

機関番号：17201

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590343

研究課題名 (和文) 急性冠症候群克服のための疾患特異的 MMP の探索

－遺伝子改変ウサギを用いた研究

研究課題名 (英文) Investigation of disease-specific MMP to conquer acute coronary syndrome –study with transgenic rabbit

研究代表者

渡辺 照男 (WATANABE TERUO)

佐賀大学・総合分析実験センター・客員研究員

研究者番号：40037396

研究成果の概要 (和文)：MMP-1 および MMP-9 をマクロファージ特異的に過剰発現させたトランスジェニック (Tg) ウサギを開発した。このうち MMP-9 Tg ウサギの足指先端部に肉芽腫様の病変が見られ、MMP-9 を発現したマクロファージの集積が見られた。MMP-9 Tg ウサギと既に作製されていた MMP-12 Tg を高度冠状動脈プラークによる内腔狭窄に基づく心筋梗塞発症モデルである WHHL MI ウサギと交配し、双方の特性を兼ね備えたウサギを得た。

研究成果の概要 (英文)：We established MMP-1 and MMP-9 transgenic rabbits, which express the enzymes in their macrophages. MMP-9 Tg rabbits have granuloma-like lesion in their toes. Female MMP-9 and MMP-12 Tg rabbits were mated with WHHL MI, and hybrid offsprings were obtained.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：人体病理学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：MMP、動脈硬化、遺伝子組換え、ウサギ、病体モデル

## 1. 研究開始当初の背景

動脈硬化の合併症の中で最も重要で死亡率の高い急性冠症候群 (ACS) では、冠状動脈プラークの破綻による心筋梗塞やそれに基づく突然死が引き起こされるが、プラーク破綻のメカニズムについては未だ不明な点が多い。現在、プラーク破綻の要因として特に注目されているのが、マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) と呼ばれる蛋白分解酵素である。これまで動脈硬化病変における MMPs 発現を病理学的に検討してきた結果、MMP-1 と MMP-12 が正常な動脈には発現せず、動脈硬化

でのみ特異的に発現していることを突き止めた。プラーク破綻がほとんど起らないウサギの大動脈病変と、しばしばプラーク破綻が認められるヒトの大動脈病変との間で、全 MMPs 発現を比較解析した結果、MMP-9 が、ヒトでは増加していたのに対し、ウサギでは逆に減少傾向にあった。これらの結果は、この3つの酵素 (MMP-1, MMP-12, MMP-9 のいずれかまたはすべて) が、動脈硬化とその合併症の発症に重要に関わる疾患特異的 MMPs であることを強く示唆していた。

## 2. 研究の目的

MMP-1, -9, -12の発現増加と動脈硬化性疾患、特にプラーク破綻の発生・進展との因果関係を解明し、それを基盤にプラーク破綻制御のための標的MMPsとしての特性を明らかにする。

また、既に作製されているMMP-12 TgウサギおよびMMP-1, MMP-9 TgウサギとWHHL MIウサギとを交配によりMMP Tg WHHL MIウサギの作製し、心筋梗塞への影響を解析する。

## 3. 研究の方法

①マクロファージ特異的にヒトMMP-1およびMMP-9を高発現するConstructを作製し、ウサギ卵へのマイクロインジェクションを行うことにより、MMP-1, -9をマクロファージ特異的に過剰発現させた新規トランスジェニック(Tg)ウサギモデルを開発する。既に作製しているMMP-12 Tgウサギと新規Tgウサギを用いて、冠状動脈プラーク破綻におけるMMP-1, -9, -12の役割を検討し、疾患特異的MMPsとしての特徴を明確にする。

②MMP-12 TgウサギおよびMMP-1, MMP-9 TgウサギとWHHL MIウサギとを交配させる。WHHL MIウサギとの交配には多くの時間と労力が必要になるため、各MMPs Tgウサギは1ラインのみを交配に用いる。

## 4. 研究成果

①MMP-9 Tgウサギの作製には54匹のドナーウサギから得られた1044個の受精卵を用いた。これらにMMP-9発現DNAコンストラクトを注入したうち879個を40匹のレシピエントウサギの卵管内に移植した。10匹のレシピエントウサギが妊娠し、26匹の産仔を得た。そのうち4匹が外来性のMMP-9陽性であったが、2匹は離乳を前に死亡したので、残りの2匹(雌雄1匹ずつ)をファウンダーとした。これらを元に繁殖を行い、現在までに12匹のF1、11匹のF2ウサギを得た。

MMP-1では、37匹のドナーから得られた693個の受精卵にMMP-1発現DNAコンストラクトを注入した。これらのうち567個を20匹のレシピエントウサギの卵管内へ移植したところ、5匹が妊娠し、20匹の産仔が得られた。産仔のうち4匹が外来性MMP-1陽性であったが、2匹が離乳前に死亡し、残りの2匹(雌2匹)をファウンダーとした。これらを用いて繁殖を行い、現在までに2匹のF1、10匹のF2ウサギを得た。

これらのTgウサギをバイオリソースとして保存するために、オスウサギから精液を採取して凍結した。

MMP-9 Tgウサギでは特に肺胞および腹腔マクロファージ、皮下および内臓脂肪に外来性

MMP-9のmRNA発現が見られた(図1)。さらにzymographyによる解析ではTgウサギの胚および腹腔由来のマクロファージでMMP-9の基質であるgelatinに対する酵素活性が確認された(図2)。

これらMMP-9 Tgウサギの足指には肉芽腫様の病変が見られ、先端部が脱落しているのが確認された(図3)。病変部の薄切標本を作製して観察したところ、MMP-9を発現するマクロファージが集積した像が観察された(図4)。②メスMMP-12 TgウサギとオスWHHL MIウサギの交配により誕生したウサギの中からMMP-12陽性メスウサギ(遺伝子型:MMP-12 +/0, LDLレセプター +/-)を選抜し、さらにオスWHHL MIウサギと交配した。誕生した仔ウサギの内、LDLレセプター遺伝子が-/-の個体(MMP-12は+/0および-/-)を選抜した。メスMMP-9 TgウサギとオスWHHL MIウサギを交配し、誕生した仔ウサギの中から遺伝子型(遺伝子型:MMP-9 +/0, LDLレセプター +/-)のメスウサギを選抜し、オスWHHL MIウサギと交配した。これらMMP Tg WHHL MIウサギは、MMPsが心筋梗塞へ与える影響を解析の解析に使用する。

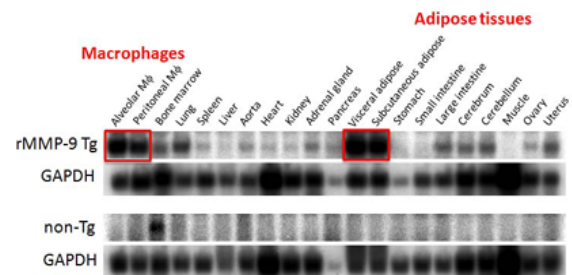


図1 外来性MMP-9のNorthern Blot像

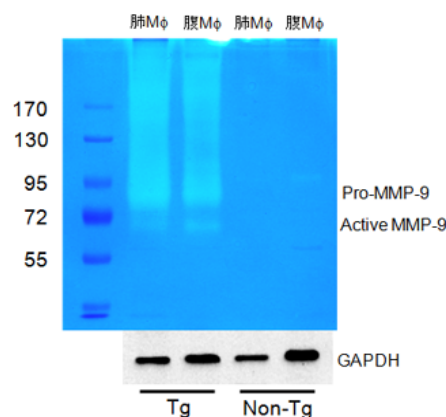


図2 Zymography(基質: Gelatin)



図3 Tgウサギの後足指に見られた病変

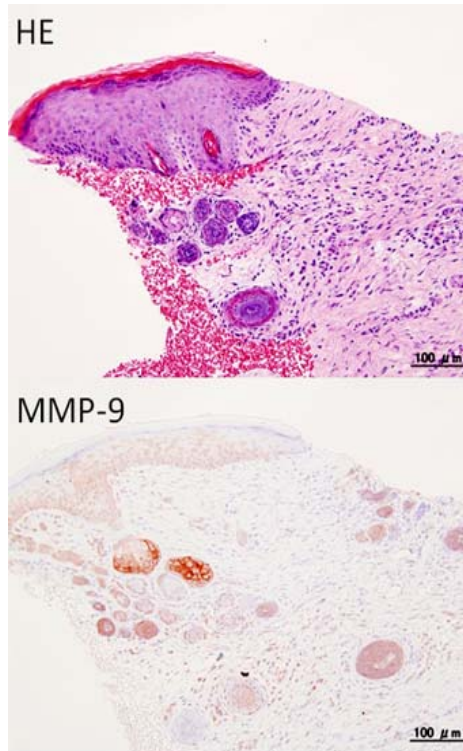


図4 MMP-9 ウサギ後足指部病変の組織像

#### 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4件)

- ① 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* 120: 2088-2094, 2009 査読あり
- ② 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* 29: 2047-2053, 2009 査読あり

- ③ Yu Y, Koike T, Kitajima S, Liu E, Morimoto M, Shiomi M, Hatakeyama K, Asada Y, Wang K, 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 査読あり
- ④ Yamada S, Wang K-Y, 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* 172:1419-1429, 2008 査読あり

#### 〔学会発表〕(計6件)

- ① 西島和俊, 山口慎二, 森本正敏, 渡辺照男. 北嶋修司長期保存された遺伝子改変ウサギ凍結精子の受精能の検討. 第4回ウサギフォーラム、2010年7月24日(秋田市)
- ② Koike T, Kitajima S, Yu Y, Nishijima K, Waqar AB, Inoue T, Wang Y, Bo Z, 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. 第42回日本動脈硬化学会総会・学術集会、2010年7月15～16日(岐阜市)
- ③ 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(東京都)
- ④ 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（下関市）

⑤ 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（さいたま市）

⑥ 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（神戸市）

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○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.animal.med.saga-u.ac.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

渡辺 照男 (WATANABE TERUO)

佐賀大学・総合分析実験センター・客員研究員

研究者番号：40037396

### (2) 研究分担者

西島 和俊 (NISHIJIMA KAZUTOSHI)

佐賀大学・総合分析実験センター・助教

研究者番号：70435874

(3) 連携研究者 ( )

研究者番号：