

ヒト iPS 細胞のオートファジーに変化を与える食物 のファイトケミカル

笹沼いづみ*¹, 塚原崇*², 大橋彩登*¹, 重田亨耶*¹

Food phytochemicals modulating autophagy in human iPS cell

Izumi SASANUMA, Takashi TSUKAHARA, Ayato OHASHI, Kyouya SHIGETA

Phytochemicals such as polyphenols, steroid saponins, and polysaccharides are consumed as a food and are also widely used in traditional Chinese medicine. In this work, we define the roles of polyphenols, steroid saponins, and polysaccharides from kanpyo, dioscorea, and barley in the productions of β -glucosidase in iPS cells (iPSCs). First, we isolated polyphenols, steroid saponins, and polysaccharides from kanpyo, dioscorea, and barley, and iPSCs were treated by the isolated compounds. The polyphenols, steroid saponins, and polysaccharides stimulated the proliferation of iPSCs. The β -glucosidases in iPSCs were induced by the steroid saponins. On the other hand, the induction of β -glucosidases was inhibited by the polysaccharides and polyphenols. Our results indicate that the β -glucosidases involved in the metabolism of sphingolipids such as glucosylceramide are stimulated by the steroid glucosides and are inhibited by the polysaccharides and polyphenols. We conclude that the phytochemicals affect the production of β -glucosidases involved in the autophagy.

KEYWORDS: iPS cells, Phytochemicals, Autophagy.

1. 緒言

ファイトケミカルは植物が生産する生理活性物質である。これらには、配糖体化合物や多糖が含まれており、ヒトの細胞の分化や増殖、さらに抗がん作用などの生理活性が認められる。また、多糖類や配糖体化合物はオートファジーに必要な β -グルコシターゼの基質となるため、細胞に様々な影響を与える。

iPS 細胞は多様な組織や臓器の細胞に分化する能力とほぼ無限に増殖する能力をもつ。そして、この幹細胞は再生医療や創薬への応用が期待されている。

本研究では食物由来のファイトケミカル、特に多糖類、ポリフェノール、ステロイドサポニンに注目して iPS 細胞に及ぼす影響について検討した。

2. 材料及び方法

供試細胞：iPS 細胞 (PBRC-HPS003)。

供試植物：市販の干瓢、大麦、山芋を用いた。

iPS 細胞の培養：modified DMEM/F12 SUBSER-ESrP を培地として用いた。

細胞数の測定：MTT 法で行った。

形質変化観察：ギムザ液で染色した。

β -グルコシターゼ活性：サリシンを基質として測定、または活性染色で検出した。

プロテアーゼ活性：ゼラチンゼイモグラム。

糖鎖の検出：PAS。

タンパク質の分析：SDS-PAGE。

成分分析：吸収波長分析と TLC で行った。

β -グルカン定量：色素法で行った。

多糖の分子量測定：オストワルド粘度計を用いて測定した。

*1 物質工学科(Dept. of Materials Chemistry and Bioengineering), E-mail: sasaki@oyama-ct.ac.jp

*2 専攻科 物質工学コース(Materials Chemistry and Bioengineering, Advanced Course)

3. 結果

3. 1 干瓢ポリフェノールの iPS 細胞への影響

カンピョウのエタノール抽出物は iPS 細胞を無添加のコントロール培養に比較して著しく増殖させた (Fig. 1)。

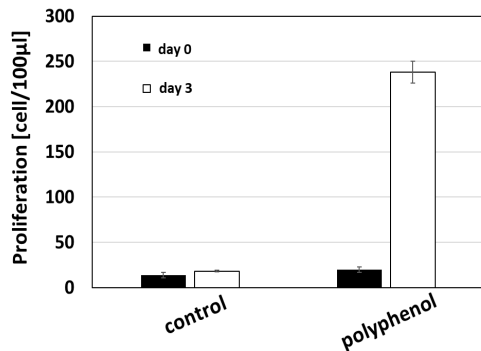


Fig. 1 Proliferative effect of the kanpyo extract on iPS cells. The kanpyo extract was added to iPS-cell culture and the number of cell was measured at the day 0 (filled bars) and day 3 (open bars).

β -グルコシターゼ活性は、0 日目に比べて 3 日目は細胞外の分解活性が低下し、細胞内の糖転移反応が高くなった (Fig. 2, 4(A))。この時の細胞では、カンピョウ抽出物を加えても形態の変化がなかった。

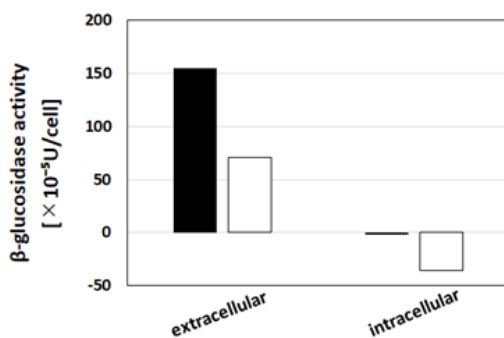


Fig. 2 The β -glucosidase activities of iPS cells inhibited by the kanpyo extract. The kanpyo extract was added to iPS-cell culture and the β -glucosidase activities were measured at the day 0 (filled bars) and day 3 (open bars).

糖鎖の変化では、細胞外で 225kDa、100kDa、62kDa のタンパク質の糖鎖が少なく、細胞内では 150kDa、75kDa の分子量のタンパク質に糖鎖が付加されていた (Fig. 3(B)(C))。ゼラチンゼイモグラムと GBA 活性染色では活性が見られなかったため、 β -グルコシターゼとプロテアーゼ活性が抑制されていることが明らかになった (Fig. 3(A)(D))。

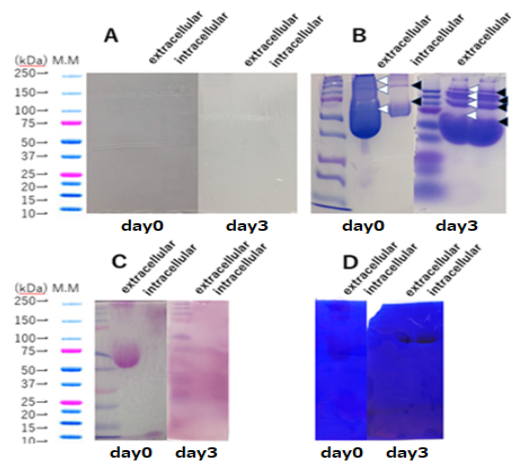


Fig. 3 The kanpyo extract modulates autophagy activity. The indexes of the autophagy activity are β -glucosidase (A), glycosylation of proteins (C) and proteinase (D). The SDS-PAGE for proteins from the iPS cells (B).

カンピョウのエタノール抽出物の主成分は Rf 値 0.76 であり、吸収は 290nm であった (Fig. 4)。

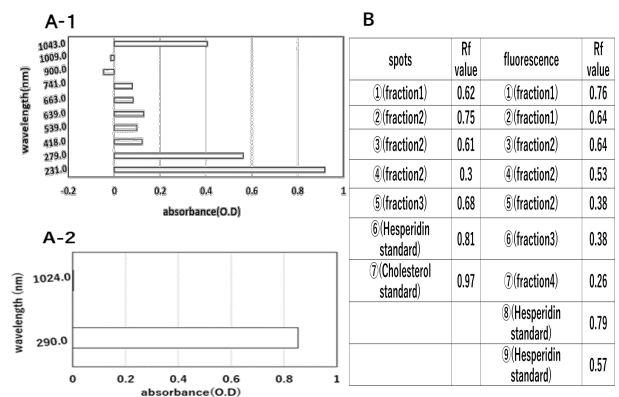


Fig. 4 Purification and identification of polyphenol from the kanpyo extract. A, Spectroscopic analysis of the crude extract (A-1) and the purified (A-2) extract. B, Thin-layer chromatography for the extract and Rf value.

3. 2 大麦多糖の iPS 細胞への影響

大麦のβ-グルカンを足場を用いて iPS 細胞を培養したところ、コントロールと比較して iPS 細胞の増殖率が大きくなった (Fig. 5)。β-グルコシダーゼ(GBA)活性は、day0 において細胞外では糖転移反応、細胞内では分解活性が見られ、day3 においては細胞内細胞外共に糖転移反応が認められた (Fig. 6)。

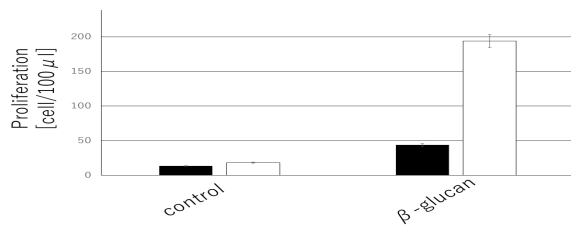


Fig. 5 Proliferative effect of the barley β-glucan on iPS cells. The barley β-glucan was added to iPS-cell culture and the number of cell was measured at the day 0 (filled bars) and day 3 (open bars).

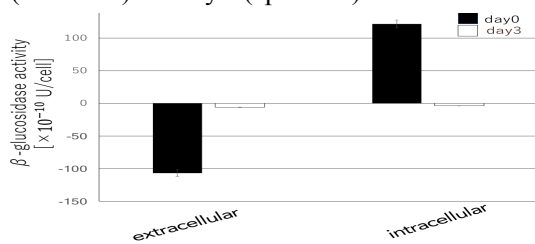


Fig. 6 The β-glucosidase activities of iPS cells inhibited by the barley β-glucan. The barley β-glucan was added to iPS-cell culture and the β-glucosidase activities were measured at the day 0 (filled bars) and day 3 (open bars).

また、native-PAGE では GBA 及びプロテアーゼの活性が認められなかった (Fig. 7)。そして、細胞の状態に変化がなかった。

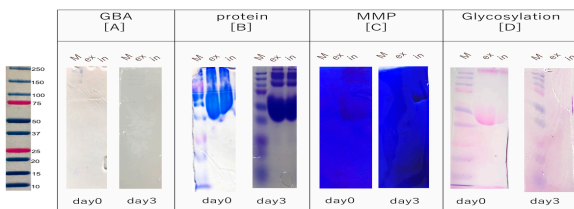


Fig. 7 The barley β-glucan modulates autophagy activity. The indexes of the autophagy activity are β-glucosidase (A), glycosylation of proteins (D) and proteinase (C). The SDS-PAGE for proteins from the iPS cells (B).

大麦の多糖を有機溶媒沈殿で分画 (Fig. 8(A))したところ、10%のイソプロパノール沈殿画分から、重合度約 13,000 のβ-グルカンが得られた (Fig. 8(B))。

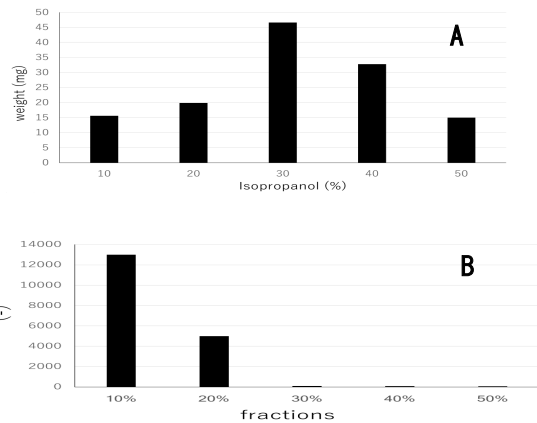


Fig. 8 Purification and characterization of the β-glucan from barley. A, Isopropanol fractionation. B, Molecular weight determination.

3. 3 山芋抽出物の iPS 細胞培養への影響

ニンジン、ヤマモモをアルカリ抽出物とエタノール抽出物に分画し、iPS 細胞に添加したところ、ヤマモモのエタノール抽出物を添加した培養で iPS 細胞の増加 (Fig. 9) とβ-グルコシダーゼ活性の増加 (Fig. 10)が確認された。

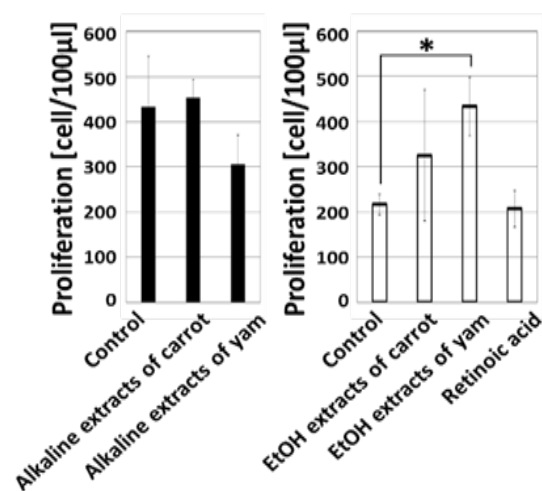


Fig. 9 The root crops extracts as growth factors for iPS cells. The results are expressed as the mean ± S.E.M. The differences (* p<0.01) were analyzed by t-test.

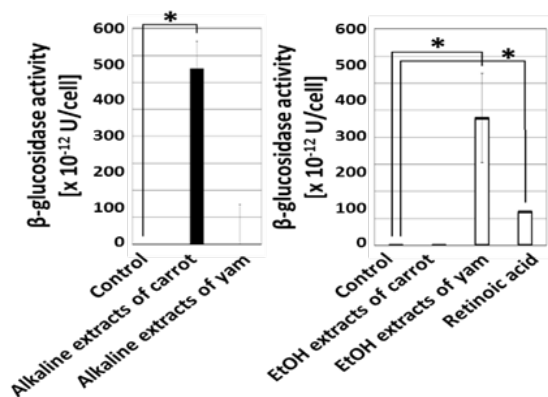


Fig. 10 Beta-glucosidases induced by root extracts in iPS cells. The results are expressed as the mean \pm S.E.M. The differences (* $p < 0.01$) were analyzed by t-test.

4. 考察

4. 1 干瓢ポリフェノールの iPS 細胞への影響

カンピョウのエタノール抽出物には、iPS細胞を増殖させる化合物が含まれていた。この化合物は、吸収波長とRF値からポリフェノール配糖体の一種であるフラボンCであると推定された。このポリフェノール配糖体は β -グルコシダーゼとプロテアーゼ活性を抑制することから、オートファジーを抑制すると推定された。フラボンは細胞内受容体であるステロイド受容体に作用し、細胞を増殖させることが知られている¹⁾。よって、カンピョウ抽出物に含まれるポリフェノールは糖部分が切断されて、細胞膜を透過して細胞内のステロイド受容体と結合することで細胞増殖を促進させたと推察された。

4. 2 大麦多糖の iPS 細胞への影響

大麦の β -グルカンを足場に用いてiPS細胞を培養したところ、細胞増殖率が大きくなり、 β -グルコシダーゼ及びプロテアーゼの活性が抑制された。これらの結果から、大麦 β -グルカンはiPS細胞のオートファジーを抑制すると考えられた。大麦から精製された β -グルカンは重合度13,000であり、この分子量のグルカンは動物細胞の様々な受容体に影響を与えることが知られ²⁾、その一つに

β -グルコシダーゼがある。 β -グルコシダーゼは細胞増殖因子の補助受容体として作用することが知られている³⁾。よって、本酵素が β -グルカン薄膜に接着し、増殖因子受容体を刺激したため細胞が増殖したと推察された。

4. 3 山芋抽出物の iPS 細胞培養への影響

ヤマモのエタノール抽出物に含まれる主成分はステロイドサポニンであり、diosgenin、dioscinとcoreajaponinが含まれる⁴⁾。この中で、dioscinとcoreajaponinは構造に β -グルコシド結合を有し、 β -グルコシダーゼの基質となりうる。山芋エタノール抽出物はiPS細胞を増殖させ、 β -グルコシダーゼ活性を上昇させた。これらのことから、ステロイドサポニンがiPS細胞の β -グルコシダーゼ活性によって、アグリコンであるdiosgeninに変化し、細胞膜を透過して細胞内のステロイド受容体に作用し、iPS細胞を増殖させたと考えられた。ステロイド受容体の一種であるエストロゲン受容体は、神経突起の形成をはじめとする神経分化において多様な役割を果たす。また、 β -グルコシダーゼが活性化されていたことから、オートファジーが活性化していることが推察できた。よってdiosgeninは、iPS細胞をステロイド受容体の活性化を通して、増殖・分化させると考えられた。さらに、dioscinとcoreajaponinが、 β -グルコシダーゼを誘導し、オートファジーを活性化して分化を促進させることが示唆された。

参考文献

- 1) E.Grotewold: The Science of Flavonoids, Springer Science+Business Media, LLC, USA, pp.213-257 (2008)
- 2) J.J.Volman, J.D.Ramakers, J.Plat: Dietary modulation of immune function by β -glucans, Physiology & Behavior 94 (2), pp. 276-284 (2008)
- 3) I.Urakawa, Y.Yamazaki, T.Shimada, K.Iijima, H.Hasegawa, K.Okawa, T.Fujita, S.Fukumoto, T.Yamashita: Klotho converts canonical FGF receptor into a specific receptor for FGF23, Nature 444, pp.770-774 (2006)
- 4) K.H.Kim, M.A.Kim, E.Moon, S.Y.Kim, S.Z.Choi, M.W.Son, K.R.Lee: Furostanol saponins from the rhizomes of *Dioscorea japonica* and their effects on NGF induction, Bioorg Med Chem Lett. 21(7), pp.2075-2078 (2011)

【受理年月日 2018年 9月12日】