

光感受性物質の細胞への取り込みと光化学反応の画像解析

Image analysis of cellular uptake and photochemical reaction of photo-sensitizers

バイオ・マテリアル学科 南谷晴之 (Haruyuki MINAMITANI)

On photodynamic therapy (PDT) for curing malignant tumor tissues, photosensitizer plays important role to produce reactive oxygen substances. In this study, intracellular localization and behavior of Talaporfin was investigated by using fluorescent imaging with cytotoxic effect observation. WKA rat normal fibroblast cell lines (WFB) and H-ras oncogene-transfected rat fibroblast cell lines (W31) were used. Accumulation of Talaporfin was not observed in the nucleus and cytomembrane but observed around the nucleus site, especially in the mitochondria. After irradiation of excitation light ($\lambda=512\text{nm}$) on the Talaporfin endocytosed W31, swelling of the whole cell and of the nucleus with damage of cell membrane occurred as the effect of PDT. Cell death of W31 was more significant than that of WFB which means photochemical reaction of Talaporfin effectively functioned in tumor cells.

腫瘍細胞などの光線力学的治療(Photodynamic Therapy: PDT) は、細胞内に選択的に取り込ませた光感受性物質に特定波長の光照射を行い、その励起エネルギーに基づく光化学反応によって活性酸素を産生させ、その活性酸素により腫瘍組織部位を局所的に壊死破壊することが可能であり、正常細胞への影響を軽減することができる。第二世代の光感受性物質として注目されている Talaporfin はその細胞内への蓄積様態と反応作用について未だ不明なことが多く、本研究では、Talaporfin の細胞内局在と PDT による殺細胞効果の発現過程を蛍光イメージングにより解析した。

光感受性物質の細胞への取り込み実験には、WKA ラット胎児由来線維芽細胞株(WFB)と H-ras 癌遺伝子を導入し形質転換した癌化線維芽細胞株(W31)を使用した。WFB と W31 にそれぞれ Talaporfin を 30 分取り込ませたとき、Talaporfin の濃度別の蓄積局在を共焦点レーザー蛍光顕微鏡 TE2000-U (Nikon)・CSU21(横河電機)で蛍光イメージングし、その画像を画像解析ソフト Image Pro Plus (Media Cybernetics) によって定量観察した。核とミトコンドリア染色のためにそれぞれアクリジンオレンジと MitoTracker[®]Red を使用し、Talaporfin の局在部位との関連を精査した。光化学反応の実験も同様に、WFB と W31 を使用し、共焦点レーザー蛍光顕微鏡を用いて、PDT による細胞死の過程を PDT 開始から 30 分間観察し、その様子を動画に撮像した。

その結果、W31において Talaporfin の共焦点蛍光画像をサーフェイスプロットしたところ、核および細胞膜への局在はなく、核の近傍部に集積していることが確認された(Fig.1)。その分布は MitoTracker[®]Red で染色されたミトコンドリアの蛍光と同じ分布を示したため、ミトコンドリアへの集積が顕著であることが示唆された。Talaporfin は核に集積しないことから、Talaporfin の添加濃度を上げていったときの蛍光量積算値の上昇は、核外に取り込まれた Talaporfin によるものと考えられる(Fig.2)。一方、WFB において Talaporfin 添加濃度の増加に伴う蛍光量積算値が線形に増加しなかったことから、正常細胞の WFB にはほとんど Talaporfin の集積しないことが示唆された。Talaporfin を取り込ませた W31 に励起光を照射すると、PDT による細胞死の過程において、細胞の膨張、ミトコンドリアの膨張、細胞核

の膨張、細胞膜の崩壊が確認された。その細胞死の様態は、Talaporfin の光化学反応により細胞をネクロシスに誘導することが明らかとなった。一方、WFB においては PDT による細胞死が確認されなかったことから Talaporfin の癌細胞選択的蓄積性が示された。



Fig.1 Surface-plot of fluorescence intensity emitted from Talaporfin in tumor cells W31.

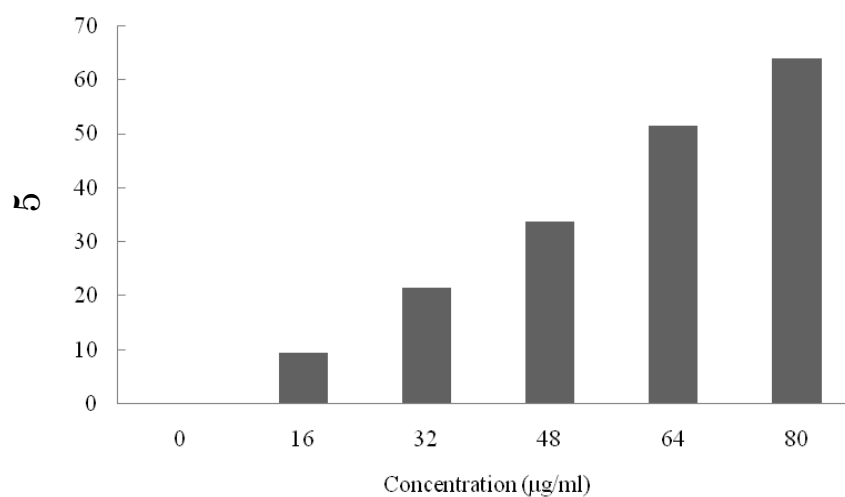


Fig.2 Relationship between fluorescence intensity of Talaporfin accumulated in tumor cells W31 and Talaporfin concentration.