

乾しいたけエキスによる PC-12細胞の増殖効果の検討

藤岡 竜太¹⁾ 岡本 昭¹⁾ 永野 明宏²⁾ 森川 拓弥²⁾ 柴田 弘紀²⁾

Growth responses of PC-12 cells to dried Shiitake (*Lentinula edodes*) extract

Ryuta FUJIOKA¹⁾ Akira OKAMOTO¹⁾ Akihiro NAGANO²⁾
Takuya MORIKAWA²⁾ Hiroki SHIBATA²⁾

【要 旨】

大分県では乾しいたけの生産が盛んに行われており、本研究ではその乾しいたけエキス（乾しいたけ抽出物）に着目した。乾しいたけエキスはラットを使用した動物実験で肥満予防に効果がある報告もされているため、動物細胞の1つであり神経分化のモデルとしても使用されているラットの副腎髄質褐色腫より単離されたPC-12細胞を使用して栄養学の観点から増殖効果の検討を行った。市販されている冬菇（どんこ）と香信（こうしん）の2種類で乾しいたけエキスの細胞増殖効果を検討した。無血清培地で培養した結果、生細胞では冬菇と香信の両種類で、低濃度では濃度依存的に細胞増殖の低下が認められた。さらに同濃度では香信よりも冬菇で細胞毒性が低下し、低濃度（0.045%）の冬菇を暴露した細胞では死細胞の割合が低下した。また、神経成長因子（NGF）暴露による神経突起伸長の変化はコントロールの蒸留水と比較すると伸長の低下が認められ、細胞から伸びる神経突起の数が増えた。このことから、乾しいたけエキスは細胞増殖の栄養分にもなり、神経突起伸長に影響を与えている可能性が示唆された。

【キーワード】

乾しいたけ 冬菇 香信 PC-12 神経成長因子

1. 緒言

日本で栽培されているきのこの1つにしいたけ (*Lentinula edodes* : Shiitake) がある。しいたけには、ダシのうま味成分の1つであるグアニル酸やアミノ酸など含まれており、乾しい

たけを戻す際に抽出される乾しいたけエキスはさまざまな料理に使用されている。しいたけはさまざまな疾患にも関与しており¹⁾、乾しいたけエキスはマウスの実験では肝疾患を改善する効果も報告されている²⁾。ラットを使用した実験では、しいたけに含まれるエリタデニンが血中コレステロールの代謝に影響し、低下させる

1) 別府大学短期大学部食物栄養科

2) 九州大学生体防御医学研究所ゲノミクス分野

働きがあることから肥満予防が期待できる効果もある³⁾。また、免疫細胞を使用した実験でも乾しいたけエキスにより、免疫細胞の増殖が認められ、免疫系に影響を与えることが示唆され⁴⁾⁻⁵⁾、免疫増強効果の報告もされている⁶⁾。

本研究では神経分化の研究に用いられるラットの副腎髄質褐色腫 PC-12細胞を使用して細胞毒性や神経成長因子 (NGF) による神経突起伸長の変化を検討した。PC-12細胞を使用したアミノ酸暴露による報告⁷⁾⁻⁸⁾もされており、乾しいたけエキスがPC-12細胞の栄養分として寄与するか、神経突起伸長の観点から神経分化に影響するかの2点について調べ、神経疾患への応用が期待できるか検討した。

2. 試料・試薬

乾しいたけ

- ・冬菇 (大分県内で購入) 50 g
- ・香信 (大分県内で購入) 50 g

細胞培養

- ・PC-12細胞 (副腎髄質褐色細胞腫)
理研 Cell bank より購入
37℃のCO₂インキュベータ (アズワン) を使用し株化された細胞を継代培養した。
- ・細胞培養用培地の組成
MEM (Minimum Essential Medium) (Gibco) 500 ml
Fetal Bovine Serum (Mediatech Inc.) 56.8 ml
Penicilline Streptomycin (Gibco) 5.68 ml
NEAA 5.68 ml

細胞実験用試薬

- ・Cell Counting Kit-8 (Dojindo)
- ・Cytotoxicity LDH Assay Kit WST (Dojindo)
- ・NGF (Nerve growth factor)

細胞実験測定用器具

- ・位相差顕微鏡 (Primovert Zeiss 社)

- ・蛍光測定用プレートリーダー (iMark Bio Lad 社)
- ・-80℃超低温フリーザー (KANOU LAB -80℃)

軸索伸長測定関連試薬

- ・神経成長因子 (神経成長因子-β (NGF-β / β-NGF), ヒト組換え体 富士フィルム 和光純薬 (株))

3. 方法

乾しいたけ (冬菇、香信の2種類) 50 gを500 mlの蒸留水に24時間浸して、乾しいたけエキスの原液を抽出した (図1:冬菇、図2:香信)。フィルター (DISMIC-25CS ADVANTEC 社) 処理した後、4℃で保存した。保存後、96wellのマルチウェルプレートを使用し、通常の血清培地を用いてPC-12細胞を24時間培養した。24時間後、無血清培地に変更し、表



図1. 冬菇の乾しいたけエキス



図2. 香信の乾しいたけエキス

表1. 乾しいたけエキス原液の割合

乾しいたけエキス終濃度 (%)	0	0.045	0.091	0.136	0.182	0.227	0.341	0.455
乾しいたけエキス原液 (冬菇、香信) (μl)	0	1	2	3	4	5	7.5	10
蒸留水 (μl)	10	9	8	7	6	5	2.5	0
無血清培地 (μl)	210	210	210	210	210	210	210	210
合計 (μl)	220	220	220	220	220	220	220	220

1の割合で暴露して、さらに24時間培養を試みた。

上記の表1の割合で24時間暴露後、マイクロプレートリーダーによる吸光度の測定(生細胞: 450 nmと630 nmの2波長、死細胞: 490 nmと630 nmの2波長)を行った。PC-12細胞は接着細胞であるため、上清100 μlは死細胞の評価に使用するCytotoxicity LDH Assay Kit-WSTを使用し、細胞も含めた残りは生細胞の評価に使用するCell Counting Kit-8を使用して評価した。また、並行して、継代培養したPC-12細胞に20 ng/mlに濃度調整した神経成長因子を暴露して、暴露後の神経突起伸長の変化を調べた。神経突起伸長の測定方法は報告されている文献^{9)~10)}を参考にして調べた。細胞体の長さより長い神経突起20本を選択し、長さを測定して分化に神経突起が影響しているかを調べた。表2はその20本の平均値を示している。

4. 結果

冬菇と香信による生細胞の増殖の変化を調べた結果を図3に示した。また、死細胞を調べた

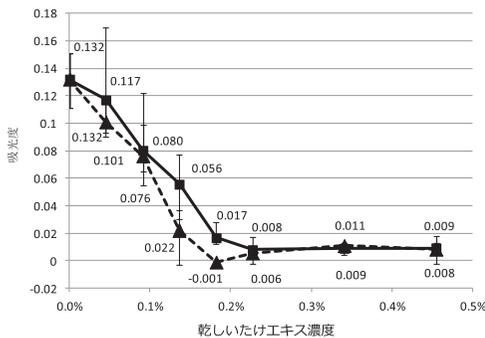


図3. 乾しいたけエキスが生細胞に与える影響 (—■—: 冬菇 --▲--: 香信)

結果を図4に示した。3回ずつ調べ、その平均値の吸光度を縦軸に示している。濃度は終濃度である。

冬菇、香信ともに濃度依存的に生細胞の増殖が低下した(吸光度が高いと生細胞の割合が多い)。冬菇と香信を比較すると、香信より冬菇で細胞毒性が低下していた(図3. 0% - 0.182%)。このことから乾しいたけエキスはPC-12細胞の生存に影響している可能性がある。また、Cytotoxicity LDH Assay Kit WSTを使用して死細胞の測定も同様に行った。死細胞に関しては、香信よりも冬菇で細胞毒性が低下する結果が得られた。そして、冬菇では、低濃度(0.045%)では死細胞の割合が低下する結果も確認された。

次に神経成長因子を暴露した細胞の形態について位相差顕微鏡を用いて調べた、その結果、冬菇(図5)と香信(図6)ではコントロールの蒸留水(図7)や血清培地(図8)と比較して神経突起伸長による変化が確認された。細胞から伸びる神経突起の本数を数えたところ、コントロールの蒸留水、血清培地と比較して、冬菇、香信ともに数が増加していた(表2)。ま

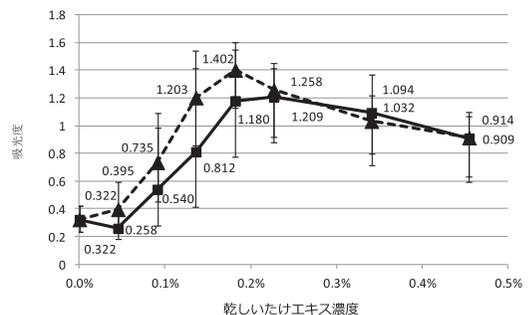


図4. 乾しいたけエキスが死細胞に与える影響 (—■—: 冬菇 --▲--: 香信)

た、コントロールと比較して神経突起の最大伸長の長さは低下していた(表2)。このことから、乾しいたけエキスが神経突起伸長に影響を与えている可能性が考えられる。また、細胞から伸びる神経突起の枝分かれについて確認したところ乾しいたけエキスを暴露した神経突起で枝分かれの箇所が増える結果が得られた。また目視による確認だが乾しいたけエキスを暴露した神経突起には瘤の形態が多数確認された。

5. 考察

乾しいたけエキス暴露により乾しいたけエキスが神経分化モデルとして使用される PC-12

細胞の細胞増殖に影響を与えることがわかった。特に低濃度の乾しいたけエキスでは死細胞の割合が低下したこと、細胞培養の栄養分として応用できる可能性が示された。また、神経突起伸長の変化が認められた。乾しいたけエキスが神経突起伸長や形態に影響を与えている可能性が考えられる。低濃度だと細胞増殖や神経突起伸長に影響を与えていることから、低濃度で暴露させた PC-12細胞の遺伝子を調べ、発現量の検討、および1時間ごとなどの時間変化による神経突起伸長の測定を実施し、乾しいたけエキスの有効性を検証したいと考えている。

表2. 神経突起伸長数と神経突起の長さ (n=20)

	神経突起伸長数 (細胞からの本数)	神経突起 最大長 (μm)	神経突起 最短長 (μm)	細胞体 最大直径 (μm)	細胞体 最小直径 (μm)
冬菇	3.8	6.2	2.04	5.5	3.65
香信	4	6.21	1.48	5.83	4.04
コントロールの蒸留水	2.65	6.65	1.78	5.06	2.96
血清培地	3.15	9.43	2.48	6.76	4.04

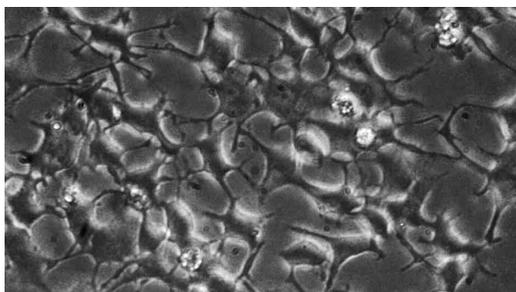


図5. PC-12細胞の神経突起 (冬菇)

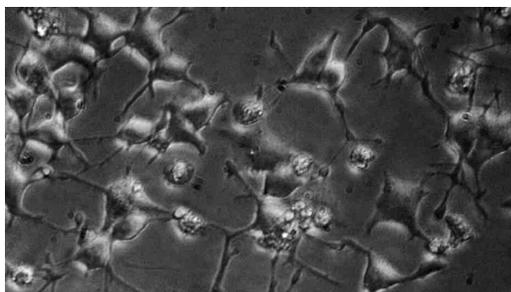


図6. PC-12細胞の神経突起 (香信)

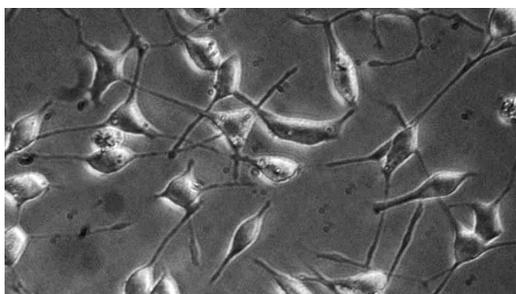


図7. PC-12細胞の神経突起 (コントロールの蒸留水)

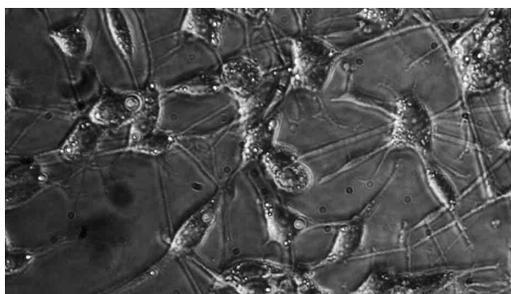


図8. PC-12細胞の神経突起 (血清培地)

6. 謝辞

本研究は2019年度別府大学短期大学部の学長裁量経費（R1短6）により実験遂行することができました。感謝申し上げます。

7. 参考文献

- 1) Nguyen AH, Gonzaga MI, Lim VM, Adler MJ, Mitkov MV, Cappel MA. Clinical features of shiitake dermatitis: a systematic review. *Int J Dermatol*. 56(6):610-616(2007).
- 2) Chandra LC, Smith BJ, Clarke SL, Marlow D, D'Offay JM, Kuvibidila SR. Differential effects of shiitake- and white button mushroom-supplemented diets on hepatic steatosis in C57BL/6 mice. *Food Chem Toxicol*. 49(12):3074-80(2011).
- 3) Handayani D, Chen J, Meyer BJ, Huang XF. Dietary Shiitake Mushroom (*Lentinus edodes*) Prevents Fat Deposition and Lowers Triglyceride in Rats Fed a High-Fat Diet. *J Obes*. 2011: 258051(2011).
- 4) Shin MS, Park HJ, Maeda T, Nishioka H, Fujii H, Kang I. The Effects of AHCC®, a Standardized Extract of Cultured *Lentinula edodes* Mycelia, on Natural Killer and T Cells in Health and Disease: Reviews on Human and Animal Studies. *J Immunol Res*. 2019: 3758576(2019).
- 5) Gaullier JM, Sleboda J, Øfjord ES, Ulvestad E, Nurminiemi M, Moe C, Tor A, Gudmundsen O. Supplementation with a soluble β -glucan exported from Shiitake medicinal mushroom, *Lentinus edodes* (Berk.) singer mycelium: a crossover, placebo-controlled study in healthy elderly. *Int J Med Mushrooms*. 13(4):319-26(2011).
- 6) Vetvicka V, Vetvickova J. Immune-enhancing effects of Maitake (*Grifola frondosa*) and Shiitake (*Lentinula edodes*) extracts. *Ann Transl Med*. 2(2):14(2014).
- 7) Sano A, Shi H, Suzuki R, Shirataki Y, Sakagami H. Change in Amino Acid Pools During Neuronal Differentiation of PC12 Cells. *In Vivo*. 32(6):1403-1408(2018).
- 8) Zielke HR, Tildon JT, Kauffman FC, Baab PJ. Effect of nerve growth factor on the synthesis of amino acids in PC12 cells. *J Neurosci Res*. 22(4):418-24(1989).
- 9) Wang S1, Watanabe T, Noritake J, Fukata M, Yoshimura T, Itoh N, Harada T, Nakagawa M, Matsuura Y, Arimura N, Kaibuchi K. IQGAP3, a novel effector of Rac1 and Cdc42, regulates neurite outgrowth. *J Cell Sci*. 120(Pt4):567-77(2007).
- 10) Kamata Y, Shiraga H, Tai A, Kawamoto Y, Gohda E. Induction of neurite outgrowth in PC12 cells by the medium-chain fatty acid octanoic acid. *Neuroscience*. 146(3):1073-81(2007).