

マイクロRNA制御による新たなNASH診断法・治療法の開発

京都大学医学部附属病院 循環器内科

助教 堀江 貴裕

(共同研究者)

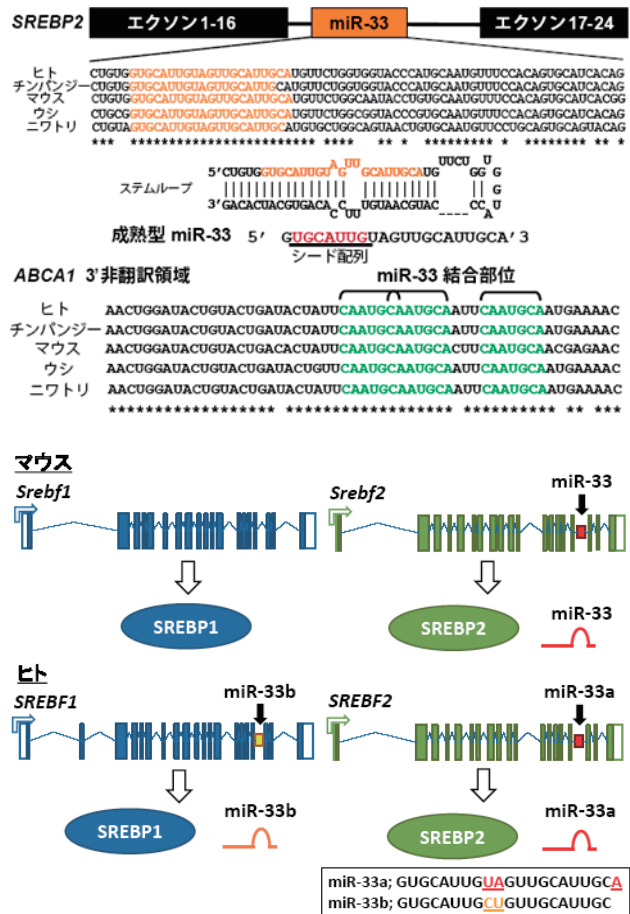
京都大学医学部附属病院 循環器内科 准教授 尾野 亘

京都大学医学部附属病院 循環器内科 教授 木村 剛

はじめに

内在性のマイクロRNA (microRNA; miRNA) とよばれる20塩基長程のnon-coding RNAが遺伝子発現を制御し、疾患形成に関与することが明らかとなってきた。miRNAは標的配列を有するメッセンジャーRNA (mRNA) の3' 端非翻訳領域 (UTR) に結合し、その遺伝子の翻訳抑制あるいはmRNAの分解を介して遺伝子の発現を負に制御しているとされる⁽¹⁾。miRNAは発生や分化に加え、癌、心血管疾患、脂質代謝異常などの種々の病態形成に関与することが明らかにされつつある⁽²⁻⁴⁾。

コレステロール代謝を制御する転写因子sterol regulatory element binding protein (SREBP) 2のイントロンに存在するmiR-33は右図のように種を超えて高度に保存されている。miR-33はコレステロール輸送体ATP-binding cassette subfamily A1(ABCA1)の発現を抑制し、細胞内コレステロール量を維持していることが明らかとなった⁽⁵⁻⁷⁾。ABCA1の3' UTRにはmiR-33の結合部位が種を超えて保存され存在している。miR-33欠損マウスは肝臓中ABCA1の発現が増加し、細胞外へのコレステロール輸送が増加し、血中HDL-Cの上昇を認めた⁽⁷⁾。アポE欠損マウスにおいてmiR-33aを欠損させると動脈硬化形成および大動脈瘤形成を抑制した^(8, 9)。さらにmiR-33欠損マウスは塩化カルシウム負荷による大動脈瘤形成にも抵抗



性を示した⁽⁹⁾。また、このマウスは肝臓の脂質合成がコレステロールから脂肪酸へ傾いていた⁽¹⁰⁾。一方、ヒトにはmiR-33aに加え、脂肪酸代謝を制御するSREBP1のイントロンにmiR-33aと相同性の高いmiR-33bが存在する(ヒトはmiR-33をmiR-33aと表記、前頁下図)。miR-33bをSREBP1のイントロンにノックインしたヒト化マウスでは、肝臓中ABCA1の発現低下、細胞外へのコレステロール輸送の減少、血中HDL-C低下を示した⁽¹¹⁾。従って、miR-33a/bは宿主遺伝子であるSREBP2/1と共に細胞内脂質代謝の恒常性維持に関わっていると考えられる⁽¹²⁾。

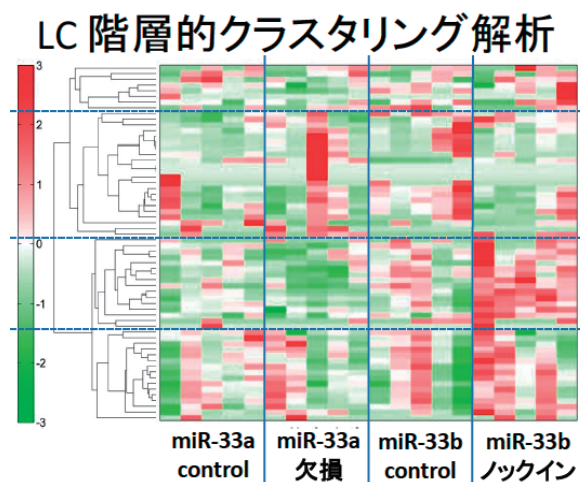
肝臓の炎症・線維化と脂質代謝は密接に関与しており、細胞内コレステロールの増加による小胞体ストレスや細胞死がNASHの一因とする報告もある。上記のとおり、miR-33は細胞内脂質代謝を変化させ、NASH形成に関与している可能性があり本研究を計画した。

結 果

まずmiR-33a/bの肝臓に対する役割の解析を細胞および生体において開始した。その結果を手掛かりとしてNASHの病態にせまり、疾患治療に展開していく予定である。

① miR-33欠損マウス、miR-33bノックインマウスの表現型解析

miR-33a欠損マウス、miR-33bノックインマウスに高脂肪・高コレステロール負荷を行い、肝臓の遺伝子変化、代謝産物の網羅的検討を行った。右図はそれらの一例でリピドミクス解析の結果であるが、各群において非常に特徴的なプロファイルを示した。現在、これらの結果をもとに肝臓の炎症・線維化に関わる因子を複数抽出し、検討を行っている。一方、miR-33a欠損マウスにおいて圧負荷心における線維芽細胞の増殖が抑制されていることが明らかとなった



た⁽¹³⁾。また、大動脈瘤の形成にも関与していることが明らかになった⁽⁹⁾。肝臓における線維化にもこのmiRNAが関与している可能性があり、引き続き肝臓の表現型解析を行っている。

② マウスからの初代培養細胞(肝細胞・肝stellate細胞)の単離および解析

コラゲナーゼ還流による初代肝臓細胞の採取およびNycodenzを用いた濃度勾配による初代stellate細胞の採取に成功した。miR-33の有無による遺伝子や機能の違いについて解析を行っている。Stellate細胞において、線維化、炎症に関わるmiR-33に制御される遺伝子群を同定した。現在、これらの遺伝子について生体で解析を行っている。

③ コンディショナルmiR-33 (a) 欠損マウスの作成および解析

細胞特異的、臓器特異的なmiR-33aの機能を明らかにするためにコンディショナルmiR-33a欠損マウスの作製を開始し、樹立に成功した。このマウスと全身でCreを発現するマウスとの交配においてmiR-33aがきちんと欠損し、全身のmiR-33a欠損マウスと同様にHDLコレステロールが増加することを確認した⁽¹³⁾。線維芽細胞特異的、肝細胞特異的miR-33a欠損マウスの作成を開始しており、これらのマウスの解析を引き続き行う予定である。

④ NAFLD/NASH患者の血清サンプルの解析

NAFLD/NASH患者の血清中のマイクロRNAの発現レベルを測定する。血清中のmiR-33a/bレベルは測定可能であることは確認しており、現在、解析を行っている。

考 察

マイクロRNA研究は、その機能制御による疾患治療や創薬標的、疾患マーカーとして注目されている分野である。NASHは、肝臓疾患以外にも糖代謝異常、脂質代謝異常、動脈硬化、癌などとの関連が強く示唆されている。病態解明は未だ途上であり、このため有効な治療法もないのが現状である。miR-33a/bの宿主遺伝子であるSREBP1/2はスタチンの標的であり、それらのイントロン存在するmiR-33b/aも創薬の標的となりうる。miR-33a/bがNASH形成に大きく寄与するならば、新たなNASH治療法の創薬標的につながる可能性がある。また、肝生検以外には現在のところ確立したNASH診断法はなく、より安全で簡便な診断法が望まれる。血清中のmiR-33a/bレベルがNASHの診断や治療効果の判定などに対して安全・簡便なマーカーとして有用であれば、早期発見・早期治療につながり、多くの患者にとって有益となりうる。我が国でもNASH患者は、食事の欧米化に伴い増加しており国内に200-300万人の患者がいるとの推定もある。生活習慣病に加え、肝がんをはじめ各種癌の発症が増加することが示されている。機序の解明及び治療法の開発が急務であり、本研究がこれらの解決の糸口になることを期待している。

要 約

転写因子 SREBP1およびSREBP2のイントロンに各々存在する miRNA (miR) -33b, miR-33a はコレステロール輸送体ABCA1の発現制御を介し、細胞内コレステロール恒常性を維持している。非アルコール性脂肪肝疾患の10人に一人は肝硬変や肝細胞がんなどに発展する可能性が高い非アルコール性脂肪肝炎(NASH)とされる。NASH患者数は近年増加し、糖・脂質代謝異常、動脈硬化、癌との関連が強く示唆されている。NASHは慢性炎症・線維化を特徴とする。その詳細な機序は明らかではないが、細胞内脂質の蓄積が一因とされている。本研究は、NASH形成におけるmiR-33a/bの役割を解明し、疾患治療応用への橋渡しを行うために

開始された。新たなNASH診断法・治療法を開発すべく、引き続きその機序の解明を行って
いきたい。

文 献

1. Bartel, D. P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* **116**, 281-97 (2004) .
2. van Rooij, E. & Olson, E. N. MicroRNA therapeutics for cardiovascular disease: opportunities and obstacles. *Nat Rev Drug Discov* **11**, 860-72 (2012) .
3. Rottiers, V. & Naar, A. M. MicroRNAs in metabolism and metabolic disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**, 239-50 (2012) .
4. Horie, T. et al. MicroRNAs and Lipoprotein Metabolism. *J Atheroscler Thromb* **21**, 17-22 (2014) .
5. Rayner, K. J. et al. MiR-33 contributes to the regulation of cholesterol homeostasis. *Science* **328**, 1570-3 (2010) .
6. Najafi-Shoushtari, S. H. et al. MicroRNA-33 and the SREBP host genes cooperate to control cholesterol homeostasis. *Science* **328**, 1566-9 (2010) .
7. Horie, T. et al. MicroRNA-33 encoded by an intron of sterol regulatory element-binding protein 2 (Srebp2) regulates HDL in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**, 17321-6 (2010) .
8. Horie, T. et al. MicroRNA-33 deficiency reduces the progression of atherosclerotic plaque in ApoE^{-/-} mice. *J Am Heart Assoc* **1**, e003376 (2012) .
9. Nakao, T. et al. Genetic Ablation of MicroRNA-33 Attenuates Inflammation and Abdominal Aortic Aneurysm Formation via Several Anti-Inflammatory Pathways. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **37**, 2161-2170 (2017) .
10. Horie, T. et al. MicroRNA-33 regulates sterol regulatory element-binding protein 1 expression in mice. *Nat Commun* **4**, 2883 (2013) .
11. Horie, T. et al. MicroRNA-33b knock-in mice for an intron of sterol regulatory element-binding factor 1 (Srebf1) exhibit reduced HDL-C in vivo. *Sci Rep* **4**, 5312 (2014) .
12. Ono, K. et al. MicroRNA-33a/b in lipid metabolism - novel "thrifty" models. *Circ J* **79**, 278-84(2015).
13. Nishiga, M. et al. MicroRNA-33 Controls Adaptive Fibrotic Response in the Remodeling Heart by Preserving Lipid Raft Cholesterol. *Circ Res* **120**, 835-847 (2017) .