

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月 10日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790979

研究課題名（和文）髄鞘形成におけるテニューリン4の機能解明と髄鞘関連疾患への応用を目指す研究

研究課題名（英文）Analysis of Teneurin-4 Function in the CNS Myelination

研究代表者

鈴木 喜晴（SUZUKI NOBUHARU）

東京医科歯科大学・大学院保健衛生学研究科・講師

研究者番号：30596565

研究成果の概要（和文）：本研究では細胞膜貫通型タンパク質・テニューリン4（Ten-4）に注目し、Ten-4欠損マウスの中樞神経系では小径軸索特異的な髄鞘形成不全が見られ、オリゴデンドロサイトの細胞突起形成阻害が起きていることが解った。さらにTen-4の下流でfocal adhesion kinase（FAK）が活性化し、細胞突起形成を制御していることが解った。本研究により、Ten-4機能の分子機序の一端が解明され、今後髄鞘関連疾患の応用的研究に役立つものと期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we focused on function of the transmembrane protein teneurin-4 (Ten-4). In the Ten-4 deficient mice, hypomyelination of small-diameter axons was observed. The process formation of Ten-4 deficient oligodendrocytes was significantly reduced. Further, focal adhesion kinase (FAK) played a role downstream of Ten-4 in the process formation. This study will facilitate a better understanding of oligodendrocyte biology and be useful for application studies for the myelin-related diseases.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：神経分子病態学

1. 研究開始当初の背景

中枢神経系において神経軸索はオリゴデンドロサイトが形成する髄鞘によって包まれており、その成熟・維持と活動電位の効率的な伝播を可能としている。髄鞘欠損により、軸索崩壊等を伴った様々な神経障害を引き起こすことが知られている。このような髄鞘の形成・維持に関わる疾患は、発生段階で髄鞘の形成阻害を示す髄鞘形成不全と一度形成された髄鞘が欠落していく脱髄性疾患の二つに大別される。髄鞘形成不全はそのほとんどが遺伝性で、髄鞘構成タンパク質であるPLPの遺伝子に変異が生じることに起因するペリツェウス・メルツバッハ病（PMD）等が

知られており、企図振戦や痙性下肢麻痺等の神経障害が見られる（Garbern, 2007）。脱髄性疾患の原因は多様で、最も良く知られている多発性硬化症は自己免疫疾患の一種としても分類されているが、共通して起こる異常として、オリゴデンドロサイトの細胞死や髄鞘維持能力の欠陥による髄鞘の欠落が見られ、軸索崩壊を伴い、様々な神経障害を呈する（Piaton et al., 2010）。髄鞘形成不全と脱髄性疾患の病因解明のためにオリゴデンドロサイトの発生に関する研究が近年盛んになりつつある。

マウス中枢神経系でのオリゴデンドロサイトの発生では、胎生期に神経幹細胞から生

じたオリゴデンドロサイト前駆細胞が生後直後から 1、2 週の間オリゴデンドロサイトへと分化し、傍らにある軸索に髄鞘を形成する。生後およそ 2 ヶ月の間に中枢神経系の髄鞘形成は完了する (Baumann and Pham-Dinh, 2001)。オリゴデンドロサイトは分化過程で細胞形態を大きく変化させ、多数の分枝構造を伴う細胞突起を形成する。この過程での精密な細胞突起形成が特に直径の小さい軸索 (小径軸索) の髄鞘形成に必須であると考えられている (Butt and Berry, 2000)。オリゴデンドロサイトの細胞突起形成においていくつか重要な分子が同定されている。チロシンキナーゼである focal adhesion kinase (FAK) は、近年オリゴデンドロサイトの細胞突起形成に必要な分子として報告され (Lafrenaye and Fuss, 2010)、オリゴデンドロサイト特異的な FAK ノックアウトマウスでは小径軸索特異的な髄鞘形成不全が見られた (Camara et al., 2009)。しかし、中枢神経系での髄鞘の形成・維持やオリゴデンドロサイトの発生に関しては未だ解明されていないことが多く、特に先に挙げた髄鞘形成不全や脱髄性疾患の多くは有効な治療法が確立されていない。そのため、その診断や治療の方法確立に向けて、基礎的・応用的研究の必要性が求められている。オリゴデンドロサイトの分化や髄鞘形成を促進する分子に注目し、その分子の活性化機構を解明し、その活性化を制御する方法を確立することが有効と考えられる。

研究代表者らは、これまでに細胞膜貫通型タンパク質であるテニューリン 4 (Ten-4) 欠損マウスを用いて Ten-4 の生物学的役割を解析して来た。Ten-4 欠損マウスは、生後 4 週齢から下肢に激しい振戦や麻痺を呈する。研究代表者らの結果から、Ten-4 欠損マウスの中枢神経系では、オリゴデンドロサイトの分化が阻害され、髄鞘形成の障害が起きていることが解った。さらに野生型マウスではオリゴデンドロサイトの分化時期に Ten-4 の発現が誘導されることが解った。これらの解析から、Ten-4 の発現と活性化はオリゴデンドロサイトの分化に必須であり、中枢神経系の髄鞘形成を促進していることが強く示唆された。しかし、(1) Ten-4 欠損マウスでの髄鞘形成障害の詳細、また、(2) オリゴデンドロサイトの分化や細胞形態形成における Ten-4 の役割や、(3) 細胞内シグナル伝達経路や、(4) 結合分子の解析等の分子メカニズムは解明されていなかった。そのため、この研究をさらに発展させることで、Ten-4 による新たな髄鞘形成機序が解明され、その機序に基づい

た髄鞘関連疾患への応用研究が期待された。

2. 研究の目的

- (1) Ten-4 欠損マウスでの髄鞘形成障害を詳細に解析する—Ten-4 欠損マウスの中枢神経系、末梢神経系の各組織での髄鞘形成の電子顕微鏡を用いた解析を行う。
- (2) オリゴデンドロサイトの分化・細胞形態形成における Ten-4 の役割を解明する—Ten-4 欠損マウスからオリゴデンドロサイトの初代培養を行い分化・細胞形態、特に細胞突起形成の評価を行う。
- (3) オリゴデンドロサイトの分化における Ten-4 分子メカニズムの解析する—Ten-4 欠損マウスやオリゴデンドロサイトと FAK 欠損マウス、オリゴデンドロサイトの表現型が類似していることから、Ten-4 の下流エフェクター分子として FAK に注目し、細胞内シグナル伝達の解析を行う。
- (4) Ten-4 結合分子の候補を同定する—中枢神経系組織と抗 Ten-4 抗体を用いた免疫沈降法とマスマスペクトロメトリー解析によって Ten-4 と共沈降したタンパク質を同定する。

これらの解析を通して、Ten-4 によるオリゴデンドロサイトの分化・細胞形態形成と髄鞘形成の分子メカニズムを解明し、それに基づく応用研究の可能性を検討する。

3. 研究の方法

- (1) 電子顕微鏡による Ten-4 欠損マウスでの髄鞘形成の解析—髄鞘形成が完了する時期である 7 週齢の Ten-4 欠損マウスから、中枢神経系組織である脊髄と脳梁、末梢神経系組織である坐骨神経を摘出・調製し電子顕微鏡による観察を行った。任意に 100 本の軸索を選び、髄鞘形成の有無、軸索の直径、髄鞘の外径と内径を測定した。それらをもとに髄鞘形成された軸索 (有髄軸索) の割合、軸索の直径に応じた有髄軸索の割合、髄鞘形成した軸索の髄鞘の外径に対する内径の値 (g-ratio) を計算・統計処理し解析に用いた。

- (2) Ten-4 欠損オリゴデンドロサイトの細胞形態形成の解析—オリゴデンドロサイト前駆細胞が豊富に得られる新生児マウスの大脳皮質を用いて初代培養を行った。分化誘導後にオリゴデンドロサイト前駆細胞のマーカー (NG2) とオリゴデンドロサイトのマーカー (GalC) の免疫染色を行い、陽性細胞の計測と細胞形態の解析を行った。細胞形態の解析は細胞の総面積と、細胞体から描く同心

円と細胞突起の交点の計測 (Sholl 解析) を用いて、細胞突起形成の評価を行った。

(3) オリゴデンドロサイトの細胞形態形成における Ten-4 シグナル解析—生後 7-9 日齢の Ten-4 欠損マウスの脊髄からライセイトを調製し、ウェスタンブロット法で FAK の 397 番目チロシン残基のリン酸化を調べた。

shRNA を用いて Ten-4 の発現をノックダウンしたオリゴドサイト前駆細胞株 CG-4 を準備した。分化誘導後にウェスタンブロット法で FAK の 397 番目チロシン残基のリン酸化を調べた。さらに Ten-4 の発現をノックダウンした CG-4 細胞に FAK の constitutively active form を発現するプラスミドをトランスフェクションし、細胞突起形成の評価を行った。コントロールとして、Mock プラスミドと FAK の dominant negative form を発現するプラスミドを用いた。

(4) Ten-4 結合候補分子のスクリーニング解析—生後 1 週齢の野生型マウスの脳脊髄からライセイトを調製し、抗 Ten-4 抗体を用いて免疫沈降法を行い、それらをマスマスペクトロメトリーで解析しタンパク質の同定を行った。コントロールとして normal IgG による免疫沈降試料を用いた。

4. 研究成果

(1) 電子顕微鏡による Ten-4 欠損マウスの髄鞘形成の解析—7 週齢のマウスの脊髄を用いて解析を行ったところ、野生型マウスでは 81.0% の軸索で髄鞘形成が見られたのに対し、Ten-4 欠損マウスでは 23.7% の軸索で髄鞘形成が見られた (図1)。さらに軸索の直径に対する髄鞘形成能の違いも解った。Ten-4 欠損マウスでは、直径 1.5 μm 以下の軸索で顕著な軸索形成不全が見られたのに対し、直径が 1.5 μm より大きい軸索では野生型マウスと比較し、髄鞘形成に違いが見られないことが解った (図1)。また、それら髄鞘形成している軸索の髄鞘の外径に対する内径の値 (g-ratio) に差は見られなかった。これらのことから、Ten-4 欠損マウスの脊髄では小径軸索特異的な髄鞘形成不全が起きていることが解った。さらに中枢神経系の脳梁と末梢神経系の坐骨神経で同様の解析を行ったところ、Ten-4 欠損マウスの脳梁

では脊髄と同様に小径軸索特異的な髄鞘形成不全が見られたのに対し、坐骨神経では野生型と比べ違いは見られなかった。また脳梁、坐骨神経ともに Ten-4 欠損マウスと野生型マ

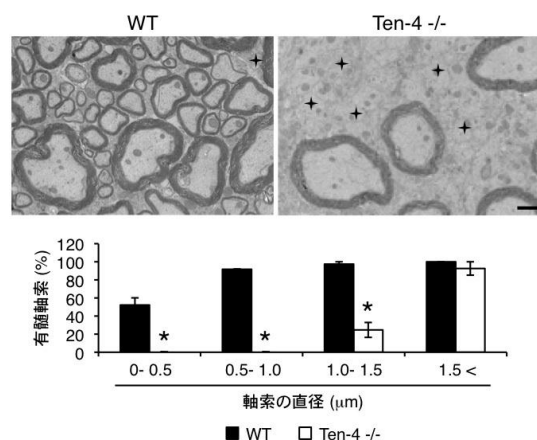


図1. Ten-4の欠損による小径軸索特異的な髄鞘形成不全
+: 無髄軸索; スケールバー: 1 μm ; * $p < 0.001$

ウスの間に髄鞘形成した軸索の g-ratio に差は認められなかった。これらの結果から、Ten-4 欠損マウスでは中枢神経系の小径軸索に特異的な髄鞘形成不全が起きていることが示された。

(2) Ten-4 欠損オリゴデンドロサイトの細胞形態形成の解析—次に研究代表者らは Ten-4 欠損マウスの大脳皮質を用いて初代培養を行った。分化誘導 2 日目と 4 日目の細胞形態を観察したところ、野生型オリゴデンドロサイトに比べ、Ten-4 欠損オリゴデンドロサイトでは、

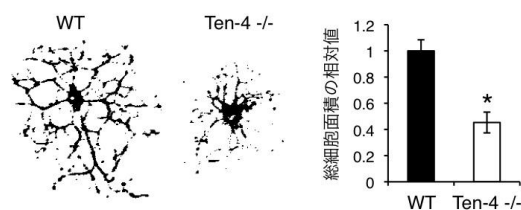


図2. Ten-4欠損オリゴデンドロサイトでの細胞突起形成阻害
WTとTen-4欠損オリゴデンドロサイトの代表的な細胞形態 (左) と総細胞面積 (右) * $p < 0.0001$

細胞突起の長さや分枝が減少していることが解った (図2)。また、2 日目と比べると 4 日目でその差が顕著になることから、Ten-4 はオリゴデンドロサイトの分化過程での細胞突起形成に必要であることが示された。

(3) オリゴデンドロサイトの細胞形態形成におけるTen-4シグナル解析—次に研究代表者らはTen-4の下流シグナル分子の解析を行った。Focal adhesion kinase (FAK) はオリゴデンドロサイトの突起形成に必要で (Lafrenaye and Fuss, 2010)、さらにオリゴデンドロサイト特異的にFAKをノックアウトしたマウスでは、その中枢神経系で小径軸索特異的な髄鞘形成不全が引き起こされる (Camara et al., 2009)。これらのFAKの生物学的機能がTen-4の機能と類似しているため、我々はFAKがTen-4の下流エフェクター分子として機能しているのではないかという仮説を立てその検証を行った。はじめに生後約1週齢のTen-4欠損マウス脊髄のライセイトを調製し、FAKの活性化 (397番目チロシン残基のリン酸化) を調べたところ、野生型と比べ有意に減少していることが解った。次にTen-4の発現をノックダウンしたオリゴドサイト前駆細胞株CG-4を用いてFAKの活性化を調べた。このTen-4をノックダウンしたCG-4細胞ではコントロールのCG-4細胞と比べて、分化誘導後の突起形成が減少した。この結果は初代培養オリゴデンドロサイトの結果と一致するものである。この条件下においてFAKのリン酸化を調べたところ、Ten-4をノックダウンしたCG-4細胞で有意に減少していることが解った (図3)。これらの結果からTen-4はFAKの活性化 (リン酸化) に必要であることが示唆された。

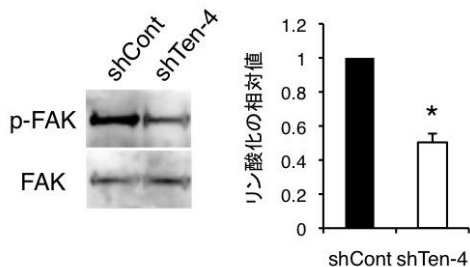


図3. Ten-4ノックダウンによるFAKの活性化阻害
shCont: コントロールshRNA, shTen-4: Ten-4 shRNA;
*p < 0.01

さらに我々は、Ten-4の下流でFAKが突起形成を制御しているかどうかを調べるために、FAKのconstitutively active formを用いて、Ten-4ノックダウンの表現型がレスキューされるかどうかを調べた。その結果、Ten-4をノックダウンしたCG-4細胞にMockプラスミドやFAKのdominant negative formを発現するプラスミドをトランスフェクションしても細胞突起形成に変化は見られなかったのに対し、FAKのconstitutively active formをトランスフェクションした細胞で突起形成阻害がレスキューされることが解った (図4)。これらの結

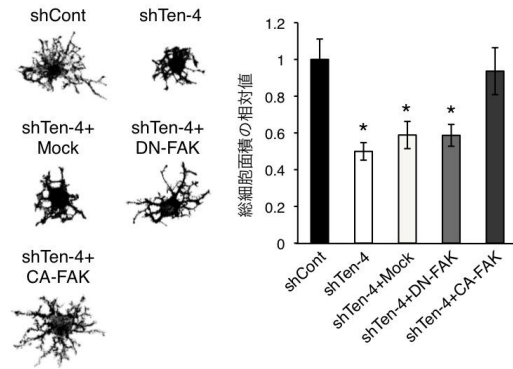


図4. Ten-4ノックダウンの細胞突起形成阻害に対する Constitutively active FAKのレスキュー効果
各々のtransfected cellの代表的な細胞形態 (左) と総細胞面積 (右) shCont: コントロールshRNA, shTen-4: Ten-4 shRNA, DN-FAK: Dominant negative FAK, CA-FAK: Constitutively active FAK; *p < 0.005

果から、細胞突起形成においてTen-4の下流でFAKが制御されていることが解り、オリゴデンドロサイトの分化におけるTen-4によるシグナル経路の一端が明らかとなった。これらの結果はSuzuki et al., 2012, J. Neurosci.にて研究期間内に報告した。論文掲載に伴い文部科学省にてプレスリリースもを行い、本研究内容が多くの新聞記事・インターネット記事に掲載された。

(4) Ten-4の結合分子候補のスクリーニング解析—研究代表者らは、Ten-4結合タンパク質候補の同定も試みた。野生型マウスの脳・脊髄のライセイトと抗Ten-4抗体を用いて免疫沈降を行い、マススペクトロメトリーによってTen-4と共沈降するタンパク質の解析を行った。抗Ten-4抗体での沈降したタンパク質群には、コントロール群と比較することで、Ten-4をはじめ様々な特異的なタンパク質が存在することが解った。主に膜タンパク質や細胞内タンパク質が検出された。これら同定されたタンパク質群には細胞骨格に関連した分子が多かったことから、Ten-4の細胞骨格制御に関わる機能が推測された。このことはTen-4がFAKを介してオリゴデンドロサイトの細胞突起形成を制御していることと関連していると考えられる。

本研究によってこれまで明らかにされていなかったTen-4による髄鞘形成メカニズムの一部が解明された。Ten-4欠損マウスでは小径軸索特異的な髄鞘形成不全が起こることが分かったが、類似した小径軸索優位な障害が、多発性硬化症の患者の脊髄でも見られることが分かっている (DeLuca et al., 2004)。このことからTen-4が多発性硬化症の病因に関わっている可能性も考えられる。また、本研究結果よりTen-4-FAKシグナルがオリゴデ

ドロサイトの形態形成に重要であることが解った。さらにTen-4と結合または複合体を形成すると予想されるタンパク質の候補も得られた。これらTen-4-FAKシグナル経路や結合候補分子に注目し研究を進展させることで、Ten-4の分子作用機序の解明とそのメカニズムに基づく髄鞘関連疾患への応用研究の可能性が期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

(1) Nobuharu Suzuki, Masaya Fukushi, Keisuke Kosaki, Andrew D. Doyle, Susana de Vega, Keigo Yoshizaki, Chihiro Akazawa, Eri Arikawa-Hirasawa, and Yoshihiko Yamada
“Teneurin-4 Is a Novel Regulator of Oligodendrocyte Differentiation and Myelination of Small-Diameter Axons in the CNS” *The Journal of Neuroscience*, Vol. 32, pp. 11586-11599, 2012 (査読有)
DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2045-11.2012.

[学会発表] (計1件)

(1) 招待講演: 鈴木喜晴、有川-平澤恵理、山田吉彦、赤澤智宏、“Oligodendrocyte Development and Dysmyelinating Diseases: Teneurin-4 As a Novel Regulator of CNS Myelination” 第34回日本神経科学大会 The Japan-Australia joint symposium (平成23年9月16日、パシフィコ横浜)

[その他] (計1件)

(1) プレスリリース記事 [新聞記事: 日本経済新聞 (平成24年8月22日)、神戸新聞 (平成24年8月22日)、北國新聞 (平成24年8月22日)、秋田魁新報 (平成24年8月23日) 等; インターネット記事: ウォール・ストリート・ジャーナル日本版 (平成24年8月22日)、日本経済新聞電子版 (平成24年8月22日)、MSN産経ニュース (平成24年8月22日)、日刊工業新聞電子版 (平成24年8月23日) 等他多数]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 喜晴 (SUZUKI NOBUHARU)

東京医科歯科大学・大学院保健衛生学研究科・講師

研究者番号: 30596565

