

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月27日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790359

 研究課題名（和文）アポCⅢの動脈硬化における役割
 ー新規遺伝子改変ウサギによる検討

研究課題名（英文）Investigation of apoC-III on atherosclerosis

研究代表者

小池 智也（KOIKE TOMONARI）

神戸大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：40432158

研究成果の概要（和文）：

ヒトと類似した脂質代謝系を有するウサギを用いて、ヒトアポリポ蛋白 CIII(アポ CIII) トランスジェニック(Tg)ウサギを開発し、脂質代謝と動脈硬化におけるアポ CIII の役割を明らかにすることを目的とした。初年度のマイクロインジェクションにて500個を超える胚に遺伝子導入したが、当初の予想よりも産仔数が少なく、Tg ウサギは得られなかった。そのため、材料と方法の改善を行った結果、格段に産仔数の増加が認められ48匹の産仔を得たが、ヒトアポ CIII 遺伝子を発現する個体は得られなかった。改善された方法によって Tg ウサギを得られる可能性が高くなったため、今後もマイクロインジェクションを継続する。

研究成果の概要（英文）：

Features of lipoprotein metabolism in rabbits, unlike mouse, resemble to human, we planned to make human apoCIII transgenic (Tg) rabbits to reveal its functions on lipoprotein metabolism and atherogenesis. For the first year, we injected more than 500 embryos but failed to obtain any positive Tg rabbits due to low number of living pups born. After that, we modified the protocol of microinjection. In the second year, we successfully got 48 alive pups. Although we still did not get any positive rabbits that carry human apoCIII gene, it is quite possible that we will be successful soon. The work is under way for the further experiment.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：分子病態学、動脈硬化

1. 研究開始当初の背景

アポ CIII は、79 のアミノ酸からなる糖タンパクであり、主に肝臓と小腸で産生される。アポ CIII は、生理的には TG-rich リポ蛋白(カイロミクロン、超低比重リポ蛋白 VLDL) の主要な構成アポ蛋白として機能している。そのため、血中アポ CIII 濃度は血清 TG 値とよく相関する。約 20 年前、アポ CIII の生理機能を明らかにする目的で細胞実験な

らびに動物実験が行われ、その結果、アポ CIII は単にリポ蛋白を構成するアポ蛋白というだけでなく、TG を水解する酵素(リポ蛋白リパーゼ)を直接阻害する機能があることが明らかにされ、それを裏付けるように、ヒトのアポ CIII を過剰発現したマウスにおいて、高 TG 血症が発症した。臨床においても、高 TG 血症を示す生活習慣病(2 型糖尿病、メタボリックシンドローム)患者におい

て、アポ CIII 濃度の増加が認められるが、TG-rich リポ蛋白の増加に伴う構成蛋白の増加というだけでなく、上述のメカニズムによって、アポ CIII が高 TG 血症をさらに悪化させている可能性が考えられる。

一方、動脈硬化の発生進展に対して高 TG 血症がどのような役割を果たすかは、長年議論が続いてきたが、近年、米国での大規模臨床研究(CARE trial)において、高 TG 血症が、動脈硬化の合併症発症の予測因子となることが報告された。さらに興味深いことに、血中のアポ CIII 濃度そのものが、動脈硬化の合併症発症の独立した危険因子となることが示された。

これらの報告を整理することで、ひとつの仮説を着想した。上述のように、アポ CIII は単に TG-rich リポ蛋白に搭載されるだけでなく、積極的に TG-rich リポ蛋白代謝の阻害も行う。そのため、アポ CIII を多く持つ TG-rich リポ蛋白は、血中の滞留時間が延長される。この滞留時間の延長が、TG-rich リポ蛋白の動脈壁への浸入・貯留のチャンスを増やし、その結果として動脈硬化の発生を促進するのでは、という仮説である。つまり、単なる TG という要素だけでは説明できなかった動脈硬化との関係が、アポ CIII という新たな要素を加え、アポ CIII が増加したときの TG という絞り込みを行うことで、TG と動脈硬化の関係がクリアカットになるのではと考えた。

この仮説を明らかにするためには、アポ CIII を過剰発現した動物モデルを用いた、動脈硬化研究が必須となる。既に、アポ CIII・Tg マウスが開発されているが、マウスのアポ CIII はヒトとは異なっており、脂質代謝系自体にも大きな違いが存在するため、CIII と動脈硬化との関係を解析できない。そこで申請者らは、ヒトアポ CIII・Tg ウサギの開発を計画した。ウサギは、後述のように、アポ CIII 蛋白とリポ蛋白代謝系がヒトとよく類似しているため、アポ CIII の脂質代謝ならびに動脈硬化における役割の解明において、非常に適したモデルといえる。

2. 研究の目的

本研究では、アポ CIII の脂質代謝ならびに動脈硬化の発生進展における役割を明らかにするため、①発現量の異なる複数系統のアポ CIII・Tg ウサギを開発することにより、様々な割合でアポ CIII を持つ TG-rich リポ蛋白を再現して、リポ蛋白代謝に対する CIII の影響を解明し、②それらの脂質変化が動脈硬化にどのような影響を及ぼすのかを明らかにする。さらに、発現量の異なるアポ CIII・Tg ウサギの開発により③様々なタイプの高 TG 血症を示すウサギの誕生が予想され、理想的な表現型を示した系統を、新規

の高 TG 血症疾患モデル動物として確立することを旨とする。

3. 研究の方法

(1) アポ CIII・Tg ウサギの開発

アポ CIII を生理的な発現臓器(肝臓、小腸)で過剰発現させるために、ヒトのアポ CIII ゲノム遺伝子を採用し、その配列の両端にインスレーター配列を挿入することで、染色体上の位置に影響を受けずに安定して発現できるコンストラクトを用いて、ウサギ受精卵へのマイクロインジェクションを行う。生まれた子ウサギの耳組織を採取してゲノムを抽出し、ゲノム PCR 並びに Southern blotting により遺伝子導入の確認とコピー数の定量を行う。また、Tg ウサギが1ヶ月齢の時点で採血し、アポ CIII の血中濃度を、臨床検査で用いられる自動分析器にて計測する。F1 世代以降で十分な数のウサギが増えた時点で各臓器における mRNA 発現を Northern blotting で確認する。

(2) アポ CIII・Tg ウサギの表現型解析

Tg ウサギが3ヶ月齢の時点で、血漿中のアポ CIII 濃度の計測、絶食時ならびに摂食後の TG-rich リポ蛋白の変化、ならびに関連する脂質を分析する。

a) 絶食時に採血を行い、血中のアポ CIII 濃度を計測する。血中の TG、総コレステロール、HDL-コレステロールを Wako 社のキットにより測定する。また、同血漿を超遠心法により 7 分画 (>1.006, 1.006-1.02, 1.02-1.04, 1.04-1.06, 1.06-1.08, 1.08-1.10, 1.10-1.21 g/ml) に分離し、各分画に存在するリポ蛋白の、コレステロールと TG 含有量を計測する。同サンプルを agarose gel に流し、各分画のリポ蛋白の泳動パターンを解析する。また、同サンプルを SDS-PAGE にて泳動し、各種アポ蛋白(B100, E, AI, CIII)の分布と量を検討する。各分画のアポ CIII 濃度を上記分析器にて測定する。また、ヘパリン注射後血漿を採取し、リポ蛋白リパーゼ活性をアイソトープラベルしたトリオレインを用いて測定する。

b) 再摂食から 1, 2, 4, 6, 12 時間後に採血して、血中 TG 値の変化を計測すると共に、同血漿を超遠心して >1.006 g/ml の比重を採取し、SDS-PAGE にて分離し、Western blotting 後アポ B 抗体で染色してアポ B48 とアポ B100 の量的変化を解析する。

(3) Tg ウサギへの動脈硬化誘導実験

アポ CIII・Tg ウサギならびに同腹の non-Tg ウサギが4ヶ月齢の時点で、コレステロールを 0.3% 添加した特殊餌を給餌し、高コレステロール血症を生じさせる。これを8週間ならびに24週間継続し、動脈硬化の早期病変(脂肪斑)、および、進行病変(粥腫)を発生させる。特殊食期間中、毎週採血し脂質の変化

(特に TG-rich リポ蛋白動態)を解析する。特殊食終了後、解剖して大動脈並びに冠状動脈を採取し、病理組織学的に解析する。大動脈は SudanIV により病変を脂肪染色し、画像解析ソフトにより面積を計測する。その後大動脈弓部、胸部、腹部に分けそれぞれ 10-20 の小片へと切り出し、顕微鏡標本を作製する。HE 染色、エラスチンなどの線維成分を染める EVG 染色、特異抗体を用いた免疫染色(マクロファージ抗体 RAM-11、血管平滑筋細胞抗体 HHHF35)により細胞成分を染め分ける。高 TG 血症と動脈硬化との直接的関係を解析するため、高 TG 血症で増えるリポ蛋白のマーカ分子(アポ CIII, アポ B48, B100, アポ E)を特異抗体により染色し、TG-rich リポ蛋白の沈着とマクロファージの泡沫化との関係を病理組織学的に解析する。EVG により染色された内弾性板を基準に内膜病変の断面積を計測し、免疫染色にて染色された細胞成分を画像解析ソフトにより計測する。

(4) 高 TG 血症疾患モデルの樹立

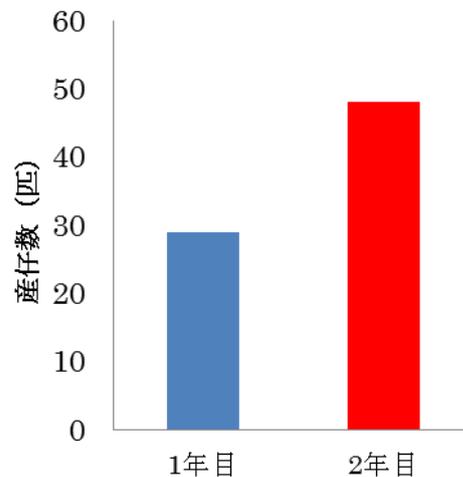
上記検討の中で、特に有用と思われる表現型を示す系統について、新たな疾患モデルウサギとしての樹立を試みる。具体的には、①生活習慣病患者で見られる程度の高 TG 血症を示すウサギ(TG 値 150-300mg/dl 程度、IV 型高脂血症モデル)、②空腹時 TG 値は正常(<150mg/dl)だが食事後に著明な高 TG 血症を示し 6 時間以上持続するウサギ(食後高 TG 血症モデル)、③血中の TG 値が極めて高く(1,000mg/dl)、血清静置試験により上層にクリーム層が認められるウサギ(I or V 型高脂血症モデル)、の表現型を示すモデルの出現が期待される。これらの表現型が認められる系統に関して、同一世代間での複数個体(n=10 以上)を解析し、個体間の表現型のばらつきを検証すると共に、その性質が継代されるかどうかを次代を得ることで検証し、再現性が高く継代する有用な系統に関して、精子を採取し凍結保存する。

4. 研究成果

初年度では、アポ CIII の遺伝子コンストラクトを、マイクロインジェクションにより注入した受精卵を、1 羽のレシピエントウサギあたり、20-30 個を子宮に戻し、妊娠を誘発するため hCG を静注した。2 週間後に腹部を触診し、妊娠の有無を確認した。その結果、29 匹の子ウサギが生まれたものの、アポ CIII 遺伝子が導入された子ウサギは得られなかった。そのため、実験工程を見直し、改善点を模索した。2 年目には、レシピエントは経産個体を使用することにし、マイクロインジェクション後 3-4 時間培養して、胚の状態が良いものを選抜した後、レシピエントの子宮に移植した。また、採卵のタイミングをより厳密にするため、1 回あたりの実験スケール

を小さくし、hCG 注射から 19-20 時間後に確実に採卵できるような体制にした。その結果、240 個の胚をドナーウサギに移植し、48 匹の産仔を得た。

胚移植後の産仔数



これらの耳組織の一部を採取し、ゲノム DNA を抽出して、ゲノム PCR を行った結果、ヒトアポ CIII 遺伝子がゲノム上に組み込まれたウサギは、残念ながら得られなかった。しかしながら、本研究により、ウサギのマイクロインジェクションにおいて、より出生数の多い方法の確立に成功したため、これまで以上に Tg ウサギの開発効率が高まることが予想される。そのため、今後も、アポ CIII Tg ウサギの開発を実現させるべく、改善された方法にてマイクロインジェクションを継続する。

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 1 件)

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. Human apolipoprotein A-II protects against diet-induced atherosclerosis in transgenic rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 33:224-231, 2013

[学会発表] (計 6 件)

1. Koike T, Kitajima S, Nishijima K, Liu E, Watanabe T, Fan J. Apolipoprotein-AII plays an important role in lipid

- metabolism and atherosclerosis. 4th international Rabbit Biotechnology Meeting. 2011年6月30日～7月1日. Hungarian Academy of Sciences (Budapest)
2. Niimi M, Nozako M, Koyama T, Nagano C, Kohashi M, Okutsu R, Kudo Y, Yoshikawa T, Koike T, Fan J. Probuocol has different anti-atherogenic effects compared to atorvastatin. 第43回日本動脈硬化学会総会・学術集会. 2011年7月15日～16日. ロイトン札幌 (札幌市)
3. Koike T, Wang Y, Yu Y, Wang X, Niimi M, Waqar AB, Kitajima S, Nishijima K, Fan J. ApoAII-rich HDLs have anti-inflammatory functions. XVI International Symposium on Atherosclerosis. 2012年3月25日～29日. Sydney Convention and Exhibition Centre (Sydney)
4. Yu Y, Ning B, Wang X, Waqar AB, Koike T, Shiomi M, Fan J. WHHLMI rabbits develop metabolic syndrome when consumed normal-calories-diet containing fat and fructose. 第44回日本動脈硬化学会総会・学術集会. 2012年07月19日～20日. ヒルトン福岡シーホーク (福岡市)
5. Koike T, Kitajima S, Nishijima K, Liu E, Watanabe T, Fan J. Apolipoprotein-AII plays an important role in lipid metabolism. 第1回日中合同ウサギバイオサイエンスフォーラム. 2012年8月3日～5日. 宮崎観光ホテル (宮崎市)
6. 小池 智也, 伊藤 隆, 山田 悟士, 国吉 信恵, 小林 努, 塩見 雅志. 急性冠症候群誘発モデル、WHHLMIウサギ. 第116回関西実験動物研究会. 2012年12月14日. 聖護院御殿荘 (京都市)

〔図書〕 (計 1 件)

Shiomi M, Koike T, Ishida T. LIPOPROTEINS ROLE IN HEALTH AND DISEASES. INTECH. 2012, 758(533-560)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小池 智也 (KOIKE TOMONARI)

神戸大学・大学院医学研究科附属動物実験施設・特命助教

研究者番号：40432158