

令和 5 年 5 月 19 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2022

課題番号：18K16927

研究課題名（和文）中心性漿液性脈絡網膜症における漿液性網膜剥離の病態解明

研究課題名（英文）Pathophysiology of serous retinal detachment in central serous chorioretinopathy

研究代表者

三木 明子（Miki, Akiko）

神戸大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10726988

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：中心性漿液性脈絡網膜症（CSC）では、網膜色素上皮細胞（RPE）の細胞間接着異常を認めるが、その分子生物学的機序は不明である。我々は、脈絡膜中大血管によるRPEへの機械的ストレスがRPEの細胞間接着が脆弱化すると考え、Hippo経路のYAPに着目した。本研究の目的は、RPEの細胞間接着とYAPの関係を明らかにすることである。YAPはマウス脈絡膜血管、RPEに発現し、ARPE細胞を用いた研究では、タイトジャンクションの形成と共に、YAPの局在が変化し、YAPの阻害によりタイトジャンクション機能が低下した。これら結果から、YAPはRPEのタイトジャンクションに重要な役割を有す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

CSCの分子メカニズムは不明である。CSCではRPEのタイトジャンクションが低下するが、本研究では、RPEのタイトジャンクションとHippo経路のYAPが関係することが示された。CSCの治療は光線力学療法（保険適応外使用）が広く行われているが、光線力学療法で用いるベルテポルフィンにより核内移行したYAPが阻害されることが知られている。CSCにおいて光線力学療法が奏功する理由は現時点で不明であるが、YAPがCSCのタイトジャンクションに関連していることがその理由の一つである可能性がある。今後さらにHippo経路とRPEの関係について検討することでCSCの病態背景が明らかになる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Central serous chorioretinopathy (CSC) is a disease that causes serous retinal detachment in the macula due to abnormal intercellular adhesion of retinal pigment epithelial (RPE) cells, resulting in vision loss. In this study, we focused on the Hippo pathway as a signal involved in intercellular adhesion and YAP as a Hippo pathway molecule involved in RPE cell survival. The aim of this study was to clarify the relationship between tight junction and YAP in RPE; YAP was expressed in mouse choroidal vessels and RPE; studies using ARPE cells showed that the localization of YAP changed with the formation of tight junctions, and inhibition of YAP tight junction function was impaired. These results suggest that YAP may play an important role in RPE tight junctions.

研究分野：眼科

キーワード：網膜色素上皮細胞

1. 研究開始当初の背景

中心性漿液性脈絡網膜症 (CSC) は、外眼血液網膜関門の破綻、つまり網膜色素上皮細胞 (RPE) の細胞間接着異常により黄斑部に漿液性網膜剥離を生じ視力低下をきたす疾患であるが、その分子生物学的機序は不明である。近年、光干渉断層計 (OCT) の研究において、CSC では脈絡膜厚の肥厚及び脈絡膜血管の拡張が見られることが報告されている。我々は CSC の発症機序について、拡張した脈絡膜血管が RPE へ機械的ストレスを負荷し、そのために RPE 間の細胞間接着が脆弱化すると仮説した。今回、細胞間接着に関与しているシグナルとして Hippo 経路に着目した。Hippo 経路は YAP (Yes-associated protein)/TAZ (transcriptional coactivator with PDZ-binding motif) を制御するシグナルで、YAP/TAZ は細胞外からうける機械的ストレスを生化学的な応答へと変換するメカノトランスダクションの制御分子であり、細胞間接着因子を介して細胞増殖に重要な役割を果たすことが知られている。

2. 研究の目的

本研究では、CSC における細胞接着因子と Hippo 経路の機械刺激応答シグナルとの関連について、ARPE19 細胞を用いて、機械的ストレスと YAP/TAZ との関係を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

- ・ YAP の局在についてマウス眼を用いて免疫染色で同定
- ・ ARPE 細胞を用いてタイトジャンクションの形成について免疫染色及び TER を用いて検討
- ・ ARPE 細胞を用いてタイトジャンクションと YAP の局在変化について免疫染色を用いて検討
- ・ siRNA 干渉により YAP を阻害し、タイトジャンクションの変化について FITC でキストラン、TER を用いて検討

4. 研究成果

・ YAP の局在

マウスの眼を環流固定した後に凍結切片にし、YAP1 抗体を用いて免疫染色を行なった。YAP は脈絡膜血管及び網膜色素上皮細胞に局在していた。

・ ARPE 細胞のタイトジャンクション

ARPE 細胞を培養し、タイトジャンクションの変化について検討した。

細胞接着因子として、ZO-1、N-カドヘリン、E-カドヘリンの抗体を用いて免疫染色を用いて検討した。眼以外の上皮細胞では、E-カドヘリンと Hippo 経路、YAP との関連が報告されていたため、当初、E-カドヘリンで検討したが、既報のとおり、RPE では、アドヘレンスジャンクションとしては、E-カドヘリンの発現がほぼ見られなかった。一方、N カドヘリンは発現していた。

上皮細胞のタイトジャンクションと Hippo 経路について、E-カドヘリンとの関係が報告されているが、RPE では E カドヘリンの発現がないことから、他の上皮細胞とは異なる、Hippo 経路とタイトジャンクションの関係があることが示唆された。

Zo-1、N カドヘリンともに、培養開始後 2 週間後、4 週間後と細胞壁への発現が増加した。

TER は既報と同様に、培養開始後 2 週間をピークに、徐々に低下した。

・ ARPE 細胞のタイトジャンクション形成と YAP の局在変化

ARPE 細胞を同様に培養し、YAP の染色を行なった。

YAP は度重なる染色条件の調整を必要とし、ZO-1、N カドヘリンとの多重染色は困難であった。当初、細胞接着が開始してからの研究を検討していたが、細胞接着を同定する時期にばらつきが生じたため、培養開始後からの時間経過で検討することに変更した。

培養開始後 2 週間～4 週間まで局在は変わらず核内及び核外に存在した。

他の上皮細胞では、タイトジャンクション形成とともに、YAP が核内から核外へ移行し、リン酸化するが、RPE では、核外への移行はみられたが、核内にも局在を認めた。

さらに培養期間を最大 6 週間まで延長したが、YAP は核内・核外両方に局在していた。

一方、観察時期を 12 時間にしたところ、YAP は核内のみに局在していた。

・ siRNA 干渉による YAP 阻害とタイトジャンクション

ARPE 細胞を培養し、siRNA を用いて YAP を阻害し、タイトジャンクションについて、TER 及び FITC-dextran を用いて検討した。

YAP を阻害した群では、対照群よりも TER が有意に低下していた。また、FITC-dextran を用いた透過性実験では、YAP を阻害した群において有意に、FITC-dextran 透過量が増加していた。

これらの結果から、RPE のタイトジャンクションと YAP が関連する可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔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
---------	---------