

## 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21日現在

機関番号：17201

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21790322

研究課題名（和文） 遺伝子改変ウサギを用いたアポリポ蛋白 CIII の機能解析

研究課題名（英文） Analysis of apolipoprotein CIII function with transgenic rabbit

研究代表者

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

研究成果の概要（和文）：アポリポ蛋白質（apo）CIII の脂質代謝における機能を知ることが目的として、ヒト apoCIII 遺伝子改変ウサギの作製実験を行った。159 匹のドナーウサギから 5094 個の卵を採取し、その内 2727 個にヒト apoCIII を発現させる DNA コンストラクトを注入した。87 匹の仮親ウサギの卵管に 2276 個の胚を移植した結果、18 匹が妊娠し、24 匹の仔ウサギを得た。これらの仔ウサギからゲノム DNA を抽出し、PCR 法により導入遺伝子の検討を行ったが、ヒト apoCIII 遺伝子が導入されたウサギは得られなかった。

研究成果の概要（英文）：We attempted to create a transgenic rabbit as a tool to analyze the function of apolipoprotein (apo) CIII on lipid metabolism. 2727 ova were microinjected with human apoCIII expression DNA construct. 2276 embryos were transferred into 87 recipient rabbits, and 24 offspring were born. As a result of PCR analysis, no integration of human apoCIII gene was recognized in the offspring.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	2,000,000	600,000	2,600,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医科学

キーワード：動脈硬化、遺伝子組換え、病態モデル、ウサギ

## 1. 研究開始当初の背景

アポリポ蛋白質 CIII（apoCIII）は、超低密度リポ蛋白質（VLDL）やカイロミクロンを構成する蛋白質で、リポ蛋白リパーゼを阻害してトリグリセリド（TG）の異化を遅らせる機能を持つと考えられている（Aalto-Setälä et al., J. Clin. Invest., 1992）。血中

apoCIII 値は TG 値とよく相関し、IIb、III、IV、V、I 型高脂血症などで高値を示すことが知られており、臨床的にもその重要性が認識されている。血中 TG レベルは動脈硬化や心筋梗塞などの心血管系疾患の主要な危険因子であり（Jeppesen et al., Circulation, 1998）、高 TG 血症は、近年わが国でも大きく取り上げ

られているメタボリック症候群に関連し、II型糖尿病や心血管系疾患を進行させる (Reilly and Rader, *Circulation*, 2003)。また、apoCIII はそれ自体が単球の血管内皮細胞への接着を強化することにより、動脈硬化の進展に寄与するとの報告もあり (Kawakami et al., *Circulation*, 2006)、これらの病態の解明、治療法の開発が急務となっている。

ヒト apoCIII を過剰発現した遺伝子改変マウスにおいても重度の高 TG 血症が確認されているが (Ito et al., *Science*, 1990, Ebara et al., *J. Clin. Invest.*, 1997)、それを成因とする病態についてはあまり知られていない。マウスの脂質代謝系は VLDL 中に apoB48 が存在し、コレステロールエステル転送蛋白 (CETP) の活性がみられず、肝性リパーゼが血中に遊離するなどヒトとは異なり、食事由来脂質による高脂血症や動脈硬化などに抵抗性を持つことが (Greentje et al., *J. Lipid. Res.*, 2004) 病態の進行がみられない理由であると考えられる。従って、マウスはヒトの脂質代謝系のモデルとしては適当ではなく、現在ヒト apoCIII の生体に対する影響を解明するために適切なモデルが存在しないため、新たな動物モデルの開発が求められる。

I ウサギの脂質代謝系は、VLDL 中に apoB100 が含まれ、CETP 活性があり、肝性リパーゼが細胞膜に結合するなどヒトと類似しているため、これまでにもウサギを用いた脂質代謝や心血管障害に関する研究がなされてきた (塩見と伊藤, アニテックス, 2003)。また、いくつかの研究グループが遺伝子改変ウサギを作出し、成果を上げてきたが (Fan and Watanabe, *Pharmacol. Ther.*, 2003)、世界でもその技術を有する研究機関はわずかで、国内で Tg ウサギを開発し、その病態を解析できるのは研究代表者の研究グループのみである。

## 2. 研究の目的

ヒト apoCIII を導入した遺伝子改変ウサギを作製し、ヒト apoCIII の生体に対する効果を解析する。血液生化学検査や糖負荷試験などにより、ヒト apoCIII 遺伝子改変ウサギの脂質および糖代謝の特性を明らかにする。

高脂肪、高コレステロール食の負荷により、脂質代謝異常、動脈硬化等を惹起し、遺伝子改変ウサギと野生型のウサギで比較することにより、ヒト apoCIII の高発現がこれらの病態に与える影響について検討する。ヒト apoCIII 遺伝子改変ウサギが開発され、その特性が明らかとなれば、メタボリック症候群や心血管系障害の治療法を開発する上で、不可欠なモデル動物となることが期待される。

## 3. 研究の方法

4つのエクソンを含むヒト apoCIII (ゲノムアクセッションナンバー: AY422951) を制限酵素 *Pst*I で切り出し (4.4 kb)、pJC13ベクターに挿入した (図1)。ヒト apoCIII の発現はヒト apoE 遺伝子由来のプロモータの制御下に起き、これにより肝臓特異的にヒト apoCIII が発現することとなる (de Silva et al., *J. Biol. Chem.*, 1994)。さらに、ニワトリ由来の  $\beta$ -グロブリン 5' HS4 遺伝子 (1.2 kb) をヒト apoE プロモータおよびヒト apoCIII ゲノムの前後に2コピーずつ配列した。この遺伝子はインスレーター機能を有し、これにより外来遺伝子が宿主動物のゲノムに導入された際の位置効果を避けることが出来ると考えられている (Recillas-Targa et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002)。このコンストラクトを制限酵素 *Sa*I で切断して直鎖状にしたものをマイクロインジェクションに用いた (図1)。

実験には日本白色種ウサギを用いた。雌のドナーウサギに 150 単位の妊馬血清ゴナドトロピンを筋肉内に投与することにより過排卵を誘起した。3 日後に雄ウサギと交配、もしくは精液を人工授精するとともにヒト絨毛性ゴナドトロピン 100 単位を耳静脈内に投与して排卵を誘起した。翌日、ウサギを麻酔薬の過量投与により安楽殺し、開腹して卵管を採取した。卵管内を M2 バッファーで還流することにより受精卵を得た。ヒト apoCIII を高発現させる DNA コンストラクト (図 1) をウサギ受精卵の雄性前核内に注入した。

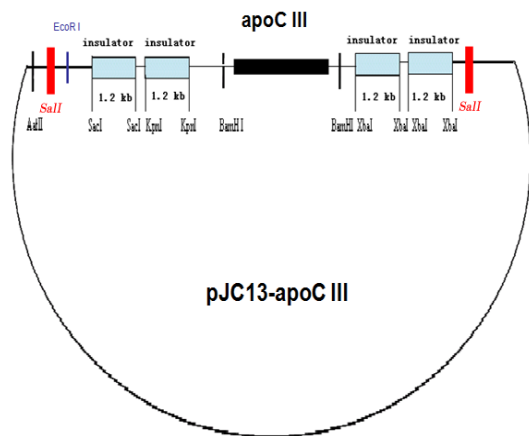


図1 ヒト apoCIII 発現遺伝子の構造  
制限酵素 *SalI* で切断し、直鎖状にしたものをマイクロインジェクションに用いた。

これをドナーウサギの卵管内に移植した。仮親ウサギには胚移植の1日前に50単位のヒト絨毛性ゴナドトロピンを耳静脈に投与することにより、ドナーウサギとの繁殖周期の同調を図った。

得られた仔ウサギの耳生検を行い、組織片をプロテナーゼKで消化した。フェノール・クロロホルム法によりゲノムDNAを抽出し、これをテンプレートとしてPCR法により導入遺伝子を確認した (forward primer: 5'-GTTAAGGACAAGTTCTCTGAG-3'; reverse primer: 5'-CAGCTTCTTGCCAGCTTT-3')。

#### 4. 研究成果

ヒト apo CIII を発現する DNA コンストラクト (CIII1) を 55 匹のドナーウサギから採取した 967 個の前核期受精卵の雄性前核に注入し、内 786 個を 31 匹の仮親に移植したところ、5 匹が妊娠し (妊娠率 16.1%)、15 匹の仔ウサギを得た。しかしそのいずれにもヒト apo CIII の遺伝子導入は確認されなかった。

妊娠率が極端に低いことから再度 DNA コンストラクトの調整を行い (CIII2)、104 匹のドナーウサギから得た 2125 個の受精卵にマイクロインジェクションを行った。この内 1490 個の胚を 24 匹の仮親ウサギに移植したところ 13 匹の妊娠が確認されたが出生に至

った仔ウサギは 9 匹のみで、そのいずれにおいてもヒト apo CIII の遺伝子導入は確認されなかった。

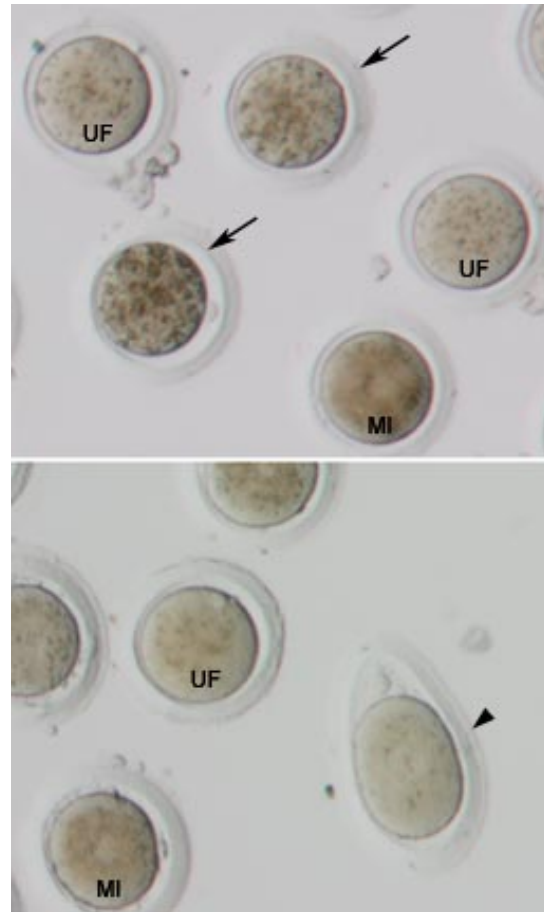


図2 ウサギ卵細胞の形態

マイクロインジェクション可能な受精卵

(MI) の他に、未受精卵 (UF) や褐色斑点が多数存在するもの (矢印)、奇形卵 (矢頭) も観察される。

総計では 159 匹のドナーウサギから 5094 個の卵を採取し、ドナー一匹当たり平均 32.0 個卵が得られた。しかし、採取された全てが受精卵ではなく、未受精卵やマイクロインジェクションには適さない異常卵も多数存在し (図2)、マイクロインジェクションが行えたのは 2727 個であった。87 匹の仮親ウサギの一方の卵管内に 2276 個 (26.2 個/匹) の胚を移植した。その結果、18 匹の仮親が妊娠 (20.7%) し、24 匹の仔ウサギを得たが、ヒ

ト apoCIII 遺伝子が導入された個体は得られなかった (表 1)。

マイクロインジェクションによる遺伝子改変動物の作製においては、使用する卵、仮親、DNA コンストラクト、DNA の精製度等、多くの要因がその成果を左右するため、今回の結果の原因については明らかではない。

DNA コンストラクト	CIII1	CIII2	合計
ドナーウサギ数	55	104	159
採取卵数	1610	3484	5094
一匹当たりの採取卵数	29.3	33.5	32.0
マイクロインジェクションした卵数	967	1760	2727
仮親数	31	56	87
移植卵数	786	1490	2276
一匹当たりの移植卵数	25.4	26.6	26.2
妊娠数	5	13	18
妊娠率 (%)	16.1	23.2	20.7
出生仔数	15	9	24
遺伝子導入仔数	0	0	0

表 1 胚操作の成績

#### 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 0 件)

[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)

[その他]

ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

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

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号 :

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号 :