

令和 4 年 5 月 20 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K16926

研究課題名(和文) 脈絡膜血管形態及び脈絡膜血管新生におけるYAP/TAZの役割の解明

研究課題名(英文) The role of YAP/TAZ in chorioidal vascular structure and chorioidal neovascularization

研究代表者

松宮 亘 (Matsumiya, Wataru)

神戸大学・医学研究科・助教

研究者番号：30707120

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的はHippo経路エフェクターであるYAP/TAZの脈絡膜血管新生(CNV)への役割を明らかにすることである。レーザー誘発CNVモデルを用いたYAP阻害薬ベルテポルフィン(VP)の効果を検査した実験では、VP処理によりCNV体積は有意に小さい結果であった。そのためVPはYAP阻害作用により、CNV進展を抑制し得る可能性が示唆された。またヒト脈絡膜血管内皮細胞を用いて脈絡膜血管におけるYAPに対するVPの影響を調べ、VP濃度の増加に伴ってpYAPの核内以降が抑制されている結果であった。以上から脈絡膜血管においてYAPが重要な役割を担っている可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、加齢黄斑変性(AMD)の一亜型であるポリープ状脈絡膜血管症(PCV)の治療において、YAP阻害作用を持つベルテポルフィンを用いた光線力学療法の有効性が臨床的に注目されている。本研究では、AMDの病態の首座である脈絡膜血管においてYAPが重要な役割を担っている可能性が示唆された。本研究の結果が、今後、YAPを介するHippo経路をターゲットにしたAMD及びPCV治療の臨床応用につながる可能性が期待される。

研究成果の概要(英文)：This study aims to clarify the role of the Hippo pathway effector YAP / TAZ in chorioidal angiogenesis (CNV). In an experiment to see the effect of the YAP inhibitor, verteporfin (VP), using a laser-induced CNV model, the CNV volume was significantly smaller in VP treatment than in control. Thus, it was suggested that VP might suppress CNV progression by YAP inhibitory action. We also investigated the effect of VP on YAP in chorioidal blood vessels using human chorioidal vascular endothelial cells and found that as the VP concentration increased, the intranuclear transition of pYAP was suppressed. The above suggests that YAP may play an important role in chorioidal blood vessels.

研究分野：血管新生と脈絡膜

キーワード：YAP/TAZ pYAP 脈絡膜新生血管 脈絡膜 脈絡膜血管内皮細胞 ベルテポルフィン

1. 研究開始当初の背景

臨床において網膜血管新生疾患の加齢黄斑変性症(AMD)は、先進国における 50 歳以上の中途失明原因の第 1 位であり、我が国でも中途失明原因の第 4 位となっている。滲出型 AMD は、典型 AMD, ポリープ状脈絡膜血管症(PCV), 網膜血管腫様増殖(RAP)の 3 つのサブタイプに分けられるが、欧米では典型 AMD が AMD 全体の大部分を占めるのに対し、本邦ではポリープ状脈絡膜血管症(PCV)の割合が半数以上と多いという特色がある。

PCV は脈絡膜より発生する異常血管網の先端にポリープ状病巣を有する形態学的特徴があり、治療への反応が典型 AMD と異なることが临床上問題となっている。例えば、典型 AMD を対象としたランダム化比較試験(RCT) (抗血管内皮増殖因子(VEGF)薬単独群 vs. 抗 VEGF 薬 + ベルテポルフィンによる光線力学療法(vPDT)併用群)では併用療法の効果は限定的であったのに対し(Larsen M, et al. Ophthalmology 2012)、PCV を対象にした RCT では、抗 VEGF 薬単独群に比して抗 VEGF 薬+vPDT 併用群において良好な視力改善と治療回数の軽減、高いポリープ病巣の閉塞率が確認されている(Koh A, et al. JAMA Ophthalmol 2017)。PCV の治療結果に大きく影響を及ぼすという点でポリープ病巣が重要であるが、ポリープ病巣の形成や治療への反応に関するメカニズムについての詳細は未だに不明である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、Hippo 経路エフェクターである YAP/TAZ の脈絡膜血管形態および脈絡膜血管新生への役割を明らかにすることである。

我々は SNPs(一塩基多型)を用いた遺伝子解析で、ARMS2 A69S 多型において PCV と典型 AMD では異なる遺伝的背景を持つことを報告した(Yanagisawa S, Matsumiya W, et al. Mol Vis. 2011)。さらに抗 VEGF 薬(ranibizumab)への反応が、PCV と典型 AMD で異なること、PCV に対しては抗 VEGF 薬 + vPDT が有効であることを報告し(Matsumiya W, et al. Ophthalmologica. 2015, Matsumiya W, et al. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 2017)、治療による臨床経過が PCV と典型 AMD で異なることを明らかにした。

このように、我々のグループは長年にわたり、PCV の遺伝的背景および治療反応性の両面から研究を続けているが、PCV を含めた AMD に関しては依然不明な部分も多い。我々は並行して病態解明を目的としてマウス脈絡網膜血管の基礎研究も続けてきて(Matsumiya W, et al. IOVS 2012)おり、PCV の形態的特徴に注目し PCV を含めた AMD の分子生物学的な解明を試みている。

我々は、まず血管形態の面から、巨大化した脈絡膜血管であるポリープ病巣と Hippo 経路の関係に注目した。そして、近年、Hippo 経路の上流制御機構の一つとして細胞間接着および細胞-細胞外マトリックス接着の状態が注目されているが、これは我々のグループが以前に明らかにした「エラスチンをコードする ELN 遺伝子多型は PCV の疾患感受性遺伝子多型である。」という結果に繋がる(Kondo N, Matsumiya W, et al. IOVS 2008)。また、PCV の治療において、YAP 阻害作用を持つベルテポルフィンを用いた光線力学療法が効果的であることと合わせて、我々は「PCV の病態に Hippo 経路が関与しているのではないか」という仮説を持つに至った。実際、Kim らはタモキシフェン誘導 Cre/loxP システムを用いて時期特異的にマウス血管内皮細胞における YAP/TAZ 遺伝子をノックアウトしたところ網膜血管における異常が生じたことを報告しており(Kim J, et al. J Clin Invest 2017) 眼の血管において Hippo 経路が重要な役割をしていることは間違いないと思われる。

Hippo 経路と PCV を含めた AMD の関係については全く実験がなされておらず、本研究でその糸口が解明されれば、Hippo 経路をターゲットにした PCV 治療が臨床に応用され PCV ならびに AMD 患者の視機能予後を改善させることが期待される。

3. 研究の方法

1) 予備実験：マウスの脈絡膜血管の描出・マウスの脈絡膜における YAP の発現の確認・マウスのレーザー誘発脈絡膜新生血管(CNV)モデルの作成

・**マウスのレーザー誘発脈絡膜新生血管(CNV)モデル**：6 週齢の C57/BL6 マウスに、腹腔内麻酔にて深麻酔させたのち、コンタクトレンズを装着し左右眼にレーザー光凝固装置を用い、レーザー(波長 532nm、出力 200mW、照射時間 100ms、スポットサイズ 100 μ m)を片眼に付き 4 発視神経乳頭周囲に照射し、Bruch 膜の障害を作成することで実験的脈絡膜新生血管を作成した。

・**CNV 体積の評価**：光学顕微鏡にて作成した CNV 標本を 1 micrometer ずつ画像撮影を行

い、画像ソフトウェア (Image J) を用いて 2 値化した後に面積を計測し、各画像の面積を合計することで体積 (μM^3) を求め、両群の CNV 体積測定を行った。

2) 脈絡膜新生血管に対する YAP 阻害薬 (ベルテポルフィン: VP) の効果の解析

・レーザー誘発 CNV モデルを用いた YAP 阻害薬 VP の CNV に対する効果

上述した方法で C57BL/6J マウスのレーザー誘発 CNV モデルを作成し、レーザー照射後 1 週間ベルテポルフィン腹腔内投与 ($100\text{mg}/\text{kg}$, 隔日計 4 回投与) または偽薬 (蒸留水) 投与を行い、抗 PECAM 抗体にて染色し脈絡膜展開標本作成した。各群 $N=7$ で CNV 体積を測定して比較を行った。

・ヒト脈絡膜血管内皮細胞における YAP/phosphorylation YAP (pYAP) の発現の確認

ヒト脈絡膜血管内皮細胞 (HCVECS, Celprogen USA) を用いて、抗 YAP 抗体及び抗 pYAP 抗体による免疫染色 (Topro3 との共染色) を行い、細胞における YAP/pYAP の発現を確認した。

・ヒト脈絡膜血管内皮細胞における VP 負荷に伴う pYAP の発現の変化

VP 濃度を $0, 0.3\mu\text{M}, 1\mu\text{M}, 3\mu\text{M}$, と振り分けてヒト脈絡膜血管内皮細胞を播種時に VP 添加を行い 60% confluent 時点で染色を行った。

VP 濃度を $0, 0.3\mu\text{M}, 1\mu\text{M}, 3\mu\text{M}$, と振り分けてヒト脈絡膜血管内皮細胞 60% confluent 時点から VP 添加を行い 24 時間後に染色を行った。

4. 研究成果

・予備実験

レーザー誘発脈絡膜新生血管 (CNV) モデルを用いて解析用に実験的脈絡膜新生血管を作成し、画像評価し得た。(図 1)

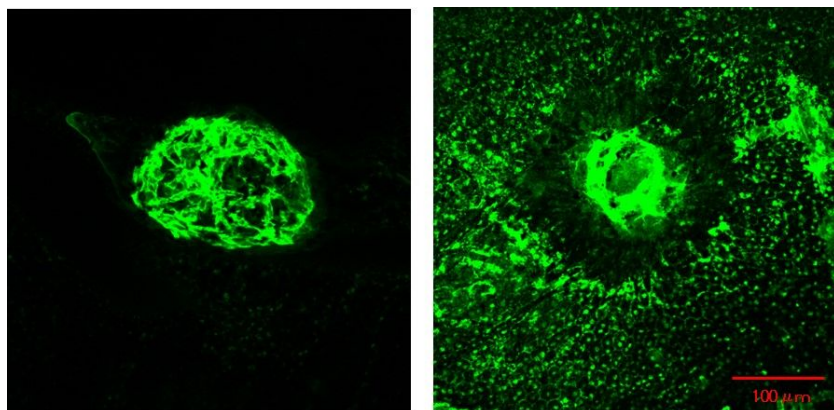


図 1 抗 PECAM 抗体で免疫染色した実験的脈絡膜新生血管 (左・右)

・レーザー誘発 CNV モデルを用いた YAP 阻害薬 VP の CNV に対する効果

レーザー誘発 CNV モデルマウスを用いて H₂O (コントロール) と VP で処理した実験的脈絡膜血管新生の堆積を測定したところ、 $VP 56838 \pm 34946 \mu\text{M}^3$ vs コントロール $90524 \pm 46641 \mu\text{M}^3$ と有意に VP 群で CNV 体積は小さい結果であった。($N=7, P=0.04$) (図 2)

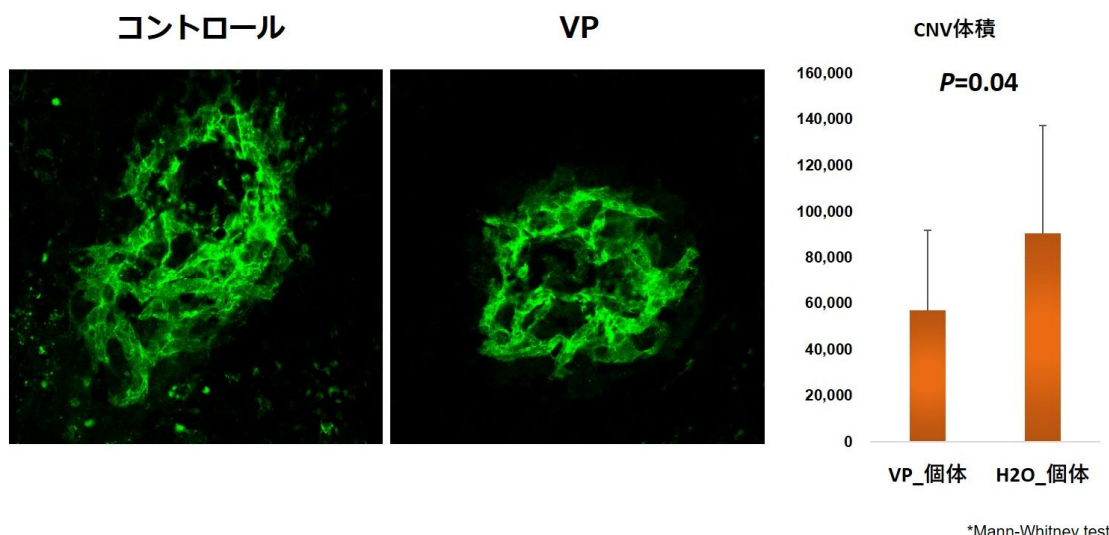


図 2 H₂O (コントロール) と VP で処理した実験的脈絡膜新生血管。(左) H₂O (コントロール) と VP の群間の CNV 体積の比較 (右)

この結果から、VP は YAP 阻害作用により、CNV 進展を抑制し得る可能性が示唆された。次に、脈絡膜血管において VP が YAP を介してどのように作用しているかを調べるため、ヒト脈絡膜血管内皮細胞を用いて細胞実験を行った。

・ヒト脈絡膜血管内皮細胞における YAP/phosphorylation YAP(pYAP)の発現の確認

抗 YAP 抗体及び抗 pYAP 抗体 (いずれも赤) によるヒト脈絡膜血管内皮細胞の免疫染色(Topro3 : 青)を行い、ヒト脈絡膜血管内皮細胞においても YAP が主に核内に局在し pYAP が細胞質に局在することを確認した。(図 3)

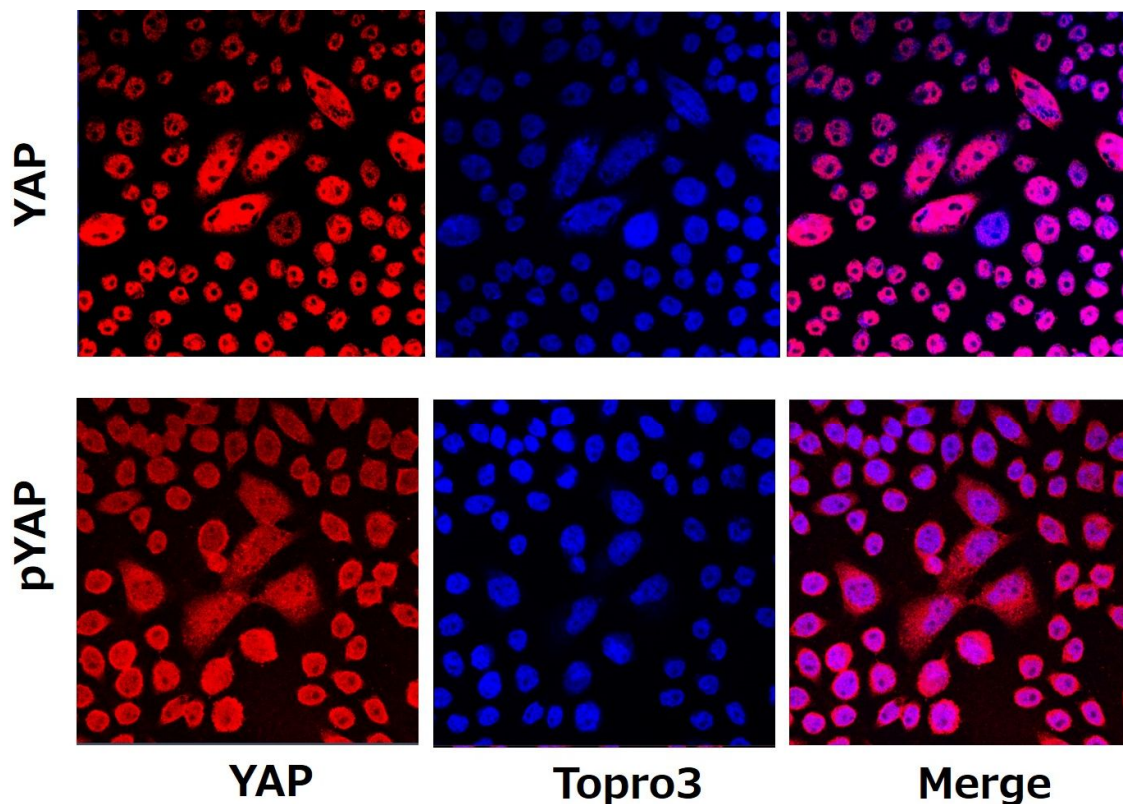


図 3 ヒト脈絡膜血管内皮細胞の抗 YAP 抗体及び抗 pYAP 抗体の免疫染色

・ヒト脈絡膜血管内皮細胞における VP 負荷に伴う pYAP の発現の変化

一定の VP 濃度 (0, 0.3 μ M, 1 μ M, 3 μ M) 条件下でヒト脈絡膜血管内皮細胞を播種時に VP 添加を行い 60% confluent 時点で染色。(図 4)

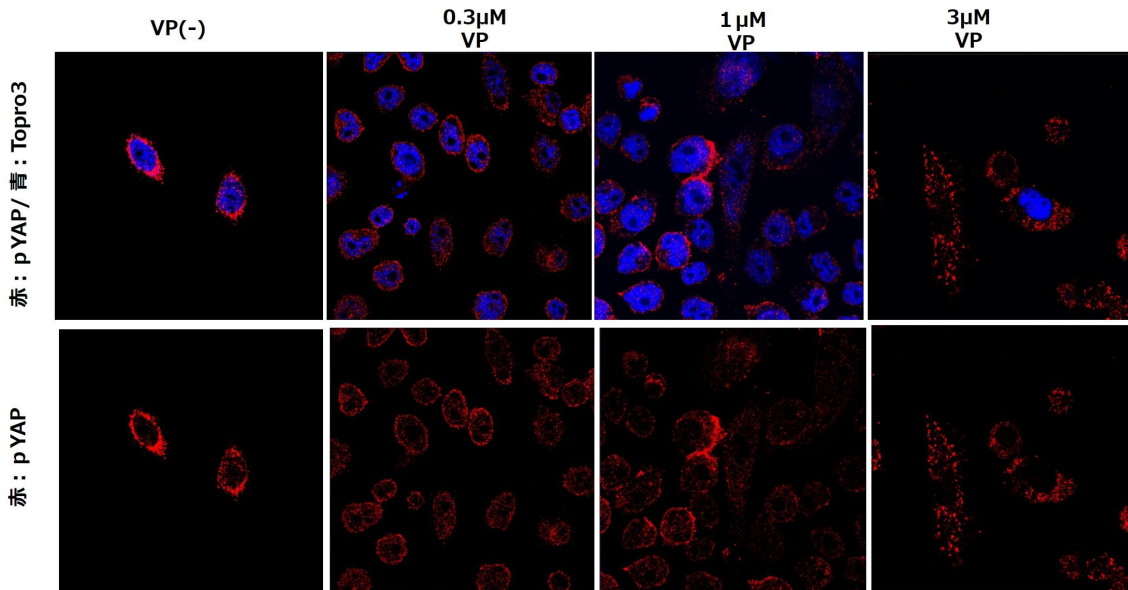


図 4 VP 濃度 (0, 0.3 μ M, 1 μ M, 3 μ M) 条件下処理したヒト脈絡膜血管内皮細胞 (赤 pYAP 青 Topro3)

VP 濃度勾配に反比例して細胞の輪郭が不明瞭になっている。また 3 μ M VP のみで脱核した細胞が認められ、VP によるアポトーシスの誘導が生じた可能性が示唆された。

一定の VP 濃度 (0, 0.3 μ M, 1 μ M, 3 μ M) 条件下でヒト脈絡膜血管内皮細胞 60% confluent 時点から VP 添加を行い 24 時間後に染色。(図 5)

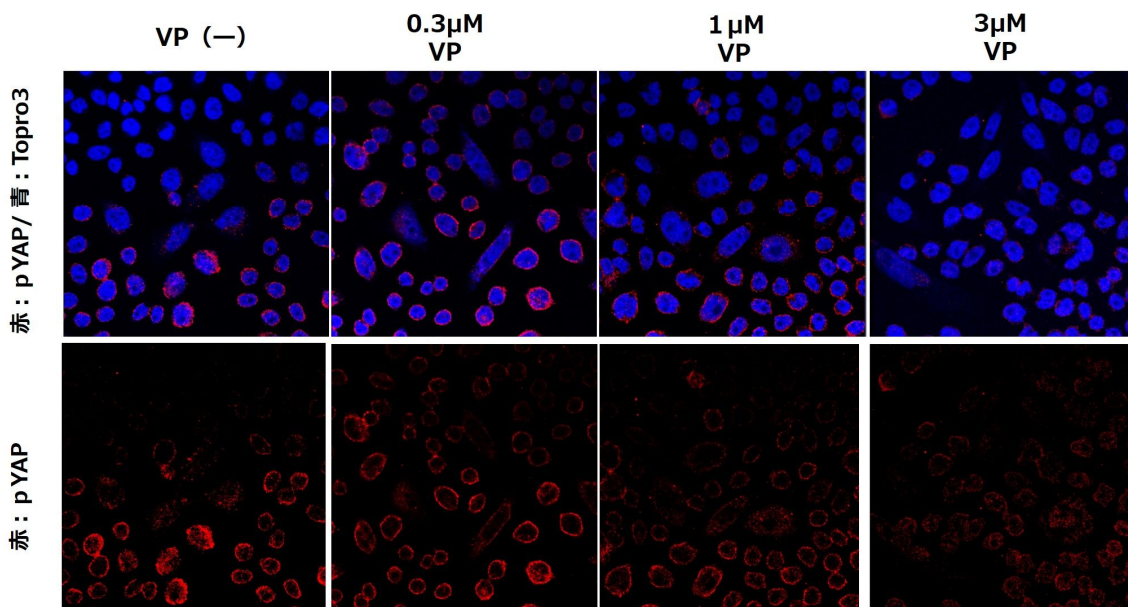


図 5 VP 濃度 (0, 0.3 μ M, 1 μ M, 3 μ M) 条件下処理したヒト脈絡膜血管内皮細胞 (赤 pYAP 青 Topro3)

いずれの濃度にも細胞数に変化は認めないが、VP 濃度が高いほど pYAP は細胞全体に均一に薄くなっていた。pYAP の核内以降が抑制されているとして矛盾しない結果であった。

既報では VP 負荷により pYAP が細胞質で分解されず保持されるとの報告がある一方、腫瘍細胞を用いた研究では pYAP/YAP 蛋白両者が減少するとの報告もある。本結果は後者を支持する可能性があるが、VP 濃度による YAP 局在の変化も確認する予定である。さらに今後一定の VP 濃度下で 1)Western で YAP と pYAP の蛋白発現量の変化、2)MTT アッセイ 3) Migration アッセイを行い、ヒト脈絡膜血管内皮細胞においてベルテポルフィン負荷が YAP 経路を介して細胞増殖を調整していることを証明したい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Kim KW, Kusahara S, Katsuyama-Yoshikawa A, Nobuyoshi S, Kitamura M, Mori S, Sotani N, Ueda K, Matsumiya W, Miki A, Kurimoto T, Imai H, Nakamura M.	4. 巻 15
2. 論文標題 Changes in Gene Expression Profiling and Phenotype in Aged Multidrug Resistance Protein 4-Deficient Mouse Retinas	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Antioxidants (Basel)	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/antiox10030455	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Daiki Sakai, Wataru Matsumiya, Sentaro Kusahara, Makoto Nakamura	4. 巻 18
2. 論文標題 The choroidal structure changes in a case with hypertensive choroidopathy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Am J Ophthalmol Case Rep.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajoc.2020.100710.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Jain A, Chea S, Matsumiya W, Halim MS, Yasar C, Kuang G, Sepah YJ, Khanani AM, Do DV, Nguyen QD, Kuang	4. 巻 18
2. 論文標題 Severe vision loss secondary to retinal arteriolar occlusions after multiple intravitreal brolocizumab administrations.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Am J Ophthalmol Case Rep.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajoc.2020.100687.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Daiki Sakai, Wataru Matsumiya, Sentaro Kusahara, Makoto Nakamura	4. 巻 18
2. 論文標題 The choroidal structure changes in a case with hypertensive choroidopathy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Am J Ophthalmol Case Rep.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajoc.2020.100710	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nakai S, Matsumiya W, Miki A, Honda S, Nakamura M.	4. 巻 63(5)
2. 論文標題 Association of an age-related maculopathy susceptibility 2 gene variant with the 12-month outcomes of intravitreal aflibercept combined with photodynamic therapy for polypoidal choroidal vasculopathy.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Jpn J Ophthalmol.	6. 最初と最後の頁 389-395
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10384-019-00683-6. Epub 2019 Aug 2.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 松宮亘、西庄龍東、勝山敦子、宇治彰人(京都大)、楠原仙太郎、中村誠
2. 発表標題 Vogt-小柳-原田病治療経過中の脈絡膜再肥厚と脈絡膜構造変化の検討
3. 学会等名 日本眼科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中井 駿一郎、松宮 亘、林田 真由香、三木 明子、本田 茂、中村 誠
2. 発表標題 ポリープ状脈絡膜血管症へのaflibercept併用光線力学的療法と異常血管網の進展
3. 学会等名 日本眼科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西庄龍東、松宮亘、勝山敦子、宇治彰人、楠原仙太郎、中村誠
2. 発表標題 Vogt-小柳-原田病治療前後の脈絡膜構造指標の変化と相関
3. 学会等名 日本眼科学会総会
4. 発表年 2019年

1 . 発表者名 Wataru Matsumiya, Ryuto Nishisho, Atsuko Katsuyama, Akihito Uji (Kyoto Univ.), Sentaro Kusuhara, Makoto Nakamura
2 . 発表標題 The relationship between the choroidal structure and choroidal thickening in Vogt-Koyanagi-Harada disease
3 . 学会等名 ARVO (Association for Research in Vision and Ophthalmology) 2019
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Ryuto Nishisho, Wataru Matsumiya, Atsuko Katsuyama, Akihito Uji (Kyoto Univ.), Sentaro Kusuhara, Makoto Nakamura
2 . 発表標題 Post-treatment change of choroidal structural parameters and their correlations and fluctuations in Vogt-Koyanagi-Harada disease
3 . 学会等名 ARVO (Association for Research in Vision and Ophthalmology) 2019
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Shunichiro Nakai, Wataru Matsumiya, Mayuka Hayashida, Akiko Miki, Shigeru Honda (Osaka City University), Makoto Nakamura
2 . 発表標題 The association of the branching vascular network area progression with the outcomes of combination therapy with intravitreal aflibercept and verteporfin photodynamic therapy for polypoidal choroidal vasculopathy
3 . 学会等名 ARVO (Association for Research in Vision and Ophthalmology) 2019
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Wataru Matsumiya, Mayuka Hayashida, Ryuto Nishisho, Akira Tetsumoto, Atsuko Katsuyama, Akiko Miki, Hisanori Imai, Sentaro Kusuhara, Makoto Nakamura
2 . 発表標題 Wataru Matsumiya, Mayuka Hayashida, Ryuto Nishisho, Akira Tetsumoto, Atsuko Katsuyama, Akiko Miki, Hisanori Imai, Sentaro Kusuhara, Makoto Nakamura
3 . 学会等名 GOIW (Global Ocular Inflammation Workshops) 2019
4 . 発表年 2019年

1. 発表者名 酒井 大輝、松宮 亘、楠原 仙太郎、中村 誠
2. 発表標題 経過中に脈絡膜変化を伴った妊娠高血圧症候群に続発した高血圧性脈絡膜症の1症例
3. 学会等名 第58回日本網膜硝子体学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中井 駿一郎、松宮 亘、本田 茂、林田 真由香、三木 明子、安積 淳、中村 誠
2. 発表標題 ポリープ状脈絡膜血管症へのafibercept単独療法とafibercept併用光線力学的療法との2年経過比較
3. 学会等名 第57回網膜硝子体学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松宮亘、本田茂、林田真由香、中井駿一郎、勝山敦子、大塚慶子、三木明子、楠原仙太郎、中村誠
2. 発表標題 ポリープ状脈絡膜血管症へのアフリベルセプト併用光線力学療法後の網膜色素上皮萎縮
3. 学会等名 第122回 日本眼科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中井 駿一郎、松宮 亘、本田 茂、林田 真由香、三木 明子、中村 誠
2. 発表標題 ポリープ状脈絡膜血管症に対するafibercept併用光線力学的療法の3年経過
3. 学会等名 第72回 日本臨床眼科学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 松宮 亘	4. 発行年 2019年
2. 出版社 メディカル菱出版	5. 総ページ数 2
3. 書名 あたらしい眼科	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------