

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	猪川 文朗
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1・2 項該当		
論文題目 Detailed neuronal distribution of GPR3 and its co-expression with EF-hand calcium-binding proteins in the mouse central nervous system (マウス中枢神経系における GPR3 の詳細な分布と EF-hand 型カルシウム結合蛋白との共発現)			
論文審査担当者			
主査	教授	橋本 浩一	印
審査委員	教授	川上 秀史	
審査委員	講師	淵上 学	
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>GPR3 は恒常的 G_s 活性化型 G 蛋白共役型受容体の一つであり、リガンド非存在下に G_s を活性化し細胞内 cAMP を一定レベルに維持するユニークな受容体である。GPR3 は GPR6・GPR12 と共に受容体ファミリーを形成し、中枢神経系に豊富に発現し、神経細胞において突起伸長や細胞分化、細胞生存に関与することがこれまで明らかにされている。一方、GPR3 はアミロイド β の産生亢進、情動反応、神経因性疼痛、コカイン依存、アポトーシス刺激からの保護など中枢神経系に関連した病態との関連性が指摘されている。しかしながら、中枢神経系における GPR3 の詳細な発現分布については特異的抗体不在のため不明であった。今回、GPR3 ノックアウト/LacZ ノックインマウスを用い、GPR3 プロモーター活性化発現部位を β ガラクトシダーゼに対する蛍光基質 (Spider β-gal) により同定することに新たに成功し、様々な神経細胞特異的マーカー蛋白抗体との蛍光二重染色による神経特異的発現解析が可能になった。中枢神経系における GPR3 のさらなる生理的役割解明には、GPR3 の詳細な発現解析が重要であると考えられ、本研究ではマウス中枢神経系における GPR3 発現部位を、X-gal 蛍光染色法と各種神経細胞サブタイプマーカーとの蛍光二重染色法により詳細に同定し、中枢神経系における GPR3 の生理的役割の手掛かりを得ることを研究目的とした。</p> <p>GPR3 プロモーター発現は、既報の GPR3 発現領域 (手綱核、海馬、視床、線状体、皮質) に加え、大脳基底核や嗅覚、聴覚、感情・運動機能に関係する様々な脳神経核で観察された。中枢神経系の各部位において蛍光二重染色法により、さらに詳細な GPR3 発現部位を同定した。結果は以下にまとめられる。</p> <p>嗅球では、GPR3 は主に糸球体層で発現が観察され、その大部分がカルビンジン (CB) 陽性神経であり、コレシストキニン (CCK) 陽性神経細胞にも一部発現が観察され、external tufted cell での発現が示唆された。大脳皮質では、大脳皮質第 V 層神経細胞に豊富な発現が観察でき、II-IV 層および VI 層にも若干の発現を観察した。皮質体性感覚野では、第 V 層の GPR3 発現陽性神経細胞の多くは CCK や CB 陽性であった。また、その一部は GAD67 やパルブアルブミン (PV) 陽性の抑制性神経細胞であった。運動野の第 V 層では、GPR3 発現細胞の約半数が CTIP2 陽性細胞であり、皮質錐体細胞での GPR3 発現を認めた。海馬では、海馬 CA2 の錐体細胞層に GPR3 発現が観察され、概ね CB 陽性神経細胞に発現を認めた。また、CA1、CA2、歯状回では PV 陽性あるいは CCK 陽性の抑制性神経細胞に豊富な発現を認めた。視床では、視床外側核のグルタミン酸作動性神経細胞に豊富な GPR3 発現を認め、視床網様核の PV 陽性抑制性神経細胞にも発現が観察された。線状体では、背外側 DARRP32 陽性中型有棘細胞に主要な GPR3 発現を認めた。中脳では、黒質網様部外側部の PV 陽性神経細胞に GPR3 発現を認めたが、黒質緻密部、腹側被蓋野のドーパミン作動性神経細胞での GPR3 発現を認めなかった。淡蒼球内節では、多くの抑制性神経細胞で GPR3 発現を認め、主に PV 陽性神経細胞に発現を認めた。扁桃体では、</p>			

主に基底外側核 (BLA) で GPR3 発現を認め、内側核では発現を認めなかった。BLA では、抑制性・興奮性の両神経細胞に発現を認めた。小脳では、小脳深部核の大型神経細胞に強い GPR3 発現を認め、同部位のグルタミン酸作動性神経細胞での発現が示唆された。顆粒細胞層ではゴルジ細胞・カルレチニン陰性単極性刷毛細胞での発現が示唆された。脊髄では、脊髄前角、中間帯、後角でカルレチニン陽性細胞の多くに GPR3 発現を認めた。

また、GPR3 は海馬 CA2 のマーカー蛋白である neuronal Ca²⁺-binding protein 2 (NECAB2) と中枢神経系の様々な部位で高い共発現を認め、さらに、細胞レベルにおいても GPR3 は神経突起先端での NECAB2 との共局在を認めた。

以上の結果から、GPR3 は既報の発現部位に加えて、嗅球、扁桃体、淡蒼球内節、上丘・下丘、三叉神経核、前庭神経核、蝸牛神経核、顔面神経核、脊髄で GPR3 発現を新たに確認した。また GPR3 はマウス中枢神経系において多くの部位で、興奮性ニューロン (グルタミン酸作動性) と抑制性ニューロン (GABA 作動性) に発現を認めた。さらに、GPR3 は NECAB2 とマウス中枢神経系の多くの領域で共発現し、神経突起先端部位での共局在を認めた。

近年、NECAB2 はアデノシン A2A 受容体と相互作用し、Gs-cAMP と MAP kinase 活性を介して受容体機能を修飾することが報告されている。GPR3 も Gs-cAMP と MAP kinase 活性化能を有するため、NECAB2 と相互作用し、神経細胞におけるシナプス機能やアポトーシスなどにおいて、カルシウムシグナリングを修飾する可能性が示唆された。

これまで内側手綱核や扁桃体における GPR3 発現から不安・抑うつ関連疾患への関連性が指摘されている。本研究ではさらに、海馬 CA2 錐体細胞などに限局した発現から学習・記憶との関連性、海馬抑制性神経細胞への発現から癲癇や脳虚血などの病態への関連性が示唆された。また、皮質老人斑蓄積部位に一致した発現からアルツハイマー病病態との関連性や、線条体中型有棘細胞、淡蒼球内節や黒質緻密部に投射する黒質網様部のパルブアルブミン陽性細胞での発現からパーキンソン病態発現との関連性が示唆された。

本研究において中枢神経系での詳細な GPR3 発現分布が解明され、各種病態における GPR3 の新たな役割解明への手掛かりとなる可能性が示唆された。

よって審査委員会全員は、本論文が猪川文朗に博士 (医学) の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。