

ノンコーディング RNA を介した新規 NASH 診断法・治療法の開発

堀江貴裕

京都大学大学院医学研究科 循環器内科学

【研究の背景】

内在性のマイクロ RNA (microRNA; miRNA) とよばれる 20 塩基長程のノンコーディング RNA が遺伝子発現を精巧に調節していることが明らかとなった。ヒトは約 2500 種類の miRNA が同定されている。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 は発生や分化のみならず、癌、心血管代謝疾患などの病態形成に関与することが明らかにされつつある²⁾。

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³⁾。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)。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⁴⁾。従って、miR-33a/b は 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。

非アルコール性脂肪肝疾患 (NAFLD) は、内臓脂肪型肥満を基盤としたメタボリックシンドロームの肝病変であり、日本では検診受診の 9-30% が NAFLD と言われている。この 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) と言われている。NASH 患者数は近年増加し、肝臓疾患以外にも糖脂質代謝異常、動脈硬化、癌などとの関連が強く示唆されている。NAFLD の一部が慢性炎症と線維化を特徴とする NASH に移行するが、その機序解明は未だ途上であり、有効な治療法がない。肝臓の炎症、線維化は脂質代謝と密接に関係することが明らかとなりつつある。本研究では脂質代謝を制御する miR-33 と NAFLD/NASH との関係を明らかにすることにより、新たな治療法への手がかりを得ることを目的とする。

【目 的】

ノンコーディング RNA を介した新たな NAFLD/NASH の診断法・治療法を開発する。

【方 法】・【結 果】

肝臓の炎症および線維化と脂質代謝は密接に関与しており miR-33a/b のそれらに対する役割の解析を行う。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。

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-33 欠損マウスは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⁵⁾。従って、肝臓における線維化にも関与している可能性がある。様々な食事負荷による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。

③ コンディショナル miR-33(a)欠損マウスの作製・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 欠損マウスを作製した。このマウスにおいて全身で Cre を発現するマウスとの交配で、miR-33a が欠損し、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⁵⁾。線維芽細胞特異的な miR-33a 欠損マウスの作製も行った⁵⁾。

④ NAFLD/NASH 患者の肝生検サンプルおよび血清サンプルの解析

NAFLD/NASH 患者の肝生検サンプルの遺伝子発現と血清中のマイクロ RNA の発現レベルを測定する。現在、症例を増加させているが、肝臓及び血清中の miR-33a/b レベルは測定可能であることはすでに実験で確認している。

【考 察】・【臨床的意義・臨床への貢献度】

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。その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。また、肝生検以外には今のところ確立した NASH 診断法はなく、より安全で簡便な診断法が望まれる。miR-33a/b が NASH 形成に大きく寄与するならば、新たな NASH 治療法の確立につながる可能性がある。また、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より安全・簡便なマーカーとして有用である可能性がある。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 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おり、早急にその機序の解明及び根本治療の開発が必要であり、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。

【参考・引用文献】

1. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004;116:281-97.
2. Rottiers V, Naar AM. MicroRNAs in metabolism and metabolic disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2012;13:239-50.
3. Horie T, Ono K, Horiguchi M, Nishi H, Nakamura T, Nagao K, Kinoshita M, Kuwabara Y, Marusawa H, Iwanaga Y, Hasegawa K, Yokode M, Kimura T, Kita T. 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;107:17321-6.
4. Horie T, Nishino T, Baba O, Kuwabara Y, Nakao T, Nishiga M, Usami S, Izuhara M, Nakazeki F, Ide Y, Koyama S, Sowa N, Yahagi N, Shimano H, Nakamura T, Hasegawa K, Kume N, 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. *Sci Rep*. 2014;4:5312.
5. Nishiga M, Horie T, Kuwabara Y, Nagao K, Baba O, Nakao T, Nishino T, Hakuno D, Nakashima Y, Nishi H, Nakazeki F, Ide Y, Koyama S, Kimura M, Hanada R, Nakamura T, Inada T, Hasegawa K, Conway SJ, Kita T, Kimura T, Ono K. MicroRNA-33 Controls Adaptive Fibrotic Response in the Remodeling Heart by Preserving Lipid Raft Cholesterol. *Circ Res*. 2016.