

# 論文内容要旨

GPR3 expression in retinal ganglion cells  
contributes to neuron survival and accelerates  
axonal regeneration after optic nerve crush in mice

(マウスの網膜神経節細胞における GPR3 の発現は神経細胞の生存および視神経障害後の軸索再生に寄与する)

Neurobiology of Disease, 2022, in press.

主指導教員：酒井 規雄 教授

(医系科学研究科 神経薬理学)

副指導教員：木内 良明 教授

(医系科学研究科 視覚病態学)

副指導教員：田中 茂 講師

(医系科学研究科 神経薬理学)

益田 俊

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

緑内障は全世界で6,000万人以上が罹患し、中途失明の最も一般的な原因疾患の1つである。緑内障の病態進行には、高眼圧以外に正常眼圧でもRGCの脱落・消失が生じることがあり正常眼圧緑内障(NTG)と呼ばれている。緑内障病態には、高眼圧の他に老化、低血圧、酸化ストレス、遺伝素因など複数因子の関与が指摘されているが、緑内障に関する分子メカニズムの多くは不明である。一方、細胞内cAMP上昇は、神経細胞生存や神経突起伸長に作用し、軸索損傷後の軸索再生において重要な因子である。GPR3は恒常的G $\alpha$ s活性化能を有し、リガンド非存在下にcAMPレベル上昇に寄与するG蛋白質共役型受容体である。また、GPR3は中枢神経系に豊富に発現し、神経突起伸長・生存・分化に関与することがこれまで報告されている。しかしながら、網膜神経細胞(RGC)におけるGPR3発現や、網膜神経細胞死や視神経障害後の軸索再生など、緑内障関連因子への影響については不明である。本研究ではマウス網膜におけるGPR3発現を検討し、加齢や高眼圧に伴う網膜神経細胞死や、軸索障害後の神経再生への影響を検討した。

網膜におけるGPR3発現検討には、CRISPR-Cas9技術を用いてPAタグGPR3(PA-GPR3)ノックインマウスを作成し、マウス網膜でのGPR3発現を検討した。マウス網膜におけるGPR3発現は、RGCでは比較的高く、外顆粒層や内顆粒層の神経細胞では弱く、アマクリン細胞にはまばらに発現を認めたが、ミュラー細胞には発現を認めなかった。

次に、RGCにおけるGPR3発現が加齢や高眼圧に伴う網膜神経細胞死に与える影響を検討した。野生型マウスとGPR3ノックアウトマウスでは、生後8-20週齢において、体重と眼圧に有意な差を認めなかった。また、3-4週齢では、野生型マウスとGPR3ノックアウトマウス間でRGC数と内網状層(IPL)厚に差は見られなかったが、GPR3ノックアウトマウスでは野生型マウスと比較して10-12週齢の早期に、RGC数とIPL厚の有意な減少を認め、同傾向は50-60週齢まで持続した。したがって、RGCにおけるGPR3発現が、眼圧に影響を与えることなく、加齢に伴うRGC生存に関与することが示唆された。さらに、GPR3発現は網膜虚血再灌流(I/R)8-48時間後に有意に減少し、GPR3ノックアウトマウスでは野生型マウスと比較して、I/R後のRGC数やIPL厚の有意な減少を認めた。以上の結果から、マウスRGCにおけるGPR3発現は、加齢や網膜虚血時の生存を促進することが明らかとなった。

さらに、初代培養網膜神経節細胞を用いて、GPR3発現が神経細胞突起伸長と細胞生存に与える影響について検討した。その結果siRNAによるGPR3発現抑制により、培養24、48時間後において、有意な神経突起伸長の抑制と細胞生存の減弱を認めた。逆に、GPR3遺伝子導入により培養24、48時間後において有意な神経突起伸長を認めた。したがって、培養RGCにおけるGPR3の発現が、神経突起伸長と細胞生存を促進することが示唆された。

次に、RGCに発現するGPR3が視神経障害後の軸索再生に与える影響について検討した。野生型マウスまたはGPR3ノックアウトマウスに視神経軸索挫滅処置(ONC)施し、手術直後に軸索再生促進因子ザイモサンを眼窩内投与し、神経損傷から28日後に軸索再生を、蛍光順行性トレーサーを用いて評価した。野生型マウスでは、軸索再生はザイモサンによって促進を認めたが、GPR3ノックアウトマウスでは、ザイモサンによる軸索再生が有意に抑制された。したがって、RGCに発現するGPR3は、ONC後のザイモサンによる網膜軸索再生に関与していることが示唆さ

れた。

最後に、RGC への GPR3 遺伝子導入が ONC 後の軸索再生に与える影響を検討した。アデノ随伴ウイルスベクター(rAAV)による網膜への GPR3 遺伝子導入により、rAAV-GPR3 導入 14 日後に Mock 導入群と比較し、RGC における cAMP 上昇と ERK1/2 リン酸化の促進傾向を認めた。また、GPR3 導入群では、Mock 導入群と比較し、ONC 4 週間後に有意な軸索再生を認めた。さらに、Mock 導入後にザイモサンを添加すると、軸索再生が促進されたが、GPR3+ザイモサン導入群では、CPT-cAMP +ザイモサン導入群と同程度にまで、有意で顕著な軸索再生を認めた。以上の結果から、rAAV を介した RGC への GPR3 遺伝子導入は、ONC 後の軸索再生を促進することが明らかとなった。

今回の検討により、マウス RGC における GPR3 発現が、加齢や虚血ストレスに対し神経保護的に作用し、さらに RGC への GPR3 遺伝子導入が視神経軸索障害後の軸索再生を促進することが明らかとなった。

- 2 ページ目（当該ページ）より要旨の本文を入力してください。
  - 要旨本文については、日本語の場合は 2,000 字以内、英文の場合は 1,000word 以内で作成してください。
  - 論文の abstract そのままを提出しないでください。
  - 図表は使用しないでください。
  - 要旨本文は、ワードの横書きで、必ず A4 版 2 枚以内で作成してください。フォントは「MS 明朝」とし、英数字は「Century」の半角を使用し、10 ポイントで作成してください。
  - 要旨の書き方に上記以外の決まりはありません。書き出しを「初めに～」、「目的」、「私は～」など、どのようにしても問題ございません。指導教員にご相談ください。
- 
- Please start content of the abstract from the second page.
  - The title of the thesis, the name of the journal and Japanese translation etc. on the front page must be exactly the same as written on ③Abstract (論文目録) including font, font size and punctuation marks.
  - If you are not sure which department your supervisors belong to, please ask the Student Support Group
  - The abstract must contain no more than 2,000 characters in Japanese or 1,000 words in English.
  - The abstract here must be prepared separately from the one with the thesis applied to a journal.
  - Tables and charts must not be included.
  - The abstract must be written horizontally and limited to two sheets of A4 size paper. Alphanumeric characters must be written in 10 points “Century” and others must be written in 10 pints “MS 明朝”.
  - There is no fixed format other than the above in the way of writing the abstract. You may start a sentence with “First of all,” “Purpose,” “I,” or any others. Please consult with your academic supervisors.