

令和 5 年 6 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08904

研究課題名(和文) コレステロールにより制御される長鎖非コードRNAの機能解析とその臨床応用

研究課題名(英文) Functional analysis of cholesterol-related long non-coding RNAs and their clinical application

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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトゲノムの蛋白をコードする領域は2%程度であり、残りの領域からタンパク質をコードしない非コードRNA(non-coding RNA; ncRNA)が多く転写されている。短鎖ncRNAの一つであるmicroRNA研究の発展からこれらが生命現象や様々な病態に関与していることが明らかとなってきた。一方、200塩基長以上のncRNAである長鎖ncRNA(long non-coding RNA; lncRNA)に関しては、個々の機能が明らかとされているものはごくわずかである。本研究ではコレステロールに関わるlncRNAに注目して、その機能や役割を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

超高齢化社会を迎える日本において心筋梗塞や脳梗塞などの動脈硬化性疾患は重要な疾患であり、新規治療の開発は急務である。動脈硬化性疾患とコレステロール代謝は密接な関係があり、スタチンやPCSK9阻害剤などが開発されその有効性が示されている。本研究ではコレステロール代謝にかかわる新規lncRNAを見出し、その機能を明らかにする。それらを制御することによる新たな治療開発などの臨床応用につなげることを目的とする。本研究は新規治療標的としてのシーズに加え、次世代の研究領域の発展につながる可能性もあり、新規性・独自性に加えて医学・薬学さらには科学の発展への貢献も高いと考える

研究成果の概要(英文)：Protein-encoding regions of the human genome account for only about 2%, and many non-coding RNAs (ncRNAs) are transcribed from the remaining regions. Developments in microRNA research, which are one of the short ncRNAs, have revealed that they are involved in various physiological and pathological conditions. On the other hand, the functions of long ncRNAs (lncRNAs), which are ncRNAs with a base length of 200 bases or longer, are largely unknown. In this study, we focused on the cholesterol-related lncRNAs and clarified their functions and roles.

研究分野：循環器内科学

キーワード：非コードRNA 心血管代謝性疾患 コレステロール

## 1. 研究開始当初の背景

ヒトゲノムの蛋白をコードする遺伝子領域はわずか 2%程度であり、残りの領域からタンパク質をコードしない非コード RNA (non-coding RNA; ncRNA) が非常に多く転写されていることが、次世代シーケンサーを用いた網羅的解析により明らかとなった。この 20 年間で短鎖 ncRNA の一つである microRNA (miRNA、miR) 研究の発展からこれらが生命現象や様々な病態に関与していることが明らかとなり、疾患治療への応用が検討されつつある。申請者らも心血管代謝性疾患における miRNA の役割について数多く報告し、臨床応用へ向けて研究を加速している。

一方、200 塩基長以上の ncRNA である長鎖 lncRNA (long non-coding RNA; lncRNA) に関しては、理研のデータベースからヒトでは約 28000 の lncRNA が発現しており、それらの約 70% が機能を有すると見積もられているが、個々の機能が明らかとされているものはごくわずかである。lncRNA の作用機序としては、RNA-蛋白相互作用に加え、RNA-DNA、RNA-RNA さらには RNA-miRNA など多岐にわたる相互作用が示唆されており、またエピジェネティックに作用するなど従来のタンパク間の相互作用では想像がつかない現象が報告されてきている。従って、lncRNA 研究からこれまでとは違う全く新しい病態形成機構が明らかになる可能性がある。

## 2. 研究の目的

超高齢化社会を迎える日本において心筋梗塞や脳梗塞などの動脈硬化性疾患は重要な疾患であり、患者数も多く、新規治療の開発は急務である。動脈硬化性疾患とコレステロール代謝は密接な関係があり、スタチンや PCSK9 阻害剤などが開発されその有効性が示されており、これらの薬剤は現在の循環器疾患治療には不可欠な薬剤となっている。本研究ではコレステロール代謝にかかわる新規 lncRNA を見出し、その機能を明らかにする。細胞のみならず生体における役割を詳細に解明し、疾患への関与について検討を行う。最終的には lncRNA を制御することによる新たな治療開発や疾患マーカーの開発などの臨床応用につなげることを目的とする。

## 3. 研究の方法

コレステロール量を変化させると多くの lncRNA がダイナミックに変動していることが明らかとなった。その中で特に変動の大きなものに注目した (lncRNA-M とする)。この lncRNA-M はヒト臓器では肝臓や脳などのコレステロール合成の盛んな臓器で発現が高かった。本研究はこの新規 lncRNA-M に注目し、その機能を詳細に解明する。細胞実験に加え、生体での影響を明らかにするために lncRNA-M 欠損マウスを作成する。細胞や生体、疾患モデルでの機能解析に加え、患者サンプルを用いた検討も加えてその治療標的や臨床応用などの可能性について評価する。

## 4. 研究成果

### (1) 細胞実験での評価：

THP1 マクロファージ、HepG2 肝細胞、マウス肝臓由来の初代培養細胞、マウス腹腔内マクロファージに対して、レンチウイルスベクターをもちいて lncRNA-M の過剰発現およびノックダウンを行った。細胞増殖や細胞死については大きな差を認め

なかった。定量的 PCR を行うことにより脂質代謝関連遺伝子、炎症関連遺伝子の評価を行い、特定の遺伝子が変化することが確認できた。

(2) 作用機序の解明：

lncRNA-M との結合蛋白の探索を行った。lncRNA-M をビオチンラベルし、ビオチンによる pull-down 法にて同定した。質量分析解析から多くの候補蛋白がえられたが、そのから、実際に免疫沈降にて結合が確認された数種類について検討を重ねている。機能評価のためこれらの結合蛋白の shRNA を作成し、ノックダウンを行い、それらの表現型を確認した。上述の脂質代謝関連遺伝子、炎症関連遺伝子に変化があった結合蛋白に注目して、解析を行っている。

(3) lncRNA-M 欠損マウスの解析：

lncRNA-M 欠損マウスは従来のマウス ES 細胞を用いた相同組み換えを用いて作成を行った。この lncRNA-M 欠損マウスはメンデルの法則に従って生まれてきた。特に雌雄差は認めず、外見上は明らかな異常なく成長した。8 週齢、通常食での定常状態での血清脂質プロファイル、肝臓組織の評価を行ったが、野生型と lncRNA-M 欠損マウスとの間に大きな差異は認めなかった。食事量や体重変化も大きな違いを認めず、血糖値や糖負荷試験をおこなったが、有意な変化は認めなかった。脂質代謝関連遺伝子・炎症関連遺伝子についても同様であった。網羅的な検討として肝臓、脂肪組織の RNA-seq を行い、他の遺伝子群について検討を行っている。

引き続き病態モデルでの評価として脂質と関連の深い動脈硬化および脂肪肝モデルで検討を行った。動脈硬化モデルとして、LDL 欠損マウスとの交配を開始したが原因は明らかでないが繁殖困難があり、ApoE 欠損マウスとの交配に変更した。ApoE 欠損マウスのバックグラウンドでは順調に繁殖が成功し、これらのマウスを用いて実験を行った。ApoE 欠損マウスおよび lncRNA-M/ApoE ダブル欠損マウスを 8 週齢よりコレステロール含有の Western 食を負荷して、20 週齢で大動脈基部の動脈硬化形成について評価を行った。肝臓についても評価を行った。血清脂質については大きな差異を認めなかったものの、動脈硬化の形成および脂肪肝の程度は野生型と lncRNA-M 欠損マウスとの間に有意な差異を認めた。現在、そのメカニズムについて検討を重ねている。

(4) 生体における lncRNA-M の制御実験：

生体での lncRNA-M の過剰発現およびノックダウンの実験の系を立ち上げるために AAV ベクターの実験を開始した。現在、コンストラクトを作成し、生体での投与に向けて、条件検討を行っている。生体での投与実験が可能となれば、病態モデルへの投与を行い、その表現型の解析を行う予定である。

(5) ヒト疾患との関わりの解明：

ヒトでの疾患との関連を明らかにするため患者血清における lncRNA-M の発現解析を計画した。現在、症例を増やしている状況で有る。

上述の通り、細胞およびマウスを用いてその役割や作用機序を明らかにしつつある。lncRNA-M 欠損マウスは定常状態では明らかな表現型を示さなかったが、疾患モデルにおいて表現型を示した。これらの結果から lncRNA-M は疾患形成に重要な役割を果たしていると考えられた。本研究を推進することにより lncRNA-M の作用機序や病態における役割をさらに解き明かしていく。ヒトサンプルでの評価を加えることにより、より臨

床に近い評価も加えていくことによりヒト疾患での関係も明らかにしていきたいと考えている。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Miyagawa S, Horie T, Nishino T, Koyama S, Watanabe T, Baba O, Yamasaki T, Sowa N, Otani C, Matsushita K, Kojima H, Kimura M, Nakashima Y, Obika S, Kasahara Y, Kotera J, Oka K, Fujita Ryo, Sasaki T, Takemiya A, Hasegawa K, Kimura T, Ono K.	4. 巻 in press
2. 論文標題 Inhibition of microRNA-33b in humanized mice ameliorates nonalcoholic steatohepatitis.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Life Sci Alliance	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yamasaki T, Horie T, Koyama S, Nakao T, Baba O, Kimura M, Sowa N, Sakamoto K, Yamazaki K, Obika S, Kasahara Y, Kotera J, Oka K, Fujita R, Sasaki T, Takemiya A, Hasegawa K, Minatoya K, Kimura T, Ono K.	4. 巻 12(1)
2. 論文標題 Inhibition of microRNA-33b specifically ameliorates abdominal aortic aneurysm formation via suppression of inflammatory pathways.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 11984
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-16017-5.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 2.Ono K, Horie T, Baba O, Kimura M, Tsuji S, Rodriguez RR, Miyagawa S, Kimura T.	4. 巻 288(22)
2. 論文標題 Functional non-coding RNAs in vascular diseases.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 FEBS J.	6. 最初と最後の頁 6315-6330
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/febs.15678.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Horie T, Nakao T, Miyasaka Y, Nishino T, Matsumura S, Nakazeki F, Ide Y, Kimura M, Tsuji S, Ruiz Rodriguez R, Watanabe T, Yamasaki T, Xu S, Otani C, Miyagawa S, Matsushita K, Sowa N, Omori A, Tanaka J, Nishimura C, Picciotto MR, Inoue H, Watanabe D, Nakamura K, Sasaki T, Kimura T, Ono K, et al.	4. 巻 12
2. 論文標題 MicroRNA-33 maintains adaptive thermogenesis via enhanced sympathetic nerve activity.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nat Commun.	6. 最初と最後の頁 843
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-021-21107-5.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Ono K, Horie T, Baba O, Kimura M, Tsuji S, Ruiz Rodriguez R, Sawa M, Kimura T.	4. 巻 in press
2. 論文標題 Functional Non-coding RNAs in Vascular Diseases.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 FEBS Lett.	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/febs.15678.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kuwabara Y, Tsuji S, Nishiga M, Izuhara M, Ito S, Nagao K, Horie T, Watanabe S, Koyama S, Kiryu H, Nakashima Y, Baba O, Nakao T, Nishino T, Sowa N, Miyasaka Y, Hatani T, Ide Y, Nakazeki F, Kimura M, Yoshida Y, Inada T, Kimura T, Ono K.	4. 巻 3
2. 論文標題 LincRNA alleviates cardiac systolic dysfunction under pressure overload.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Commun Biol.	6. 最初と最後の頁 434
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-020-01164-0.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kimura M, Horie T, Baba O, Ide Y, Tsuji S, Ruiz Rodriguez R, Watanabe T, Yamasaki T, Otani C, Xu S, Miyasaka Y, Nakashima Y, Kimura T, Ono K.	4. 巻 21
2. 論文標題 Homeobox A4 suppresses vascular remodeling by repressing YAP/TEAD transcriptional activity.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 EMBO Rep.	6. 最初と最後の頁 e48389
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embr.201948389.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ono K, Wada H, Satoh-Asahara N, Inoue H, Uehara K, Funada J, Ogo A, Horie T, Fujita M, Shimatsu A, Hasegawa K.	4. 巻 20
2. 論文標題 ABLE-MET Investigators. Effects of Metformin on Left Ventricular Size and Function in Hypertensive Patients with Type 2 Diabetes Mellitus: Results of a Randomized, Controlled, Multicenter, Phase IV Trial.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Am J Cardiovasc Drugs.	6. 最初と最後の頁 283-293
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s40256-019-00381-1.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nagao K, Tamura A, Sato Y, Hata R, Kawase Y, Kadota K, Horie T, Sowa N, Nishiga M, Ono K, Inada T, Tanaka M.	4. 巻 7
2. 論文標題 Utility of collagen-derived peptides as markers of organ injury in patients with acute heart failure.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Open Heart	6. 最初と最後の頁 e001041
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/openhrt-2019-001041.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Takahiro Horie
2. 発表標題 Identification of metabolic regulatory mechanism by non-coding RNA
3. 学会等名 第26回日本心血管内分泌代謝学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takahiro Horie
2. 発表標題 Identification of MicroRNA-33-mediated Metabolic Regulatory Mechanism
3. 学会等名 第7回日本心血管協会 (JCVA) 学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takahiro Horie, Takeshi Kimura, Koh Ono
2. 発表標題 Identification of Neuronal Regulatory Mechanisms of Energy Expenditure via MicroRNA-33
3. 学会等名 第86回日本循環器学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takahiro Horie, Takeshi Kimura, Koh Ono
2. 発表標題 Elucidation of Metabolic Regulatory Mechanisms mediated by MicroRNA-33a/b
3. 学会等名 第86 回日本循環器学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takahiro Horie
2. 発表標題 High-intensity statins work regardless of age. (Debate: Lipid Management: Is there Anything Beyond LDL?)
3. 学会等名 第84回 日本循環器学会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takahiro Horie, Satoshi Koyama, Takeshi Kimura, Koh Ono
2. 発表標題 miR-33b has more impact on the formation of insulin resistance and atherosclerosis than miR-33a.
3. 学会等名 第84回 日本循環器学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計3件

産業財産権の名称 NASHの予防及び/又は治療剤	発明者 京都大学、大阪大学、医薬基盤・健康・栄養研究所	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-097796	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件



〔その他〕

京都大学循環器内科 分子循環器グループ  
<http://kyoto-u-cardio.jp/kisokenkyu/metabolic/>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------