（書式１２）

| | |
|---|---|
| 氏　　名 | 面髙（おもだか）　宗子（かずこ） |
| 学位の種類 | 博士（医学） |
| 学位授与年月日 | 平成 27 年 3 月 25 日 |
| 学位授与の条件 | 学位規則第 4 条第 1 項 |
| 研究科専攻 | 東北大学大学院医学系研究科（博士課程）　医科学専攻 |
| 学位論文題目 | Artemin/GFRα3 経路の視神経損傷後の軸索再生における役割 |
| 論文審査委員 | 主査　教授　中澤　徹<br>教授　阿部　俊明　　教授　瀧　靖之 |

# 論 文 内 容 要 旨

【目的】

緑内障は本邦の失明原因の第一位を占め、高齢化社会において現在も増加し続ける重要な眼疾患である。通常眼圧を十分に下降させることにより進行を止めることが出来るとされている。しかし、本邦では眼圧が正常なタイプの緑内障（正常眼圧緑内障）が全緑内障の大半を占め、更に十分に眼圧下降を得られても視野障害が進行する症例が存在し、眼圧下降以外の新たな治療法の開発が急務である。緑内障は視神経乳頭篩状板部での軸索障害による網膜神経節細胞（RGC: retinal ganglion cell）死が主原因であり、神経保護治療の開発が期待されている。これまでに当教室では脳由来神経栄養因子（BDNF: brain-derived neurotrophic factor）を用いた治療開発を進めたが、軸索保護作用や長期的な効果が認められないことが明らかとなった。本研究では他の有力な神経栄養因子であるグリア細胞由来神経栄養因子（GDNF: glial cell line-derived neurotrophic factor）の治療応用への可能性について検討した。

【方法】

成熟ラット（Sprague-Dawley rat, 200-240g）に視神経切断を行った。眼球後方から視神経を確認、視神経鞘を切除し視神経を露出した。眼球後壁から 1mm の部位で血管損傷しないよ

うに視神経のみを剪刃で切断した。軸索切断後 1, 3, 7, 10 日目の網膜を摘出し解析に用いた。生存 RGC 密度を測定するために、脳上丘に逆行性染色トレーサーであるフルオロゴールドを注入し、染色された RGC 密度を網膜伸展標本で顕微鏡下に計測した。RNA 発現変化は定量的 RT-PCR 法、蛋白の変化はウエスタンブロット法や免疫染色法で調べた。GDNF 関連分子の受容体である GFRα1, 2, 3 の網膜における役割を調べるために、発達期の網膜で蛋白・RNA の経時的な発現変動を調べた。視神経切断で確認された GFRα3 の劇的な発現増加の役割を検討するために、成熟ラット網膜の初代培養を用いて、GFRα3 のリガンドである Artemin（ARTN）の RGC 生存のシグナル伝達経路や軸索再生作用を調べた。また、生体ラットを用いて GDNF 関連分子の軸索再生作用について、視神経挫滅後の瘢痕部位を乗り越えた再生軸索を計測した。

【結果】

成熟ラットの視神経切断モデルにおいて、網膜 GFRα3 の mRNA は 3 日後をピークに約 10 倍の遺伝子発現上昇を示した。また、網膜 GFRα3 蛋白も有意に増加し、免疫染色では、その発現上昇は RGC に認められた。網膜 GFRα3 の遺伝子発現は発達期の早期（生後 7 日まで）に見られた。免疫染色法では GFRα3 蛋白は主に網膜内層に強く認められた。GDNF 関連分子は *in vivo*、*in vitro* 共に RGC に対して神経保護作用を認めた。特に ARTN の網膜初代培養における RGC 生存維持には PI3K、MAKP が重要な働きをしていた。ARTN/GFRα3 は生体成熟ラットにおいて、有意な軸索再生促進作用を有した。

【結論】

ARTN/GFRα3 は軸索損傷後 RGC に対する神経保護作用と、他の GDNF 分子には認めない強力な軸索再生促進作用を有することが判明した。本研究の成果は、緑内障の神経栄養因子を用いた遺伝子導入による神経保護治療の開発に寄与する発見と考えられる。

【所定様式⑬No.1】大学院の課程による者（課程博･医学）

# 審　査　結　果　の　要　旨

博士論文題目　Artemin/GFRα3 経路の視神経損傷後の軸索再生における役割

所属専攻・分野名　医科学専攻　・　眼科学　分野

氏名　面髙　宗子

緑内障は本邦の失明原因の第一位を占め、高齢化社会において現在も増加し続ける重要な眼疾患である。通常眼圧を十分に下降させることにより進行を抑えられることが出来るとされている。しかし、本邦では眼圧が正常なタイプの緑内障（正常眼圧緑内障）が全緑内障の大半を占め、更に十分に眼圧下降を得られても視野障害が進行する症例が存在し、眼圧下降以外の新たな治療法の開発が必要である。緑内障は視神経乳頭篩状板部での軸索障害による網膜神経節細胞（RGC）死が主原因であり、神経保護治療の開発が期待されている。これまでに当教室では脳由来神経栄養因子（BDNF）を用いた治療開発を進めたが、軸索保護作用や長期的な効果が認められないことが明らかとなった。

そこで申請者は、ラットの緑内障モデルを用いて眼圧下降に依存しない神経保護治療の可能性を探求するために、神経栄養因子である GDNF 関連分子に注目し、その役割を検討した。まず成熟ラットに視神経切断を行い、視神経切断モデルを作成し、RNA 発現変化の検討を定量的 RT-PCR 法にて行った。網膜 GFRα3 遺伝子発現を調べると、mRNA は 3 日後をピークに約 10 倍の遺伝子発現上昇を示していた。また、網膜 GFRα3 蛋白もウエスタンブロット法にて有意に増加していることが判明した。

この視神経切断後の GFRα3 発現上昇の役割を検討するために、発達網膜での発現変動、GFRα3 のリガンドである ARTN 蛋白を用いて網膜初代培養によるシグナル伝達経路の検討、そして神経保護や軸索伸長における作用を検討した。その結果、GFRα3 は発達網膜で RGC が軸索伸長する時期に発現が高く、軸索障害後 72 時間後に胎生期に発現量の多い GFRα3 が発現増加していることは、軸索損傷後 72 時間の地点は、軸索再生や細胞の運命を決定づける大事なタイミングであることが示唆された。また、ARTN は培養、生体ともに神経保護作用を認め、MAPK や PI3K 経路を介していること、ARTN には GDNF 関連分子の中で唯一、強力な軸索伸長作用を認めることを明らかにした。RGC における ARTN/GFRα3 は軸索障害時に神経保護作用と軸索伸長作用を共に有することが判明した。

緑内障は篩状板部における軸索障害が病態の主体であり、RGC 細胞体と軸索共に恒常性を維持することが真の治療と考えられている。ARTN/GFRα3 の作用は新たな再生と生存維持の 2 つの作用を有する分子であり、この経路の解明は緑内障治療に重要な 2 つの側面を共に制御するに当たり重要な研究テーマと考えられた。これらの成果は、緑内障の神経栄養因子を用いた遺伝子導入治療を応用した神経保護治療の開発に寄与するものと考えられる。

よって，本論文は博士（医学）の学位論文として合格と認める。