

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2016

課題番号：25860701

研究課題名(和文)新規髄鞘形成分子テニューリン4の分子機能メカニズム解明とその応用を目指す研究

研究課題名(英文)Molecular Mechanism of Myelination Regulated by Teneurin-4

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・准教授

研究者番号：30596565

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：中枢神経系の髄鞘形成障害や欠落・変性は、白質形成不全症や脱髄性疾患等の様々な神経疾患を引き起こす。その診断・治療を目的とした髄鞘形成の分子作用機序の解明の必要性が求められている。本研究では膜貫通型タンパク質テニューリン-4(Ten-4)に着目し、オリゴデンドロサイトによる髄鞘形成の分子機序を解明を目的に実験を行った。その結果、Ten-4は細胞接着活性を有しており、オリゴデンドロサイトの他の細胞との相互作用や形態形成に関わっていることが示された。今後より詳細な分子メカニズム解析が期待される。

研究成果の概要(英文)：Myelination by oligodendrocytes is essential for proper functioning of the central nervous system (CNS). Here, we showed that a type II transmembrane protein teneurin-4 (Ten-4) was essential for CNS myelination. Further, Ten-4 possessed cell-cell adhesion activity. The recombinant protein of the Ten-4 extracellular domain promoted cell attachment and a positive effect on oligodendrocyte morphological change and myelination. These findings suggest that Ten-4 is a novel regulator of oligodendrocyte differentiation and that it plays a critical role in the myelination of axons in the CNS.

研究分野：分子生物学

キーワード：オリゴデンドロサイト 髄鞘 Teneurin-4

## 1. 研究開始当初の背景

中枢神経系の神経情報伝達は、神経軸索にオリゴデンドロサイトが髄鞘を形成することによって正常に機能する。髄鞘の形成・維持に障害が起こると、効率的な活動電位の伝播や神経軸索の成熟・維持が阻害され、様々な神経障害を引き起こすことが知られている。発生段階で髄鞘の形成阻害が生じる白質形成不全症として、髄鞘構成タンパク質 PLP の遺伝子変異に起因するペリツェウス・メルツバッハ病 (PMD) が知られており、振戦や痙性下肢麻痺等の神経障害が見られる。一度形成された髄鞘が欠落していく脱髄性疾患としては多発性硬化症が最も良く知られており、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、振戦その他様々な神経障害を呈する。中枢神経系での髄鞘形成は、オリゴデンドロサイトの細胞突起が薄いシート状の構造に変化し、神経軸索に巻き付くダイナミックな現象である。通常、一つのオリゴデンドロサイトから多数の髄鞘が形成され、末梢神経系のシュワン細胞による髄鞘形成とは形態学的に異なる。この中枢神経系の髄鞘形成過程、また、その後の維持の過程で様々な分子が関わっていると考えられているが、その分子機序の詳細はほとんど解明されていないため、多くの関連疾患で有効な治療法が確立されていない。そのため髄鞘形成に関与する重要分子の基礎的・応用的研究の必要性が求められている。また、髄鞘形成は異種細胞間での複雑な現象であるため、分子機序解明のアプローチ法の開発が未だ不十分で、研究目的に応じた解析方法の改良が必要である。

最近研究代表者らは、中枢神経系で顕著な髄鞘形成不全を生じ、激しい振戦を呈する変異型マウスを発見し、膜貫通型タンパク質であるテニューリン-4 (Ten-4) の遺伝子発現が完全に阻害されていることを明らかにした (引用文献 1)。さらにオリゴデンドロサイト前駆細胞 (OPC) 株 CG-4 の単培養系を用いた結果から、Ten-4 は Focal Adhesion Kinase (FAK) の活性化を制御して、細胞分化や細胞突起形成を促していることを解明した。しかし髄鞘形成・維持の過程において Ten-4 の分子作用機序は未だ解明されていない。特に Ten-4 はオリゴデンドロサイトだけでなく神経細胞にも発現していることから、髄鞘形成において各々の細胞種に発現する Ten-4 の機能を解明し、その分子機構を探る必要がある。また最近、ショウジョウバエの中枢神経系や末梢神経系神経筋接合部位において、テニューリンファミリー分子 (ショウジョウバエでは 2 種類: Ten-a、Ten-m) のホモフィリック

またはヘテロフィリック結合が同種または異種細胞間の特異的相互作用に必須であることが報告された (引用文献 2,3)。また他の哺乳類テニューリン分子 (例: Ten-2) が細胞間相互作用に重要であることも報告されている (引用文献 4)。これらのことから髄鞘形成・維持の過程でのオリゴデンドロサイト-神経軸索間の相互作用 (細胞接着) において、Ten-4 が重要な役割を担っている可能性が考えられる。さらに Ten-4 欠損マウスでは特に小径軸索の髄鞘形成に選択的な障害が生じるが (引用文献 1)、多発性硬化症でも小径軸索に優位な障害が見られることから (引用文献 5)、Ten-4 の機能解析から多発性硬化症の病態機序に関する重要な情報が得られる可能性がある。

## 2. 研究の目的

本研究では中枢神経系の髄鞘形成における Ten-4 の分子機能、特に細胞接着活性に注目し、その活性同定と機序解明を目指した。さらに中枢神経系で OPC とオリゴデンドロサイトで特異的に蛍光タンパク質 VENUS を発現する Sox10-VENUS マウス (引用文献 6) を利用することで、OPC の効率的な分離とオリゴデンドロサイトの細胞突起の細部をリアルタイムで解析できる *in vitro* 髄鞘形成系の構築を行い、解析に用いた。

## 3. 研究の方法

(1) 細胞間接着アッセイトランスフェクションの 48 時間後、細胞を 0.2% EDTA 溶液で回収し、1% FBS を含む Leibovitz L15 培地で懸濁した。細菌培養用 35 mm ディッシュに細胞数  $2.5 \times 10^5$  個となるよう播き、回転型シェイカーで振盪させながら (80 rpm)、37°C、5% CO<sub>2</sub> の条件下でインキュベートした。1 時間ごとに細胞の様子を光学顕微鏡で観察して画像データを取得し、Image J を用いて、凝集した細胞の面積から細胞間の接着活性を解析した。

(2) Sox10-Venus マウスからのオリゴデンドロサイト前駆細胞の精製と培養—生後 0-2 日の Sox10-Venus マウス (引用文献 6) の脳よりパイン / DNase 処理によって細胞を採取し、フローサイトメーター (Moflo) を使用して、Venus 陽性細胞を精製した。精製した細胞をポリリジンコートした培養スライドに播種し、1 日間 0.5% FBS 入り培養液にて培養後、4% PFA で固定して、各種マーカー分子の免疫染色を行った。

分化誘導の際は、培養 1 日後に 0.5% FBS を除いた分化誘導培地でさらに 3 日間培養した後に免疫染色を行った。

(3) Ten-4 細胞外ドメインのオリゴデンドロサイト接着アッセイ—Ten-4 細胞外ドメインの組換えタンパク質 (Ten-4ECD) を 96-well プレートにコートし、3% BSA でブロッキング後、Sox10-Venus オリゴデンドロサイト前駆細胞を播種して、1 時間インキュベートした。メタノールとクリスタルバイオレットを用いて、固定と染色を行い、Wash して接着しなかった細胞を除去した後に、接着した細胞をカウントした。

分化誘導をかける際は、(2)の分化誘導条件に Ten-4ECD をコートしたスライドを用いて、培養と免疫染色を行った。

#### 4. 研究成果

(1) Ten-4 の細胞接着活性—初めに、Ten-4 の細胞間接着活性を調べるため、Ten-4 過剰発現細胞とコントロール細胞を準備し、培養液中で振盪しながら、細胞凝集形成能を評価した。アッセイ開始前ではいずれの細胞にも細胞集塊は形成されていなかったのに対し、アッセイ開始から 3 時間後では、コントロールと比べ、Ten-4 過剰発現細胞でより大きな細胞集塊が観察された (図 1)。これらの結果をもとに、それぞれの細胞集塊をその面積ごとに解析した。その結果、アッセイ 3 時間後では、Ten-4 過剰発現細胞がコントロールと比べて  $2 \times 10^3 \mu\text{m}^2$  以上の大きな集塊が有意に増加し、 $2 \times 10^2 \mu\text{m}^2$  以上  $5 \times 10^3 \mu\text{m}^2$  未満の小さな細胞集塊が減少していることが解った (図 1)。これらの結果により、Ten-4 は細胞間接着を促進することが解った。

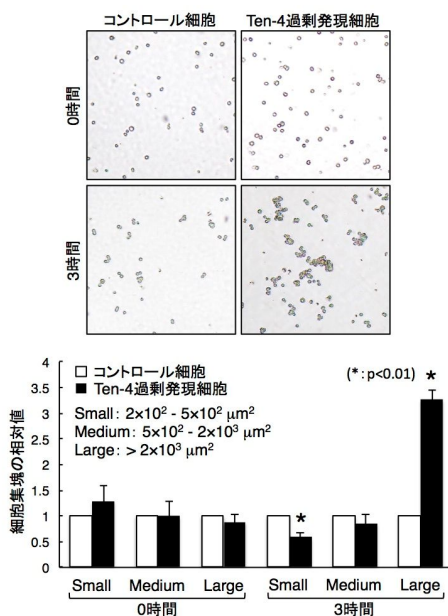


図1. 細胞間接着アッセイ  
 各々の細胞集塊のサイズカテゴリーにおいて、コントロール細胞の集塊を1.0として、Ten-4過剰発現細胞の集塊を相対値で示した。

さらにこのアッセイ条件下における Ten-4 の細胞内局在を調べるため、抗 Ten-4 抗体を用いて免疫染色を行った。また、F-アクチン、Rac1 の局在も調べた。その結果、Ten-4 は細胞膜辺縁に局在し、特に細胞接着部位に強く局在していることが確認できた (図 2)。また、F-アクチンと Rac1 は細胞接着部位を含む細胞膜辺縁で Ten-4 と共局在していることが確認できた (図 2)。これらの結果より、Ten-4 はアクチン骨格形成に関わり細胞間接着を制御している可能性が示された。

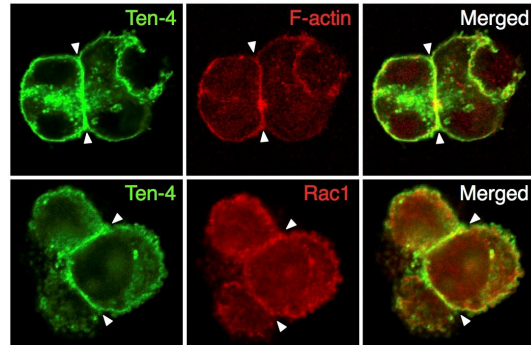


図2. Ten-4の細胞内局在  
 細胞間接着アッセイ3時間後の細胞を固定して免疫染色した。矢尻: 細胞間接着部位におけるTen-4とF-アクチンまたはRac1の共局在

(2) Sox10-Venus マウスを用いたオリゴデンドロサイト前駆細胞の精製・培養法確立—次にオリゴデンドロサイトにおける細胞接着活性を調べるために、オリゴデンドロサイトの精製を試みた。ラットと比較し、マウスではオリゴデンドロサイトの一般化された精製方法が確立されておらず、本研究では、中枢神経系においてオリゴデンドロサイト系譜細胞特異的に発現している転写因子 Sox10 のプロモーター下で蛍光タンパク質 Venus を発現するマウス (Sox10-Venus マウス: 引用文献 6) を用いて、オリゴデンドロサイト前駆細胞の調製を行った。生後 0-2 日の Sox10-Venus マウスの脳から Venus 陽性細胞をフローサイトメーターによって精製し、培養した。その細胞を各種マーカーで染色した結果、大部分の細胞がオリゴデンドロサイト前駆細胞のマーカーである NG2 陽性であることが解った (図 3)。さらに、これらの細胞を無血清培地を用いて分化誘導したところ、オリゴデンドロサイトのマーカーである GalC 陽性細胞へと分化することが解った (図 4)。また、NG2 陽性オリゴデンドロサイト前駆細胞を 20% FBS 存在下で培養すると II 型アストロサイトに分化することも解り、これらの結果より、Sox10-Venus マウスを用いて、オリゴデンドロサイト前駆細胞の精製と分化誘導に成功した。蛍光タンパク質 Venus を用いることにより、分化過程での細胞形態変

化のタイムラプス解析にも成功した。

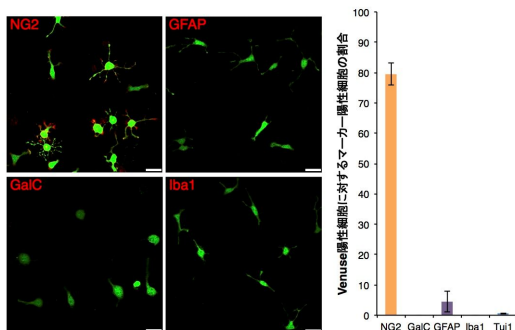


図3. Sox10-Venus陽性細胞の同定  
生後0-2日のSox10-Venusマウスの脳由来Venus陽性細胞を各々のマーカー分子の抗体で免疫染色を行った。NG2: オリゴデンドロサイト前駆細胞; GFAP: アストロサイト; GalC: オリゴデンドロサイト; Iba1: ミクログリア

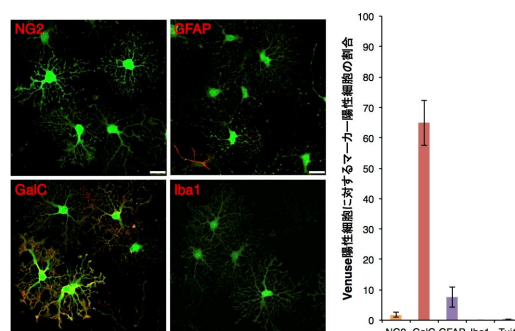


図4. 分化誘導後のSox10-Venus陽性細胞の同定  
生後0-2日のSox10-Venusマウスの脳由来Venus陽性細胞を各々のマーカー分子の抗体で免疫染色を行った。NG2: オリゴデンドロサイト前駆細胞; GFAP: アストロサイト; GalC: オリゴデンドロサイト; Iba1: ミクログリア

### (3) Ten-4 のオリゴデンドロサイト接着活性

—(1)の結果より、Ten-4 細胞外ドメインは細胞接着活性を有すると予想されたことから、Ten-4 細胞外ドメインの組換えタンパク質 (Ten-4ECD) を調整し、(2)の方法で精製したオリゴデンドロサイト前駆細胞の細胞接着アッセイを行った。その結果、Ten-4 細胞外ドメインはオリゴデンドロサイト前駆細胞接着活性を有することが解った(図5)。さらに Ten-4ECD 上でオリゴデンドロサイト前駆細胞をオリゴデンドロサイトへと分化誘導したところ、細胞突起部位にシート状の細胞膜構造を形成した(図6)。このシート状構造が髄鞘形成に重要であると考えられる。

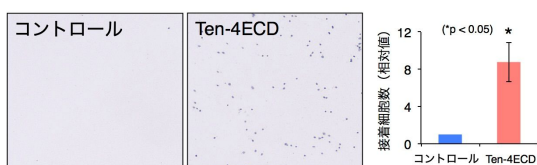


図5. Ten-4ECDのオリゴデンドロサイト前駆細胞接着活性  
画像はウェル内の代表的な視野を示している。コントロールを1.0としたときのTen-4ECDウェル内の接着細胞の割合を示した。

本研究結果より、Ten-4 がオリゴデンドロサイトの細胞接着に重要であることが明らか

となった。今後、Ten-4 欠損マウス由来のオリゴデンドロサイトを用いた接着アッセイや分化誘導アッセイ、また、細胞外・細胞内の結合タンパク質同定等を行うことで、さらに詳細なメカニズムが明らかとなり、髄鞘関連疾患への応用研究の可能性が期待される。

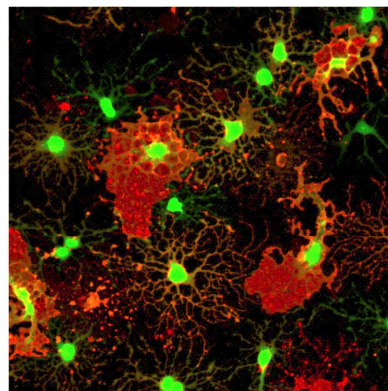


図6. Ten-4ECD上でのオリゴデンドロサイトの形態  
Ten-4ECD上で3日間分化誘導後に分化マーカーであるO4(赤)で免疫染色を行った。緑: Venus

### < 引用文献 >

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.
2. Weizhe Hong, Timothy J. Mosca, and Liqun Luo “Teneurins instruct synaptic partner matching in an olfactory map” *Nature*, Vol. 484, pp. 201-207, 2012.
3. Timothy J. Mosca, Weizhe Hong, Vardhan S. Dani, Vincenzo Favaloro, and Liqun Luo “Trans-synaptic Teneurin signalling in neuromuscular synapse organization and target choice” *Nature*, Vol. 484, pp. 237-241, 2012.
4. Beatrix P. Rubin, Richard P. Tucker, Marianne Brown-Luedi, Doris Martin, and Ruth Chiquet-Ehrismann “Teneurin 2 is expressed by the neurons of the thalamofugal visual system in situ and promotes homophilic cell-cell adhesion in vitro” *Development*, Vol. 129, pp. 4697-4705, 2002.
5. G. C. DeLuca, G. C. Ebers, and M. M. Esiri “Axonal loss in multiple sclerosis: a pathological survey of the corticospinal and sensory tracts” *Brain*, Vol. 127, pp. 1009-1018, 2004.
6. Shinsuke Shibata, Akimasa Yasuda, Francois Renault-Mihara, Satoshi Suyama, Hiroyuki Katoh, Takayoshi Inoue, Yukiko U Inoue, Narihito Nagoshi,

Momoka Sato, Masaya Nakamura, Chihiro Akazawa and Hideyuki Okano “Teneurin 2 is expressed by the Sox10- Venus mice: a new tool for real-time labeling of neural crest lineage cells and oligodendrocytes” *Molecular Brain*, Vol. 3, 31, 2010.

#### 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, Tadahiro Numakawa, Joshua Chou, Susana de Vega, Chihiro Mizuniwa, Kaori Sekimoto, Naoki Adachi, Hiroshi Kunugi, Eri Arikawa-Hirasawa, Yoshihiko Yamada, and Chihiro Akazawa “Teneurin-4 promotes cellular protrusion formation and neurite outgrowth through focal adhesion kinase signaling” *The FASEB Journal*, Vol. 28, pp. 1386-1397, 2014 (査読有)

DOI: 10.1096/fj.13-241034. Epub 2013 Dec 16.

〔学会発表〕(計13件)

1. 兵頭舞、鈴木喜晴、林千香子、須藤絵里子グレース、馬淵洋、赤澤智宏「Teneurin-4の細胞間接着活性の解析」第16回日本再生医療学会総会(平成29年3月9日、仙台国際センター)

2. 木倉直美、鈴木喜晴、林千香子、須藤絵里子グレース、馬淵洋、赤澤智宏「中枢神経系髄鞘形成における Teneurin-4 の細胞内結合タンパク質の解析」第16回日本再生医療学会総会(平成29年3月8日、仙台国際センター)

3. 林千香子、鈴木喜晴、馬淵洋、木倉直美、須藤絵里子グレース、赤澤智宏「オリゴデンドロサイトの分化・髄鞘形成における Teneurin-4 細胞外ドメインの機能」第16回日本再生医療学会総会(平成29年3月8日、仙台国際センター)

4. Nobuharu Suzuki, Chikako Hayashi, Naomi Kikura, Mai Hyodo, Yo Mabuchi, Susana de Vega, Eri Arikawa-Hirasawa, Yoshihiko Yamada, and Chihiro Akazawa ”Teneurin-4 Is a Transmembrane Protein That Regulates Myelination by Oligodendrocytes in the Central Nervous System” *The 2017 Japan-NIH joint Symposium*(平成29年2月16日、東北大学星陵オーデトリウム)

5. 鈴木喜晴、石井佳菜、馬淵洋、林千香子、木倉直美、赤澤智宏「Teneurin-4 Is Required for Myelination in the Central Nervous System and Quiescence of Muscle Satellite Cells」第59回日

本神経化学会大会(平成28年9月8日、福岡国際会議場)

6. Nobuharu Suzuki, Kaori Sekimoto, Chikako Hayashi, Yo Mabuchi, Eriko G Suto, Tetsuya Nakamura, and Chihiro Akazawa ”A Novel Murine Experimental System for Analyzing Differentiation of Oligodendrocyte Precursor Cells Using Sox10-Venus Mice” *Experimental Biology 2016*(平成28年4月4日、San Diego Convention Center)

7. 林千香子、鈴木喜晴、関本佳織、須藤絵里子グレース、馬淵洋、中村哲也、赤澤智宏「Sox10-Venus マウスを用いた新規オリゴデンドロサイト分化解析法」第15回日本再生医療学会総会(平成28年3月19日、大阪国際会議場)

8. 鈴木喜晴、関本佳織、水庭千尋、赤澤智宏「Teneurin-4のFAKシグナル経路を介した神経突起形成」第15回日本再生医療学会総会(平成28年3月19日、大阪国際会議場)

9. 関本佳織、鈴木喜晴、馬淵洋、林千香子、中村哲也、赤澤智宏「Isolation of Sox10-Venus oligodendrocyte precursor cells differentiable to oligodendrocytes and type 2 astrocytes」第37回日本分子生物学会年会(平成26年11月27日、パシフィコ横浜)

10. 招待講演: 赤澤智宏、鈴木喜晴、馬淵洋 “A Transmembrane Protein Teneurin-4 Positively Regulates Neural and Glial Protrusion Formation through Focal Adhesion Kinase Signaling” 第37回日本神経科学大会 The Japan-Australia joint symposium(平成26年9月13日、パシフィコ横浜)

11. 関本佳織、鈴木喜晴、須藤絵里子グレース、馬淵洋、赤澤智宏「Sox10-Venus マウスを用いたオリゴデンドロサイト前駆細胞の純化培養法の確立と分化解析」第9回日本臨床検査教育学会学術大会(平成26年8月21日、大田区産業プラザ)

12. 林千香子、鈴木喜晴、関本佳織、須藤絵里子グレース、馬淵洋、赤澤智宏「新規オリゴデンドロサイト前駆細胞培養法を用いたアストロサイトの分化機構解析」第9回日本臨床検査教育学会学術大会(平成26年8月21日、大田区産業プラザ)

13. Kaori Sekimoto, Nobuharu Suzuki, Yo Mabuchi, and Chihiro Akazawa ”In vitro Analysis of Differentiation of Oligodendrocytes and Astrocytes Using Sox10-Venus Mice” *Experimental Biology 2016*(平成26年4月30

日、San Diego Convention Center)

## 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・准教授  
研究者番号：30596565

### (2) 研究協力者

山田 吉彦 (YAMADA YOSHIHIKO)  
米国国立保健衛生研究所・歯学頭蓋研究  
所・部長

平澤 恵理 (HIRASAWA ERI)  
順天堂大学・大学院医学研究科・老人性疾  
患病態治療研究センター・教授

赤澤 知宏 (AKAZAWA CHIHIRO)  
東京医科歯科大学・大学院保健衛生学研究  
科・教授

馬淵 洋 (MABUCHI YO)  
東京医科歯科大学・大学院保健衛生学研究  
科・助教