

令和2年度
博士論文

光線力学的診断・治療用光感受性物質 Talaporfin の
細胞内の取り込みと排出機序の同定

公立千歳科学技術大学大学院光科学研究科

齋藤 琢磨

目次

1.1 背景.....	1
1.2 目的.....	2
2.1 光線力学的診断と治療.....	3
2.1.1 光線力学的診断・治療の歴史.....	3
2.1.2 光線力学的診断.....	3
2.1.3 光線力学的治療.....	4
2.1.4 光感受性物質 Talaporfin-sodium.....	5
2.2 薬物トランスポーター.....	6
2.2.1 SLC トランスポーター.....	6
2.2.2 ABC トランスポーター.....	6
2.3 エンドサイトーシス.....	8
2.3.1 クラスリンエンド依存性サイトーシス.....	9
2.3.2 カベオラエンドサイトーシス.....	10
2.3.3 脂質ラフトエンドサイトーシス.....	10
2.4 ワールブルク効果.....	11
2.5 Ras 遺伝子.....	12
3.1 細胞株.....	13
3.1.1 継代培養方法.....	14
3.1.1 PBMC の抽出方法.....	14
3.2 細胞の Talaporfin の取り込み量の同定.....	15
3.3 細胞の Talaporfin の排出量の同定.....	15
3.4 ABC-トランスポーターの同定.....	15
3.4.1 RNA の抽出方法.....	15
3.4.2 cDNA の合成方法.....	16
3.4.3 PCR と電気泳動法.....	16
3.5 Talaporfin の細胞内局在の撮像.....	18
3.6 Talaporfin のエンドサイトーシス経路の同定.....	18
3.7 Talaporfin の消失経路の同定.....	19
3.8 細胞内の ATP の解析.....	19
3.9 Ras タンパクの阻害による Talaporfin の取り込みの解析.....	20
3.10 Talaporfin-sodium.....	20
3.11 統計.....	20

4.1 細胞の Talaporfin の取り込み量の同定	21
4.2 細胞の Talaporfin の排出量の同定.....	23
4.3 Talaporfin の取り込みに関わる ABC トランスポーターの同定	25
4.4 Talaporfin の細胞内局在のイメージング	26
4.4.1 ヒト肉腫細胞株	26
4.4.2 ヒト肺癌細胞株	32
4.5 Talaporfin のエンドサイトーシスの取り込み経路の同定.....	38
4.6 Talaporfin のライソソームにおける分解の解析	41
4.7 Talaporfin のエンドサイトーシスの取り込み経路の同定.....	43
4.8 Ras 由来のシグナル阻害時の Talaporfin の取り込みの変化	46
5.1 結論と考察	49
5.2 今後の課題	50
参考文献	1
謝辞.....	4

1.1 背景

WHO の調査によると、2018 年の癌の発症数は 1810 万人、死亡数は 960 万人に達し、死亡者数は増加傾向にある^[1]。また、厚生労働省調査の死亡率の年次推移によると、癌は一貫して上昇を続け、昭和 56 年以降、日本人の死因の第 1 位となっており、早急な対応が必要である(図 1.1)。そこで、低侵襲的で副作用が少ない光線力学的診断・治療法の研究が進められている。光線力学的診断・治療法は従来の抗癌剤治療や放射線療法と異なり、治療時の苦痛や副作用が少なく、他の診断や治療方法と併用が可能であるという利点を持つ^[3-7]。光線力学的治療・診断に用いられる光感受性物質は癌特異的に集積する物質であり、第一世代のフォトリン、第二世代の Talaporfin と 5-アミノレブリン酸 (5-ALA) が保険適用され、広い癌腫に保険適用が進められている。第二世代の 5-ALA に関しては分子トランスポーターの関与による取り込みと排出及びヘムの生合成による代謝の経路が知られている。しかし、Talaporfin に関しては、1989 年に Robers らがエンドサイトーシスの関与の報告をして以来、詳しい取り込みや排出のメカニズムに関する報告はされていない^[8]。エンドサイトーシスは抗癌剤を含む薬物輸送の経路として研究され、それらの制御が癌治療においても重要であると考えられている^[9]。また、もう一つの分子トランスポーターを介した薬物輸送経路の研究が進められており、ABC トランスポーター及び SLC トランスポーターの研究も積極的に進められている^[10]。薬物の取り込みと排出に関わる分子機構やメカニズムを明らかにすることは、その薬物の実験的、臨床的な使用の観点からも重要である。しかし、Talaporfin の輸送経路に関してはエンドサイトーシス以外の詳しいメカニズムは明らかになっていない。

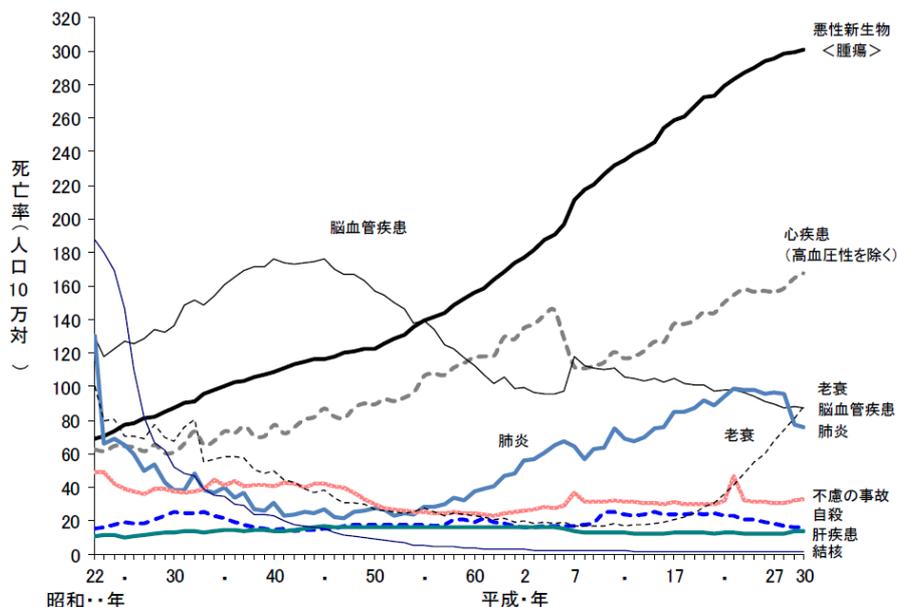


図 1.1 主な死因別にみた死亡率の年次推移^[2]

1.2 目的

本研究では、第二世代の光感受性物質 **Talaporfin sodium** の細胞内への取り込みと排出のメカニズムを明らかにすることにより、光線力学的診断及び治療における **Talaporfin** の促進に役立てることを主な目的とする。

2.1 光線力学的診断と治療

2.1.1 光線力学的診断・治療の歴史

光線力学的診断 (PDD: Photodynamic Diagnosis)、光線力学的治療 (PDT: Photodynamic Therapy)の歴史は今から 100 年前に遡る^[11]。当時は適切な薬剤と光源の問題から、半世紀の間普及することはなかった。しかし、1960 年代になると、アメリカの Mayo clinic の Lipson 等が、癌に効率的に集積する Hematoporphyrin 誘導体 (HpD)を開発し、急速にこの分野は発展した。HpD は癌病巣に特異的に集積し、光線照射によって光線力学的反応が惹起されることが証明され、R.Fontana、D.Sanderson、D.Cortese 等によって気管支の診断的有用性が検討されていたが、1970 年代になると、Roswell Park Memorial Institute の Thomas J Dougherty が、動物実験の原発性悪性腫瘍の PDT を試み、その成果を基に、臨床応用として乳癌の皮膚転移巣で局所抑制効果が報告された。日本では 1978 年 Dougherty との共同研究により、犬肺癌モデルを使っての内視鏡的 PDD および PDT の前臨床試験を行い、安全性と有効性の確認後、臨床応用として 1979 年に肺癌の PDD を、1980 年に乳癌の皮膚転移巣に PDT の効果を確認し、1980 年に早期肺癌の PDT が施行された。1989 年から 1992 年に亘って早期の肺癌、胃癌、食道癌、子宮頸部癌、膀胱癌に対する Photofrin と excimer dye laser による PDT の Phase II 多施設共同臨床研究が行われ、その有効性と安全性が確認され、1994 年に厚生省によって、保険認可された^[12, 13]。Talaporfin は 2003 年に世界保健機関 (WHO)にて Talaporfin で登録が行われ、2004 年に東京医科大学の加藤治文等により初期肺癌で労働厚生省の認可を得て、臨床に用いられている。現在では第三世代の光感受性物質としてマンノース受容体をターゲットとしたマンノース結合クロリン (M-クロリン)や、グルコースを結合させ、ワールブルク効果による腫瘍選択性を持たせたグルコース共役クロリン (G-クロリン)^[14]、抗体と培養することで結合するフタロシアニン色素を用い、癌特異的な抗原をターゲットとし、免疫と光を利用した、光免疫療法といった治療方法が模索されている^[15]。

2.1.2 光線力学的診断

PDD とは、腫瘍組織と正常組織を判別する診断法である。腫瘍親和性を有する物質である。光感受性物質を生体に投与し、腫瘍組織に選択的に蓄積された後に、光感受性物質を蓄積した組織に励起光を照射すると、励起一重項状態になる。励起一重項状態から基底状態になる際に、熱と共に蛍光が発生する (図 2.1.3)。この蛍光を検出する事により癌診断する方法が PDD である。通常、術中に腫瘍組織と正常組織の境界を判別することは極めて困難ではあるが、PDD の蛍光を捉え、スペクトルの検出やイメージングをすることによって、境界を判別することが可能である。

2.1.3 光線力学的治療

PDTとは、生体内で腫瘍に蓄積されやすい腫瘍親和性の光感受性物質と光照射することによって引き起こされる光化学反応を利用し、癌細胞を選択的に破壊する治療方法である^[16]。光感受性物質が特定の波長の光を吸収すると、励起一重項状態に移行する。励起一重項状態は前述の熱と蛍光を発しながら基底状態に戻る性質と、項間交差によって励起三重項状態に遷移する性質がある。この励起三重項状態から直接腫瘍に作用し、ラジカルを生成し腫瘍を破壊する Type1 と励起三重項状態のエネルギーが酸素分子に移動することにより酸化力の非常に強い励起一重項酸素分子を生成し、その酸化作用によって腫瘍を破壊する Type2 の 2 種類の作用機序によって PDT は引き起こされる。PDT では主に Type2 により癌細胞を死滅させるとされている。PDT が施行された癌細胞はミトコンドリア内膜の損失、粗面小胞体の膨潤化の作用により壊死する。また、腫瘍血管を閉塞させることにより、癌細胞の酸素、栄養の供給を遮断する作用も発見されている。

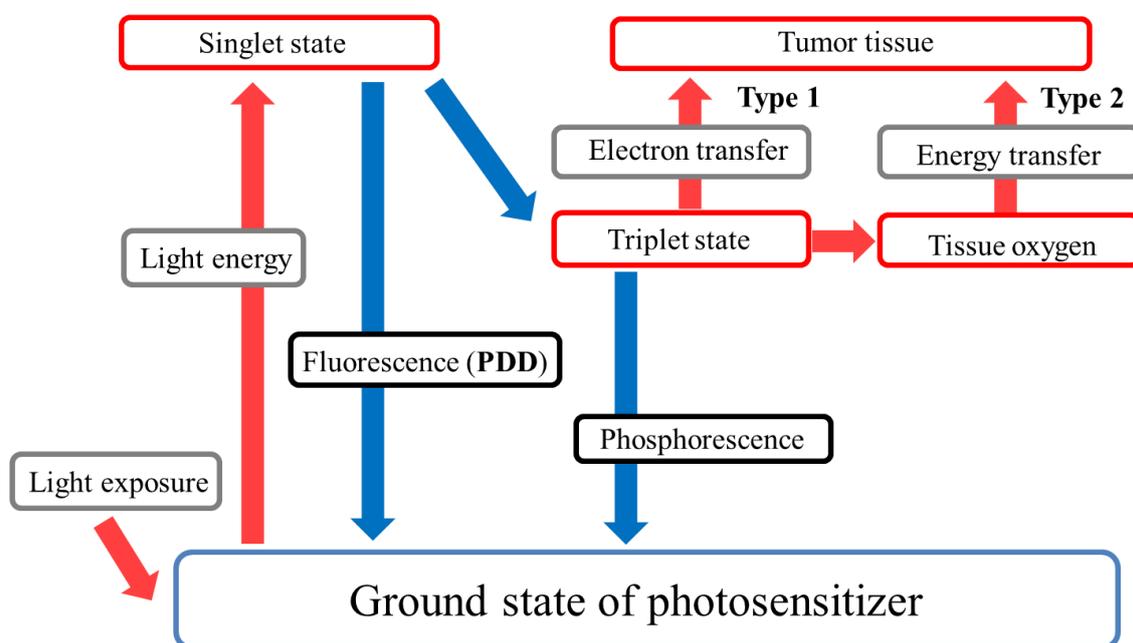


図 2.1 光線力学的診断・治療のメカニズム

2.1.4 光感受性物質 Talaporfin-sodium

光感受性物質とは腫瘍親和性を有する物質であり、本研究では蛍光強度が高く、治療効果も期待される第二世代の光感受性物質 Talaporfin-sodium に着目した (図 2.2)^[17]。Talaporfin は日本では早期肺癌、表在性食道癌、脳腫瘍といった様々な癌腫において保険適用が進められている。Talaporfin はクロリン環構造にアスパラギン酸がアミド結合した物質となっており、Soret 帯 (400nm) と Q 帯 (502,530,600,654nm) の各波長に吸収ピークを有する。腫瘍に取り込まれた Talaporfin は吸収帯が 10nm ピークシフトし、664nm となる。この吸収帯で励起すると波長 670nm の蛍光が発生する。Talaporfin の取り込みと排出に関するメカニズムについては過去にエンドサイトーシスによる取り込みが蛍光顕微鏡を用いた細胞内局在により示されているが、薬剤の取り込み・排出に関わる SLC・ABC トランスポーター等の分子メカニズムに関しては未だに不明である (図 2.3)。

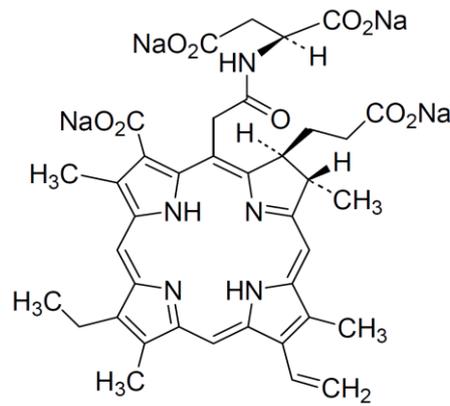


図 2.2 Talaporfin の構造式

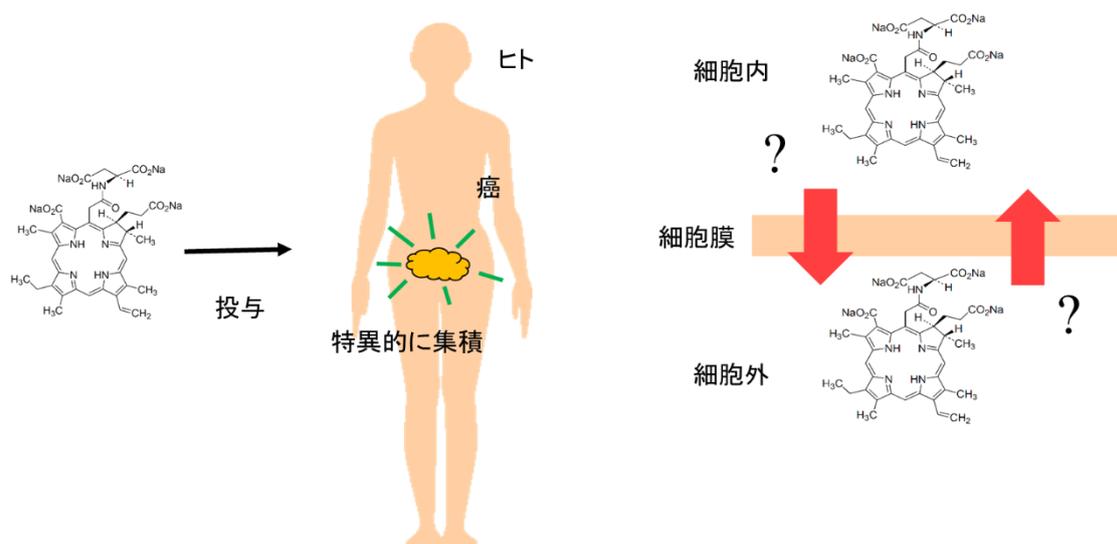


図 2.3 Talaporfin の代謝経路

2.2 薬物トランスポーター

生体内には必要な物質を体内・組織細胞内に取り込むためのトランスポーター、生体内からの異物の排除を担う、あるいは体内への侵入を防ぐトランスポーター等多数のトランスポーターが備わっている。薬物に関するトランスポーターは創薬や臨床的な観点からも有効性や安全性に大きく関わり、重要な要素と考えられる。直接的には体内における薬物の動態、濃度、薬効、毒性と密接に関わっている。したがって、ある薬物の体内動態を制御するトランスポーターを特定し、制御することができれば、その薬物の有効性や安全性、効果の向上につながられると考えられている^[18]。

2.2.1 SLC トランスポーター

SLC (solute carrier) トランスポーターは現在 47 の遺伝子ファミリー (SLC1~SLC47) と 362 種類の遺伝子からなる巨大な遺伝子スーパーファミリーである。1987 年に Hediger らが最初のトランスポーターを発見して以来、様々な物質を輸送するトランスポーターが同定され続け、現在でも増え続けている。SLC トランスポーターの定義は、何らかの溶質を輸送する膜貫通領域を持つ輸送体とされており、機能的な観点から分類が行われている。ファミリー内の遺伝子は約 20~25% のアミノ酸レベルの相同性はあるものの、ファミリー間で、遺伝子進化学的な関連性は認められず、輸送する基質の種類や輸送駆動力によってファミリーの分類が行われている。SLC トランスポーターが輸送する基質は非常に多岐にわたっており、イオン、糖、アミノ酸、核酸のような低分子のものから、ペプチド、胆汁酸、ビタミン、脂肪酸を含む、様々な薬物の輸送も担っている。

2.2.2 ABC トランスポーター

ABC (ATP Binding Cassette) は現在 A から G までの 7 つのサブファミリーと 48 あるいは 49 種類の ABC タンパク質遺伝子が存在している。ABC タンパク質は約 250 のアミノ酸によって構成されるアミノ酸配列からなる ATP 結合ドメインを 1 機能分子当たり 2 つ持つ膜タンパク質ファミリーであり、バクテリアから大腸菌、ヒトに至るまでほとんどの生物で、主に ATP 加水分解エネルギーに依存した能動的な輸送を担っている。ABC トランスポーターは糖、イオン、アミノ酸といった親水性のあるものから、脂質や脂溶性低分子化合物など疎水性の高いものまで多岐にわたって輸送を担っている。ABC タンパク質の異常は高脂血症、嚢胞性線維症、糖尿病、老人の失明、呼吸不全などの様々な疾患を引き起こすことでも知られている。また、癌治療においては、MDR1、MRP1、BCRP (ABCG2) 等が薬物の代謝に関わっているとされており、これらの薬物トランスポーターが抗癌剤治療における多剤耐性に関与しているため、抗癌剤治療の大きな障壁として存在している。また、光感受性物質の 5-ALA は ABCG2 や ABCC10、ABCB6 等の薬物トランスポーターが PDD 及び PDT の妨げになっていることが各所で報告されている。これらの研究から、今

後も薬物による治療や診断の観点からもABCタンパク質の機能の多様性や分子基盤の解明は重要な因子であると考えられる。

2.3 エンドサイトーシス

エンドサイトーシスは真核細胞の原形質膜から細胞質に様々な積み荷となる分子を輸送する 60~120nm の小さな膜小胞を生成するとされている。積み荷は細胞内への栄養素の取り込み、細胞シグナルの伝達、細胞発達の調整、細胞接着に至る様々な生理学的なプロセスに関与しているとされている。細胞におけるエンドサイトーシスは複数確認されており、クラスリンタンパク質を介するクラスリン依存性エンドサイトーシス、カベオリンタンパク質を媒介するカベオラエンドサイトーシス、細胞膜上のラフト構造に依存する脂質ラフトエンドサイトーシス等に分類される (図 2.4)。また、これらのエンドサイトーシスはピノサイトーシスに分類される。この他に、好中球、単球、マクロファージ等がウイルスや細菌等の異物排除を目的とした取り込みを持つファゴサイトーシスも存在する。

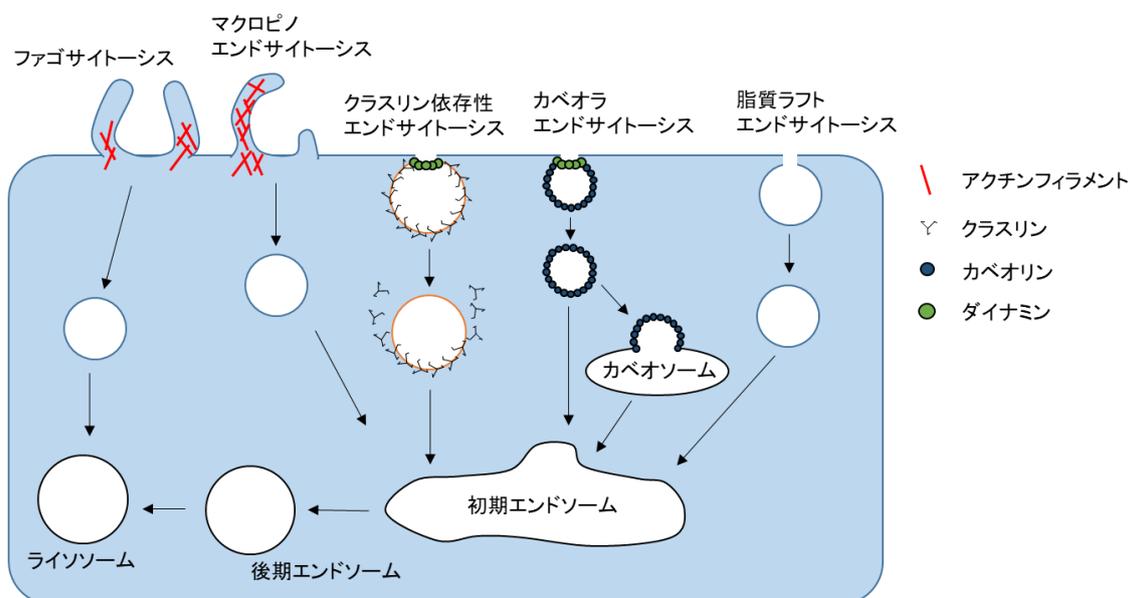


図 2.4 エンドサイトーシスの経路

2.3.1 クラスリンエンド依存性サイトーシス

クラスリンタンパク質を介したエンドサイトーシス機構はそのタンパク質の名前からクラスリン依存性エンドサイトーシスと命名されている^[19]。クラスリン依存性エンドサイトーシスの膜陥入は約 150nm となり、エンドサイトーシス小胞の直径は約 100nm の円形となっている。クラスリン依存性エンドサイトーシスは、アダプター分子に対する結合、膜の窪み、積み荷の集積、膜の皮膜化、切断、脱被膜の 5 つのステップを経て、積み荷を内包した膜小胞を細胞内部に送り込む (図 2.5)。クラスリンによる取り込みには 50 以上の細胞膜タンパク質が関与しているとされているが、それらのタンパク質がどのように関与しエンドサイトーシスを形成するかは未だに謎になっている。

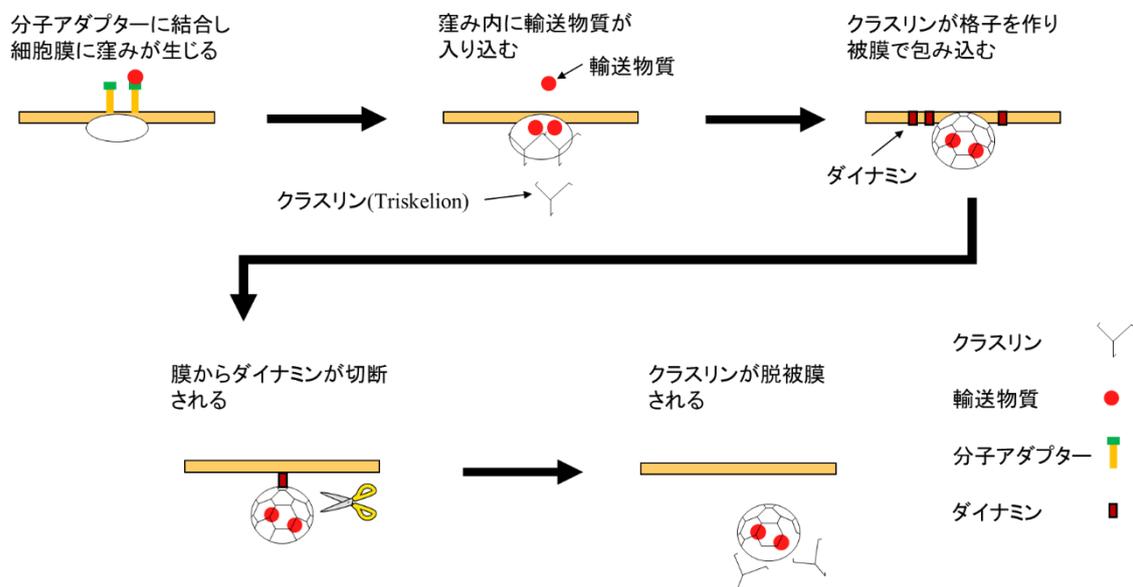


図 2.5 クラスリン依存性エンドサイトーシスの取り込みプロセス

2.3.2 カベオラエンドサイトーシス

カベオリン (CAV)タンパク質ファミリーを介したエンドサイトーシスの機構はそのタンパク質の名前からカベオラエンドサイトーシスと命名されている^[20]。カベオラエンドサイトーシスは 50~80nm のフラスコ状の膜陥入により積み荷を取り込む機構であり、スフィンゴ脂質とコレステロールに富んでいることが示されている(図 2.6)。カベオラエンドサイトーシスは SV40 やインフルエンザウィルスの侵入経路として研究が進められており、制御機構に Ras タンパク質が関与していることが報告されている。

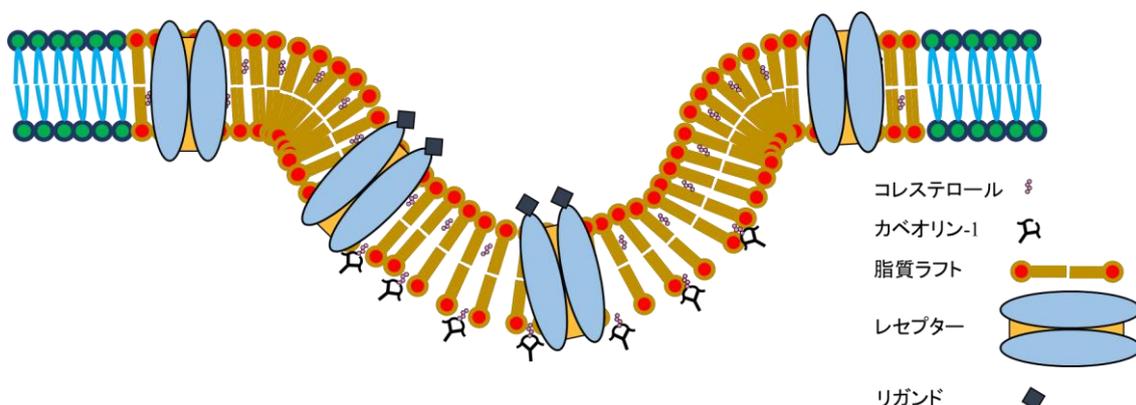


図 2.6 カベオラ・脂質ラフトエンドサイトーシスの構造

2.3.3 脂質ラフトエンドサイトーシス

脂質ラフトは、秩序液体 (Lo)状態に詰まったステロールとスフィンゴ脂質を含む細胞原形質膜の領域であると考えられている。脂質ラフトは不飽和アシル鎖を有し、無秩序に原形質膜に存在する無秩序液体 (Ld)と共存していると考えられている^[21, 22]。脂質ラフトは哺乳類細胞に存在し、細胞の生存率、分化、ウィルス・細菌感染、シグナル伝達経路、膜脂質及びタンパク質の選別等、多くの生物学的なプロセスに関与しているとされている。細胞におけるエンドサイトーシスや食作用、その他の分子の輸送プロセスは脂質ラフトの主成分であるコレステロール又はスフィンゴミエリンが除去されることで影響を受けることが知られており^[23]、エンドサイトーシス関係の減少は細胞膜の脂質またラフトドメインの形成によって調整されていることが示唆されている。

2.4 ワールブルク効果

ワールブルク効果とは 1930 年代、オットー・H・ワールブルグが発見した現象である。酸素の存在下ではほとんどの分化細胞はグルコースを代謝し、細胞質内でピルビン酸を生成し、ミトコンドリア内のクエン酸回路を用いてエネルギーを生成する (図 2.7)。この反応は酸素の存在下でのみ可能であり、全ての正常細胞で好気性解糖が観察される。増殖期の細胞は DNA、膜、タンパク質を生産するためにエネルギーと有機物が必要である。しかし、腫瘍細胞の場合は、酸素の存在下または非存在下でグルコースの細胞の取り込みと分解を増加させ、細胞に必要である大量のグリコシル化誘導体を生産できる。また、シグナル伝達経路の 1 つであるプロテインキナーゼ B (Akt)-ホスファチジルイノシトール-3-キナーゼ (PI3K) によって誘導されるグルコースのリン酸化により、腫瘍細胞の増殖や細胞内のグルコースの取り込みや消費に影響を与えるという報告がある[24]。

ワールブルク効果の応用として、フルオロ-2-デオキシグルコース-陽電子放出断層撮影 (FDG-PET) が挙げられる。これは癌細胞ではグルコースの代謝が多いことを利用したもので、F-FDG (フルオロ-2-デオキシグルコース) はグルコーストランスポーターから取り込まれ、グルコースと同様の振る舞いをするが、グルコースとは異なり、細胞内で利用できるエネルギー源とはならない。F-FDG はリン酸化により細胞外に放出されず、腫瘍細胞に蓄積され、PET カメラを使用し、そこから放出される放射線を検出する手法である。

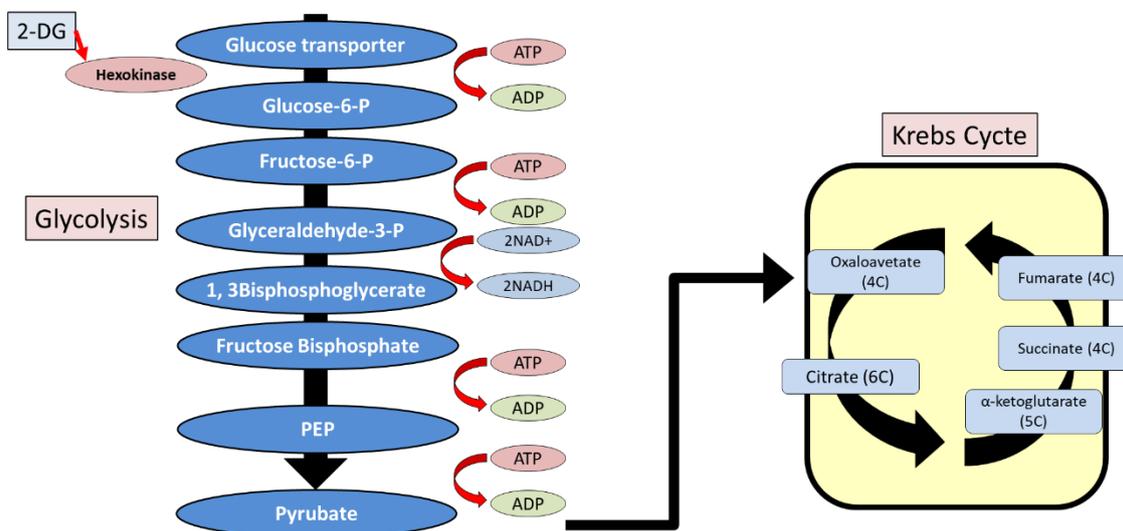


図 2.7 解糖系とクエン酸回路の代謝系

2.5 Ras 遺伝子

Ras は細胞質の核となるシグナル伝達経路を制御するタンパク質で、KRAS4A、KRAS4B、HRAS、NRAS のファミリーからなる^[25]。Ras ファミリータンパク質は低分子のグアニンヌクレオチド結合タンパク質の一種で、活性化の GTP 結合状態と、不活性化の GDP 結合状態を循環することでシグナルのオンとオフのスイッチとして機能している。Ras タンパク質は PI3K-Akt-mTOR 経路、RAF-MEK-ERK 経路、RALGDS-RAL 経路の 3 つの分子経路に対するシグナル伝達をすることにより、細胞の生存、増殖、分化等の機能を調整する重要な役割を持っている。また、Raf 等の KRAS は PI3K やエンドサイトーシス、細胞移動や骨格の変異等、複数のエフェクターが確認されている。

Ras タンパクの変異は様々な腫瘍細胞で確認され、Ras の活性化突然変異はヒト腫瘍の約 30%で確認されている。Ras の変異が起こると、GTP 結合による活性化状態が解除されず、常に活性化シグナルが伝達される。K-Ras の変異は、前述のワールブルグ効果と密接に関わっているという報告がある^[26]。K-Ras の変異はワールブルグ効果の増強に寄与しているとされ、グルコースの取り込みやクエン酸回路に使用されるグルタミンの取り込みの増強などが報告されている^[26, 27]。

3.1 細胞株

本研究で使用した細胞株は表 3.1 に示す。すべての細胞株の培地は 10%ウシ血清アルブミン(FBS) と 1%ペニシリン・ストレプトマイシンを加えたものを使用し、インキュベーター内で 37°C 5% CO₂濃度で培養をした。肉腫細胞株 OS2000、OS13、MFH03 は札幌医大第一病理学講座から提供されたものを使用した。他の細胞株は、American Type Culture Collection(ATCC)、JCRB 細胞バンク、理研 BRC から購入した。

細胞株	組織	培地
MFH03	肉腫	IMDM
U2OS	骨肉腫	DMEM
OS2000	骨肉腫	IMDM
OS13	骨肉腫	IMDM
SBC3	肺	DMEM
SBC5	肺	DMEM
A549	肺	DMEM
HT-29	大腸	DMEM
CRC21	大腸	DMEM
SW480 bulk	大腸	DMEM
SW480 MP	大腸	DMEM
SW480 SP	大腸	DMEM
MKN45	胃	RPMI1640
MIA-PaCa-2	すい臓	DMEM
Panc-1	すい臓	DMEM
ACHN	腎臓	RPMI1640
caki-1	腎層	RPMI1640
293T	胎児の腎臓	DMEM
UM-UC-3	膀胱	DMEM
MD901	びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫	RPMI1640
WILL2	びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫	RPMI1640
SUP T-1	T リンパ芽球	RPMI1640
KHM2B	成人 B 急性リンパ芽球性白血病	RPMI1640
HFL-III	正常線維芽細胞肺	HamF12
HDFa	表皮角化細胞	DMEM
PBMC	末梢血単核細胞	AIM-V

表 3.1 使用した細胞株

3.1.1 継代培養方法

以下に細胞の継代培養の手順を示す。

- ① 細胞が T75 フラスコ内で 70~80%になっていることを確認した。
- ② T75 フラスコ内の培地を吸引し、1×PBS 3ml で細胞を洗浄した。洗浄後 T75 フラスコ内の 1×PBS を吸引した。
- ③ Trypsin/EDTA 溶液 1mL を細胞に添加し、1~10 分インキュベートした。
- ④ 新しい培地 3mL を加えて T75 フラスコ内から剥がれきれていない細胞を全て剥し、遠沈管に移し、遠心分離 (4℃・1500rpm・3 分間)をした。
- ⑤ 遠心分離後、細胞が遠沈管の底に堆積されていることを確認した後、新しい培地を加えて懸濁した。
- ⑥ 作成した細胞懸濁液からオートセルカウンターを用いて細胞数を求めた。

3.1.1 PBMC の抽出方法

- ① 50ml シリンジでヘパリンを 19G の注射針を用いて少量吸い、シリンジ内をリンスした。
- ② 21G の翼状針に変え、ヘルシードナーから規定量の血液を抜き、使用するまで攪拌機で攪拌した。
- ③ フィルター付きの遠沈管に 2 本にリンフォプレップ 15ml を加え、軽く遠心(1500rpm、10 秒)した。
- ④ 2 本のフィルター付き遠沈管に採取した血液を等量になるように加え、遠心分離 (1000G、30 分)を行った。
- ⑤ 上澄みから余計な成分を除去し、PBMC 領域からディスプレイサブルのピペットを用いて PBMC を採取し、遠沈管に加え、50ml になるまで 1×PBS を加えて遠心分離 (1500rpm、5 分)をした。
- ⑥ 遠心後、上澄みを除去し、Lysing buffer を 2ml 加え、10 分間静置し、赤血球を溶結し、遠心分離(1500rpm、5 分)した。
- ⑦ 遠心後、上澄みを除去し、1×PBS を 10ml 加え、遠心分離(1500rpm、5 分)した。この工程は 2-3 回繰り返した。
- ⑧ 洗浄した PBMC を AIM-V (10% FBS)培地に加え、実験までインキュベーター内で維持した。

3.2 細胞の Talaporfin の取り込み量の同定

- ① 1×PBS で細胞を洗浄し、Talaporfin を最終濃度 30 μ g/ml になるように細胞ごとの規定の無血清培地に添加し、細胞に加えた。
- ② 1~4 時間後にそれぞれの細胞をフラスコから Trypsin/EDTA 溶液で剥がし、細胞懸濁液をエッペンチューブに加え、遠心分離 (4°C・1500rpm・3 分間)した。
- ③ 遠心分離後、1×PBS 1ml を加え、再度遠心分離する。この工程は 3 回行った。
- ④ 細胞を洗浄後、0.5%ホルマリン溶液で細胞を固定し、フローサイトメトリー解析を行った。

3.3 細胞の Talaporfin の排出量の同定

- ① 1×PBS で細胞を洗浄し、Talaporfin を最終濃度 30 μ g/ml になるように細胞ごとの規定の無血清培地に添加し、細胞に加えた。
- ② 1 時間後、1×PBS で細胞を洗浄し、新鮮な無血清培地を 10ml 加え、1~24 時間培養した。
- ③ 培養後、それぞれの細胞をフラスコから Trypsin/EDTA 溶液で剥がし、細胞懸濁液をエッペンチューブに加え、遠心分離 (4°C・1500rpm・3 分間)した。
- ④ 遠心分離後、1×PBS 1ml を加え、再度遠心分離する。この工程は 3 回行った。
- ⑤ 細胞を洗浄後、0.5%ホルマリン溶液で細胞を固定し、フローサイトメトリー解析を行った。

3.4 ABC-トランスポーターの同定

3.4.1 RNA の抽出方法

- ① 目的の細胞を 1×10⁶cells 以上用意した。
- ② 用意した細胞を通常の継代方法で Trypsin 処理まで行い、ファルコンチューブでペレット状にして保持した。
- ③ ファルコンチューブ内に TRIzol を 1ml 加え、軽く攪拌し、RNA 抽出用エッペンチューブに移した。
- ④ 集めた細胞を 1ml の注射器に 21G 以下の細さの針で 3 回通す。200 μ l のクロロホルムを加えてよくかき混ぜた。かき混ぜた後、遠心分離(12000rpm 30min 4°C)した。その間に新たにエッペンチューブを用意した。
- ⑤ 遠心分離後、上清のみを回収し、新しく用意したエッペンチューブに移した。
- ⑥ 回収した上清と等量の 2-プロパノール(薬品庫)を混和し、グライコブルーを 1 μ l 加えて染色する。その後、遠心分離(15000rpm 30min 4°C)した。

- ⑦ 遠心後、沈殿したペレットを残して全てピペットで上清を除去した。
- ⑧ 70%エタノール 1ml を加え、その後、エタノールを除去した。
- ⑨ 埃が入らないようにカバーを被せ、37°Cの恒温器に入れ、乾かす。
- ⑩ 乾いたペレットに RNase free water(30~50 μ l)を加えた。
- ⑪ 50°C 5 分間で再度温め、ピペッティングし攪拌し、NanoDrop にて濃度測定をした。

3.4.2 cDNA の合成方法

- ① Total RNA の量を 0.1ng~5 μ g に調整した。
- ② 1 サンプル当たりの各試薬の含有量は以下のとおりとする。

● 5X Reaction Buffer	4 μ l
● 10mM dNTP Mix	2 μ l
● Random Hexamer Primer	1 μ l
● RiboLock RNase Inhibitor	1 μ l
● RevertAid RT	1 μ l
	Total 9 μ l
- ③ 計算した total RNA 量に RNase free water を加えて合計で 11 μ l になるようにした。
- ④ RNA 液 11 μ l+試薬 Mix 9 μ l=20 μ l をよく混和した。
- ⑤ 前もってサーマルサイクラーの電源を入れ、103°Cになるまで待つ。サーマルサイクラー(PCR の機械)を以下のように設定した。
 - 25°C 5 分
 - 42°C 60 分
 - 70°C 5 分
 - 4°C 保存(∞)
- ⑥ 完成した cDNA は-20°Cで冷凍保存した。

3.4.3 PCR と電気泳動法

- ① Taq を除く試薬は 37°Cの恒温器で温めて使用した。

● Taq	0.1 μ
● 5×Q	4 μ l
● 10×B	2 μ l
● 2mMdNTPs	2 μ l
● MgCl ₂	1 μ l
● H ₂ O	7.5 μ l
● Template(cDNA)	1 μ l
● Primer Forward	1.2 μ l

● Primer Reverse 1.2 μ l

これらの試薬は 1Primer 当たりの量とした。

加えたものをサーマルサイクラーに入れ、以下の条件でスタートさせた。

1. 94°C 2min
2. 94°C 15sec
3. 58°C 30sec
4. 72°C 30sec
5. 72°C 2min
6. 4°C ∞

2~4 は増幅によるサイクル部分で 30~35 サイクル程度。

- ② 次にゲルの作成をした。ゲルは三角フラスコに 1×TAE 100ml とアガロース 2g を加えたものにサララップを軽く掛け、電子レンジで 2 分間温めて溶解させた。
- ③ 電子レンジから取り出し、水でよく冷やし、エチジウムブロマイド 100 μ l を加えて混ぜた。
- ④ 混ぜた後、ゲルの型に流し込み、サララップを上部にかけて埃が入らないようにし、固まるまで待った。
- ⑤ ゲルが固まったら、100bps DNA Ladder、10×Loading buffer、cDNA を用意した。
- ⑥ 完成したゲルを電気泳動の装置に入れた。
- ⑦ 100bps DNA Ladder をゲルの一番端の穴に入れた。
- ⑧ 10×Loading buffer を 1 μ l と cDNA 9 μ l を Parafilm 上で 10 倍希釈し、それぞれゲルの穴に入れた。
- ⑨ Dolphin – view (クラボウ、大阪、日本)を使い撮影を行った。

3.5 Talaporfin の細胞内局在の撮像

- ① 実験の 24 時間前に 1×10^5 cells/ml になるように細胞を 6-well-ガラスシャーレディッシュに完全培地で培養した。
- ② 24 時間後、CellLight™ Early Endosomes-GFP, BacMam 2.0 (Thermo Fisher Scientific, ウォルサム, MA) もしくは CellLight™ Lysosomes-GFP, BacMam 2.0 (Thermo Fisher Scientific, ウォルサム, MA) を細胞当たりのウイルス数 (CCP) 10~50 になるように培地に添加した。
- ③ 1 晩後、培地を取り除き、 $1 \times$ PBS で 1 回洗浄し、最終濃度 30, 60, 100μ g/ml になるように完全培地に添加し、細胞に加えて培養した。
- ④ 20 分おきに細胞を $1 \times$ PBS で 1 回洗浄し、5% ホルマリンで 10 分間固定した後、 $1 \times$ PBS で 3 回洗浄し、共焦点レーザー顕微鏡 ELYRAS.1LSM780 (Karl Zeiss, Oberkochen, Germany) で観察した。

3.6 Talaporfin のエンドサイトーシス経路の同定

- ① MFH03 であらかじめ細胞懸濁液を作成した。
- ② エッペンチューブにそれぞれ 1×10^6 cells/ml になるように細胞懸濁液を入れた。
- ③ エッペンチューブを遠心分離 ($4^\circ\text{C} \cdot 1500\text{rpm} \cdot 3$ 分間) し、培地をすべて除去し、阻害剤を加えた無血清培地にそれぞれ 2-デオキシ-D-グルコース (2-DG, 50mM) およびアジ化ナトリウム (0.1% w/v)、メチル- β -シクロデキストリン (5mM)、ゲニステイン (0.1 mM)、スクロース (0.45M)、塩酸クロロプロマジン (20mM)、サイトカラシン B (1 mM)、およびコルヒチン (1mM)、Pitstop 2 (25 μ M) を添加し、 37°C で 30 分間プレ培養した。試薬はそれぞれ Sigma-Aldrich (St Louis, MO)、Wako (大阪、日本)、アブカム (ケンブリッジ、UK) および Kanto Chemical (東京、日本) から購入した。これらに加えて、能動輸送の阻害として氷上で 30 分プレ培養した。
- ④ 30 分後、それぞれのエッペンチューブに Talaporfin を最終濃度 30μ g/ml になるように添加し、 37°C で 1 時間培養した。
- ⑤ 1 時間後、それぞれのエッペンチューブを遠心分離 ($4^\circ\text{C} \cdot 1500\text{rpm} \cdot 3$ 分間) し、上澄みを除去し、 $1 \times$ PBS で洗浄した。この工程は 3 回行った。
- ⑥ 0.5% ホルマリンで細胞を固定し、フローサイトメトリー解析を行った。

3.7 Talaporfin の消失経路の同定

- ① MFH03 を T75 フラスコで 70~80%コンフルエンスの状態を用意した。
- ② T75 フラスコから MFH03 を剥がし、6-well-プレートに 5.0×10^6 cells/well になるように播種した。
- ③ 6-well-プレートで培養した MFH03 にそれぞれ無血清培地条件下 (Talaporfin の最終濃度 $30 \mu\text{g/ml}$ で 1 時間培養) と完全培地条件下 (Talaporfin の最終濃度 $100 \mu\text{g/ml}$ で 24 時間培養) で Talaporfin を添加し、培養を行った。
- ④ それぞれの条件下で培養後、培地を取り除き、 $1 \times \text{PBS}$ で 1 回洗浄し、無血清培地と完全培地をそれぞれ 2ml 添加し、48 時間培養した。
- ⑤ 培養後、細胞を剥がし、96-well-プレートにそれぞれ移し、 $1 \times \text{PBS}$ で洗浄した。この工程は 3 回行った。
- ⑥ 洗浄後、0.5% ホルマリンで細胞を固定し、フローサイトメトリー解析を行った。

3.8 細胞内の ATP の解析

- ① それぞれの細胞株及び正常細胞を T75 フラスコで 70~80%コンフルエンスの状態を用意した。
- ② T75 フラスコから細胞を剥がし、96-well-プレートに 1×10^5 cells / well になるように播種し、そこから倍希釈で 5.0×10^4 、 2.5×10^4 cells / well を用意した。それぞれの細胞に完全培地もしくは 2-DG (50nM) + NaN₃ (0.1% w/v) を添加した培地 $100 \mu\text{l}$ を加え、30 分培養した。
- ③ 培養後、1well 当たりに $100 \mu\text{l}$ の「細胞の」ATP 測定試薬もしくは Intracellular ATP 測定キット ver.2 (東洋ビーネット、東京、日本) を添加した。
- ④ マルチ検出モードプレートリーダー インフィニット M1000 Pro (Tecan、チューリッヒ、スイス) をあらかじめ 23°C に調整し使用した。測定時の条件は「細胞の」ATP 測定試薬もしくは Intracellular ATP 測定キット ver.2 のプロトコールに従い、60 秒間攪拌した後、10 分間静置し、発光を測定した。

3.9 Ras タンパクの阻害による Talaporfin の取り込みの解析

- ① それぞれの細胞株及び正常細胞を T75 フラスコで 70~80%コンフルエンスの状態を用意した。
- ② T75 フラスコから細胞を剥がし、12-well-プレートに 2.0×10^5 cells / well になるように播種し、24 時間培養した。
- ③ 培養後、完全培地を除去し、それぞれの濃度で調整した Ras のシグナル伝達経路の PI3K 阻害剤(Wortmannin 及び ZSTK474)と MAPK 阻害剤(Soratinib 及び Trametinib) を添加した完全培地を加え、1 時間培養した。
- ④ 培養後、阻害剤入りの培地を除去し、1×PBS で 1 回洗浄した後、Talaporfin($30 \mu\text{g/ml}$) 入りの無血清培地を添加し、1 時間培養した。
- ⑤ 培養後、培地を除去し、Trypsin / EDTA を加え、細胞を剥がし、96-well-プレートに移し、遠心分離($4^\circ\text{C} \cdot 1500\text{rpm} \cdot 3$ 分間)した。
- ⑥ 遠心分離後、細胞に 1×PBS で 2 回洗浄した後に、0.5%ホルマリンを加え、フローサイトメトリー解析を行った。

3.10 Talaporfin-sodium

本研究では光感受性物質 Talaporfin-sodium (明治製菓、東京、日本)を用いた。Talaporfin は 1×PBS で希釈し、その後遮光し、 4°C の冷蔵庫で保存した。

3.11 統計

スチューデントの t 検定を使用して、2 つのグループの比較を行った。値 $P < 0.05$ は有意差とした。

4.1 細胞の Talaporfin の取り込み量の同定

フローサイトメトリー解析により、Talaporfin の細胞ごとの取り込み量を解析した(表 4.1 及び図 4.1)。解析した結果、PBMC を除く、全ての細胞株で Talaporfin は細胞内に取り込まれるという結果が得られた。

また、取り込みの経時ごとに Talaporfin は細胞に多く取り込まれていったが、取り込みは時間と比例関係になく、徐々に取り込みの割合は減少することが示された。

細胞株	MFI (%)			
	1 時間	2 時間	3 時間	4 時間
UMUC3	18706	27242	32729	37574
MFH03	15170	20979	27882	33880
U2OS	12705	18359	25238	26668
HT29	10078	16309	22837	25461
CRC21	8913	14151	19544	24876
293T	11735	17206	20510	24321
MKN45	9700	15472	19715	23681
SW480 MP	8666	13797	18772	22806
ACHN	7026	11868	15431	19524
HFL-III	9576	13233	16988	18230
caki-1	6588	10697	14553	17726
OS2000	10049	12642	13054	13737
OS13	5309	8454	11339	13829
SW480 SP	4582	7450	10227	12596
SW480 bulk	4160	6721	8957	11718
KHM2B	3641	5855	8695	11664
MD901	5689	8042	10010	11613
WILL2	3015	5804	8689	10400
SUP T-1	5015	6956	8878	10120
HDFa	2448	3464	4764	5910
PBMC	44	58	74	85

表 4.1 細胞種ごとの取り込み時間別の Talaporfin の取り込み量

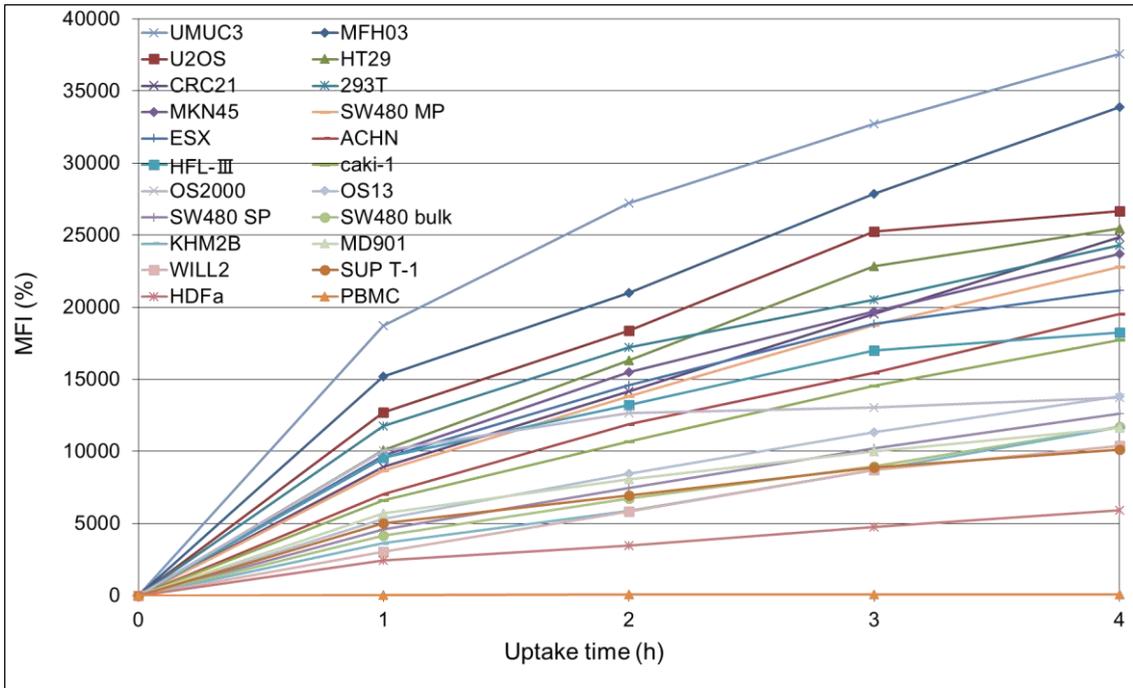


図 4.1 細胞ごとの Talaporfin の時間別の取り込み量

4.2 細胞の Talaporfin の排出量の同定

細胞ごとの Talaporfin の排出量をフローサイトメトリー解析で測定した(表 4.2 及び図 4.2)。解析した結果、全ての細胞株で Talaporfin の蛍光の減少が確認された。

また、CRC21、caki-1、HT29、MKN45 の細胞株では排出 24 時間時点の蛍光強度の減少は 70~45%程度の緩やかであり、MD901、OS13、WILL2、293T は排出 24 時間時点で 20~9%程度の大幅な蛍光強度の減少が確認された。また、これらの細胞株の組織由来の共通点は見られなかった。

細胞株	MFI (%)				
	1 時間	2 時間	3 時間	4 時間	24 時間
CRC21	78.54	85.83	82.25	83.36	71.77
caki-1	50.90	48.02	55.60	58.17	61.07
HT29	65.40	62.47	68.06	74.60	50.64
NKN45	77.48	56.70	58.90	52.11	45.44
HFL-3	56.26	58.74	58.74	58.74	33.44
UMUC3	63.37	64.93	56.78	52.33	33.15
OS2000	46.85	43.12	41.21	37.77	30.17
U2OS	46.23	47.98	54.50	52.30	28.82
SW480 SP	85.62	96.05	88.56	81.79	25.52
SW480 MP	70.81	74.91	61.99	59.21	24.43
SUP-T1	56.34	37.80	43.48	42.83	23.46
SW480 bulk	80.84	84.38	77.28	73.99	20.97
HDFa	74.17	72.92	85.59	79.05	19.98
ACHN	52.50	53.36	40.44	33.37	19.71
MFH03	74.50	80.19	74.43	66.85	18.97
293T	80.07	67.77	81.70	60.19	17.23
WILL2	55.74	53.22	53.64	37.11	11.62
OS13	45.09	45.96	39.35	37.52	10.02
MD901	64.23	60.86	53.93	45.84	8.89

表 4.2 細胞ごとの排出時間別の Talaporfin の排出量

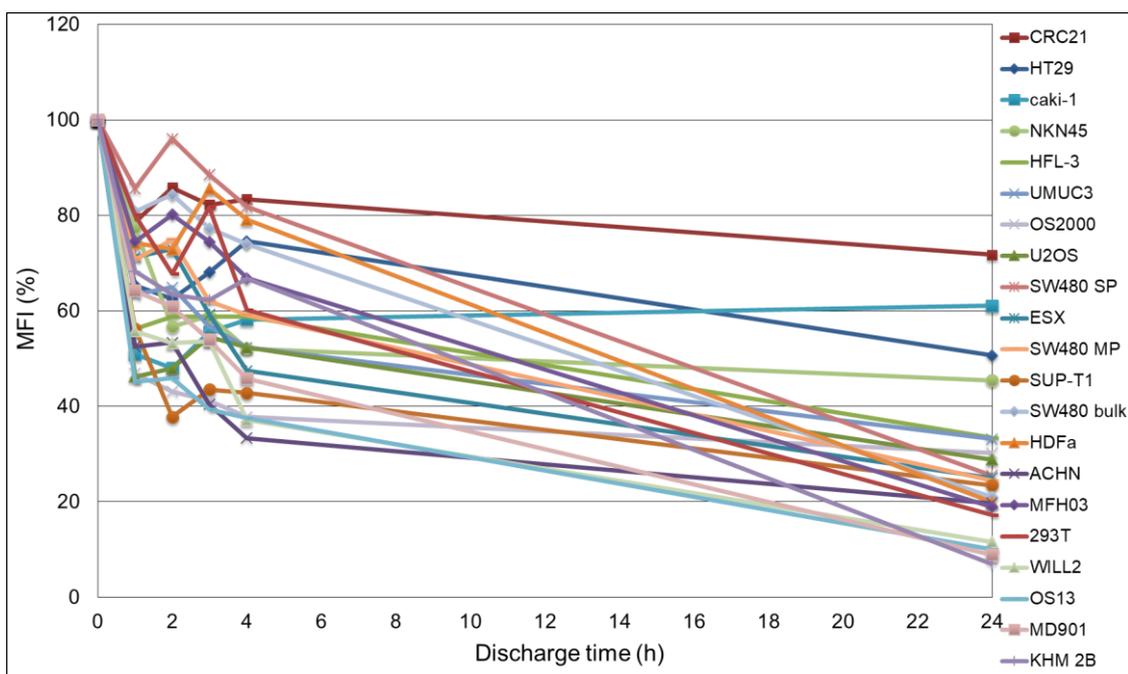


図 4.2 細胞ごとの Talaporfin の時間別の排出量

4.3 Talaporfin の取り込みに関わる ABC トランスポーターの同定

Talaporfin の取り込みに関わる可能性のある ABC トランスポーター48 種類を RT-PCR 法で増幅させた後、電気泳動法を用いて解析を行った。解析の条件として、表 4.2 及び図 4.2 の結果を元に、全ての細胞株で発現が確認され、CRC21 で最も発現が強く、293T で発現が弱い遺伝子を模索したが、その条件に当てはまる遺伝子を同定することができなかった(図 4.3)。

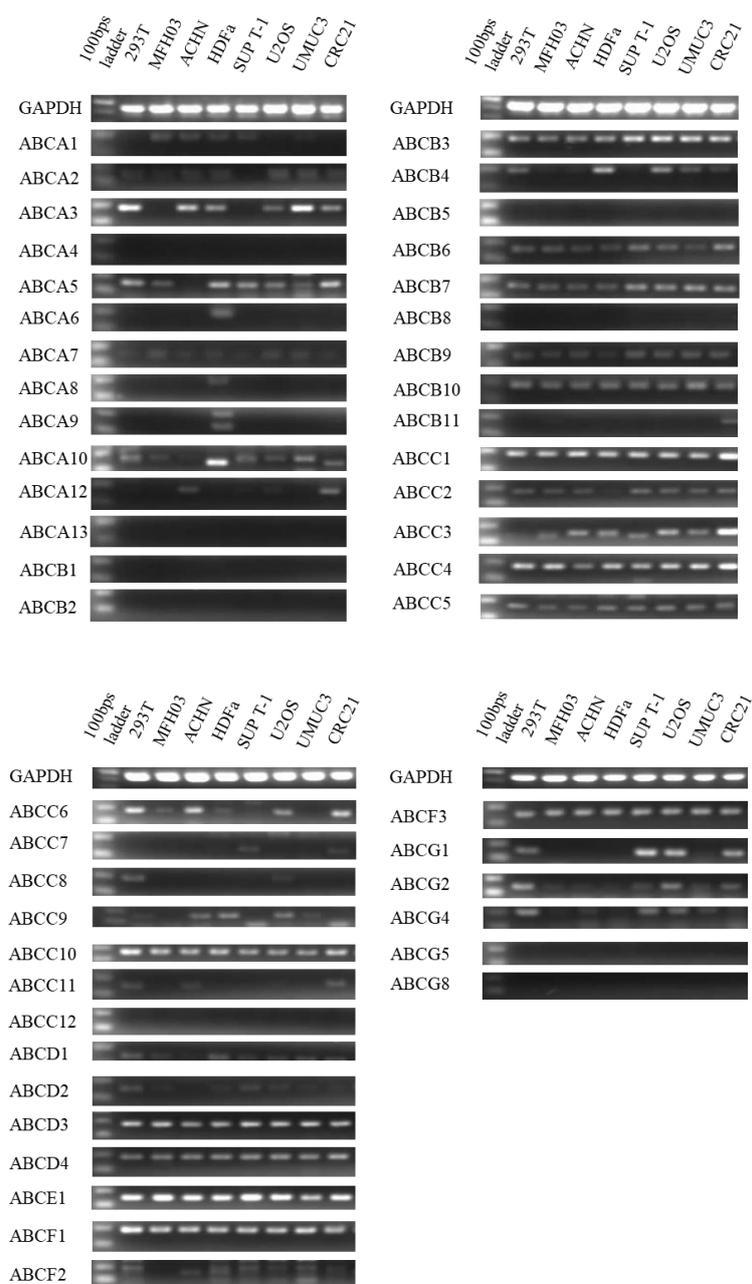


図 4.3 電気泳動法による ABC トランスポーターの解析

4.4 Talaporfin の細胞内局在のイメージング

Talaporfin の細胞内の局在を調べるために EEA1 もしくは LAMP1 (リソソーム)、MitotrackerOrange (ミトコンドリア)、Talaporfin のそれぞれの染色マーカーを用いて、Talaporfin の細胞内の局在をイメージングした。

4.4.1 ヒト肉腫細胞株

ヒト肉腫細胞株 MFH03、OS13、OS2000 に EEA1 と LAMP1-GFP を導入し、その後 Talaporfin で染色を行い、蛍光顕微鏡で観察した。Talaporfin は時間経過により、徐々に細胞に取り込まれ、取り込み開始から 120 分で全ての肉腫細胞株で Talaporfin の蛍光強度が最大となった。また、細胞内で GFP が発現している細胞内局在と Talaporfin の細胞内の蓄積位置がそれぞれ一致していることが示された。しかし、Talaporfin とコントロールであるミトコンドリアの蛍光は一致せず、Talaporfin はミトコンドリア内には集積されないことが明らかとなった (図 4.4-図 4.12)。

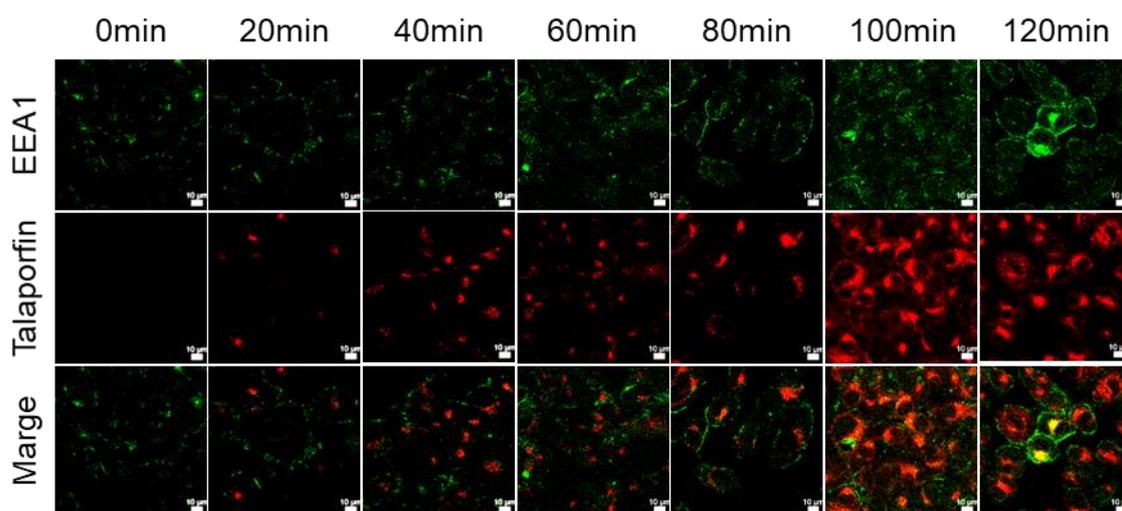


図 4.4 MFH03 の初期エンドソーム抗原 EEA1 と Talaporfin の経時ごとの取り込み量の変化

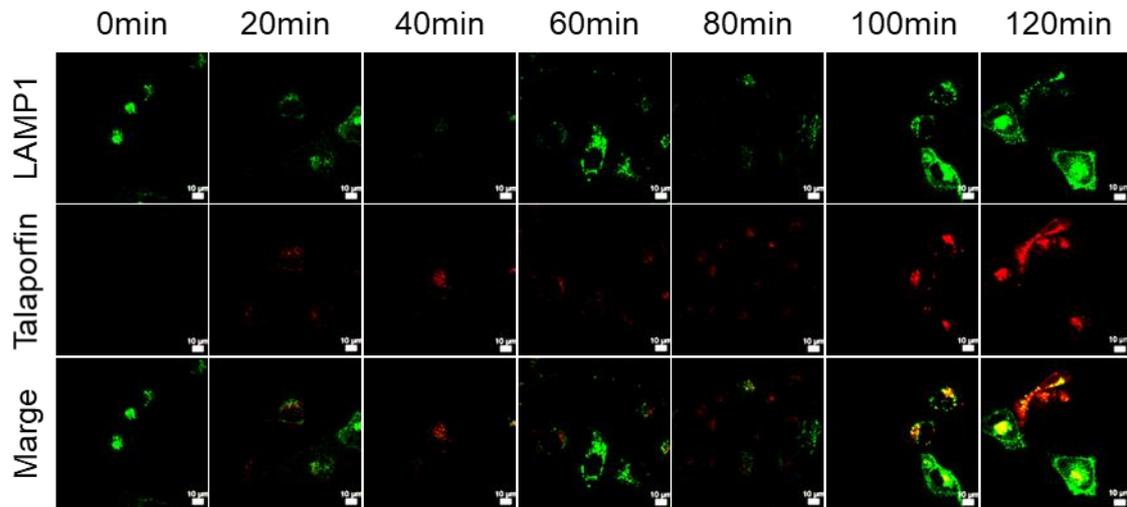


図 4.5 MFH03 のエンドソーム抗原 LAMP1 と Talaporfin の経時ごとの取り込み量の変化

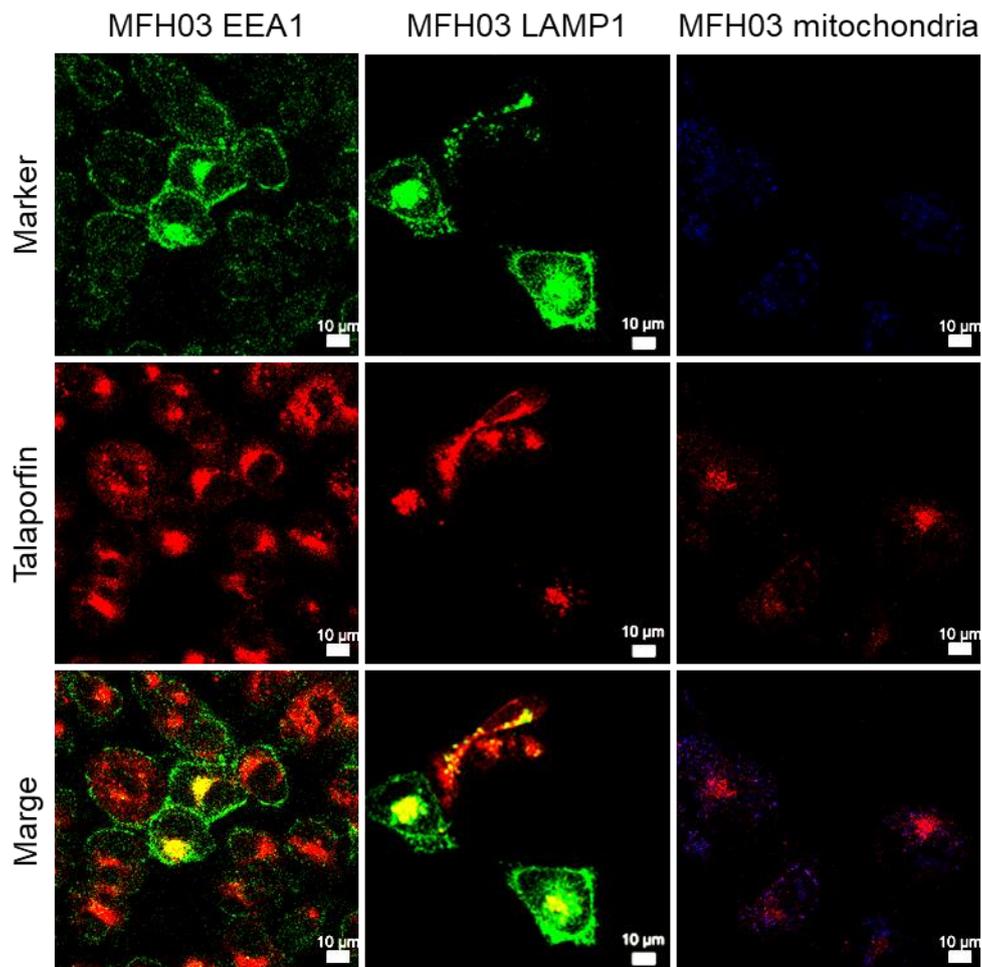


図 4.6 MFH03 の Talaporfin とライソソームの細胞内局在

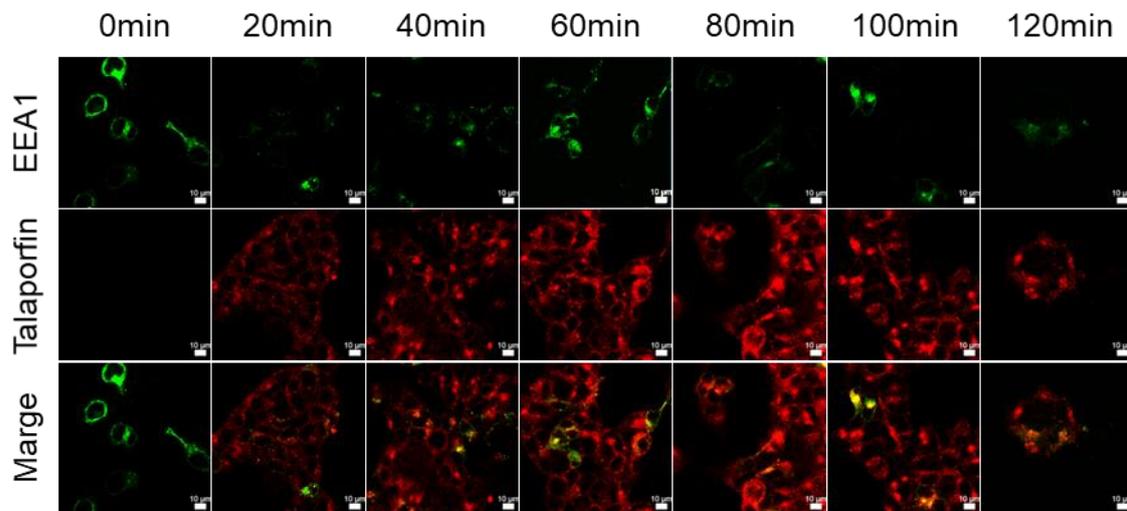


図 4.7 OS13 の初期エンドソーム抗原 EEA1 と Talaporfin の経時ごとの取り込み量の変化

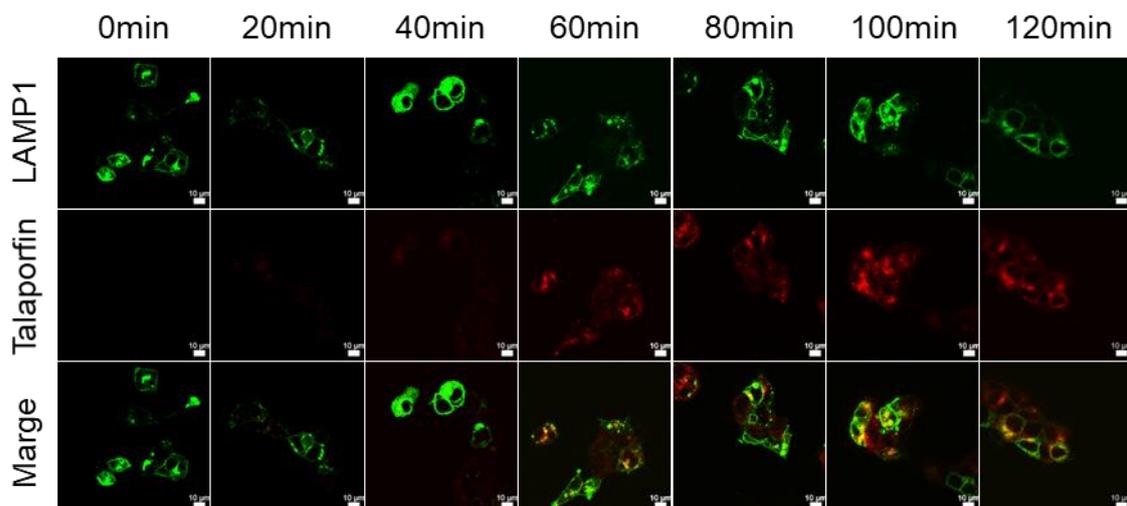


図 4.8 OS13 のエンドソーム抗原 LAMP1 と Talaporfin の経時ごとの取り込み量の変化

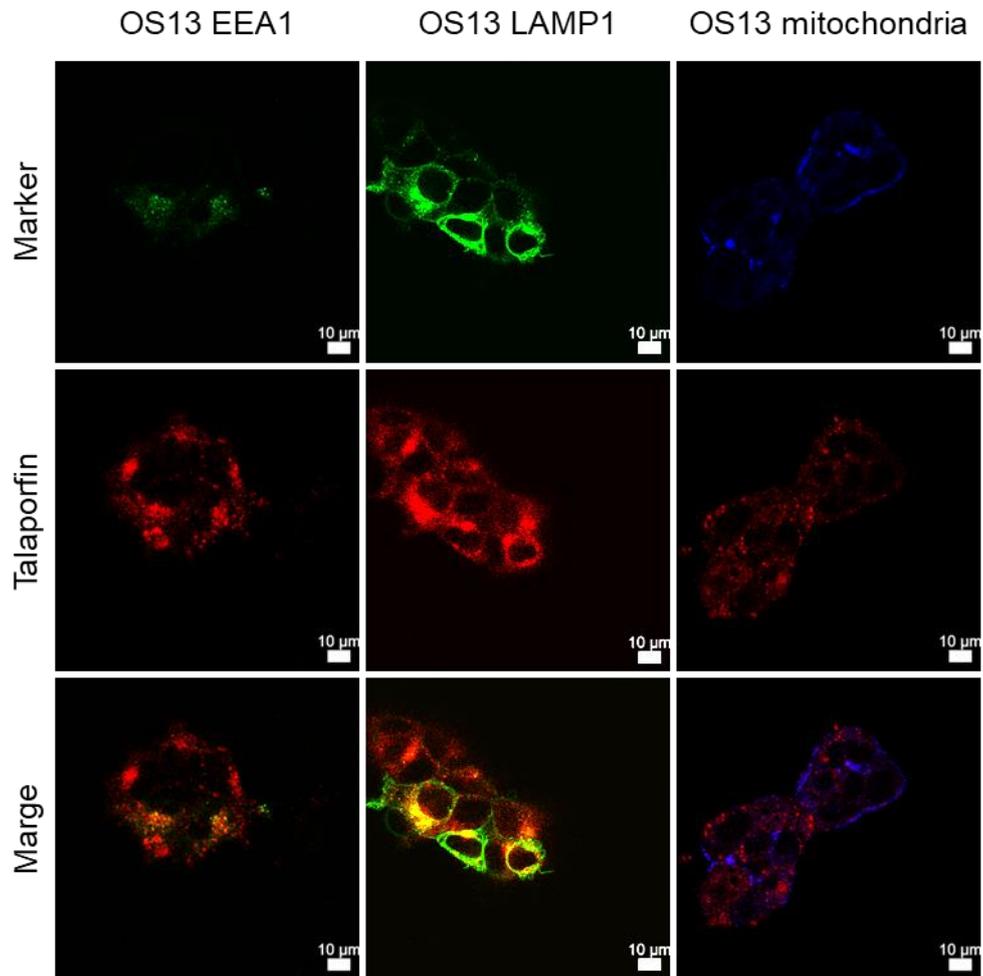


図 4.9 OS13 の Talaporfin とライソソームの細胞内局在

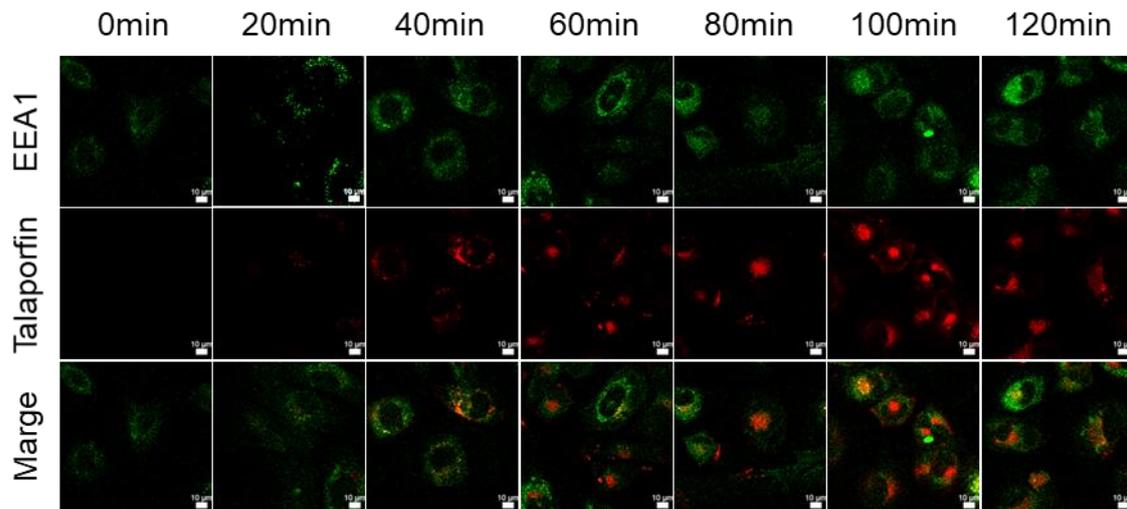


図 4.10 OS2000 の初期エンドソーム抗原 EEA1 と Talaporfin の経時ごとの取り込み量の変化

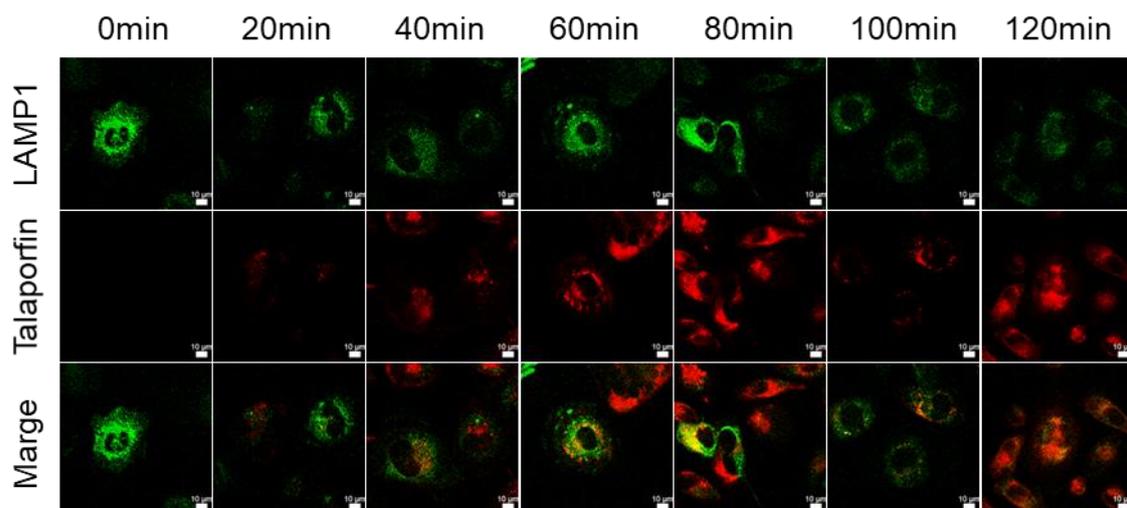


図 4.11 OS2000 のエンドソーム抗原 LAMP1 と Talaporfin の経時ごとの取り込み量の変化

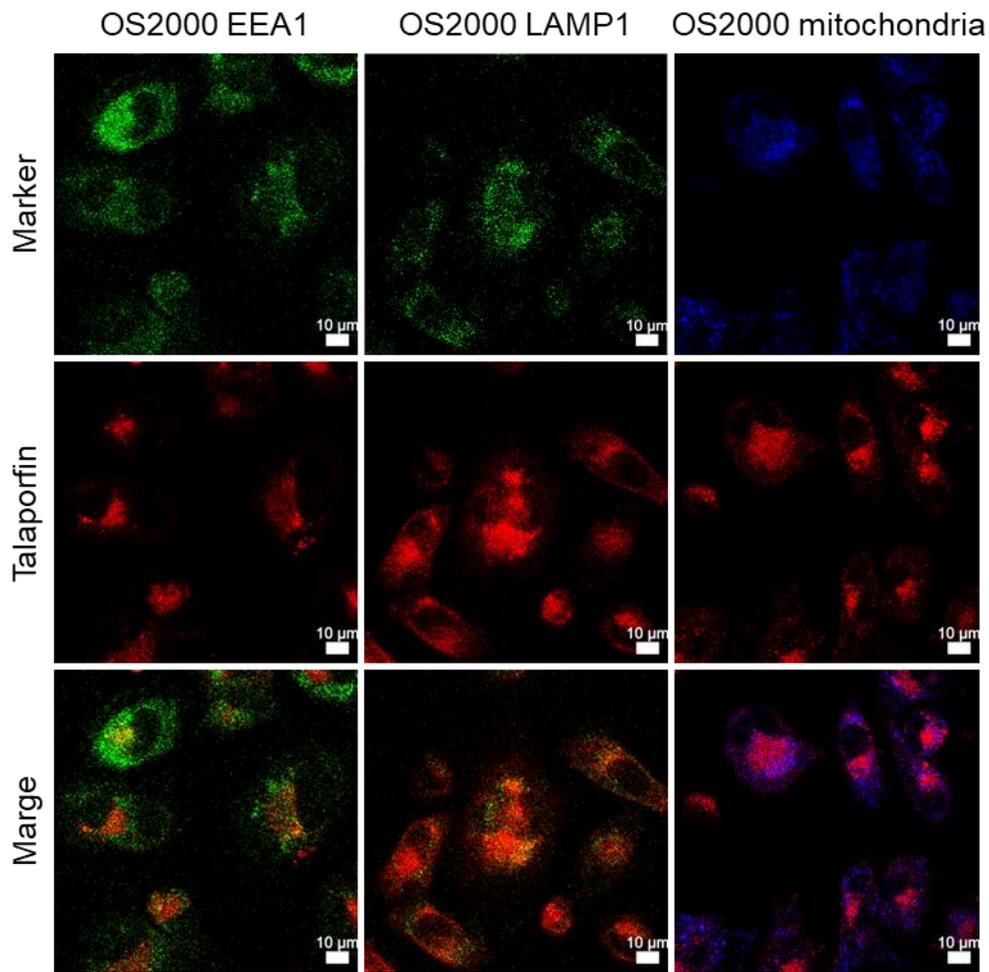


図 4.12 OS2000 の Talaporfin とライソソームの細胞内局在

4.4.2 ヒト肺癌細胞株

ヒト肺癌細胞株 SBC3、SBC5、A549 に肉腫細胞株と同様に EEA1 と LAMP1-GFP を導入し、その後 Talaporfin で染色を行い、蛍光顕微鏡で観察した。全ての肺癌細胞株で肉腫細胞株と同様に 120 分の時に Talaporfin の蛍光強度が最大となった。また、細胞内で GFP が発現している細胞内局在と Talaporfin の細胞内の蓄積位置がそれぞれ一致していることが示された。しかし、Talaporfin はコントロールであるミトコンドリアとは局在が一致せず、ミトコンドリア内には集積されないことが明らかとなった(図 4.13-図 4.21)。

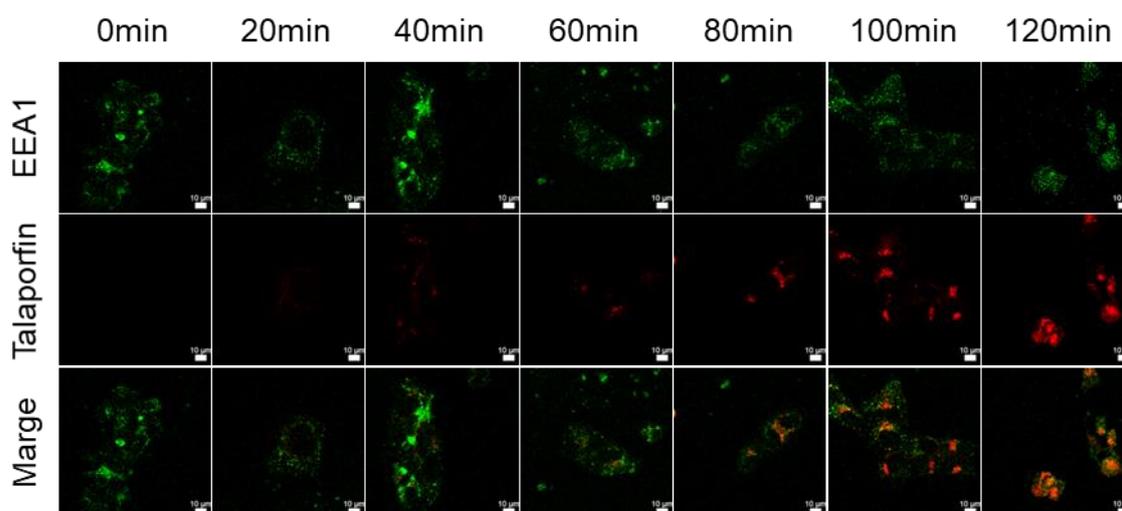


図 4.13 SBC3 の初期エンドソーム抗原 EEA1 と Talaporfin の経時ごとの取り込み量の変化

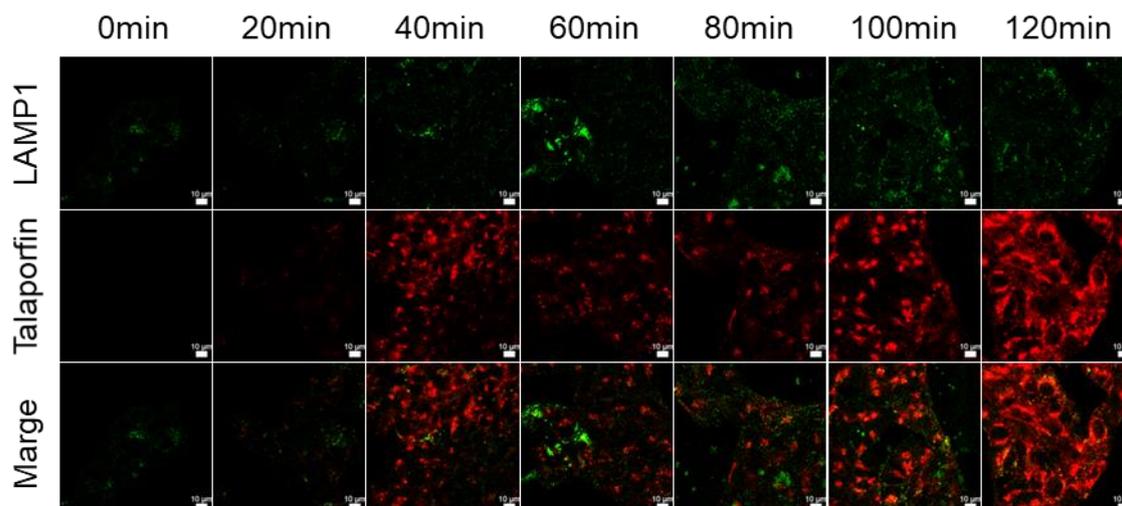


図 4.14 SBC3 のエンドソーム抗原 LAMP1 と Talaporfin の経時ごとの取り込み量の変化

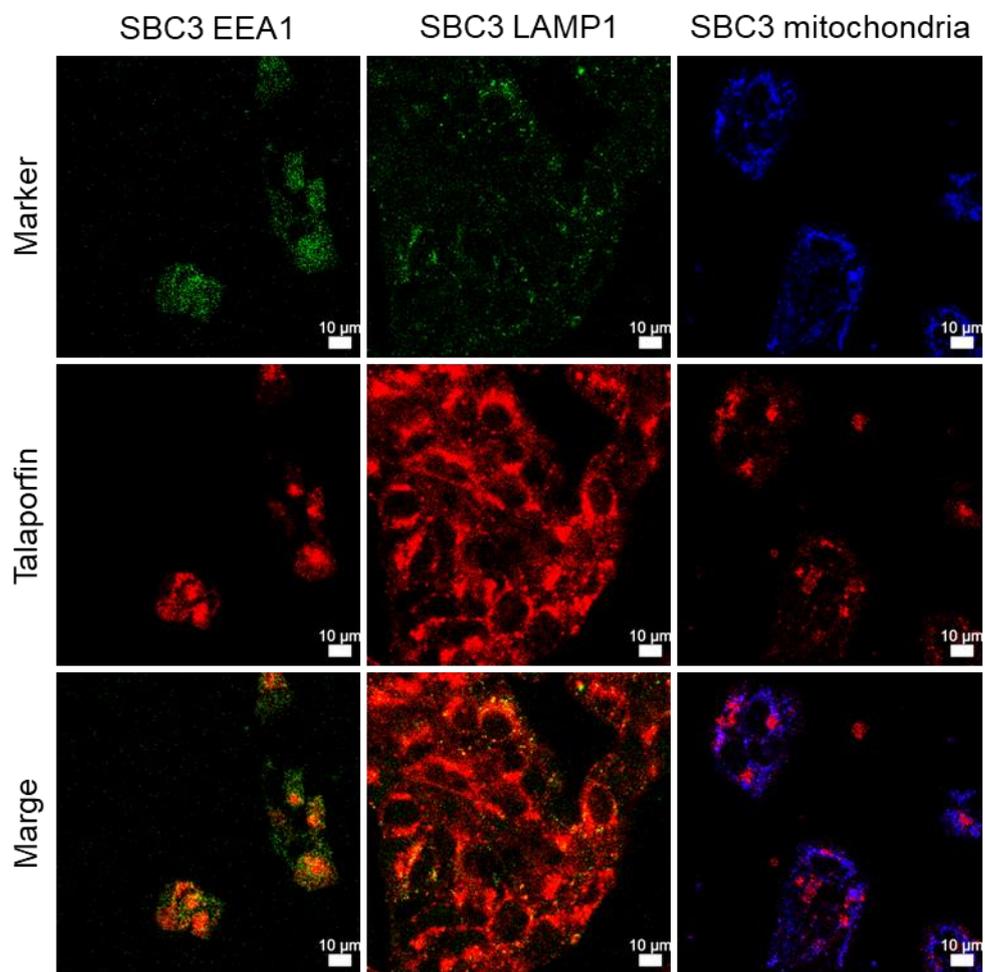


図 4.15 SBC3 の Talaporfin とライソソームの細胞内局在

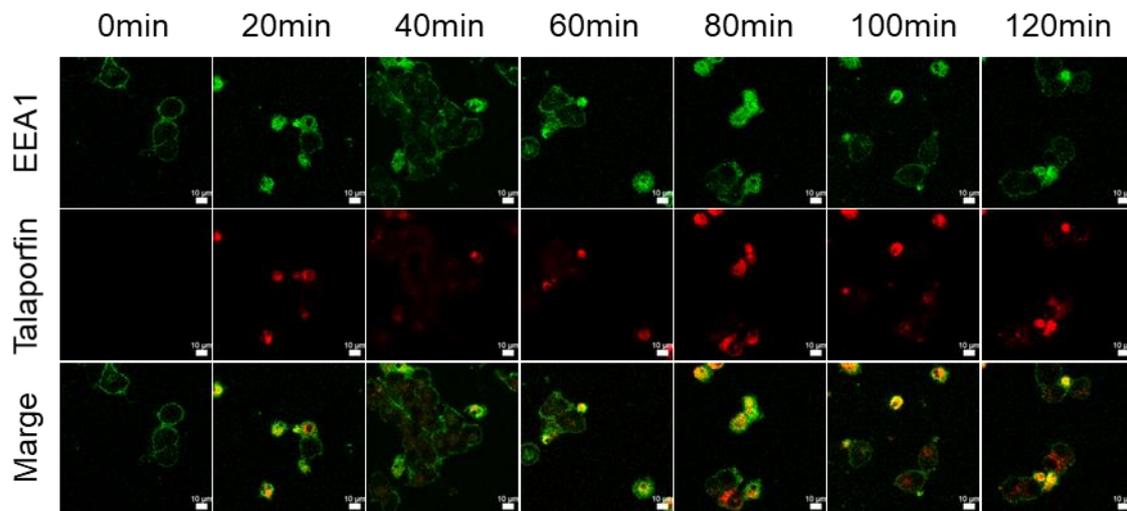


図 4.16 SBC5 の初期エンドソーム抗原 EEA1 と Talaporfin の経時ごとの取り込み量の変化

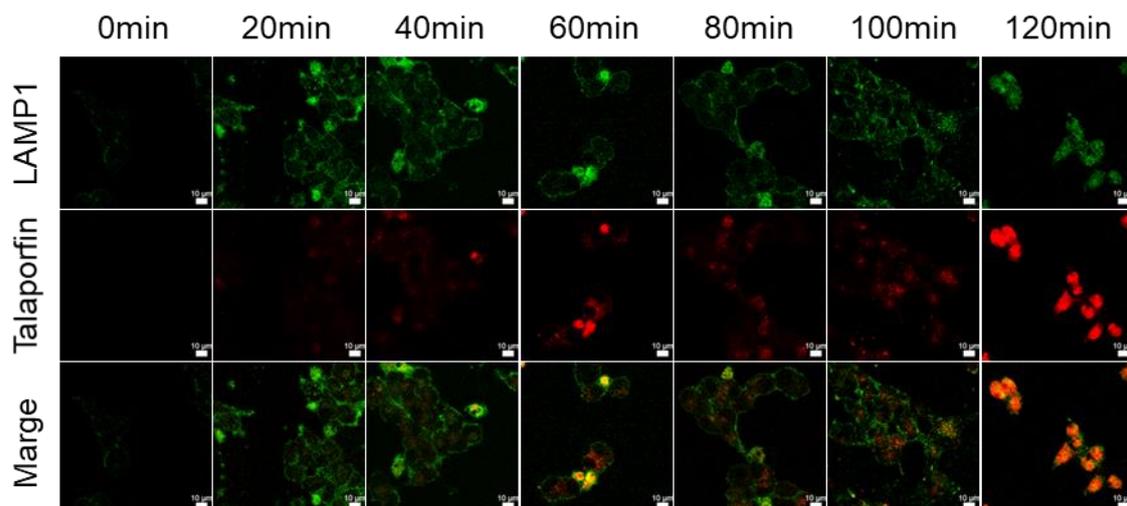


図 4.17 SBC5 のエンドソーム抗原 LAMP1 と Talaporfin の経時ごとの取り込み量の変化

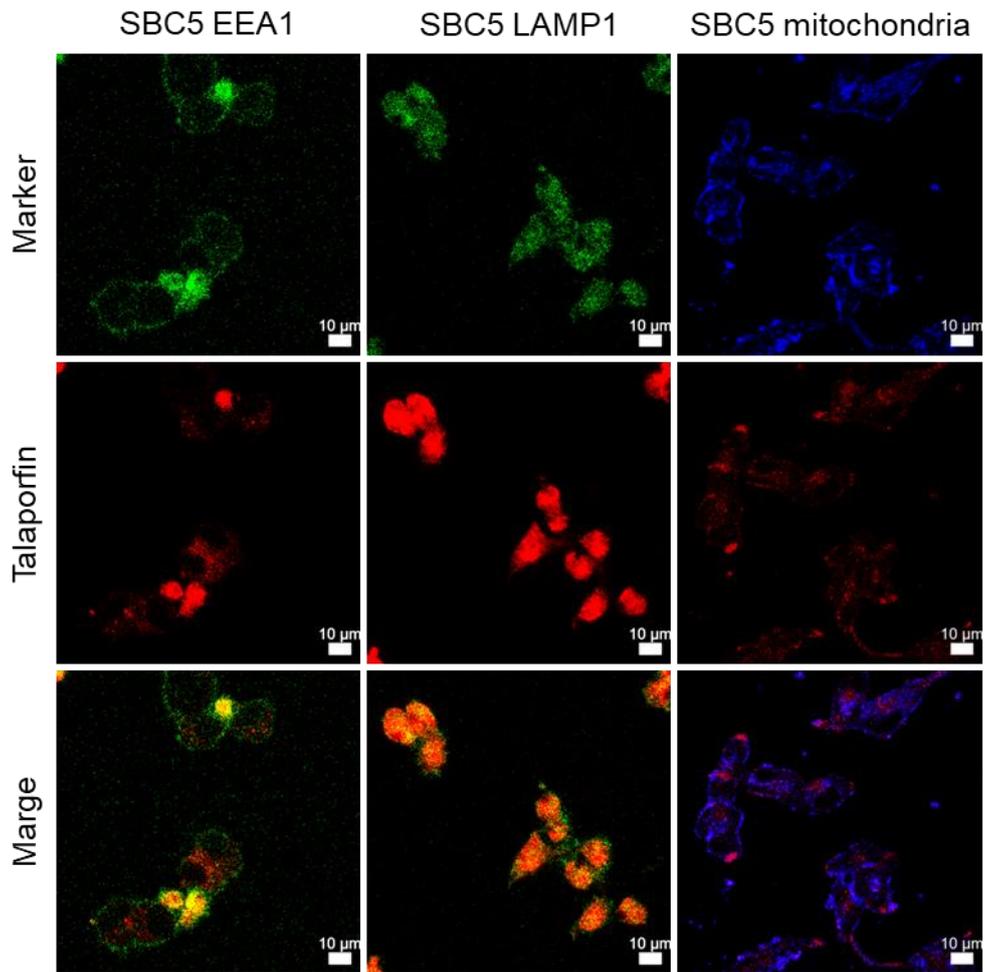


図 4.18 SBC5 の Talaporfin とライソソームの細胞内局在

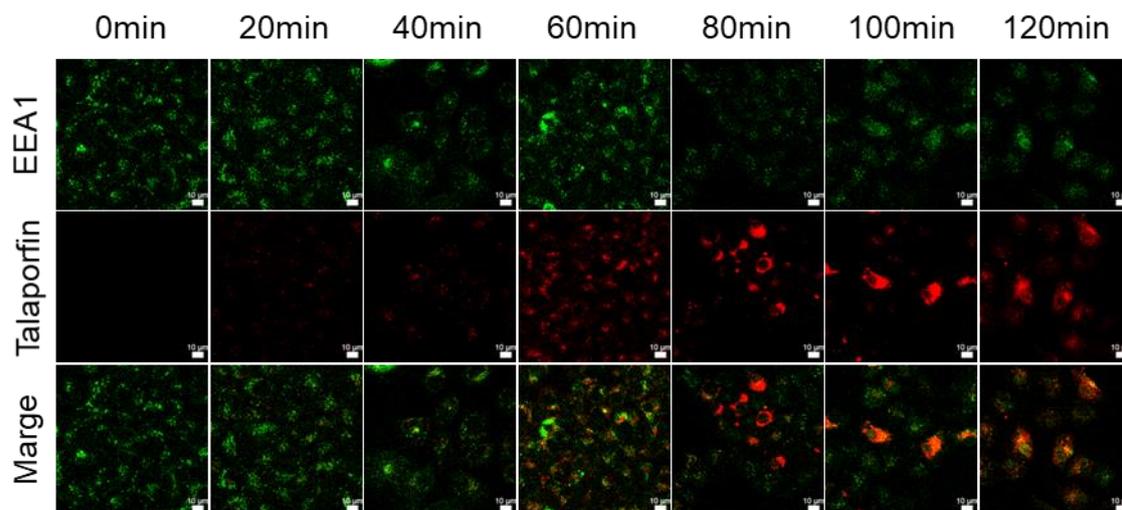


図 4.19 A549 の初期エンドソーム抗原 EEA1 と Talaporfin の経時ごとの取り込み量の変化

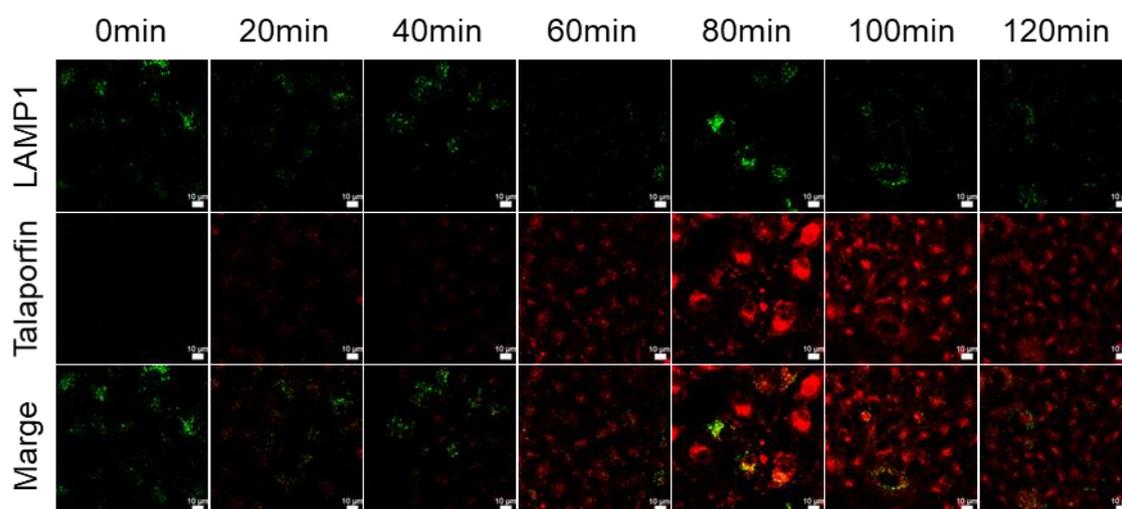


図 4.20 A549 のエンドソーム抗原 LAMP1 と Talaporfin の経時ごとの取り込み量の変化

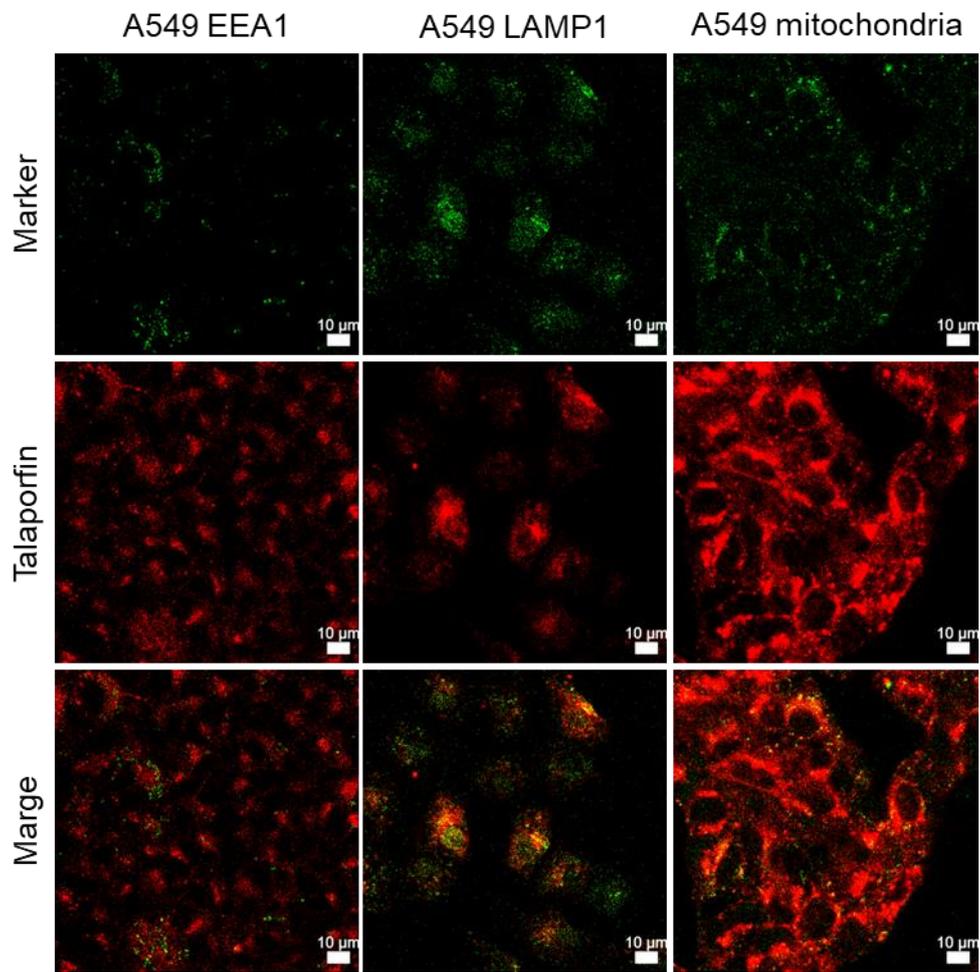


図 4.21 A549 の Talaporfin とライソソームの細胞内局在

4.5 Talaporfin のエンドサイトーシスの取り込み経路の同定

Talaporfin のエンドサイトーシスによる細胞内への取り込み経路を同定するために、エンドサイトーシスの特定の取り込み経路をブロックする阻害剤を用いてヒト肉腫細胞株 MFH03 に対する取り込み経路を解析した。

On ice は細胞への能動輸送の阻害、2-デオキシグルコース + アジ化ナトリウム (2-DG + NaN₃) は細胞の解糖系による代謝と、ミトコンドリア内の電子伝達系による ATP 産生の阻害、クロムプロマジン塩酸塩 (CPZ) はクラスリン依存性エンドサイトーシスによる被膜形成の阻害、コルヒチンは細胞内における微小管形成の阻害、サイトカラシンβ (CCB) はアクチン重合の阻害、ゲニステインはカベオラエンドサイトーシスの阻害、メチルβシクロデキストリン (MβCD) はカベオラ・脂質ラフトエンドサイトーシスの阻害、スクロースがクラスリン依存性エンドサイトーシスの格子形成の阻害剤としてそれぞれ用いた。

クラスリン依存性エンドサイトーシスの被膜形成の阻害剤である CPZ を除くすべての阻害剤で Talaporfin の取り込みの減少が確認された (図 4.22)。

細胞を 4°C 以下まで冷やした on ice ではコントロールと比較して、5.6% まで Talaporfin の取り込みが低下した。また、細胞内の ATP を枯渇させた場合にも 16.3% まで取り込みが減少した (図 4.23)。

クラスリン依存性エンドサイトーシスの被膜形成の阻害剤である CPZ の場合、111.5% まで上昇したが、格子形成を阻害するスクロースでは 23.0% まで低下した。カベオラエンドサイトーシスの阻害剤であるゲニステインでも 47.5% まで低下した。また、脂質ラフト及びカベオラエンドサイトーシスの MβCD も取り込み量が 50.8% まで低下した。微小管形成の阻害剤であるコルヒチンでも 68.1% まで取り込みが低下し、アクチン重合の阻害剤である CCB でも 82.8% まで取り込みが低下した (図 4.24)。

クラスリン依存性エンドサイトーシスを特異的に阻害する Pitstop 2 で各種肉腫及び肺癌の細胞株を比較した結果、全ての肉腫で 35~44% に低下し、肺癌の細胞株で 46~65% まで取り込みが減少した (図 4.25)。

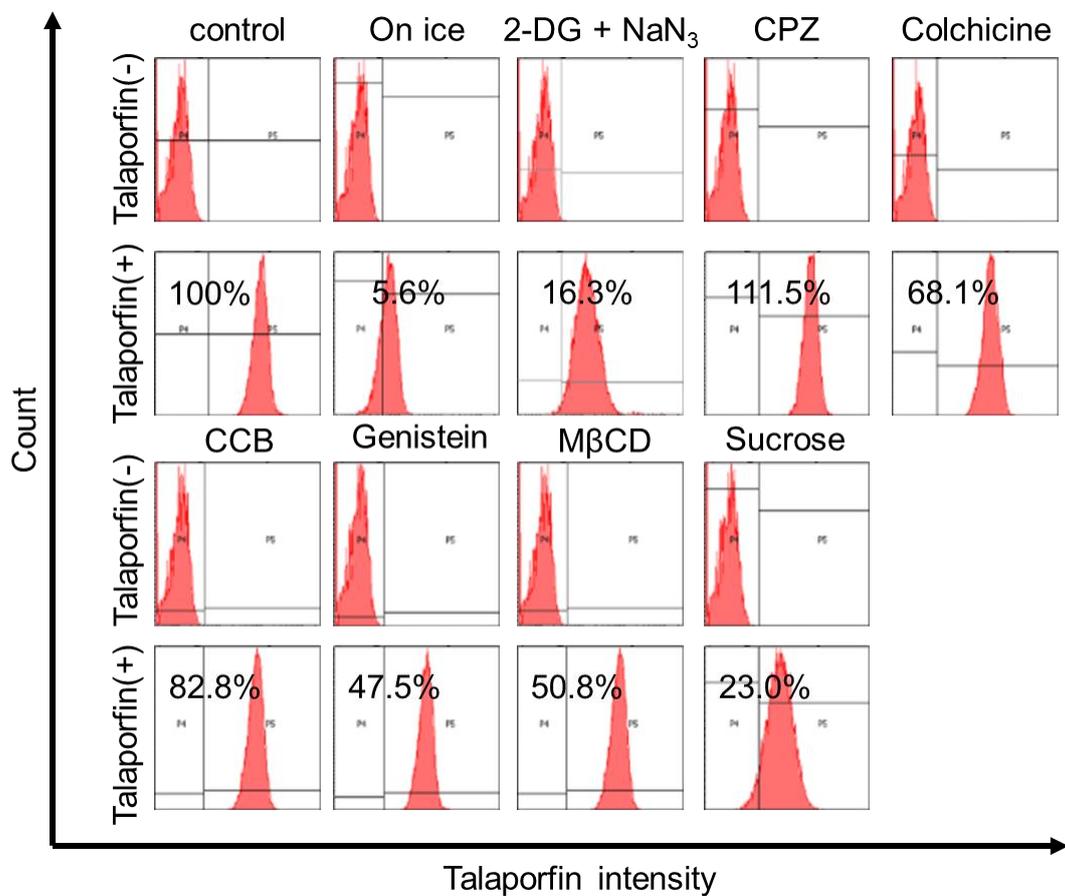


図 4.22 Talaporfin の取り込み経路別の蛍光強度

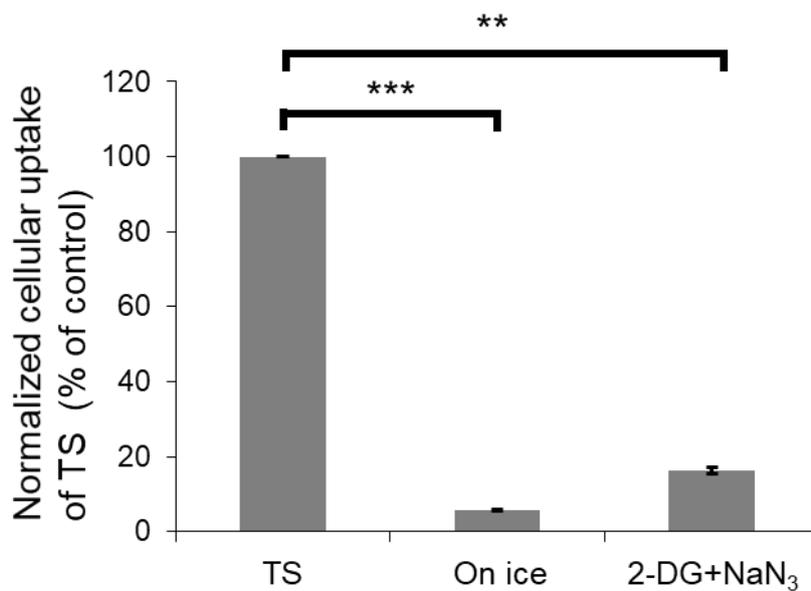


図 4.23 能動輸送と ATP 輸送の比較

標準偏差 ± SE. *p < 0.05, **p < 0.005, ***p < 0.0005

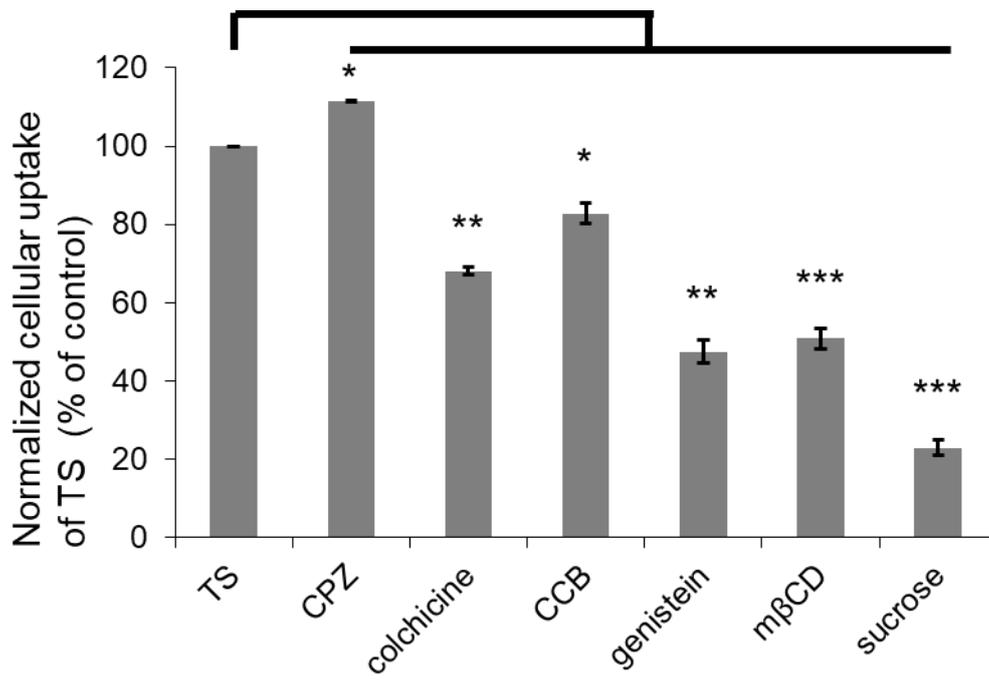


図 4.24 エンドサイトーシス経路の比較
標準偏差 ± SE. *p < 0.05, **p < 0.005, ***p < 0.0005

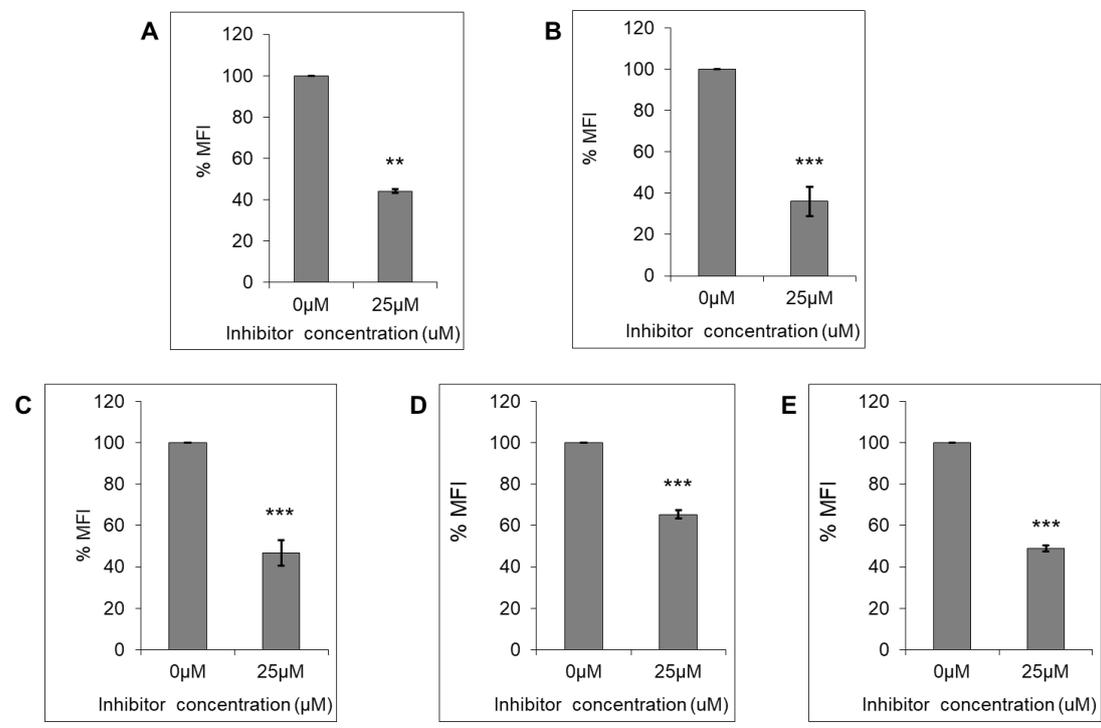


図 4.25 Pitstop 2 の阻害による取り込み量の変化 (A: MFH03, B: OS13, C: SBC3, D: SBC5, E: A549)

4.6 Talaporfin のライソソームにおける分解の解析

Talaporfin の細胞内からの消失が、排出かライソソームにおける分解かを特定するために、ライソソームでの分解を抑制するクロロキシン (CQ) と塩化アンモニウム (NH_4Cl) を用いて解析をした。

CQ、 NH_4Cl ともに添加していない場合と比較し、細胞群の蛍光のシフトが少ないことがわかる(図 4.26)。また、細胞群の広がりもコントロールと比較し、少ないことが確認された。

コントロールを 100%としたときの比較では、CQ では 12.5、25 μM ともにコントロールの減少量である 20.4%と比較し、38.6%、38.7%と共にコントロールより高い蛍光強度を維持した。また、同じく NH_4Cl でもコントロールの 20.7%と比較し、33.6%、31.4%と共にコントロールより有意に高い蛍光強度を維持した (図 4.27)。

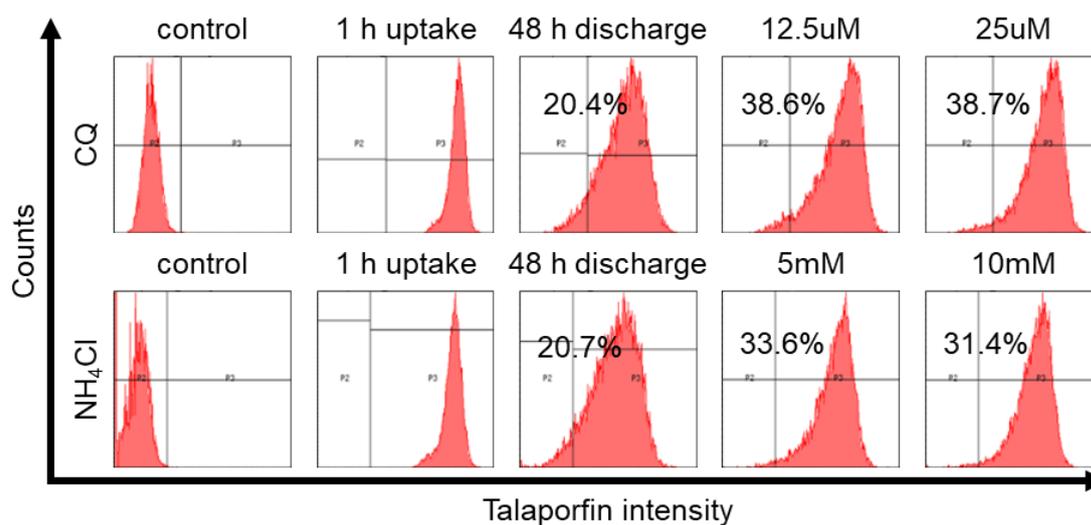


図 4.26 各種ライソソームの分解の阻害剤の蛍光強度

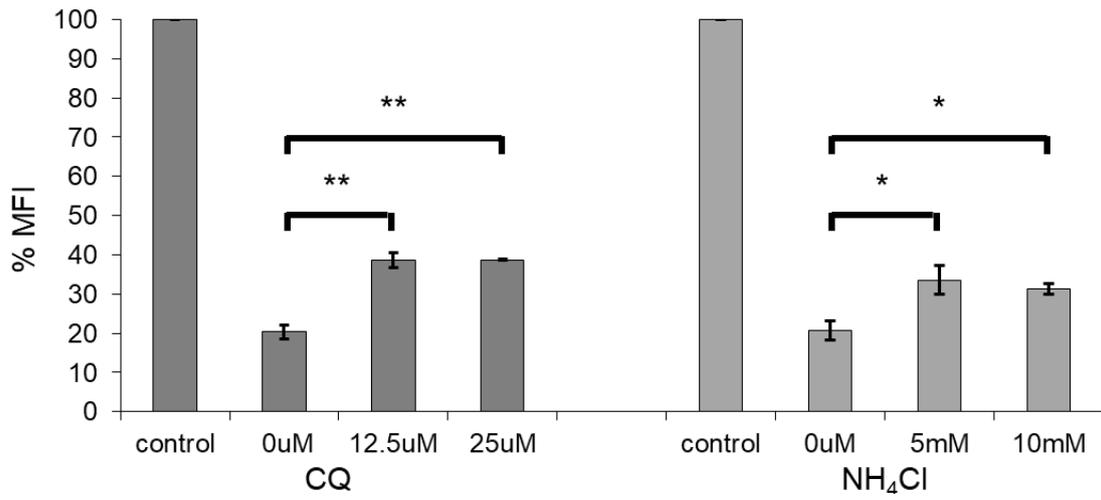


図 4.27 コントロールと各種ライソソームの分解の阻害剤の蛍光強度の比較

標準偏差 ± SE. * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$

4.7 Talaporfin のエンドサイトーシスの取り込み経路の同定

Talaporfin の取り込みが細胞内の ATP 量に依存しているかを調べるために肉腫と肺癌の細胞株を用いて解析を行った。

初めに肉腫及び肺癌の細胞株の Talaporfin の経時ごとの取り込み量を測定した結果、HOS、A549、SBC3、MFH03、SBC5、OS13 の順番に Talaporfin の取り込み量が多いという結果となった(図 4.28)。

さらに細胞種ごとの細胞内 ATP 量を測定すると、MFH03、SBC5、A549、OS13、HOS、HDFa、SBC3、PBMC の順番となり、Talaporfin の取り込み量と細胞内の ATP 量の両方で相関性は見られなかった (図 4.29-30)。

次に細胞内 ATP を阻害した場合、Talaporfin の取り込み量及び細胞内の ATP 量に関して相関性が見られるかを解糖系及び電子伝達系を阻害する 2-DG +NaN₃ を用いて 1 時間阻害した後、Talaporfin の蛍光をフローサイトメーター、ATP 量をマイクロプレートリーダーで測定をした。2-DG +NaN₃ を添加しないで培養した細胞株をそれぞれのコントロールとし、その数値を 100%とした時の減少量を算出し計算をした結果、データを出すことができない PBMC を除き、全ての細胞株で細胞内の ATP 量が減少すると、Talaporfin の細胞内の取り込み量が減少した (図 4.31)。

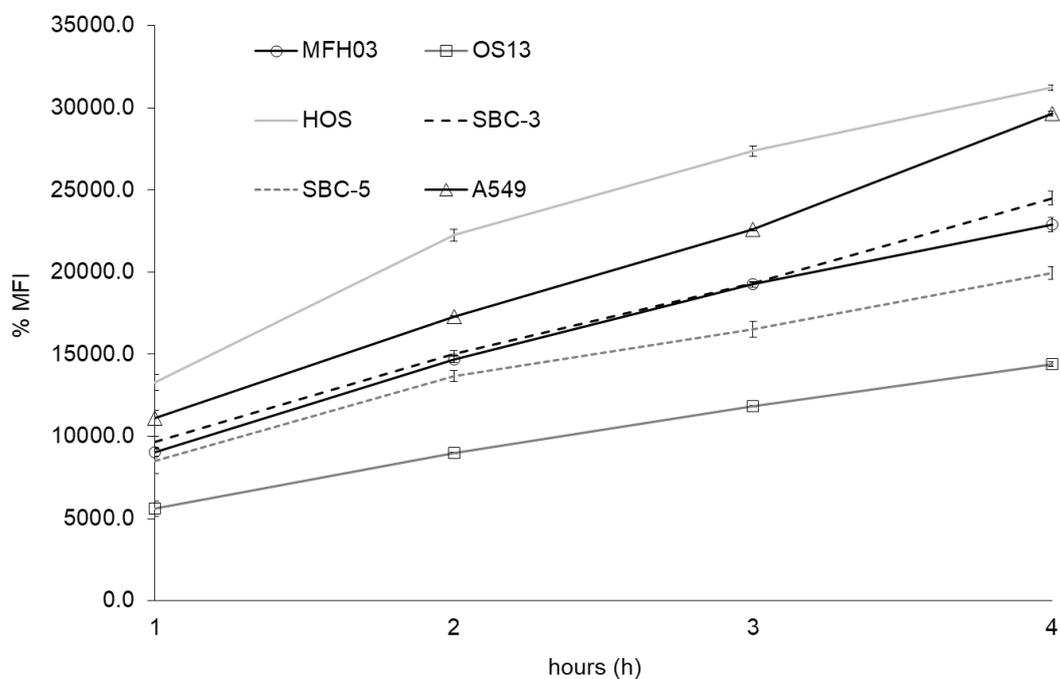


図 4.28 肉腫及び肺癌細胞株の経時ごとの Talaporfin の取り込み量の変化
標準偏差 ± SE

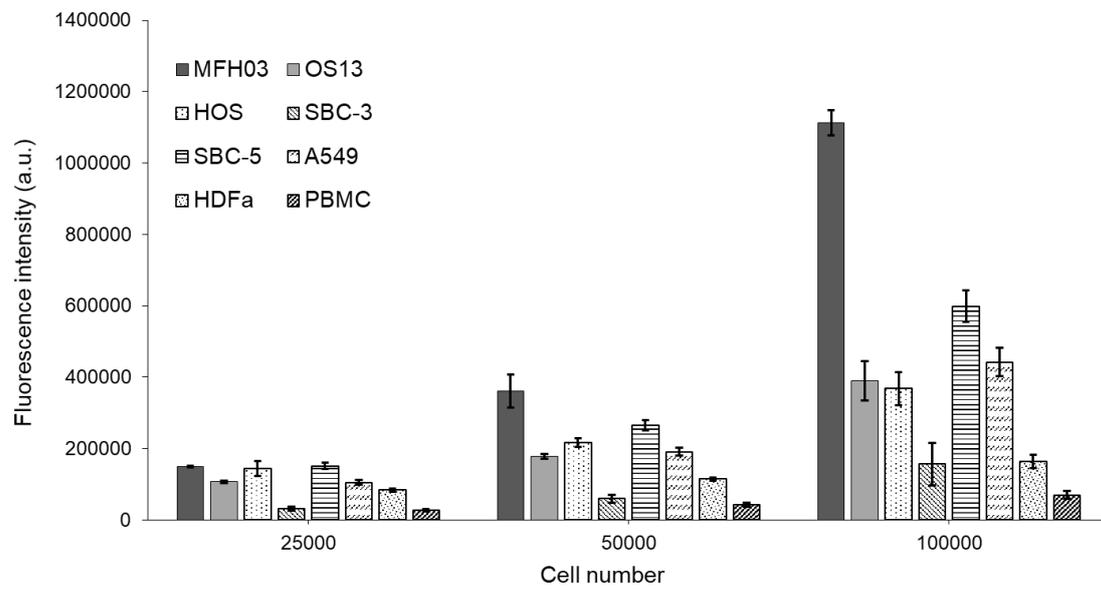


図 4.29 細胞種ごとの ATP 量
標準偏差 ± SE

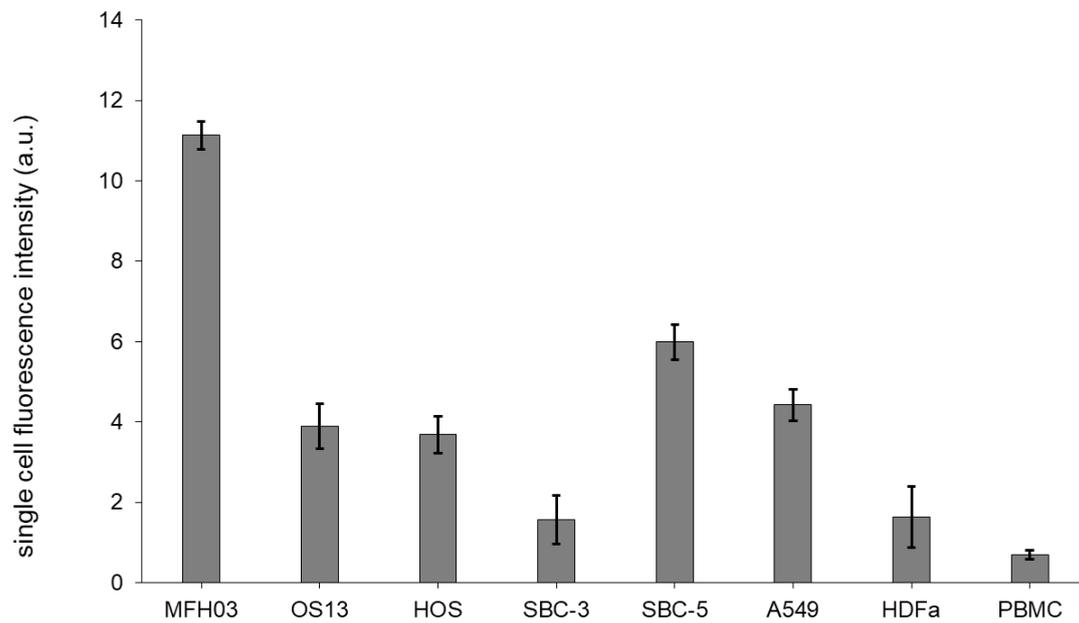


図 4.30 細胞 1 つ当たりの ATP 量
標準偏差 ± SE

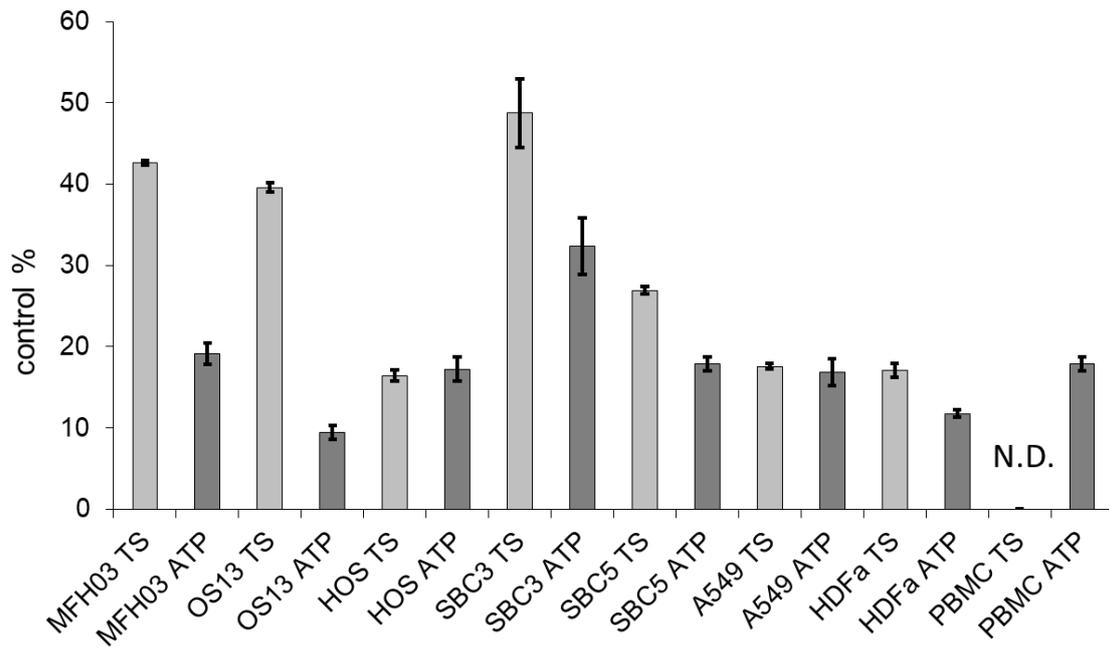


図 4.31 細胞内の ATP を阻害時の Talaporfin 及び ATP 量の相関
標準偏差 ± SE

4.8 Ras 由来のシグナル阻害時の Talaporfin の取り込みの変化

Talaporfin の取り込みに細胞内の ATP 量が関与していることから解糖系のシグナル伝達及びクエン酸回路の電子伝達系のシグナル伝達に関与しているとされる Ras タンパク質が Talaporfin の取り込み量に影響を与えるか Ras のシグナル伝達の阻害剤 4 種類を用いて解析を行った。

Wortmannin は PI3K 経路の阻害剤 (2~200nM)、ZSTK474 は PI3K 経路のサブユニット α 、 β 、 δ 、 γ の阻害剤 (0.01~1 μ M)、sorafenib は MAPK 経路の Raf-1 及び B-raf の阻害剤 (0.5~50 μ M)、trametinib は MAPK 経路の MEK1/2 の阻害剤 (0.1~10nM) として用いた。

Ras タンパクのシグナル伝達を阻害した結果、A549 では wortmannin が 81~85% まで取り込み量が減少し、ZSTK474 は 73~88% まで取り込み量が減少、sorafenib は 51~83% まで取り込み量が減少、trametinib は 72~83% まで取り込み量が減少した。全ての阻害剤で有意に Talaporfin の取り込みが阻害された (図 4.32)。

膵臓癌細胞株の MIA PaCa 2 でも同様に wortmannin が 85~91% まで取り込み量が減少し、ZSTK474 は 78~84% まで取り込み量が減少、sorafenib は 62~76% まで取り込み量が減少、trametinib は 79~96% まで取り込み量が減少した。全ての阻害剤で有意に Talaporfin の取り込みが阻害された (図 4.33)。

HDFa では wortmannin では有意な減少が確認できず、ZSTK474 の 0.01 μ M で 83% まで取り込み量が減少、sorafenib の 50 μ M で 14% まで取り込み量が減少し、trametinib では 77~84% まで取り込み量が減少した (図 4.34)。

Ras を同様に阻害し、ATP 濃度の測定をしたが、全ての阻害剤において ATP 量が有意に低下するものは確認されなかった (図 4.35)。

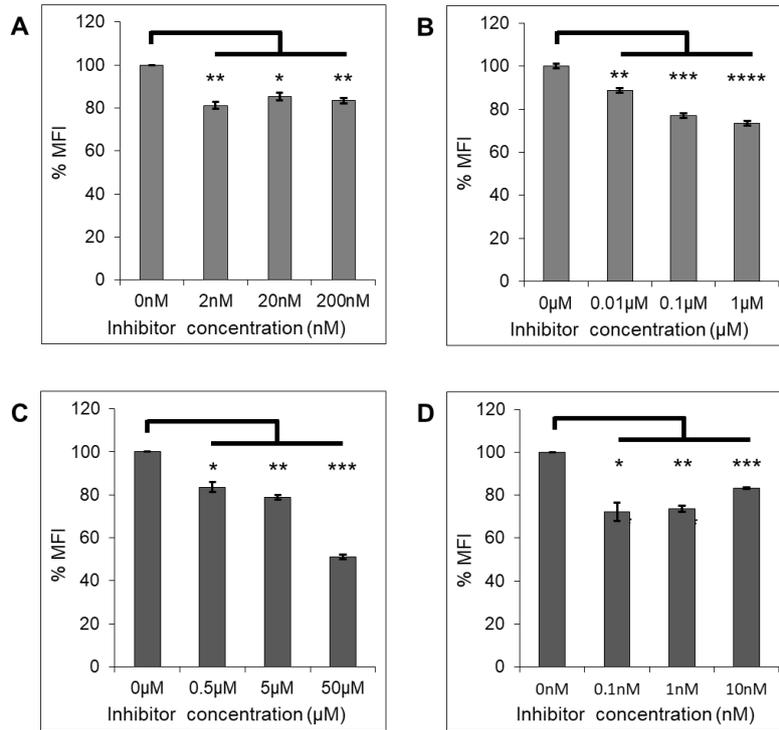


図 4.32 肺癌細胞株 A549 の Ras 阻害時の Talaporfin の取り込み (A: wortmannin, B: ZSTK474, C: sorafenib, D: trametinib) 標準偏差 ± SE. * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.0005$

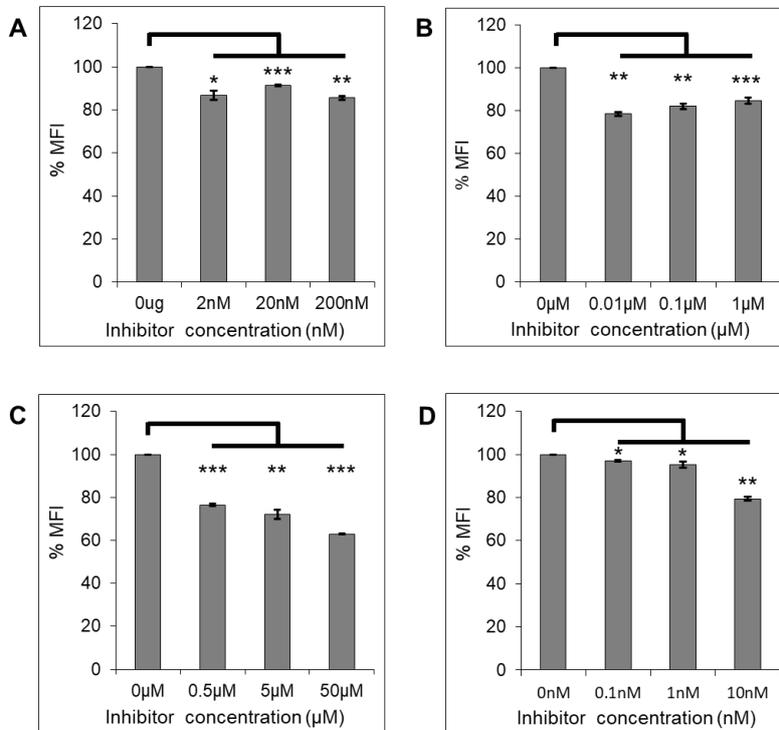


図 4.33 肺癌細胞株 MIA PaCa 2 の Ras 阻害時の Talaporfin の取り込み (A: wortmannin, B: ZSTK474, C: sorafenib, D: trametinib) 標準偏差 ± SE. * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.0005$

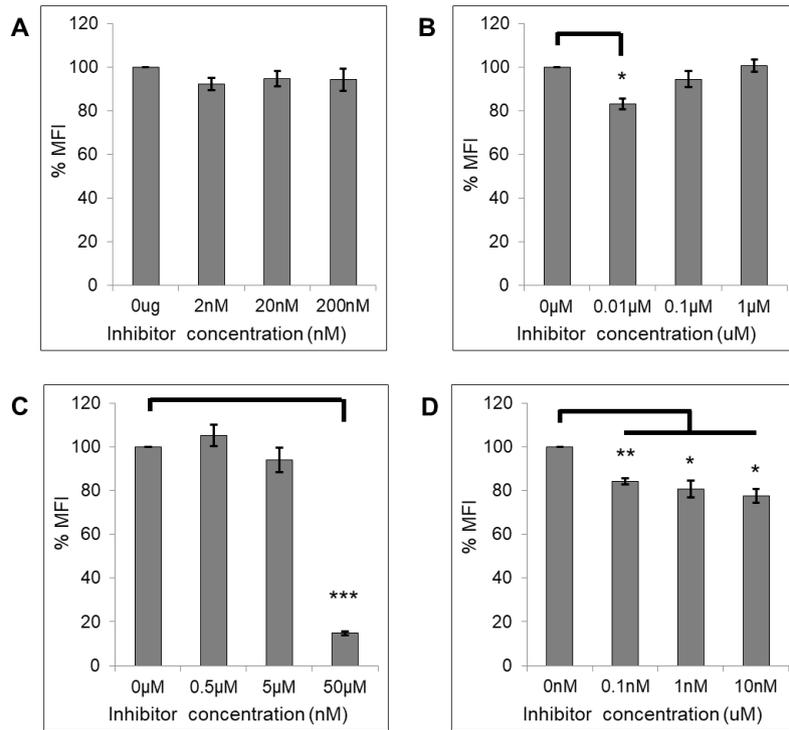


図 4.34 ヒト角化細胞株 HDFa の Ras 阻害時の Talaporfin の取り込み (A: wortmannin, B: ZSTK474, C: sorafenib, D: trametinib) 標準偏差 ± SE. * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.0005$

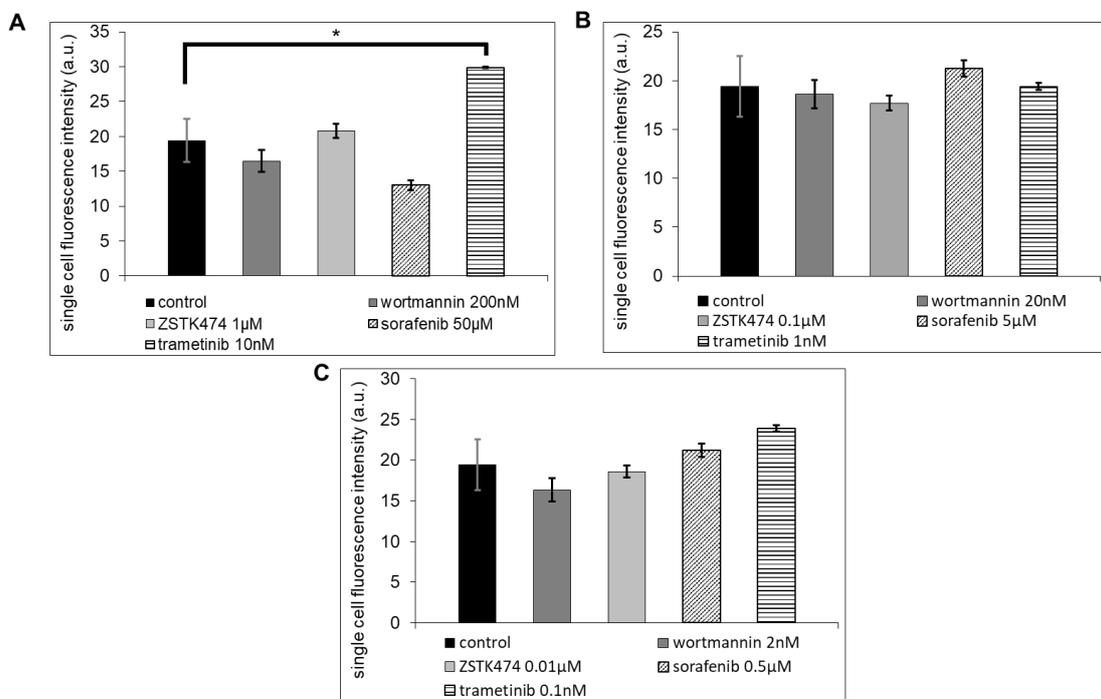


図.4.35 ヒト膵臓癌細胞株 MIA PaCa 2 の Ras 阻害時の ATP 量 (A: Ras 阻害剤の高濃度, B: Ras 阻害剤の中濃度, C: Ras 阻害剤の低濃度)

5.1 結論と考察

本研究では、Talaporfin の取り込みと排出の機序を同定することを目的とし実験を行った。結論として、Talaporfin はクラスリン依存性エンドサイトーシスもしくはカベイラエンドサイトーシスから細胞内に取り込まれ、初期エンドソームから後期エンドソームに移行し、ライソソームで分解されることが明らかとなった。また、Talaporfin の取り込みには十分な ATP が必要であると考えられる。更に、Talaporfin の取り込みの制御には Ras タンパク質が関わっていることが明らかとなった。

取り込みの実験では、Talaporfin を特異的に取り込まない細胞と排出をしない細胞を選別したが、PBMC を除く全ての細胞で Talaporfin は取り込まれた。これは、細胞に PBMC を除く全ての細胞上に存在する何らかの分子機構が関わっていると考えられる。

排出の実験では、Talaporfin の排出には細胞間に何らかの差があることが示され、ABC トランスポーターを介した排出を検討したが、条件に当てはまるトランスポーターの同定には至らなかった。ABC トランスポーターは Talaporfin の排出には関与していない可能性が高い。しかし、ABC トランスポーターの他に SLC トランスポーター等の分子機構が関与している可能性をまだ排除しきれていないため、さらに解析を進める必要がある。

Talaporfin の細胞内の局在を観察した結果、Talaporfin は初期エンドソームと後期エンドソームの局在が一致することが判明し、Talaporfin の取り込みはエンドサイトーシスが関与しているという過去の報告と一致した。また、肉腫、肺癌の細胞株両方で局在が一致したことから、Talaporfin の大部分はエンドサイトーシスが関わっている可能性が高いと考えられる。

Talaporfin の取り込み機構の同定では、Talaporfin の取り込み機構は低温処理により能動輸送であることが示され、ATP の阻害からエネルギー依存的な輸送経路であることが示された。これは Talaporfin が何らかの分子機構で取り込まれることを示し、腫瘍特異的に取り込まれるという過去の報告とも一致している。Talaporfin は主にクラスリン依存性エンドサイトーシスもしくはカベオラエンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれている可能性が示された。クラスリン依存性エンドサイトーシスに関しては特異的な阻害剤である Pitstop 2 でも確認された。

Talaporfin の分解の阻害では、Talaporfin の大部分は前述の細胞内の局在の実験によりライソソーム内に取り込まれることが示されているため、この結果は一致しているといえる。このことから治療時に Talaporfin を静脈注射した後、ライソソームの分解を阻害することで長時間 Talaporfin を生体内に維持できる可能性が示されている。しかし、クロロキンは毒性が高いことでも知られている試薬であるため、in vivo での更なる実験が必要である。

Talaporfin の ATP 濃度と取り込み量の相関性では、細胞内の ATP 量が直接的に細胞の取り込み量と相関することはなかった。これは、細胞内の ATP 量が Talaporfin の取り込みには十分な量蓄積されているためであると考えられる。また、2-DG +NaN₃で細胞内の ATP

を阻害した場合、Talaporfin の取り込み量も減少した。これは、Talaporfin を取り込むための ATP が細胞内に十分に蓄積されていなかったためであると考えられる。生体内の酸素の枯渇条件下では腫瘍細胞は解糖系を用いてエネルギー産生を行うため、十分な ATP 産生を行い、正常細胞では ATP 枯渇する。このメカニズムとして Talaporfin が生体内で腫瘍特異的に蓄積されるということが考えられる。

Ras タンパク質は PI3K と MAPK 経路両方ともに阻害することにより Talaporfin の取り込み量が減少した。PI3K 経路は解糖系の Hexokinase や PFK といったシグナル伝達経路に関わっており、これらが阻害されたため、細胞内の ATP 量が減少し、Talaporfin の取り込み量が減少したと考えた。また、MAPK 経路は細胞の成長や促進以外にもエンドサイトーシスや β 酸化といった Talaporfin の直接的な取り込み機序やエネルギー産生に影響を与えたと考えた。しかし、Ras 経路と ATP 産生が直接的に関与しないことが確認され、Ras の PI3K 及び MAPK が直接的にクラスリン依存性エンドサイトーシス及びカベオラエンドサイトーシスに作用したと考えられる。

以上の考察から、これらの制御機構をコントロールすることで Talaporfin を用いた PDD 及び PDT の効果を促進することができる可能性が示された。

5.2 今後の課題

今後の課題として、クラスリン依存性エンドサイトーシスでは何らかのアダプター分子が関与しているため、Talaporfin の取り込みに関与するアダプター分子の特定は、Talaporfin による PDD 及び PDT の有効な癌腫を特定するために非常に重要な因子であると考えられる。そのため、クラスリン依存性エンドサイトーシスのアダプターの特定が必要であると考えられる。

Talaporfin の取り込み、排出には SLC トランスポーターの可能性もあるため、SLC トランスポーターの遺伝子やタンパク質が Talaporfin に関与しているかを調べる必要がある。

Ras タンパク質と ATP 量の相関について MIA PaCa 2 を用いて解析をしたが、他の細胞の A549 及び HDFa も解析をする必要があると考えられる。

参考文献

- [1] WHO guidelines for the pharmacological and radiotherapeutic management of cancer pain in adults and adolescents. 2019
- [2] 厚生労働省大臣官房統計情報部: 厚生労働省 平成 30 年我が国の人口動態. 10-11, 2018
- [3] Choi JY., Shim KN., Kim SE., Jung HK., Jung SA., Yoo K. The Clinical Value of 18F-Fluorodeoxyglucose Uptake on Positron Emission Tomography/Computed Tomography for Predicting Regional Lymph Node Metastasis and Non-curative Surgery in Primary Gastric Carcinoma. *Korean J Gastroenterol.* 64 (6), 340-7, 2014
- [4] Yang Liu., Yoshio E. Cytoreductive Surgery Under Aminolevulinic Acid-Mediated Photodynamic Diagnosis Plus Hyperthermic Intraperitoneal Chemotherapy in Patients with Peritoneal Carcinomatosis from Ovarian Cancer and Primary Peritoneal Carcinoma: Results of a Phase I Trial. *Ann Surg Oncol.* 21(13), 4256-62, 2014
- [5] Kentaro K., Yoshiyuki F. Diagnostic Laparoscopy with 5-Aminolevulinic-Acid-Mediated Photodynamic Diagnosis Enhances the Detection of Peritoneal Micrometastases in Advanced Gastric Cancer. *Oncology.* 87, 257-265, 2014
- [6] Yutaka K., Yasutoshi M., Hirotaka K. Fluorescent detection of peritoneal metastasis in human colorectal cancer using 5-aminolevulinic acid. *International Journal of Oncology.* 45, 41-46, 2014
- [7] Kentaro K., Yoshiyuki F., Masahiko Y., Masahiro I. Staging Laparoscopy Using ALA-Mediated Photodynamic Diagnosis Improves the Detection of Peritoneal Metastases in Advanced Gastric Cancer. *Journal of Surgical Oncology.* 106, 294-298. 2012
- [8] Roberts WG., Berns MW. In vitro photosensitization I. Cellular uptake and subcellular localization of mono-L-aspartyl chlorin e6, chloro-aluminum sulfonated phthalocyanine, and photofrin II. *Lasers Surg Med.* 9 (2), 90-101, 1989
- [9] Guo S., Zhang X., Zheng M., Zhang X., Min C., Wang Z., Cheon SH., Oak MH., Nah SY, Kim KM. Selectivity of commonly used inhibitors of clathrin-mediated and caveolae-dependent endocytosis of G protein-coupled receptors. *Biochim Biophys Acta.* 1848, 2101-2110, 2015

- [10] Liu Y., Endo Y., Fujita T., Ishibashi H., Nishioka T., Canbay E., Li Y., Ogura S., Yonemura Y. What do drug transporters really do?. *Ann Surg Oncol.* 21 (13), 4256-62, 2014
- [11] 加藤治文, 會澤勝夫: レーザーによる光線力学的診断治療: 2005 Digital Archive; Copyright The Laser Society of Japan: 第14巻 第3号 208-218: 1986
- [12] Jiro Akimoto: Photodynamic Therapy Using Talaporfin Sodium and Diode Laser for Newly Diagnosed Malignant Gliomas. licensee InTech. 2013
- [13] Nakamura T., Oinuma T., Usefulness of Photodynamic Diagnosis and Therapy using Talaporfin Sodium for an Advanced-aged Patient with Inoperable Gastric Cancer (a secondary publication). *Laser Ther* 201-210, 2014
- [14] Kataoka H., Nishie H., Hayashi N., Tanaka M., Nomoto A., Yano S., Joh T. New photodynamic therapy with next-generation photosensitizers. *Ann Transl Med.* 5 (8), 183, 2017
- [15] Kobayashi H., Choyke PL. Near-Infrared Photoimmunotherapy of Cancer. *Acc Chem Res.* 52 (8), 2332-2339, 2019
- [16] 小原實, 神成文彦, 佐藤俊一: レーザー応用光学: 198-200, 1998
- [17] Meiji Seikaファルマ株式会社: 光線力学的療法用剤劇薬処方せん医薬品注射用レザフィリン100mg. 2013
- [18] 乾賢一: 薬物トランスポーター活用ライブラリー 昨日・輸送基質から創薬・臨床応用まで. 2009
- [19] Kaksonen M., Roux A. Mechanisms of clathrin-mediated endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 19 (5), 313-326, 2018
- [20] Mayor S., Pagano RE. Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8 (8), 603-12, 2007
- [21] Kim JH., Singh A., Del Poeta M., Brown DA., London E. The effect of sterol structure upon clathrin-mediated and clathrin-independent endocytosis. *J Cell Sci.* 130 (16), 2682-2695, 2017
- [22] 小林俊秀: 脂質ラフトは存在するか?. *生化学.* 第81巻 第1号, 17-23, 2009
- [23] Shakor AB., Taniguchi M., Kitatani K., Hashimoto M., Asano S., Hayashi A., Nomura K., Bielawski J., Bielawska A., Watanabe K., Kobayashi T., Igarashi Y., Umehara H., Takeya H., Okazaki T. Sphingomyelin synthase 1-generated sphingomyelin plays an important role in transferrin trafficking and cell proliferation. *J Biol Chem.* 286 (41), 36053-62, 2011
- [24] Razungles J., Cavallès V., Jalaguier S., Teyssier C. The Warburg effect: from theory to therapeutic applications in cancer. *Med Sci.* 29 (11), 1026-33, 2013
- [25] Serna Blasco R., Sanz-Álvarez M., Aguilera Ó., García-Foncillas J. Targeting

the RAS-dependent chemoresistance. The Warburg connection. *Semin Cancer Biol.* 54, 80-90, 2018

- [26] Ying H., Kimmelman AC., Lyssiotis CA., Hua S., Chu GC., Fletcher-Sananikone E., Locasale JW., Son J., Zhang H., Coloff JL., Yan H., Wang W., Chen S., Viale A., Zheng H., Paik JH., Lim C., Guimaraes AR., Martin ES., Chang J., Hezel AF., Perry SR., Hu J., Gan B., Xiao Y., Asara JM., Weissleder R., Wang YA., Chin L., Cantley LC., DePinho RA. Oncogenic Kras maintains pancreatic tumors through regulation of anabolic glucose metabolism. *Cell.* 149 (3), 656-70, 2012
- [27] Fujioka Y., Tsuda M., Hattori T., Sasaki J., Sasaki T., Miyazaki T., Ohba Y. The Ras-PI3K signaling pathway is involved in clathrin-independent endocytosis and the internalization of influenza viruses. *PLoS One.* 6 (1), 16324, 2011

謝辞

本論文は、我が恩師である千歳科学技術大学 李黎明教授の御指導によりまとめた研究成果である。日々の研究指導、御鞭撻を賜りましたことに心より感謝の意を申し上げます。

本論文の副査を引き受けて頂いた、川辺豊教授、札幌医科大学名誉教授・札幌道都病院学術センターの佐藤昇志学術センター長に心より感謝の意を申し上げます。

本研究を行うにあたり、実験施設、実験資材を提供して頂き、手助けをいただきました、札幌医科大学 病理学第一講座の鳥越俊彦教授、塚原智英准教授、廣橋良彦准教授、金関貴幸准教授、久保輝文特任助教、分子生物学講座の鈴木健史准教授に心より感謝の意を申し上げます。

札幌医科大学で研究に当たり手助けをしていただいた、只野裕己先生、濱田修人先生、渡辺祐人先生、村井愛子研究補助員、長谷川舞研究補助員、柳川純子研究補助員、赤松あすか研究補助員、湊崎智紗研究補助員に心より感謝の意を申し上げます。

共に学び、手助けをしていただきました、同研究室の岩井瑞樹氏、鈴木拓郎氏、内田啓介氏、小山峻介氏、高橋晴紀氏、田中凌氏、津田日香留女史、水本朔氏、鈴木健翔氏、そして本研究を支えて頂いた皆様に心より感謝の意を申し上げます。