

Title	Activating transcription factor 3 (ATF 3) induction by axotomy in sensory and motoneurons : a novel neuronal marker of nerve injury
Author(s)	辻野, 宏明
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41849
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	辻野宏明
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第15208号
学位授与年月日	平成12年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科生理系専攻
学位論文名	Activating transcription factor 3 (ATF 3) induction by axotomy in sensory and motoneurons : a novel neuronal marker of nerve injury (知覚および運動神経細胞軸索切断後の転写因子 ATF 3 の誘導 : 神経損傷の新規マーカー)
論文審査委員	(主査) 教授 遠山 正彌 (副査) 教授 越智 隆弘 教授 吉川 秀樹

論文内容の要旨

【目的】

Activating transcription factor 3 (ATF 3) は転写因子 ATF/CREB family の一員であり、多くの組織でストレスによって誘導されることが報告されている。今回我々は、末梢神経損傷後の ATF 3 の発現の特徴を明らかにする目的で以下の実験を施行した。

【方法ならびに成績】

(1) ノーザンブロット法による ATF 3 mRNA の発現解析

無処置のコントロールラットの後根神経節(以下 DRG) では ATF 3 mRNA の発現は認められなかったが、坐骨神経切断後の DRG では ATF 3 mRNA の発現が誘導された。

(2) in situ hybridization 法による坐骨神経切断後の ATF 3 mRNA の発現解析

DRG においては術後6時間までは ATF 3 mRNA の発現は認められなかったが、術後12時間より誘導されはじめ術後1~14日をピークとしその後発現は減少するものの術後70日でもコントロールレベルより高値を示した。

脊髓前角においては術後12時間までは ATF 3 mRNA の発現は認められなかったが、術後1日より誘導されはじめ術後3~7日をピークとしその後発現は減少し術後42日に発現はコントロールレベルにもどった。

(3) spinal nerve 切断後と坐骨神経切断後における ATF 3 mRNA の発現の誘導

DRG に近い spinal nerve 切断後では切断後6時間で発現誘導が明らかになったのに対し、坐骨神経切断後では切断後12時間で発現が誘導された。

(5) 軸索切断と ATF 3 の発現の関係

切断部に注入された逆行性トレーサー fluorogold でラベルされた neuron と ATF 3 mRNA を発現した neuron はほぼ一致した。

(6) 免疫組織化学法による DRG および脊髓における ATF 3 蛋白の発現解析

コントロールの DRG および脊髓においては ATF 3 蛋白の発現は認められなかったが、坐骨神経切断後 ATF 3 蛋白の発現が DRG neuron、脊髓前角の motoneuron に認められた。また、脊髓後角においては坐骨神経切断後も電気刺激後も ATF 3 蛋白の発現は誘導されなかった。

(7) 2重免疫染色を用いた坐骨神経切断後の DRG と脊髓における c-jun と ATF 3 の発現パターンの相違

DRG においては ATF 3 は c-jun よりも多くの population の neuron に発現が認められた。脊髄前角においては ATF 3 と c-jun の発現はほぼ一致した。

(8) 足底へのホルマリン及び CFA 注入後の DRG における ATF 3 の発現

ホルマリン注入後 DRG において ATF 3 の発現が誘導されたが、CFA 注入後は ATF 3 の発現は誘導されなかった。

【総括】

ATF 3 は肝臓、心臓、腎臓などで直接損傷、虚血、toxin といったストレスによって発現が誘導されることが報告されてきた。ATF 3 は細胞のストレスに反応し誘導される為ストレス反応に何らかの役割を果たしていると考えられるが、その機能に関してはいまだ十分に解明されていない。現在までに ATF 3 は homodimer として ATF/CRE site に結合し転写の抑制に働き、c-jun との heterodimer として ATF/CRE site、AP-1 site に結合し転写の促進に働くことが報告されている。

今回の実験の結果によって ATF 3 は正常では DRG や脊髄では発現していないが、軸索損傷後に DRG neuron や脊髄前角の motoneuron に発現が誘導される事が明らかとなった。

また、軸索損傷後の ATF 3 の発現誘導の時期はいままでに報告されてきた他の臓器でのストレス後の発現誘導時期と比較すると遅かった、この理由として発現誘導のメカニズムの違いが考えられる。軸索損傷後の ATF 3 の発現誘導は、今回の実験の結果で細胞体から損傷部までの距離依存的に誘導時期が変化する事から何らかの分子の軸索からの輸送のブロックがトリガーになっていると示唆される。

さらに、切断部に注入された逆行性トレーサーでラベルされた neuron のほぼすべてに ATF 3 の発現が誘導された結果から、軸索損傷をうけたすべての neuron で ATF 3 は発現が誘導されると考えられた。また、軸索損傷で発現が誘導される c-jun の発現と比較すると、坐骨神経切断後脊髄前角の motoneuron では ATF 3 と c-jun の発現は一致したが、DRG では ATF 3 は c-jun よりも多くの population の neuron に発現が認められた。

ATF 3 は c-jun など他の転写因子と比較すると軸索損傷、痛覚刺激、c-fiber に対する電気刺激などの刺激によっても脊髄後角の neuron で発現が誘導されない点も異なっていた。つまり、ATF 3 はシナプスを介した発現は誘導されない事が示唆された。

足底へのホルマリンの注入では ATF 3 の発現が誘導されたが CFA の注入では発現が誘導されなかった事実は、ホルマリンの様に組織およびそこに含まれる神経終末が損傷されると発現が誘導されるが、CFA のような炎症のみでは発現が誘導されない事が明らかになった。

以上の結果から ATF 3 は末梢神経の軸索損傷に際して、損傷された neuron のみに発現が誘導される末梢神経損傷にたいする有用なマーカーとなりうると考えられた。

論文審査の結果の要旨

転写因子 ATF/CREB family の一員である ATF 3 は現在までにいくつかの臓器および cell line でストレスによって誘導されることが報告されており細胞のストレス反応の過程で重要な役割をはたしていると考えられている。いままでも ATF 3 の神経系における発現の特徴は明らかではなかった。本研究は northern blotting、in situ hybridization 法、免疫組織化学法を用いて ATF 3 が末梢神経系において通常は発現していないが軸索損傷後、損傷を受けた神経細胞に誘導される事実を明らかにした。さらに、逆行性トレーサーと in situ hybridization 法による二重標識を用いて ATF 3 が軸索損傷後すべての損傷神経細胞において ATF 3 が誘導される事実を明らかにし、また、電気刺激や炎症といった神経細胞に対する直接損傷でないストレスに対しては ATF 3 が誘導されない事実を明らかにした。末梢神経における直接損傷に対してこのような発現パターンをとる遺伝子は現在までに報告されておらず、ATF 3 は末梢神経における軸索損傷の有用なマーカーとなりうるといふ本研究の成果は神経科学分野の研究のなかで広く応用される事が期待され非常に高く評価できる。

さらに、本研究は ATF 3 との間でダイマーを形成し転写調節に作用する c-Jun と ATF 3 が軸索損傷後知覚神経細胞と運動神経細胞との間で異なった発現パターンを示す事実を報告している。知覚神経細胞と運動神経細胞が軸索損

傷後異なった運命をたどる事実、つまり軸索損傷後運動神経細胞はすべて生存するのに対し知覚神経細胞は一部が細胞死を起こすという事実を解明する上でこの研究成果は非常に興味深く示唆にとんでおり高く評価できる。

最後に、本論文は神経科学分野の国際誌として評価の高い *Molecular and Cellular Neuroscience* に掲載されている点からも国際的にも高い評価を得ており学位の授与に値すると考えられる。