

***in vitro*における有機スズを用いた胸腺リンパ球の細胞死誘導メカニズムの解析**

山口明子*¹⁾，富山健一¹⁾，佐山友里江¹⁾，牛田素子¹⁾，栗山孝雄¹⁾

中島晴信²⁾，松田芳和³⁾，荒川泰昭¹⁾

(¹⁾ 静岡県立大学・生体衛生学，²⁾ 大阪府立公衆衛生研究所，³⁾ 日本クリニック(株)中央研究所)

【目的】当研究室では，胸腺リンパ球および脳神経細胞の有機スズを用いた細胞死誘導実験系を *in vitro* で確立している。そして現在この系を用いてジブチルスズ (Bu_2Sn) やトリブチルスズ (Bu_3Sn) など有機スズ暴露による細胞死誘導経路の検討を行っている。また，*in vivo* の先行研究において， Bu_3Sn 暴露の場合は Caspase 依存型の細胞死 (アポトーシス) を誘発し， Bu_2Sn 暴露の場合は Caspase 非依存型の細胞死 (ネクロシス) を誘発することを明らかにしている。そこで本研究では，この *in vitro* の細胞死誘導実験系を用いて， Bu_3Sn によって誘導される Caspase 依存型の細胞死についてその誘導メカニズムの詳細な解析を試みた。

【方法】ラット (Wistar 系，雄性，3 週齢) より胸腺を摘出し，胸腺リンパ球を回収し初代培養を行った。この培養細胞に Bu_2Sn ならびに Bu_3Sn を 10^{-6}M 濃度となるように添加し，37 °C で 10，30，60，120 分間インキュベーションした。また Bu_2Sn 及び Bu_3Sn 暴露を行う前に Caspase9 の Inhibitor (Z-LEHD-FMK) を添加し 60 分間 37 °C インキュベーションを行い同様の操作を行った。次に，細胞より核及びミトコンドリアを分離し細胞質タンパク質を回収し，これを用いて Caspase 8 および Caspase 3 の活性量を定量した。さらに，この細胞質タンパク質を 15%SDS 電気泳動及びウエスタンブロットティングを用いて Cytochrome *c* の発現を解析した。

【結果及び考察】 Bu_2Sn と Bu_3Sn 添加 1 時間後の細胞内 Caspase 8 および Caspase 3 の活性量を測定した結果， Bu_3Sn 暴露では Caspase 8 および Caspase 3 の活性量の著しい増大がみられた。ちなみに， Bu_2Sn 暴露では各 Caspase の活性量は Bu_3Sn の 4 分の 1 程度であった。次に細胞質中の Cytochrome *c* の発現を解析したところ，両有機スズとも暴露 10 分後には Cytochrome *c* の発現がみられ始めたが，その発現量は Bu_2Sn 暴露では低く， Bu_3Sn 暴露において著しく高かった。そこで Caspase 9 の Inhibitor を用いて Caspase 9 活性を抑制したところ，これと連動して Bu_3Sn 暴露細胞の Caspase 3 活性量は 3 分の 1 程度まで減少した。また， Bu_3Sn 暴露では CAD の強い発現が確認され，かつその活性抑制因子である ICAD の発現はほとんど確認されなかった。ちなみに， Bu_2Sn 暴露では CAD の発現以外に ICAD の発現もみられた。また，遺伝子への関与も Bu_3Sn 暴露では CAD mRNA 発現は高く，ICAD mRNA 発現はほとんどみられなかった。以上の結果から， Bu_3Sn 暴露による Caspase 依存型の細胞死は Caspase 8 が直接 Caspase 3 を活性化させているのではなく，ミトコンドリアの活性化を経て Caspase 9 を活性化し，これが Caspase 3 を活性化させ，さらに CAD を活性化させて最終的に細胞死を誘導しているものと思われる。