

Myelin-Associated Glycoprotein の中枢神経系における 発現に関する免疫組織化学的検討

新潟大学脳研究所神経内科学部門（主任：辻 省次教授）

石 黒 英 明

Immunohistochemical Study of Expression of Myelin-associated
Glycoprotein in Central Nervous System

Hideaki ISHIGURO

*Department of Neurology,
Brain Research Institute, Niigata University
(Director: Prof. Shoji TSUJI)*

Two polypeptide isoforms of myelin-associated glycoprotein (MAG) with molecular masses of 72 KDa (large MAG, L-MAG) and 67 kDa (small MAG, S-MAG) are produced by alternative splicing of the exon 12 portion of the MAG gene in rodent brain. We prepared antisera specific to the L-MAG and the S-MAG amino acid residues, respectively. Immunohistochemical staining of developing mouse brain showed that the L-MAG antiserum stained the myelin sheaths and the cytoplasm of the oligodendrocytes in the rapid myelinating stage, while the S-MAG antiserum stained only the myelin sheaths in the adult stage. The L-MAG positive cells were also present in the white matter around the experimental cerebral infarcts produced by occlusion of the left middle cerebral artery in the rat 3 days before observation. These findings suggest that L-MAG protein play an important role in myelin formation during rapid myelination in development and remyelination.

Key words: Myelin-associated glycoprotein, isoforms, immunohistochemistry, development, myelinogenesis, remyelination

ミエリン関連糖蛋白, アイソフォーム, 免疫組織化学染色, 髄鞘形成, 髄鞘再生

Reprint requests to: Hideaki ISHIGURO,
Department of Neurology, Brain Research
Institute, Niigata University,
Asahimachi-dori 1, Niigata City,
951, JAPAN.

別刷請求先: 〒951 新潟市旭町通1番町
新潟大学脳研究所神経内科 石黒英明

緒 言

髄鞘は中枢神経系及び末梢神経系において、神経軸索を取り囲みその絶縁効果により、跳躍伝導を可能にしている。髄鞘が一次的または二次的に崩壊することによって、神経系に重篤な障害が生じるが、髄鞘と髄鞘を形成する oligodendrocyte に関してはその発生や再生など不明な点も多く、これを解明することは脱髄の機序や治療を考える上で重要である。この髄鞘を構成する主要蛋白は、中枢神経系では myelin basic protein (MBP), proteolipid protein (PLP), 2', 3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase (CNP), myelin-associated glycoprotein (MAG) などがある。

MAG は、分子量約 100 kDa で30%の糖鎖を含む糖蛋白で、その含有量は中枢神経系でも全髄鞘蛋白の約1%と微量であるが、軸索周囲に局在することより、髄鞘と軸索の接着に重要な役割を担っているものと考えられている¹⁾。これまでラット、マウスおよびヒトにおいて MAG の遺伝子解析が行われている²⁾⁻⁶⁾ が、ラットおよびマウスでは MAG 遺伝子が転写される際にエクソン12の部分で alternative splicing を起こすことにより、2種類の mRNA が存在することが明らかにされている⁴⁾⁵⁾。この2種類の mRNA より質量の異なる蛋白、すなわち 72 kDa の蛋白 (large form MAG, L-MAG) と、67 kDa の蛋白 (small form MAG, S-MAG) が翻訳される⁷⁾。発達や髄鞘再生における経時的分析にお

いて、L-MAG mRNA の発現は髄鞘形成期や脱髄後の髄鞘再生期に多く、一方で S-MAG mRNA は L-MAG mRNA に遅れて発現することが明らかにされている⁴⁾⁵⁾⁸⁾。我々は、マウスの L-MAG, S-MAG 蛋白に特異的なアミノ酸配列部分のペプチドを合成し、それぞれに特異的な抗体を作製することに成功した⁹⁾。本研究では、この抗体を用いて免疫組織化学染色を行い、髄鞘形成期や、髄鞘再生期におけるこれら蛋白の細胞レベルでの発現を明らかにし、その存在意義に関して検討を行った。

材料及び方法

抗体は既法のごとく⁹⁾¹⁰⁾、L-MAG に特異的な21のアミノ酸配列と S-MAG に特異的な11のアミノ酸配列を基に作製した合成ペプチドを抗原に用いた (図 1)。それぞれのペプチドは、Freund アジュバントと共に懸濁化し、2週間間隔で数回家兔皮下に免疫し、抗血清を得た。

発達に伴う MAG の発現をみるために、生後14日、20日、30日、56日の雄 ddY マウスを用いた。これらマウスに麻醉後4%パラホルムアルデヒドで灌流固定を行った。大脳、小脳、脳幹と腰部脊髓をとりだし更に4時間同じ固定液で後固定を行い、アルコール脱水、キシレン浸潤後パラフィン包埋した。4 μ m のパラフィン切片を作製し、脱パラフィンした。前処置として先ず0.3% H₂O₂を含むメタノールに室温で15分間反応させ内因性のペルオキシダーゼ活性を消失させた。ついで PBS にて40倍

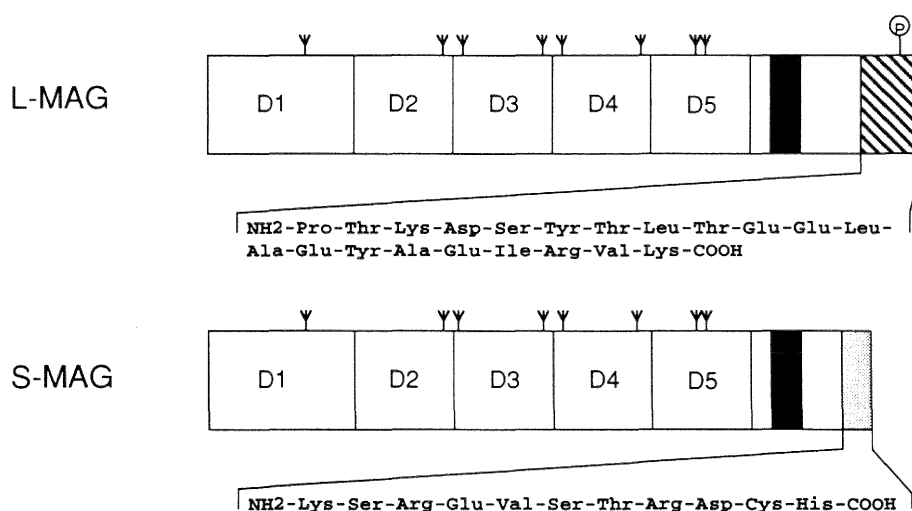


図 1 抗原に用いた合成ペプチドの一次構造と、MAG 分子内の位置。D1-D5 は免疫グロブリン類似のドメイン構造、黒い部分は膜貫通部分を示す。

に希釈した正常ブタ血清に室温で30分間反応させ、非特異反応を防御した。前述の抗 L-MAG 血清、抗 S-MAG 血清を PBS で1,000倍希釈し室温で一晩反応させ、ついでビオチン化抗ウサギ IgG 抗体とアビチン-ビオチン混合液にて反応させ、DAB を用いて発色可視化した。対照実験として、免疫前血清、及び抗原にて吸収した抗血清で同様の染色を行った。

脳虚血後における MAG の変化を見るために、成熟雄 Sprague-Dawley ラットをハロセン麻酔下に顕微鏡下で左中大脳動脈起始部を閉塞したモデルを用いた¹¹⁾¹²⁾。対照には中大脳動脈を閉塞することなしに同様の手技で手術を行ったラットを用意した。両者とも手術後3日目に4%パラホルムアルデヒドで灌流固定し先述と同様に L-MAG、S-MAG 抗血清を用いて免疫染色を行った。病変部位の確認および細胞同定のため、連続する切片でヘマトキシリン-エオジン染色、クリューパー-パレラ染色、ABC 法による GFAP 免疫染色を行った。

結 果

発達における MAG の変化

小脳において生後14日のマウスでは抗 L-MAG 血清ですでに一部の髄鞘で陽性染色を示していた。加齢と共にその染色強度は増していった。一方、抗 S-MAG 血清での染色では生後14日では髄鞘は染色されず、生後30日でわずかに染色性を示し始めるようになり、生後40日、56日では徐々に抗 L-MAG 血清と同様の染色態度を示すようになっていった (図 2)。

大脳においては生後14日では L-MAG、S-MAG とも髄鞘に明らかな陽性染色を認めなかったが、生後30日、40日で L-MAG が染色され、生後56日目では L-MAG、S-MAG とも髄鞘に一致して陽性染色が得られた (図 3)。

脊髄においては、生後14日ですでに L-MAG、S-MAG とも髄鞘に一致して陽性染色が得られた。S-MAG 染色性はやや弱かった (図 4)。

抗 L-MAG 血清では、大脳、小脳、脊髄にわたり髄鞘以外に、生後14、30日での時点で oligodendrocyte の形態を示す L-MAG 陽性細胞が存在した (図 5)。抗 S-MAG 血清では S-MAG 陽性の細胞はいずれの時点においても確認されなかった。

対照に用いた免疫前血清、及び免疫抗原にて吸収した抗血清はいずれも髄鞘をはじめ中枢神経系に免疫染色性を示さなかった。

脳虚血モデルにおける MAG の変化

MCA 閉塞3日後における病変部位は、左頭頂後頭葉

の皮質と線状体に及んでいた (図 6)。この虚血巣は壊死巣を形成し、L-MAG、S-MAG、GFAP などの免疫反応性は著しく低下していた。この壊死巣以外では L-MAG、S-MAG の髄鞘における免疫反応性は、対照動物にみられるものとはほぼ変わりなく、明らかな脱髄を思わせる所見はみられなかった。しかし、脳梁両側において L-MAG 陽性の髄鞘の中に L-MAG に強い陽性反応を示す細胞群が存在した (図 6)。この細胞はやや太い突起を持つ細胞で、髄鞘形成期の白質にみられる L-MAG 陽性細胞に類似した形態を示し、GFAP 陽性の反応性グリア細胞とは突起の伸展態度などから形態的に明らかに異なっていた。これら L-MAG 陽性細胞は、白質に局限して存在し、大脳皮質、深部灰白質内には存在しなかった。また同様の細胞は対照動物脳には認められなかった。一方 GFAP 陽性の反応性グリア細胞は、梗塞巣を除く障害側半球全体に広く出現し、明らかに L-MAG 陽性細胞とは異なる分布をしていた。この L-MAG 陽性細胞は脳梁の障害側に多く認められたが、非障害側の脳梁の非障害側の対称的な部位にも存在した。S-MAG 染色では L-MAG 陽性細胞と同じ形態の細胞が、同じ脳梁に、淡く染色されているのを認めた。

考 察

MAG は中枢および末梢神経系の myelin を構成する蛋白の一つで、髄鞘の機能および構造維持に深く関わっているとされている。1979年 Sternberger らは、精製した MAG をウサギに免疫して得た抗体で、ラットの中枢神経系を染色し、MAG が myelination に先立って oligodendrocyte の胞体に発現し、myelination が進むにつれて染色強度を増し、その後髄鞘の形成が終わるにつれて徐々に染色性が薄くなること、MAG が軸索周囲の髄鞘に発現している事を示した¹³⁾。Higgins らは、MAG の cording region を probe とした cDNA fragment を用いて *in situ* hybridization を行い、髄鞘形成期に MAG の mRNA が oligodendrocyte の胞体に発現することを報告している¹⁴⁾。本研究は、2種類の MAG 蛋白、L-MAG、S-MAG のうち、髄鞘形成期の oligodendrocyte の胞体に出現するのは L-MAG であること、L-MAG は髄鞘の形成早期に髄鞘に発現し、成熟してもその免疫反応性に変わりはないこと、S-MAG はそれに遅れて髄鞘に発現することなどが明らかになった。L-MAG 陽性の oligodendrocyte の胞体が髄鞘形成初期にのみ見られたことに関しては、髄鞘形成期には、oligodendrocyte の胞体が豊かで、蛋白合

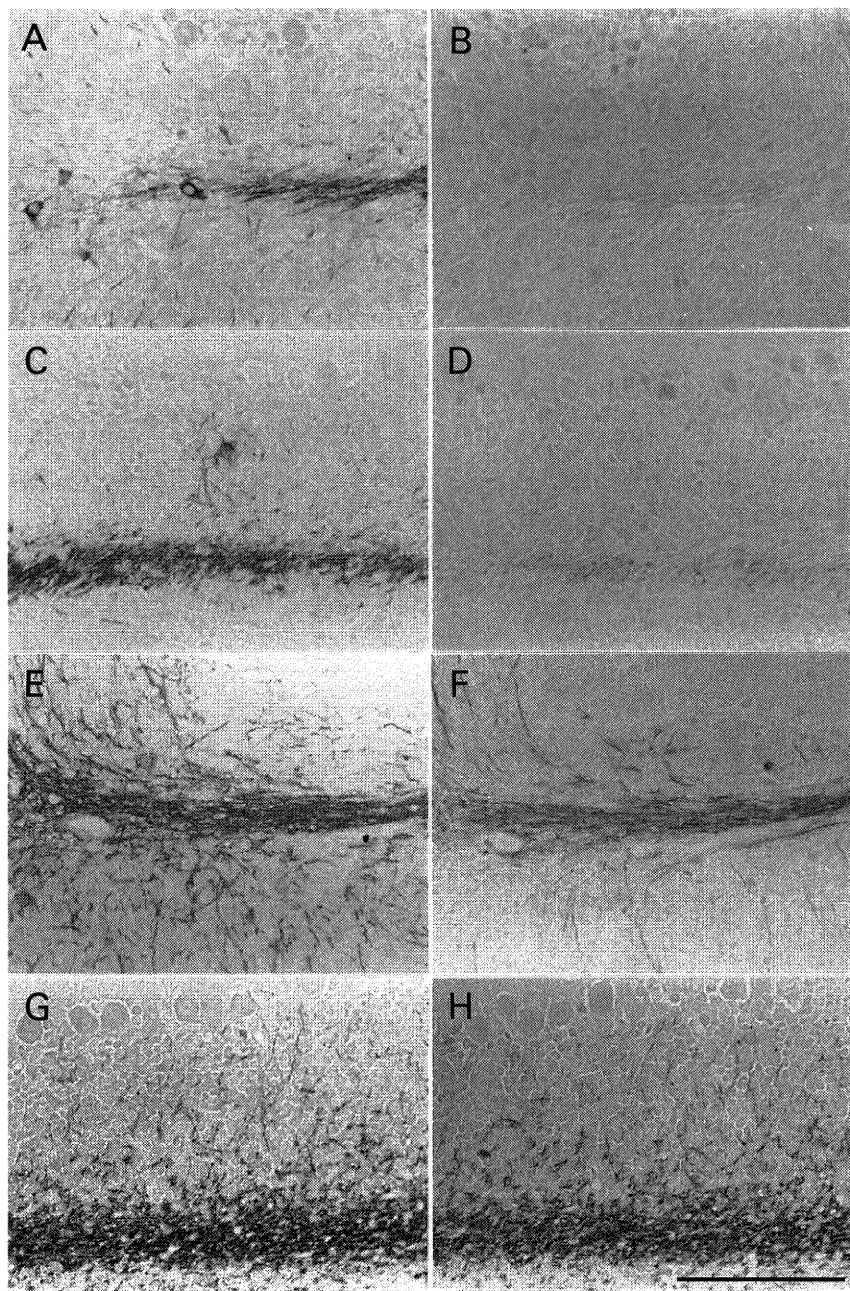


図 2 小脳白質における MAG の染色性.

A, B : 生後14日, C, D : 生後30日, E, F : 生後40日, G, H : 生後56日. A, C, E, G : L-MAG 染色, B, D, F, H : S-MAG 染色. (— : 100 μ m)

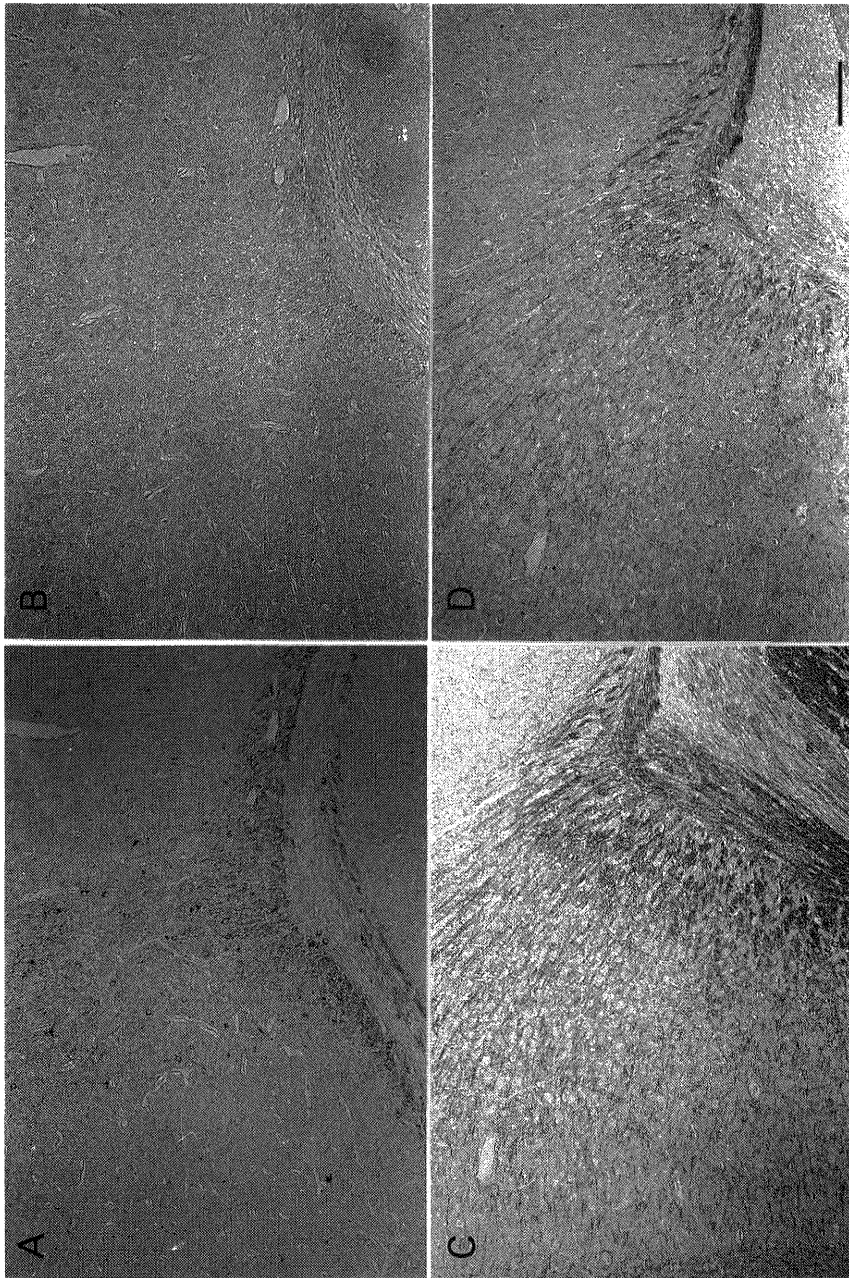


図3 大脳脳梁周囲のMAGの染色性. A, B: 生後14日, C, D: 生後56日. A, C: L-MAG染色, B, D: S-MAG染色. (—: 100 μ m)

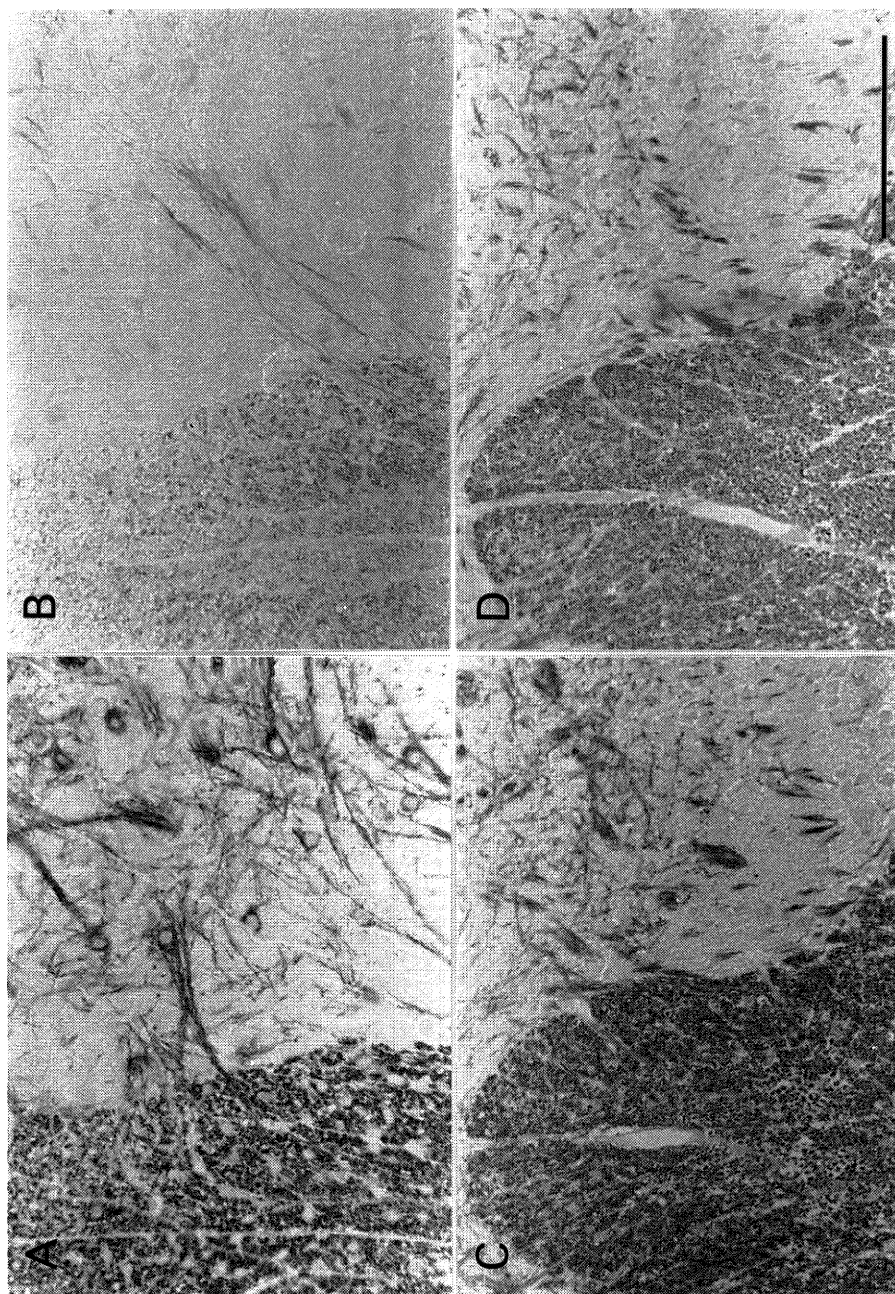


図 4 脊髄の MAG の染色性. A, B : 生後14日, C, D : 生後56日. A, C : L-MAG 染色, B, D : S-MAG 染色.
(— : 100 μ m)

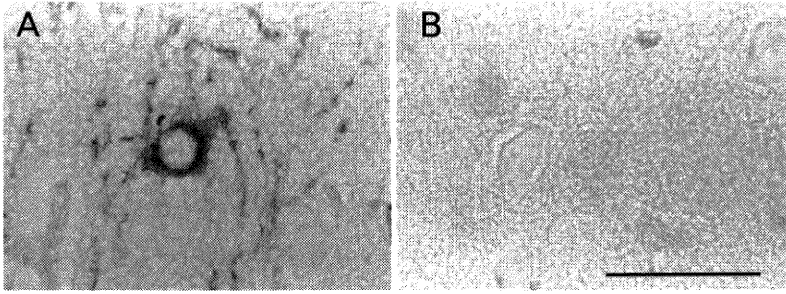


図 5 A : 生後14日の大脳白質にみられた L-MAG 陽性細胞. B : S-MAG 染色では同様細胞は染色されなかった. (— : 30 μ m)

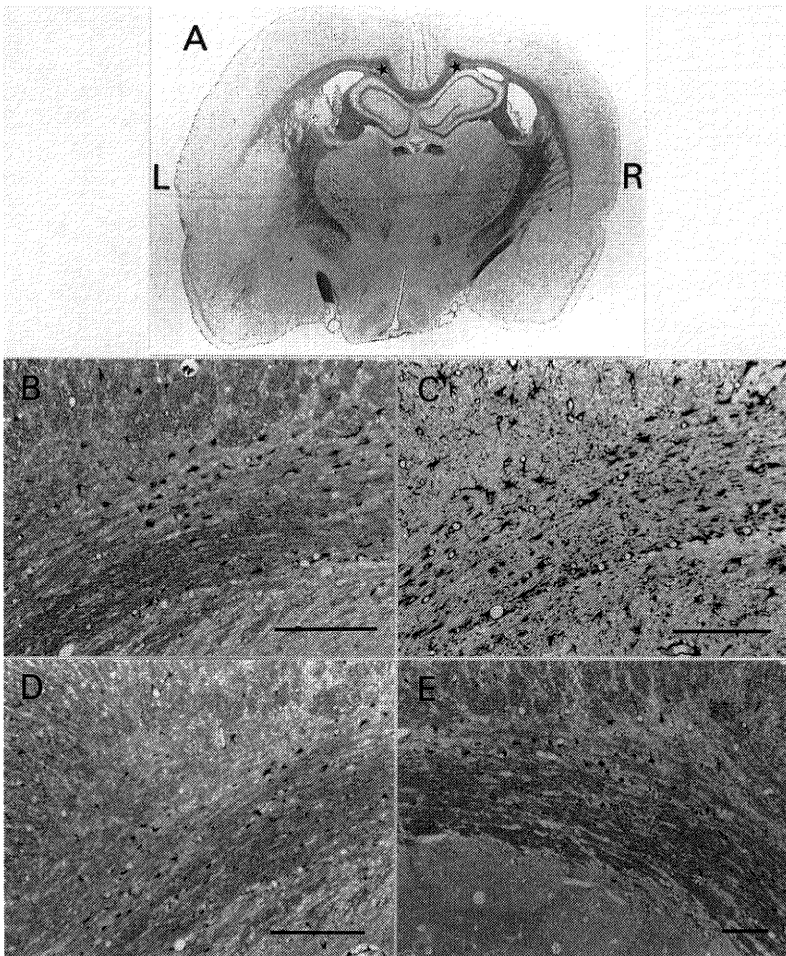


図 6 中大脳動脈閉塞ラットの MAG の染色性. A : 大脳断面の K.B. 染色. 大脳皮質, 線状体に梗塞巣を認める. *に示した部位を観察した. B, C, D : 障害側半球の脳梁. B : L-MAG 染色, C : GFAP 染色, D : S-MAG 染色. E : 障害対側の脳梁, L-MAG 染色. (— : 100 μ m)

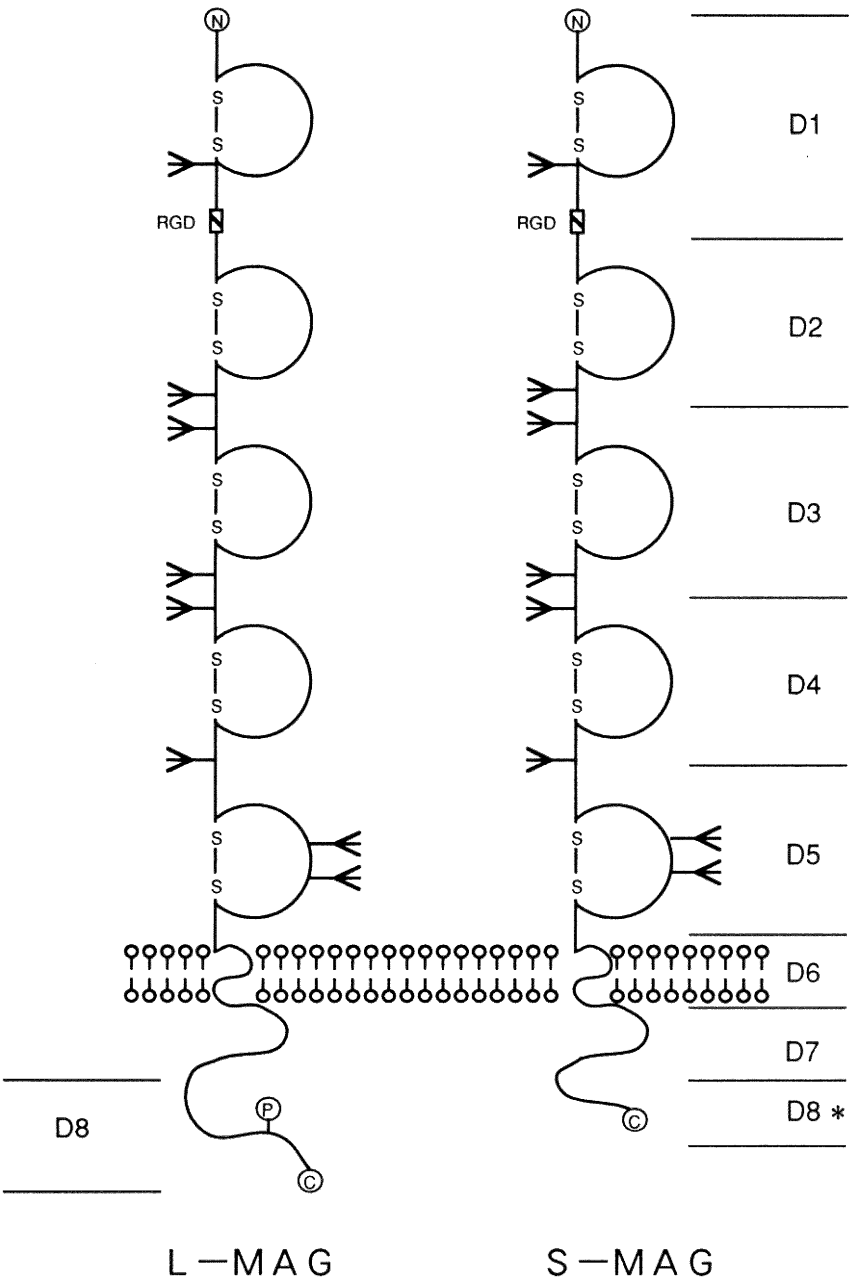


図 7 MAG の分子構造モデル。S-S 結合を持つループからなる免疫グロブリン類似構造，糖鎖結合部位，Arg-Gly-Asp (RGD) 配列部，L-MAG の tyrosin kinase によるリン酸化部位，C 末端側の L-MAG，S-MAG の分子構造の違い (D8 および D8*) を示す。

成が盛んで、髄鞘形成が進むと oligodendrocyte の胞体は縮小し、蛋白合成が低下するためであろうと考えられる。

MAG は、免疫系認識分子の免疫グロブリンの分子構造上の類似性や、neural cell adhesion molecule (NCAM) などの細胞間認識分子との分子構造上の類似性、免疫交叉反応性などより免疫グロブリンスーパーファミリーの一員として細胞接着に重要な働きをすることが考えられている³⁾¹⁵⁾¹⁶⁾。また、MAG のN末端よりにフィブロネクチン受容体などにみられ細胞認識に関わる構造とされている Arg-Gly-Asp 配列が存在する⁴⁾。更に alternative splicing によって作られる2種類の MAG 蛋白のうち、L-MAG はC末端側の細胞内部分に、tyrosin autophosphorylation site に類似した構造があり、これは receptor の調節機構に関わる構造とされている¹⁷⁾ (図7)。L-MAG が髄鞘形成期の初期より oligodendrocyte の胞体とミエリン膜に発現していることは、L-MAG が髄鞘が軸索を認識する機構に深く関わっていることを想像させる。藤田らは、髄鞘形成不全マウスである quaking mouse において、L-MAG の発現が髄鞘形成期にみられないことを見いだした⁹⁾¹⁸⁾。このことも L-MAG の細胞認識機能の存在を強く示唆するものと考えられる。

一方で、生化学的分析では、中枢神経系において S-MAG の発現は脳の成熟と共に増加し、成熟脳では全 MAG のなかで S-MAG が優位に存在するとされている¹⁹⁾。免疫組織染色上 S-MAG は L-MAG より遅れて出現し、髄鞘に沿って分布することから、S-MAG は L-MAG の認識した細胞間の接着を維持する機能を有する可能性が考えられた。

中大脳動脈閉塞による脳虚血モデルラットは比較的単純な脳障害モデルで、障害部位が局限しており、また障害発生時期が明らかであることなどより、神経障害に対する組織修復を研究する上で有用なモデルの一つである¹¹⁾。本研究では障害3日後の大脳白質にて、L-MAG 陽性細胞が出現することを確認した。この細胞は、反応性の astrocyte や microglia とはその分布において、白質内に局限するという点で異なり、また形態でも相違がみられ、oligodendrocyte であると考えられた。Ludwin らは、大脳皮質の一部を取り除いた脳外傷モデルラットの障害3日後の大脳で、外傷周囲および対側を含めた脳梁に、細胞分裂する oligodendrocyte が存在することを見いだした²⁰⁾。このことより虚血巣の周囲にみられた L-MAG 陽性細胞は、分裂することによって幼若化した oligodendrocyte である可能性が高い。

我々は同じ脳虚血モデルラットを用いて、虚血後の蛋白変化をイムノブロットング法にて調べた結果、髄鞘構成蛋白である MAG と CNP は、虚血3日後まで減少し、その後増加傾向を示した²¹⁾。この結果より、虚血部の組織崩壊にて減少した髄鞘蛋白が、その後の髄鞘再生によって増加する可能性が示唆されていた。成熟脳において、MAG は S-MAG 優位に発現するとされていることより、この時期に L-MAG 陽性細胞が出現することは、まさに再生初期の像を見ていると考えられた。銅のキレート剤である cuprizone を用いた実験的脱髄モデルにおいても、髄鞘再生期において L-MAG mRNA の発現が増加することが知られている⁸⁾。これらのことから、L-MAG は単に幼若脳の髄鞘形成期のみならず、成熟脳における髄鞘再生期にも神経組織修復に重要な役割を示すことが考えられる。

稿を終えるにあたり、御助言、御校閲を賜りました辻 省次教授に深謝いたします。また研究の場をお与え下さいました宮武 正前教授に深くお礼申し上げます。終始研究を指導していただいた、佐藤修三先生、犬塚 貴先生、藤田信也先生に心からお礼申し上げます。

更に研究に御協力いただきました中野亮一先生、馬場広子先生、諸橋イネ子さん、小黒由起子さんに感謝いたします。

参 考 文 献

- 1) Quarles, R.H.: Myelin-associated glycoprotein in development and disease. *Dev. Neurosci.*, **6**: 285~303, 1983/84.
- 2) Arquint, M., Roder, J., Chia, L.-S., Down, J., Wilkinson, D., Bayley, H., Braun, P. and Dunn, R.: Molecular cloning and primary structure of myelin associated glycoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**: 600~604, 1987.
- 3) Salzer, J.L., Holmes, W.P. and Colman, D.R.: The amino acid sequences of the myelin-associated glycoprotein: homology to the immunoglobulin super family. *J. Cell Biol.*, **104**: 965~967, 1987.
- 4) Lai, C., Brow, M.A., Nave, K.-A., Noronha, A.B., Quarles, R.H., Bloom, F.E., Milner, R.J. and Sutcliffe, J.G.: Two forms of 1B236/myelin-associated glycoprotein, a cell adhesion molecule for postnatal neural development. *Proc. Natl.*

- Acad. Sci. USA, **84**: 4337~4341, 1987.
- 5) **Fujita, N., Sato, S., Kurihara, T., Kuwano, T., Sakimura, K., Inuzuka, T., Takahashi, Y. and Miyatake, T.**: cDNA cloning of mouse myelin-associated glycoprotein: a novel alternative splicing pattern. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **165**: 1162~1169, 1989.
- 6) **Sato, S., Fujita, N., Kurihara, T., Kuwano, R., Sakimura, K., Takahashi, Y. and Miyatake, T.**: cDNA cloning and amino acid sequence for human myelin-associated glycoprotein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **163**: 1473~1480, 1989.
- 7) **Frail, D.E. and Braun, P.E.**: Two developmentally regulated messenger RNAs differing in their coding region may exist for myelin-associated glycoprotein. *J. Biol. Chem.*, **259**: 14857~14862, 1984.
- 8) **Fujita, N., Ishiguro, H., Sato, S., Kurihara, T., Kuwano, R., Sakimura, K., Takahashi, Y. and Miyatake, T.**: Induction of myelin-associated glycoprotein mRNA in experimental remyelination. *Brain Res.*, **513**: 152~155, 1990.
- 9) **Fujita, N., Sato, S., Ishiguro, H., Inuzuka, T., Baba, H., Kurihara, T., Takahashi, Y. and Miyatake, T.**: The large isoform of myelin-associated glycoprotein is scarcely expressed in the quaking mouse brain. *J. Neurochem.*, **55**: 1056~1059, 1990.
- 10) **Ishiguro, H., Sato, S., Fujita, N., Inuzuka, T., Nakano, R. and Miyatake, T.**: Immunohistochemical localization of myelin-associated glycoprotein isoforms during the development in the mouse brain. *Brain Res.*, **563**: 288~292, 1991.
- 11) **Yamamoto, M., Tamura, A., Kirino, T., Shimizu, M. and Sano, K.**: Behavioral changes after focal cerebral ischemia by left middle cerebral artery occlusion in rats. *Brain Res.*, **452**: 323~328, 1988.
- 12) **Ishiguro, H., Inuzuka, T., Fujita, N., Sato, S., Nakano, R., Tamura, A., Kirino, T. and Miyatake, T.**: Expression of the large myelin-associated glycoprotein isoform in rat oligodendrocytes around cerebral infarcts. *Mol. Chemical. Neuropathol.*, **20**: 173~179, 1993.
- 13) **Sternberger, N.H., Quarles, R.H., Itoyama, Y. and Webster, H.deF.**: Myelin-associated glycoprotein demonstrated immunohistochemically in myelin and myelin-forming cells of developing rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**: 1510~1514, 1979.
- 14) **Higgins, G.A., Schmale, H., Bloom, F.E., Wilson, M.C. and Milner, R.J.**: Cellular localization of 1B236/myelin-associated glycoprotein mRNA during rat brain development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**: 2074~2078, 1988.
- 15) **Sato, S., Baba, H., Tanaka, M., Yanagisawa, K. and Miyatake, T.**: Antigenic determinant sheared between myelin-associated glycoprotein from human brain and natural killer cells. *Biomed. Res.*, **4**: 489~494, 1983.
- 16) **McGarry, R.C., Helfand, S.L., Quales, R.H. and Roder, J.C.**: Recognition of myelin-associated glycoprotein by monoclonal antibody HNK-1. *Nature*, **306**: 376~378, 1983.
- 17) **Edwards, A.M., Braun, P.E. and Bell, J.C.**: Phosphorylation of myelin-associated glycoprotein in vivo and in vitro occurs only in the cytoplasmic domain of the large isoform. *J. Neurochem.*, **52**: 317~320, 1989.
- 18) **Fujita, N., Sato, S., Kurihara, T., Inuzuka, T., Takahashi, Y. and Miyatake, T.**: Developmentally regulated alternative splicing of brain myelin-associated glycoprotein mRNA is lacking in the quaking mouse. *FEBS Lett.*, **232**: 323~327, 1988.
- 19) **Pedraza, L., Frey, A.B., Hempstead, B.L., Colman, D.R. and Salzer, J.L.**: Differential expression of MAG isoforms during development. *J. Neurosci. Res.*, **29**: 141~148, 1991.
- 20) **Ludwin, S.K.**: Proliferation of mature oligodendrocytes after trauma to the central nervous system. *Nature*, **308**: 274~275, 1984.
- 21) **Inuzuka, T., Tamura, A., Sato, S., Kirino, T., Yanagisawa, K., Toyoshima, I. and Miyatake, T.**: Changes in the concentration of cerebral proteins following occlusion of the middle cerebral artery in rats. *Stroke*, **21**: 917~922, 1990.