

平成 30 年 6 月 26 日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H06900

研究課題名(和文)心不全の慢性炎症・線維化におけるmicroRNA-33の役割の検討

研究課題名(英文)Elucidating the role of microRNA-33 in chronic inflammation, fibrosis, and heart failure

研究代表者

西賀 雅隆(Nishiga, Masataka)

京都大学・医学研究科・医員

研究者番号：00782393

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：タンパクに翻訳されないマイクロRNA (microRNA; miR)は、主に20-24塩基の短いRNAであり、他の遺伝子の発現を調節している。我々の注目するmiR-33は善玉コレステロールであるHDL-Cを低下させ、動脈硬化に関わることがこれまでに分かっており、動脈硬化治療の標的となる可能性がある。今回、このmiR-33が心不全においても役割を果たしていることが明らかとなった。圧負荷マウスモデルを用いて調べたところ、心臓においてはmiR-33は心筋細胞よりも線維芽細胞で優位に働いており、心臓線維化に関わっていた。結果は、動脈硬化と心不全の共通した病態の機序の解明や治療法の開発に繋がるものである。

研究成果の概要(英文)：MicroRNAs are small non-protein-coding RNAs (20-24 bp) that bind to specific mRNAs and inhibit translation or promote mRNA degradation. We have been focusing on miR-33 which decreases HDL-C and promotes atherosclerosis, and it is a potential therapeutic target against atherosclerosis. In this study, we clarified that miR-33 is also involved in heart failure. We used pressure-overload mouse model and found that miR-33 has roles dominantly in cardiac fibroblasts and is involved in cardiac fibrosis. The results show that atherosclerosis and heart failure share mechanisms that can be novel therapeutic targets.

研究分野：循環器内科学

キーワード：心不全 線維化 動脈硬化 microRNA

1. 研究開始当初の背景

近年、循環器臨床においては急性心筋梗塞に対するカテーテル治療等の急性期治療が発展し、心筋梗塞による直接の死亡が減少しているが、その結果として慢性期に心不全を発症する患者が増加している。代償期から非代償期に以降する心不全の病態解明および新規治療法の開発が重要である。

心不全では、心筋細胞と線維芽細胞・炎症細胞等が相互に関連し、炎症とそれに伴う線維化が生じており、この慢性炎症が近年注目されている。特に、線維化のプロセスに関しては未解明な部分が多い。一方で、我々の注目している microRNA-33(miR-33)はコレステロール維持に働き、動脈硬化促進作用があるため治療の標的として臨床応用の可能性がある(図1)。miR-33が標的とする遺伝子は細胞内・細胞膜コレステロール管理に重要で、炎症と深く関わっている。そこで、心臓においても心不全・線維化との関わりを検討することで、新たな治療法につながる可能性がある。

2. 研究の目的

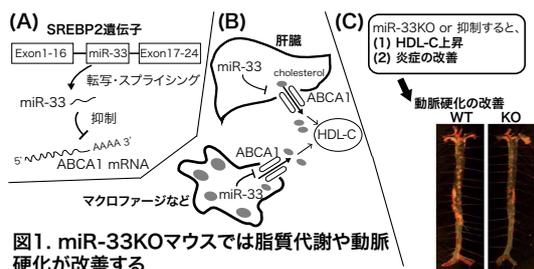


図1. miR-33KOマウスでは脂質代謝や動脈硬化が改善する  
 (A) miR-33はSREBP2のintronから転写されABCA1を標的とする  
 (B) miR-33はABCA1を介して、HDL-C生成を抑制している  
 (C) miR-33KOマウスは動脈硬化に抵抗性

miR-33 欠損マウスは HDL-C が野生型と比較して上昇し、動脈硬化モデルでは動脈硬化に抵抗性である。この miR-33 欠損マウスを用いて心不全モデルでの検討を行ったところ、野生型と比較して心室線維化が軽減されることをすでに確認した(図3)。miR-33を抑制することが、心不全および臓器線維化を軽減する可能性が考えられる。この機序を解明することで、線維化に関する新たな知見を得ること、miR-33 抑制治療の臨床応用を目指すことを目的とした。

3. 研究の方法

miR-33 欠損マウスにおいて圧負荷心不全モデルでは線維化が軽減されることを確認済みであるが、このことが心機能を改善させるのかを調べる。線維芽細胞がこの過程に重要と考えられるため、次に、心臓線維芽細胞特異的に miR-33 を欠損したマウスを用いて、同様に、病理組織・遺伝子発現等の解析を行う。培養細胞を用いる実験では、miR-33 欠損細胞の増殖能を評価する。miR-33 の細胞内コ

レステロール維持機能との関連 (lipid raft の変化など) を解析し、この過程に重要なシグナル伝達経路を同定する。さらに、臨床サンプルを用いて、ヒトでも応用できる機序であることを確認する予定である。

4. 研究成果

心不全患者からの心筋生検サンプルを用いて、miR-33 の発現量を計測した。その結果、心不全の進行しているサンプルほど、miR-33 の発現が低下していることが判明した(図2)。

miR-33 欠損マウスの圧負荷心不全モデルでは、線維化が軽減された(図3-1、3-2)。一方で、心機能を心エコーを経時的に評価したところ、線維化が軽減するにも関わらず、慢性期に心機能が低下することが分かった。

ペリオスチンプロモータ下に Cre リコンビナーゼを発現する Pn-Cre と miR-33flox マウスをかけ合わせ、心臓線維芽細胞特異的 miR-33 ノックアウトマウスを作成した。結果、この線維芽細胞特異的 miR-33 ノックアウトマウスでも全身ノックアウトマウスと同様に、線維化が軽減する傾向が得られた。

miR-33 欠損線維芽細胞を培養したところ、増殖能の低下がみられた(図4-1、4-2)。またコレラ毒素にて標識される lipid raft のシグナルが減少していた。このことは、miR-33 欠損による細胞内および細胞膜コレステロールの低下が、この表現型を引き起こしていることを示唆している(図5)。

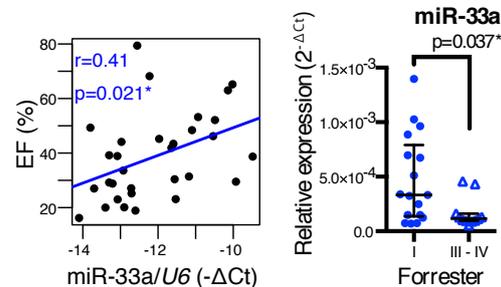


図2. 心不全患者でのmiR-33発現量  
 心不全が重症な患者ほどmiR-33aの発現が低い

(Circ Res. 2017;120(5):835-47 より)

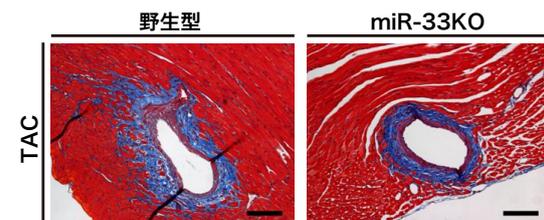


図3-1. miR-33KO マウスは圧負荷 (TAC) による線維化が抑制されている

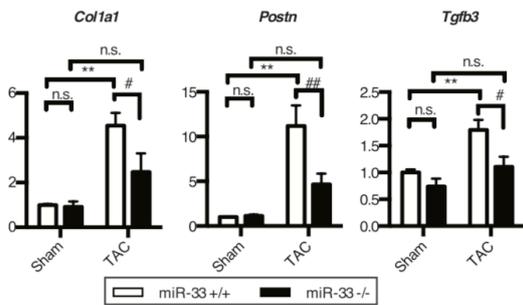


図 3-2. miR-33KO マウスでは TAC による線維化関連遺伝子上昇が抑制されている

(Circ Res. 2017;120(5):835-47 より)

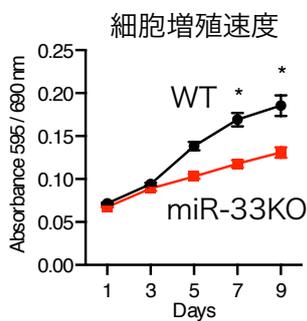


図 4-1. miR-33 と細胞増殖  
miR-33KO 線維芽細胞は細胞増殖が遅い

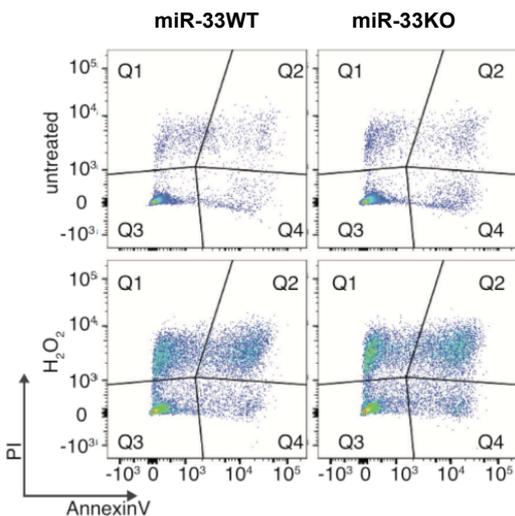


図 4-2. miR-33 とアポトーシス  
miR-33KO 線維芽細胞はアポトーシスしやすい

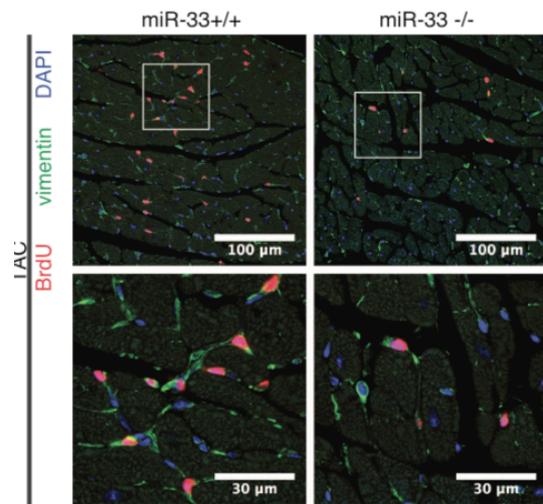


図 4-3. in vivo での細胞増殖 (TAC 後に BrdU 投与)

(Circ Res. 2017;120(5):835-47 より)

これらの結果から、動脈硬化を促進する miR-33 は心臓の線維芽細胞の増殖にも関わっており、心不全においては、線維化を促進するということがわかった。この miR-33 は既に動脈硬化治療薬の標的になりうると考えられており、臨床応用へ向けて研究が進められてきた。この miR-33 が心不全にも関わっていることが示された点で重要な結果と考えられる。

しかし一方で、興味深いことに、miR-33 欠損マウスでは、圧負荷刺激後の心臓線維化が軽減したにも関わらず、遠隔期に心機能 (主に EF) がむしろ低下した (図 6)。このことは、miR-33 が促進している心臓線維化あるいは線維芽細胞の増殖は、心不全時の代償反応として保護的に働いている可能性も示唆している。

近年、臓器線維化は心臓に限らず、様々な臓器で注目されてきている。疾患の終末像としての臓器線維化だけでなく、ストレスへの応答に必要な線維化を示す結果でもあり、線維化の病態解明という意味においても重要な結果であると考えられる (図 5)。

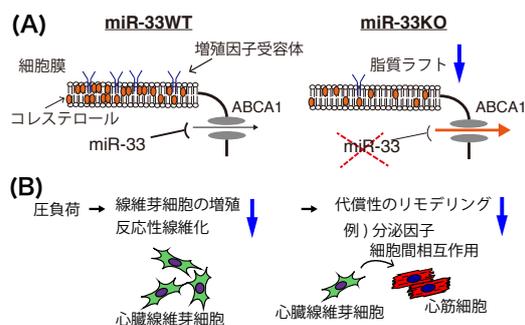


図 5. miR-33 による脂質ラフトの維持

(A) miR-33KO 細胞では ABCA1 の亢進により脂質ラフトが減少する  
(B) miR-33KO 線維芽細胞は圧負荷による活性化が抑制されている

(Circ Res. 2017;120(5):835-47 より)

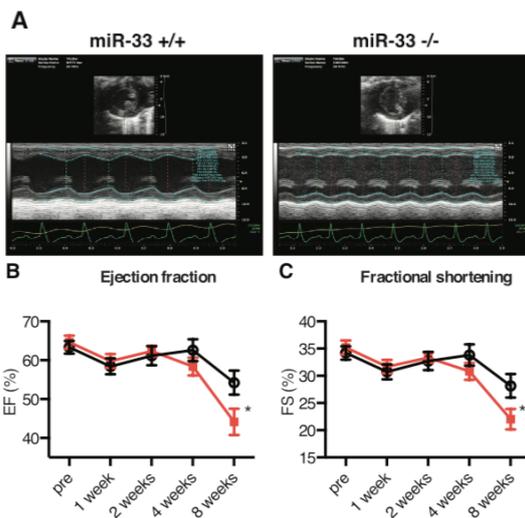


図 6. miR-33KO マウスの心機能評価

TAC 後 2 ヶ月では miR-33KO マウスのほうが野生型 (WT) よりも EF が悪化する

## 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 1 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):835-47

[学会発表] (計 7 件)

1. 第 53 回日本臨床分子医学会学術集会 平成 28 年 4 月 15 日~16 日 東京  
西賀雅隆、堀江貴裕、桑原康秀、馬場理、伯野大彦、中島康弘、中尾哲史、西野共達、長谷川浩二、北徹、木村剛、尾野亘. マイクロ RNA-33 は細胞内の脂質恒常性を維持することで心臓線維化を促進する
2. 第 20 回日本心不全学会学術集会 平成 28 年 10 月 7 日~9 日 札幌  
西賀雅隆、堀江貴裕、桑原康秀、木村剛、尾野亘. MicroRNA-33 は細胞内脂質の維持を介して心臓線維化を促進する. MicroRNA-33 promotes cardiac fibrosis through maintaining cellular lipid contents.
3. 第 39 回日本分子生物学会年会 平成 28 年 11 月 30 日~12 月 2 日 横浜  
西賀雅隆、堀江貴裕、桑原康秀、長中央和也、中尾哲史、西野共達、中関典子、井手裕也、小山智史、北徹、木村剛、尾野亘. MicroRNA-33 は脂質ラフト維持を介して心臓線維化を促進する
4. 第 20 回日本心血管内分泌代謝学会学術総会 平成 28 年 12 月 16 日~17 日 東京  
西賀雅隆、堀江貴裕、桑原康秀、長中央和也、中尾哲史、西野共達、長谷川浩二、北徹、木村剛、尾野亘. MicroRNA-33 は脂質ラフトの維持を介して代償性の心臓線維化を促進する
5. BCVS 2016 Scientific Sessions, July 18-21, 2016, Phoenix, AZ

**Masataka Nishiga**, Takahiro Horie, Yasuhide Kuwabara, Osamu Baba, Tetsushi Nakao, Tomohiro Nishino, Daihiko Hakuno, Yasuhiro Nakashima, Noriko Nakazeki, Yuya Ide, Satoshi Koyama, Koji Hasegawa, Toru Kita, Takeshi Kimura, Koh Ono. MicroRNA-33 promotes cardiac fibrosis by maintaining cellular lipid homeostasis.

6. AHA 2016 Scientific Sessions, Nov 12-16, 2016, New Orleans, LA  
**Masataka Nishiga**, Takahiro Horie, Yasuhide Kuwabara, Osamu Baba, Tetsushi Nakao, Tomohiro Nishino, Daihiko Hakuno, Yasuhiro Nakashima, Kazuya Nagao, Koji Hasegawa, Toru Kita, Takeshi Kimura and Koh Ono. MicroRNA-33 Maintains Cellular Cholesterol Content in Fibroblasts and Fibrotic Response in Heart
7. KEYSTONE SYMPOSIA RNA-Based Approaches in Cardiovascular Disease (X8), March 26-30, 2017, Keystone, Colorado, USA  
**Masataka Nishiga**  
MicroRNA-33 controls adaptive fibrotic response in the remodeling heart by preserving lipid raft cholesterol

〔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：

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

西賀 雅隆 (Nishiga, Masataka)  
京都大学医学部附属病院循環器内科 医員  
研究者番号：00782393