

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590401

研究課題名(和文) プラーク破綻における MMP-9 の役割：新たな急性冠症候群発症モデルの開発

研究課題名(英文) Effects of MMP-9 on plaque rupture: development of a novel model for acute coronary syndromes.

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000 円、(間接経費) 1,200,000 円

研究成果の概要(和文)：マトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)-9の動脈硬化に対する作用を知るために、マクロファージ特異的にMMP-9を高発現させた(Tg)ウサギの解析を行った。高コレステロール食を負荷した結果、コントロールに比べ、MMP-9 Tgウサギでは動脈硬化病変が進展していた。そこで、急性冠症候群発症モデルの確立を目的として、先行研究で動脈硬化を進展させることが確認されているMMP-12 TgウサギとMMP-9 Tgウサギとを交配し、双方の導入遺伝子を併せ持つMMP-9/12 Tgウサギを確立した。現在、その特性を解析している。

研究成果の概要(英文)：Matrix metalloprotease (MMP)-9 transgenic (Tg) rabbits were analyzed to clarify the effects of MMP-9 on atherosclerosis. With high cholesterol diet loading, the arteriosclerotic lesion in MMP-9 Tg rabbit was larger than in control rabbit. Subsequently, MMP-9 Tg rabbit was mated with MMP-12 (known to accelerate the initiation of atherosclerosis) Tg rabbit and MMP-9/12 Tg rabbit was established as a candidate for a novel model for acute coronary syndromes.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：MMP-9 動脈硬化 遺伝子組換え ウサギ 病態モデル

## 1. 研究開始当初の背景

動脈硬化とその合併症は、本邦での死因の約3割を占めるが、中でも急性冠症候群(ACS)は最も死亡率が高いため、その克服は急務の課題である。ACSは、冠状動脈プラークの破綻と血栓形成による心筋虚血により生じる臨床症候群であり、不安定狭心症、急性心筋梗塞、心突然死が含まれる。

動脈硬化の発生からACS発症までに包括的に関わる鍵分子として、我々はマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)に注目し、剖検例から培養細胞、動物モデルまでを活用した種々の検討を行ってきた。その中で、重度の冠状動脈プラークと心筋梗塞を自然発症する世界初の動物モデルであるWHHLMIウサギとヒトの剖検例とで冠状動脈プラークを病理学的に比較検討した結果、WHHLMIウサギにはヒトと同様のマクロファージに富む不安定プラークが認められるものの、ヒトのACS症例にあるようなプラーク破綻像は非常に稀であった。これらの病変について網羅的なMMPs発現解析を行ったところ、ほとんどのMMPs発現はヒトとウサギでよく一致していたが、ヒトの病変で高発現していたMMP-9が、ウサギでは発現が有意に弱いことを見出した。この結果から、ウサギでプラーク破綻が少ないのはMMP-9の発現が低いことが原因であることが示唆された。

そこで、我々は冠状動脈プラークの発生・進展におけるMMP-9の役割を詳細に解明するため、MMP-9を過剰発現するトランスジェニック(Tg)ウサギの作製を試み、これに成功した。このウサギを解析することにより、動脈硬化の発生・進展におけるMMP-9の役割が明らかになると期待される。

## 2. 研究の目的

本研究では、我々が(平成20年~22年度科学研究費の支援により)開発に成功した、マクロファージ特異的にMMP-9を過剰発現するTgウサギモデルを用いて、動脈硬化の

発生・進展におけるMMP-9の役割を解明すると共に、MMP-9がプラークの不安定化と破綻に及ぼす役割を病理学的に検討する。この過程で、ウサギモデルにおけるプラーク破綻の発生とそのメカニズムを検討し、世界初となるACS発症モデルウサギの確立を目指す。

## 3. 研究の方法

ウサギの各臓器と肺胞ならびに腹腔マクロファージを採取し、導入したMMP-9遺伝子がマクロファージ特異的に発現していることをnorthern blotで確認する。さらにwestern blotting, zymographyによって、MMP-9の発現解析を行う。

MMP-9 Tgウサギに高コレステロールを給与して動脈硬化を誘導する。給与終了後に解剖して大動脈並びに冠状動脈を採取する。動脈硬化病変の量的・質的变化を病理学的に解析する事により動脈硬化の発生の初期段階と複合病変の形成時期におけるMMP-9の作用を検討する。

MMP-9 TgウサギとMMP12 Tgウサギとを交配し、MMP-9/12 Tgウサギを確立する。高コレステロール給与により動脈硬化を誘導し、冠状動脈における血栓の形成とそれに伴う心筋虚血・壊死の有無を、病理組織学的に解析する。

## 4. 研究成果

野生型のウサギにおいてMMP-9は骨髄や妊娠したウサギの乳腺に発現するが、MMP-9 Tgウサギにおいてはマクロファージや脂肪組織に強い発現が確認された(図1)。

野生型ウサギおよびMMP-9 Tgウサギから肺胞ならびに腹膜マクロファージを採取し、ゼラチンを用いたzymographyによる解析を行ったところ、MMP-9 Tgウサギのみで陽性反応が確認された(図2)。

図1 MMP-9 Tgおよび野生型ウサギにおけるMMP-9の発現

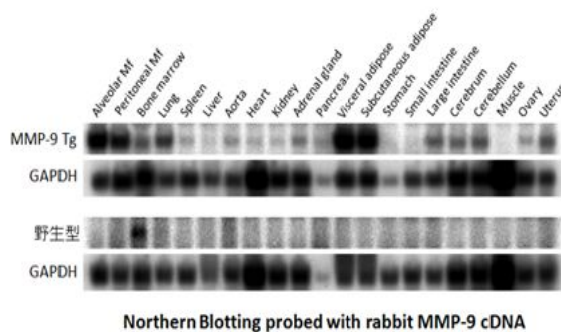
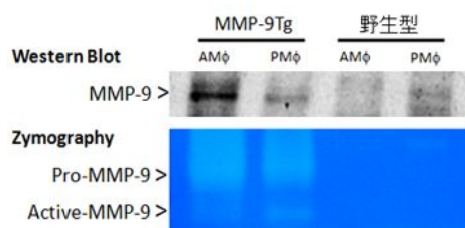


図2 MMP-9に対するZymography



これらの結果から、MMP-9 TgウサギにおいてはMMP-9がマクロファージに高発現し、このMMP-9は酵素活性を保持している事が確認された。

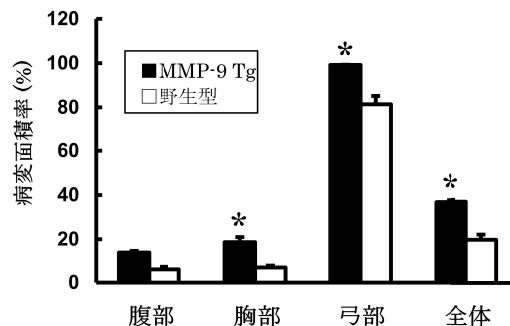
そこで、MMP9 Tgウサギの繁殖を行い、動脈硬化誘導実験に供するオスMMP9 Tgおよび対照となる同腹のオス野生型ウサギを得た。これらのウサギに対して高コレステロール食を給与した。週ごとに摂食量、体重を計測するとともに血中の総コレステロール値をモニタリングして1200～1500mg/mL程度に保たれるように食餌中のコレステロール濃度を調節した。高コレステロール給与期26週間の後、ウサギを安楽殺し、血液、大動脈、心臓等を採取して血液生化学的、病理学的解析を行った。

MMP-9 Tgウサギは野生型ウサギに比べ体重が軽く摂食量も少ない傾向にあったが、トリグリセリド高い傾向にあった。

大動脈のマクロ標本を作製し、MMP-9 Tgウサギと野生型ウサギで比較したところ、MMP-9 Tgウサギでは大動脈の弓部、胸部お

よび全体の動脈硬化病変が進展していた(図3)。

図3 MMP-9 Tgおよび野生型ウサギにおける動脈硬化の占める割合



\*: 野生型に対して有意差あり

急性冠症候群の新たなモデルウサギの開発を目指して、当初、MMP-9 Tgウサギと心筋梗塞を自然発症するWHHL MIウサギの双方の特徴を持つウサギの開発を計画していたが、複数の原因遺伝子を持つと考えられているWHHL MIウサギと他の系統のウサギを交配することで、WHHL MIウサギの持つ形質が失われると考えられた。

そこで、計画を変更し、先行研究により動脈硬化が促進する事が明らかとなっているMMP-12 TgウサギとMMP-9 Tgウサギを交配し、これらの導入遺伝子を併せ持つ急性冠症候群モデルの開発を目指した。MMP-12とMMP-9の双方を過剰発現するMMP-9/12 Tgウサギを用いてMMP-9 Tgウサギと同様の方法で、動脈硬化誘導実験を行った。現在、高コレステロール給与26週を終え、大動脈の病理学的解析を進めている。

同時に、冠動脈を広く検索することを目的として考案したウサギ心臓ブロック作製法に従い、各系統のウサギの動脈硬化病変の解析を進めている。これらの結果を解析する事により、MMP-9/12 TgウサギがACS発症モデルとなり得るかを検討する。

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 Nabeshima A, Yamada S, Guo X, Tanimoto A, Wang KY, Shimajiri S, Kimura S, Tasaki T, Noguchi H, Kitada S, Watanabe T, Fujii J, Kohno K, Sasaguri Y. Peroxiredoxin 4 protects against nonalcoholic steatohepatitis and type 2 diabetes in a nongenetic mouse model. Antioxid Redox Signal 2013 19:1983-98. 査読有り
- 2 Human apolipoprotein A-II protects against diet-induced atherosclerosis in transgenic rabbits. Wang Y, Niimi M, Nishijima K, Waqar AB, Yu Y, Koike T, Kitajima S, Liu E, Inoue T, Kohashi M, Keyamura Y, Yoshikawa T, Zhang J, Ma L, Zha X, Watanabe T, Asada Y, Chen YE, Fan J. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2013 33:224-31. 査読有り
- 3 Guo X, Yamada S, Tanimoto A, Ding Y, Wang KY, Shimajiri S, Murata Y, Kimura S, Tasaki T, Nabeshima A, Watanabe T, Kohno K, Sasaguri Y. Overexpression of peroxiredoxin 4 attenuates atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice. Antioxid Redox Signal. 2012 17:1362-75. 査読有り

〔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)

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

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

範 江林 (FAN, Jianglin)  
山梨大学・医学工学総合研究部・教授  
研究者番号：60272192

(3) 研究分担者

北嶋 修司 (KITAJIMA, Shuji)  
佐賀大学・総合分析実験センター・准教授  
研究者番号：70284643

(3) 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