

3. 急性冠症候群バイオマーカーとしてのマイクロ RNA の可能性について

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
急性冠症候群バイオマーカーとしてのマイクロ RNA の可能性について

研究分担者：尾野 亘（京都大学大学院医学研究科 循環器内科学 講師）

研究要旨

細胞の中だけでなく、血液を含む体液にもマイクロ RNA が脂質膜に包まれて存在している。我々は心血管疾患の患者血清中のマイクロ RNA について検討した。その結果、急性冠症候群において、胸痛発症後トロポニン T よりも早期に末梢血に miR-133 が上昇し、これがトロポニン T とよく相関することを見出した。さらに、この血中マイクロ RNA が臓器間において情報を伝達する可能性についても明らかにした(Kuwabara Y et al. *Circulation: Cardiovascular Genetics*. 2011;4:446-454.)。さらに心血管疾患症例において血中および体液中の診断マーカー、情報伝達について検討をつづけている。

A. 研究目的

我々は、研究代表者と共同で、急性冠症候群患者血清における自己抗体発現パターンの解析、血清ナルディライジンの解析を行っている。一方で、心血管病における病態生理学的意義がまだ充分解明されていない核酸、特にマイクロ RNA の疾患バイオマーカー、あるいは予知マーカーとしての可能性を追求している。

マイクロ RNA は 22 塩基程度のタンパクをコードしない RNA であり、標的メッセンジャー RNA の翻訳を抑制する作用がある。心血管疾患の発症や進展にも深く関与していることが知られている。最近、筋肉特異的マイクロ RNA が急性心筋梗塞患者の血中において上昇する、という報告がなされているが、その上昇の意義や由来については完全には解明されていない。今回、急性心筋梗塞を含む種々の心血管疾患において、血中マイクロ RNA の診断における意義を解明することを目標とする。

B. 研究方法

京都大学循環器内科に入院した症例において、血清を保存し、症例ごとに特異的な血中プロファイルを持つマイクロ RNA を探索する。具体的には代表的な症例を 5 例ずつプールし、マイクロアレイにて特異的な変動を示した候補マイクロ RNA について定量的 PCR 法により集積した検体において測定を行う。さらに培養細胞を用いて、その機能、意義について検討を行う。

（倫理面への配慮）

「心血管疾患患者における血中バイオマーカーおよび RNA 発現レベルと病態との関連の検討（ヒト遺伝子解析承認番号 G-322）」は倫理委員会にて承認済みであり、倫理面で問題のないように進める。

C. 研究結果

血清中マイクロ RNA-1 と-133a が、急性冠症候群に対するバイオマーカーとして有用かどうかを Receiver Operating Characteristic 曲線にて評価

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 細胞培養液からエキソソームを分離し、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。また放出されたエキ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.
- 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- β 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

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

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^{-/-} 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^{-/-} 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)

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

2 . 実用新案登録

該当なし

3 . その他

該当なし