

論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（ 医学 ）	氏名	益田 俊
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 ①・2 項該当		
論文題目 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)			
論文審査担当者			
主 査	教授	橋本 浩一	印
審査委員	教授	丸山 博文	
審査委員	講師	岡崎 貴仁	
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>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である。緑内障の病態進行には、高眼圧の関与がよく知られているが、正常眼圧でも網膜神経節細胞(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。しかしながら、緑内障に関する分子メカニズムの多くは不明である。</p> <p>一方、細胞内 cAMP 上昇は、神経細胞生存や神経突起伸長を促進し、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 Gαs 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、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、加齢や虚血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。</p> <p>CRISPR-Cas9 技術を用いて作成した PA タグ GPR3 (PA-GPR3) ノックインマウスを用いて、マウス網膜での GPR3 発現を検討した。マウス網膜において、GPR3 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、ミュラー細胞には発現を認めなかった。</p> <p>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、10-12 週齢の早期には、GPR3 ノックアウトマウスでは野生型マウスと比較して 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 発現は、眼圧に影響を与えることなく、加齢に伴う RGC 生存に関係することが示唆された。さらに、GPR3 発現は、高眼圧負荷による網膜虚血再灌流 (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。</p> <p>さらに、初代培養 RGC を用いて、GPR3 発現が神経細胞突起伸張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、有意な神経突起伸張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。</p> <p>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) を施し、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た。神経損傷から 28 日後に軸索再生を、</p>			

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)を用いて網膜へGPR3遺伝子を導入した。rAAV-GPR3導入14日後には、Mock導入群と比較して、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、ONC4週間後には、GPR3導入群では、Mock導入群と比較して、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。

このように、本研究は、RGCの生存や軸索再生におけるGPR3の役割の一端を解明し、緑内障の病態生理の理解に大きな貢献をもたらした。よって審査委員会委員全員は、本論文が益田俊に博士(医学)の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。