

培養肺上皮細胞 RLE-6TN における インスリン取り込み機構

小田啓祐*, 湯元良子*, 永井純也*, 片山博和, 高野幹久*

Eur J Pharmacol., 672(1-3), 62-69, 2011

Mechanism underlying insulin uptake in alveolar epithelial cell line RLE-6TN

Oda K*, Yumoto R*, Nagai J*, Katayama H, Takano M*

ABSTRACT: For the development of efficient pulmonary delivery systems for protein and peptide drugs, it is important to understand their transport mechanisms in alveolar epithelial cells. In this study, the uptake mechanism for FITC-insulin in cultured alveolar epithelial cell line RLE-6TN was elucidated. FITC-insulin uptake by RLE-6TN cells was time-dependent, temperature-sensitive, and concentration-dependent. The uptake was inhibited by metabolic inhibitors, cytochalasin D, clathrin-mediated endocytosis inhibitors, and dynasore, an inhibitor of dynamin GTPase. On the other hand, no inhibitory effect was observed with caveolae-mediated endocytosis inhibitors and a macropinocytosis inhibitor. Intracellular FITC-insulin was found to be partly transported to the basal side of the epithelial cell monolayers. In addition, colocalization of FITC-insulin and LysoTracker Red was observed on confocal laser scanning microscopy, indicating that FITC-insulin was partly targeted to lysosomes. In accordance with these findings, SDS-PAGE/fluoroimage analysis showed that intact FITC-insulin in the cells was eliminated with time. The possible receptor involved in FITC-insulin uptake by RLE-6TN cells was examined by using siRNA. Transfection of the cells with megalin or insulin receptor siRNA successfully reduced the corresponding mRNA expression. FITC-insulin uptake decreased on the transfection with insulin receptor siRNA, but not that with megalin siRNA. These results suggest that insulin is taken up through endocytosis in RLE-6TN cells, and after the endocytosis, the intracellular insulin is partly degraded in lysosomes and partly transported to the basal side. Insulin receptor, but not megalin, may be involved at least partly in insulin endocytosis in RLE-6TN cells.

抄録 タンパク質医薬品の有効な肺送達システムの開発のため、肺上皮細胞におけるそれらの輸送機構を理解することは重要である。本研究では、FITC-インスリンの培養肺胞上皮細胞 RLE-6TN における取り込み機構について検討した。RLE-6TN 細胞による FITC-インスリンの取り込みは、時間、温度および濃度に依存した。取り込みは代謝阻害剤のサイトカラシン D、クラスリン介在性エンドサイトーシス阻害剤、およびダイナミン阻害剤のダイナソアにより阻害された。一方、カベオラ介在性エンドーシスの阻害剤やマクロピノサイトーシス阻害剤では、阻害されなかった。細胞内の FITC-

インスリンは、部分的に単層上皮細胞の基底膜側に輸送されることがわかった。さらに、FITC-インスリンと Lyso Tracker Red が細胞内で同じところに局在することが、共焦点レーザー走査型顕微鏡により観察され、FITC-インスリンは一部リソソームに局在することが示された。これらの知見の裏付けとして、SDS-PAGE 蛍光イメージ分析により細胞内のインタクトな FITC-インスリンが時間の経過と共に排除されることがわかった。RLE-6TN 細胞による FITC-インスリンの取り込みに関与する受容体について、siRNA を用いて検討した。メガリン基質またはインスリン受容体 siRNA の細胞内導入は、対応する RNA の発現を減少させた。FITC-インスリンの取り込みは、インスリン受容体 siRNA 細胞内導入では減少したが、メガリン siRNA では減少しなかった。以上の結果から、インスリンは RLE-6TN 細胞にエンドサイトーシスにより取り込まれ、エンドサイトーシスにより取り込まれた後、細胞内インスリンの一部はリソソームで分解され、基底膜側に輸送されることが示唆された。メガリンではなくインスリン受容体が RLE-6TN 細胞におけるインスリンのエンドサイトーシスに少なくとも一部は関与しているものと思われた。

* Department of Pharmaceutics and Therapeutics, Graduate School of Biomedical Sciences,
Hiroshima University
広島大学薬学部