

令和 6 年 5 月 30 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06787

研究課題名(和文) 糖尿病網膜症の病態形成におけるYAP/HIF-1 複合体の役割

研究課題名(英文) The role of the YAP/HIF-1a complex in the pathogenesis of diabetic retinopathy

研究代表者

柏原 俊英 (Kashihara, Toshihide)

北里大学・薬学部・講師

研究者番号：20552334

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)：YAPは細胞の生存やエネルギー代謝に重要な転写共役因子である。本研究では、糖尿病モデルラットの網膜におけるYAPの活性化及びYAPとHIF-1の相互作用がGLUT1の発現に与える影響を検討した。ストレプトゾトシン誘発性糖尿病モデルラット及び糖尿病の病態形成に関わるメチルグリオキサールを硝子体内投与したラットの網膜において、ミュラー細胞のYAPが活性化することを見出した。しかしながら、これらのラットの網膜ではHIF-1およびGLUT1の発現量の変化は認められなかった。これらの結果より、糖尿病時の網膜では、ミュラー細胞のYAPは活性化しているが、GLUT1の発現には影響しないものと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病網膜症は糖尿病三大合併症の一つであり、本国における成人の失明原因の第2位である。しかしながら、その病態形成に関わる機序は十分に解明されていない。YAPは、細胞の生存やエネルギー代謝を制御する重要な転写共役因子であるが、網膜神経変性疾患における役割は明らかにされていない。本研究は、糖尿病モデルラットのミュラー細胞においてYAPが顕著に活性化することを見出した。このことは、糖尿病網膜症を含む網膜神経変性疾患の病態解明に寄与するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：YAP, a transcriptional coactivator, is essential for cell survival and energy metabolism. In this study, we investigated the activation of YAP and the effect of the interaction between YAP and HIF-1 on the expression level of GLUT1 in the retina of diabetic model rats. We found that YAP in Muller cells is activated in the retinas of streptozotocin-induced diabetic model rats and rats with methylglyoxal intravitreal injection, which is involved in the pathogenesis of diabetes. However, there were no observed changes in the expression levels of HIF-1 and GLUT1 in the retinas of these rats. These results suggest that, while YAP in Muller cells is activated in the diabetic retina, it does not affect the expression of GLUT1.

研究分野：眼薬理学

キーワード：糖尿病網膜症 YAP ミュラー細胞

## 1. 研究開始当初の背景

糖尿病網膜症は糖尿病三大合併症の一つであり、本国における成人の失明原因の第 2 位である。糖尿病網膜症の発症と進行の鍵となる因子は VEGF である。VEGF は、血管形成や血管新生を誘導する因子であり、強力な血管透過性亢進作用を持つ。元来 VEGF は血管の恒常性維持に必要な不可欠な因子である。しかし、網膜組織が高血糖や低酸素状態に陥り VEGF が過剰に発現すると、網膜浮腫や網膜出血が生じ、糖尿病網膜症を重症化させる。しかしながら、糖尿病網膜症において VEGF が過剰発現する分子メカニズムは未だ十分に解明されていない。

YAP は、器官のサイズを制御する Hippo 情報伝達経路の最終的なエフェクターとして機能する、極めて重要な転写共役因子である。Hippo 経路が活性化すると、下流の YAP はリン酸化され、不活性化される。一方、伸展や組織障害などのストレス刺激は Hippo 経路を抑制して、YAP を活性化する。活性化した YAP は核内へ移行し、種々の転写因子に結合して細胞の生存や分裂を促進する。近年、糖代謝の亢進した癌細胞や糖尿病モデルマウスの心筋細胞で、YAP が活性化していることが明らかになってきた。従って、糖尿病時の網膜構成細胞においても高血糖や糖代謝異常が YAP を活性化し、糖尿病網膜症の病態形成に関与している可能性がある。

最近、種々の細胞で YAP がエネルギー代謝を制御することが明らかとなり、注目されている。研究代表者は、依然として未知であった心臓のエネルギー代謝における YAP の役割に着目して検討を行った。その結果、ごく最近、YAP が GLUT1 の発現を顕著に増加させて、心筋細胞の糖代謝を亢進させることを発見した。興味深いことに、この反応は、YAP が HIF-1 $\alpha$  に直接結合して HIF-1 $\alpha$  を強く活性化させることで生じていた。HIF-1 $\alpha$  は、細胞が低酸素状態に陥った際に誘導される転写因子で、GLUT1 のみならず VEGF 等の虚血関連遺伝子を発現させる。従って、糖尿病時の網膜構成細胞において、YAP による HIF-1 $\alpha$  の活性化は、GLUT1 や VEGF の発現を誘導し、糖尿病網膜症を悪化させている可能性がある。

## 2. 研究の目的

本研究では、糖尿病時の網膜構成細胞において、高血糖により YAP が活性化されるか否かを明らかにし、YAP による HIF-1 $\alpha$  の活性化が虚血関連遺伝子の発現に及ぼす影響について検討することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) ストレプトゾトシン (STZ) 糖尿病モデルラット網膜を用いた YAP の活性化の検討

6-8 週齢の SD 系ラットに STZ を 65 mg/kg 腹腔内投与して、1 型糖尿病モデルラットを作製した。STZ 投与 1 週間後に血糖値を測定し、300 mg/dL 以上のラットを糖尿病発症とみなし、各実験に用いた。Vehicle を投与したラットをコントロールとして用いた。網膜標本を 1, 2, 3 ヶ月後に採取し、Western blot 法にてタンパク質の発現量を検討し、免疫組織染色法にて YAP の発現が変化した細胞の同定を行った。

### (2) メチルグリオキサール (MGO) 硝子体内投与モデルラット網膜を用いた YAP の活性化の検討

糖尿病では高反応性糖代謝物の MGO の血中及び細胞内濃度が増加し病態形成に働くことが示唆されている。そこで、YAP の活性化への MGO の関与を検討した。6-8 週齢の SD 系ラットの片眼に 1 又は 2  $\mu$ mol の MGO を投与し、もう片眼には Vehicle を投与しコントロールとした。網膜標本を 4 日後に採取し、Western blot 法にてタンパク質の発現量の検討を、免疫組織染色法にて YAP の発現が変化した細胞の同定を、定量 PCR 法にて mRNA の解析を行った。

### (3) ラットミュラー細胞株 rMC-1 細胞を用いた YAP の活性化の検討

MGO が直接ミュラー細胞の YAP を活性化しているのか明らかにするために、rMC-1 細胞に 0.1, 0.2, 0.4 mM の MGO を処置して活性化型 YAP の発現変化を Western blot 法にて評価した。

## 4. 研究成果

STZ 誘発性 1 型糖尿病モデルラットを作製しその病態の確認を行った。Vehicle 投与群に比べ STZ 投与群は、投与 1 週間後から 3 ヶ月後まで顕著な体重減少と高血糖を示した。STZ 投与群では網膜のストレスマーカーである GFAP の発現量が 2 ヶ月後から徐々に増加した (図 1)。STZ 投与 2 ヶ月後において YAP の発現量の増加傾向と YAP の不活性化を示す非リン酸化型 YAP (pS127-YAP) の減少、すなわち総 YAP に対する非リン酸化型 YAP の割合の減少が認められた。さらに、活性化型 YAP の抗体を用いて検討した結果、STZ 投与 2 ヶ月後において活性化型 YAP の発現量の増加が認められた。このことから、STZ 投与 2 ヶ月後の網膜において YAP の活性化が示唆された。

YAP は上流の Hippo シグナル伝達経路によって負に制御されることがよく知られている。そこで、この YAP の活性化が Hippo シグナル伝達経路を介して起こっているか否か、Hippo シグ

ナル伝達経路の最下流に位置するLATS1の活性化を Western blot 法で評価した。YAPの活性化が認められた STZ 投与2ヶ月後の網膜において、活性化型 LATS1 (pS909-LATS1) の発現量の変化は認められなかった。これより、STZ 糖尿病モデルラットの網膜における YAP の活性化に Hippo シグナル伝達経路は関与しない可能性が考えられた。

次に、免疫組織染色法により網膜のどの細胞で YAP が活性化しているのか検討した。Vehicle 投与群及び STZ 投与群いずれにおいても YAP はミューラーグリア細胞に多く存在していることが分かった。このミューラー細胞における YAP のシグナル強度は、Vehicle 投与群に比べ STZ 投与群の方が強かった。このことから、糖尿病時の網膜ではミューラーグリア細胞の YAP が活性化している可能性が示された。

YAP の活性化に伴って網膜の HIF-1 および GLUT1 の発現量が変化しているか否か Western blot 法で検討した。STZ 投与1, 2, 3ヶ月後のいずれにおいても HIF-1 および GLUT1 の発現量の変化は認められなかった。

1 µmol の MGO 投与群では、総 YAP、不活性化型 YAP 及び活性化型 YAP のいずれにおいても YAP の発現量に変化は殆ど認められなかった(図2)。2 µmol の MGO 投与群では、総 YAP と活性化型 YAP では MGO 投与群において有意な発現量の増加が認められた(図2ABD)。不活性化型 YAP は、MGO 投与群において増加傾向を示した(図2AC)。また、いずれにおいても活性化型 LATS1 の発現量の変化は認められなかった。これより、STZ 糖尿病モデルラットと同様に MGO 投与モデルラット網膜において YAP の活性化が示唆され、これに Hippo シグナル伝達経路は関与しない可能性が示された。

免疫組織染色法により網膜における YAP の発現分布の変化を検討した。活性化型 YAP は、Vehicle 投与群でも MGO 投与群でもミューラー細胞の核に多く発現が認められたが、Vehicle 投与群に比べ MGO 投与群の方がより強い蛍光強度を示した。これより、MGO 投与モデルラット網膜でも STZ 糖尿病モデルラットと同様にミューラー細胞において YAP が活性化することが示唆された。

MGO が直接ミューラー細胞の YAP を活性化しているのか明らかにするために、rMC-1 細胞に 0.1, 0.2, 0.4 mM の MGO を処置して活性化型 YAP の発現量の変化を検討した。いずれの濃度の MGO においても、活性化型 YAP の発現量はコントロールと比べ有意な差は認められなかった。これより、網膜において MGO は間接的に YAP を活性化する可能性が示された。

MGO 投与によるミューラー細胞の YAP の活性化が、網膜の HIF-1 および GLUT1 の発現量に与える影響を Western blot 法で検討した。2 µmol の MGO 投与は、網膜における HIF-1 および GLUT1 の発現量に影響を与えなかった。

そこで、MGO 硝子体内投与モデルの網膜において YAP シグナリングが活性化しているか否か、YAP の標的遺伝子である CYR61 の mRNA 量を測定することで確認した。その結果、CYR61 の mRNA 量は有意に増加しており、ミューラー細胞において YAP シグナリングが亢進していることが示唆された。

本研究結果より、糖尿病時の網膜ではミューラー細胞の YAP が活性化していることが示唆された。しかしながら、ミューラー細胞の YAP の活性化は GLUT1 の発現増加を伴わなかったことから、ミューラー細胞では YAP と HIF-1 $\alpha$  の相互作用は弱いものと考えられた。

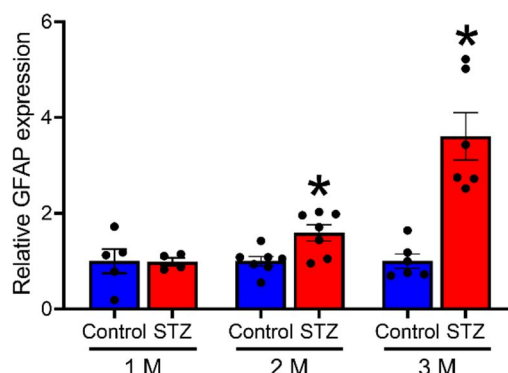


図 1. STZ 糖尿病モデルラット網膜における GFAP の発現変化

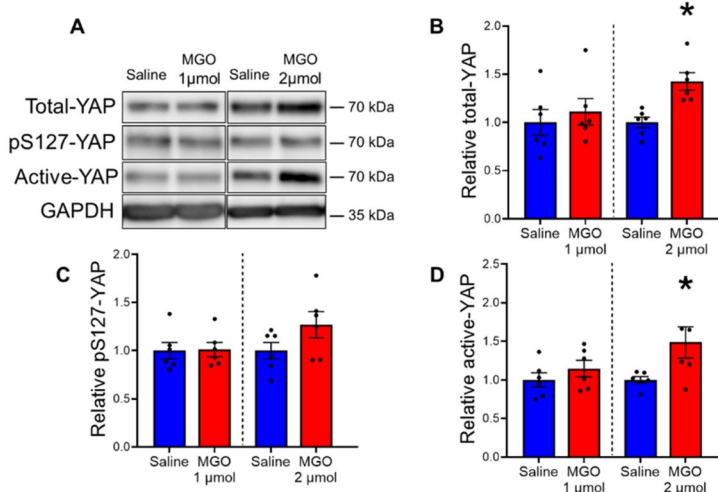


図 2. MGO 投与モデルラット網膜における YAP の発現変化

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 柏原俊英、森田祐生、平島枝里、森田茜、中原努
2. 発表標題 ラットNMDA誘発網膜神経傷害モデルにおけるYAPの発現変化
3. 学会等名 第42回日本眼薬理学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 奥山祐未、柏原俊英、矢崎真由子、萩原歩美、井上紗栄、中原努
2. 発表標題 Methylglyoxal 誘発ラット網膜傷害におけるミュラー細胞のYAPの発現変化
3. 学会等名 第148回日本薬理学会関東部会
4. 発表年 2023年

〔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
---------	---------