

## 論文の内容の要旨

論文提出者氏名	平野隆雄
論文審査担当者	主査 宇佐美真一 副査 新藤隆行・中山淳
論文題目	Physiological significance of Rag1 in neuronal death, especially optic neuropathy (神経、特に視神経の細胞死における Rag1 の生理的重要性)
(論文の内容の要旨)	
<p>【背景と目的】核内転写因子 nuclear factor kappa B (NF-<math>\kappa</math>B)が細胞死あるいは細胞生存に関与していることはよく知られている。しかしながら、中枢神経系での細胞死における NF-<math>\kappa</math>B の詳細な役割については明らかとされていない。以前、我々は NF-<math>\kappa</math>B のサブタイプの1つである p50 欠損マウス(NF-<math>\kappa</math>Bp50 欠損マウス)における経時的な網膜神経節細胞(RGCs)の障害について報告した。本研究では NF-<math>\kappa</math>Bp50 欠損マウスで認められる RGCs 障害を制御している因子の発現と活性化について検討を行った。</p> <p>【材料及び方法】組換え活性化遺伝子(<i>Rag:Recombination activating gene</i>)は <i>Rag1</i> および <i>Rag2</i> により構成されている。この2つの遺伝子が V(D)J 組換え酵素の <i>Rag1</i> および <i>Rag2</i> を作り、多種多様な抗体産生を可能にし、適応免疫には欠かせない。<i>Rag1</i> は中枢神経系、その中でもとくに海馬などの細胞密度が高い領域での発現が確認されているが、同領域での <i>Rag1</i> の役割については明らかとされていない。本研究では、<i>Rag1</i> が RGCs 障害に関係しているという仮説をたて、まず <i>Rag1</i> の視路での発現を4ヶ月齢の野生型マウスを用い免疫染色法、ウエスタンブロット法、PCR 法により検討した。次いで、<i>Rag1</i> の RGCs 細胞死への関与を明らかにするため、6ヶ月齢の野生型マウス、NF-<math>\kappa</math>Bp50 欠損マウス、NF-<math>\kappa</math>Bp50・<i>Rag1</i> ダブル欠損マウス、<i>Rag1</i> 欠損マウスの4群において網膜切片・フルオレセイン逆行性染色により RGCs 数を評価した。RGCs の細胞表面マーカー CD90.2 陽性細胞において Annexin V を用いたフローサイトメトリーにより RGCs 細胞死数を検討した。<i>In vitro</i> では neuronal stem-like cells(mouse)を用いた NMDA 誘導性細胞死の実験系により、<i>Rag1</i> の発現有無と神経細胞死との関連性を検討した。また、人為的に <i>Rag1</i> を過剰発現させた HEK293 細胞での Bax、cleaved caspase-3、-8、-9 などの細胞死制御因子の発現をウエスタンブロット法により評価した。さらに、ヒト網膜における <i>Rag1</i> の発現を組織学的に検討した。</p> <p>【結果】4ヶ月齢の野生型マウスの網膜・視神経において免疫染色法、ウエスタンブロット法、PCR 法により RGCs にのみ <i>Rag1</i> が発現することが明らかとなった。6ヶ月齢の NF-<math>\kappa</math>Bp50 欠損マウスでは網膜切片、フルオレセイン逆行性染色により測定した RGCs 数が野生型マウスと比較し有意な減少が認められた。しかしながら、NF-<math>\kappa</math>Bp50・<i>Rag1</i> ダブル欠損マウスでは、野生型マウスと RGCs 数において有意差が認められなかった。フローサイトメトリーの結果、6ヶ月齢の NF-<math>\kappa</math>Bp50 欠損マウスの RGCs 細胞死数が野生型マウスと比較し有意に増加していた。一方、NF-<math>\kappa</math>Bp50・<i>Rag1</i> ダブル欠損マウスの RGCs 細胞死数は野生型マウスと同等であった。Murine neuronal stem-like cells を用いた NMDA 誘導性細胞死の実験系において、コントロール群に比し <i>Rag1</i> の発現を抑制した群では Live cells の割合が有意に多かった。また、<i>Rag1</i> を過剰発現させた HEK293 細胞において、細胞死関連因子 Bax、cleaved caspase-3、-8、-9 の発現はコントロール群より有意に強いことが認められた。組織学的解析により、ヒト網膜でも <i>Rag1</i> が RGCs 特異的に発現していることが確認された。</p> <p>【結論】マウスの視路において <i>Rag1</i> が RGCs 特異的に発現していることが明らかとなった。また、<i>In vivo</i> および <i>in vitro</i> の結果より <i>Rag1</i> が神経細胞死に関与することが示された。さらに、ヒト網膜でも <i>RAG1</i> が RGCs に発現していることが確認されたことから今後、緑内障を代表とする RGCs 障害に対して <i>RAG1</i> が新たな治療法のターゲット候補となる可能性が示唆された。</p>	