

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08858

研究課題名（和文）動脈硬化の発症・進展におけるアポA-Vの役割の解析：遺伝子欠損ウサギを用いた研究

研究課題名（英文）Functions of apo A-V in atherosclerosis: a study of knockout rabbit model

研究代表者

新見 学 (Niimi, Manabu)

山梨大学・大学院総合研究部・助教

研究者番号：80644898

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：新規の中性脂肪代謝研究モデル動物である、アポA-V欠損ウサギの作製に成功した。アポA-V欠損ウサギは、血漿中性脂肪および中性脂肪リッチリポ蛋白が上昇した。その上昇は高コレステロール飼料ならびに非絶食で増強されたことから、アポA-Vの異常と食後高脂血症との関連が示唆される。アポA-V欠損ウサギはヒト中性脂肪代謝や食後高脂血症、動脈硬化性疾患などの病態解明に貢献できるものと期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心筋梗塞や脳梗塞などの動脈硬化性疾患は本邦における死亡原因の上位を占める。本研究では心筋梗塞のリスク遺伝子として同定されたアポA-Vに着目し、新規の動物モデルとしてアポA-V欠損ウサギ作製した。アポA-Vの欠損により中性脂肪に富むリポ蛋白の代謝に異常をきたすことを明らかにした。本研究で樹立したアポA-V欠損ウサギの応用により、脂質異常症や動脈硬化性疾患の新たな予防・治療法の開発が期待される。

研究成果の概要（英文）：Apo A-V knockout (KO) rabbits were generated. Apo A-V KO rabbits showed increased plasma triglycerides (TG) and TG-rich lipoproteins levels. The elevations were exacerbated by a high cholesterol diet and postprandial state, suggesting a relationship between apo A-V and postprandial hyperlipidemia. Apo A-V deficient rabbits may become a valuable model for studying human triglycerides metabolism, postprandial hyperlipidemia, and atherosclerotic diseases.

研究分野：リポタンパク代謝

キーワード：アポA-V リポタンパク 中性脂肪 脂質異常症 食後高脂血症 レムナントリポタンパク 動脈硬化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アポ A-V は分子量 39 kDa のアポリポ蛋白質で、血漿中ではカイロミクロン、超低比重リポ蛋白質 (VLDL) および高比重リポ蛋白質 (HDL) に局在している。主な生理機能はリポ蛋白リパーゼと協調してリポ蛋白中の中性脂肪の異化に関与していると考えられている。ゲノムワイド関連解析研究においては、アポ A-V は LDL 受容体とともに心筋梗塞のリスク遺伝子として同定されている (Nature, 2015)。これは LDL 代謝の異常に加えて、レムナントリポ蛋白などの中性脂肪リッチリポ蛋白代謝の異常も心筋梗塞発症の重要な危険因子であることを示唆している。しかし、アポ A-V のリポ蛋白代謝における役割および動脈硬化性疾患における病理学的意義は十分に解明されていない。

2. 研究の目的

ヒトと類似したリポ蛋白代謝系を持つウサギを用い、新規のモデル動物であるアポ A-V 欠損ウサギを作製し、アポ A-V のリポ蛋白代謝および動脈硬化性疾患における役割を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) CRISPR/Cas9 によるアポ A-V 欠損ウサギの作製

Single guide RNA (sgRNA) の設計

ウサギ *APOA5* ゲノム遺伝子配列から、ゲノム編集ウェブツールを用いて標的ゲノム領域を選定し、エクソン 3 中の PAM 配列に隣接する 20 塩基を標的として sgRNA を作成した (図 1)。

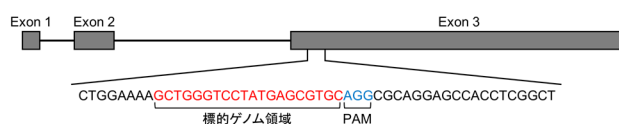


図1. CRISPER/Cas9標的ゲノム領域

受精卵の採取、マイクロインジェクションおよび胚移植

10 匹の雌性 New Zealand White ウサギを妊馬血清性性腺刺激ホルモン (PMSG) により過排卵処置し、3 日後に人工授精とともにヒト絨毛性性腺刺激ホルモン (hCG) を投与した。人工授精 17 ~ 19 時間後に卵管灌流により受精卵を採取した。sgRNA および Cas9 蛋白質を受精卵細胞質にマイクロインジェクション法により注入し、仮親に胚移植を行った。

ジェノタイプピング

仮親から出産したウサギ産仔の尾組織を採取して、ゲノム DNA を抽出し標的ゲノム領域の塩基配列をサンガー法により決定した。

(2) アポ A-V 欠損ウサギの血漿脂質表現型解析

飼育飼料

離乳後、17 週齢まで普通飼料 (CR-3M、日本クレア) で飼育した。17 週齢から高コレステロール飼料 (0.3% コレステロール、3% 大豆油) で 2 週間飼育した。

採血

血漿脂質測定のために、絶食 (一晚絶食) および非絶食で採血を行った。耳介動脈から血液を EDTA およびアプロチニンを添加した採血チューブに採取し、遠心分離により血漿を分離した。

血漿脂質測定

総コレステロール (TC)、中性脂肪 (TG)、HDL コレステロール (HDL-C) を市販試薬 (富士フィルム和光純薬) で測定した。LDL コレステロール (LDL-C) は TC から HDL-C および下記で測定した VLDL-C を減じて算出した。

血漿リポ蛋白分離

卓上超遠心分離機 (Optima MAX-TL、ベックマンコールター) 用いて、VLDL (比重 1.006 浮上分画) を採取した。分画中の TC および TG 含量を上記試薬により測定した。

4. 研究成果

(1) CRISPR/Cas9 によるアポ A-V 欠損ウサギの作製

CRISPR/Cas9 による *APOA5* 遺伝子変異導入成績を表に示す。10 匹の雌性ウサギから採取した 402 個の受精卵のうち、238 個にマイクロインジェクションを行い 7 匹の仮親に移植した。38 匹の産仔が産出し、そのうち 23 匹が離乳した (離乳率 61%)。ジェノタイプピングの結果、離乳産仔 23 匹中 19 匹に変異が認められた (変異導入率 83%)。また、変異導入個体 19 匹中 16 匹が両アレルへ、3 匹が片アレルへの変異導入が同定された。代表的な変異を図 2 に示す。また、全ての変異で早期終止コドンの導入が推定された。

表. APOA5遺伝子変異導入成績

	数
採卵	402
マイクロインジェクション胚	238
移植仮親	7
出産仮親	6
産仔	38
離乳産仔	23
変異個体	19

野生型	CTGGAAAAGCTGGGTCTATGAGCGTGCAGGCCAGGAGCCACCTCGGCT
変異導入 (片アレル)	CTGGAAAAGCTGGGTCTATGAGCG-----CAGGAGCCACCTCGGCT
	CTGGAAAAGCTGGGTCTATGAGC-----AGGCCAGGAGCCACCTCGGCT
変異導入 (両アレル)	CTGGAAAAGCTGGGTCTATGAGC-----AGGCCAGGAGCCACCTCGGCT
	CTGGAAAAGCTGGGTCTATGAGCG-----cagAGCCACCTCGGCT
	CTGGAAAAGCTGGGTCTATGAGC-----GCGCAGGAGCCACCTCGGCT
	CTGGAAAAGCTGGGTCTATGAG-----gacAGCCACCTCGGCT
	CTGGAAAAGCTGGGTCTATGAGCG-----CAGGAGCCACCTCGGCT
	CTGGAAAAGCTGGGTCTATGAGCG-----CAGGAGCCACCTCGGCT
	CTGGAAAAGCTGGGTCTATGAGCG-----CAGGCCAGGAGCCACCTCGGCT
	CTGGAAAAGCTGGGTCTATGAGCG-----AGGCCAGGAGCCACCTCGGCT
	CTGGAAAAGCTGGGTCTATGAGCG-----CAGGAGCCACCTCGGCT
	CTGGAAAAGCTGGGTCTATGAGCG-----TGCAGGCCAGGAGCCACCTCGGCT
	CTGGAAAAGCTGGGTCTATGAGCG-----AGGCCAGGAGCCACCTCGGCT
	CTGGAAAAGCTGGGTCTATGAGCG-----GCAGGCCAGGAGCCACCTCGGCT
	CTGGAAAAGCTGGGTCTATGAGCG-----GCAGGCCAGGAGCCACCTCGGCT
	CTGGAAAAGCTGGGTCTATGAGCGCGTGA-----CAGGAGCCACCTCGGCT
	CTGGAAAAGCTGGGTCTATGAGC-----CACCTCGGCT
	CTGGAAAAGCTGGGTCTATGAGCG-----GGCCAGGAGCCACCTCGGCT
	CTGGAAAAGCTGGGTCTATGAGCG-----CAGGCCAGGAGCCACCTCGGCT
	CTGGAAAAGCTGGGTCTATGAGCG-----cCCTCGGCT
	CTGGAAAAGCTGGGTCTATGAGCG-----CAGGCCAGGAGCCACCTCGGCT

図2. 代表的な導入変異配列

(2) アポ A-V 欠損ウサギの血漿脂質表現型解析

野生型ウサギ (WT, 4 匹) と両アレルに変異が導入されたアポ A-V 欠損ウサギ (KO, 16 匹) の血漿脂質を比較した。普通飼料飼育下での絶食採血において、アポ A-V 欠損により血漿 TG および VLDL-C が上昇した (図3)。KO ウサギの血漿 TG は WT ウサギの 1.6 倍、VLDL-C は 3.2 倍に上昇した。血漿 TC および HDL-C はそれぞれ 1.2 倍の軽微な上昇を認めたと、LDL-C は変動しなかった。

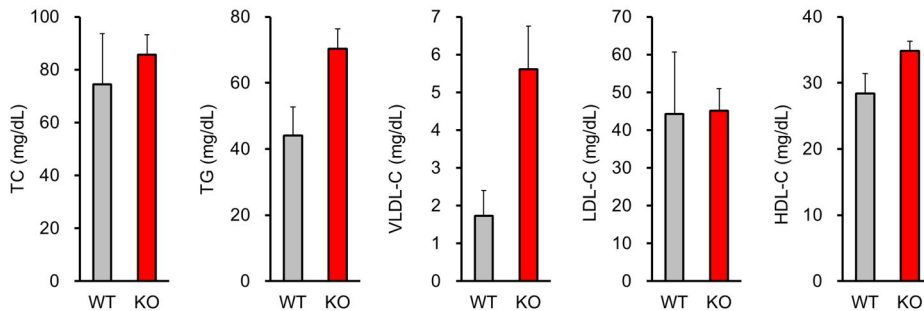


図3. 血漿脂質 (普通飼料、絶食採血)

高コレステロール飼料飼育下の絶食採血では、アポ A-V 欠損ウサギの血漿 TG および VLDL-C の上昇が増幅された (図4)。KO ウサギの血漿 TG は WT ウサギの 3.3 倍、VLDL-C は 2.8 倍に上昇した。血漿 TC および HDL-C はそれぞれ 1.4 倍および 1.6 倍の軽微な上昇を認めた。高コレステロール飼料の負荷により LDL-C は 300 mg/dL 程度まで上昇したが、KO および WT ウサギ両群での差異は認められなかった。

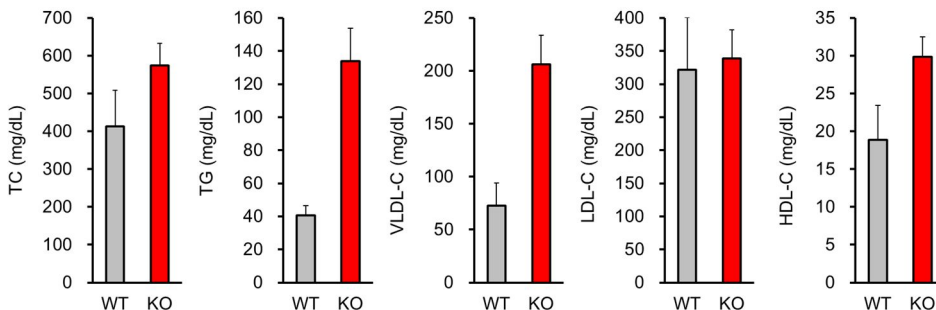


図4. 血漿脂質 (高コレステロール飼料、絶食採血)

高コレステロール飼料飼育下の非絶食採血では、アポ A-V 欠損ウサギの血漿 TG および VLDL-C の上昇がさらに増強された (図5)。KO ウサギの血漿 TG は WT ウサギの 7.3 倍、VLDL-C は 3.7 倍に上昇した。血漿 TC、HDL-C および LDL-C の両群での変動の傾向は絶食採血と同様であった。

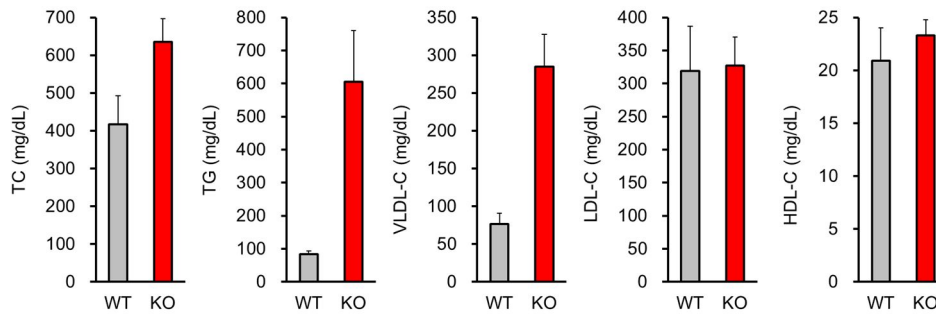


図5. 血漿脂質(高コレステロール飼料、非絶食採血)

高コレステロール飼料飼育下での絶食および非絶食採血の血漿脂質表現型の対比を 図 6 に示す。KO ウサギにおいて、非絶食採血での血漿 TG および VLDL-C は絶食採血と比較して上昇したのに対して、HDL-C は低下した。

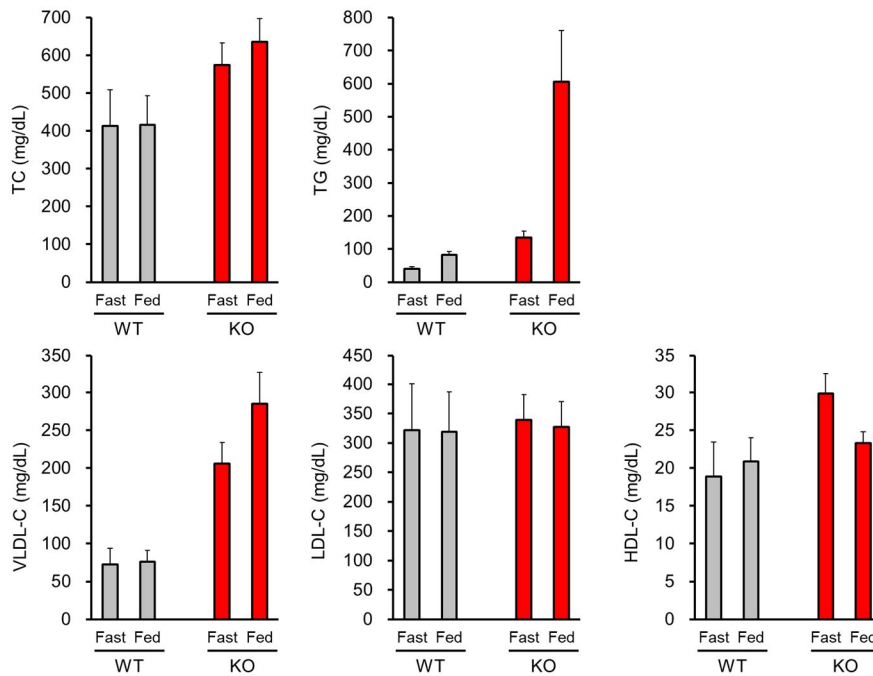


図6. 血漿脂質(高コレステロール飼料、絶食 vs. 非絶食採血)

(3) まとめ

新規の中性脂肪代謝研究モデル動物である、アポ A-V 欠損ウサギの作製に成功した。アポ A-V 欠損ウサギは、血漿中性脂肪および中性脂肪リッチリポ蛋白が上昇した。その上昇は高コレステロール飼料ならびに非絶食で増強されたことから、アポ A-V の異常と食後高脂血症との関連が示唆される。アポ A-V 欠損ウサギはヒト中性脂肪代謝のメカニズムの解明に有用な新しい疾患モデルになると考えられ、食後高脂血症や動脈硬化性疾患の病態解明に貢献できるものと期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Tang Xiangming, Niimi Manabu, Zhou Huanjin, Chen Lu, Chen Yajie, Yan Haizhao, Shiomi Masashi, Fan Jianglin	4. 巻 13
2. 論文標題 Pathological Investigations of Intracranial Atherosclerosis Using Multiple Hypercholesterolemic Rabbit Models	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Endocrinology	6. 最初と最後の頁 834207
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fendo.2022.834207	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Chen Yajie, Niimi Manabu, Zhang Lan, Tang Xiangming, Lu Jian, Fan Jianglin	4. 巻 13
2. 論文標題 A Simple Telemetry Sensor System for Monitoring Body Temperature in Rabbits --A Brief Report	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Animals	6. 最初と最後の頁 1677
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ani13101677	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Tang Xiangming, Zhou Huanjin, Yan Haizhao, Niimi Manabu, Fan Jianglin	4. 巻 29
2. 論文標題 Is apoCIII-Lowering A Double-Edged Sword?	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Atherosclerosis and Thrombosis	6. 最初と最後の頁 1117 ~ 1124
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5551/jat.LE002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Niimi Manabu, Yan Haizhao, Chen Yajie, Wang Yao, Fan Jianglin	4. 巻 167
2. 論文標題 Isolation and Analysis of Plasma Lipoproteins by Ultracentrifugation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Visualized Experiments	6. 最初と最後の頁 e61790
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3791/61790	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Niimi Manabu, Chen Yajie, Yan Haizhao, Wang Yao, Koike Tomonari, Fan Jianglin	4. 巻 10
2. 論文標題 Hyperlipidemic Rabbit Models for Anti-Atherosclerotic Drug Development	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Applied Sciences	6. 最初と最後の頁 8681
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/APP10238681	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yan Haizhao, Niimi Manabu, Matsuhisa Fumikazu, Zhou Huanjin, Kitajima Shuji, Chen Yajie, Wang Chuan, Yang Xiawen, Yao Jian, Yang Dongshan, Zhang Jifeng, Murakami Masami, Nakajima Katsuyuki, Wang Yao, Liu Enqi, Liang Jingyan, Chen Y. Eugene, Fan Jianglin	4. 巻 40
2. 論文標題 Apolipoprotein CIII Deficiency Protects Against Atherosclerosis in Knockout Rabbits	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology	6. 最初と最後の頁 2095 ~ 2107
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1161/ATVBAHA.120.314368	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計9件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 新見 学、松久 葉一、北嶋 修司、範 江林
2. 発表標題 中性脂肪代謝異常の新規疾患モデル：アポA-V欠損ウサギの樹立
3. 学会等名 第70回日本実験動物学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 新見 学、松久 葉一、北嶋 修司、範 江林
2. 発表標題 中性脂肪代謝異常の新規疾患モデル：アポA-V欠損ウサギ
3. 学会等名 第55回日本動脈硬化学会 総会・学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 新見 学、唐 向明、成田 啓之、範 江林
2. 発表標題 アポB-48含有カイロミクロンレムナントは動脈硬化を増悪させる
3. 学会等名 第54回日本動脈硬化学会 総会・学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 唐 向明、周 煥錦、Yan Haizhao、新見 学、範 江林
2. 発表標題 Apolipoprotein CIII deficient knock-out rabbits are susceptible to diet-induced fatty liver and insulin resistance
3. 学会等名 第54回日本動脈硬化学会 総会・学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 新見 学、松久 葉一、北嶋 修司、範 江林
2. 発表標題 カイロミクロンレムナントはアポE欠損ウサギの動脈硬化進展を促進させる
3. 学会等名 第110回日本病理学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 新見 学、松久 葉一、周 煥錦、Chen Yajie、Yan Haizhao、北嶋 修司、範 江林
2. 発表標題 カイロミクロンレムナントは動脈硬化進展を促進させる：アポE欠損ウサギを用いた研究
3. 学会等名 第53回日本動脈硬化学会 総会・学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 新見 学、Chen Yajie、範 江林
2. 発表標題 マトリックスメタロプロテナーゼと動脈硬化性疾患：ウサギモデルからの知見
3. 学会等名 第53回日本動脈硬化学会 総会・学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yan H, Niimi M, Matsuhisa F, Yang X, Zhou H, Kitajima S, Chen Y, Wang C, Yao J, Yang D, Zhang J, Murakami M, Nakajima K, Wang Y, Liu E, Liang J, Lai L, Chen YE, Fan J
2. 発表標題 Apolipoprotein CIII deficiency inhibits cholesterol diet-induced hyperlipidemia and atherosclerosis in knockout rabbits
3. 学会等名 The 19th International Symposium on Atherosclerosis (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yan H, Niimi M, Zhou H, Matsuhisa F, Kitajima S, Yang X, Chen YJ, Murakami M, Nakajima K, Liang J, Jifeng Zhang J, Chen YE, Yao J, Fan J
2. 発表標題 Deletion of the apoCIII gene in knockout rabbits attenuates cholesterol diet-induced hyperlipidemia and protects against atherosclerosis
3. 学会等名 88th European Atherosclerosis Society (EAS) Congress 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Jianglin Fan, Manabu Niimi, Yajie Chen, Ritsuko Suzuki, Enqi Liu	4. 発行年 2022年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 880
3. 書名 Atherosclerosis Methods and Protocols, Chapter 25: Use of Rabbit Models to Study Atherosclerosis	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	松久 葉一 (Matsuhisa Fumikazu) (20754253)	佐賀大学・総合分析実験センター・助教 (17201)	
研究 分担者	チェン ヤジエ (Chen Yajie) (90867756)	山梨大学・大学院総合研究部・特任助教 (13501)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 協力者	範 江林 (Fan Jianglin) (60272192)	山梨大学・大学院総合研究部・教授 (13501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関