに期待されている。

Tgウサギを用いるもう一つの目的は、ウサギを“動物工場”として利用し、治療用の生物活性蛋

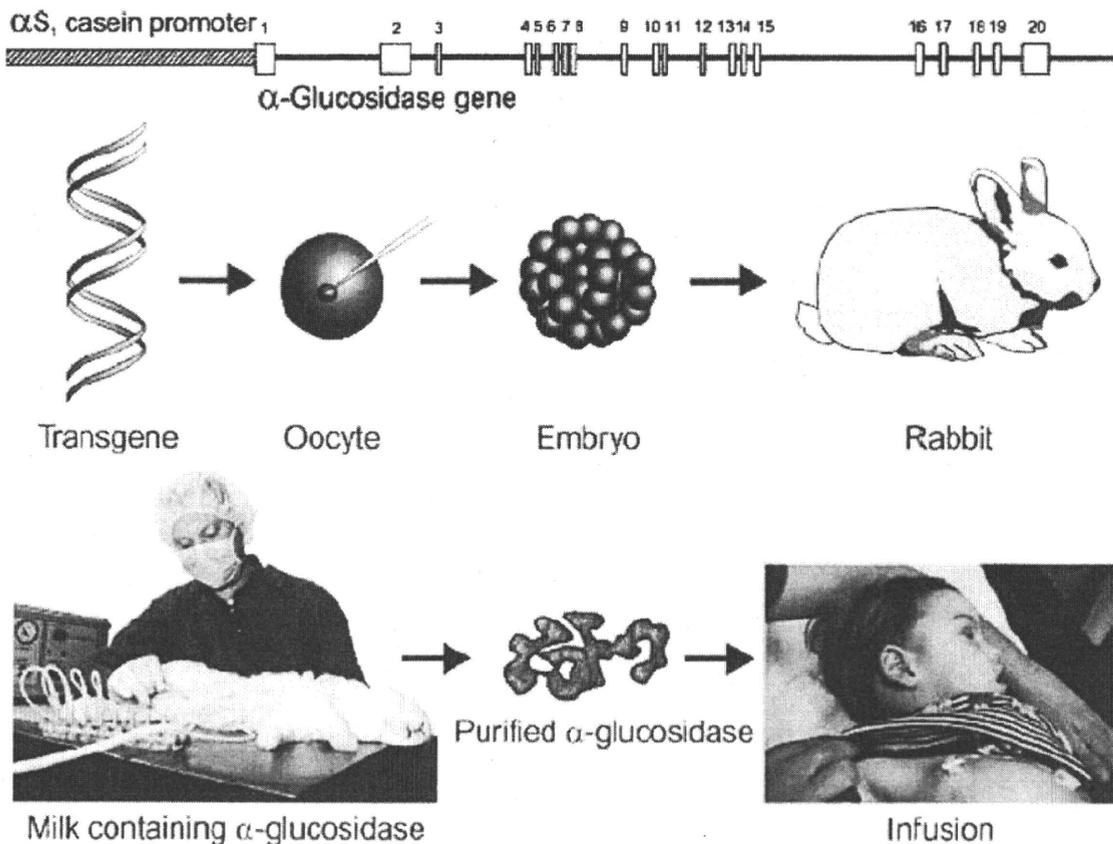


図2 Tgウサギより精製されたαグルコシダーゼを用いたヒト糖原蓄積症に対する治療法（参考文献4より）

白を大量生産しようとするものである。その理由として、ウサギはウシやヒツジに比し繁殖期間が短く、飼育環境整備が容易でありどこでも簡単に飼育できる。また、授乳期のメスウサギは、蛋白成分に富む乳汁を毎日200ml分泌し、年に4~7回の妊娠が可能のため、高価な蛋白質や生理活性物質を生産する低コストの“動物工場”としての実用化が期待されている。現在まで、ウサギの乳汁で生産された治療用の蛋白質は10数種類が報告されており、臨床応用まで実現したのがオランダのPharming社が製造するヒト α グルコシダーゼである。アムステルダム市には α グルコシダーゼ欠損による糖原蓄積症の小児患者が6人いる。この病気は、肝臓や、腎臓、心臓、骨格筋などに大量のグリコーゲンが蓄積し、心不全により死亡する遺伝病であるが、これまで有効な治療法がなかった。アムステルダム大学とPharming社との共同開発で、Tgウサギの乳汁から精製した α グルコシダーゼを患児に投与したところ、全員の症状が改善したという(図2)⁴⁾。従って、今後も、Tgウサギがヒトの疾患の治療を目的とした活性物質の生産に大きく寄与するものと期待される。

3. Tgウサギの展望について

ウサギのユニークな生理的特徴を利用して、これまでにマウスでは研究できなかった疾患の治療と診断法の開発がさらに進展していくことを確信している。とくに新薬の開発に膨大な経費を投入している製薬会社がその点をよく認識していると感じている。たとえ、マウスではよく効いている薬剤でも、やはり臨床試験の実施を行なう前に、ウサギなどのモデルでの試験が必要ではという指摘がしばしば聞かれるようになった。しかし、ウサギ実験がマウスより多くの飼育スペースとコストを必要とすることが現実問題として残されているため、Tgウサギの作製・系統維持、研究者への

無償提供などを円滑に行なうためには、ウサギバイオリソースの充実が必要となってくる。現在、山梨大学、神戸大学、佐賀大学を中心として世界初の日本ウサギバイオリソースセンターの実現を目指している。

Tgウサギの開発・利用をさらに発展させるには、当面、いくつかのハードルを越えなければならない。その点について私の持論を述べたい。まず、ウサギのノックアウトモデルがいつ成功できるのかという問題が残っている。ウサギのES細胞樹立の試みはすでに15年以上経過しているが、未だ、キメラを作ることのできるウサギES細胞は開発できていない。そのほかの代替法として、核移植によるクローンウサギの作製やRNAiによるノックダウンウサギの作製がいくつかの施設で試みられたが、いずれも実用化まで至っていないのが現状である。ノックアウトウサギを作製できるもっとも有望な方法は最近、京都大学(芹川ら)でノックアウトラット作製に用いられたZinc Finger Nucleases (ZFN) 法であろう⁵⁾。近い将来、ZFN法によるノックアウトウサギの成功が期待されている。もう一つの課題は、遺伝子改変ウサギの作製に必要なゲノム遺伝子情報の充実である。アメリカが主導しているウサギゲノムの解読は、現在までに2回の読み取りが終了しているが、すべてのゲノム情報の解読が早期に完了し、Web上に公開されることが強く求められる。また、基礎医学研究に必須となる抗体やELISAキットも、ウサギに使用できるものを今後さらに充実させる必要がある。これらの問題を踏まえて、昨年に初めて出版された[Rabbit Biotechnology: Rabbit genomics, transgenesis, cloning and models, 2009, Springer]⁶⁾ という本を是非一度参照していただきたい。

参考文献:

- 1) Hammer RE, Pursel VG, Rexroad CE, Jr., Wall RJ,

- Bolt DJ, Ebert KM, Palmiter RD, Brinster RL. Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection. *Nature*. 1985;**315**:680-683.
- 2) 渡辺照男. 疾患モデルとしてのトランスジェニックウサギの開発. *Labio*. 2006;**21**:56-60.
- 3) 範江林. 遺伝子改変ウサギ・モデルの現状と展望. アニテックス. 2003;**15**:61-66.
- 4) Van den Hout JM, Kamphoven JH, Winkel LP, Arts WF, De Klerk JB, Loonen MC, Vulto AG, Cromme-Dijkhuis A, Weisglas-Kuperus N, Hop W, Van Hirtum H, Van Diggelen OP, Boer M, Kroos MA, Van Doorn PA, Van der Voort E, Sibbles B, Van Corven EJ, Brakenhoff JP, Van Hove J, Smeitink JA, de Jong G, Reuser AJ, Van der Ploeg AT. Long-term intravenous treatment of Pompe disease with recombinant human alpha-glucosidase from milk. *Pediatrics*. 2004;**113**:e448-457.
- 5) Mashimo T, Takizawa A, Voigt B, Yoshimi K, Hiai H, Kuramoto T, Serikawa T. Generation of knockout rats with X-linked severe combined immunodeficiency (X-SCID) using zinc-finger nucleases. *PLoS One*. 5:e8870.
- 6) Houdebine L, Fan J. *Rabbit Biotechnology: Rabbit genomics, transgenesis, cloning and models*: Springer; 2009.

特集

トランスレーショナルリサーチに 貢献するウサギ

ウサギ精子・胚の凍結保存とバイオリソース

北嶋 修司, 西島 和俊

佐賀大学総合分析実験センター・生物資源開発部門

1. はじめに

一般に、バイオリソース（生物遺伝資源）とは、「研究開発のための材料として用いられる生物系統、集団、組織、細胞、DNA、さらにはそれから産み出される情報」として認識されている。実験動物学の分野では、マウス、ラット、ウサギ等の実験動物そのものがバイオリソースである。近年では、遺伝子組換え技術の発展により、遺伝子機能の解明やヒト疾患モデル動物として、毎年数多くの遺伝子改変動物が開発されている。そのため、実験動物の系統数は、急速な数で増加しているものと想像される。これら世界中で開発された実験動物系統をバイオリソースとして有効に活用していくためには、系統保存ならびに保存系統に関する情報管理（データベース化）等を統括的に行なうバイオリソース事業の整備とその推進が重要となってくると考えられる。我が国では、2002年より文部科学省により実験動植物やES細胞などの幹細胞、各種生物の遺伝子材料等のうち、国が戦略的に整備することが重要なものについて、体系的な収集・保存・提供等を行なうための体制を整備するための事業として「ナショナルバイオリソースプロジェクト（National BioResource Project, NBRP）」が開始された（NBRP情報公開サイト：<http://www.nbrp.jp/index.jsp>）。現在、実験動物のうち哺乳類では、マウス、ラットおよ

びニホンザルがNBRPに採択されており、順調な成果があげられている。残念ながら、本稿のテーマであるウサギはNBRPには採択されていないが、近年、医学生物学研究に有用な自然発症モデルや遺伝子改変ウサギ等の開発が進んでおり、今後、バイオリソースとして整備が進められることが望まれる。

バイオリソースとしての実験動物系統の保存には、それぞれの動物種毎に適した保存方法を確立する必要があると考えられる。そのため、実験動物学に携わる研究者にとって、各種実験動物の系統保存やその関連技術の開発、確立等も重要な研究課題のひとつである。筆者らの施設では、実験動物としてのウサギの特徴に着目し、その特徴を生かしたヒト疾患モデルとしての遺伝子改変ウサギの開発を行なうとともに、作出した遺伝子改変ウサギについてバイオリソースとして維持・保存するための研究を進めてきた。本稿では、バイオリソースとしてのウサギの凍結精子・胚による系統保存について概説したい。

2. バイオリソースとしてのウサギ

実験動物としてのウサギの大きな特徴のひとつとして、脂質代謝系がヒトに非常に類似しているという点が挙げられる^{2,3)}。このため、ウサギは、脂質代謝や動脈硬化といった研究分野では、なく

てはならない実験動物種である。事実、1985年のノーベル賞（生理学・医学賞）で、BrownとGoldsteinら受賞した「コレステロール代謝とその関与する疾患の研究」に渡辺家族性高脂血症（Watanabe heritable hyperlipdemic, WHHL）ウサギが多大な貢献をしたことはよく知られるところである。WHHLウサギは、神戸大学の故渡辺嘉雄博士らにより開発された自然発症モデル動物であり、低比重リポ蛋白（Low density lipoprotein, LDL）レセプターの異常に起因する高コレステロール血症が特徴である⁴⁾。また、近年では、こうした自然発症モデル以外にも遺伝子組換え技術を利用して、ヒト疾患モデルあるいは動物工場として様々な遺伝子改変ウサギが開発されている。ヒト疾患モデルとしては、脂質代謝や動脈硬化に関連するリポ蛋白や酵素の遺伝子を導入したトランスジェニック（Tg）ウサギが多く報告されている⁵⁾。その他にも、心疾患や炎症、眼疾患等の疾患モデルとなるTgウサギも開発されている⁶⁾。動物工場は、遺伝子組換え技術により、有用な蛋白質や生理活性物質を動物の乳汁中に産生させる方法であり、乳汁中に産生された目的物質を精製、回収することで大量かつ安価に生産することが可能となる。例えば、現在、培養細胞等を用いて生産されている医薬品を動物工場で産生させる事により生産コストを削減することができる。世界で初めての動物工場による医薬品は、GTC Biotherapeutics社による遺伝子改変ヤギを使って生産されたヒトアンチトロンビンIIIであり、2006年にヨーロッパで認可されている。動物工場では、乳汁中に目的のタンパク質を産生させることからウシやヤギ等の乳量の多い動物種が適していると考えられる。ウサギは、ウシやヤギと比較して1頭当りの乳量は少ないものの、乳汁中の蛋白濃度が高度であること、性成熟期間が4～5ヵ月と短期間であること、実験室内での飼育管理が容易であること等か

ら小規模生産、短期開発に適した動物種として利用価値が高いと考えられている。

このように、近年では、医学生物学研究や医薬品の開発を目的に多くのウサギ系統が開発・確立されている。しかし、これらの系統は、個々の開発者により独自に維持・保存されているのが現状で、統括的な収集・保存・提供等を目的としたウサギのバイオリソースセンターはないようである。ただし、ウサギを家畜として利用することの多いヨーロッパでは、研究資源というよりも家畜としての品種保存を目的に凍結胚による保存が実施されている。例えば、フランスのThe French National Cryobank (<http://www.cryobanque.org/>)では、1999年からウシ、ヤギ、ヒツジ、ブタ、家禽等の品種保存を実施しているが、この中にはウサギも含まれており、いくつかのウサギ品種が凍結胚で保存されている。しかし、あくまでも産業家畜としての意味合いが強く、研究用としての保存を目的としたものではない。

3. ウサギ精子・胚による凍結保存

実験動物の系統保存を行なう方法として、個体で維持する方法と凍結精子・胚で保存する方法が挙げられる。個体で維持する場合は、飼育スペースの確保と毎日の飼育管理業務、また、品質を維持するための定期的な微生物学的ならびに遺伝学的モニタリング等の実施が必要不可欠であり、これらに関連する労力と費用が発生する。いっぽう、凍結精子・胚で保存する場合、保管のための液体窒素コンテナと定期的な液体窒素の補充が必要であるが、個体での維持に比較すると少ない手間とコストで長期間安定して維持することが可能である。ウサギの系統保存を行なう場合、ウサギは身体が大きいことから個体での維持には広い飼育スペースが必要となる。また、ウサギは近交系でないことから近交退化を防ぐために、ある程度大き

表1 ウサギ精子および胚の凍結保存の比較

比較項目	精子	胚
凍結保存手技	報告あり	報告あり (桑実期胚)
採取方法	容易 (人工陰による射出精液)	煩雑 (過排卵処置後, 卵管or子宮灌流)
保存方法	液体窒素中	液体窒素中
個体を得る方法	容易 (人工授精)	煩雑 (卵管もしくは子宮内への胚移植)
凍結にかかる費用	低	高

なコロニーで維持する必要がある。これらのことを考慮すると、凍結精子・胚による保存は、ウサギにおいてもっとも効率的で有用な方法であると考えられる。すでにマウス・ラットでは、凍結胚で保存する方法が広く一般的に行なわれている。しかし、そのためには、その動物種で精子・胚の凍結技術や保存された精子もしくは胚から個体を得るために必要な生殖工学等の関連技術が確立されていること、また、それらの技術を習得していること等が必須となってくる。

ウサギ精子・胚の凍結保存に関しては、古くから多くの報告があるものの、それぞれの研究者が様々なプロトコールで進めているのが現状であり、その成績もまちまちで、標準的な手技が確立されているとは言い難い。しかし、少なくとも技術的にはウサギの精子ならびに胚を凍結保存することは可能であると言える。では、精子と胚による凍結保存を比較した場合、どちらがよいのであろうか？表1にそれぞれウサギの精子と胚による凍結保存の比較についてまとめてみた。

まず、凍結用の精子・胚の採取について比較すると、精子の場合、人工陰を用いて採取することが容易であり、同じ雄ウサギから非侵襲的に繰り返し採取することも可能である。いっぽう、胚の場合、一般的に効率的に胚を採取するため、胚採取に先立ちホルモン処置による過排卵処置を行なう必要がある。さらに、胚の採取は、ウサギの安

楽死後あるいは麻酔下で卵管もしくは子宮灌流により採取しなければならない。したがって、胚の場合、採取までの準備や採取の方法が煩雑で精子採取に比べて技術的にも難しいと思われる。次に、凍結保存された精子・胚から個体を得る方法について比較すると、凍結精子では、融解後の精子を用いて直接人工授精を行なうことで産仔を得ることができる。いっぽう、凍結胚では、融解後の胚を麻酔下で雌ウサギの卵管もしくは子宮内に移植手術を行なう必要がある。また、胚移植を行なう雌ウサギは、凍結保存時の胚の発生ステージと同期化させるため、事前にホルモン注射もしくは精管結紮雄と交配し、偽妊娠の状態を誘起しておかなければならない。したがって、凍結胚から産仔を得る場合も、凍結精子と比較すると煩雑で、技術的にも難しいと思われる。以上のことを考え合わせると、ウサギでは、凍結精子による保存が技術的にも容易、コスト的にも安価であり、非常に利用価値が高いということが示唆される。

しかし、凍結精子もしくは胚での保存を実施する際、保存する系統の遺伝形質がどのように伝達されるかという点に注意する必要がある。例えば、先に紹介したWHHLウサギは、LDLレセプター変異の劣勢遺伝である。この場合、WHHLウサギの雄から採取した精子を凍結保存し、保存された凍結精子から個体を得る際に、野生型の雌ウサギに人工授精を行なえば、得られる産仔は、LDLレセ

プターの遺伝子型に関してはヘテロ型となる。したがって、LDLレセプター変異がホモ型の子孫を得るためには、もう一度ヘテロ型同士で交配する必要がある。ウサギの性成熟には約半年ほどかかることから、保存した凍結精子からホモ型個体のウサギコロニーを再構築するには1年以上かかってしまうことになる。このような場合、凍結精子よりも凍結胚で保存した方がウサギコロニーの再構築の時間短縮には有利であると考えられる。目的の遺伝子型がホモ型の胚を凍結保存することにより、胚移植後にホモ型の産仔を得ることができる。さらに、目的の表現型が単一遺伝子ではなく多遺伝子によって支配されているような場合も、系統保存には、凍結精子ではなく凍結胚による保

存もしくは個体によるコロニー維持が適していると考えられる。

これに対し、外来遺伝子を導入して作出したTgウサギでは、導入された外来遺伝子の次世代への伝達に着目すれば十分であることから、凍結精子による保存で十分その目的を達することができると考えられる。したがって、凍結精子による保存は、Tgウサギの系統の保存には、非常に適した方法であると考えられる。実際、筆者らの施設では、これまでに開発したTgウサギについて凍結精子での維持・保存を進めている。現在、佐賀大学総合分析実験センターで維持・保存しているTgウサギ系統を表2に示した。表に挙げたウサギ系統は、すでに凍結精子による保存を完了している。

表2 佐賀大学で維持・保存しているトランスジェニックウサギ系統

導入遺伝子	病態モデル	文献
Human apo (a)	脂質代謝, 動脈硬化	Fan J. <i>et al.</i> (1999), <i>Biochem Biophys Res Commun</i> , 255 :639-644. Fan J. <i>et al.</i> (2000), <i>J Lipid Res</i> , 41 :1004-1012. Fan J. <i>et al.</i> (2001), <i>Arterioscler Thromb Vasc Biol</i> , 21 :88-94. Ichikawa T. <i>et al.</i> (2002), <i>Am J Pathol</i> , 160 :227-236. Sun H. <i>et al.</i> (2002), <i>J Biol Chem</i> , 277 :47486-47492. Kitajima S. <i>et al.</i> (2007), <i>Atherosclerosis</i> , 193 :269-276.
Human apoAII	脂質代謝, 動脈硬化	Koike T. <i>et al.</i> (2009), <i>Arterioscler Thromb Vasc Biol</i> , 29 :2047-2053.
Human LPL	脂質代謝, 動脈硬化 肥満	Fan J. <i>et al.</i> (2001), <i>J Biol Chem</i> , 276 :40071-40079. Koike T. <i>et al.</i> (2004), <i>J Biol Chem</i> , 279 :7521-7529. Ichikawa T. <i>et al.</i> (2004), <i>Lab Invest</i> , 84 :715-726. Kitajima S. <i>et al.</i> (2004), <i>Diabetologia</i> , 47 :1202-1209. Liu E. <i>et al.</i> (2005), <i>Metabolism</i> , 54 :132-138. Ichikawa T. <i>et al.</i> (2005), <i>Atherosclerosis</i> , 179 :87-95. Koike T. <i>et al.</i> (2005), <i>Cardiovasc Res</i> , 65 :524-534.
Human CRP	動脈硬化 炎症	Koike T. <i>et al.</i> (2009), <i>Circulation</i> , 120 :2088-2094.
Human MMP-12	動脈硬化 炎症	Fan J. <i>et al.</i> (2004), <i>Transgenic Res</i> , 13 :261-269. Wang W. <i>et al.</i> (2004), <i>Am J Pathol</i> , 165 :1375-1383. Liang J. <i>et al.</i> (2006), <i>Circulation</i> , 113 :1993-2001. Yamada S. <i>et al.</i> (2008), <i>Am J Pathol</i> , 172 :1419-1429.
Human VEGF	肝内血管腫 (Kasabach-Merritt症候群) 糸球体腎炎	Kitajima S. <i>et al.</i> (2005), <i>Lab Invest</i> , 85 :1517-1527. Liu E. <i>et al.</i> (2007), <i>J Am Soc Nephrol</i> , 18 :2094-2104.

LPL, Lipoprotein Lipase; CRP, C-reactive Protein; MMP-12, Macrophage Metalloproteinase-12; VEGF, Vascular Endothelial Growth Factor.

これらのTgウサギの分与や、この他に、現在開発中の遺伝子改変ウサギ等に関しては筆者らの施設のホームページを参照して頂きたい (<http://www.animal.med.saga-u.ac.jp/>)。次に筆者らの施設の例として、ウサギ精子の凍結保存について言及したい。

4. ウサギ精子の凍結保存

一般に、精子をそのまま凍結しても融解後の生存率は極めて悪い。そのため、精液を適切な凍害保護剤を加えた保存溶液で希釈した後に凍結する方法がとられている。また、精子の急速な冷却も凍結融解後の生存性を低下させることが知られている(低温ショック)。そこで、精子を室温から4~5℃まで、一旦、ゆっくりと冷却した後、凍結操作を行なう方法が行なわれている。しかし、これらの手順は、動物種によって大きく異なる。これまで、ウサギの精子に対する凍害防止剤として、グリセロール、エチレングリコール、ジメチルスルホキシド(DMSO)およびアミド類等が報告されている⁵⁾。グリセロールは、ウシ等の家畜においてもっとも一般的な凍害保護剤として知られているが、ウサギでは凍結融解後の精子を用いた人工授精の成績は低く、効果的な凍害保護剤ではないとされている。筆者らは、これまで報告されている上記の凍害保護剤の比較検討の結果から、アセトアミドが凍結融解後の精子運動率でもっとも安定した成績を示すことを観察しており、凍害保護剤としてアセトアミドを使用してウサギ精子の凍結保存を進めている。近年、Kashiwazaki⁶⁾らも凍害保護剤として、それぞれ1.0 Mのグリセロール、ラクトアミド、アセトアミドおよびDMSOを比較検討した結果、日本白色種ウサギにおける精子の凍害保護剤として、ラクトアミドとアセトアミドが効果的であったと報告している。

筆者らの施設における精子凍結の成績を紹介す

ると、先に表2にしたTgウサギについては、それぞれ世代毎に精子をストローで凍結保存しており、現在、本数にして約1,000本を保存している。これらの凍結精子の融解後の精子運動率は、 $34.5 \pm 9.4\%$ である(凍結時に1本を融解して精子運動率を確認している)。また、これまでの凍結精子を用いた人工授精の成績は、妊娠率70.1%、平均産仔数 4.4 ± 2.7 匹($n=77$)である。ちなみに、新鮮精子を用いた人工授精の成績は、妊娠率77.3%、平均産仔数 6.0 ± 2.7 匹($n=172$)である。ただし、新鮮精子の場合は、雌ウサギ1匹当たり 10×10^6 個の運動精子を用いて人工授精を行なっているが、凍結精子の場合は、融解後に、 $20 \sim 40 \times 10^6$ 個の運動精子を用いて人工授精を実施している。新鮮精子と比較すると成績(効率)は低いものの、系統を保存する目的には十分に有用であると考えられる。

この他にも、精子凍結技術は、系統維持・保存のためだけではなく生体に代わる輸送手段としても利用できる。もちろん、凍結精子だけではなく凍結胚による輸送も有用であると考えられる。生体での輸送は、輸送中の温湿度や飲水の管理などが必要な上、輸送中の動物へのストレスや逃亡、死亡といった事故が懸念される。しかし、生体の輸送に代わって凍結精子・胚で輸送を行なえば、これらの輸送時に懸念される問題や事故の発生防止になるだけでなく、輸送コストの削減にもつながる。実際に、筆者らは、2005年に補体成分C6欠損ウサギをドイツのJohanes-Gutenberg大学から導入する際に、生体の輸送ではなく凍結精子による輸送を実施した⁷⁾。その際、輸送された凍結精子を融解して5匹の日本白色種ウサギの雌に人工授精したところ、4匹が妊娠し、全部で11匹の産仔を得ることに成功している。

5. おわりに

これからも医学生物学研究のために様々な疾患モデル動物等が作製され、多くの研究成果がもたらされることが期待される。現在、実験動物として広く用いられているマウスでは適さない研究分野もあり、マウスにかわる実験動物種の開発が切望されている。ウサギもその中の動物種の一つである。今後、医学生物学研究や医薬品開発への益々の利用に向けて、ウサギのゲノム解析、遺伝子組換え技術、精子・胚の凍結保存等の関連技術の進展・確立、統括的なバイオリソース事業の整備等が望まれる。

参考文献

- 1) 科学技術・学術審議会 他：バイオリソース整備戦略のための報告書（平成18年6月28日）
- 2) 塩見雅志, 伊藤 隆：高脂血症・動脈硬化に関する研究におけるWHHLウサギを用いた研究の貢献. アニテックス, **15**: 11-14, 2003.
- 3) Fan, J. and Watanabe, T.: Transgenic rabbits as therapeutic protein bioreactors and human disease models. *Pharmacol. & Therapeutics*, **99**: 261-282, 2003.
- 4) Shiomi, M. and 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) Mocé, E. and Vicente, JS.: Rabbit sperm cryopreservation: A review. *Anim. Reprod. Sci.*, **110**: 1-24, 2009.
- 6) Kashiwazaki, N., Okuda, Y., Seita, Y. *et al.*: Comparison of glycerol, lactamide, acetamide and dimethylsulfoxide as cryoprotectants of Japanese white rabbit spermatozoa. *J. Reprod. & Develop.*, **52**: 511-516, 2006.
- 7) Liu, E., Kitajima, S., Wiese, E. *et al.*: Re-establishment of complement C6-deficient rabbit colony by cryopreserved sperm transported from abroad. *Exp. Anim.*, **56**: 167-171, 2007.

原 著

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

Examination of utility of sperm cryopreservation for preservation of transgenic rabbit lines: Fertility performance of transgenic rabbit's sperm cryopreserved for 5.6 years

西島 和俊¹⁾, 山口 慎二¹⁾, 森本 正敏²⁾, 渡辺 照男¹⁾, 北嶋 修司¹⁾

Kazutoshi NISHIJIMA¹⁾, Shinji YAMAGUCHI¹⁾, Masatoshi MORIMOTO²⁾,
Teruo WATANABE¹⁾, Shuji KITAJIMA¹⁾

(Received 3 September 2010 / Accepted 10 September 2010)

Summary

Sperm cryopreservation should be the most efficient way to preserve transgenic (Tg) rabbit lines, since rabbit semen is easily collectable. Though the frozen sperm is assumed to be maintained in liquid nitrogen almost permanently, the reliability of a long-term cryopreservation has not been examined in rabbits. In this study, we determined the fertilization ability of long-preserved (5.6 years) sperm derived from human lipoprotein lipase (hLPL)-Tg rabbit. Motility of frozen and thawed was 36.3%, which was not significantly different from that when the same sperm was thawed immediately after frozen (41.7%). Five virgin female Japanese white rabbits were inseminated artificially (20×10^6 sperms/head) with the thawed long-preserved sperm. As a result, the pregnancy rate was 60.0%, the mean litter size was 5.3 and the weaning rate was 93.8%. When fresh semen from the same male hLPL-Tg rabbit was inseminated artificially (10×10^6 sperms/head), the pregnancy rate was 62.5%, the mean litter size was 7.2 and the weaning rate was 75.8%. The result indicated that Tg rabbit sperm cryopreserved for 5.6 years had fertilization ability, and sperm cryopreservation would be an adequate method for preservation of Tg rabbit lines.

緒 言

近年の遺伝子工学, 発生工学の発達により, 多くの遺伝子改変動物が作製され医学, 生物学の分野における研究に広く用いられている。このような中, 作製された遺伝子改変動物をバイオリソースとして維持・保存する必要性が高まっている。ナショナルバイオリソースプロジェクト (NBRP) ではライフサイエンス研究に有用なバイオリソースの整備を目的とし, マウス・ラットを始めニホンザルから植物, 微生物に至るまで様々な生物が収集・保存されている (<http://www.nbrp.jp/>)。さらに,

バイオリソースの質の向上を目指し, 保存技術の改良やゲノム解析などによるバイオリソースの付加価値向上など時代の要請に応えた整備が進められている。

佐賀大学では, ヒト病態モデル動物としての遺伝子改変 (Tg) ウサギを開発すると共に, その維持・保存に取り組んできた^[14]。ウサギは, コレステロールエステル転送蛋白活性をもち, 血中の主要なリポ蛋白は低比重リポ蛋白であるなど脂質代謝系がヒトに近く, 動脈硬化に対して感受性を有することから^[13]当該分野の研究には不可欠な実験動物である。これまでのところ, ウサギ

¹⁾佐賀大学総合分析実験センター 生物資源開発部門
〒849-8501 佐賀市鍋島5-1-1

²⁾熊本保健科学大学リハビリテーション学科
〒861-5598 熊本市和泉町325番地

¹⁾Division of Biological Resources and Development, Analysis Research Center for Experimental Sciences, Saga University, 5-1-1 Nabeshima, Saga 849-8501, Japan

²⁾Department of Rehabilitation, Kumamoto Health Science University, 325 Izumimachi, Kumamoto 861-5598, Japan

はNBRPには採用されていないが、今後、ES細胞やiPS細胞の樹立、Zinc-Finger Nuclease技術^[3]の応用など、ウサギにおける遺伝子工学技術が発展すれば、さらに有用なモデルとなり得るため、バイオリソースとしてその系統保存も重要性が増すと考えられる。

動物の保存方法としては、個体による系統維持のほか、凍結胚・凍結精子による保存が行われている^[7]。保存方法は動物の種や使用目的、設備、経費等を考慮して選択する必要がある。ウサギはマウスやラットに比較して大型であることから、個体による系統維持には飼育スペースやコストがかかるため、凍結胚や凍結精子による系統保存が効率的である。ウサギでは、射出精液の採取や人工授精が容易に行えることから、精子凍結による保存が簡便かつ経済的であると考えられる^[4, 14]。そのため、我々はこれまでに開発したTgウサギの系統について、主に凍結精子による系統維持を進めてきた。一般に、液体窒素中の凍結精子は半永久的に保存できるとされるが、ウサギにおいて、長期にわたる精子凍結保存の信頼性については検討されていない。そこで、Tgウサギの系統保存のための精子凍結保存の有用性を検討する目的で、佐賀大学において長期保存中のTgウサギ1系統の凍結精子について、融解後の精子運動率、人工授精後の妊娠率、産仔数などを指標とした受精能、さらに導入遺伝子、表現型の次世代への伝達について検討を行った。

材料および方法

本実験は、すべて佐賀大学動物実験安全管理規則に則って行われた。

1. 動物

6月齢の未経産メス日本白色種ウサギ (JW/CSK, 日本SLC, 浜松) 5匹を使用した。ウサギは温度 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 15\%$ 、照明時間が明期12時間 (8:00~20:00) 暗期12時間 (20:00~8:00) の飼育室で水洗架台にて飼育した。ウサギにはCRB-1 (日本クレア, 東京) を一日当たり120g、給餌した (出産予定日1週間前から離乳時までは自由摂取とした)。飲水は自動給水装置により水道水を自由に摂取させた。

2. 凍結精子

当施設で凍結後、液体窒素中に約5.6年間保存しているヒトリボ蛋白リパーゼ (hLPL) Tgウサギ (遺伝子型, hLPL: +/0)^[1, 6]由来の凍結精子を使用した。以下に精子凍結時のプロトコルを記す。

- 1) 人工腔を用いて精液を採取。
- 2) 200xgで15分間遠心分離を行い、精子数が 600×10^6

個/mlとなるように上清を除去後、Egg-Yolk Hapes extender (EYH, 125 mM Glucose, 105 mM Lactose, 91 mM Raffinose, 10 mM HEPES, 6% Acetamide, 20% Egg-yolk, 1000 U/ml Streptomycin, 1000 U/ml Penicillin G, pH: 7.2) で6倍に希釈。

- 3) クールサーモユニット CTU-N (タイテック, 埼玉) を用いて精子を 25°C から 5°C まで $-0.2^\circ\text{C}/\text{min}$ の速度で冷却した後、精子を0.5mlのプラスチックストロー (富士平工業, 東京) に充填。
- 4) 精液を充填したストローを 4°C に設定した冷蔵庫に30分間静置。
- 5) 精液入りストローを液体窒素蒸気中に移して15分間静置した後、液体窒素に浸漬して凍結。

3. 人工授精および凍結精子の受精能の評価

凍結保存されていた精子は、液体窒素中からとり出したストローを 37°C の温湯に30秒間浸漬することにより融解した。融解後、改良ノイバウエル血球計算盤を用いて、不動精子数および総精子数を計測し、運動精子数および精子運動率を、以下の計算式により算出した。

$$\text{運動精子数} = \text{総精子数} - \text{不動精子数}$$

$$\text{精子運動率} (\%) = \frac{\text{運動精子数}}{\text{総精子数}} \times 100$$

融解後の精子を運動精子数で 40×10^6 個/mlとなるようにトリス・クエン酸・グルコース緩衝液 (313.79 mM Trizma base, 103.07 mM Citric acid, 33.3 mM Glucose, Kanamycin 80 mg/L) で調整後、ガラスピペットを用いて、 20×10^6 個/0.5mlの精子をメスウサギの腔内に注入した。精子注入後、排卵を誘起するため1匹当たり5.0Uのヒト絨毛性ゴナドトロピン (あすか製薬, 東京) を耳静脈から静脈内注射した。凍結精子の受精能の評価として、人工授精後の妊娠率、平均産仔数、離乳率を算出した。

4. 導入遺伝子の伝達と表現型の評価

離乳時に仔ウサギの組織片からゲノムDNAを抽出し、hLPL遺伝子に特異的なプライマーを用いてPCRを行い、導入遺伝子が伝達されたか否かを確認した。

人工授精により得られたウサギが16週齢になった時点で、16時間の絶食の後に耳動脈より採血した。血清中のトリグリセライド (TG) 値をTG測定キット (和光純薬工業, 大阪) を使用して測定し、Tgおよびnon-Tg (対照) ウサギと比較した。

5. 統計解析

妊娠率と離乳率についてはFisher's exact testを用

いて、平均産仔数、ならびに血中TG値については Student's *t*-testを用いてそれぞれ有意差検定を行った。

結果

人工授精に使用した精子の凍結前の運動率は90.0%、凍結直後に融解した際の運動率は41.7%であった。約5.6年凍結保存された後に融解した精子の運動率は36.3%であり、凍結直後に融解した時の運動率に比較して顕著な低下は見られなかった(表1)。

表1 ヒトLPL-Tgウサギの精子運動率の比較

	精子運動率 (%)
新鮮精子 (凍結前)	90.0
凍結融解精子	
凍結直後	41.7
5.6年間保存後	36.8

人工授精を実施したメスウサギ5匹のうち3匹が出産し(妊娠率, 60.0%), 合計16匹(平均産仔数, 5.3 ± 0.9 匹)の仔ウサギが得られた。出生した仔ウサギのうち, 15匹が離乳(離乳率, 93.8%)した(表2)。今回使用した精子を供与したオスhLPL-Tgウサギ生存時の新鮮精子を用いた人工授精成績 (10×10^6 個/匹で実施)は, 妊娠率が62.5%, 平均産仔数が 7.2 ± 0.5 匹, 離乳率が75.8%であった(表2)。

離乳時の仔ウサギの性別はオス10匹とメス5匹であった。PCRによる遺伝子解析の結果, オスでは5匹がTgで5匹がnon-Tg, メスでは2匹がTgで3匹がnon-Tgで

表2 ヒトLPL-Tgウサギの人工授精成績

	注入精子数 ($\times 10^6$ 個/匹)	交配メス (匹)	妊娠率 (%)	平均産仔数 ¹⁾ (匹)	離乳率 (%)	性比 ²⁾	
						オス	メス
新鮮精子	10	8	62.5	7.2 ± 0.5	75.8	17/25	8/25
凍結精子 (5.6年間保存)	20	5	60.0	5.3 ± 0.9	93.8	10/15	5/15

1) 数値は mean \pm SE

2) 離乳時のオスもしくはメスの匹数/離乳時の総匹数

表3 ヒトLPL-Tgウサギの血中トリグリセライド (TG) 値

	オス		メス	
	匹数	TG (mg/dL) ¹⁾	匹数	TG (mg/dL) ¹⁾
hLPL (-/0)	5	34.5 ± 5.3	2	36.1 ± 2.5
hLPL (+/0)	5	$7.1 \pm 1.6^*$	3	10.9 ± 2.2

¹⁾ 数値は mean \pm SE

*: $p < 0.01$ vs hLPL (-/0)

あった(表3)。これらのウサギの血清中TGの平均値はTgウサギのオスが 7.1 ± 1.6 mg/dL, メスが 10.9 ± 2.2 mg/dLであり, non-Tgウサギのオス 34.5 ± 5.3 mg/dL, メス 36.1 ± 2.5 mg/dLに比べ明らかな低値を示した(表3)。

考察

精子の凍結保存は, 種や系統の保存のために様々な動物で行われているが^[7], 種や系統により適した精子の凍結方法が異なることが明らかになっている^[8-11]。実験動物において, マウスでは標準的な精子凍結法が確立されて専用試薬が市販されているのに対し^[11], ウサギでは未だ標準的な方法が存在せず, 研究者により様々なプロトコルが存在する^[8,14]。ヒト疾患モデル動物など貴重な系統を凍結精子で維持する場合, 最も重要な点は保存期間中に精子の生存率や受精能が低下することなく長期間安定的に保存できるということである。一般に, 液体窒素での保存期間は半永久的といわれているが, 検証的な研究は少ない。ヒトでは28年間凍結保存された精子で受胎したことが実証されているが^[2], ウサギにおいて長期間凍結保存された精子の受精について検討した報告は見当たらない。本研究により, 我々が用いたプロトコルで凍結保存したウサギ精子は, 約5.6年間保存した後も受精能を保持していたことが確認された。凍結精子と新鮮精子の受精能については, 人工授精に用いた精子の量が異なるため直接比較することは出来ないが, 新鮮精子 (10×10^6 個/匹)に対し, 今回の凍結融解後の精子数を2倍 (20×10^6 個/匹)用いた際の人工授精の成績は, 平均産仔数が低い傾向にあったものの, 妊娠率, 平均産仔数, 離乳率いずれにおいても有意な差は認められな

かった。

凍結精子によるTgウサギの系統保存においては、凍結精子の受精能に加え、得られた産仔に導入遺伝子が伝達され、表現系が維持されることも重要である。LPLは、食事由来のカイロミクロンや肝臓で合成された超低比重リポ蛋白といったTGに富むリポ蛋白中のTGを遊離脂肪酸とグリセロールに加水分解する酵素である。このため、hLPL-TgウサギではLPL活性の亢進にともない表現型として著しい低TG血症を示す^[1,6]。本研究において、凍結融解後の精子から人工授精で得られたhLPL-Tgウサギの血清中TG濃度は、同腹のnon-Tgウサギに比べて有意に低い値を示した(表3)。これは、Tgウサギで導入遺伝子が伝達されるとともに導入された遺伝子が発現し、産生されたLPLが活性を維持していることを示していると考えられる。

凍結胚では目的遺伝子をホモ接合体で保存できるのが利点であるが、胚の採取や融解後の移植には技術的な修練が必要である^[4,5]。一方、凍結精子では、精子の採取や人工授精の手技は比較的容易であるが^[4]、凍結保存された精子から個体を得るためには他のウサギ由来の卵子と受精させる必要があることから、目的遺伝子をヘテロ接合体の状態では保存できない。しかし、Tgウサギの場合、導入された外来遺伝子はヘミ接合体の状態でも効果を示すことから、必ずしも導入遺伝子をホモ接合体の状態でも保持する必要はない。また、ウサギは近交系でないことから、出来るだけ遺伝子背景を揃える目的で、しばしば同腹のウサギを同一の実験に用いることがあるが、この際には交配に用いる親の遺伝子型がヘミもしくはヘテロ接合体である方がむしろ有利である。なぜなら、遺伝子型がヘミ接合体のTgウサギを用いて野生型ウサギと交配を行うことで、Tgとnon-Tgの仔ウサギが1:1で得られると期待されるからである。これらのことから、Tgウサギでは、凍結精子による系統の保存が最も効率的であると考えられる。

本検討より、我々が用いたプロトコルで凍結保存したウサギ精子は、少なくとも約5.6年間は液体窒素中に安定的に保存可能であることが明らかとなった。Tgウサギの系統保存には、凍結精子の保存が有用であると考えられることから、今後、バイオリソースとしてのTgウサギの系統保存・供与などの基盤体制の整備に向け、ウサギ精子の凍結保存におけるより長期保存の信頼性の確認、ウサギの品種・系統による最適な凍結方法の開発、凍結融解後の精子を用いた効率的な人工授精の条件の確立などの検討を進めて行く必要がある。

謝 辞

本研究は、科学研究費補助金(基盤研究C、課題番号22500386)を受けて実施した。

引用文献

- [1] Araki, M., Fan, J., Challah, M., Bensadoun, A., Yamada, N., Honda, K., and Watanabe, T. (2000). Transgenic rabbits expressing human lipoprotein lipase. *Cytotechnology*, **33**, 93-99.
- [2] Feldschuh, J., Brassel, J., Durso, N., and Levine, A. (2005). Successful sperm storage for 28 years. *Fertil. Steril.*, **84**, 1017.
- [3] Geurts, A.M., Cost, G.J., Freyvert, Y., Zeitler, B., Miller, J.C., Choi, V.M., Jenkins, S.S., Wood, A., Cui, X., Meng, X., Vincent, A., Lam, S., Michalkiewicz, M., Schilling, R., Foeckler, J., Kalloway, S., Weiler, H., Ménoret, S., Anegon, I., Davis, G.D., Zhang, L., Rebar, E.J., Gregory, P.D., Urnov, F.D., Jacob, H.J., and Buelow, R. (2009). Knockout rats via embryo microinjection of zinc-finger nucleases. *Science*, **325**, 433.
- [4] Kitajima, S. (2009) Improvement of Rabbit Production. *In* Rabbit Biotechnology: Rabbit genomics, transgenesis, cloning and models, pp 3-12, Houdebine, L.M., and Fan, J. (edit), Springer, New York.
- [5] Kitajima, S., Liu, E., and Fan, J. (2009) . Rabbit Transgenesis. *In* Rabbit Biotechnology: Rabbit genomics, transgenesis, cloning and models, pp 37-48, Houdebine, L.M., and Fan, J. (edit), Springer, New York.
- [6] Liu, E., Kitajima, S., Higaki, Y., Morimoto, M., Sun, H., Watanabe, T., Yamada, N., and Fan, J. (2005). High lipoprotein lipase activity increases insulin sensitivity in transgenic rabbits. *Metabolism*, **54**, 132-138.
- [7] Mazur, P., Leibo, S.P., and Seidel, G.E. Jr. (2007). Cryopreservation of the germplasm of animals used in biological and medical research: importance, impact, status, and future directions. *Biol. Reprod.*, **78**, 2-12.
- [8] Mocé, E., and Vicente, J.S. (2009). Rabbit sperm cryopreservation: a review. *Anim. Reprod. Sci.*, **110**, 1-24.
- [9] Nakatsukasa, E., Kashiwazaki, N., Takizawa, A.,

- Shino, M., Kitada, K., Serikawa, T., Hakamata, Y., Kobayashi, E., Takahashi, R., Ueda, M., Nakashima, T., and Nakagata, N. (2003). Cryopreservation of spermatozoa from closed colonies, and inbred, spontaneous mutant, and transgenic strains of rats. *Comp. Med.*, **53**, 639-641.
- [10] Rath, D., Bathgate, R., Rodriguez-Martinez, H., Roca, J., Strzezek, J., and Waberski, D. (2009). Recent advances in boar semen cryopreservation. *Soc. Reprod. Fertil. Suppl.*, **66**, 51-66.
- [11] Shaw, J.M., and Nakagata, N. (2002). Cryopreservation of transgenic mouse lines. *Methods Mol. Biol.*, **180**, 207-228.
- [12] Yanni, A.E. (2004). The laboratory rabbit: an animal model of atherosclerosis research. *Lab. Anim.*, **38**, 246-256.
- [13] 塩見 雅志, 伊藤 隆. (2003). 高脂血症・動脈硬化に関する研究におけるWHHLウサギを用いた研究の貢献. *アニテックス*, **15**, 11-14.
- [14] 北嶋修司, 西島和俊. (2010) 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.

要 約

ウサギは射出精液の採取および人工授精が容易に行えることなどから、凍結精子による系統保存が最も効率的であると考えられるが、長期にわたるウサギ精子の凍結保存の信頼性については検討されていない。そこで、本研究では、我々の施設で長期保存中の遺伝子改変 (Tg) ウサギ由来の凍結精子の受精能について検討を行った。約5.6年間凍結保存されていたTgウサギ1系統の凍結精子を融解し、運動精子数、精子運動率を計測後、運動精子 20×10^6 個/匹を未経産の日本白色種メスウサギ5匹に人工授精した。融解後の精子の運動率は36.3%で、同サンプルを凍結後ただちに融解した際の運動率 (41.7%) に比較して顕著な低下は見られなかった。人工授精した5匹のうち3匹が出産し、妊娠率は60.0%、平均産仔数は5.3匹、離乳率は93.8%であった。同じオスTgウサギの新鮮精子を人工授精 (10×10^6 個/匹) した場合の成績は、妊娠率62.5%、平均産仔数7.2匹、離乳率は75.8%であった。凍結融解精子を用いた人工授精では平均産仔数がやや少なかったが、約5.6年間液体窒素中に凍結保存された精子は良好な受精能を維持していることが確認された。また、導入遺伝子および表現型の子孫への伝達も確認されたことと合わせて、精子凍結保存はTgウサギの系統保存に有用な方法であると考えられた。

ORIGINAL ARTICLE

Human C-reactive protein enhances thrombus formation after neointimal balloon injury in transgenic rabbits

S. MATSUDA,* A. YAMASHITA,* Y. SATO,* S. KITAJIMA,† T. KOIKE,‡ C. SUGITA,* S. MORIGUCHI-GOTO,* K. HATAKEYAMA,* M. TAKAHASHI,* C. KOSHIMOTO,§ Y. MATSUURA,* T. IWAKIRI,* Y. E. CHEN,¶ J. FAN‡¹ and Y. ASADA*¹

*Department of Pathology, Faculty of Medicine, University of Miyazaki, Miyazaki; †Analytical Research Center for Experimental Sciences, Saga University, Saga; ‡Department of Molecular Pathology, Interdisciplinary Graduate School of Engineering and Medicine, University of Yamanashi, Yamanashi; §Department of Bio-resources, Division of Biotechnology, Frontier Science Research Center, University of Miyazaki, Miyazaki, Japan; and ¶Cardiovascular Center, Department of Internal Medicine, University of Michigan, Ann Arbor, MI, USA

To cite this article: 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 YE, Fan J, Asada Y. Human C-reactive protein enhances thrombus formation after neointimal balloon injury in transgenic rabbits. *J Thromb Haemost* 2011; **9**: 201–8.

Summary. *Background:* High plasma levels of C-reactive protein (CRP) constitute a powerful predictive marker of cardiovascular events. Several lines of evidence suggest that CRP has prothrombotic effects. However, whether CRP directly participates in the pathogenesis of thrombosis in vivo has not been fully clarified. *Objective:* To test whether human CRP (hCRP) affects arterial thrombus formation after balloon injury of smooth muscle cell (SMC)-rich or macrophage-rich neointima. *Methods:* We compared the susceptibility of transgenic (Tg) rabbits expressing hCRP ($46.21 \pm 13.85 \text{ mg L}^{-1}$, $n = 22$) and non-Tg rabbits to arterial thrombus formation after balloon injury of SMC-rich or macrophage-rich neointima. *Results:* Thrombus size on SMC-rich or macrophage-rich neointima was significantly increased, and was accompanied by an increase in fibrin content in hCRP-Tg rabbits, as compared with non-Tg rabbits. Thrombus size did not significantly differ between SMC-rich and macrophage-rich neointima in hCRP-Tg rabbits. Tissue factor (TF) mRNA expression and activity in these neointimal lesions were significantly increased in hCRP-Tg rabbits as compared with non-Tg rabbits. The degree of CRP deposition correlated with the elevated TF expression and thrombus size on injured neointima. In addition, hCRP isolated from hCRP-Tg rabbit plasma induced TF mRNA expression and activity in rabbit cultured vascular SMCs. *Conclusions:* These results suggest

that elevated plasma hCRP levels promote thrombus formation on injured SMC-rich neointima by enhancing TF expression, but have no additive effects in macrophage-rich neointima.

Keywords: cardiovascular diseases, prognosis, smooth muscle cells, thrombosis, tissue factor.

Introduction

C-reactive protein (CRP) is an inflammatory acute-phase reactant that has emerged as a powerful predictor of cardiovascular diseases. High levels of plasma CRP are associated with future cardiovascular events in apparently healthy individuals and with a worse prognosis in patients with acute coronary events [1].

On the other hand, CRP has also been implicated in the pathogenesis of cardiovascular diseases such as atherothrombosis. This notion was initially suggested by the demonstration that: (i) CRP is expressed in atherosclerotic lesions [2,3], where its concentration is associated with plaque instability [4]; and (ii) CRP induces proinflammatory changes in cultured vascular cells [5,6]. However, recent studies with transgenic (Tg) rabbits [7] and Tg mice [8–11] from various laboratories have indicated that CRP does not directly participate in the progression of atherosclerosis. These findings are also supported by human genetic studies [12,13], suggesting that CRP triggers cardiovascular events through other mechanisms, such as the promotion of thrombosis. This notion is supported by the following findings. Tg mice expressing CRP have impaired endothelial functions [14], and CRP reduces the expression of tissue-type plasminogen activator (t-PA) [15] and increases that of tissue factor (TF) [16] in vascular cells. In addition, injection of purified CRP activates the blood coagulation system [17]. Danenberg *et al.* [18] demonstrated that human CRP (hCRP)-Tg mice have a higher rate of thrombotic occlusion after arterial injury than non-Tg mice, whereas others have found

Correspondence: Yujiro Asada, Department of Pathology, Faculty of Medicine, University of Miyazaki, 5200 Kihara, Kiyotake, Miyazaki 889-1692, Japan.

Tel.: +81 985 85 2810; fax: +81 985 85 7614.

E-mail: yasada@fc.miyazaki-u.ac.jp

¹These authors are joint senior authors.

Received 17 March 2010, accepted 24 September 2010

that hCRP does not affect the incidence of thrombus in apolipoprotein E knockout mice [19,20]. Regardless of these persistent controversies, mouse models are not apparently appropriate for examining hCRP physiologic functions, because plasma levels of CRP, even in the presence of inflammatory stimuli, are extremely low in mice as compared with humans and rabbits [21].

Recently, we established Tg rabbits expressing hCRP in the liver, and showed that the hCRP-Tg rabbit model might be useful for investigating the relationship between CRP and cardiovascular disease [7]. As in humans, but not in mice, plasma CRP in the rabbit functions as an acute reactant protein during inflammation, and hCRP can activate the rabbit complement system [7]. We previously established a rabbit model of arterial intimal injury and thrombosis [22,23], and examined whether hCRP promotes neointimal proliferation and thrombus formation in this model *in vivo*.

Materials and methods

Transgenic rabbits expressing hCRP under the control of a liver-specific promoter were generated in our laboratory as previously described [7]. Here, we studied male hCRP-Tg rabbits (2.5–3.0 kg) expressing a plasma hCRP concentration of $46.21 \pm 13.85 \text{ mg L}^{-1}$ ($n = 22$) and non-Tg littermates as controls ($n = 25$). All animal research protocols were approved by the Animal Care Committee of Miyazaki University (No. 2006-069-4), and the animals received humane care according to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals prepared by the Institute of Laboratory Animal Resources and published by the US National Institutes of Health.

Femoral artery injury models

Non-Tg rabbits and hCRP-Tg rabbits were fed with a conventional diet (non-Tg, $n = 15$; hCRP-Tg, $n = 12$) or a 0.5% cholesterol diet (non-Tg, $n = 10$; hCRP-Tg, $n = 10$) for 1 week before and 3 weeks after balloon injury to determine the effect of hCRP on the development of thrombus formation.

Neointimal lesions in the femoral artery were induced by the balloon-injury method, as previously described [22,23]. The rabbits were anesthetized with intravenous pentobarbital (25 mg kg^{-1}), and an angioplasty balloon catheter (diameter, 2.5 mm; length, 9 mm; Quantum, Boston Scientific, Galway, Ireland) was then inserted into the femoral artery under fluoroscopic guidance. The catheter was inflated to 1.5 atm and retracted by 50 mm three times to denude the endothelium. The neointimal lesions were collected for analysis 5 days and 3 weeks later (see below).

To induce thrombus formation on the neointimal surface, balloon injury was induced once again 3 weeks after the first balloon injury. A 2F balloon catheter (Baxter Healthcare, Irvine, CA, USA) was inserted via the anterior tibial artery into the femoral artery, inflated to 1.4 atm, and retracted by 30 mm three times. The rabbits were injected with intravenous heparin

(500 U kg^{-1}) 15 min later, and killed with a pentobarbital overdose. Rabbits were also killed 5 days and 3 weeks after the first balloon injury, for assessment of cell proliferation and apoptosis (see Data S1). The rabbits were perfused with 50 mL of 0.01 mol L^{-1} phosphate-buffered saline (PBS) (pH 7.4) and then perfusion-fixed with 4% paraformaldehyde for histologic and immunohistochemical staining.

Blood samples were collected from the medial auditory artery into 3.8% sodium citrate (9 : 1, v/v) for evaluation of blood parameters, platelet aggregation, whole-blood coagulation and platelet adhesion under flow (see Data S1).

Histologic examinations and immunohistochemistry

The femoral arteries were fixed in 4% paraformaldehyde for 24 h at 4 °C, cut into five sections at 4-mm intervals, and embedded in paraffin. Serial sections (3- μm thick) were stained with hematoxylin and eosin (HE). Areas of neointimal lesions and thrombus size were quantified on HE-stained specimens with an image analysis system (Axio Vision 4.0.5; Carl Zeiss, Munchen, Germany) and light microscopy.

Serial sections (3- μm thick) were also immunohistochemically stained with antibodies (Abs) against hCRP, α -smooth muscle actin, rabbit macrophages, TF, rabbit fibrin, glycoprotein IIb–IIIa, and Ki-67 (Table S1). The sections were rinsed with PBS, and incubated with peroxidase-conjugated secondary Abs at room temperature for 60 min; staining was then visualized after the 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride reaction followed by counterstaining with Meyer's hematoxylin. The primary Abs were replaced with mouse non-specific IgG or sheep or guinea pig serum in control sections. Immunostained areas in whole cross-sectional areas of neointima and thrombus were quantified with a color imaging morphometry system (WinRoof, Mitani, Fukui, Japan). All quantitative analyses were performed in a blinded manner by two investigators.

Analysis of TF expression and activity

The neointima of the femoral arteries produced 3 weeks after the first balloon injury was carefully separated from the media and adventitia under a stereomicroscope. Total RNA was extracted with Trizol, and TF mRNA and β -actin expression was determined by quantitative real-time RT-PCR with SYBR Premix Ex Taq kits (Takara Bio, Shiga, Japan), according to the manufacturer's instructions. The panel of the primers is shown in Table S2.

Rabbit plasma clotting time initiated by the neointimal homogenate was measured with a coagulation timer (Thrombotrack, AXIS-SHIELD; PoC AS, Oslo, Norway) [23,24] for evaluation of neointimal TF activity. The neointima was homogenized in Tris-buffered saline (pH 7.4) containing 5 mmol L^{-1} CaCl_2 and 0.1% Triton X (Nakalai Tesque, Kyoto, Japan), with a Polytron PT3000 (Kinematica, Littau, Switzerland). After centrifugation at $2500 \times g$ for 10 min, the supernatant (vessel sample; 100 μL , containing 100 μg of

protein) was incubated for 1 min with rabbit plasma (100 μL) with or without anti-rabbit TF antibody (10 pg mL^{-1} , 4511; American Diagnostica, Stamford, CT, USA) or recombinant human TF pathway inhibitor (250 ng mL^{-1} ; Chemo-Sero-Therapeutic Research Institute, Kumamoto, Japan); clotting was then initiated by adding 20 mmol L^{-1} CaCl_2 (100 μL). The protein concentrations were determined with the BCA protein assay kit (Pierce, Rockford, IL, USA). A standard curve was obtained from serial dilutions of recombinant TF (American Diagnostica), and TF activity is expressed as arbitrary units.

Expression and activity of TF mRNA in cultured vascular smooth muscle cells (SMCs)

Aortic SMCs isolated from the femoral arteries of non-Tg rabbits by the explant technique were cultured in smooth muscle growth medium (SmGM-2 bullet kit; Lonza, Basel, Switzerland) [24] for five passages. Trypsin-EDTA (Sigma, St Louis, MO, USA) was briefly added to 80–90% confluent SMCs, which were then suspended (1×10^5 cells in 100 μL of serum-free medium) in cuvettes and incubated with hCRP (20, 50 and 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) that was affinity-purified from hCRP-Tg rabbit plasma [7]. Total RNA was extracted, and the mRNA expression of TF and β -actin was determined as described above. The TF activity of SMCs was assessed from plasma clotting times. Briefly, rabbit plasma (100 μL) was added to viable SMCs (1×10^5 cells in 100 μL of serum-free medium) in cuvettes for analysis with a coagulation timer (AXIS-SHIELD), and clotting assays were performed as described above.

Statistical analysis

All data are presented as means \pm standard deviations. Differences for individual groups were tested with Student's *t*-test and ANOVA (GraphPad Prism version 4.03; GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Three groups of TF mRNAs and activities were analyzed by one-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple-comparison test in the cell culture study. Platelet adhesion was analyzed in the flow chamber system by two-way ANOVA. Microscopic assessments of femoral arteries, TF mRNA and activity of neointima, blood parameters, platelet aggregation and thromboelastogram assay findings between two groups were compared with Student's *t*-test. Relationships between factors were evaluated with linear regression analysis. Statistical significance was established at $P < 0.05$.

Results

Effects of hCRP on the neointimal lesions

We initially investigated the effects of hCRP on the neointimal lesions of the femoral arteries induced by balloon injury. Figure 1 shows that neointimal lesions at 3 weeks after injury contained mainly SMCs with a few macrophages in rabbits fed

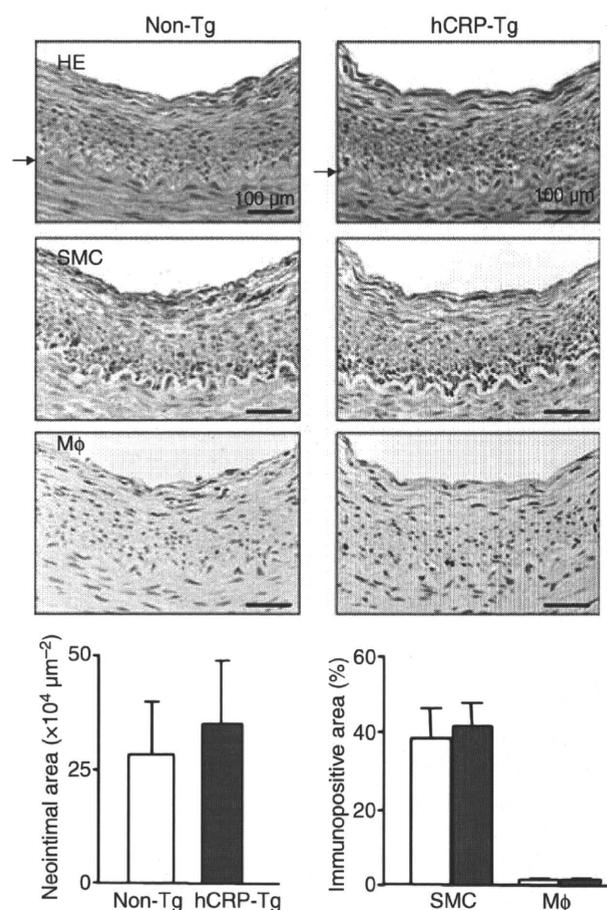


Fig. 1. Neointimal formation 3 weeks after balloon injury. Neointimal lesions mainly contain smooth muscle cells (SMCs) with a few macrophages (M ϕ). Neointimal area and cellular components (SMCs and macrophages) do not significantly differ between transgenic (Tg) and non-Tg rabbits ($n = 6$ per group). Arrowheads indicate internal elastic lamina. hCRP, human C-reactive protein; HE, hematoxylin and eosin.

with a conventional diet, but neointimal size and cellular components (both SMCs and macrophages) did not significantly differ between Tg and non-Tg rabbits. Neither cell proliferation nor apoptosis differed significantly in the neointima of Tg and non-Tg rabbits at 5 days and at 3 weeks after balloon injury (Fig. S1). Immunohistochemical staining frequently revealed hCRP-immunoreactive proteins in the neointimal lesions (but not in the normal intima; data not shown) of hCRP-Tg rabbits (Fig. 2). RT-PCR analysis did not detect any hCRP mRNA transcripts in the neointimal lesions (Fig. S2), suggesting that hCRP-immunoreactive proteins were derived from the circulation.

We immunohistochemically stained the neointima to determine whether hCRP affects TF expression in neointimal SMCs. We found that the level of immunoreactive TF proteins was increased three-fold in hCRP-Tg rabbits as compared with non-Tg rabbits (Fig. 2). Furthermore, TF mRNA expression and activities were increased 1.8-fold and 4.5-fold, respectively, in the neointimal lesions of Tg rabbits as compared with non-Tg rabbits (Fig. 3). Taken together, these data indicated that