

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670383

研究課題名(和文)マイクロRNAの局所徐放システムの構築と生体応用

研究課題名(英文)Development of local microRNA delivery system and in vivo application

研究代表者

尾野 亘(ONO, KOH)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：00359275

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文):近年、冠動脈疾患治療には薬剤溶出性ステントが用いられている。しかし、この薬剤は血管内皮細胞を障害するため、血栓症などの発症が問題となっている。我々は、血管内皮細胞を誘導する作用のあるマイクロRNA(miR)-126に着目し研究を開始した。まず、miR-126を発現させるための2本鎖合成RNAを設計した。この2本鎖合成RNAを乳酸・グリコール酸共重合体(PLGA)ナノ粒子に含有させ、ステントに電氣的に均一にコーティングし、局所で徐放化できるステントを開発した。ウサギの腸骨動脈においてmiR-126搭載ステントがコントロールRNAと比較して、有意に再狭窄予防効果を持つことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文):Recently, drug eluting stent (DES) is mainly used for the treatment of coronary artery diseases. However, the drug can inhibit the growth of endothelial cells, which causes thrombosis or chronic inflammation. Therefore, the ideal treatment is to regenerate the endothelial cells and inhibit the growth of smooth muscle cells. We utilized miR-126 which can induce the regeneration of endothelial cells and inhibit inflammation for this experiment. We generated cholesterol conjugated double strand synthetic RNAs which can overexpress mature miR-126 locally without any vectors. We loaded these double strand RNAs into poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) nano-particles and coated the stent with these PLGA nano-particles. We evaluated the effect of this stent in rabbit model of vascular injury. miR-126-eluting stent could significantly inhibit the restenosis of iliac artery after vascular injury compared with control RNA-eluting stent.

研究分野：循環器内科学

キーワード：マイクロRNA ステント ナノ粒子 動脈硬化

1. 研究開始当初の背景

冠動脈疾患治療においては、薬剤溶出性ステント(drug eluting stent; DES)の登場により、早期の再狭窄率が劇的に改善した。しかし、DES 留置後一年以降に生じる超遅発性ステント血栓症(very late stent thrombosis; VLST)と、遠隔期再狭窄である‘late catch-up’現象が、重大な問題として残されている。最近になり、ステント治療後の neoatherosclerosis がこれらの共通の根本病態として注目を集めており、ステントによる内皮細胞障害・コレステロール浸潤が引き金になっていると指摘されている。そこで、今回我々は、血管内皮細胞を誘導・増殖する作用のある microRNA(miRNA; miR)-126 をステントから徐放化するシステムを開発する。この方法により、複数の miRNA の徐放化も可能で、癌などの他の疾患への応用も十分に考えられ、幅広い研究展開が可能となる。

2. 研究の目的

今回、ステント治療後の再内皮化を促進するために、血管内皮細胞特異的に発現し、血管内皮細胞増殖効果・抗炎症作用を持つ miR-126 による治療法開発について検討を開始した。miRNA は複数の標的遺伝子の抑制作用をもち、その投与により大きな効果が期待されるが、全身投与では大きな副作用が生じると考えられる。そこで安全かつ効率的な局所への drug delivery system(DDS)の構築が欠かせないが、現在のところ、その検討は不十分である。我々の目標は

細胞内に効率的に取り込まれ、目的 miRNA が生成される 2 本鎖合成 RNA の設計

2 本鎖合成 RNA をステントから局所に徐放化させるシステムの構築

生体における有用性の検討(治療効果の確認)

である。今後、このシステムにより、複数の miRNA の徐放化も可能であるため、幅広い研究展開が可能となると考えられる。

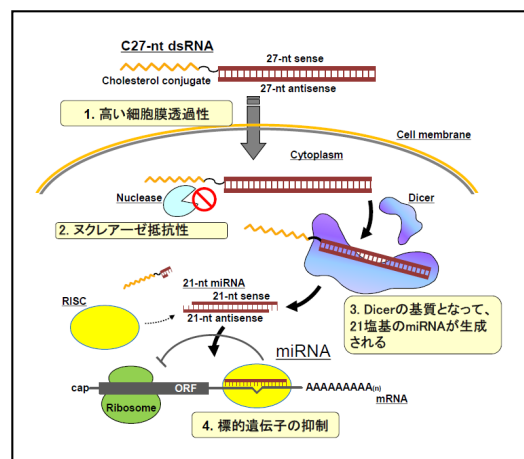
3. 研究の方法

本研究の目標は、細胞内に効率的に取り込まれ、目的 miRNA が生成される 2 本鎖合成 RNA を設計し、2 本鎖合成 RNA をステントから局所に徐放化させるシステムを構築した上で、生体において治療効果を確認することである。すでに我々の合成した 2 本鎖 RNA が機能を発揮することはヒト臍帯静脈血管内皮細胞を用いた実験で確認済みである。早期の臨床応用を視野に、ウイルスなどのベクターを使用せず、miR-126 を局所で安全に過剰発現させるため、合成 RNA を乳酸・グリコール酸共重合体 (PLGA) ナノ粒子を用いて、1 か月程度の期間をかけてステントから徐放させる予定である。ウサギ腸骨動脈擦過モデルにおいて合成 RNA の徐放化効果およびこの

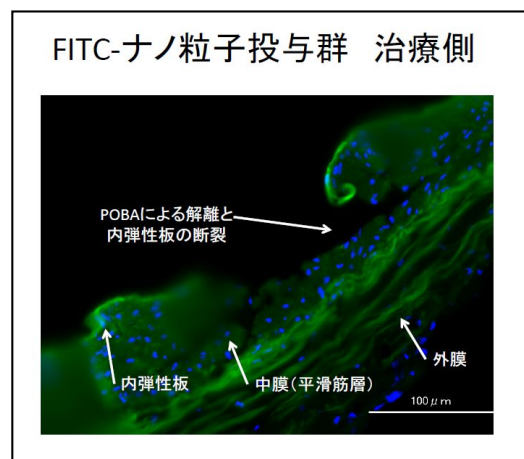
ステントによる治療効果を確認する。

4. 研究成果

早期の臨床応用を視野に、ウイルスなどのベクターを使用せず、miR-126 を局所で発現させるための 2 本鎖合成 RNA を設計した。非特異的炎症を抑制するために両端に塩基を付加し、27 塩基の 2 本鎖 RNA とした。また、2 本鎖 RNA のセンス鎖に細胞膜への透過性を上昇させるためにコレステロールを結合させ、アンチセンス鎖(成熟 miR-126 となる)は分解を受けにくいように、ホスホロチオエート化した(下図)。この結果、安定的に miR-126 を細胞内で発現させることが可能となった。

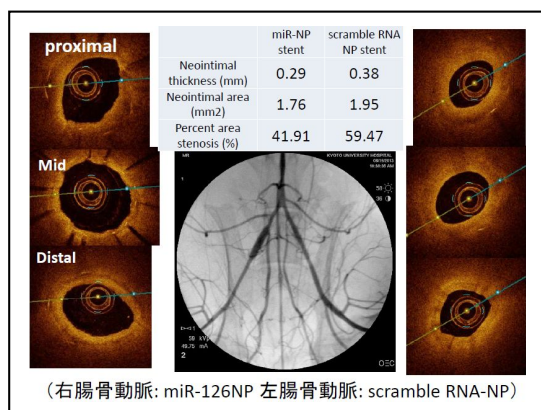


さらに、PLGA ナノ粒子に FITC を入れ、局所に放出したところ、下図のように、組織内に安定的に FITC が移行することを確認した。



研究の最終的な目標を達成するために、ブタ冠動脈での miR-126 を PLGA ナノ粒子に封入し、ステントに電着し、miR-126 徐放化ステントを作成した。miR-126 封入ナノ粒子積層ステントおよびコントロール RNA 封入ナノ粒子積層ステントを、それぞれ左右のウサギ腸骨動脈に留置した。4 週間後、血管造影および光コヒーレンストモグラフィー

(OCT)を用いて評価したところ、miR-126搭載ステントにおいて、コントロールRNAと比較して、有意に再狭窄予防効果を認めた(図)。



実際に局所での血管内皮細胞の再生および、平滑筋細胞の増殖抑制を認めた。この結果により平成26年3月7日「マイクロRNA溶出型ステント及びそれを用いた管腔治療」として特許を出願した(特願2014-044463)。さらに平成27年3月6日にはPCT出願を行った(PCT/JP2015/056749)。

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9件)

1: 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.

2: 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

3: 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.

4: Ono K; Seeing is believing - imaging of a plaque in the renal artery. J Cardiol Cases 2013 in press

5: Yamamoto E, Natsuaki M, Morimoto T, Furukawa Y, Nakagawa Y, Ono K, Mitsudo K, Nobuyoshi M, Doi O, Tamura T, Tanaka M, Kimura T; CREDO-Kyoto PCI/CABG Registry Cohort-2 Investigators. Long-Term Outcomes After Percutaneous Coronary Intervention for Chronic Total Occlusion (from the CREDO-Kyoto Registry Cohort-2). Am J Cardiol. 2013;112:767-74.

6: Takanabe-Mori R, Ono K, Wada H, Takaya T, Ura S, Yamakage H, Satoh-Asahara N, Shimatsu A, Takahashi Y, Fujita M, Fujita Y, Sawamura T, Hasegawa K. Lectin-Like Oxidized Low-Density Lipoprotein Receptor-1 Plays an Important Role in Vascular Inflammation in Current Smokers. J Atheroscler Thromb. 2013;20:585-90.

7: 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.

8: 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.

9: Tokushige A, Shiomi H, Morimoto T, Ono K, Furukawa Y, Nakagawa Y, Kadota K, Iwabuchi M, Shizuta S, Tada T, Tazaki J, Kato Y, Hayano M, Abe M, Hamasaki S, Tei C, Nakashima H, Mitsudo K, Nobuyoshi M, Kita T, Kimura T. Influence of initial acute myocardial infarction presentation on the outcome of surgical procedures after coronary stent implantation: a report from the CREDO-Kyoto PCI/CABG Registry Cohort-2. *Cardiovasc Interv Ther.* 2013 ;28:45-55.

[学会発表](計 30 件)

1.国際学会

The 18th International Vascular Biology Meeting, 2014 April 14th, 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 14th, Kyoto

Baba O, Horie T, 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 atherosclerotic plaque progression in apoE knockout mice.

European Society of Cardiology Congress 2014, 30 Aug 2014 - 4 Sep., Barcelona - Spain

1) Horie T, Nishino T, Baba O, Kuwabara Y,

Nakano T, Nishiga M, Usami S, Izuhara M, Kimura T, Ono K. MicroRNA-33 deficiency leads to high fat diet- induced obesity and insulin resistance in vivo.

2) Nishino T, Horie T, Baba O, Kuwabara Y, Yokode M, Kita T, Kimura T, Ono K. MicroRNA-33, embedded in Srebf2 intron, regulate fatty acid synthesis through targeting SREBP-1 in vivo.

9th Metabolic Syndrome, Type 2 Diabetes and Atherosclerosis Congress September 12-14, Kyoto, Japan

1) Horie T, Nishino T, Baba O, Kuwabara Y, Nakano T, Nishiga M, Usami S, Izuhara M, Kimura T, Ono K. Serum HDL-C decreases in microRNA-33b knock-in mice for an intron of sterol regulatory element-binding factor 1 (Srebf1).

2) Baba O, Horie T, Ono K, Kuwabara Y, Sowa N, Hasegawa K, Kume N, Yokode M, Kita T, Kimura T. MicroRNA-33 deficiency reduces atherosclerotic plaque progression in apoE knockout mice.

3) Kuwabara Y, Horie T, Baba O, Nishiga M, Usami S, Izuhara M, Nakao T, Nishino T, Kita T, Kimura T, Ono K. MicroRNA-451 is involved in diabetic cardiomyopathy through suppression of the LKB1/AMPK pathway.

4) Nishino T, Horie T, Baba O, Kuwabara Y, Yokode M, Kita T, Kimura T, Ono K. MicroRNA-33, embedded in Srebf2 intron, regulate fatty acid synthesis through targeting SREBP-1 in vivo.

The 8th Otsuka Asia Atherosclerosis Conference
Oct 11th-12th, 2014 Shanghai

Current Topics in HDL-C

~Novel regulation by microRNA-33 and implications for future therapeutic strategies~

Ono K.

American Heart Association Annual Scientific Sessions 2014, November 15-19, Chicago, Illinois

- 1) Nishino T, Horie T, Baba O, Kuwabara Y, Nakao T, Nishiga M, Usami S, Izuhara M, Ide Y, Nakazeki F, Koyama S, Yokode M, Kita T, Kimura T, Ono K. MicroRNA-33, Located Within Srebf2 Intron, Regulate Fatty Acid Synthesis via Targeting SREBP-1 in vivo
- 2) Horie T, Nishino T, Baba O, Kuwabara Y, Nakao T, Nishiga M, Usami S, Izuhara M, Ide Y, Nakazeki F, Koyama S, 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
- 3) Wada H, Satoh-Asahara N, Akao M, Abe M, Ono K., Morimoto M, Shimatsu A, Takahashi Y, Hasegawa K. Self-rating Depression Scale Score as an Inverse and Independent Predictor of Successful Smoking Cessation with a Pharmacological Treatment for Nicotine Addiction

2.国内学会

平成 26 年 4 月 11 日 第 51 回日本臨床分子医学会学術集会 YIA-3 堀江貴裕 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 日本臨床分子医学会奨励賞 (YIA) 受賞、東京

平成 26 年 4 月 11 日 第 51 回日本臨床分子医学会学術集会 桑原康秀 microRNA-451 は LKB1-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

食誘導性心肥大を誘導する、東京

平成 26 年 4 月 11 日 第 51 回日本臨床分子医学会学術集会 馬場 理 アポ E 欠損マウスにおいてマイクロ RNA-33 欠損は動脈硬化進展を抑制する、東京

平成 26 年 5 月 10 日第 1 回 Research Planet 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。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 東京

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

Featured Session : 最先端の病態研究 「microRNA-33 の動脈硬化・脂質制御における役割」 尾野 亘

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

第 9 回五島雄一郎賞受賞講演 「High impact of microRNA-33 on atherosclerosis and lipid metabolism」 尾野 亘

平成 26 年 7 月 12 日 転写代謝システム班会議 仙台

1)「脂質代謝を起点としたマイクロ RNA、転写因子の相互作用の解明」 尾野 亘

2)「マイクロ RNA の骨髄機能および慢性炎症における役割」馬場 理、堀江貴裕、桑原康秀、木村 剛、尾野 亘

3)「microRNA-33 は生体内で SREBP-1 を介して脂肪酸合成を制御する」西野共達、堀江貴裕、尾野 亘

平成 26 年 8 月 10 日 第 1 回 iHF フォーラム 「microRNA-33b knock-in mice for an intron of sterol regulatory element-binding factor 1

(Srebf1) exhibit reduced HDL-C in vivo」尾野 亘、堀江貴裕、西野共達、北徹、木村剛

平成 26 年 9 月 5-6 日 第 5 回 Molecular Cardiovascular Conference 神戸ベイシェラトンホテル&タワーズ

- 1) microRNA-33b knock-in mice for an intron of sterol regulatory element-binding factor 1 (Srebf1) exhibit reduced HDL-C in vivo. 尾野 亘、堀江貴裕、西野共達、北 徹、木村 剛
- 2) 飽和脂肪酸により誘導される microRNA-451 は、糖尿病性心筋症の増悪因子である。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、井手裕也、中関典子、小山智史、木村 剛、尾野 亘

2015 年 2 月 6-7 日 新学術領域研究 転写代謝システム 新学術領域若手ワークショップ 群馬県伊香保

- 1) 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 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
- 2) 心肥大・心不全における lincRNA の機能解析 桑原康秀、堀江貴裕、中島康弘、伯野大彦、馬場 理、出原正康、宇佐美俊輔、西賀雅隆、西野共達、中尾哲史、井手裕也、中関典子、小山智史、北 徹、木村 剛、尾野 亘
- 3) miR-33 ノックアウトマウスにおける大動脈瘤についての検討 中尾哲史、堀江貴裕、馬場 理、西賀雅隆、西野共達、宇佐美俊輔、桑原康秀、出原正康、中関典子、井手裕也、小山智史、曾和尚也、大野聡子、青木浩樹、木村 剛、尾野 亘
- 4) microRNA-33b promotes atherosclerotic

plaque formation in vivo 西野共達、堀江貴裕、馬場 理、桑原康秀、尾野 亘

- 5) マイクロ RNA-33 の骨髄機能および慢性炎症における役割 馬場理、堀江貴裕、伯野大彦、中島康弘、桑原康秀、中尾哲史、出原正康、宇佐美俊輔、西賀雅隆、西野共達、井手裕也、中関典子、小山智史、木村 剛、尾野 亘

2015 年 2 月 7 日 第 44 回日本心脈管作動物質学会 シンポジウム 2 高松 高血圧における臓器関連 「miR-33a/b による細胞・臓器レベルの脂質代謝制御機構」 尾野 亘

〔図書〕(計 1 件)
尾野 亘 「代謝と循環器疾患に関わる microRNA」 Annual Review 循環器 2014 中外医学社 pp35-41

〔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：尾野 亘、斉藤成達、出原正康、木村 剛
種類：PCT 出願
番号：PCT/JP2015/056749
出願年月日：2015/03/06
国内外の別：国際

〔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・医学研究科・准教授
研究者番号：00359275