

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 准教授）

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、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。

心不全の病態に関与している可能性のあるマイクロ RNA を同定し、その診断能および病態形成への寄与を検討するのが本年度の研究の主目的である。心不全関連血中マイクロ RNA のスクリーニングのために、心不全の急性期および緩解期の血清を用いて検討を行う。同一個人の血清を比較して検討を行うことにより個体差を排除した病態に特異的なデータが得られるものと考えている。

B. 研究方法

急性心不全の増悪期と緩解期の血清サンプルを比較し、その変動から疾患関連マイクロ RNA 候補を選出する。このためのスクリーニングとしてプールした血清からマイクロ RNA を抽出し、定量的 PCR 法と RNA シークエンス法を用いて網羅的にマイクロ RNA の変動を検出した。これにより変動が確認されたマイクロ RNA については症

例ごとに個別に抽出および定量を行う。これらにより得られた発現量およびその変化のデータを臨床的情報と照らし合わせ、診断能や予後予測能を検定する。これらの臨床情報との相関から血清中のマイクロ RNA の働きとして想定されるものについては細胞・動物モデルにおいて更なる実験を行い、機能解明を行う。

（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

少数例のプールサンプルからの網羅的解析の結果、数種類のマイクロ RNA の変動が確認された。これは定量的 PCR 法および RNA シークエンス法のいずれにおいても確認されており、信頼性が高いものと考えている。具体的には臓器特異的な発現が知られているマイクロ RNA-X1、血管内皮機能に重要とされるマイクロ RNA-X2 の急性期での

上昇と治療による低下などが観察されている。これらの変動を今後、個別症例からの RNA 抽出および定量を行い確認する。また、個別の定量値と臨床データとの相関を検討する。また並行して動物の心不全モデルにおいても同様の結果が得られるかどうか検討を開始する。

D . 考察

心不全患者の診断における血清マイクロ RNA についての報告は少数散見されるが、いずれも健常者との比較で検討しており急性期の変動に着目した報告はまだ見られていない。我々は短期間の間に変動する疾患において、同一個体内での要素を比較することでその要素に与える当該疾患の純粋な影響を抽出することが可能であると考えている。急性心不全はこの条件によく合致する疾患であり、本研究は心不全にまつわる研究という観点だけでなく、生体におけるストレスが血清中のマイクロ RNA を変動させるモデルとしても非常に意義深いものであると考えている。

E . 結論

心不全の急性期において血清中のマイクロ RNA 量は変動している可能性が示唆された。また、これは異なる二つの方法によっても同様の結果が得られており結果の信頼性は高いものと考えられる。今後多症例における検討において同様の変動が確認されればこれらのマイクロ RNA の変動は心不全の病勢の変動を反映していると考えられ、心不全の診断に有用である可能性がある。

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. Horie T, Nishino T, Baba O, Kuwabara Y,

Nakao T, Nishiga M, Usami S, Izuhara M, Sowa N, Yahagi N, Shimano H, Hasegawa K, Kume N Yokode M, Kita T, Kimura T, Ono K. MicroRNA-33 encoded by an intron of sterol regulatory element-binding protein-2 (Srebp2) regulates Srebp1 in vivo. The 18th International Vascular Biology Meeting, 2014 April 14th, Kyoto, Japan.

2. Baba O, Horie T, Kuwabara Y, Chujo Y, Watanabe S, Kinoshita M, Horiguchi M, Nakamura T, Chonabayashi K, Hishizawa M, Hasegawa K, Kume N Yokode M, Kita T, Kimura T, Ono K. MicroRNA-33 deficiency reduces atherosclerotic plaque progression in apoE knockout mice. The 18th International Vascular Biology Meeting, 2014 April 14th, Kyoto, Japan.
3. Horie T, Nishino T, Baba O, Kuwabara Y, Nakano T, Nishiga M, Usami S, Izuhara M, Kimura T, Ono K. MicroRNA-33 deficiency leads to high fat diet- induced obesity and insulin resistance in vivo. European Society of Cardiology Congress 2014, 30 Aug 2014 - 4 Sep., Barcelona – Spain.
4. Nishino T, Horie T, Baba O, Kuwabara Y, Yokode M, Kita T, Kimura T, Ono K. MicroRNA-33, embedded in Srebf2 intron, regulate fatty acid synthesis through targeting SREBP-1 in vivo. European Society of Cardiology Congress 2014, 30 Aug 2014 - 4 Sep., Barcelona – Spain.
5. Horie T, Nishino T, Baba O, Kuwabara Y, Nakano T, Nishiga M, Usami S, Izuhara M, Kimura T, Ono K. Serum HDL-C decreases in microRNA-33b knock-in mice for an intron of sterol regulatory element-binding factor 1 (Srebf1). 9th Metabolic Syndrome, Type 2 Diabetes and Atherosclerosis Congress September 12-14, Kyoto, Japan.

6. Baba O, Horie T, Ono K, Kuwabara Y, Sowa N, Hasegawa K, Kume N, Yokode M, Kita T, Kimura T. MicroRNA-33 deficiency reduces atherosclerotic plaque progression in apoE knockout mice. 9th Metabolic Syndrome, Type 2 Diabetes and Atherosclerosis Congress September 12-14, Kyoto, Japan.
 7. Kuwabara Y, Horie T, Baba O, Nishiga M, Usami S, Izuhara M, Nakao T, Nishino T, Kita T, Kimura T, Ono K. MicroRNA-451 is involved in diabetic cardiomyopathy through suppression of the LKB1/AMPK pathway. 9th Metabolic Syndrome, Type 2 Diabetes and Atherosclerosis Congress September 12-14, Kyoto, Japan.
 8. Nishino T, Horie T, Baba O, Kuwabara Y, Yokode M, Kita T, Kimura T, Ono K. MicroRNA-33, embedded in Srebf2 intron, regulate fatty acid synthesis through targeting SREBP-1 in vivo. 9th Metabolic Syndrome, Type 2 Diabetes and Atherosclerosis Congress September 12-14, Kyoto, Japan.
 9. Current Topics in HDL-C~Novel regulation by microRNA-33 and implications for future therapeutic strategies~. Koh Ono. The 8th Otsuka Asia Atherosclerosis Conference Oct 11th-12th, 2014 Shanghai, China.
 10. Nishino T, Horie T, Baba O, Kuwabara Y, Nakao T, Nishiga M, Usami S, Izuhara M, Ide Y, Nakazeki F, Koyama S, Yokode M, Kita T, Kimura T, Ono K. MicroRNA-33, Located Within Srebf2 Intron, Regulate Fatty Acid Synthesis via Targeting SREBP-1 in vivo. American Heart Association Annual Scientific Sessions 2014, November 15-19, Chicago, Illinois, U.S.A.
 11. Horie T, Nishino T, Baba O, Kuwabara Y, Nakao T, Nishiga M, Usami S, Izuhara M, Ide Y, Nakazeki F, Koyama S, 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. American Heart Association Annual Scientific Sessions 2014, November 15-19, Chicago, Illinois, U.S.A.
 12. Wada H, Satoh-Asahara N, Akao M, Abe M, Ono K, Morimoto M, Shimatsu A, Takahashi Y, Hasegawa K. Self-rating Depression Scale Score as an Inverse and Independent Predictor of Successful Smoking Cessation with a Pharmacological Treatment for Nicotine Addiction. American Heart Association Annual Scientific Sessions 2014, November 15-19, Chicago, Illinois, U.S.A.
- 2.国内学会
1. 堀江貴裕. 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.第51回日本臨床分子医学会学術集会 YIA-3 日本臨床分子医学会奨励賞(YIA)受賞 平成26年4月11日, 東京.
 2. 桑原康秀. 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. 第51回日本臨床分子医学会学術集会 平成26年4月11日, 東京.
 3. 馬場 理. アポE欠損マウスにおいてマイクロRNA-33欠損は動脈硬化進展を抑制する. 第51回日本臨床分子医学会学術集会 平成26年4月11日, 東京.
 4. 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、尾野巨. 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. 第 1 回 Research Planet 平成 26 年 5 月 10 日,
5. 尾野 巨. Featured Session:最先端の病態研究 「microRNA-33 の動脈硬化・脂質制御における役割」. 第 46 回日本動脈硬化学会総会・学術集会 平成 26 年 7 月 10 日, 東京.
 6. 尾野 巨. 第 9 回五島雄一郎賞受賞講演 「High impact of microRNA-33 on atherosclerosis and lipid metabolism」. 第 46 回日本動脈硬化学会総会・学術集会 平成 26 年 7 月 11 日, 東京.
 7. 尾野 巨. 「脂質代謝を起点としたマイクロ RNA、転写因子の相互作用の解明」. 転写代謝システム班会議 平成 26 年 7 月 12 日, 仙台.
 8. 馬場 理、堀江貴裕、桑原康秀、木村 剛、尾野 巨. 「マイクロ RNA の骨髄機能および慢性炎症における役割」. 転写代謝システム班会議 平成 26 年 7 月 12 日, 仙台.
 9. 西野共達、堀江貴裕、尾野 巨. 「microRNA-33 は生体内で SREBP-1 を介して脂肪酸合成を制御する」. 転写代謝システム班会議 平成 26 年 7 月 12 日, 仙台.
 10. 「microRNA-33b knock-in mice for an intron of sterol regulatory element-binding factor 1 (Srebf1) exhibit reduced HDL-C in vivo」尾野 巨、堀江貴裕、西野共達、北徹、木村剛. 第 1 回 iHF フォーラム 平成 26 年 8 月 10 日,
 11. 尾野 巨、堀江貴裕、西野共達、北 徹、木村 剛. microRNA-33b knock-in mice for an intron of sterol regulatory element-binding factor 1 (Srebf1) exhibit reduced HDL-C in vivo. 第 5 回 Molecular Cardiovascular Conference 平成 26 年 9 月 5-6 日, 神戸ベイシェラトンホテル&タワーズ.
 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、井手裕也、中関典子、小山智史、木村 剛、尾野 巨. 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. 第 5 回 Molecular Cardiovascular Conference 平成 26 年 9 月 5-6 日, 神戸ベイシェラトンホテル&タワーズ.
 13. 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、中関典子、井手裕也、小山智史、曾和尚也、矢作直也、島野 仁、横出正之、北 徹、木村 剛、尾野 巨. Srebf1 のイントロンに microRNA-33b をノックインしたマウスは HDL コレステロールの減少を示す. 新学術領域研究 転写代謝システム 新学術領域若手ワークショップ 2015 年 2 月 6-7 日, 群馬県伊香保.
 14. 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 巨. 心肥大・心不全における lincRNA の機能解析. 新学術領域研究 転写代謝システム 新学術領域若手ワークショップ 2015 年 2 月 6-7 日, 群馬県伊香保.
 15. 中尾哲史、堀江貴裕、馬場 理、西賀雅隆、西野共達、宇佐美俊輔、桑原康秀、出原正康、中関典子、井手裕也、小山智史、曾和尚也、大野聡子、青木浩樹、木村 剛、尾野 巨. miR-33 ノックアウトマウスにおける大動脈瘤についての検討. 新学術領域研究 転写代謝システム 新学術領域若手ワークショップ 2015 年 2 月 6-7 日, 群馬県伊香保.
 16. 西野共達、堀江貴裕、馬場 理、桑原康秀、尾野 巨. microRNA-33b promotes atherosclerotic plaque formation in vivo. 新学術領域研究 転写代謝システム 新学術領域若手ワークショップ 2015 年 2 月 6-7 日,

群馬県伊香保.

17. 馬場理、堀江貴裕、伯野大彦、中島康弘、桑原康秀、中尾哲史、出原正康、宇佐美俊輔、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. マイクロRNA-33 の骨髄機能および慢性炎症における役割. 新学術領域研究 転写代謝システム 新学術領域若手ワークショップ 2015 年 2 月 6-7 日, 群馬県伊香保.
18. 尾野 亘. 「miR-33a/b による細胞・臓器レベルの脂質代謝制御機構」. 第 44 回日本心臓血管作動物質学会 シンポジウム 2 高血圧における臓器連関 2015 年 2 月 7 日, 高松.

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