

特 集

トランスレーショナルリサーチに
貢献するウサギ

高コレステロール血症、心血管疾患に関する トランスレーショナルリサーチにおける WHHLMIウサギの有用性

塩見 雅志, 伊藤 隆

神戸大学 大学院 医学研究科 附属動物実験施設

1. はじめに

WHOの調査によると、WHO加盟国の死因の第一位は心血管疾患であり、死因の約30%を占めている。わが国では、死因の第一位は悪性新生物(がん)、第2位が心血管疾患であり、心血管疾患はわが国においても克服しなければならない重要な疾患である。心血管疾患の危険因子として、高コレステロール血症、高血圧、糖代謝異常、喫煙、加齢、男性などが指摘されている。なかでも、血清脂質値の管理が重要とされており、現在の日本人の正常値は、血清総コレステロールの上限が220mg/dl、動脈硬化の原因になると考えられているLDL(低比重リポ蛋白)コレステロールの上限が140mg/dl、動脈硬化抑制因子であるHDL(高比重リポ蛋白)コレステロールの下限が40mg/dlとされている。1980年代以降の研究により、血清総コレステロール値と心血管疾患の発生率の間に高い相関があり、薬剤等で血清総コレステロール値を低下させると心血管疾患の発生を抑制できることが示された。コレステロール低下剤の開発は、日本の製薬会社(旧三共株式会社)が世界に先駆けて開発したコレステロール合成阻害剤(HMG-CoA還元酵素阻害剤、通称スタチン)が契機となり、その薬効評価に使用された実験動物が、故渡辺嘉雄先生(神戸大学)が開発されたWHHL

(Watanabe heritable hyperlipidemic)ウサギであった¹⁾。旧三共株式会社の研究スタッフは、当初ラットを用いて薬効評価を実施したが、コレステロール低下作用は認められず開発を断念しかけていた。しかし、培養系とニワトリでの強いコレステロール合成阻害作用から、このスタチンの薬効を評価できる哺乳動物の探索を行なっていた。彼らによって麻布大学の紀要に掲載されていたWHHLウサギが見出され、WHHLウサギがスタチンの開発に貢献することになった。それは1979年のことであった。現在市場に出てるスタチンは7種類以上あり、世界中で2,000万人以上に処方される薬剤に成長し、スタチンの服用で心血管疾患による死亡率が対象群に比較して20~50%低下すると報告され、高脂血症や心血管疾患の治療に欠かせない薬剤となった。この経緯は、薬剤の開発というトランスレーショナルリサーチを遂行するに当たり、適切な動物種を選定することがいかに重要であるかを如実に物語っている。本総説では、WHHLMIウサギの開発過程とスタチンの開発におけるWHHLウサギのかかわりをとおして、トランスレーショナルリサーチにおける動物種選定の重要性を考えてみたい。

2. WHHLウサギ開発の歴史と特性

WHHLウサギは1973年に偶然発見された高脂血症を示す1匹のオスの日本白色種ウサギに由来する。8年間の交配実験を通して系統として確立された。当初、HLR (Hyperlipidemic rabbit) と命名され、その後開発者の名前を付すべきとの助言により、WHL (Watanabe-hyperlipidemic) ウサギと改名された。その後、動脈硬化の国際誌に投稿した際に編集者の一人からの助言で、WHHLウサギと命名された²⁾。

系統として確立した当時のWHHLウサギは、成熟齢における血清総コレステロール値が300～700 mg/dl、中性脂肪値が300～400mg/dlであり、大動脈に動脈硬化が発生し、四肢の指関節に黄色腫が発生した¹⁾。血压、血糖値等は正常レベルであった。スタチンの開発に当たり、旧三共株式会社の研究スタッフはWHHLウサギの高脂血症の発症機序の解明を試みた。その結果、細胞表面に発現するLDL受容体の活性が顕著に低下し、血中からのLDLの異化が遅延し、血中にLDLが蓄積していくことが明らかにされた^{2,3)}。これらの所見は、ヒトの家族性高コレステロール血症 (FH) にきわめて類似しており、世界初のFHの自然発症のモデル動物であることが確認された。その後、1985年にノーベル賞を受賞したGoldstein JLとBrown MSの研究グループが、彼らが提唱していたリポ蛋白代謝におけるLDL受容体仮説をWHHLウサギを用いて証明した。彼らの研究によってヒトのリポ蛋白代謝が解明され、WHHLウサギのリポ蛋白代謝はヒトのリポ蛋白代謝に類似していることが明らかとなった。WHHLウサギ血中のリポ蛋白の組成および代謝がヒトに類似していたことから、WHHLウサギはコレステロール低下剤の開発研究に広く使用されるようになった。

高脂血症のモデル動物として重要なことは、ヒトの高脂血症で最後のイベントとなる心筋梗塞が

発症することである。心筋梗塞の発症には心臓の冠動脈に動脈硬化が発生することが必須条件であるが、系統として確立した当時のWHHLウサギでは冠動脈の動脈硬化発生率はきわめて低値であった。神戸大学では冠動脈に動脈硬化が発生するWHHLウサギを開発するべく、選抜交配を実施し、1985年に冠動脈疾患を好発するWHHLウサギを開発し、1992年には重度の冠動脈病変が発生するWHHLウサギを開発した。しかし、心筋梗塞の発生率は改善されず低率であった。その後7年間の選抜交配の結果、動脈硬化による冠動脈の閉塞によって心筋梗塞が発生するWHHLMIウサギの開発に成功した⁴⁾。これらの系統開発の過程で、大動脈と冠動脈の動脈硬化病変には質的に違いがあることが示唆され、冠動脈病変に対する薬剤の抑制効果を確認できる数少ない実験動物となった。しかし、WHHLウサギは開発過程によって冠動脈病変の発生状況が異なるため、どのステージのWHHLウサギであるかを確認する必要がある。なお、冠動脈に動脈硬化が安定して発生するWHHLウサギはWHHLMIウサギである。

これらの系統開発過程において、動脈硬化の発生機序の解明にWHHLウサギが用いられ、動脈硬化病変に酸化LDLが蓄積していること、LDLの酸化を抑制すると動脈硬化の発生・進展を抑制できること、動脈硬化が発生する際には動脈内皮にリンパ球接着因子が発現し、単球が接着して内皮下に侵入し、マクロファージとなって酸化LDLを貪食し、動脈硬化病変が形成されること等が解明された^{2,3)}。

3. 脂質代謝、動脈硬化における種差

ウサギのリポ蛋白代謝はヒトに類似していることを上述した。リポ蛋白代謝がヒトと大きく異なるれば、その動物種は脂質低下剤を開発する上で大きな障害となる。実験動物の代表であるマウスや

表1 ヒトの脂質代謝、動脈硬化、心機能解析等に対する高脂血症の遺伝子組換えマウスとウサギの類似性

	遺伝子組換 マウス*	WHHLMI ウサギ
脂質代謝		
血中の主要リポ蛋白	×	(LDL)
内因性リポ蛋白の構造蛋白	×	(apoB100)
アポB編集酵素の発現	×	(小腸)
血中CETP活性	×	(有)
肝性リバーゼ	×	(血管壁に結合)
動脈硬化		
冠動脈	×	(自然発症)
病変の構成	×	(種々の病変)
心臓		
心電図 四肢誘導	×	(ヒトに類似)
胸部誘導	×	(ヒトに類似)
その他		
炎症マーカー	×	(CRP)
脂質低下剤**の効果	×	(有)

*apoE (-/-) マウス, LDLR (-/-) マウス

**スタチン (HMG-CoA還元酵素阻害剤, コレステロール合成阻害剤)

ラットでは脂質代謝がヒトと大きく異なる(表1)。マウス・ラットのリポ蛋白代謝でヒトやウサギと大きく異なる点は複数ある^{2,3)}。主な点は次のとおりである。1) apoB編集酵素が肝臓で発現する。その結果、ヒトやウサギの内因性リポ蛋白は構造蛋白としてapoB-100を有するが、マウスやラットでは外因性リポ蛋白と同じapoB-48を有する。apoB-48を持つリポ蛋白の代謝回転はきわめて速く、マウスやラットでは血中におけるリポ蛋白の構成がヒトと大きく異なる一因となっている。2) 肝性リバーゼが血中に遊離している。その結果、中性脂肪の分解と遊離脂肪酸の組織への受け渡しがヒトと異なる。3) コレステロールエステル転送蛋白が発現していない。その結果、末梢組織から回収されたコレステロールがLDL等に渡されず、血中のHDLコレステロールの比率が増大し、血中のリポ蛋白の構成がヒトと大きく異なる。4) コレステロール合成の律速酵素の活性が強い。その結果コレステロール合成阻害剤に対して抵抗性を示す。したがって、マウスやラットの高脂血症

のモデルでは血中に鬱滞しているリポ蛋白の種類がヒトと異なり、脂質低下剤の開発の障害になっている。また、ヒトの炎症マーカーであるC-反応性蛋白(CRP)はマウスやラットでは機能しておらず、動脈内皮細胞の機能にも差異が認められ、心筋線維の種類もヒトやウサギと異なることが知られている。さらに心電図所見もマウスやラットはヒトと大きく異なるがウサギはヒトに類似している。このようにマウスやラットでは脂質代謝や心血管疾患に関連する因子がヒトやウサギと大きく異なっている。したがって、マウスやラットをこれらの分野の実験に使用する場合には十分な配慮が必要となるであろう。

4. 脂質低下剤の開発におけるトランスレーショナルリサーチ

WHHLウサギはリポ蛋白代謝がヒトにきわめて類似していることから、さまざまな脂質低下剤の開発に用いられてきた(表2)^{2,3)}。コレステロール合成阻害剤(コレステロール合成の上流に位置す

表2 WHHL／WHHLMIウサギを用いた薬剤開発研究

	脂質低下効果	動脈硬化抑制効果	
		大動脈	冠動脈
コレステロール合成阻害剤			
スタチン	○	×, ○	○
スクアレン合成阻害剤	○	○	○
陰イオン交換樹脂剤	○	○	
スタチン + インイオン交換樹脂剤	○	○	○
MTP阻害剤	○		
ACAT阻害剤	×, ○	×, ○	×, ○
抗酸化剤			
プロピコール	○	○	
ビタミンE	×	×, ○	
コロニー刺激因子			
MCSF	×, ○	○	
GMCSF	×, ○	○	
アポE	×, ○	○	
フィブラーート	×		
魚油, ω3脂肪酸	×, ○	×, ○	
チアゾリディンディオノン	×	△	△
チアゾリディンディオノン+スタチン	○	○	○
ACE阻害剤	×	○	
A-II受容体拮抗剤	×	○	
カルシウム拮抗剤	×	×	
βプロッカーハー	×	×	
遺伝子治療	○		

るHMG-CoA還元酵素や下流に位置するスクアレン合成酵素などの阻害剤), 魚油等で代表されるω-3系脂肪酸, 胆汁酸を吸着して腸-肝循環を遮断する陰イオン交換樹脂製剤, 中性脂肪の低下作用を持つフィブラーート系薬剤などの薬効が調べられ, コレステロール合成阻害剤と陰イオン交換樹脂製剤でコレステロール低下効果が確認されている。コレステロール合成阻害剤の一つであるスタチンを用いた研究では, 投与用量に依存して血清総コレステロールが低下(対照群に比較して10~30%低下)した。コレステロール低下のメカニズムは, 肝臓でのコレステロール合成抑制に伴うLDL受容体の増加による血中LDLの低下と, 高用量の場合の肝からのVLDL(超低比重リポ蛋白)コレステロールの分泌低下の二つのメカニズムが

関与していることが示唆された。スクアレン合成阻害剤も同様の作用機序で血清コレステロール値を低下させると考えられる。WHHLウサギはLDL受容体異常のdefective typeであることから, 肝細胞におけるコレステロール合成阻害によって細胞表面に到達するLDL受容体蛋白が増加することが推測できる。陰イオン交換樹脂製剤は十二指腸で胆汁酸を吸着し腸-肝循環を遮断する。その結果, 肝においてコレステロールが胆汁酸の材料として消費され, 肝細胞がコレステロール不足となってLDL受容体が増加することが示されている。したがって, コレステロール合成阻害剤と陰イオン交換樹脂製剤の併用投与によって血清総コレステロール値は相加的に減少することもWHHLウサギを用いた研究で示されている。このことは, 一般的

特集：トランスレーショナルリサーチに貢献するウサギ

な高コレステロール血症に加えて、LDL受容体に異常があるヒトの家族性高コレステロール血症（除くLDL受容体ネガティブタイプ）においても、薬物治療が可能であることを示唆している。

5. 脂質低下剤の動脈硬化抑制作用に関するトランスレーショナルリサーチ

血清総コレステロール値を低下させる目的は、動脈硬化を抑制し、心血管イベントや脳血管イベントを抑制することにある。コレステロール低下剤の投与によって動脈硬化が抑制できることがWHHLウサギを用いた研究で初めて証明された（表2）。スタチンを高用量で8ヵ月投与すると、血清総コレステロール値が20～30%低下し、冠動脈の狭窄率が対照群に比較して有意に低下した⁵⁾。しかし、臨床における冠動脈造影による評価で、スタチンの投与で冠動脈狭窄率の改善が認められないケースにおいても心血管イベントの発生が有意に抑制できることが確認された。そのメカニズムの解明にもWHHLウサギが用いられた⁶⁾。冠動脈にすでに動脈硬化が完成している成熟齢（10ヶ月齢）のWHHLウサギ（冠動脈病変好発系）にスタチンを1年間投与すると、冠動脈病変の進展抑制と同時に、動脈硬化病変中のマクロファージや脂質の蓄積の減少、コラーゲンなどの線維成分の増加と平滑筋細胞の減少の抑制が生じ、その結果、動脈硬化病変が破綻（病変が破れて血栓を生じる）しにくい安定な病変に質的に改善されることが明らかとなった。この研究によって、スタチンの動脈硬化病変安定化作用が心イベントの発生抑制に重要であることが確認された。スタチンの動脈硬化安定化作用が示されたことも一因となってスタチンの開発と処方される患者数は急激に增加了。また、動脈硬化の安定化が心イベントの抑制における重要な要素であることをvivoの実験で裏付けることができたことは、重要であった。コレ

ステロール合成の下流部分を阻害するスクアレン合成阻害剤も同様の効果を示した。また、脂肪酸の質を換えて中性脂肪を低下させるω-3系脂肪酸、抗酸化剤、マクロファージの機能を調節する薬剤、アンギオテンシン系を阻害する薬剤などの動脈硬化抑制作用もWHHLウサギを用いて確認された^{2,3)}。このようにWHHLウサギは動脈硬化抑制作用に関する研究にきわめて有効である。

6. 動脈硬化のイメージング

動脈硬化の進展を抑制あるいは治療する薬剤が開発された場合に必要になるのがヒトにおける薬効評価である。冠動脈病変の程度については冠動脈造影で病変の影を見る能够であるが、び漫性に病変が広く発生している場合や冠動脈が動脈硬化によるリモデリングで外側に拡大している⁷⁾場合には、病変の程度を判定することが困難となる。さらに、動脈硬化の破綻につながる危険な病変を非観血的に調べる技術と装置の開発は、治療効果の判定のみならず心血管イベントの発生予防においてもきわめて重要である。また、心血管イベントの原因になる動脈硬化病変として、マクロファージや脂質が蓄積したソフトプラークが重要と考えられており、このソフトプラークを検出する方法として、CT (Computed Tomography, コンピュータ断層撮影), PET (Positron Emission Tomography, 陽電子放射断層撮影), CT+PET, MR (Magnetic Resonance, 核磁気共鳴), IVUS (Intravascular Ultrasound, 血管内超音波エコー)などを用いた方法がWHHLMIウサギを用いて研究されている^{2,3)}。一例として、抗酸化剤をWHHLMIウサギに投与し、その動脈硬化抑制効果がCT+PETで確認されている⁸⁾。さらに研究が進み、動脈硬化病変のイメージング技術が確立すると、薬剤の効果の判定のみならず、心筋梗塞などの心血管イベントの原因になる危険性を持つ冠動脈病変

の検出が可能となり、虚血性心疾患の発生予防が可能になると期待できる。

7. 今後の展望

脂質低下剤の開発や診断技術の開発研究が精力的に進められているが、心血管疾患の克服には未だ解決すべき様々な課題が残されている。とくに重要な課題として、冠動脈病変の破綻（動脈病変の破裂に伴う血栓の形成）による急性冠症候群の発生機序と予防法の解明、治療法の確立が待たれている。未だ、ヒトの急性冠症候群に対応したモデル動物は開発されていない。急性冠症候群のモデル動物の開発のために、WHHLMIウサギを用いて冠動脈病変の不安定化の亢進、冠動脈病変への物理的ストレス負荷などが試みられており^{2, 3)}、その実験結果が期待されている。冠動脈病変の不安定化においては、選抜交配による系統開発と共に遺伝子組換えWHHLMIウサギの開発が進められている^{2, 3)}。また、血清総コレステロール値が同程度であっても冠動脈病変の程度や発生する病変の質がウサギごとに異なることから、メタボロミクス解析によるマーカーや危険因子の解析も重要な課題となる。WHHLMIウサギを用いたメタボロミクス解析によって、心血管イベントに関するマーカーや危険因子が明らかになれば、臨床における診断や発症予防に貢献できると期待できる。

8. まとめ

高コレステロール血症、動脈硬化、心血管イベントの治療、診断、予防に関するトランスレーショナルリサーチにWHHLウサギおよび心筋梗塞を発症するWHHLMIウサギは貢献してきた。心血管疾患による死亡が世界の死因の第一であることから、現在なお心血管疾患に関する研究は人類が克服すべき重要な疾患の一つであり、WHHLMI

ウサギは今後ともこの分野の研究に貢献するであろう。WHHLウサギは故渡辺嘉雄先生のご尽力と製薬会社のご支援で系統維持が行なわれ、世界各国の研究者に分与され、脂質代謝、動脈硬化、治療薬の開発等の研究に貢献してきた。神戸大学は現在なお年間100匹余のWHHLMIウサギの分与を継続している。バイオリソースとして30年余の歴史があるが、一研究機関の努力と民間支援のみで継続することには限界がある。日本で開発され、ノーベル賞研究に貢献し、心血管疾患のトランスレーショナルリサーチに活用されているWHHLMIウサギを次世代に引き継ぐためには、バイオリソース体制の確立が今後の課題である。

謝辞

本研究の一部は、厚生労働省科学研究費補助金創薬基盤推進研究事業（H20-生物資源-一般-002）により実施した。現在までにWHHLウサギあるいはWHHLMIウサギの系統維持を支援して戴いた旧三共株式会社、武田薬品工業株式会社、バイエル薬品株式会社、塩野義製薬株式会社、大正製薬株式会社、第一三共株式会社、大塚製薬株式会社、日本新薬株式会社、萬有製薬株式会社に深謝します。

参考文献

- 1) Watanabe Y. *Atherosclerosis* 1980; **36**: 261-268.
- 2) Shiomi M, Ito T. *Atherosclerosis* 2009; **207**: 1-7.
- 3) Shiomi M, Fun J. *Curr Opin Lipidol* 2008; **19**: 631-636.
- 4) Shiomi M, et al. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; **23**: 1239-1244.
- 5) Watanabe Y, et al. *Biochim Biophys Acta* 1988; **960**: 294-302.
- 6) Shiomi M, et al. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995; **15**: 1938-1944.
- 7) Shiomi M, et al. *Atherosclerosis* 2008; **198**: 287-293.
- 8) Ogawa M, et al. *J Nucl Med*. 2006; **47**: 1845-1850.