

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461144

研究課題名(和文)イントロン性マイクロRNA-33a, -33bの脂質代謝制御機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the regulatory mechanism of lipid metabolism by intronic microRNA-33a, -33b

研究代表者

堀江 貴裕 (HORIE, TAKAHIRO)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：20565577

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：コレステロール代謝を制御する転写因子SREBP2のイントロンにmiR-33aが存在する。ヒトは、脂肪酸代謝を制御するSREBP1のイントロンにmiR-33aと相同性の高いmiR-33bが存在する。miR-33aの各臓器における生体における役割を解明するためにコンディショナルmiR-33a欠損マウスを作成した。繊維芽細胞においてmiR-33aを欠損させると心臓の線維化が抑制されることが明らかになった。miR-33bの役割を明らかにするため、ヒトmiR-33b配列をSREBP1のイントロンに挿入したマウスを作製した。このマウスはABCA1の発現低下を示し、血清中HDL-Cが35%の低下を示した。

研究成果の概要(英文)：miR-33a is located in the intron of SREBP2, which is a main transcriptional factor that regulates cholesterol homeostasis. On the other hand, miR-33b is located in the intron of SREBP1, which regulates fatty acid homeostasis in human. To elucidate the function of miR-33a in various organs or cells, we developed miR-33a conditional KO mice. When miR-33a was ablated in fibroblast cells, cardiac fibrosis was inhibited under pressure-overload condition via modulation of lipid rafts. To elucidate the function of miR-33b in vivo, we developed miR-33b knock-in mice, which have human miR-33b sequence in the same intron of SREBP1 as human. These mice showed reduced expression of ABCA1 and decreased levels of serum HDL-C. These results indicate that miR-33a/b have multiple functions in regulating lipid homeostasis.

研究分野：循環器内科学

キーワード：脂質代謝 マイクロRNA SREBP

1. 研究開始当初の背景

近年、内在性のマイクロ RNA (microRNA; miRNA; miR) とよばれる 20 塩基長程度の小さな RNA が遺伝子発現を精巧に調節し様々な生命現象に関与する事が明らかにされてきた。マイクロ RNA は塩基配列相補性を示すメッセンジャー RNA (mRNA) の 3' 非翻訳領域を標的とし、翻訳抑制あるいは分解を介してその発現を負に制御する。現在、ヒトでは約 2500 種類の miRNA が同定されており、発生や分化のみならず、癌や心血管代謝疾患などの病態形成に関与することが明らかにされつつある (*Nature* 2011、*Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012、Horie T, et al. *J Atheroscler Thromb.* 2014)。申請者らは、早期から心血管代謝疾患に関わるマイクロ RNA の機能解析を行ってきた。コレステロール代謝を制御する転写因子 SREBP2 のイントロンに miR-33 が種を超えて存在している。申請者らは miR-33 欠損マウスを作製し、SREBP2 と miR-33 が協調的にコレステロール輸送蛋白 ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) の発現を負に制御し、細胞内コレステロールのレベルを調節する事を明らかにした。実際、miR-33 欠損マウスでは組織中 ABCA1 発現の上昇と血中 HDL コレステロール (HDL-C) の上昇を認めた (Horie T et al. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010)。アポ E 欠損マウスにおいて miR-33 を欠損させると機能的な HDL-C の上昇およびマクロファージのコレステロール引き抜き能の改善の示し、動脈硬化形成を抑制した (Horie T et al. *J Am Heart Assoc.* 2012)。さらに miR-33 は肝臓においてコレステロール合成・脂肪酸合成を変化させ、原料となるアセチル CoA を振り分ける役目があることも明らかとした (Horie T et al. *Nature Commun.* 2013)。一方、ヒトにおいては脂肪酸代謝を制御する転写因子 SREBP1 のイントロンに miR-33(a) と相同性のある miR-33b が存在する (ヒトは miR-33 を miR-33a と表記)。

2. 研究の目的

上述のとおり、miR-33 は動脈硬化治療の標的となりうる。miR-33 制御をヒトへ臨床応用する場合、miR-33b の機能解析は不可欠である。しかしながら、げっ歯類には miR-33b が存在せず、マウスを用いた miR-33b の機能解析は難しい。miR-33 と SREBP2 が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、SREBP1 とそのイントロンに存在する miR-33b は協調的に何らかの作用を示すと考えられる。本研究では miR-33 の機能をより詳細に理解するためコンディショナル miR-33 欠損マウスを作製し、検討を行う。また、miR-33b ノックインマウスを作製し、イントロン性 miR-33b の機能解析に加え、ホスト遺伝子 SREBP1 との関係や SREBP2 とそのイントロン性 miR-33(a) との関係を包括的に解明する。これらの知見を新たな脂質異常改善薬・動脈硬化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 欠損マウスは組織中 ABCA1 上昇、血中 HDL-C 上昇、抗動脈硬化作用など様々な表現型を示すことが明らかとなった。また、miR-33 は肝臓においてコレステロール合成、脂肪酸合成を切り替えるスイッチとなるという新たな知見も見出した。本研究では以下の点に注目し miR-33a、miR-33b の機能をさらに詳細に解明する。

- (1) SREBP2 のイントロンに存在する miR-33(a) の各臓器における役割の解明
- (2) SREBP1 のイントロンに存在する miR-33b の脂質代謝における機能解析
- (3) SREBP1 のイントロンに存在する miR-33b の動脈硬化における役割の解明
- (4) miR-33a, miR-33b の生体における個々の機能解析 (そのホスト遺伝子である SREBP-2, -1 との相互作用を含めて)

4. 研究成果

- (1) SREBP2 のイントロンに存在する miR-33(a) の各臓器における役割の解明: miR-33(a) 欠損マウスは多彩な表現型を示した。miR-33(a) は全身の臓器に広範囲に発現している。各臓器における生体における役割を解明するため、コンディショナル miR-33(a) 欠損マウスの作製に成功した。線維芽細胞特異的な miR-33 欠損マウスは心臓圧負荷モデルにおいて、脂質ラフトの減少を介して、線維化が抑制されることがあきらかとなった (*Cir Res* 2017)。今後、各種 Cre マウスとの交配を勧め、miR-33(a) の各臓器における役割を明らかにしたい。
- (2) SREBP1 のイントロンに存在する miR-33b の脂質代謝における機能解析: 上述のとおり、ヒトには SREBP1 のイントロンに miR-33b が存在するが、げっ歯類には欠失している。そのため、生体における miR-33b の機能評価が困難である。この点を克服するためにヒト miR-33b 配列をマウスの SREBP1 の同一イントロンに挿入した miR-33b ノックインマウスの作製に成功した。この miR-33b ノックインマウスは miR-33b が SREBP1 と共に発現し、生理的な発現レベルを示した。このマウスにおいては、肝臓の ABCA1 の発現レベルが低下を示し、血中の HDL-C は約 35% の低下を示した (*Sci Rep* 2014)。これらの結果から、SREBP1 のイントロンに存在する miR-33b は血中の HDL-C 代謝を制御していることが示され、新たな治療標的となることが示唆された。また、げっ歯類はヒトに比べて HDL-C が高値であるが、miR-33b がいないことがその一因であると考えられた。
- (3) SREBP1 のイントロンに存在する miR-33b の動脈硬化における役割の解明:

miR-33b ノックインマウスとアポE 欠損マウスとの交配を行い、動脈硬化形成におけるmiR-33bの役割の解明を開始した。現在、動脈硬化の評価を行っているところである。

- (4) miR-33a, miR-33b の生体における個々の機能解析(その宿主遺伝子であるSREBP-2, -1 との相互作用を含めて): miR-33(a)欠損マウス, miR-33b ノックインマウスとの交配により、miR-33a/bの有無により4系統のマウスを樹立した。現在、個々の機能につき詳細に解明しているところである。

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 13 件)

- (1) Nishiga M, Horie T, Kuwabara Y, Nagao K, Baba O, Nakao T, Nishino T, Hakuno D, Nakashima Y, Nishi H, Nakazeki F, Ide Y, Koyama S, Kimura M, Hanada R, Nakamura T, Inada T, Hasegawa K, Conway SJ, Kita T, Kimura T, Ono K. MicroRNA-33 Controls Adaptive Fibrotic Response in the Remodeling Heart by Preserving Lipid Raft Cholesterol. *Circ Res*. 2017;120(5):835-847. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.309528.
- (2) Izuhara M, Kuwabara Y, Saito N, Yamamoto E, Hakuno D, Nakashima Y, Horie T, Baba O, Nishiga M, Nakao T, Nishino T, Nakazeki F, Ide Y, Kimura M, Kimura T, Ono K. Prevention of neointimal formation using miRNA-126-containing nanoparticle-conjugated stents in a rabbit model. *PLoS One*. 2017;12(3):e0172798. doi: 10.1371/journal.pone.0172798.
- (3) Koyama S, Kuraguchi T, Sato Y, Kuwabara Y, Usami S, Horie T, Baba O, Hakuno D, Nakashima Y, Nishino T, Nishiga M, Nakao T, Arai H, Kimura T, Ono K. Dynamic Changes of Serum MicroRNA-122-5p through Therapeutic Courses Indicates Amelioration of Acute Liver Injury Accompanied by Acute Cardiac Decompensation. *ESC Heart Fail*. 2017;4(2):112-121. doi: 10.1002/ehf2.12123.
- (4) Eso Y, Takai A, Matsumoto T, Inuzuka T, Horie T, Ono K, Uemoto S, Lee K, Edelmann W, Chiba T, Marusawa H. MSH2 dysregulation is triggered by proinflammatory cytokine stimulation and is associated with liver cancer development. *Cancer Res*. 2016;76(15):4383-93. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-2926.
- (5) Horie T, Kimura T, Ono K. Emerging Novel Biomarkers for Arteriosclerosis Obliterans. *J Atheroscler Thromb*. 2016;23(2):171-2. doi: 10.5551/jat.ED028.
- (6) Miyamoto S, Usami S, Kuwabara Y, Horie T, Baba O, Hakuno D, Nakashima Y, Nishiga M, Izuhara M, Nakao T, Nishino T, Ide Y, Nakazeki F, Wang J, Ueyama K, Kimura T, Ono K. Expression Patterns of miRNA-423-5p in the Serum and Pericardial Fluid in Patients Undergoing Cardiac Surgery. *PLoS One*. 2015;10(11):e0142904. doi: 10.1371/journal.pone.0142904.
- (7) Kim J, Yoon H, Horie T, Burchett JM, Restivo JL, Rotllan N, Ramirez CM, Verghese PB, Ihara M, Hoe HS, Esau C, Fernández-Hernando C, Holtzman DM, Cirrito JR, Ono K, Kim J. microRNA-33 Regulates ApoE Lipidation and Amyloid- Metabolism in the Brain. *J Neurosci*. 2015;35(44):14717-26. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2053-15.2015.

- (8) Izuhara M, Ono K, Shiomi H, Morimoto T, Furukawa Y, Nakagawa Y, Shizuta S, Tada T, Tazaki J, Horie T, Kuwabara Y, Baba O, Nishino T, Kita T, Kimura T; CREDO-Kyoto PCI/CABG Registry Cohort-2 Investigators. High-density lipoprotein cholesterol levels and cardiovascular outcomes in Japanese patients after percutaneous coronary intervention: a report from the CREDO-Kyoto registry cohort-2. *Atherosclerosis*. 2015;242(2):632-8. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2015.05.010.
- (9) Kuwabara Y, Horie T, Baba O, Watanabe S, Nishiga M, Usami S, Izuhara M, Nakao T, Nishino T, Otsu K, Kita T, Kimura T, Ono K. MicroRNA-451 exacerbates lipotoxicity in cardiac myocytes and high-fat diet-induced cardiac hypertrophy in mice through suppression of the LKB1/AMPK pathway. *Circ Res*. 2015;116(2):279-88. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.304707.
- (10) Ono K, Horie T, Nishino T, Baba O, Kuwabara Y, Yokode M, Kita T, Kimura T. MicroRNA-33a/b in lipid metabolism - novel "thrifty" models. *Circ J*. 2015;79(2):278-84. doi: 10.1253/circj.CJ-14-1252.
- (11) Ono K, Horie T, Nishino T, Baba O, Kuwabara Y, Kimura T. MicroRNAs and High-Density Lipoprotein Cholesterol Metabolism. *Int Heart J*. 2015;56(4):365-71. doi: 10.1536/ihj.15-019.
- (12) Horie T, Nishino T, Baba O, Kuwabara Y, Nakao T, Nishiga M, Usami S, Izuhara M, Nakazeki F, Ide Y, Koyama S, Sowa N, Yahagi N, Shimano H, Nakamura T, Hasegawa K, Kume N, Yokode M, Kita T, Kimura T, Ono K. MicroRNA-33b knock-in mice for an intron of sterol regulatory element-binding factor 1 (*Srebf1*) exhibit reduced HDL-C in vivo. *Sci Rep*. 2014;4:5312. doi: 10.1038/srep05312.
- (13) Watanabe S, Horie T, Nagao K, Kuwabara Y, Baba O, Nishi H, Sowa N, Narazaki M, Matsuda T, Takemura G, Wada H, Hasegawa K, Kimura T, Ono K. Cardiac-specific inhibition of kinase activity in calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase- leads to accelerated left ventricular remodeling and heart failure after transverse aortic constriction in mice. *PLoS One*. 2014;9(9):e108201. doi: 10.1371/journal.pone.0108201.

〔学会発表〕(計 15 件)

平成 28 年度

第 48 回 日本動脈硬化学会総会・学術集会

平成 28 年 7 月 14-15 日 東京

堀江貴裕 マイクロ RNA による HDL 代謝制御 (シンポジウム 4 HDL の機能評価と HDL を標的とした薬剤開発の将来展望)

平成 27 年度

Basic Cardiovascular Sciences Scientific Sessions 2015, 2015 年 7 月 13-16 日, New Orleans, LA

Takahiro Horie, Tomohiro Nishino, Yasuhide Kuwabara, Osamu Baba, Takeshi Kimura, Koh Ono: Serum HDL-C decreases in microRNA-33b knock-in mice for an intron of sterol regulatory element-binding factor 1 (*Srebf1*).

American Heart Association Scientific Sessions 2015, 2015 年 11 月 7-11 日, Orlando,

FL

Horie T, Nishino T, Baba O, Kuwabara Y, Nakao T, Nishiga M, Usami S, Izuhara M, Nakazeki F, Ide Y, Koyama S, Sowa N, Nakashima Y, Hakuno D, Kimura T, Ono K. Serum HDL cholesterol decreases in microRNA-33b knock-in mice for an intron of sterol regulatory element-binding factor1 (Srebf1)

第 1 回国際心血管薬物療法学会日本部会、平成 27 年 6 月 20-21 日、京都

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、中関典子、井手裕也、小山智史、曾和尚也、矢作直也、島野仁、横出正之、北徹、木村剛、尾野亘：Srebp1 のイントロンに存在する microRNA-33b は HDL コレステロールを減少させる（研究奨励最優秀賞（基礎部門））

第 47 回日本動脈硬化化学会総会・学術集会、平成 27 年 7 月 9-10 日、仙台

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、中関典子、井手裕也、小山智史、曾和尚也、矢作直也、島野仁、横出正之、北徹、木村剛、尾野亘：Srebf1 のイントロンに microRNA-33b をノックインしたマウスは HDL コレステロールの減少を示す（優秀ポスター賞）

第 23 回日本血管生物医学会学術集会 (CVMM2015) 平成 27 年 12 月 10-12 日、神戸

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、中関典子、井手裕也、小山智史、曾和尚也、矢作直也、島野仁、横出正之、北徹、木村剛、尾野亘：Srebp1 のイントロンに存在する microRNA-33b は HDL コレステロールを減少させる（Young Investigators Awards 優秀賞）

第 45 回日本心臓血管作動物質学会 平成 28 年 2 月 6 日、徳島

堀江貴裕 マイクロ RNA-33 を介した新たな脂質代謝制御機構の解明（シンポジウム）

平成 26 年度

The 18th International Vascular Biology Meeting (IVBM), 2014 年 4 月 14-17 日, Japan Kyoto

Takahiro Horie, Tomohiro Nishino, Osamu Baba, Yasuhide Kuwabara, Tetsushi Nakao, Masataka Nishiga, Shunsuke Usami, Masayasu Izuhara, Naoya Sowa, Naoya Yahagi, Hitoshi Shimano, Koji Hasegawa, Noriaki Kume, 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.

European Society of Cardiology Congress 2014, 2014 年 8 月 30 日-9 月 3 日, Spain Barcelona

Takahiro Horie, Tomohiro Nishino, Osamu Baba, Yasuhide Kuwabara, Tetsushi Nakao, Masataka Nishiga, Shunsuke Usami, Masayasu Izuhara, Naoya Sowa, Takeshi Kimura, and Koh Ono: MicroRNA-33 deficiency leads to high fat diet- induced obesity and insulin resistance in vivo.

9th Metabolic Syndrome, Type 2 Diabetes and Atherosclerosis Congress (MSDA), 2014 年 9 月 12-14 日, Japan Kyoto

Takahiro Horie, Tomohiro, Nishino, Osamu Baba, Yasuhide Kuwabara, Tetsushi Nakao, Masataka Nishiga, Shunsuke Usami, Masayasu Izuhara, Takeshi Kimura, Koh Ono: Serum HDL-C decreases in microRNA-33b knock-in mice for an intron of sterol regulatory element-binding factor (Srebf1). (Poster Award)

American Heart Association 2014 Scientific Sessions, 2014 年 11 月 15-19 日, USA Chicago

Takahiro Horie, Tomohiro Nishino, Osamu Baba, Yasuhide Kuwabara, Tetsushi Nakao,

Masataka Nishiga, Shunsuke Usami, Masayasu Izuhara, Fumiko Nakazeki, Yuya Ide, Satoshi Koyama, Masayuki Yokode, Takeshi Kimura, and Koh Ono: MicroRNA-33b Knock-in Mice for an Intron of Sterol Regulatory Element-Binding Factor 1 (Srebf1) Exhibit Reduced HDL-C in vivo.

第 51 回日本臨床分子医学会, 平成 26 年 4 月 11-12 日, 東京

堀江貴裕、西野共達、馬場理、桑原康秀、矢作直也、島野仁、横出正之、北徹、木村剛、尾野亘: 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。(学術奨励賞)

第 46 回日本動脈硬化学会総会・学術集会, 平成 26 年 7 月 10-11 日, 東京

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、尾野亘: マイクロ RNA-33 による脂質代謝制御機構の解明 (Young Faculty Initiative Session 新たなパラダイムへの挑戦)

第 37 回日本分子生物学会年会, 平成 26 年 11 月 25-27 日, 横浜

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、井手裕也、中関典子、小山智史、曾和尚也、木村剛、尾野亘: *Srebf1* のイントロンに microRNA-33b をノックインしたマウスは HDL コレステロールの減少を示す。

第 50 回高血圧モデル学会学術総会, 平成 26 年 12 月 5-6 日, 和歌山

堀江貴裕: 心血管代謝疾患形成に関与するマイクロ RNA の機能解析 (岡本研究奨励賞)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 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 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)
京都大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号: 20565577
(2) 研究分担者
(3) 連携研究者
(4) 研究協力者