ワサビ成分の神経細胞分化促進活性に関する研究

福　家　洋　子（都立短期大学健康栄養学科教授）

1. はじめに

日本独特の香辛料であるワサビの辛み成分が，微生物の生育抑制効果をもつことからこの成分であるアリルイソチオシアナート（AIT，CH_2＝CH-CH_2＝N＝C＝S）を利用した食品の保存法等が開発されている。著者らは，ワサビ成分の抗菌性以外の生理的活性に関する研究を進めてきた。その過程で，ワサビの水抽出画分を95℃以上10 min 加熱した試料中に強い抗腫瘍活性をもつ成分が存在することを見い出した[1]。活性成分検索のターゲット細胞としてヒト胃癌細胞由来のMKN-28細胞を用いて，ワサビに存在する抗腫瘍成分の1つを同定し，その構造を決定した[2]。**Fig.1** に示すように分子量205の6-メチルスルフィニルヘキシルイソチオシアナート（6-MITCと略）であった。この成分は，沢ワサビ特有の香りを構成する成分の1つであることが報告されている[3]。またこの成分は，多少の辛みを有しているがワサビのあのツーンとくる辛み成分の主成分ではない。

また，ワサビと同じアブラナ科のブロッコリーからは，メチル基が2分子少ない同族体のスルフォラファン［4-(メチルスルフィニル）ブタンイソチオシアナート］（4-MITCと略）が単離・同定されている[4]。Zhangらは，4-MITCが肝臓の第二相解毒酵素であるキノンレダクターゼ誘導活性をもち，ラットでの乳ガンの重量減少や遅延効果を報告している[5]。著者らもワサビの6-MITCもまたキノンレダクターゼ誘導活性をもつことを発表し[6]，マウスでの実験腫瘍転移系を使い，超微小転移の段階で肺における増幅遺伝子を検出するという転移検出系によって，ワサビの6-MITCが転移を抑制することを報告している[7,8]。

このようにワサビ成分（6-MITC）の種々の培養細胞への影響を検討する過程で，未分化芽球であるK-562 細胞が形態的変化を示したことから，6-MITCが細胞の分化誘導に何らかの影響を及ぼすと推察され，本研究を開始した。

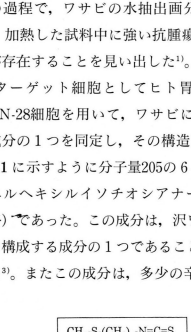


Fig. 1　ワサビ・ブロッコリーの活性成分

実験方法

1. 細胞系および培養

K-562細胞：慢性骨髄性ヒト白血病細胞。未分化芽球で，顆粒球・赤血球・マクロファージ・巨核球などへ分化誘導可能な多能性幹細胞である。

培養は，RPMI1640培地（シグマ社）にFBS（牛胎児血清：コスモバイオ）を10%濃度で添加し，37℃，5%CO_2インキュベーター内で行った。

PC-12細胞：ラット副腎髄質褐色細胞からクロ

ーン化。NGF（神経成長因子）の添加により数日で肥大し，扁平となり長い神経線維を伸ばす。神経細胞に類似した形態をとる。副腎髄質のクロム親和性細胞は，発生段階の細胞分化の系譜からすれば，末梢神経系の仲間と考えられ，種々の性質を備えている[9]。

培養は，RPMI 1640培地に非働化した10%HS（馬血清：コスモバイオ）および5%FBS を添加し，培養した。

なお分化誘導実験では，RPMI 1640培地に組織培養用添加剤 RD-1（極東）を加え，無血清培地を使用した。

2．試料および試薬

沢ワサビの抗腫瘍成分である 6-(methylsulfinyl) hexyl isothiocyanate (6-MITC) およびブロコリーに見出された 4-(methylsulfinyl) butyl isothiocyanate (4-MITC) は，化学合成品（白鳥製薬）を使用した。なお CH_3-SO-(CH_2) n-NCS の基本構造は，同じであるがメチル基の長さが細胞の変化に影響を与えるのではないかと考え，メチル基の長さ（n=2，8）についても合成し，一部実験に用いた。つまり，n=2，4，6，8 のイソチオシアナートが準備された。神経成長因子（NGF）は，Chemicon International Inc. 製マウス顎下腺由来2.5S を使用した。コラーゲンは，新田ゼラチン㈱生物化学研究所製組織培養用コラーゲンタイプ I-A を使用した。

結果および考察

1．K-562細胞の形態変化に及ぼす影響

回収された細胞を1.0×10^5/ml に調製し，96ウエルマイクロプレートに100μl ずつ播種し，1時間後に各試料を添加した。FBS の量は，5%に減じて培養し24，48時間培養後の影響を調べた。

Table 1 に K-562細胞の48時間後の顕微鏡写真から算出した形態変化の結果を示した。形態的変化を **Fig. 2** に示したが，試料添加細胞では，細胞が明らかに長形になった。この細長い細胞は，膜染色，核染色によって生細胞であることを確かめている。分化誘導剤であるハービマイシン A による細胞の変化と類似していた。また核染色によって核の大きさを比較したが，おおきな差は見られなかった。

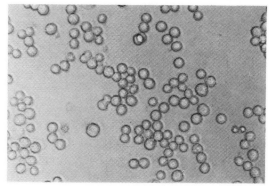
形態変化の程度は表下に示すように 3 段階とし

Table 1　6-MITC による K-562 細胞の形態変化

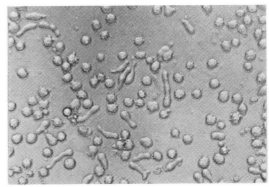
<48h 後>

6-MITC (μg/ml)	1.0	1.5	2.0	3.5	5.0
n=2	—	—	—	D	D
n=4	—	—	+	++ (21.1%)	D
n=6	—	—	+++ (33.1%)	D	D
n=8	—	++ (21.9%)	D	D	D

−　形態変化 0～10%以下　　D　細胞死
+　11～20%
++　21～30%
+++　30%以上



RPMI 培地＋FBS 5%



RPMI 培地＋FBS 5%
＋6-MITC (2μg/ml)

Fig. 2　K-562 細胞の形態変化

た。試料濃度が高くなると強い細胞毒性により細胞は，死滅するが，濃度を下げてゆくと細胞の分化を促進するものと考えられた。メチル基の長さによる影響を見ると，n=4，6，8の中では，細胞毒性の強さに比例した結果となった。n=2では，24時間の時点で，わずかながら形態変化が観察されていた。

2．PC-12細胞の分化誘導に及ぼす6-MITCの影響

2.1 PC-12細胞に対する細胞増殖抑制活性

ワサビの6-MITCは，抗腫瘍成分として研究されたものであり，強い細胞毒性を有している。分化誘導実験を行うにあたり，試料濃度を決定するためにPC-12細胞に対する細胞増殖抑制活性を調べた。生細胞数の測定は，MTTアッセー[10]により行った。結果を**Fig.3**に示した。この結果より，6-MITCを10μM以上に設定すると細胞の死滅する割合が高まることから，本実験では，2.0および5.0μMの条件とした。

2.2 NGF添加量と神経線維数の変化

48ウエルプレートをコラーゲンコートした後，PC-12細胞を2×10^4/mlに調製し，各ウエルに0.5mlずつ分注し培養した。24時間後にNGFを0・50・100ng/mlになるように添加した。培養12日目に神経様樹状突起の変化を撮影し，顕微鏡写真から神経線維の長さを測定し3段階に分けて表した（**Fig. 4**）。50，100ng/mlでの神経線維の伸展は，顕著であった。100μmまでの長さでは，NGFの添加量が50ng/mlの方が高いくらいであった。6-MITCの影響を調べる実験では，NGF量を50ng/mlと設定した。結果を示していないが，細胞数は，神経線維数と反比例した。

2.3 6-MITCによるPC-12細胞の分化誘導促進効果

PC-12細胞を無血清培養し，24時間後にNGF（50ng/ml）および6-MITCを添加し培養を行った。なお，培養4日ごとに培地および添加試料は，交換された。培養12日目の測定値を**Fig. 5**に示した。結果は，NGF 50ng・NGF+6-MITC（2μM）・NGF+6-MITC（5μM）の3実験を比較したものである。NGFおよび6-MITC（5μM）が存在する実験区が，神経線維数が高くなった。6-MITCが2μMでは，差が見られずさらに添加量の検討が必要である。また

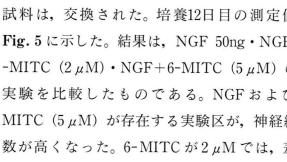


Fig. 4　NGF添加量と神経線維伸展

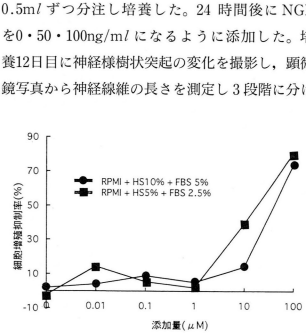


Fig. 3　6-MITCの細胞増殖抑制率

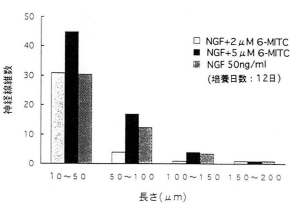


Fig. 5　6-MITCの神経線維伸展に及ぼす影響

写真を割愛したが，培養6日目の神経線維の伸展が始まる時点では，両者の差がさらに顕著であった。

なぜ，6-MITC を加えると NGF 存在下で神経樹状突起の伸展が，促進されるのか？そのメカニズムの検討のために，さらにこの研究を続けたいと願っているところである。

ワサビの 6-MITC の抗腫瘍活性の研究では，他機関との研究によってそのメカニズムが推定できそうな段階にある。この抗腫瘍活性の成果が，細胞の分化促進のメカニズム解明のヒントになるのではと期待しているところである。

PC-12細胞を NGF 存在下で培養した際について，先述した形態的変化とともに機能的変化も詳しく調べられている[9]。オルニチン脱炭酸酵素の増大，アセチルコリン受容体の増大とアセチルコリンエステラーゼの変化，Ca や Na チャネルの機能調節，他がある。現在 6-MITC や 4-MITC による PC-12細胞の分化促進効果を生化学的機能変化の面から実験を進めている。

われわれ日本人が，長い間食べ続けてきた貴重な香辛料であるワサビに抗菌性以外に新たな生理活性が明らかになってきたことは，大変興味あることであり，世界にアピールしたいと考えている。今回の研究結果は，高濃度では，がん細胞をも死滅させる成分が，低濃度では，神経細胞系の分化に何らかの影響を与えるのではないか。ということを期待させるものである。

終わりに臨みまして，本研究に多大な研究助成をいただきました浦上・食文化振興財団に心より感謝申しあげます。

またワサビという日本独特の香辛料が素材であったことで海外の研究者に追われずにすんでいることも幸いしています。

文　献

1) 福家洋子，大石芳江，岩下恵子，小野晴寛，篠原和毅：日本食品科学工学会，41，709 (1994)
2) 小野晴寛，足立恵子，福家洋子，篠原和毅：日本食品科学工学会　43，1092-1097 (1996)
3) H. Etoh, A. Nishimura, R. Takasawa, A. Yagi, K. Saito, K. Sakata, I. Kishima and K. Ina: *Agric. Biol. Chem.* 54，1587-1589 (1990)
4) Y. Zhang, P. Talalay, C. G. Cho and G. H. Posner: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89，2399-2403 (1992)
5) Y. Zhang, TW, Kensler, C-G Cho, GH Posner and P. Talalay: *Proc.. Natl. Acad. Sci. USA*, 91，3147-3150 (1994)
6) Y. Fuke, Y. Haga, H. Ono, T. Nomura and K. Ryouyama: *Cytotechnology*, 25，197-203 (1997)
7) 福家洋子，芳賀良子，沢木佐重子，野村孝弘，鉾山一雄：日本癌学会 (1997) 9月 京都
8) 沢木佐重子，福家洋子，芳賀良子，野村孝弘，鉾山一雄：日本食品科学工学会，(1998) 8月　札幌
9) 畠中　寛：発生と分化のモデル-クロム親和性細胞とPC-12細胞- 医学のあゆみ　140，5-8 (1987)
10) 細胞トキシコロジー試験法：日本組織培養学会編，p98，朝倉書店 (1991)

Induction of differentiation in K-562 leukemia cells and PC-12 pheochromocytoma cells by 6-(methylsulfinyl)-hexyl isothiocyanate of wasabi (*Eutrema wasabi* Maxim.)

Yoko Fuke (Department of Food Science & Human Nutrition, Tokyo Metropolitan College)

Wasabi (*Eutrema wasabi* Maxim.) is a very popular spice in Japan which exhibits physiological attributes such as anti-microbial activity and the inhibition of platelet aggregation.

Synthetic 6-(methylsulfinyl)hexyl isothiocyanate (6-MITC, a potent antiproliferative principal from wasabi) slightly inhibited the induction of mouse skin tumors in a two-stage process of carcinogenesis, but the effect was not significant. However, 6-MITC did significantly inhibit the mutation of skin resulting from topical applications of the carcinogens.

When a murine hepatoma cell line, Hepa 1c1c7, was treated with 6-MITC, it augmented the induction of quinone reductase, a phase 2 detoxification enzyme (Cytotechnology, 25, 197-203, 1997). A low concentration of 6-MITC was also found to induce morphological changes in K-562 human leukemia cells.

PC-12 rat pheochromocytoma cells are widely used as target cells of nerve growth factor (NGF) in order to induce differentiation of PC-12 cells. When PC-12 cells were treated with 6-MITC (5μM) and NGF (50ng/ml), the neurites were longer and more numerous than obtained following treatment with NGF only.

These results suggested that 6-MITC might be effective for inducting the differentiation of nerve stem cell lines or the development of PC-12 cells into neurite-bearing cells.