

令和元年6月17日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08600

研究課題名(和文)新規VEGF受容体結合因子に基づく血管新生制御法の検討

研究課題名(英文) Regulation of angiogenesis by a novel VEGF receptor binding protein

研究代表者

林 寿来 (Hayashi, Hisaki)

愛知医科大学・医学部・講師

研究者番号：30533715

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：G蛋白活性調節因子(AGS8)は血管内皮細胞増殖因子(VEGF)受容体に結合してVEGFシグナルを制御する分子である。VEGFは加齢黄斑変性における脈絡膜血管新生の増悪因子であり、加齢黄斑変性治療における分子標的である。本研究ではAGS8発現制御による新しい抗血管新生制御法の検討を行った。その結果、脈絡膜由来の内皮細胞においてAGS8はVEGFシグナルを制御していること、AGS8蛋白の発現は加齢黄斑変性の実験モデルにおける脈絡膜血管新生部位に特異的であること、AGS8の発現抑制は脈絡膜新生血管の発達を抑制した。AGS8は加齢黄斑変性治療における標的分子になりうる可能性を示すことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

失明原因ともなる加齢黄斑変性において脈絡膜血管新生の抑制が治療の鍵となるとされている。実際に現在ではVEGFを分子標的とした抗血管新生療法が行われているところであるが、VEGFは全身の血管に発現しており、抗VEGF療法では種々の副作用が報告されている。本研究において、加齢黄斑変性のモデルマウスでは、VEGF受容体結合分子であるAGS8は脈絡膜内皮細胞の新生血管部位にのみ限定的に発現しており、その発現抑制が効果的にVEGFシグナルおよび脈絡膜血管新生を抑制することが明らかになった。そのため、AGS8は加齢黄斑変性治療においては副作用の少ない特異的な新しい分子標的になりうる可能性が考えられる。

研究成果の概要(英文)：Vascular endothelial cell growth factor (VEGF) is essential for the development and progression of age-related macular degeneration (AMD), and VEGF signaling molecules are effective targets for the treatment of AMD. I have recently reported that activator of G-protein signaling 8 (AGS8) is a novel VEGF receptor-binding protein and is involved in VEGF-induced angiogenesis in cultured endothelial cells (EC); however, the role of AGS8 in CNV is not yet understood. This study aimed to explore the role of AGS8 in CNV in cultured cells, explanted choroid tissue, and laser-induced CNV in a mouse AMD model. Here, I finally reached my conclusion that AGS8 is a possible novel therapeutic target molecule for CNV in AMD.

研究分野：医化学

キーワード：加齢黄斑変性 血管新生 脈絡膜 G蛋白活性調節因子 VEGF

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

本邦において超高齢化時代の到来に従い、失明原因として加齢黄斑変性が急増している。加齢黄斑変性では黄斑が様々な異常をきたすことが知られているが、なかでも滲出型と分類されるタイプでは、脈絡膜由来の血管が黄斑部に漏出して血管新生を起こす結果、網膜機能を破綻する。そのため、血管新生の抑制こそが滲出型加齢黄斑変性疾患の治療の鍵となるとされている。実際に現在では血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) を分子標的とした抗血管新生療法が行われているところであるが、種々の副作用等が報告されている。一方で、申請者の所属する研究グループでは以前新しい三量体 G 蛋白活性調節因子として Activator of G-protein Signaling 8 (AGS8) を同定した。申請者はこれまで培養細胞を用いた研究を行い、AGS8 は血管内皮増殖因子受容体(VEGFR-2)と結合して活性を制御する分子であり、血管内皮細胞において血管新生を制御していることを明らかにしてきた。

2. 研究の目的

本研究では脈絡膜血管内皮細胞において AGS8 が誘導する血管新生分子メカニズムの詳細を明らかにするとともに、光凝固レーザー照射による実験的加齢黄斑変性症モデルマウスを作成し、AGS8 分子の発現制御による血管新生の抑制を検討する。以上をもって、AGS8 を標的として VEGF シグナルを制御する新しい加齢黄斑変性の制御法の検討を行う。

3. 研究の方法

サル脈絡膜由来の培養血管内皮細胞 (RF6/A) を用いて、AGS8 発現抑制における VEGF シグナル伝達および細胞機能に対する影響を解析した。さらに、マウス脈絡膜初代培養を行い、移植片から出芽する脈絡膜血管内皮細胞における AGS8 機能の解析を行った。また、マウスの目にレーザー照射を行い網膜色素上皮細胞に障害を作成、新生血管を誘導する加齢黄斑変性モデル動物を作成した。このマウスモデルにおける AGS8 の発現パターンを免疫染色法で解明するとともに、AGS8 siRNA を硝子体に投与することで眼組織における AGS8 の機能阻害を誘導し、新生血管にどのような影響を与えるのかについて解析を行った。

4. 研究成果

脈絡膜由来の血管内皮細胞 RF6/A 細胞において、SiRNA 導入によって AGS8 ノックダウンを行ったところ、VEGF が惹起する VEGF 受容体や下流シグナル(Akt および p38/MAPK リン酸化)が抑制され、管腔形成能が低下した(図1)。C57BL/6N 種のマウス眼球より脈絡膜を単離、細切、血管内皮用の培養液中で Matrigel コーティングしたカバーガラス上で培養を行った。Flow cytometer 解析の結果、組織片から外側に向かって移動する細胞の 70% 以上が血管内皮細胞であることを確認している。同時に、移動中の細胞は AGS8 抗体による免疫染色により、ほぼ 100% が AGS8 分子を発現していることを確認している(図2)。そこで、SiRNA を用いて AGS8 遺伝子の発現をノックダウンし、組織片から外側に移動する細胞の解析を行った。その結果、対照に比べて AGS8 ノックダウンでは、細胞移動が有意に抑制することが明らかになった。8 週齢オス C57BL/6N マウスに対して光凝固レーザーの照射を行い、加齢黄斑変性モデルを作成した。その結果、AGS8 は特異的に新生血管のみに発現していることが確認された(図3)。さらに AGS8 siRNA の硝子体投与による AGS8 の発現抑制は、脈絡膜血管新生を特異的に抑制することが明らかになった(図4)。以上の結果から、AGS8 は脈絡膜内皮細胞において VEGF シグナルを制御し、生体内で血管新生を制御していること、また AGS8 発現の抑制は脈絡膜血管新生を特異的に抑制することが明らかになった。本研究において、AGS8 は加齢黄斑変性治療における標的分子になりうる可能性を示すことができた。

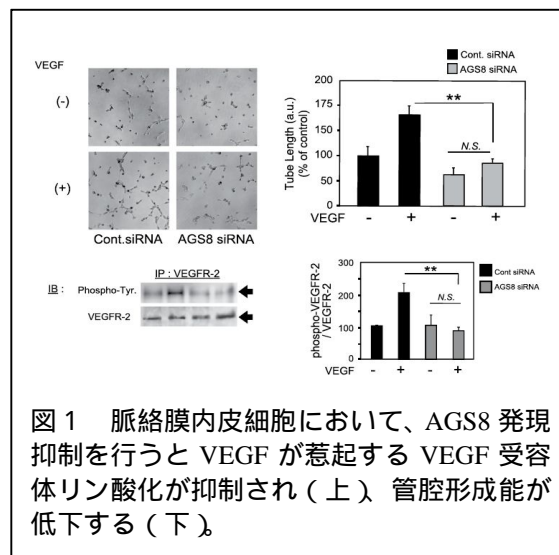


図1 脈絡膜内皮細胞において、AGS8 発現抑制を行うと VEGF が惹起する VEGF 受容体リン酸化が抑制され(上)、管腔形成能が低下する(下)。

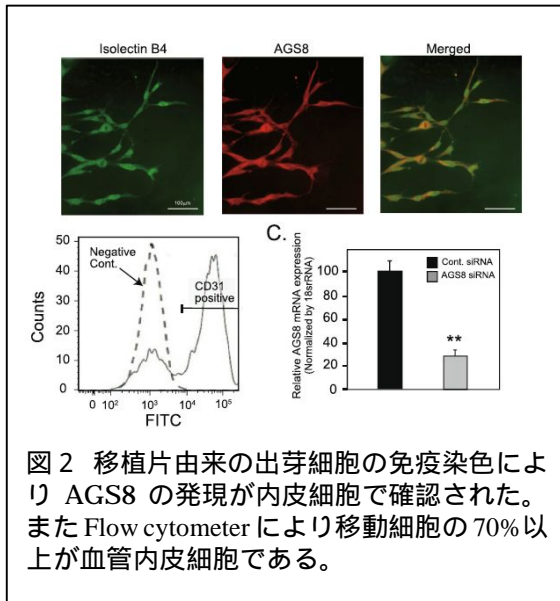


図2 移植片由来の出芽細胞の免疫染色により AGS8 の発現が内皮細胞で確認された。また Flow cytometer により移動細胞の70%以上が血管内皮細胞である。

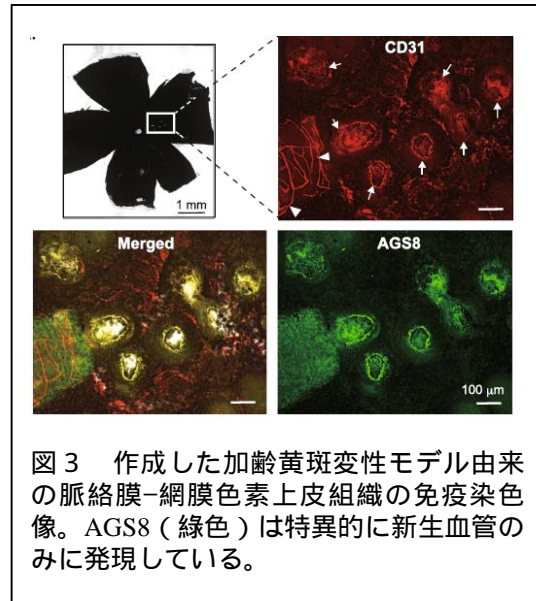


図3 作成した加齢黄斑変性モデル由来の脈絡膜-網膜色素上皮組織の免疫染色像。AGS8 (緑色) は特異的に新生血管のみに発現している。

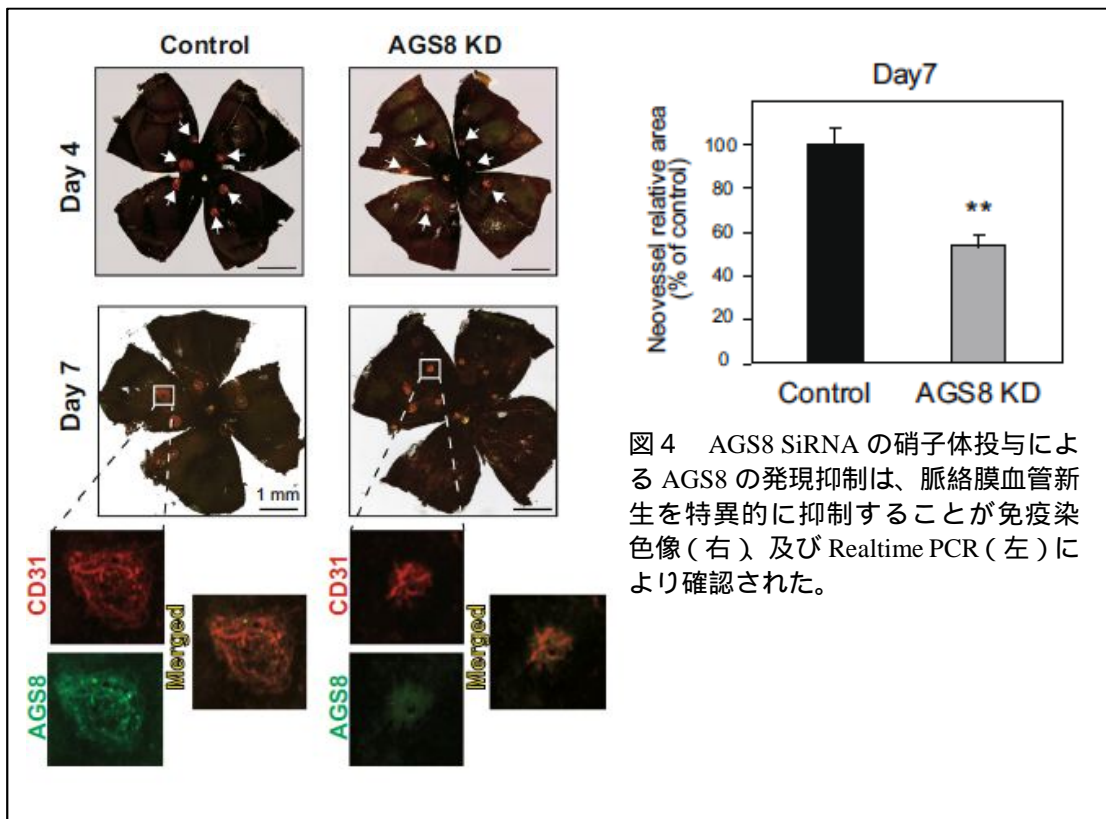


図4 AGS8 SiRNA の硝子体投与による AGS8 の発現抑制は、脈絡膜血管新生を特異的に抑制することが免疫染色像 (右) 及び Realtime PCR (左) により確認された。

5 . 主な発表論文等
〔雑誌論文〕(計 7 件)

Hayashi H, Mamun AA, Takeyama M, Yamamura A, Zako M, Yagasaki R, Nakahara T, Kamei M, Sato M. Activator of G-protein signaling 8 is involved in VEGF-induced choroidal neovascularization. Scientific Reports 9(1): 1560, 2019.

Sakima M, Hayashi H, Mamun AA, Sato M. VEGFR-3 signaling is regulated by a G-protein activator, activator of G-protein signaling 8, in lymphatic endothelial cells. Experimental Cell Research 368(1): 13-23, 2018.

Kinoshita H, Watanabe K, Azma T, Feng G-G, Akahori T, Hayashi H, Sato M, Fujiwara Y, Wakatsuki A. Human serum albumin and oxidative stress in preeclamptic women and the mechanism of albumin for stress reduction. *Heliyon* 3(8): e00369, 2017.

Mamun AA, Hayashi H, Sakima M, Sato M. Adenosine triphosphate is a critical determinant for VEGFR signal during hypoxia. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 311(6): C985-C995, 2016.

Nakamura E, Kinoshita H, Feng GG, Hayashi H, Satomoto M, Sato M, Fujiwara Y. Sevoflurane inhalation accelerates the long-term memory consolidation via small GTPase overexpression in the hippocampus of mice in adolescence. *PLoS One* 11(9): e0163151, 2016.

Yasuda Y, Feng GG, Li J, Nakamura E, Hayashi H, Sato M, Fujiwara Y, Kinoshita H. High oxygen modifies vasodilator effect of cysteine via enhanced oxidative stress and thromboxane production in the rat mesenteric artery. *Pflugers Archiv: European Journal of Physiology* 468(9): 1555-64, 2016.

Hayashi H, Mamun AA, Sakima M, Sato M. Activator of G-protein signaling 8 is involved in VEGF-mediated signal processing in angiogenesis. *Journal of Cell Science* 129(6): 1210-1222, 2016.

〔学会発表〕(計 8 件)

第 6 3 回中部日本生理学会

林寿来, Abudollah Al Mamun, 佐喜眞未帆, 佐藤元彦. G タンパク活性調節因子 AGS8 は脈絡膜血管新生を制御する. 2016.11.3 ~ 2016.11.4 岡崎市
心血管膜輸送研究会 2016

Hisaki Hayashi, Mamun Abudulla Al, Miho Sakima, Rina Yagasaki, Tsutomu Nakahara, Motohiko Sato. The role of activator of G-protein 8 in choroidal vascular formation. 2016.10.24 ~ 2016.10.25 福岡市

第 9 0 回日本薬理学会

Hisaki Hayashi, Abdullah Al Mamun, Miho Sakima, Masayuki Takeyama, Masahiro Zako, Rina Yagasaki, Tsutomu Nakahara, Motohiko Sato. Inhibition of choroidal angiogenesis by targeting a regulatory protein for heterotrimeric G-protein. 2017.3.15 ~ 2017.3.17 長崎市

第 9 3 回日本生理学会

G-protein. Hisaki Hayashi, Abdullah Al Mamun, Miho Sakima, Masayuki Takeyama, Masahiro Zako, Rina Yagasaki, Tsutomu, Nakahara, Motohiko Sato. Activator of G-protein signaling 8 is involved in VEGF-induced choroidal angiogenesis. 2017.3.28 ~ 2017.3.30 浜松市

Experimental Biology 2017

Hisaki Hayashi, Abdullah Al Mamun, Miho Sakima, Masayuki Takeyama, Masahiro Zako, Rina Yagasaki, Tsutomu Nakahara, Motohiko Sato. Activator of G-protein signaling 8 is involved in VEGF-induced choroidal angiogenesis. 2017.4.22 ~ 2017.4.26 Chicago, USA

第 6 4 回中部生理学会

林寿来 Mamun Abdulla Al 佐喜眞未帆 武山正行 雑喉正泰 矢ヶ崎莉菜 中原努 瓶井資弘 佐藤元彦 G 蛋白活性調節因子による脈絡膜血管新生の制御 2017.10.6 - 2017.10.7 甲府市

第27回日本病態生理学会

林 寿来 Mamun Abdullah Al 佐喜眞 未帆 山村彩 武山正行 雑喉正泰 矢ヶ崎莉菜 中原努 瓶井 資弘、佐藤 元彦 脈絡膜血管新生における AGS8 の意義. 2017.8.18 – 2017.8.18 小平市

The 9th FAOPS Congress

Hisaki Hayashi. Role of activator of G-protein signaling (AGS) 8 in vascular development and choroidal neovascularization. 2019.3.28 – 2019.3.31 神戸市

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：中原努

ローマ字氏名：Tsutomu Nakahara

所属研究機関名：北里大学

部局名：薬学部

職名：教授

研究者番号 (8 桁): 10296519

(2)研究協力者

研究協力者氏名：雑喉正泰

ローマ字氏名： Masahiro Zako