

培養ラット視神経乏突起神経膠細胞のアクチンの分布について

梶川 大介, 久保田 浩, 盛 隆興, 下奥 仁

兵庫医科大学眼科学教室

要 約

培養ラット視神経 oligodendrocyte の運動性の観察を目的として、収縮蛋白質の一つであるアクチンに対する免疫組織学的検索を行った。未分化・未熟である extensive network type oligodendrocyte (type 1 OL) においてアクチンは細胞突起にびまん性染色を示し、より分化・成熟度の進んだ membranous expansion type oligodendrocyte (type 2 OL) においてアクチンは membranous expansion の先端部にびまん性染色を示す細胞とその染色性をほとんど示さない細胞が認められ、分化・成熟度が進むにつれてアクチンの分布も変化することを示した。つまり、未分化・未熟な oligodendrocyte は、その標的細胞である軸索を探索する上で高い運動性が要求されるためアクチンが豊富に存在し、ミエリン形成が終了すると特別な運動性は必要なくなることから、分化・成熟度の進んだ oligodendrocyte ではアクチンが減少すると考えられ、運動性に関与する収縮蛋白質もミエリン形成に伴い変化すると推察された。(日眼会誌 95:944-950, 1991)

キーワード：乏突起神経膠細胞, 視神経, 培養, アクチン, 細胞運動

The Distribution of Actin on Cultured Oligodendrocytes from Rat Optic Nerve

Daisuke Kajikawa, Hiroshi Kubota, Takaoki Mori
and Masashi Shimo-oku

Department of Ophthalmology, Hyogo College of Medicine

Abstract

Two types of cultured oligodendrocytes (OLs) from rat optic nerve were analyzed for the distribution of actin, a major contractile protein, using immunocytochemistry. Type 1 OLs showed extensive network of processes and type 2 OLs showed elaborate membranous expansion along an extensive network. Actin was diffusely stained on an extensive network of processes in type 1 OLs and on the distal portion of membranous expansion in type 2 OLs, but some oligodendrocytes were not stained. It was demonstrated that the distribution of actin in type 1 OLs and type 2 OLs varied with development in oligodendrocyte differentiation and maturation. Our results suggest that undifferentiated and immature oligodendrocytes display remarkable cell movement to search for target axons, and differentiated and mature oligodendrocytes do not require cell movement when myelination has finished. In conclusion, it is considered that actin plays an important role in myelinogenesis. (*Acta Soc Ophthalmol Jpn* 95: 944-950, 1991)

Key words: Oligodendrocyte, Optic nerve, Culture, Actin, Cell movement

別刷請求先: 663 西宮市武庫川町1-1 兵庫医科大学眼科学教室 梶川 大介
(平成2年11月2日受付, 平成3年1月17日改訂受理)

Reprint requests to: Daisuke Kajikawa, M.D. Department of Ophthalmology, Hyogo College of Medicine,
1-1 Mukogawa-cho, Nishinomiya 663, Japan

(Received November 2, 1990 and accepted in revised form January 17, 1991)

I 緒 言

細胞は一般に細胞分裂, 原形質流動, 遊走, 分泌, 形態変化などの運動性を示し, それにはいくつかの収縮蛋白質が関与していることが知られており, その主要なものにはアクチンとチューブリンである¹⁾. 著者らは先にラット視神経 oligodendrocyte の分離培養を行い, extensive network type oligodendrocyte (type 1 OL) と membranous expansion type oligodendrocyte (type 2 OL) の2種類の形態が存在し, type 1 OL から type 2 OL へと発育して行き, それらが分化・成熟度の違いによることを報告した²⁾. 一方, 大脳 astrocyte においては, in vivo, in vitro 共に免疫組織学的検索によりアクチンの存在が確認されており, また, astrocyte の前駆細胞はアクチンの特徴的な分布を示しながら活発な細胞運動の時期を経て分化していくと言われている³⁾⁻⁵⁾. 今回著者らは, 先に分類した2種類の培養ラット視神経 oligodendrocyte のアクチンに対する免疫組織学的検索を行い, アクチンの分布が oligodendrocyte の分化・成熟に伴い変化することを認めたので報告する.

II 実験方法

1. 継代培養

視神経初代組織培養は既報に準じ⁶⁾, 生後4日目の Wistar ラット視神経を無菌下で視神経幹を注意深く剥離し, 細切した. これらをあらかじめ poly-L-lysine を被覆した75cm²プラスチックフラスコ (Corning 社) に播種し, 8~10日間初代組織培養を行った. 次いで, グリア細胞層に一致した部分をパスツールピペットを用いて採取した. 得られた細胞浮遊液を軽くピペッティングし, 機械的に細胞分解を行った後, 1,000rpm, 5分間遠沈を行った. 上清を破棄し, 新鮮な培養液を入れ, poly-L-lysine を被覆した35mmプラスチックディッシュ (Corning 社) にステンレススチールメッシュで濾過させながら播種した. 培養液は10%牛胎児血清加 Dulbecco 変法 Eagle 培地を用い, 2日毎に培養液を交換し37°C, 5%CO₂ インキュベーターで培養を行った.

2. 免疫組織化学

oligodendrocyte の特異的マーカーである Myelin Basic Protein (MBP) に対する抗 MBP モノクローナル抗体 (Eurogenetics 社製) および抗アクチン抗体 (Biomedical Technologies 社製) を用い, 間接蛍光光

体法にて二重染色を行った. 全ての洗浄は, 0.1%牛血清アルブミン加0.05M リン酸緩衝液 pH 7.4 (0.1% BSA-0.05M PBS) を用いた. 継代培養後2~3日目の培養細胞を5回洗浄後, 4%サッカロースを含む3%パラホルムアルデヒドで30分間, 室温下で固定した. 再び洗浄後, 30分間室温下で風乾し, 1%BSA-0.1M PBS で100倍希釈したマウス抗 MBP モノクローナル抗体を4°C, overnight で反応させた. 100倍希釈したラビット抗アクチン抗体を2時間, 室温下で反応させ, さらに各々100倍希釈したフルオレセイン標識抗マウス IgG (Cappel 社製) およびロダミン標識抗ラビット IgG (Cappel 社製) の混合溶液を2時間, 室温下で反応させた. フルオレセインの励起には B フィルター (1F420-490), ロダミンの励起には G フィルター (IF500-550) を各々使い, 位相差顕微鏡・倒立型落射蛍光顕微鏡 (ニコン・ダイアフォト TMD-EF) にて同一視野での観察を行った.

III 結 果

継代培養後2日目における培養細胞は, 初代組織培養における構成成分である oligodendrocyte・astrocyte・線維芽細胞などであり⁶⁾, 各々の細胞が単離細胞として認められ, oligodendrocyte は分離培養と同様に2種類の特徴的な形態を示した²⁾.

1. extensive network type oligodendrocyte (type 1 OL)

MBP に対する免疫蛍光染色において, 細胞体の辺縁から5~10本の主細胞突起を伸展し, その間で網目状に絡み合った細胞突起, いわゆる extensive network を形成する細胞突起がびまん性に染色された (図 1A). 一方, アクチンに対する免疫蛍光染色においても, MBP の染色性とほぼ同様に extensive network を形成する細胞突起がびまん性に染色された (図 1B).

2. transitional type oligodendrocyte (transitional type OL)

type 1 OL から type 2 OL へ発育しつつある移行期の oligodendrocyte (transitional type oligodendrocyte) は種々の形態を呈し, 当初 extensive network にはほぼ一致していたアクチンのびまん性染色も membranous expansion を伸展し始めると, その分布も変化した. extensive network の間で MBP のびまん性染色を示す小さな membranous expansion を伸展する oligodendrocyte では, extensive network にはほぼ一致したアクチンのびまん性染色を示した (図 2

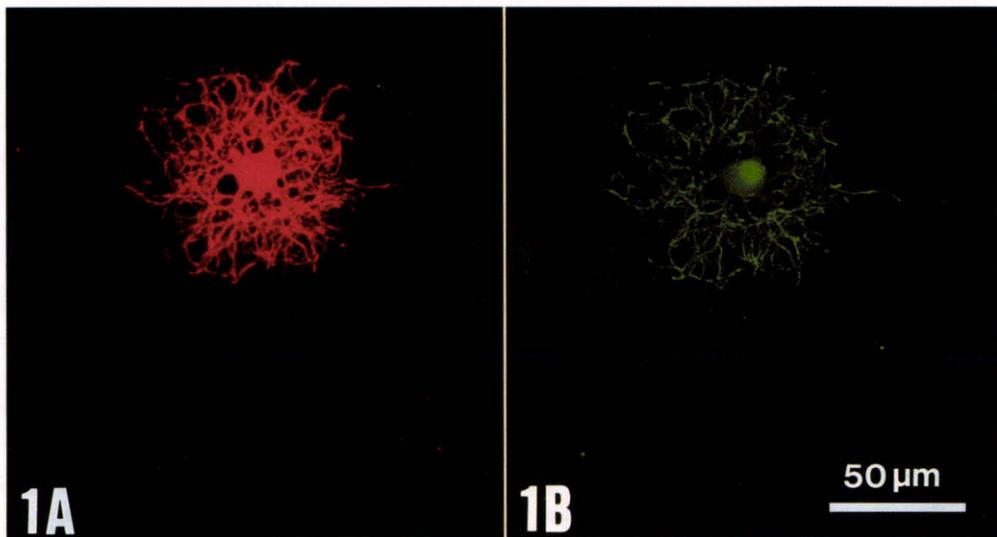


図1 継代培養後2日目の type 1 OL における MBP およびアクチンに対する二重染色. A: MBP 染色 (ロダミン発色, $\times 400$), B: アクチン染色 (フルオレセイン発色, $\times 400$). 網目状に絡み合った細胞突起において, 染色性の強弱はあるものの MBP およびアクチンの両方がびまん性染色を示す.

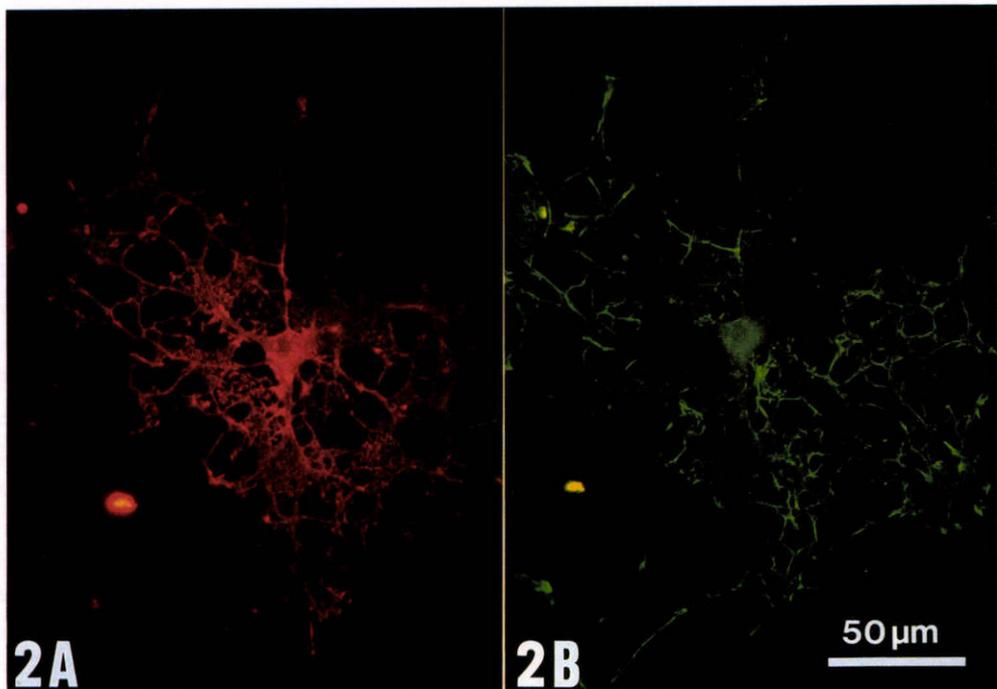


図2 継代培養後3日目の transitional type OL における MBP およびアクチンに対する二重染色. A: MBP 染色 (ロダミン発色, $\times 400$), B: アクチン染色 (フルオレセイン発色, $\times 400$). 細胞突起およびその間で伸展している小さな membranous expansion は MBP のびまん性染色を示すが, membranous expansion にはアクチンの染色性は得られず, 細胞突起にアクチンのびまん性染色を示す.

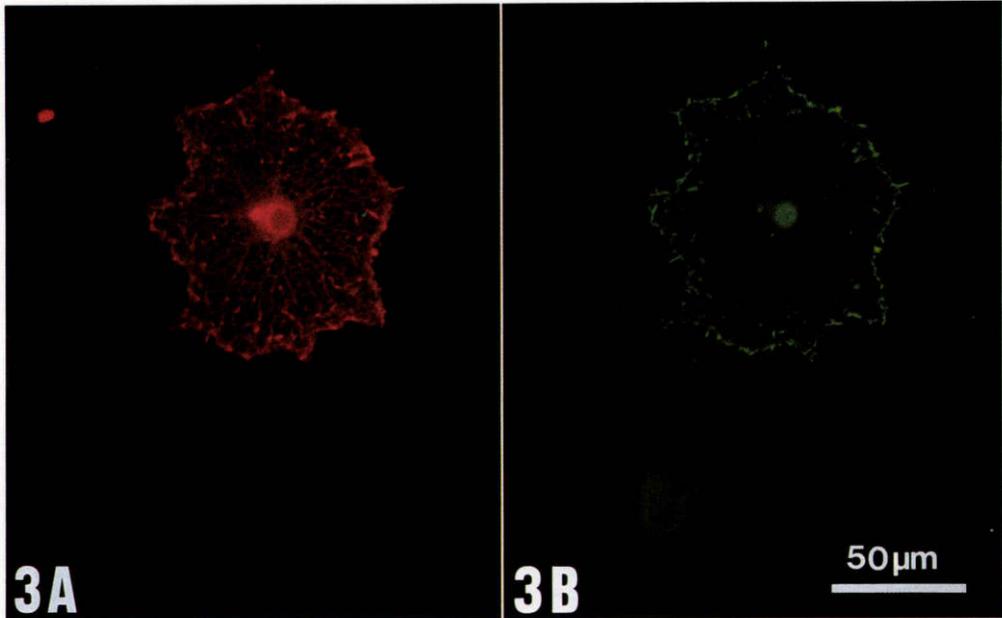


図3 継代培養後3日目の transitional type OL における MBP およびアクチンに対する二重染色. A: MBP 染色(ロダミン発色, $\times 400$), B: アクチン染色(フルオレセイン発色, $\times 400$). extensive network を形成する細胞突起およびその先端部に認められる細い帯状の membranous expansion が, MBP のびまん性染色を示す. extensive network の末梢側細胞突起の一部と帯状の membranous expansion にアクチンのびまん性染色を示す.

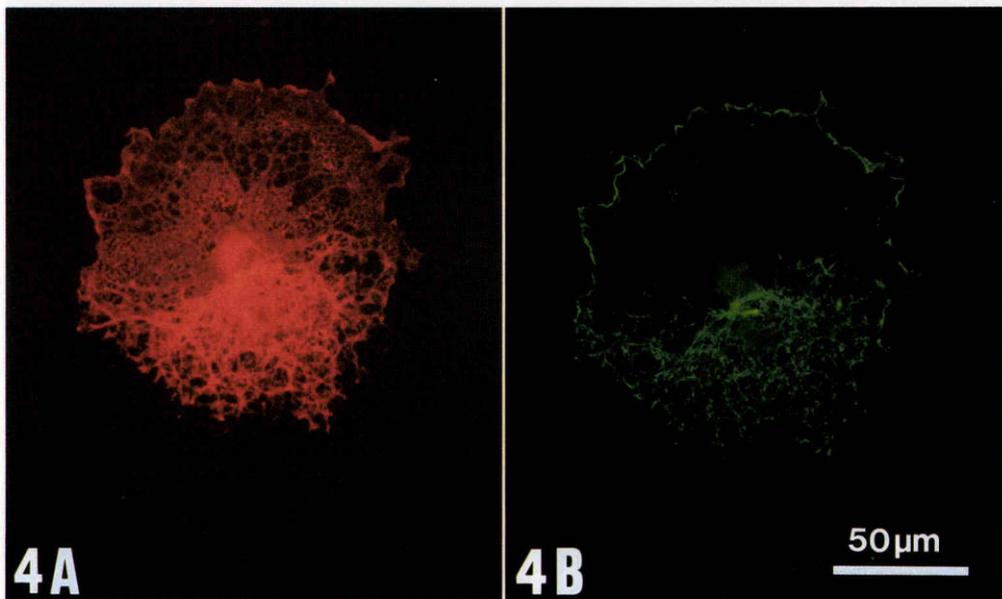


図4 継代培養後3日目の transitional type OL における MBP およびアクチンに対する二重染色. A: MBP 染色(ロダミン発色, $\times 400$), B: アクチン染色(フルオレセイン発色, $\times 400$). extensive network を形成する細胞突起および上方の部分的な membranous expansion が, MBP のびまん性染色を示す. 下方の細胞突起と上方の membranous expansion の先端部にアクチンのびまん性染色を示す.

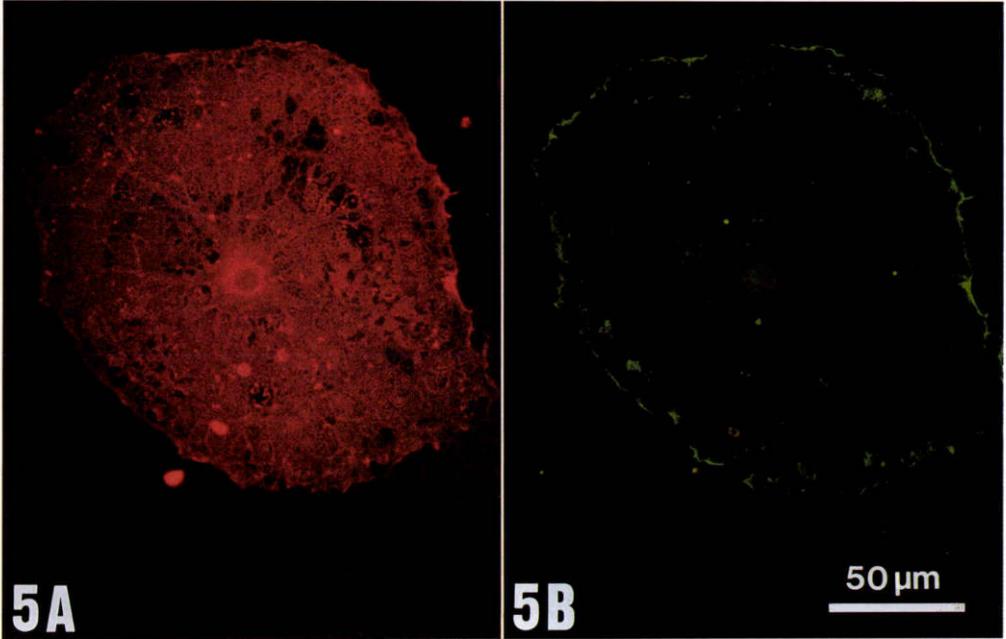


図5 継代培養後3日目のtype 2 OLにおけるMBPおよびアクチンに対する二重染色。A: MBP染色(ロダミン発色, $\times 400$)。B: アクチン染色(フルオレセイン発色, $\times 400$)。extensive networkおよびその間で伸展する広範囲のmembranous expansionが、MBPのびまん性染色を示す。membranous expansionの先端部が、アクチンのびまん性染色を示す。

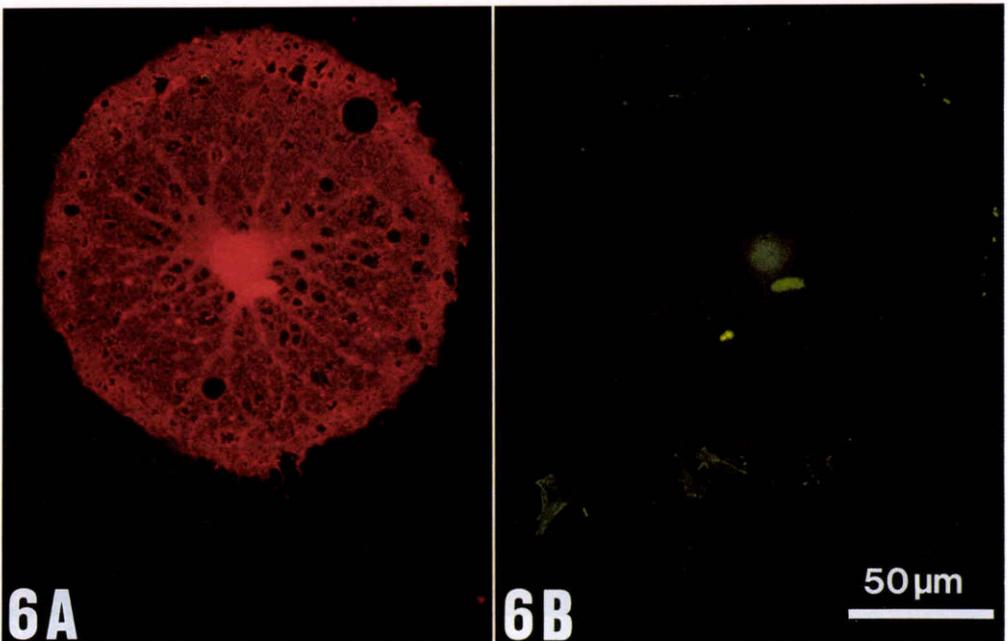


図6 継代培養後3日目のtype 2 OLにおけるMBPおよびアクチンに対する二重染色。A: MBP染色(ロダミン発色, $\times 400$)。B: アクチン染色(フルオレセイン発色, $\times 400$)。細胞突起およびmembranous expansionの先端部においても、アクチンの染色性はほとんど認められない。

A, 2B). extensive networkの先端部から membranous expansionを伸展する oligodendrocyte では, extensive networkの末梢側細胞突起の一部とその先端部にアクチンのびまん性染色を示した(図3A, 3B). 上方に部分的な membranous expansionを伸展する oligodendrocyte では, 下方の extensive networkと membranous expansionの先端部にアクチンのびまん性染色を示した(図4A, 4B).

C. membranous expansion type oligodendrocyte (type 2 OL)

さらに発育が進むと, extensive networkの形成範囲に一致した MBP に対してびまん性染色を示す広範囲の membranous expansionを伸展した(図5A, 6A). 典型的な type 2 OLにおいても, membranous expansionの先端部にアクチンのびまん性染色を示す oligodendrocyte(図5B)やほとんどその染色性を示さない oligodendrocyte(図6B)が認められた.

IV 考 按

ラット視神経の oligodendrocyte は, in vivo において1つの oligodendrocyte より約30もの異なる軸索にミエリンを形成すると言われており⁷⁾, 中枢神経系におけるミエリン形成の一連の流れは, 1) ミエリン膜構成成分の合成, 膜内への細胞内輸送, 2) 軸索と細胞突起との相互作用, 3) oligodendrocyte のミエリン膜による wrapping, 4) 軸索周囲における多層性のミエリン膜の形成と compaction の順序で生じると考えられている⁸⁾. 著者ら²⁾は先に, 未分化・未熟な extensive network type OL (type 1 OL) がより分化・成熟度の進んだ membranous expansion type OL (type 2 OL) に発育し, その membrane がミエリン膜に相当することを報告した. 今回のアクチンの局在分布の検討では, type 1 OL における extensive network の細胞突起にアクチンはびまん性染色を示し, 一方, type 2 OL においては membranous expansion の先端部にアクチンのびまん性染色を示す細胞とほとんどその染色性を示さない細胞が認められた. また, 新生児ラット視神経は, 露呈した軸索の存在が特徴的とされており, この時期では形態的に分化した oligodendrocyte は認められず, 生後14日目になって分化した oligodendrocyte のミエリン膜によって多数の軸索が取り囲まれているのが電子顕微鏡的に観察されている⁹⁾. 今回我々の結果で示されたように oligodendrocyte の分化・成熟と共にアクチンの分布が変化することとミエ

リン形成における oligodendrocyte の形態的变化により, 未分化・未熟な oligodendrocyte におけるアクチンのびまん性染色を示す extensive network の細胞突起は, アクチンが豊富に存在し運動性が高いと考えられ, 運動性の高い細胞突起を幾つも伸展することにより標的である軸索を探索し, 軸索との相互作用, ミエリン膜の wrapping, compaction へと一連の変化が生じるが, ミエリン形成が終了すると高い運動性は必要ではないのでアクチンのびまん性染色が消失すると考えられ, アクチンなどの運動性に関与する収縮蛋白もミエリン形成に重要な関係があることが示唆された.

Kachar ら¹⁰⁾は, ビデオマイクロスコープを用いて培養 oligodendrocyte における幾つかの運動性のパターンを動的に観察すると共に, アクチンの染色性が, その細胞体・主要細胞突起よりも filopodia・lamellipodia 構造の周辺部に著明に認められることも示し, これらの運動性がミエリン鞘を形成するための重要な役割を果たすと示唆しているが, 今回我々が示した oligodendrocyte とは若干形態的に異なるものの我々の type 2 OL におけるアクチンの分布の結果も彼らの考えを支持するものである. また, extensive network の間に認められた membranous expansion にはアクチンの染色性は認められなかったが, 広範囲の membranous expansion の先端部ではアクチンのびまん性染色を示す細胞も認めた. 一方, 神経突起の先端にみられる成長円錐は, 形態学的にアクチン線維が優位である filopodia が終末部に存在し, 機能的には活発な細胞運動, 特異的な軸索経路の誘導, 軸索輸送などに関与していると考えられている¹¹⁾. in vitro におけるアクチンの役割が, in vivo においても直接相当するかは不明ではあるが, ミエリン形成細胞である oligodendrocyte においても運動性や細胞内の物質輸送に関する何らかの収縮蛋白質は不可欠である. 今回の我々の結果より, ミエリン膜の主要構成成分である MBP¹²⁾ および収縮蛋白質の一つであるアクチンの両方を認める membranous expansion 先端部は, 活発な運動性を発揮しながら標的である軸索を wrapping していることが推定され, in vivo においてもアクチンは初期のミエリン形成に重要な役割を果たしていることが示唆された.

文 献

- 1) 祖父江憲治, 垣内史朗: 神経系における収縮蛋白質. 蛋核酵 29: 1030—1045, 1984.
- 2) Kajikawa D, Mori T, Kubota H, et al: The

- isolation of cultured oligodendrocytes from rat optic nerve. *Brain Res* 534: 65—72, 1990.
- 3) **Kalnins VI, Opas M, Ahmet I, et al**: Astrocyte cell lineage. IV. Changes in the organization of microfilaments and adhesion patterns during astrocyte differentiation in culture. *J Neurocytol* 13: 867—882, 1984.
 - 4) **Ciesielski-Treska J, Guerold B, Aunis D**: Immunofluorescence study on the organization of actin in astroglial cells in primary cultures. *Neurosci* 7: 509—522, 1982.
 - 5) **Gröschel-Stewart U, Unsicker K, Leonhardt H**: Immunohistochemical demonstration of contractile proteins in astrocytes, marginal glial and ependymal cells in rat diencephalon. *Cell Tiss Res* 180: 133—137, 1977.
 - 6) **梶川大介, 久保田浩, 盛 隆興**: ラット視神経初代組織培養におけるグリア細胞の形態学的・免疫組織学的検索. *眼紀* 41: 1047—1054, 1990.
 - 7) **Peters A, Palay SL, Webster HdeF**: The fine structure of the nervous system: The neurons and supporting cells. Philadelphia, WB Saunders Co, 181—262, 1976.
 - 8) **Pfeiffer SE**: Oligodendrocyte development in culture systems, In Norton WT(ed): *Oligodendroglia*, *Advances in Neurochemistry*, vol 5, New York, Plenum Press, 233—298, 1984.
 - 9) **Omlin FX, Waldmeyer**: Minisegments of newborn rat optic nerves in vitro: Gliogenesis and myelination. *Exp Brain Res* 65: 189—199, 1986.
 - 10) **Kachar B, Behar T, Dubois-Dalcq M**: Cell shape and motility of oligodendrocytes cultured without neurons. *Cell Tissue Res* 244: 27—38, 1986.
 - 11) **五十嵐道弘**: 成長円錐の生物学. *蛋核酵* 35: 464—479, 1990.
 - 12) **Norton WT, Poduslo SE**: Myelination in rat brain: Method of myelin isolation. *J Neurochem* 21: 749—757, 1973.
-