

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)

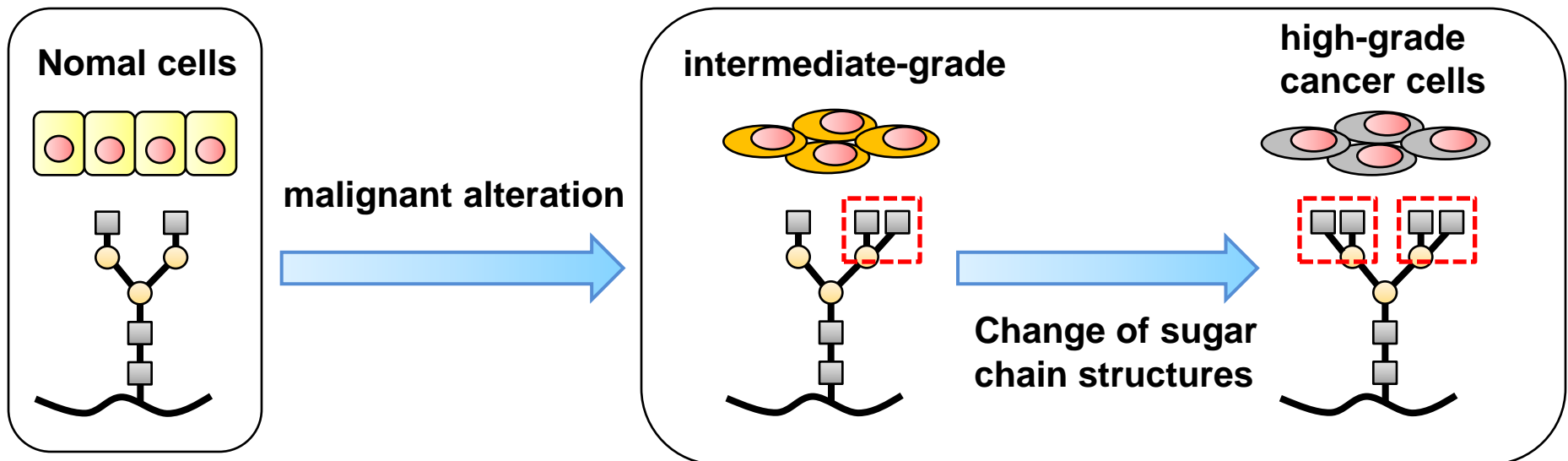
背景

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

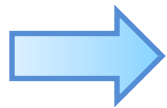


ガンを含む様々な疾病の一因と考えられている



現在のガン治療法とその課題

- ・**外科的療法**
再発や免疫力低下の可能性、進行度合による限界
- ・**放射線療法**
ガンの種類による感受性の違い、治療に時間を要する
- ・**抗ガン剤療法**
副作用、薬剤耐性の問題



機能性食品などを用いた**補完代替療法**

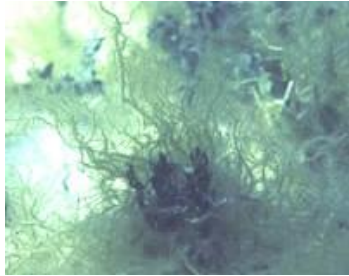
- ・有効性や作用メカニズムが完全に明らかとなっていない
- ・効果の低さ

ガン細胞に特徴的な遺伝子変化や糖鎖合成異常の分子メカニズムに基づいた治療法の開発

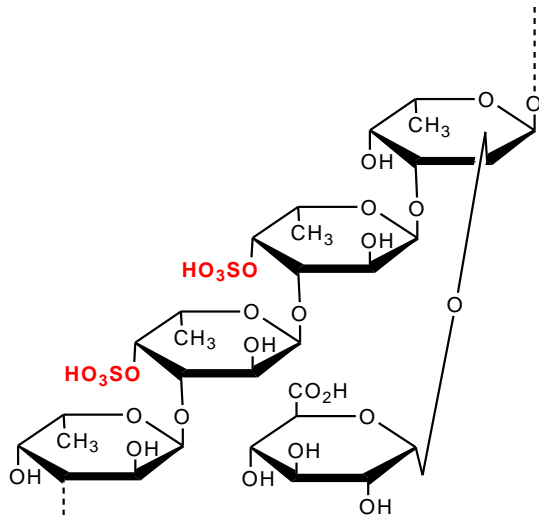
複数のサプリメントの併用

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)

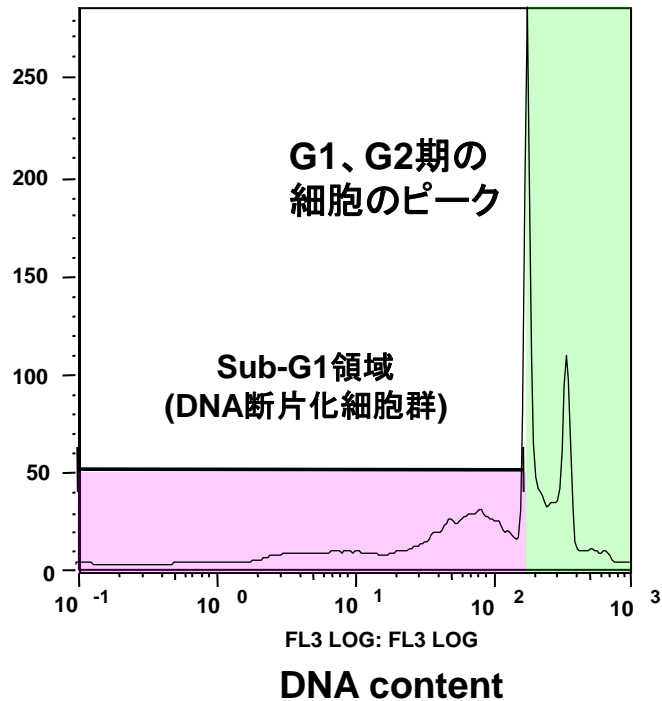
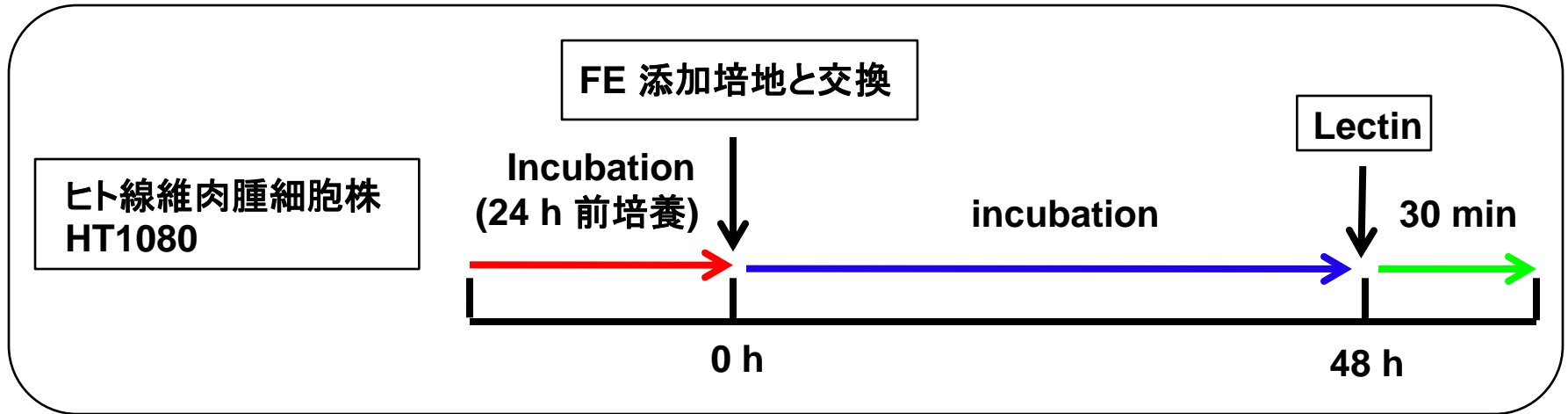
↓ ← アワビグリコシダーゼ

酵素消化低分子化フコイダン 抽出物
(Fucoidan Extract : FE)

Components

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

実験条件



Sub-G1 assay

正常DNA
断片化DNA

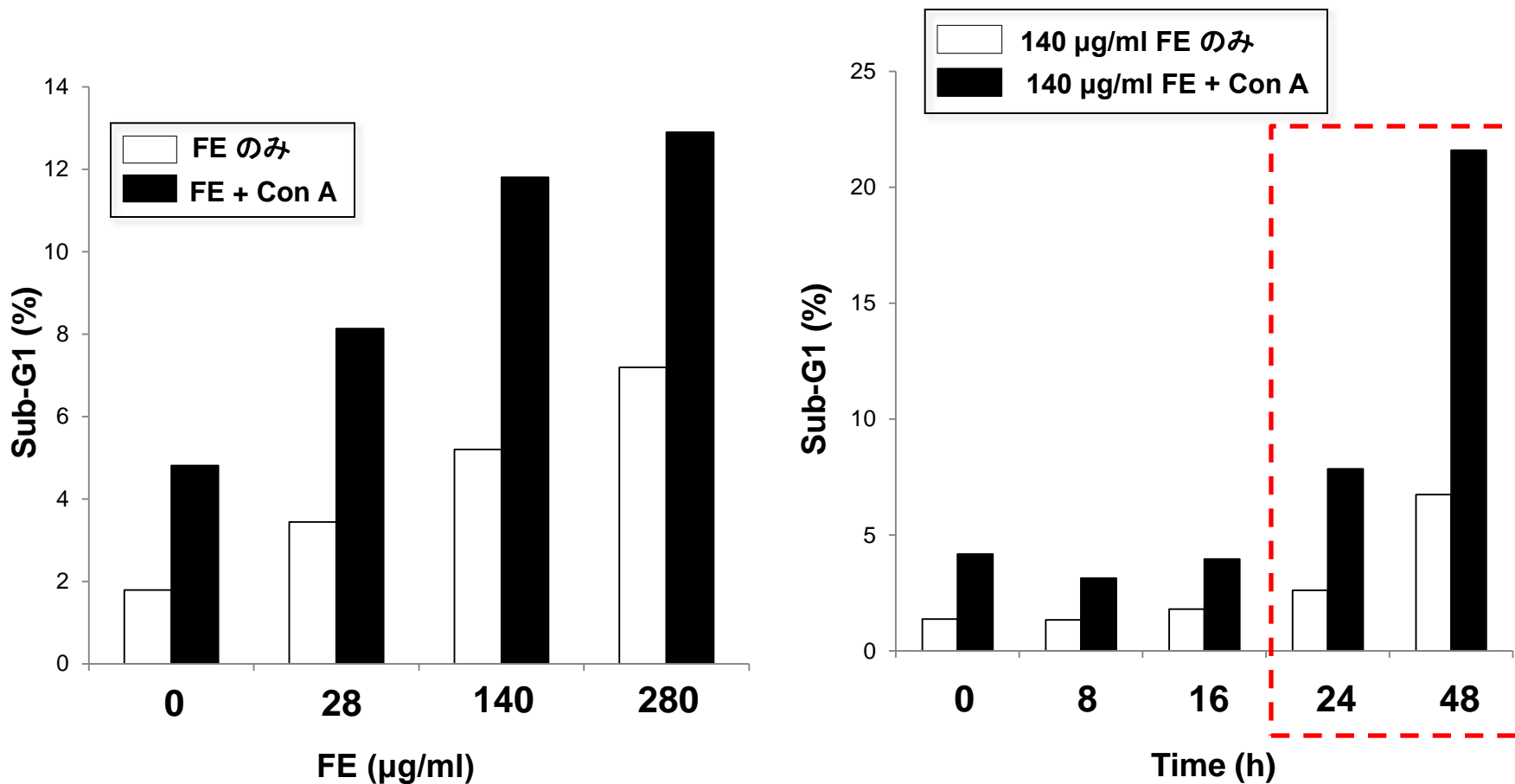
蛍光強度強

蛍光強度弱

EtOH 固定 → PI染色

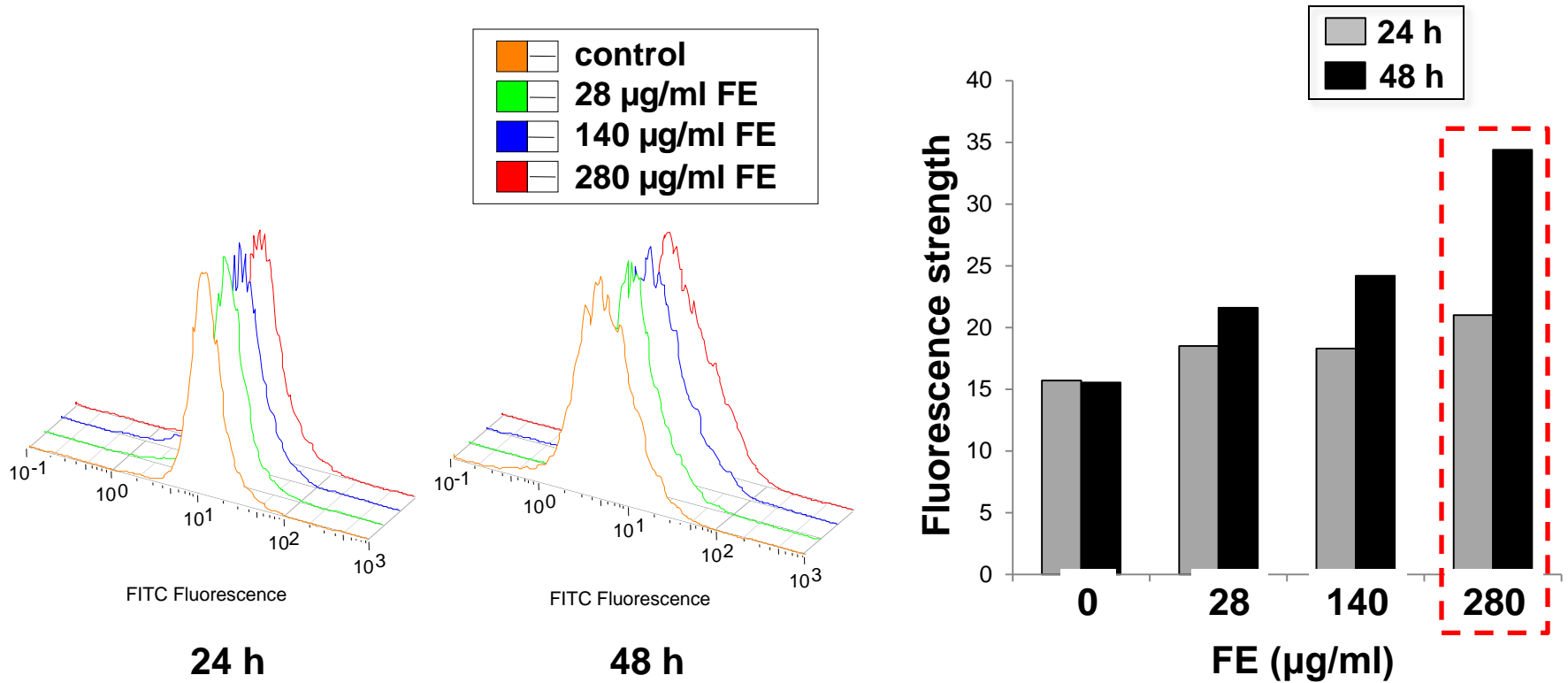
二重らせん構造に
intercalation

FEとCon Aによる細胞死誘導増強効果



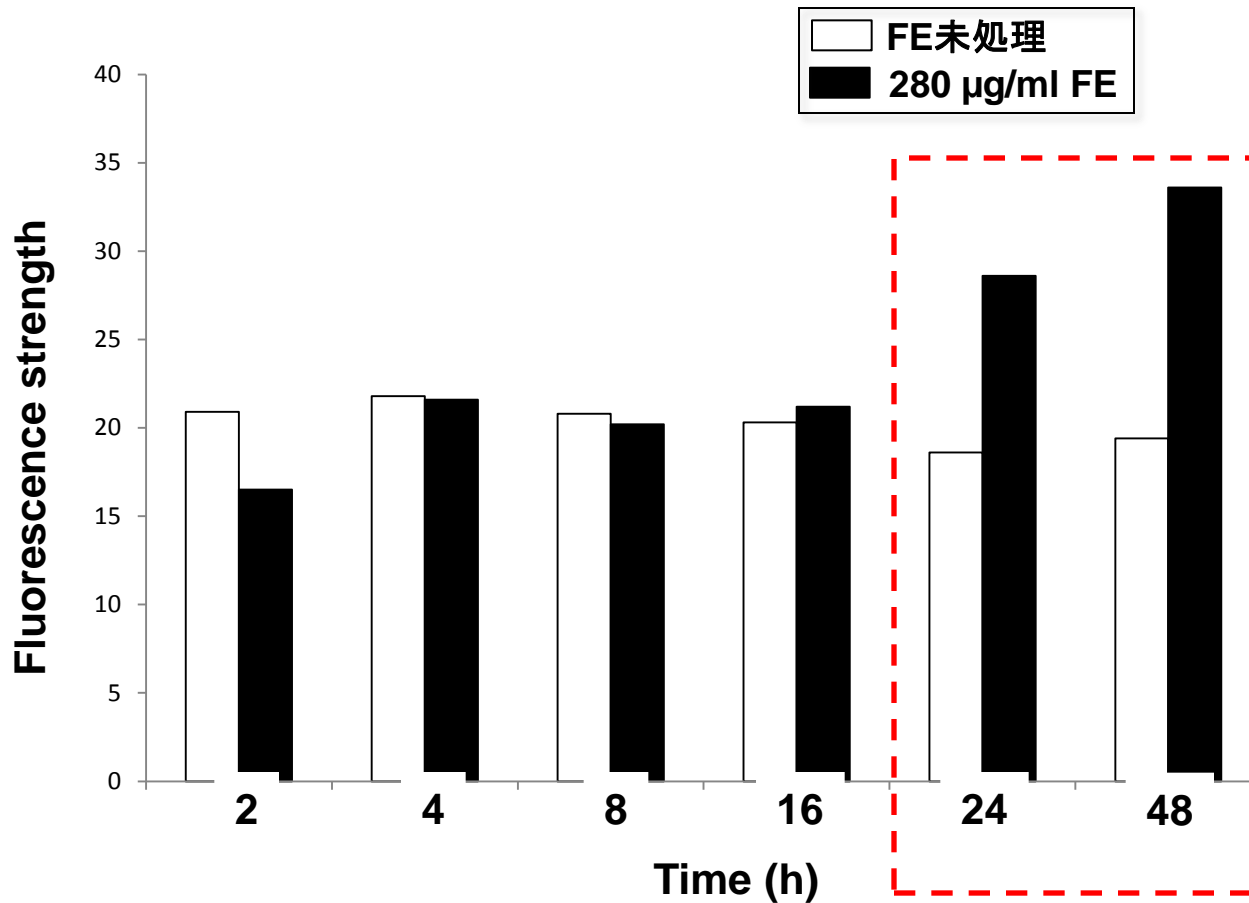
- ・FE処理濃度依存的な死細胞数の増加が確認された
- ・細胞死誘導増強効果はFE処理24時間以降に認められた

FE処理したHT1080細胞のCon A反応性糖鎖発現量の変化



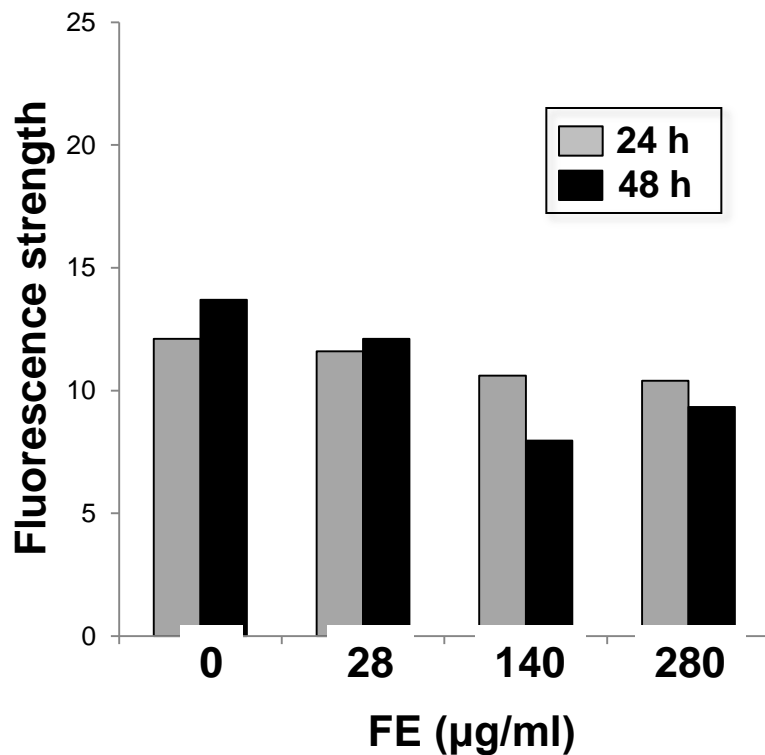
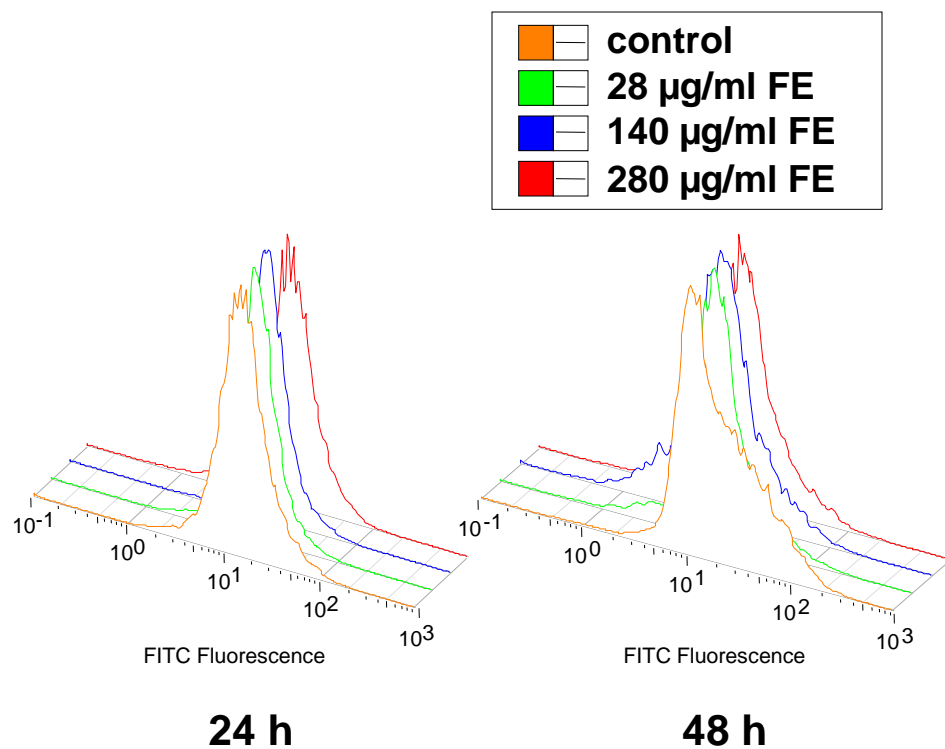
FE処理濃度依存的なCon A反応性糖鎖の発現量増加が確認された

HT1080細胞のCon A反応性糖鎖発現量の経時的変化



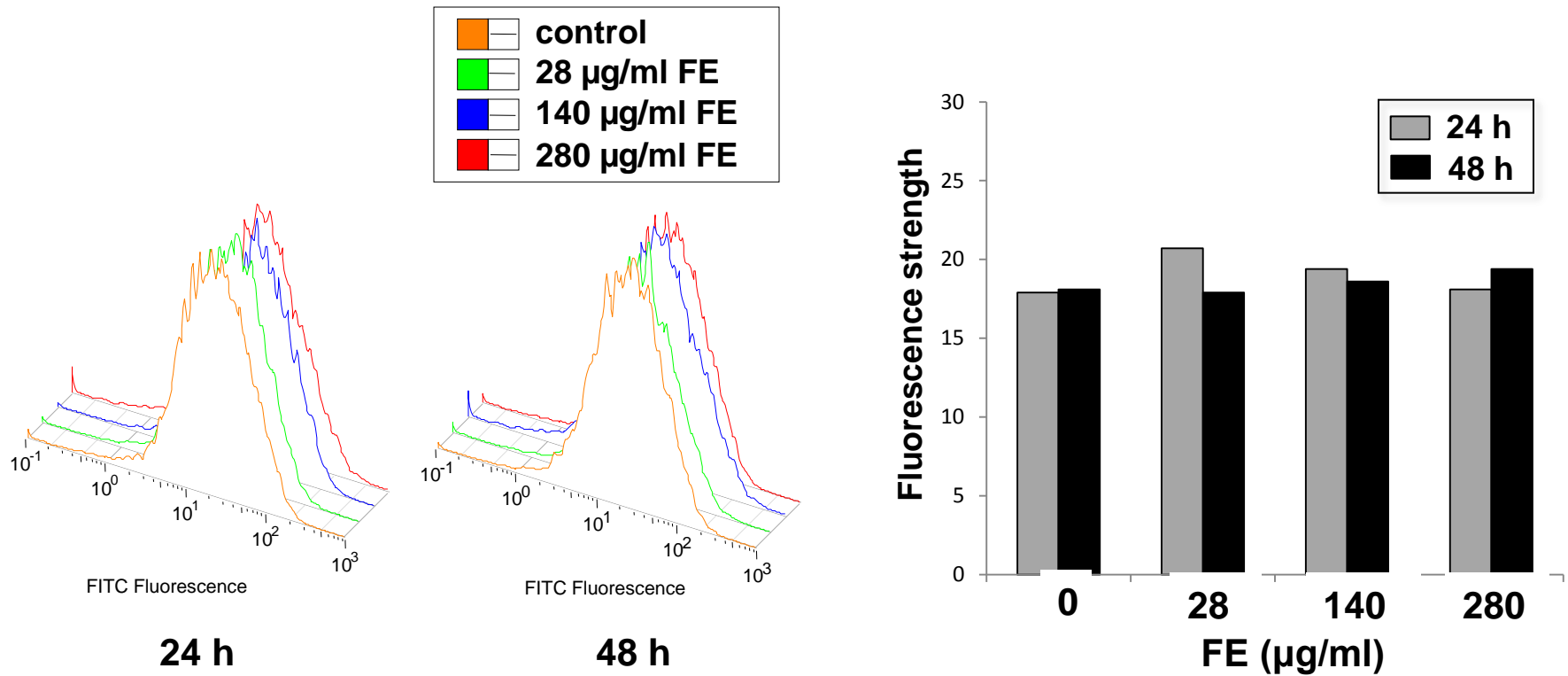
FE処理時間依存的なCon A反応性糖鎖の発現量増加が確認された

FE処理したHT1080細胞のPHA-L4反応性糖鎖発現量の変化



FE処理濃度依存的なPHA-L4反応性糖鎖の発現量減少が確認された

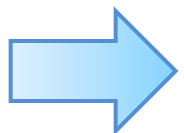
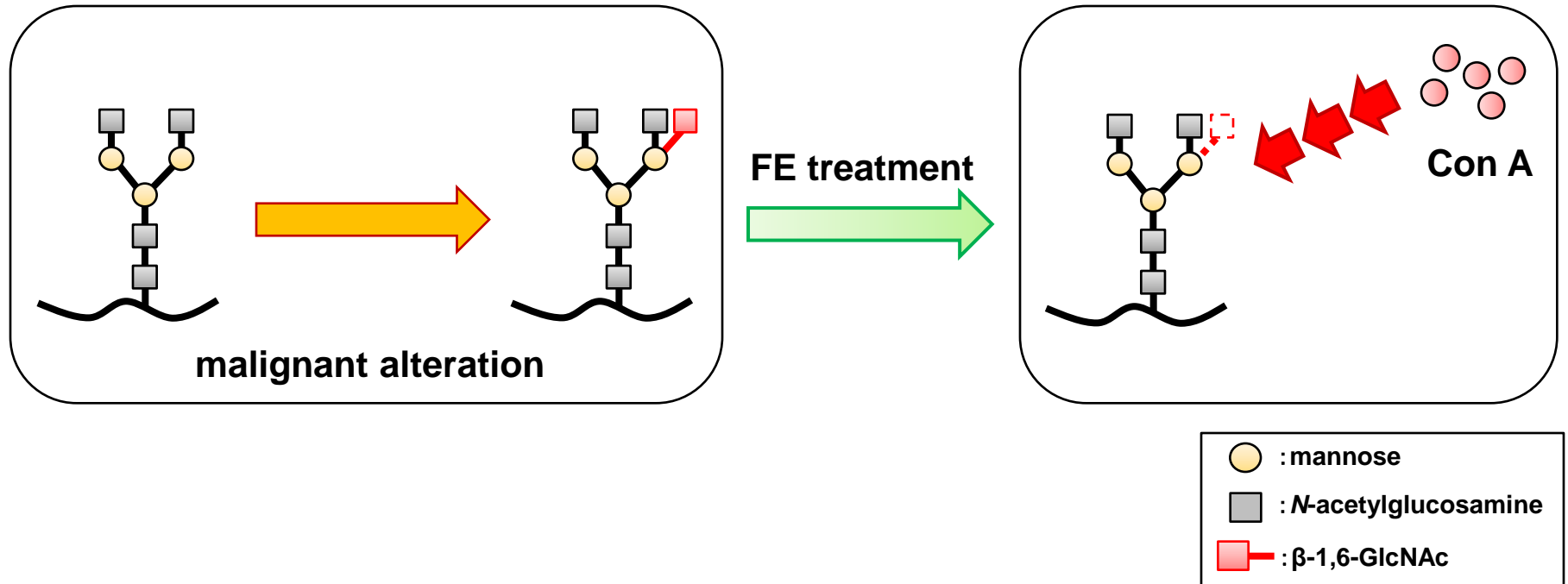
FE処理したTIG-1細胞のCon A反応性糖鎖発現量の変化



Con A反応性糖鎖の発現量に変化は認められなかった

小活

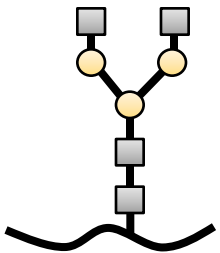
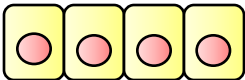
- ・細胞死誘導増強効果はFE処理24時間以降に認められた
- ・FE処理によるCon A反応性糖鎖の発現量増加及びPHA-L4 反応性糖鎖の発現量減少が確認された



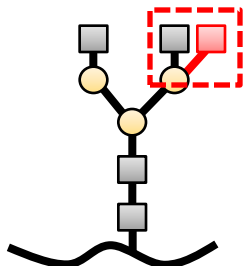
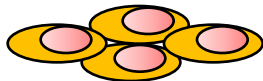
細胞死誘導増強効果の要因であると示唆された

ガン細胞におけるGnT-Vの役割

Normal cells



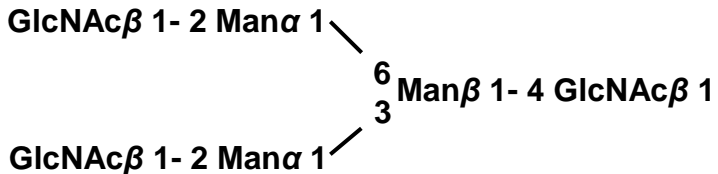
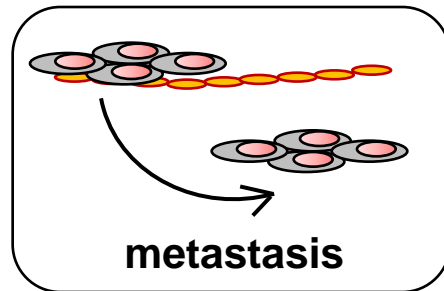
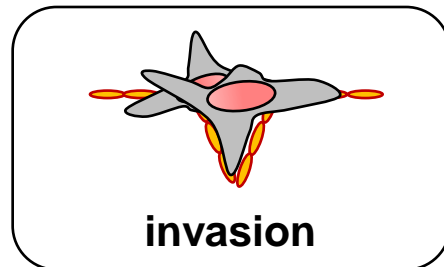
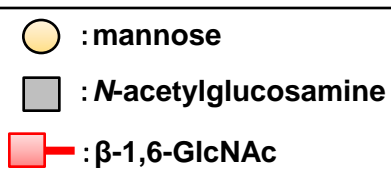
Cancer cells



malignant alteration

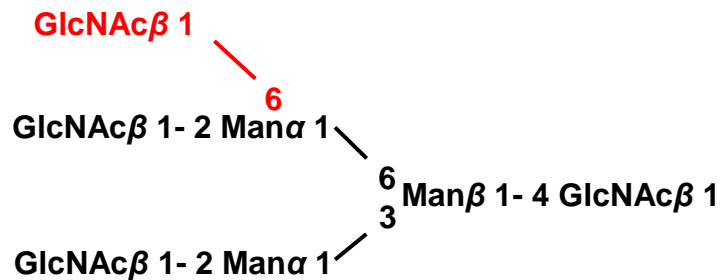
GnT-Vの発現量増加

Ets-1の発現量増加



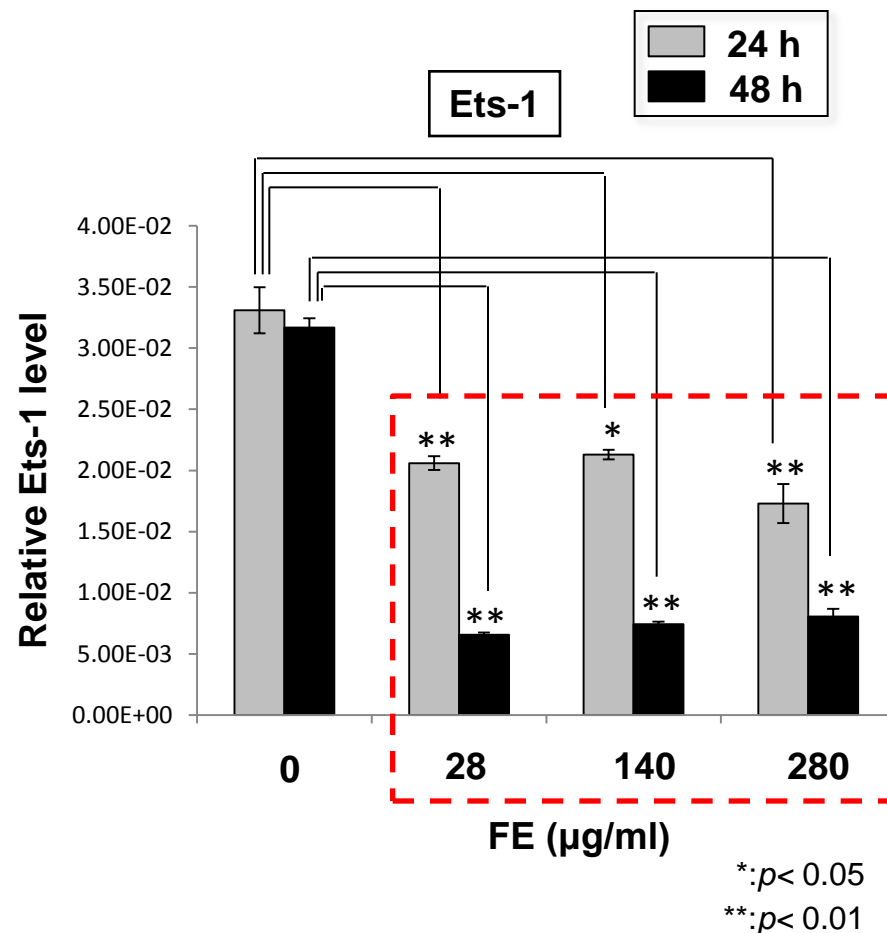
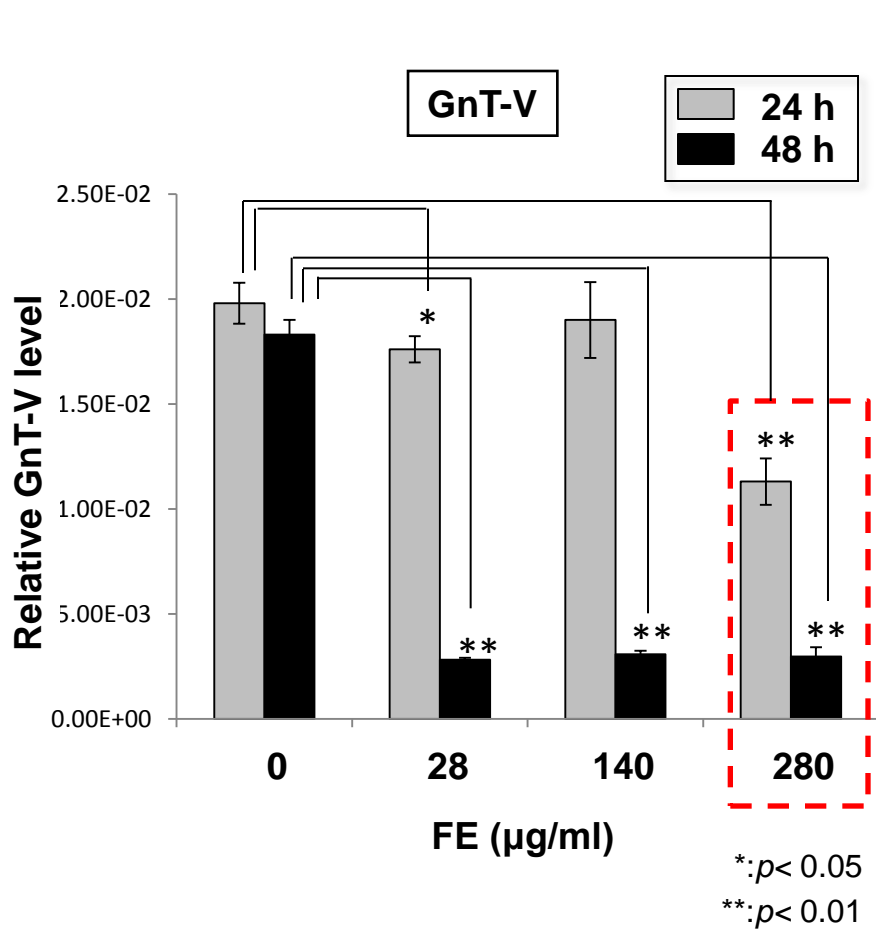
GnT-V

UDP-GlcNAc → UDP



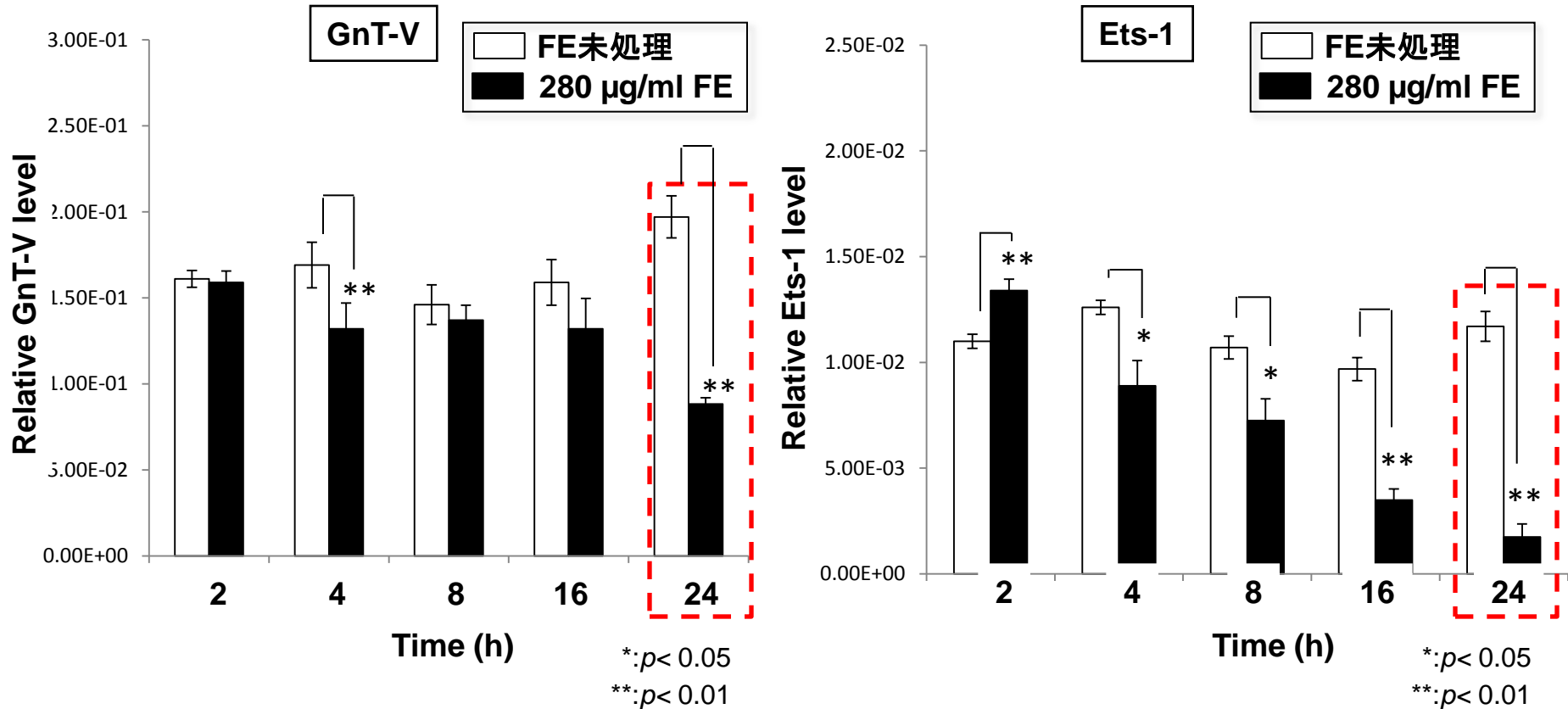
GnT-Vはβ-1,6-GlcNAc分岐鎖の形成に関与し、ガンの浸潤・転移とも深く関係している

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



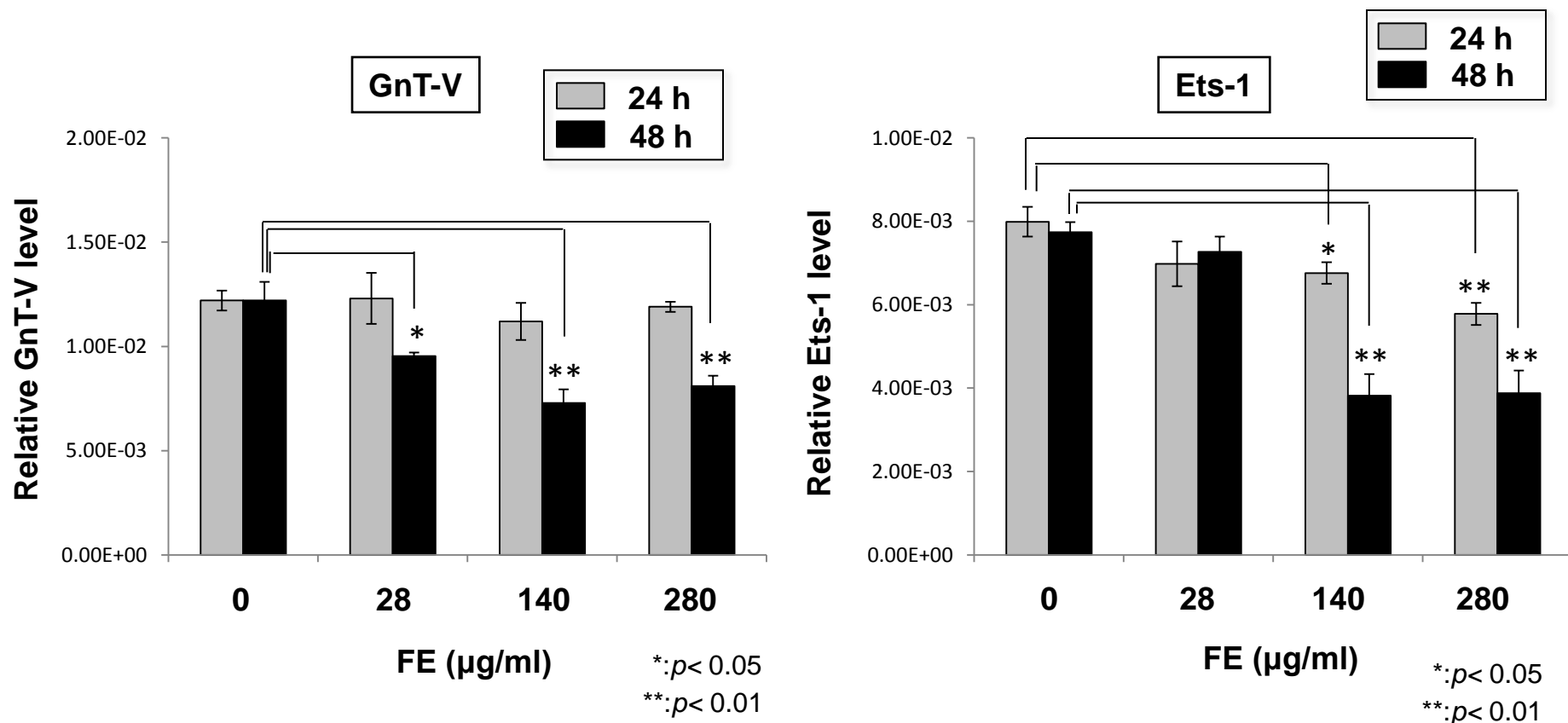
FE処理によってGnT-V及びEts-1のmRNA発現量減少が確認された

HT1080細胞のGnT-V及びEts-1のmRNA発現量の経時的変化



FE処理時間依存的なGnT-V及びEts-1のmRNA発現量減少が確認された

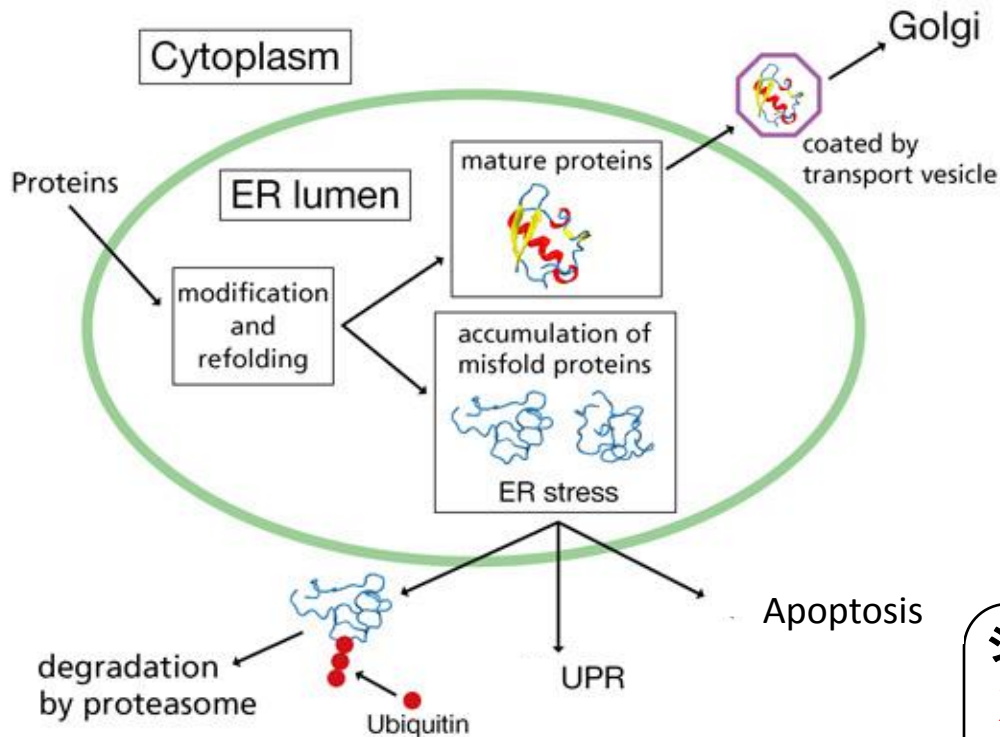
FE処理したTIG-1細胞のGnT-V及びEts-1のmRNA発現量の変化



- ・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

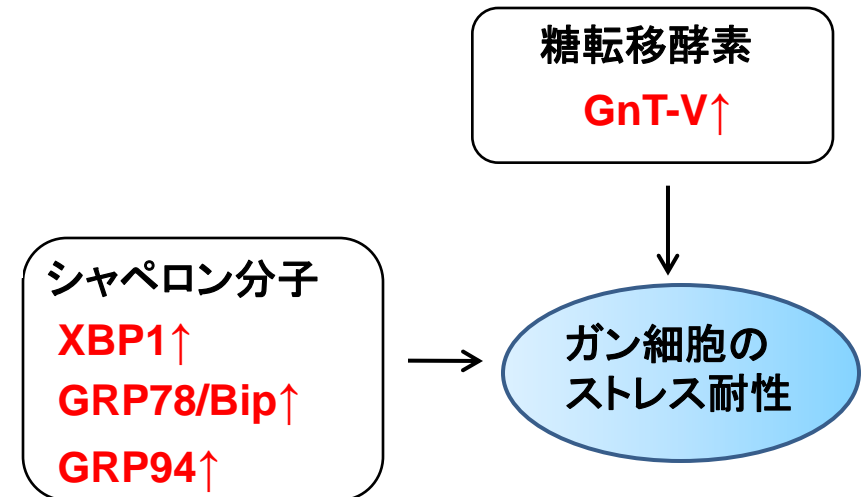
小胞体 (ER) ストレスについて

- ・・・小胞体内腔に折り畳み不全のタンパク質 (unfolded proteins) が蓄積するようになる状態

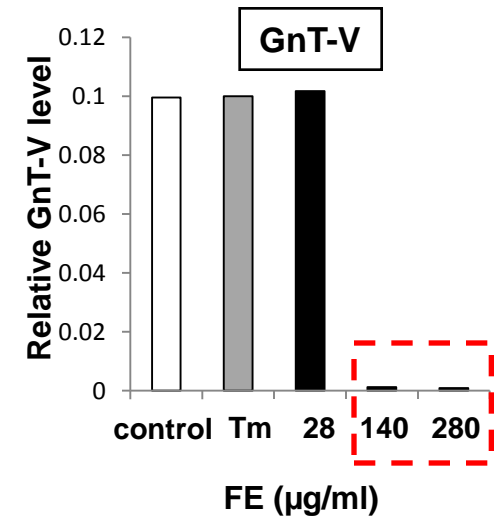
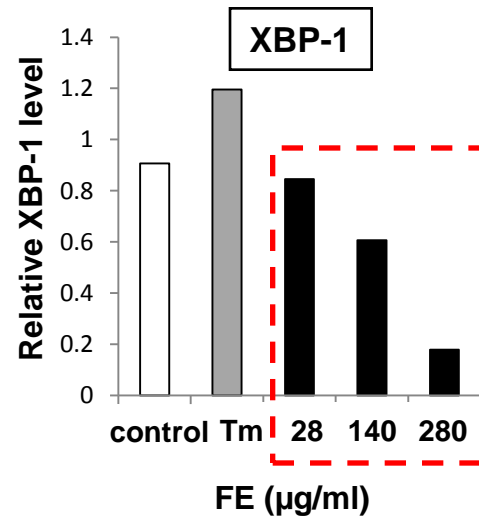
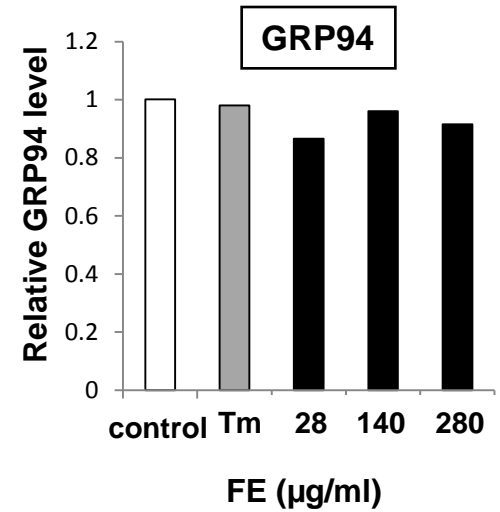
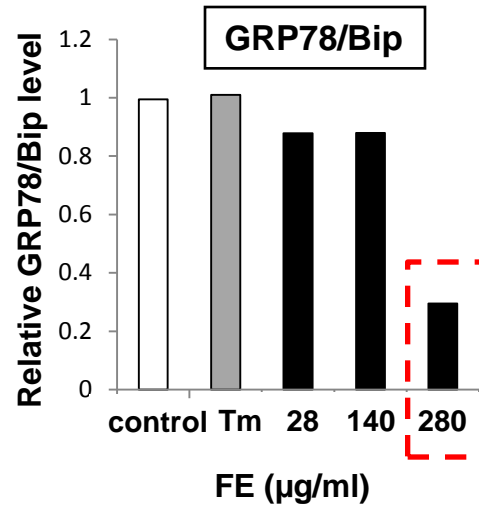
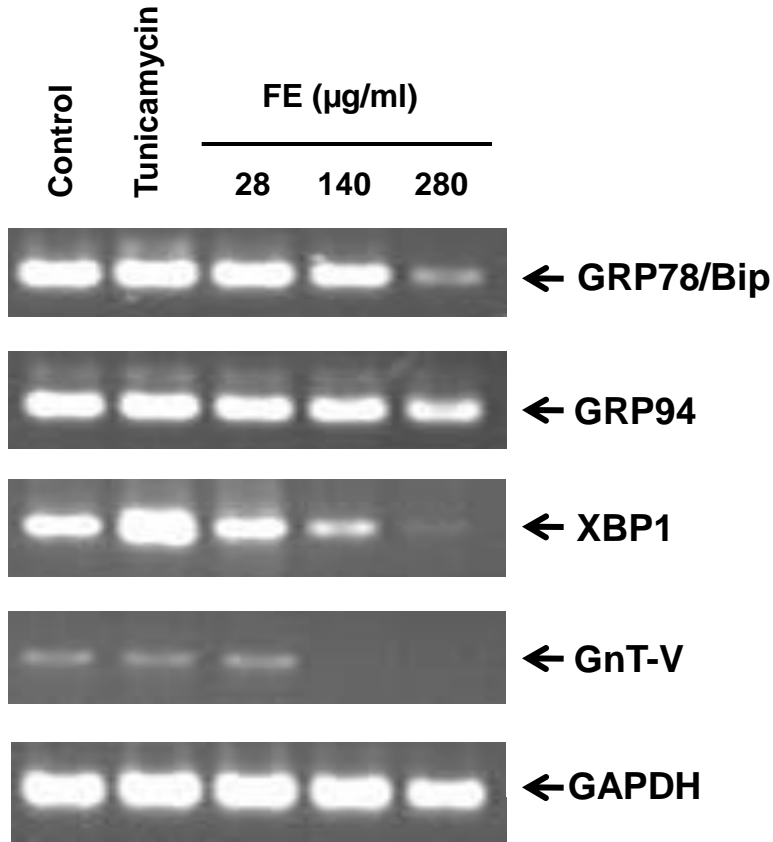


UPR (unfolded protein response)

- ・・・小胞体内に存在するシャペロン分子 (GRP78/Bip、GRP94など) を転写レベルで誘導して異常タンパク質の巻き戻しを図る応答



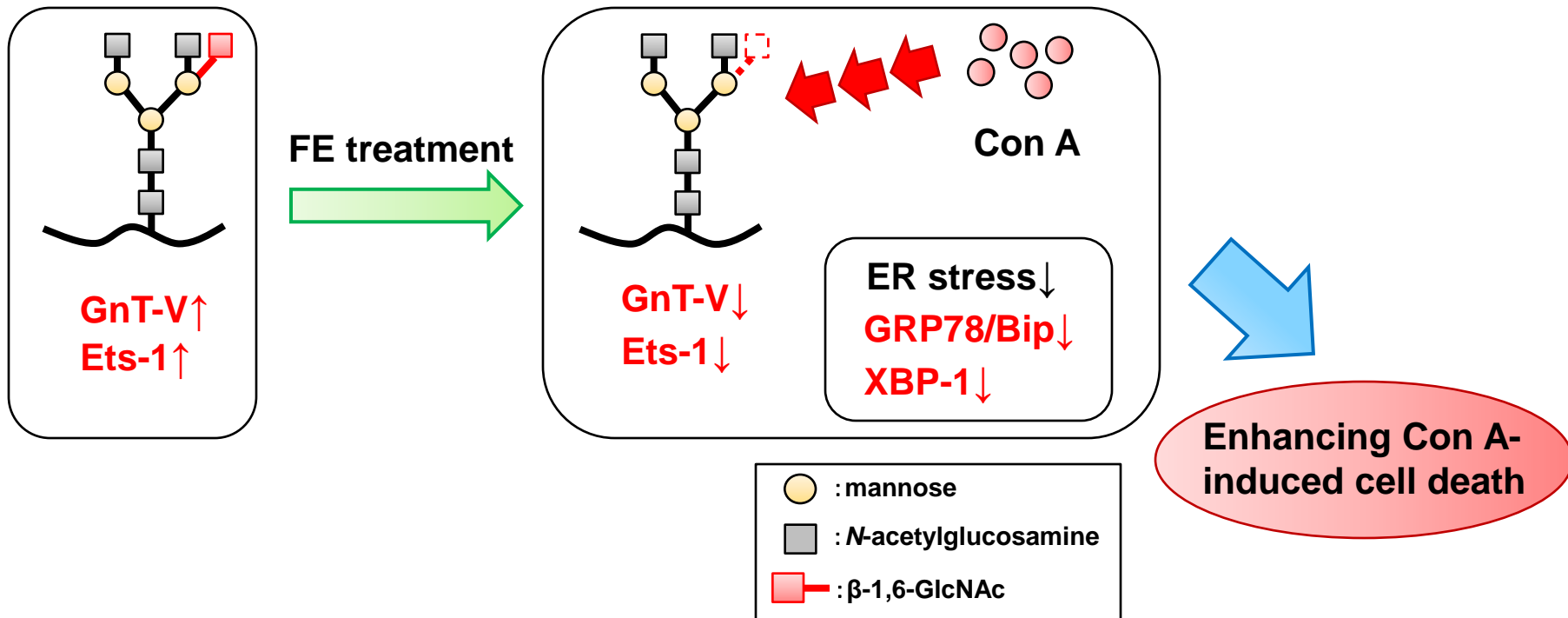
ERストレス関連遺伝子に対する影響



FEはERストレスを増加させるのではなく軽減すると推測された

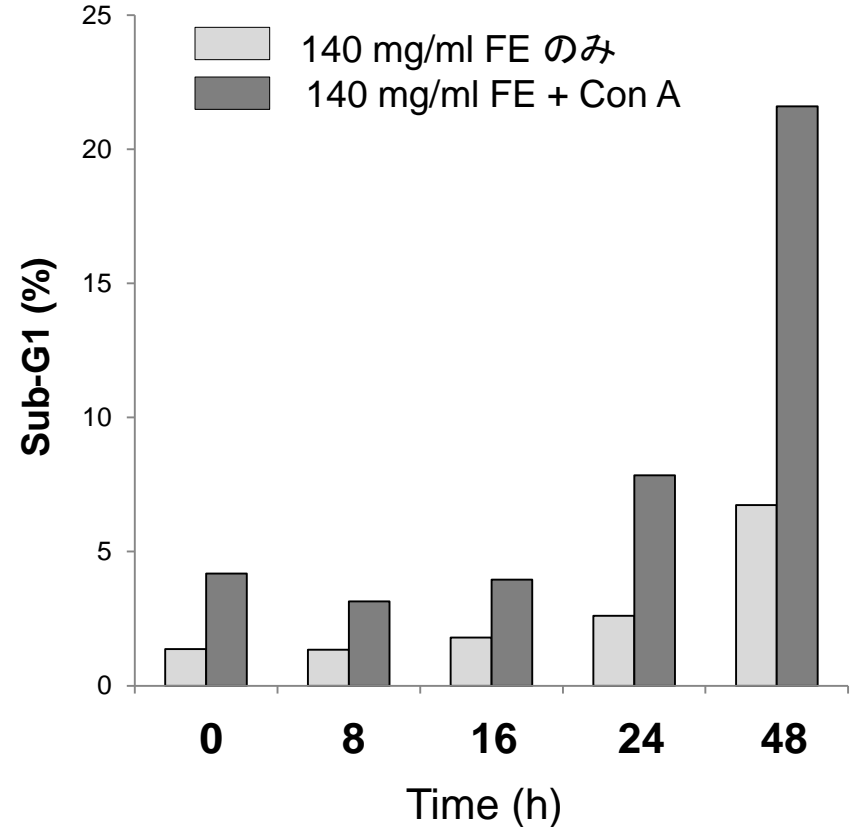
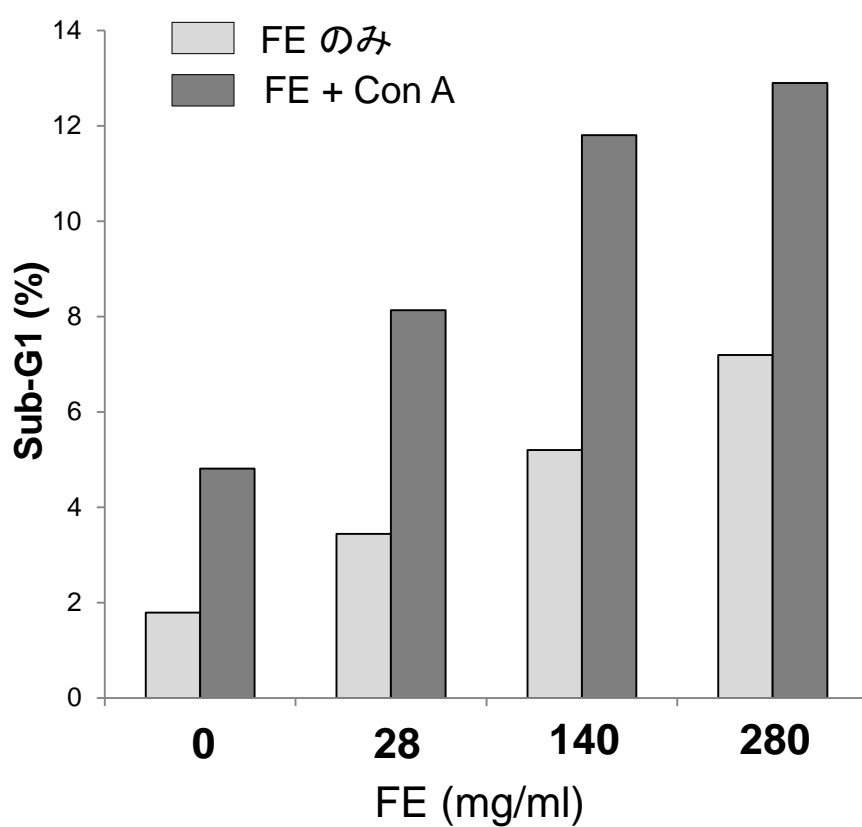
総括

- ・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と示唆された
- ・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



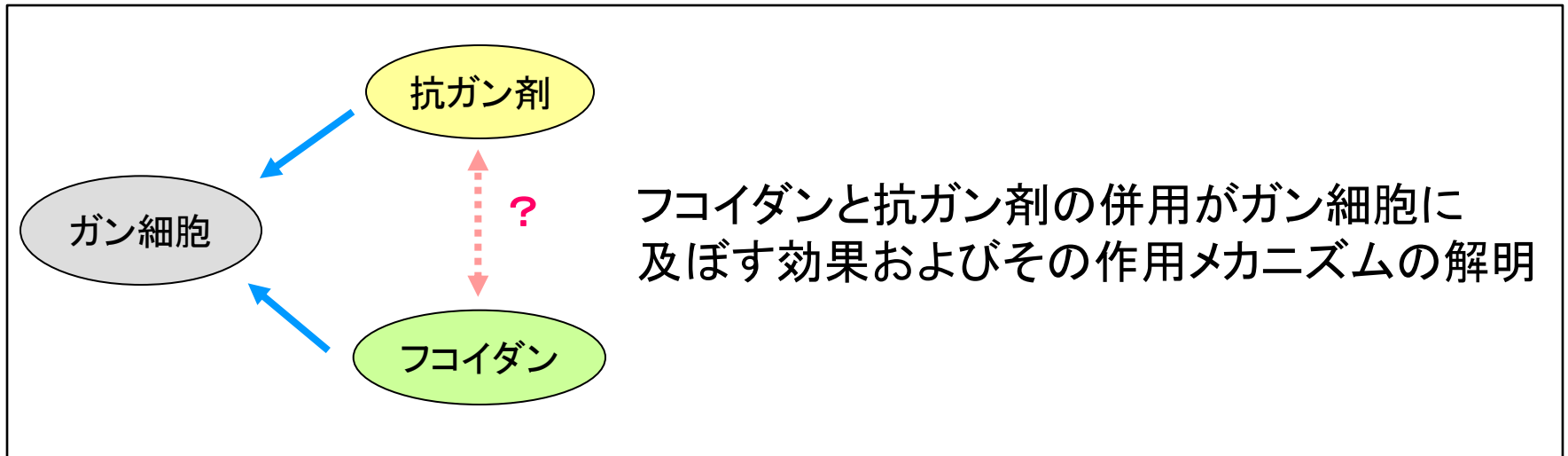
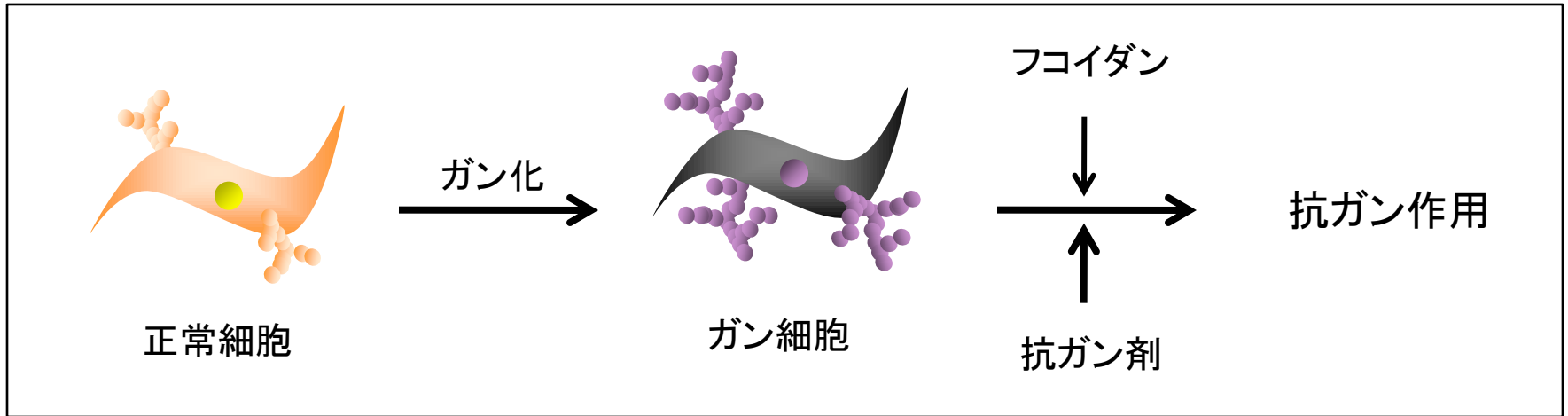
酵素消化低分子フコイダン抽出物と 抗ガン剤併用による抗腫瘍効果の増強

FEとCon Aによる細胞死誘導増強効果

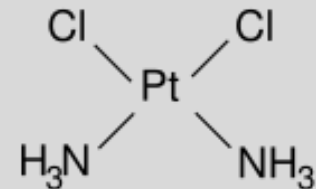


FE処理濃度依存細胞死誘導効果の増加を確認
FE処理24時間以降に細胞死誘導増強効果を確認

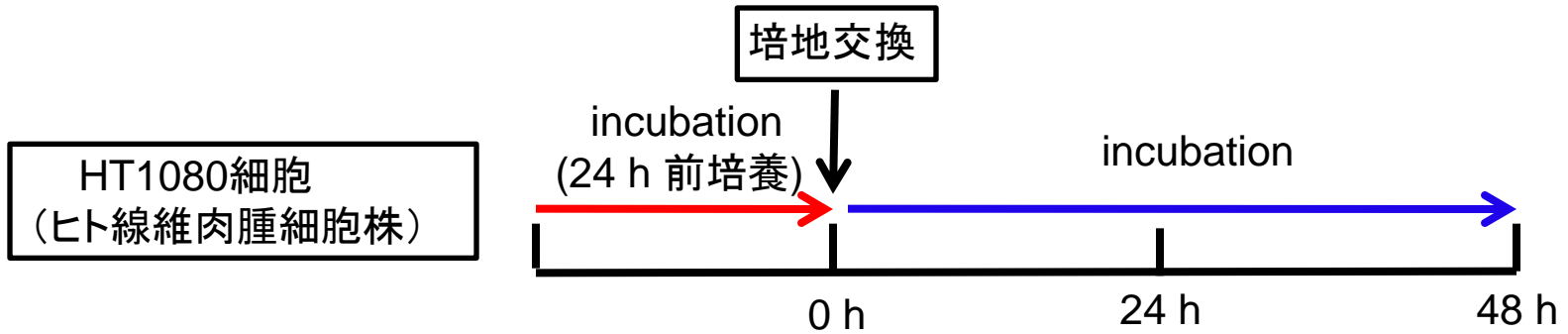
目的



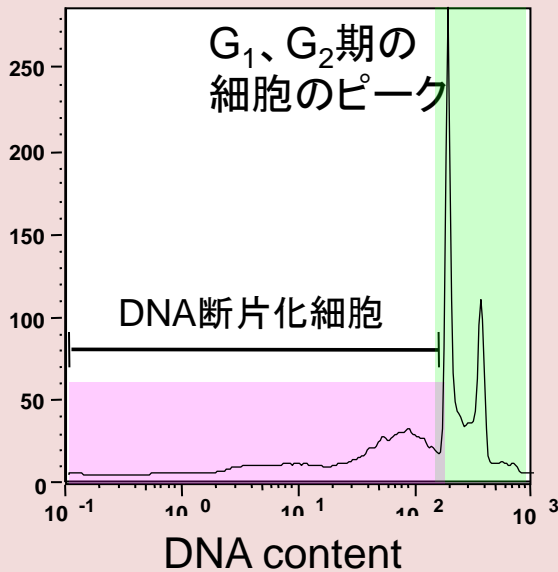
cisplatin(CDDP) : 腫瘍細胞のDNA合成阻害
および細胞分裂を阻害



実験条件



Sub-G1 assay



EtOH 固定



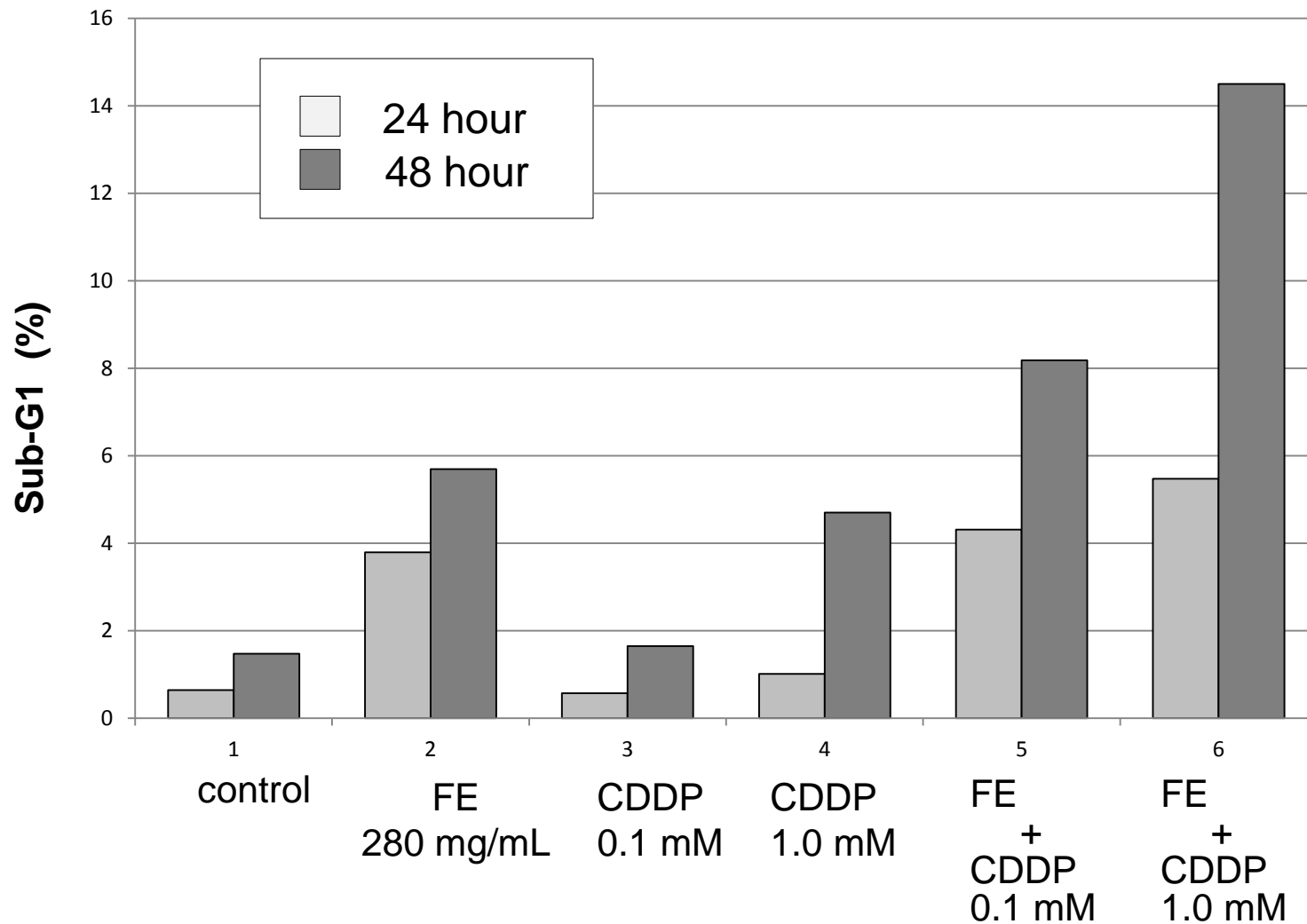
PI染色



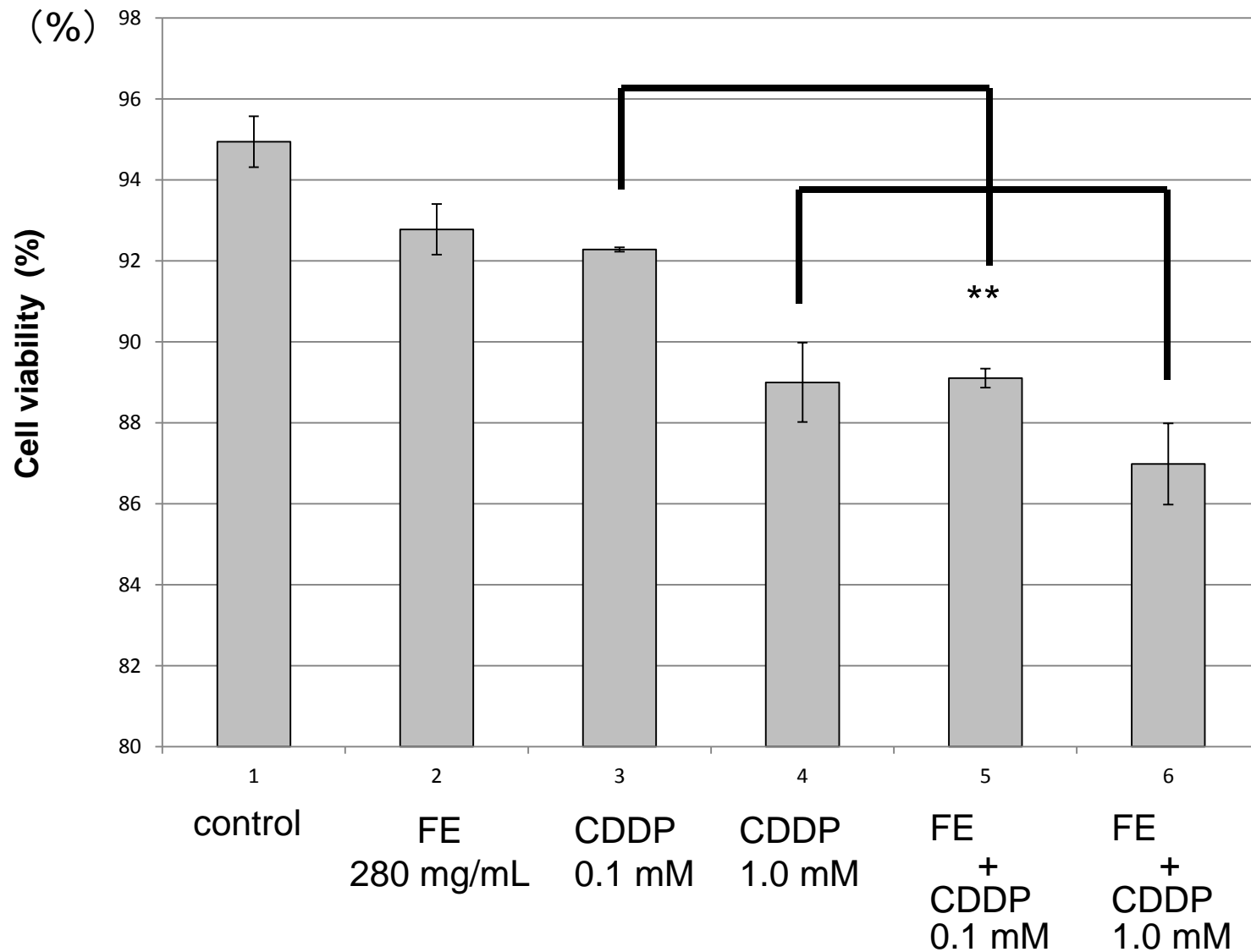
二重らせん構造にintercalation

Trypanblue staining

濃青色の色素でタンパク質に強く結合。
死細胞は損傷により膜の透過性が高く
細胞内に入り込み、全体を青く染色



FEとCDDPの併用による処理濃度および処理時間依存のSub-G1細胞割合の増加を確認



FEとCDDPの併用による濃度依存細胞生存率の低下を確認

総括

- ・FEとCDDPの併用による処理濃度および処理時間依存の細胞死誘導の増強を確認
- ・FEとCDDPの併用による濃度依存細胞生存率の低下を確認

併用により、CDDPの使用量を減少させる事が出来る
つまり、FEによるCDDPの副作用の軽減の可能性が示唆された。