

機関番号：14501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20500373

研究課題名（和文） メタボリックシンドロームのモデル動物の開発および動脈病変に及ぼす影響の解析

研究課題名（英文） Development of the model animal for metabolic syndrome and analysis of its influence to arterial lesions.

研究代表者

伊藤 隆（ITO TAKASHI）

神戸大学・大学院医学研究科・助手

研究者番号：30135793

研究成果の概要（和文）：本研究では、メタボリックシンドローム（MS）を併発するWHHLMIウサギの確立と内臓脂肪が動脈硬化に及ぼす影響の解析を実施した。MSを併発する系統の確立には、空腹時の血糖値と血清インスリン値を指標にして選抜交配を実施した。MSの指標を用いた解析で、MSが遺伝することが示唆された。内臓脂肪の蓄積量は加齢により増加し、内臓脂肪と大動脈病変が有意に相関した。以上の結果から、WHHLMIウサギはMSのモデル動物として有用であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：In the present study, we have developed an animal model for metabolic syndrome by improving the WHHLMI rabbit, an animal model for spontaneous coronary atherosclerosis and myocardial infarction, and have analyzed influences of visceral fat accumulation on progression of atherosclerosis. To develop WHHLMI rabbits with metabolic syndrome, we carried out selective breeding using indices of serum levels of blood sugar and immunoreactive insulin. Metabolic syndrome of this rabbits was inherited from the parents to the offspring. Accumulation of visceral fat was increased with aging, and related to area of atherosclerotic lesions in the aorta. These results suggested that WHHLMI rabbits is a good animal model for metabolic syndrome.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	700,000	210,000	910,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：実験動物学

科研費の分科・細目：実験動物学

キーワード：育種学，モデル動物，循環器・高血圧，糖尿病，動物

1. 研究開始当初の背景

1) 研究目的

本研究は、メタボリックシンドローム（内臓脂肪の蓄積，インスリン機能低下，脂質代謝異常，高血圧を伴う疾患で心筋梗塞等を発症する）の病態モデルの開発およ

び動脈硬化に及ぼす影響を解析することを目的として実施した。

- 2) メタボリックシンドロームの臨床上の意義に関する国内外の研究の動向
メタボリックシンドロームの臨床的帰

結は心血管病である。従来から、血清総コレステロール値が比較的低値であるにもかかわらず心血管病を発症するケースが多く観察されている。その一因として、メタボリックシンドロームが重要と考えられている。米国で実施された6,255人を13年間追跡調査したNHANES IIにおいて、冠動脈疾患死の総死亡ハザード比はメタボリックシンドローム群が非メタボリックシンドローム群に比較して有意に高いことが示された。メタボリックシンドロームの診断基準については、WHOの診断基準、米国のNational Cholesterol Education Programの診断基準が広く使用されているが、いずれの診断基準においてもメタボリックシンドロームの診断が心血管疾患の発症予測に有用であると考えられている。わが国においても、メタボリックシンドロームが心血管疾患の発症に強く関わっていることが報告されており、成人男子の約2割が該当すると推測されているメタボリックシンドロームの病態の解明と治療法の確立が急務となっている。

3) 研究を実施する上での準備状況

当施設では、高脂血症を示す1匹の日本白色種突然変異ウサギを選抜育種し、1980年に高コレステロール血症と大動脈に動脈硬化を自然発症するWHHLウサギを開発確立した。その後、WHHLウサギの選抜育種により冠動脈に動脈硬化が自然発症するWHHLCAウサギ（仮称）を開発し、さらにWHHLCAウサギを選抜育種して心筋梗塞が自然発症するWHHLMUウサギを開発した。これらの選抜交配の過程で、一部のWHHLCAウサギとWHHLMUウサギでは、インスリン抵抗性と内臓脂肪の蓄積が認められ、メタボリックシンドロームの病態を呈していると考えられる。また、インスリン抵抗性を示すWHHLCAウサギにインスリン抵抗性改善薬を投与した結果、インスリン抵抗性が改善し、内臓脂肪が減少した。さらに、高インスリン血症を示すウサギから高インスリン血症を示すウサギが生まれる頻度が高いことを確認している（未発表）。したがって、WHHLMUウサギを育種改良することによってメタボ

リックシンドロームを併発するモデル動物を開発できると考えられる。

2. 研究の目的

本研究は、選抜交配を実施して、メタボリックシンドロームを併発する WHHLMUウサギを確立すると同時に系統開発過程で内臓脂肪が動脈硬化に及ぼす影響を解析することを目的に実施した。

現在維持している WHHLMUウサギについて空腹時血清インスリン値と血糖値を測定し、高インスリン血症を示すウサギを選抜する。高インスリン血症を示す WHHLMUウサギと通常の WHHLMUウサギについて、糖負荷試験を実施して、インスリン抵抗性を確認する。インスリン抵抗性を確認できたウサギについて、HDL レベルを測定する。さらに、大腿動脈で観血的に血圧を測定し、安楽死後内臓脂肪の重量および脂肪細胞のサイズの計測、各種サイトカインについて免疫染色を実施し、動脈硬化の発生状況を病理組織学的に調べる。これらのデータを元にしてメタボリックシンドロームが動脈硬化に及ぼす影響について解析する。

3. 研究の方法

1) メタボリックシンドロームの病態の検査と発生状況の調査

系統維持している WHHLMUウサギ約150匹について空腹時血清インスリン値と血糖値を測定し、高インスリン血症を示すウサギを選抜する。高インスリン血症を示す WHHLMUウサギと通常の WHHLMUウサギ、それぞれ6月齢、12月齢、18月齢の各6匹について、糖負荷試験を実施するとともに、インスリン抵抗性の指標である homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR)を算出し、評価した。超遠心法でHDLを分画し総コレステロールと中性脂肪を測定した。また、大腿動脈で観血的に血圧を測定し、さらに、ウサギが死亡した場合に、内臓脂肪の重量を計測し、脂肪細胞が分泌すると報告されている各種サイトカインの発現を免疫染色で確認した。また、大動脈について動脈硬化病変を病理組織学

的および免疫組織学的に解析した。

2) 系統開発に使用する種親の選抜と選抜交配の実施

WHHLMI ウサギの病態解析の結果に基づいて、種畜を選抜し、選抜交配を実施した。

3) インスリン抵抗性の確認

経口糖負荷試験、静脈内糖負荷試験、インスリン負荷試験を実施し、糖代謝異常について確認した。

4) 糖代謝異常の遺伝性の確認

メタボリックシンドロームの指標となる HOMA-IR が高値(>10.0)の両親、両親とも中間値(3.0-10.0)、片親が中間値で片親が低値(<3.0)を示す場合の仔ウサギの HOMA-IR を比較し、糖代謝異常の遺伝性について確認した。

5) 動脈硬化と内臓脂肪蓄積に関する相関解析

12-15月齢のWHHLMIウサギ40匹を用いて、内臓脂肪の蓄積量と大動脈動脈硬化病変の面積について相関解析を実施した。

4. 研究成果

1) 系統開発に使用する種親の選抜と選抜交配の実施

2008年から2010年の間に、標準飼料の制限給餌(120g/日)下で空腹時の血糖値120mg/dl以上、血清インスリン値1.0ng/mlを示すウサギを種畜として選抜し、289組の交配を実施し、491匹の産仔を得た。

2) 内臓脂肪(腸間膜脂肪)の蓄積

内臓脂肪の蓄積量は、2007年生まれのWHHLMIウサギが10-14月齢で 39.1 ± 9.4 g、17-24月齢で 58.2 ± 7.9 gであったが、選抜交配後の2009年生まれのウサギWHHLMIウサギでは、それぞれ 78.9 ± 8.8 g、 93.9 ± 14.6 gに増加した。

3) インスリン抵抗性の確認

インスリン抵抗性の指標として空腹時の血糖値と血清インスリン値からHOMA-IRを算出した。ヒトにおいては、HOMA-IRが3.0以上の場合にインスリン抵抗性の可能性があるとして診断されているが、75%(258/346)のWHHLMIウサギでHOMA-IRが3.0以上であった。また、WHHLMIウサギ(2.78 ± 0.8 ng/ml)と対照の日本白色種ウサギ(0.23 ± 0.16 ng/ml)について経口糖負荷試験、静脈内糖負荷試験、静脈内インスリン負荷試験を実施し、インスリン抵抗性の指標となる Matsuda-DeFronzo index (MDFI)

あるいは血糖消失率(Kitt)を算出した。その結果、経口糖負荷試験におけるMDFIは、それぞれ 1.6 ± 0.4 、 24.3 ± 8.8 、インスリン負荷試験におけるKittは、それぞれ 1.8 ± 0.3 、 3.8 ± 0.2 であり、WHHLMIウサギでいずれも有意な低値であった。これらの結果は、WHHLMIウサギがインスリン抵抗性であることを強く示唆している。

4) 糖代謝異常の遺伝性の確認

メタボリックシンドロームの指標となるHOMA-IRが高値(>10.0)の仔ウサギの頻度は、両親ともにHOMA-IRが高値の場合に0.476、両親とも中間値の場合に0.346、低値と中間値の場合が0.130であり、HOMA-IRが低値(<3.0)のウサギの頻度は、両親ともHOMA-IRが高値の場合が0.095、両親とも中間値の場合が0.166、低値と中間値の場合が0.217であった。これらの頻度は統計的に有意であり、WHHLMIウサギにおける糖代謝異常は遺伝性を示すことが示唆された。

5) 内臓脂肪の蓄積に関する相関解析

17-19月齢のWHHLMIウサギ11匹の相関解析において、内臓脂肪は、体重($r=0.711$)、腹囲長($r=0.830$)、Body-mass index ($r=0.846$)、空腹時インスリン値($r=0.683$)、HOMA-IR ($r=0.739$)、血清中性脂肪 ($r=0.813$)、超低比重リポタンパク中性脂肪 ($r=0.869$)、低比重リポタンパク中性脂肪 ($r=0.708$)と有意な相関を示した。しかしこれらの相関は、15月齢以下のWHHLMIウサギでは認められなかった。この結果は、内臓脂肪の蓄積が少ない段階では各種パラメーターとの相関が得られないことを示唆しており、各種パラメーターの変動が内臓脂肪の蓄積に依存している可能性があることを示唆していると考えられる。

6) 動脈硬化と内臓脂肪蓄積に関する相関解析

12-15月齢のWHHLMIウサギでは、内臓脂肪の蓄積量は大動脈の動脈硬化病変の面積(76.5 ± 3.6)と正の相関($r=0.323$, $P=0.042$)を示したが、18-24月齢では有意な相関は認められなかった。18月齢以上になると大動脈内膜全面に動脈硬化病変が拡大(86.8 ± 1.1)するため内臓脂肪蓄積の影響を評価することが困難であったと考えられる。

7) 内臓脂肪の免疫組織解析

死亡したWHHLMIウサギについて、内臓脂肪を採取し、ホルマリン固定して、免疫組織標本を作製した。脂肪細胞は脂肪を蓄積して肥大し、脂肪細胞の間隙に

RAM-11 陽性の単球/マクロファージが認められ、炎症反応のマーカーである CRP 及び単球/マクロファージを誘引する MCP-1 が陽性であった。

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 3 件)

1. 塩見 雅志: トランスレショナルリサーチにおける WHHL/WHHLMI ウサギの役割—高脂血症、動脈硬化等について—。関西実験動物研究会会報 30: 1-12 (2008)
2. Shiomi M, Fun 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 Oct; 19 (6): 631-6.
3. 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* 査読有 2009(Nov); 207(1):1-7.

[学会発表] (計 7 件)

1. 平山 信恵, 山田 悟士, 伊藤 隆, 塩見 雅志: 新しいメタボリックシンドロームのモデル動物としての WHHLMI ウサギ. 第3回ウサギフォーラム—医療に貢献する実験用ウサギの新しい展開. 2008年7月26日(神戸大学医学部神緑会館, 神戸)
2. Shiomi M, Yamada S, Hirayama N, and Ito T: WHHLMI rabbits, a suitable animal model for human cardiovascular diseases. Symposium on "Animal models", 3rd Congress of Asian Federation of Laboratory Animal Science (AFLAS), September 27-30, 2008 (Beijing, China)
3. 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 (WHHLMI 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(千里阪急ホテル, 豊中)
4. Shiomi M: WHHL rabbits, history and applications. "3rd International Meeting on

Rabbit Biotechnology, June 4-5, 2009 (Xi'an, China)

5. Ito T, Yamada S, Kobayashi T, Hirayama N, and Shiomi M: Correlation of visceral fat accumulation with plasma CRP and atherosclerosis in metabolic syndrome-prone WHHLMI rabbits. XVth International Symposium on Atherosclerosis, June 14-18, 2009 (Boston, USA)
6. 伊藤 隆, 小林 努, 平山 信恵, 山田 悟士, 塩見 雅志: 内臓脂肪が蓄積した WHHLMI ウサギはメタボリックシンドロームのモデル動物である. 第57回日本実験動物学会総会. 2010年5月12-14日(京都テルサ, 京都)
7. 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)

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.kobe-u.ac.jp/iea/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 隆 (ITO TAKASHI)

神戸大学・大学院医学研究科・助手

研究者番号：30135793

(2) 研究分担者

塩見 雅志 (SHIOMI MASASHI)

神戸大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：50226106