

海藻モズク *Cladosiphon novae-caledoniae kylin* 由来の酵素消化フコイダン抽出物は腫瘍細胞の浸潤及び血管新生を阻害する

叶軍¹、李玉萍¹、照屋輝一郎¹、片倉喜範¹、市川明²、江藤博³、細井睦敬⁴、細井昌子⁵、西本真司⁶、白畑實隆^{1,*}

¹九州大学大学院農学研究院遺伝子資源工学部門 (〒812-8581 福岡)

²京都工芸繊維大学繊維学部応用生物学科 (〒606-8585 京都左京区松ヶ崎)

³第一産業株式会社 (〒530-0037 大阪)

⁴クリニック細井皮膚科 (〒812-0054 福岡)

⁵九州大学医学部医学科 (〒812-8582)

⁶西本第二クリニック (〒640-8156 和歌山)

*連絡先著者 (e-mail : sirahata@grt.kyushu-u.ac.jp、TEL : +81-92-642-3045、FAX : +81-92-642-3052)

提出 2005 年 2 月 3 日 ; 改訂版受理 2005 年 3 月 4 日

キーワード : 血管新生、抗腫瘍活性、フコイダン、浸潤、マトリクス・メタロプロテアーゼ、VEGF

要約

フコイダンは数種類の褐藻類の細胞壁において見出される独自の構造を有する硫酸化多糖類であり、近年、特に酵素消化フコイダン抽出物において、その抗腫瘍能のため大いに注目を集めている。本研究では、ヒト腫瘍細胞の *in vitro* での浸潤と血管新生能に及ぼす、海藻モズク *Cladosiphon novae-caledoniae kylin* から調製された酵素消化フコイダン抽出物の効果を評価した。まず、腫瘍細胞の酸化ストレスに及ぼすフコイダン抽出物の効果を評価し、フコイダン抽出物処理時の細胞内 H_2O_2 濃度及び腫瘍細胞からの H_2O_2 放出双方の大幅な抑制を実証し、フコイダン抽出物が腫瘍細胞の酸化ストレスを改善することを示した。次に、ヒト線維肉腫 HT1080 細胞の浸潤能に及ぼすフコイダン抽出物の効果を試験し、恐らくはマトリクス・金属プロテアーゼ (MMPs) MMP-2/9 活性の抑制を介した、フコイダン抽出物による浸潤の有意な抑制が示された。さらに、ヒト子宮癌 HeLa 細胞の血管新生に及ぼすフコイダン抽出物の効果を調べ、フコイダン抽出物が血管新生因子である血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) の発現と分泌を抑制して、腫瘍細胞の血管細管形成を抑制することを見出した。結果をまとめると、*Cladosiphon novae-caledoniae kylin* からの酵素消化フコイダン抽出物が腫

瘍細胞の浸潤と血管新生に抑制効果を及ぼすことが明らかとなった。これらの効果は、少なくとも部分的には酵素消化フコイダン抽出物の抗酸化能によって発現されるのであろう。

序文

転移は癌治療／療法における主要な問題であり、癌細胞の転移にはいくつかの連続して起こる段階がある。癌細胞は血流またはリンパ系を介して癌の原発部位から他の身体部分に移動し、細胞外マトリクス (ECM) を吸収して、その周囲のタンパク質を分解する。マトリクス・金属プロテアーゼ (MMPs) は腫瘍浸潤に関与する鍵酵素であり、MMPs はコラーゲン、プロテオグリカン、エラスチン、ラミニン、フィブロネクチンなどの ECM タンパク質を分解する (Johnson et al. 1998)。ヒトでは、MMP-2 (ゼラチナーゼ A/M_r 72,000 IV 型コラーゲナーゼ) 及び MMP-9 (ゼラチナーゼ B/M_r 92,000 IV 型コラーゲナーゼ) が、IV 型コラーゲン分解の主要酵素と考えられており、IV 型コラーゲンは基底膜の主成分である (Westermarck and Kahari 1999)。MMP-2 及び MMP-9 ともに様々な悪性腫瘍で多量に発現しており (Johnsen et al. 1998)、浸潤や転移の一因となっている (Liabakk et al. 1996)。

腫瘍血管新生は、既存の血管からの血管内皮細胞による新しい毛細血管の形成であり、既存の血管から遠く離れた腫瘍細胞に栄養を供給するための重要な機構である。腫瘍血管新生は、線維芽細胞増殖因子 (FGF)、血小板由来増殖因子 (PDGF)、血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) などの血管新生因子によって制御されると考えられる。VEGF は高度に保存された二量体のヘパリン結合糖タンパク質であり、正常及び異常な血管新生の調節において極めて重要な役割を果たす (Ferrara 1993)。現在、活性酸素種 (ROS) が血管新生の調節に関与していると考えられており、ROS も VEGF 発現を調節しており、ROS 消去剤が理想的な抗血管新生剤となることを示唆している。

フコイダンは数種類の褐藻類の細胞壁において見出される独自の構造を有する硫酸化多糖類である。近年、フコイダンはその強力な抗腫瘍能のため、臨床において大いに注目を集めており、精力的に研究されてきた。フコイダンは *in vivo* において腫瘍細胞の増殖を抑制し、腫瘍に対する免疫系を活性化させる (Usui et al. 1980; Yamamoto et al. 1984; Noda et al. 1990; Itoh et al. 1993; Zhuang et al. 1995; Maruyama et al. 2003)。硫酸化はフコイダンの抗腫瘍活性を高めた (Yamamoto et al. 1984)。小柳らは (2003)、フコイダンがヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) の移動後の細管形成を抑制し、その化学的過硫酸化が抑制能を高めることを報告した。彼らは、フコイダンが VEGF 受容体への VEGF の結合を阻害することを示した。最近では、ラジカル分解により調製された低分子量フコイダン (分子量約 4 kDa) が、内皮細胞の塩基性線維芽細胞増殖因子誘発性の細管形成を促進させることが報告されている (Chabut et al. 2003, 2004)。今回、トンガ王国原産のモズク *Cladosiphon novae-caledoniae kylin* からの酵素消化フコイダン抽出物が、細胞内 ROS を消去し、腫瘍細胞の浸潤、血管新生能を抑制するという最初の証拠を示す。

材料と方法

フコイダン及び試薬の調製

トンガ王国原産の海藻モズク *Cladosiphon novae-caledoniae kylin* から調製されたアワビ・グリコシダーゼ消化フコイダン抽出物は、“パワー・フコイダン” という製品名で市販されており、研究のために第一産業株式会社（日本 大阪）から提供された。希釈していない原液（pH 3.7）を NaOH で pH 7.0 に中和した。2,200 × g、15 分間の遠心分離によって沈殿物を除去した。次に、0.2 μm 孔のフィルター（Millipore、米国マサチューセッツ州）で上清を滅菌し、“フコイダン抽出物（43.5 mg/mL）” として 4°C で保存した。2',7'-Dichlorodihydro-fluorescein diacetate (H₂DCFDA) は Molecular probes 社（米国オレゴン州ユージーン）から購入した。

2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt (WST-1) は和光純薬工業株式会社（日本 大阪）から購入した。マトリゲルと I 型コラーゲンはフナコシ株式会社（日本 東京）から入手した。ヒト VEGF イムノアッセイ・キットは R&D システム社（米国ミネソタ州）から入手した。血管新生細管染色キット（CD31 染色用）は TCS Cellworks 社（英国バッキンガム）から購入した。

細胞培養と処理

ヒト線維肉腫細胞株 HT1080、ヒト子宮癌細胞株 HeLa、ヒト正常線維芽細胞株 TIG-1 を、10% ウシ胎仔血清（FBS）（Biowest 社、フランス）、2 mM L-グルタミン、10 mM HEPES 添加イーグル最少必須培地（MEM：Invitrogen 社、米国カリフォルニア州カールズバッド）（10% FBS/MEM）で培養した。HUVEC は EBM-2 培地（Cambrex 社、米国メリーランド州）で培養した。フコイダン抽出物（最終濃度：10~20%）を 10 × MEM と混和し、MilliQ 水で希釈した。フコイダン抽出物での処理は下記のように実施した。

細胞生存率アッセイ

HT1080 細胞（5 × 10⁵ 細胞/ウェル）を 24 ウェル・プレートに播種し、5% CO₂、37°C で、24 時間 10% FBS/MEM 中で培養後、フコイダン抽出物含有 10% FBS/MEM で培地交換して、細胞をさらに 24 時間培養した。次に、培地を除き、500 μL の WST-1 試薬をウェルに添加し、プレートを 37°C で 2 時間インキュベートした。100 μL の反応液を新しい 96 ウェル・マ

マイクロプレートに移し、マイクロプレート・リーダー (Tecan、スイス マネドルフ) を使用して 450 nm での吸光度を測定した。

細胞内 H_2O_2 のフローサイトメトリー解析

H_2DCFDA は細胞透過性を有する活性酸素種の指示物質であり、細胞内エステラーゼによってアセテート基が外され、細胞内で酸化が生じて初めて蛍光を発する。HT1080 細胞をフコイダン抽出物含有 MEM で 24 時間前処理し、 $5 \mu M$ H_2DCFDA と $37^\circ C$ 、30 分間インキュベートした。 $2',7'$ -dichlorofluorescein (DCF) の蛍光強度をフローサイトメーター (EPICS XL system II、Beckman Coulter 社、米国フロリダ州マイアミ) で測定した。

H_2O_2 放出の測定

Ruch らの方法 (1983 年) に従って、HeLa 細胞から培地中への H_2O_2 放出を分析した。この蛍光法は、 H_2O_2 及び西洋ワサビ・ペルオキシダーゼ存在下でのホモバニリン酸のその蛍光性二量体への変換に基づいている。HT1080 細胞をフコイダン抽出物で 24 時間処理後、まず細胞を PBS で洗い、 $800 \mu L$ の反応バッファー (pH 7.4 のフェノールレッド不含ハンクス平衡塩溶液中 $100 \mu M$ ホモバニリン酸、 5 ユニット/mL 西洋ワサビ・ペルオキシダーゼ IV 型、 1 mM HEPES) とインキュベートした。同じ方法で反応バッファーのみを処理して、対照として用いた。30 分間のインキュベート後、この溶液を回収して、 0.1 M グリシン-NaOH バッファーで pH 10.0 に調整した。励起波長 321 nm、発光波長 421 nm の蛍光分光光度計 (F-2500、日立、日本 東京) で蛍光を測定した。 $0\sim 10$ mM の濃度範囲の H_2O_2 を用いて作成した検量線によって溶液中の H_2O_2 濃度を推定した。検量線を描くために利用した溶液中の正確な H_2O_2 濃度は、吸光係数 $43.6 M^{-1} cm^{-1}$ を用いて 240 nm での分光光度法で測定された。

マトリゲル浸潤アッセイ

$700 \mu L$ の $10 \mu g$ フィブロネクチン含有無血清 MEM で 24 ウェル・マイクロプレートの各ウェルをコーティングした。次に $8 \mu m$ チェンバー (クラボウ社、日本 大阪) の上部を $20 \mu L$ のマトリゲルで、下部を $10 \mu L$ コラーゲンでコーティングした。次に、24 ウェル・マイクロプレートにチャンバーを挿入した。HT1080 細胞をフコイダン抽出物で 24 時間前処理し、チャンバーに播種して (1×10^5 細胞/ウェル)、 $37^\circ C$ で 12 時間培養した。コラーゲンの下面に侵入した細胞を固定し、Diff-Quik (Sysmex、日本 兵庫) 染色して、光学顕微鏡下で任

意の3つの視野について数えた。

ザイモグラフィーアッセイ

HT1080細胞を10% FBS/MEM中で一晩培養し、続いてフコイダン抽出物含有10% FBS/MEMで24時間処理した。2 mLの新しい無血清MEMで培地交換し、細胞をさらに24時間培養した。上清を回収して、超遠心分離法 (Millipore) によって濃縮した。濃縮済み培地 5 μ Lを2 \times サンプル・バッファー (0.25 M Tris-HCl, pH 6.0, 8.5%グリセロール、4%SDS、0.01%ブロモフェノール・ブルー) 5 μ Lと混和させ、ゼラチン含有ゲル (7.5%ポリアクリルアミド及び2 mg/mLゼラチン) を用いて電気泳動した。電気泳動後、2.5% Triton X-100で3回、10分間ゲルを洗浄し、インキュベーション・バッファー (50 mM Tris-HCl, pH 7.6, 10 mM CaCl₂, 50 mM NaCl, 0.05% Brij35) と37°Cで一晩インキュベートさせた。インキュベーション後、室温で1時間、ゲルをCBB溶液 (0.25%クマシー・ブルーR250、40%メタノール、10%酢酸) で染色して、40%メタノールと10%酢酸で脱色させた。

半定量RT-PCR

メーカーの説明書に従って、GenElute Mammalian Total RNA isolation kit (シグマ、ミズーリ州セントルイス) を使用して全RNAを単離した。増幅用プライマー配列は、GAPDH : 5'-AC-CACAGTCCATGCCATCAC-3' (フォワード) 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3' (リバーズ) 、MMP-2 : 5'-TTCTATGGCTGCCCAAGGAGAGCTGCAAC-3' (フォワード) 5'-CAG-CTCAGCAGCCTAGCCAGTCGGATTTGA-3' (リバーズ) 、VEGF : 5'-GGGCCTCCGAAACCATGAAC-3' (フォワード) 5'-CTGGTTCCCGAAACCCTGAG-3' (リバーズ) であった。PCR条件は、94°C30秒、58°C30秒、72°C1分を30サイクル (GAPDH) 、94°C45秒、60°C45秒、72°C1分を30サイクル (MMP-2) 、94°C45秒、60°C45秒、72°C1分を35サイクル (VEGF) であった。

培地中に分泌されたVEGFの測定

HeLa細胞 (5 \times 10⁵細胞/ウェル) を10% FBS/MEMの入った24ウェル・プレートに一晩播種した。次にフコイダン抽出物を含む無血清MEMで培地交換し、さらに24時間培養した。新しい無血清MEMで培地交換して、細胞をさらに24時間培養した。上清を回収して、メーカーのプロトコールの方法に従って、VEGFの分泌量を測定した。

細管形成アッセイ

HeLa 細胞 (1×10^6 細胞) を 10% FBS/MEM の入った 90mm ディッシュに一晩播種した。無血清 MEM またはフコイダン抽出物含有 MEM で培地交換して、細胞を 24 時間培養し、次に無血清 MEM でさらに 72 時間培養した。培養済み培地を回収し、 $0.2 \mu\text{m}$ フィルターでろ過した。共培養系で細管形成アッセイを実施した。HUVEC 細胞を 1 : 40 の比率で TIG-1 細胞と混和させ、24 ウェル・マイクロプレートに播種し、EBM-2 培地中で一晩培養した。培地を除いて、腫瘍細胞培養済み培地と EBM-2 との 2 : 1 の混合液を添加した。2 日ごとに培地交換した。形成した細管を HUVEC 特異的マーカー CD31 (PECAM-1) で検出した。簡単に説明すると、11 日目に培地を完全に除き、共培養プレートは 70% エタノール溶液で 30 分間固定した。1% BSA 含有 PBS でのインキュベーション後、共培養プレートをマウス抗ヒト CD31 抗体とともに 60 分間インキュベートし、続いてアルカリフォスファターゼ抱合ヤギ抗マウス IgG 二次抗体とともにさらに 60 分間インキュベートした。プレートの洗浄後、細管が濃い紫色になるまで、BCIP/NBT 基質を添加した。血管新生定量用ソフトウェア (AngioSys 1.0 TCS、Cellworks 社、英国) によって記録画像を解析した。細管形成の評価のために、ウェル当たり任意の 12 視野を撮影した。

結果

フコイダン抽出物の調製及びその特性

高分子量フコイダンを含む抽出物を海藻 *Cladosiphon novae-caledoniae kylin* から純度 85% で精製し、アワビ・グリコシダーゼで消化し、フコイダン抽出物として本研究で使用した。TSK-gel G3000PW_{XL} (東ソー、日本 東京) を使用したサイズ排除クロマトグラフィーによってフコイダン抽出物の分子組成を評価し、フコイダン抽出物が低分子量 (MW) 消化画分 (72%、MW : <500) 及び未消化画分 [28% 未満、ピーク MW : 800 kDa (データ未掲載)] から成ることが確認された。TAK-gel Sugar AXG カラム (東ソー) を備えた蛍光分光光度計 (LC-9A、島津、日本 京都) によってさらに糖組成を評価し、フコイダン抽出物中の糖がフコース (73%)、キシロース (12%)、マンノース (7%) で主に構成されることを示した (データ未掲載)。フラスコ燃焼法及びイオン・クロマトグラフィ法によって測定された硫酸化率は 14.5% であった。これらの結果をまとめて、本研究で用いたフコイダン抽出物が、未消化フコイダンの他、消化フコイダン及び他の物質の混合物で主に構成されると考えた。

腫瘍細胞の生存に及ぼすフコイダン抽出物の効果

HT1080 細胞及び HeLa 細胞の生存に及ぼすフコイダン抽出物の効果を評価するために、異なる濃度（1~80%）のフコイダン抽出物で細胞を二日間処理し、WST-1 アッセイによって細胞増殖を評価した。図 1 に示すように、20%未満のフコイダン抽出物を暴露させた場合、HT1080 細胞の生存への顕著な効果は認められなかった。さらに、20%未満のフコイダン抽出物の暴露では、HeLa 細胞の生存に影響を及ぼさなかった（データ未掲載）。腫瘍細胞の増殖に及ぼすフコイダン抽出物の毒性効果を除外するために、実験を通じて 20%未満のフコイダン抽出物を用いた。

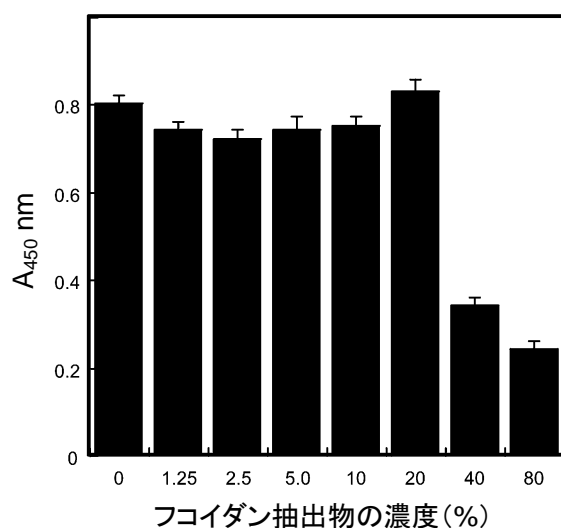


図1. HT1080 細胞の生存に及ぼすフコイダン抽出物の効果。

HT1080 細胞の生存に及ぼすフコイダン抽出物の効果を検証するために、異なる濃度のフコイダン抽出物（11.0 mg/mL, 100%）で細胞を二日間処理し、WST-1 アッセイにより細胞増殖を評価した。

フコイダン抽出物は腫瘍細胞における H_2O_2 の蓄積と放出を減少させる

次に、HT1080 細胞内でのフコイダン抽出物の H_2O_2 消去能を調べた。HT1080 細胞内での H_2O_2 産生を測定するために、 H_2DCFDA を使用した。フコイダン抽出物含有 MEM で HT1080 細胞を 24 時間前処理し、 $5 \mu M$ H_2DCFDA とともに $37^\circ C$ で 30 分間インキュベートした。図 2a に見られるように、フコイダン抽出物によって HT1080 細胞内の H_2O_2 が消去されることが示された。フコイダン抽出物によって HeLa 細胞内の H_2O_2 も消去された(データ未掲載)。さらに、フコイダン抽出物での処理で、HeLa 細胞から培地中への H_2O_2 放出も顕著に減少した(図 2b)。これらの結果は、フコイダン抽出物が ROS 誘発性の酸化ストレスを軽減させ、細胞及びその周辺の酸化ストレスを低下させることを示唆する。

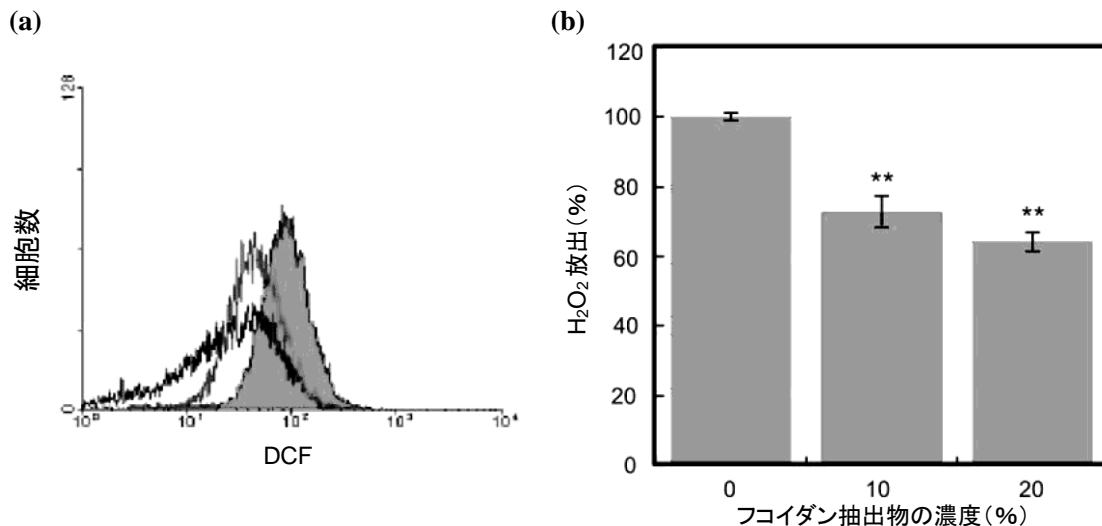


図2. フコイダン抽出物は腫瘍細胞での H_2O_2 の蓄積と放出を減少させる。(a) HT1080 細胞内での H_2O_2 産生を測定するために、 H_2DCFDA を使用した。フコイダン抽出物を含む 10% FBS/MEM で HT1080 細胞を 24 時間前処理して、 $37^\circ C$ 、30 分間、 $5 \mu M$ H_2DCFDA とインキュベートした。フローサイトメーターを使用して DCF の蛍光強度を測定した。横軸は DCF の蛍光強度を示しており、これは HT1080 細胞内での酸化状態を示している。縦軸は細胞数を示している。(b) Ruch らの方法 (1983 年) に従って、HeLa 細胞から培養液中への H_2O_2 放出を分析した。この蛍光法は、 H_2O_2 及び西洋ワサビ・ペルオキシダーゼ存在下でのホモバニリン酸のその蛍光性二量体への変換に基づいている。励起波長 321 nm、発光波長 421 nm の蛍光分光光度計で蛍光強度を測定した。独立した 3 回の実験での平均値 \pm 標準偏差でデータを表した。スチューデント t 検定を利用し、結果は統計的に有意であった (** $p < 0.01$; $n = 3$)。

フコイダン抽出物は HT1080 細胞の浸潤を抑制する

MMP-2 及び MMP-9 は腫瘍細胞から分泌され、腫瘍細胞の浸潤に関与している。最初に、MMP-2 の転写に及ぼすフコイダン抽出物の効果を調べるために、RT-PCR 解析を実施した。図 3a は、フコイダン抽出物での処理時、HT1080 細胞での MMP-2 の転写が若干低下することを示している。次に、培地中の MMP-2 及び MMP-9 の濃度を検知するために、酵素電気泳動法を実施した。図 3b に見られるように、フコイダン抽出物での処理時、HT1080 から分泌される両酵素の活性は低下した。最後に、マトリゲル浸潤アッセイによって、フコイダン抽出物処理済み HT1080 細胞の浸潤能を調べた。図 3c に見られるように、フコイダン抽出物での処理時、マトリゲルに侵入する細胞数も減少した。まとめると、これらの結果は全て、フコイダン抽出物が腫瘍細胞の浸潤能を減弱させることを示唆している。

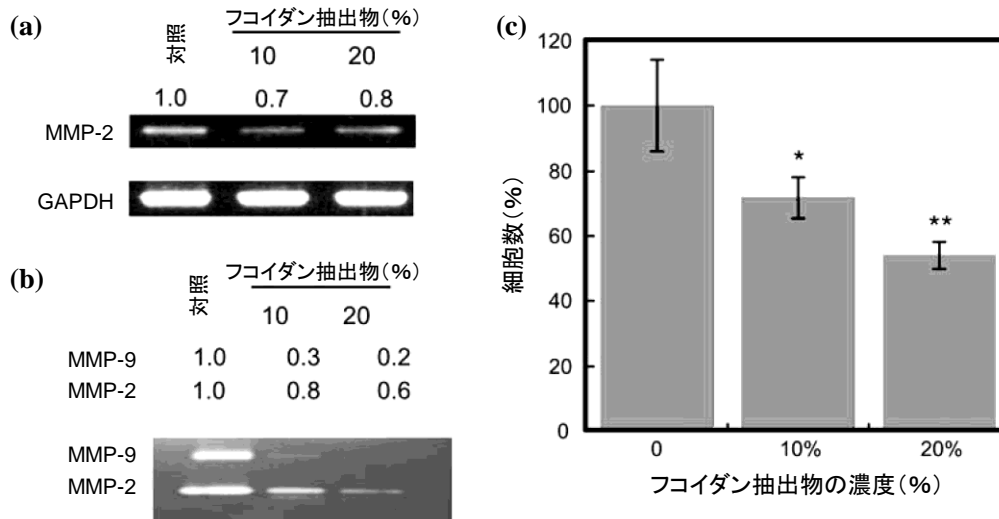


図 3. フコイダン抽出物は HT1080 細胞の浸潤を抑制する。(a) フコイダン抽出物を含む 10% FBS/MEM で HT1080 細胞を 24 時間前処理後、全 RNAs を調製し、MMP-2 及び GAPDH に関する RT-PCR 解析を実施した。Image Gauge 4.0 ソフトウェア (富士フィルム、東京) で解析した RT-PCR の数値データを写真の上に示している。(b) フコイダン抽出物を含む 10% FBS/MEM で HT1080 細胞を 24 時間前処理後、2 mL の無血清 MEM で培地交換し、さらに 24 時間細胞を培養した。上清を濃縮し、酵素電気泳動法にかけた。Image Gauge 4.0 ソフトウェアで解析した酵素電気泳動法の数値データを酵素電気泳動写真の上に示している。(c) フコイダン抽出物を含む 10% FBS/MEM で HT1080 細胞を 24 時間前処理後、1 ウェル当たり 1×10^5 個の細胞をチェンバー内に播種し、37°C で 12 時間培養した。コラーゲンの下面に侵入している細胞を固定し、Diff-Quick 染色した。光学顕微鏡下での任意の 3 つの視野について侵入した細胞を数えた。独立した 3 回の実験での平均値 ± 標準偏差でデータを表した。スチューデント t 検定を利用し、結果は統計的に有意であった (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; $n = 3$)。

フコイダン抽出物は VEGF の発現と分泌を抑制する

VEGF と H_2O_2 は既知の血管新生因子である。図 2 に見られるように、フコイダン抽出物は H_2O_2 の蓄積と放出を減少させ、腫瘍細胞の血管新生能を低下させる可能性がある。このため、次に VEGF の発現に及ぼすフコイダン抽出物の効果を調べた。図 4a に見られるように、フコイダン抽出物での処理時、HeLa 細胞での VEGF 発現は大幅に抑制された。この結果と一致して、フコイダン抽出物での処理時、VEGF の分泌も抑制された (図 4b)。これらの結果は全て、フコイダン抽出物が、 H_2O_2 放出の減少及び VEGF 分泌の抑制によって、腫瘍細胞の血管新生能を低下させることを実証している。

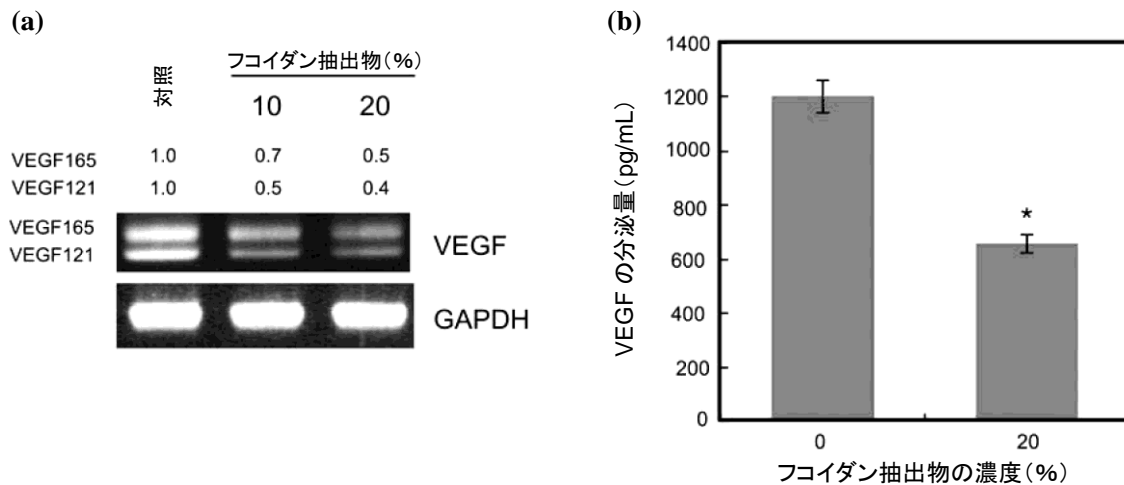


図4. フコイダン抽出物は HeLa 細胞での VEGF の発現と分泌を抑制する。(a) 10% FBS/MEM で HeLa 細胞を 24 時間培養後、フコイダン抽出物を含む無血清 MEM で培地交換し、さらに 24 時間細胞を培養した。全 RNA 調製後、VEGF について RT-PCR を実施した。Image Gauge 4.0 ソフトウェアで解析した RT-PCR の数値データを写真の上に表示している。(b) 上記の様に処理した HeLa 細胞の上清を新しい無血清 MEM と交換し、さらに 24 時間培養後、VEGF 分泌を測定するために上清を回収した。VEGF の測定方法は、「材料と方法」に記載した。独立した 3 回の実験での平均値±標準偏差でデータを表した。スチューデント t-検定を利用し、結果は統計的に有意であった (* $p < 0.05$; $n = 3$)。

フコイダンは腫瘍血管新生を抑制する

次に共培養系を用いて、腫瘍血管新生に及ぼすフコイダン抽出物の効果を調べた。無細胞培養済み培地（対照）と比較して、HeLa 細胞培養済み培地（HeLa CM）により、全ての試験項目で血管の細管形成が顕著に増加することを結果は示した。対照的に、フコイダン抽出物で処理された HeLa 細胞培養済み培地（フコイダン ex.-HeLa）では、細管形成アッセイでの全パラメータが大幅に抑えられた（図 5）。これらの結果は、フコイダン抽出物が腫瘍細胞の血管新生を抑制することを示している。

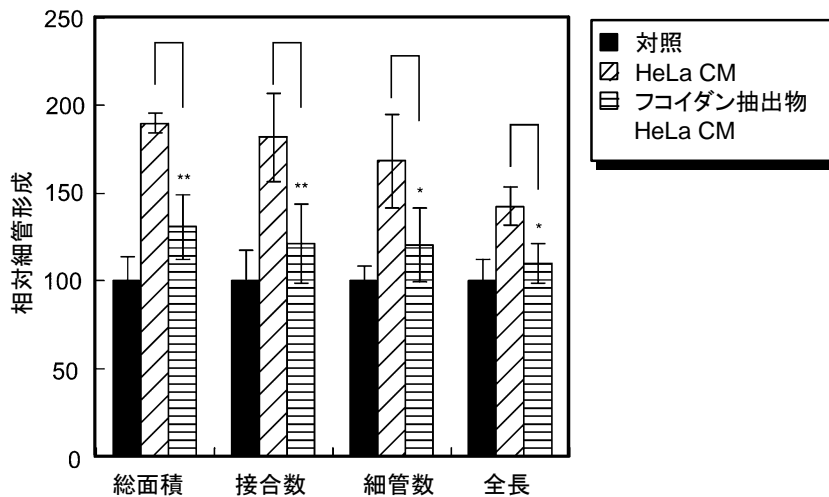


図5. フコイダンは血管の細管形成を抑制する。

EBM-2 と非細胞処理 MEM の混合物（対照）、HeLa 細胞培養済み MEM（HeLa CM）、フコイダン抽出物処理済み HeLa 細胞培養済み MEM（フコイダン抽出物 HeLa CM）をそれぞれ 1 : 2 の割合で HUVEC/TIG-1 共培養系に供した。11 日目に、細管染色キットによって細管形成を検出し、位相差顕微鏡下で可視化した。血管新生の定量分析用ソフトウェアを用いて写真を分析した。1 ウェル当たり任意の 12 視野での細管形成を評価した。独立した 3 回の実験での平均値±標準偏差でデータを表した。スチューデント t-検定を利用し、結果は統計的に有意であった（* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; $n = 3$ ）。

考察

フコイダンは抗腫瘍活性を有することが報告されている（Soeda et al. 1994; Haroun-Bouhedja et al. 2002）。しかし、フコイダンが腫瘍細胞の浸潤や血管新生を抑制する機序は明確には解明されていない。本研究では、海草 *Cladosiphon novae-caledoniae* kylin に由来し、アワビ・

グリコシダーゼで消化されたフコイダン抽出物を使用した。フコイダン抽出物は、糖組成分析によって主にフコースから成り（73%）、またサイズ排除クロマトグラフィーによって低分子量の消化画分（72%, MW : <500）から成ることが見出され、従って、フコイダン抽出物は主に消化フコイダンから成った。本研究では、腫瘍細胞の浸潤・血管新生能に及ぼすこの新規フコイダン由来物質の機能性の評価を試みた。

腫瘍細胞は、正常細胞と比較して (Szatrowski and Nathan 1991)、MMP-2 及び MMP-9 濃度の上昇とともに (Johnsen et al. 1998)、高レベルの酸化ストレスを伴い、これは腫瘍細胞での酸化ストレスと MMP-2/9 発現の相関関係を強く示唆している (Belkhiri et al. 1997; Gurjar et al. 2001; Grote et al. 2003; Kolev et al. 2003)。さらに、細胞内酸化ストレスの軽減によって、MMP-2/9 が下方制御される。実際に、数種のフコイダン由来物質が *in vitro* または *in vivo* での抗酸化能を示している (Xue et al. 1998, 2001; Ruperez et al. 2002; Zhang et al. 2003)。Cladosiphon novae-caledoniae kylin からのフコイダン抽出物が HT1080 細胞の細胞内 H₂O₂ 及び H₂O₂ 放出をともに効果的に減少させ、これによって、MMP-2/9 発現の抑制、その結果としての浸潤能の抑制をもたらす得ることを我々は実証した。フコイダン抽出物による ROS 減少の機序は解明していないが、フコイダン抽出物がスーパーオキシド・ジスムターゼやグルタチオン・ペルオキシダーゼなどの抗酸化酵素を活性化させると推測できる。

H₂O₂ 放出は、癌細胞の血管新生過程での誘引の 1 つと考えられる (Szatrowski and Nathan 1991)。腫瘍増殖中、*in vitro* でのエタノール誘発性血管新生において H₂O₂ が極めて重要な役割を果たすことが報告されている (Qian et al. 2003)。腫瘍血管新生は腫瘍からの VEGF 産生と直接の相関があると考えられているものの (Berkman et al. 1993; Guidi et al. 1995; Wizigmann-Voos et al. 1995; Mattern et al. 1996; Suzuki et al. 1996; Balsari et al. 1999)、H₂O₂ も多くの細胞株での顕著な VEGF 発現誘導の原因となる (Brauchle et al. 1996; Chua et al. 1998; Cho et al. 2001; Masuda et al. 2002; Zhu et al. 2002)。このように、腫瘍細胞やその周辺での ROS 消去及び ROS ストレスの減少は、H₂O₂ 放出の抑制及び VEGF 発現の下方制御を介して腫瘍細胞の血管新生を抑制するはずである。

数種の酸化防止剤が腫瘍血管新生を抑制する。N-アセチル・システイン (NAC) は、VEGF 産生の抑制を介して (Albini et al. 2001)、また強力な内皮アポトーシス因子であるアンギオスタチンの産生を促進することで (Agarwal et al. 2004) 腫瘍血管新生を抑制する。ビタミン E は、外因性 H₂O₂ 誘発性の細管形成を抑制し (Tang and Meydani 2001)、VEGF 発現の抑制を介してメラノーマの血管新生を抑制することが (Malafa et al. 2002) 示されている。本研究では、Cladosiphon novae-caledoniae kylin からの酵素消化フコイダン抽出物での処理時の細胞内 ROS 濃度及び H₂O₂ 放出の低下が、MMP-2/9 活性及び VEGF 発現の低下、さらにその結果としての腫瘍細胞の浸潤抑制及び細管形成抑制の原因であった。フコイダン抽出物の有効成分は不明である。フコイダンの低分子量硫酸含有物の抗酸化活性への関与が報告されている (Xue et al. 2001, 2004; Quanbin et al. 2003)。他方で、フコイダンの過硫酸化は、抗腫瘍浸潤 (Soeda et al. 1994) 及び血管新生活性 (Koyanagi et al. 2003) を増進

させ得る。未消化、高分子量フコイダン抽出物では、HT1080 細胞内の ROS を消去せず、MMP-2 mRNA 発現を促進しないことを認めた（データ未掲載）。従って、海草モズクからの酵素消化フコイダン抽出物中の有効成分は、低分子量、硫酸化画分と考えられる。一方で、抗酸化カロチノイド、フコキサンチンなどの低分子量の有効成分が（Okuzumi et al. 1990, 1993; Hoyoku 1995）、フコイダン抽出物の酵素消化によって放出されるという別の可能性も考えられる。酵素消化フコイダン抽出物中の有効成分に関する一層の研究が必要とされる。

参考文献

- Agarwal A., Munoz-Najar U., Klueh U., Shih S.C. and Claffey K.P. 2004. N-acetyl-cysteine promotes angiostatin production and vascular collapse in an orthotopic model of breast cancer. *Am. J. Pathol.* 164: 1683–1696.
- Albini A., Morini M., D'Agostini F., Ferrari N., Campelli F., Arena G., Noonan D.M., Pesce C. and De Flora S. 2001. Inhibition of angiogenesis-driven Kaposi's sarcoma tumor growth in nude mice by oral N-acetylcysteine. *Cancer Res.* 61: 8171–8178.
- Balsari A., Maier J.A., Colnaghi M.I. and Menard S. 1999. Correlation between tumor vascularity, vascular endothelial growth factor production by tumor cells, serum vascular endothelial growth factor levels, and serum angiogenic activity in patients with breast carcinoma. *Lab. Invest.* 79: 897–902.
- Belkhiry A., Richards C., Whaley M., McQueen S.A. and Orr F.W. 1997. Increased expression of activated matrix metalloproteinase-2 by human endothelial cells after sublethal H₂O₂ exposure. *Lab. Invest.* 77: 533–539.
- Berkman R.A., Merrill M.J., Reinhold W.C., Monacci W.T., Saxena A., Clark, W.C., Robertson J.T., Ali I.U. and Old-field E.H. 1993. Expression of the vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor gene in central nervous system neoplasms. *J. Clin. Invest.* 91: 153–159.
- Brauchle M., Funk J.O., Kind P. and Werner S. 1996. Ultraviolet B and H₂O₂ are potent inducers of vascular endothelial growth factor expression in cultured keratinocytes. *J Biol Chem* 271: 21793–21797.
- Chabut D., Fischer A.-M., Collic-Jouault S., Laurendeau I., Matou S., Le Bonniec B. and Helley D. 2003. Low molecular weight fucoidan and heparin enhance the basic fibroblast growth factor-induced tube formation of endothelial cells through heparin sulfate-dependent $\alpha 6$ overexpression. *Mol. Pharmacol.* 64: 696–702.
- Chabut D., Fischer A.M., Helley D. and Collic S. 2004. Low molecular weight fucoidan promotes FGF-2-induced vascular tube formation by human endothelial cells, with decreased PAI-1

- release and ICAM-1 downregulation. *Thrombosis Res.* 113: 93–95.
- Cho M., Hunt T.K. and Hussain M.Z. 2001. Hydrogen peroxide stimulates macrophage vascular endothelial growth factor release. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 280: H2357–2363.
- Chua C.C., Hamdy R.C. and Chua B.H. 1998. Upregulation of vascular endothelial growth factor by H₂O₂ in rat heart endothelial cells. *Free Radic. Biol. Med.* 25: 891–897.
- Ferrara N. 1993. Vascular endothelial growth factor. *Trends Cardiovasc. Med.* 3: 244–250.
- Grote K., Flach I., Luchtefeld M., Akin E., Holland S.M., Drexler H. and Schieffer B. 2003. Mechanical stretch enhances mRNA expression and proenzyme release of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) via NAD(P)H oxidase-derived reactive oxygen species. *Circ. Res.* 92: e80–86.
- Guidi A.J., Abu-Jawdeh G., Berse B., Jackman R.W., Tognazzi K., Dvorak H.F. and Brown L.F. 1995. Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) expression and angiogenesis in cervical neoplasia. *J. Natl. Cancer Inst.* 87: 1237–1245.
- Gurjar M.V., Deleon J., Sharma R.V. and Bhalla R.C. 2001. Role of reactive oxygen species in IL-1 beta-stimulated sustained ERK activation and MMP-9 induction. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 281: H2568–2574.
- Haroun-Bouhedja F., Lindenmeyer F., Lu H., Soria C., Jozefonvicz J. and Boisson-Vidal C. 2002. *In vitro* effects of fucans on DA-MB231 tumor cell adhesion and invasion. *Anticancer Res.* 22: 2285–2292.
- Hoyoku H. 1995. Cancer chemoprevention by natural carotenoids and their related compounds. *J. Cell. Biochem. Suppl.* 22: 231–235.
- Itoh H., Noda H., Amano H., Zhuang C., Mizuno T. and Ito H. 1993. Antitumor activity and immunological properties of marine algal polysaccharides, especially Fucoidan, prepared from *Sargassum thunbergii* of Pheophyceae. *Anticancer Res.* 13(6A): 2045–2052.
- Johnsen M., Lund L.R., Romer J., Almholt K. and Dano K. 1998. Cancer invasion and tissue remodeling: common themes in proteolytic matrix degradation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10: 667–6671.
- Johnson L.L., Dyer R. and Hupe D.J. 1998. Matrix metalloproteinases. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2: 466–471.
- Kolev K., Skopal J., Simon L., Csonka E., Machovich R. and Nagy Z. 2003. Matrix metalloproteinase-9 expression in posthypoxic human brain capillary endothelial cells: H₂O₂ as a trigger and NF-kappaB as a signal transducer. *Thromb. Haemost.* 90: 528–537.
- Koyanagi S., Tanigawa N., Nakagawa H., Soeda S. and Shimeno H. 2003. Oversulfation of fucoidan enhances its antiangiogenic and antitumor activities. *Biochem. Pharmacol.* 65: 173–179.
- Liabakk N.B., Talbot I., Smith R.A., Wilkinson K. and Balkwill F. 1996. Matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) and matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) type IV collagenases in colorectal cancer.

- Cancer Res. 56: 190–196.
- Malafa M.P., Fokum F.D., Smith L. and Louis A. 2002. Inhibition of angiogenesis and promotion of melanoma dormancy by vitamin E succinate. *Ann. Surg. Oncol.* 9: 1023–1032.
- Maruyama H., Tamauchi H., Hashimoto M. and Nakano T. 2003. Antitumor activity and immune response of Mekabu Fucoidan extracted from Sporophyll of *Undaria pinnatifida*. *In Vivo* 17: 245–249.
- Masuda M., Suzui M., Lim J.T., Deguchi A., Soh J.W. and Weinstein I.B. 2002. Epigallocatechin-3-gallate decreases VEGF production in head and neck and breast carcinoma cells by inhibiting EGFR-related pathways of signal transduction. *J. Exp. Ther. Oncol.* 2: 350–359.
- Mattern J., Koomagi R. and Volm M. 1996. Association of vascular endothelial growth factor expression with intratumoral microvessel density and tumor cell proliferation in human epidermoid lung carcinoma. *Br. J. Cancer* 73: 931–934.
- Noda H., Amano H., Arashima K. and Nisizawa K. 1990. Antitumor activity of marine algae. *Hydrobiologica* 204–205: 577–584.
- Okuzumi J., Nishino H., Murakoshi M., Iwashima A., Tanaka Y., Yamane T., Fujita Y. and Takahashi T. 1990. Inhibitory effects of fucoxanthin, a natural carotenoid, on N-myc expression and cell cycle progression in human malignant tumor cells. *Cancer Lett.* 55: 75–81.
- Okuzumi J., Takahashi T., Yamane T., Kitao Y., Inagake M., Ohya K., Nishino H. and Tanaka Y. 1993. Inhibitory effects of fucoxanthin, a natural carotenoid, on N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine-induced mouse duodenal carcinogenesis. *Cancer Lett.* 68: 159–168.
- Qian Y., Luo J., Leonard S.S., Harris G.K., Millecchia L., Flynn D.C. and Shi X. 2003. Hydrogen peroxide formation and actin filament reorganization by Cdc42 are essential for ethanol-induced *in vitro* angiogenesis. *J. Biol. Chem.* 278: 16189–16197.
- Quanbin Z., Pengzhan Y., Zhien L., Hong Z., Zuhong X. and Pengcheng L. 2003. Antioxidant activities of sulfated polysaccharide fractions from *Porphyra haitanesis*. *J. Appl. Phycol.* 15: 305–310.
- Ruch W., Cooper P.H. and Baggiolini M. 1983. Assay of H₂O₂ production by macrophages and neutrophils with homovanillic acid and horse-radish peroxidase. *J. Immunol. Methods* 63: 347–357.
- Ruperez P., Ahrazem O. and Leal J.A. 2002. Potential antioxidant capacity of sulfated polysaccharides from the edible marine brown seaweed *Fucus vesiculosus*. *J. Agric. Food Chem.* 50: 840–845.
- Soeda S., Ishida S., Shimeno H. and Nagamatsu A. 1994. Inhibitory effect of oversulfated fucoidan on invasion through reconstituted basement membrane by murine Lewis lung carcinoma. *Jpn. J.*

- Cancer Res. 85: 1144–1150.
- Suzuki K., Hayashi N., Miyamoto Y., Yamamoto M., Ohkawa K., Ito Y., Sasaki Y., Yamaguchi Y., Nakase H., Noda K., Enomoto N., Arai K., Yamada Y., Yoshihara H., Tujimura T., Kawano K., Yoshikawa K. and Kamada T. 1996. Expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* 56: 3004–3009.
- Szatrowski T.P. and Nathan C.F. 1991. Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells. *Cancer Res.* 51: 794–798.
- Tang F.Y. and Meydani M. 2001. Green tea catechins and vitamin E inhibit angiogenesis of human microvascular endothelial cells through suppression of IL-8 production. *Nutr. Cancer* 41: 119–125.
- Usui T., Asari K. and Mizuno T. 1980. Isolation of highly purified “Fucoidan” from *Eisenia bicyclios* and its anticoagulant and antitumor activities. *Agric. Biol. Chem.* 44: 1965–1966.
- Westermarck J. and Kahari V.M. 1999. Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. *Faseb. J.* 13: 781–792.
- Wizigmann-Voos S., Breier G., Risau W. and Plate K.H. 1995. Up-regulation of vascular endothelial growth factor and its receptors in von Hippel-Lindau disease-associated and sporadic hemangioblastomas. *Cancer Res.* 55: 1358–1364.
- Xue C.-H., Fang Y., Lin H., Chen L., Li Z.-J., Deng D. and Lu C.-X. 2001. Chemical characters and antioxidative properties of sulfated polysaccharides from *Laminaria japonica*. *J. Appl. Phycol.* 13: 67–70.
- Xue C., Yu G., Hirata T., Terao J. and Lin H. 1998. Antioxidative activities of several marine polysaccharides evaluated in a phosphatidylcholine-liposomal suspension and organic solvents. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62: 206–209.
- Xue Z., Chang-Hu X., Zhao-Jie L., Yue-Piao C., Hong-Ying L and Hong-Tao Q. 2004. Antioxidant and hepatoprotective activities of low molecular weight sulfated polysaccharide from *Laminaria japonica*. *J. Appl. Phycol.* 16: 111–115.
- Yamamoto I., Takahashi M., Suzuki T., Seino H. and Mori H. 1984. Antitumor effect of seaweeds. IV. Enhancement of antitumor activity by sulfation of a crude Fucoidan from *Sargassum kjellmanianum*. *Jpn. J. Exp. Med.* 54: 143–151.
- Zhang Q., Li N., Zhou G., Lu X., Xu Z. and Li Z. 2003. *In vivo* antioxidant activity of polysaccharide fraction from *Porphyra haitanesis* (Rhodophyta) in aging mice. *Pharmacol. Res.* 48: 151–155.
- Zhu J.W., Yu B.M., Ji Y.B., Zheng M.H. and Li D.H. 2002. Upregulation of vascular endothelial growth factor by hydrogen peroxide in human colon cancer. *World J. Gastroenterol.* 8: 153–157.
- Zhuang C., Itoh H., Mizuno T. and Ito H. 1995. Antitumor active Fucoidan from the brown seaweed, *Umitoranoo (Aragassum thunbergii)*. *Biosci. Biotech. Biochem.* 59: 563–567.