

令和元年6月19日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H04718

研究課題名(和文) 遺伝子改変ウサギモデルによる動脈硬化の発生におけるアポ蛋白CIIIの機能解析

研究課題名(英文) Creation of Knock-out rabbit models for the study of atherosclerosis

研究代表者

範江林(FAN, Jianglin)

山梨大学・大学院総合研究部・教授

研究者番号：60272192

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,100,000円

研究成果の概要(和文)：アポリポ蛋白CIII(アポCIII)は、トリグリセリド(TG)-richリポ蛋白の主要な構成蛋白である。高値の血清アポCIIIは高TG血症だけでなく、動脈硬化の発症にも関連することが指摘されている。しかし、アポCIIIはどのように動脈硬化に関与しているのか、その分子病理学的機序については未だ解明されていない。我々は、世界で初めて、ヒトと類似したアポCIIIと脂質代謝系を有するトランスジェニック(Tg)ウサギ及びアポCIII遺伝子欠損(KO)ウサギの作製に成功し、脂質代謝及び動脈硬化の発生におけるアポCIIIの生理機能及び病理学的意義について検討している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

動脈硬化とその合併症である心筋梗塞、脳卒中といった疾患は、日本を始めとした先進国における死亡原因の約30%を占め、人口の高齢化が加速する中で、今や医学領域のみならず社会経済的にも最も重要な課題となっている。新規アポCIII遺伝子改変ウサギモデルの確立は、動脈硬化の研究に限らず、脂質代謝、高脂血症の研究及び新薬の開発に新たな研究ツールとしての利用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Apolipoprotein CIII (apoCIII) is a constituent of all lipoproteins except LDLs and mediates the metabolism of triglyceride (TG)-rich lipoproteins through inhibition of LPL activity. Elevated plasma levels of apoCIII are directly correlated with the plasma TG and increase the cardiovascular risk. However, the pathophysiological functions of apoCIII in vivo have not been fully elucidated. To examine the functional roles of apoCIII in lipoprotein metabolism and atherosclerosis, we generated both transgenic (Tg) and apoCIII knockout (KO) rabbits. Tg rabbits showed high levels of plasma TG whereas apoCIII KO rabbits exhibited lower plasma levels of TG than those of wild-type (WT) rabbits while total cholesterol and HDL-cholesterol levels were unchanged. Analysis of lipoproteins revealed that reduced plasma TG levels in KO rabbits were accompanied by significant reduction of VLDLs and intermediate-density lipoproteins (IDLs).

研究分野：基礎医学

キーワード：リポ蛋白代謝 高脂血症 動脈硬化 動物モデル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アポリポ蛋白 CIII (アポ CIII) は、トリグリセリド (TG) -rich リポ蛋白の主要な構成蛋白である。高値の血清アポ CIII は高 TG 血症だけでなく、動脈硬化の発症にも相関することが指摘されている。10 万人規模の遺伝子解析研究より、アポ CIII 遺伝子機能喪失と虚血性心疾患の低下との相関が明らかにされ、血中アポ CIII 値を低下させることは次世代の脂質代謝異常の優れた Target として注目されている。しかし、アポ CIII はどのように動脈硬化に関与しているのか、その分子病理学的機序については未だ解明されていない。

2. 研究の目的

脂質代謝において、アポ CIII の生理機能は何か、どのように動脈硬化の発生に関与するのか、という仮説を再検証すべく、新たにアポ CIII・Tg ウサギ並びに KO ウサギ・モデルを作製し、アポ CIII と動脈硬化の発生との関係を明らかにする目的で本研究の実施を計画した。

3. 研究の方法

- ヒトアポ CIII を過剰発現する Tg ウサギの作製及び解析 (詳細に関しては主な発表論文 7 番を参照)
- アポ CIII・KO ウサギの繁殖と解析及び動脈硬化実験 (詳細に関しては主な発表論文 6 番を参照)

4. 研究成果

4.1 アポ CIII・Tg ウサギの実験結果

4.1.1 アポ C-III・Tg ウサギの作製とその表現型解析:

ヒトアポ C-III ゲノム配列にインスレーターとしてニワトリ グロビン配列を結合したコンストラクトを用い、マイクロインジェクション法により遺伝子導入を行った。雌性ドナーウサギから受精卵を回収し計 1,015 個の前核期胚にマイクロインジェクションを行った。生存胚 686 個を計 23 羽のレシピエントに移植し、61 羽の産仔を得た。離乳した計 36 羽中 2 羽に遺伝子導入が確認された。これら 2 羽のファウンダー Tg ウサギの血清ヒトアポ CIII 濃度はそれぞれ 2.1 及び 6.4 mg/dL であった。また、血清を用いたウェスタブロットにおいても、ヒトアポ C-III の発現が確認された。得られた陽性個体の血中アポ CIII 濃度はヒトにおける濃度と比べると、低～中程度の発現であった。中発現のファウンダーを用いて F1, F2 個体を得て表現型解析を行う事とした。

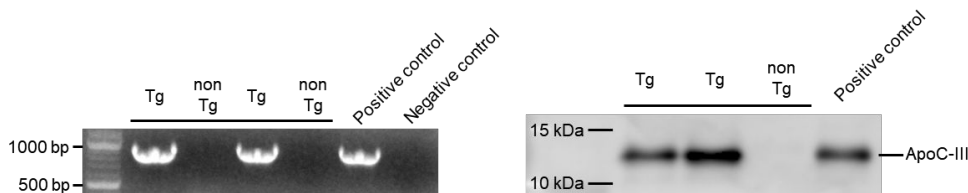


図 1. アポ CIII・Tg ウサギのジェノタイプング (左) と Western blotting (右)

また、肝臓特異的高発現 Tg ウサギを作出する目的で、アポ E プロモーター配列にヒトアポ C-III cDNA 配列を結合したコンストラクトを用いた遺伝子導入も試みた。雌性ドナーウサギから受精卵を回収し計 100 個の前核期胚にマイクロインジェクションを行った。生存胚 60 個を計 7 羽のレシピエントに移植し、15 羽の産仔を得た。離乳した計 13 羽中 1 羽に遺伝子導入が確認された。遺伝子導入個体の血中アポ C-III の発現を確認したが、アポ C-III 蛋白質の検出は認められなかった。本コンストラクトを用いた Tg ウサギの作出には至っていない。

4.1.2 アポ C-III Tg ウサギの血漿アポ CIII 発現及び血漿脂質の変化:

普通食下において、血中アポ C-III は 22 mg/dL まで上昇する個体が認められた一方で 10 mg/dL 程度で推移する個体も見られ、その発現量は同腹個体においても変動が認められた。血漿アポ C-III の発現上昇に応じて、血漿総コレステロール (TC) 及び中性脂肪 (TG) は上昇し、HDL-コレステロール (HDL-C) は低下する傾向を示した (図 2)。

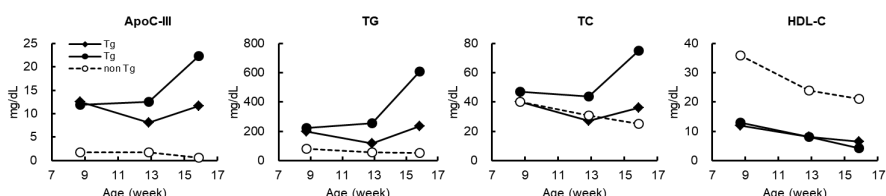
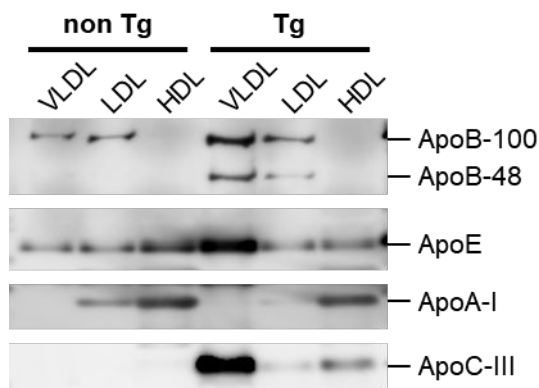


図 2. 血清アポ CIII 濃度 (左) と血清脂質 (右)



アポCIII-Tgウサギの血漿リポ蛋白中のアポ蛋白組成を検討する目的で、血漿を超遠心分離により分画しウェスタンブロットにて分析した(図3)。Tgウサギにおいて、アポC-IIIはほとんどがVLDLに局在し一部がHDL中に含有していた。また、TgウサギのVLDL中のアポB及びアポEに増加が認められた。

図3. ウェスタンブロットによるリポ蛋白中のアポ蛋白解析

4.1.3 高コレステロール飼料摂取時の血漿脂質への影響：

高脂血症状態でのアポC-IIIが脂質代謝に及ぼす影響を検討する目的で、0.3%コレステロール含有飼料を摂取させ、血漿脂質の変動を検討した(図4)。Tgウサギはコレステロール負荷飼料への感受性が高く、血漿TCが対照に比べて上昇した。血漿TG及びHDL-Cについては大きな変動は認められなかったが、Tgウサギの血漿TGは対照に比べ高値で推移した。また、Tgウサギのリポ蛋白リパーゼ(LPL)への影響を検討するため、ヘパリン静注後血漿を用いLPL活性を測定した(図4)。TgウサギのLPL活性は対照に比べて低下が認められた。

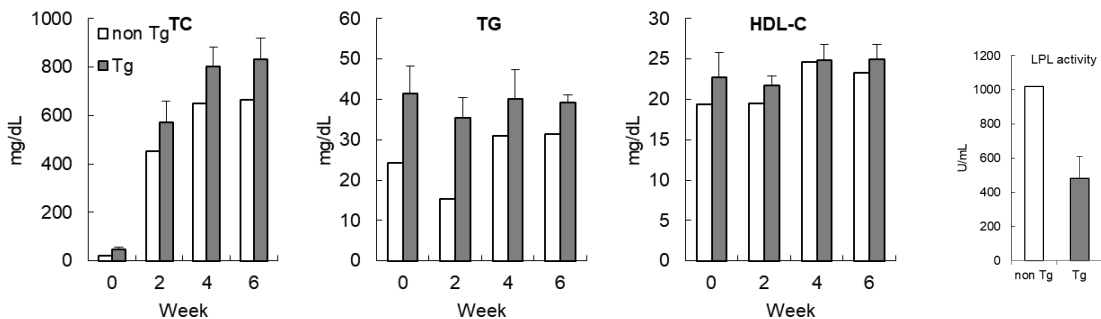


図4. 高コレステロール食を負荷したウサギの血漿脂質変化とLPL活性の測定

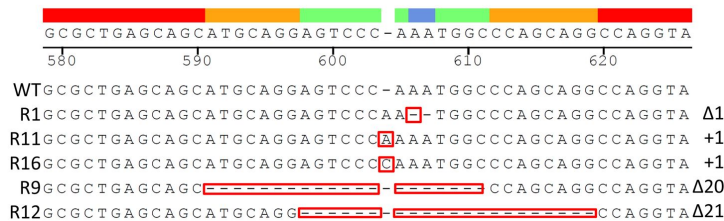
4.2 アポCIII・KOウサギの実験

4.2.1 ZFN人工制限酵素によるアポCIII・KOウサギの作製：図5に示すように145個の受精卵にアポCIII遺伝子第3エクソン配列を標的とするZFN set 1 DNAを注入してから、7羽の里親に移植した。ZFN set 1 DNAの受精卵に対する影響はControl DNAと

A

ZFN Set	# Embryos Transferred	# Recipient Animals	# Kits Born (%)	# KO Kits (%)
ZFN set1	145	7	21 (14.5)	5 (23.8)
Control	75	6	22 (29.3)	N/A

B

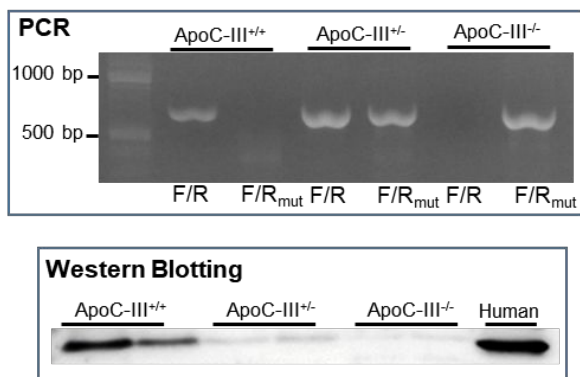


同様に出生への影響は認められなかった。ZFN set 1 DNAを注入した受精卵から21羽の子ウサギが得られ、内、5羽(23%)にアポCIII遺伝子のmutationが確認された。アポCIII遺伝子の塩基配列欠失(deletion)変異を有するFounderウサギが3羽(R1, R9, R12)と、挿入変異を有するFounderウサギ2羽(R11, R16)が得られた。更に繁殖を行い、R11系統の確立ができた。

それをを用いて、ホモ接合体KO並びにヘテロKOと野生型ウサギを用いた解析を行った。

図5. ZFNによるアポCIII・KOウサギの作製 (Δ: deletion, +: insertion)

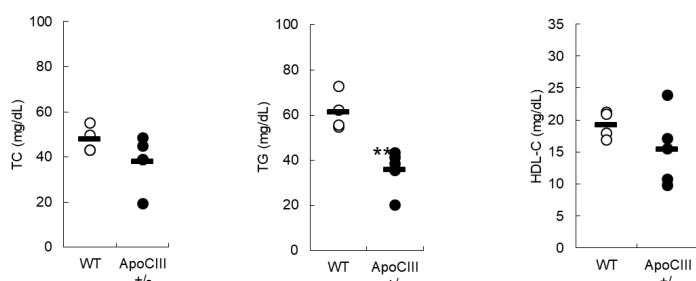
4.2.2 アポ CIII・K0 ウサギの同定：



て、野生型、K0 ヘテロ、K0 ホモウサギの同定が PCR により確認できた (図 6 上)。

図 6 . PCR による K0 ウサギの同定 (上)。2 種類のプライマーを用いて、PCR 反応後の DNA をアガロースゲルで流した後、二つバンドが検出される。F/R は野生型ウサギのバンドで、F/R_{mut} は K0 ウサギに認められる mutant バンドである。F/R のみのバンドは野生型ウサギ、F/R_{mut} のバンドのみあるウサギはホモ K0 ウサギである。Western blotting (下)。ウサギの血清及びヒトの血清 (コントロール) を用いて、SDS - PAGE で電気泳動の後、アポ CIII 抗体と反応した結果である。

更に、これらのウサギの血清を用いて、Western blotting により、アポ CIII 蛋白の変化を調べた。図 6 下に示すようにヘテロ K0 ウサギのアポ CIII 量が野生型ウサギと比べ減少しており、ホモ K0 ウサギの場合は血清にはアポ CIII が殆ど検出できなかった。アポ CIII・K0 ウサギは正常ウサギと比べ、全身の臓器の異常が認められなかった。正常食下並びに高脂肪食を負荷した 8 週間後の血清脂質、リポ蛋白、アポ蛋白、動脈硬化発生におけるアポ CIII 欠損の影響についての検討を行った。



化については現在検討中である。

図 7 . 野生型ウサギとアポ CIII・K0 ウサギ (ヘテロ) の血清脂質解析。TC:総コレステロール、TG:トリグリセリド、HDL-C : HDL コレステロール

超遠心法を用いて、ウサギのリポ蛋白分画を行った。野生型ウサギと比べて、アポ CIII の欠損ウサギの VLDL、IDL 及び HDL₂₋₃ のトリグリセリド量が著しく減少していた。また、アポ CIII の欠損ウサギの HDL₂ のコレステロール量も野生型ウサギより低下した。ウエスタンブロットの解析により各リポ蛋白におけるアポ CIII の分布を調べたところ、野生型ウサギのアポ CIII は主に VLDL と HDL に分布しており、アポ CIII・K0 ウサギには

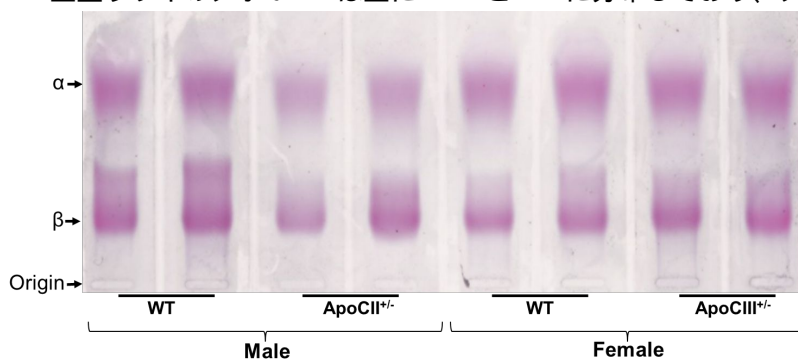


図 8 . アガロースゲル電気泳動によるリポ蛋白の解析

繁殖させたウサギを PCR 法と Western blot により Genotyping を行った。R11 系統 K0 ウサギのアポ CIII 第 3 エクソンには 1 個アデニン (A) 塩基の挿入があり、それを検出するために、二つのプライマーを設計した。つまり、野生型バンドを検出できるプライマー

3' -GTTTACCGGGTCGTCCGGTC-5' と mutant バンドを検出できるプライマー

3' -TTTTACCGGGTCGTCCGGTC-5' である。これらのプライマーを用い

通常食の飼育下で、野生型ウサギに比し、雄アポ CIII・K0 ウサギの血漿トリグリセリド値は野生型ウサギより有意に低下していたが、総コレステロール値及び HDL-C の変化はなかった (図 7)。雄 K0 ウサギと比べ、雌 K0 ウサギの血漿脂質の変化は軽度であった。雌雄の性差の変

アポ CIII の消失が確認できた。一方、アポ CIII・K0 ウサギの VLDL の減少がアガロースゲル電気泳動で認められ、アポ B-100 減少も認められた (図 8)。アポ CIII の欠損によるリポ蛋白代謝に及ぼす影響の機序については、現在検討中である。

4.2.3 高コレステロール食の実験：

0.3%高コレステロール食を負荷して、アポ CIII・K0 ウサギの脂質代謝及び動脈硬化の発生におけるアポ CIII の役割の検討を行った。野生型ウサギと比べて、アポ CIII・K0 ヘテロウサギの血漿脂質の値が低く（図9左）、アポ CIII 欠損によって VLDL のクリアランスが亢進されることが確認された（図9右）。更にアポ CIII・K0（ヘテロ）ウサギの動脈硬化の程度が野生型ウサギと比較して減少している傾向を示しているものの、高脂肪食を負荷したホモ K0 ウサギの実験を全て完了させてから、明確な結論を出せるものと考えられる。

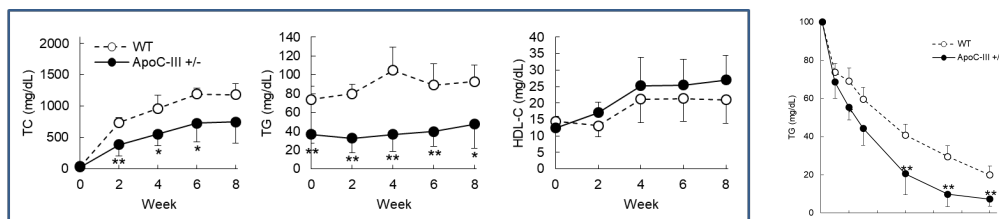


図9. 高脂肪食下での血清脂質の変化(左)とVLDLクリアランス実験(右)

結論：

アポ CIII・Tg ウサギの作製に成功した。アポ CIII の過剰発現によって血漿の TC 並びに TG の上昇が認められた。アポ CIII が LPL の活性を抑制することによって TG 代謝を調節していると考えられる。

アポ CIII・K0 ウサギでは血漿 TG の低下と VLDL の減少が認められた。また、高コレステロール食に対して抵抗性を示していた。

今後、これらのアポ CIII 遺伝子改変ウサギを用いて動脈硬化の発症への影響について更に明らかにしていきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 10 件)

1. Wang C, Niimi M, Watanabe T, Wang Y, Liang J, Fan J: Treatment of atherosclerosis by traditional Chinese medicine: Questions and quandaries, *Atherosclerosis* 2018, 277:136-144
doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2018.08.039 査読有
2. Ning B, Chen Y, Waqar AB, Yan H, Shiomi M, Zhang J, Chen YE, Wang Y, Itabe H, Liang J, Fan J: Hypertension enhances advanced atherosclerosis and induces cardiac death in Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits, *The American journal of pathology* 2018, 188:2936-2947 doi: 10.1016/j.ajpath.2018.08.007 査読有
3. Lu R, Yuan T, Wang Y, Zhang T, Yuan Y, Wu D, Zhou M, He Z, Lu Y, Chen Y, Fan J, Liang J, Cheng Y: Spontaneous severe hypercholesterolemia and atherosclerosis lesions in rabbits with deficiency of low-density lipoprotein receptor (LDLR) on exon 7, *EBioMedicine* 2018, 36:29-38
doi: 10.1016/j.ebiom.2018.09.020 査読有
4. Fan J, Chen Y, Yan H, Niimi M, Wang Y, Liang J: Principles and Applications of Rabbit Models for Atherosclerosis Research, *Journal of atherosclerosis and thrombosis* 2018, 25:213-220 doi: 10.5551/jat.RV17018 査読有
5. Fan J, Chen Y, Yan H, Liu B, Wang Y, Zhang J, Chen YE, Liu E, Liang J: Genomic and Transcriptomic Analysis of Hypercholesterolemic Rabbits: Progress and Perspectives, *International journal of molecular sciences* 2018, 19(11)
doi: 10.3390/ijms19113512 査読有
6. Zhang J, Niimi M, Yang D, Liang J, Xu J, Kimura T, Mathew 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, *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2017, 37:1068-1075
doi: 10.1161/ATVBAHA.117.309114 査読有
7. Wang C, Nishijima K, Kitajima S, Niimi M, Yan H, Chen Y, Ning B, Matsuhisa F, Liu E, Zhang J, Chen YE, Fan J: Increased Hepatic Expression of Endothelial Lipase Inhibits Cholesterol Diet-Induced Hypercholesterolemia and Atherosclerosis in Transgenic Rabbits, *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2017, 37:1282-1289 doi: 10.1161/ATVBAHA.117.309139 査読有

8. 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, 245:187-193
doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2015.12.002 査読有
9. 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, *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2016, 36:810-816
doi: 10.1161/ATVBAHA.115.306871 査読有
10. Fan J, Kitajima S, Watanabe T, Xu J, Zhang J, Liu E, Chen YE: Rabbit models for the study of human atherosclerosis: from pathophysiological mechanisms to translational medicine, *Pharmacology & therapeutics* 2015, 146:104-119
doi: 10.1016/j.pharmthera.2014.09.009 査読有

〔学会発表〕(計5件)

Jianglin Fan

Functional roles of MMPs in the pathogenesis of atherosclerosis.

The 11th Asian and Pan-pacific Connective Tissue Societies Symposium & The 3rd National Conference of CSMB 2018年11月16日 Chinese Society of Matrix Biology

Yajie Chen, Ahmed Bilal Waqar, Jifeng Zhang, Jingyan Liang, Y. Eugene Chen, Jianglin Fan.

Macrophage-derived MMP-9 enhances vascular calcification and progression of atherosclerosis in transgenic rabbits.

XVIIIth International Symposium on Atherosclerosis 2018年6月9日

Jianglin Fan

Can we treat atherosclerosis by stem cell therapy? 2018 International (Guangzhou) Stem Cell and Precision Medicine Industrialization Conference 2018年5月20日

範 江林

Elucidation of Novel Functional Roles of MMPs in Atherosclerosis using Transgenic Rabbits.第2回全国(中国)基質生物学学会議 2017年6月9日

範 江林

動脈硬化の発生におけるマクロファージの役割

第17回動脈硬化教育フォーラム 2017年1月29日

〔図書〕(計2件)

Fundamentals of Laboratory Animal Science, Enqi Liu, Jianglin Fan CRC Press 2017年7月 ISBN:978-1-4987-4351-8

C Reactive Protein and its Pathophysiological Roles in Atherosclerosis. Jianglin Fan, Jifeng Zhang and Y. Eugene Chen. John Wiley & Sons Inc. 2015年3月 ISBN:978-1-118-28591-6

〔その他〕

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名: 北嶋 修司

ローマ字氏名:(KITAJIMA, Shuji)

所属研究機関名: 佐賀大学

部局名: 総合分析実験センター

職名: 准教授

研究者番号(8桁): 70284643

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。