

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：13401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670101

研究課題名(和文)ミトコンドリア代謝によるリンパ球ケモタクシス制御

研究課題名(英文)Control of lymphocyte chemotaxis by mitochondrial metabolism

研究代表者

松岡 達 (Matsuoka, Satoshi)

福井大学・医学部・教授

研究者番号：00263096

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：ミトコンドリア代謝に関与するミトコンドリアNa<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup>交換輸送体NCLXの抑制は、Bリンパ球細胞走化を抑制しランダムな細胞運動を増加した。この機序として、NCLXが細胞質Ca<sup>2+</sup>動態を調節することでアクチン重合やRac1局在化を制御し、その結果、細胞走化や細胞運動を制御することが示唆された。この制御はマウス脾臓由来Bリンパ球でも見られたが、Tリンパ球では見られなかった。ミトコンドリア-小胞体間Ca<sup>2+</sup>動態の違いが、Bリンパ球とTリンパ球の細胞走化におけるNCLXの寄与の違いに関与すると考えられた。また、ミトコンドリア酸化が、Bリンパ球細胞走化・遊走に重要な役割を担う可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Inhibition of mitochondrial Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger (NCLX), which is strongly related with mitochondrial energy metabolism, caused attenuation of chemotaxis toward CXCL12 and augmentation of random cell movement in B lymphocytes (A20). The following mechanisms were elucidated; NCLX modulates actin polymerization and Rac1 localization through controlling cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> so that chemotaxis and cell motility of B lymphocytes are influenced. The control by NCLX was observed also in native B lymphocytes derived from mouse spleen, but not in T lymphocytes. It was demonstrated that the difference in Ca<sup>2+</sup> dynamics in mitochondria and endoplasmic reticulum causes the preferential contribution of NCLX to chemotaxis in B lymphocytes. In addition, it was suggested that mitochondrial beta-oxidation has important roles in cell motility and chemotaxis of B lymphocytes.

研究分野：細胞生理学

キーワード：ミトコンドリア ケモタクシス 代謝 システム生物学

1. 研究開始当初の背景

リンパ球やある種の癌細胞の細胞走化において、ミトコンドリア機能が関与するとの報告があるが (Campello *et al.*, *J Exp Med*, 2006; Desai *et al.*, *Biophys J*, 2013)、その詳細ならびに全容は明らかでない。研究代表者は、培養 B リンパ球細胞 A20 において、ミトコンドリア代謝に関与すると考えられるミトコンドリア  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$  交換輸送体 NCLX を siRNA を用いてノックダウンすると、ケモカイン CXCL12 に対する細胞走化が抑制されること、一方、ランダムな細胞運動は増加することを見出した。そこで、ミトコンドリア代謝がリンパ球細胞遊走・走化を制御するという新たな仮説をたてた。

2. 研究の目的

細胞生理学実験ならびに数理モデル解析を組み合わせたフィジオーム研究手法によって、B リンパ球の遊走・走化におけるミトコンドリア代謝の役割を解明する。

3. 研究の方法

培養 B リンパ球細胞 (A20 B リンパ球、DT40 B リンパ球) ならびにマウス脾臓 B リンパ球を用いて、以下の検討を行った。

(1) 細胞遊走・走化のタイムラプス解析

マウス脾臓から B リンパ球細胞ならびに T リンパ球細胞を単離した (Miltenyi Biotec; B cell isolation kit,  $\text{CD}^+$  T cell kit)、コラーゲンゲルを利用したケモタクシスチャンパー (ibidi) に細胞を播種し、片側のチャンパーに CXCL12 (100 ng/ml) を添加することで細胞走化のタイムラプス実験を行った。

A20 B リンパ球細胞をフィブロネクチンコートしたガラスボトムディッシュに接着させた。解糖系阻害剤 (2-deoxy-D-glucose; 10 mM) またはミトコンドリア  $\beta$  酸化阻害剤 (Etomoxir; 40  $\mu\text{M}$ ) 存在下でタイムラプス実験を行った。

(2) 細胞走化時におけるミトコンドリア局在の解析

A20 B リンパ球細胞にミトコンドリア膜電位感受性色素 (TMRE; 25 nM) を負荷し、フィブロネクチンコートしたガラスボトムディッシュに接着させた。starvation medium (0.1% BSA 含有 RPMI1640) で 1 時間処理後、CXCL12 (100 ng/ml) 存在下で共焦点レーザー顕微鏡を用いてタイムラプス実験を行った。また、A20 B リンパ球細胞ならびに DT40 B リンパ球細胞にミトコンドリア感受性色素 (MitoTracker Orange; 100 nM) を負荷し、starvation medium で 1 時間処理後、CXCL12 存在下におけるミトコンドリアの局在について、共焦点レーザー顕微鏡を用いて解析した。

(3) 細胞走化時における細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  の測定

A20 B リンパ球細胞をフィブロネクチンコートしたガラスボトムディッシュに接着させた。細胞に CXCL12 (100 ng/ml) を添加し、2 時間インキュベートした後、細胞質  $\text{Ca}^{2+}$  感受性色素 fura-2, AM (5  $\mu\text{M}$ ) を負荷して、蛍光顕微鏡にて蛍光強度を測定した。

(4) 細胞走化時におけるアクチン重合、Rac1 局在の解析

A20 B リンパ球細胞をフィブロネクチンコートしたガラスボトムディッシュに接着させた。細胞を starvation medium (0.1% BSA 含有 RPMI1640) で 1 時間処理後、CXCL12 (100 ng/ml) を添加し、2 時間インキュベートした。3.7% ホルマリン溶液で細胞を固定し、免疫染色に供した。

(5) 細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  動態・ミトコンドリア代謝を担う遺伝子群の発現解析

マウス脾臓から単離した B リンパ球細胞ならびに T リンパ球細胞を用いて、ミトコンドリア・小胞体・細胞膜  $\text{Ca}^{2+}$  輸送体群ならびにミトコンドリア代謝関連遺伝子の mRNA 発現量をリアルタイム PCR にて比較した。

(6) ミトコンドリア数理モデル構築

ミトコンドリア代謝酵素、輸送体群を実験データに合うよう数式化し、組み合わせることによって、詳細なミトコンドリア数理モデルを構築した。

4. 研究成果

(1) 細胞走化時におけるミトコンドリアの局在と NCLX の関与

A20 B リンパ球細胞では、CXCL12 存在下における細胞走化時には、ミトコンドリアは進行方向の後方に局在していた。また、siRNA を用いて NCLX をノックダウンすると、ミトコンドリアの局在が消失し、細胞走化も抑制された (図 1)。同様の結果は、NCLX ヘテロノックアウト DT40 B リンパ球でも得られた。すなわち、NCLX は細胞走化時におけるミトコンドリアの局在化に深く関与することが

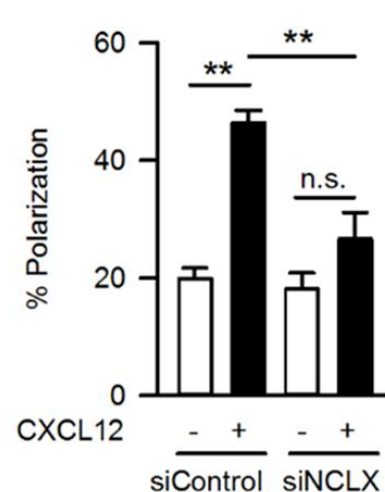


図1 A20リンパ球ミトコンドリア局在化に対するNCLXノックダウンの効果

示唆された。

## (2) NCLX を介した細胞内 $Ca^{2+}$ 動態の細胞走化における役割

siRNA による NCLX ノックダウン A20 B リンパ球細胞では、細胞質  $Ca^{2+}$  濃度が 15% 程度増大していた。一方、コントロール細胞では、CXCL12 の添加によって細胞質  $Ca^{2+}$  濃度が 20% 程度増大したが、NCLX ノックダウン細胞では CXCL12 添加による細胞質  $Ca^{2+}$  濃度のさらなる増大は認められなかった (図 2)。同様の結果が、薬物 (CGP-37157; 2  $\mu$ M, 20  $\mu$ M) による NCLX の抑制でも認められた。これらの結果から、NCLX 抑制による細胞質  $Ca^{2+}$  増加がランダムな細胞運動増加と関与すること、CXCL12 に対する細胞質  $Ca^{2+}$  増大効果の消失が NCLX 抑制による細胞走化抑制に関与することが推察された。

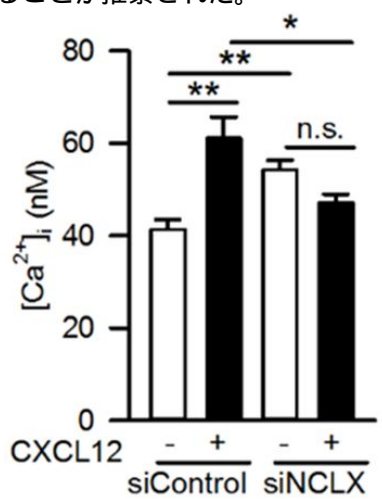


図2 A20リンパ球細胞質 $Ca^{2+}$ 濃度に対するNCLXノックダウンの効果

細胞の動きに深く関与するアクチン重合や低分子量 G タンパク Rac1 の局在は、 $Ca^{2+}$  依存性であると報告されている (Grunicke, *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 2009; Babich *et al.*, *Immunol Rev*, 2013)。そこで、NCLX がこれらの因子に関与するか検討した。その結果、siRNA による NCLX ノックダウン A20 B リンパ球細胞では、アクチン重合ならびに Rac1 局在が亢進していた。また、コントロール細胞では、CXCL12 の添加によってアクチン重合ならびに Rac1 局在が増大したが、NCLX ノックダウン細胞ではさらなる増大は認められなかった (図 3)。

以上の結果から、NCLX を介した細胞内  $Ca^{2+}$  動態が、アクチン重合や Rac1 の局在を介して細胞走化、ランダムな細胞の動きを制御することが示唆された。

## (3) 細胞内 $Ca^{2+}$ 動態・ミトコンドリア代謝を担う遺伝子群の発現解析

マウス脾臓から単離した B リンパ球細胞ならびに T リンパ球細胞を用いて、CXCL12 に対する細胞走化を調べた。その結果、薬物 (CGP-37157) による NCLX の阻害は、B リン

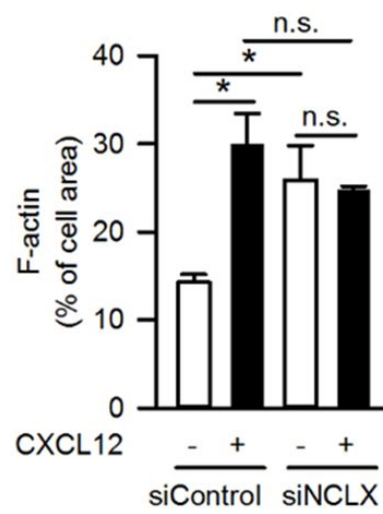


図3 A20リンパ球のアクチン重合に対するNCLXノックダウンの効果

ンパ球細胞の走化を著しく抑制したが、T リンパ球では影響を及ぼさなかった (図 4)。したがって、細胞走化における NCLX の寄与は B リンパ球に特異的であることが示唆された。

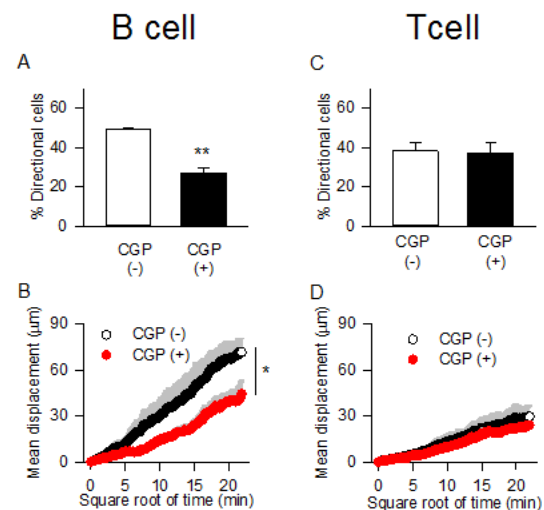


図4 マウス脾臓Bリンパ球(A,B)及びTリンパ球(C,D)に対するNCLX抑制の効果。A,C; CXCL12に向かい走化した細胞の割合。B,D; 平均移動距離。CGP:CGP-37157

そこで、ミトコンドリア・小胞体・細胞膜  $Ca^{2+}$  動態を担う遺伝子群ならびにミトコンドリア代謝に関与する遺伝子群の mRNA 発現量を B リンパ球と T リンパ球と比較したところ、ミトコンドリアと小胞体の  $Ca^{2+}$  輸送担体 (NCLX, Letm1, IP3R1-3, SERCA3) ならびに store-operate  $Ca^{2+}$  entry を担う orai1 の発現量が B リンパ球に比べて T リンパ球で著しく少なかった。一方、細胞膜  $Ca^{2+}$  輸送体 (NCX1-3, PMCA1,2,4) の発現量に違いは認められなかった。さらに、ミトコンドリア ATP 産生酵素 (ATP5b) の発現も同程度であった。これらの結果から、NCLX を介したミトコンドリア・小胞体の  $Ca^{2+}$  動態の違いが、B リンパ球と T リンパ球の細胞走化における NCLX の寄与の違いに関与すると考えられた。

上記(1)～(3)の成果を論文発表した(論文)

#### (4) 細胞遊走におけるミトコンドリア代謝の役割

A20 Bリンパ球細胞の細胞遊走における解糖系ならびにミトコンドリアβ酸化阻害の役割を調べた。その結果、解糖系の阻害剤(10 mM 2-deoxy-D-glucose)の添加では、細胞遊走に明らかな影響は認められなかったが、ミトコンドリアβ酸化阻害剤(40 μM Etomoxir)の添加によって、細胞遊走が抑制される傾向が認められた。したがって、ミトコンドリアβ酸化が、細胞遊走・走化に重要な役割を担う可能性が示唆された。

#### (5) ミトコンドリア数理モデル解析

ミトコンドリア数理モデルを用いて、Ca<sup>2+</sup>によるミトコンドリア代謝制御のメカニズムについて詳細な検討を行った。その結果、細胞質に存在する基質の組み合わせ、組成によって、Ca<sup>2+</sup>によるミトコンドリア代謝制御の寄与が大きく異なることを見出した。上記成果を論文に投稿中である。

#### (6) 新たな細胞遊走解析技術の開発

光変換型蛍光タンパク KikGR のノックインマウスにUV照射することで、内在性の皮膚由来樹状細胞等をラベルする技術をもとに、細胞遊走を解析する方法を共同研究により開発した。この成果を論文発表した(論文)

#### 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3件)

Kim B, Takeuchi A, Hikida M, Matsuoka S. Roles of the mitochondrial Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger, NCLX, in B lymphocyte chemotaxis. *Scientific Reports* (in press). 査読有.

Takeuchi A, Matsuoka S. The destiny of Ca<sup>2+</sup> released by mitochondria. *The Journal of Physiological Sciences*, 65(1), 11-24, 2015. DOI:10.1007/s12576-014-0326-7, 査読有.

Tomura M, Hata A, Matsuoka S, Shand FH, Nakanishi Y, Ikebuchi R, Ueha S, Tsutsui H, Inaba K, Matsushima K, Miyawaki A, Kabashima K, Watanabe T, Kanagawa O. Tracking and quantification of dendritic cell migration and antigen trafficking between the skin and lymph nodes. *Scientific Reports*. 4, 6030, 2014. DOI:10.1038/srep06030, 査読有.

[学会発表](計6件)

Takeuchi A, Horiguchi K, Iino S, Fukazawa Y, Matsuoka S. 「Contribution of mitochondria to the generation of automaticity of sinoatrial node cells; a simulation study」e-Heart シンポジウム、

2015年9月19日、立命館大学(南草津市・滋賀県)

Matsuoka S, Takeuchi A. 「Physiome study on mitochondrial Ca<sup>2+</sup> dynamics」67<sup>th</sup> Annual Meeting of the Korean Physiological Society, 2015年10月22日、釜山(韓国)

竹内綾子、金鳳柱、松岡達 「リンパ球細胞走化・遊走におけるイオン・水動態」第2回「水シグナリングの分子動態から病態へ」研究会、2015年3月2日、アオッサ(福井市・福井県)

松岡達 「ミトコンドリアモデル」e-Heart シンポジウム、2015年2月28日、立命館大学(南草津市・滋賀県)

松岡達 「数理解析から解き明かす細胞機能」第26回分子糖尿病学シンポジウム、2014年12月6日、高知市文化プラザかるぼーと(高知市・高知県)

松岡達、金鳳柱、竹内綾子 「ミトコンドリアNa<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup>交換輸送体NCLXによるBリンパ球細胞走化の調節」第61回中部日本生理学会、2014年11月7日、名古屋市立大学(名古屋市・愛知県)

[その他]

ホームページ

福井大学医学部統合生理学ホームページ

<http://isphysio.med.u-fukui.ac.jp/>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

松岡達 (MATSUOKA, Satoshi)

福井大学・医学部・教授

研究者番号：00263096