

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 13 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790703

研究課題名（和文）マイクロ RNA の心血管疾患における役割の解明：新規治療法の開発を目指して

研究課題名（英文）Elucidation of the function of microRNAs on cardiovascular and metabolic disease: Investigation for a novel therapy by regulating microRNAs

研究代表者

堀江 貴裕（HORIE TAKAHIRO）

京都大学・医学研究科・特定助教

研究者番号：20565577

研究成果の概要（和文）：

マイクロ RNA と呼ばれる 20 塩基程度の蛋白をコードしない小さな RNA が遺伝子の発現を精巧に制御しており、近年、その発現異常や機能異常は様々な疾患の形成に関与することが明らかとなってきた。今回の研究では心血管代謝疾患に関わるマイクロ RNA の機能解析を miR-33 および miR-146a を中心として行った。その結果、miR-33 は HDL コレステロール代謝に、miR-146a はドキシソルビシンによる心筋障害に関与することが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

Small non-coding RNAs termed microRNAs, about 20bp, bind to the 3' UTR of target mRNAs and inhibit their expressions post-transcriptionally. Recently, dysregulation of microRNA expression or function has been found to be relevant to various diseases in human. In this study, we investigated the function of microRNAs on cardiovascular and metabolic diseases, and found that microRNA-33 regulated HDL cholesterol metabolism and microRNA-146a was associated with doxorubicin-induced cardiac damage.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2010 年度 | 1,600,000 | 480,000 | 2,080,000 |
| 2011 年度 | 1,400,000 | 420,000 | 1,820,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,000,000 | 900,000 | 3,900,000 |

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

1. 研究開始当初の背景
マイクロ RNA (microRNA; miRNA) とよばれる
18～23 塩基長程度の小さな non-coding RNA

がさまざまな疾患の形成に関与することが明らかになってきた。miRNA 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 (UTR) を標的とし、翻訳抑制あるいは分解を介してその発現を抑制する。部分的な相補性を介して標的遺伝子の機能を阻害するため標的は1つと限らず、複数の遺伝子を標的とする。miRNAにより様々な組織や細胞における遺伝子発現の調節、調和がとられ高等生物はより多様性を保持していると考えられ、生物の進化や胚発生に重要な働きを担っていることが明らかとなっている。ヒトでは約 1000 種類の miRNA が同定されており、癌において miRNA の発現が変化し、関与していることが明かにされつつあり、さらに心血管疾患や代謝性疾患においても miRNA の関与が明らかになりつつある。

2. 研究の目的

miRNA の心血管疾患形成における役割を解明し、その機能を制御することによる新規治療法の開発へと結びつける。一般に、心血管疾患は、脂質代謝異常、耐糖能異常、高血圧といった危険因子の重複により動脈硬化性病変が形成され、心筋梗塞ひいては心不全へとつながる。約 1000 種類同定されている miRNA のうち、本研究では miR-33 及び miR-146a の 2 つの miRNA に注目し研究を進める。(1) miR-33 は sterol regulatory element binding protein 2 (SREBP2) のイントロンに存在しており、脂質代謝異常形成に (2) miR-146a は高血圧性心不全ラットの心臓にて発現上昇があるため心筋障害の形成に関わる可能性がある。

3. 研究の方法

(1) miR-33 の脂質代謝異常・動脈硬化形成過程における役割を明らかにする。

- ① miR-33 KO マウスを用いた表現型解析を通して、生体内での miR-33 の機能解析を行う。
- ② 動脈硬化の形成過程における miR-33 の役割を明らかにする。

(2) miR-146a の心不全形成過程における役割を明らかにする。

- ① 初代培養心筋細胞を用いて、miR-146a の機能を詳細に検討する。
- ② マウスのドキシソルピシン心不全モデルを用いて生体内での機能解析をする。

4. 研究成果

(1) miR-33 の脂質代謝異常・動脈硬化形成過程における役割を明らかにする。

- ① miR-33 KO マウスを用いた表現型解析を通して、生体内での miR-33 の機能解析を行う。 コレステロール代謝において最も大切な転写因子である SREBP2 のイントロンに miR-33 が存在する。miR-33 はコレステロール輸送蛋

白の ATP-binding cassette A1 (ABCA1) の 3' UTR に結合しその翻訳を抑制することを細胞実験で明らかにした。生体での役割を明らかにするために miR-33 欠損マウスを作製した。このマウスにおいては、肝臓およびマクロファージにおける ABCA1 の発現の上昇を認めた。ABCA1 は HDL コレステロール (HDL-C) の形成に不可欠な分子であり、ABCA1 による apoA-I に対するコレステロール引き渡しは HDL-C 形成の最初のステップである。miR-33 欠損マウスは、マクロファージにおいては apoA-I に対するコレステロール引き渡し能の上昇が認められ、血清 HDL-C の著明な増加が認められた (雄: 22%、雌: 39%)。これらのことから miR-33 は生体において、ABCA1 の発現を抑制し、HDL-C の生成を負に制御する因子であることが明らかになった。

上記の内容は *Proc Natl Acad Sci U S A.* に報告した (下記の雑誌論文⑤参照)。

② 動脈硬化の形成過程における miR-33 の役割を明らかにする。

miR-33 欠損マウスは HDL-C の増加を示した。また、マクロファージにおいても ABCA1 の発現上昇がみられたので、miR-33 の欠損は動脈硬化に対して良い影響があることが推察される。miR-33 が動脈硬化の形成にどのように影響を与えるかの検討を開始した。このため、miR-33 欠損マウスを動脈硬化モデルマウスである apoE 欠損マウスとの交配を行い、現在解析中である。

(2) miR-146a の心不全形成過程における役割を明らかにする。

① 初代培養心筋細胞を用いて、miR-146a の機能を詳細に検討する。

高血圧性心不全モデル動物であるダールラットの心臓で miRNA のマイクロアレイを行ったところ miR-146a が心不全で増加していることが明らかとなった。心不全における miR-146a の機能を明らかとするためにラット初代心筋培養細胞にドキシソルピシン刺激を行った。ドキシソルピシンの刺激により miR-146a の発現上昇が認められた。一方で miR-146a は心筋保護因子ニューレギュリン 1 の受容体である ErbB4 の 3' UTR に結合しその発現を負に制御する事が明らかとなった。miR-146a を過剰発現させた心筋細胞はアポトーシスが増加した。従って、ドキシソルピシンによる心筋障害の一因として、miR-146a の上昇に伴う ErbB4 の発現低下を介したニューレギュリン 1-ErbB4 シグナルの減弱にある事が示唆された。

上記の内容は、*Cardiovascular Res.* に報告した (下記の雑誌論文⑦参照)。

② マウスのドキシソルピシン心不全モデルを用いて生体内での機能解析をする。

上記の結果を、生体内で検討するためにドキシ

ソルビシンを腹腔内投与したマウスの心臓の解析をおこなった。ドキシソルビシン投与後の心臓においては miR-146a の上昇および ErbB4 の発現低下が認められた。現在、miR-146a の抑制による心機能の改善効果を検討している。

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 10 件)

- ① Kuwabara Y, Ono K, Horie T, Nishi H, Nagao K, Kinoshita M, Watanabe S, Baba O, Kojima Y, Shizuta S, Imai M, Tamura T, Kita T, Kimura T. Increased microRNA-1 and microRNA-133a levels in serum of patients with cardiovascular disease indicate myocardial damage. *Circ Cardiovasc Genet*. 査読有、4、2011、446-454
DOI:10.1161/CIRCGENETICS.110.958975
- ② Wada H, Ura S, Kitaoka S, Satoh-Asahara N, Horie T, Ono K, Takaya T, Takanabe-Mori R, Akao M, Abe M, Morimoto T, Murayama T, Yokode M, Fujita M, Shimatsu A, Hasegawa K. Distinct characteristics of circulating vascular endothelial growth factor- α and C levels in human subjects. *PLoS One*. 査読有、6、2011、e29351
DOI: 10.1371/journal.pone.0029351
- ③ 堀江貴裕、尾野亘、横出正之、木村剛、コレステロールホメオスタシスとマイクロ RNA、*血管医学*、査読無、12、2011、39-46
- ④ 尾野亘、堀江貴裕、木村剛、北徹、microRNA-33 は生体内で HDL コレステロールを制御する、*実験医学*、査読無、29、2011、575-578
- ⑤ Horie T, Ono K, Horiguchi M, Nishi H, Nakamura T, Nagao K, Kinoshita M, Kuwabara Y, Marusawa H, Iwanaga Y, Hasegawa K, Yokode M, Kimura T, Kita T. MicroRNA-33 encoded by an intron of Srebp2 regulates HDL in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 査読有、107、2010、17321-6
- ⑥ Kinoshita M, Ono K, Horie T, Nagao K, Nishi H, Kuwabara Y, Takanabe-Mori R, Hasegawa K, Kita T, and Kimura T. Regulation of adipocyte differentiation by activation of serotonin (5-HT) receptors 5-HT_{2AR} and 5-HT_{2CR} and involvement of

microRNA-448-mediated repression of KLF5. *Molecular Endocrinology*. 査読有、24、2010、1978-87

- ⑦ Horie T, Ono K, Nishi H, Nagao K, Kinoshita M, Watanabe S, Kuwabara Y, Nakashima Y, Takanabe-Mori R, Nishi E, Hasegawa K, Kita T, Kimura T. Acute Doxorubicin Cardiotoxicity Is Associated with miR-146a-induced Inhibition of the Neuregulin-ErbB Pathway. *Cardiovascular Res*. 査読有、87、2010、656-664
- ⑧ Nishi H, Ono K, Iwanaga Y, Horie T, Nagao K, Takemura G, Kinoshita M, Kuwabara Y, Takanabe Mori R, Hasegawa K, Kita T, Kimura T. MicroRNA-15b modulates cellular ATP levels and degenerates mitochondria via ARL2 in neonatal rat cardiac myocytes. *J Biol Chem*. 査読有、285、2010、4920-30
- ⑨ Nagao K, Ono K, Iwanaga Y, Tamaki Y, Kojima Y, Horie T, Nishi H, Kinoshita M, Kuwabara Y, Hasegawa K, Kita T, Kimura T. Neural cell adhesion molecule is a cardioprotective factor up-regulated by metabolic stress. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 査読有、48、2010、1157-68
- ⑩ Takanabe-Mori R, Ono K, Sowa N, Takaya T, Horie T, Satoh-Asahara N, Shimatsu A, Fujita M, Sawamura T, Hasegawa K. LOX-1 is required for the adipose tissue expression of proinflammatory cytokines in high-fat diet-induced obese mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 査読有、398、2010、576-80

[学会発表] (計 18 件)

- ① 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 Regulates Atherosclerosis Formation. 第 76 回日本循環器学会学術集会、2012 年 3 月 16-18 日、福岡国際会議場 (福岡)
- ② Koh Ono, Yasuhide Kuwabara, Takahiro Horie, Toru Kita, Takeshi Kimura. Increased MicroRNA-1 and MicroRNA-133a Levels in Serum of Patients with Cardiovascular Disease Indicate the Existence of Myocardial Damage. 第 76 回日本循環器学会学術集会、2012 年 3 月 16-18 日、福岡国際会議

- 場 (福岡)
- ③ Yasuhide Kuwabara, Koh Ono, Takahiro Horie, Hitoo Nishi, Shin Watanabe, Minako Kinoshita, Osamu Baba, Yoshimasa Chujo, Toru Kita, Takeshi Kimura. Circulating MicroRNAs Drived from Damaged Cardiomyocytes can Regulate the Gene Expression in Recipient Cells. *microRNA-33 Regulates Atherosclerosis Formation*. 第76回日本循環器学会学術集会、2012年3月16-18日、福岡国際会議場 (福岡)
- ④ Naoya Sowa, Koh Ono, Takahiro Horie, Koji Hasegawa, Toru Kita, Takeshi Kimura. MicroRNA 26b Encoded by the Intron of SCP1 Has an Antagonistic on its Host Gene and Cardiac Hypertrophy. 第76回日本循環器学会学術集会、2012年3月16-18日、福岡国際会議場 (福岡)
- ⑤ Yasuhide Kuwabara, Koh Ono, Takahiro Horie, Hitoo Nishi, Shin Watanabe, Minako Kinoshita, Osamu Baba, Yoshimasa Chujo, Kazuya Nagao, Yoji Kojima, Toru Kita, Takeshi Kimura. Increased MicroRNA-1 and MicroRNA-133a Levels in Serum of Patients with Cardiovascular Disease Indicate the Existence of Myocardial Damage. American Heart Association Scientific Sessions 2011、2011年11月12-16日、Orange County Convention Center(Orlando, USA)
- ⑥ Naoya Sowa, Koh Ono, Takahiro Horie, Koji Hasegawa, Takeshi Kimura. MicroRNA 26b Encoded by the Intron of Small CTD Phosphatases (SCPs) Has an Antagonistic Effect on its Host Gene and Suppresses Cardiac Hypertrophy. American Heart Association Scientific Sessions 2011. 2011年11月12-16日、Orange County Convention Center(Orlando, USA)
- ⑦ Y. Kuwabara, K. Ono, T. Horie, H. Nishi, S. Watanabe, M. Kinoshita, O. Baba, T. Kita, T. Kimura. Elevated microRNA-1 and microRNA-133a levels in serum of patients with cardiovascular diseases indicate the myocardial damage. ESC Congress 2011. 2011年8月27-31日、Paris Nord Villepinte(Paris, France)
- ⑧ S. Watanabe, K. Ono, T. Horie, H. Nishi, Y. Kuwabara, O. Baba, T. Kimura. CaMKK beta contributes to energy supply in adaptive phase of pressure-overload-induced heart failure. ESC Congress 2011. 2011年8月27-31日、Paris Nord Villepinte(Paris, France)
- ⑨ Horie T, Ono K, Iwanaga Y, Nishi H, Nagao K, Kinoshita M, Watanabe S, Kuwabara Y, Nakashima Y, Takanabe-Mori R, Nishi E, Hasegawa K, Kita T, Kimura T. MiR-146a-induced inhibition of the neuregulin-ErbB4 pathway may be involved in deterioration of cardiotoxicity under concurrent chemotherapy with doxorubicin and Trastuzumab. American Heart Association Annual Scientific Sessions 2010、2010年11月13-17日、McCormick Place(Chicago, USA)
- ⑩ Ono K, Sowa N, Horie T, Hasegawa K, Kita T, Kimura T. MicroRNA 26b family encoded by the introns of small CTD Phosphatases (SCPs) 1 to 3 suppresses phenylephrine-induced cardiomyocyte hypertrophy by targeting TRPC3/6 and GATA4. American Heart Association Annual Scientific Sessions 2010、2010年11月13-17日、McCormick Place(Chicago, USA)
- ⑪ Watanabe S, Ono K, Horie T, Nishi H, Kinoshita M, Kuwabara Y, Baba O, Kimura T. Ca²⁺/Calmodulin-dependent kinase beta contributes to energy supply in adaptive phase of pressure-overload-induced heart failure. American Heart Association Annual Scientific Sessions 2010、2010年11月13-17日、McCormick Place(Chicago, USA)
- ⑫ Nishi H, Ono K, Horie T, Nagao K, Kinoshita M, Kuwabara Y, Baba O, Nakashima Y, Nagao K, Takanabe-Mori R, Hasegawa K, Kita T, Kimura T. MicroRNA-27a regulates beta-myocin heavy chain gene expression by targeting thyroid hormone receptor beta 1 in neonatal rat ventricular myocytes. American Heart Association Annual Scientific Sessions 2010、2010年11月13-17日、McCormick Place(Chicago, USA)
- ⑬ Kuwabara Y, Ono K, Horie T, Nishi H, Kinoshita M, Watanabe S, Nakashima Y, Nagao K, Kojima Y, Kita T, Kimura T. MicroRNA-1 and microRNA-133a are useful as early diagnostic biomarkers in patients with acute coronary syndrome. American Heart Association Annual Scientific Sessions 2010、2010年11月13-17日、McCormick Place(Chicago, USA)
- ⑭ Watanabe S, Ono K, Horie T, Nishi H,

Kuwabara Y, Kimura T. Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase beta contributes to energy supply in adaptive phase of pressure-overload-induced heart failure. European Society of Cardiology Congress 2010、2010年8月28日-9月1日、Stockholmsmassan(Stockholm, Sweden)

- ⑮ 堀江貴裕、尾野 亘、西 仁勇、長央和也、木下美菜子、桑原康秀、森利依子、長谷川浩二、北 徹、木村 剛. ドキソルピシンによる心筋障害には miR-146a による neuregulin/ErbB シグナルの抑制が関わる. 第 47 回日本臨床分子医学会学術集会、2010年4月10-11日、東京国際フォーラム (東京)
- ⑯ 木下美菜子、尾野 亘、桑原康秀、西 仁勇、長央和也、堀江貴裕、森利依子、長谷川浩二、北 徹、木村 剛. MicroRNA-448 は脂肪細胞分化を抑制する. 第 47 回日本臨床分子医学会学術集会、2010年4月10-11日、東京国際フォーラム (東京)
- ⑰ Ono K, Nishi H, Iwanaga Y, Horie T, Nagao K, Takemura G, Kinoshita M, Kuwabara Y, Takanabe-Mori R, Hasegawa K, Kita T, Kimura T. MicroRNA-15b modulates cellular ATP levels and degenerates mitochondria via Arl2 in neonatal rat cardiac myocytes. ISHR World Congress 2010 Kyoto、2010年5月13-16日、京都国際会議場 (京都)
- ⑱ 堀江貴裕、尾野 亘、西 仁勇、長央和也、木下美菜子、桑原康秀、森利依子、長谷川浩二、北 徹、木村 剛. SREBP2 のイントロンにコードされるマイクロ RNA-33 は生体において HDL の形成を制御する. 第 2 回 京阪神心不全研究会、2010年12月4日、阪急電鉄本社ビル1階 (大阪)

[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・医学研究科・特定助教

研究者番号：20565577