

光感受性物質 Talaporfin sodium の細胞内取り込み及び排出の同定

Identification of intracellular uptake and discharge for photosensitizer Talaporfin sodium

齋藤琢磨 (Takuma SAITO)

The photosensitizer Talaporfin sodium is widely used for photodynamic therapy (PDT). However, its uptake and discharge mechanism has not been clarified. In this study, we aim to clarify the uptake and discharge mechanism of Talaporfin. We analyzed the cells using flow cytometry and investigated the tendency of uptake and discharge. As a result, it was suggested that endocytosis may be involved in Talaporfin uptake. In the future, perform comprehensive analysis using CRISPR-cas9 library.

【背景・目的】光感受性物質 Talaporfin sodium は第二世代の光感受性物質として早期肺癌、食道癌、脳腫瘍に適応されており、我が国では、早期胃癌や子宮頸癌といった癌腫に対する保険適応も進められている。しかし、Talaporfin の取り込み、排出に関わる機構は明らかになっていない。これらに関わる遺伝子を同定することができれば、光線力学的治療 (PDT) に有効な腫瘍種を治療前に解析、検討することができる。本研究では、光感受性物質 Talaporfin sodium の細胞内の取り込みと排出に関わる機構を明らかにすることを目的とする。

【材料・方法】本研究では、細胞内の Talaporfin の取り込み量を定量的に解析するためにフローサイトメトリー法を用いた。取り込みの測定では各種細胞に Talaporfin を 30 μ g/ml で 1~4 時間取り込ませた。排出の測定では 1 時間取り込ませ、その後 1~24 時間インキュベートし、それぞれフローサイトメーターで解析を行った。次にフローサイトメトリー法で解析した細胞の中から 8 種類を候補とし、細胞内の遺伝子を RT-PCR 法で増幅し、電気泳動法で ABC-Transporter の発現を確認した。解析した遺伝子の中から全細胞で発現し、蛍光強度比がフローサイトメトリーと一致した Transporter に対して siRNA を用いたノックダウンをし、相関性を確かめた。エンドサイトーシスの取り込みに関する実験では 6 種類のエンドサイトーシス阻害剤と氷上に置いたものと、2-デオキシ-D-グルコースとアゾ化ナトリウムを用いて、各種取り込み経路を阻害し、エンドサイトーシスを解析した。

【結果・考察】フローサイトメトリー法により、それぞれの細胞を解析した結果、取り込みではヒト膀胱癌細胞 UMUC3、ヒト骨肉腫細胞 MFH03、ヒト骨肉腫細胞 U2OS で 25000~40000%、ヒト大腸癌細胞株 CRC21、ヒト胎児腎細胞 293T、ヒト腎癌細胞株 ACHN では 20000~25000%、ヒト T リンパ球性白血病細胞 SUP T-1、ヒト皮膚繊維芽細胞 HDFa では 5000~10000%の蛍光が増加した(Fig.1 a)。排出においては、293T、MFH03、ACHN では 80~90%、HDFa、SUP T-1、U2OS、UMUC3 では 60~80%、CRC21 では 30%であった(Fig.1 b)。Talaporfin の細胞種ごとの取り込み、排出に関する実験の結果から、Talaporfin は細胞種ごとに取り込み、排出能に差が出るのが判明し、何らかの細胞膜タンパク質が関与していることが示された。それらの細胞の遺伝子を RT-PCR で増幅させ、全細胞で発現し、293T、MFH03、ACHN では発現が強く、CRC21 では発現が弱い遺伝子を解析した結果、ABCC10 及び ABCF1 が候補となった(Fig.2)。この二つの Transporter を siRNA でノックダウンをし、Talaporfin の

排出量が低下するかを測定したが、コントロールと比較し、有意な差は見られなかった。このことから、ABCF1はTalaporfinの排出に関与していないことが示された。エンドサイトーシスの測定の結果、2-デオキシ-D-グルコースと氷上固定でTalaporfinの取り込み量が5~20%に減少することが確認された。また、それぞれの阻害剤を用いた結果、スクロースとゲニステイン、メチル-β-シクロデキストリンの3種類でTalaporfinの取り込みが20~50%に減少した。これらの結果から、Talaporfinの取り込みにはATPによるエネルギー依存的な取り込みかつ能動輸送が関与している可能性が示唆され、クラスリンエンドサイトーシス及びカベイレンドサイトーシスが関与している可能性が示唆された(Fig.3)。

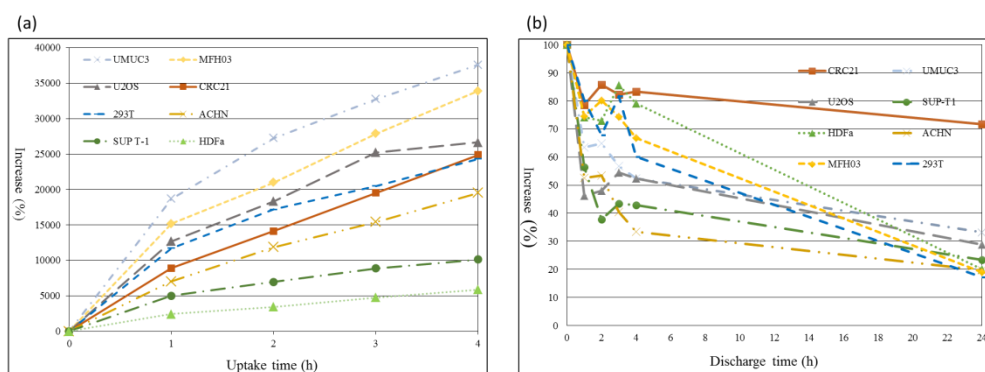


Fig.1 Analysis of intracellular Talaporfin concentration by flow cytometry

(a) uptake time 1-4 hours (b) discharge time 1-24 hours

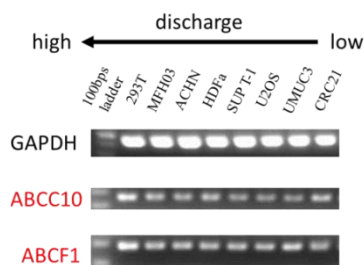


Fig.2 RT-PCR for 8 cell line

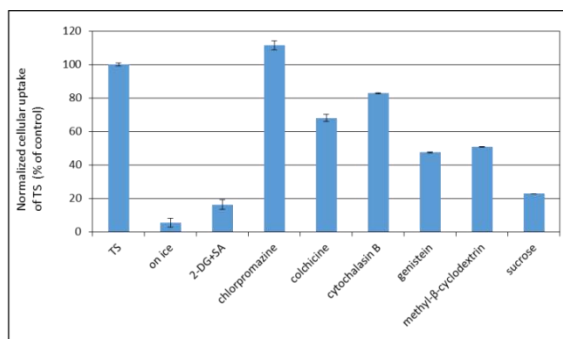


Fig.3 uptake pathway of Talaporfin using endocytosis inhibitor

参考文献 1. Ming.Y, Xiaoxiang. Z November INT J NANOMED 529-542 (2016)

2. Dagny.L. Ulrich, John D. schuetz January J. Biol Chem 12679-12690 (2012)