

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 29 日現在

機関番号：37601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21500392

研究課題名（和文）高脂血症マウスを用いた生活習慣病重責モデルの作成と応用

研究課題名（英文）The creation and application of lifestyle-related diseases in the hyperlipidemia mouse.

研究代表者

伊藤 薫（ITO KAORU）

南九州大学・健康栄養学部・教授

研究者番号：70341633

研究成果の概要（和文）：ヨーロッパモリネズミ（*Apodemus sylvaticus*）には普通食でも血中コレステロール値が高い個体群が出現するためヒトの高脂血症モデルとして使用できる。このマウスに高コレステロール添加食を負荷しヒトの動脈硬化モデルとして有効かを検討した。高コレステロール添加食を5週間負荷すると血中コレステロール値の上昇が認められ、その上昇の程度は高コレステロールマウス群で有意に大きく、脂肪肝や肝硬変などの病理的変化がみられた。血中コレステロール値の増加に伴い内皮依存性弛緩反応の有意な減弱が認められた。高コレステロール血症では血管内皮細胞の血管保護に関与する機能を障害し、それが動脈硬化を引き起こす一因となることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：We evaluated the effect of high cholesterol diet on endothelial function of artery from European wood mice (*Apodemus Sylvaticus*), some of which spontaneously exhibit hyperlipidemia on a normal diet. According to the plasma cholesterol level, mice were divided into two groups; hypercholesterol mice and normocholesterol mice. Both mice were fed with a normal or high-cholesterol diet for 5 weeks. The high-cholesterol diet increased the total plasma cholesterol level in both groups. The endothelium-dependent relaxation of isolated aorta was worsened in both mice after high cholesterol feeding. Thus, the endothelium-dependent relaxation was inhibited depending on the total plasma cholesterol level.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：実験動物学

キーワード：疾患モデル、高脂血症、血管機能、動脈硬化、循環器・高血圧

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 動脈硬化は高血圧、糖尿病、虚血性心疾患などの生活習慣病と密接に関連している。動脈硬化を起こす最大要因は高脂血症である。血中の中性脂肪や低比重リポ蛋白

(low density lipoprotein; LDL) 濃度の上昇は過酸化脂質や酸化型 LDL の増加につながり、過酸化物の増加は血管に保護的に働いている血管内皮細胞を障害し、それが血管壁の粥状硬化を起こし動脈硬化の促進要因とな

る。このように生活習慣病の要因としては血管の機能変化が最も重要であり、生活習慣病の克服にはこれら要因の発現機構を明らかにすることが必要であり、適当な高脂血症動物モデルを用いて、血管病態の原因を究明するとともに、栄養学および薬理学の観点からその予防法、治療法を検討することが望ましい。

(2) 宮崎医科大学動物実験施設（現、宮崎大学フロンティア科学実験総合センター）の土屋公幸は同施設において系統維持しているマウス（ヨーロッパモリネズミ *Apodemus sylvaticus*）の中から高脂血症を呈する突然変異個体を見いだした。この *Apodemus sylvaticus* 由来の自然発症高脂血症(AHL)マウスは普通飼料で飼育しても、血清総コレステロール値が正常群（ANL マウス）に比べ有意に高い。また通常、マウスやラットでは効果がないコレステロール合成阻害薬プラバスタチンや食物繊維の連続投与により AHL マウスの血清総コレステロール値が有意に低下する。このマウスにおけるコレステロール値の変動はヒトの高脂血症患者と非常に類似している。AHL マウスの特性と高脂血症発症機序が明らかになれば、ヒトの遺伝性高脂血症のモデルとして高脂血症の発症メカニズムの解明やその治療法の開発に資することが可能である。また、通常ヒトは加齢とともに耐糖能低下や高血圧など複数の症状を併発することが多いので、この AHL マウスに高血糖や高血圧などを併発させることで、高脂血症と糖尿病や高脂血症と高血圧を併せ持つ生活習慣病が重積した生活習慣病モデルを確立すれば利用価値がきわめて高い。

## 2. 研究の目的

(1) 本研究では、AHLマウスの血管機能を解析しその異常を起こす機構を明らかにし、いかなる因子が高脂血症に関与するかを解明することで、本モデルの特性を明らかにする。そして本動物で動脈硬化を起こさせる条件を見だし、さらに実験的に糖尿病や高血圧を起こさせて、人で見られる生活習慣病の重積モデルを確立する。

(2) 高脂血症の動物モデルはこれまでいくつか報告されているが、*apoE*ノックアウトマウスのように極端に血中コレステロール値が高いモデルが多く、ヒトの大部分の高脂血症とはかけ離れている。その点、*Apodemus sylvaticus*はコレステロールレベルがヒトの高脂血症と同様であり、ヒトに近いモデルであるといえる。

(3) 本研究では、AHLマウスにより血中コレステロールの上昇と血管内皮機能の異常に関する機構と本モデルの特性を明らかにすることから、いかなる因子が高脂血症に関与するかを解明する。またAHLマウスで動脈

硬化を起こさせる条件を見だし、さらに実験的に糖尿病や高血圧を起こさせて、ヒトで見られる生活習慣病の重積モデルを作製し、メタボリックシンドロームモデルを確立する。

## 3. 研究の方法

(1) 研究分担者の越本が系統維持をしている *Apodemus sylvaticus* を血中コレステロール濃度により、自然発症高脂血症マウス(AHL)群と正常マウス (*Apodemus hyperlipidemic*: ANL)群に分けて血中コレステロール値の上昇が血管機能におよぼす影響を観察する。また高コレステロール食摂取による影響を検討するために、両マウスに高コレステロール食（1.25%コレステロール添加飼料）を5週間負荷して飼育して、普通食で飼育したマウスとの差異を観察した。

(2) 実験はマウスを麻酔して採血した後、心臓、肝臓を摘出し組織重量を測定した。血管の反応性は大動脈を用いるため、摘出後、幅 2-3 mm のリング状標本を作製した。血中総コレステロール値から、マウスを高コレステロール群（AHL群:180 mg/dL以上）と正常群（ANL群:160 mg/dL以下）とに分類した。

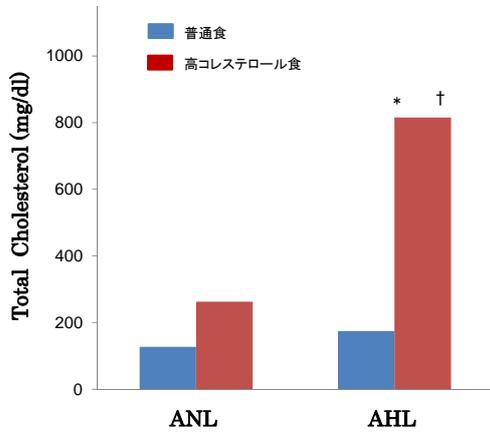
(3) 血液を遠心後、血清を採取して総コレステロール（TCH）、HDL コレステロール（HDL）、中性脂肪（TG）を富士ドライケム（富士フィルム）で測定した。酸化ストレスの測定は酸化ストレスのマーカーと言われている 8-hydroxydeoxyguanosin のエライザキットを用いて行った。

(4) 血管の反応性の測定は大動脈標本を用い、その等尺性張力を測定した。作用薬の弛緩反応は、あらかじめ標本をセロトニン（5-HT）で、その最大反応の約 60 %に収縮させ、作用薬を累積的に投与して測定を行った。弛緩薬としてアセチルコリン（ACh）、ニトロプルシドナトリウム（SNP）を用いた。

## 4. 研究成果

(1) 普通食で飼育した ANL、AHL 群の血中総コレステロール値は ANL に比べ AHL 群で有意に高かった。高コレステロール食を5週間負荷することにより ANL、AHL 両群で血中総コレステロール量の有意な増大が認められた。その増大の程度は AHL 群で有意に大きかった(図 1、表 1)。血中中性脂肪量は普通食では差がなかったが、高コレステロール負荷食では個体差が大きく AHL 群で高い傾向であったが両群間で有意な差は認められなかった。HDL コレステロール値は高コレステロール食負荷の AHL 群において ANL 群に比べ有意な増加が認められた。体重、肝臓、心臓重量を測定したところ肝重量の増大が認められ、肝重量体重比は AHL 群で有意に大きかった。体重、心重量は両群間に差

がなく、高コレステロール食負荷によっても変化は認められなかった(表 1)。AHL 群では、高コレステロール食の負荷により肝臓において多くの個体で脂肪肝や肝硬変の病巣が認められた。



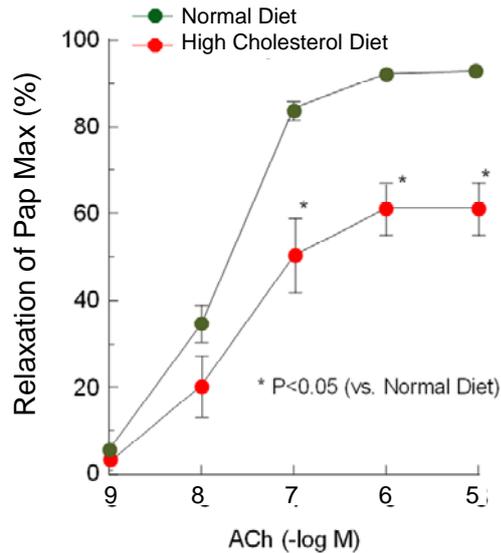
〔図 1. 普通食と高コレステロール添加食で飼育した ANL と AHL マウスの血中総コレステロール量の比較。\* ; P<0.05 (vs. ANL)、† ; P<0.01 (vs. Normal Diet)〕

	n	Normal Diet	High Chole Diet
<b>ANL</b>			
TCH (mg/ml)	12	126.92 ± 8.12	174.83 ± 22.87 *
Body Weight (g)	12	25.41 ± 0.95	28.25 ± 1.55
HDL (mg/ml)	12	47.76 ± 5.70	61.00 ± 9.27
TG (mg/ml)	12	392.76 ± 89.56	225.33 ± 42.84
Liver/Body Weight	12	0.043 ± 0.002	6.37 ± 0.36 *
<b>AHL</b>			
TCH (mg/ml)	16	262.44 ± 10.62 †	815.69 ± 279.96 *†
Body Weight (g)	16	28.04 ± 1.26	28.78 ± 1.31
HDL (mg/ml)	16	53.63 ± 8.98	102.69 ± 21.64 †
TG (mg/ml)	16	530.11 ± 100.02	1407.81 ± 906.78
Liver/Body Weight	16	1.23 ± 0.08 *	13.39 ± 1.24 *†

\*; P<0.05 (vs Normal Diet)  
†; P<0.05 (vs ANL)

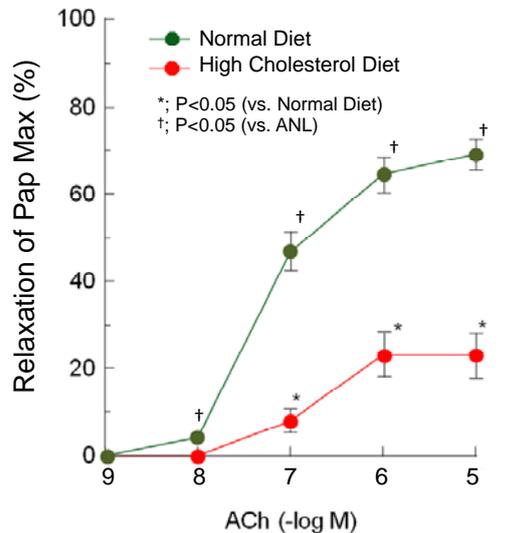
〔表 1. ANL、AHL マウスの体重、血中脂質、肝体重量比のまとめ〕

(2) 血中コレステロール量の増大が血管の収縮性や拡張性に影響するかを観察するために、両マウスの大動脈標本の等尺性張力を測定した。60 mM KCl やセロトニン (5-HT) による収縮反応は両群で差がなかった。弛緩反応は、あらかじめ標本を 5-HT で、その最大反応の約 60 % に収縮させ、ACh を累積的に投与したところ、両群の標本で用量依存性の弛緩反応を引き起こした。その反応は標本の内皮を機械的に擦過することで消失したことから、内皮を介する弛緩反応と考えられる。内皮を介する弛緩反応は ANL に比べ AHL 群で有意に減弱していた(図 2、3)。この ACh による弛緩反応は一酸化窒素 (NO) 合成阻害剤の前処置により消失することから、この弛緩反応は内皮からの NO の合成遊離によると考えられる。高コレステロール添



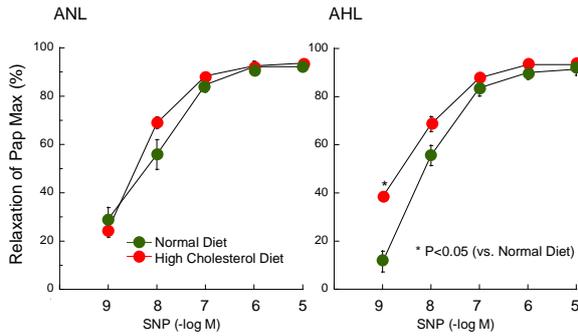
〔図 2. ANL 群大動脈における ACh の弛緩反応。ACh は普通食、高コレステロール添加食両群の血管において用量依存性の弛緩反応を引き起こした。ACh の弛緩反応は高コレステロール群で有意に減弱した。\* ; P<0.01 (vs. Normal Diet)〕

加食により NO を介する弛緩反応は ANL、AHL 両群とも有意な減弱がみられ、この減弱の程度は AHL 群で有意に大きかった(図 2、3)。血中コレステロール量の増大は NO による弛緩反応を減弱引き起こすことから、血中脂質の増加が内皮からの NO の合成遊離に影響している可能性が示された。



〔図 3. AHL 群大動脈における ACh の弛緩反応。ACh は普通食、高コレステロール負荷食両群の血管において用量依存性の弛緩反応を引き起こした。ACh の弛緩反応は高コレステロール群で有意に減弱した。\* ; P<0.01 (vs. Normal Diet)、† ; P<0.01 (vs. ANL)〕

(3) 高コレステロールによる ACh の弛緩反応の減弱が血管平滑筋機能に影響している可能性を検討するために、内皮非依存性の弛緩を起こす SNP による弛緩反応を両群の標本で観察した。SNP は両群の標本で用量依存性の弛緩反応を引き起こしたが、その弛緩反応には差がなく、高コレステロール負荷による減弱も認められなかった(図 4)。この結果から平滑筋細胞内 cGMP 作用以降の機能には血中コレステロールの増加が影響せず NO の感受性には変化がないと考えられる。



〔図 4. ANL、AHL 群大動脈における SNP の弛緩反応。SNP は普通食、高コレステロール添加食両群の血管において用量依存性の弛緩反応を引き起こした。SNP の弛緩反応は両群において高コレステロール負荷で減弱しなかった。\* ;  $P < 0.01$  (vs. Normal Diet)〕

(4) 血中コレステロール値の上昇は内皮依存性の NO による弛緩反応の減弱を引き起こす。特に AHL 群に高コレステロール食を負荷した場合には総コレステロール値の増加と共に HDL 値の増加も認められた。HDL 値の増加は動脈硬化に対し抑制的に作用するが、AHL 群では HDL 値の上昇にもかかわらず、さらなる NO の作用低下が認められた。この減弱は平滑筋の NO に対する感受性の変化によるものではなく、内皮細胞における NO の合成・遊離に影響している可能性が示唆された。酸化ストレスのマーカーである 8-hydroxydeoxyguanosin の血中濃度を測定したところ ANL 群では  $274.57 \pm 17.68$  pg/ml、AHL 群  $359.10 \pm 37.01$  pg/ml と AHL 群で有意な上昇が認められた。血中の酸化ストレスの上昇は血中コレステロールの酸化を引き起こす。血中コレステロール値が高い場合、血中過酸化脂質量が増加する可能性が高くなる。

以上の結果をヒトにおける高脂血症の場合に当てはめると、脂質の摂取量を制限しない生活を続けることは、AHL 群と同様に血中酸化コレステロール値の増加を引き起こし、それが内皮機能に影響して内皮細胞から合成遊離される NO の作用を減弱して、血管の拡張性の低下を引き起こす可能性が示唆

された。

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

- ① 伊藤薫、畑中麻衣子、川北久美子、中村真理、河野紗也加、越本知大、篠原明男、伊藤勝昭、高コレステロール食負荷による自然発症高コレステロール血症マウスにおける内皮依存性弛緩反応への影響、第 84 回日本薬理学会年会、横浜、2011
- ② 畑中麻衣子、川北久美子、杉山亜紀、伊藤薫、高コレステロール負荷が自然発症高コレステロール血症マウスの血管機能におよぼす影響、第 58 回日本栄養改善学会学術総会、広島、2011
- ③ 伊藤薫、畑中麻衣子、杉山亜紀、川北久美子、高コレステロール食負荷がマウスの血管内皮機能に及ぼす影響、第 66 回日本栄養・食糧学会大会、仙台、2012

〔図書〕(計 0 件)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

伊藤 薫 (ITO KAORU)

南九州大学・健康栄養学部・教授

研究者番号：70341633

##### (2) 研究分担者

( 0 )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

越本 知大 (KOSHIMOTO CHIHIRO)

宮崎大学・フロンティア科学実験総合センター・教授

研究者番号：70295210

伊藤 勝昭 (ITO KATSUAKI)

宮崎大学・農学部・名誉教授

研究者番号：70136795