

光感受性物質 Talaporfin の細胞内取り込み及び排出の同定

Identification of intracellular uptake and discharge for photosensitizer Talaporfin

齋藤 琢磨 (Takuma SAITO)

The photosensitizer Talaporfin 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, knock down the autophagy master gene TFEB and examine whether it affects the ability to excrete Talaporfin.

【背景・目的】光感受性物質 Talaporfin 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、排出の過程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) に有効な癌種を治療前に解析、検討することができる。本研究では、光感受性物質の細胞内の取り込みと排出の過程を明らかにすることを目的とする。

【材料・方法】細胞内の Talaporfin の排出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。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、解析を行った。エンドサイトーシスの細胞内局在の実験では、細胞株に Talaporfin と初期エンドソーム抗原 1 (EEA1) もしくはリソソーム関連膜タンパク質 1 (LAMP1) を取り込ませ、共焦点顕微鏡で 2 時間、20 分おきにホルマリン固定をして観察した。エンドサイトーシスの経路の実験では 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。ABC-Transporter との関連性を調べるため、フローサイトメトリー法で解析した細胞の中から 8 種類を候補とし解析を行った。解析した遺伝子の中から全細胞で発現し、蛍光強度比が一致した Transporter に対して siRNA でノックダウンをし、関連性を確かめた。

【結果・考察】フローサイトメトリー法を用いて解析した結果、ヒト癌細胞株 293T、MFH03、ACHN では高い排出能を示し、HDFa、SUPT-1、U2OS、UMUC3 では中程度の排出能、CRC21 では低い排出能であった。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 は細胞種ごとに排出能に差が出るのが判明し、細胞膜タンパク質が関与していることが示された (Fig.1)。次にエンドサイトーシスの局在を蛍光顕微鏡で観察した結果、EEA1 及び LAMP1 で Talaporfin の蛍光と細胞内局在が一致するという結果となり、Talaporfin の取り込みにはエンドサイトーシスが関わっている可能性が高いことが明らかになった (Fig.2)。エンドサイトーシスの経路の結果、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、クラスリン及びカベオラエ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)。フローサイト

