

ミトコンドリアによるリンパ球細胞走化制御に関する ナノファイバー技術を用いた研究

研究代表者： 松岡 達（医学部・教授）、藤田 聡（工学部・准教授）
共同研究者： 竹内 綾子（医学部・特命助教）

概 要
ミトコンドリア Ca^{2+} 、 Cl^- 感受性蛍光タンパク（Case12-mito、Clomeleon-mito）を発現したマウス由来培養 B リンパ球細胞（A20）を、ナノファイバー上でライブセルイメージング可能なチャンバーの開発に成功した。これにより、リンパ球細胞走化時のミトコンドリア Ca^{2+} 、 Cl^- 動態の定量的評価が可能となった。また、ミトコンドリア Ca^{2+} 排出タンパクである NCLX を A20 B 細胞で siRNA ノックダウンまたは薬剤により抑制すると、トランスウェルチャンバーにおけるケモタクシスも抑制された。NCLX をノックダウンした細胞では F アクチンの重合が促進されたが、ケモカイン（CXCL12）による更なる重合は起こらなかった。NCLX は、B リンパ球ケモタクシスにおいて、ケモカインに対する F アクチンの重合過程に関連すると推測された。
関連キーワード
リンパ球、細胞走化、ミトコンドリア、イオン、ナノファイバー

研究の背景および目的

松岡、竹内らは、ミトコンドリア Ca^{2+} 輸送体（NCLX）が B リンパ球の抗原受容体刺激に対する細胞内 Ca^{2+} 応答に重要であることを見いだした。さらに、NCLX 抑制は B リンパ球（A20B リンパ球及びマウス脾臓 B リンパ球）のランダムな細胞走化を増大し、ケモカインに向かうケモタクシスを抑制した。また、ミトコンドリア Cl^- 放出を促進する薬物は、B リンパ球のケモタクシスを抑制することを見いだした。これら一連の研究から、ミトコンドリア Ca^{2+} 輸送体、 Cl^- 輸送体がリンパ球細胞走化を制御するという仮説を得た。一方、藤田

は、ナノファイバーに添って遊走する細胞の挙動をタイムラプス顕微鏡で観察することで、1細胞の遊走挙動を定量的に評価する技術を確認している。

本研究では、ミトコンドリア Ca^{2+} 感受性タンパク（Case12-mito）ならびに松岡・竹内が新規に開発したミトコンドリア Cl^- 感受性蛍光タンパク（Clomeleon-mito）と、藤田による独創的なナノファイバー技術を用いた実験を中心に、この仮説を確認することを目指す。

研究の内容および成果

1. マウス由来 B リンパ球細胞 A20 を用いたミトコンドリア内 Ca^{2+} 、 Cl^- イオンイメージング

マウス由来培養 B リンパ球細胞 A20 を用いて、ミトコンドリア内 Ca^{2+} 、 Cl^- のライブセルイメージングを行った。ミトコンドリア Ca^{2+} イメージングは、 Ca^{2+} 感受性タ

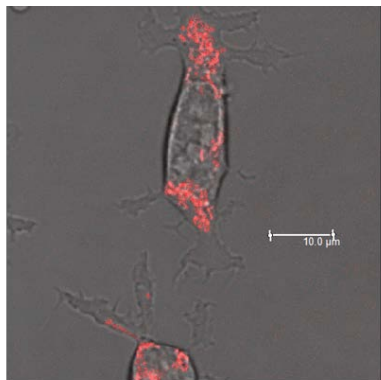


図1 Clomeleon-mitoを発現するA20B細胞

ンパク Case12-mito (Evrogen)をミトコンドリアに発現することで行った。ミトコンドリア Cl^- イメージングは、細胞内 Cl^- 感受性タンパク Clomeleon (Kuner and Augustine, *Neuron*, 2000) にミトコンドリア標的シグナルを付加することで新たに開発した Clomeleon-mito を用いた（図1）。Case12-mito、Clomeleon-mito とともに A20 B 細胞のミトコンドリア特異的に発現した。

2. A20 B リンパ球のケモタクシスを評価するためのナノファイバーの開発

ナノファイバーを、ガラスボトムディッシュの底面より数 $10\ \mu\text{m}$ の上方に位置するように張ったチャンバーを設計・作成し、散布した A20 B リンパ球細胞がナノファイバー上を走化する条件を検討した。当初用いたポリウレタンは、自家蛍光を

有したので、ポリ-ε-カプロラクトン(PCL)を用いたナノファイバーに素材を変更した。また、顕微鏡の自動フォーカス機能に対応できるように、チャンバーの高さを低くした。さらに、チャンバーに投与する細胞数、細胞投与からナノファイバー上の細胞走化を観察できるまでの時間等の条件を検討した。

3. ナノファイバーを用いた A20 B リンパ球細胞のケモタクシス測定

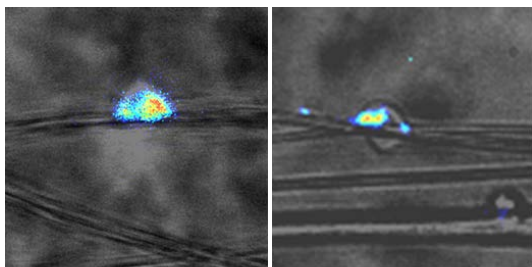


図2 Case12-mito(左)、Clomeleon-mito(右)発現するカーボンナノファイバー上のA20 B細胞

Case12-mito、Clomeleon-mito を発現した A20 B 細胞をナノファイバー上で観察することに成功した。二つの蛍光タンパクとも細胞内での輝度に

不均一性があり、ミトコンドリア毎の Ca^{2+} 、Cl 濃度不均一性が示唆された。共焦点レーザー顕微鏡による、より高解像度観察の準備を進めている。現状では、蛍光細胞がナノファイバー上に接着する確率が低いので、確率を向上させるよう実験条件の再検討を行っている。

4. ミトコンドリア Ca^{2+} 輸送体 NCLX と B リンパ球ケモタクシス

ミトコンドリア Ca^{2+} 排出タンパクである NCLX を B リンパ球で siRNA ノックダウンまたは薬剤により抑制すると、トランスウェルチャンバーを用いたケモタクシスも抑制された。また、siRNA ノックダウンによりケモカイン (CXCL12) 非存在下でも F アクチンの重合が促進されたが、ケモカインによる更なる重合は起こらなかった。NCLX 抑制による B リンパ球のランダムな細胞走化の増大と、ケモカインに向かうケモタクシスの抑制は、F アクチンの重合促進が一因であると考えられた。

本研究から、リンパ球細胞走化時のミトコンドリアイオン (Ca^{2+} 、Cl) 動態を定量的に評価可能な、ナノファイバー技術と蛍光タンパクを応用した新しい実験系を確立することができた。

本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

「主な発表論文等」

1. Takeuchi A, Kim B, Matsuoka S: The destiny of Ca^{2+} released by mitochondria. *J Physiol Sci* 65(1), 11-24, 2015.
2. 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. *Sci Rep* 2014, 4:6030.
3. Batnyam O, Uematsu H, Chou CW, Suye S, Fujita S: Taiwanin A Incorporated Polyurethane Fiber Sheets for Prevention of Postoperative Cancer Recurrence, *J Biomater Sci Polym Ed.* (submitted, under review)
4. 竹内綾子, 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(福井、2015年3月)
5. 竹内綾子, 松岡達「ミトコンドリアモデル」e-Heart シンポジウム(南草津、2015年2月)
6. 金森 啓一郎, 荻原 裕佑, 末 信一郎, 藤田 聡: シングルナノファイバーを用いたガン細胞浸潤現象の解析, 平成26年度高分子学会北陸地区若手研究会, 2014.11(富山)【優秀ポスター賞受賞】
7. Batnyam O, Fujita S, Chou CW, Suye S: Capacity of Polyurethane Elastomers Fibers as a Drug Delivery System. The International Symposium on Fiber Science and Technology 2014, 2014.9 (Tokyo)
8. Fujita S: Electrospun nanofibers for prevention of cancer recurrence: The 3rd International Symposium of Materials on Regenerative Medicine, 2014.8 (Taoyuan,

Taiwan, invited)

9. 藤田 聡, バトニヤム オノン, 周 志謂, 末 信一郎: 癌細胞の増殖抑制を目指した抗癌剤含有ナノファイバーシートの創製, 平成26年度繊維学会年次大会, 2014.6(東京)

「特記事項」

なし

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

1. 科研費・挑戦的萌芽研究, 2014~2015年度, ミトコンドリア代謝によるリンパ球ケモタクシス制御(代表・松岡), 採択, 377万円
2. 公益財団法人ソルト・サイエンス研究財団 平成26年度助成研究「ミトコンドリア Na 動態に関する細胞生理・システム生物学的研究」(代表・松岡), 採択, 100万円
3. 科研費・若手研究(B), 2014年度, 分子配向を利用したバイオミメティック・ファイバーの創成と組織構築への応用(代表・藤田), 採択, 208万円
4. 科研費・基盤研究(A), 2014年度, 次世代器官再生医療のための基盤技術の開発(分担・藤田), 採択, 156万円