

心血管代謝性疾患関連の非コードRNA制御による 新たな骨格筋治療法の開発

京都大学医学部附属病院 循環器内科
准教授 堀江 貴裕

(共同研究者)

京都大学医学部附属病院 循環器内科学

教授 尾野 亘

京都大学医学部附属病院 先制医療/生活習慣病センター

特定講師 馬場 理

はじめに

循環器疾患や糖尿病などの心血管代謝性疾患は超高齢化を迎える我が国において、健康寿命の延伸を目指して新たな治療法を開発するためにもその発症機序の解明が重要である。申請者らは非コードRNAの機能解析を一貫して行ってきた。特にSterol regulatory element-binding factor (SREBF)-2,1のイントロンにそれぞれ存在するマイクロRNA (miR)-33a/bが種々の脂質代謝関連遺伝子、炎症制御を行う遺伝子の発現を負に制御しており、様々な心血管代謝性疾患の原因となることを明らかとしてきた⁽¹⁾。miR-33a/bはコレステロール輸送体であるABCA1、脂肪酸代謝遺伝子のCPT1、CROT等様々な脂質代謝に重要な遺伝子を標的とし、その発現を負に制御する。特にABCA1は細胞内コレステロールを細胞外に排出し、抗動脈硬化・抗炎症作用を有するHDLコレステロールの形成に不可欠な分子である。miR-33a欠損マウスはこれら標的遺伝子の発現増加を示し、脂質代謝や炎症の改善を介して、動脈硬化や大動脈瘤の抑制、線維化の抑制等を示した⁽²⁻⁵⁾。通常のマウスはmiR-33bを発現しないが、申請者らが作成したmiR-33bノックイン (knock-in; KI) マウスは、ヒトと同様にmiR-33aに加え、それと相同性のあるmiR-33bを発現する⁽⁶⁾。このヒト化miR-33bKIマウスでは脂質代謝異常や炎症亢進を示し、動脈硬化や腹部大動脈瘤、さらには非アルコール性脂肪肝炎の悪化を示した⁽⁷⁻⁹⁾。また、人工核酸によるmiR-33bの抑制はこれらの治療に繋がる事も示してきた^(8,9)。一方で、骨格筋は全身の代謝を制御し、心血管代謝性疾患の形成に寄与する。骨格筋量はその予後に加え、患者ADLおよびQOLに直結する。

本研究では遺伝子改変動物実験や細胞実験を通して、骨格筋における非コードRNAであるmiR-33a/bの役割を詳細に明らかにする。骨格筋における非コードRNAの役割が明らかになれば、骨格筋関連疾患の病態解明ひいては治療法の開発へつなげることが可能と考え検討を開始した。

結 果

まず、ヒトおよびマウスの臓器においてmiR-33aの発現レベルを検討したところ、骨格筋において肝臓と同等レベルに発現していることを確認した。さらに骨格筋芽細胞であるC2C12の分化過程においてmiR-33aが誘導されることも明らかとなった。次に野生型およびmiR-33a欠損マウスの下腿の骨格筋(前脛骨筋)に神経毒であるカルディオトキシンの注射を行い、骨格筋の変性を誘導し、その後の骨格筋再生過程を観察した。この過程においてもmiR-33aは発現増加を認め、miR-33a欠損マウスにおいて骨格筋の再生が著明に促進することが明らかになった。組織学的には骨格筋の再生に重要な幹細胞である筋衛星細胞(Pax7陽性細胞)の量が、miR-33a欠損マウスで有意に増加していることが明らかとなった。また、miR-33aの標的遺伝子として細胞周期を制御するCDK6の発現がmiR-33a欠損マウスで増加を示していた。

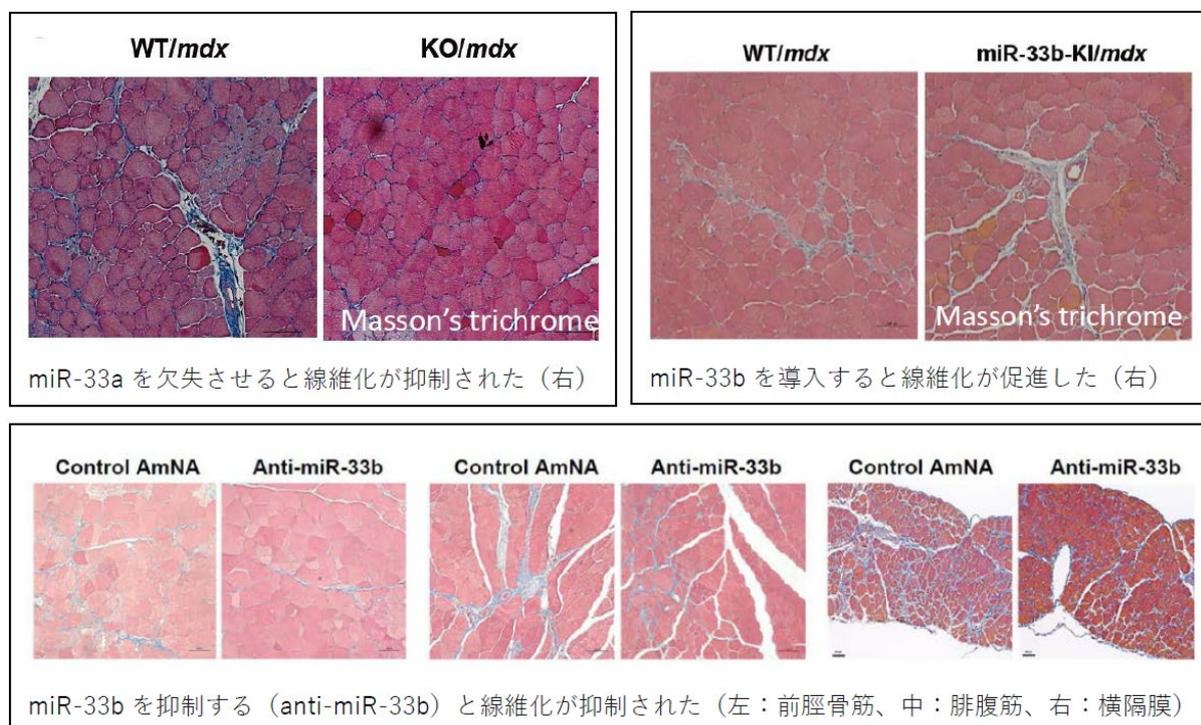
引き続き、miR-33a/bの生体での骨格筋における役割をより明らかにするために、筋ジストロフィーマウスモデルであるmdxマウスを用いた検討を行った。筋ジストロフィーは進行性の骨格筋変性と筋力低下をきたす遺伝性疾患で、デュシェンヌ型筋ジストロフィーは最重症型とされている。mdxマウスはデュシェンヌ型筋ジストロフィーの疾患モデルマウスであり、責任遺伝子であるジストロフィンにナンセンス変異を有し、ヒト患者と同様にジストロフィンが発現せず、骨格筋障害を引き起こす。mdxマウスの骨格筋において、miR-33aの発現は野生型マウスと比較して増加を示していた。そこでmiR-33a欠損マウスとmdxマウスを交配してmiR-33a欠損・mdxマウスを作成し、mdxマウスと比較を行った。8週齢での検討で、血清中のCKなどの筋逸脱酵素の量がmiR-33a・mdxマウスにおいて有意に低下を示し、トレッドミルなどでの運動耐容能も保持されていた。さらに組織学的には骨格筋線維の肥大が促進し、線維化が軽減していることが明らかとなった(図1)。一方で、miR-33bKI・mdxマウスは逆の表現型を示し、血清中の筋逸脱酵素の増加、運動耐容能の低下、骨格筋線維の萎縮及び線維化の亢進を示した(図1)。遺伝子解析を行ったところ、CDK6、FST、ABCA1などの細胞増殖、骨格筋分化、炎症に関わるmiR-33a/bの標的遺伝子の発現が変化していることが明らかとなった。従って、miR-33a/bはこれらの遺伝子の発現を介して、骨格筋の幹細胞とされる筋衛星細胞の増殖や筋細胞への分化を抑制していると考えられた。次にマウス骨格筋からの初代培養細胞の樹立を試みた^(10, 11)。8週令の雄のマウスの前脛骨筋を採取し、Type II コラゲナーゼで60分間処理を行った。その後、18Gの針を用いて懸濁を行った後に、70 μ mのセルストレーナーでフィルターを行い、コラーゲンコートをしたDishへ播種して培養を行った。得られた初代骨格筋芽細胞を通常培地(20%のウシ胎児血清培地)で増殖させたのちに低血清培地(2%のウマ血清培地)に変えることにより、骨格筋への分化が得られた。この細胞においてもmiR-33a欠損は細胞増殖および筋肥大の表現型を示した。

さらに治療応用として、miR-33a/bを抑制することのできる人工核酸を作成してmdxマウスに投与した。骨格筋に50 μ gを直接投与した際にはコントロールと比較してmiR-33a/

bを抑制する人工核酸は標的遺伝子の発現増加が認められ、骨格筋障害及び線維化の軽減が認められた。さらに全身投与として20mg/kg/週で4週間の皮下投与を行った。局所投与と同様にmiR-33a/bを抑制する人工核酸の投与により標的遺伝子の発現増加とともに、mdxマウスの骨格筋障害及び線維化の軽減、運動耐容能の改善が認められた(図1)。この骨格筋サンプルを用いて網羅的な遺伝子解析を行ったところ、miR-33a/bの標的遺伝子群に加えて、骨格筋の肥大や再生、細胞増殖に関わる遺伝子群の発現増加していることが確認された。ヒトでの関連を明らかにするために、デュシェンヌ型筋ジストロフィー患者由来のiPS細胞から分化させた筋管にmiR-33a/bを阻害する人工核酸を投与したところ、この細胞においてもマウスと同様の標的遺伝子の変化を示した。従って、miR-33a/bの阻害は筋ジストロフィーの新たな治療法につながると考えられた^(12, 13)。

図1

骨格筋のマッソントリクローム染色（青色：線維化を示す）



考 察

脂質代謝異常、動脈硬化性疾患、代謝異常関連脂肪肝炎をはじめとする心血管代謝性疾患とmiR-33a/bの関係について明らかとなりつつある。一方で骨格筋は全身の代謝に大きく影響を与え、心血管代謝性疾患においても骨格筋との関連が報告されつつある。本研究では骨格筋における非コードRNAの働きに注目して検討を行った。本検討から、miR-33a/bは骨格筋の再生、肥大に重要な働きを持っており、骨格筋障害や筋ジストロフィーの病態形成にも密接に関わっていることを見出した。また、筋ジストロフィーのモデルマウスにおいて

miR-33を欠損させる、あるいはmiR-33を抑制する人工核酸の投与によりその病態を大きく改善させることが明らかとなった。本研究の成果は、いまだ十分な治療薬が存在しない筋ジストロフィー等に対する新たな治療法の開発につながる可能性もあり、臨床応用を目指してさらに検討を重ねていきたい。

要 約

心血管代謝性疾患の発症に関わると考えるmiR-33が骨格筋組織に影響を与えることが本検討から示唆された。さらに詳細な検討を重ねることにより、骨格筋関連疾患の病態解明ひいては治療応用につながると期待される。

最後に、今回、多大なご支援をいただきました大和証券財団およびその関係者の方々に深く御礼を申し上げます。

文 献

1. Horie T, Baba O, Kuwabara Y, Yokode M, Kita T, Kimura T, et al. MicroRNAs and Lipoprotein Metabolism. *J Atheroscler Thromb*. 2014;21(1):17-22.
2. Horie T, Ono K, Horiguchi M, Nishi H, Nakamura T, Nagao K, et al. MicroRNA-33 encoded by an intron of sterol regulatory element-binding protein 2 (Srebp2) regulates HDL in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(40):17321-6.
3. Horie T, Baba O, Kuwabara Y, Chujo Y, Watanabe S, Kinoshita M, et al. MicroRNA-33 deficiency reduces the progression of atherosclerotic plaque in ApoE^{-/-} mice. *J Am Heart Assoc*. 2012;1(6):e003376.
4. Nakao T, Horie T, Baba O, Nishiga M, Nishino T, Izuhara M, et al. Genetic Ablation of MicroRNA-33 Attenuates Inflammation and Abdominal Aortic Aneurysm Formation via Several Anti-Inflammatory Pathways. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2017;37(11):2161-70.
5. Nishiga M, Horie T, Kuwabara Y, Nagao K, Baba O, Nakao T, et al. MicroRNA-33 Controls Adaptive Fibrotic Response in the Remodeling Heart by Preserving Lipid Raft Cholesterol. *Circ Res*. 2017;120(5):835-47.
6. Horie T, Nishino T, Baba O, Kuwabara Y, Nakao T, Nishiga M, 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*. 2014;4:5312.
7. Nishino T, Horie T, Baba O, Sowa N, Hanada R, Kuwabara Y, et al. SREBF1/MicroRNA-33b Axis Exhibits Potent Effect on Unstable Atherosclerotic Plaque Formation In Vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2018;38(10):2460-73.
8. Yamasaki T, Horie T, Koyama S, Nakao T, Baba O, Kimura M, et al. Inhibition of microRNA-33b specifically

- ameliorates abdominal aortic aneurysm formation via suppression of inflammatory pathways. *Sci Rep.* 2022;12(1):11984.
9. Miyagawa S, Horie T, Nishino T, Koyama S, Watanabe T, Baba O, et al. Inhibition of microRNA-33b in humanized mice ameliorates nonalcoholic steatohepatitis. *Life Sci Alliance.* 2023;6(8).
 10. Motohashi N, Asakura Y, and Asakura A. Isolation, culture, and transplantation of muscle satellite cells. *J Vis Exp.* 2014(86).
 11. Danoviz ME, and Yablonka-Reuveni Z. Skeletal muscle satellite cells: background and methods for isolation and analysis in a primary culture system. *Methods Mol Biol.* 2012;798:21-52.
 12. Sowa N, Horie T, Ide Y, Baba O, Kora K, Yoshida T, et al. MicroRNA-33 inhibition ameliorates muscular dystrophy by enhancing skeletal muscle regeneration. *EMBO Mol Med.* 2025;17(8):1902-25.
 13. Lopez MA, and Alexander MS. miR-33 inhibition as a novel therapeutic approach for treating muscular dystrophy. *EMBO Mol Med.* 2025;17(8):1893-5.