

## 第 36 回麻布環境科学研究会 一般学術講演 4

## 植物由来アルカロイド Swainsonine の癌細胞増殖抑制効果： マイトファジー異常の関与

○深沢 敬亮, 中村 ひかる, 藤田 純平, 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

### 【背景および目的】

*Oxytropis sp.* (オヤマノエンドウ属) などの毒草に含まれるアルカロイド Swainsonine (以下 SW) は家畜に神経症状を伴う中毒を引き起こすことが知られている (1)。本物質は、ライソゾームおよびゴルジ装置内の  $\alpha$ -マンノシダーゼ阻害による糖代謝異常を介してライソゾーム内にオリゴ糖の蓄積・細胞の空胞化を起こす。また、肺癌、メラノーマ、胃癌、大腸癌およびグリオーマにおいて、SW による *in vivo* および *in vitro* 両者での癌細胞増殖抑制効果が報告されている (2)。SW による  $\alpha$ -マンノシダーゼ阻害により、細胞内小器官の膜の異常、さらにはオートファジー障害 (オートファゴソームとリソソームの膜の融合障害) が起こり、結果として、内呼吸により生理的に損傷されたミトコンドリアのオートファジーによる品質管理 (マイトファジー) 不全 (図 1)、それに引き続く活性酸素種産生・シトクロムおよびミトコンドリア DNA の放出が、細胞傷害の発生機序として推察されている。本研究では培養癌細胞系 (イヌ肝細胞癌由来腫瘍細胞株) を SW のバイオアッセイ系として用い、SW による癌細胞傷害像を観察することで、SW 曝露による癌細胞増殖抑制機序およびマイトファジー障害による細胞死のメカニズムの解析をすることを目的とした。

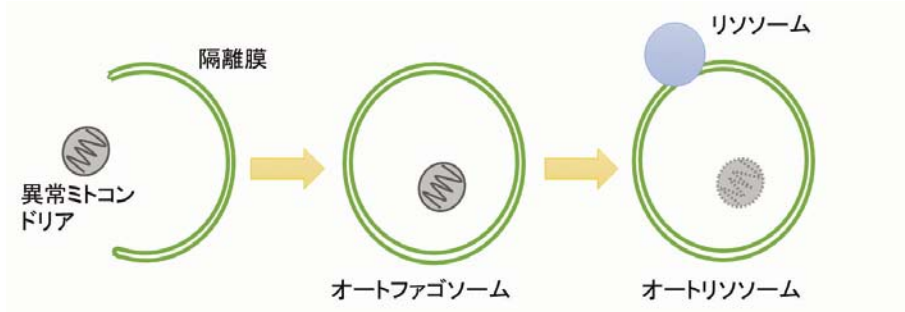


図 1 マイトファジー (損傷したミトコンドリアのクリアランス) の模式図

### 【材料および方法】

イヌ肝細胞癌由来腫瘍細胞株 (No.95-112: ヨーキー 雌 11 才 肝臓細胞癌腫瘍塊をヌードマウスに移植し、生着後に初代培養し細胞株を樹立)、腎尿細管上皮由来細胞 (ICR マウス 雌 5 週齢の腎を初代培養後の継代数 2 代目の細胞) をウシ胎子血清 (ニチレイ, 東京, 日本) 10% 加 Minimum Essential Medium (MEM) を培養液として用い、5% CO<sub>2</sub>, 37°C のインキュベーターで培養した。各培養細胞を用い、SW 未添加群および SW 添加群 (500  $\mu$ g/ml) を作製し、1, 3, 6 時間曝露を行い、細胞傷害像を光学および電子顕微鏡により観察した。また、免疫染色およびウエスタンブロット解析 (抗 LC3 抗体: オートファジーマーカー, Bioass Inc) (Lamp1: ライソ

°"ÜÚ"§"|#JPTT \*OD€\$P•ÛÄ-ĩÄæž内膜蛋白Ú"§" \$FMM 4JHOBMJOH 5FDIOPMPH  
細胞傷害•w活性酸素種 w関与w確認 whŠ免疫染色 ϕ抗 ÇÄé-žÊ³i抗体•活性酸素種傷害 %/"Ú"  
§"|\$04.0 #\*0 \$0 -5%|抗VQFSPYJEF EJTNUBTfϕ40%£抗体•活性酸素種分解酵素Ú"§"|4BC  
#JPUFDIOPMJHZ \*OD£)実施`h{異常ÛÄ-ĩÄæž)検出b"目的p|+\$ .JUPDIPOESJBM .FN  
"TTBž+\$U €\$BZNBO \$IFNJDBM \$PNQBOZ£)用Mh解析)実施`h{

2ALS'|βo³

- } 光学顕微鏡観察 w結果| È 肝細胞癌由来腫瘍細胞 S'| 腎尿管上皮由来細胞 Mc•tSMo< 48 w曝  
露時間 t 依存`o 細胞数 w減少 S'| 細胞質内 w空胞 w増加 U観察 ^•h\qT'|48 U細胞傷害)引V  
起\b\qU示唆^•h{
- } |"ÄÑ•'"Ú"§" -\$ )用Mh蛍光抗体法 px|48 w曝露時間 t 依存`o -\$ 陽性顆粒数 w細胞質  
内 w増加 U認 Š'•h{ ‡h| 電子顕微鏡 t'" 観察 px| |"ÄÑ•°1"Üqæ¹¹"Üw 膜融合障害  
)示唆 b" 像 U観察 ^•h{ \•'w 結果 T'|48 U初期 w|"ÄÑ•'"w 亢進 S'|fw 後 w|"Ä  
Ñ•'" w停滞)引V起\b\qU示唆^•h{
- } +\$ 解析 w結果|48 w曝露時間 t 依存`o 正常ÛÄ-ĩÄæžw 減少 S'| 異常ÛÄ-ĩÄæžw 増加 U  
観察 ^•h{ ‡h免疫染色 w結果| ÇÄé-žÊ³iS'| 40%w陽性顆粒 w増加 U認 Š'•h\qT'|  
48 t'"細胞傷害 t活性酸素種 U関与 b" \qU示唆 ^•h{

\$ y IT R ~ITtSZ" 48 .Đt'"Ú ÄÑ•'"È•wÜÜ\$

以上 w結果 T'| 4XBJOTPO細胞傷害 tx| |"ÄÑ•°1"Üqæ¹¹"Üw膜融合障害 t'"|"  
ÄÑ•'" 障害)背景 q`h| 損傷ÛÄ-ĩÄæžw«æžáïµ 異常ϕ Ú ÄÑ•'" 障害 £- 活性酸素 U関  
与`oM"\qU示唆^•hϕ図 ϑ

2€° Y³

- } 5BLFEFBU 4B\$M SFCFMMBS BUBYJB TRYQUBDRG EQBPMBCSDBVJDEXGZUF SO NPOH  
.FE 4DJ
- } -J FU B\$XBJOTPOJOF BDUJWBUFT NJUPDIPOESJB NFEJBUFE BQPQUPUJD C  
UIF HSPXUI PG MVOH DBODFS YFOPHSBGUT \*OU + #JPM 4DJ