

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460486

研究課題名(和文) 動脈硬化進展とプラーク破綻におけるMMP-1の役割：遺伝子改変ウサギを用いた研究

研究課題名(英文) Elucidation of roles of MMP-1 in atherosclerosis and plaque rupture using transgenic rabbits

研究代表者

新見 学 (NIIMI, Manabu)

山梨大学・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) 3,800,000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-1(MMP-1)の高発現は動脈硬化や動脈瘤の発生に関連すると考えられているが、マクロファージ由来のMMP-1の直接的な関与については明かでない。我々はマクロファージ特異的にヒトMMP-1を発現する遺伝子改変(Tg)ウサギを作製し、これらの解明を試みた。コレステロール食により動脈硬化を誘発したところ、MMP-1 Tgウサギは対照に比べて動脈硬化病変中の血管中膜の弾性線維の破綻が増加した。また、大動脈瘤モデルにおいて、MMP-1 Tgウサギは大動脈の拡張が促進した。これらの結果はマクロファージ由来のMMP-1が血管病変に重要な役割を果たしていることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：Increased expression of matrix metalloprotease-1 (MMP-1) has been implicated in atherosclerosis and aneurysms; however, it is not fully understood whether macrophage-derived MMP-1 affects atherosclerosis and aneurysm. To investigate this hypothesis, we generated transgenic (Tg) rabbits expressing human MMP-1 in macrophages under the control of human scavenger receptor promoter. After feeding a cholesterol rich diet, MMP-1 Tg rabbits had similar lesion size of aortic atherosclerosis compared with non-Tg rabbits; however, Tg rabbits showed a remarkable destruction of the medial elastic lamina in the aortic lesions. Using an elastase-induced aneurysm model, we found that Tg rabbits showed greater aortic dilation than non-Tg rabbits. These results indicate that macrophage-derived MMP-1 plays an important role in pathogenesis of vascular disease.

研究分野：実験病理学

キーワード：動脈硬化 腹部大動脈瘤 ウサギ トランスジェニック MMP-1

1. 研究開始当初の背景

マトリックスメタロプロテアーゼ (MMPs) は細胞外基質 (コラーゲン、エラスチン、糖蛋白、プロテオグリカンなど) の主な分解酵素であり、動脈硬化病変中での MMP の活性亢進は、プラークの不安定化や破綻のリスクを惹起させると考えられている。事実、ヒト動脈硬化病変中にコラゲナーゼを始めとする種々の MMPs の発現が認められており、冠動脈疾患と血中 MMPs の関連も報告されている。MMPs の中でも動脈硬化病変を構成する主要な細胞成分であるコラーゲンを分解するコラゲナーゼ (MMP-1, -8, -13) とプラーク破綻の関連性について種々の解析が行われてきた。しかし、マクロファージ由来の MMP-1 が及ぼす、動脈硬化進展並びにプラーク破綻への直接的な関与については解明されていない。

そこで我々はヒトと相同な MMP-1 遺伝子を有し、且つヒトと類似のリポ蛋白代謝を有する実験動物であるウサギを用いて、これらを解明することを着想した。

2. 研究の目的

動脈硬化及びプラーク破綻にマクロファージ由来 MMP-1 が及ぼす直接的な影響を明らかにする事を目的とした。この目的を達成するためにマクロファージ特異的ヒト MMP-1 遺伝子改変 (Tg) ウサギを作製し、動脈硬化性疾患を誘発した病態モデルにより評価する事とした。

3. 研究の方法

(1)マクロファージ特異的ヒト MMP-1 Tg ウサギの作製

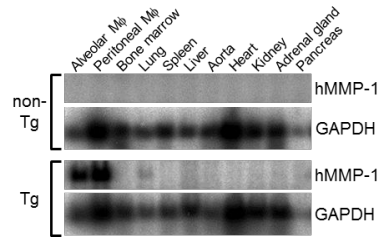
マクロファージ特異的ヒト MMP-1 Tg ウサギを作製するために、ヒトスカベンジャー受容体 A プロモーター/エンハンサー配列をプロモーターとしてヒト MMP-1 Tg コンストラクトを作製した (図 1)。

Insulator	Scavenger receptor-A enhancer/promoter	h MMP-1 cDNA	poly A	Insulator
-----------	--	--------------	--------	-----------

図 1

Tg コンストラクトを受精卵にマイクロインジェクションし、偽妊娠雌性ウサギに移植した。産仔の genomic DNA を鋳型として PCR によりジェノタイピングを行った。693 個の受精卵にマイクロインジェクションし、567 個を 20 匹の偽妊娠雌性ウサギ (仮親) へ移植、11 匹の生存産仔を得た。その内、2 匹が Tg 陽性個体であった。ノーザンブロットにより mRNA の発現を解析したところ、ヒト MMP-1 は肺泡マクロファージ及び腹腔マクロファージに特異的な発現が認められた (図 2)。

また、ウェスタンブロットにより Tg ウサギにおける腹腔及び肺泡マクロファージ中の MMP-1 の増加 (図 3、上) さらにザイモグラフィにより MMP-1 酵素活性の上昇を確認した (図 3、下)。



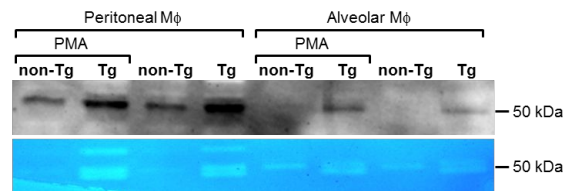
hMMP-1, ヒト MMP-1

GAPDH, グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素

Peritoneal Mφ, 腹腔マクロファージ

Alveolar Mφ, 肺泡マクロファージ

図 2



Peritoneal Mφ, 腹腔マクロファージ

Alveolar Mφ, 肺泡マクロファージ

PMA, phorbol 12-myristate 13-acetate

図 3

(2) コレステロール食誘発性動脈硬化モデル

MMP-1 Tg 及び同腹対照 (non-Tg) ウサギにコレステロール含有飼料を 16 週間摂取させ食餌性動脈硬化を誘発した。その間、経時的に血漿総コレステロール (TC) を測定した。16 週時に大動脈を採取し、動脈硬化病変を病理学的に解析した。ホルマリン固定後の大動脈に SudanIV による脂質染色を施し、肉眼的な脂質沈着面積を測定した。また、薄切標本を作製し、顕微鏡的な病理組織学解析を行った。病理組織学解析として、動脈硬化病変面積、病変中の構成細胞であるマクロファージの免疫染色による定量を行った。さらに、MMP-1 が及ぼす動脈硬化病変中の質的变化として中膜弾性線維の破綻を弾性線維染色により定量した。

(3) エラスターゼ誘発性大動脈瘤モデル

MMP-1 Tg 及び non-Tg ウサギにコレステロール含有飼料を摂取させ高脂血症とし、腹部大動脈周囲にエラスターゼを塗布して大動脈瘤を誘発した。腹部大動脈径を超音波エコーにより計測し、大動脈瘤誘発 2 週間後に大動脈を採取し病理組織学解析を行った。

4. 研究成果

(1) マクロファージ特異的ヒト MMP-1 Tg ウサギの一般所見

マクロファージ特異的ヒト MMP-1 Tg ウサギの作製に成功した。MMP1 Tg に外見的な異常所見は認められなかった。また、体重、血漿生化学 (脂質、肝機能、腎機能)、血液学的検査値は Tg と non-Tg で差異は認められなかった。

(2) コレステロール食誘発性動脈硬化モデル

MMP-1 の動脈硬化進展及びプラーク破綻に及ぼす影響を評価する目的で、Tg 及び non-Tg ウサギにコレステロール含有飼料を摂取させ高脂血症とし、動脈硬化を誘発した。コレステロール含有飼料により血漿 TC は 1200 mg/dL 程度まで上昇した。Tg と non-Tg で血漿 TC の変化に差は認められなかった(図4)。

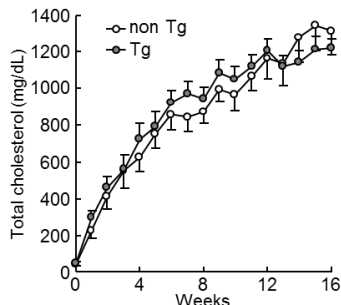


図4

採取した大動脈を肉眼的に解析したところ、動脈硬化病変における脂質沈着面積は Tg と non-Tg で同程度であった(図5)。

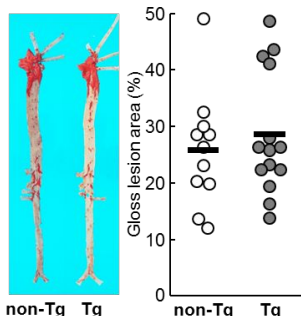
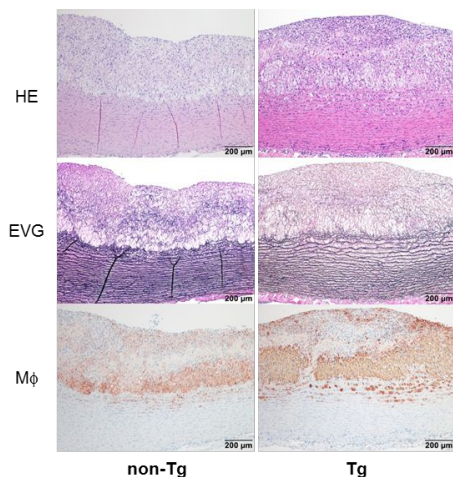


図5

次に顕微鏡的に動脈硬化病変の解析を行った。図6 に Tg 及び non-Tg の代表的な動脈硬化病変を示す。



HE, Hematoxylin-Eosin 染色
 EVG, elastica van Gieson (弾性線維) 染色
 Mφ, マクロファージ免疫染色

図6

EVG 染色標本を用いて動脈硬化内膜肥厚面積(図7、左) 及びMφ免疫染色標本を用いてマクロファージ陽性面積(図7、右)を定量

したところ、Tg と non-Tg で差は認められなかった。

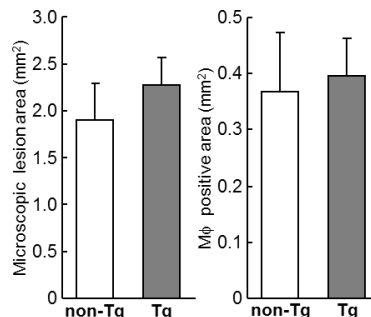
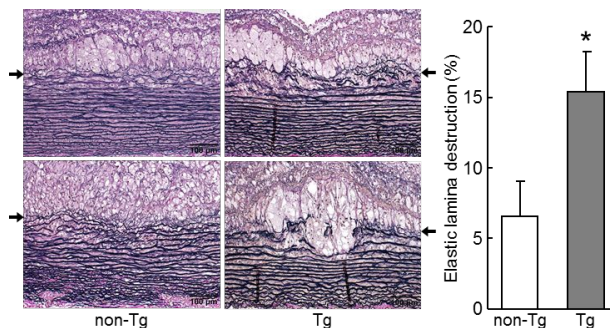


図7

大動脈の病理学的解析の所見より、動脈硬化病変を有する箇所弾性線維の断裂が散見されたことから、大動脈中膜弾性線維の断裂の定量を行った。その結果、Tg ウサギは non-Tg に比べて大動脈の弾性線維の断裂が有意に増加していた(図8)。



矢印、内弾性板の位置を示す

図8

(3) エラスターゼ誘発性大動脈瘤モデル

動脈硬化モデルの実験結果から、MMP-1 が大動脈の弾性線維の破綻に関与している知見が得られた。そこで、大動脈の弾性線維の破綻が疾患発症に密接に関連している大動脈瘤における MMP-1 の役割を検討することとした。エラスターゼにより誘発した大動脈瘤モデルにおいて、Tg は non-Tg に比べて腹部大動脈径の拡張が有意に促進していた(図9)。

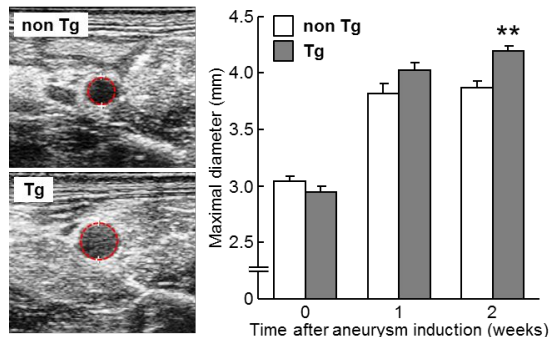


図9

また、大動脈瘤形成部分には著明な弾性線維の断裂が観察されるとともに、外膜及び中膜を中心にマクロファージの集簇が認められた。

(4)まとめ及び今後の展望

マクロファージ由来のMMP-1は動脈硬化病変において弾性線維の破綻に関与し、血管病変に重要な役割を果たしていることが明らかになった。大動脈及び冠動脈において、動脈硬化プラークの破綻は認められなかったことから、MMP-1単独ではプラークの破綻を惹起するのは困難であると考えられた。プラーク破綻にはMMP-1に加えて他のMMPsやMMPインヒビターの組合せが重要であると考えられ、今後の検討課題である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計7件)

Zhang J, Niimi M, Yang D, Liang J, Xu J, Kimura T, Mattew AV, Guo Y, Fan Y, Zhu T, Song J, Ackermann R, Koike Y, Schwendeman A, Lai L, Pennathur S, Garcia-Barrio M, Fan J, Chen YE. Deficiency of cholesteryl ester transfer protein protects against atherosclerosis in rabbits.

Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2017; 37(6):1068-1075. 査読有

DOI:10.1161/ATVBAHA.117.309114

Wang Z, Zhang J, Li H, Li J, Niimi M, Ding G, Chen H, Xu J, Zhang H, Xu Z, Dai Y, Gui T, Li S, Liu Z, Wu S, Cao M, Zhou L, Lu X, Wang J, Yang J, Fu Y, Yang D, Song J, Zhu T, Li S, Ning B, Wang Z, Koike T, Shiomi M, Liu E, Chen L, Fan J, Chen YE, Li Y. Hyperlipidemia-associated gene variations and expression patterns revealed by whole-genome and transcriptome sequencing of rabbit models.

Sci Rep. 2016;6:26942. 査読有

DOI:10.1038/srep26942

Li S, Wang YN, Niimi M, Ning B, Chen Y, Kang D, Waqar AB, Wang Z, Yu Q, Liu E, Zhang J, Shiomi M, Chen YE, Fan J. Angiotensin II destabilizes coronary plaques in Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits.

Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2016;36(5):810-6. 査読有

DOI:10.1161/ATVBAHA.115.306871

Niimi M, Yang D, Kitajima S, Ning B, Wang C, Li S, Liu E, Zhang J, Eugene Chen Y, Fan J. ApoE knockout rabbits: A novel model for the study of human hyperlipidemia.

Atherosclerosis. 2016;245:187-93. 査読有

DOI:10.1016/j.atherosclerosis.2015.12.002

Fang C, Ning B, Waqar AB, Niimi M, Li S, Satoh K, Shiomi M, Ye T, Dong S, Fan

J. Bisphenol A exposure induces metabolic disorders and enhances atherosclerosis in hyperlipidemic rabbits.

J Appl Toxicol. 2015 ;35(9):1058-70. 査読有

DOI:10.1002/jat.3103

Nishijima K, Kitajima S, Koshimoto C, Morimoto M, Watanabe T, Fan J, Matsuda Y. Motility and fertility of rabbit sperm cryopreserved using soybean lecithin as an alternative to egg yolk.

Theriogenology. 2015;84(7):1172-5. 査読有

DOI:10.1016/j.theriogenology.2015.06.018

Bisphenol A exposure enhances atherosclerosis in WHHL rabbits. Fang C, Ning B, Waqar AB, Niimi M, Li S, Satoh K, Shiomi M, Ye T, Dong S, Fan J.

PLoS One. 2014;9(10):e110977. 査読有
DOI:10.1371/journal.pone.0110977

[学会発表](計6件)

Niimi M, Nishijima K, Kitajima S, Matsuhisa F, Satoh K, Hirokazu Yamazaki H, Fan J. Macrophage-derived matrix metalloprotease-1 accelerates aortic aneurysm formation in transgenic rabbits.

第49回 日本動脈硬化学会総会・学術集会. 2017年7月6-7日. グランドプリンスホテル広島(広島県・広島市)

Wang C, Nishijima K, Kitajima S, Niimi M, Ning B, Fan J. Hepatic overexpression of endothelial lipase reduces plasma HDL levels in transgenic rabbits.

第48回 日本動脈硬化学会総会・学術集会. 2016年7月14-15日. 京王プラザホテル(東京都・新宿区)

Li S, Wang YN, Niimi M, Ning B, Chen Y, Kang D, Wang Z, Yu Q, Waqar AB, Liu E, Zhang J, Shiomi M, Y. Chen YE, Fan J. Angiotensin destabilizes coronary plaques in WHHL rabbits.

第48回 日本動脈硬化学会総会・学術集会. 2016年7月14-15日. 京王プラザホテル(東京都・新宿区)

Niimi M, Kitajima S, Matsuhisa F, Ning B, Wang C, Yang D, Zhang J, Chen YE, Fan J. A novel model for the study of human atherosclerosis: Apo E knockout rabbits.

第63回 日本実験動物学会総会. 2016年5月18-20日. ミューザ川崎(神奈川県・川崎市)

Niimi M, Ning B, Wang C, Li S, Zhang

J, Chen YE, Fan J. ApoE knockout rabbits: a novel model for the study of human hyperlipidemia.

第 47 回 日本動脈硬化学会総会・学術集会. 2015 年 7 月 9-10 日. 仙台国際センター (宮城県・仙台市)

Zhang J, Xu J, Liang J, Yang D, Guo Y, Zhu T, Song J, Niimi M, Lai L, Fan J, Chen YE. CETP deficiency in rabbits protects high fat high cholesterol diet induced atherosclerosis.

Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology /Peripheral Vascular Disease, Scientific Sessions 2015. 2015 年 5 月 7-9 日. サンフランシスコ (アメリカ)

〔その他〕

ホームページ

http://www.med.yamanashi.ac.jp/clinical_basic/pathol01/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新見 学 (NIIMI, Manabu)

山梨大学・総合研究部・助教

研究者番号：80644898

(2) 研究分担者

西島 和俊 (NISHIJIMA, Kazutoshi)

秋田大学・バイオサイエンス教育・研究サ

ポートセンター・准教授

研究者番号：70435874

(3) 連携研究者

範 江林 (FAN, Jianglin)

山梨大学・総合研究部・教授

研究者番号：60272192