

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 24 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860556

研究課題名(和文)心疾患におけるnon-coding RNAの機能解析

研究課題名(英文)Analysis of Non-coding RNA Functions in Heart Diseases

研究代表者

桑原 康秀 (Yasuhide, Kuwabara)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：60632099

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：心不全は高血圧等を基礎疾患とし、末梢に必要な血液を送り出すことが不可能となった臨床症候群である。本研究は、タンパク質をコードしないRNA(non-coding RNA)に着目し、心不全発症の分子生物学的機構の解明を行う研究であった。肥満や2型糖尿病は心不全の発症を増加させるが、本研究では、心筋細胞特異的なnon-coding RNA欠損マウスを用いて、non-coding RNAの一種であるmiR-451が、肥満や2型糖尿病によって引き起こされる心肥大の増悪因子であることを解明した。また、心不全によって誘導される長鎖non-coding RNAの機能解析も行い、興味深い結果も得ている。

研究成果の概要(英文)：Heart failure is a clinical syndrome, in which the heart can not pump the blood necessary in whole organs. In this investigation, we focused on the protein non-coding RNAs and tried to figure out the molecular mechanisms underlying cardiac hypertrophy and heart failure. It is known that type 2 diabetes and obesity induce cardiac hypertrophy and heart failure. During this research period, we found that miR-451, which is one of the non-coding RNAs, exacerbated the cardiac hypertrophy induced by obesity and type 2 diabetes by using cardiomyocyte-specific miR-451 knockout mice. We also conducted the analysis of a long non-coding RNA, which is upregulated in heart failure, and got the interesting results.

研究分野：循環器内科学

キーワード：心不全 非コードRNA

1. 研究開始当初の背景

(1) 肥満を背景とした糖尿病生心筋症の発症に関わる microRNA の機能解析

C57BL/6 マウスに高脂肪食を長期間摂食させると、肥満と 2 型糖尿病が生じ、更に高脂肪食誘導性の心肥大が生じることが報告されている。われわれは高脂肪食誘導性心肥大における microRNA の機能を評価するため、C57BL/6 マウスに高脂肪食を 20 週摂食させ、心臓における microRNA の発現を網羅的に評価し、miR-451 が有意に上昇することを見いだしていた。さらにラット新生仔心筋細胞に miR-451 の過剰発現を行うと、心筋細胞傷害が誘導されることを見いだしていた。

(2) 圧負荷による心肥大、心不全に至る過程の long intergenic non-coding RNA の役割の解明

予備実験により、C57BL/6 マウスに圧負荷を行うと心肥大や心不全において 3 種類の長鎖非コード RNA (lincRNA) が誘導されることを見いだしていた。この lincRNA を我々は lincRNA-Hypertrophy (lincRNA-Hy) と名付けた。またこれらの 3 種の lincRNA をマウス新生仔心筋細胞に過剰発現を行うと、コントロールと比較し、有意に細胞表面面積が上昇することを見いだしていた。

2. 研究の目的

(1) 肥満を背景とした糖尿病生心筋症の発症に関わる microRNA の機能解析

本研究では miR-451 の、高脂肪食誘導性の心肥大における機能を生体で詳細に評価することとした。

(2) 圧負荷による心肥大、心不全に至る過程の long intergenic non-coding RNA の役割の解明

本研究では、内在性の lincRNA-Hypertrophy の機能をさらに詳細に解明することを目的とし、ノックダウンの系を確立することとした。また 3 つのうち 1 つの lincRNA-Hypertrophy に着目し、lincRNA-Hy5 と名付け、作用機序の解明を行うため、miRNA と lincRNA-Hy5 の結合を評価することとした。

3. 研究の方法

(1) 肥満を背景とした糖尿病生心筋症の発症に関わる microRNA の機能解析

心筋細胞特異的に miR-451 を欠損させたマウスを作製するため、miR-451 flox マウスと心筋細胞特異的に Cre を発現する aMHC-Cre トランスジェニックマウスをかけ合わせた。その結果得られた心筋細胞特異的 miR-451 欠損マウス (miR-451 cKO) に普通食、あるいは

高脂肪食を 20 週間摂食させ、その心臓における表現型を解析した。

(2) 圧負荷による心肥大、心不全に至る過程の long intergenic non-coding RNA の役割の解明

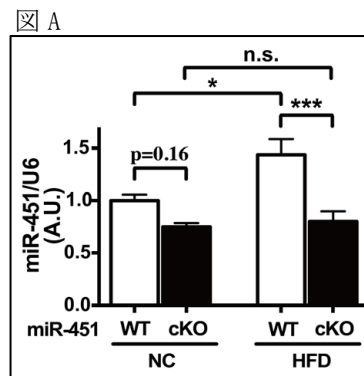
lincRNA-Hypertrophy のノックダウンの系を確立するために、shRNA, miRNA, CRISPR-dCas 等を用いてノックダウンを試みた。

また、lincRNA-Hy5 と miRNA の結合を評価するため、ルシフェラーゼの下流に lincRNA-Hy5 を繋いだコンストラクトを作製し、miRNA の過剰発現ベクターと共発現させ、ルシフェラーゼアッセイを行った。

4. 研究成果

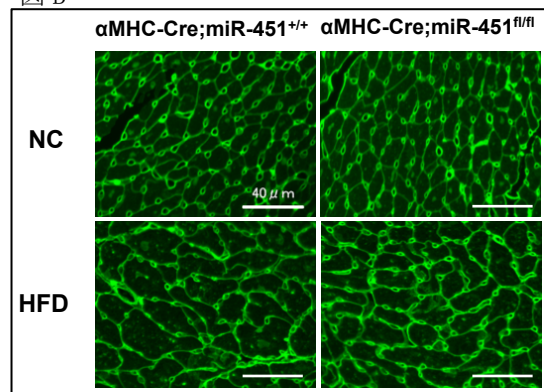
(1) 肥満を背景とした糖尿病生心筋症の発症に関わる microRNA の機能解析

心臓特異的 miR-451 欠損マウスとコントロールマウスに普通食と高脂肪食を 20 週摂食させたところ、miR-451 の高脂肪食による上昇は認められなかった (下図 A)。



心重量と細胞膜染色により心肥大の程度を測定したところ、高脂肪食誘導性の心肥大が一部低下を認めた (下図 B)。

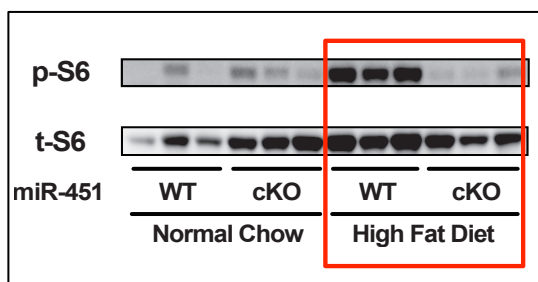
図 B



Cab39 は代謝の重要な因子である AMPK の上流のタンパクである LKB1 の安定化タンパクと

して知られている。miR-451 は先行研究により Cab39 をターゲットとすることが報告されているため、心臓の Cab39 のタンパク量を調べたところ、高脂肪食負荷マウスで認められた Cab39 のタンパクレベルの低下が、miR-451 cKO では改善していた。また LKB1/AMPK 経路はタンパク合成に重要な mTOR を抑制することが知られているため、mTOR 経路のリン酸化を Western Blotting にて評価したところ、対象マウスでは mTOR とその下流の S6 のリン酸化が有意に上昇していたが、そのリン酸化が miR-451 cKO では抑制されていた(下図 C)。

図 C



これらの結果は下記の主な発表論文等に記載したように、アメリカ心臓協会誌の一つである *Circulation Research* に報告した。

miR-451 が上昇するメカニズムに関しては、高脂肪食を負荷すると血中のパルミチン酸が上昇すること、またラット新生仔心筋細胞にパルミチン酸を負荷すると miR-451 が濃度依存性に上昇することから、飽和脂肪酸を介した経路が示唆されるが、詳細なメカニズムについては更なる研究が必要であると考えられた。

(2) 圧負荷による心肥大、心不全に至る過程の long intergenic non-coding RNA の役割の解明

lincRNA-Hy5 のノックダウンの系を確立するために、shRNA, miRNA, CRISPR-dCas 等を用いてノックダウンを試みた。しかし、マウス新生仔心筋細胞において、再現性よくノックダウンを行うことはできなかった。おそらくこれは、マウス新生仔心筋細胞において lincRNA-Hy5 の発現量が非常に低いためと考えられた。

また lincRNA-Hy5 の miRNA との結合を、ルシフェラーゼアッセイを用いて評価し、いくつかの miRNA と結合することを見いだした。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 7 件)

1. **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;116:279-88. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.304707.

2. 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:e0142904. doi: 10.1371/journal.pone.0142904. eCollection 2015.

3. Ono K, Horie T, Nishino T, Baba O, **Kuwabara Y**, Kimura T. MicroRNAs and High-Density Lipoprotein Cholesterol Metabolism. *Int Heart J.* 2015;56:365-71. doi: 10.1536/ihj.15-019.

4. 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;242:632-8. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2015.05.010.

5. 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;79:278-84. doi:10.1253/circj.CJ-14-1252.

6. 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- β leads to accelerated left ventricular remodeling and heart failure after transverse aortic constriction in mice. *PLoS One.*

2014;9:e108201. doi:
10.1371/journal.pone.0108201.

7. 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.

〔学会発表〕（計 16 件）

国際学会

1. LincRNAs Regulated by Pressure-overload Induce Hypertrophy in Neonatal Mouse Cardiac Myocytes. **Kuwabara Y**, Horie T, Baba O, Nishiga M, Usami S, Izuhara M, Nakao T, Nishino T, Ide Y, Nakazeki F, Koyama S, Kita T, Kimura T, Ono K. The 80th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, Mar 18-20, 2016, Sendai, Miyagi, Japan
2. Long Intergenic Noncoding RNA and Myogenin Circuitry Promotes Myoblast Differentiation. **Yasuhide Kuwabara**, Takahiro Horie, Shin Watanabe, Osamu Baba, Takeshi Kimura, Koh Ono. Keystone Symposia, Noncoding RNAs in Health and Disease, Feb 21-24, 2016, Santa Fe, New Mexico, USA
3. MicroRNA-451 Aggravates Lipotoxic Cardiomyopathy through Suppression of the LKB1/AMP Pathway. **Yasuhide Kuwabara**, Takahiro Horie, Osamu Baba, Toru Kita, Takeshi Kimura, Koh Ono. Basic Cardiovascular Sciences 2015, Jul 13-16, Hilton New Orleans Riverside, New Orleans, Louisiana, USA
4. MicroRNA-451 Induced by Palmitate Aggravates Diabetic Cardiomyopathy via Suppression of the LKB1/AMPK Signaling Pathway. **Yasuhide Kuwabara**, Takahiro Horie, Osamu Baba, Masayasu Izuhara, Shunsuke Usami, Tetsushi Nakao, Masataka Nishiga, Tomohiro Nishino, Yuya Ide, Fumiko Nakazeki, Satoshi Koyama, Koji Hasegawa, Toru Kita, Takeshi Kimura, Koh Ono. 20th Asian Pacific Society of Cardiology Congress, Apr 29-May 2, 2015, ADNEC, Abu Dhabi, UAE

5. MicroRNA-451 is Involved in Diabetic Cardiomyopathy through LKB1/AMPK Pathway. **Kuwabara Y**, Horie T, Baba O, Nishiga M, Usami S, Izuhara M, Nakao T, Nishino T, Yuya Ide, Fumiko Nakazeki, Kimura T, Ono K. The 79th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, Apr 24-26, 2015, Osaka, Japan
6. MicroRNA-451 Exacerbates Lipotoxicity in Cardiomyocytes and High-Fat Diet-Induced Cardiac Hypertrophy in Mice through Suppression of the LKB1/AMPK Pathway. **Yasuhide Kuwabara**, Takahiro Horie, Osamu Baba, Shin Watanabe, Toru Kita, Takeshi Kimura, Koh Ono. Keystone Symposia, Mitochondria, Metabolism and Heart Failure joint with Diabetes and Metabolic Dysfunction. Jan 27-Feb 1, 2015, Santa Fe, New Mexico, USA
7. MicroRNA-451 is Involved in Diabetic Cardiomyopathy through Suppression of the LKB1/AMPK Pathway. **Yasuhide Kuwabara**, Takahiro Horie, Osamu Baba, Masataka Nishiga, Shunsuke Usami, Masayasu Izuhara, Tetsushi Nakao, Tomohiro Nishino, Toru Kita, Takeshi Kimura, Koh Ono. 9th Metabolic Syndrome, Type 2 Diabetes and Atherosclerosis Congress. Sep 12-14, 2014, Kyoto, Japan

国内学会

1. 第1回 Cardiac Biomarker研究会 神戸 シェラトン&タワーズ 神戸 兵庫 **桑原康秀**: 虚血性心疾患の新規バイオマーカーとして、非コードRNAの可能性を探る 2015年11月21日
2. 第19回 日本心不全学術集会 ワークショップ(6) グランフロント大阪 ナレッジキャピタル コングレコンベンションセンター 大阪 **桑原康秀**, 堀江貴裕, 馬場理, 出原正康, 宇佐美俊輔, 西賀雅隆, 西野共達, 北徹, 木村剛, 尾野亘 マウス大動脈縮窄モデルにより増加する lincRNA はマウス心筋細胞において心肥大を誘導する 2015年10月22日-24日
3. 平成27年度 新学術領域班会議 生命素子による転写環境とエネルギー代謝のクロストーク制御「転写代謝システム」 菊南温泉ユウベルホテル 熊本市 熊本 **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 肥大刺激によって誘導される lincRNA の心臓と骨格筋における機能解析 2015年6月14日-16日

4. 第52回 日本臨床分子医学会学術集會
みやこめっせ 京都
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、北徹、木村剛、尾野亘: 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 2015年4月10日-11日
5. 新学術領域研究 転写研究会&転写サイクル&転写代謝システム共催 若手ワークショップ@伊香保 ホテル松本楼 渋川市伊香保町 群馬
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 心肥大・心不全における lincRNA の機能解析 2015年2月5日-7日
6. 第九回 高血圧と冠動脈疾患研究会 大手町サンケイプラザ 東京
桑原康秀、堀江貴裕、馬場理、木村剛、尾野亘。肥満を伴う糖尿病性心筋症における、microRNA-451の機能解析。 2014年12月20日
7. 第37回 日本分子生物学会年会 パシフィック横浜 横浜
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。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。 2014年11月25日-27日
8. 第5回 Molecular Cardiovascular Conference II 神戸ベイシェラトンホテル&タワーズ 神戸
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。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。 2014年9月5日-6日
9. 第51回 日本臨床分子医学会学術集會 東京国際フォーラム 東京
桑原康秀、堀江貴裕、馬場理、渡邊真、西賀雅隆、宇佐美俊輔、出原正康、中尾哲史、西野共達、木村剛、尾野亘。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。 2014年4月11日-12日

[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：

[その他]

ホームページ等
京都大学大学院医学研究科 循環器内科学
心血管疾患分子機構説明グループ
<http://kyoto-u-cardio.jp/kisokenkyu/metabolic/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

桑原 康秀, (KUWABARA Yasuhide)
京都大学大学院医学研究科 地域医療システム学講座 特定助教

研究者番号：60632099