

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20248

研究課題名(和文) 網膜剥離の視細胞死におけるFasリガンドの役割と神経保護

研究課題名(英文) The role of Fas ligand in retinal detachment induced photoreceptor cell death

研究代表者

松本 英孝 (Matsumoto, Hidetaka)

群馬大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：30420178

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：網膜剥離は裂孔原性網膜剥離や糖尿病網膜症、加齢黄斑変性など様々な疾患で見られる。治療によって網膜が復位しても、剥離期間中に起こる視細胞死により恒久的な視力低下が起こる。このため、剥離網膜における視細胞死の抑制が重要である。本研究では、Fasリガンドの遺伝子改変マウスに網膜剥離を作製することによって、剥離網膜における視細胞死にFasリガンドが関与することを証明した。また、可溶性Fasリガンドが剥離網膜における視細胞死を抑制することも明らかにした。これらの結果から、Fasリガンドは剥離網膜における細胞死抑制の治療標的になりえると考えた。

研究成果の概要(英文)： Separation of photoreceptors from underlying retinal pigment epithelium, as seen in retinal detachment (RD), causes photoreceptor cell death, resulting in permanent vision loss. In a majority of cases, photoreceptor cell death occurs even if the retina is successfully reattached surgically. Therefore, it is important to define the mechanism(s) of photoreceptor cell death in the detached retina and establish therapeutic targets that prevent photoreceptor loss and the subsequent decrease in visual acuity.

We investigated the role of Fas ligand (FasL) in RD induced photoreceptor cell death using genetically modified mice. Our results showed that FasL induced cell death of photoreceptors following RD. In addition, photoreceptor loss in detached retina was inhibited by a subretinal injection of recombinant soluble FasL. These indicate that treatment targeting FasL could significantly reduce photoreceptor cell loss in patients with RD.

研究分野：医歯薬学

キーワード：網膜剥離 視細胞死 Fasリガンド 神経保護

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 網膜剥離は裂孔原性網膜剥離や加齢黄斑変性、糖尿病網膜症など様々な疾患で見られる。治療によって網膜が復位しても、剥離期間中に起こる視細胞死により視力が低下する。このため、剥離網膜における視細胞死の抑制が重要である。

(2) これまでの研究で、剥離網膜の視細胞死と Fas-Fas リガンドの関与が報告されている。Fas リガンド (膜貫通型タンパク) は、Fas に結合することによって細胞にアポトーシスを誘導するデス因子である。Fas に結合した膜結合型 Fas リガンドは、メタロプロテアーゼによって切断され可溶型となる。この可溶型 Fas リガンドのアポトーシス誘導能は非常に低く、膜結合型 Fas リガンドのアンタゴニストとしての働きも示唆されている。現在、Fas リガンドの完全欠損マウスである Fas1<sup>-/-</sup>マウスや、Fas リガンドのメタロプロテアーゼ切断部位に遺伝子変異のある CS マウスが存在する。CS マウスでは、メタロプロテアーゼによる膜結合型 Fas リガンドの切断が起こらないため、野生型マウスよりも Fas シグナルが強くと考えられている。

### 2. 研究の目的

(1) 2013 年に研究代表者らが報告したマウス網膜剥離モデルを用いて、剥離網膜の視細胞死における Fas リガンドの働きを Fas1<sup>-/-</sup>マウスと CS マウスを用いて検討する。

(2) 剥離網膜における視細胞保護のために、Fas シグナルを抑制する新たな治療法の開発を目指す。

### 3. 研究の方法

(1) 網膜剥離を作製した後、経時的に眼球を摘出し、顕微鏡用ならびに電顕用の組織標本作製する。視細胞死の量については、TUNEL 染色と外顆粒層厚で評価し、形態 (アポトーシスまたはネクローシス) については、電子顕微鏡を用いて解析する。

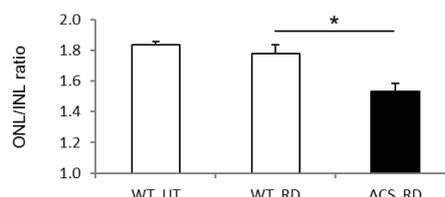
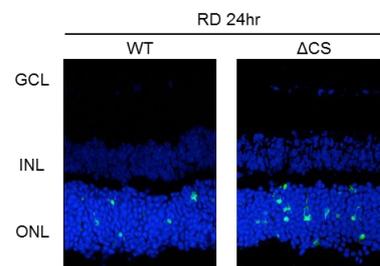
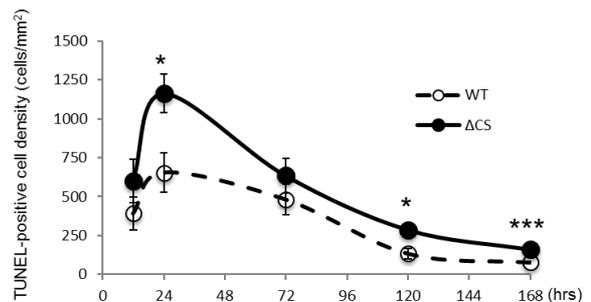
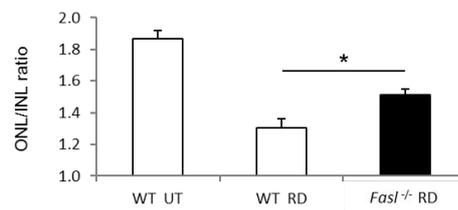
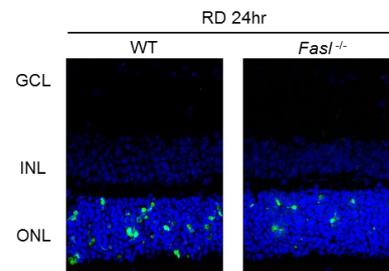
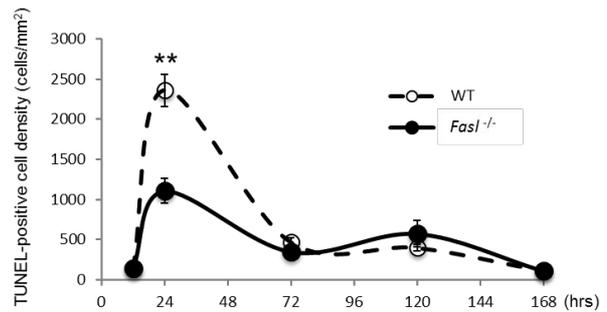
(2) 網膜剥離後に網膜内で上昇すると報告されている炎症性サイトカインである monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) や interleukin-6 (IL-6) の発現量を ELISA にて測定する。

(3) CS マウス眼に網膜剥離を作製する際に、リコンビナントマウス可溶型 Fas リガンドを網膜下に注入する。網膜剥離後の視細胞死を TUNEL 染色と外顆粒層厚にて評価し、緩衝液を注入したコントロール群と比較する。

### 4. 研究成果

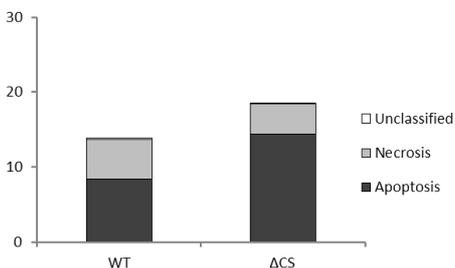
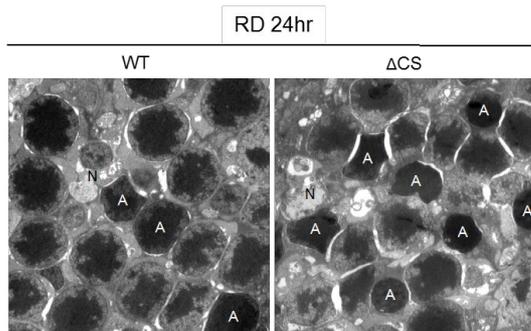
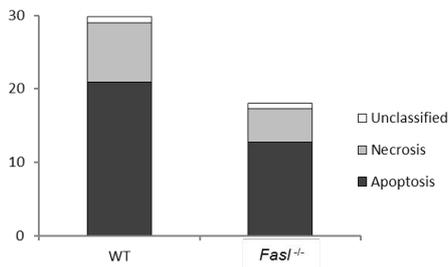
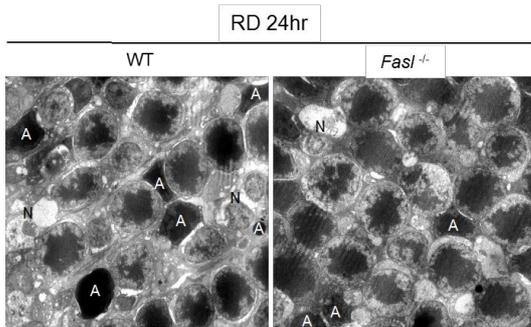
(1) 今回用いた網膜剥離モデルでは視細胞死のピークは day1 となる。Fas1<sup>-/-</sup>マウスでは野生型マウスと比較し、day1 で有意に視細胞死が少なく、CS マウスでは野生型マウスと比較し day1, 5, 7 で有意に視細胞死が多かった。

また、day7 における外顆粒層厚は、TUNEL 染色による視細胞死量と一致して Fas1<sup>-/-</sup>マウスでは野生型マウスと比較し有意に厚く、CS マウスでは野生型マウスと比較し有意に薄くなった。



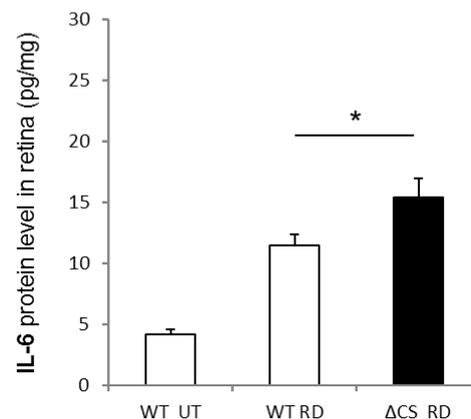
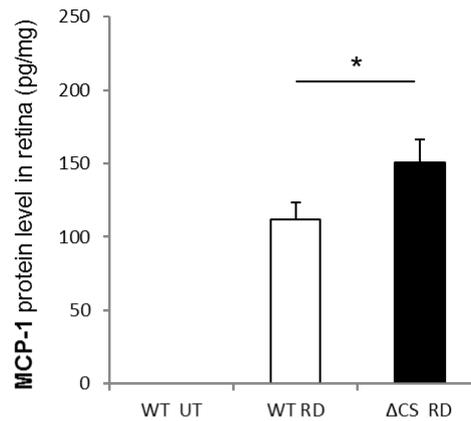
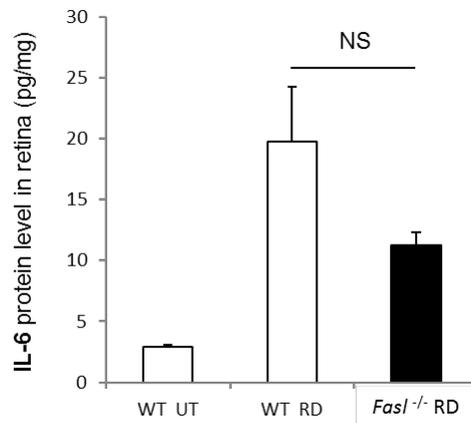
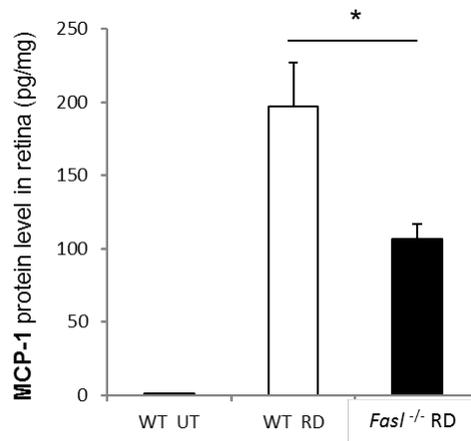
これらの結果から、剥離網膜における視細胞死に膜結合型 Fas リガンドが関与していることが証明された。

次に、電顕で視細胞死のタイプを評価したところ Fas1<sup>-/-</sup>マウスではアポトーシス、ネクローシスともに野生型マウスより有意に少なかった。一方、CSマウスでは野生型マウスより有意にアポトーシスが多く、ネクローシスは同等であった。これらのことから、膜結合型 Fas リガンドは主にアポトーシスで視細胞死を制御していることが分かった。

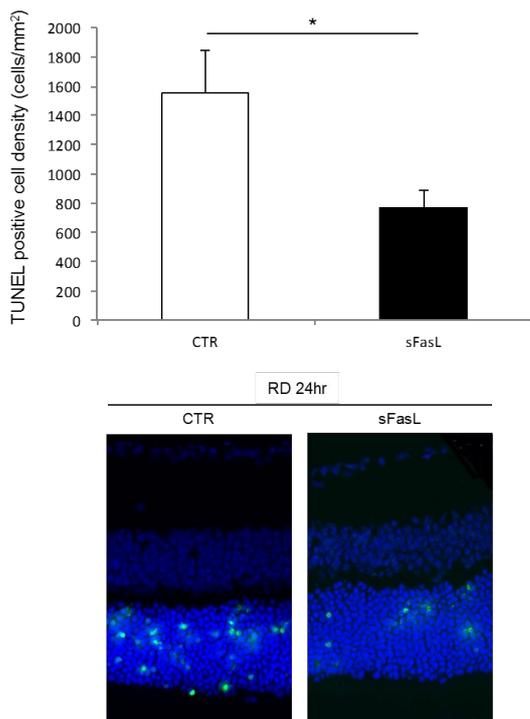


( 2 )

網膜剥離作製 24 時間後の網膜内の MCP-1 と IL-6 の発現は、視細胞死と一致して Fas1<sup>-/-</sup>マウスでは野生型マウスより少なく、CSマウスでは野生型マウスより多かった。



(3) CS マウス眼に網膜剥離を作製する際にリコンビナントマウス可溶性 Fas リガンドを網膜下に注入すると、網膜剥離後の視細胞死が有意に抑制された。これは、膜結合型 Fas リガンドに対するアンタゴニストとしての効果と考えられ、剥離網膜における視細胞死抑制の治療になりえると考えた。



#### <引用文献>

Zacks DN, Zheng QD, Han Y, Bakhru R, Miller JW. FAS-mediated apoptosis and its relation to intrinsic pathway activation in an experimental model of retinal detachment. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 45, 2004, 4563-4569.

Suda T, Hashimoto H, Tanaka M, Ochi T, Nagata S. Membrane Fas ligand kills human peripheral blood T lymphocytes, and soluble Fas ligand blocks the killing. *J Exp Med*, 186, 1997, 2045-2050.

Gregory MS, Hackett CG, Abernathy EF, Lee KS, Saff RR, Hohlbaum AM, Moody KS, Hobson MW, Jones A, Kolovou P, Karray S, Giani A, John SW, Chen DF, Marshak-Rothstein A, Ksander BR. Opposing roles for membrane bound and soluble Fas ligand in glaucoma-associated retinal ganglion cell death. *PLoS One* 2011. DOI: 10.1371/journal.pone.0017659.

Matsumoto H, Miller JW, Vavvas DG. Retinal detachment model in rodents by subretinal injection of sodium hyaluronate. *J Vis Exp* 2013. DOI: 10.3791/50660.

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

H Matsumoto, Y Murakami, K Kataoka, S Notomi, D Mantopoulos, G Trichonas, JW Miller, MS Gregory, BR Ksander, A Marshak-Rothstein and DG Vavvas. Membrane-bound and soluble Fas ligands have opposite functions in photoreceptor cell death following separation from the retinal pigment epithelium. *Cell Death and Disease* 査読有 6, 2015, e1986. DOI:10.1038/cddis.2015.334

〔学会発表〕(計1件)

松本英孝、村上祐介、片岡恵子、納富昭司、Miller Joan、Gregory Meredith、Ksander Bruce、Marshak-Rothstein Ann、Vavvas Demetrios、岸章治  
網膜剥離後の視細胞死と炎症細胞浸潤における Fas リガンドの役割  
2015年4月16日 第119回 日本眼科学会総会(ロイトン札幌)

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

松本 英孝 (MATSUMOTO Hidetaka)

群馬大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：30420178