

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790753

研究課題名(和文) マイクロRNA制御による新規動脈硬化予防法・治療法の開発

研究課題名(英文) Investigation of the novel prevention and treatment for atherosclerosis by microRNA modulation

研究代表者

堀江 貴裕 (HORIE, TAKAHIRO)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：20565577

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：マイクロRNAとよばれる内在性の小さなRNAが遺伝子発現を精巧に調節し、種々の疾患形成に関与する事が明らかとされてきた。以前、我々はSREBP2のイントロンに存在するマイクロRNA-33(miR-33)が、細胞内コレステロール恒常性と血中HDL形成を調節していることを示した。今回の研究ではmiR-33が、動脈硬化形成にどのような影響を与えるかを検討した。アポE欠損マウスと呼ばれる動脈硬化形成モデル動物においてmiR-33を欠損させると、血中HDL上昇およびマクロファージ形質を変化させ、動脈硬化形成が抑制された。これらの結果からmiR-33が動脈硬化治療の新規標的となりうることを示唆された。

研究成果の概要(英文)：Endogenous small RNAs, called microRNA, regulate gene expression precisely and it has been clear that microRNAs are involved in various kinds of disease formation. Previously, we showed that microRNA-33 (miR-33) which is located in the intron of SREBP2 regulates intracellular cholesterol homeostasis and HDL cholesterol formation. In this study, we explored the impact of miR-33 on atherosclerosis formation. miR-33 deficiency under apoE deficient mice background showed reduced atherosclerosis formation via upregulation of serum HDL levels and phenotypic changes of macrophages. These results indicated that miR-33 could become the new target of the arteriosclerosis treatment.

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 動脈硬化 HDL

1. 研究開始当初の背景

心筋梗塞、心不全、狭心症、閉塞性動脈硬化症に代表される心血管疾患は動脈硬化性病変が主たる原因の一つである。現在、動脈硬化に対する治療法はその危険因子の除去、すなわち高血圧、耐糖能異常、脂質代謝異常、肥満などへの治療が主体である。とりわけ脂質代謝異常の是正は重要であり、心血管イベントの発症が low-density lipoprotein (LDL) 値と正の相関を、high-density lipoprotein (HDL) 値と負の相関を示す事は種々の大規模臨床試験で示されている。しかし、現行の薬剤では、LDL 値の低下作用と比較して HDL 値の上昇作用は十分ではない。HDL を安全にかつ十分に上昇させる治療法の開発は動脈硬化の予防・治療法の発展に大きく寄与すると考えられる。

マイクロ RNA (microRNA; miRNA; miR) とよばれる内在性の 20 塩基長程度の小さな RNA が遺伝子発現を精巧に調節し、種々の疾患形成に関与する事が明らかになってきた。現在、ヒトでは約 1000 種類の miRNA が同定されており、発生や分化のみならず、心血管疾患や代謝性疾患においても miRNA の関与が明らかにされつつある。

申請者らはコレステロール代謝遺伝子を制御する転写因子 sterol regulatory element-binding protein 2 (SREBP2) のイントロン 16 に存在する miR-33 が、ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) の発現を調節し、HDL の形成を制御している事を明らかにした。ABCA1 はコレステロール逆輸送系および HDL 形成に必須の分子である。miR-33 欠損マウスを作成したところ、組織における ABCA1 の発現増加を認めた。miR-33 欠損マウスから採取した腹腔内マクロファージは apoA-I に対するコレステロールの引き抜き能の増強を示し、これらのマウスでは血清中 HDL の上昇 (オス: 約 22%、メス: 約 39%) を認めた (Horie T, et al. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010)。

2. 研究の目的

miR-33 の抑制は既存の薬剤とは全く異なった機序を介して HDL を上昇させる。しかし、動脈硬化形成における役割については未だ明らかではない。本研究では、動脈硬化形成過程における miR-33 の機能を詳細な検討により明らかにし、新たな動脈硬化治療開発の標的となりうるかどうかにつき評価する。

3. 研究の方法

miR-33 欠損マウスとアポ E 欠損マウスとの交配を行い、高コレステロール食負荷を行う。血中の脂質プロファイルの比較、大動脈の動脈硬化病変の進展程度をオイルレッド O 染色、Sudan 染色を行い、評価する。動脈硬化巢の免疫染色を行い、マクロファージ浸潤の程度、線維化の程度などの評価を行う。血清 HDL によるコレステロール引き抜き能の検討を

行う。マクロファージにおける miR-33 の動脈硬化形成における役割を検討するため、細胞実験として腹腔内マクロファージを採取し機能評価を行う。さらに生体におけるマクロファージ内の miR-33 の役割を明らかにするために骨髄移植実験を行う。

4. 研究成果

動脈硬化形成における miR-33 の役割を明らかにするために動脈硬化モデルマウスであるアポ E 欠損マウスと我々の作成した miR-33 欠損マウスの交配を行い、miR-33・アポ E ダブル欠損マウスを得た。16 週間のウェスタン食負荷の後にアポ E 欠損マウスと miR-33・アポ E ダブル欠損マウスとを比較検討した。

全大動脈を Sudan 染色で大動脈基部をオイルレッド O 染色で染色し評価したところ、動脈硬化病変は miR-33・アポ E ダブル欠損マウスで有意な減少を認めた (全大動脈: 24.7% vs. 17.2%, 大動脈基部: 0.44mm² vs. 0.36mm²)。動脈硬化病変部の脂質蓄積量・マクロファージ浸潤・リンパ球浸潤・アポトーシス細胞数は有意に miR-33・アポ E ダブル欠損マウスで低下を示した。一方、線維化の程度は明らかな違いは認めなかった。

肝臓中の ABCA1 発現は miR-33・アポ E ダブル欠損マウスで増加を示し、それに伴い、血中 HDL コレステロール値も約 20% の有意な増加を示した。これらの HDL では、マクロファージからのコレステロール引き抜き能も増加を示したため、値のみならず、機能的にも増加していることが確認された。

一方で、動脈硬化形成におけるマクロファージ内の miR-33 の役割を明らかにするために各々のマウスから腹腔内マクロファージを採取し、比較を行った。miR-33・アポ E ダブル欠損マウスから採取した腹腔内マクロファージは ABCA1・ABCG1 の発現上昇を示し、アポ A-I および HDL に対するコレステロール引き渡し能が高いことが確認され、コレステロール負荷により誘導されるアポトーシスに抵抗性を示すことが明らかとなった。従って、miR-33 欠損がマクロファージに対して機能的変化を与えることが示唆された。生体においてマクロファージ内の miR-33 が動脈硬化形成における役割を明らかにするためにアポ E 欠損マウスおよび miR-33・アポ E ダブル欠損マウスの骨髄を採取しアポ E 欠損マウスへ移植を行った (骨髄移植実験)。骨髄においてのみ miR-33 を欠損させることにより、動脈硬化病変部の脂質蓄積量の有意な減少を示した。

これらの結果から miR-33 欠損は HDL コレステロール増加作用、マクロファージのコレステロール引き抜き能の改善作用を介し、抗動脈硬化作用を示したと考えられた。従って、miR-33 の制御は、新たな動脈硬化治療法に対する標的となりうると考えられた。尚、上記の内容は *J Am Heart Assoc.* に報告した (下

記の主な発表論文等の雑誌論文 参照)

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 6 件)

Horie T, Baba O, Kuwabara Y, Yokode M, Kita T, Kimura T, Ono K; MicroRNAs and lipoprotein metabolism. *J Atheroscler Thromb.* 2014;21:17-22. https://www.jstage.jst.go.jp/article/jat/21/1/21_20859/article 査読有

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. 査読有

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. 査読有

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^{-/-} mice *J Am Heart Assoc.* 2012;1:e003376. doi: 10.1161/JAHA.112.003376. 査読有

Takaya T, Nishi H, Horie T, Ono K, Hasegawa K. Roles of MicroRNAs and Myocardial Cell Differentiation. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2012; 111:139-52. doi: 10.1016/B978-0-12-398459-3. 査読有

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. 査読有

〔学会発表〕(計 19 件)

第 78 回日本循環器学会学術集会 平成 26 年 3 月 21 日~23 日 東京国際フォーラム

Takahiro Horie, Tomohiro Nishino, Osamu Baba, Yasuhide Kuwabara, Tetsushi Nakao, Masataka Nishiga, Shunsuke Usami, Masayasu Izuhara, Naoya Sowa, Naoya Yahagi, Hitoshi Shimano, Masayuki Yokode, Toru Kita, Takeshi Kimura, Koh Ono MicroRNA-33 Encoded by an Intron of Sterol Regulatory Element-Binding Protein 2 (Srebp2) Regulates Srebp1 in vivo.

Yasuhide Kuwabara, Takahiro Horie, Osamu Baba, Shin Watanabe, Masayasu Izuhara, Tetsushi Nakao, Shunsuke Usami, Tomohiro Nishino, Masataka Nishiga, Toru Kita, Takeshi Kimura, Koh Ono MicroRNA-451 Exacerbates Lipotoxicity in Neonatal Rat Cardiomyocytes, and High Fat Diet Induced Cardiac Hypertrophy in Mice through LKB1/AMPK Pathway.

転写研究会・転写サイクル・転写代謝システム共催『若手ワークショップ 2014』平成 26 年 1 月 30 日~2 月 1 日 群馬県磯部温泉

堀江貴裕、西野共達、馬場理、桑原康秀、中尾哲史、西賀雅隆、宇佐美俊輔、出原正康、矢作直也、島野仁、横出正之、北徹、木村剛、尾野巨 SREBP-2 のイントロンに存在するマイクロ RNA-33 は SREBP-1 の発現を制御する

桑原康秀、堀江貴裕、馬場理、出原正康、宇佐美俊輔、中尾哲史、西賀雅隆、西野共達、井出裕也、中関典子、木村剛、尾野巨 microRNA-451 は LKBA-AMPK 経路を抑制することで、ラット心筋細胞において細胞障害を生体においては高脂肪食による心肥大を誘導する。

第八回 高血圧と冠動脈疾患研究会 大手町産経プラザ 4 階 『サンケイホール』平成 25 年 12 月 21 日

堀江貴裕、馬場理、桑原康秀、横出正之、北徹、木村剛、尾野巨 マイクロ RNA 制御による新規動脈硬化治療法の探索的研究

平成 25 年度新学術領域「転写代謝システム」第 5 回総括班会議 国際シンポジウム “International Symposium on Transcription and Metabolism” 平成 25 年 11 月 11 日(月) 淡路夢舞台国際会議場

Takahiro Horie MicroRNA encoded by an

intron of Srebf2 regulates SREBP-1 in vivo.

第 45 回日本動脈硬化学会 平成 25 年 7 月 18-19 日 京王プラザホテル イブニングセミナー2 近未来の動脈硬化治療
堀江貴裕、馬場 理、木村 剛、尾野 亘
MicroRNA-33 Deficiency Reduces the Progression of Atherosclerotic Plaque in ApoE^{-/-} Mice

若手奨励賞 堀江貴裕 MicroRNA-33 Deficiency Reduces the Progression of Atherosclerotic Plaque in ApoE^{-/-} Mice

成人病の病因・病態の解明に関する研究助成 第 19 回研究発表会 (TMFC) 平成 25 年 7 月 6 日-7 日 大阪 セントレジスホテル大阪

堀江貴裕 MicroRNA-33 deficiency reduces atherosclerosis formation in vivo.

18th Annual Scientific Meeting of the International Society of Cardiovascular Pharmacotherapy 28th-30th June, Italy, Roma

Takahiro Horie, Osamu Baba, Masataka Nishiga, Koji Hasegawa, Masayuki Yokode, Takeshi Kimura, Koh Ono. MicroRNA-33 deficiency reduces atherosclerosis formation in vivo.

第 50 回日本臨床分子医学会学術集会 平成 25 年 4 月 12 日 マイクロ RNA-33 欠損はアポ E 欠損マウスにおいて動脈硬化形成を抑制する

堀江貴裕、馬場 理、桑原康秀、久米典昭、横出正之、北徹、木村 剛、尾野 亘
転写研究会・転写サイクル・転写代謝システム共催『若手ワークショップ@鬼怒川』平成 25 年 1 月 24-26 日 栃木 ホテル鬼怒川御苑

堀江貴裕 マイクロ RNA-33 欠損はアポ E 欠損マウスにおいて動脈硬化形成を抑制する

第 1 回万有医学奨励賞報告会 平成 24 年 12 月 8 日 東京 品川ラフォーレ

堀江貴裕 動脈硬化形成過程におけるマイクロ RNA の機能解析～新規動脈硬化治療法の開発を目指して～

第 20 回日本血管生物医学会学術集会 併催] 第 10 回 Korea-Japan Joint Symposium on Vascular Biology 平成 24 年 12 月 5-7 日 徳島あわぎんホール

Takahiro Horie, Osamu Baba, Koh Ono, Yasuhide Kuwabara, Naoya Sowa, Koji Hasegawa, Noriaki Kume, Masayuki Yokode, Toru Kita, Takeshi Kimura. MicroRNA-33 deficiency reduces atherosclerosis formation in vivo.

American Heart Association Annual Scientific Sessions 2012, November 3-7, Los Angeles Convention Center

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.

Baba O, Horie T, Kuwabara Y, Izuhara M, Usami S, Nakao T, Nishiga M, Nishino T, Sowa N, Hasegawa K, Kume N, Yokode M, Kita T, Kimura T, and Ono K. MicroRNA 33 Deficiency in Leukocytes Reduced the Lipid Accumulation in Atherosclerotic Plaque in ApoE Knockout Mice.

ATVB Early Career Networking Reception. 2012 November 6, Westin Bonaventure Hotel & Suites, Los Angeles, CA

Horie T, Baba O, Ono K, Kuwabara Y, Hasegawa K, Kume N, Yokode M, Kita T, Kimura T: MicroRNA-33 Deficiency Reduced Atherosclerosis Formation In Vivo.

第 3 回 Molecular Cardiovascular Conference 平成 24 年 9 月 7-9 北海道キ口口

Takahiro Horie, Osamu Baba, Koh Ono, Yasuhide Kuwabara, Naoya Sowa, Koji Hasegawa, Noriaki Kume, Masayuki Yokode, Toru Kita, Takeshi Kimura. MicroRNA-33 deficiency reduced atherosclerosis formation in vivo. European Society of Cardiology Congress 2012, 25 Aug 2012 - 29 Aug, Munich - Germany

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.

第 44 回 日本動脈硬化学会学術集会 平成 24 年 7 月 19 日 博多

Takahiro Horie, Osamu Baba, Koh Ono, Shin Watanabe, Hitoo Nishi, Minako Kinoshita, Yasuhide Kuwabara, Yoshimasa Chujo, Naoya Sowa, Koji Hasegawa, Noriaki Kume, Masayuki Yokode, Toru Kita, Takeshi Kimura. MicroRNA-33 deficiency reduced atherosclerosis formation in vivo.

平成 24 年度『転写代謝システム領域班会議 平成 24 年 7 月 2-4 日 筑波グラントホテル

堀江貴裕、馬場理、尾野亘、桑原康秀、曾和尚也、長谷川浩二、久米典昭、横出正之、北徹、木村剛 マイクロ RNA-33 欠損は動脈硬化形成を抑制する

第 49 回日本臨床分子医学会学術集会 平成 24 年 4 月 13 日、14 日 京都 みやこメッセ

堀江貴裕 マイクロ RNA-33 欠損は動脈

硬化形成を抑制する
第 109 回 日本内科学会講演会 平成
24 年 4 月 13-15 日 京都みやこメッセ
堀江貴裕、馬場理、尾野巨、渡邊真、西
仁勇、木下美菜子、桑原康秀、中條克真、
横出正之、木村剛 マイクロ RNA-33 は
動脈硬化形成を制御する

〔図書〕(計 1 件)

堀江貴裕 マイクロ RNA-33 の動脈硬化形成
における機能・役割について Asahi Medical
12月号 第42巻12号 p36-37

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔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

堀江 貴裕 (HORIE TAKAHIRO)

研究者番号：20565577

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：