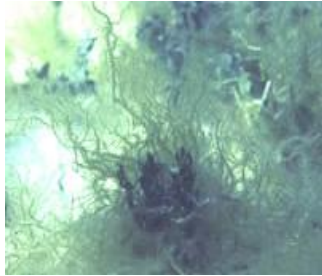


酵素消化低分子化フコイダン 抽出物によるガン細胞特異的 アポトーシス誘導

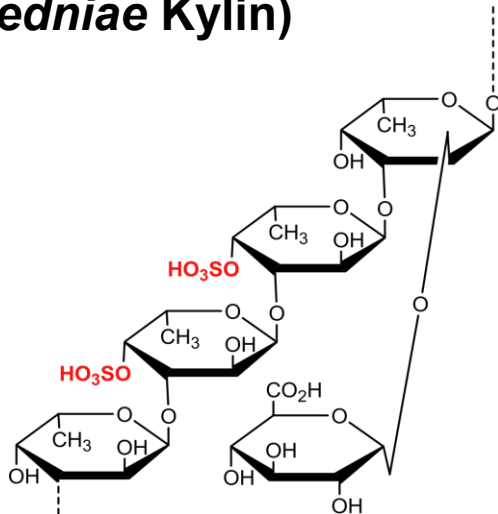
九州大学大学院農学研究院
生命機能科学部門
白畑 實隆

酵素消化低分子化フコイダン抽出物について

フコイダン… コンブ、ワカメ、モズクなどのメカブなど褐藻類の粘質物に多く含まれる硫酸多糖の一種。主に L-フコースを主成分として含み、数十から数十万個に連なった化合物。平均分子量：約800,000



トンガ王国産モズク
(*Cladosiphon novae-caledoniae* Kylin)



フコイダンの基本構造

Preparation

トンガ王国産モズク

↓ ← 有機酸抽出／脱塩処理

高分子フコイダン (平均分子量：約800kDa)

↓ ← アワビグリコシダーゼ

酵素消化低分子化フコイダン 抽出物 (Fucoidan Extract : **FE**)(平均分子量：約500;一部高分子フコイダンも含有)

Components

Fucose	62.1 %	Galactose	3.3 %
Xylose	10.5 %	Uronic acid	14.6 %
Mannose	6.0 %	Sulfate group	14.5 %
Glucose	3.5 %		

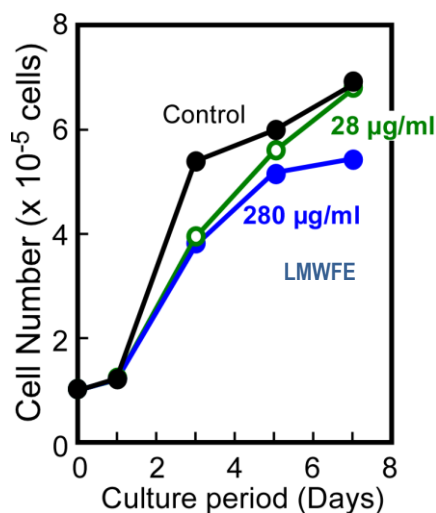
ガン細胞に対する酵素消化低分子化 フコイダンのアポトーシス誘導効果



酵素消化低分子フコイダン抽出物は正常細胞の増殖は抑制せず、ガン細胞の増殖を抑制する。

ヒト正常線維芽細胞

TIG-1

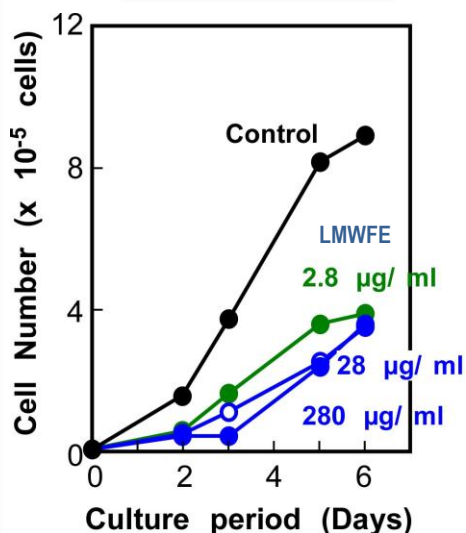


Normal fibroblast

Normal

ヒト子宮ガン細胞

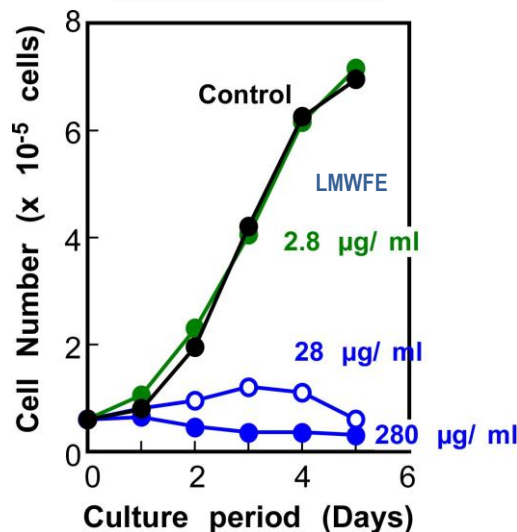
HeLa



Cervical carcinoma

ヒト線維肉腫細胞

HT1080

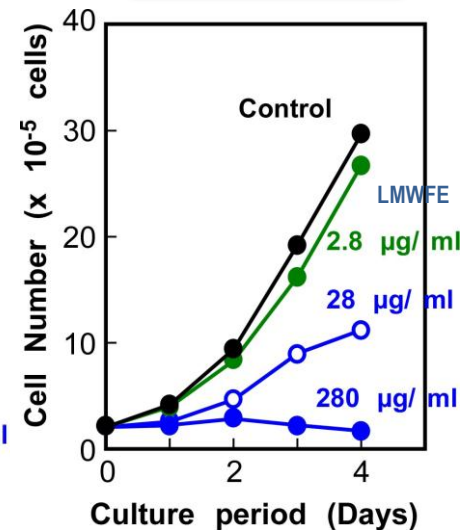


Fibrosarcoma

Cancer

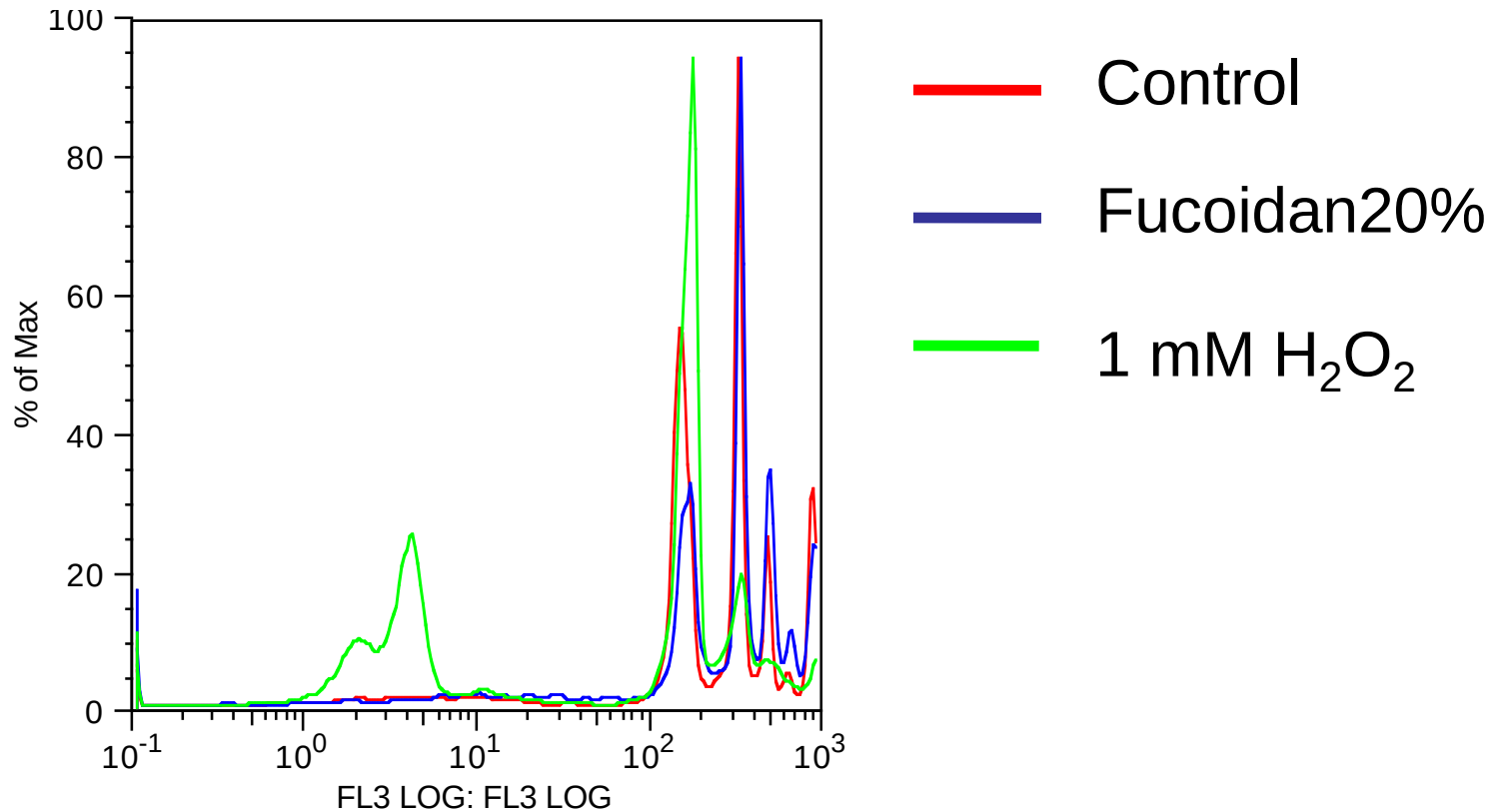
ヒト白血病細胞

HL-60

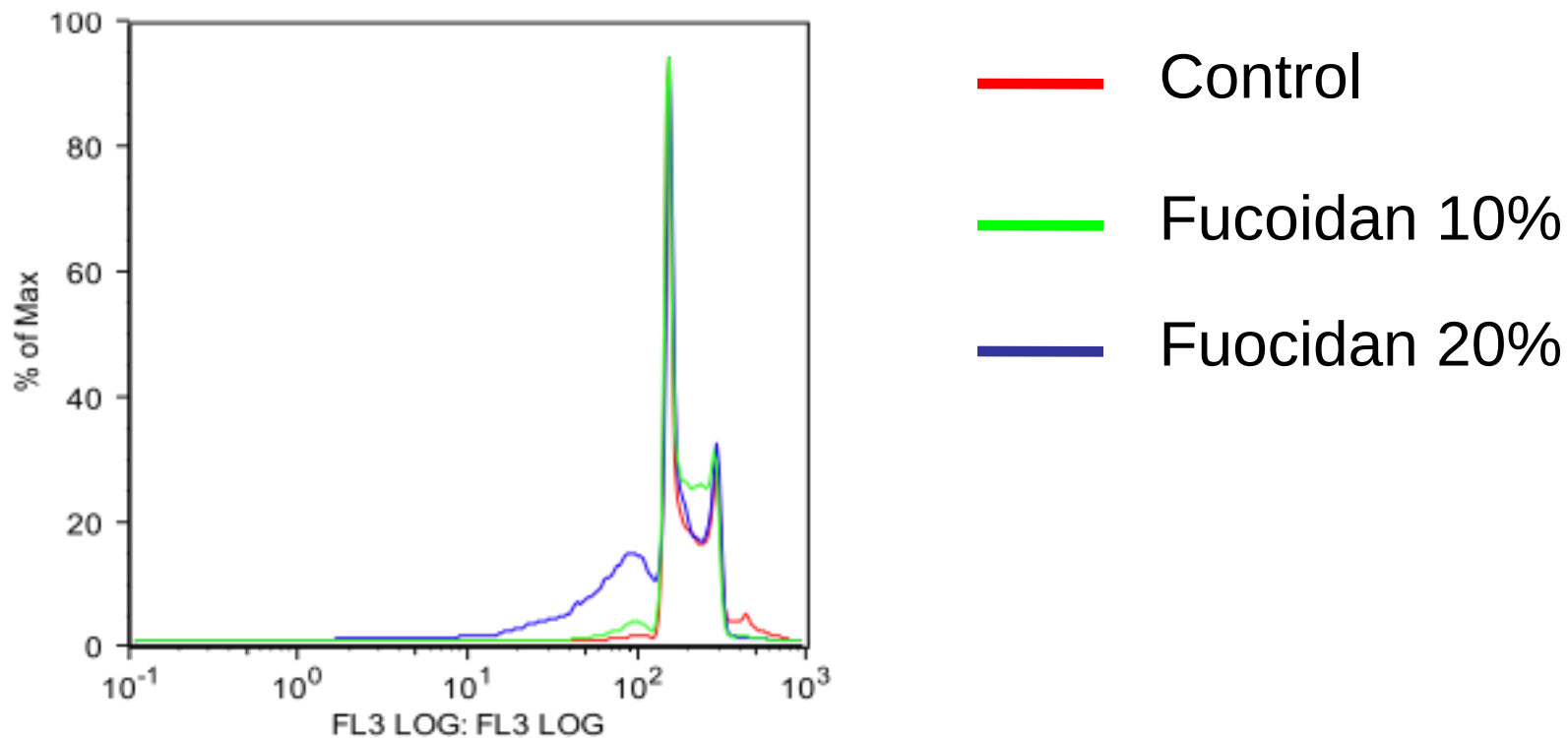


Acute promyelocytic leukemia



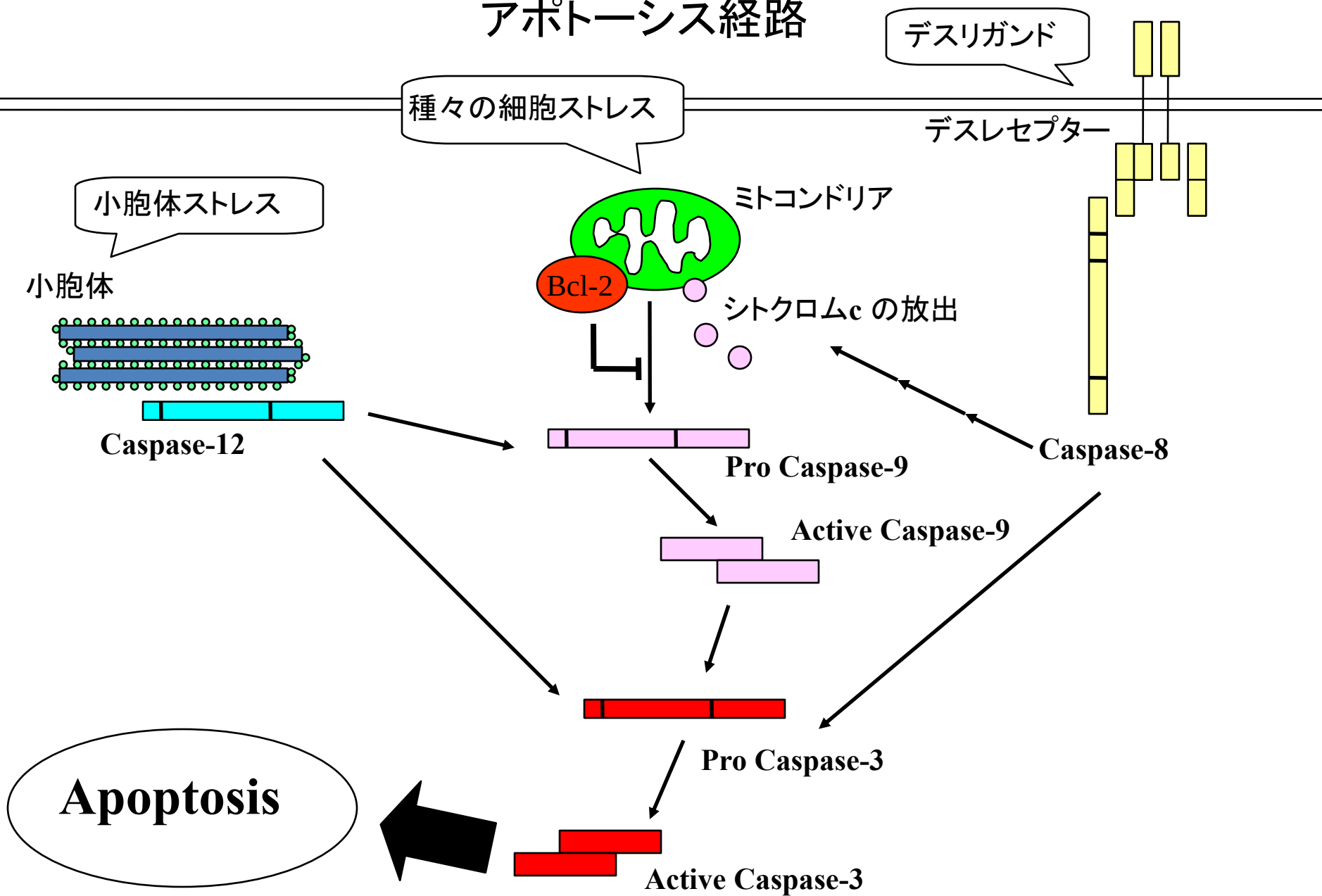


酵素消化低分子フコイダンは正常ヒト末梢血リンパ球には
アポトーシスを誘導しない



酵素消化低分子フコイダンはヒト白血病細胞HL60にはアポトーシスを誘導する

アポトーシス経路



ヒト白血病由来HL-60 細胞に対する
酵素消化低分子化フコイダンのアポトーシス誘導効果

研究の背景

2010 年～ 世界の死因第1位 ガン

WHO 2008

三大療法

+

代替療法

=

統合医療

外科的療法
放射線療法
化学療法

免疫療法
東洋医学
健康食品

QOL(Quality Of Life)
の向上

フコイダン 免疫賦活作用
血管新生抑制作用
アポトーシス誘導作用

トンガ産モズク
(*Cladosiphon novae-caledniae* Kylin)

有機酸抽出／脱塩

アワビグリコシダーゼ

酵素消化低分子化フコイダン抽出物 (FE)
(分子量: 500以下)

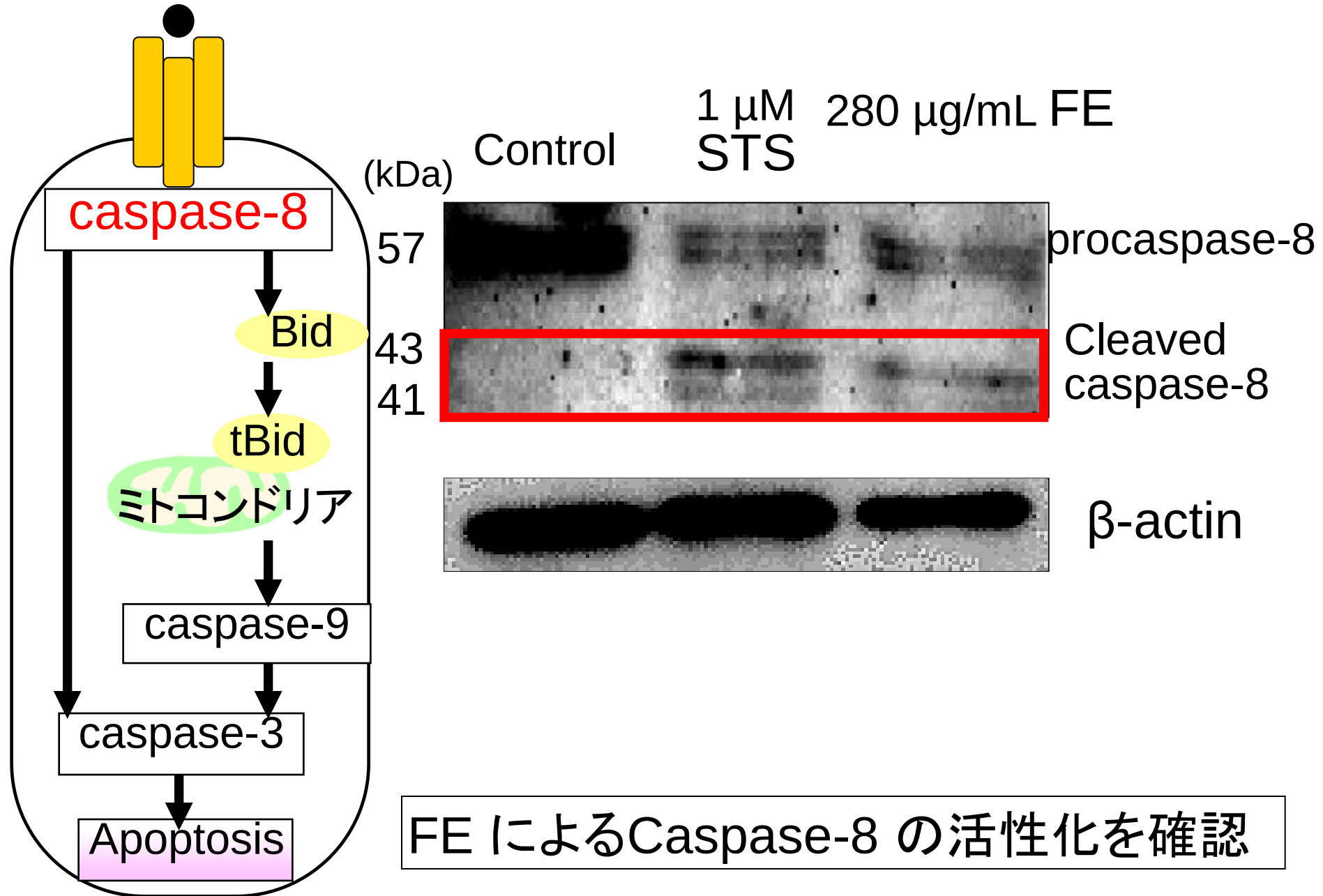
活性成分は？

ヒト前骨髄性
白血病細胞株
HL-60

作用機序は？

アポトーシス

FEによるCaspase-8 の活性化 ～Western blotting～

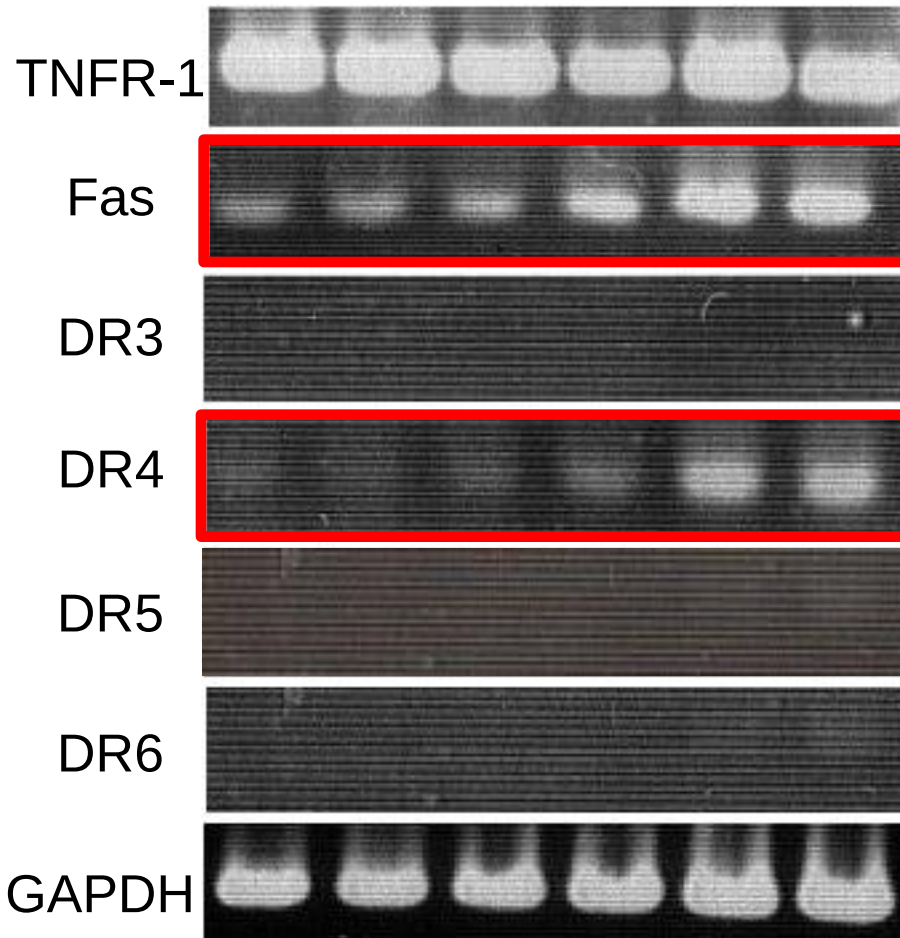


FEによるデスレセプター及びデスリガンドの mRNAの発現量上昇 ～RT-PCR～

レセプター

Treatment time of
280 μ g/mL FE (h.)

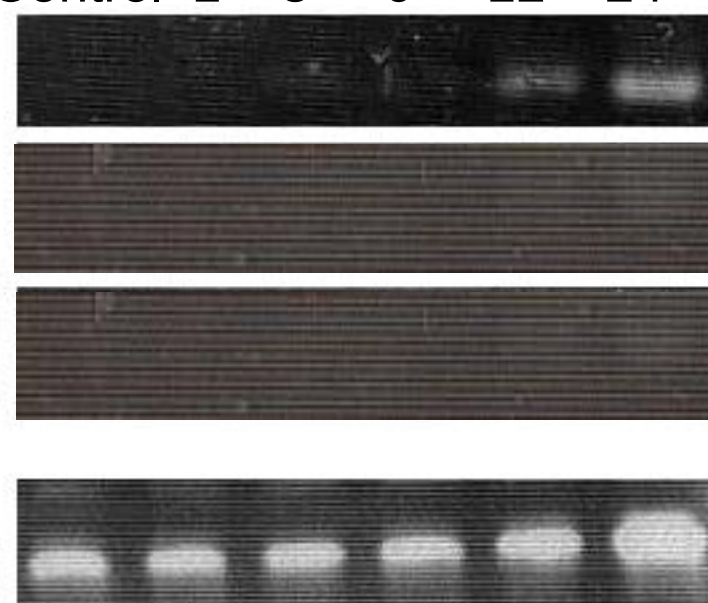
Control 1 3 6 12 24



リガンド

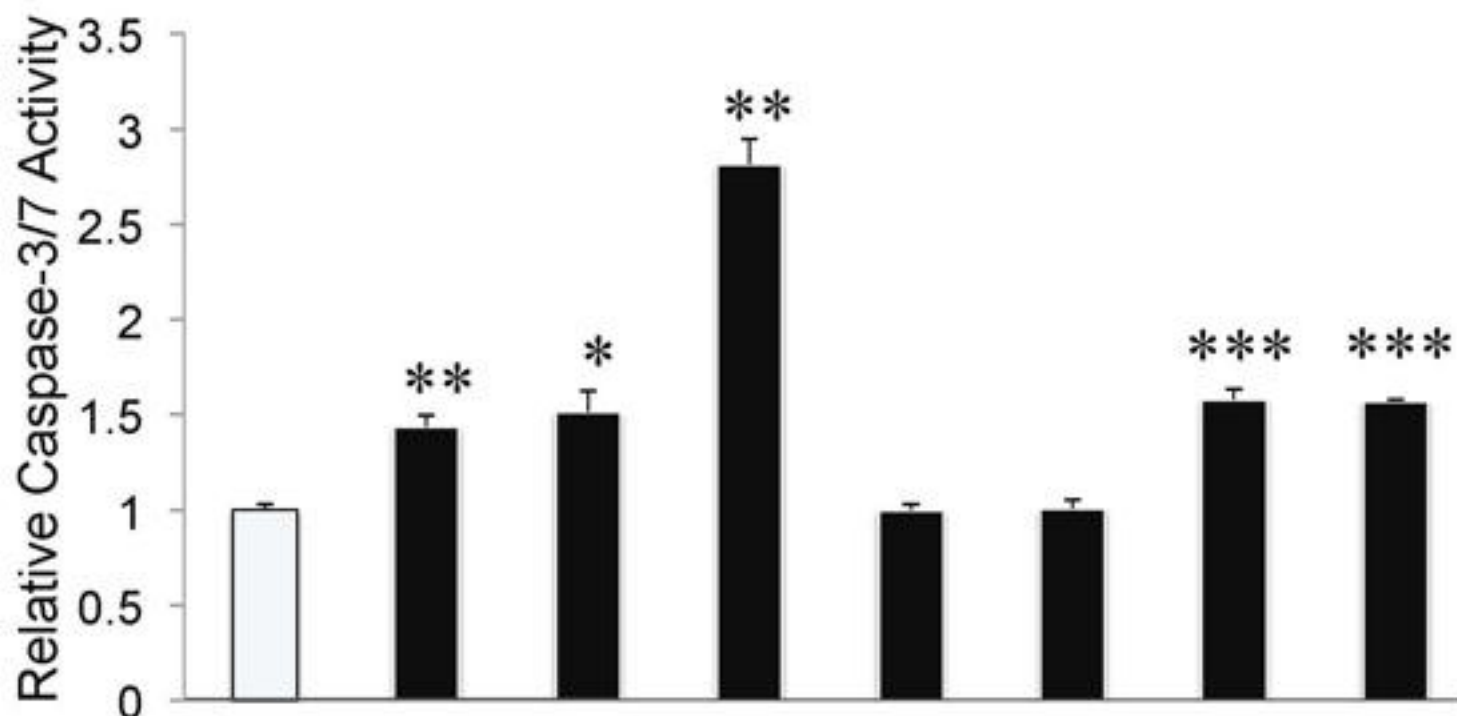
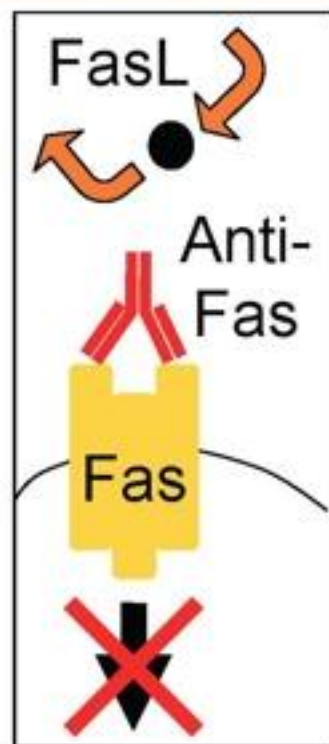
Treatment time of
280 μ g/mL FE (h.)

Control 1 3 6 12 24



FE誘導アポトーシスは
FasL/Fas, TRAIL/DR4
を介する可能性がある

FE誘導アポトーシスはFas依存的？～Caspase-3/7 assay～

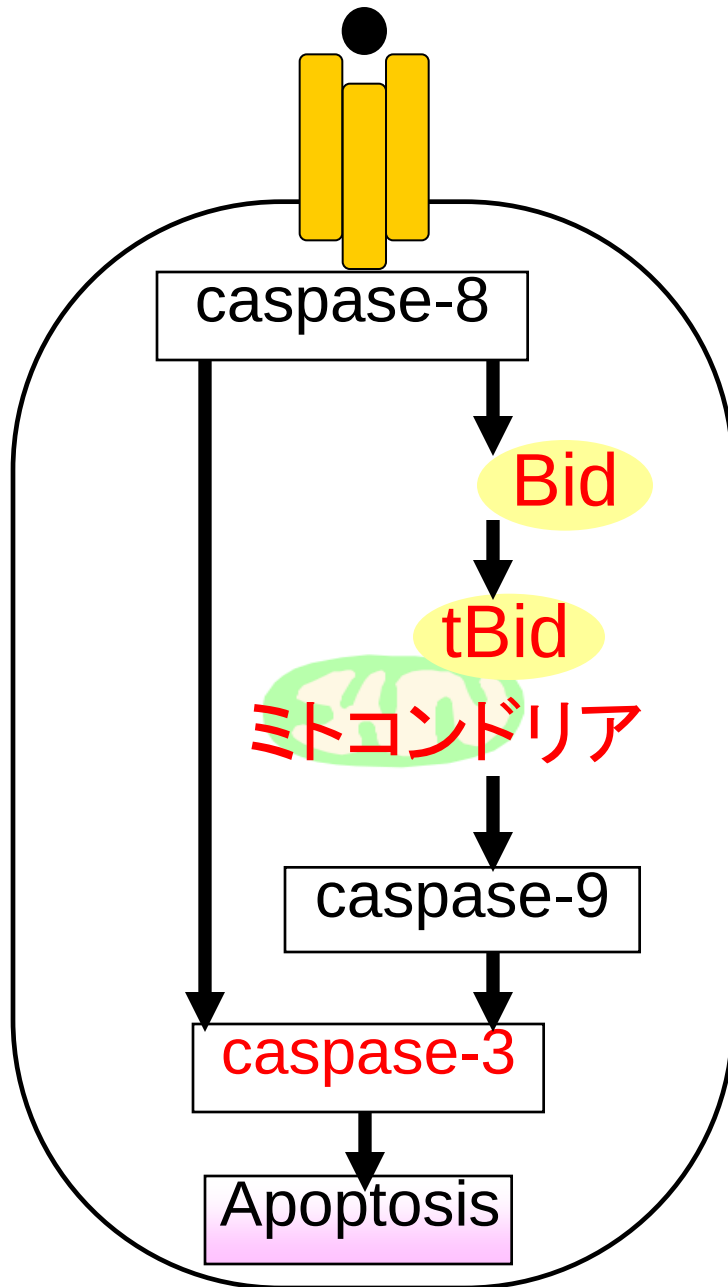


1 μ g/mL FasL	—	+	—	+	—	+	—	+
140 μ g/mL FE	—	—	+	+	—	—	+	+
0.5 μ g/mL Anti-Fas	—	—	—	—	+	+	+	+

Results are expressed as the mean $\pm$ SEM (n=3)
 (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$, relative to control)

FE にFasL と同様の機能はない

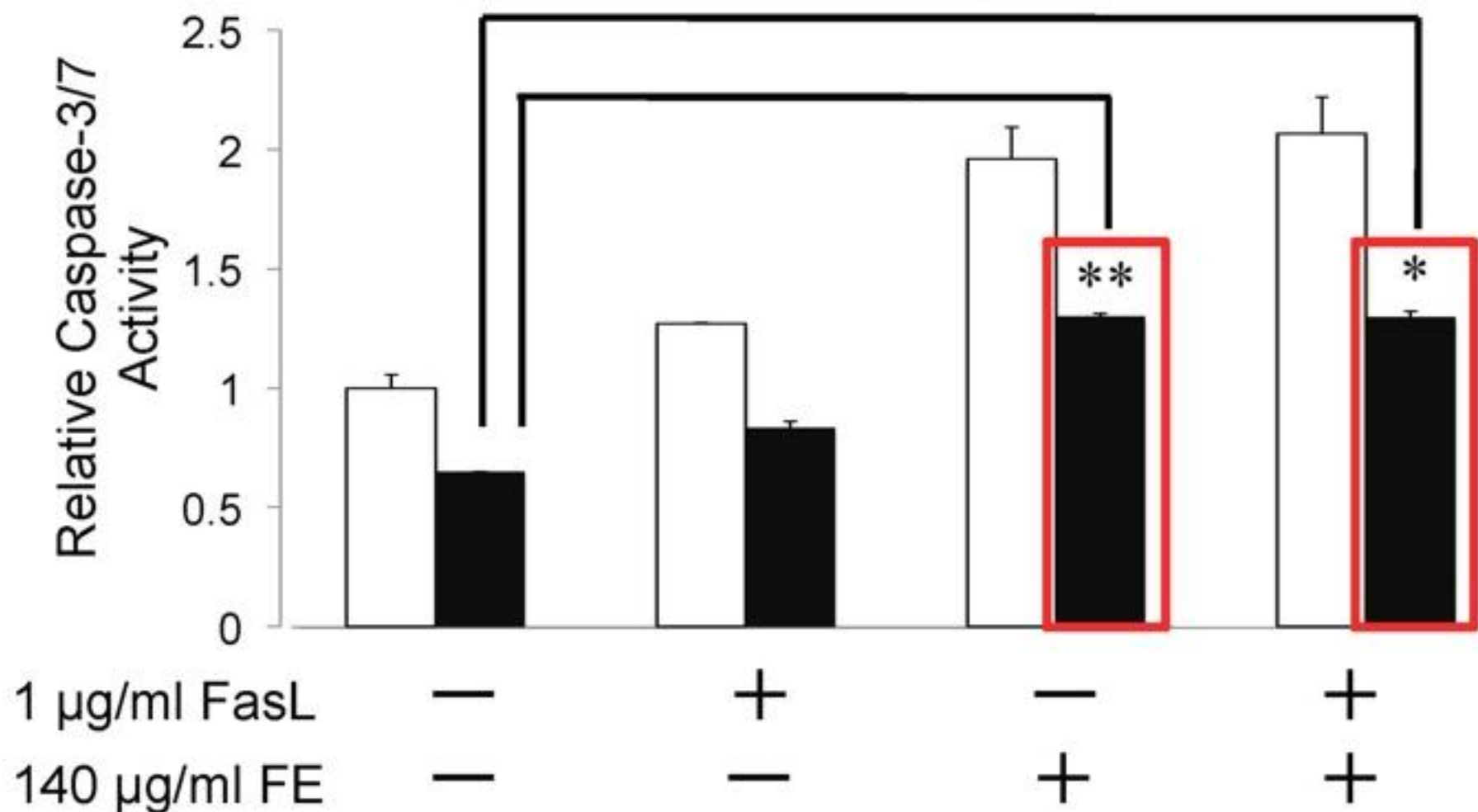
背景 ～作用機序解明～



- Caspase-8 依存性は？
- どのデスレセプターを介するか？

FE誘導アポトーシスはデスシグナル依存的？～Caspase-3/7 assay～

□ control ■ 0.2 μ M caspase-8 inhibitor



Results are expressed as the mean $\pm$ SEM (n=2) (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$)

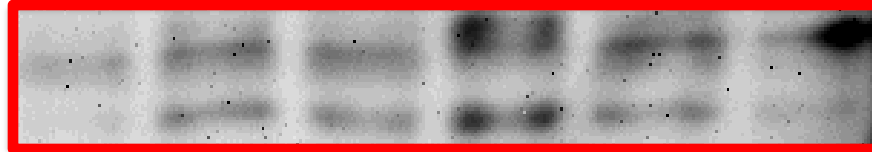
FE 誘導アポトーシスはデスシグナル以外の経路も介する

MAPキナーゼ経路の発現量変化 ~Western blotting~

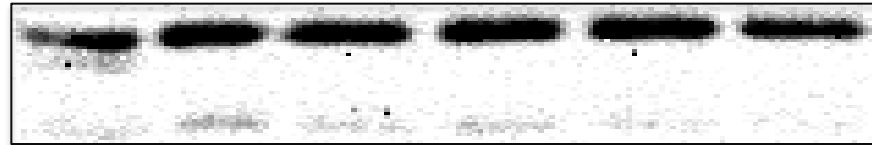
Treatment time of 280 $\mu\text{g/mL}$ FE (h.)

Control 1 3 6 12 24

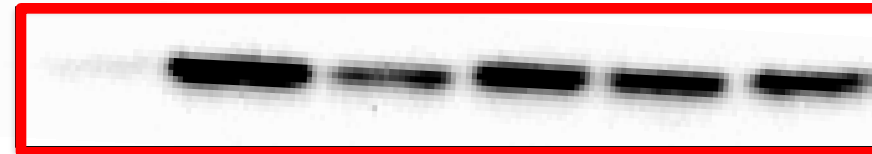
phospho-JNK



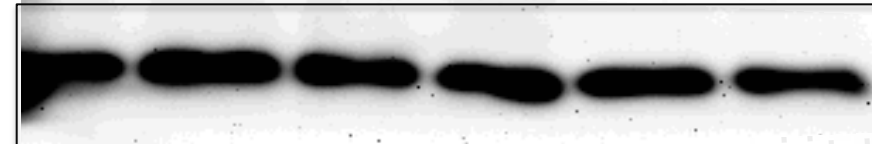
JNK



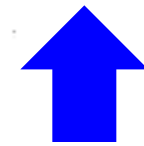
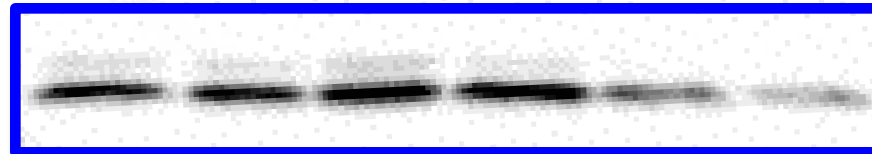
phospho-p38



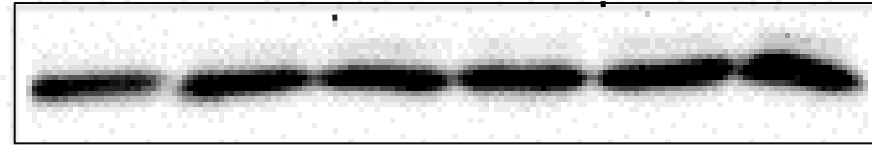
p38



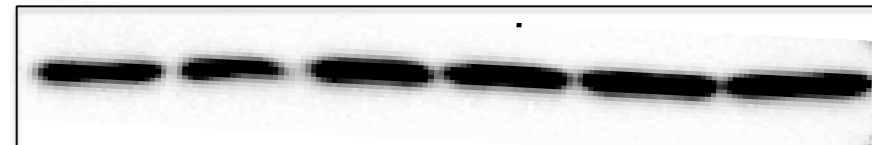
phospho-ERK

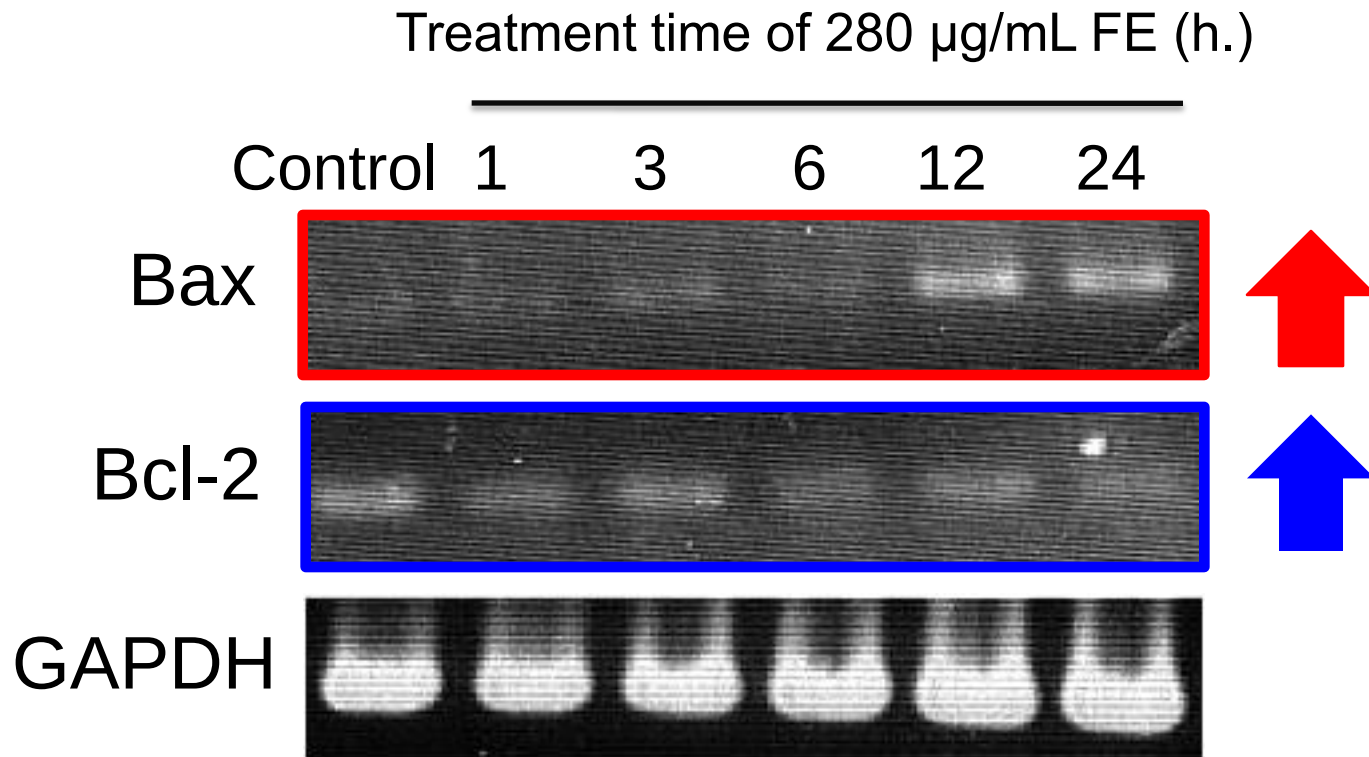


ERK



β -actin

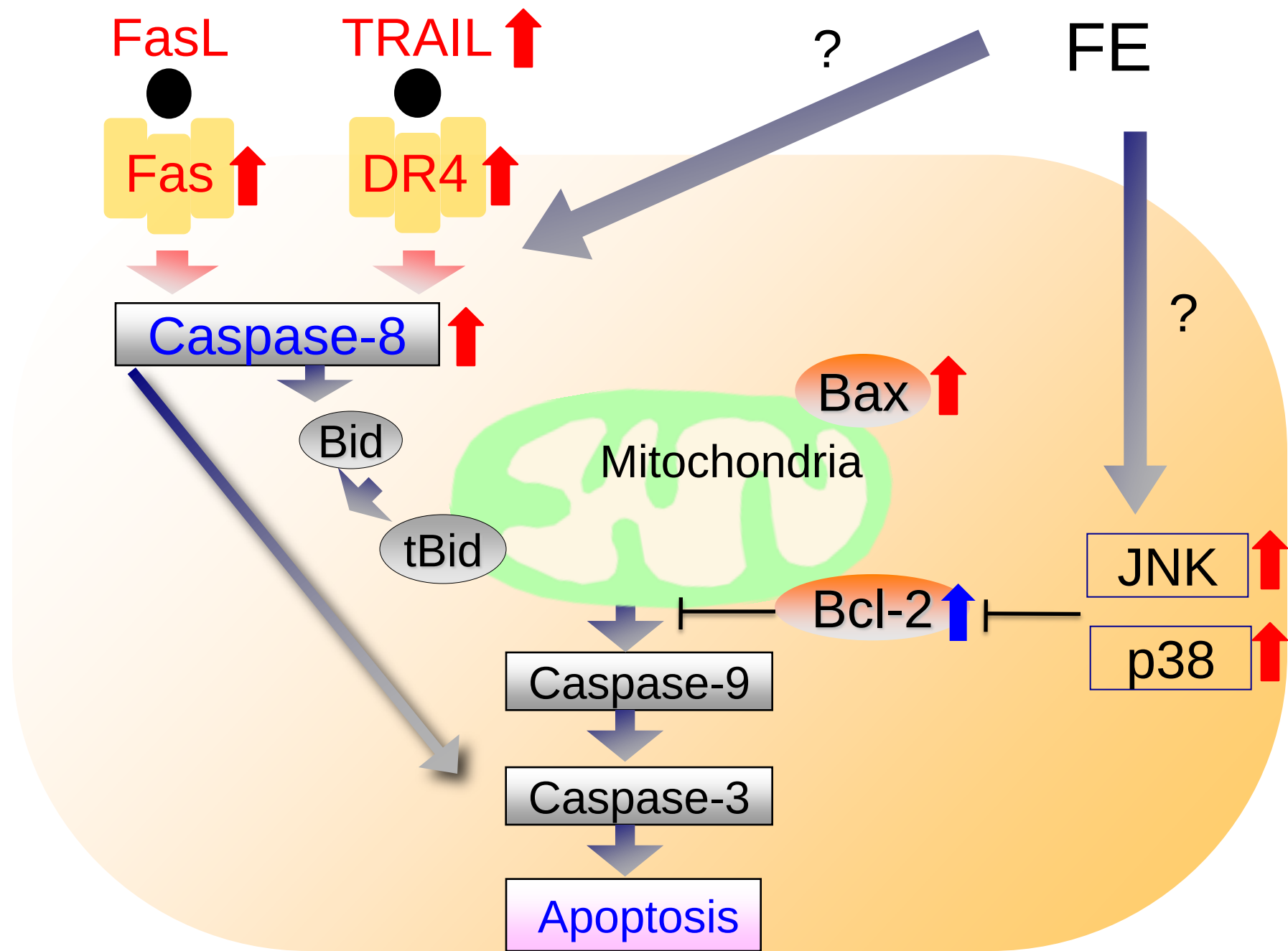




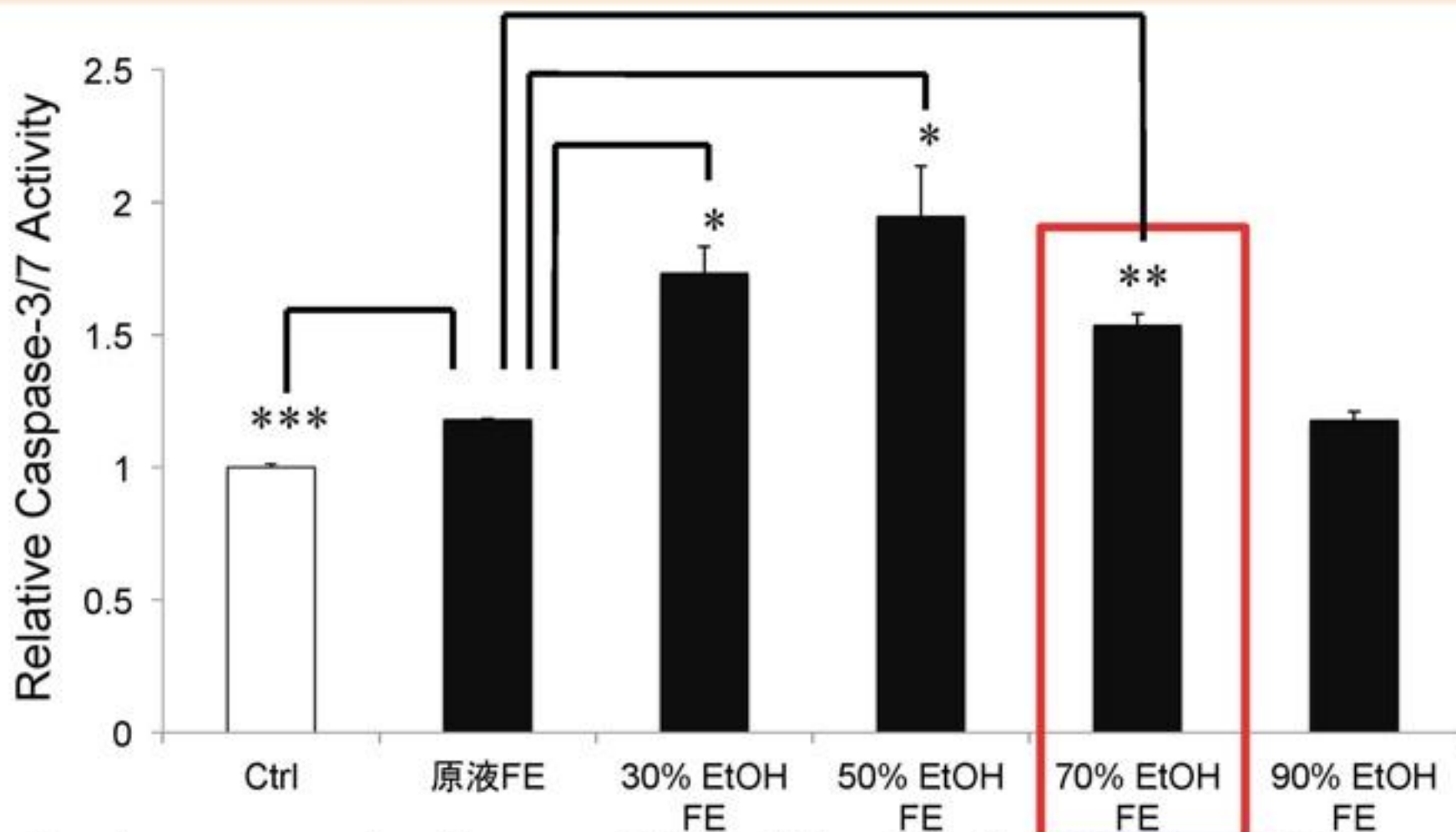
Bax の発現量増加、Bcl-2 の発現量減少

小括

～作用機序解明～



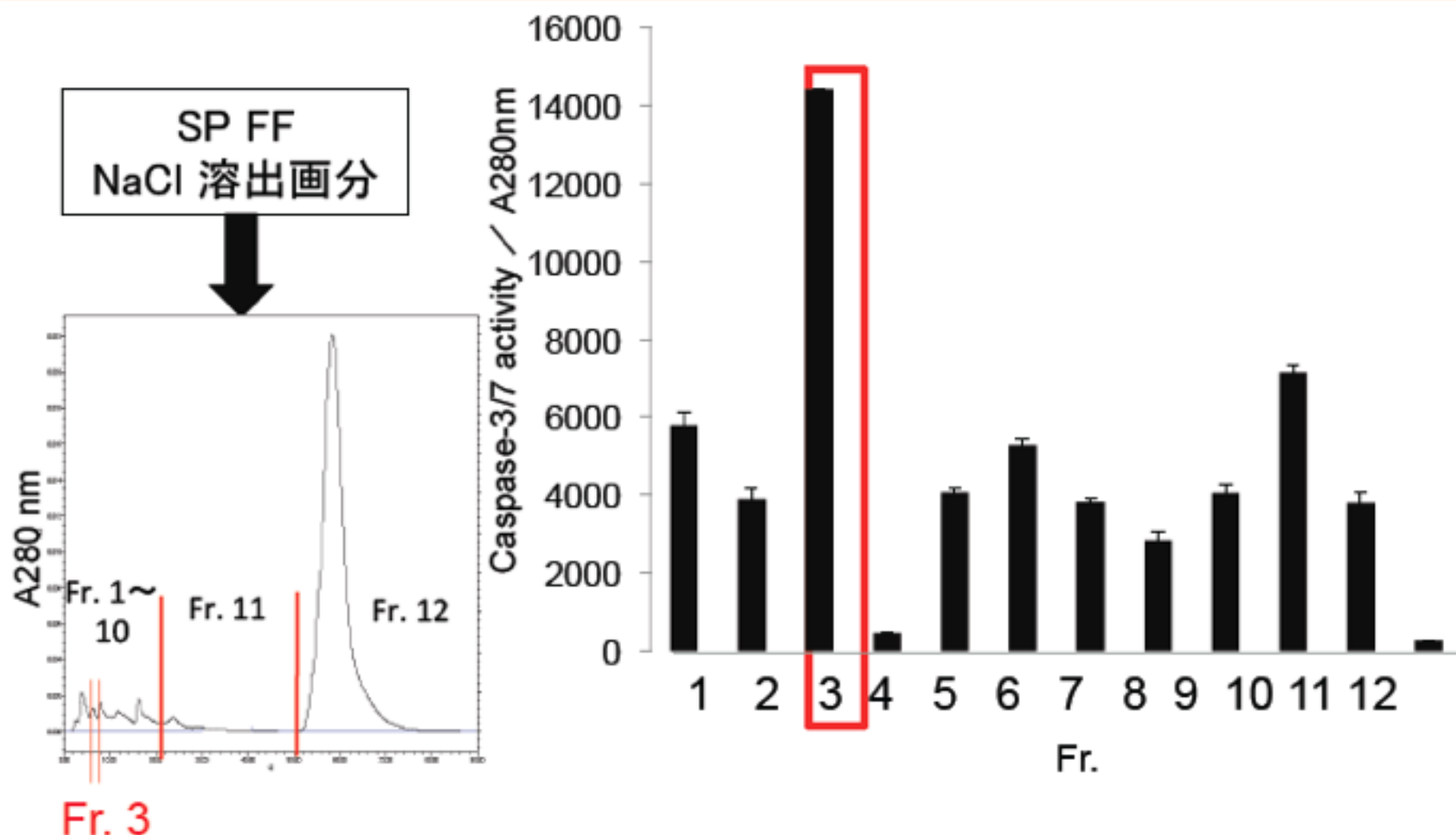
エタノール抽出の濃度検定



Results are expressed as the mean $\pm$ SEM (n=3) (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$)

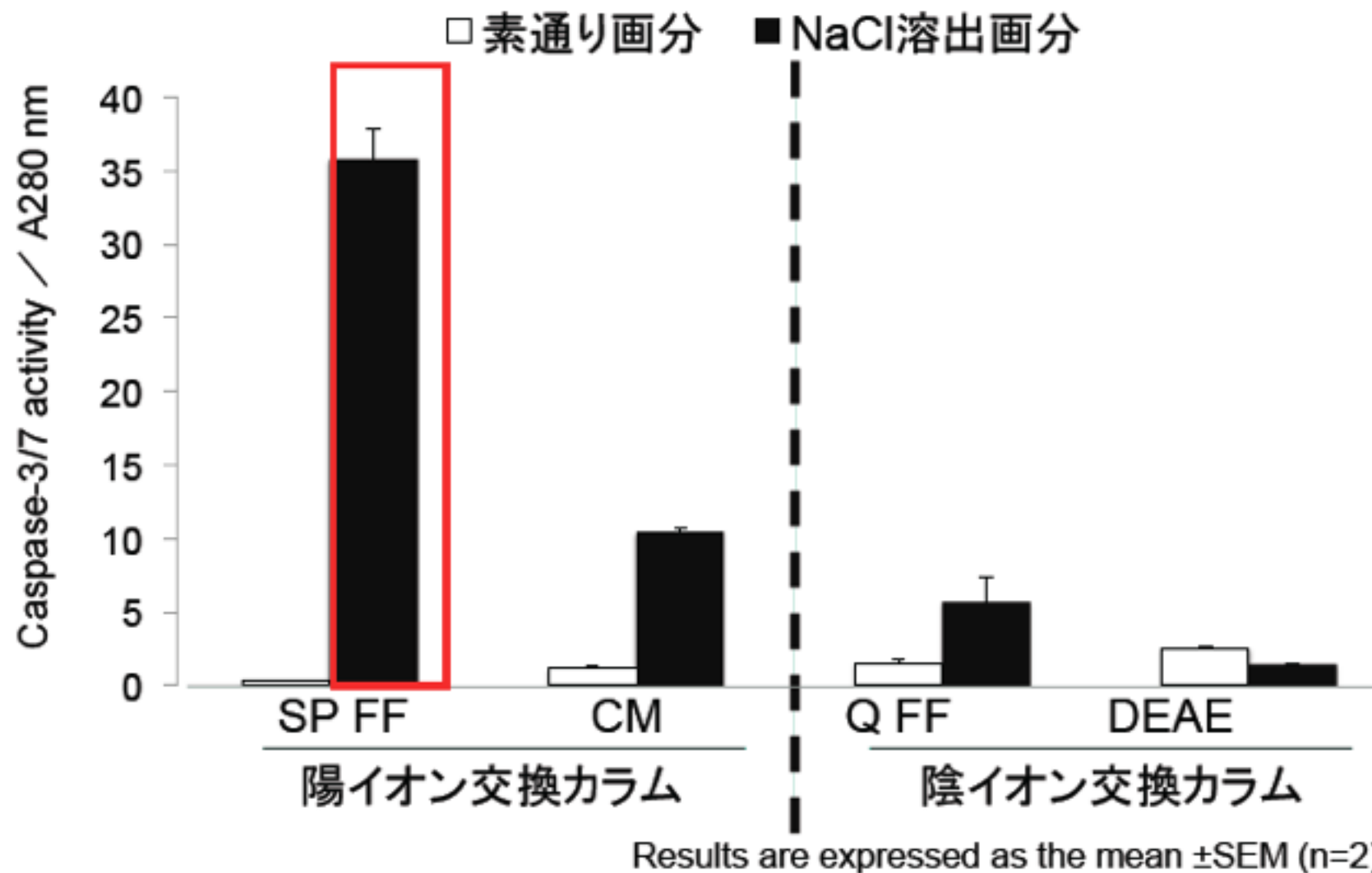
回収率が高くcaspase-3/7活性の増加する70%が適切

逆相クロマトグラフィーによる精製



Results are expressed as the mean $\pm$ SEM (n=2)

イオン交換クロマトグラフィーによる精製



活性成分は陽イオン性で、SP FF NaCl溶出画分に高濃度で含まれる

総括

FEは複数の経路を介してアポトーシスを誘導する
→ 複数の作用点を有するアポトーシス誘導剤

70% エタノール抽出



陽イオン交換クロマトグラフィー
SP FF のNaCl 画分



逆相クロマトグラフィーのFr. 3



比活性の高い画分の回収

活性成分精製法の確立

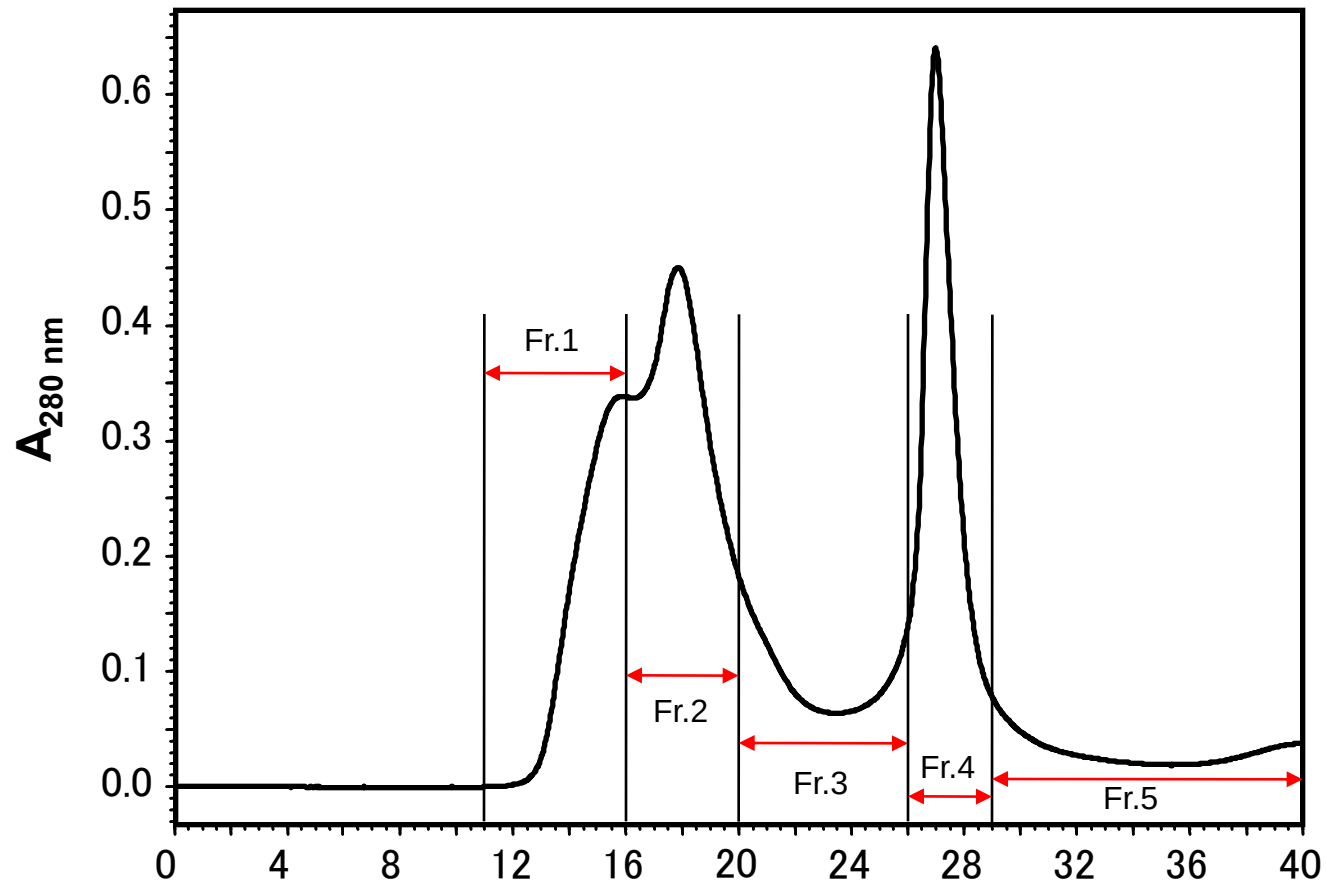


質量分析等

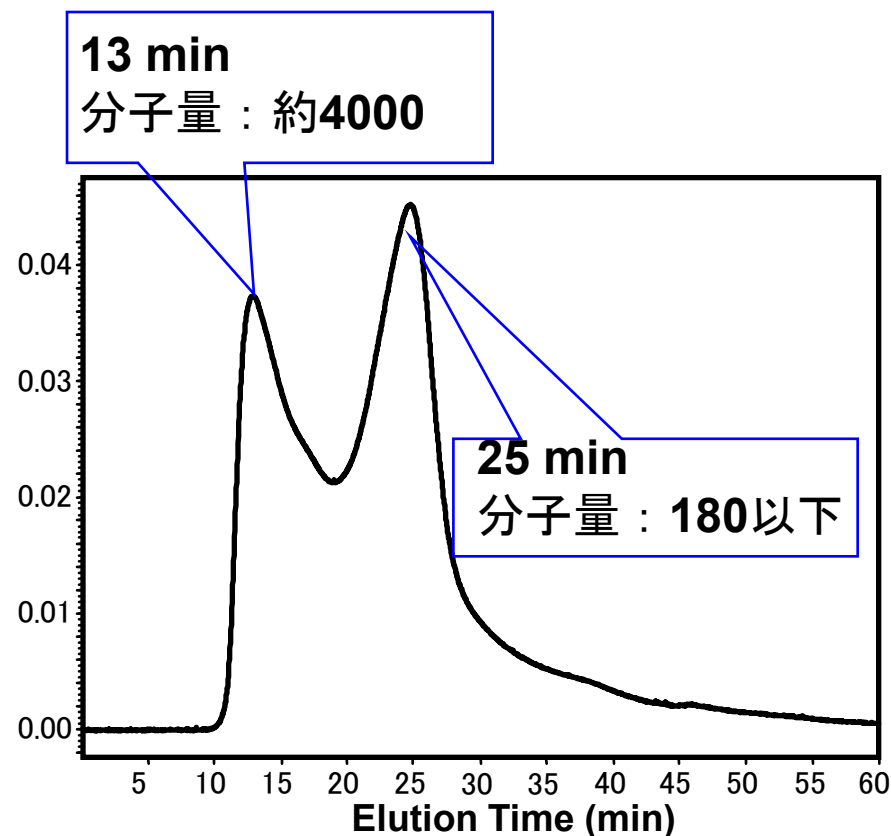
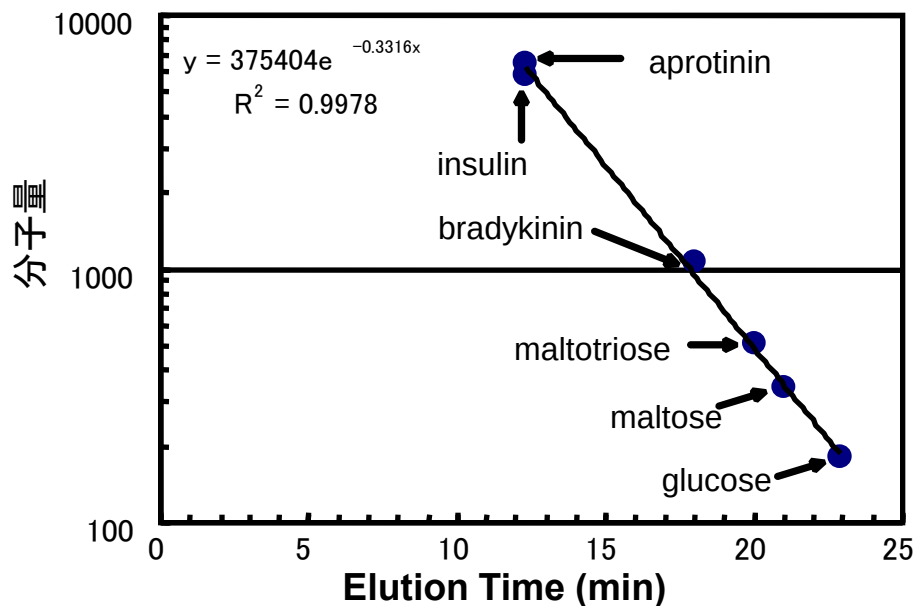


活性成分特定

活性成分は陽イオン性で
極性が高い



LH-20ゲルろ過カラムによる酵素消化低分子
化フコイダンの分画



逆相カラム分画における酵素消化低分子化フコイダ
ン中のアポトーシス誘導画分(Fr.1)の分子量の推定
LH-20ゲルろ過カラム使用

酵素消化低分子化フコイダン抽出物はカスパーゼ経路が破損しているMCF-7乳ガン細胞に対しては、カスパーゼ非依存性のアポトーシス誘導経路を活性化してアポトーシスを誘導する。

PLoS ONE | www.plosone.org

November 2011 | Volume 6 | Issue 11 | e27441

フコイダン抽出物はROS依存性JNK活性化経路及びミトコンドリア介在経路が関与する機構を介してMCF-7細胞にアポトーシスを誘導する。

要約

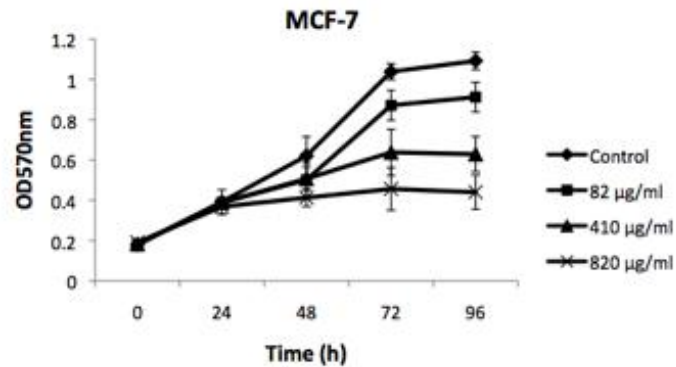
背景: フコイダン抽出物(FE)、酵素消化した低分子化合物、は褐藻類から抽出される。種々の活性をもつ天然化合物として、FEは特にアジアの国々でガン治療の治療効率と安全性を改善するために魅力あるものとなっている。本研究では、ヒトのガン細胞に関する抗腫瘍特性を研究し、さらにその活性の基礎となっている機構を調べるために行われた。

方法/基本的発見: FEはMCF-7、MDA-MB-231、及びHT1080細胞の増殖を阻害する。MCF-7ガン細胞においてFEが介在するアポトーシスはDNA断片化、核凝縮、及びホスファチジルセリン露出を伴う。FEはミトコンドリア膜電位(DYm)の消失及びBcl-2ファミリー構成員の発現調節を通してミトコンドリア膜透過性(MMP)を誘導する。

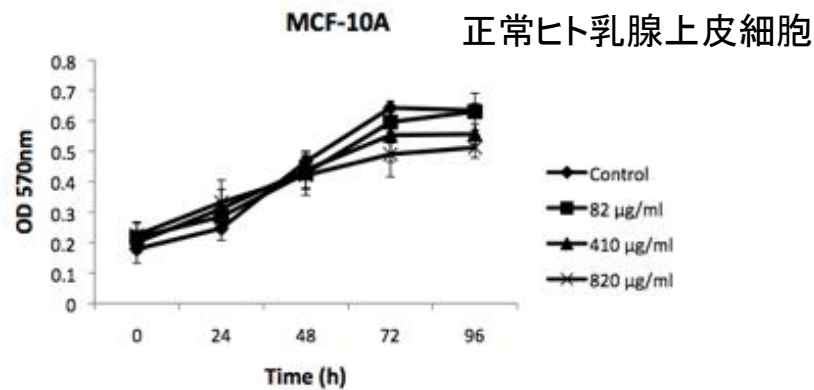
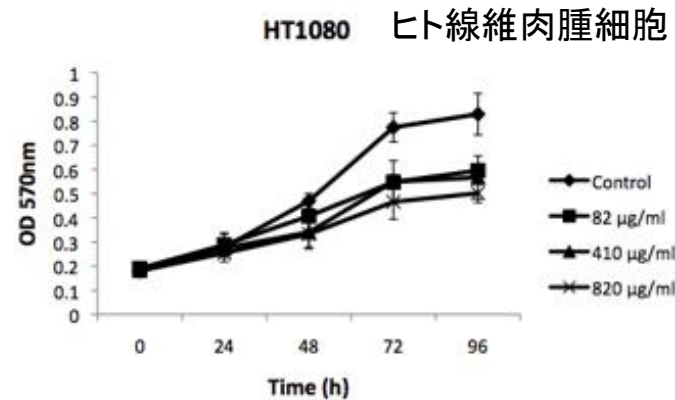
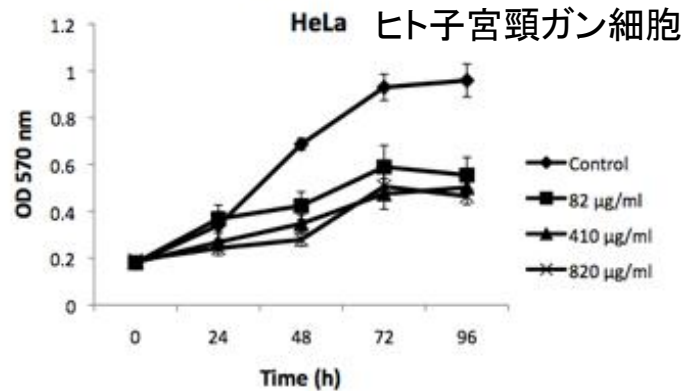
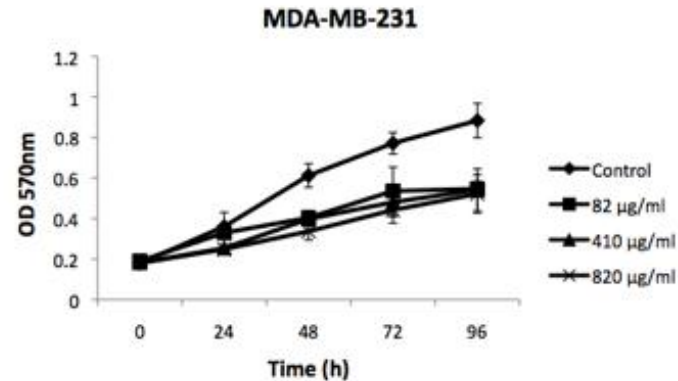
MMPに先行してアポトーシス誘導因子(AIF)及びチトクロームCの放出が起こる。AIF放出はアポトーシスの最終段階であるDNA断片化をカスパーゼ非依存性ミトコンドリア経路を介して起こす。加えて、FEはc-JUN N-末端キナーゼ(JNK)、p38、及び細胞外シグナル調節キナーゼ(ERK)1/2のリン酸化を誘導することが見出された。アポトーシスはJNKの阻害によって減少することが明らかとなった。さらに、FE介在アポトーシスは活性酸素種(ROS)の発生を伴い、ROSはDYmの減少及びJNK、p38、及びERK1/2キナーゼのリン酸化を引き起こすことが見出された。

結論/意義: これらのデータはFEがMCF-7ガン細胞においてROS介在MAPキナーゼの活性化及びBcl-2ファミリータンパク質介在ミトコンドリア経路の調節を通じてカスパーゼ非依存性アポトーシス経路を活性化することを示唆する。得られたデータはまたFEが天然の抗ガン及びガン抑制剤としてさらに研究する価値があるという証拠を提供する。

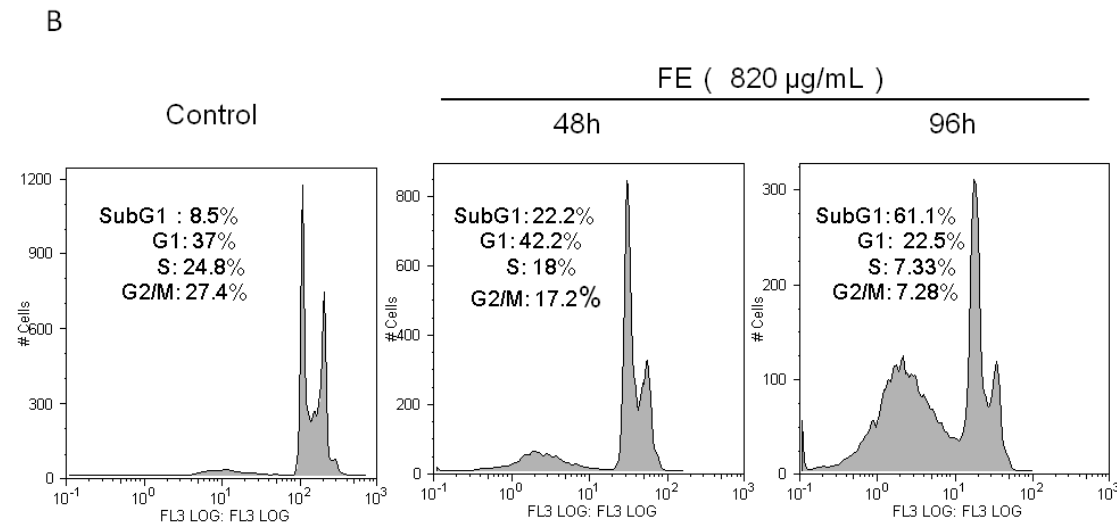
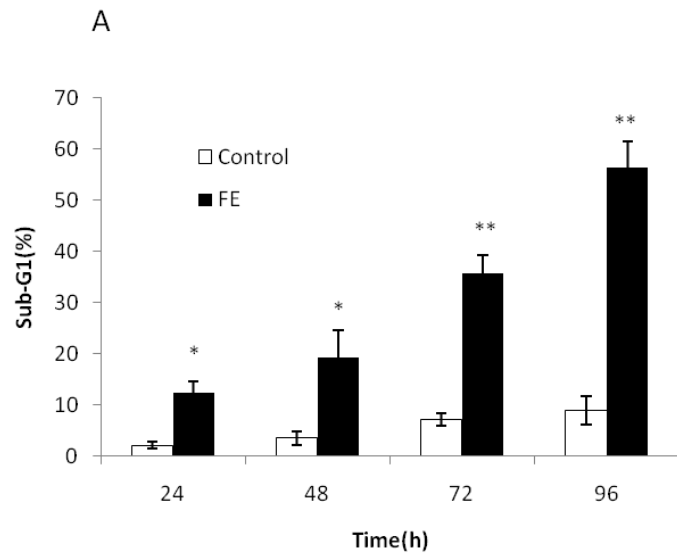
ヒト乳ガン細胞



ヒト乳腺ガン細胞

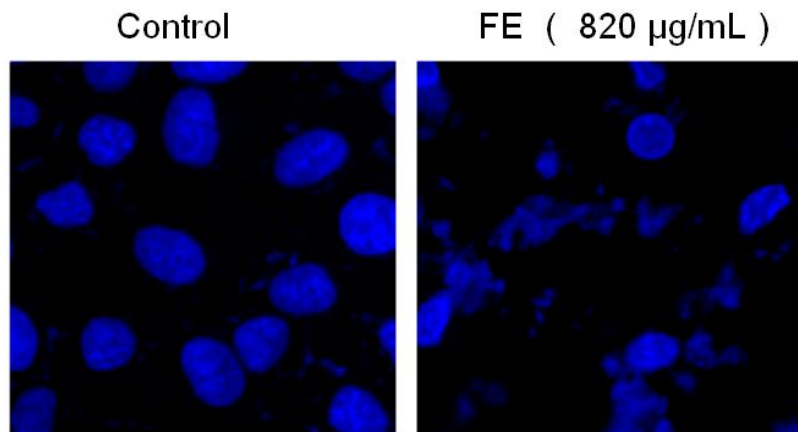


低分子フコイダンによるがん細胞特異的増殖抑制

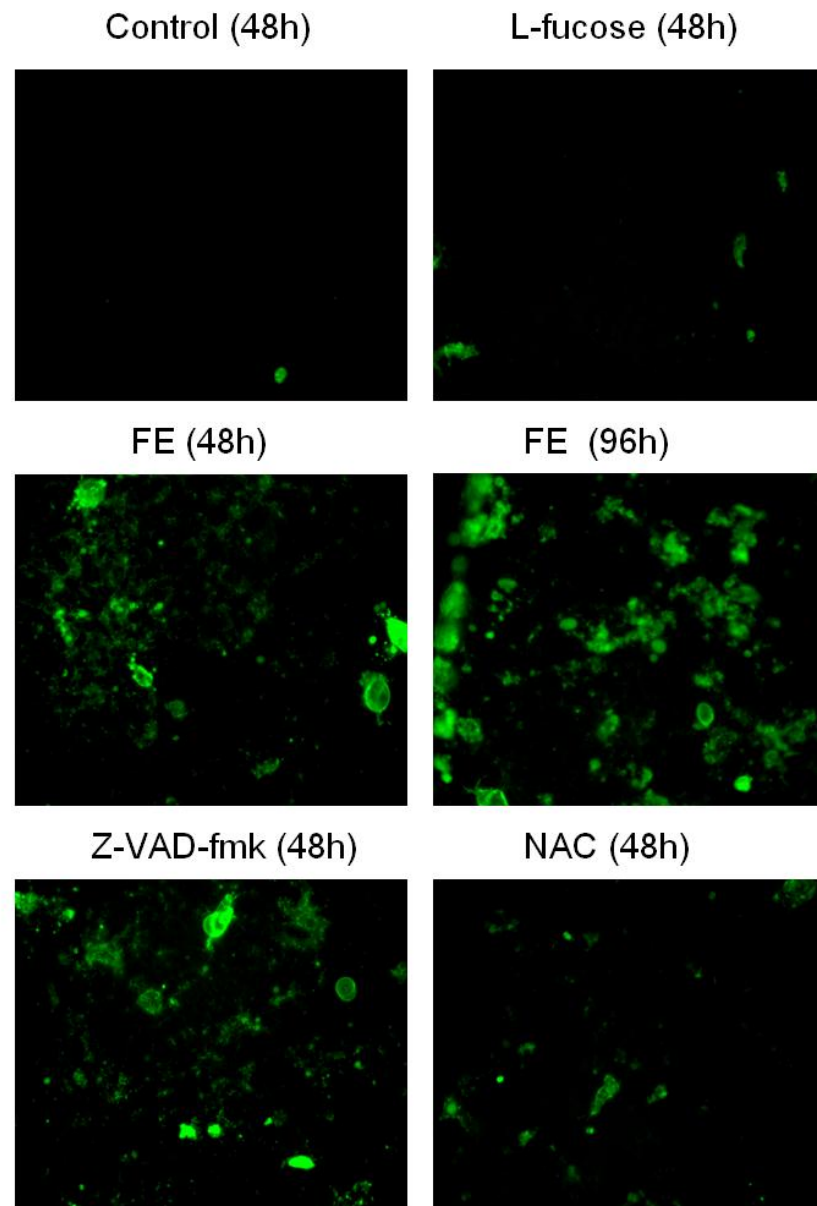


フコイダンはヒト乳腺ガン上皮細胞MCF-7にアポトーシスを誘導する。

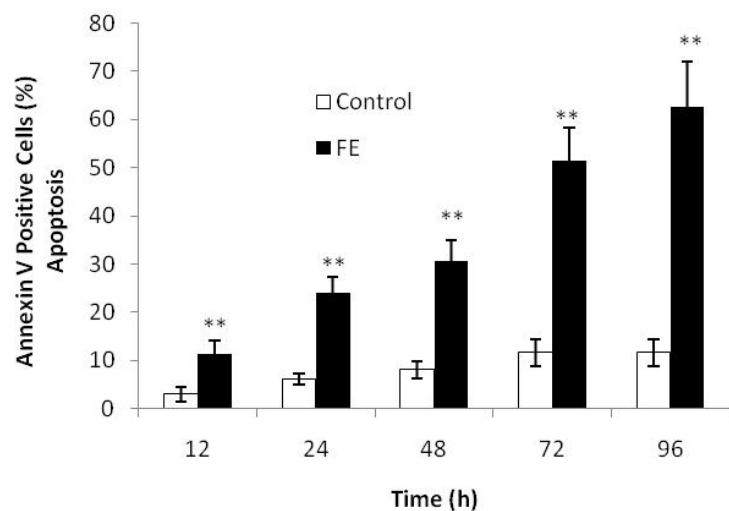
C



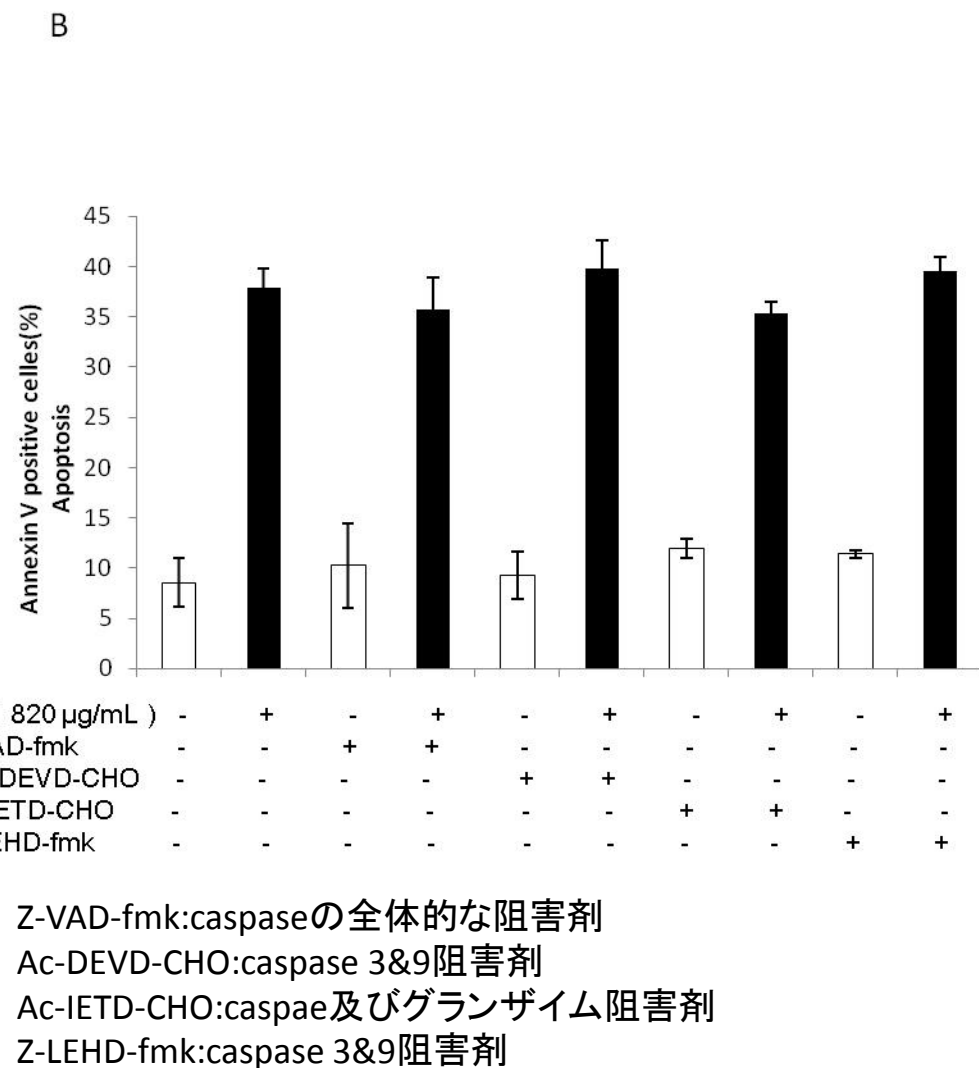
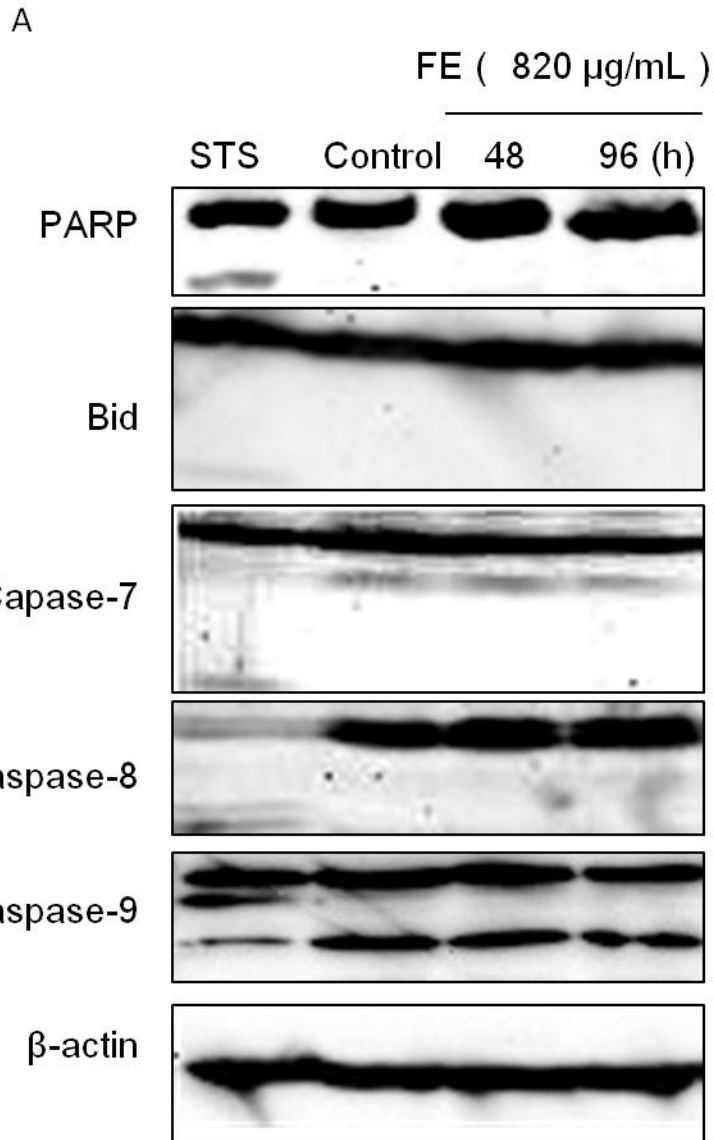
E



D

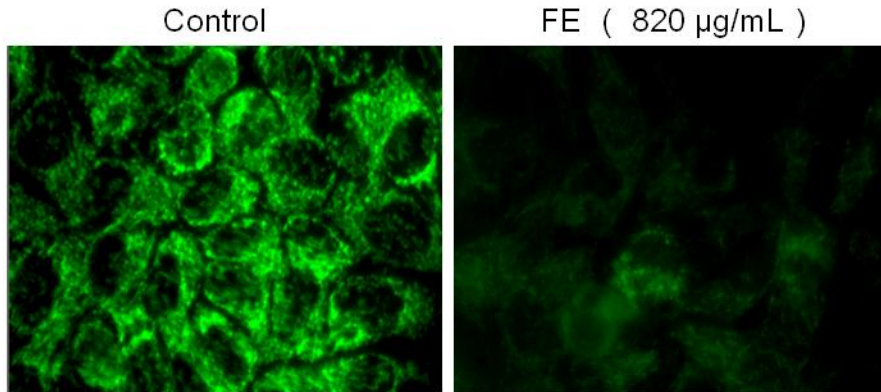


フコイダン処理したMCF-7細胞は典型的な核凝縮を起こし、細胞膜表面にフォスファチジルセリンを発現する(annexin-positive)アポトーシスの特徴を示す。

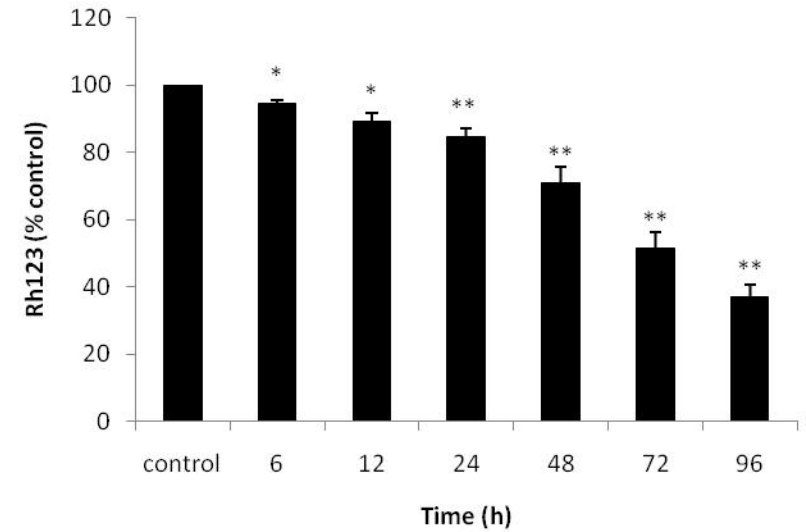


Caspase-3を発現しないMCF-7細胞ではcaspase経路の諸タンパク質(PARP、Bid、Caspase-7、-8、-9)は活性化されないため、caspase非依存性アポトーシスを起こすことが推測された。

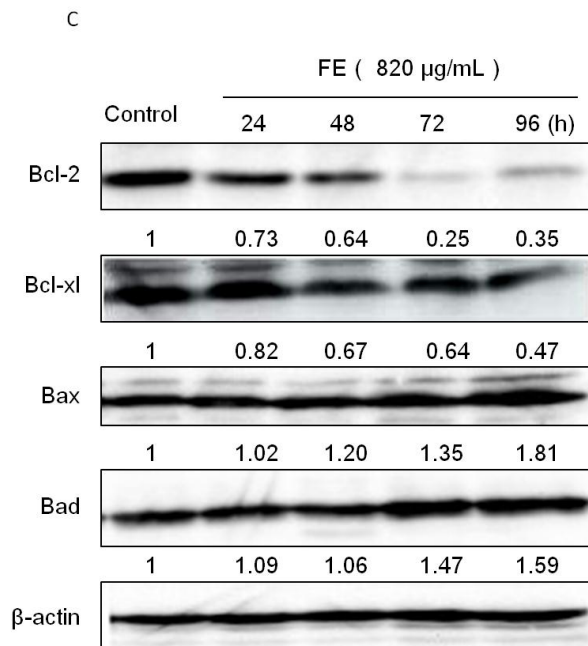
A



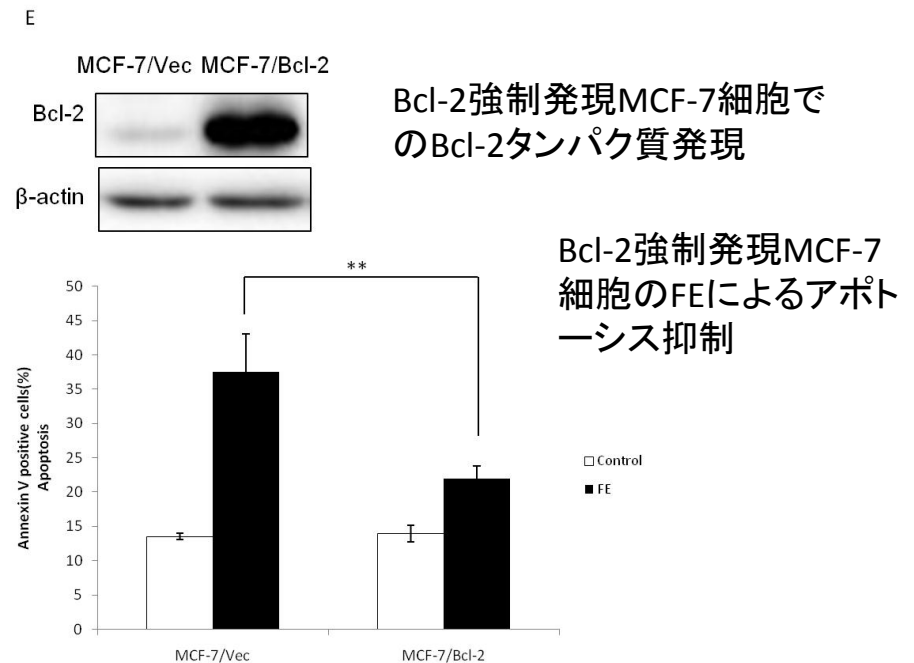
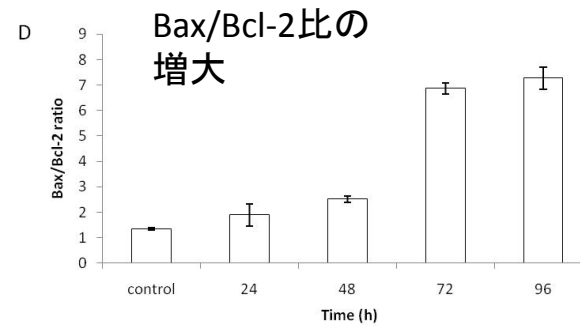
B



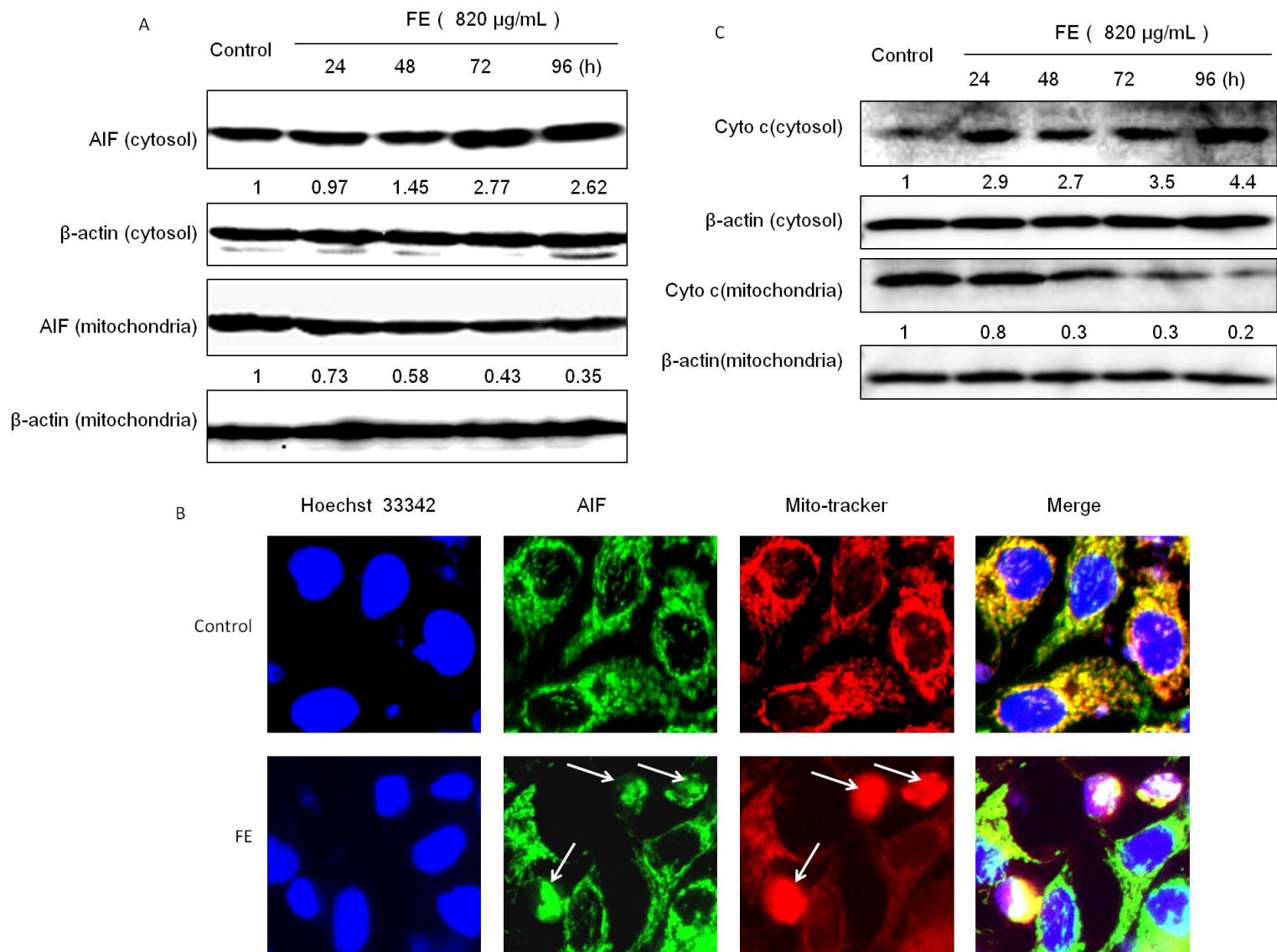
フコイダンはミトコンドリアの膜電位の消失を誘導する。



Bcl2:アポトーシス抑制タンパク質
 Bcl-xl:アポトーシス抑制タンパク質
 Bax:アポトーシス促進タンパク質
 Bad:アポトーシス促進タンパク質

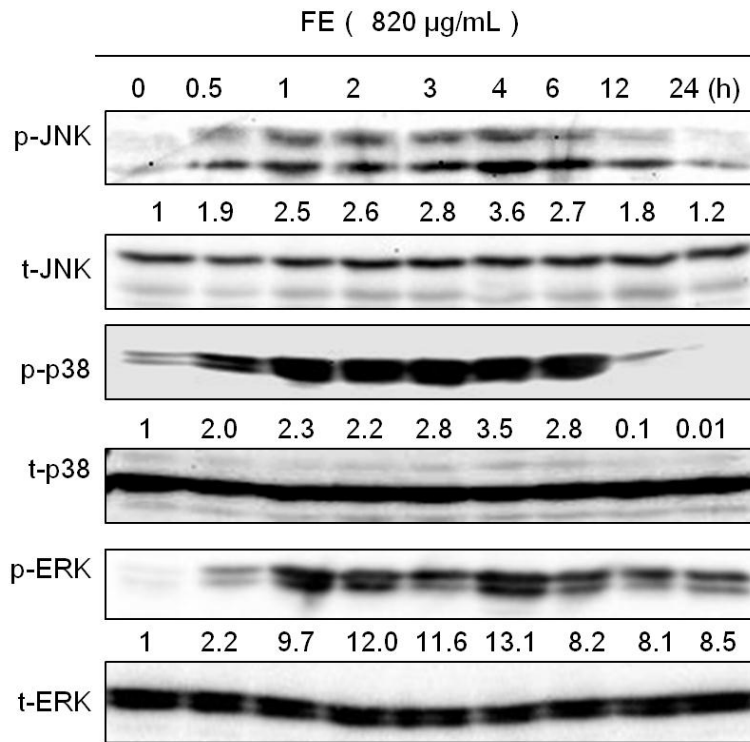


フコイダン は Bcl-2ファミリータンパク質を調節する。



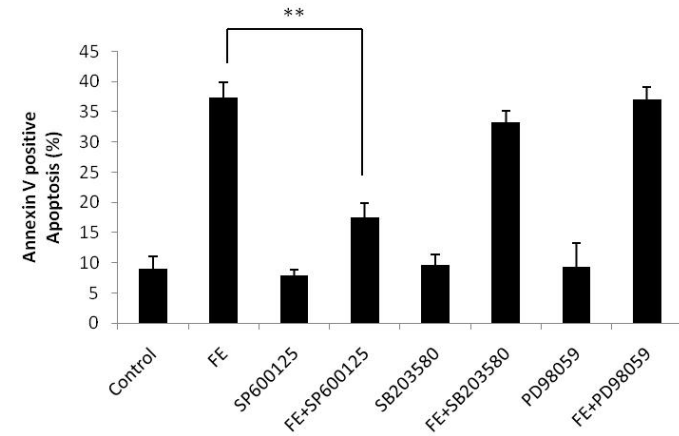
フコイダン[®]はミトコンドリアからアポトーシス誘導因子(AIF)及びチクロームcを放出させ、核内に移行させる。

A

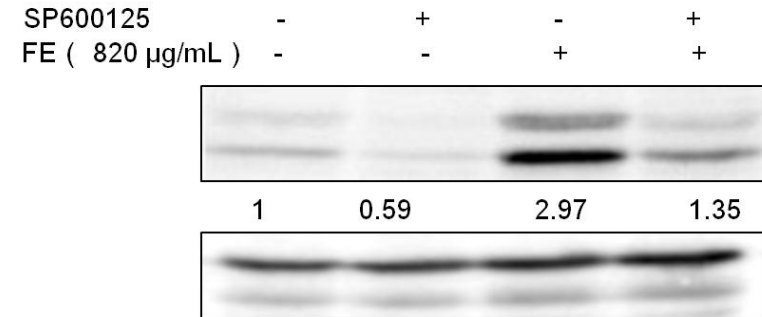


p-JNK、p38、p-ERKの活性化が起こる。

B



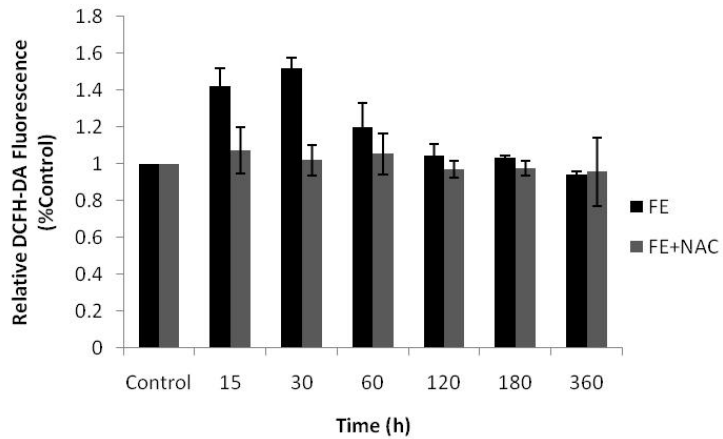
C



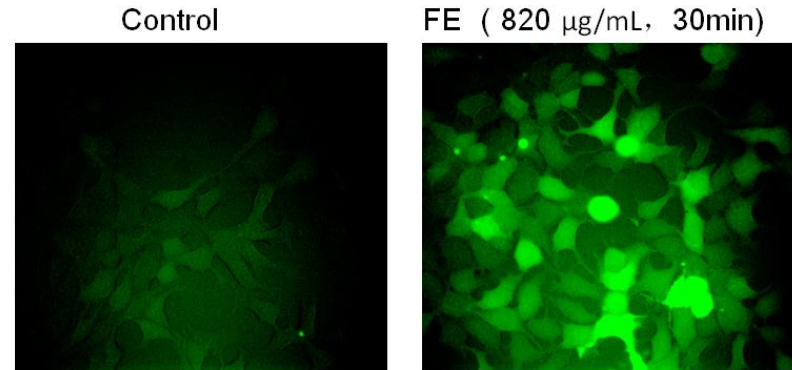
JNKインヒビターSP600125によりフコイダンによるアポトーシスは部分的に抑制される。

フコイダン誘導アポトーシスにおけるMAPキナーゼの役割。

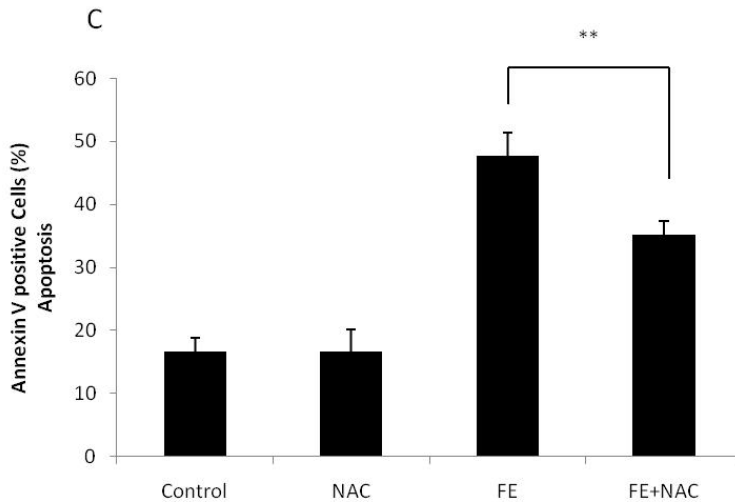
A 細胞内活性酸素種発生量の経時的変化



B



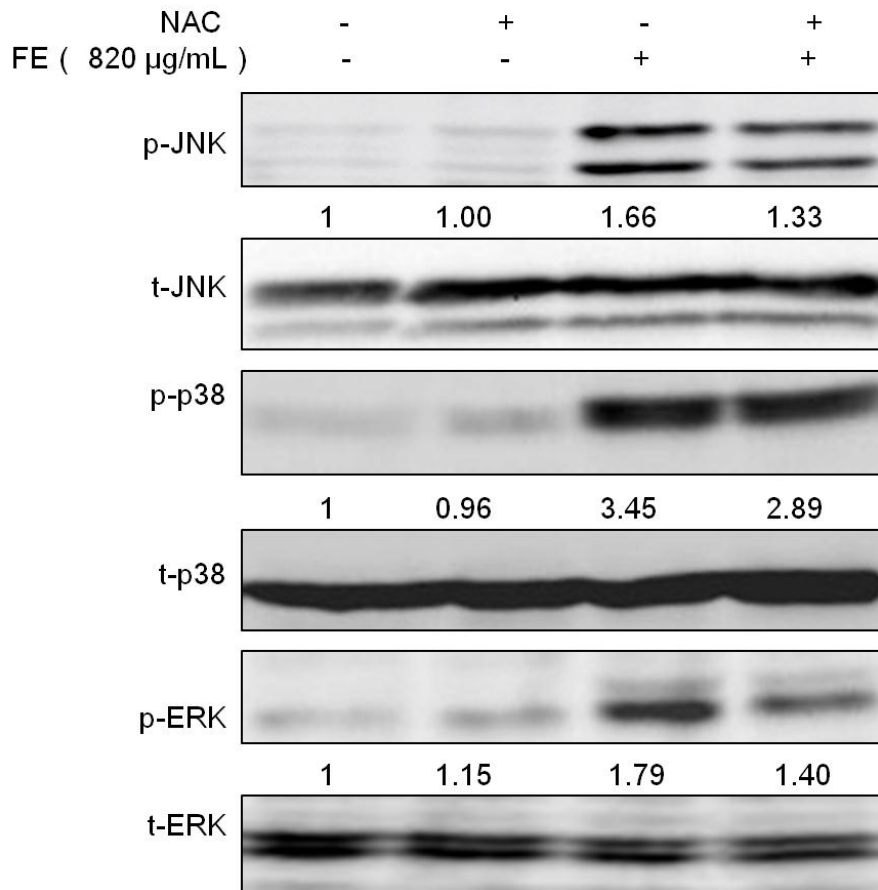
フコイダン処理30分で活性酸素種が発生する。



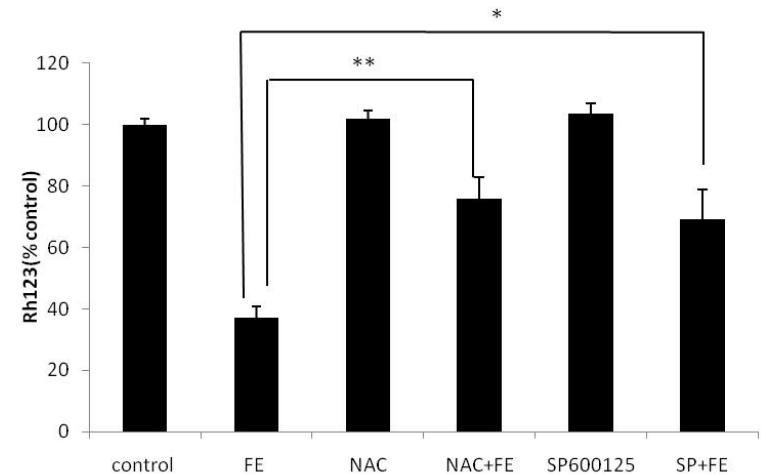
活性酸素種を抑制する抗酸化剤N-アセチルシステイン処理により、フコイダンにより誘導されたアポトーシスが部分的に抑制される。

フコイダンは一過性に活性酸素種を発生させ、アポトーシスを誘導する。

D



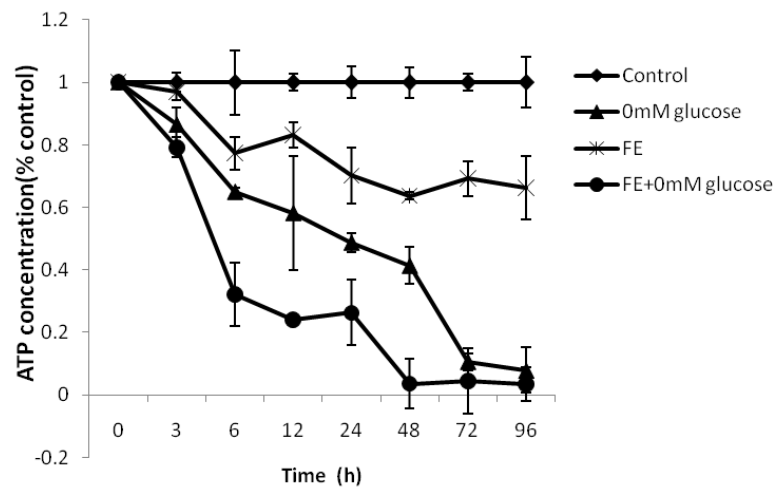
E



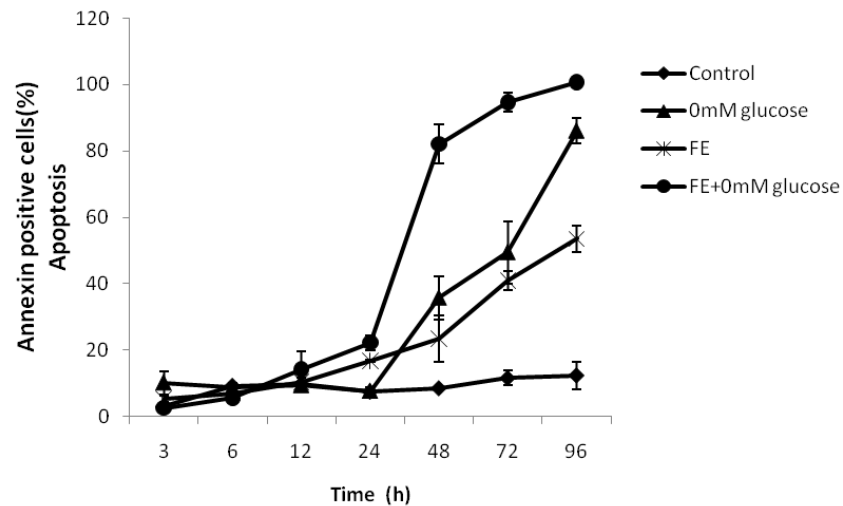
ミトコンドリアの膜電位のFEによる消失に対するN-acetyl cysteineおよびSP600125の保護効果

抗酸化剤N-acetyl cysteinで前処理したMCF-7細胞ではJNK、p38、ERKの活性化が部分的に抑制されることから、フコイダン処理による一過性のROS発生が先行して必要であることが示唆される。

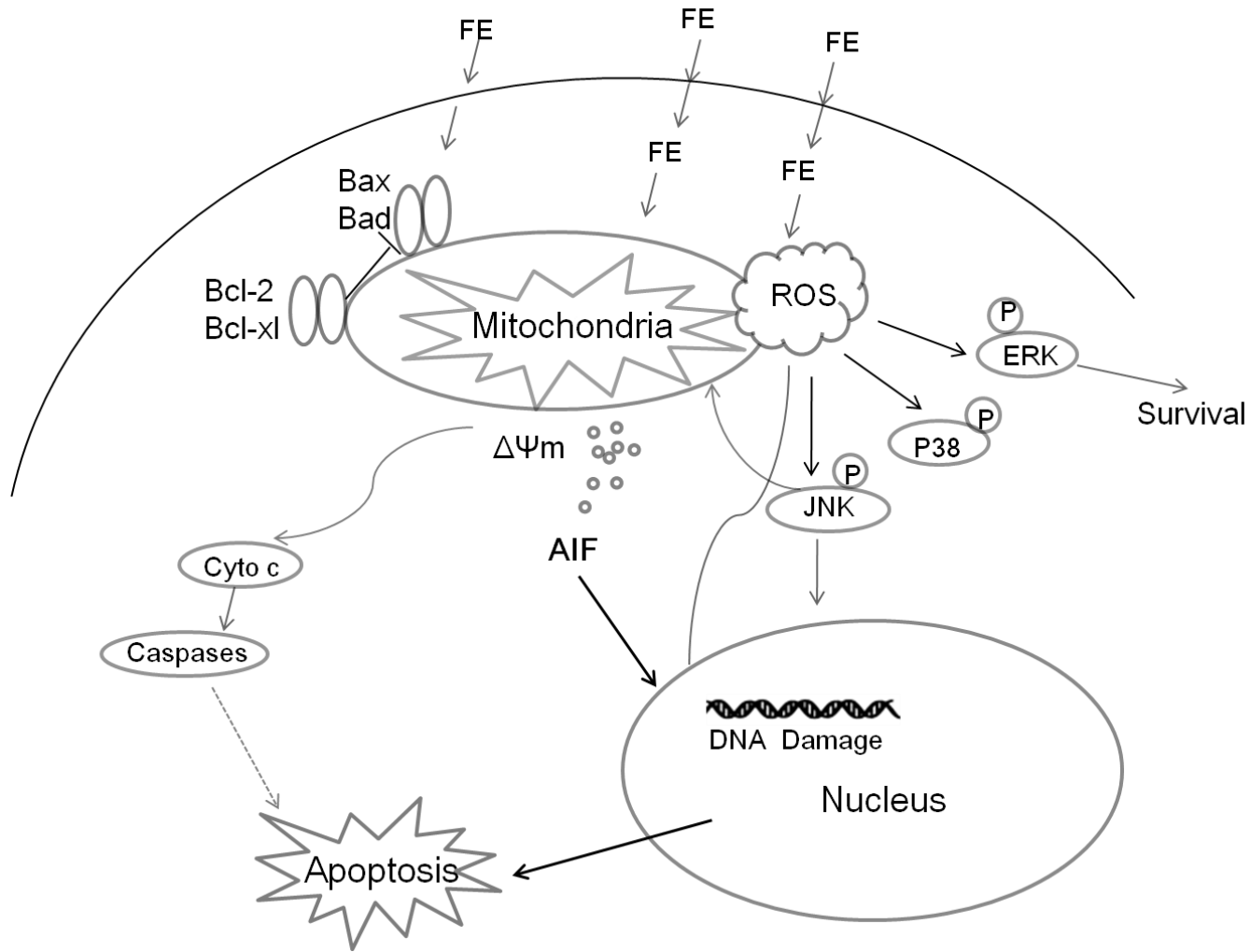
A



B



細胞代謝に及ぼすフコイダンの影響。フコイタンはグルコース飢餓状態でのATP枯渇及びアポトーシスを促進する。



フコイタンはアポトーシス経路が壊れている乳ガンMCF-7細胞に対して、AIFやJNKを活性化し、まだ良く分かっていない核内の経路でDNA分解酵素を誘導し、アポトーシスを誘導する。

酵素消化低分子フコイダン抽出物と 抗ガン剤併用による抗腫瘍効果の増強

抗ガン剤の副作用

ガン細胞は活発に増殖をし続けるため、増殖しやすい細胞に取り込まれて毒性を発揮するのが抗ガン剤である。

したがって、正常細胞、とくに、髪の毛、腸管細胞、白血球や赤血球などを生み出す造血幹細胞も大きなダメージを受け、重篤な副作用が生じる。

抗がん剤の副作用と発現時期

副作用発現時期	副作用の種類
投与日	アレルギー反応, 吐き気, おう吐, 血管痛, 発熱, 血圧低下
投与後2～7日	だるさ, 食欲不振, 吐き気, おう吐, 下痢
投与後1週間～2週間	口内炎, 下痢, 食欲不振, 胃もたれ, 貧血, 白血球減少, 血小板減少
投与後2週間～4週間	脱毛, 皮膚の角化, しみ, 手足のしびれ, 膀胱炎

・ シスプラチン

白金を含む抗ガン剤。がん細胞の2本のDNA鎖と結合することで、DNAの複製を妨げ、がん細胞を死滅させる。

適応となるがん

肺がん、膀胱がん、前立腺がん、卵巣がん、食道がん、胃がん、子宮頸がん、悪性リンパ腫など。

主な副作用

激しい副作用がある。

もっとも深刻なものは腎不全などの腎臓機能の障害。

・ マイトマイシン

抗がん性抗生物質。アルキル化剤と同じようにDNAの分裂阻止や、活性酸素によるDNA鎖切断などによってDNAの複製を阻害し、抗がん作用を発揮する。

適応となるがん

慢性骨髄性白血病、慢性リンパ性白血病、頭頸部がん、肺がん、胃がん、大腸、肝臓がん、膵臓がん、子宮頸がん。

主な副作用

骨髄抑制。腎障害。

・タモキシフェン

乳がん細胞のエストロゲン受容体をブロックし、細胞の増殖を抑制する。
ホルモン療法として使用。

適応となるがん
乳がんなど。

主な副作用
強くない。
目のかすみなど。

・パクリタキセル（タキソール）

微小管に結合して安定化させ脱重合を阻害することで、腫瘍細胞の分裂を阻害する。

適応となるがん

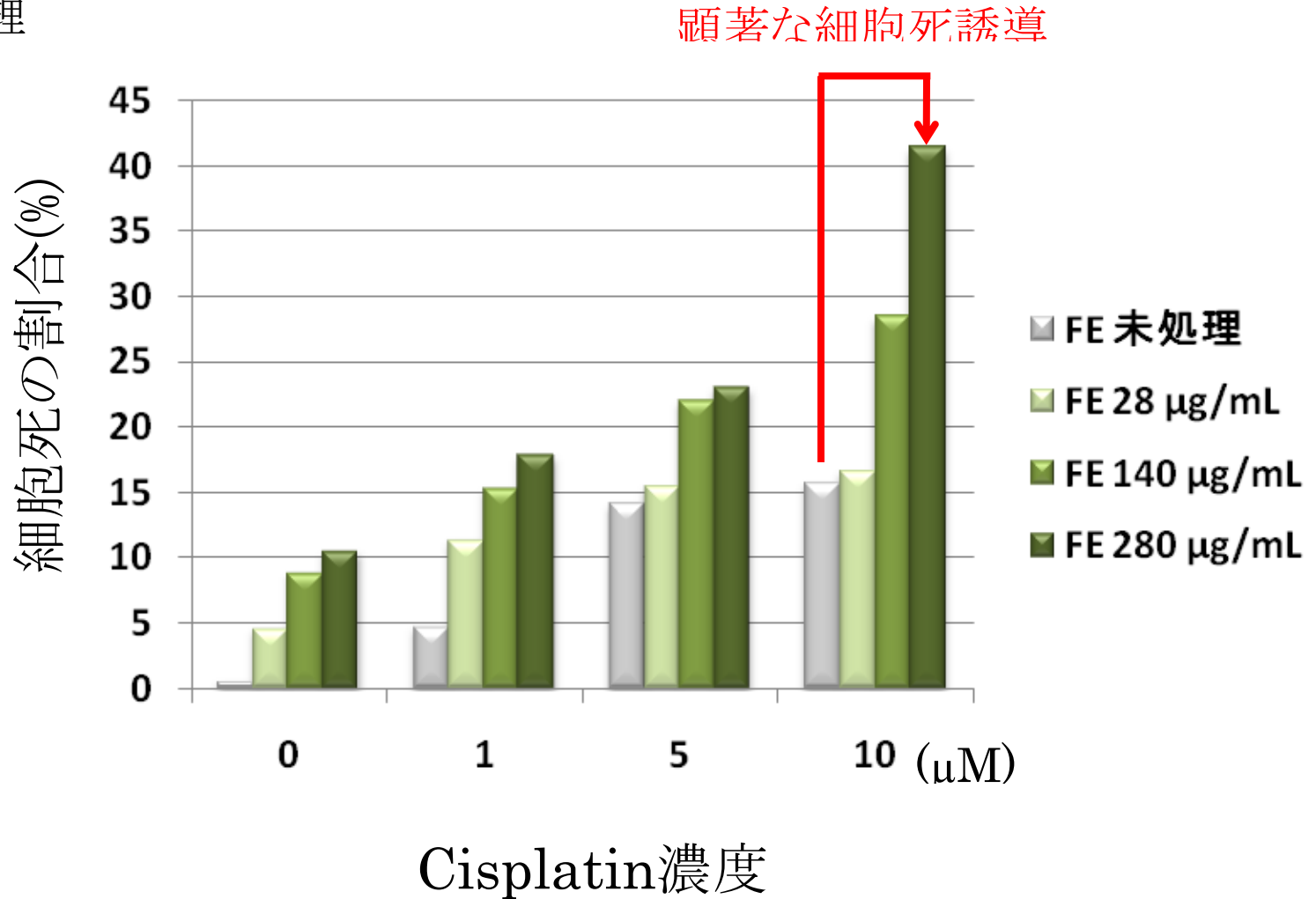
卵巣がん、非小細胞肺がん、乳がん、胃がん、子宮体がんなど。

主な副作用

発熱、骨髄抑制、関節や筋肉の痛み、比較的軽い吐き気や嘔吐、そして頭髮以外の体毛を含めた全身的な脱毛。深刻なアレルギー症状が現れることもある。

ガン細胞(HT1080)における酵素消化低分子化フコイダンの効果

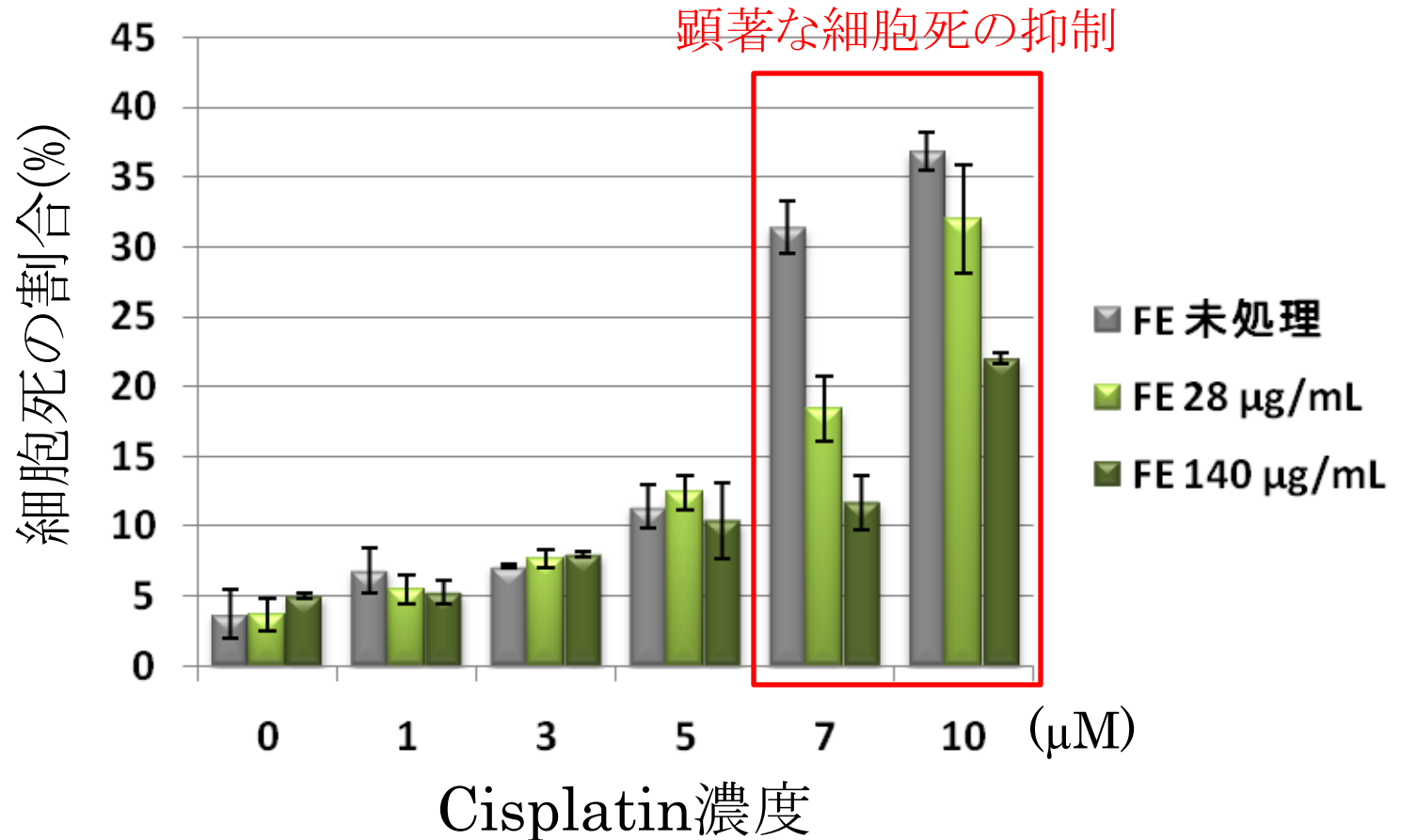
48 時間処理



酵素消化低分子化フコイダン抽出物が、抗ガン剤cisplatinによる細胞死誘導を増強

正常細胞(TIG-1)における酵素消化低分子化フコイダンの効果

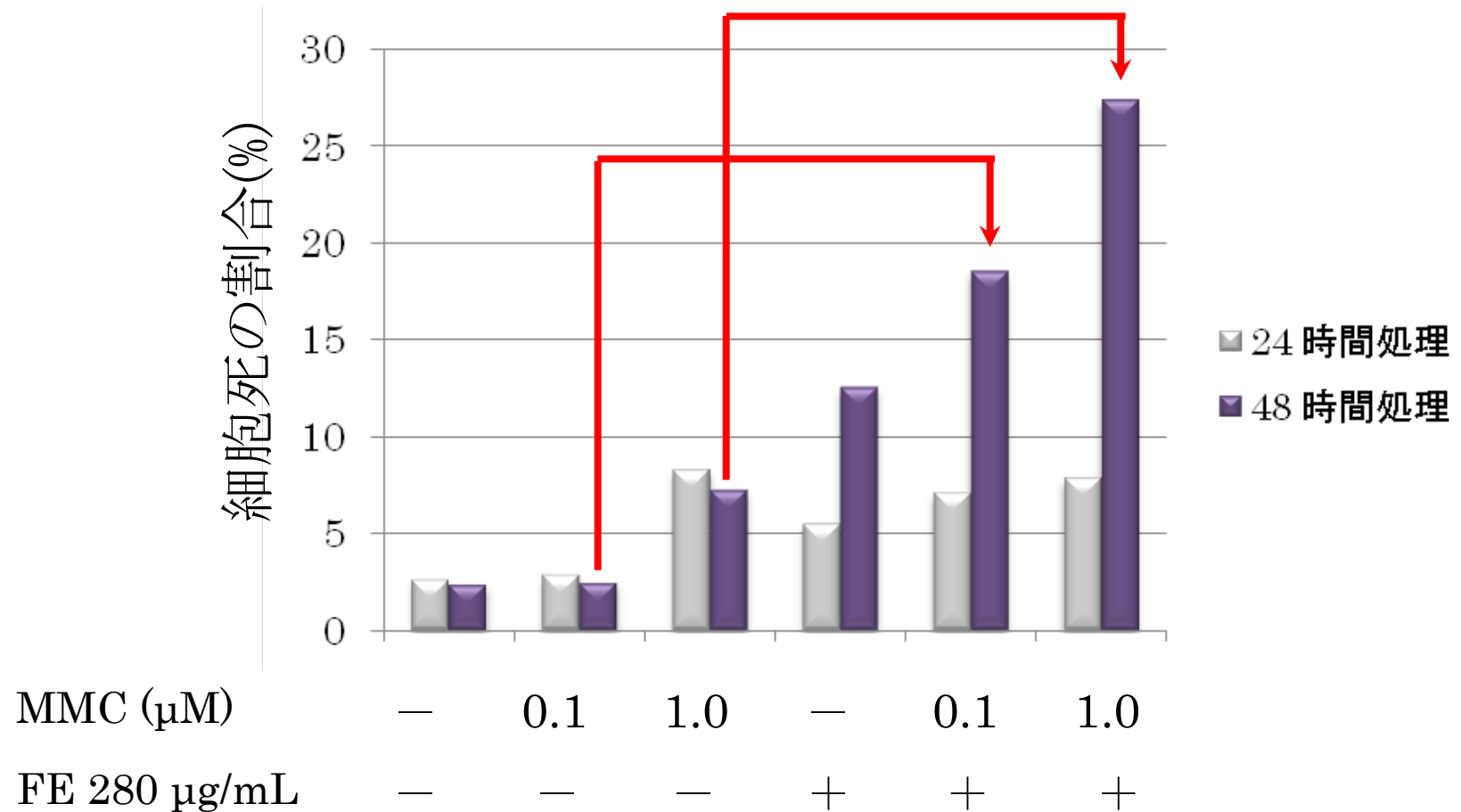
48 時間処理



酵素消化低分子化フコイダン抽出物が、抗ガン剤cisplatinによる細胞死誘導を抑制

ガン細胞(HT1080)における酵素消化低分子化フコイダンの効果2

抗ガン剤MitomycinC(MMC)使用



酵素消化低分子化フコイタン抽出物が、
抗ガン剤MitomycinCによる細胞死誘導も増強

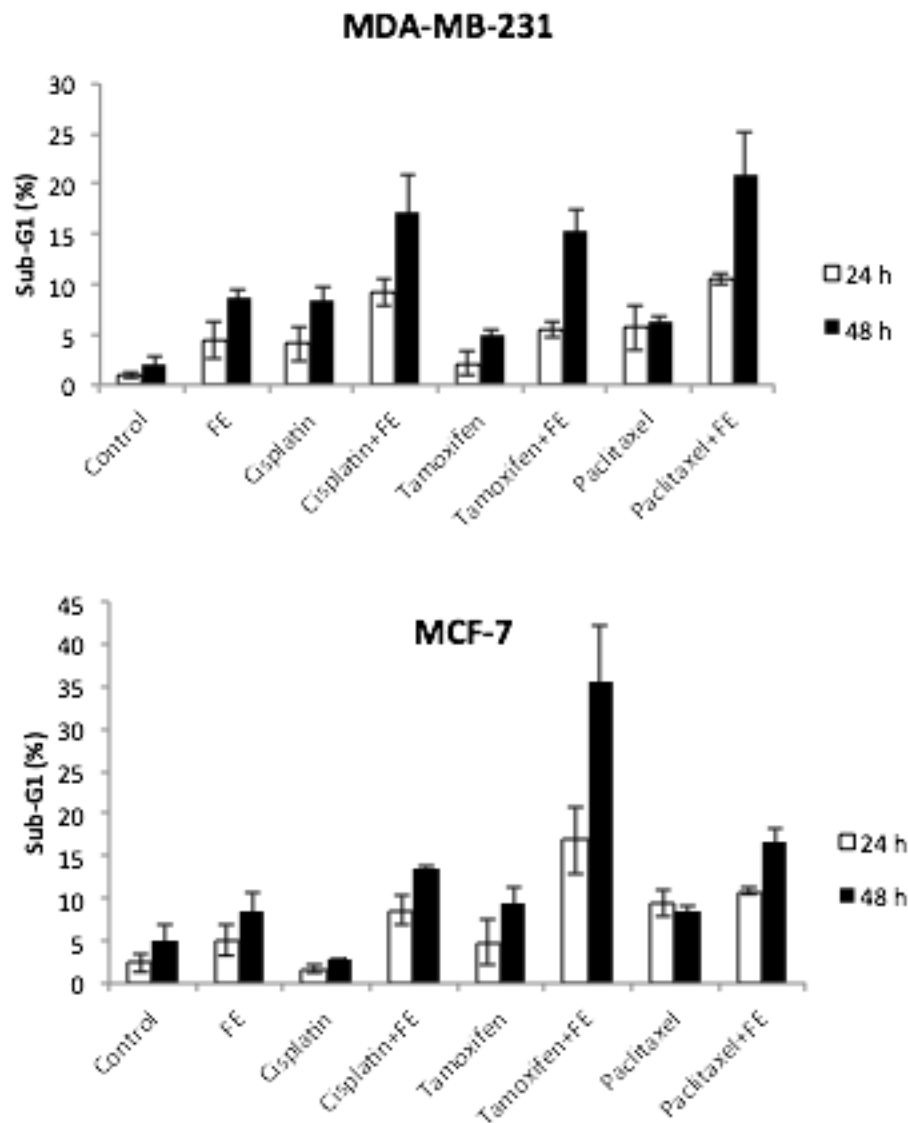


Fig.1 MDA-MB-231 and MCF-7 cells were treated with FE either alone at 200 μ g/mL or in combination(200 μ g/mL FE plus 5 μ M Cisplatin , 200 μ g/mL FE plus 10 μ M Tamoxifen and 200 μ g/mL FE plus 2.5 nM paclitaxel) , and after indicated time of incubation were measured by flow cytometry.

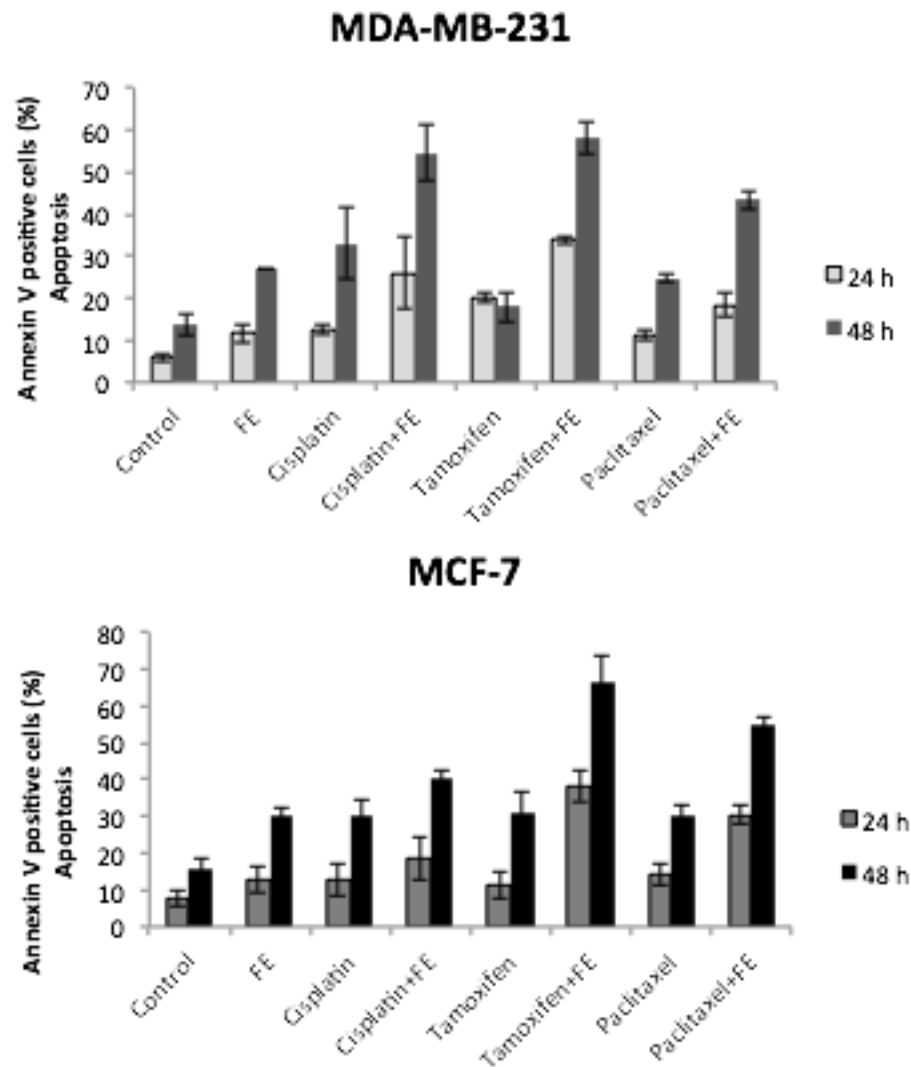


Fig.2 MDA-MB-231 and MCF-7 cells were treated with FE either alone at 200 μ g/mL or in combination (200 μ g/mL FE plus 5 μ M Cisplatin , 200 μ g/mL FE plus 10 μ M Tamoxifen and 200 μ g/mL FE plus 2.5 nM paclitaxel) . Apoptosis was evaluated by determining the percentage of annexin V-positive cells.

小 括

- ・ 酵素消化低分子フコイダンと抗ガン剤CDDP(シスプラチン)、MMC(マイトマイシンC)、タモキシフェンまたはパクリタキセルとの併用により抗ガン剤のガン細胞死有効効果が増強された。
- ・ 酵素消化低分子フコイダンはCDDPによる正常細胞の障害を抑制した。
- ・ 酵素消化低分子フコイダンと抗ガン剤の併用により抗ガン剤の効果を高めるとともに、正常細胞に対する障害を抑制し、副作用を軽減することが期待された。

今後の予定

1. 抗ガン剤とフコイダンの組合せによるヒトガン細胞アポトーシス誘導効果に関する論文を出版する。
2. 乳ガン細胞とタモフェキシンに限って作用機構を詳細に解析した論文を出版する。
3. 乳ガン細胞を移植したマウスを用いて、タモキシフェンとフコイダンとの併用効果に関する論文を出版する。
4. フコイダン中の活性成分を精製し、同定した論文を出版する。

2010年9月22日 日本癌学会学術大会で口頭発表

酵素消化低分子化フコイダン抽出物による 癌細胞特異的細胞死及び糖鎖合成経路の 改変誘導

Kiichiro Teruya¹, Sanetaka Shirahata¹,
Toshihiro Yoshida²

(1. Dept. Biosci. and Biotech., Fac. Agr., Kyushu Univ., 2. Yoshida Clinic)

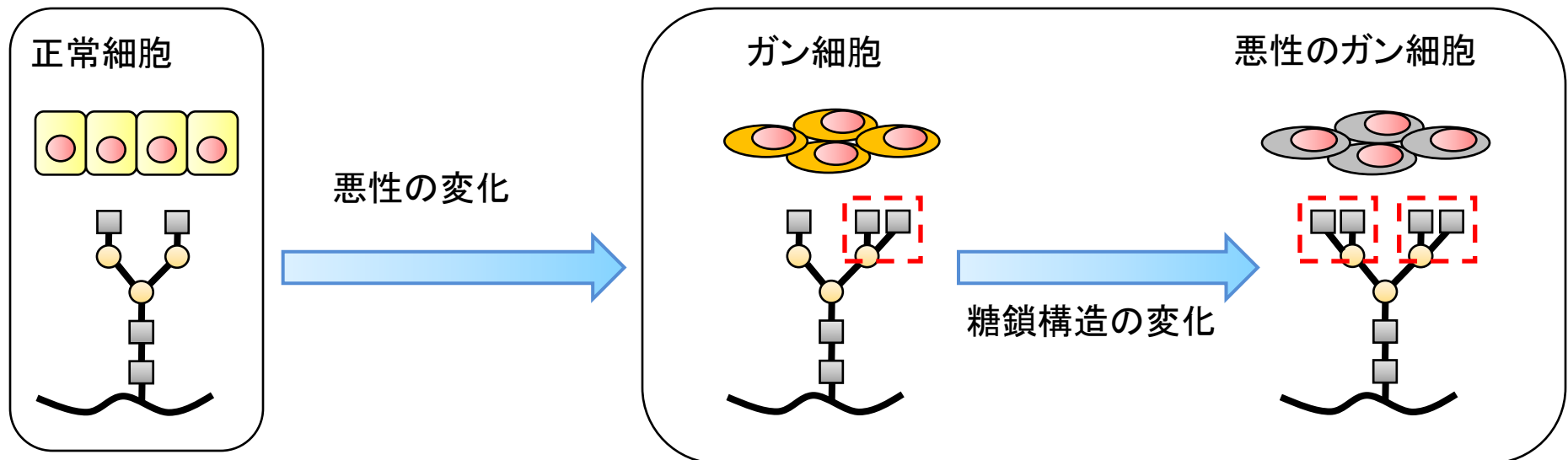
背景

細胞表面に発現している糖鎖は免疫機能や恒常性維持機能のいずれにも密接に関与している

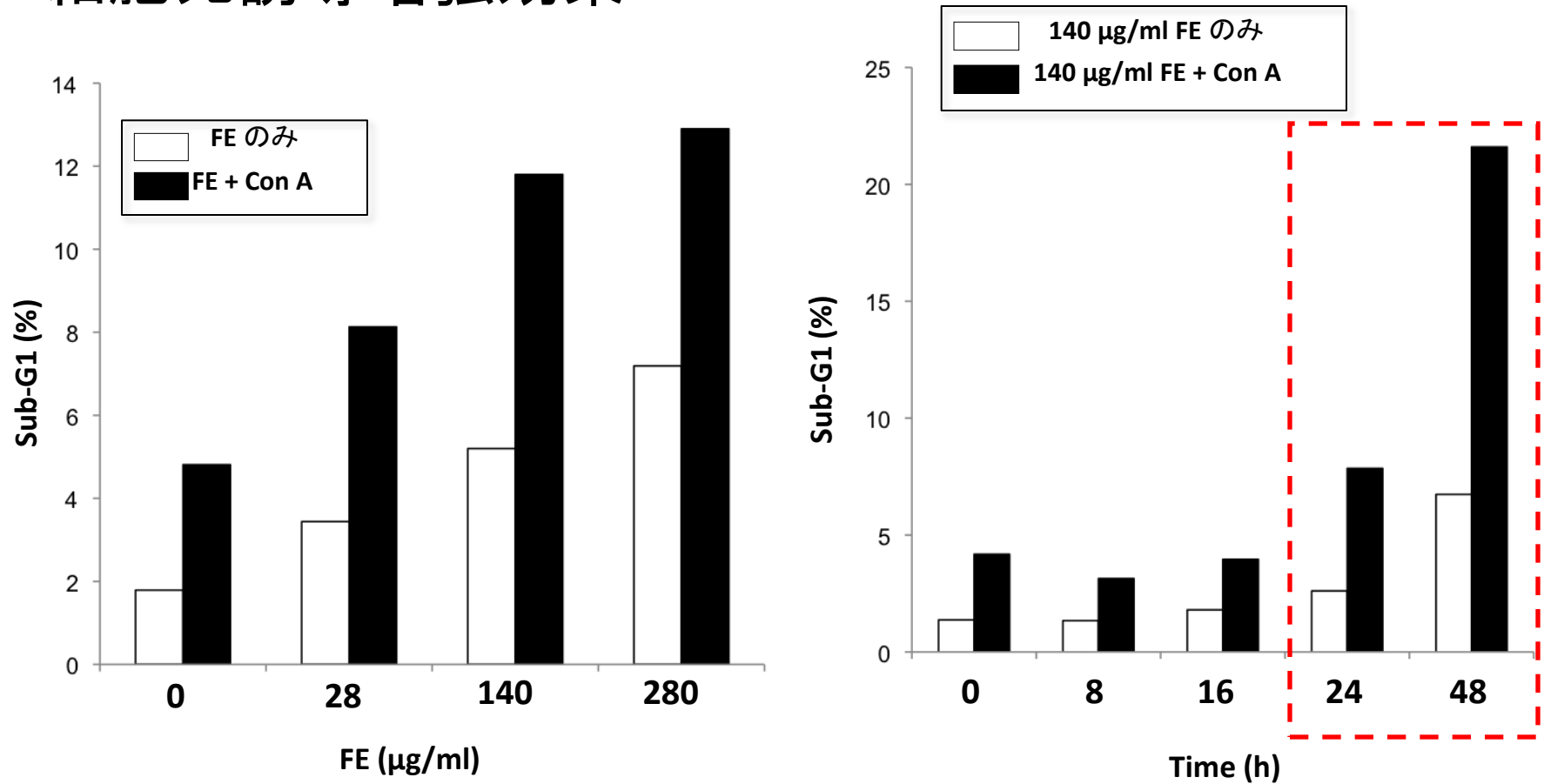
糖鎖合成の異常



ガンを含む様々な疾病の一因と考えられている

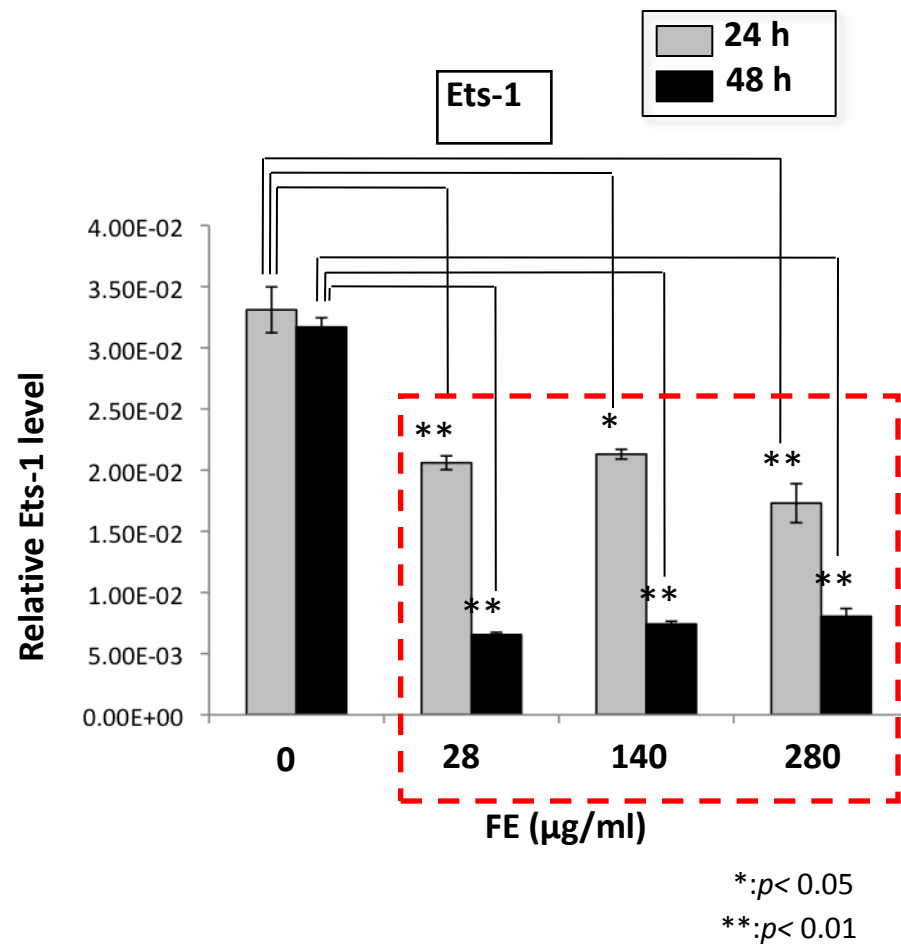
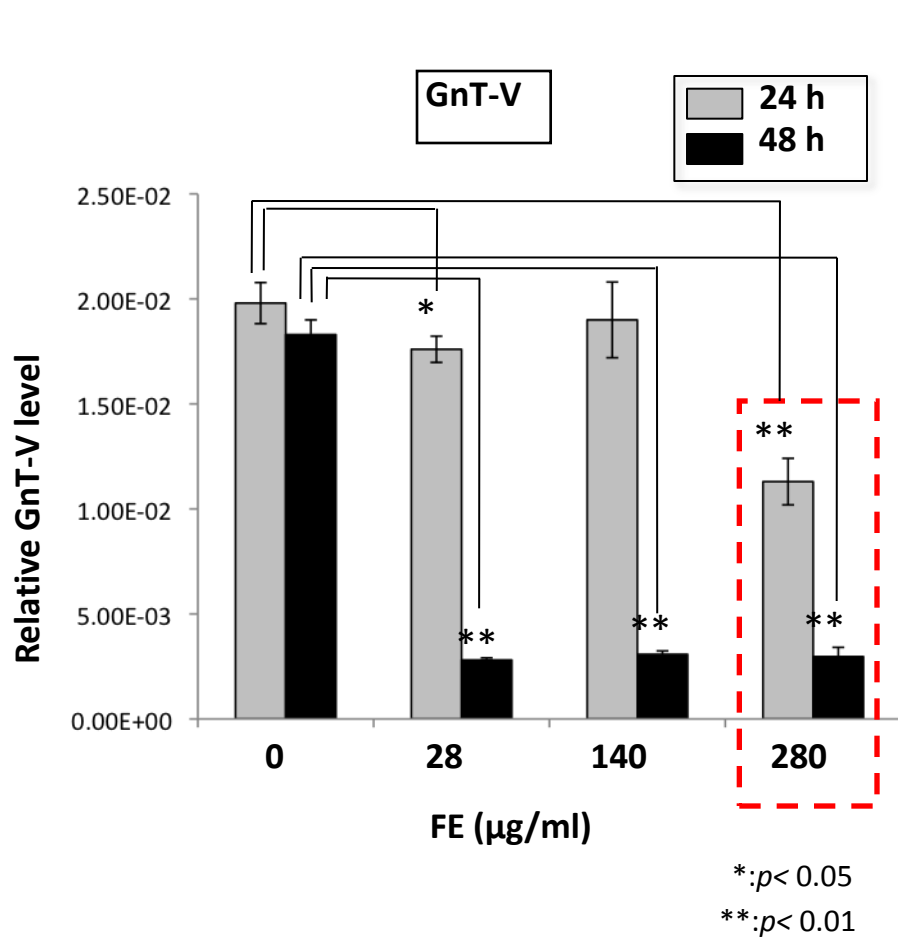


FEと糖鎖結合タンパク質Con Aの併用による細胞死誘導増強効果



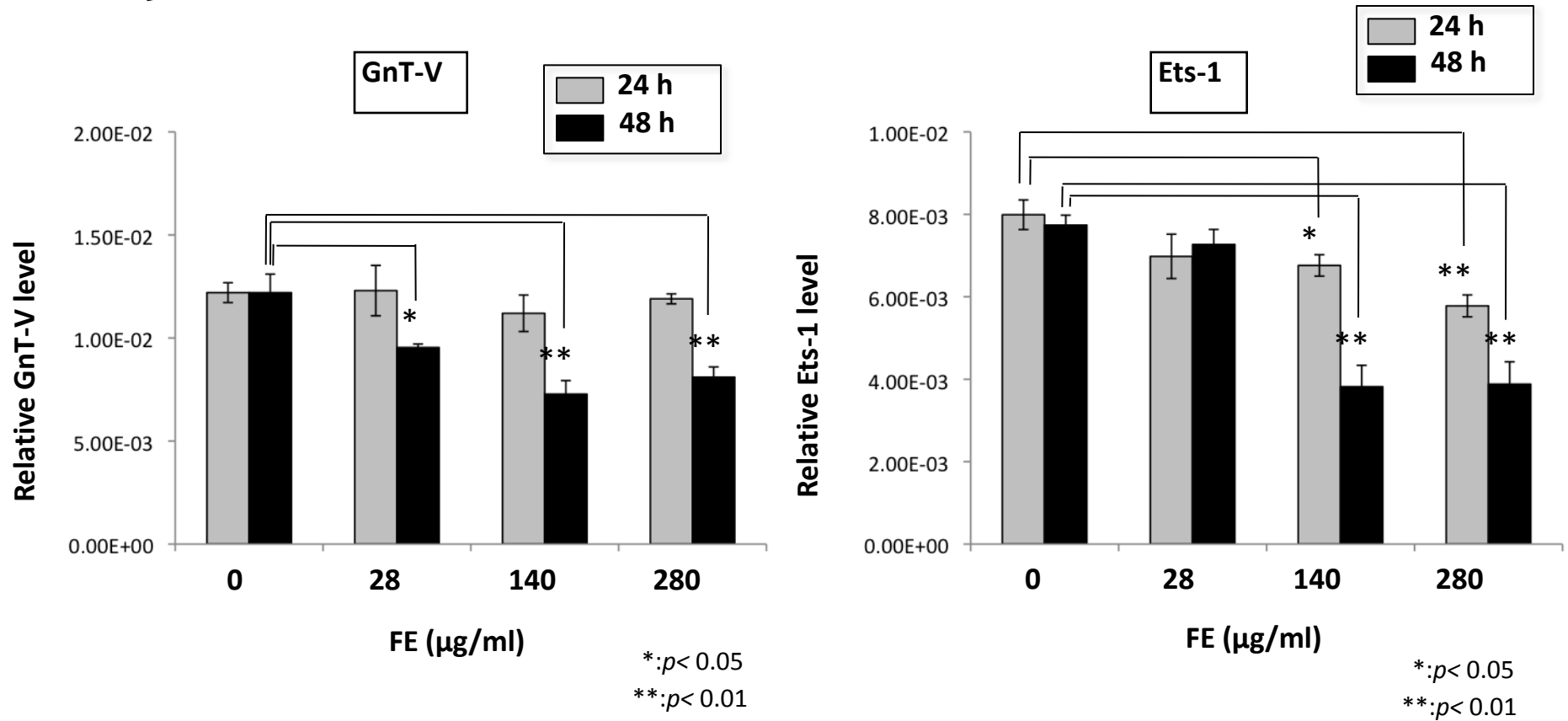
- ・FE処理によりガン細胞表面の糖鎖構造に変化が起こり、ConAとの併用による細胞死が促進された。
- ・細胞死誘導増強効果はFE処理24時間以降に認められた。

FE処理したHT1080細胞のGnT-V及びEts-1のmRNA発現量の変化



FE処理によってGnT-V及びEts-1のmRNA発現量減少が確認された

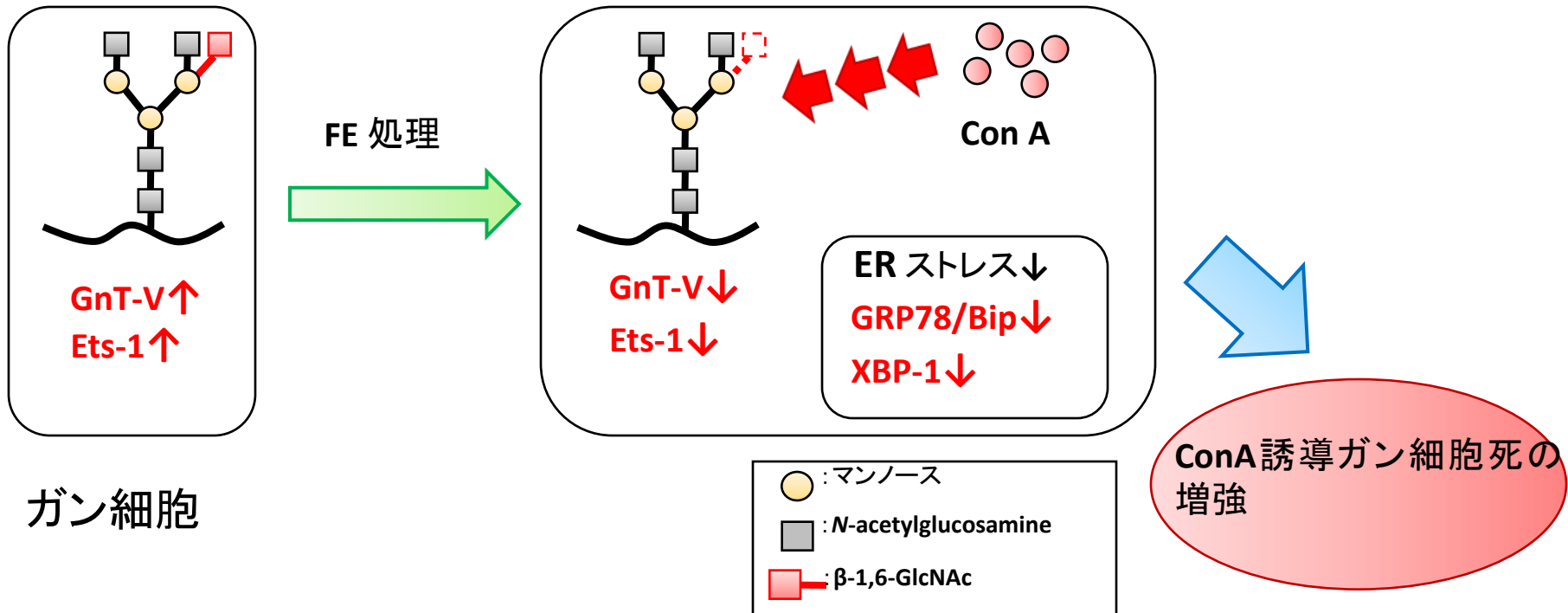
FE処理したヒト正常線維芽細胞TIG-1のGnT-V及びEts-1のmRNA発現量の変化



- ・ ヒト正常細胞ではFE処理24時間ではGnT-V及びEts-1のmRNA発現量に顕著な変化は認められなかった
- ・ 48 時間処理ではわずかな発現量減少が確認された

総括

- ・FE処理によってCon A反応性糖鎖の発現量増加及びPHA-L4反応性糖鎖の発現量減少が確認された
- ・糖鎖発現量の変化にはGnT-V及びEts-1の発現抑制が深く関与していることが示唆された
- ・FEによるERストレスの軽減がGnT-Vの発現抑制に寄与していると推測された



今後の予定

フコイダンによる細胞表面糖鎖の変化は学問的には興味ある現象である。

しかし、ガン治療の観点から考えた場合、細胞表面の糖鎖変化がフコイダンの抗腫瘍効果において、種々の変化を起こす原因なのか、フコイダンによるガン細胞の形質変化に伴う付随的な変化なのかを見極める必要がある。

付随的な変化である場合は、ROS発生抑制などガン形質の抑制の原因となるより重要な作用機構の解明に力を入れる。

まとめ

- 低分子フコイダン濃度依存的にガン細胞の増殖及びアポトーシス死を誘導するが、正常細胞には作用しない。
- 低分子フコイダンは強い活性酸素消去能を示し、ガン細胞の転移・浸潤能及び血管新生能を抑制する。腫瘍免疫も増強する。
- 低分子フコイダンはガン化の過程で生じたガン細胞表面の異常糖鎖を糖鎖合成経路に作用して変化させ、アポトーシスを起こしやすくする。正常細胞には作用しない。
- 低分子フコイダンは抗癌剤によるガン細胞死を増強するが、抗癌剤による正常細胞の死は抑制する。抗酸化作用により抗癌剤の副作用を軽減することが期待される。

ご清聴ありがとうございました。