

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390211

研究課題名(和文)マイクロRNA-33a/bによるHDLコレステロール制御機構の解明と治療への応用

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

研究代表者

尾野 亘(ONO, KOH)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：00359275

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円、(間接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：マイクロRNA(miR)は22塩基程度の小さなタンパクをコードしないRNAであり、標的メッセンジャーRNAの翻訳を抑制する。miR-33を抑制すると、HDLコレステロールが上昇して動脈硬化が改善するため、治療標的の一つとして研究が進められている。一方、miR-33欠損マウスは加齢に伴い肥満を呈する。このマウスの肝臓では脂肪酸代謝系の遺伝子群が発現上昇しており、我々はmiR-33の新たな標的遺伝子としてSREBP-1を同定した。SREBP-1とSREBP-2の間にmiR-33を介する新たな制御機構が存在することを示す。miR-33を治療標的とする際にはSREBP-1の上昇を考慮する必要がある。

研究成果の概要(英文)：MicroRNAs (miRs) are small non-protein-coding RNAs that bind to specific mRNAs and inhibit translation or promote mRNA degradation. Recent reports, including ours, have indicated that miR-33 located within the intron of sterol regulatory element binding protein (SREBP) 2 controls cholesterol homeostasis and can be a potential therapeutic target for the treatment of atherosclerosis. Here we show that deletion of miR-33 results in marked worsening of high fat diet-induced obesity and liver steatosis. Using miR-33<sup>-/-</sup>-Srebp1<sup>+/-</sup> mice we demonstrate that SREBP-1 is a target of miR-33 and that the mechanisms leading to obesity and liver steatosis in miR-33<sup>-/-</sup> mice involve enhanced expression of SREBP-1. These results elucidate a novel interaction between SREBP-1 and SREBP-2 mediated by miR-33 in vivo.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：マイクロRNA HDL-C 動脈硬化 ABCA1 SREBP-2 SREBP-1 脂肪肝

### 1. 研究開始当初の背景

スタチン治療による LDL 低下療法の有効性と安全性は多くの大規模臨床研究によりそのエビデンスが確立した。しかしながら、コレステロール逆輸送系を担う HDL コレステロールに対しては、スタチンは軽度の上昇作用しかなく、その効果、意義については未だ未解明な点が多い。

コレステロール合成の主要な転写因子である SREBP-2 遺伝子のイントロン 16 には miR-33(33a)が存在する。我々は miR-33 欠損マウスを作成し、マクロファージおよび肝臓において miR-33 の標的遺伝子である ABCA1 の蛋白発現が上昇することを示した。また血中 HDL コレステロールがオスで 22%、メスで 39% 増加することを見いだした (*Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107:17321-6.)

スタチンは現在最も広く臨床において使用されている薬剤の一つであるが、必然的に SREBP-2 遺伝子の転写亢進を介して、HDL の低下作用を持つ miR-33 を増加させてしまうという、負の側面もあることが判明した。ヒトではマウスと異なり、中性脂肪の合成に関わる SREBP-1 遺伝子のイントロンにも miR-33a と同様の配列を持つ miR-33b が存在する。すなわち、SREBP-1,2 の両者が活性化されている場合 (スタチン服用中の肥満者など) には、miR-33a/b 発現が増強し、HDL に対する低下作用が強まると考えられる。従って、miRNA-33a/b の機能を抑制することができれば、スタチンとの組み合わせにより、強力に LDL を下げ、HDL を上昇させるという理想的な治療が可能となる。

### 2. 研究の目的

本研究では miR-33a/b を介したコレステロール制御、代謝調節機構を解明し、miR-33a/b の制御による新規の心血管疾患治療法の開発や、miR-33a/b の測定を利用した新しい診断方法に展開するための基盤となる研究を行う。

### 3. 研究の方法

本研究計画では、以下の 4 点について検討する。

- (1)我々の作成した miR-33(miR-33a)欠損マウスの動脈硬化における解析を行うとともに、
  - (2)全身の代謝調節機構に対する作用を検討する。さらにヒトでの病態を解析するために、
  - (3)miR-33b を *Srebp1* にノックインしたマウスを作成する。生体での miR-33a/b の働きが、宿主遺伝子 *Srebp2*、*Srebp1* の発現変化とともに詳細に解析できる。
  - (4)また、ヒトでの miR-33a/b の発現レベルと病態との関係についても検討を行う。
- 本研究では miRNA によるコレステロール制御という新しい機序の詳細を明らかにするとともに、新規の心血管疾患治療法へとつなぐための基盤を築く。

### 4. 研究成果

(1)miR-33 と Apoe ダブルノックアウトマウス (miR-33<sup>-/-</sup>Apoe<sup>-/-</sup>)においては HDL-C が上昇し、この血清はコレステロール引き抜き能が miR-33<sup>+/+</sup> Apoe<sup>-/-</sup>マウスに比し上昇していた。miR-33<sup>-/-</sup> Apoe<sup>-/-</sup>の腹腔内マクロファージにおいては ABCA1、ABCG1 発現とも上昇し、ApoA-I と HDL-C によるコレステロール引

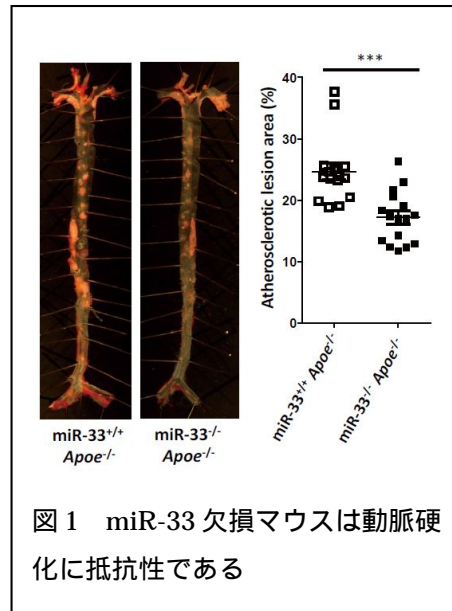


図1 miR-33 欠損マウスは動脈硬化に抵抗性である

き抜き能が miR-33<sup>+/+</sup> Apoe<sup>-/-</sup>より上昇した。また、遊離コレステロールによるアポトーシスにも抵抗性であった。この結果、コレステロール含有食負荷 miR-33<sup>-/-</sup> Apoe<sup>-/-</sup>においてはプラークのサイズ (図1) と脂質蓄積量、CD68 陽性細胞数、CD3 陽性細胞数、VCAM-1 発現面積、iNOS 陽性面積が低下した。また、血球系細胞における miR-33 の働きを調べるために、miR-33<sup>+/+</sup> Apoe<sup>-/-</sup>あるいは miR-33<sup>-/-</sup> Apoe<sup>-/-</sup>の骨髄を Apoe<sup>-/-</sup>マウスに移植したところ、miR-33<sup>-/-</sup> Apoe<sup>-/-</sup>の骨髄を移植したマウスにおいては HDL-C の上昇なしに、動脈硬化巣内の脂質蓄積量が低下した。miR-33<sup>-/-</sup> Apoe<sup>-/-</sup>のマクロファージにおいては、ABCA1 及び ABCG1 発現が多く、遊離コレステロール負荷に抵抗性であることが、動脈硬化病変の進行抑制、さらにプラーク安定化にも影響を与えると推察される (*J Am Heart Assoc.* 2012;1:e003376.)

(2)このように、miR-33 は良い治療標的となりうるために、臨床応用へ向けての研究が進められている。すでに、21 塩基の合成 RNA や 8 塩基の合成 RNA によってアフリカミドリザルにおいて 12 週から 15 週間 miR-33 を抑制し、安全に HDL-C を上昇することができたとの報告がある。しかしながら、複数の標的遺伝子を持つ miRNA を抑制することが安全であるかどうかは慎重に検討しなければならない。

この目的で、我々は長期的に完全に miR-33 を抑制した場合の影響をマウスによって検

討した。miR-33 欠損マウスにおいては正常食においても 26 週齢を越えると肥満を呈する。また高脂肪食を負荷すると、さらに肥満が亢進し脂肪肝を呈する。このマウスの肝臓を用いたマイクロアレイ解析においては脂肪酸代謝系の遺伝子群が発現上昇していた。データベースによる検討では miR-33 の標的遺伝子に *Srebf1* が存在した。さらに miR-33 欠損マウス *Srebf1* ヘテロマウス(miR-33<sup>-/-</sup>*Srebf1*<sup>+/-</sup>)においては SREBP-1 のレベルが miR-33<sup>+/-</sup>*Srebf1*<sup>+/-</sup> と同等になり、miR-33<sup>-/-</sup>*Srebf1*<sup>+/-</sup>で認められた肥満(脂肪細胞の増大と炎症)と脂肪肝が改善した(図 2)。

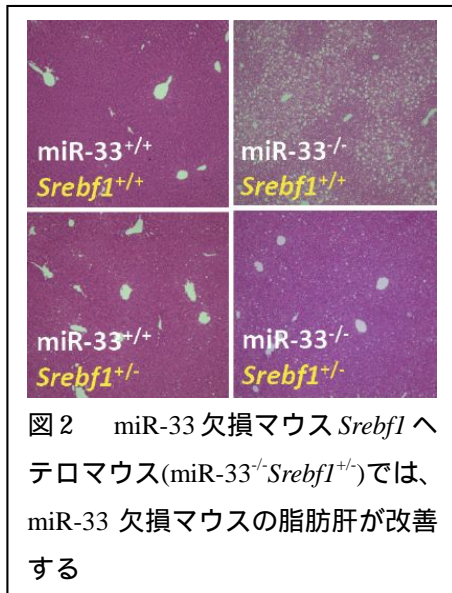


図 2 miR-33 欠損マウス *Srebf1* ヘテロマウス(miR-33<sup>-/-</sup>*Srebf1*<sup>+/-</sup>)では、miR-33 欠損マウスの脂肪肝が改善する

すなわち、miR-33 が欠損すると SREBP-1 が増加し、脂肪酸合成の上昇と脂肪酸の脂肪組織、肝臓への蓄積につながるようになる。これは SREBP-1 と SREBP-2 の間に miR-33 を介する新たな制御機構が存在することを示す(図 3)。

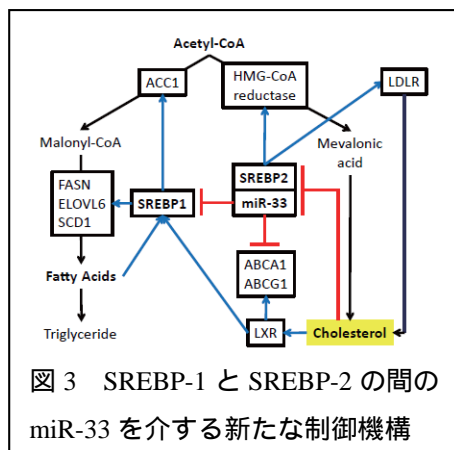


図 3 SREBP-1 と SREBP-2 の間の miR-33 を介する新たな制御機構

従って、miR-33 を動脈硬化の治療標的とする際には SREBP-1 の上昇を考慮する必要がある (*Nat Commun.* 2013;4:2883. doi: 10.1038/ncomms3883.)。

(3)および(4)また、miR-33b を *Srebf1* にノック

インしたマウスの作成に成功した(図 4)。こ

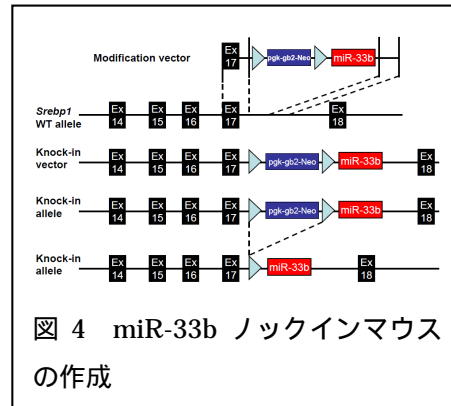


図 4 miR-33b ノックインマウスの作成

のマウスにおいてはイントロンを改変しているが、宿主遺伝子である *Srebf1* の発現やスプライシングには影響せず、また miR-33b が SREBP-1 特異的な刺激によって、*Srebf1* とともに発現することを確認している。ヒト疾患モデルと対比させて検討していく。また、ヒトでの miR-33a/b の発現レベルと病態との関連について検討中である。

## 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 28 件)

Horie T, Baba O, Kuwabara Y, Yokode M, Kita T, Kimura T, and Ono K; MicroRNAs and lipoprotein metabolism. *J of Atherosclerosis and Thrombosis* 2014;21:17-22.

[https://www.jstage.jst.go.jp/article/jat/21/1/21\\_20859/\\_article](https://www.jstage.jst.go.jp/article/jat/21/1/21_20859/_article)(査読あり)

Nagao K, Sowa N, Inoue K, Tokunaga M, Fukuchi K, Uchiyama K, Ito H, Hayashi F, Makita T, Inada T, Tanaka M, Kimura T, and Ono K. Myocardial expression level of neural cell adhesion molecule correlates with reduced left ventricular function in human cardiomyopathy. *Circulation; Heart Failure*. 2014;7:351-8 doi: 10.1161/CIRCHEARTFAILURE.113.000939. (査読あり)

Horie T, Nishino T, Baba O, Kuwabara Y, Nakao T, Nishiga M, Usami S, Izuhara M, Sowa N, Yahagi N, Shimano H, Matsumura S, Inoue K, Marusawa H, Nakamura T,

Hasegawa K, Kume N, Yokode M, Kita T, Kimura T, and Ono K; MicroRNA-33 regulates sterol regulatory element-binding protein 1 expression in mice *Nat Commun.* 2013;4:2883. doi: 10.1038/ncomms3883. (査読あり)

Morikami Y, Natsuaki M, Morimoto T, Ono K, Nakagawa Y, Furukawa Y, Sakata R, Aota M, Okada Y, Onoe M, Kawasuji M, Koshiji T, Nakajima H, Nishizawa J, Yamanaka K, Yamamoto H, Kimura T; CREDO-Kyoto PCI/CABG registry cohort-2 investigators. Impact of polyvascular disease on clinical outcomes in patients undergoing coronary revascularization: An observation from the CREDO-Kyoto Registry Cohort-2. *Atherosclerosis.* 2013;228:426-31. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2013.04.005. (査読あり)

Tamaki Y, Iwanaga Y, Niizuma S, Kawashima T, Kato T, Inuzuka Y, Horie T, Morooka H, Takase T, Akahashi Y, Kobuke K, Ono K, Shioi T, Sheikh SP, Ambartsumian N, Lukanidin E, Koshimizu TA, Miyazaki S, Kimura T. Metastasis-associated protein, S100A4 mediates cardiac fibrosis potentially through the modulation of p53 in cardiac fibroblasts. *J Mol Cell Cardiol.* 2013;57:72-81. doi: 10.1016/j.yjmcc.2013.01.007. (査読あり)

Horie T, Baba O, Kuwabara Y, Chujo Y, Watanabe S, Kinoshita M, Horiguchi M, Nakamura T, Chonabayashi K, Hishizawa M, Hasegawa K, Kume N, Yokode M, Kita T, Kimura T, Ono K. MicroRNA-33-deficiency reduces the progression of atherosclerotic plaque in apoE<sup>-/-</sup> mice. *J Am Heart Assoc.* 2012;1:e003376. doi:

10.1161/JAHA.112.003376. (査読あり)

Ono K. Current concept of reverse cholesterol transport and novel strategy for atheroprotection. *J Cardiol.* 2012 ;60:339-43. doi: 10.1016/j.jjcc.2012.07.014. (査読あり)

Sowa N, Horie T, Kuwabara Y, Baba O, Watanabe S, Nishi H, Kinoshita M, Takanabe-Mori R, Wada H, Shimatsu A, Hasegawa K, Kimura T, and Ono K. MicroRNA 26b Encoded by the Intron of Small CTD Phosphatase (SCP) 1 Has an Antagonistic Effect on its Host Gene. *Journal of Cellular Biochem.* 2012 ;113:3455-65. doi: 10.1002/jcb.24222. (査読あり)

Kuwabara Y, Ono K, Horie T, Nishi H, Nagao K, Kinoshita M, Watanabe S, Baba O, Kojima Y, Shizuta S, Imai M, Tamura T, Kita T, Kimura T. Increased microRNA-1 and microRNA-133a Levels in Serum of Patients with Cardiovascular Disease Indicate the Existence of Myocardial Damage. *Circulation: Cardiovascular Genetics.* 2011;4:446-454. doi: 10.1161/CIRCGENETICS.110.958975. (査読あり)

Ono K. MicroRNA links obesity and impaired glucose metabolism. *Cell Res.* 2011;21:864-6. doi: 10.1038/cr.2011.78. (査読なし)

Ono K, Kuwabara Y, Han J. MicroRNAs and Cardiovascular Diseases. *FEBS J* 2011;278:1619-33. doi: 10.1111/j.1742-4658.2011.08090.x. (査読あり)

Tada T, Kimura T, Morimoto T, Ono K, Furukawa Y, Nakagawa Y, Nakashima H, Ito A, Shiode N, Namura M, Inoue N, Nishikawa H, Nakao K, Mitsudo K

Comparison of Three-Year Clinical Outcomes after Sirolimus-eluting Stent Implantation among Insulin-treated Diabetic, Non-insulin-treated Diabetic and Non-diabetic Patients From the j-Cypher Registry *Am J Cardiol* 2011;107:1155-62. doi: 10.1016/j.amjcard.2010.12.013. (査読あり)

Nishi H, Ono K, Horie T, Nagao K, Kinoshita M, Kuwabara Y, Watanabe S, Takaya T, Tamaki Y, Takanabe-Mori R, Wada H, Hasegawa K, Iwanaga Y, Kawamura T, Kita T, Kimura T. MicroRNA-27a regulates beta cardiac myosin heavy chain gene expression by targeting thyroid hormone receptor beta 1 in neonatal rat ventricular myocytes. *Mol Cell Biol*. 2011;31:744-55. doi: 10.1128/MCB.00581-10. (査読あり)

[学会発表] (計 57 件)

Kuwabara Y, Ono K, Horie T, Nishi H, Watanabe S, Kinoshita M, Baba O, Chujo Y, Nagao K, Kojima Y, Kita T, Kimura T: MicroRNA-1 and microRNA-133a elevations in serum of patients with cardiovascular disease indicate the existence of myocardial damage. American Heart Association Annual Scientific Sessions 2011, November 12-16, Orlando, Florida  
Nagao K, Ono K, Horie T, Tamaki Y, Iwanaga Y, Makita T, Inada T, Tanaka M, Kita T, Kimura T. Neural cell adhesion molecule is a cardioprotective factor upregulated by metabolic stress. European Society of Cardiology Congress 2011 August 27-31, Paris, France  
Ono K, MicroRNA-33 Encoded by an Intron of Srebp2 Regulates HDL in vivo. 2011AVDRC International Symposium, Intervention of Vascular Aging: New

Frontiers 平成 23 年 9 月 22 日 College of Medicine, Yeungnam University, Daegu, Korea.

Ono K. MicroRNA-33-deficiency reduces the progression of atherosclerotic plaque in apoE<sup>-/-</sup> mice Cold spring harbor laboratory meeting. Regulatory and non-coding RNA Aug. 28<sup>th</sup> to Sep 1<sup>st</sup> in 2012 (NY, U.S.A.)

Ono K. Symposium 6 (Insulin resistance) MicroRNA regulation of lipid homeostasis. 25<sup>th</sup> Spring Congress of Korean Diabetes Association May 11<sup>th</sup>, 2012. Hotel Inter-Burgo Exco, Daegu

Baba O, Horie T, Nakamura T, Hasegawa K, Kume N, Yokode M, Kita T, Kimura T, and Ono K. MicroRNA 33 Deficiency Reduces Atherosclerotic Plaque progression in ApoE Knockout Mice. European Society of Cardiology Congress 2012, 25 Aug 2012 - 29 Aug, Munich - Germany

Horie T, Baba O, Ono K, Kuwabara Y, Hasegawa K, Kume N, Yokode M, Kita T, and Kimura T. MicroRNA-33 Deficiency Reduced Atherosclerosis Formation In Vivo. American Heart Association Annual Scientific Sessions 2012, November 3-7, Los Angeles Convention Center

Ono K. Cardiac-specific inhibition of kinase activity in calcium/calmodulin-dependent kinase kinase- $\beta$  leads to accelerated left ventricular remodeling and heart failure after transverse aortic constriction in mice. Cold spring harbor laboratory meeting. Regulatory and non-coding RNA Aug. 13<sup>th</sup> to 17<sup>th</sup> in 2013 (NY, U.S.A.)

Kuwabara Y. LncRNAs regulated by pressure-overload induce hypertrophy in neonatal mouse ventricular cardiomyocytes. American Heart Association Annual Scientific Sessions 2013, November 16-22,

Dallas

Ono K 'Cholesterol and Fatty acid regulation by miR-33a/b' Molecular Clock ~New waves of RNA regulation~, 2014 March 29<sup>th</sup>, Kyoto

Horie T, Nishino T, Baba O, Kuwabara Y, Nakao T, Nishiga M, Usami S, Izuhara M, Sowa N, Yahagi N, Shimano H, Hasegawa K, Kume N Yokode M, Kita T, Kimura T, Ono K. MicroRNA-33 encoded by an intron of sterol regulatory element-binding protein-2 (Srebp2) regulates Srebp1 in vivo The 18th International Vascular Biology Meeting, 2014 April 14<sup>th</sup>, Kyoto

〔図書〕(計 2件)

尾野 亘 Annual Review 糖尿病・代謝・内分泌 2012、 microRNA による HDL 代謝調節 p80-85、中外医学社  
尾野 亘 Annual Review 循環器 2014、代謝と循環器疾患に関わる microRNA p35-41、中外医学社

〔産業財産権〕

出願状況(計 1件)

名称：マイクロRNA溶出型ステント及びそれを用いた管腔治療  
発明者：尾野 亘、斉藤成達、出原正康、木村 剛  
権利者：同上  
種類：  
番号：特願 2014-044463  
出願年月日：平成 26 年 3 月 7 日  
国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等  
<http://kyoto-u-cardio.jp/kisokenkyu/metabolic/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

尾野 亘 (ONO, Koh)  
京都大学大学院医学研究科循環器内科学・講師  
研究者番号：00359275

(2)研究分担者

中邨智之 (NAKAMURA, Tomoyuki)  
関西医科大学医学部薬理学  
研究者番号：20362527

(3)連携研究者

掛谷秀昭 (KAKEYA, Hideaki)  
京都大学大学院薬学研究科  
研究者番号：00270596

(4)連携研究者

佐藤史顕 (SATO, Fumiaki)  
京都大学大学院薬学研究科  
研究者番号：20467426

(5)連携研究者

堀江貴裕 (HORIE, Takahiro)  
京都大学大学院医学研究科循環器内科  
研究者番号：20565577