

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23790395

研究課題名(和文) 遺伝子改変ウサギモデルによる動脈プラーク破綻における MMP-9 の役割の解析

研究課題名(英文) Elucidation of the effects of matrix metalloproteinase-9 on atherosclerotic plaque rupture in transgenic rabbits

研究代表者

康 徳東 (KANG, Dedong)

山梨大学・医学工学総合研究部・助教

研究者番号：00571952

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000 円、(間接経費) 900,000 円

研究成果の概要(和文)：MMPは細胞外基質の分解により、細胞分化や増殖、遊走などの様々な生理機能を持つ酵素である。一方で、マクロファージから分泌されるMMPの亢進は、動脈硬化の発生に關与することが指摘されており、特にゼラチンの高い分解能を有しているMMP-9の高発現は動脈硬化の発生だけでなくプラークの破綻にも重要な役割を果たしている可能性が明らかにされた。しかし、今までこの仮説を証明できるモデル動物が存在せず、MMP-9を標的とする治療薬の開発も行われなかった。今回の研究では、マクロファージ特異的に発現するMMP-9・Tgウサギを作製し、動脈硬化の形成及びプラーク破綻におけるMMP-9の役割を検討することを計画した。

研究成果の概要(英文)：Matrix metalloproteinase (MMP) is an important mediator to modulate cell differentiation, proliferation and migration through digestion of extracellular matrix. In pathological conditions, increased expression of MMPs may be involved in many diseases such as atherosclerosis. In our previous study, we have demonstrated that increased expression of MMP-9, a gelatinase, may be associated with the development of atherosclerosis and plaque rupture. While this hypothesis is interesting, there are still no suitable animal models by which one can prove this. In the current study, we attempted to examine the hypothesis whether increased expression of macrophage-derived MMP-9 may be involved in atherosclerosis and plaque rupture. For doing so, we first generated transgenic rabbits which expressed high levels of MMP-9 in macrophages. Now, we have bred these Tg rabbits and are currently performing the cholesterol-fed experiments.

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：動脈硬化 MMP ウサギ

## 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(MMP)は、コラーゲンをはじめとする細胞外マトリックスを分解する酵素であり、体内で様々な細胞から産生され、種々の生理機能および病的な役割を果たしている。現在までに約23種類のMMPが報告されている。近年、マクロファージから分泌されるMMPの高発現が動脈硬化の病変に確認され、病変の発生・進展における関与が示唆されている。特に、マクロファージ由来のMMPは、プラーク線維被膜に多く存在する細胞外基質を分解することにより、粥腫性プラークの破綻にも影響を与えることが考えられる。そのため、不安定化プラークに存在するMMPsの役割を解明することにより、プラークの破綻で引き起こされる動脈硬化性疾患の発症予防が期待されている。しかし、破裂しやすい、いわゆる不安定化プラークに存在するMMPsの中で、破裂に至る過程においてどのMMPが特に重要なトリガーになるかについては明らかにされておらず、プラーク安定化を狙う創薬標的の面においても、疾患特異的なMMPsの解明が強く求められている。

## 2. 研究の目的

本研究では、マクロファージ特異的にMMP-9を過剰発現させるトランスジェニック(Tg)ウサギを開発すると共に、臨床的に最も重要なプラークの進行および破裂におけるMMP-9の役割を解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) MMP-9 遺伝子導入 Tg ウサギの作製・繁殖

発現量の異なる複数系統を開発する目的でマイクロインジェクションを行い、最終的に2系統の founder ウサギの開発に成功した。2つの系統MMP-9・Tgウサギを確立するため、我々が開発したウサギの人工授精法を駆使して繁殖を行い、MMP-9・Tgウサギ系統を確立した。これらの2系統にて、遺伝子導入から特異的発現、機能的蛋白発現までを解明すべく、各系統のウサギよりマクロファージを含む体内の各種臓器を採取し、MMP-9の発現量をNorthern blottingやWestern blotting、gelatin zymographyにて測定した。

また、腹腔および肺胞マクロファージを採取し、incubation後の培養上清および細胞内のMMP-9蛋白量をWestern blottingで解析し、ゼラチンの分解活性もZymographyで確認された。

### (2) MMP-9・Tgウサギを用いた動脈硬化実験

交配により確立したMMP-9・Tgウサギ系統を用いて、動脈硬化の進展に及ぼす影響を検討した。6ヶ月齢のTgウサギと同腹のnon-Tgウサギにコレステロール添加食を負荷させ、血漿脂質(総コレステロール、中性脂肪、HDL-C)やリポ蛋白の変化の測定を行いながら、これらのウサギの動脈硬化の形成やプラーク破綻の有無について検討を行った。

## 4. 研究成果

### (1) MMP-9トランスジェニック(Tg)ウサギの系統確立

Founder ウサギから人工授精を行い、2系統のMMP-9・Tgウサギが確立された。MMP-9・Tg ウサギは肺胞および腹腔内マクロファージ、皮下および内臓脂肪にMMP-9 mRNAの高発現がNorthern blottingにて確認された。動脈硬化実験に必要な数の雌雄ウサギの繁殖を行った。

## (2) MMP-9・Tgウサギのコレステロール負荷による高脂血症および動脈硬化誘導実験

動脈硬化プラークの安定性・破綻におけるMMP-9の役割を明らかにするため、6ヶ月齢のTgウサギと同腹のnon-Tgウサギに対して、コレステロール添加した食餌を16週間と28週間投与することにより、高脂血症と動脈硬化の誘導を行った。

この研究は世界で初めて行われた研究であり、動脈硬化におけるMMP-9の役割を明らかにするだけでなく、将来、MMP-9を標的とする動脈硬化の進行を抑制する新規治療法の開発にも非常に意義があるものと期待される。

## 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 2 件)

- 1) Li S, Kang D, Fan J (他 5 名, 5 番目) ProbucoI suppresses macrophage infiltration and MMP expression in atherosclerotic plaques of WHHL rabbits. J Atheroscler Thromb. 査読

有 2014.

<http://dx.doi.org/10.5551/jat.21600>

- 2) Terasaki Y, Kang D, Fukuda Y (他 12 名, 5 番目) Hydrogen therapy attenuates irradiation-induced lung damage by reducing oxidative stress. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 査読有 2011, 301, L415-26  
DOI: 10.1152/ajplung.00008.2011

[学会発表](計 3 件)

- 1) Fang C, Kang D, Fan J (他 6 名, 6 番目) Bisphenol A impairs insulin sensitivity, glucose metabolism and liver function in WHHL rabbits. 第 2 回ウサギバイオサイエンス研究会. 2013 年 8 月 3 日. 山形テルサ
- 2) Waqar AB, Kang D, Fan J (他 5 名, 2 番目) A proposal for sectioning rabbit's heart for analysis of coronary atherosclerosis. 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 08 月 04 日. 宮崎観光ホテル
- 3) Terasaki Y, Kang D, Fukuda Y (他 12 名, 5 番目) Hydrogen therapy attenuates irradiation-induced lung damage by reducing oxidative stress. 第 100 回日本病理学会総会. 2011 年 04 月 28 日. パシフィコ横浜

[その他]

ホームページ等

[http://www.med.yamanashi.ac.jp/clinical  
\\_basic/pathol01](http://www.med.yamanashi.ac.jp/clinical_basic/pathol01)

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

康 徳東 (KANG, Dedong)

山梨大学・医学工学総合研究部・助教

研究者番号 : 00571952

### (2)研究分担者

なし

### (3)連携研究者

なし