

## 第4章 ヒトLPLトランスジェニックウサギの作製

### 4.1 目的

前章の病理組織学的な検討で、動脈硬化病変に LPL が存在することが明らかになった。特に LPL は動脈硬化病変に浸潤したマクロファージから分泌されることが確かめられており、マクロファージの泡沫細胞化に何らかの役割を果たしていることが推測できる。しかし、LPL がどのように動脈硬化に関与しているか、実際には不明な点が多い。血中でのレムナントリポ蛋白の形成を促進する点からすると、LPL は動脈硬化の進展を促進する可能性がある。しかし、動脈硬化病変に浸潤したマクロファージ由来の泡沫細胞から放出された LPL の役割については何も解明されていないのが現状である。

LPL の役割を明らかにするため、我々はヒト LPL 遺伝子を導入したトランスジェニックウサギの作製に初めて成功した[79]。さらにこれらのウサギを利用して LPL のリポ蛋白代謝におけるレムナントリポ蛋白代謝と、コレステロール食を負荷した際に生じる動脈硬化発生における役割の解明を目指した。

### 4.2 研究材料と方法

#### 4.2.1 トランスジェニックウサギの作製[52]

##### 4.2.1.1 遺伝子発現ベクター

2種類の遺伝子発現ベクターを本実験で使用した。

chicken  $\beta$ -actin[80]を中心に promoter としてデザインされたのが、pCAL-1 hLPL（以下 pCAL-1）[81]である。全長は 3.8 kb で、両端は SalI と HindIII で plasmid から切断されている。

pAL-1 hLPL（以下 pAL-1）は、ヒトマクロファージのスカベンジャー受容体の Fxba-A1[82]を promoter として用いている。全長は 7.6 kb である。

LPL cDNA[3]は全長 1.58 kb で両端を EcoRI で結合している。後述の

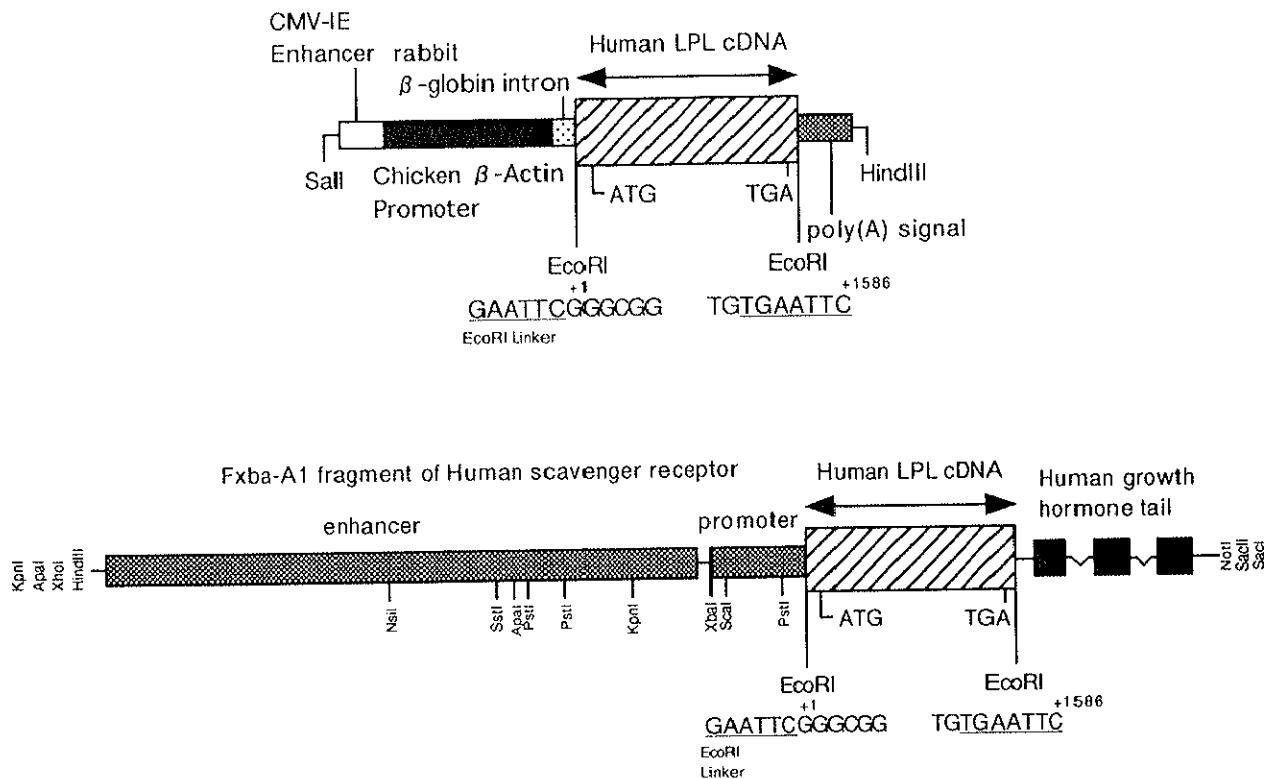


図 4-1 LPL 遺伝子導入ベクター

上が pCAL-1 hLPL[81], 下が pAL-1 hLPL[82]

pCAL-1 では chicken β-actin promoter に CMV-IE enhancer, rabbit β-globin intron が、  
pAL-1 では Fxba-A1 enhancer・promoter が LPL cDNA の 5'末端側に結合されている。

Southern, Northern, *in situ* の各ハイブリダイゼーションはすべてこの LPL cDNA を使用した。

#### 4.2.1.2 Donor および Recipient ウサギの調整

トランスジェニックウサギの作製は週 2 回行った。

実験第 1 日の午前 11 時 30 分に, Donor ウサギ (Specific Pathogen Free のメスの日本白ウサギ, 生後 16 週齢以上で動物センター搬入後 2 週間以上経過したもの, SLC (浜松) から購入) に pregnant mare's serum (PMS, Sigma, St.Louis, MO) 150 IU を筋注した。

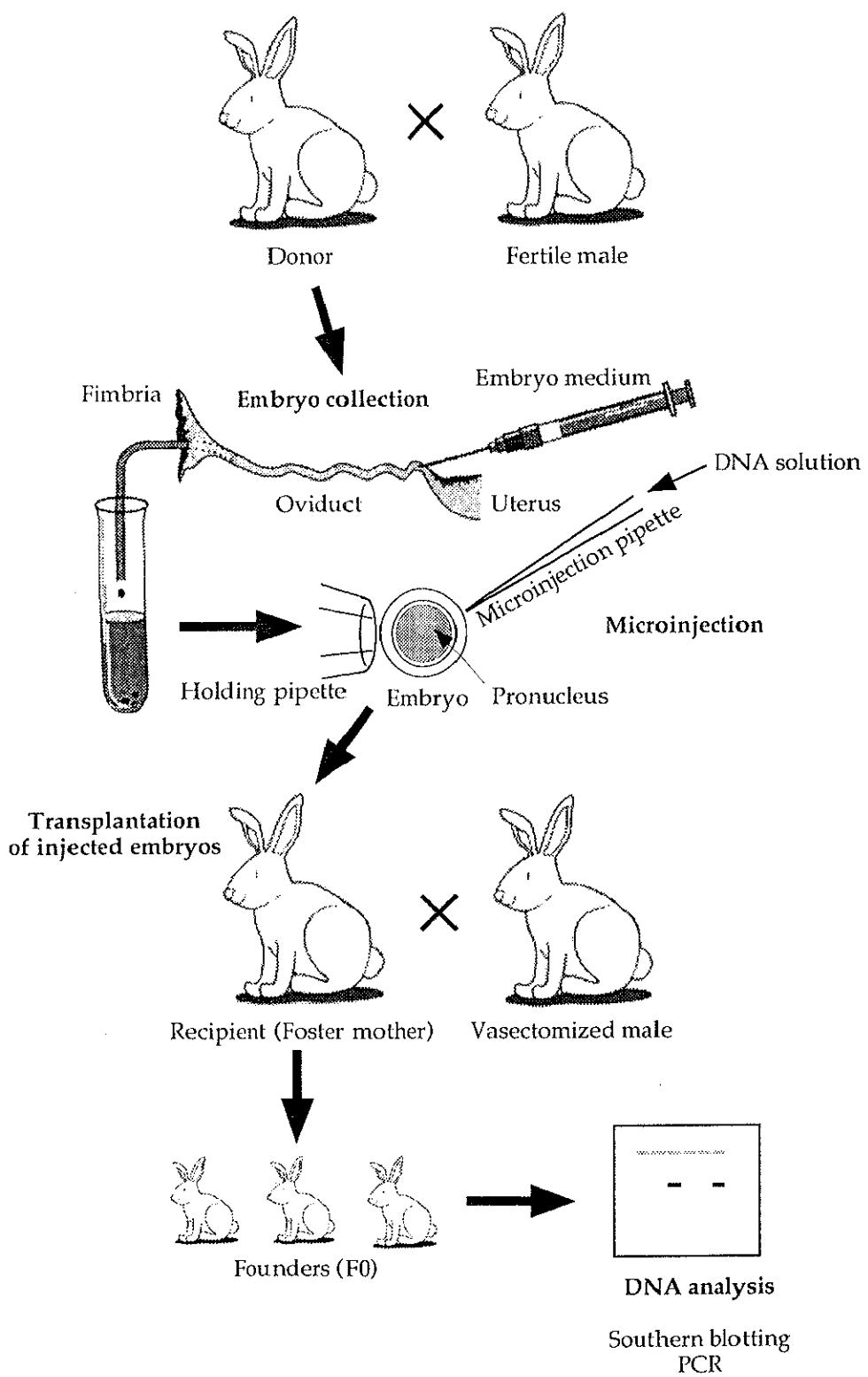


図4-2 トランスジェニックウサギの作製手順[53]

実験第4日の午後12時30分～1時30分に、交尾を行わせた。異なった2匹のオスウサギを用いて、それぞれ少なくとも1回の交尾を行った。交尾の成功は(1)オスが後ろからメスを抱え込む体勢をとつて(2)オスが後ろに倒れ込んで鳴き声をあげるか、(3)ないしメスの外性器にゼラチン様の物質が付着していることの確認で判断した。交尾後すぐにhuman chorionic gonadotropin (hCG, Sigma) 150 IU を静注した。

Recipient ウサギ (Specific Pathogen Free のメスの日本白ウサギ、体重3 kg 以上のもので経産のもの、SLC ないし東京実験動物から購入したものか、後述する山之内株式会社筑波研究センターで出産・授乳を経たウサギを使用) を実験第4日の午後1時30分～2時に、精管切除を行つたオスウサギと交尾させて、hCG を 150 IU 静注し、偽妊娠状態を誘起させた。

一回の実験あたり、Donor は4羽前後、Recipient は2羽準備した。

#### 4.2.1.3 卵の採取

実験第5日の午前9時に（交尾から19～20時間後），致死量のネンブタール注射液（ダイナボット株式会社、大阪）を急速に静注して Donor ウサギを安樂死させた。仰臥位にして腹部を剃毛し、クーパー剪刀で腹部に縦切開をいれ、腸をよけて卵巣・卵管を露出させた。図4-2 のように19 G 翼状針（テルモ、東京）のチューブ部分の一端を卵管采から卵管へ約1～1.5 cm 挿入し、反対側を滅菌スピツ内にさし込んだ。

18 G 針を付けた 20 ml のシリンジに Embryo medium (CMRL-1066 (Gibco BRL, Life Technology, Gaithersburg, MD) 43.5 ml, 100 mM Pyruvate sodium solution 0.5 ml, 1.0 M Hepes solution pH 7.3 0.5 ml, Rabbit serum 5 ml, 100× Penicillin / Streptomycin solution 250 µl) を満たし、針の先端を鈍にして子宮卵管移行部を穿刺し、卵管峡部を越えた位置まで針の先端を進め、Embryo medium を注入して卵管から卵管采へ逆行性に卵管内の卵を滅菌ス

ピット内に回収した。もう一側の卵管でも同様に卵を採取した。

#### 4.2.1.4 卵の調整

採取した卵を実体顕微鏡で観察し、一細胞期の受精卵で形状や核クロマチンが正常なものを選んだ。

ガスバーナーで細くのばしたパストールピペット（岩城硝子、千葉）にチューブを接続したもので吸引しながら卵を回収した。Embryo medium 400 µl を 6 cm プラスチックディッシュの中央に球状に置き、その周囲にミネラルオイル (Sigma Chemical Co., St.Louis, MO) 12 ml を静かに注入したものを用意し、回収した卵を Embryo medium 内にいったん集め、再確認して問題のない卵を Hepes medium (1.1× ABC medium 4.5 ml, 12.5× Hepes solution pH 7.4 400 µl, 10× NaHCO<sub>3</sub> 85 µl, 100× Pyruvate sodium 50 µl) に同様にミネラルオイルを注入したディッシュに移した。

#### 4.2.1.5 マイクロインジェクション

200 倍のノマルスキー微分干渉装置付き倒立位相差顕微鏡 IX-70 (オリンパス、東京) を使用した。

マイクロインジェクションピペットは直径 1.2 mm の芯入硝子管 GC-1.2 (成茂科学、東京)、ホールディングピペットは直径 1.0 mm の硝子管 GDC-1 (成茂科学) を用い、マイクロピペット製造器 PC-10 (成茂科学) で加熱伸展させて、電極研磨器 EG-6 (成茂科学) で先端を研磨してから、ガラスデシケーター内に入れ、Hexamethyldisilazane (Pierce Chemical Co., Rockford, IL) でコーティングしたものを使用した。

マイクロインジェクションピペット内に前述のベクターDNA 溶液 10 µl を注入して、向かって右手の三次元懸架式ジョイステイック油圧マイクロマニピュレーターMMO-202D (成茂科学) に接続した。

ホールディングピペットは顕微鏡の向かって左手の粗動電動マニピュレーターMM-88（成茂科学）に取り付けた。

チャンバースライド（Nunc, Naperville, IL）の上蓋を取り除いたスライドグラス上に Hepes medium 200 µl を球状にのせ、その周辺に 200 µl のミネラルオイルを静かに広げ、Hepes medium を中央に固定させた。

Hepes medium 入りのプラスティックディッシュから卵をチャンバースライドに移した。卵をホールディングピペットで吸引しながら保持し、そこへインジェクションピペットで透明帯・細胞膜・核膜を穿刺し、マイクロインジェクターIM-300（成茂科学）でベクターDNA 溶液を注入した。前核の膨張で、DNA 溶液が注入されたと判断した。

#### 4.2.1.6 卵の移植

マイクロインジェクションが終わった卵は、前出のミネラルオイル入りの Hepes medium 内に戻し、37°Cで約 3 時間 incubate し、状態の良い卵を選び、96 穴プラスチックプレートの Hepes medium 20 µl に移した。

Recipient ウサギにネンブタールをゆっくり静注して十分に麻酔し、仰臥位にして腹部を広く剃毛した。十分に消毒して、滅菌した穴あき布をかけた。

メスで腹部に正中切開をいれ、皮膚・皮下・腹筋・腹膜と開き、クーパー剪刀で切開を広げた。腸・膀胱をよけて卵巣・卵管を露出させた。

19 G 翼状針の針の部分を切り落としたチューブを 2.5 ml のシリンジにつなげ、卵の入った medium を吸引した。卵管采からチューブを卵管に約 1.5~2 cm 挿入し、卵を注入した。内臓を修復し、腹筋、皮膚をそれぞれ縫合した。

術後の体温低下に注意しながら、大学から山之内製薬株式会社筑波研究センターに搬出した。

#### 4.2.2 遺伝子導入の確認

##### 4.2.2.1 組織の採取

出生後 2 週間以上経過した仔ウサギの耳から組織摘出用パンチ（夏目製作所、東京）を用いて組織を採取した。

##### 4.2.2.2 DNA の抽出

採取した組織に digestion buffer (50 mM Tris-HCl, 100 mM EDTA, 0.5% SDS に 200 µg/ml のプロティナーゼ K (和光純薬、大阪) を含む) を加え、55℃ で一晩加熱して組織を溶解させた。

そこへ phenol:chlorophorm:isoamyl alcohol (25:24:1 溶液、Gibco BRL) を加えて DNA を抽出し、エタノールで沈殿後、遠心乾燥させた。

50 µl の 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA に溶解した。

##### 4.2.2.3 Southern hybridization 法

10 µg のウサギ DNA に EcoRI (宝酒造、草津) を加え、37℃ で一晩 incubate した。1% アガロースゲルで DNA を電気泳動し、Turboblotter (Schleicher & Schuell, Keene, NH) で Nitran nylon membrane (Schleicher & Schuell) に transblot した。

Prime-It II Random primer labeling kit (Stratagene, La Jolla, CA) を用いて <sup>32</sup>P でラベルした LPL cDNA プローブを合成した。68℃ で 3 時間ハイブリダイゼーションし、洗浄後、約 2 日間 -80℃ で Biomax Scientific Imaging Film (Kodak, Rochester, NY) に感光させた。

##### 4.2.2.4 Polymerase chain reaction (PCR) 法

Southern hybridization 法のダブルチェックとして、PCR 法を行った。

TaKaRa Taq(宝酒造)を使用した。Oligonucleotide primerとしてhuman LPL primer F(CAT TGC AGG AAG TCT GAC C), human LPL primer R(GGA TTC CAA TGC TTC CAC C)を使用した。

#### 4.2.3 遺伝子発現様式の解析と組織分布

##### 4.2.3.1 組織の採取

ネンブタール注射液でウサギを安楽死させ、開腹・開胸・開頭し、臓器を順に摘出した。1 mm 角に細かく切り、液体窒素で凍結後、-80°Cで保存した。

##### 4.2.3.2 RNA の抽出

凍結した組織に Trizol reagent (Gibco BRL)を加え、ヒスコトロン（日本精機）で攪拌破碎し、chloroform, isopropyl alcohol で RNA を精製した。

##### 4.2.3.3 Northern hybridization 法

10 µg の RNA を取り、もう一度エタノール沈殿した。RNA 溶液に glyoxal と dimethyl sulfoxide を加え、1.2%アガロースゲルで電気泳動し、Turboblotter で Nitran nylon membrane に transblot した。

Southern hybridization 法と同様に  $^{32}\text{P}$  でラベルした LPL cDNA を用いてハイブリダイゼーションした。RNA 量のコントロールとして、 $^{32}\text{P}$  でラベルした human  $\beta$ -actin cDNA (Clontech Laboratories, Palo Alto, CA)で再度ハイブリダイゼーションした。

##### 4.2.3.4 *In situ* hybridization 法[83]

各組織を 5 mm 角に切除し、O.C.T. Compound (Sakura Finetechnical, Tokyo)に包埋して液体窒素で凍結した。厚さが約 8  $\mu\text{m}$  になるように凍結切片を作製し、4%パラフォルムアルデヒド-PBS 溶液で固定し、脱水後 -20°Cで保

存した。

Prime-It II Random primer labeling kit (Stratagene)を用いて<sup>35</sup>SでラベルしたLPL cDNAプローブを合成した。1枚のスライドグラスあたり $0.5 \times 10^6$  cpmのプローブを用い、ハイブリダイゼーション溶液(50% formamide, 4x SSC, 10% dextran sulfate, 250 μg/ml salmon sperm DNA, 250 μg/ml herring DNA, 400 μg/ml yeast tRNA, 0.5x Denhardts' solution)に溶解させて、37°Cで18時間ハイブリダイゼーションさせた。

ハイブリダイゼーション終了後、4x SSC, 40% formamideで15分2回(45°C), 4x SSCで30分(60°C), 1x SSCで15分3回(室温), 0.5x SSCで30分2回(室温)順次洗浄し、アルコールで脱水した。NR-M2エマルジョン(コニカ、東京)でオートラジオグラフィを行った。4°Cで2~4週間感光させた後、コニカドールX(コニカ)で現像、スーパーフジフィックス(富士写真フィルム、東京)で定着を行い、洗浄後HE染色を行った。

#### 4.2.3.5 免疫組織染色

第3章と同様の方法で行った。抗体は5D2を用いた。

#### 4.2.4 血中LPL蛋白量とLPL活性の測定

ウサギの耳動脈から前採血を行った後、耳静脈から30 u/kgのヘパリンナトリウム(Novo Nordisk, Bagsvaerd, Denmark)を静注した。10分後に再度動脈から採血し、遠心後血漿を採取し、-80°Cで保存した。

ヒトとウサギに対するモノクローナル抗体で、LPL蛋白分子を分別してから蛋白量と酵素活性の測定を行ったため、正常ウサギの血漿ではウサギのLPLのみ、L01ウサギの血漿ではヒトLPLのみを測定した。LPL蛋白量はEnzyme-linked immunosorbent assay法で測定した。LPL活性は<sup>14</sup>Cでラベルしたtriolein phosphatidylcholineに血漿を加え、加水分解されて生成された<sup>14</sup>C-

free fatty acid を測定し、その比率から算出した[84]。

## 4.3 結果

### 4.3.1 トランスジェニックウサギの作製と遺伝子導入

pCAL-1 と pAL-1 をマイクロインジェクションして得られた結果が表 4-1 である。

表 4-1 LPL トランスジェニックウサギの作製結果

	pCAL-1	pAL-1
Collected Embryos	6646	2136
Donors (Embryos per donors)	297 (22.3)	69 (31.0)
Implanted embryos	4045	1114
Recipients (Embryos per recipients)	116 (34.9)	29 (38.4)
Pregnancies (% of recipients)	48 (41%)	18 (62%)
Pups born	166	72
Transgenic pups	6	6
Viable transgenic pups	3	4
Percentage of offspring transgenic	3.6%	8.3%

pCAL-1 では 166 羽の仔ウサギのうち 6 羽、pAL-1 では 72 羽の仔ウサギのうち 6 羽に遺伝子が導入されていた。

採取された全ての受精卵のうち 50~60% にマイクロインジェクションが行われ、1 羽の Recipient あたり 35~38 個の割合で卵管への移植が行われた計算になる。

pCAL-1, pAL-1 ともに 6 羽ずつの遺伝子の導入が確認されたが、pCAL-1 が 3 羽、pAL-1 が 2 羽出生直後に死亡した。

Southern hybridization の結果を図 4-3 に示す。PCR 法も同時に行ったが、結果はすべて Southern hybridization と一致した。

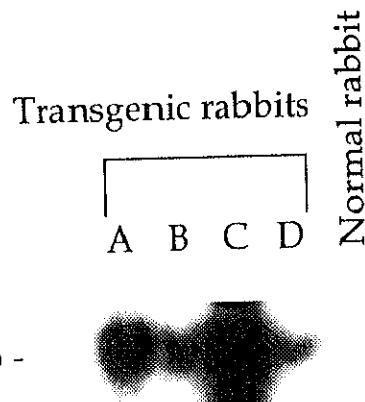


図 4-3 Southern hybridization

A, B, C のレーンが生後すぐに死亡したトランジェニックウサギ、D は後述する L01 ウサギ。その隣が正常ウサギのレーンである。ヒト LPL cDNA プローブを用いてハイブリダイゼーションを行っており、1.58 kb の大きさのバンドが A~D に認められる。

最初の成長した遺伝子導入ウサギは 1997 年 8 月に生まれた pCAL-1 を導入したもので、L01 と名付けた。1998 年 4 月以降 pCAL-1, pAL-1 両方のトランジェニックウサギの出生・成長が次々に確認されるようになったが、時間的な制約から、以下の実験は L01 のみに行われた。

#### 4.3.2 Northern hybridization

L01 ウサギと正常のウサギの Northern hybridization の結果が図 4-4 である。正常ウサギでのヒト LPL cDNA プローブを用いたハイブリダイゼーション

## LPL Transgenic rabbit (L01)

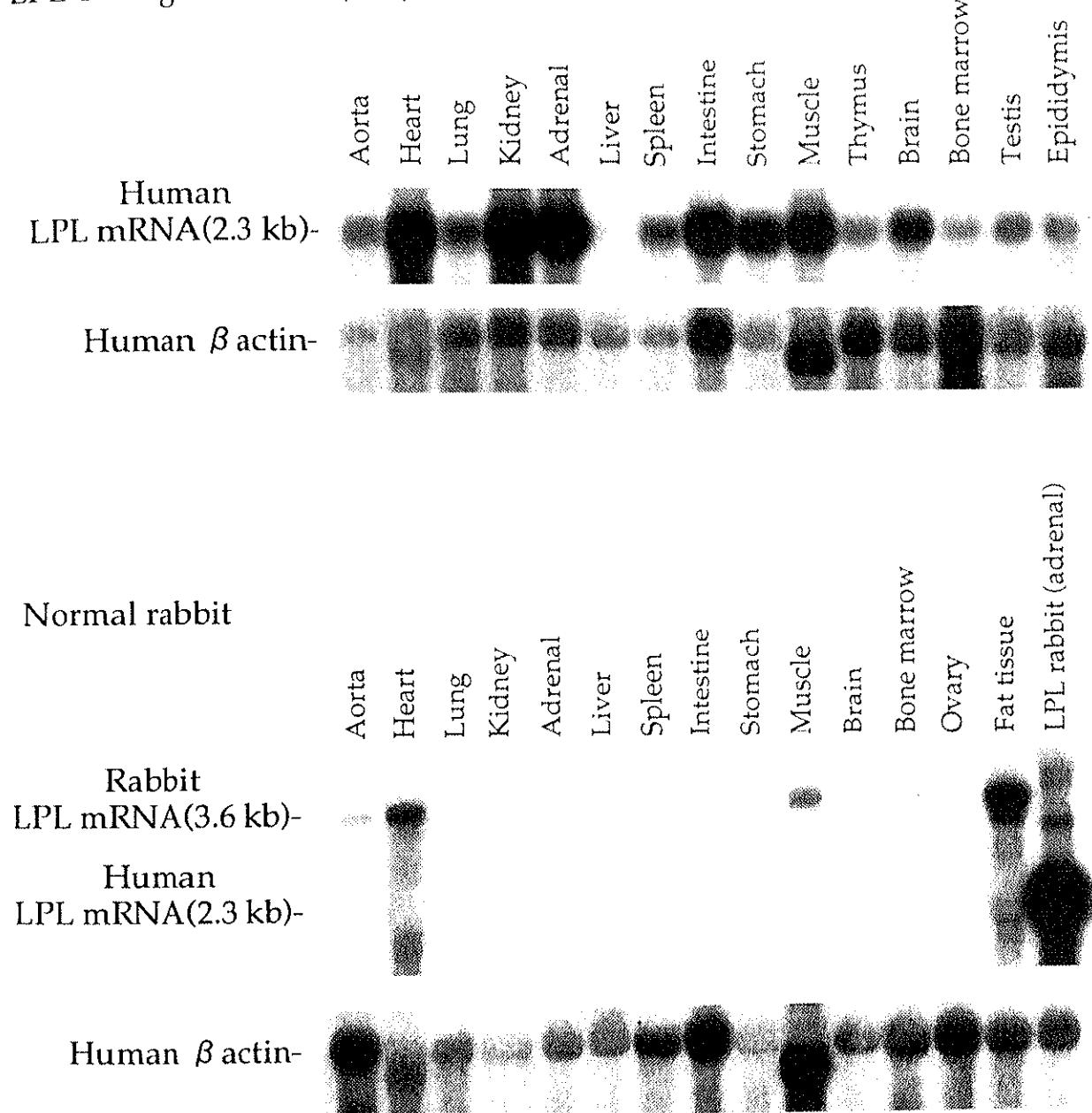


図 4-4 Northern hybridization

上が L01 ウサギ、下が正常ウサギの各組織の Northern hybridization。それぞれヒト LPL cDNA プローブとヒト  $\beta$ -actin cDNA プローブでハイブリダイゼーションしている。L01 ウサギには 2.3 kb の大きさの位置に、導入した遺伝子から転写された LPL mRNA を表すバンドを認め、心臓・副腎・骨格筋などに分布していた。 $\beta$ -actin cDNA プローブでのハイブリダイゼーションは RNA 量の比較のため行っている。正常ウサギではウサギ LPL mRNA（心臓・筋肉・脂肪組織に存在）がヒト LPL cDNA と交差して、3.6 kb の位置に認められた。

では、ヒト LPL cDNA プローブがウサギ LPL mRNA と交差し、脂肪組織・心臓・筋肉などで 3.6 kb の大きさのバンドが認められた。

L01 ウサギでのヒト LPL cDNA プローブを用いたハイブリダイゼーションでは、導入遺伝子の存在を示す 2.3 kb の大きさのバンドをほとんどの組織に認めた。human  $\beta$ -actin cDNA プローブでのハイブリダイゼーションのバンドとのシグナル比を計算すると、胃・腎臓・心臓・副腎・脳・骨格筋・大動脈の順で強く認められ、肝臓ではほとんど発現を認めなかった。

#### 4.3.3 *In situ hybridization* (図 4-5)

Northern hybridization によって、遺伝子発現が確認された臓器のうち副腎、小腸を選び、*in situ hybridization* を行った。ここでは L01 ウサギの小腸を図 4-5A に、正常ウサギの小腸を図 4-5B に示す。黒色の斑点が、 $^{35}$ S によって感光したエマルジョンの銀顆粒で mRNA の局在を示している。いくつかの小腸腺を構成する細胞に斑点が認められ、特に腺底部で顆粒の密度が大きかった。粘膜筋板や筋層の平滑筋細胞は陰性だった。正常のウサギないし L01 ウサギの小腸を RNase 処理したものには斑点を認めなかった。L01 ウサギの副腎でも皮質・髓質に陽性の細胞が地図状に分布していた。

#### 4.3.4 免疫組織染色

骨格筋、副腎、小腸に対して免疫組織染色を行った。ここでは L01 ウサギの小腸を図 4-5C に、正常ウサギの小腸を図 4-5D に示す。*in situ hybridization* 法と同様に、いくつかの小腸腺の粘膜上皮細胞の細胞質が陽性に染まっている。筋層の平滑筋や、粘膜固有層のリンパ球・単球系細胞は陰性だった。

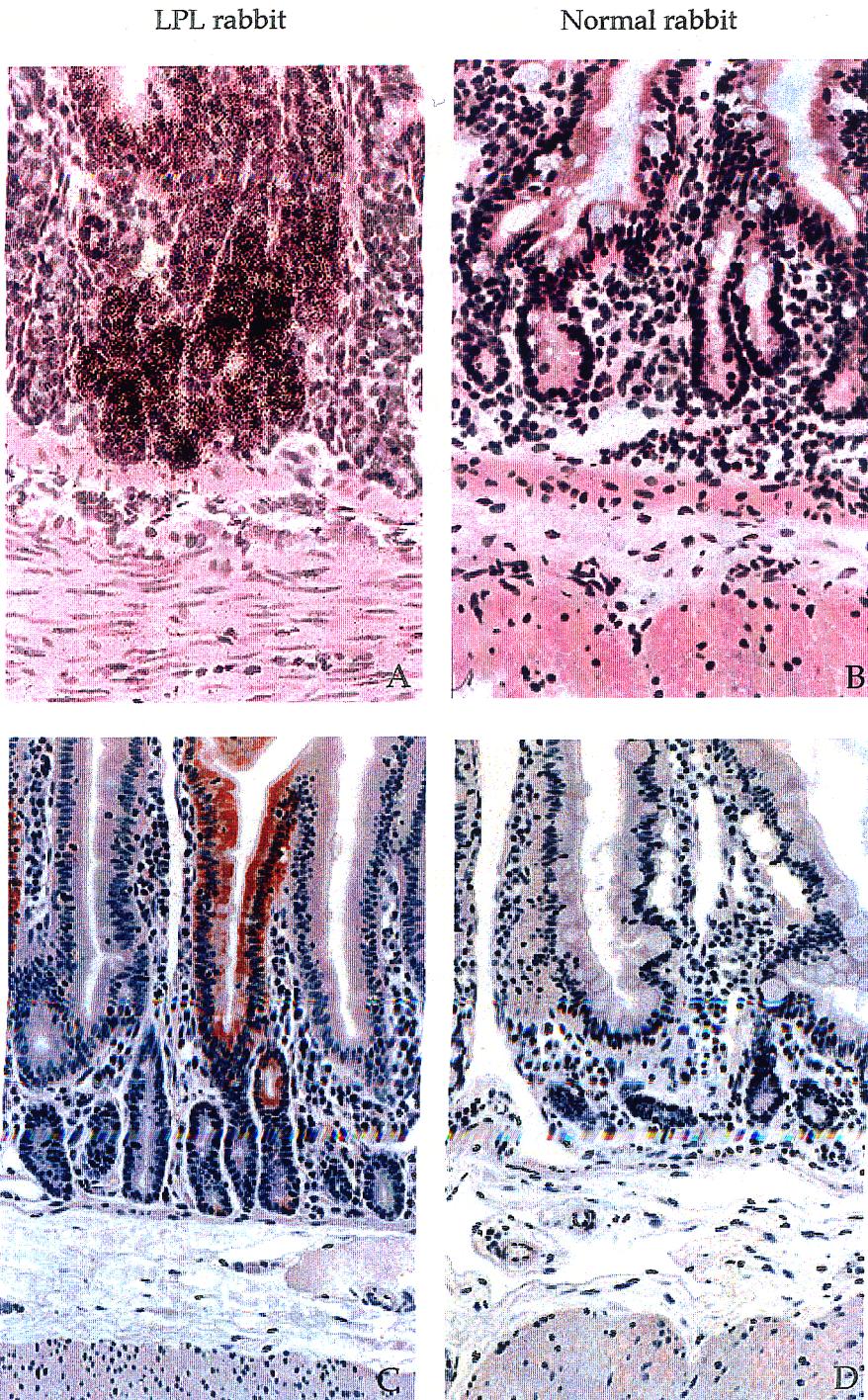


図4-5 LPLウサギの *in situ* hybridizationと免疫組織染色  
上段が *in situ* hybridization、下段が免疫組織染色で、左側がL01ウサギの小腸、右側が正常ウサギの小腸。*in situ* hybridizationではヒトLPL cDNAプローブでハイブリダイズされた、導入されて発現したヒトLPL mRNAが黒色の顆粒として中央の小腸腺の粘膜上皮細胞に認められる。免疫染色では、粘膜上皮細胞の細胞質が陽性になっている。

#### 4.3.5 血中 LPL 蛋白量と LPL 活性

L01 ウサギと正常ウサギの血中の LPL を測定した（表 4-2）。

正常ウサギの LPL はヘパリン静注後に蛋白量・活性値の上昇が見られ、L01 ウサギでもヘパリン静注後同様な上昇が認められた。L01 ウサギのヘパリン静注後の蛋白量はヒトの基準値に匹敵していた。全体の LPL 蛋白のうち約 30%が血中に遊離しており、残り 70%がヘパリン静注で放出される計算になった。

表 4-2 L01・正常ウサギ血中の LPL 蛋白量・活性値

	LPL protein ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	LPL activity ( $\mu\text{mol FFA}/\text{ml/h}$ )		
	pre-heparin	post-heparin	pre-heparin	post-heparin
L01 rabbit (n=1)	1.84	3.95	0.52	19.80
Normal rabbits (n=3)	0.39±0.09	0.96±0.08	2.00	8.64±2.42

左側が LPL 蛋白量、右側が LPL 活性、各々ヘパリン静注前と静注後の値を列挙した。

L01 はヒト LPL のみ、正常ウサギはウサギ LPL のみを測定している。

参考までにヒトのヘパリン静注 10 分後の血漿での基準値は以下の通り；

LPL protein : 1.36-3.21  $\mu\text{g}/\text{ml}$  LPL activity : 10.2±3.0  $\mu\text{mol FFA}/\text{ml/hr}$

#### 4.4 考察

発生工学の発展で、トランスジェニックマウスが、疾患モデルとして多方面で利用されるようになった。しかし、マウスは脂質代謝および動脈硬化研究においていくつかの欠点が指摘されている。例えばヒトと異なり CETP がマウスでは欠損しているため、血清中のリポ蛋白はほとんど HDL であり、コレステロール負荷食を投与しても動脈硬化が起こりにくい。またマウスのサイズが小さいため、大動脈においてさえ動脈硬化の病理学的観察や定量的な分析などが非常に困難である。そのためアメリカの National Institute of Health (NIH) が 1992 年にサイズが大きく、コレステロール負荷に反応し、数ヶ月で動脈硬化病変が形成されるトランスジェニックウサギの開発を提唱していた。

我々はトランスジェニックウサギの作製を試み、動脈硬化の発生に関連する Lp(a)[85] とこの LPL トランスジェニックウサギの作製に成功した。

今まで pCAL-1 を導入したウサギは 6 羽、pAL-1 を導入したウサギも 6 羽出生している。遺伝子を導入したウサギから計算するとその導入率はそれぞれ 3.6%, 8.3% であった。一般的にトランスジェニックウサギの遺伝子導入率は 1 ~ 5% と言われており、導入率自体に遜色はないが、最終的に発育する率は低かった。これにはいくつかの理由が考えられる。一つは、手術後に山之内製薬株式会社筑波研究センターに搬出しており、これが recipient ウサギのストレスになっている可能性が考えられる。また搬入後、出産までの間に、妊娠状態を確認するため Recipient ウサギの腹部の触診を行っているが、これが流産などの原因になっている可能性もある。ウサギは元来神経質な動物であり、周産期にストレスが加わると仔ウサギを食殺してしまうことがある。今回の pCAL-1, pAL-1 合わせて 238 羽の出産があったが、無事に成長したものは 144 羽で、流産が 8 羽、出産後 1 週間以内の死亡が 79 羽、食殺が 7 羽に認められた。

トランスジェニックマウスの作製に比べ、トランスジェニックウサギの作製

には、より高いレベルの精度が要求されるが、入念な準備と根気強い繰り返しで、目的を達成することができた。しかし、時間的制約から、本研究では L01 の解析にとどまってしまい、F1 の作製や、それらのコレステロール負荷食投与による脂質代謝・動脈硬化病変の検討を行うところまで至らなかった。

最初の LPL 導入ウサギとして成長した L01 は splay leg[86]と呼ばれる奇形をもっていた。splay leg の原因には不明な点も多いが、劣性遺伝であるとの説が一般的になっており、マイクロインジェクションによる直接の受精卵の障害ではないと考えられる。L01 は常に腹這いの状態で、運動不足のためと考えられる摂食不良で、生後 8 ヶ月の時点での体重は 1.9 kg と、正常では生後 10~11 週相当の体重しかなかった。成長の遅滞が原因と考えられるが、停留睾丸が認められ、妊娠性がないと判断された。そのため F1 の作製を断念し、LPL の活性と RNA の発現様式の組織学的な検討に用いた。

表 4-2 のとおり、L01 ウサギのヒト LPL はヘパリン静注によって血中に放出されており、ヘパリン静注後の LPL 蛋白量はヒトの基準値と同程度であった。遺伝子導入されて合成されたヒトの LPL も、ウサギの血管内皮細胞表面に存在する HSPG に結合し、ヘパリンでその結合が切断されることが推測された。また活性値と比較すると、遊離状態で血中に存在する LPL 蛋白には酵素活性がないことが推察された。

正常のウサギの Northern hybridization では、内因性のウサギ LPL が心臓・骨格筋・脂肪組織で合成されていることが示されたが、LPL ウサギでは肝臓を除く胃・腎臓・心臓・副腎・脳・骨格筋・大動脈などで、導入したヒト LPL mRNA の発現を示す 2.3kb の大きさのバンドを認めた。同じ pCAL-1 を用いてトランスジェニックマウスを作製した Shimada らの結果と比較すると、mRNA の分子量は同じで、発現を示した臓器もほぼ同じだった[81]。L01 ウサギはるいそうが強く（摂食不良のためと考えられた）、脂肪組織の検討はできなかった。

免疫組織染色と *in situ* hybridization を用いて、LPL を発現している組織での、LPL の分布を検討した。小腸の粘膜上皮細胞や副腎の皮質細胞・髓質細胞に LPL mRNA が発現しており、LPL 蛋白が合成されていることが確認された。

以上、 $\beta$ -actin を promoter としても p CAL-1 の導入によりウサギ体内で遺伝子産物が発現すること、発現されたヒト LPL はウサギの LPL と同じように血管内皮表面に結合して存在し、ヘパリン静注後に血中に放出されること、ウサギに発現されたヒトの LPL 蛋白量と LPL 活性は、ヒトの LPL 蛋白量・活性と同程度であったことが確認された。

現在、すでに成功している他の LPL トランスジェニックウサギの分析と繁殖を開始している。これらのトランスジェニックウサギを利用して、LPL の過剰発現による脂質代謝への影響、および大動脈・冠状動脈の動脈硬化に及ぼす影響を検討でき、LPL—レムナントリポ蛋白—動脈硬化の関連、および LPL—マクロファージ—泡沫細胞の関連を直接的に実証できるものと考えている。

本研究では、pCAL-1 および pAL-1 をマイクロインジェクションすることによって、ヒト LPL 遺伝子をウサギに導入することに成功したこと、 $\beta$ -actin promoter によって多くの臓器で導入したヒト LPL 遺伝子が発現し、合成・分泌された LPL 蛋白が血管内皮細胞表面に結合するなど、生理的な動態を示すこと、作製された LPL トランスジェニックウサギが脂質代謝と動脈硬化についての研究に応用できる可能性が示された。