

## マウス胚性幹細胞から心筋細胞への分化に及ぼす人参含有成分の効果

佐々木俊也,<sup>a</sup> 呉 基鳳,<sup>b</sup> 松岡英明,<sup>a,c</sup> 斉藤美佳子<sup>\*,a,c</sup>Effect of *Panax ginseng* Components on the Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells into Cardiac-like CellsToshiya SASAKI,<sup>a</sup> Ki-Bong OH,<sup>b</sup> Hideaki MATSUOKA,<sup>a,c</sup> and Mikako SAITO<sup>\*,a,c</sup>

<sup>a</sup>Department of Biotechnology and Life Science, Tokyo University of Agriculture and Technology, 2-24-16, Naka-cho, Koganei City 184-8588, Japan, <sup>b</sup>School of Agricultural Biotechnology, Seoul National University, 103 Seodun-dong, Kwonsun-gu, Suwon 441-744, Korea, and <sup>c</sup>Core Research for Evolutional Science and Technology (CREST), Japan Science and Technology Agency (JST), 4-1-8, Honcho, Kawaguchi City 332-0012, Japan

(Received August 29, 2007; Accepted November 20, 2007)

Bioactive compounds that may control the specific differentiation from mouse embryonic stem (ES) cells into cardiac-like cells have been screened from herbal medicines. Among seven preparations, *Panax ginseng* was found to promote the differentiation into beating cells and to sustain their beating for longer than the control. Active compounds were found in its water-soluble fraction. Although they were not isolated, their candidates were surveyed in 42 compounds selected from the database of *P. ginseng*. Finally we found that vitamin B<sub>12</sub> (VB<sub>12</sub>) and methionine were active. VB<sub>12</sub> accelerated the differentiation into beating cells and made the beating rate constantly 100%. Moreover, VB<sub>12</sub> was effective in the recovery of beating that was inhibited by spermine action. The mechanism of action of VB<sub>12</sub> is discussed in terms of the relevance of intercellular electrical signal transduction.

**Key words**—embryonic stem cell; cardiac-like cell; *Panax ginseng*; differentiation

## 序 論

胚性幹細胞 (ES 細胞) は、発生初期胚の内部細胞塊に由来するものであり、自己複製能と個体を形成するすべての細胞種へと分化できる多分化能を有する。したがって、ES 細胞から *in vitro* で、心筋細胞など様々な種類の細胞を分化誘導させ、それらを用いた細胞治療の可能性や安全性などに関する議論が盛んになされている。<sup>1-3)</sup> しかし、実際に細胞治療や移植に利用できるような、十分な純度と形状を持った細胞塊や組織を得ることは極めて難しい。分化過程を高精度に制御する分子機構の解明が強く求められている所以である。

われわれは、特に心筋細胞への分化を精密制御するために、マウス ES 細胞の分化培養系を用いて、

新規制御分子を探索している。そのリソースとして注目しているのが生薬である。生薬は、古くから様々の治療に利用されてきたことから分かるように、多くの薬理活性物質が含まれているはずであり、実際、今日までに単離され分子構造が明らかになった分子の種類は少なくない。<sup>4)</sup> そして、それ以外にも、いまだ同定されていない活性分子が数多く含まれているはずである。かつて、生薬から抗真菌活性物質を探索していたが、その際、自ら開発した高感度アッセイシステムを利用して探索した結果、多くに新規活性物質の存在を確認することができた。<sup>5-7)</sup> その経験に基づき、本研究でも、ES 細胞から心筋細胞への分化過程に影響を及ぼす新規物質の探索を行った。なお、アッセイ系としては、拍動率を指標とする常法によった。

## 材 料 と 方 法

1. 細胞培養 CD1 マウス由来初代線維芽細胞を Dulbecco's Modified Eagle's Medium (高グル

<sup>a</sup>東京農工大学大学院工学府生命工学専攻, <sup>b</sup>School of Agricultural Biotechnology, Seoul National University, <sup>c</sup>CREST, JST

\*e-mail: mikako@cc.tuat.ac.jp

コース, 10% FBS を含む) で 3 日間培養後, マイトマイシン処理を 3 時間行い, 0.1% トリプシンで分散しゼラチンコートした 35 mm ディッシュにコンフルエント状態になるように播種し, これをフィーダー細胞とした. 調製したフィーダー細胞上でマウス ES 細胞を CO<sub>2</sub> インキュベーターで 37°C にて 3 日間培養した. ES 細胞は 129 line/R-CMTI-1 を使用した. 培地は Dulbecco's Modified Eagle's Medium (高グルコース, 15% FBS, 1000 U/ml マウス LIF, 0.1 mM 2-メルカプトエタノール, 1 mM ピルビン酸, 0.1 mM 非必須アミノ酸を含む) を使用した.

**2. 分化誘導** ES 細胞を *in vitro* で分化させる際には, 未分化維持に必要な LIF を加えずに高密度になるまで培養するか, ディッシュに接着しないようにした液滴培養 (ハンギングドロップ法) 中で細胞塊を形成させるかすることによって, 二重の細胞層からなるボールのような胚様体 (embryoid body; EB 体) と呼ばれる球状の構造を形成させることが最も広く用いられている方法である.

この常法に従い, フィーダー細胞上で 3 日間培養した ES 細胞を 0.1% トリプシンで分散をしたのちに回収した. 800 cells/drop 又は 2000 cells/drop になるようにそれぞれハンギングドロップを作製し, CO<sub>2</sub> インキュベーターで培養を開始し, これを分化誘導培養 0 日目とした. 培地は Dulbecco's Modified Eagle's Medium (高グルコース, 15% FBS, 0.1 mM 2-メルカプトエタノール, 1 mM ピルビン酸, 0.1 mM 非必須アミノ酸を含む) を使用した. 2 日間培養し, EB 体を形成させたのち, 4 ウェルプレート各ウェルに 1 個ずつ EB 体を播種し, 24 時間後に, 各試料を含む培地に交換し培養, 観察を行った.

**3. 生薬粗抽出物の調製** 強心, 強壯作用が報告されている黄耆, 生姜, 天門冬, 百合, 人參, 地黄, 肉蓯蓉の 7 種類の生薬を選び, (株) 栃本天海堂より購入した.

5 g の各生薬に対して 50 ml の 60% アセトンを加えて 3 日間室温で静置し抽出した. この抽出液を濾別したのち, さらに 50 ml の 60% アセトンを加えて 2 日間静置し, 抽出を続けた. 同様に抽出液を濾別したのち, 初めの濾液と合わせ, これをエバポレーターで濃縮し, 凍結乾燥した. これを, 粗抽出

物とした. この粗抽出物に上記の培地を加えて, 最終濃度が 0.5 mg/ml, あるいは 1.0 mg/ml になるように調製して, 以後の活性試験に用いた.

7 種類の生薬のうち, 人參のみが活性を示した (後述) ので, さらに分画を進めた. すなわち, 粗抽出物をヘキサン, 酢酸エチル, 及び水で処理し, 各溶媒に抽出された画分について, 各々, 活性を調べた. また, 人參の含有成分に関するデータベースに基づき, 42 種類の非サポニン水溶性既知成分を選び, 各々について活性を調べた.

**4. 拍動率の算出法** ES 細胞から心筋細胞への分化の指標として拍動率を採用した. 拍動率は常法に従って以下のように算出した. 4 ウェルプレートの各ウェルに 1 個ずつ EB 体を播種し, ディッシュ上に接着を確認したのち, 生薬入り培地に換え, 観察を続けた. また, 適宜培地交換を行った. 毎日, 顕微観察 (IX70, オリンパス) により, EB 体の拍動の有無を調べた. EB 体をディッシュの底面に付着させて培養すると, 数日後に EB 体の一部が自律的に動き出し, 規則的に収縮する様子を見ることができると, EB 体の一部でも動き出したときに「拍動した」と判断する. 1 条件につき総数 (N<sub>0</sub>) 12-20 個の EB 体を用い, 拍動が観察された EB 体の数を N<sub>p</sub> とし,  $N_p/N_0 \times 100 (\%)$  を拍動率とした.

## 結 果

### 1. 生薬の拍動率及び形態学的変化に及ぼす影響

予備実験の結果, 人參抽出物を加えた場合は, 拍動が活発になり, より長期間拍動し続けるような印象を得た. しかし, 観察時間を決めて繰り返し実験を 3 回行ったところ, 2 回は有意差が認められたが, 他の 1 回は有意差が認められなかった. 一方, 人參抽出物を入れた場合は最長 85 日後でも拍動を続けた例が得られた (途中の観察記録は取得せず). しかし, コントロールでは約 40 個の EB 体で調べたが, 33 日以上拍動し続けたものは 1 個もなかった. 以上の結果から, 人參粗抽出物には, 拍動維持に効果のある物質を含んでいるのではないかと推察された. Figure 1 に有意差が得られた連続実験結果を 2 例示す. Figure 1(a)において, 生薬を含まないコントロールでは, 分化誘導培養 7 日目に初めて拍動が観察されたのち, 徐々に拍動率が上昇し,

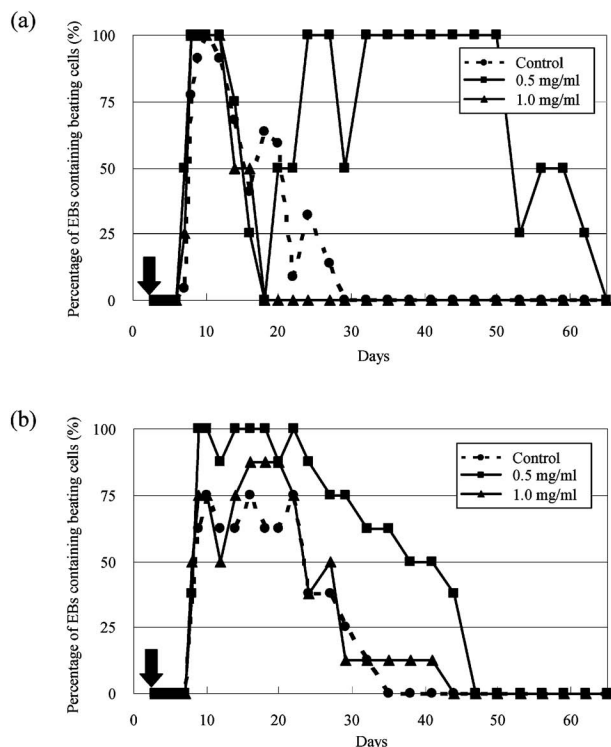


Fig. 1. Effect of the Acetone Extract of *Panax ginseng* on the Beating Rate of EBs

At the arrow, medium was replaced by a fresh medium containing *P. ginseng* extract.

10日目には拍動率は100%になった。一方、人参の粗抽出物(0.5 mg/ml)を添加した培地で培養した場合は、拍動率は9日目で100%に達した。

いったん、拍動開始したのち、その維持期間に対しても、人参粗抽出物の効果がみられた。すなわち、コントロールでは12日目以降14日目まで70%以上の拍動率を維持したものの、16日目からは減少し、29日目に拍動が停止した。これに対し、人参の粗抽出物を添加した培地で培養した場合は、29日目以降も拍動を維持し続けた。

Figure 1(b)においても、パターンは異なるものの、拍動維持期間を長くする効果があることが認められた。

一方、生姜、天門冬を添加した場合は、0.5 mg/ml, 1.0 mg/mlいずれの場合においても拍動は観察されなかった。黄耆は0.5 mg/mlの濃度ではコントロールと同程度の70-75%の拍動率を示したが、1.0 mg/mlではかえって拍動率は低下し、高々30-50%であった。百合、肉蓯蓉の場合は0.5 mg/mlの濃度では若干、拍動率を上昇させる傾向が認められたが、1.0 mg/mlではコントロールとほぼ同等であ

った。地黄はコントロールと比べ差がなかった。

2. 人参粗抽出物の各種溶媒で抽出及び各画分の活性 490 gの人参に対して1.5 lの60%アセトンを加えて3日間室温にて抽出した。この抽出物を濾別後、さらに1.5 lの60%アセトンを加えて2日間室温にて抽出を繰り返した。同様に抽出液を濾別したのち、初めの濾液と合わせ、エバポレーターにより濃縮し、凍結乾燥し、64.634 gの粗抽出物を得た。この粗抽出物に150 mlのヘキサンと150 mlの水を加え、各相で抽出した。ヘキサン相を分取したのち、残った水相にさらに150 mlのヘキサンを加え同様に抽出操作を繰り返した。ヘキサン相を分取し、初回の抽出分と合わせて、ヘキサン画分とした。引き続き、水相に150 mlの酢酸エチルを加え、抽出を繰り返して酢酸エチル画分を得た。得られたヘキサン画分、酢酸エチル画分、水画分の乾重量は、それぞれ1.116 g, 1.093 g, 40.345 gであった。

ヘキサン画分を作用させた場合は、拍動率は低かった。また、高濃度では、細胞に与えるダメージも増加した。すなわち、0.06 mg/ml及び0.12 mg/mlで作用させたところ、拍動率は高々40%程度であり、それも持続しなかった。酢酸エチル画分を作用させた場合は、拍動開始時期が早まったが、拍動率はコントロールと同程度であった。これに対して、水相画分を0.12 mg/ml、及び0.5 mg/mlで作用させた場合、拍動開始時期が早まり、また、特に0.12 mg/mlの場合は、拍動率も80%程度に達した。以上のことから、拍動を促進させる活性を示す成分は水画分のみが存在することが分かった。

### 3. 人参含有水溶性成分の心筋分化に及ぼす影響

人参に含まれている42種類の非サポニン水溶性既知成分について、拍動率に対する効果の有無を調べた結果、1) 拍動率に影響を及ぼさなかったものは、リノレン酸、ファルネソール、ピオチン、ニコチンアミド、リシン、フェニルアラニン、1,4-ブタンジアミン、アデニン、*n*-カプロン酸、ロイシン、システイン、2-ピロリドン、リンゴ酸、フマル酸の14種類であった。Figure 2(a)はリノレン酸の場合の結果である。

また、2) 拍動率がコントロールより低かったものは、スペルミン、アスパラギン酸、プロリン、マレイン酸、スピナシン、DL-バリン、ニコチンアミド、チロシン、フェルル酸、オイゲノール、硫酸イ

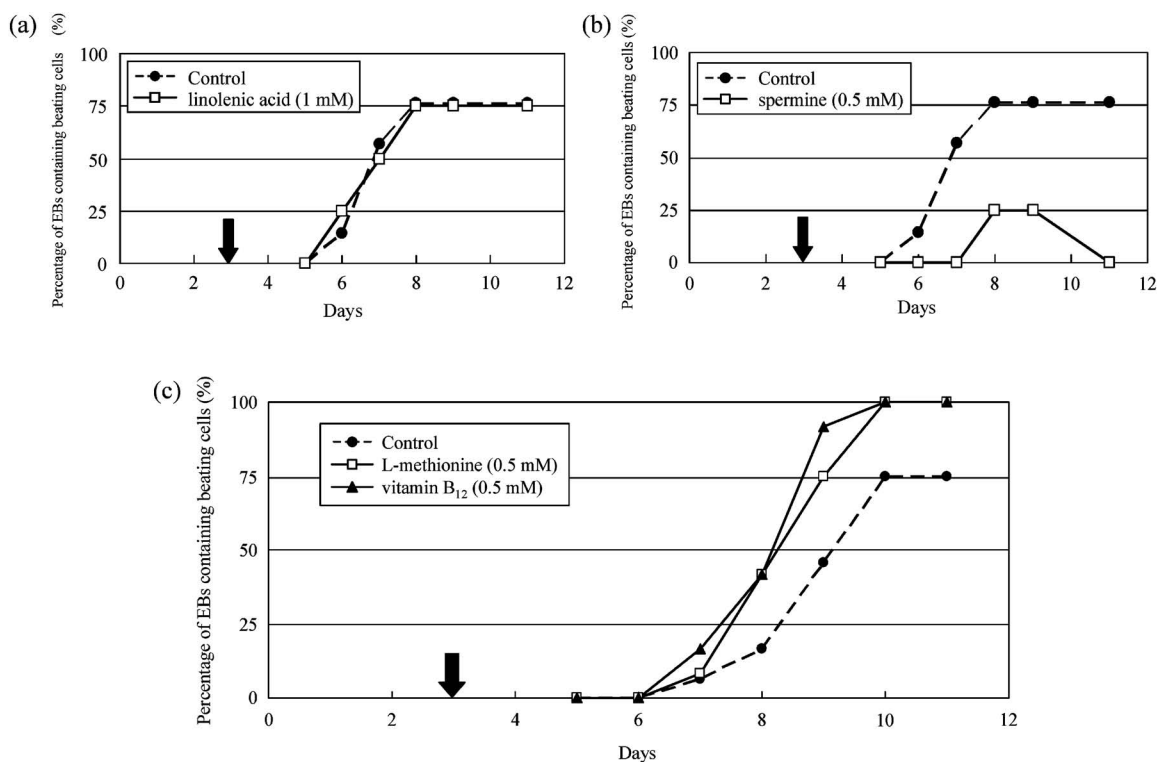


Fig. 2. Effects of Water Soluble Compounds that are Known to be Components of *P. ginseng* on the Beating Rate of EBs

(a) A case of no effect caused by linolenic acid action, (b) a case of inhibition effect obtained with spermine, (c) a case of promotive effect obtained with VB<sub>12</sub> and L-methionine. At the arrows, medium was replaced by a fresh medium containing respective compounds.

ソプロピル, ピラジンの 12 種類であった. Figure 2(b)はスペルミンを作用させた場合の結果である.

一方, 3) 拍動率がコントロールより高かったものは, ビタミン B<sub>12</sub> (VB<sub>12</sub>), メチオニン, コハク酸, グルタミン酸, イソロイシン, アルギニン, 塩化コリン, クエン酸, ピルビン酸, オレイン酸, インドール-3-酢酸, 葉酸, プロピオン酸イソブチル, ピログルタミン酸, 2-オキソグルタル酸, グアニンの 16 種類であった. したがって, 上記の水相画分には, これら 16 種類の物質が混在していた可能性がある. この 16 種類の中では, 特に, VB<sub>12</sub>, メチオニンの効果が顕著であった [Fig. 2 (c)]. そこで, VB<sub>12</sub>を選び, 拍動率に及ぼす効果について, さらに詳しく調べた. VB<sub>12</sub>の濃度を変化させたところ, 0.5 mM では顕著な効果が認められたが, より高濃度では, 逆に阻害効果が優勢になった (Fig. 3).

4. 拍動阻害作用後の回復過程に及ぼす VB<sub>12</sub> の効果 分化誘導培養 12 日目にスペルミン 1 mM を 1 日間作用させたところ, すべての EB 体の拍動が停止した. そこで, スペルミンを洗浄除去後,

VB<sub>12</sub>を含む培地を添加し, 拍動が再開する過程を観察した. その結果, 0.5 mM の VB<sub>12</sub>を作用させた場合は, コントロールよりも, 常に高い拍動率を示した (Fig. 4). さらに, 拍動が一度回復したのちにスペルミンをもう一度作用し拍動を停止させたのち, VB<sub>12</sub>によって拍動が回復するか調べたが, この場合は, コントロールとの差は認められなかった.

## 考 察

人参は, 生薬の中では最も多彩な薬理作用が報告されているものの 1 つであり, 古来, 様々な疾患の治療に用いられてきた. したがって, その薬理活性の多くは, 生物個体に投与して得られた症状の観察結果, 治療効果の評価, に基づいて見い出されてきたものである. 比較的高濃度に含まれているサポニンには, 例えば, 血圧の降圧作用,<sup>8)</sup> ヒト遅延整流性カリウムイオンチャンネルへの影響,<sup>9)</sup> 心的外傷に対する保護効果,<sup>10)</sup> 心筋細胞の代謝活性に及ぼす効果,<sup>11)</sup> などがある. 一方, サポニン以外の画分にも, 例えば, インスリン様作用を示す成分の存在が報告されている.<sup>12)</sup> そして, 今回新たに, 心筋細胞

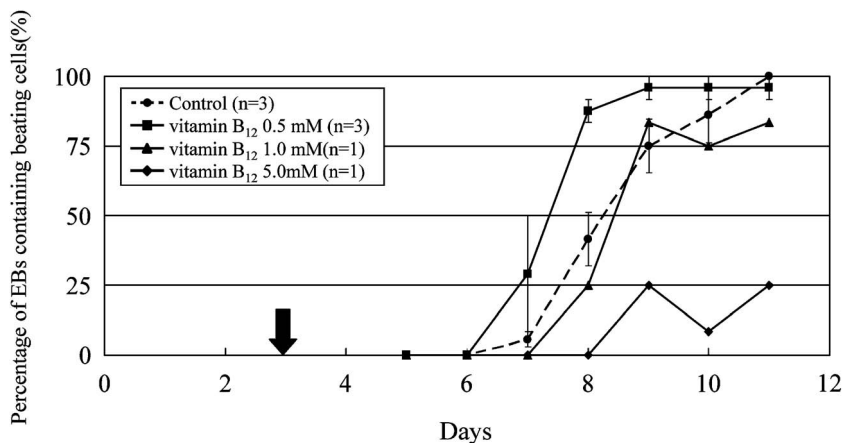


Fig. 3. Comparison of the Beating Promotion Effects Obtained with Different Concentrations of VB<sub>12</sub>. At the arrow, medium was replaced by a fresh medium containing respective concentration of VB<sub>12</sub>.

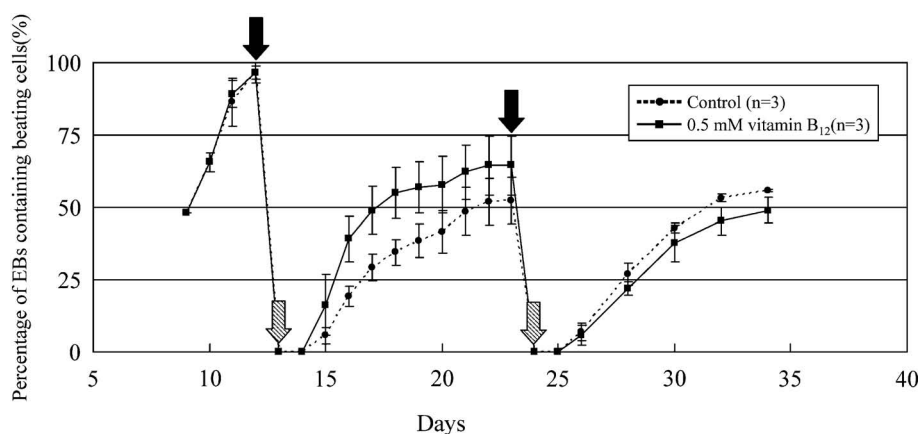


Fig. 4. Effect of VB<sub>12</sub> on the Recovery of Beating Activity that was Once Inhibited by Spermine Action. Spermine (1 mM) and VB<sub>12</sub> (0.5 mM) were added to the medium at black arrows and hatched arrows, respectively.

への分化促進, 及びその拍動活性の維持という, 心筋細胞に対する全く新しい効果が見い出された.

活性成分を追究する方法には, 拍動現象を指標にして分画精製を繰り返しながら直接その成分を得る方法と, 入手できる化学物質を網羅的に作用させて同様の効果を示すものを推定する方法があるが, 人参の場合は, その含有成分に関して膨大なデータが蓄積されているため, 本研究では, 後者の方法によった. その結果, 16種類が有望であり, さらにVB<sub>12</sub>の効果が顕著であることを見い出した.

VB<sub>12</sub>は哺乳類の生体内ではメチオニンシンターゼとメチルマロニル-CoA ムターゼの補酵素として働いており, これらの酵素を介して, 様々の代謝に関与している. 具体的には, 血液細胞の形成,<sup>13)</sup> 神経システムの維持,<sup>14)</sup> 急性心筋梗塞の患者における高ホモシステイン血症の症状軽減効果<sup>15)</sup>などが報告

されている. しかし, 細胞分化過程の制御に直接関与しているとの報告は見当たらない.

今回, 見い出されたVB<sub>12</sub>の効果では, 拍動細胞がはじめて現れるまでの培養時間は6日目でコントロールと変わらなかったが [Fig. 2(c)], いったん, 拍動細胞が現れたのちは, コントロールよりも速やかに拍動率が上昇した. コントロールでは2日後の8日目で高々40%であるのに対して, VB<sub>12</sub>を作用させた場合は85%以上に達した (Fig. 3). 同様な拍動率上昇の促進効果は, スペルミン処理によっていったん, 拍動が停止させたのちに, 再度回復する際にも観察された (Fig. 4).

拍動するためには, 1) 収縮性タンパク質ができることと, 2) それを駆動して自律的拍動するための電気化学的シグナル伝達系が必要である. 未分化な細胞では1), 2)ともに存在しないため, 拍動を

指標とすることで心筋細胞としての機能を有した細胞へ分化したと判断できる。

VB<sub>12</sub>の添加によって、コントロールに比べて早い時期に拍動率の上昇が認められたが、拍動領域はコントロールと同程度であった。このことは、VB<sub>12</sub>の作用により、収縮タンパク質が多く産生されたという訳ではなく、むしろ、ギャップジャンクションなどを形成することで電気化学的シグナル伝達系の構築が促進され、その結果、拍動開始時期が早まり、拍動率が高くなったのではないかと考えられる。このため、VB<sub>12</sub>によって得られた上記の効果は、1)よりも2)に対する効果の方が大きいのではないかと推察される。これまでに、ES細胞から心筋細胞への分化誘導因子として報告された物質はアスコルビン酸<sup>16)</sup>とカルディオゲノール<sup>17)</sup>ぐらいであるが、それらの効果は、いずれも収縮性タンパク質の合成に関する遺伝子に及ぼす効果であった。したがって、VB<sub>12</sub>の作用は、これらの物質とも異なる新しい効果と考えられる。

今回、観察されたVB<sub>12</sub>の有効濃度は0.5–1.0 mMであった。ペプチドホルモンや神経伝達物質などの有効濃度よりもはるかに高い濃度である。したがって、特異的レセプターを介しての作用、あるいは酵素のアクチベーターとしての作用など、化学的増幅を伴う作用ではなく、直接、代謝系で消費されて作用するような作用形式ではないかと想像される。また、有効濃度以上では効果が失われることから、標的反応系が、フィードバック制御を構成していることが推察される。このような作用形式は、これまでに報告されたVB<sub>12</sub>の作用形式とは異なるものである。

人参粗抽出物には、スペルミンのような拍動阻害物質も少なからず含まれていると思われる。したがって、阻害性物質をすべて除去し、有効成分のみを集め、それらを同時に作用させたならば、相乗効果によって、予想以上の高い効果が得られるかも知れない。

なお、本研究で用いているES細胞は既に樹立されたマウスES細胞である。マウスES細胞を樹立するためにはマウス受精卵及びマウス個体を使用するが、動物愛護の観点から動物を科学的利用に供する場合は、「3Rの原則(Replacement, Reduction, Refinement)」等に配慮するように努めなくてはな

らず、法律に基づいた適切な利用をしなくてはならないのは当然のことである。

**謝辞** 本報告は、科学技術振興財団(JST)の戦略的創造研究推進事業(CREST)による支援を得て実施された研究成果であり、JSTに対して深甚なる謝意を表する。

## REFERENCES

- 1) Lee S. H., Lumelsky N., Studer L., Auerbach J. M., McKay R. D., *Nat. Biotechnol.*, **18**, 675–679 (2000).
- 2) Hentze H., Graichen R., Colman A., *Trends Biotechnol.*, **25**, 24–32 (2006).
- 3) Krishna K. A., Rao G. V., Rao K. S., *Regen. Med.*, **2**, 171–177 (2007).
- 4) “Chuyaku Daijiten,” ed. by Shanghai Scientific and Technical Publishers, Shogakukan Inc., Tokyo, 1998.
- 5) Iida Y., Yonemura H., Oh K.-B., Saito M., Matsuoka H., *Yakugaku Zasshi*, **119**, 964–971 (1999).
- 6) Iida Y., Oh K.-B., Saito M., Matsuoka H., Kurata H., Natsume M., Abe H., *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 584–587 (1999).
- 7) Iida Y., Oh K.-B., Saito M., Matsuoka H., Kurata H., *Planta Med.*, **66**, 435–438 (2000).
- 8) Lee D. C., Lee M. O., Kim C. Y., Clifford D. H., *Can. J. Comp. Med.*, **45**, 182–187 (1981).
- 9) Kim C.-S., Son S.-J., Kim H.-S., Kim Y.-D., Lee K.-S., Jeon B.-H., Kim K.-J., Park J.-K., Park J.-B., *Acta Pharmacol. Sin.*, **26**, 551–558 (2005).
- 10) Ji Y. C., Kim Y. B., Park S. W., Hwang S. N., Min B. K., Hong H. J., Kwon J. T., Suk J. S., *J. Korean Med. Sci.*, **20**, 291–296 (2005).
- 11) Zhang J.-M., Matsuura Y., Sueda T., Orihashi K., *Transplant. Proc.*, **31**, 2175–2178 (1999).
- 12) Takaku T., Kameda K., Matsuura Y., Sekiya K., Okuda H., *Planta Med.*, **56**, 27–30 (1990).
- 13) Aslinia F., Mazza J. J., Yale S. H., *Clin. Med. Res.*, **4**, 236–241 (2006).
- 14) Tredici G., Buccellato F. R., Braga M., Cavaletti G., Ciscato P., Moggio A., Scalabrino G., *J. Neurol. Sci.*, **156**, 18–29 (1998).
- 15) Nusier M. K., El-Dwairi Q. A., *J. Health Sci.*,

- 
- 53, 16–22 (2007).
- 16) Takahashi T., Lord B., Schulze P. C., Fryer R. M., Sarang S. S., Gullans S. R., Lee R. T., *Circulation.*, **107**, 1912–1916 (2003).
- 17) Wu X., Ding S., Ding Q., Gray N. S., Schultz P. G., *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 1590–1591 (2004).