

第34回麻布環境科学研究会 一般演題9

インドリジンアルカロイド Swainsonine のマウスおよびウシの培養腎尿細管上皮細胞における空胞変性発生機序に関する病理学的研究

○反町 有里奈, 井口 怜奈, 納谷 裕子, 荻原 喜久美, 島田 章則

麻布大学生命・環境科学部 病理学研究室

【背景・目的】

モンゴルの家畜の小脳運動失調症の発生に、毒草 (*Oxytropis glabra*: *O. glabra*) が原因として強く疑われ、その成分としてゴルジ α マンノシダーゼIIおよびライソゾーム α マンノシダーゼを阻害する Swainsonine (SW) が関与することが、マウスへの *O. glabra* 抽出液 (SW61.8 μ g/植物g含有) (第152回日本獣医学会学術集会) および合成SW (第157回同学術集会) の投与実験により示唆された。マウスに *O. glabra* 抽出液を投与したところ、罹患ヤギと同質病変が腎尿細管上皮細胞に認められ、空胞はオートファジーマーカーやライソゾームマーカーに対し陽性を示した。よって空胞はオートファゴソームあるいはオートファゴライソゾームである可能性が示唆された。Swainsonine (SW) の毒性として、1. α -マンノシダーゼ阻害によるライソゾーム内オリゴ糖蓄積を誘因とする細胞変性・細胞死、2. アポトーシス誘発による癌細胞増殖・転移抑制、3. ライソゾーム膜構成要素の糖タンパク異常によるオートファジー障害などが報告されている。さらに *O. glabra* にはSWの毒性を増強する成分が含まれており、SWのみでは空胞変性は進行しないことが示唆された (*in vivo*)。今回、培養腎尿細管上皮細胞における *O. glabra* 抽出液・SW曝露 (*in vitro*) により、*In vivo* と同様の結果が得られるかどうか、また、本疾患の病理発生 (空胞形成の機序、特にオートファジー異常の関与の有無) を明らかにすることを目的とした。

【材料と方法】

- ・初代培養腎尿細管上皮細胞
 - マウス (ICR:Jcl, 雄, 5週齢, 日本クレア, 東京, 日本)
 - ウシ (黒毛和種, 雄, 16ヶ月齢, ホルスタイン, 雌, 9ヶ月齢)
- ・SW (Carbosynth Ltd, Berksher, UK)
- ・*O. glabra* 抽出液 (SW250 μ g/ml 相当含有)
- ・8穴チャンバー (Thermo, Nunc Lab-Tek Cheamber Slide, 8well, NY, USA)
 - 上記の材料を用い、ウシ胎児血清 (ニチレイ, 東京, 日本) 10%加 Minimum Essential Medium (MEM) にて、5% CO₂, 37°Cのインキュベーターで培養した。
 - マウスおよびウシの初代培養腎尿細管上皮細胞 1.0 $\times 10^5$ cell/ml にSWを0, 100, 500, 1000 μ g/mlの濃度で添加し、24時間後の細胞傷害の有無をPAS染色にて確認し、また、*O. glabra* 抽出液と250 μ g/ml SW添加24時間後に細胞増殖抑制の解析 (MTT assay, Abcam, Cambridge, UK), PAS染色, 免疫染色 (抗LC3抗体: オートファジーマーカー, Bioss Inc, Boston, USA) (Lamp1, ライソゾームマーカー Bioss Inc, Boston, USA) (Cox IV: ミトコンドリア内膜蛋白マーカー (Cell Signaling Technology, Danvers, USA), アポトーシス検出 (Caspase assay, Immuno Chemistry Technologies, Bloomington, USA), および電顕解析を行った。さらに、マウスおよびウシの培養腎尿細管上皮細胞 2.0 $\times 10^5$ cell/ml に *O. glabra* 抽出液およびSW250 μ g/mlを添加し、12,24,48,72時間観察した。

【結果と考察】

1. MTT assay の結果, マウスおよびウシ腎尿細管上皮細胞のいずれにおいても *O. glabra* 抽出液, SW の順に強い細胞増殖抑制が認められた。
2. マウスおよびウシ腎尿細管上皮細胞のいずれにおいても SW 濃度依存性に細胞傷害 (空胞変性) が認められ, SW 曝露後の経時的細胞傷害の確認においては 72 時間まで空胞変性進行がみられ, 120 時間では空胞変性の減弱が見られた。一方, *O. glabra* 抽出液曝露では細胞密度の低下や細胞傷害などの細胞変性が強く認められた。
3. オートファジーマーカー LC3 を用いた蛍光抗体法では, *O. glabra* 抽出液, SW の順にドット状陽性と

なり, 陽性細胞 50 個中の一定面積あたりの LC3 陽性顆粒数の増数が認められた。また, SW 添加後のマウスおよびウシ腎尿細管上皮細胞における電子顕微鏡像にはともにライソゾーム様空胞の中に膜状または細胞内小器官様の物質が確認された。

まとめ

マウスおよびウシの培養腎尿細管における SW250 $\mu\text{g/ml}$ の経時的曝露実験ではマウス (*in vivo*) における所見と同様の結果が得られた。

細胞傷害 (空胞変性) の病理発生にオートファジー異常およびそれに付随するミトコンドリアクリアランス障害が関与することが示唆された。