

学 位 論 文 要 旨

研究題目

Laminin 332 regulates glial fibrillary acidic protein expression and astrocyte maturation during spinal cord development

(ラミニン 332 は、脊髄発生過程においてグリア線維酸性タンパク質の発現とアストロサイトの成熟を調節する)

兵庫医科大学大学院医学研究科

医科学専攻 高次神経制御系

整形外科学 (指導教授 橘 俊哉)

氏 名 山浦鉄人

脊髄は内側の灰白質と外側の白質から構成され、白質は求心性・遠心性の伝導路を形成する軸索束により構築される。発生期において白質は、中枢末梢の情報伝達を担う神経ネットワーク基盤として重要であるが、その形成制御機構は未解明な点が多い。特に、白質形成には軸索ガイダンスやグリア細胞の成熟が密接に関わることが示唆される一方、細胞外マトリックス (ECM) による環境調節の実態は十分解明されていない。本研究は、ECM の主要構成要素である laminin 群に着目し、とくに Laminin 332 (= Laminin $\alpha 3 \beta 3 \gamma 2$) による発生期脊髄白質形成への関与を明らかにすることを目的とした。

まず、マウス胎仔脊髄における laminin 332 の発現を免疫組織化学的に解析した結果、胚齢 E12 および E14 において、白質予定領域である marginal zone に顕著な laminin $\alpha 3$ の局在が認められた。さらに、Laminin 332 の構成因子である $\beta 3$ サブユニットも E14 の marginal zone に存在し、RT-PCR および Western blot により $\alpha 3 \cdot \beta 3 \cdot \gamma 2$ の発現が確認されたことから、本領域で機能的 Laminin 332 が形成されていることが示された。E16 以降では発現が低下し、Laminin 332 の作用は一定の発生時期に局限している可能性が示唆された。

次に、Laminin 332 と軸索との関係を検討するため、E14 脊髄に DiI を注入し軸索投射線維をラベリングした。その結果、ラベルされたニューロンは同側前角、対側後角、さらに脳幹まで遡って観察され、これらのニューロンが marginal zone に軸索を投射していることが確認された。また、同領域で laminin $\alpha 3$ mRNA が発現していたこと、さらに細胞体の乏しい marginal zone で Laminin 332 が Tuj1 陽性軸索を取り囲むように局在することから、Laminin 332 は脳幹・脊髄由来ニューロンの軸索によって供給され、発生期白質形成の微小環境を構築していると推測された。

グリア細胞との関連を検討したところ、GFAP 陽性線維は E12 および E14 の marginal zone で Laminin 332 陽性領域と一致して観察された。E16-18 では GFAP 陽性細胞が marginal zone に増加し、時期依存的にアストロサイトへの移行が進む過程が示唆された。これらは、Laminin 332 が GFAP 発現誘導によるアストロサイト成熟に寄与し、白質区画の形成に関わる可能性を示唆した。

そこで *in vitro* 解析として、アストロサイト前駆細胞株 OS3 を用い Laminin 332 による影響を検討した。Laminin 332 でコートした Dish 上では他の ECM でコートした Dish と比較し OS3 細胞は GFAP 発現を亢進し、同時に細胞増殖は抑制された。比較対象である Laminin 511 やフィブロネクチンは同様の強い GFAP 誘導作用は示さず、Laminin 332 が特異的にアストロサイト成熟を促進することが示唆された。さらに、Laminin 332 が結合する既知のインテグリン受容体 $\alpha 6 \beta 4$ / $\alpha 3 \beta 1$ を阻害したところ、特にインテグリン $\alpha 6 \beta 4$ 阻害により GFAP 誘導が抑制され、増殖抑制効果も解除された。したがって、Laminin 332 は主としてインテグリン $\alpha 6 \beta 4$ を介してアストロサイト成熟シグナルを伝達すると考えられる。また、同様の作用は E15 脊髄由来一次培養細胞でも確認され、Laminin 332 が発生期脊髄において GFAP 発現上昇を誘導しうることが支持された。

以上の結果より、Laminin 332 は発生期マウス脊髄 E12-14 の marginal zone において軸索により供給・局在し、その微小環境内でアストロサイト前駆細胞に対し分化誘導（GFAP 発現促進）と増殖抑制を与える役割を担うことが明らかとなった。これは、白質形成において、軸索が単に構造形成を行う存在ではなく、ECM を介し周囲のグリア細胞分化を誘導する活性因子としても機能することを示す。特に、インテグリン $\alpha 6 \beta 4$ 依存性の分化誘導は、白質アストロサイトの特徴である fibrous astrocyte 系譜を形成する分子基盤の一端を示している。

本研究は、白質形成という発生プロセスにおいて ECM が積極的に神経回路構築を調整する可能性を示唆した。さらに Laminin 332 の作用は、脊髄損傷（SCI）後の軸索再生およびグリア反応制御への応用可能性を示す。SCI では急性期にアストロサイトが炎症制御に有益に作用する一方、慢性期には瘢痕形成を介し再生阻害を引き起こす。発生期における Laminin 332 の役割は、軸索伸長とアストロサイト成熟がバランスする最適環境を構築することから、発生メカニズムを模倣する ECM 再構成が SCI 再生医療につながる可能性がある。