

令和元年6月24日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16002

研究課題名(和文) 動脈硬化形成におけるmiR-33a/bの役割解明と新規バイオマーカー・治療法開発

研究課題名(英文) Elucidation of the functions of miR-33a/b in atherogenesis

研究代表者

西野 共達(Nishino, Tomohiro)

京都大学・医学研究科・特定助教

研究者番号：80795584

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質に翻訳されないマイクロRNA(miR)は、短いRNAであり、遺伝子発現を精巧に調節する。マウスを用いた研究からmiR-33aがHDL-Cを低下させ、動脈硬化に関わることが明らかとなってきたが、ヒトにはこれに加えてmiR-33bが存在し、その生体機能はこれまで不明であった。今回、このmiR-33bが、動脈硬化症において役割を果たしていることを明らかにした。動脈硬化モデルを用いて調べたところ、miR-33bが、HDLコレステロール合成や炎症形成に関わり動脈硬化発症・進展を増悪させた。これらの結果から、miR-33bは新規治療標的になりつると示唆される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

動脈硬化症は心血管疾患の主因の一つである。現在の治療法は、高血圧・脂質代謝異常・耐糖能異常等の危険因子への介入である。超高齢化社会である我が国では未だ心血管疾患は主要な死因であり、新規予防法・治療法の開発が不可欠である。特に、HDL-コレステロールの増加や、慢性炎症の抑制を目指す治療法が期待されるものの詳細な分子機構が未解明であり、実現に至っていない。今回内在性の小さなRNAの一つ、miR-33bがHDL-コレステロール合成やその機能、また炎症細胞を介して炎症形成に重要であること、結果的に動脈硬化を進展させることを明らかとした。今後、miR-33bの抑制が新たな動脈硬化治療法として期待される。

研究成果の概要(英文)：Small non-coding RNA, called microRNA (miR), regulate gene expression precisely and it has been clear that microRNAs are involved in various kinds of disease mechanisms. Previously, we showed that miR-33a which is located in the intron of SREBP2 regulates intracellular cholesterol homeostasis and HDL cholesterol formation and atherosclerotic formation in mouse. Human have another family member of miR-33, miR-33b in addition to miR-33a. The function of miR-33b remains largely unknown. In this study, we explored the impact of miR-33b on atherosclerosis formation. miR-33b knock-in under apoE deficient mice background showed increased atherosclerosis formation via down-regulation of serum HDL levels and phenotypic changes of macrophages. These results indicated that miR-33b could become the new target of the arteriosclerosis treatment.

研究分野：循環器内科学

キーワード：マイクロRNA 動脈硬化症 HDL 核酸製剤

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

1. 研究開始当初の背景

脂質代謝のホメオスタシス維持は、細胞・個体レベルにおいて生命維持、エネルギー代謝維持に重要である。脂質代謝の転写因子レベルでの制御因子として SREBP2, SREBP1 が同定され、動脈硬化、肥満、高脂血症等の生活習慣病における役割が解明されてきた。

近年、microRNA(miR)とよばれる 20 塩基程度の短いノンコーディング RNA がさまざまな疾患に関わることが明らかとなってきた。miR は塩基配列相補性を示すメッセンジャーRNA の 3' 非翻訳領域に直接結合し、その発現を負に制御する。

申請者らは、脂質代謝に関わる miR-33 の研究を進めてきた。miR-33 には miR-33a、miR-33b の 2 種類があり、それぞれ SREBP2, SREBP1 のイントロンに存在する。miR-33 の主な標的遺伝子は、HDL-C 合成の律速段階の ABCA1 であり、miR-33a 欠損マウスでは、ABCA1 の発現が増加し、血清 HDL-C 値が上昇した(Horie T, et al. PNAS 2010)。また、miR-33a 欠損マウスでは、動脈硬化形成が抑制された(Horie T, et al. J Am Heart Assoc 2012)。

しかし、miR-33b は、ヒトには存在するものの、マウス等のげっ歯類には存在せず、生体内における機能解析は困難であった。さらに、高脂肪食負荷した miR-33a 欠損マウスが肥満、脂肪肝を示し(Horie T, Nishino T, et al. Nat commun. 2013)、全身での長期 miR-33a 抑制が治療応用の際に、副作用をもつ可能性が示唆されたことから、miR-33a/b の *in vivo* での機能評価が必要となってきた。

2. 研究の目的

miR-33 は動脈硬化治療の新規治療標的となりうる。しかし、ヒトへの臨床応用を考える場合、上述のように、miR-33b の機能解析は不可欠である。

さらに、miR-33a がマウス体内において、ホスト遺伝子である SREBP2 と協調的にコレステロール代謝遺伝子を制御したことから、miR-33b もホスト遺伝子である SREBP1 と協調的に何らかの機能を示すと仮説を立てた。そこで、miR-33b を有するモデル動物として、マウス *Srebfl* のヒトと同一イントロンにヒト miR-33b を挿入した miR-33b ノックイン (miR-33b^{+/+}) マウスを作成した(Horie T, Nishino T, et al. Sci Rep. 2014)(図1)。

本研究では、このモデルを主に用いて、生体内での miR-33a/b の生理的機能と動脈硬化症での役割を解明する。またヒトの動脈硬化巣サンプルでも miR-33a/b の発現について検討することとした。

これらの知見を新たな脂質異常改善、動脈硬化抑制に働く新規治療薬の開発へとつなげることを目的とする。

3. 研究の方法

これまでの研究から、miR-33 欠損マウスでは、肝臓やマクロファージなどの組織における標的遺伝子 ABCA1 の上昇、血中 HDL-C の上昇を介して、抗動脈硬化作用を示すことを明らかにした。

本研究では、miR-33b^{+/+}マウスを用いて、以下の点に注目して生体内における miR-33b の動脈硬化形成に関わる役割を詳細に検討した。

(1) miR-33b^{+/+}マウスの生理状態での miR-33a/b の発現と機能

(2) 動脈硬化症病態モデルでの検討

ヒト動脈硬化巣サンプルでの miR-33a/b の発現

動脈硬化症病態モデルとして、ApoE 欠損マウスと交配したモデルでの評価

肝臓、マクロファージにおける miR-33b の機能評価。さらに、骨髄移植モデルを使用して、血球系細胞と非血球系細胞における miR-33b の動脈硬化における影響を区別して評価。

(3) miR-33a/b を選択的に制御する新規核酸製剤の開発

4. 研究成果

(1) miR-33b^{+/+}マウスの生理状態での miR-33a/b の発現と機能

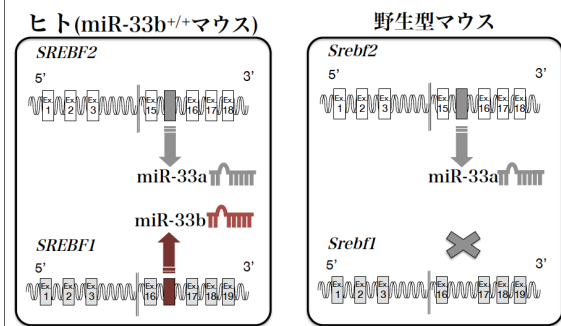
ノックインした miR-33b はホスト遺伝子 *Srebfl* と共に発現調節を受けた。また、miR-33b の発現レベルは、各臓器においてヒト FANTOM5 のデータと比較しても生理的に許容な範囲であることを確認した。結果として、通常食下で血清 HDL-C 値が野生型に比べて約 35%低下した。また、高脂肪食負荷においても同様の血清 HDL-C 値の低下を認めた。

(2) 動脈硬化症病態モデルでの検討

ヒト動脈硬化巣サンプルでの miR-33a/b の発現

内頸動脈狭窄症患者からの病変部抽出サンプルを用いて、miR-33a/b の発現量解析を行な

図1. 野生型マウスはヒトと異なりmiR-33bを欠損している。ヒトでは、miR-33a/bがSREBF2/1とともに組織・臓器特異的な発現様式を示す。



った。miR-33a/b とともに、動脈硬化プラークが豊富な病変部で高発現していることを明らかにした。動脈硬化形成進展に miR-33a/b が関わることを示唆された。

動脈硬化症病態モデルとして、ApoE 欠損マウスと交配したモデルでの評価
miR-33b^{+/+}ApoE^{-/-}マウスにおいて miR-33b^{-/-}ApoE^{-/-}マウスと比べて、動脈硬化巣の形成が悪化した。さらに、プラーク内の炎症細胞の浸潤やアポトーシスの増加、これによる壊死性コアの増大を認めた。よって、miR-33b が心血管イベント発症と相関する不安定プラーク形成・進展に関わる可能性を明らかにした。

miR-33b の肝臓、マクロファージにおける機能評価

-1、肝臓における miR-33b の役割の解明

ヒト FANTOM5 のデータと同じく、肝臓での miR-33b の発現量は miR-33a と比べ、5~8 倍多かった。HDL-C 形成の律速段階となる ABCA1 の有意な低下を認めた。また、脂肪酸の酸化等に関わる、他の標的遺伝子群の抑制も認められた。

さらに、機能的な観点からも、放射性同位元素 ³H を用いたトレース実験から、miR-33b^{+/+}マウスにおいて余剰コレステロールの体外排泄が抑制されていることを明らかにした。

-2、マクロファージにおける miR-33b の役割の解明

動脈硬化巣での炎症細胞浸潤の増加から、その主役であるマクロファージに着目した。miR-33b が標的遺伝子 ABCA1/G1 の抑制を介して、余剰コレステロールの増加による脂質ラフトの増加が、炎症性シグナルを増強することを明らかにした。

さらに骨髄移植実験の結果から、血清脂質プロファイルに関わらず、マクロファージの miR-33b が動脈硬化形成を悪化させることを示した。

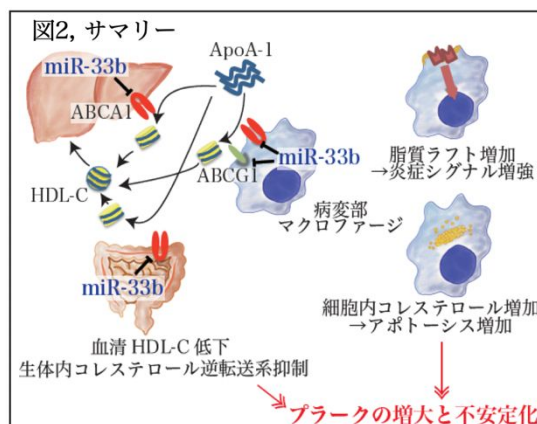
(3) miR-33a/b を選択的に制御する新規核酸製剤の開発

miR-33a/b の塩基配列は標的遺伝子を定めるシード配列は同一であるが、その直後の 2 塩基に相違がある。この 2 塩基に着目して、相補的な核酸アナログを複数作成し、miR-33a/b との結合力を元にスクリーニングを行なった。その結果、miR-33a、miR-33b それぞれに特異的な核酸アナログの開発に成功した。Ex vivo マクロファージに対して炎症刺激を加えて、miR-33b 抑制核酸製剤を投与したところ、miR-33b を選択的に抑制し、炎症性サイトカインの発現を抑制できることを明らかにした。今後、in vivo の動脈硬化モデルに対して投与して、その効果評価を行いたいと考えている。

これらの結果から、miR-33b を抑制することで、HDL-コレステロール増加、マクロファージのコレステロール引き抜き能を改善し、抗動脈硬化作用を示したと考えられた(図 2 参照、Nishino T et al, *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2018 より改変)。

従って、miR-33b の制御は、新規動脈硬化治療法に対する標的となりうると考えられた。さらに、今回開発した、選択的に miR-33b を抑制可能な核酸製剤は、in vivo 病態モデルにおける効果評価や副作用評価など、さらなる研究が必要ではあるが、臨床応用に向けての有力な候補薬剤の一つであると考えられる。

なお、上記の内容は *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* に報告した。(下記の主な発表論文等の雑誌論文 3 参照)



5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 6 件)

1. Nakazeki F, Tsuge I, Horie T, Imamura K, Tsukita K, Hotta A, Baba O, Kuwabara Y, **Nishino T**, Nakao T, Nishiga M, Nishi H, Nakashima Y, Ide Y, Koyama S, Kimura M, Tsuji S, Naitoh M, Suzuki S, Izumi Y, Kawarai T, Kaji R, Kimura T, Inoue H, Ono K. MiR-33a is a therapeutic target in SPG4-related hereditary spastic paraplegia human neurons. *Clin Sci (Lond)*. 2019 Feb 22;133(4):583-595.
2. Hakuno D, Kimura M, Ito S, Satoh J, Nakashima Y, Horie T, Kuwabara Y, Nishiga M, Ide Y, Baba O, Nishi H, Nakao T, **Nishino T**, Nakazeki F, Koyama S, Hanada R, Randolph RR, Endo J, Kimura T, Ono K. Hepatokine α 1-Microglobulin Signaling Exacerbates Inflammation and Disturbs Fibrotic Repair in Mouse Myocardial Infarction. *Sci Rep*. 2018 Nov 13;8(1):16749.
3. **Nishino T**, Horie T, Baba O, Sowa N, Hanada R, Kuwabara Y, Nakao T, Nishiga M, Nishi H, Nakashima Y, Nakazeki F, Ide Y, Koyama S, Kimura M, Nagata M, Yoshida K, Takagi Y, Nakamura T, Hasegawa K, Miyamoto S, Kimura T, Ono K. SREBF1/MicroRNA-33b Axis Exhibits Potent Effect on Unstable Atherosclerotic Plaque Formation In Vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*.

Biol. **2018** Oct;38(10):2460-2473.

4. Nakazeki F, Nishiga M, Horie T, Nishi H, Nakashima Y, Baba O, Kuwabara Y, **Nishino T**, Nakao T, Ide Y, Koyama S, Kimura M, Tsuji S, Sowa N, Yoshida S, Conway SJ, Yanagita M, Kimura T, Ono K. Loss of periostin ameliorates adipose tissue inflammation and fibrosis in vivo. *Sci Rep.* **2018** Jun 4;8(1):8553
5. Baba O, Horie T, Nakao T, Hakuno D, Nakashima Y, Nishi H, Kuwabara Y, Nishiga M, **Nishino T**, Ide Y, Nakazeki F, Koyama S, Kimura M, Hanada R, Kawahara M, Kimura T, Ono K. [MicroRNA-33 regulates the population of peripheral inflammatory Ly6C^{high} monocytes through dual pathways.](#) *Mol Cell Biol.* **2018** Apr 30. pii: MCB.00604-17. doi: 10.1128/MCB.00604-17.
6. Nakao T, Horie T, Baba O, Nishiga M, **Nishino T**, Izuhara M, Kuwabara Y, Nishi H, Usami S, Nakazeki F, Ide Y, Koyama S, Kimura M, Sowa N, Ohno S, Aoki H, Hasegawa K, Sakamoto K, Minatoya K, Kimura T, Ono K. Genetic Ablation of MicroRNA-33 Attenuates Inflammation and Abdominal Aortic Aneurysm Formation via Several Anti-Inflammatory Pathways. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **2017** Nov;37(11):2161-2170.

〔学会発表〕(計6件)

1. **西野共達**、堀江貴裕、中尾哲史、西仁勇、木村剛、尾野巨 Srebf1 のイントロンに存在する miR-33b は動脈硬化形成を促進しプラーク不安定化に寄与する 第50回日本動脈硬化学会総会・学術集会 2018年7月12-13日、大阪(口頭発表、若手奨励賞最優秀賞受賞)
2. **西野共達** SREBF1/MicroRNA-33b axis promotes unstable atherosclerotic plaque formation. 第55回日本臨床分子医学会学術集会 2018年4月13-14日、京都(ポスター発表)
3. **Nishino T**, Horie T, Baba O, Kuwabara Y, Nakao T, Nishiga M, Nishi H, Ide Y, Nakazeki F, Koyama S, Kimura T, Ono K: MiR-33b promotes development of atherosclerotic in Apoe knockout mice. 第1回日本循環器学会基礎研究フォーラム 2018年1月6-7日、東京(ポスター発表)
4. **Nishino T**, Horie T, Kuwabara Y, Nakao T, Nishiga M, Ide Y, Nakazeki F, Koyama S, Kimura M, Kimura T, Ono K: MicroRNA-33b promotes atherosclerotic plaque formation in Apoe^{-/-} mice. American Heart Association 2017, Anaheim, CA (Poster)
5. **Nishino T**, Horie T, Kuwabara Y, Nakao T, Nishiga M, Ide Y, Nakazeki F, Koyama S, Kimura M, Hanada R, Kimura T, Ono K: MicroRNA-33b promotes atherosclerotic plaque formation in Apoe^{-/-} mice. KEYSTONE SYMPOSIA RNA-Based Approaches in Cardiovascular Disease March 27-30, 2017 Keystone, CO, USA (Poster)
6. **Nishino T**, Horie T, Nakashima Y, Nishi H, Kuwabara Y, Nakao T, Nishiga M, Kimura T, Ono K: MicroRNA-33b promotes atherosclerotic plaque formation in vivo. 第49回日本動脈硬化学会総会、2017年7月6-7日、広島(ポスター発表)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

京都大学医学部附属病院循環器内科基礎研究グループ分子循環器グループ
<http://kyoto-u-cardio.jp/kisokenkyu/metabolic/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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。