

したところ、マイクロ RNA-133aの方がより有用であった。また心筋傷害マーカーとして確立している血清心筋トロポニンT値との相関を評価したところ、共に有意な相関を認め、その相関はマイクロ RNA-133a で特に強かった。

また、Ca イオノフォア刺激後に H9c2 細胞培養液からエクソソームを分離し、マイクロ RNA-133a センサーベクターを導入した 293T 細胞の培養液に添加したところ、ルシフェラーゼ活性の有意な低下を認めた。

#### D. 考察

急性心筋梗塞症例において血清中にマイクロ RNA-1 および-133a が上昇する。これらの血中の筋特異的マイクロ RNA はトロポニン T と相関することから、障害された筋肉から放出される可能性がある。また、培養細胞実験から、放出されたマイクロ RNA が他の細胞に対して作用しうる可能性が示唆された。今後さらに他の疾患も集積し、病態との関連の検討を続けている。

#### E. 結論

心血管疾患患者血清における筋肉特異的マイクロ RNA-1 と-133a の上昇は心筋傷害の存在を示唆し、特にマイクロ RNA-133a は傷害心筋から放出されることが示された。また放出されたエクソソーム内マイクロ RNA-133a は、他細胞に取り込まれ、遺伝子発現に関与する可能性が示唆された。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

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.
- 2. 学会発表**
- 1.国際学会
    1. Takahiro Horie, Osamu Baba, Masataka Nishiga, Koji Hasegawa, Masayuki Yokode, Takeshi Kimura, Koh Ono. MicroRNA-33 deficiency reduces atherosclerosis formation in vivo. 18th Annual Scientific Meeting of the International Society of Cardiovascular Pharmacotherapy 28th-30th June 2014, Roma, Italy.
    2. Ono K. Use of miRNA for the Detection of Cardiotoxicity. 4th DIA Cardiac Safety Workshop in Japan July 11-12, 2013 | Ivy Hall, Shibuya, Tokyo.
    3. Ono K. Cardiac-specific inhibition of kinase activity in calcium/calmodulin-dependent kinase kinase- $\beta$  leads to accelerated left ventricular remodeling and heart failure after transverse aortic constriction in mice. Cold spring harbor laboratory meeting. Regulatory and non-coding RNA Aug. 13th to 17th in 2013 NY, U.S.A.
    4. Kuwabara Y. LincRNAs regulated by pressure-overload induce hypertrophy in neonatal mouse ventricular cardiomyocytes. Cold spring harbor laboratory meeting. Regulatory and non-coding RNA (Aug. 13th to 17th in 2013 NY, U.S.A.)
    5. Nishino T. MicroRNA-33a, embedded in Srebf2 gene, regulates lipogenic pathway in vivo. Cold spring harbor laboratory meeting. Regulatory and non-coding RNA (Aug. 13th to 17th in 2013 NY, U.S.A.)
    6. Koh Ono. MicroRNA encoded by an intron of Srebf2 regulates SREBP-1 in vivo. 平成 25 年度新学術領域「転写代謝システム」第 5 回総括班会議国際シンポジウム “ International Symposium on Transcription and Metabolism” (2013 年 11 月 11 日、淡路)
    7. Takahiro Horie. MicroRNA encoded by an intron of Srebf2 regulates SREBP-1 in vivo. 平成 25 年度新学術領域「転写代謝システム」第 5 回総括班会議国際シンポジウム “ International Symposium on Transcription and Metabolism” (2013 年 11 月 11 日、淡路)
    8. Kuwabara Y. MicroRNA-451 Exacerbates

Lipotoxicity in Cardiomyocytes and High-Fat Diet-Induced Cardiac Hypertrophy in Mice through Suppression of the LKB1/AMPK Pathway. 平成25年度新学術領域「転写代謝システム」第5回総括班会議国際シンポジウム“International Symposium on Transcription and Metabolism” (2013年11月11日、淡路)

9. Kuwabara Y. LincRNAs regulated by pressure-overload induce hypertrophy in neonatal mouse ventricular cardiomyocytes. American Heart Association Annual Scientific Sessions 2013, November 16-22, Dallas, USA.

## 2.国内学会

1. 堀江貴裕、馬場 理、桑原康秀、久米典昭、横出正之、北徹、木村 剛、尾野 亘. マイクロRNA-33欠損はアポE欠損マウスにおいて動脈硬化形成を抑制する第50回日本臨床分子医学会学術集会 YIA-2 (2013年4月12日、東京)
2. 尾野 亘. HDL コレステロール仮説に関する最近の話題 第115回日本循環器学会近畿地方会 第41回近畿支部循環器専門医のための教育セッション (2013年6月15日、京都)
3. 堀江貴裕. MicroRNA-33 deficiency reduces atherosclerosis formation in vivo. 成人病の病因・病態の解明に関する研究助成 第19回研究発表会 (TMFC) (2013年7月6日-7日、大阪)
4. 尾野 亘 (座長). 近未来の動脈硬化治療. 第45回日本動脈硬化学会 イブニングセミナー2 (2013年7月18日、東京)
5. 堀江貴裕、馬場 理、木村 剛、尾野 亘. MicroRNA-33 Deficiency Reduces the Progression of Atherosclerotic Plaque in ApoE<sup>-/-</sup> Mice. 第45回日本動脈硬化学会 イブニングセミナー2 (2013年7月18日、東京)
6. 尾野 亘. マイクロRNAのバイオマーカーとしての応用. 第45回日本動脈硬化学会シンポジウム4 (2013年7月19日、東京)
7. 堀江貴裕. MicroRNA-33 Deficiency Reduces the Progression of Atherosclerotic Plaque in ApoE<sup>-/-</sup> Mice. 第45回日本動脈硬化学会若手奨励賞 最優秀賞 (2013年7月18日、東京)
8. 尾野 亘. 「miRNAを介した生体における転写環境と代謝の関連の検討」平成25年度新学術領域「転写代謝システム」第5回総括班会議 (2013年11月11日、淡路)
9. 尾野 亘. 「microRNAと動脈硬化・心不全」第23回循環薬理学会 次世代心不全治療の新機軸 (2013年12月6日、福岡)
10. 堀江貴裕、馬場理、桑原康秀、横出正之、北徹、木村剛、尾野亘. マイクロRNA制御による新規動脈硬化治療法の探索的研究. 第八回高血圧と冠動脈疾患研究会 (2013年12月21日、東京)
11. 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. 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. 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2014』 (2014年1月30日-2月1日、群馬)
12. 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、井出裕也、中関典子、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による心肥大を誘導する. 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2014』 (2014年1月30日-2月1日、群馬)
13. Yasuhide Kuwabara, Takahiro Horie,

Osamu Baba, Shin Watanabe, Masayasu Izuhara, Tetsushi Nakao, Shunsuke Usami, Tomohiro Nishino, Masataka Nishiga, Toru Kita, Takeshi Kimura, Koh Ono. MicroRNA-451 Exacerbates Lipotoxicity in Neonatal Rat Cardiomyocytes, and High Fat Diet Induced Cardiac Hypertrophy in Mice through LKB1/AMPK Pathway. 第78回日本循環器学会学術集会 (2014年3月21日-23日、東京)

14. Satoshi Shizuta, Takahiro Doi, Mitsuhiko Yahata, Tetsuma Kawaji, Kentaro Nakai, Hiroaki Sugiyama, Koji Goto, Takeru Makiyama, Koh Ono, Tetsuo Shioi, Takeshi Kimura. Shock Reduction Strategies in High Energy Devices. 第78回日本循環器学会学術集会 (2014年3月21日-23日、東京)

15. Takahiro Horie, Tomohiro Nishino, Osamu Baba, Yasuhide Kuwabara, Tetsushi Nakao, Masataka Nishiga, Shunsuke Usami, Masayasu Izuhara, Naoya Sowa, Naoya Yahagi, Hitoshi Shimano, Masayuki Yokode, Toru Kita, Takeshi Kimura, Koh Ono. MicroRNA-33 Encoded by an Intron of Sterol Regulatory Element-Binding Protein 2 (Srebp2) Regulates Srebp1 in vivo. 第78回日本循環器学会学術集会 (2014年3月21日-23日、東京)

## 2. 実用新案登録

該当なし

## 3. その他

該当なし

## G. 知的所有権の取得状況

### 1. 特許取得

特願 2014-044463 提出日: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」 尾野 亘、斉藤成達、出原正康、木村 剛

#### 4. NASH における NRDC の病態生理学的意義の検討

厚生労働科学研究費補助金（循環器疾患・糖尿病等生活習慣病対策総合研究事業）  
分担研究報告書

血中自己抗体検出と新規炎症マーカーを用いた急性冠症候群予知因子  
および治療標的の探索  
—NASH における NRDC の病態生理学的意義の検討—

研究分担者：妹尾 浩（京都大学大学院医学研究科 消化器内科学 講師）

#### 研究要旨

非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）は、循環器疾患、糖尿病などとリンクした新しい生活習慣病のひとつである。NASH における NRDC の病態生理学的意義を検討するために、平成 24 年度は NRDC ノックアウトマウスを用いて、NASH モデルを作成した。コリン欠乏食の投与により、野生型マウスでは肝臓の脂肪沈着と炎症を認め、肝逸脱酵素が上昇した。しかし NRDC の欠如により、肝臓に脂肪沈着を認めても炎症は生じず、肝逸脱酵素も上昇しなかった。これらの検討から、NRDC が NASH の病態に極めて重要な役割を果たしていることが示唆された。

#### A. 研究目的

急性冠症候群やメタボリック・シンドロームに代表される生活習慣病の病態やその治療標的をさぐるうえで、研究分担者らは非アルコール性脂肪性肝炎（Non alcoholic steatohepatitis、以下 NASH）に着目し、その病態と新規治療標的の探索を検討課題とした。NASH、およびその終局的な病態としての肝硬変、肝細胞癌の発症は近年とくに頻度を増しつつあり、循環器疾患、糖尿病などとリンクした新しい生活習慣病のひとつとして、その病態の解明と予防・治療法の探索が待ち望まれている。

そこで平成 24 年度は、NASH の病態においてナルディライジン（以下 NRDC）が果たす役割と意義の解明を、まずマウスを用いた基礎的実験を通じて試みることにした。

#### B. 研究方法

野生型 (WT)、および NRDC ノックアウト (KO) マウスに対して、NASH を生じさせるコリン欠乏食、またはコントロール食を経口摂取させた。4、

12、20 週後に、各マウスから肝臓を採取し、免疫組織学的検討、および TNF- $\alpha$ 、IL6、IL1- $\beta$  など、各種増殖因子・サイトカインの RNA とタンパクの定量を行った。

#### （倫理面への配慮）

平成 24 年度は、前臨床試験として、遺伝子改変マウスを用いた検討を行った。それに際して、組換え DNA 実験に関しては、京都大学組換え DNA 実験安全委員会の承認のもと、「組換え DNA 実験指針」に基づいて実施した。動物実験に関しては、京都大学動物実験委員会の承認のもと、「動物の保護および管理に関する法律」、「実験動物の飼育および保管に関する基準」、「大学等における実験動物の通知」に準拠し、動物実験が適切かつ愛護的に行われるよう配慮した。なお、本研究で該当する諸項目においては、上記京都大学の各委員会に事前申請を行い、その承認を受けた。

#### C. 研究結果

コリン欠乏食を投与した WT マウスでは 4 週目

から肝臓に脂肪の沈着を認め、12, 20週と徐々に脂肪沈着は増強した。コントロール食を投与した WT マウスでも同様の経過中、軽度の脂肪沈着を認めた。一方、NRDc KO マウスでは、脂肪沈着の程度はやや軽微であったが、経過中肝臓にやはり脂肪沈着を認めた。肝臓中の中性脂肪を測定したところ、WT マウスでも NRDc KO マウスでも、組織像に比例して中性脂肪の増加を認めた。しかし、血清中の肝逸脱酵素 (ALT) は、コリン欠乏食を投与した WT マウスのみで上昇し、NRDc KO マウスでは上昇を認めなかった。IL6 や IL1-beta などの炎症性サイトカインは、mRNA とタンパクのいずれも、コリン欠乏食を投与した WT マウスのみで上昇していた。しかし、TNF-alpha の mRNA は、コリン欠乏食の投与により WT マウスでも NRDc ノックアウトマウスでも上昇していた。TNF-alpha のタンパクは免疫染色上、コリン欠乏食の投与により WT マウスでも NRDc ノックアウトマウスでも肝臓組織に発現していた。肝臓組織を培養液中に浸し、TNF-alpha の分泌を検討したところ、TNF-alpha の分泌が NRDc KO マウスで有意に低下していることが示された。

#### D. 考察

コリン欠乏食の投与により、WT マウスおよび NRDc KO マウスの肝臓には脂肪沈着を認め、ヒトの脂肪肝を良く再現するモデルと考えられた。しかし、NRDc KO マウスでは、コリン欠乏食の投与によっても血清中の肝逸脱酵素 (ALT) が上昇せず、IL6 や IL1-beta などの炎症性サイトカインが上昇しなかったことから、NRDc の欠如により、単純性脂肪肝は生じて NASH に至らないことが示された。その原因として、NRDc KO マウスの肝臓で TNF-alpha が産生はされても十分に分泌されないことから、炎症性サイトカインのカスケードが遮断されてしまうことが原因と考えられた。

#### E. 結論

コリン欠乏食投与による動物実験は、ヒト脂肪肝および NASH を良く再現するモデルであることが確認された。NRDc の欠如によって、単純性脂肪肝は生じて NASH を生じなかったことから、NRDc は NASH の病態に極めて重要な役割を果たすことが示唆された。今後は、肝硬変への進展も含め、NRDc が NASH の病態に及ぼす影響を検討する必要がある。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

該当なし

##### 2. 学会発表

1. Kanda K, Kimura Y, Yoshioka T, Seno H, Chiba T. Nardilysin promotes gastric cancer growth by activating intrinsic cytokine signaling. The 4th JCA-AACR Special Joint Conference. December 17-18, 2013. Chiba, Japan, Bay Maihama Hotel Club Resort.
2. Chiba T, Kanda K, Seno H, Nishi E. Nardilysin and ADAM proteases promote gastric cancer cell growth by activating intrinsic cytokine signaling. Singapore Gastric Cancer Consortium. 6th Annual Scientific Meeting. July 25, 2013. Singapore, NUHS Tower Block Auditorium.

#### G. 知的所有権の取得状況

##### 1. 特許取得

該当なし

##### 2. 実用新案登録

該当なし

### 3. その他

該当なし

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

IV. 研究成果の刊行物・別刷



III. 研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
なし							

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
なし					

IV. 研究成果の刊行物・別刷

該当なし

