

平成 22 年 5 月 25 日現在

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2007～2009

課題番号：19390099

研究課題名（和文）CRP の動脈硬化・心筋梗塞への作用の解明とトランスレーショナル  
リサーチの展開研究課題名（英文）Elucidation of C-reactive protein in atherosclerosis and myocardial  
infarction and translational research

研究代表者

範 江林 (FAN JIANGLIN)

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・教授

研究者番号：60272192

研究成果の概要（和文）：我が国の死因 30%を占める心筋梗塞や脳卒中といった動脈硬化性疾患の分子病態解明は、国民の健康や QOL を向上させる上で重要な課題である。本研究では心筋梗塞の発症に最も関係している血清炎症マーカーである C-反応性蛋白の生理機能および動脈硬化の発生における役割について新たに開発した遺伝子改変ウサギモデルにより検討を行った。C-反応性蛋白が動脈硬化の発生を直接に促進することは認められないものの、動脈硬化の進展に有用な診断指標としての意義を明らかにした。また、C-反応性蛋白はバルーン障害により誘導された血栓の形成を促進していることが認められた。

研究成果の概要（英文）：Although there is a statistically significant association between modestly raised baseline plasma CRP values and future cardiovascular events, the debate is still unsettled in regard to whether CRP plays a causal role in the pathogenesis of atherosclerosis. In this study, we developed transgenic rabbits expressing human CRP in the liver and investigated the effect of hCRP on the development of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. We found that although hCRP expressed in transgenic rabbits conferred physiological functions to activate complement, hCRP did not promote the progression of atherosclerosis in transgenic rabbits compared to normal rabbits. However, hCRP Tg rabbits are susceptible to the thrombus formation induced by balloon-injury compared to non-Tg rabbits. These results suggest that CRP is a marker rather than mediator that contributes the lesion formation of atherosclerosis. CRP may accelerate the thrombus formation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
2008年度	6,500,000	1,950,000	8,450,000
2009年度	2,400,000	720,000	3,120,000
年度			
年度			
総計	12,800,000	3,840,000	16,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：動脈硬化、CRP、遺伝子改変ウサギ、トランスレーショナル研究、冠状動脈硬化

### 1. 研究開始当初の背景

C-反応性蛋白（CRP）は、インターロイキン6（IL-6）などの炎症因子の刺激により肝臓での産生が誘導される急性相反応物質であり、炎症のマーカーとして臨床検査で幅広く利用されてきた。一方で、近年、数多くの臨床的研究より、CRPの上昇は動脈硬化性疾患の予想因子並びに危険因子であることが提唱されてきた。CRP高値群では動脈硬化とその合併症である心筋梗塞、脳血管障害の危険度が正常群より数倍と高くなっており、また、培養血管細胞に対して、CRPがさまざまな炎症誘導作用を示していることが報告され、CRPが単なる炎症マーカーのみならず、むしろ動脈硬化の発生・進展および心筋梗塞発症に直接に関与していることが強く示唆されてきた。もしも、CRPが本当に心疾患のメディエーターであるなら、CRPは創薬の標的となり、そして、患者に対する積極的な降CRPの治療が心血管疾患の一次予防及び二次予防における新たな手段として用いられる可能性が期待される。この仮説は、臨床的には非常に意義が深いものの、残念ながら、現在のところ、CRPに対する国際的に（本邦を含む）一致する見解が得られておらず、CRPの高値患者を治療すべきかどうか、どのように治療するかに関してはコントロバシーとなっている。早急に有用なモデルを開発し、この仮説を検証する必要があると、アメリカ心臓学会（AHA）でも待望されている。CRPの意義に関する大きな問題点として、炎症のメディエーターとしてのCRPの作用は、培養系（in vitro）による検討がほとんどで、心疾患におけるCRPの直接作用、特にin vivoでの生理学機能および病理学意義などは

まだ解明されていない。

### 2. 研究の目的

このような背景の中で、我々が世界に先駆けて、新しいCRP動物モデルの模索を始め、CRP研究にもっとも適したモデル動物と思われるウサギに着目した。ウサギは、ヒトと同様にCRPが急性期蛋白としての機能を有しており、また、脂質代謝や動脈硬化の病理学的特徴でもヒトとの類似点が多くある。

**本研究の目的はこれらの新規遺伝子改変ウサギを用いて、CRPと動脈硬化の発生との関連性を明らかにし、新たな治療法の開拓を目指している。**

本研究ではユニークな遺伝子改変（Tg）ウサギを駆使して、総括的に次の3つの仮説を証明することを目指した。

（1）危険因子とされている高値の血漿CRPは動脈硬化の発生・進展に直接に関与しているのか、促進するのか？

（2）血管壁に沈着したCRPの病理学的意義およびメカニズムは（マクロファージの泡沫化や補体活性化、過酸化LDLなどとの相互作用）？

（3）CRPの拮抗薬の投与により動脈硬化の進展および心筋梗塞の発症を抑制できるのか？

### 3. 研究の方法

#### CRP・Tgウサギの作製・繁殖・表現型解析

肝臓特異的に発現できるプロモーターであるヒトアポ蛋白Eプロモーターを使っているので、TgウサギのCRPの発現が肝細胞であることがノーザンブロットにて確認された（図1）。ヒトCRPは肝細胞で合成されていることが免疫染色で確認できた。

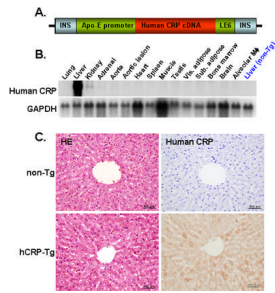


図 1: 遺伝子コンストラクト(A)、ノーザンブロット(B)、肝臓のCRP免疫染色(C)

三つの系統 CRP・Tg ウサギの血中ヒト CRP 濃度は 100mg/L(高)、50mg/L(中)、1mg/L(低)であり、動脈硬化の進展に対する CRP の作用を dose-dependent に評価できた。各ラインの F1 雄ウサギを用いて、通常の雌ウサギと交配させ、動脈硬化実験に必要な数の雌雄ウサギの繁殖を行った。血中 CRP はウェスタンブロット法により確認後、CRP 蛋白量を ELISA 法により定量した。CRP の発現による血中の脂質代謝に及ぼす影響の有無を調べるために、正常ウサギと Tg ウサギの血漿中の総コレステロール、トリグリセライド、HDL - コレステロールを測定した。リポ蛋白は超遠心法あるいは FPLC 法により分離し、アガロースゲルで分析した。リポ蛋白の顆粒サイズの変化は negative staining 法を用いて電子顕微鏡で観察した。

#### 4. 研究成果

Tg ウサギで産生されたヒト CRP の特性をウェスタンブロットで検討したところ、non-denature gel では大きな分子量サイズの 5 量体であり、SDS-PAGE では、CRP の分子量が約 26Kd の単体あることが判明した(図 2)。

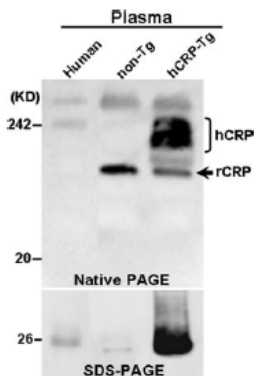
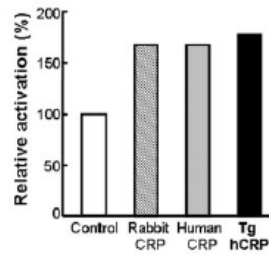


図 2: ウェスタンブロット

更に、CRP の生理機能があるかどうかを調べるために、Tg ウサギの血清か

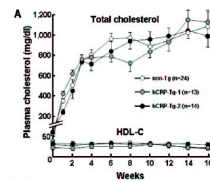
ら CRP を精製し、補体消耗実験を行った。その結果、Tg ウサギからの CRP は、ウサギならびにヒトの CRP と同様な補体活性化機能を持つことが分かった(図 3)。



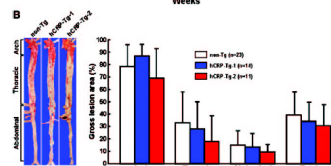
ことが分かった(図 3)。

図 3: 補体活性化実験

動脈硬化の発現における CRP の役割を調べるために、CRP の高発現 (Tg-H) と低発現 (Tg-L) Tg ウサギ並びに同腹の non-Tg 正常ウサギに高脂肪食を 16 週間負荷させ、大動脈



及び冠状動脈硬化の程度を比較した(図 4)。

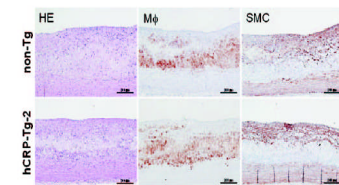


により誘導された高コレステロール血症(A)および大動脈硬化病変(B)

図 4: 高脂肪食により誘導された高コレステロール血症(A)および大動脈硬化病変(B)

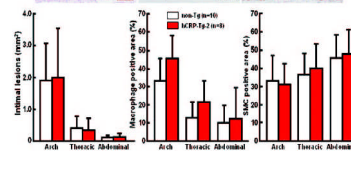
図 4 の如く、高脂肪食に誘導された血清高脂血症の程度が 3 群は同様であり、大動脈硬化の病変の広がりについては有意な差が認められなかった。

次に、大動脈の病変を画像解析により、細胞成分、特に、マクロファージと平滑筋細胞



の変化を測定した。

図 5: 大動脈病変のミクロ解析及び免疫染色の定量化



しかし、ミクロの病変並びに細胞成分の変化は正常ウサギの病変と比べて、統計学的有意さがなかった (図 5)。

発現した CRP は本当に病変に存在しているかを確認するために、大動脈標本を用いて、免疫染色を行った。その結果、Tg ウサギの病変には大量の CRP 沈着が認められた (図 6)。

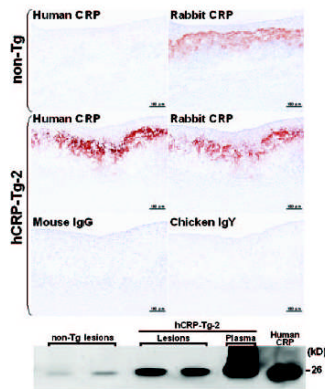


図 6: CRP 免疫染色とウェスタンブロット

動脈硬化の発生に CRP の影響は認められなかったが、血栓の形成における CRP の作用をバルーン傷害モデルで更に検討した。図 7 に示すよう、Tg ウサギで形成した血栓のサイズが正常ウサギより著しく増大していた。

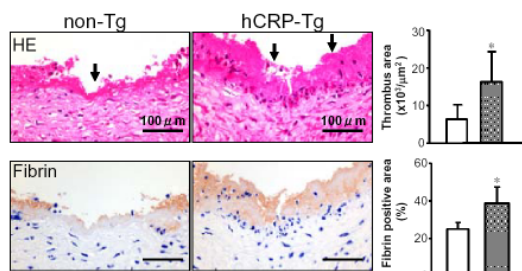


図 7: バルーン傷害による誘導した血栓

#### まとめ

世界で初めてヒト CRP 遺伝子導入した Tg ウサギの作製に成功した。Tg ウサギで発現された CRP は生理機能を有しており、ウサギの健康に悪い影響がなかった。高脂肪食に誘導された動脈硬化の発生は、正常ウサギと比し、有意差が認められなかった。しかし、Tg ウサ

ギでの血栓形成が CRP の発現により増加されている。現在、その分子メカニズムを解析しているところである。従って、高値の CRP は動脈硬化の直接の促進因子ではなく、単なるマーカーであることが示唆された。CRP と血栓形成との関係については今後の課題となる。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 18 件)

1. Koike T, Kitajima S, Yu Y, Li Y, Nishijima K, Liu E, Sun H, Waqar AB, Shibata N, Inoue T, Wang Y, Zhang B, Kobayashi J, Morimoto M, Saku K, Watanabe T, Fan J. Expression of human apoAII in transgenic rabbits leads to dyslipidemia: a new model for combined hyperlipidemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 査読有 2009;29:2047-2053.
2. Koike T, Kitajima S, Yu Y, Nishijima K, Zhang J, Ozaki Y, Morimoto M, Watanabe T, Bhakdi S, Asada Y, Chen YE, Fan J. Human C-reactive protein does not promote atherosclerosis in transgenic rabbits. *Circulation*. 査読有 2009;120:2088-2094.
3. Reifenberg K, Lehr HA, Fan J, Koike T, Wiese E, Kupper I, Sagban TA, Schaefer SC, Zahringer U, Torzewski M, Lackner KJ, Bhakdi S. Endotoxin accelerates atherosclerosis independent of complement activation. *Thromb Res*. 査読有 2009;123:653-658.
4. Zhao S, Zhang C, Lin Y, Yang P, Yu Q,

- Chu Y, Yang P, Fan J, Liu E. The effects of rosiglitazone on aortic atherosclerosis of cholesterol-fed rabbits. *Thromb Res*. 査読有 2008;123:281-287.
5. Yamada S, Wang KY, Tanimoto A, Fan J, Shimajiri S, Kitajima S, Morimoto 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*. 査読有 2008;172:1419-1429.
6. Zhang X, Qi R, Xian X, Yang F, Blackstein M, Deng X, Fan J, Ross C, Karasinska J, Hayden MR, Liu G. Spontaneous atherosclerosis in aged lipoprotein lipase-deficient mice with severe hypertriglyceridemia on a normal chow diet. *Circ Res*. 査読有 2008;102:250-256.
7. Shiomi M, Fan J. Unstable coronary plaques and cardiac events in myocardial infarction-prone Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits: questions and quandaries. *Curr Opin Lipidol*. 査読有 2008;19:631-636.
8. Wang J, Xian X, Huang W, Chen L, Wu L, Zhu Y, Fan J, Ross C, Hayden MR, Liu G. Expression of LPL in endothelial-intact artery results in lipid deposition and vascular cell adhesion molecule-1 upregulation in both LPL and ApoE-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 査読有 2007;27:197-203.
9. Liu E, Morimoto M, Kitajima S, Koike T, Yu Y, Shiiki H, Nagata M, Watanabe T, Fan J. Increased expression of vascular endothelial growth factor in kidney leads to progressive impairment of glomerular functions. *J Am Soc Nephrol*. 査読有 2007;18:2094-2104.
10. Kitajima S, Jin Y, Koike T, Yu Y, Liu E, Shiomi M, Marcovina SM, Morimoto M, Watanabe T, Fan J. Lp(a) enhances coronary atherosclerosis in transgenic Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Atherosclerosis*. 査読有 2007;193:269-276.
- [学会発表] (計 2 件)
1. 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. 第 40 回日本動脈硬化学会総会・学術集会, 2008 年 7 月 11 日, つくば国際会議場
  2. 範 江林. 動脈硬化の発生・進展における CRP の役割: Marker or Maker or both? 第 8 回 AB カンファレンス, 2007 年 7 月 28 日, 神戸ポートピアホテル
- [図書] (計 1 件)
1. Houdebine L, Fan J. *Rabbit Biotechnology: Rabbit genomics, transgenesis, cloning and models*: Springer; 2009. 136
- [産業財産権]  
○出願状況 (計 1 件)
- 名称: ヒト C 反応性蛋白遺伝子導入ウサギ  
発明者: 範 江林 他  
権利者: 国立大学法人山梨大学、国立大学法人佐賀大学、MOREHOUSE COLLEGE  
種類: 特許  
番号: 特願 2009-141742  
出願年月日: 2009 年 6 月 15 日

国内外の別：国内

○取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.med.yamanashi.ac.jp/clinical  
\\_basic/pathol01/](http://www.med.yamanashi.ac.jp/clinical_basic/pathol01/)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

範 江林 (FAN JIANGLIN)

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・教授  
研究者番号：60272192

### (2) 研究分担者

小池 智也 (KOIKE TOMONARI)

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・助教  
研究者番号：40432158

(H20→H21：連携研究者)

手塚 英夫 (TEZUKA HIDEO)

山梨大学・総合分析実験センター・准教授  
研究者番号：70155456

(H21：連携研究者)

森本 正敏 (MORIMOTO MASATOSHI)

熊本保健科学大学・保健科学部・教授  
研究番号：90136482

(H20→H21：連携研究者)

塩見 雅志 (SHIOMI MASASHI)

神戸大学・医学部附属動物実験施設・准教授  
研究者番号：50226106

(H20→H21：連携研究者)