

図 1 a) ELISA 法による血中 ApoC-III 濃度、b) post-heparin 血漿における LPL 活性

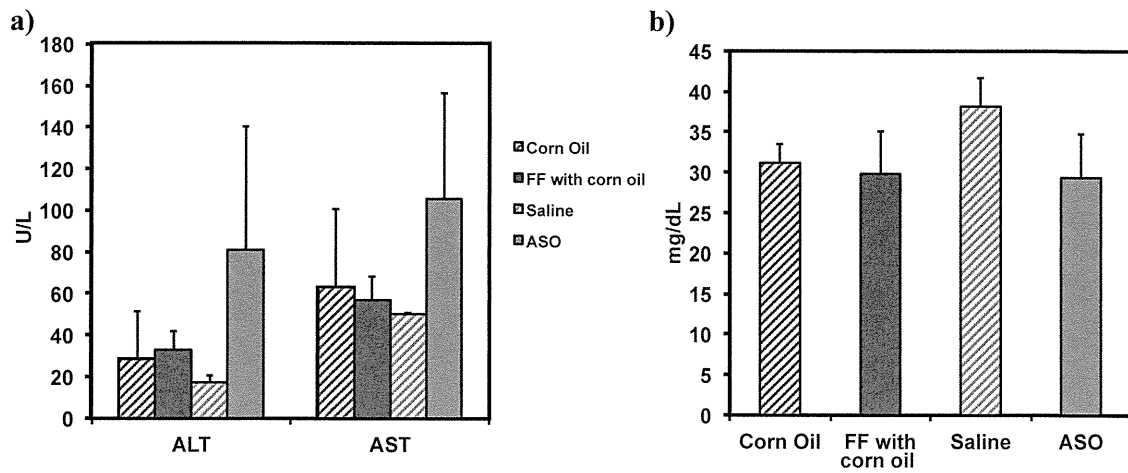


図 2 a) 各種投与群 7 日目の血清中 ALT, AST 濃度、b) BUN 濃度

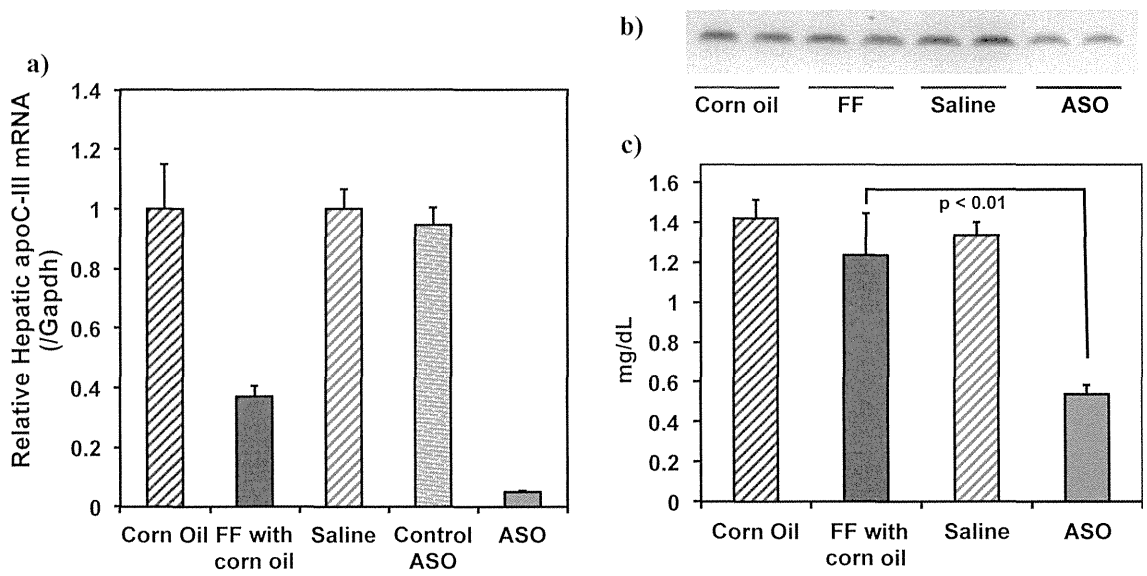


図 3 a) 各種投与群 7 日後の肝臓中 ApoC-III mRNA 発現量、b) 血清中 ApoC-III ウェスタンブロット、c) ELISA 法による血清中 ApoC-III 定量結果

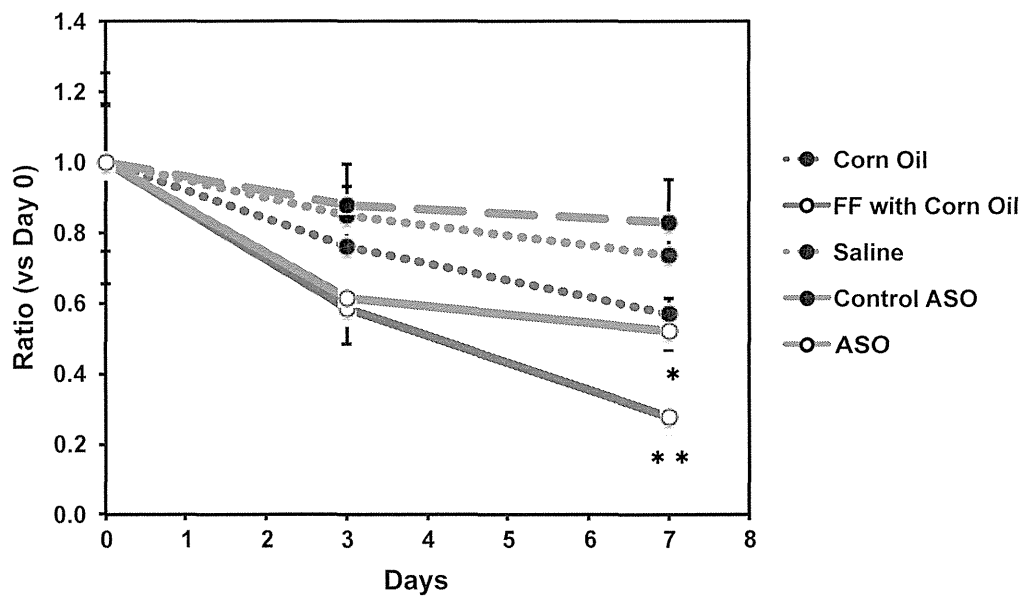


図 4 投与開始を基準とした血中 TG 値の経時的変化

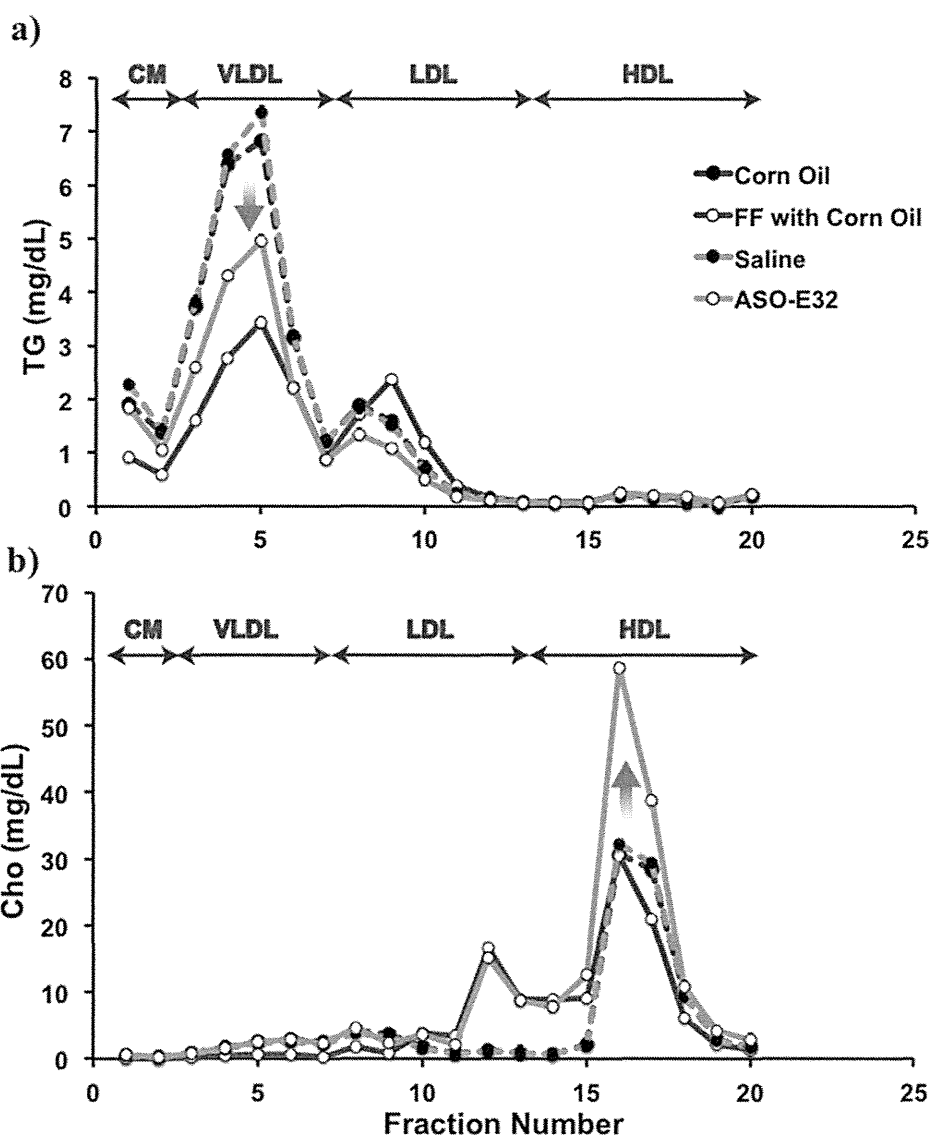


図 5 HPLC によるリポタンパク質分画中 a) TG 濃度、b) コレステロール濃度

表 1 各リポタンパク質分画中の脂質濃度 (mg/dL)

		Corn Oil	FF with corn oil	Saline	ASO
Total Cholesterol		116.67 ± 10.46	99.52 ± 13.42	99.47 ± 4.22	183.09 ± 19.94
Cho	CM	0.24 ± 0.08	0.78 ± 0.22	0.80 ± 0.18	0.89 ± 0.39
	VLDL	2.10 ± 0.31	10.25 ± 1.09	9.37 ± 1.22	9.99 ± 2.61
	LDL	35.34 ± 5.33	12.53 ± 1.26	11.19 ± 0.95	36.23 ± 9.19
	HDL	78.99 ± 5.85	75.96 ± 13.65	78.12 ± 4.98	135.99 ± 11.48
Total Triglyceride		19.36 ± 2.54	30.03 ± 30.03	31.11 ± 4.73	22.20 ± 2.60
TG	CM	1.53 ± 0.35	3.30 ± 3.30	3.69 ± 0.47	2.90 ± 1.11
	VLDL	10.93 ± 0.89	21.29 ± 21.29	22.18 ± 4.28	14.96 ± 2.72
	LDL	5.95 ± 1.64	4.64 ± 4.64	4.55 ± 0.16	3.31 ± 0.98
	HDL	0.96 ± 0.31	0.81 ± 0.81	0.70 ± 0.06	1.04 ± 0.09

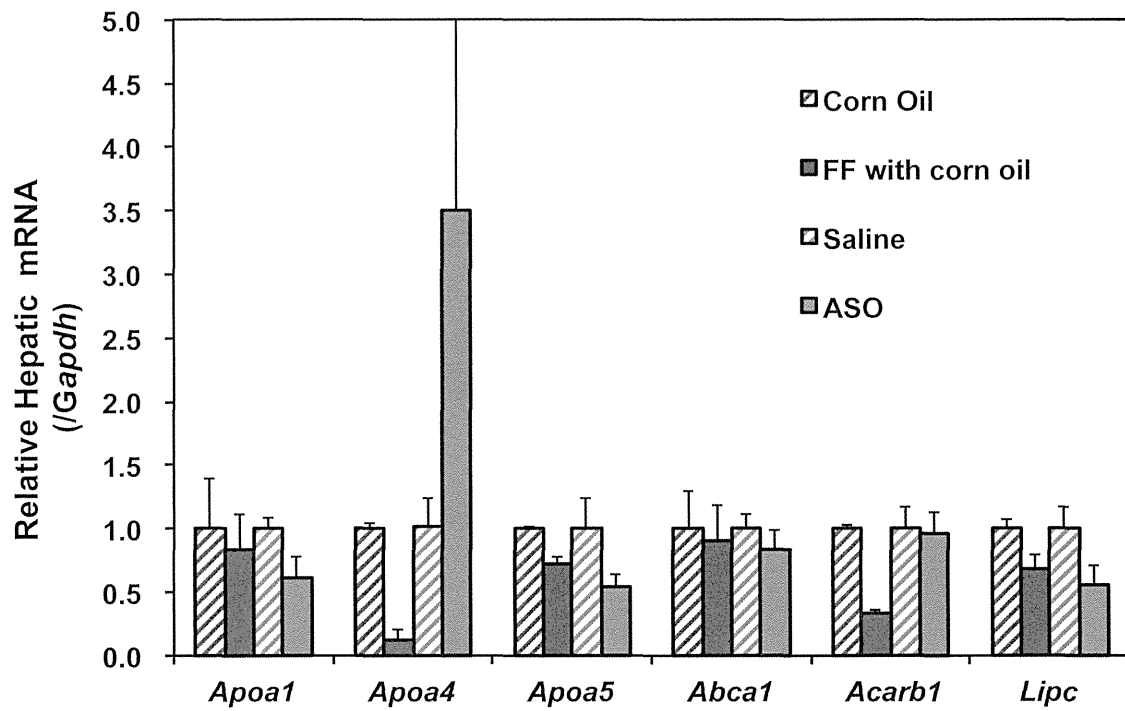


図 6 肝臓における HDL 産生・代謝関連因子の遺伝子発現レベル

アポC3をターゲットとした革新的核酸医薬の有効性及び安全性評価
-ApoE ノックアウトマウスを用いた ApoC-III アンチセンスの抗動脈硬化作用の評価-

分担研究者 柴田 雅朗 大阪保健医療大学大学院・教授

研究要旨

ApoC-IIIアンチセンスによる動脈硬化に対する治療効果ならびに安全性を評価するために、病態モデルマウスを用いて、イメージング解析、病理組織学的なアプローチで解析を行った。【実験1】高脂肪食を1週間自由摂取させたC57BL/6J マウスにapoC-IIIを標的としたBNA搭載型アンチセンス (ASO) を単回皮下投与し、また既存のトリグリセライド低下薬のFenofibrate (FF) を1回/日経口投与し、投与開始の7日後に剖検し、動物の肝臓および腎臓について病理組織学的に解析した。また、肝臓についてはさらにOil red染色を施し、脂肪蓄積の程度について解析した。その結果、病理組織学的検査では、肝細胞に空胞変性を観察し、Oil red染色では肝臓に脂肪の蓄積が亢進している傾向が窺われた。一方、FF投与群では肝細胞の空胞変性や脂肪の蓄積はほとんど正常程度に改善されていた。その反面、FF投与群では著しい肝細胞肥大を観察した。また、ASO投与群では肝臓内に泡沫細胞の集簇像が観察され、ASOが核酸であることを考えると、本所見はクッパー星細胞の変性像である可能性が示唆された。【実験2】CTを用いた非侵襲的な手法で、内臓脂肪および肝臓の脂肪蓄積量についての評価を試みた。その結果、CT計測値と生体内の実際の脂肪量は極めて良い相関を示し、小動物においても、ヒトと同様の側面からのアプローチが可能であることが示された。また、動脈硬化の初期石灰化では病理組織学的解析で検出し得たが、CTや超音波では検出が困難であった。しかしながら、ある程度の進展した動脈硬化病変の石灰化ではいずれの手法でも検出が可能であった。CTや超音波によるイメージングは非侵襲的の手法で、動物を屠殺することなく、継時的に同一個体の同一病変を追跡することが可能であり、治療実験にも応用できる有用な解析手法の一つと考えられた。【実験3】動脈硬化の治療実験モデルとしてApoE-K0マウスを用いるための基礎的解析を、本年度も継続して行った。特に免疫組織学的手法を用いて、ヒト動脈硬化病変の発症やその進展に関わる分子 (F4/80, TIMP-1, MMP-9, MMP-1/8, sLOX-1, Cxcl16) を解析した。その結果、これら分子はいずれの病期の動脈硬化病変にも局在しており、高脂肪食を負荷したApoE-K0マウスに誘発された動脈硬化は、ヒトへの外挿モデルとして、極めて有用であることが示された。

研究協力者

国立循環器病研究センター研究所

病態代謝部

斯波真理子

柴田 映子

和田 郁人

A. 研究目的

本研究では ApoC-III に対する BNA 搭載アンチセンス医薬の有効性・毒性・安全性について病理組織学的に評価し、多角的な情報を提供することを目的としている。実験 1：先行する実験において、高脂肪食を負荷した C57BL/6J マウスに対して、ApoC-III を標的とした BNA 搭載型アンチセンス (ASO) を投与し、脂質低下作用を検討した。その結果、ASO 投与は、血中および肝臓での ApoC-III mRNA 値を有意に低下させ、血中 TG 値を低下させた。そこで本年度は、ASO の肝臓に対する毒性学的影響を病理組織学的に詳細に検討した。また、先行する上記の実験では既存の脂質低下剤のフィブレート系製剤 (Fenofibrate; FF) 群も設けら

れており、同時に FF の肝臓に対する病理組織学的変化も併せて解析した。実験 2：次の段階を鑑み、基礎研究の成果をヒトに応用して、疾患予防や治療展開を行うためには、基礎研究と臨床研究の間を橋渡しする「トランスレーショナルリサーチ」が鍵となってくる。そのためには、薬効を評価する小動物での非侵襲的な動脈硬化解析法の確立が重要である。昨年度は超音波による動脈硬化病変の評価を目的として、動脈の内膜-中膜肥厚 (IMT) の測定を実施し、その結果を報告した。そこで本年度は ApoE-KO 動脈硬化モデルマウスを用いて、経時的に内臓脂肪ならびに肝臓脂肪蓄積量の測定、さらに石灰化を伴う動脈硬化病変の検出を目指して、X線 CT 装置や超音波によるイメージングを行った。実験 3：「動脈硬化の治療実験モデルとして ApoE-KO マウスを用いるための基礎的解析」をテーマとして、本年度も継続して行い、特に免疫組織学的手法を用いて、ヒトで動脈硬化病変との関連が指摘されている分子について解析し、ApoE-KO 動脈硬化モデルマウスがヒトへの外挿モデルとして有用であるか否かを評価した。

B. 研究方法

【実験 1】 — 「ApoC-III アンチセンスの投与を受けた高脂肪食負荷マウスの安全性評価のための病理組織学的解析」

高脂肪食(F2WTD, 0.3%コレステロール)を1週間自由摂取させた C57BL/6J マウスに ApoC-IIIを標的とした BNA 搭載型アンチセンス (以下 ASO と略す) を単回皮下投与し、また既存のトリグリセライド低下薬の Fenofibrate (FF; 和光純薬工業株式会社) を 100 mg/kg 用量で 1 回/日経口投与し、投与中も高脂肪食は継続して摂取させ、投与開始の7日後に全動物を屠殺・剖検した。本年度はそれらの動物の肝臓および腎臓について病理組織学的な解析を行った。また、肝臓についてはさらに Oil red 染色を施して、脂肪蓄積の程度について解析した。

1. 一般病理組織学的検査

10%中性緩衝ホルマリン溶液にて固定した肝臓および腎臓を切り出し、水洗の後、脱水系列を経て透徹を行い、パラフィン包埋した。マイクロトーム (Leica) にて 5 μ m に薄切後、カラッチのヘマトキシリン (武藤化学株式会社) とエオジン (Tissue-Tek) にて H&E 染色し、顕微鏡(model BX53, Olympus)にて観察した。

1.肝臓における脂肪蓄積の解析

前述の 10%中性緩衝ホルマリン溶液にて固定した肝臓を 10%、20%、30%のサッカロース (和光純薬工業株式会社)にて段階的に置換の後、クリオモルド (Tissue-Tek) に静置し、その中に O.C.T Compound (Sakura Finetek) を流し込み、液体窒素にてすみやかに凍結した。クリオスタット (Leica) で 5 μ m に薄切し、Oil red O 染色液 (和光純薬工業株式会社) と核染色に Hematoxylin Gill's Formula (Vector) を用いて染色し、顕微鏡 (model BX53, Olympus)にて観察し、脂肪の蓄積の程度を評価した。

【実験 2】 - 「動脈硬化モデルマウスの CT による病態イメージングとその病理組織像：脂肪肝と石灰化を伴う動脈硬化の検出」

メタボリックシンドロームは内臓脂肪型肥満に加えて、高血糖、高血圧、脂質異常症が合併してくる病態であるが、動脈硬化発症のリスクも上昇することから、CT を用いた非侵襲的なアプローチで、内臓脂肪および肝臓の脂肪蓄積量の評価を試みた。

また、進展した動脈硬化の複合病変の所見でもある石灰化の評価を超音波および CT を用いて行い、病理組織学的検査結果と照合した。

1. CT による内臓脂肪および肝臓内の蓄積脂肪の解析

(1) CT 装置を用いた内臓脂肪の測定

イソフルラン麻酔下にて、28 週齢 ApoE-KO 雄マウス (普通食 CE2 を自由摂取。日本クレア) の第 11 胸椎から尾骨下端までを、小動物用 X 線 CT 装置 (Latheta, ALOKA) にて 1.0 mm 毎にスライスし、撮影した。解析は脂肪を皮下脂肪と内臓脂肪を分け、体積より重量を算出し、脂肪重量 / (筋肉重量 + 脂肪重量) × 100 により脂肪率を算出した。なお、実験に供したマウスは 5 例で、体重は 34.4 ± 2.2 g であった。

(2) CT 装置を用いた肝臓の脂肪測定

上記の内臓脂肪測定に用いた 28 週齢 ApoE-KO 雄マウスをイソフルラン麻酔下で仰臥位にし、第 11 胸椎から第 1 腰椎の位置を小動物用 X 線 CT 装置 (Latheta) にて 0.3 mm 毎にスライスし、CT 撮影を行い、肝臓の平均 CT 値 (Hounsfield unit :HU)

/ 筋肉の平均 CT 値 (HU) から CT 値比を算出して解析した。

(3) 脂肪重量測定

CT 撮影の後、マウスを麻酔下にて、放血して安楽死させ、腸間膜脂肪、腹腔内脂肪および生殖器周囲脂肪を摘出し重量を測定した。

(4) 肝臓の病理組織学的検査および脂肪蓄積の解析

上記の CT 検査に用いたマウスより肝臓を摘出し、10% 中性緩衝ホルマリン溶液にて固定し、前述した方法で H&E 染色を行った (実験 1 : 一般病理組織学的検査の項)。また、肝臓の脂肪を証明するため、摘出した肝臓の一部を O.C.T. Compound (Sakura Finetek) を用いて凍結し、前述の方法で (実験 1 : 肝臓における脂肪蓄積の病理組織学的解析の項)、Oil red O 染色液 (和光純薬工業株式会社) を用いて染色し、顕微鏡 (model BX53, Olympus) にて観察し、脂肪の蓄積の程度を評価した。

2.大動脈石灰化のイメージング

(1)CT装置による大動脈石灰化の定量

小動物用 X 線 CT 装置 (LTC200, ALOKA)を用いて、イソフルラン麻酔下にて、動脈硬化モデルマウス (ApoE-KO マウス) の第7頸椎～第2胸椎を心拍同期条件下で撮影した。25 週齢, 34 週齢および 45 週齢の各 4 例の ApoE-KO 雌マウスを用い、普通食(CE2, 日本クレア)を自由摂取させた。また、45 週齢のマウスを用いて、上行大動脈から大動脈弓の位置決定の目的で、血管造影剤であるイオパミロン注 300 (バイエル薬品株式会社)をマウス尾静脈に注射し、10 分後、呼吸同期条件下にて CT 撮影を実施した。

(2)動物用超音波装置による大動脈石灰化の観察

上記の CT 解析に供した ApoE-KO 雌マウスを実験に用いた。超音波断層撮影の前処置のため、胸部除毛を施し、イソフルラン麻酔下にて、超音波高解像度イメージングシステム Vevo2100 装置 (Primetech Corp.) を用いて、40 MHz の探触子で大動脈のプラークの有無や輝度を観察し、石灰化様エコー像を観察した。

(3)大動脈の病理組織学的解析

上記の CT ならびに超音波解析に供したマウスを麻酔下にて、PBS で還流し、放血し安楽死させ、大動脈弁起始部から総腸骨動脈分岐部までの下行大動脈を摘出し、10%中性緩衝ホルマリン溶液にて固定した。固定後、実体顕微鏡下 (model LG-PS2, Olympus あるいは model SZX7, Olympus) で大動脈周囲の脂肪組織を除去し、切り出し、脱水系列を経て透徹し、パラフィン包埋を行った。ミクロトーム (Leica) にて薄切の後、H&E 染色を行った。また、弾性線維の染色として Elastica van Gieson (EVG)染色を行った。カルシウム検出法としては Kossa 反応を行った。これらの染色標本を顕微鏡(model BX53, Olympus)にて、動脈硬化病変と石灰化の有無、Kossa 反応陽性部位を観察した。

【実験 3】 - 「動脈硬化の治療実験モデルとして ApoE-KO マウスを用いるための基礎的解析」

上記のテーマで本年度も継続して行い、特に免疫組織学的手法を用いて、ヒトで動脈硬化発症に関わると指摘されて

りる分子について解析し、ApoE-KO マウスがヒトへの外挿モデルとして有用であるか否かを評価した。

1. 動脈硬化モデルマウスの作成

18 例の ApoE-KO マウス雄に 6 週齢から 16 週間、高脂肪食 (1.25% コレステロール含有。F2HFD1 : オリエンタル酵母工業) を自由摂取させ、動脈硬化モデルを作製した。対照としては、普通食 (CE-2 日本クレア) を自由摂取させた C57BL/6J 雄マウス (日本 SLC) 20 例を用いた。これらの動物は昨年度の動脈病変解析に用いられた。本年度はこれらのパラフィン包埋標本を用いて行った。

2. 動脈硬化病変の免疫組織学的解析

大動脈組織が包埋されているパラフィンブロックをマイクロトーム (Leica) にて 5 μm に薄切し、シランコートスライドガラス (DAKO) に貼付して標本を作製し、従来より動脈硬化との関連が指摘されている分子や網羅的解析で選ばれた分子について免疫組織学的染色を施した。スライド標本を 110°C、15 分間の熱処理により抗原賦活化を行い、非特異的染色を阻害す

るためのブロッキング処置を行い (Dako Real Antibody Diluent (Dako)、内因性ペルオキシダーゼを不活化するため 3% H_2O_2 を反応させた後、1 次抗体を反応させ、洗浄の後、それぞれの 1 次抗体に対応する 2 次抗体を反応させ (1 次抗体の免疫動物がマウス、ウサギ、ヤギである場合は Dako の LSAB kit を用いた)、DAB で発色させ、次いでヘマトキシリンにて核染色を行い、封入した。染色標本を顕微鏡 (model BX53) で観察し、代表的な部位を撮影し、デジタル画像を保存した。

免疫組織化学的染色を行った分子はヒトで動脈硬化との関連が報告されている分子と昨年度の網羅的解析で上昇を示した 2 分子 (TIMP-1 および Cxcl16) である。本実験によりヒトと ApoE-KO マウスの動脈硬化病変の類似性をみた。用いた 1 次抗体は次の通りである。抗 F4/80 ウサギ抗体 (Santa Cruz)、抗 TIMP-1 ラット抗体 (Abcam)、抗 MMP-9 ヤギ抗体 (Santa Cruz)、抗 MMP-1/8 ウサギ抗体 (Santa Cruz)、抗 sLOX-1 ウサギ抗体 (Bioss)、抗 Cxcl16 ウサギ抗体 (Abnova) であった。

C. 研究結果

【実験 1】—「ApoC-III アンチセンスの投

与を受けた高脂肪食負荷マウスの安全性評価のための病理組織学的解析」

1.一般病理組織学的検査

病理組織学的検査の結果を表1に示す。肝臓では、溶媒対照群 (Corn oil) において、肝細胞の空胞変性が軽度～強度に渡り全例 (4例) に観察され (図1A)、フィブレート系のFF (溶媒としてCorn oil)投与群では、空胞変性は正常範囲内の痕跡程度にしか示されなかった (図1B)。また、FF投与群では好酸性顆粒を含む肝細胞肥大 (図1B) を全例 (4例) に観察したが、溶媒対照群では全く観察されなかった (図1A)。

次に溶媒として生理食塩水を投与した溶媒対照群では、軽度な肝細胞の空胞変性を全例 (4例) に観察した (図1C)。一方、ASO投与群では軽度～中等度に肝細胞の空胞変性が殆どの動物 (3例) に見られた (図1D)。また、ASO投与群で肝細胞肥大が1例に観察された (図1D)。さらにASO投与群では肝臓において泡沫細胞の集簇が4例中の2例に観察された (図1E)。

なお、腎臓では投与に起因すると考えられる所見は観察されなかった。

2.肝臓における脂肪蓄積の解析

肝臓に Oil red 染色を施し、肝細胞内に蓄積している脂肪を可視化し、顕微鏡下で観察した。その結果を表1に示す。溶媒対照群 (Corn oil) では軽度～強度の脂肪蓄積が観察されたが (図2A)、FF群では痕跡程度しか示されなかった (図2B)。溶媒対照群 (生理食塩水) では軽度～中等度の脂肪蓄積であったが (図2C)、ASO群では軽度～強度であった (図2D)。ASO群では、脂肪蓄積量が若干、増加している傾向が窺われた。

【実験2】 - 「動脈硬化モデルマウスのCTによる病態イメージングとその病理組織像:脂肪肝と石灰化を伴う動脈硬化の検出」

1. CTによる内臓脂肪および肝臓内の蓄積脂肪の解析

(1) CT装置を用いた内臓脂肪の測定

CT装置による内臓脂肪の脂肪率は、脂肪摘出重量と良い相関であった (図3A-C)。

(2) CT装置を用いた肝臓の脂肪測定

ApoE-KO マウスにおいて肝臓の CT 値比 (CT 値比 = 肝臓の平均 CT 値/筋肉の平均 CT 値) と肝臓の脂肪染色 (Oil Red 染色) との比較で、CT 値が低いほど Oil red に強く染まり、CT 値比と組織像とは相関していた。図 4A に示すように CT 値比が最も低値である IH63 (CT 値比 0.26) と高値である IH64 (CT 値比 0.71) の H&E 染色像 (図 4B) および Oil red による脂肪染色像を示す (図 4C)。IH63 は IH64 より強く染まっており、CT 値比と逆相関していた。因みに、ヒトにおいても CT 値比が低いほど肝臓に脂肪が沈着していると診断されている。

2. 大動脈石灰化のイメージング

(1) CT、超音波および病理組織学的検査による大動脈石灰化の評価

まず始めに 45 週齢 ApoE-KO マウスを用い、イオパミロン血管造影剤の静脈投与後の CT 像にて、大動脈を認識し、石灰化様の CT 像を認めた (図 5A-C)。CT、超音波および病理組織学的検査の結果を表 2 に示す。25 週齢の ApoE-KO マウス 4 例を用いた検査で、大動脈の石灰化様の所見を CT で 1 例に、超音波では石灰化の疑いを 1 例に認め、病理組織学的検査では 3 例に

観察した。34 週齢および 45 週齢の各 4 例の ApoE-KO マウスを用いた検査では、CT、超音波、病理組織学的検査のいずれにおいても全例に石灰化を検出し得た。病理組織学的に観察された石灰化所見は (図 6A)、別動物であるが、Kossa 反応陽性を示し、HE 染色で観察された石灰化所見は、カルシウム沈着であることを確認している (図 6B)。

【実験 3】 - 「動脈硬化の治療実験モデルとして ApoE-KO マウスを用いるための基礎的解析」

1. 動脈硬化病変の免疫組織学的解析

(1) F4/80

抗 F4/80 抗体はマクロファージを認識する抗体である。初期病変 (図 7B)、進行性病変 (図 7C)、複合病変 (図 7D) の各病変に泡沫細胞の集簇が見られ、これらは F4/80 陽性を示すマクロファージであることが確認された。なお、Wild type マウスの動脈には陽性細胞は観察されなかった (図 7A)。

(2) TIMP-1

TIMP-1 は昨年度の研究で抗体アレイ

を用いた分子生物学的な網羅的解析で顕著な上昇をみた分子である。TIMP (Tissue Inhibitor of Matrix metalloproteinase) は内因性の MMP (Matrix metalloproteinase) 活性阻害因子で、TIMP-1 はマクロファージが分泌し、MMP-9 を分解する。TIMP-1 は初期病変で既に発現しており (図 8B)、いずれのステージの病期の動脈硬化病変にも発現していた (図 8C)。なお、Wild type マウスの正常な動脈では発現は全く観察されなかった (図 8A)。

(3)MMP-9

MMP-9 はマクロファージが分泌する蛋白質分解酵素の 1 つである。動脈硬化病変のない Wild type マウスの正常な動脈では陽性所見は全く観察されなかった (図 9A)。一方、動脈硬化病変では進展の程度に関わらず、病変部に一致して陽性を示した (図 9B~D)。詳細に観察すると、病変部では泡沫細胞 (マクロファージ) の細胞質に陽性を示し、その他、線維被膜下や病変部の間質に陽性を示した (図 9B~D)。

(4) MMP-1/8

MMP-9 と同様にマクロファージが分泌する蛋白質分解酵素の 1 つである。動脈硬化病変のない Wild type マウスの正常な動脈では陽性部位は全く観察されなかつ

た (図 10A)。一方、動脈硬化病変では、MMP-9 と同じように進展の程度に関わらず、病変部に限局して陽性を示した (図 10B~D)。詳細に見ると、病変部では泡沫細胞 (マクロファージ) の細胞質に陽性を認めるが、病変部の間質により強く陽性を示した点は MMP-9 と異なっていた (図 10B~D)。

(5)sLOX-1

sLOX-1 はごく初期の病変から発現を示し、以降、進展してゆく過程に渡り、発現が継続して観察された (図 11B~D)。末期の複合病変でも依然、発現しているが、その発現強度はむしろ減弱しているように思われた (図 11D)。この点に関してはさらに詳細な解析が必要である。なお、Wild type では発現は全く観察されなかった (図 11A)。

(6) Cxcl16

Cxcl16 は昨年度の研究で Primer array を用いた分子生物学的な網羅的解析で顕著な上昇をみた分子である。Wild type マウスの正常な動脈では全く Cxcl16 の発現は認められなかったが (図 12A)、ApoE-KO マウスでは、動脈硬化病変の進展の程度に関わらず、いずれの病変でも発現が観察された (図 12B~D)。

D. 考察

【実験 1】 先行する実験において、ASO 投与により血中および肝臓での apoC-III mRNA 値を有意に低下させ、血中 TG 値を低下させたことが明らかとなっている。本年度の病理組織学的検査では、肝細胞に空胞変性を観察し、Oil red 染色では肝臓に脂肪の蓄積が亢進している傾向が窺われた。一方、既存の脂質低下製剤である FF 投与群では肝細胞の空胞変性や脂肪の蓄積はほとんど正常程度に改善されていた。その反面、FF 投与群では著しい肝細胞肥大を観察し、細胞質内には好酸性顆粒を多数含んでおり、増生したペルオキシソームと思われるが、同定するにはカタラーゼを証明する必要がある。また、ASO 投与群では肝臓内に泡沫細胞の集簇が観察され、クッパー星細胞の変性像であると推測される。検索例数が各群 4 例と少数であり、統計処理も出来ず、明言出来ないが、ASO は肝臓の蓄積脂肪の亢進と恐らくクッパー星細胞を標的とするのではないかと推察される。ASO が核酸であることを考えるとマクロファージであるクッパー星細胞が応答するのは自然な事象であるかもしれない。

【実験 2】 メタボリックシンドロームは内臓脂肪型肥満という共通の要因に加えて、

高血糖、高血圧、脂質異常症が合併してくる病態で、動脈硬化発症のリスクも上昇する。今回の実験では CT を用いた非侵襲的な手法で、内臓脂肪および肝臓の脂肪蓄積量の評価を試みた。その結果、CT 計測値と生体内に存在する実際の脂肪量は極めて良い相関を示し、小動物においても、ヒトと同様の側面からのアプローチが可能であることが示された。また、動脈硬化の初期石灰化では病理組織学的解析では検出し得たが、CT や超音波では検出が困難であった。しかしながら、ある程度の進展した動脈硬化病変の石灰化はいずれの手法でも検出が可能であった。CT や超音波によるイメージングは非侵襲的的手法であることから、継時的に同一個体の同一病変を追跡することが可能であり、貴重なモデル動物を屠殺する必要もなく、動物愛護の観点からも好ましい。治療実験にも応用できる極めて有用な解析手法の一つと考えられた。

【実験 3】 ApoE-KO マウスに高脂肪食を負荷して作製した動脈硬化病変はヒトと類似の進展形態を示し、ヒト同様の病理組織学的な分類も可能であった。また、本モデルマウスの動硬化病変における分子生物学的な網羅的解析により、Cxcl16 や TIMP-1 を著明に上昇した分子として見出した。これらの分子は、ヒトにおいても動

脈硬化の発症との関連が示唆されている重要な因子として注目されている。そこで今回は、ヒト動脈硬化病変の発症やその進展に関わる分子（F4/80, TIMP-1, MMP-9, MMP-1/8, sLOX-1, Cxcl16）を免疫組織学的に解析した。その結果、これら分子はいずれも動脈硬化病変に局在しており、高脂肪食負荷の ApoE-KO マウスに誘発された動脈硬化はヒトへの外挿モデルとして、極めて有用であることが示された。プラークは線維性被膜で被われており、線維性被膜の崩壊こそがプラーク破綻であり、急性血栓性閉塞のトリガーとなる。血管壁に侵入したマクロファージは蛋白質分解酵素の MMP を分泌し、線維性被膜を脆弱化させる。今回の実験で、これらのいずれの分子も ApoE-KO マウスの動脈硬化モデルで観察されており、治療モデルとしての有用性が高いことも新たに示唆している。

E. 結論

- (1) 今回用いられた ASO 配列は血中および肝臓での ApoC-III mRNA 値を有意に低下させ、血中 TG 値を低下させたが、長期投与に及んだ場合、肝細胞に対する傷害作用を発揮する可能性が示唆された。
- (2) 非侵襲的手法である CT や超音波に

よるイメージングは、生体内の脂肪の計測や進展した動脈硬化の石灰化を検出することができ、継時的に同一個体の同一病変を追跡することが可能であり、治療実験にも応用できる有用な解析手法の一つと考えられた。

- (3) ApoE-KO マウスに高脂肪食を負荷して誘発した動脈硬化病変はヒトと類似の進展形態と同様の分子を発現し、ヒトの動脈硬化モデルとしての有用性が示され、治療実験や発症機序解析に相応しい病態モデルであることが示された。

F. 健康危険情報

本研究では現在のところ健康に危険を及ぼす可能性はない。

G. 研究発表

原著論文

(欧文)

なし

(邦文)

- 1) 柴田雅朗, 日下部守昭, 森本純司, 柴田映子, 斯波真理子, 的場吉信, 土佐秀樹, 飯沼宗和: テネイシン抗体と α -マンゴスチンとの複合投与による乳癌転移抑制の試み. 乳癌基礎研究, 22:

9-14, 2013 (2014年度掲載).

第 120 回日本解剖学会総会・全国学術
集会, 2014 年 3 月 28~30 日, 神戸論
文

2. 学会発表

- 1) 圓見純一郎, 柴田映子, 柴田雅朗, 森本めぐむ, 福田肇, 橋川美子, 河嶋秀和, 堀美香, 斯波真理子, 飯田秀博: Gadofluorine M によるマウスの動脈硬化プラークイメージング. 第 9 回日本分子イメージング学会総会・学術集会, 2014 年 5 月 22~23 日, 大阪
- 2) 柴田映子, 柴田雅朗, 斯波真理子: 動脈硬化の治療実験モデルとして ApoE-K0 マウスを用いるための基礎的解析. 第 46 回日本動脈硬化学会総会・学術集会, 2014 年 7 月 10~11 日, 東京
- 3) 柴田雅朗, 柴田映子, 森本純司, 斯波真理子: Vegf-c siRNA 発現ベクターではマウス乳癌転移を抑制したが、Vegf-d siRNA ではその作用は発揮されなかった. 第 23 回乳癌基礎研究会, 2014 年 7 月 26~27 日, つくば
- 4) 柴田雅朗, 柴田映子, 斯波真理子: 高脂肪食で誘発した ApoE-K0 マウスの動脈硬化病変の病理・分子生物学的解析. 第 31 回日本毒性病理学会総会・学術集会, 2015 年 1 月 29~30 日, 東京
- 5) 柴田雅朗, 柴田映子, 斯波真理子: ヒト動脈硬化モデル ApoE-K0 マウスの動脈硬化病変の病理組織学的解析.

表 1

Group	Animal No.	H&E stain			Kidney	Oil red stain
		Liver				Liver
		Cytoplasmic vacuolation	Hypertrophy of hepatocyte	Other		Oil red-positive levels
FF	A1	±	+		N	±
	A2	±	+		N	±
	A3	±	+		N	±
	A4	±	+		N	±
Control (Corn oil)	B1	1+	-		N	1+
	B2	1+	-		N	3+
	B3	2+	-		N	1+
	B4	3+	-		N	3+
Control (Saline)	C1	1+	-		N	1+
	C2	1+	-		N	1+
	C3	1+	-		N	2+
	C4	1+	-		N	2+
ASO	D1	2+	+	Formycell accumulations	N	3+
	D2	±	-		N	1+
	D3	1+	-		Lymphocytic accumulations	2+
	D4	2+	-	Formycell accumulations	N	3+

表 1. ApoC-III アンチセンスの投与を受けた高脂肪食負荷マウスの安全性評価のための病理組織学的解析

ASO 投与群では肝細胞に空胞変性を観察し、Oil red 染色では肝臓に脂肪の蓄積が亢進している傾向が観察された。一方、FF 投与群では肝細胞の空胞変性や脂肪の蓄積 (Oil red 染色) はほとんど正常程度に改善されていた。その反面、FF 投与群では著しい肝細胞肥大を観察した。また、ASO 投与群では肝臓内に泡沫細胞の集簇像が観察された。

表 2

週 齢 (w)	動物番号	CT 石灰化 mg/cm ³	超音波 石灰化	病理組織 石灰化
25w	ApoCT-5	0	無	有
	ApoCT-6	0	無	無
	ApoCT-7	200	疑い	有
	ApoCT-8	0	無	有
34w	ApoCT-9	238	有	有
	ApoCT-10	246	有	有
	ApoCT-11	166	有	有
	ApoCT-12	254	有	有
45w	ApoCT-1	348	有	有
	ApoCT-2	453	有	有
	ApoCT-3	305	有	有
	ApoCT-4	272	有	有

“0” は検出限界を意味する。

表 2. ApoE-KO マウスの週齢別 CT、超音波断層像および病理組織学的大動脈の石灰化像の比較

25 週齢において、CT および超音波断層撮影の群で、2 例が石灰化検出が出来なかったが、34 週齢とおよび 45 週齢の全ての例において検出でき、病理組織学的検査結果と一致した。

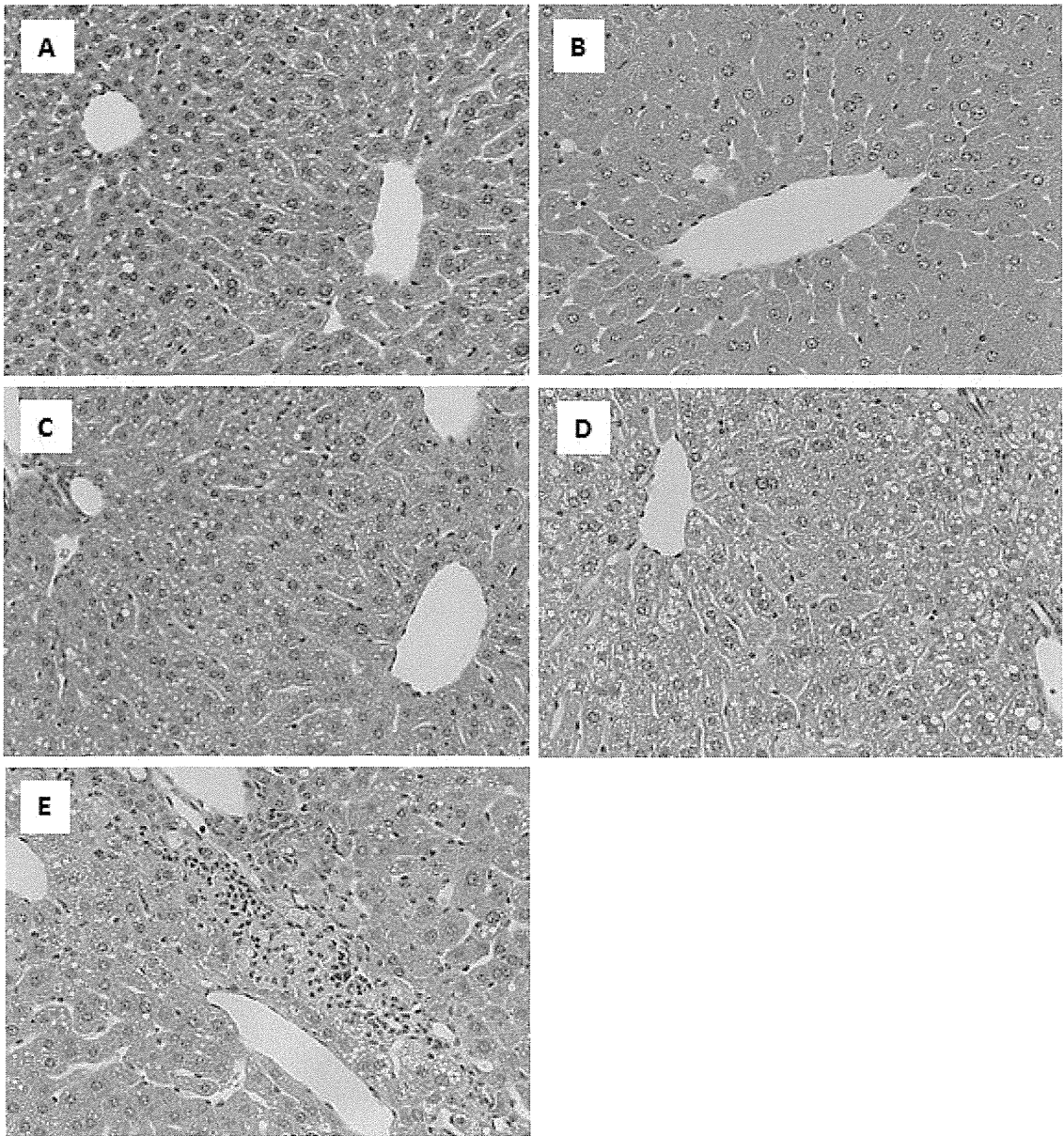


図1. ApoC-III アンチセンス (ASO)を投与した肝臓の病理組織学的所見

A: 対照群 (Corn oil)、B: Fenofirate (FF) 投与群、C: 対照群 (生理食塩水)

D: ASO 投与群、E : ASO 投与群、A~E: X200, H&E 染色

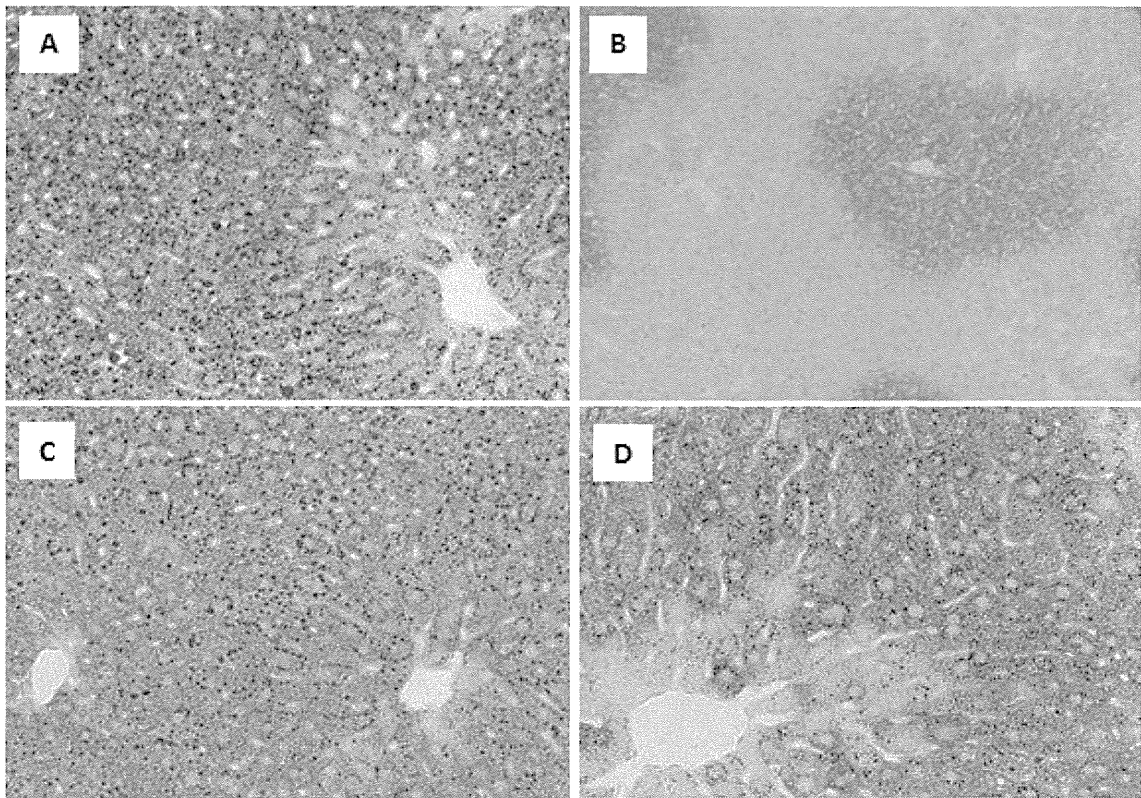


図2. ApoC-III アンチセンス(ASO)を投与した肝臓における脂肪蓄積の評価

A: 対照群 (Corn oil)、B: Fenofibrate (FF) 投与群、C: 対照群 (生理食塩水)

D: ASO 投与群、A~D: X200、Oil red 染色