



九州大学

2018年9月9日



第12回 LMF研究会

基礎研究 最新報告



九州大学大学院 農学研究院 生命機能科学部門
システム生物工学講座 細胞制御工学分野
照屋 輝一郎

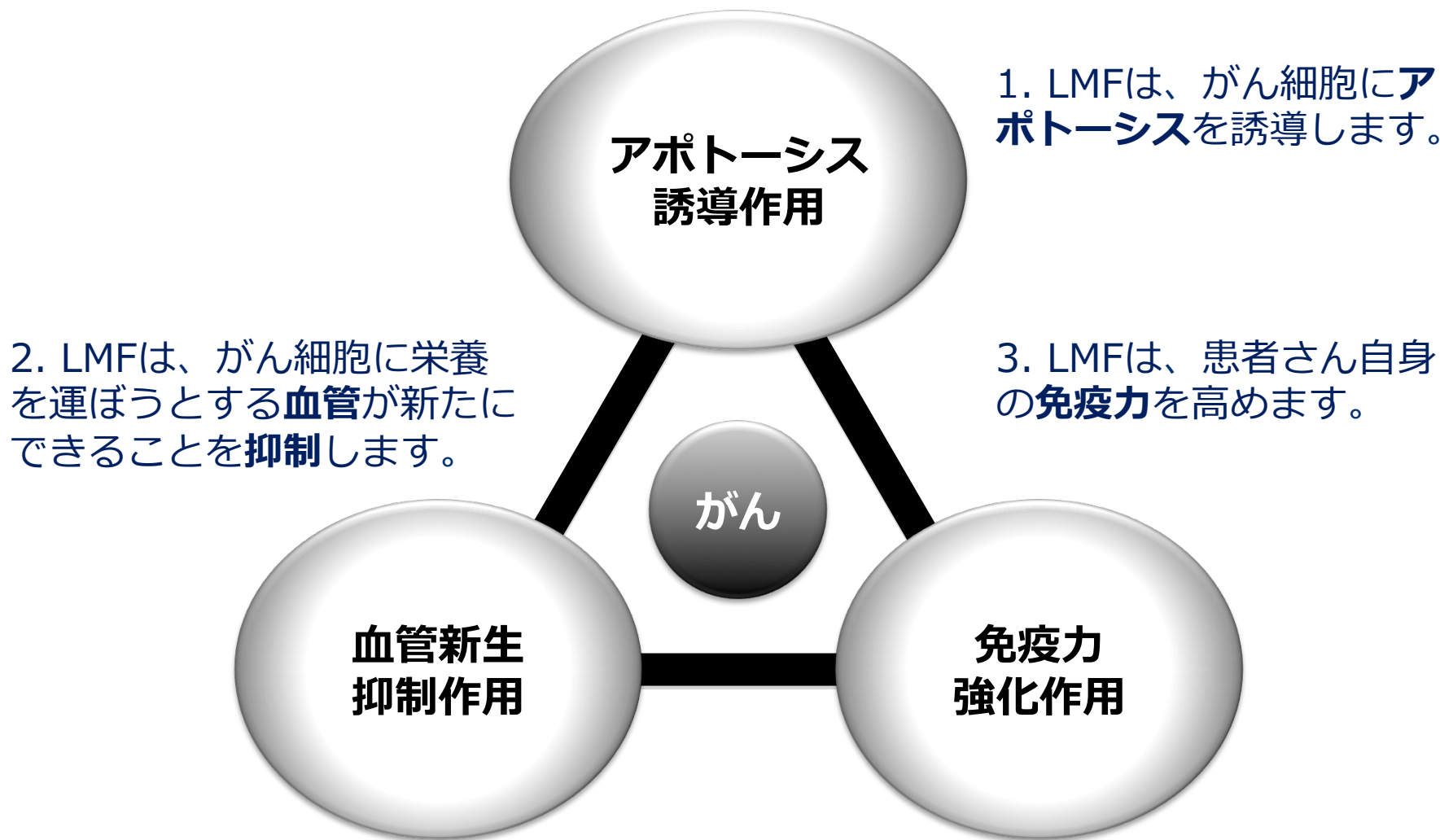
本日のトピックス

- 低分子化フコイダン（LMF）について
- LMFと低分子化前のフコイダンのがん抑制効果
- LMFとp53のかかわりについて
- がん幹細胞形質に対するLMFの効果



低分子化フコイダン（LMF）に ついて

低分子化フコイダン（LMF）の3つの作用

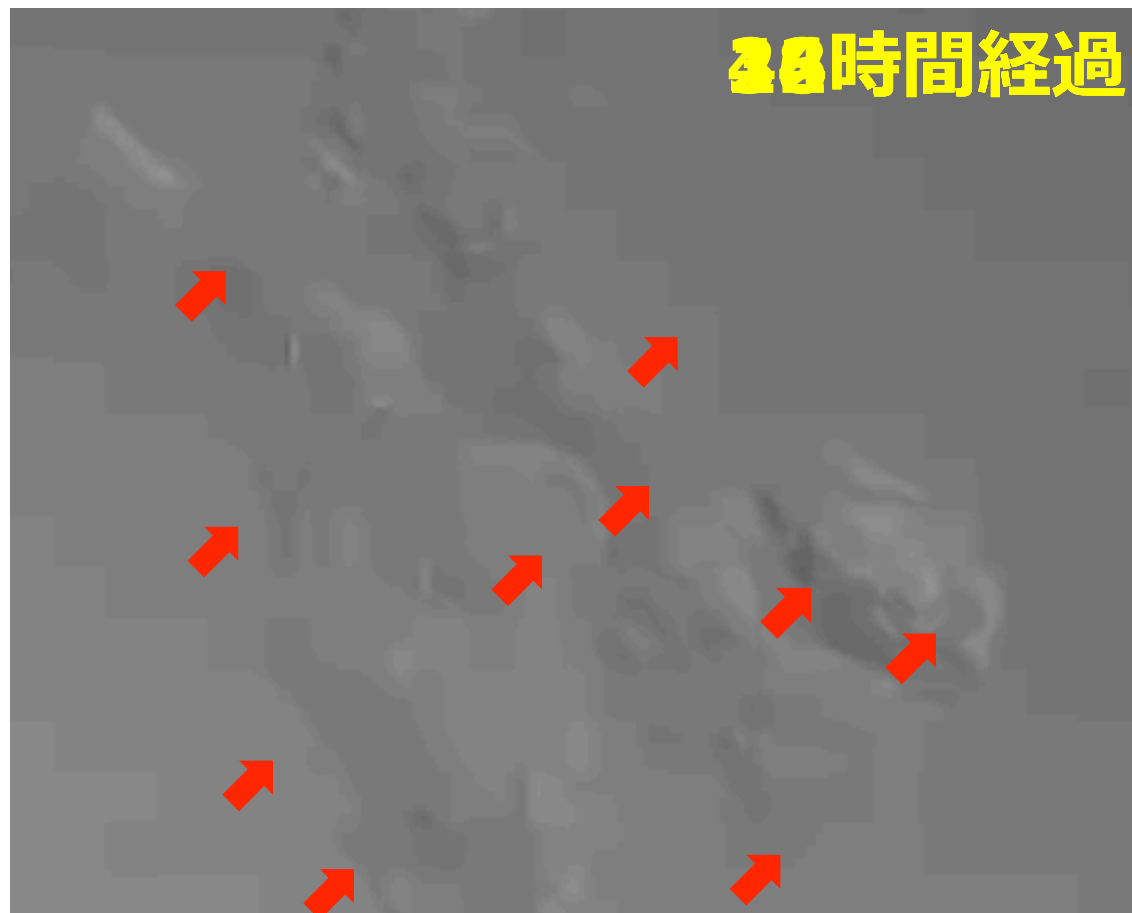




1. アポトーシス誘導作用

がん細胞にだけ特異的に作用し、
がん細胞にアポトーシス（細胞死）を誘導

LMF処理によるがん細胞のアポトーシス



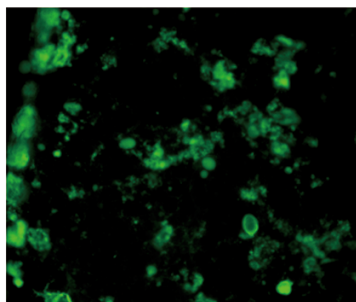
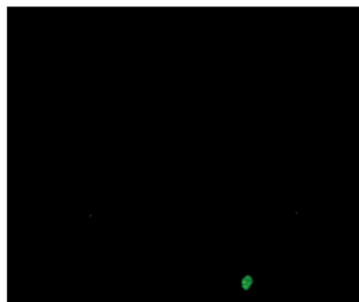
➡ :アポトーシス細胞

LMF処理 (420 $\mu\text{g}/\text{mL}$)
によるHT1080細胞のアポ
トーシス (撮影49時間)

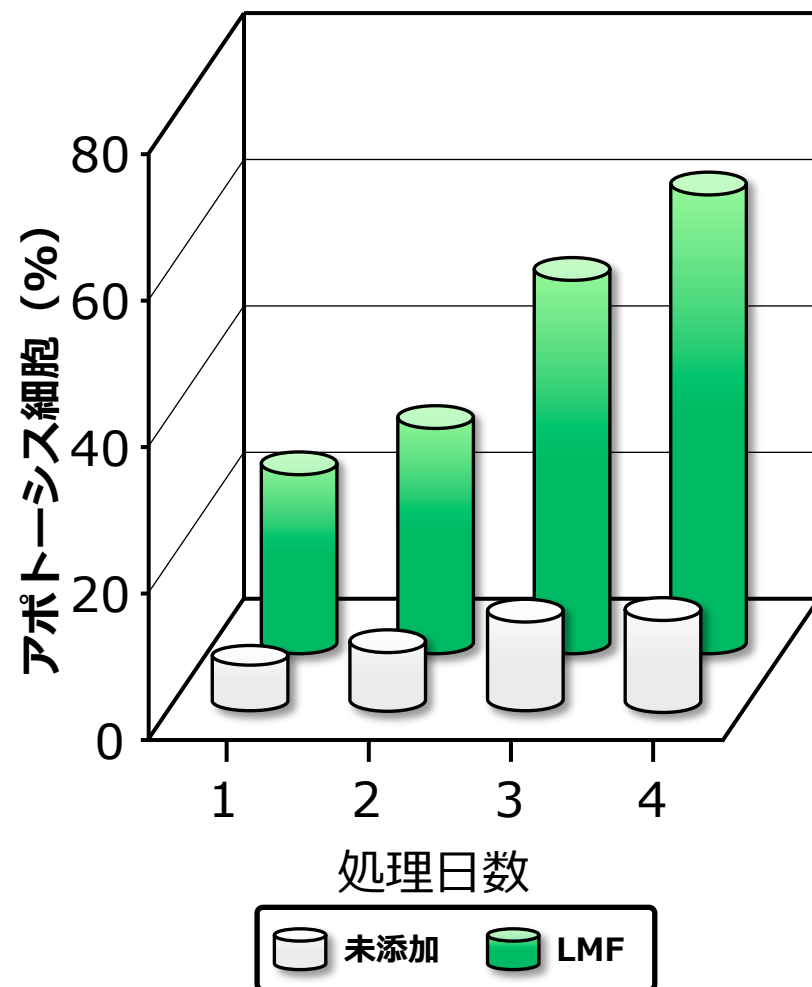
LMFはアポトーシスを誘導する

未添加

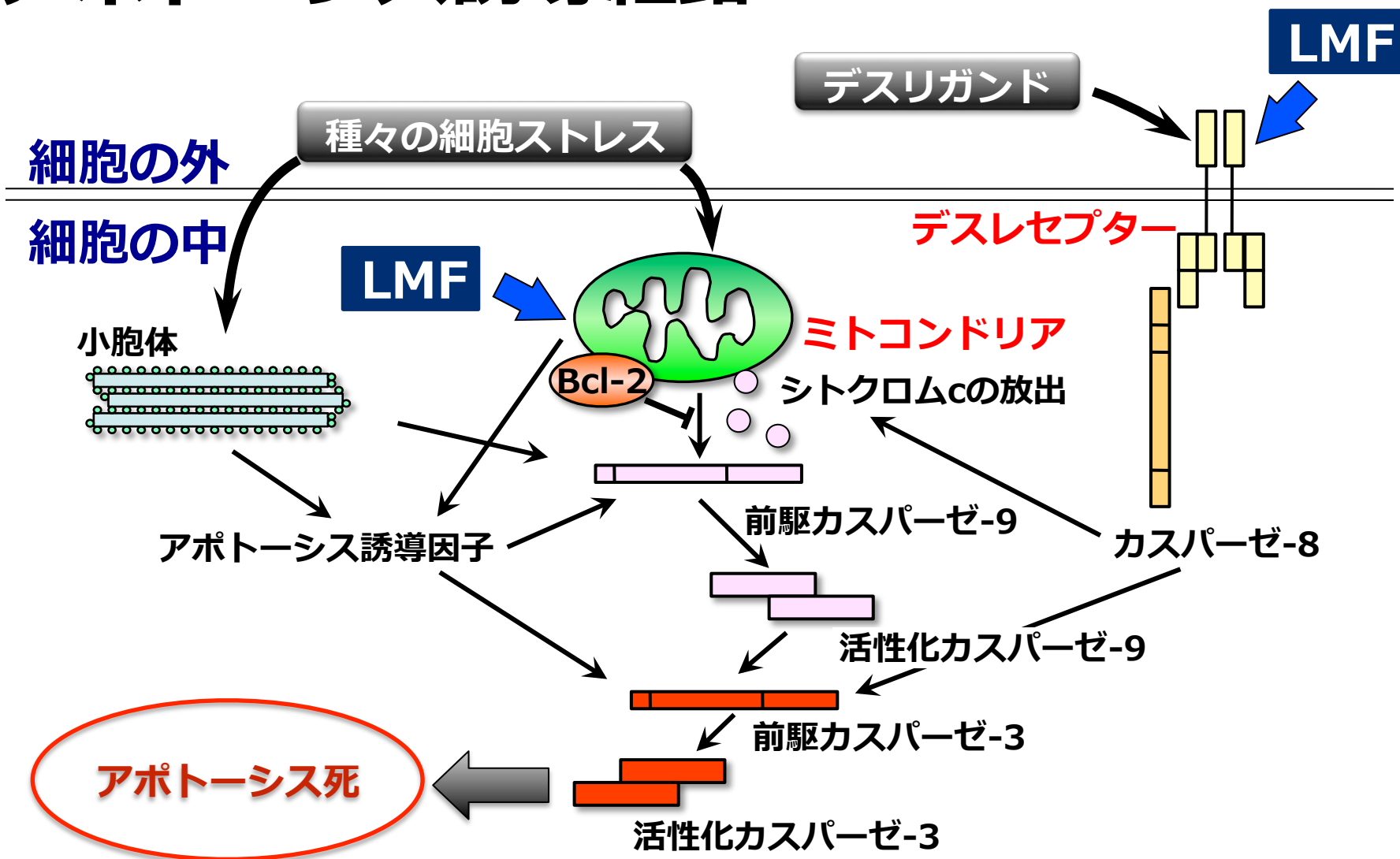
LMF処理



アポトーシス細胞（緑に染色）



アポトーシス誘導経路





2. 血管新生抑制作用

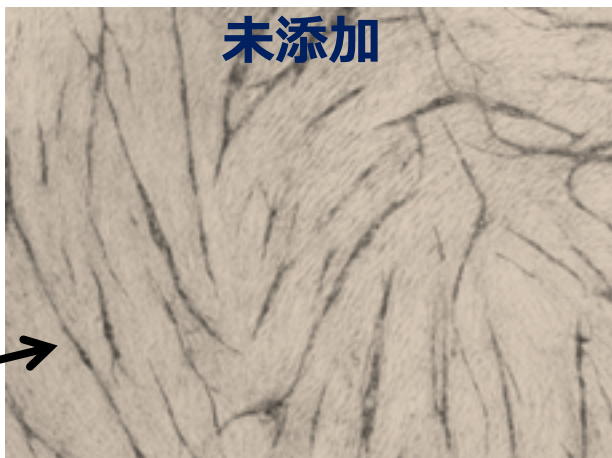
がん細胞に栄養を運ぼうとする血管が新たにできることを抑える
がん細胞を「兵糧攻め」に、
がん転移・浸潤の抑制

がん細胞の血管新生を抑制

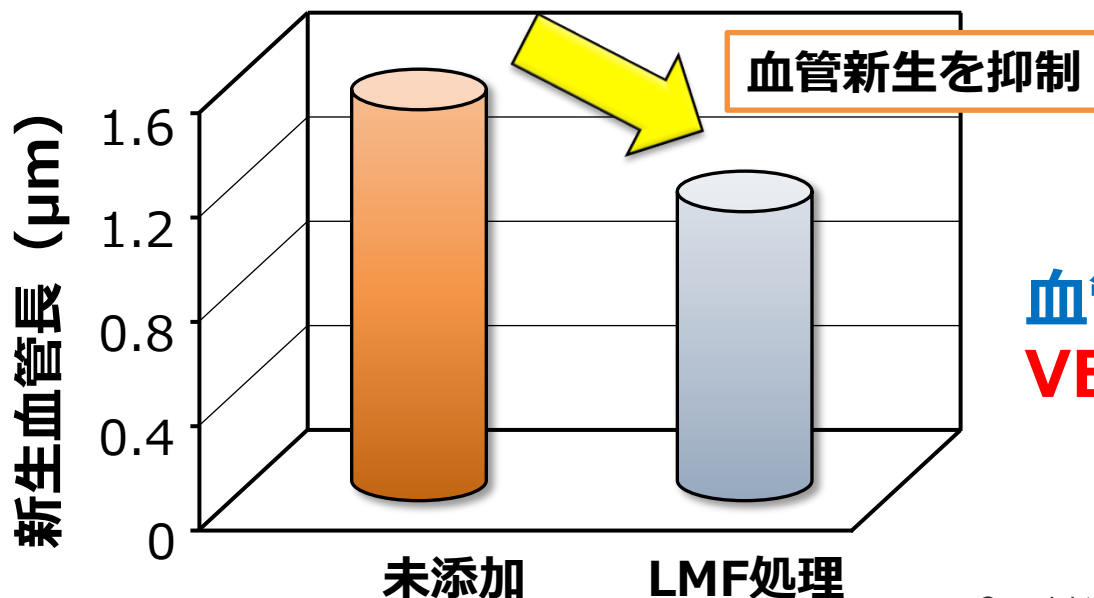
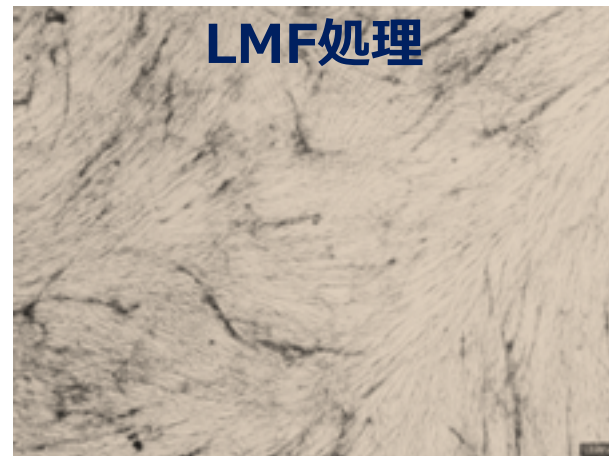
がん細胞が血管
の形成を誘導 →

血管を染色

未添加

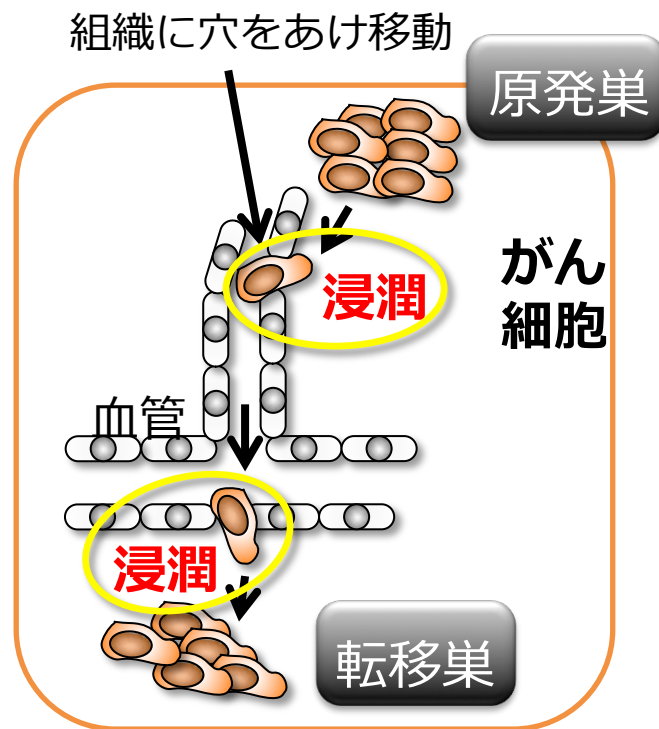
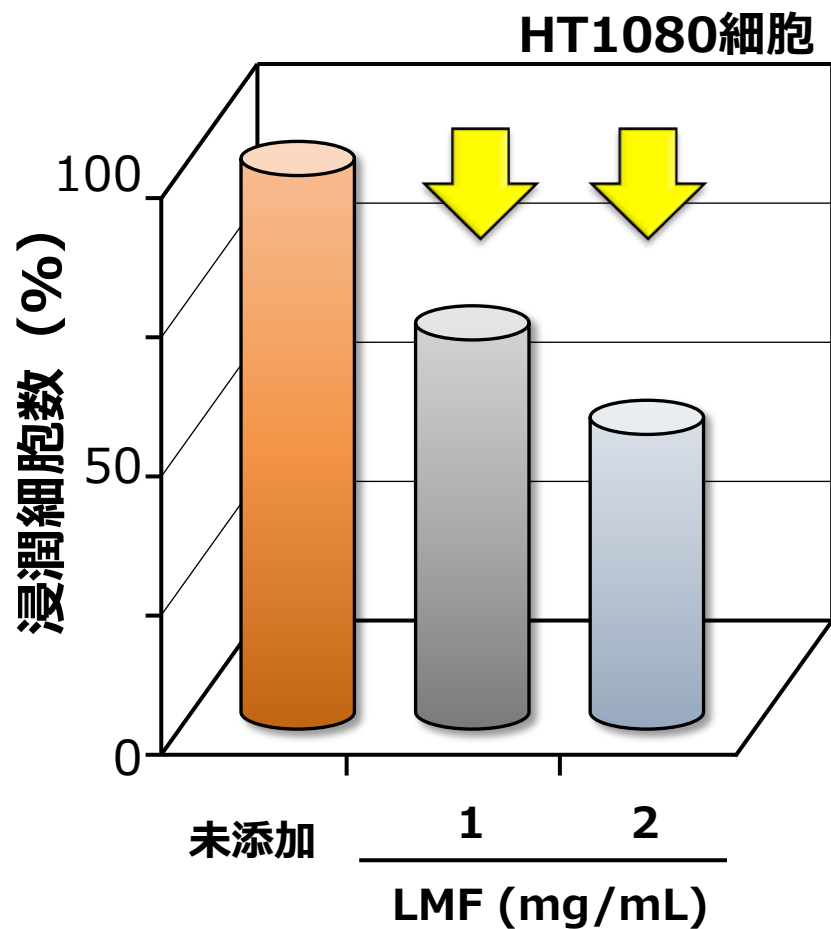


LMF処理



血管新生を起こす
VEGFの発現を低下

がん細胞の浸潤を抑制



浸潤を起こすMMP
の発現を低下

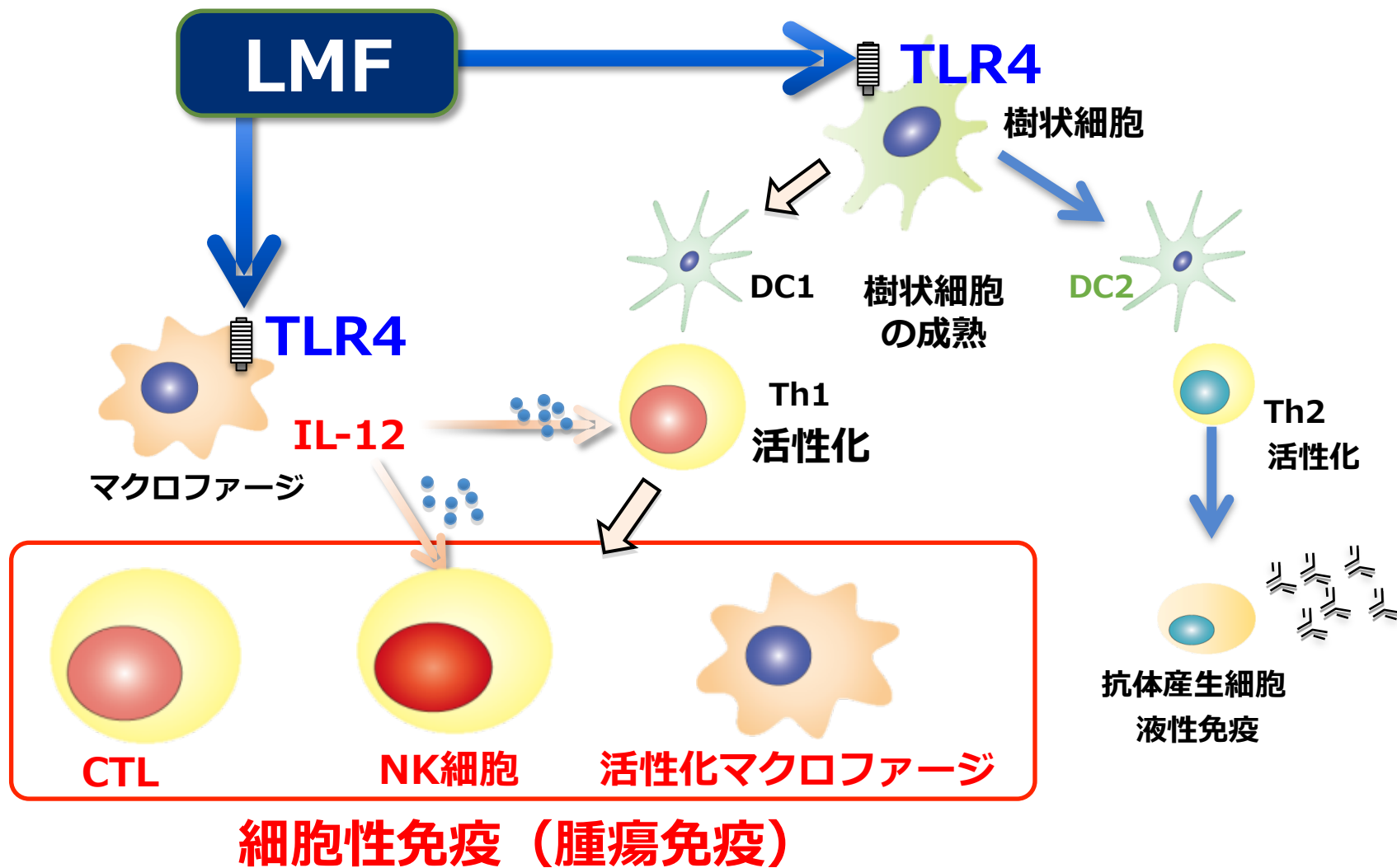


3. 免疫力強化作用

腫瘍に対する免疫を活性化

免疫：体に悪影響を与える異物を撃退する自己防衛システム

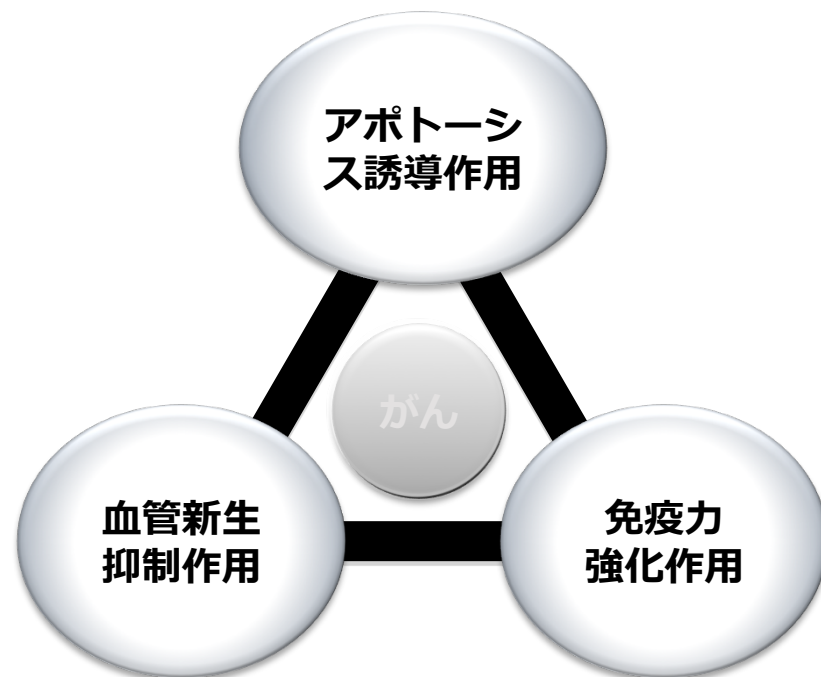
腫瘍に対する免疫の活性化



まとめ

低分子化フコイダン
(LMF) は、

- がん細胞の増殖抑制及び**アポトーシス死を誘導**するが、正常細胞には作用しない。
- がん細胞の**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。



低分子化フコイダン
(LMF) の作用

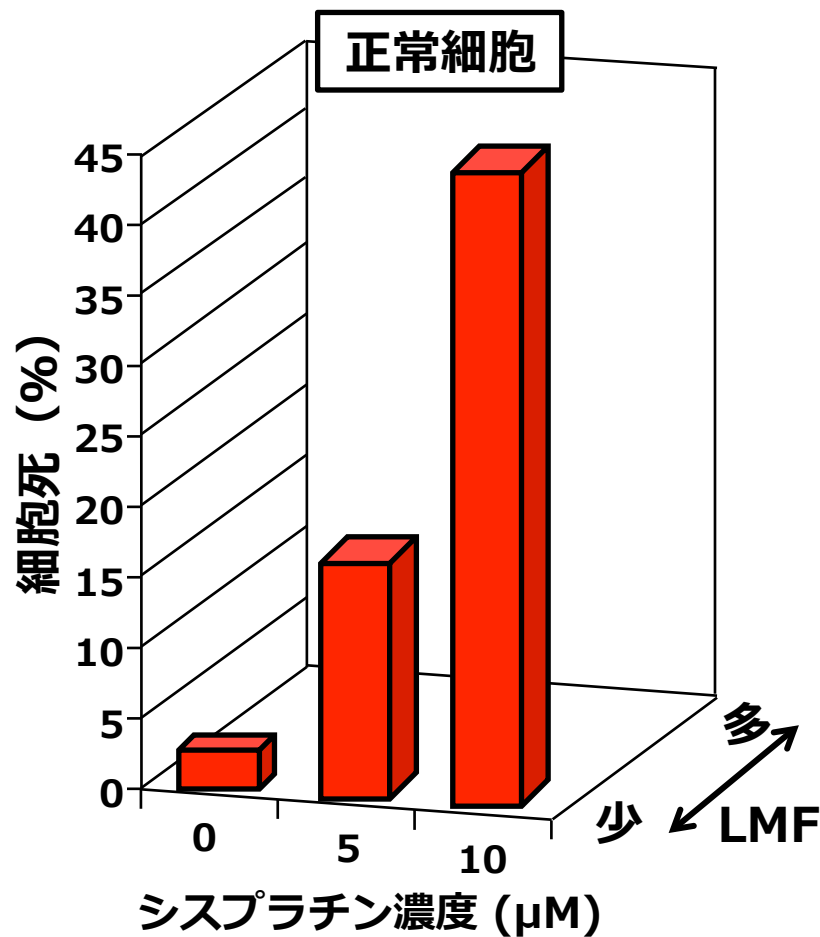
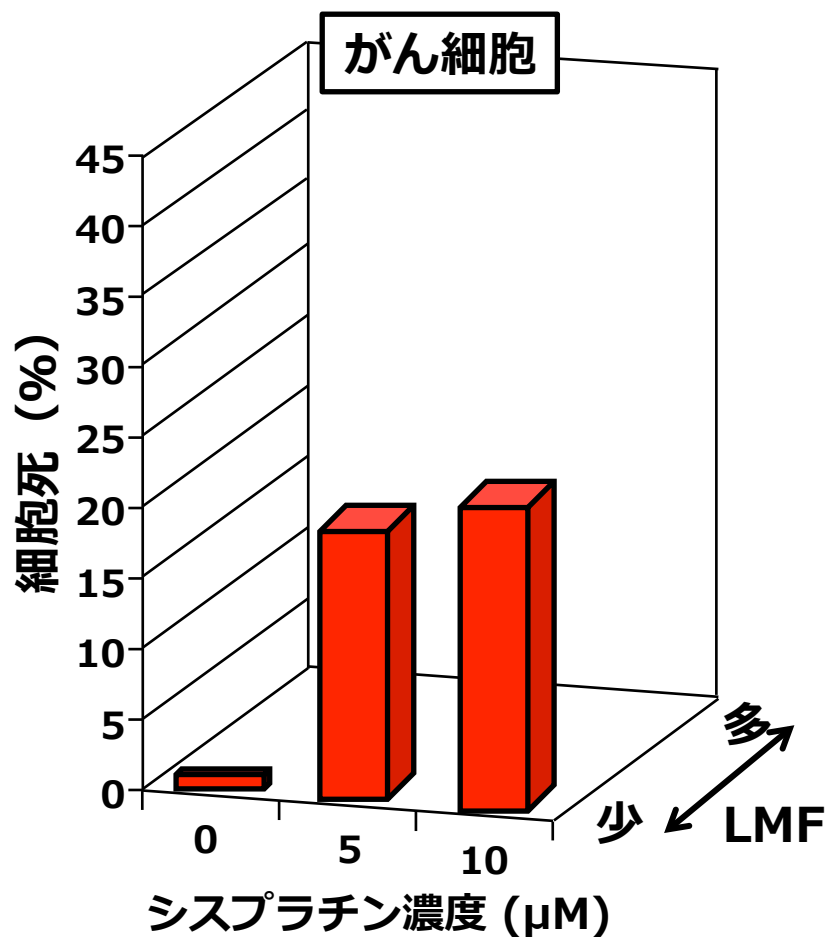


抗がん剤とLMFの併用効果

抗がん剤の効果を増強
抗がん剤の副作用を軽減



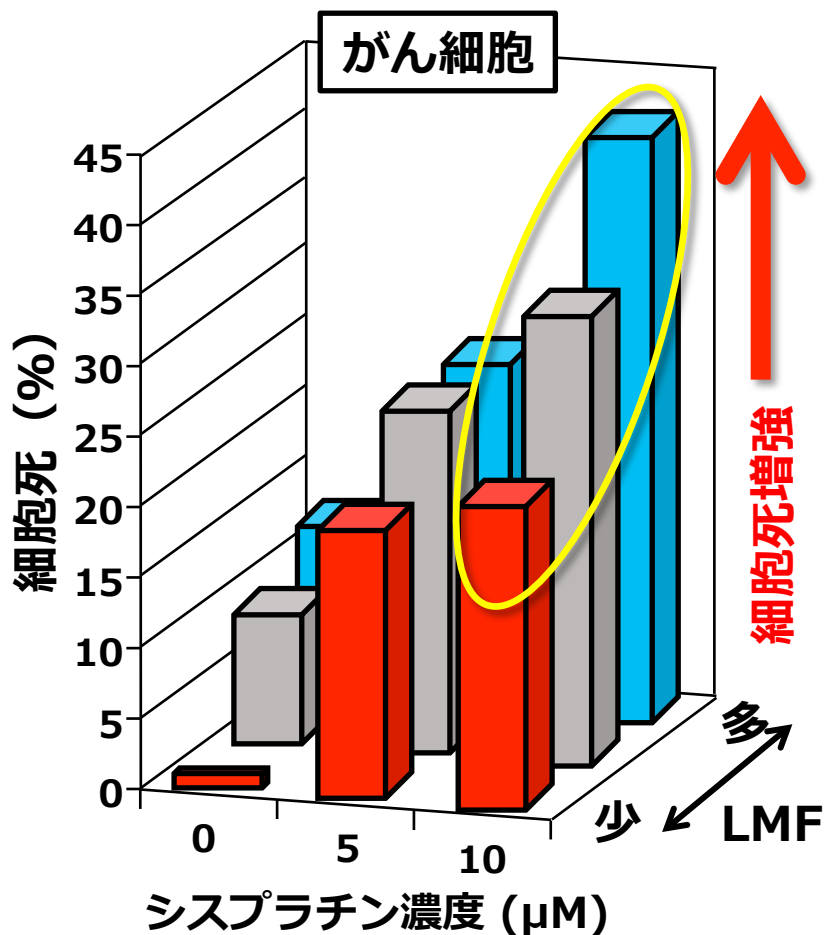
LMFと抗がん剤併用による抗腫瘍効果の増強



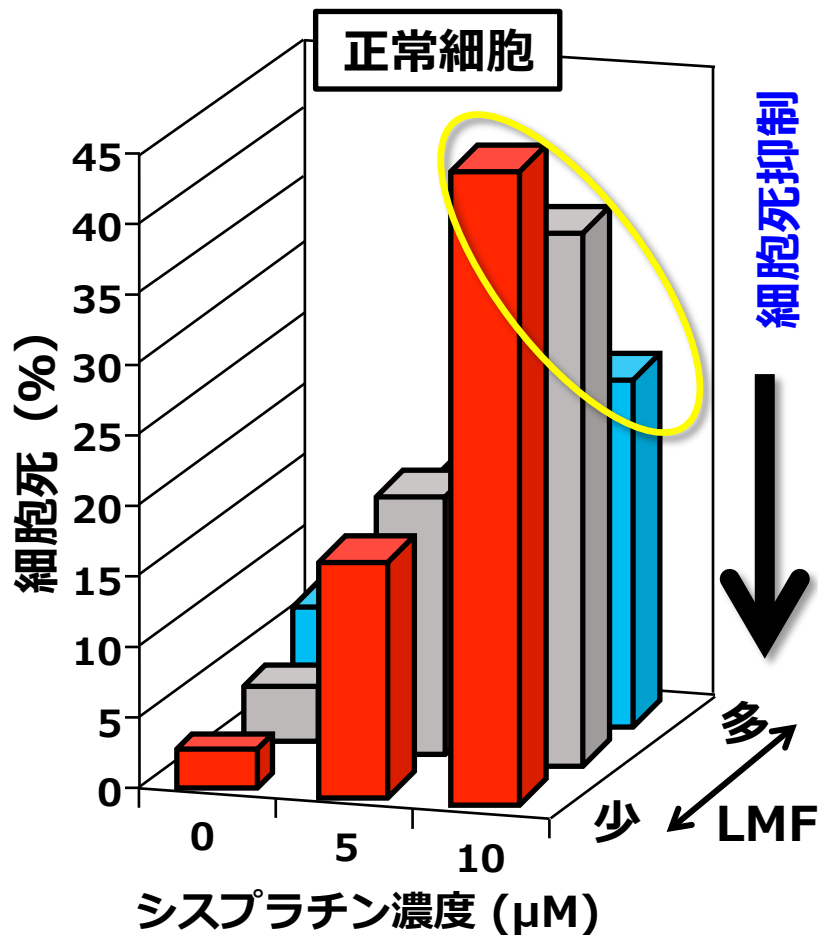


LMFと抗がん剤併用による抗腫瘍効果の増強

がん細胞死を増強



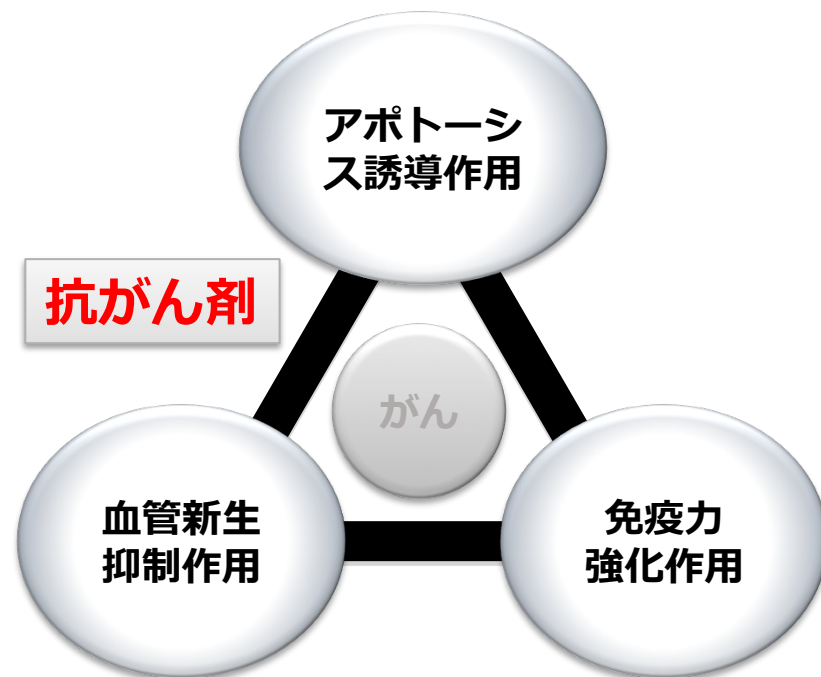
正常細胞死を抑制



まとめ

低分子化フコイダン（LMF）は、

- がん細胞の増殖抑制及び**アポトーシス死を誘導**するが、正常細胞には作用しない。
- がん細胞の**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。
- **抗がん剤**によるがん細胞死を増強するが、抗がん剤による正常細胞の死は抑制する。



低分子化フコイダン
(LMF) の作用



LMFと低分子化前のフコイダンのがん抑制効果

LMFのがん抑制効果：方法

96-well plateに細胞 を100 μ L/wellで播種

(HT1080 : 7×10^3 cells/well、TIG-1 : 2.2×10^4 cells/well)



インキュベート (Overnight、37°C、5% CO₂)



各フコイダン試料を加えた培地に交換 (添加量 : ~ 0.8 mg/mL)



インキュベート (3日間、37°C、5% CO₂)



WST-1を添加



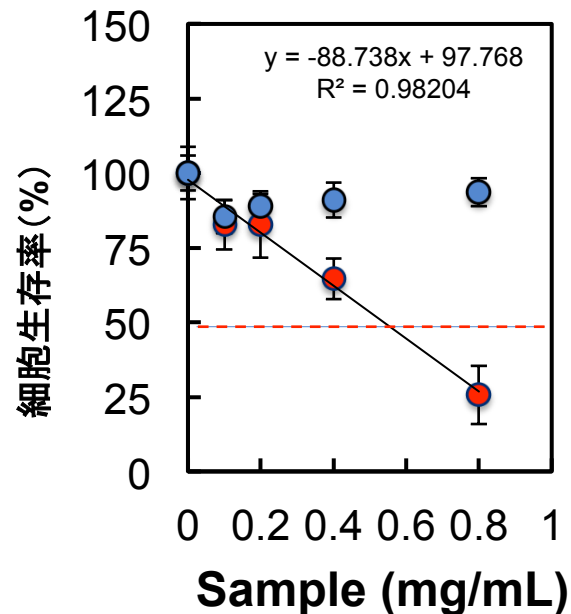
インキュベート (1時間、37°C、5% CO₂)



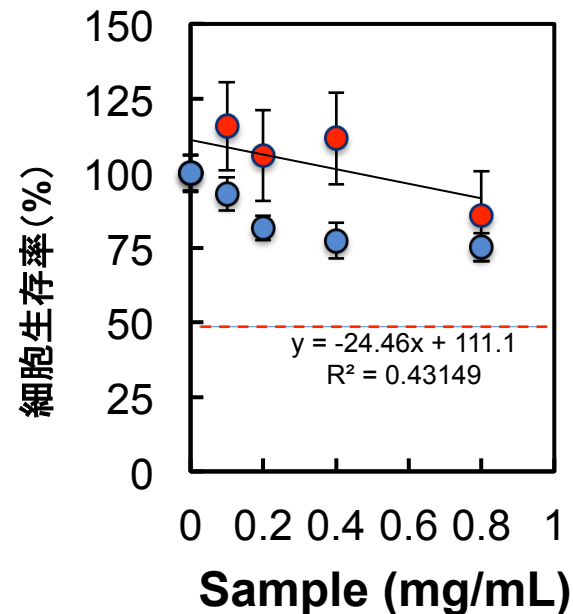
プレートリーダーで測定 (WST-1)

LMFのがん抑制効果

LMF



低分子化前のフコイダン試料 (HMF)



●: HT1080細胞、●: TIG-1細胞

HT1080細胞およびTIG-1細胞の増殖に及ぼす効果（細胞生存率はWST-1アッセイより算出）



LMFとp53のかかわりについて

LMFと抗がん剤併用によるがん細胞死誘導効果：試験方法

96-well plateに細胞を100 μ L/wellで播種

(HT1080細胞： 3×10^3 cells/well、HCT116細胞： 4×10^3 cells/well)

↓
インキュベート (Overnight、37°C、5% CO₂)

↓
LMF、LMF-CG、**カルボプラチン (CBDCA)**を加えた培地に交換

↓
インキュベート (**3日間**、37°C、5% CO₂)

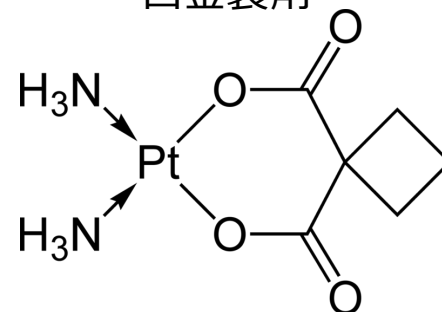
↓
WST-1を添加

↓
インキュベート (1時間、37°C、5% CO₂)

↓
プレートリーダーで測定 (WST-1)

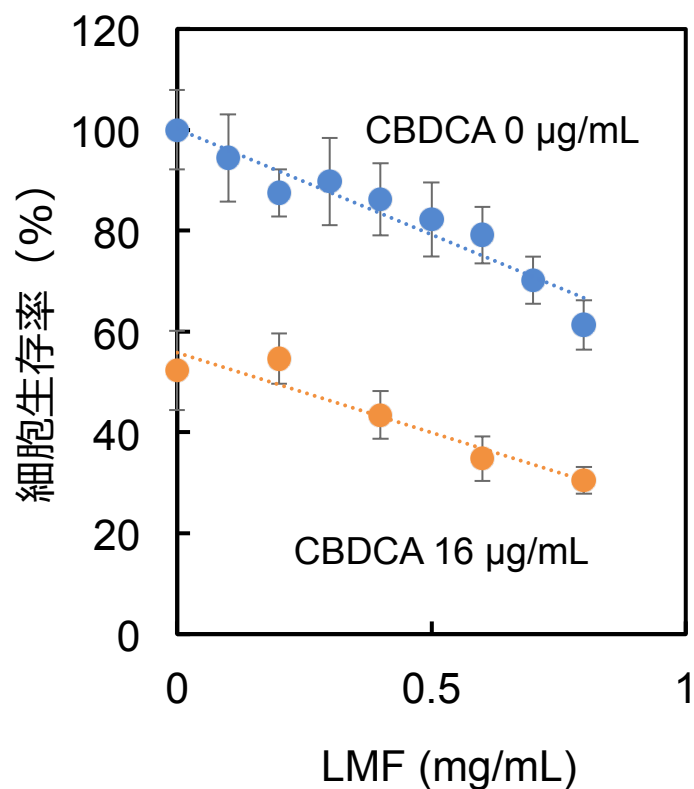
カルボプラチン (CBDCA)

白金製剤

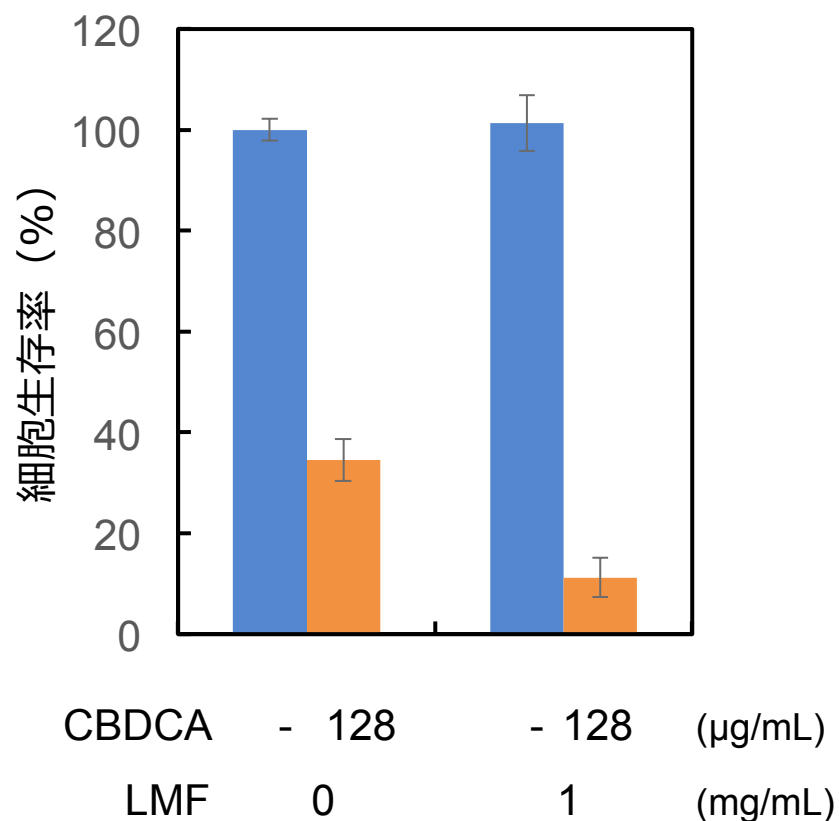


CBDCAとLMFの併用処理

HT1080細胞



HCT116細胞



細胞周期解析



24 h



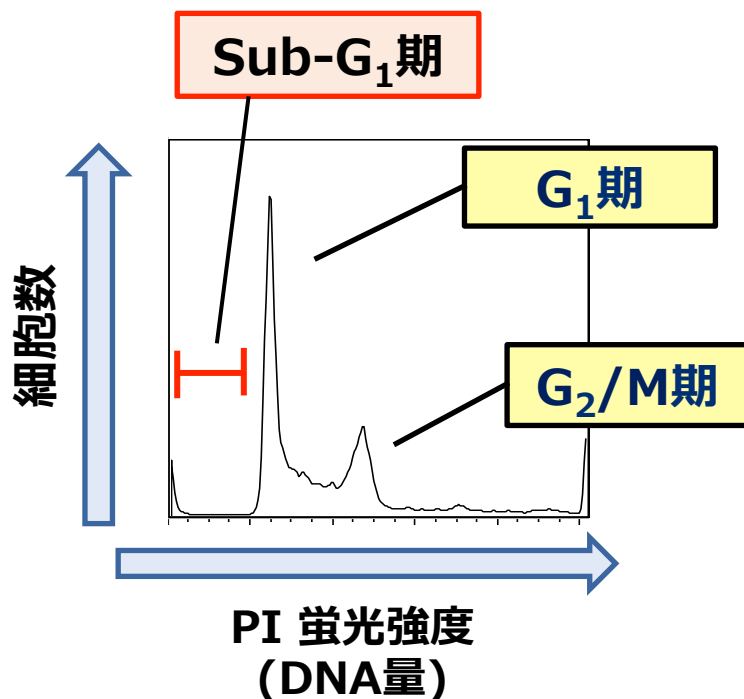
72h



細胞播種
HCT116細胞

サンプル添加
LMF, CBDCA

細胞周期解析
フローサイトメーター



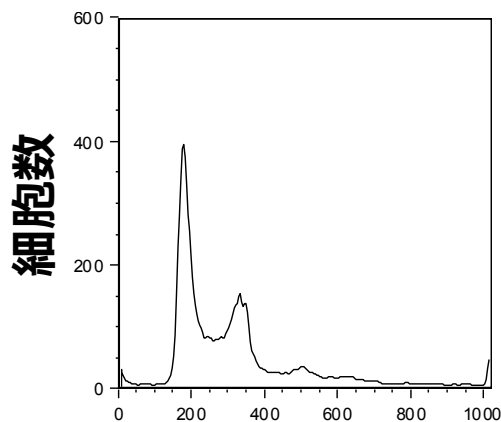
Sub-G₁期
→細胞死誘導

G₁期、G₂/M期の増減
→細胞周期の変化

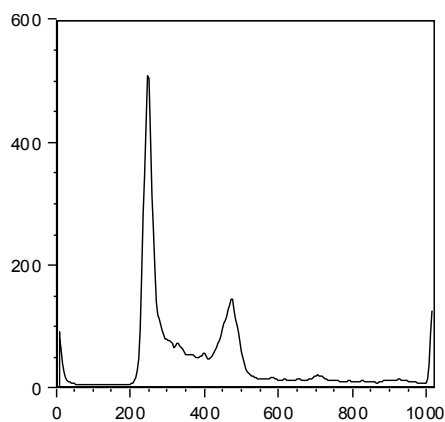
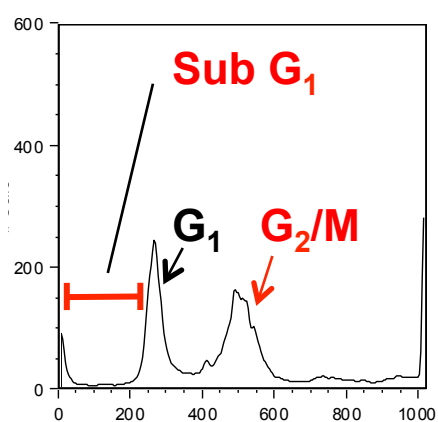
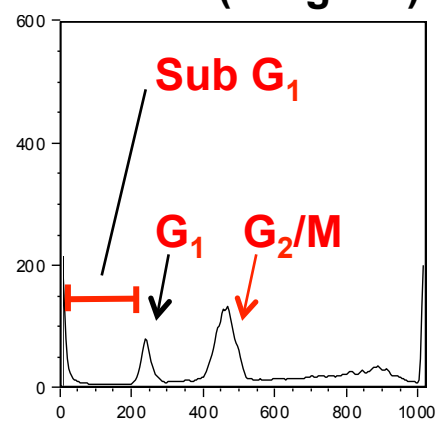


細胞周期解析 (HCT116細胞)

Control



LMF (1 mg/mL)

CBDCA (10 μ g/mL)CBDCA (10 μ g/mL)
+ LMF (1 mg/mL)

PI蛍光強度 (DNA量)

Sub G₁: 2.2%
G₁: 42.0%
G₂/M: 25.5%

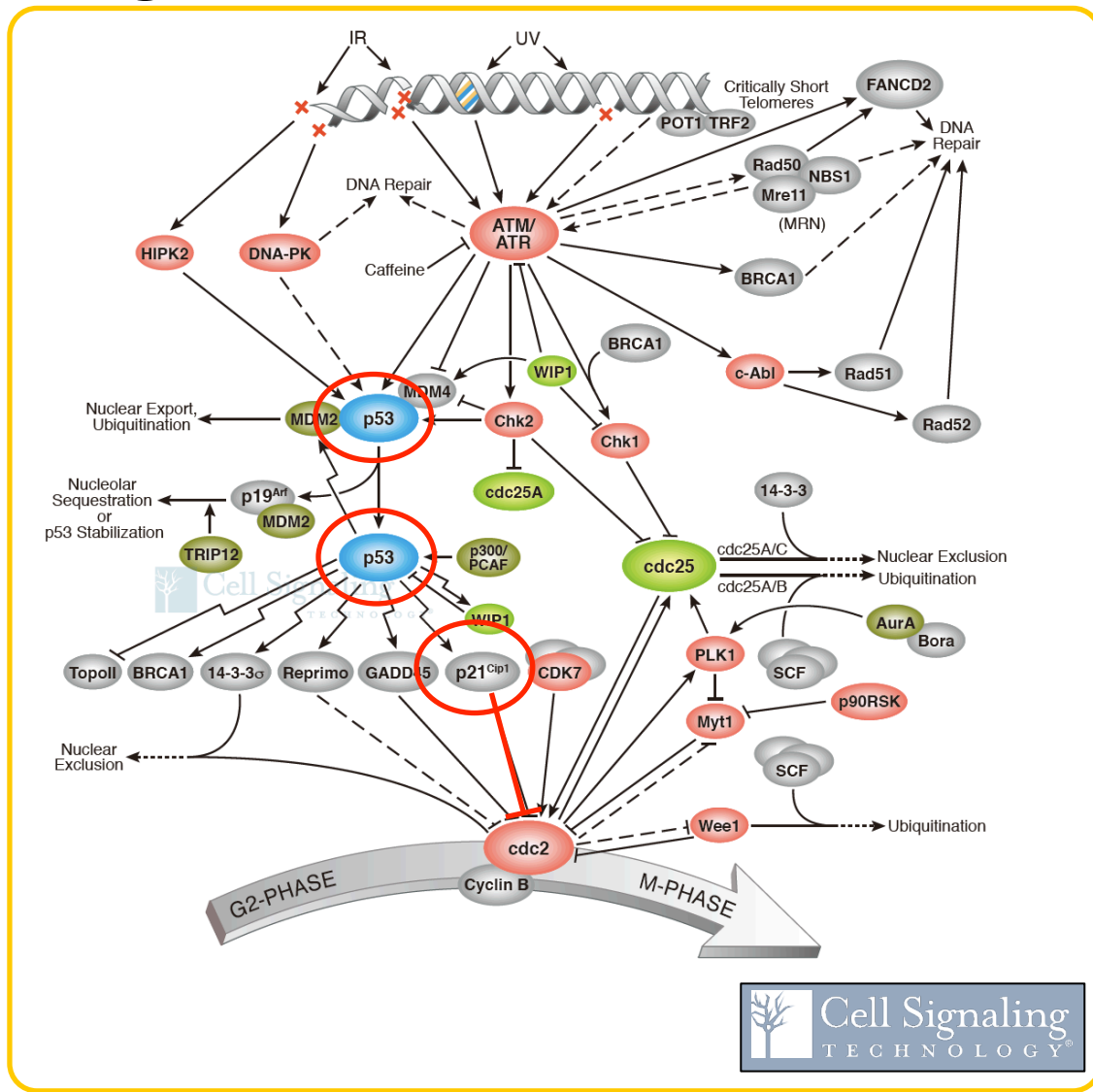
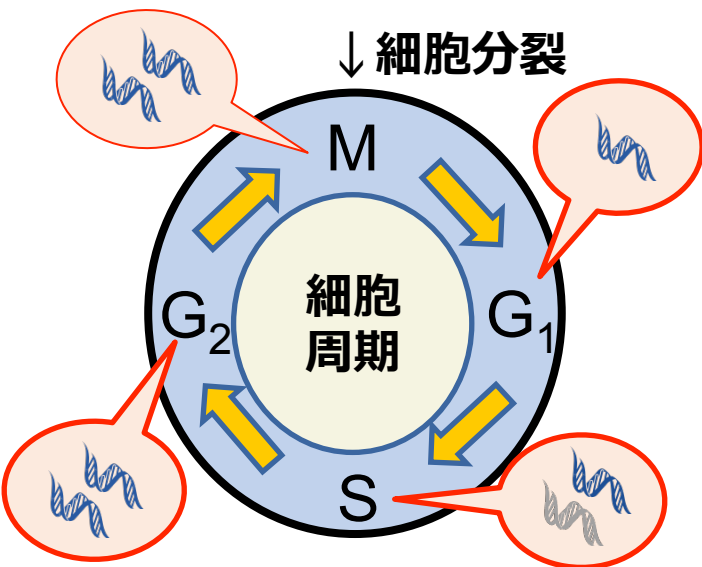
Sub G₁: 4.1%
G₁: 36.1%
G₂/M: 21.5%

Sub G₁: 6.3%
G₁: 31.3%
G₂/M: 43.5%

Sub G₁: 20.2%
G₁: 13.7%
G₂/M: 57.5%



G₂/M DNA Damage Checkpoint



p53タンパク質

がん抑制遺伝子産物として知られる**転写因子**

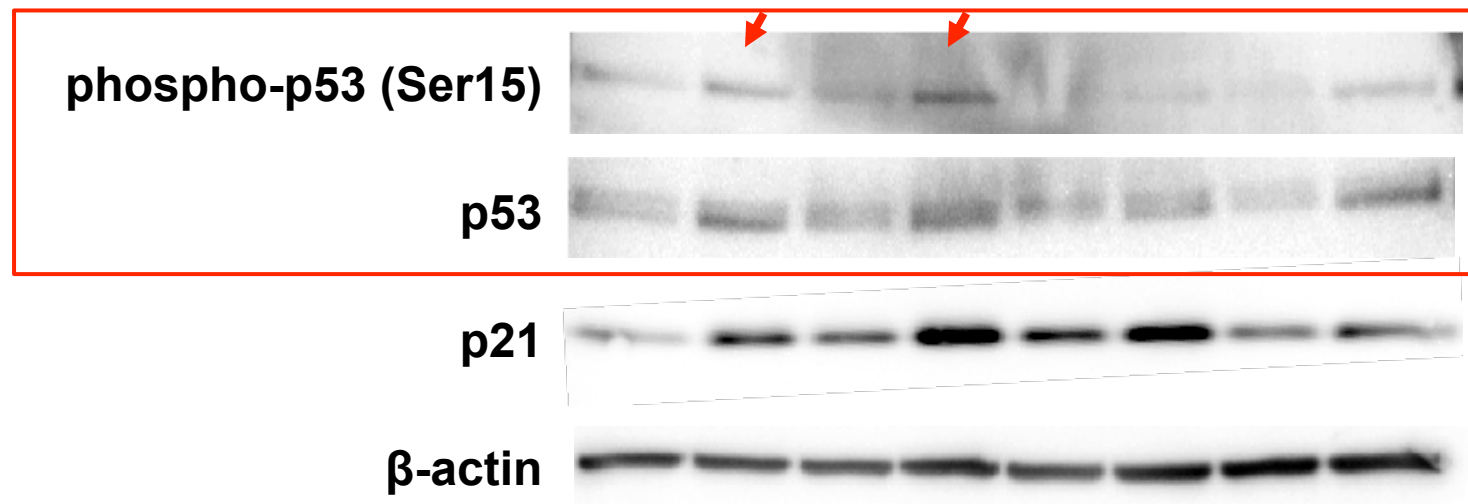
各種タンパク質の転写を促進、あるいは抑制することで、細胞への様々なストレスに対して抵抗性を示す。

- 細胞周期の停止→p21
- DNAの修復タンパク質の活性化→GADD45
- アポトーシスを誘導→BAX

LMFおよびCBDCA処理によるp53とp21のタンパク質発現の変化

HCT116 cells

	48 h				72 h			
LMF (1 mg/mL)	—	—	+	+	—	—	+	+
CBDCA (10 µg/mL)	—	+	—	+	—	+	—	+

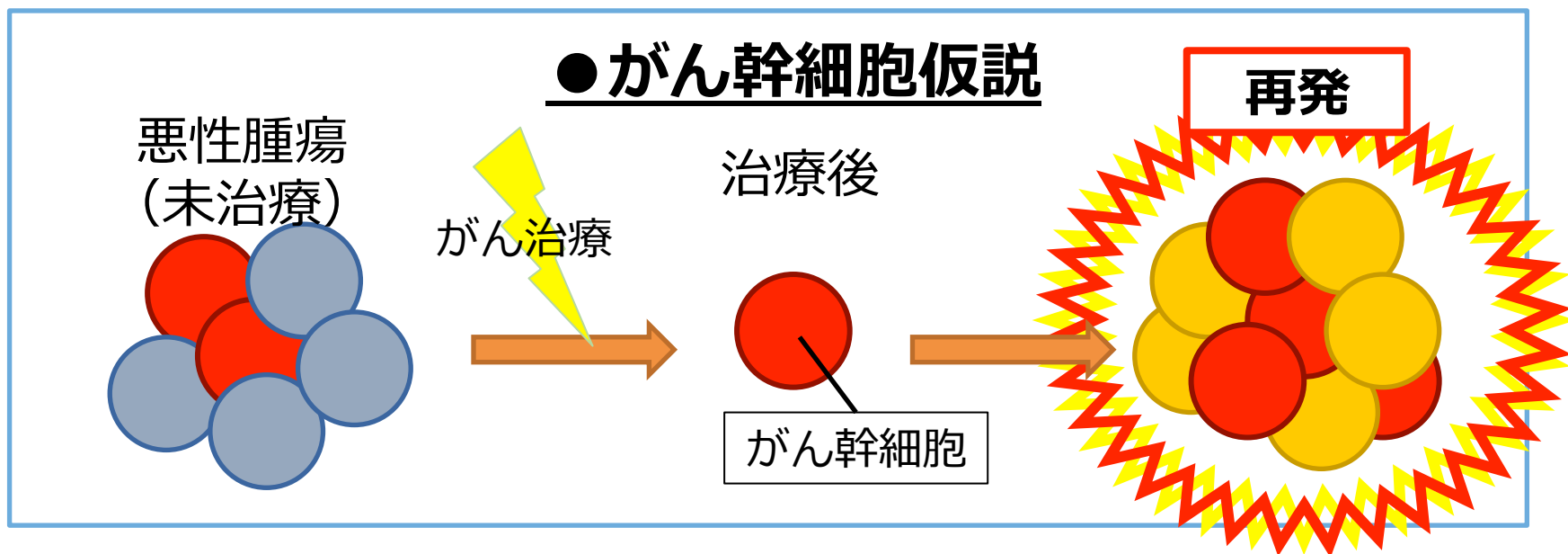




がん幹細胞形質に対するLMFの 効果

がん幹細胞

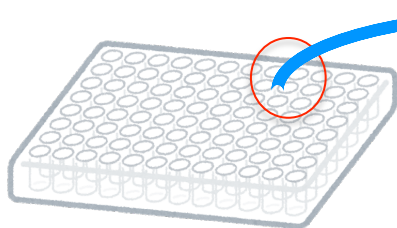
- 腫瘍形成能
- 自己複製能
- 分化細胞を生み出す
- 無制限に分裂可能



がん幹細胞に対するLMFの有用性を検証

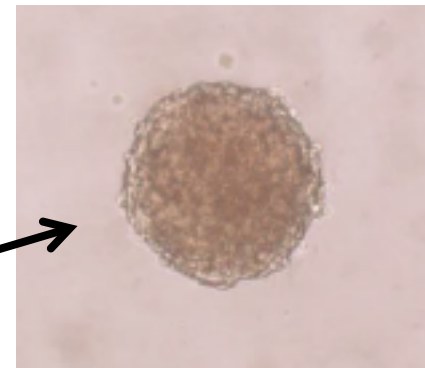
スフェロイド培養

通常の単層培養と異なり、3次元的に培養可能
→ より**生体内に近い環境を構築し**評価が可能



低吸着性プレート

Prime Surface® (住友ベークライト株式会社) を使用



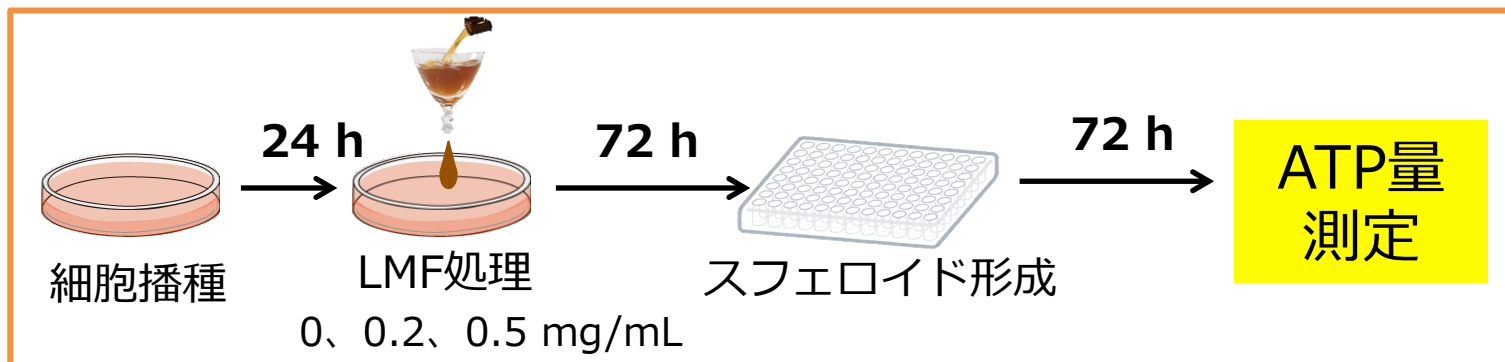
立体的に培養可能

→ **がん幹細胞**に似た環境を構築できる
=がん幹細胞ニッチ

Zhang S., et al. (2008), Liao J., et al.(2014)

スフェロイド培養を用いてがん幹細胞に対する抗がん剤と
LMFの併用効果を検証

スフェロイドの増殖抑制効果（LMF単独処理）

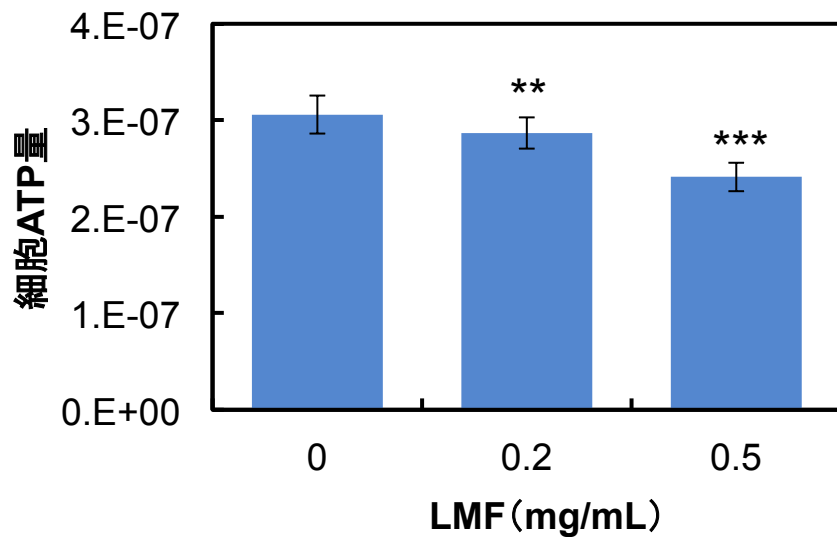


HCT116

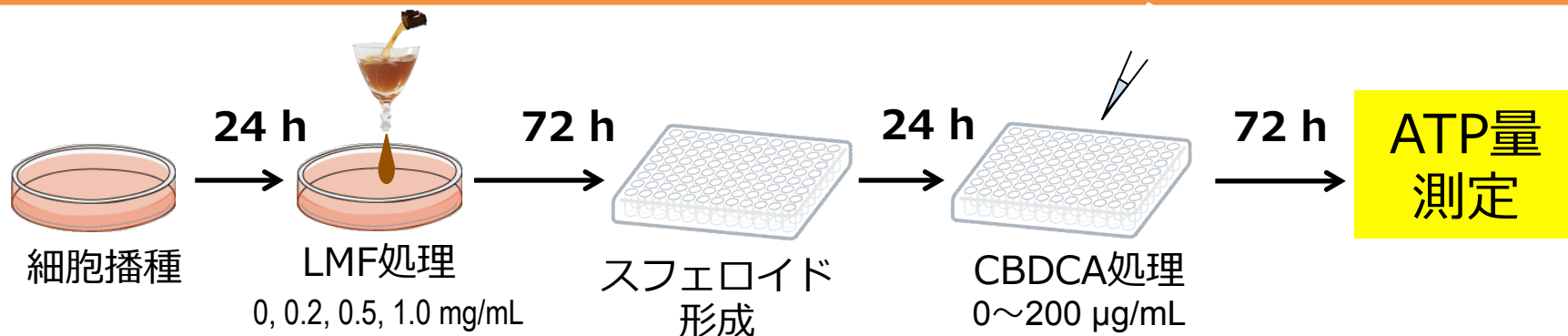
LMF単独処理

LMF前処理によってスフェロイドの増殖抑制が確認された

** ; $p < 0.01$ vs LMF 0 mg/mL
*** ; $p < 0.001$ vs LMF 0 mg/mL

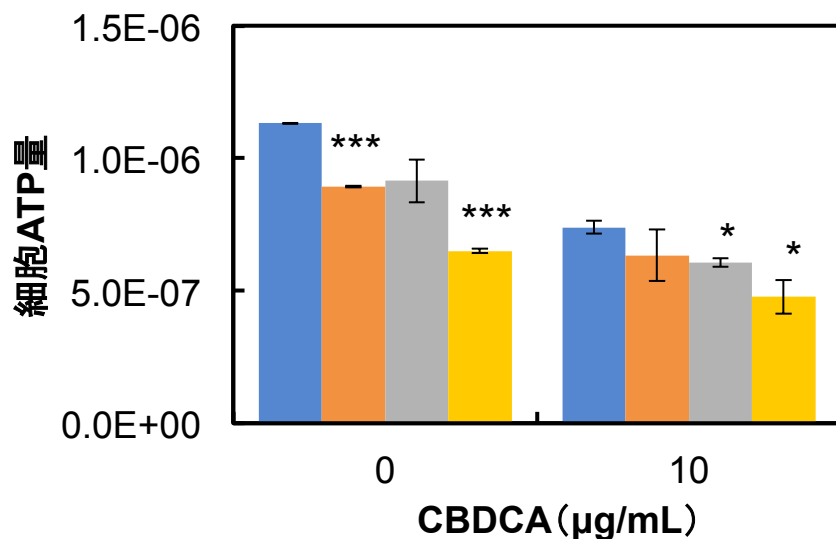


スフェロイドの増殖抑制効果（併用処理）



HCT116

LMF-CBDCA併用処理



LMF (mg/mL)

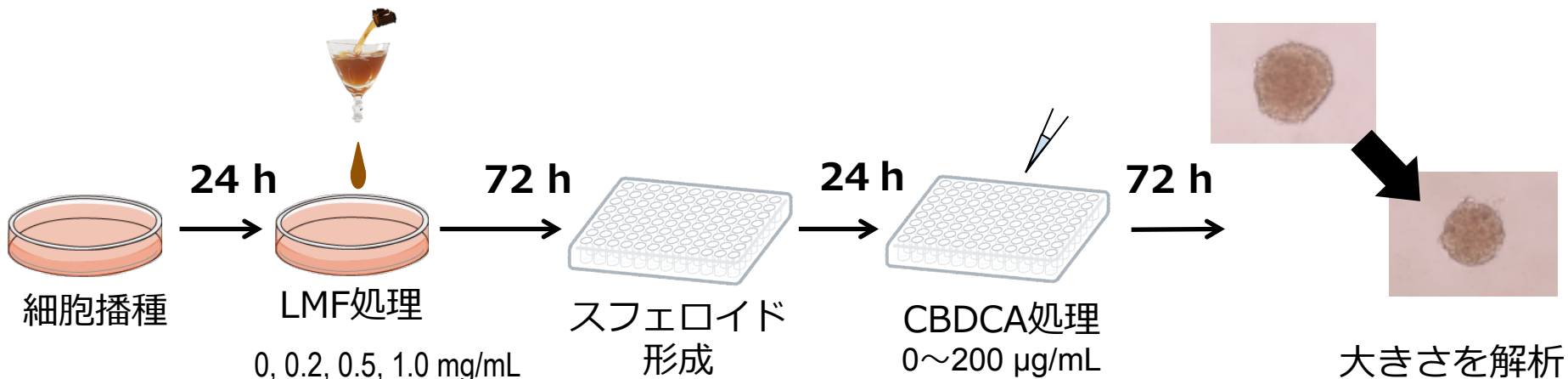
- : 0
- : 0.2
- : 0.5
- : 1

併用処理により増殖抑制効果を確認

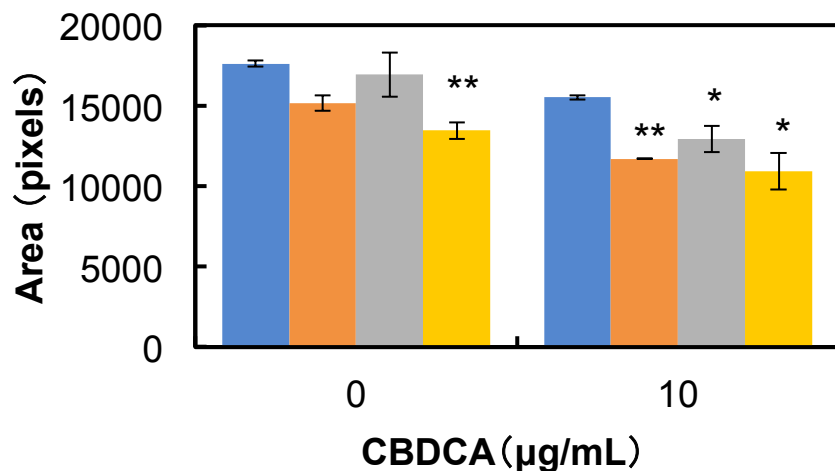
* ; $p < 0.05$ vs LMF 0 mg/mL

*** ; $p < 0.001$ vs LMF 0 mg/mL

足場非依存性増殖の抑制効果



HCT116



足場非依存性増殖

LMF (mg/mL)

- : 0
- : 0.2
- : 0.5
- : 1

LMF処理により足場
非依存性増殖を抑制

* ; $p < 0.05$ vs LMF 0 mg/mL

** ; $p < 0.01$ vs LMF 0 mg/mL

がん幹細胞マーカー（CD44, CD133）の解析



細胞のRNA



cDNA合成



定量 RT-PCR

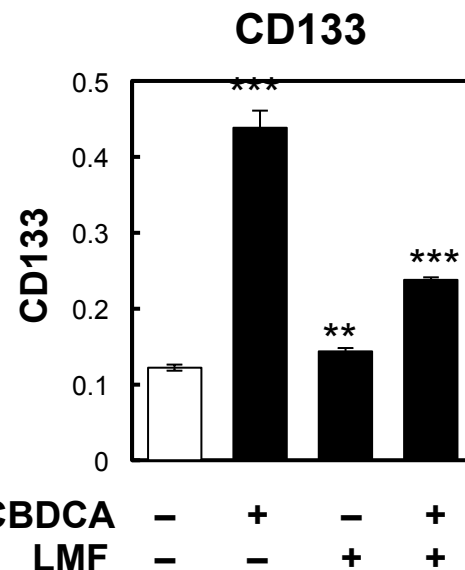
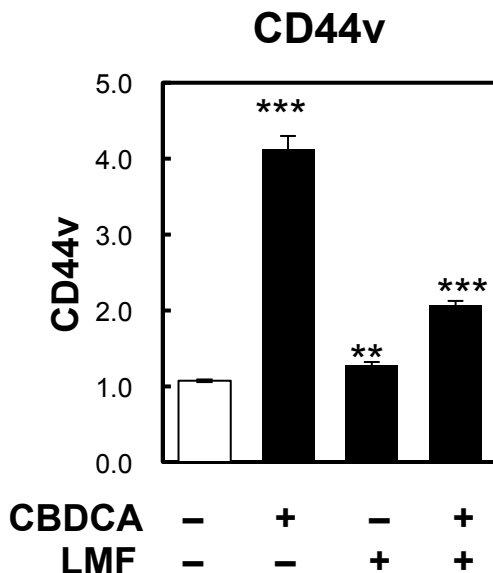
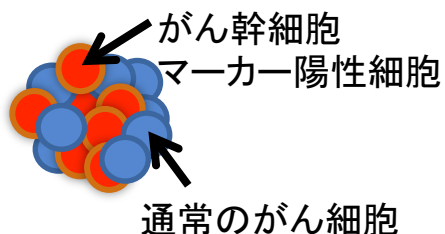
（mRNAの発現量を測定）

がん幹細胞マーカー
CD44v
CD133

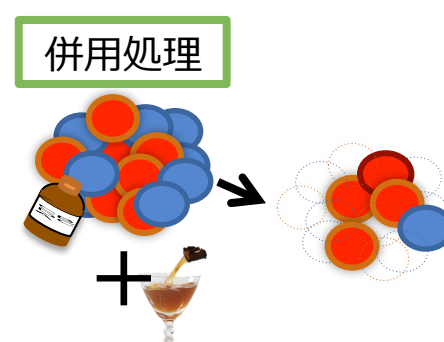
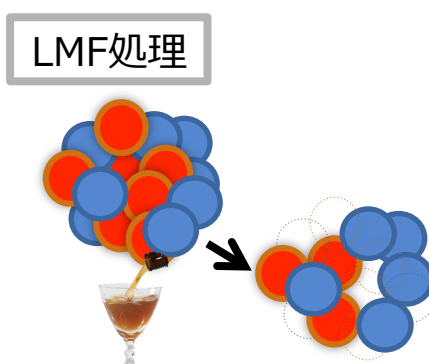
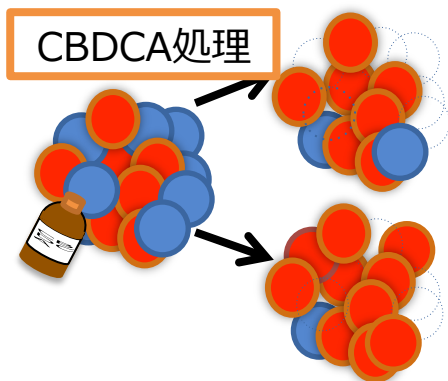
がん幹細胞マーカー(CD44, CD133)の解析

細胞数の相対値

	1	0.90	0.83	0.74
CBDCA	-	+	-	+
LMF	-	-	+	+



(** ; $p < 0.01$ vs Ctrl, *** ; $p < 0.001$ vs Ctrl)



まとめ

- LMFと低分子化処理前のフコイダン試料を比較したところ、がん抑制効果における低分子化処理の重要性が示された。
- CBDCA処理はHCT116細胞にG2/M期細胞数を増加させ、p53タンパク質の発現を増強した。LMF処理単独処理では大きな影響は見られなかったが、併用処理においてCBDCA処理の傾向を増強した。p53タンパク質の発現とp21タンパク質の発現は相関していた。
- LMFとCBDCA併用によるがん細胞スフェロイドの増殖抑制効果が確認された。併用処理によりがん幹細胞マーカーの発現減少が認められた。

今後の予定

- がん幹細胞に対するLMF（LMF-CG）の効果
- がん細胞の薬剤耐性（MDR）に対するLMF（LMF-CG）の効果
- がん細胞のエピジェネティクス変化に対するLMF（LMF-CG）の効果
- LMF（LMF-CG）と温熱処理の併用効果
- LMF（LMF-CG）と抗がん剤の併用効果
- 担がんマウスにおけるLMF（LMF-CG）の効果
- 皮膚創傷治癒過程に対するLMFの効果