

## ゲニステインによる間葉系幹細胞分化制御の解析

平野 雄（管理栄養学科・教授）

### 【緒言】

我が国における骨粗鬆症の患者数は、現在1,300万人と言われ、今後、更に増加することが予想されている。骨粗鬆症は予防が重要であり、そのためには栄養学的な介入が不可欠である。栄養学的に重要と考えられる食品の一つに大豆がある。大豆および大豆加工食品には、脂質代謝の是正<sup>1,3)</sup>、発がん抑制<sup>4,7)</sup>、循環機能改善<sup>8)</sup>、抗炎症作用<sup>9)</sup>など様々な生理活性作用がある。これら大豆および大豆加工食品の作用は健康にとってプラス面が多く、様々な研究において、健康維持・増進、疾病予防に大豆および大豆加工食品を摂取することの有用性が示唆されている。

大豆には、大豆イソフラボンと呼ばれる化合物が含まれており、これら大豆イソフラボンは、エストロゲン様作用を有しているため<sup>10)</sup>、植物エストロゲンとも呼ばれる。我々日本人は日常的に大豆食品を摂取する機会が多く、これらのエストロゲン様作用を強く受けていると考えられる。代表的な大豆イソフラボンにゲニステイン（図1）があり、そのエストロゲン活性は $17\beta$ -エストラジオールのそれを1とした場合、0.00015である<sup>11)</sup>。ゲニステインにはエストロゲン様作用のほか、抗炎症作用、肝障害予防作用、心筋細胞再生促進作用など、生体に対する様々な生理活性作用がある。

本研究では、ゲニステインの心筋細胞再生促進作用に着目し、幹細胞の分化誘導の促進作用を有する可能性を考え、ゲニステインの幹細胞分化誘導作用の検討を試みた。特に、ゲニステインにはエストロゲン様作用があることを考慮し、骨細胞分化を中心に解析を実施し、骨粗鬆症予防に対する有用性の検討を行なった。

幹細胞とは、現在注目されているiPS細胞のように、未分化な状態を維持し、様々な刺激のもと、多様な細胞・組織へ分化する細胞で、生体には間葉系幹細胞と呼ばれる幹細胞が存在する。この細胞は、中胚葉性組織（間葉）に由来する体性幹細胞であり、間葉系細胞（骨細胞、筋肉細胞、脂肪細胞など）への分化能をもっている。間葉系幹細胞は、元々、体内に存在している細胞であるため、iPS細胞とは違い、発がんの危険性も無く、またES細胞のように倫理上の問題も存在しない。従って、再生医療への応用が期待されている。

今回の実験では、ヒト間葉系幹細胞に分化誘導刺激を与え、骨芽細胞に分化させ、その分化誘導過程にゲニステインが与える影響を解析した。その結果をもとに、臨床上の骨代謝疾患の治療および予防、ならびに再生医療におけるゲニステインの有用性を検討した。

一方、栄養学的な介入の方法としては、実際に被験者に投与してその効果を判定する方法があるが、その方法では時間がかかる、被験者への負担があるなどの様々な問題点がある。その問題点を回避するために、適切な組織モデルを構築し、実験室レベルで栄養学的な効果を判定できるシステムが存在すればよいが、現実には存在していない。そこで、今回、ゲニステインの骨芽細胞分化誘導効果を、ヒト間葉系幹細胞の単層培養で確認すると

ともに、ヒト間葉系幹細胞を用いた3次元骨組織構造の構築の可能性を追求した。

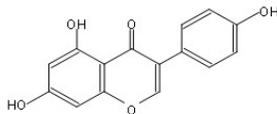


図1. ゲニステインの構造式

## 【方法】

### 1. 試薬類の調整

ゲニステインはナカライテスク（京都）より購入した。大豆イソフラボン<sup>1</sup>は Dimethyl Sulfoxide（DMSO、ナカライテスク）に溶解し、最終濃度 1、5、10 および 50  $\mu\text{M}$  となるように培地に添加した。コントロール群には vehicle として DMSO を添加し、すべての実験群において添加 DMSO は等量になるように調整した。

### 2. 細胞生存率の測定

被験細胞にはヒト間葉系幹細胞株 UBE6T-15（HSRRB、大阪）を用いた。維持培地として間葉系幹細胞用培地 MSCGM（ロンザジャパン、東京）を、骨芽細胞誘導培地として Osteogenic Differentiation Medium Bullet Kit（ロンザジャパン）を用いた。10% FBS（GIBCO-BRL、Grand Island、NY）添加 DMEM 培地（Sigma、St. Louis、MO）で調整した UBE6T-15 を 6-well 培養プレートに、 $2.5 \times 10^4$  cells / mL の細胞密度で播種した。24 時間培養後、ゲニステインが 1、5、10 および 50  $\mu\text{M}$  になるように調整した骨芽細胞誘導培地に交換し、さらに 48 時間培養した。細胞生存率の測定はトリパンブルー色素排除試験法（0.5% トリパンブルー溶液）（ナカライテスク）により行なった。

### 3. アルカリフォスファターゼ染色

細胞培養のサブカルチャーは細胞生存率の場合と同様の手順を進めた後、ゲニステインが 1 および 5  $\mu\text{M}$  になるように調整した骨芽細胞誘導培地に交換し、さらに 2 週間培養を継続した。培養後、培地を除去し、TRACP & ALP double-stain Kit（タカラバイオ、草津）を用いてアルカリフォスファターゼ染色を実施した。染色された細胞を光学顕微鏡（ECLIPSE TS100、ニコン、東京）下で観察した。

### 4. 3次元構造構築の可能性の検討

3次元構造構築の可能性を、hanging drop 法を用いて検討した。間葉系幹細胞成長培地にて培養中の UBE6T-15 を回収し、骨芽細胞分化培地を用いて  $5 \times 10^4$  cells / mL に調整し、15  $\mu\text{L}$  ずつ、100mm ディッシュの裏に貼り付けた（hanging drop 作製、図2）。1枚のディッシュ蓋に貼付する hanging drop はおよそ 30 滴とした。また、ディッシュには 3 mL 程度の Phosphate Buffer Saline（PBS）を、乾燥予防目的で添加した。hanging drop は作製後、CO<sub>2</sub> インキュベーター（37°C）内に 9 日間静置した。

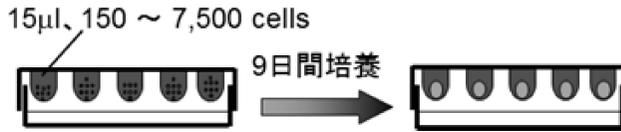


図2. hanging drop 作製の模式図

## 5. 統計解析

群間比較は SPSS statistical software ver. 14.0 (SPSS, Chicago, IL) を用いて行ない、 $p < 0.05$ をもって有意とした。結果は平均値±SD で記した。

### 【結果】

#### 1. 細胞生存率

細胞生存率の結果を図3に示した。5  $\mu\text{M}$  まではコントロールに比べ有意な差は認められなかったが、10  $\mu\text{M}$  以上では、生存率の有意な低下が認められた。よって、これ以降の骨芽細胞分化誘導実験には、5  $\mu\text{M}$  以下のゲニステインを用いることにした。

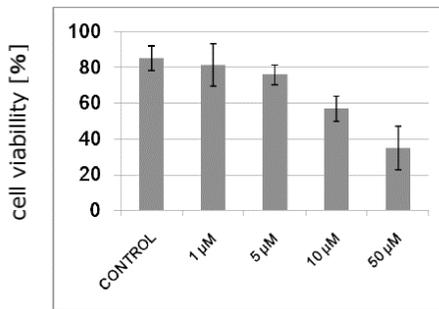


図3. ゲニステイン各濃度添加における細胞生存率 10  $\mu\text{M}$ 以上のゲニステインで細胞生存率の有意な低下が認められた。

#### 2. アルカリフォスファターゼ染色

アルカリフォスファターゼ染色の結果を図4に示した。

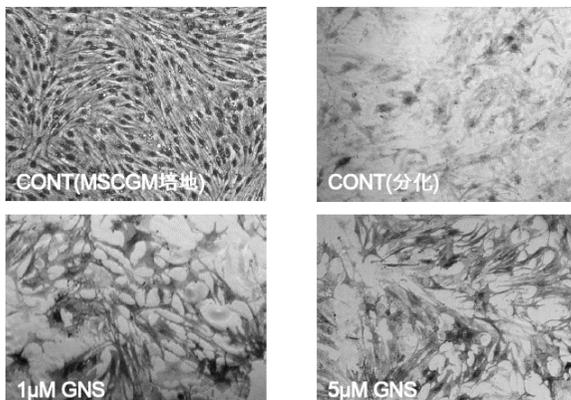


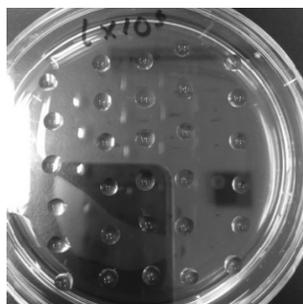
図4. アルカリフォスファターゼ染色の結果 ゲニステイン無添加で骨芽細胞分化誘導を行なった細胞 (CONT) に対し、1 および 5  $\mu\text{M}$  ゲニステイン添加細胞では、より著明に骨芽細胞への分化が認められた。

### 3. hanging drop形成

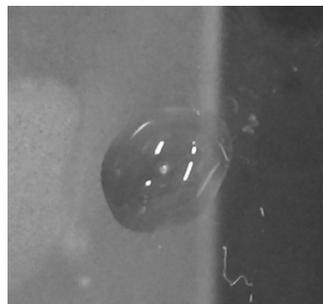
培養4日目では、 $5 \times 10^5$  cells / mLの細胞密度のhanging drop内で細胞塊が形成され、その形成率は100%であったが、他の細胞密度では形成が認められなかった。培養9日目の結果を表1に示した。培養9日目では、 $1 \times 10^4 \sim 5 \times 10^5$  cells / mL全ての範囲の細胞密度におけるhanging drop内で細胞塊が形成され、その形成率は100%であった。 $5 \times 10^5$  cells / mLの細胞密度のhanging drop内の細胞塊は逆に崩れ始め、その率は71.4%であった。崩れの状況を+で表し、より崩れが顕著であるものを++とした。hanging drop内に形成された細胞塊の様子を図5に示した。図5bと5cを比較して観察すると、細胞塊の崩れの状況を確認することが出来る。

表1. hanging drop内の細胞塊数及び崩れの状況

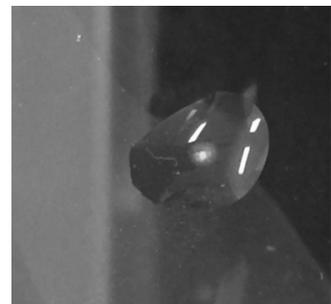
崩れ	マーク無し	$1 \times 10^4$	$1 \times 10^5$	$5 \times 10^4$	$5 \times 10^5$
-	24	30	30	34	35
+	3	0	0	2	5
++	0	2	8	8	20
割合(%)	12.5	6.7	26.7	29.4	71.4



a. 全体の様子



b. 形成された細胞塊



c. 崩れ始めた細胞塊(+)

図5. 9日培養後のhanging drop

#### 【考察】

骨代謝に関しては以下のようなことがこれまでに明らかになっている。骨量の維持、骨の強度などの物理的特性の持続および血中カルシウムバランスの維持を同時に円滑に行なうために、骨では骨吸収と骨形成が平衡を保って行なわれている。まず、破骨細胞が古くなった骨表面で骨組織の吸収を開始する。骨の吸収が進むと破骨細胞のもつ吸収能は低下し、やがて核が崩壊して消滅する。空間を察知して、骨表面にいる休止期の骨芽細胞が活動期に入り、コラーゲン産生やハイドロキシアパタイトの沈着を惹起して骨形成を開始する。骨形成を終えた細胞は、骨細胞となって骨中に埋まっていきカルシウム供給の緊急要請に備える。このように骨組織は、形成が完了した後も一生涯形成と再生を繰り返し、これを骨のリモデリングという。この骨代謝において、女性ホルモンであるエストロゲンが

大きくかかわっている<sup>12)</sup>。

以上のような観点から、本研究では、ゲニステインの骨芽細胞分化誘導に与える影響を解析した。ゲニステインには、エストロゲン様作用と同時に細胞分化促進作用が報告されているからである。その結果、まず、 $10\mu\text{M}$ 以上の濃度のゲニステインはヒト間葉系幹細胞に細胞毒性を有する可能性が示された。大豆・大豆製品に含まれる大豆イソフラボンは、抗酸化作用<sup>1)</sup>、<sup>13)</sup>、発がん抑制作用<sup>4-7)</sup>、肝機能・循環機能改善作用<sup>8)</sup>など、生体にとってプラスの作用を多く有していることが知られている。表2に2014年および2015年に発表されたゲニステインの生体に対する作用・効果をまとめた。これらの報告の多くは、 $10\mu\text{M}$ 以下の濃度で解析されており、その事実と合わせ、本実験でも $10\mu\text{M}$ 以下での解析が妥当と考えられた。

表2. ゲニステインの生体に対する作用・効果 (2014年および2015年)

作用・効果	概要	論文
発がん作用	ゲニステインによるエストロゲン代謝への影響が乳癌リスクを高める。	Gheldiu et al. 2015 <sup>14)</sup>
アルツハイマー予防効果	ゲニステインは神経シナプスでの伝達作用の阻害要因に対し、抑制的に働く。この作用は、アルツハイマー病の予防に効果があると考えられる。	Xi et al. 2015 <sup>15)</sup>
抗炎症作用	ゲニステインは ROS / Akt / NF- $\kappa$ B 経路を阻害し、AMPK 活性化を促進することにより TNF- $\alpha$ による炎症を抑えている。関節リウマチ治療にゲニステインが有効である。	Li et al. 2014 <sup>16)</sup>
感染予防効果	緑膿菌の肺胞上皮細胞への細胞接着と細胞侵入はゲニステインによって阻害された。	Buommino et al. 2014 <sup>17)</sup>
肝障害予防効果	LPS / D-GalN 誘導肝障害に対するゲニステインの防御効果は主に抗炎症反応に対する NF- $\kappa$ B のシグナル伝達経路をブロックし、肝細胞死を低下させることによる。	Lin et al. 2014 <sup>18)</sup>
癌治療効果	ゲニステインは胃癌幹細胞の幹細胞性を減じ、胃癌細胞の腫瘍形成能低下、胃癌細胞の抗癌剤感受性上昇を導いた。	Huang et al. 2014 <sup>19)</sup>
	ゲニステイン誘導体は、放射線療法による EGFR 活性化を阻害し、放射線感受性大腸癌に有効な治療併用薬となる。	Gruca et al. 2014 <sup>20)</sup>
心筋再生能促進作用	内皮コロニー形成細胞をゲニステインで前処理すると心筋梗塞治療効果が高まる。	Lee et al. 2014 <sup>21)</sup>
骨吸収抑制作用	ゲニステインは RANKL 処理による破骨細胞の分化を、酸化ストレスを低減することで抑制した。	Lee et al. 2014 <sup>22)</sup>

本実験で行なった、ゲニステイン  $1$  および  $5\mu\text{M}$  での解析結果では、ゲニステインの骨芽細胞分化誘導作用が確認できた。ただし、これはアルカリフォスファターゼ染色による実験結果のみでの結論であり、遺伝子レベルでの分化誘導は未確認である。今後は、骨分化に関連する遺伝子群の発現解析も実施し、遺伝子レベルでの分化誘導促進作用の有無を確認したい。

以上のように、本研究では、ゲニステインのヒト間葉系幹細胞の骨芽細胞への分化に与

える促進作用を確認できた。では、今回の実験で用いた $5\mu\text{M}$ の大豆イソフラボンを摂取するためにはどの程度の量の大豆・大豆加工食品を摂取すればよいのか。ゲニステイン $5\mu\text{M}$ は日本人の日常的な大豆摂取時のゲニステイン血中濃度と同等か、やや高い値である。食品安全委員会の調査報告<sup>23)</sup>によれば、男性6名に大豆粉を溶かした飲料( $6.3\mu\text{mol}/\text{kg}$ 体重)を摂取させた場合の最高濃度は $4.09 \pm 0.94\mu\text{M}$ であった。本研究で用いた $10\mu\text{M}$ はこの最高濃度とほぼ同じか、やや高い値と言える。食品に換算すると、例えば摂取した大豆中のゲニステインの20%が体内に吸収され、そのすべてがゲニステインに変換されたとし、循環血液量を $5\text{L}$ として計算すると、概算で豆腐およそ1.5丁(1丁 $300\text{g}$ )、納豆およそ3パック(1パック $45\text{g}$ )の摂取が必要となる。即ち、間葉系幹細胞の骨芽細胞への分化を促進するために食品中から $5\mu\text{M}$ の大豆イソフラボンを摂取しようとする通常よりやや多めの大豆食品を摂取しなければならず、場合によってはサプリメントとして摂取する必要がある。

一方、ヒト間葉系幹細胞を分化誘導することで3次元骨組織構造を再現できるか否かの試みについては、細胞塊の形成が認められたことで、その可能性が示されたと考えられる。通常の単層培養の場合、間葉系幹細胞を骨芽細胞へと分化誘導するには1~2週間の培養期間が必要となる。そこで、今回の実験では最長9日までの観察を行なった。本研究では、すべての細胞密度で細胞塊が認められたが、細胞密度最大の $5 \times 10^5 \text{ cells}/\text{mL}$ では、細胞塊の崩れも認められた。従って、 $1 \times 10^5 \text{ cells}/\text{mL}$ が至適細胞密度であると考えられた。

hanging dropの作製については、当研究室でも、これまでにマウスES細胞を用いて、拍動を有する細胞塊(EB ball)をhanging dropによって作製したことがある<sup>24)</sup>。ES細胞を $3.3 \times 10^4 \text{ cells}/\text{mL}$ に調整し、 $15\mu\text{L}$ ずつdropにして培養ディッシュの裏側に貼付すると、6日後にEB ballが完成している。この場合、内腔が形成された構造を取っていた。本研究でも、この方法に準じて骨形成ボール(当研究室では、bone formation-like ballと命名、以下BF ball)を作製し、骨形成を促進する、あるいは抑制する食品因子を検索するためのシステムの構築を試みた。その結果、BF ball形成の可能性を示すことができた。

しかしながら、これが、本研究で求めているBF ballであるか否かは、組織形態を確認しないと判断できない。今回の研究では、そこまで確認することができなかったが、今後、その点も含めて解析していく必要がある。

## 【まとめ】

ここまでの研究で、 $5\mu\text{M}$ 以下の濃度のゲニステインがヒト間葉系幹細胞の骨芽細胞への分化に促進的に働くことが示された。今後は、その促進作用を、遺伝子レベルも含め、さらに補強できるようなエビデンスを積み重ねるとともに、そのメカニズムの解明にも着手する予定である。また、ヒト間葉系幹細胞を特定の条件下で培養すると、細胞塊を形成することが明らかとなった。ただ、その細胞塊が骨組織を形成しているか否かの検討は、今回できなかったため、今後研究を進めていく必要がある。今後は、ヒト間葉系幹細胞から3次元骨組織を構築する方法を確立し、その構築過程における食品因子、特にゲニステインなどの影響を解析することで、骨粗鬆症の発症予防に有効な食生活の有り方を模索していきたい。

## 【文献】

- 1) Hodgson JM, Croft KD, Puddy IB, Mori TA, Beilin LJ. Soybean isoflavonoids and their metabolic products inhibit in vitro lipoprotein oxidation in serum. *J. Nutr. Biochem.* 7: 664-669 (1996)
- 2) Torre-Villalvazo I, Tovar AR, Ramos-Barragan VE, Cerbon-Cervantes MA, Torres N. Soy protein ameliorates metabolic abnormalities in liver and adipose tissue of rats fed a high fat diet. *J. Nutr.* 138: 462-468 (2008)
- 3) Frigolet ME, Tprres N, Uribe-Figueroa L, Rangel C, Jimenez-Sanchez G, Tovar AR. White adipose tissue genome wide-expression profiling and adipocyte metabolic functions after soy protein consumption in rats. *J. Nutr. Biochem.* 22: 118-129 (2011)
- 4) Lee HP, Lee J, Gourley L, Duffy SW, Day NF, Estève J. Dietary effects on breast-cancer risk in Singapore. *Lancet* 337: 1197-1200 (1991)
- 5) Mahmoud AM, Zhu T, Parray A, Siddique HR, Yang W, Saleem M, Bosland MC. Differential effects of genistein on prostate cancer cells depend on mutational status of the androgen receptor. *PloS One* 8: e78479 (2013)
- 6) Fritz H, Seely D, Flower G, Skidmore B, Fernandes R, Vadeboncoeur S, Kennedy D, Cooley K, Wong R, Sagar S, Sabri E, Fergusson D. Soy, red clover, and isoflavones and breast cancer: A systematic review. *PloS One* 8: e81968 (2013)
- 7) Chen M, Rao Y, Zheng Y, Wei S, Li Y, Guo T, Yin P. Association between soy isoflavone intake and breast cancer risk for pre- and post-menopausal women: A meta-analysis of epidemiological studies. *PLoS One* 9: e89288 (2014)
- 8) Ruetten H, Thiemermann C. Effects of tyrophostins and genistein on the circulatory failure and organ dysfunction caused by endotoxin in the rat: a possible role for protein tyrosine kinase. *Br. J. Pharmacol.* 122: 59-70 (1997)
- 9) Jeong JW, Lee HH, Han MH, Kim GY, Kim WJ, Choi YH. Anti-inflammatory effects of genistein via suppression of the toll-like receptor 4-mediated signaling pathway in lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglia. *Chem Biol Interact.* 212C: 30-39 (2014)
- 10) Messina M. Insights gained from 20 years of soy research. *J. Nutr.* Doi: 10.3945/jn.110.124107. (2010)
- 11) Yost EE, Meyer MT, Dietze JE, Meissner BM, Worley-Davis, Williams CM, Lee B, Kullman SW. Comprehensive assessment of hormones, phytoestrogens, and estrogenic activity in an anaerobic swine waste lagoon. *Environ. Sci. Technol.* 47: 13781-13790 (2013)
- 12) 西井易穂, 森井浩世, 江澤郁子, 小島至 カルシウムと骨 40-59,142 (2001)
- 13) Mann GE, Rowlands DJ, Li FY, de Winter P, Siow RC. Activation of endothelial nitric oxide synthase by dietary isoflavones: Role of NO in Nrf2-mediated antioxidant gene expression. *Cardiovasc. Res.* 75: 261-274 (2007)
- 14) Gheldiu AM, Popa DS, Loghin F, Vlase L. Oxidative metabolism of estrone modified by genistein and bisphenol A in rat liver microsomes. *Biomed Environ Sci.* 28: 834-838 (2015)
- 15) Xi YD, Zhang DD, Ding J, Yu HL, Yuan LH, Ma WW, Han J, Xiao R. Genistein inhibits

- A  $\beta$  25-35-induced synaptic toxicity and regulates Ca MKII/CREB pathway in SH-SY5Y cells. *Cel Mol Neurobiol.* (2015)
- 16) Li J, Li J, Yue Y, Hu Y, Cheng W, Liu R, Pan X, Zhang P1. Genistein suppresses tumor necrosis factor  $\alpha$ -induced inflammation via modulating reactive oxygen species/Akt/nuclear factor  $\kappa$  B and adenosine monophosphate-activated protein kinase signal pathways in human synoviocyte MH7A cells. *Drug. Des. Devel. Ther.* 8: 315-323 (2014)
  - 17) Buommino E, Di Domenico M, Paoletti I, Fusco A, De Gregorio V, Cozza V, Rizzo A, Tufano MA, Donnarumma G. Alpha(v)beta5 integrins mediates *Pseudomonas fluorescens* interaction with A549 cells. 19: 408-415 (2014)
  - 18) Lin X, Zhang S, Huang R, Wei L, Liang C, Chen Y, Lv S, Liang S, Wu X, Huang Q. Protective effect of genistein on lipopolysaccharide/D-galactosamine-induced hepatic failure in mice. *Biol. Pharm. Bull.* 37: 625-632 (2014)
  - 19) Huang W, Wan C, Luo Q, Huang Z, Luo Q. Genistein-inhibited cancer stem cell-like properties and reduced chemoresistance of gastric cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 15: 3432-3443 (2014)
  - 20) Gruca A, Krawczyk Z, Szeja W, Gryniewicz G, Rusin A. Synthetic genistein glycosides inhibiting EGFR phosphorylation enhance the effect of radiation in HCT 116 colon cancer cells. *Molecules* 19: 18558-18573 (2014)
  - 21) Lee SH, Lee JH, Asahara T, Kim YS, Jeong HC, Ahn Y, Jung JS, Kwon SM. Genistein promotes endothelial colony-forming cell (ECFC) bioactivities and cardiac regeneration in myocardial infarction. *PLoS One* 9: e96155 (2014)
  - 22) Lee SH, Kim JK, Jang HD. Genistein inhibits osteoclastic differentiation of RAW 264.7 cells via regulation of ROS production and scavenging. *Int. J. Mol. Sci.* 15: 10605-10621 (2014)
  - 23) 大豆イソフラボンを含む特定保健用食品の安全性評価の基本的な考え方、食品安全委員会、2006
  - 24) Yamashita, A, Asahi, J, Takaki, M, Nakashima, T, Kamiwada, K, Watanabe, S, Murakami, D, Hirano, T. Effects of ethanol on mouse embryonic stem cell differentiation. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.*, 7 (5), (2015)