

低分子化フコイダンの抗腫瘍効果に関する 最新研究

平成25年2月23日

九州大学大学院農学研究院生命機能科学部門
システム生物学講座細胞制御工学分野
白畑實隆

現在のガンの治療とその課題

- 外科的療法

再発や免疫力低下の可能性、進行度合いによる限界

- 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医療

治療の効果を増強させることが狙い

しかし...有効性や作用メカニズムが十分明らかになっていない

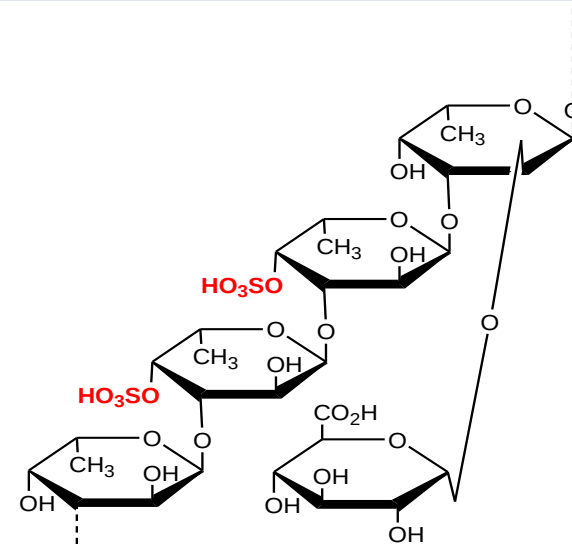
酵素消化低分子化フコイダン抽出物の
細胞表面糖鎖構造変化を伴う
ガン細胞死誘導効果

フコイダン

ワカメ、コンブ、モズクなどの褐藻類から抽出される硫酸化多糖の一種。主にL-フコースが α 1-3結合で数十から数十万個も結合した化合物で、平均分子量は約 200,000~300,000。



フコイダン (Fucoidan)



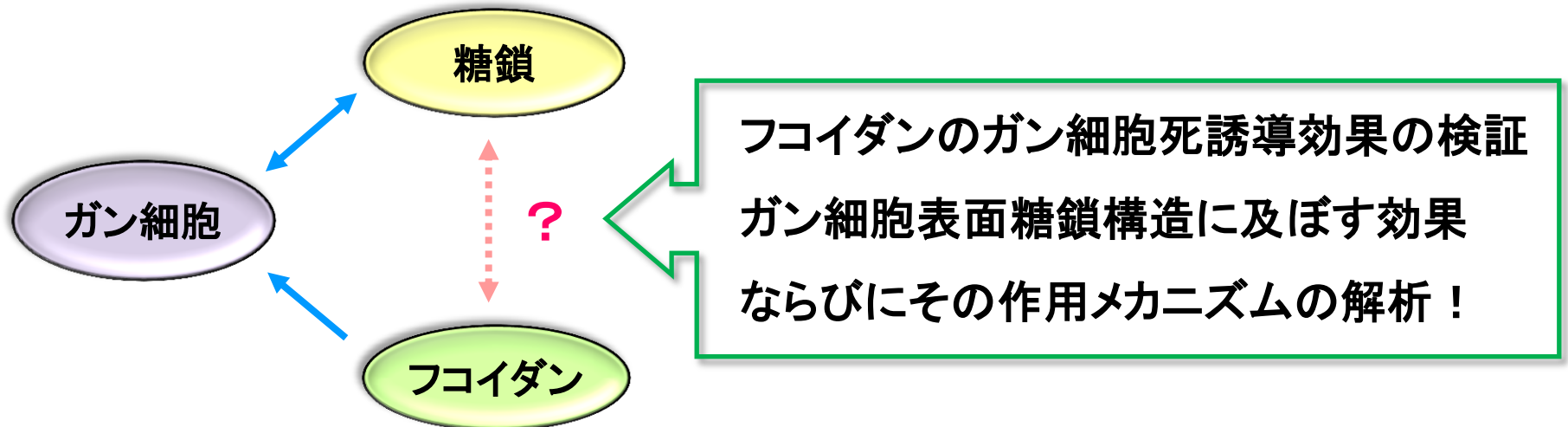
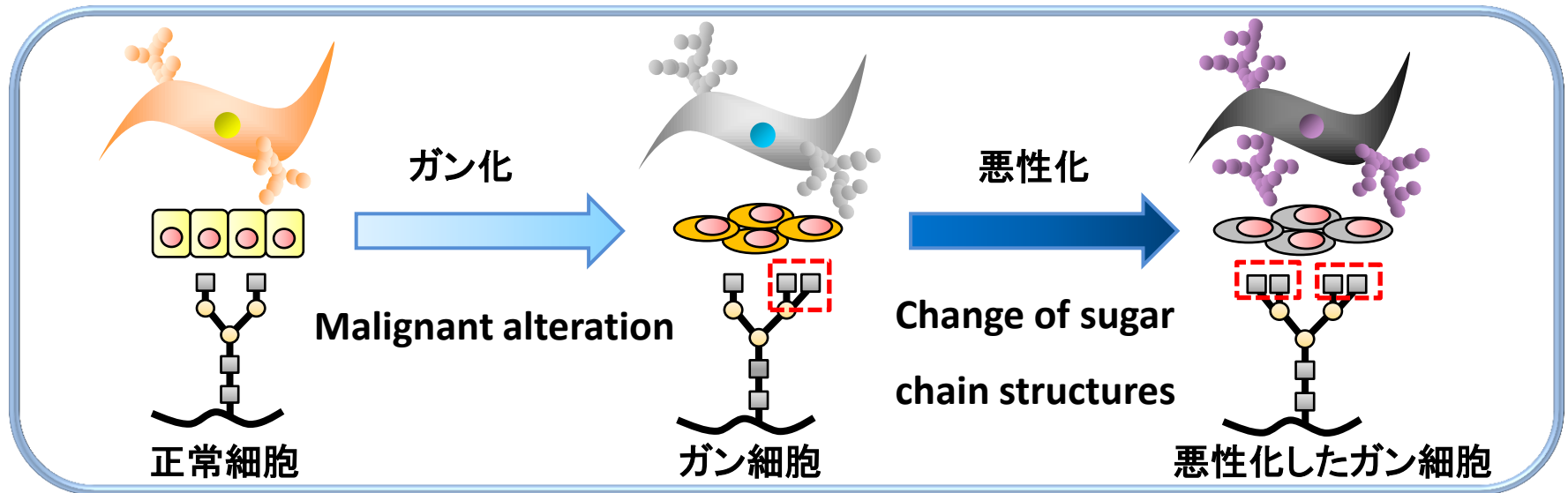
フコイダンの基本構造

フコイダンによる主な抗腫瘍効果

- ・アポトーシス誘導作用
- ・免疫賦活作用
- ・血管新生抑制作用

目的

ガン化・ガン細胞の悪性化に伴い糖鎖発現あるいは糖鎖構造が変化することが報告されている



酵素消化低分子フコイダン抽出物



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

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 (分子量：約20万~30万)



グリコシダーゼ処理

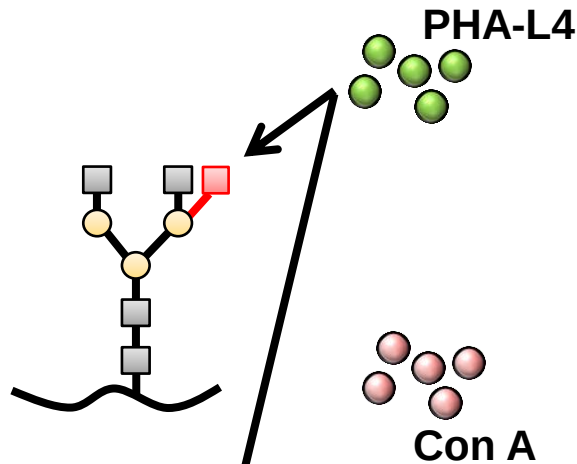
酵素消化低分子化フコイダン抽出物 (分子量：約500)
(Fucoidan Extract : **FE**)

Components

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

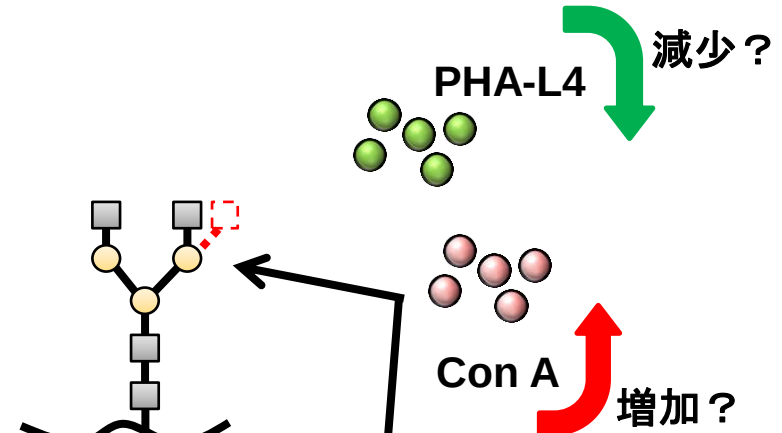
糖鎖の分岐度の評価

高度な分岐構造(悪性)

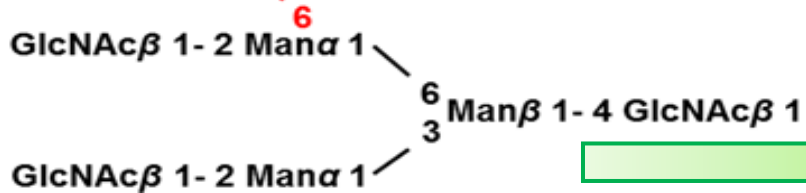


FE処理

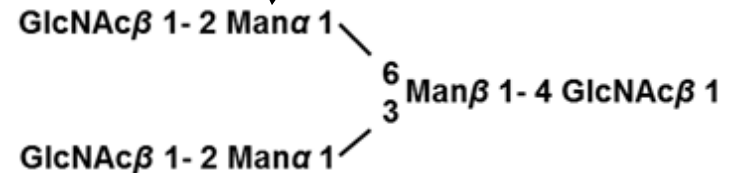
分岐構造の減少?



GlcNAc β 1



FE処理



- : Mannose
- : N-acetylglucosamine
- : β -1,6-GlcNAc

FEの各種ガン細胞への細胞死誘導効果の検証

使用した細胞

- ・ヒト線維肉腫由来細胞株HT1080
- ・ヒト肺腺ガン由来細胞株A549
- ・正常ヒト線維芽細胞TIG-1



2×10^4 cells/mlで播種

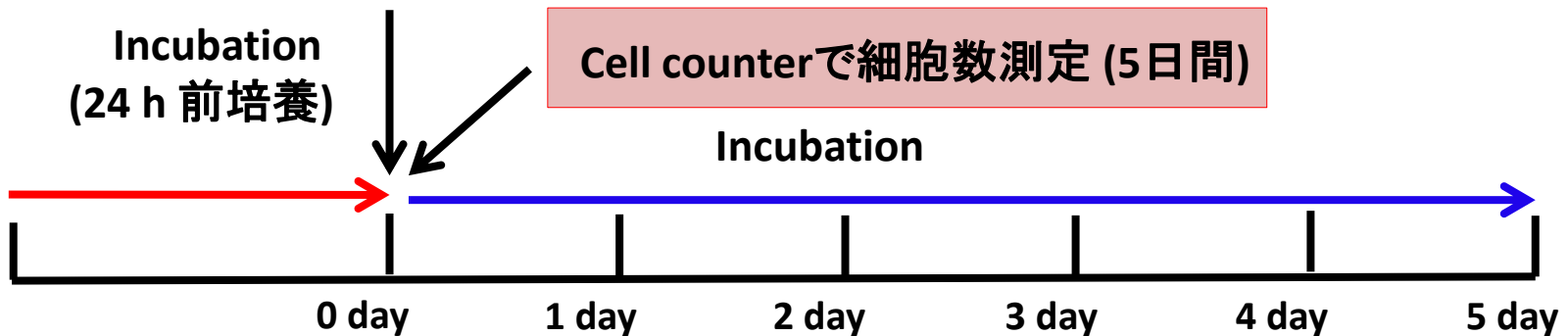
実験方法

各濃度FE 添加MEM培地と交換

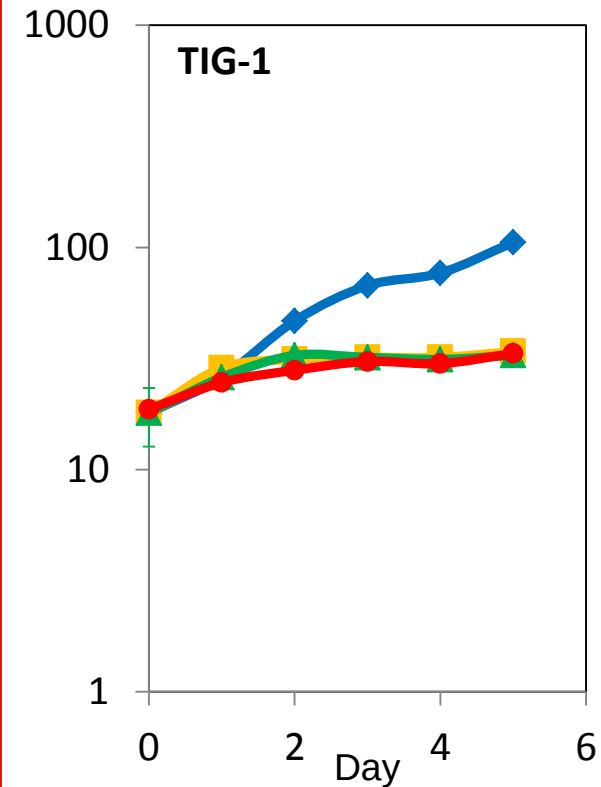
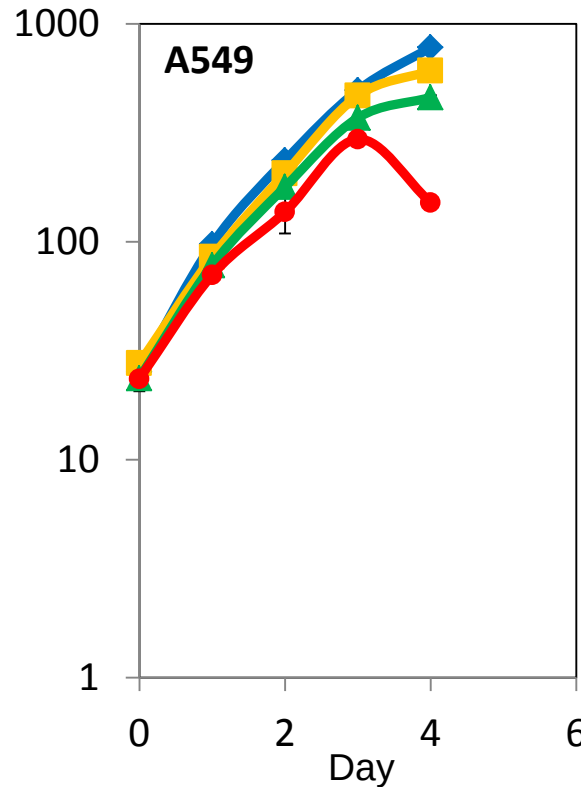
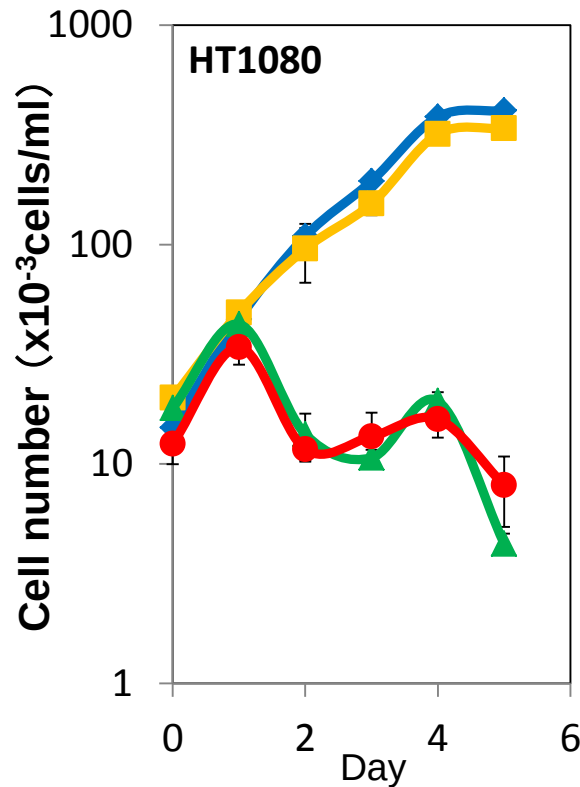
Incubation
(24 h 前培養)

Cell counterで細胞数測定 (5日間)

Incubation



FEのガン細胞死誘導効果



Cancer cells

Normal cells

- Control (PBS)
- FE (0.2 mg/ml)
- FE (0.5 mg/ml)
- FE (0.8 mg/ml)

FE処理による、ガン細胞への細胞死誘導効果が確認された。
正常細胞においては、多少増殖が抑えられるものの、
細胞数の減少は確認されなかった。

FEによる細胞表面糖鎖構造変化の解析

実験方法

使用した細胞

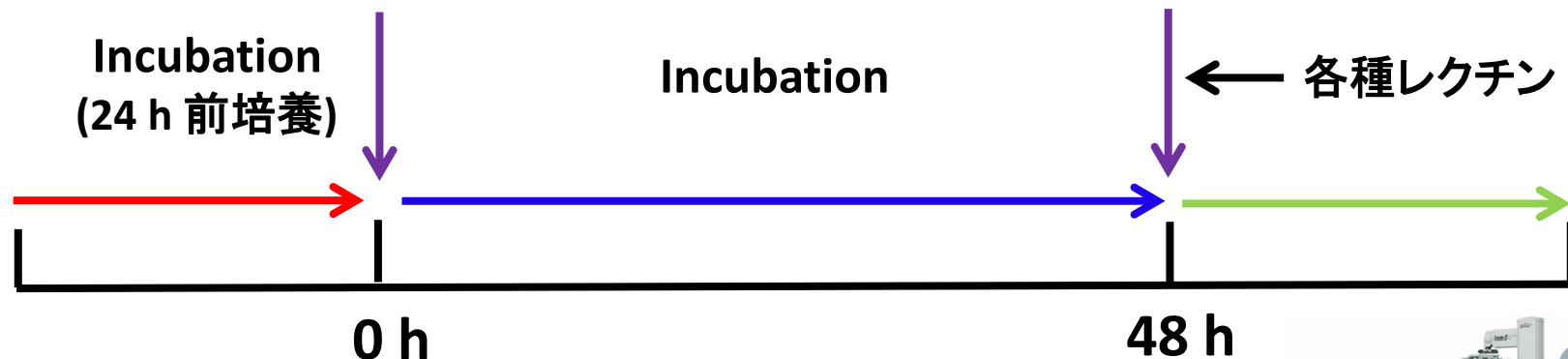
- ・ヒト線維肉腫由来細胞株HT1080
- ・ヒト肺腺ガン由来細胞株A549
- ・正常ヒト線維芽細胞TIG-1

IN Cell Analyzer 1000測定で用いた蛍光試薬

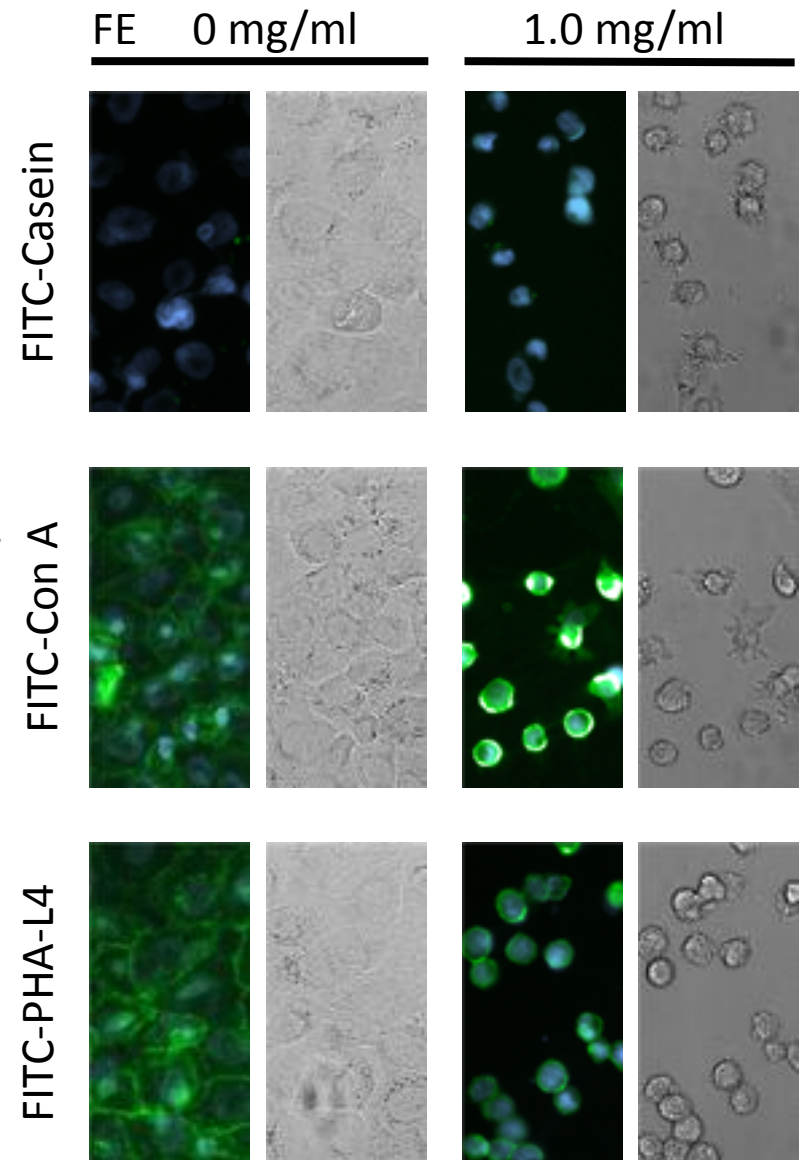
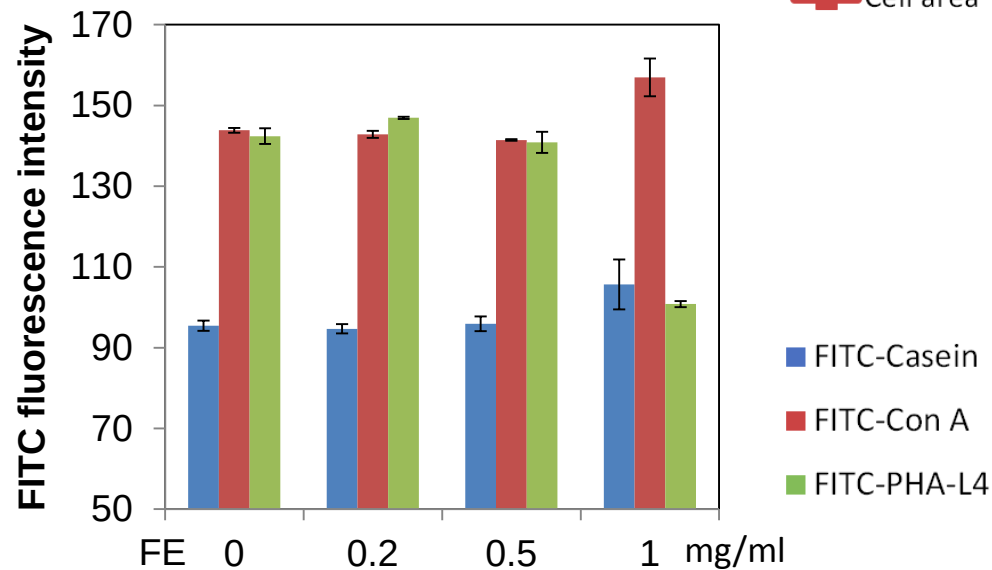
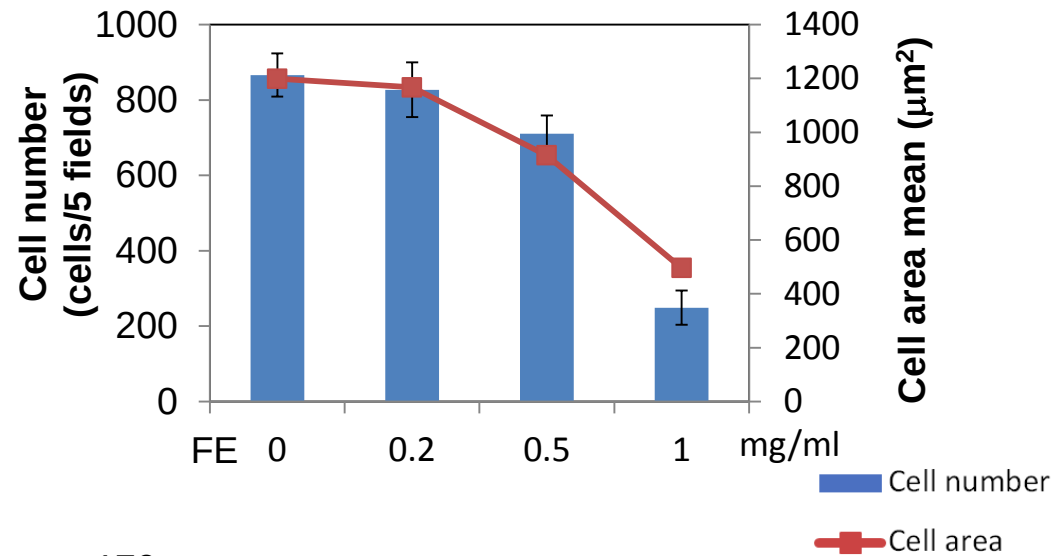
- Hoechst 33342 solution
- FITC-Casein (Control)
- FITC-Con A
- FITC-PHA-L4

各濃度FE 添加MEM培地と交換

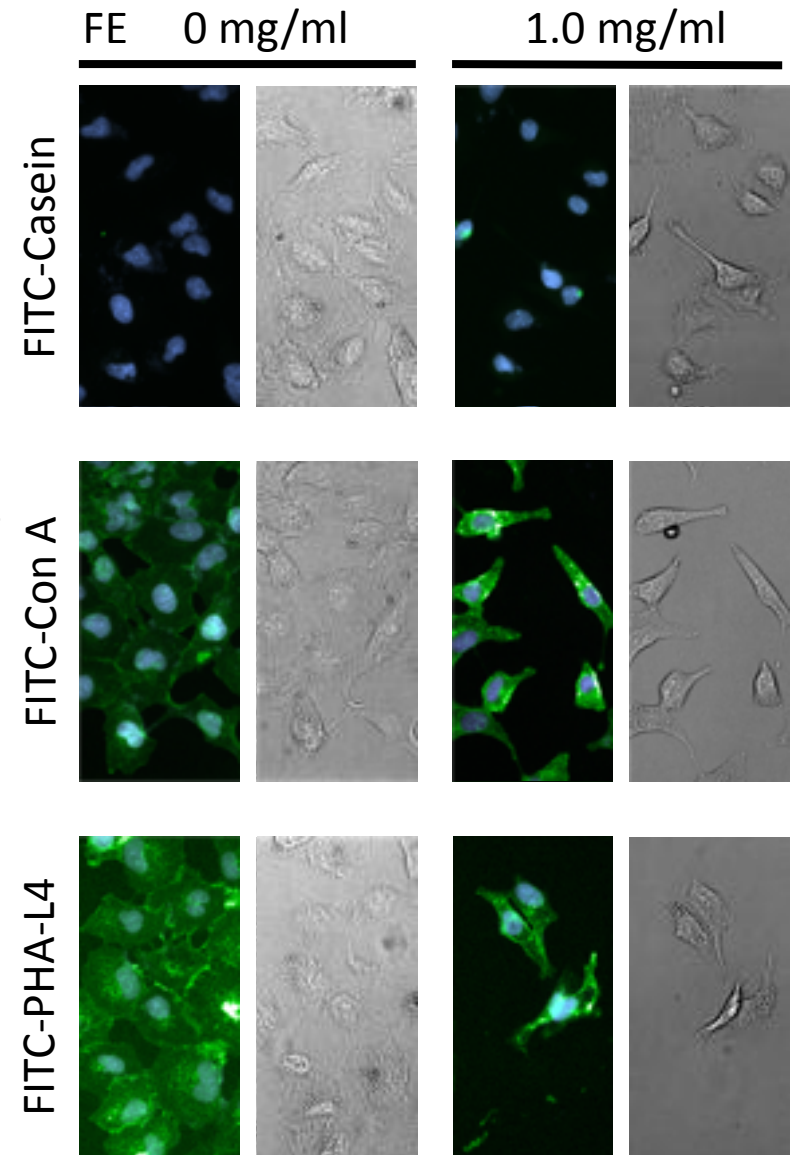
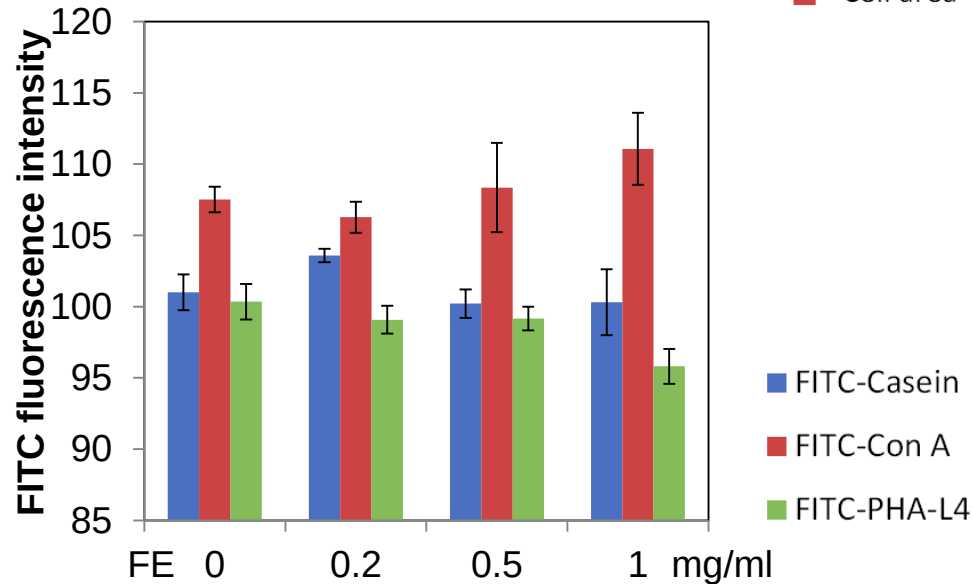
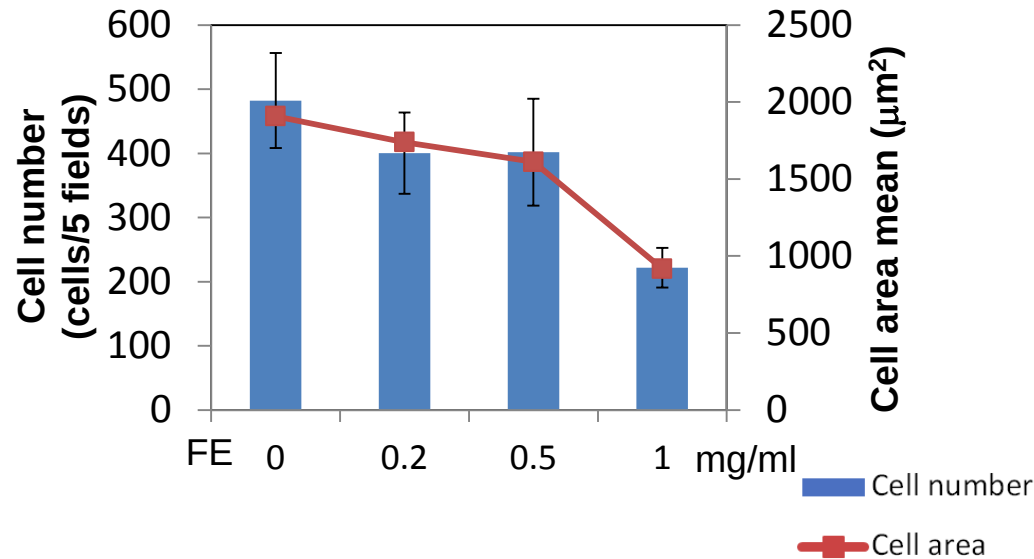
IN Cell Analyzer 1000測定



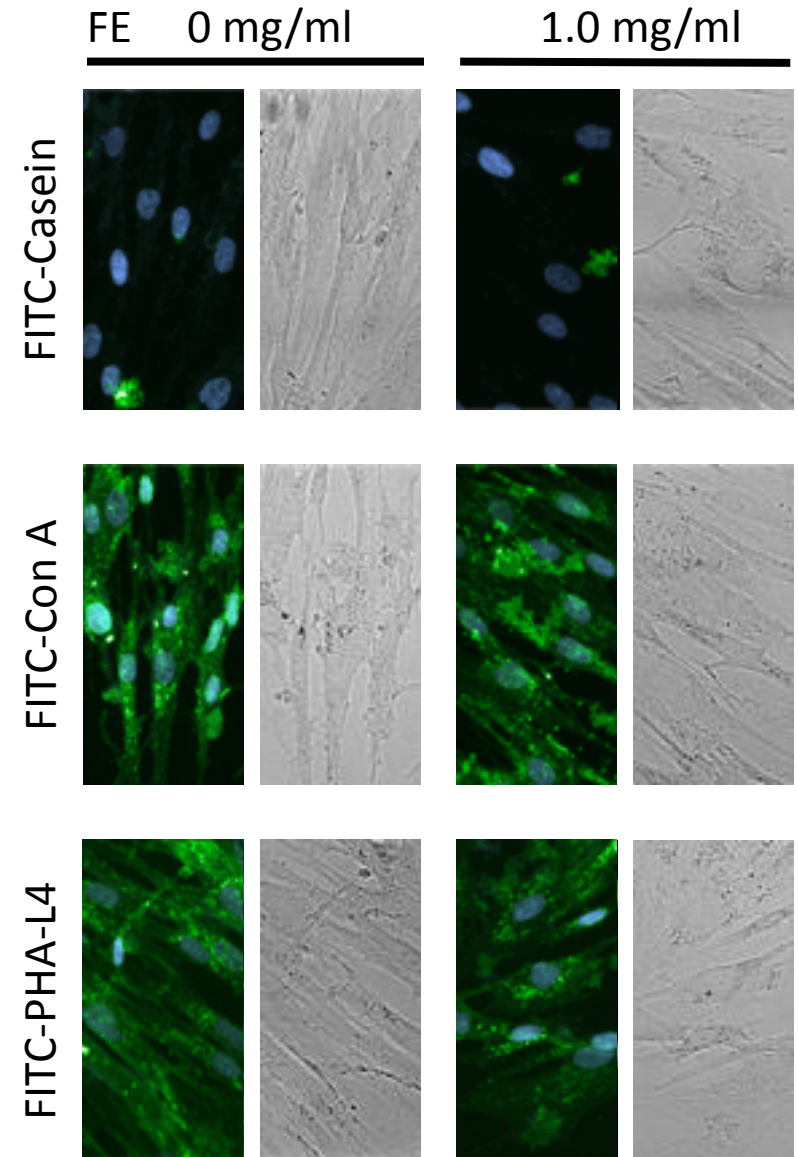
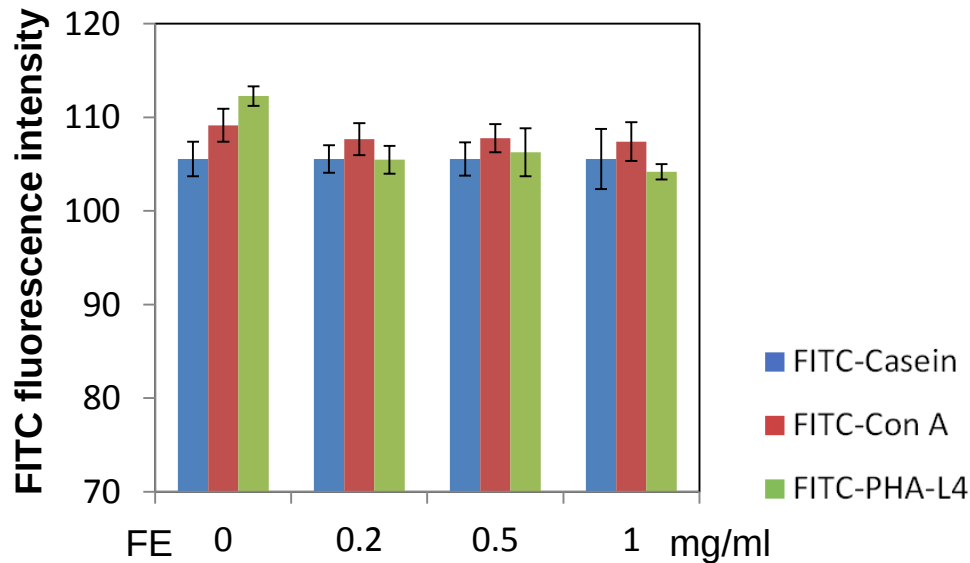
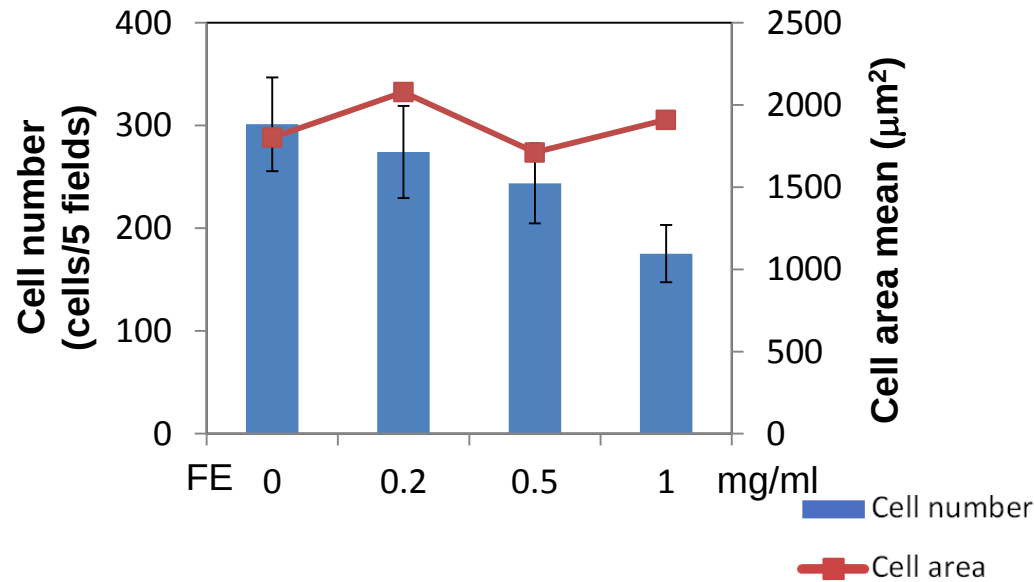
FEによるHT1080細胞の細胞表面糖鎖構造変化



FEによるA549細胞の細胞表面糖鎖構造変化



FEによる正常細胞TIG-1の細胞表面糖鎖構造変化



FEによる細胞タンパク質糖鎖構造変化の解析

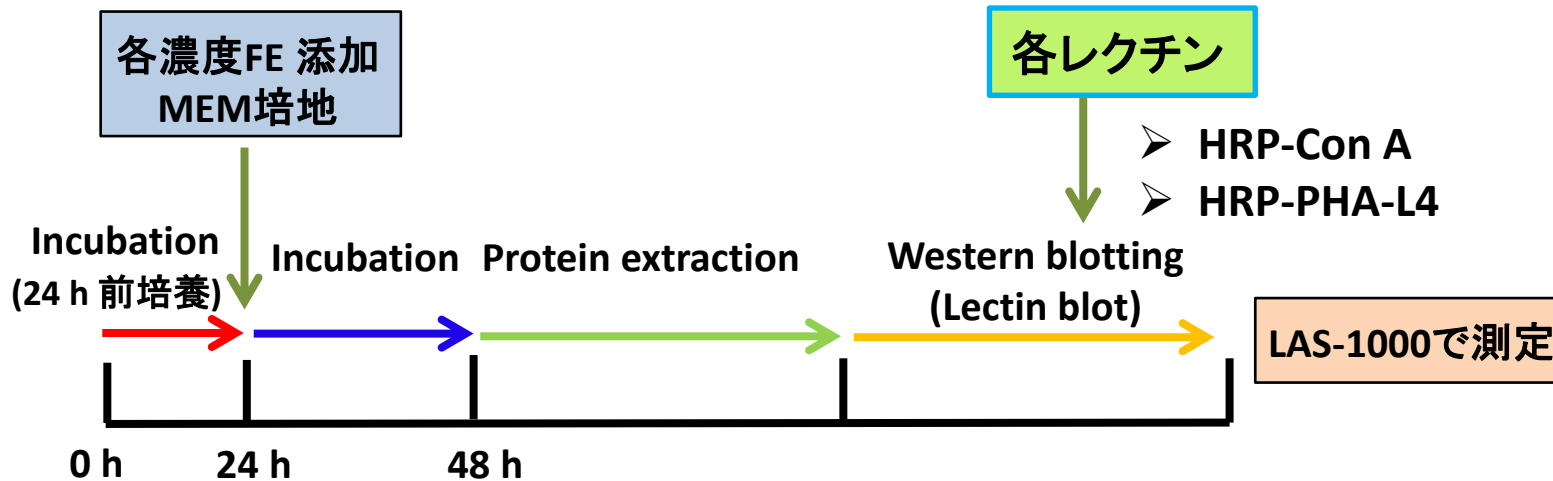
実験方法

使用した細胞

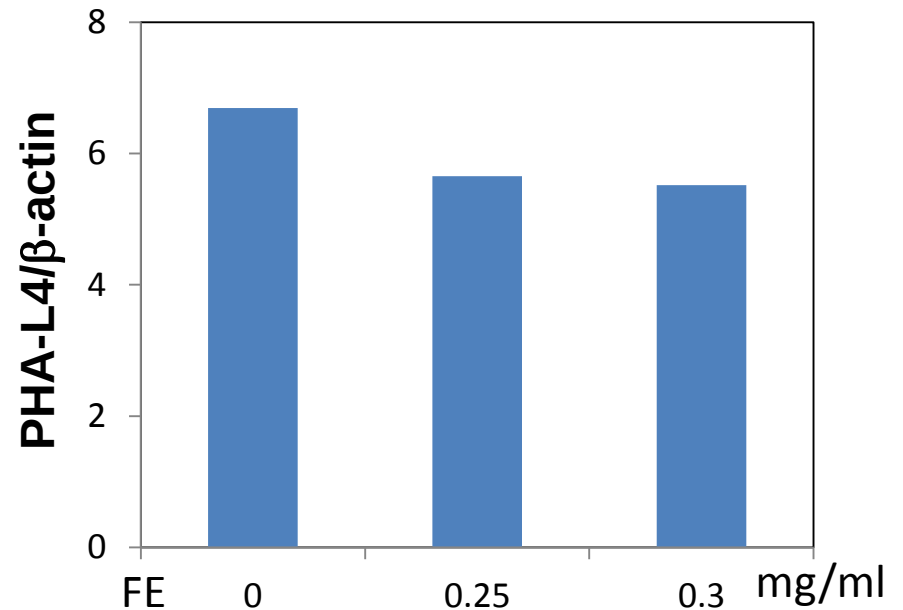
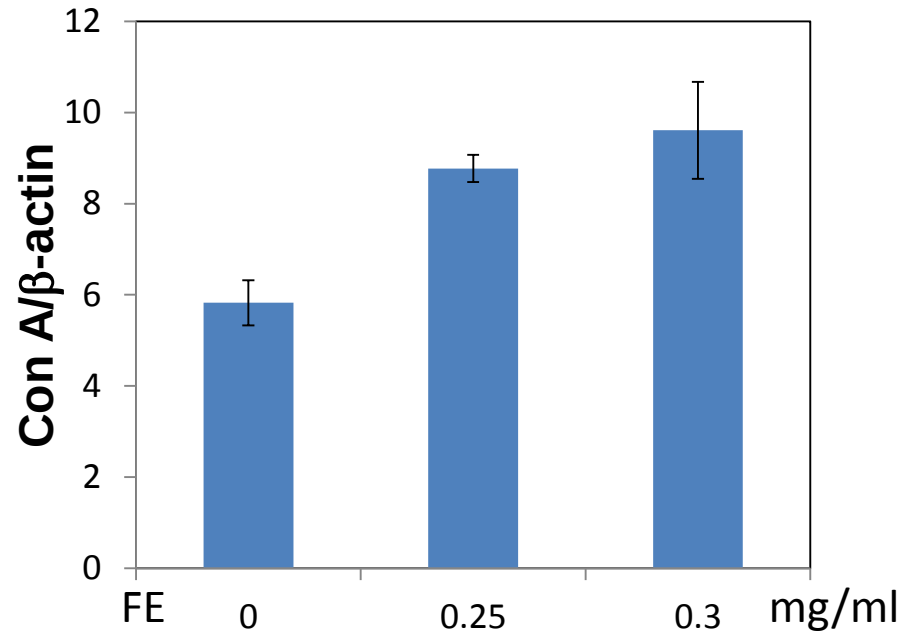
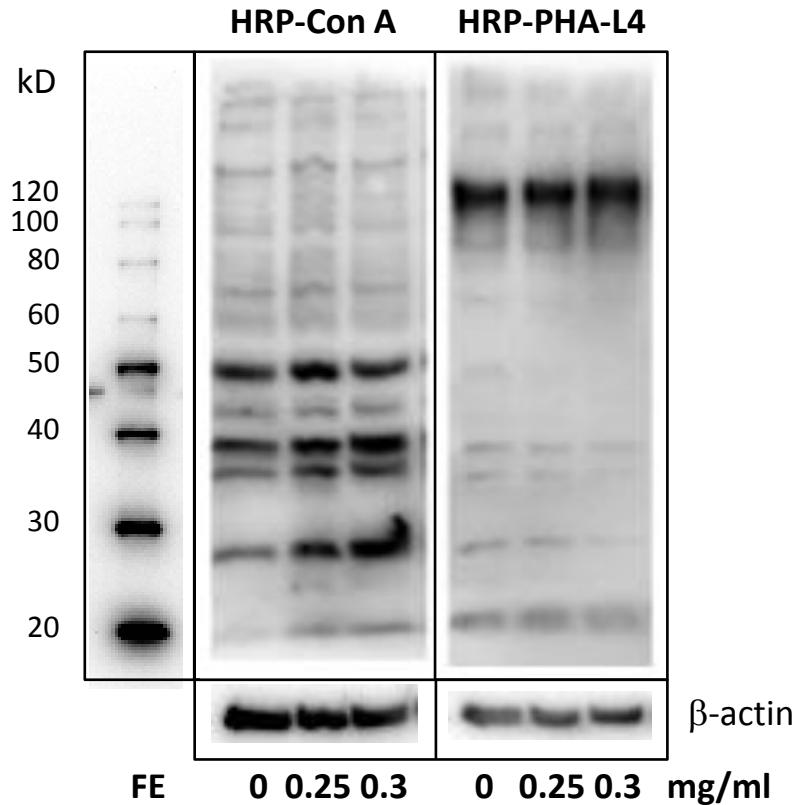
- ・ヒト線維肉腫由来細胞株HT1080
- ・ヒト肺腺ガン由来細胞株A549
- ・正常ヒト線維芽細胞TIG-1

生育に影響の出ない最大濃度

- ・・・0.2-0.3 mg/ml
- ・・・0.5 mg/ml
- ・・・0.5 mg/ml

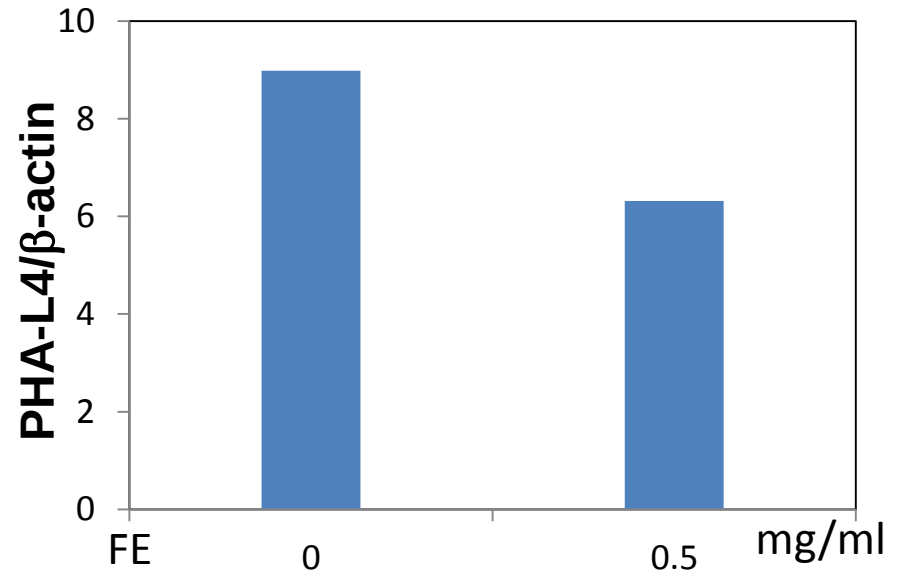
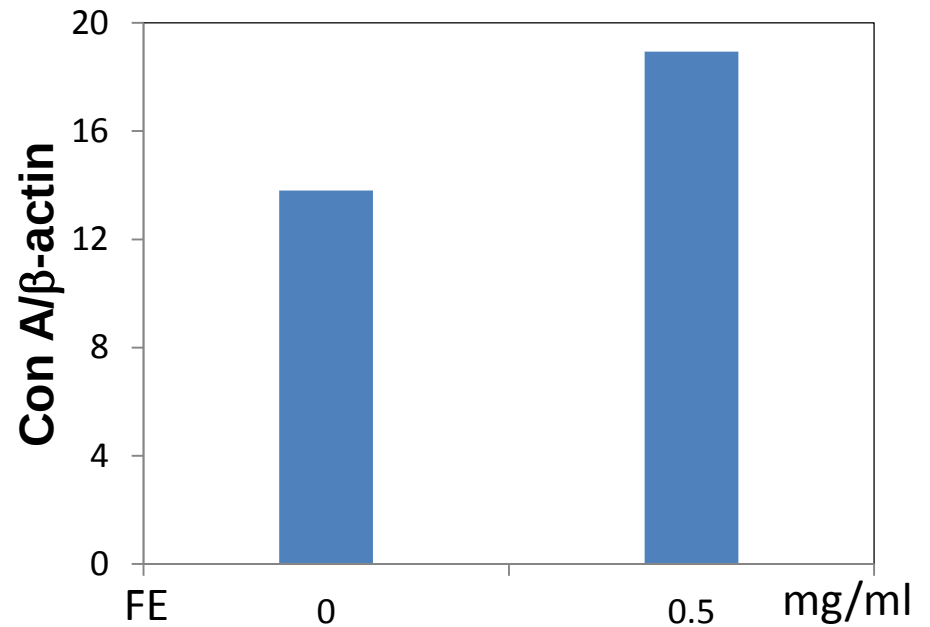
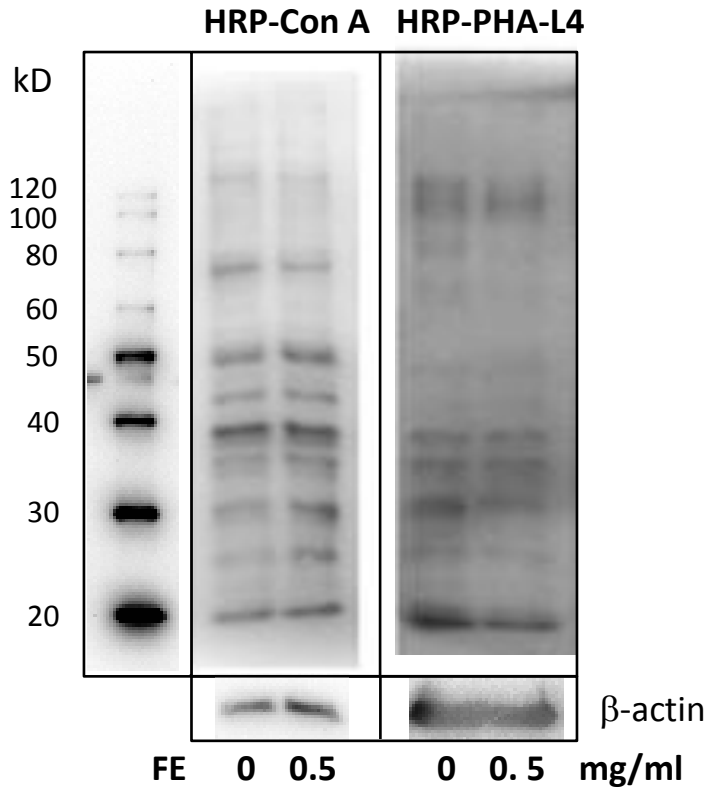


HT1080細胞のタンパク質糖鎖構造変化



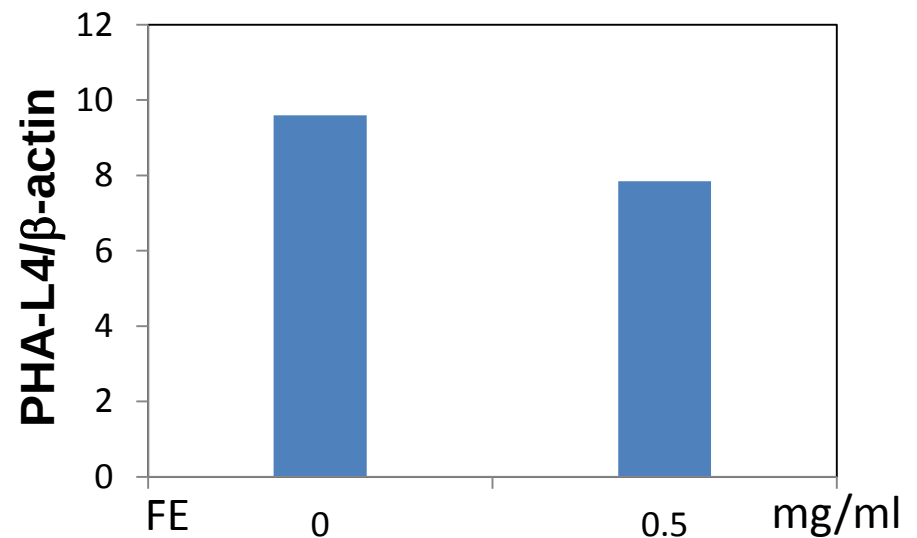
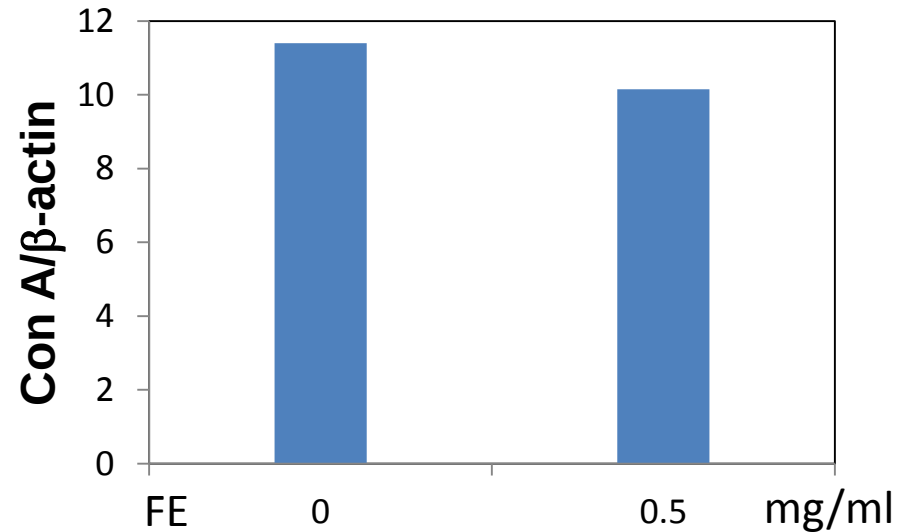
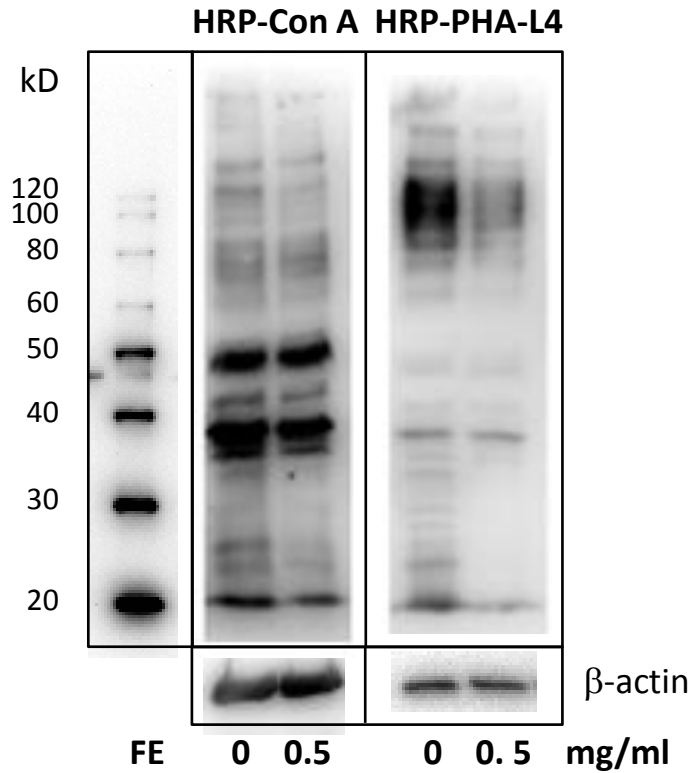
FE処理によって
濃度依存的にCon Aの結合が増
加し、PHA-L4の結合が減少する
傾向を示した。

A549細胞のタンパク質糖鎖構造変化



FE処理によって
Con Aの結合が増加する傾向を
示し、PHA-L4の結合が減少する
傾向を示した。

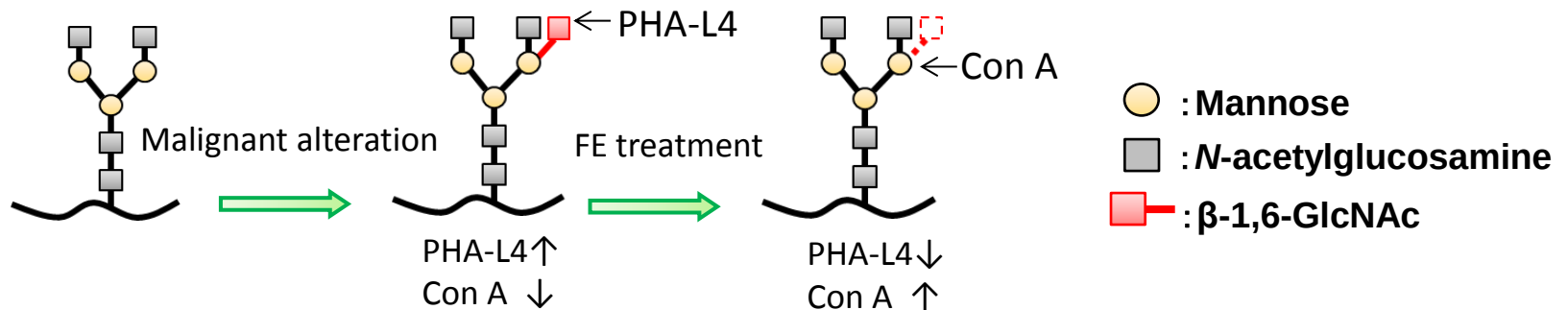
正常細胞TIG-1のタンパク質糖鎖構造変化



FE処理によって
Con A及びPHA-L4の結合が
減少する傾向を示した。

総括

- FEはガン細胞に細胞死を誘導する。
正常細胞では、増殖は抑制するが細胞死までは誘導しない。
- FE処理によって、ガン細胞のCon A結合型糖鎖の発現の増加、及びPHA-L4結合型糖鎖の発現の減少傾向が確認された。
➡ FEにより、細胞表面糖鎖のN-型糖鎖の分岐が減少したことで、マンノースが露出したことを示している。
- 正常細胞では、FE処理による糖鎖発現の傾向はガン細胞のものとは異なる。
➡ FEによる一連の細胞表面糖鎖構造の変化は、ガン細胞において見られる。



酵素消化低分子化フコイダン抽出物と抗ガン剤 との併用による抗腫瘍作用増強効果

実験に用いている抗ガン剤について

カルボプラチン(CBDCA)

⇒抗腫瘍効果のメカニズムはシスプラチンとほぼ同じで、ガン細胞の2本のDNA鎖と結合することで、DNAの複製を阻害して、ガン細胞を死滅させる。

パクリタキセル(PAC)

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

5-フルオロウラシル(5-FU)

⇒細胞が分裂、増殖する際に必要な代謝物質の代わりにガン細胞に取り込まれることで、そのDNAの合成を阻害するという特徴を持つ。

目 的

- 抗ガン剤とFE併用による抗腫瘍作用増強効果の検討
- FEによる抗ガン剤由来細胞死からの正常細胞保護効果検討

実験方法

A549細胞(ヒト肺腺ガン細胞)、TIG-1細胞(ヒト線維芽細胞) 播種

24時間 前培養

FE、抗ガン剤処理

48時間 培養



IN Cell Analyzer 1000

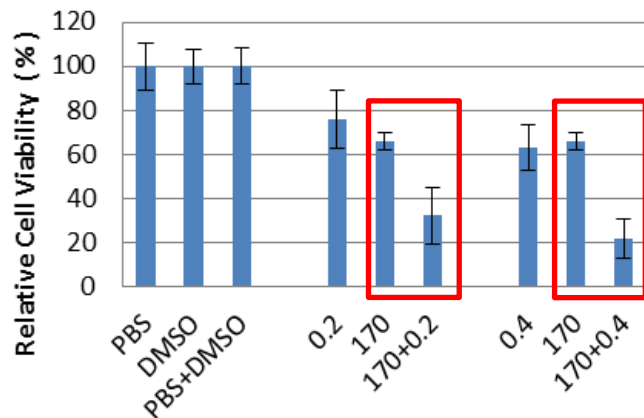
- Hoechst染色後、IN Cell Analyzer 1000を用いて解析
- WST-1染色後、細胞の代謝活性を測定

A549細胞におけるFEの効果(CBDCA)

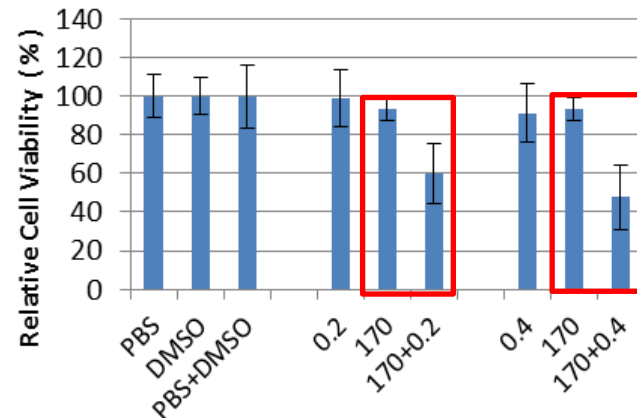
細胞生存率

WST-1

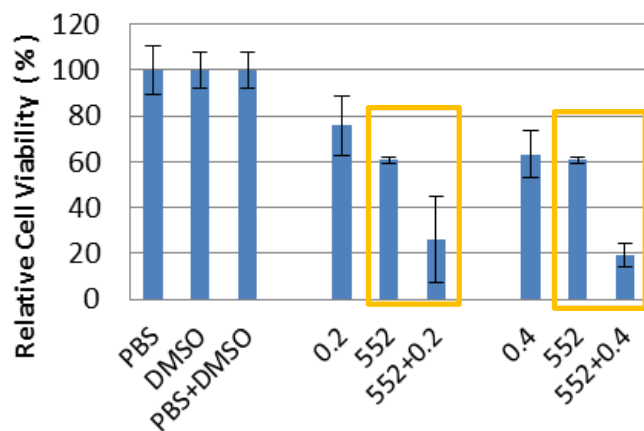
CBDCA (170 $\mu\text{g/ml}$)+FE (0.2, 0.4 mg/ml)



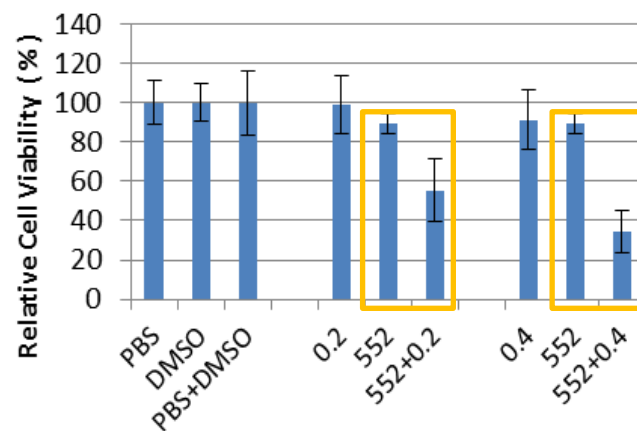
CBDCA (170 $\mu\text{g/ml}$)+FE (0.2, 0.4 mg/ml)



CBDCA (552 $\mu\text{g/ml}$)+FE (0.2, 0.4 mg/ml)



CBDCA (552 $\mu\text{g/ml}$)+FE (0.2, 0.4 mg/ml)

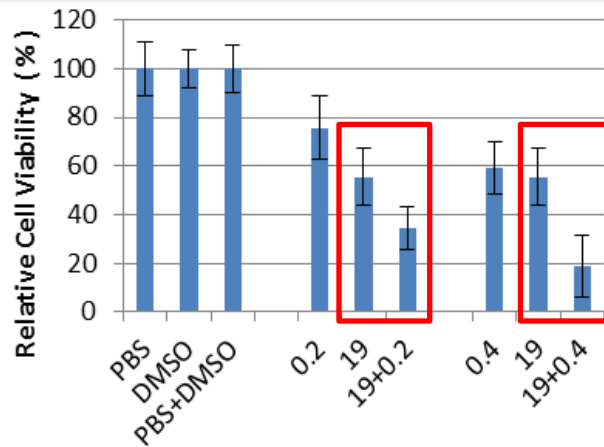


A549細胞におけるFEの効果(5-FU)

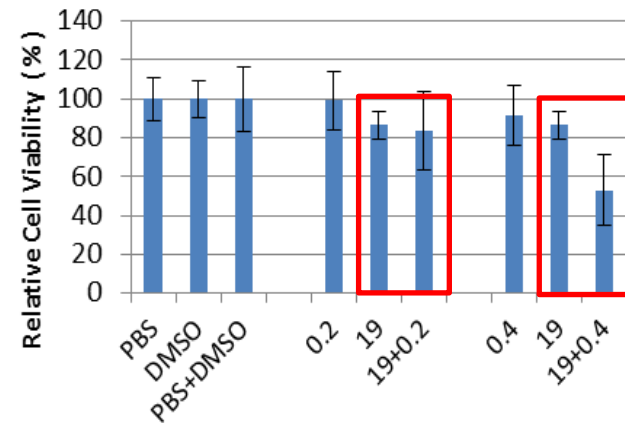
細胞生存率

WST-1

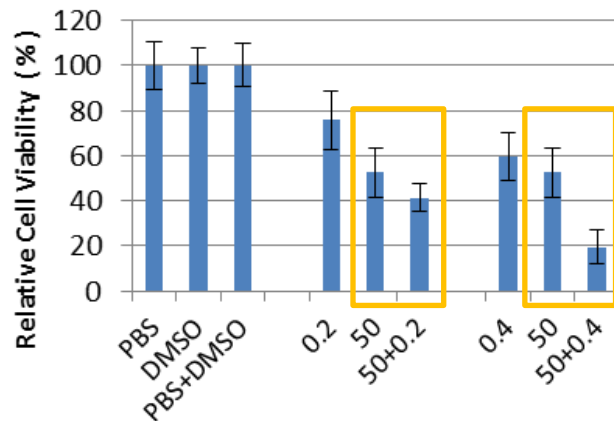
5FU (19 μ g/ml)+FE (0.2, 0.4 mg/ml)



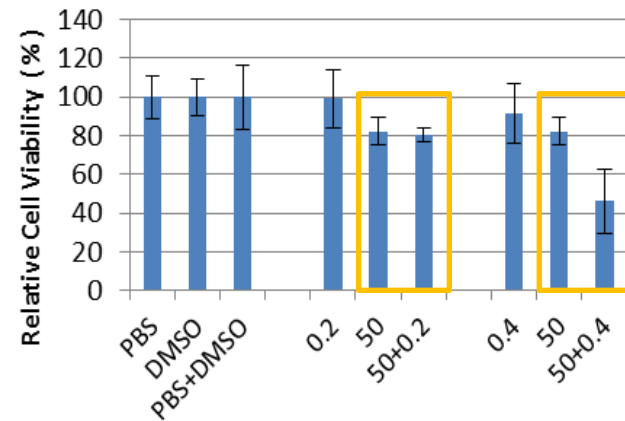
5FU (19 μ g/ml)+FE (0.2, 0.4 mg/ml)



5FU (50 μ g/ml)+FE (0.2, 0.4 mg/ml)



5FU (50 μ g/ml)+FE (0.2, 0.4 mg/ml)

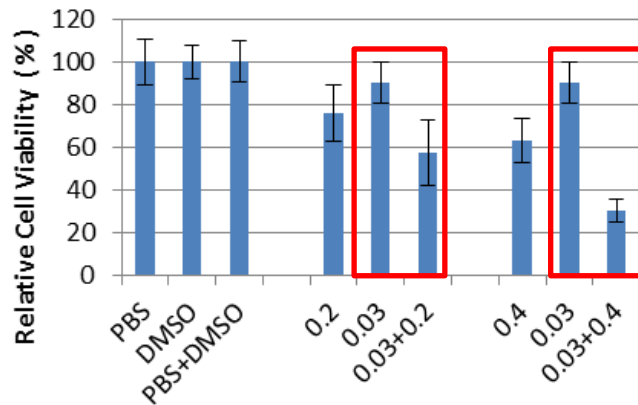


A549細胞におけるFEの効果(PAC)

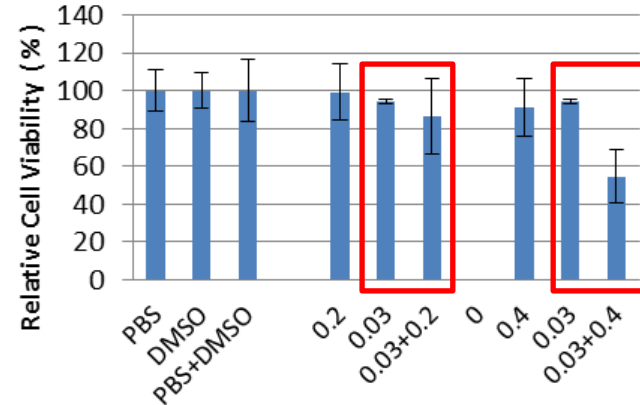
細胞生存率

WST-1

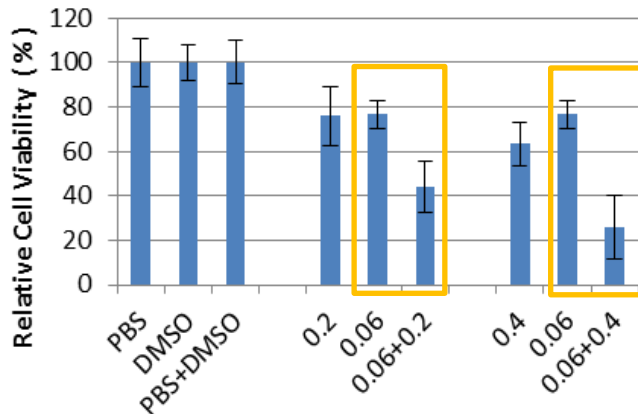
PAC (0.03 $\mu\text{g/ml}$)+FE (0.2, 0.4 mg/ml)



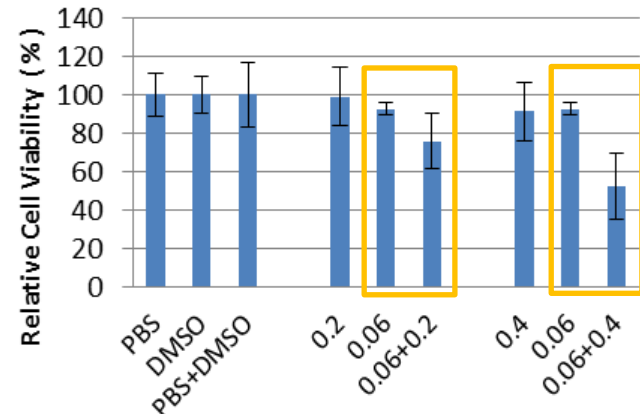
PAC (0.03 $\mu\text{g/ml}$)+FE (0.2, 0.4 mg/ml)



PAC (0.06 $\mu\text{g/ml}$)+FE (0.2, 0.4 mg/ml)



PAC (0.06 $\mu\text{g/ml}$)+FE (0.2, 0.4 mg/ml)

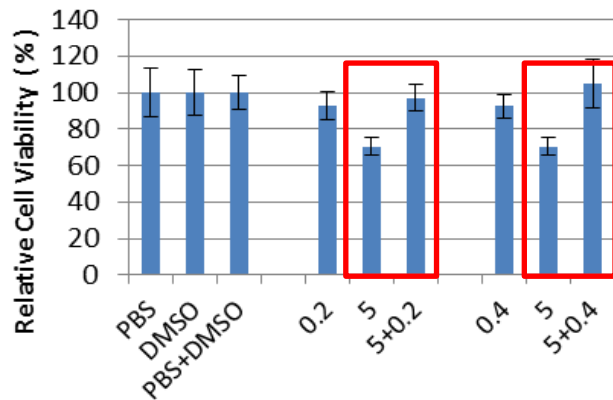


TIG-1細胞におけるFEの効果(CBDCA)

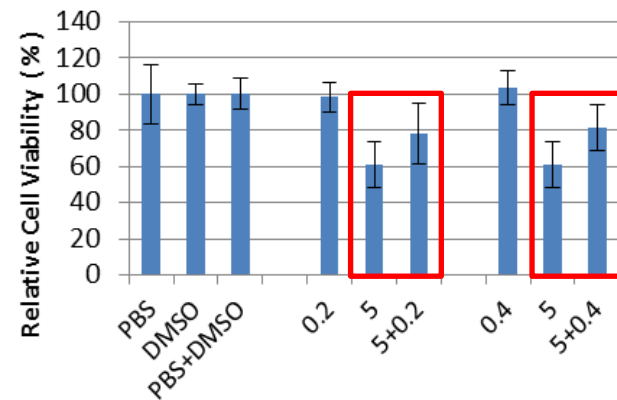
細胞生存率

WST-1

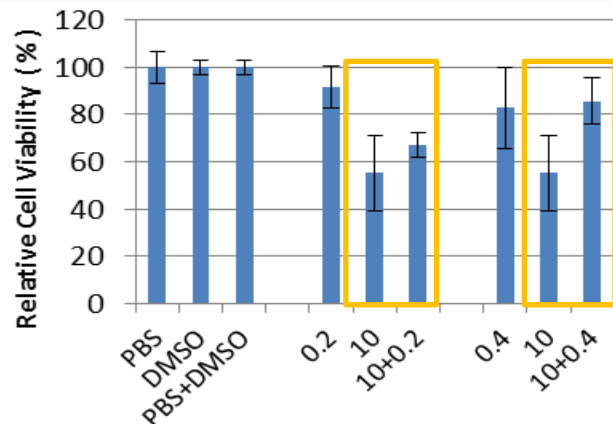
CBDCA (5 mg/ml)+FE (0.2, 0.4 mg/ml)



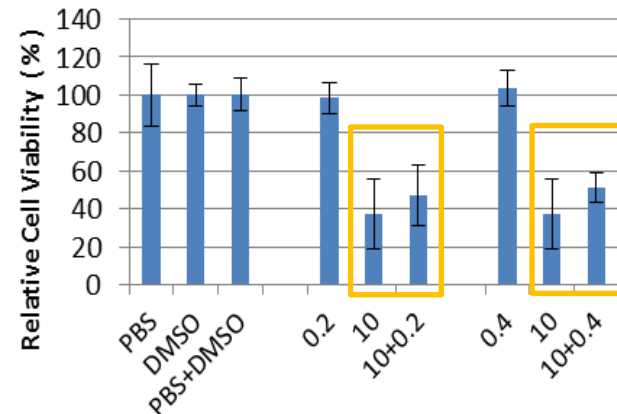
CBDCA (5 mg/ml)+FE (0.2, 0.4 mg/ml)



CBDCA (10 mg/ml)+FE (0.2, 0.4 mg/ml)



CBDCA (10 mg/ml)+FE (0.2, 0.4 mg/ml)

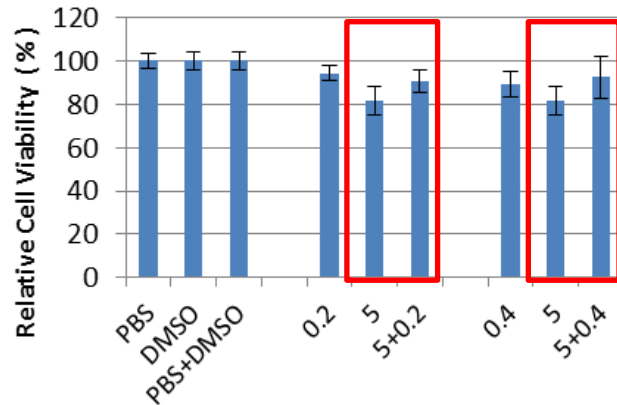


TIG-1細胞におけるFEの効果(5FU)

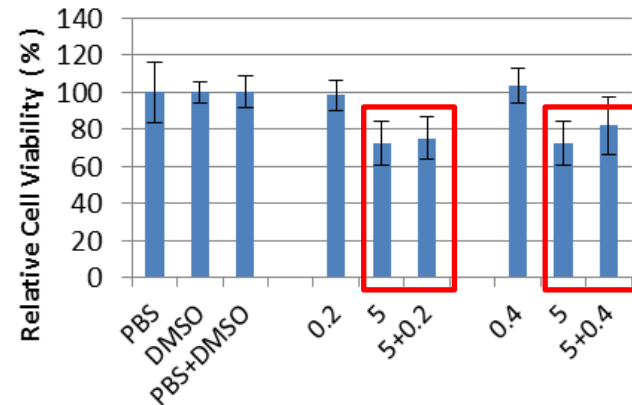
細胞生存率

WST-1

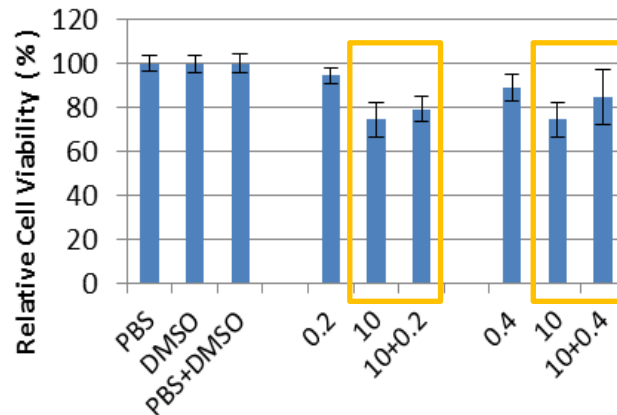
5-FU (5 mg/ml)+FE (0.2, 0.4 mg/ml)



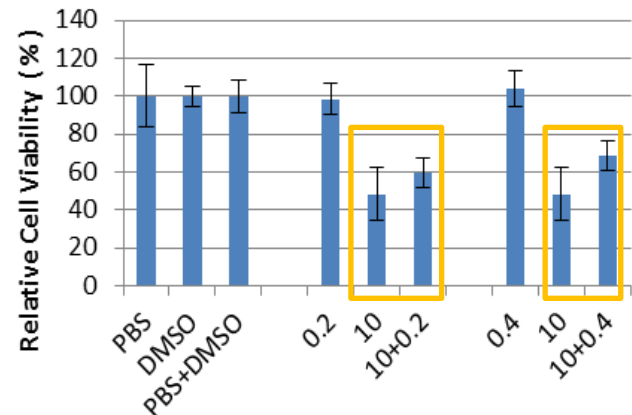
5-FU (5 mg/ml)+FE (0.2, 0.4 mg/ml)



5-FU (10 mg/ml)+FE (0.2, 0.4 mg/ml)



5-FU (10 mg/ml)+FE (0.2, 0.4 mg/ml)

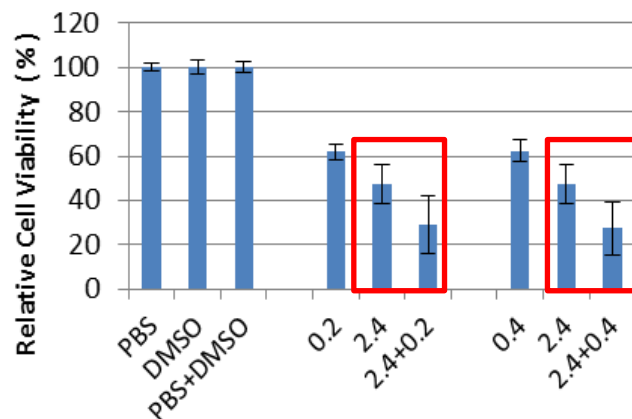


TIG-1細胞におけるFEの効果(PAC)

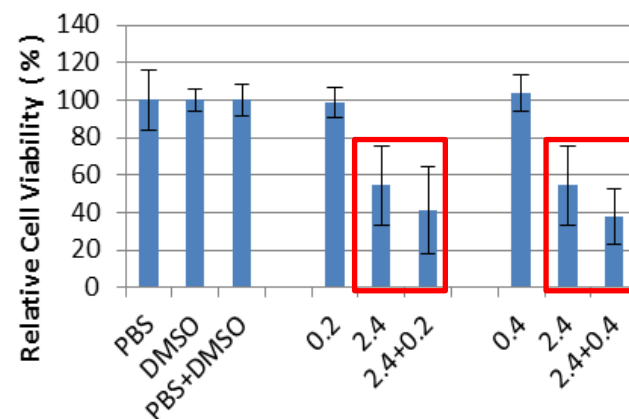
細胞生存率

WST-1

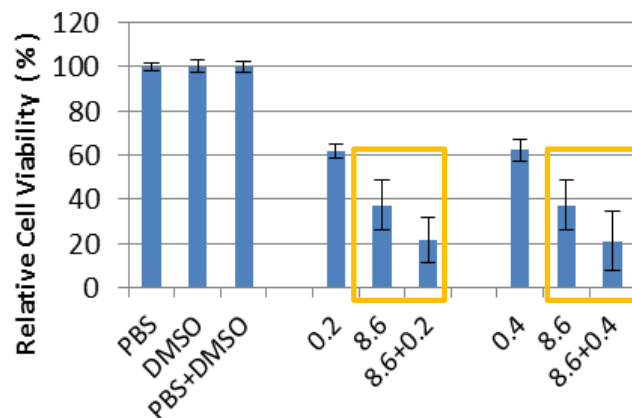
Pac (2.4 $\mu\text{g/ml}$)+FE (0.2, 0.4 mg/ml)



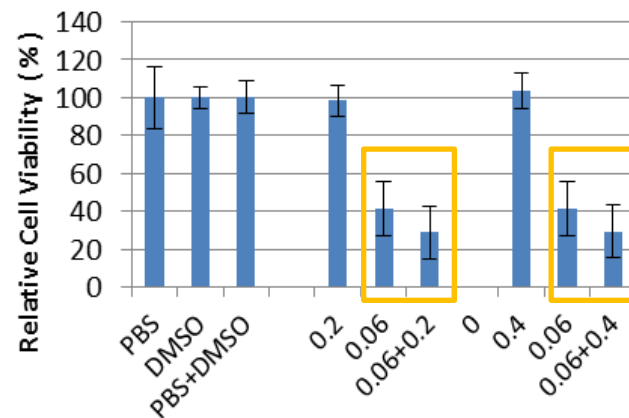
Pac (2.4 $\mu\text{g/ml}$)+FE (0.2, 0.4 mg/ml)



PAC (8.6 $\mu\text{g/ml}$)+FE (0.2, 0.4 mg/ml)



Pac (8.6 $\mu\text{g/ml}$)+FE (0.2, 0.4 mg/ml)



小括

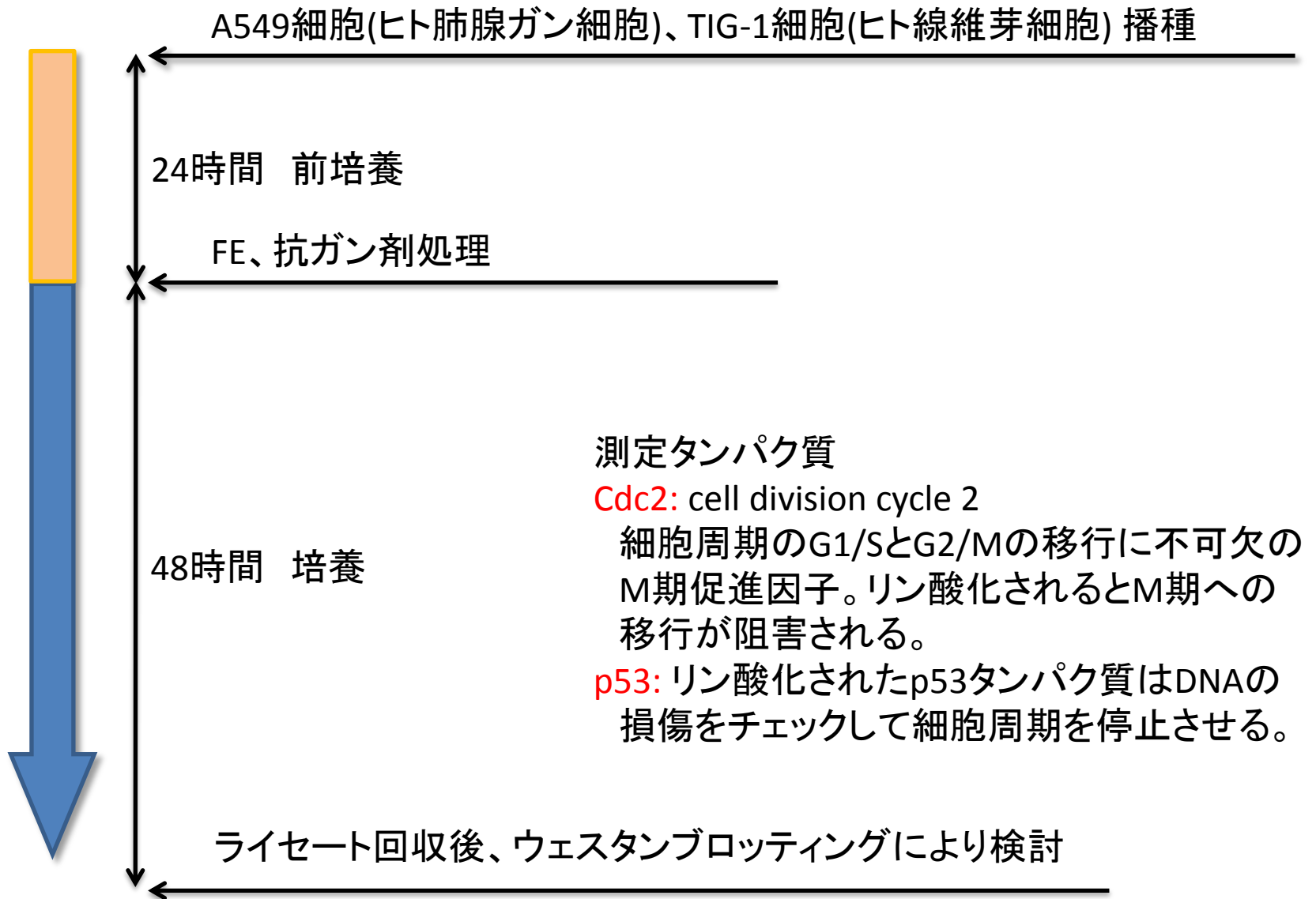
【A549細胞】

FE及び各種抗ガン剤の併用処理においてFE処理濃度(0.2 mg/ml、0.4 mg/ml)依存的に抗腫瘍作用増強効果を確認することができた。

【TIG-1細胞】

- ・FEを併用することにより、CBDCA及び5-FUによる細胞毒性軽減効果を確認することができた。
- ・PACに関しては、FEによる細胞毒性軽減効果は見られず、逆に細胞毒性を強める結果となった。

実験方法



A549細胞における細胞周期関連タンパク質の発現

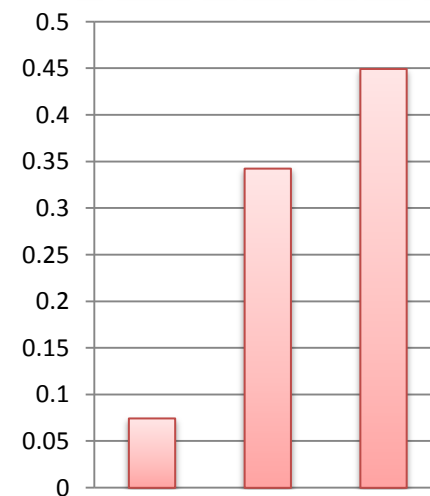
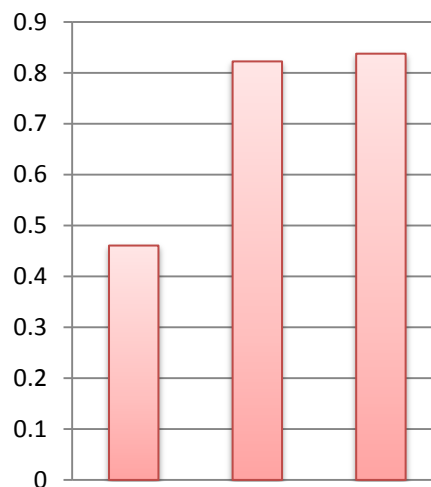
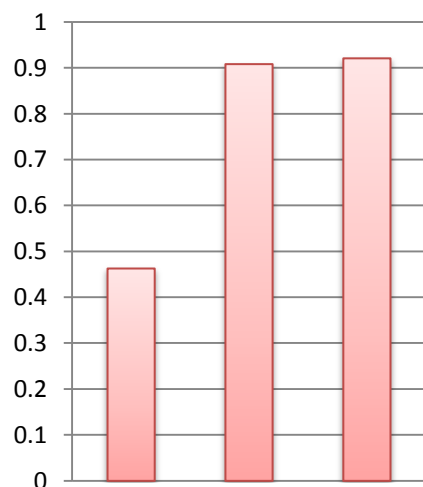
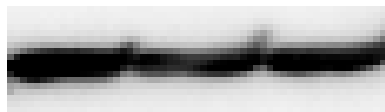
CBDCA

5-FU

PAC

p-cdc2
(34kD)

β -actin
(47kD)



CBDCA
($\mu\text{g/ml}$)
FE
(mg/ml)

552
- 0.2 0.4

5-FU
($\mu\text{g/ml}$)
FE
(mg/ml)

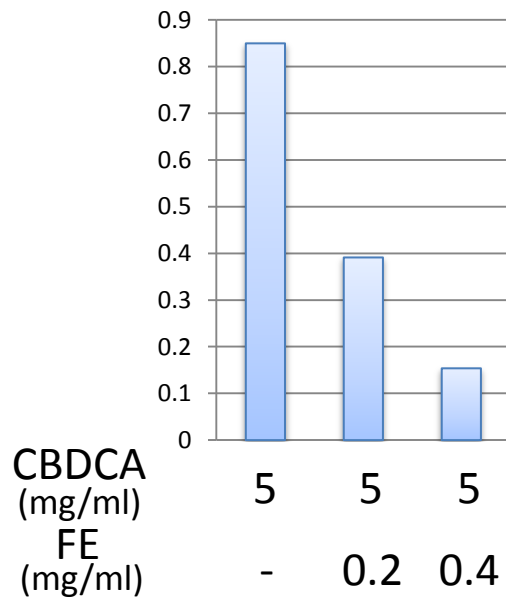
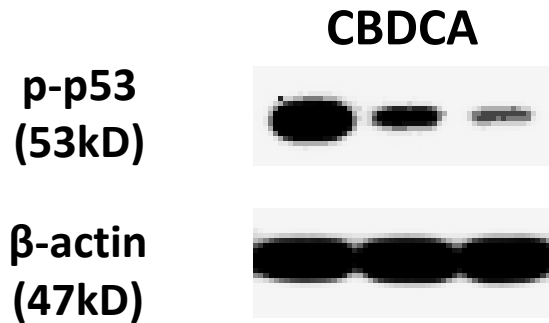
50
- 0.2 0.4

PAC
($\mu\text{g/ml}$)
FE
(mg/ml)

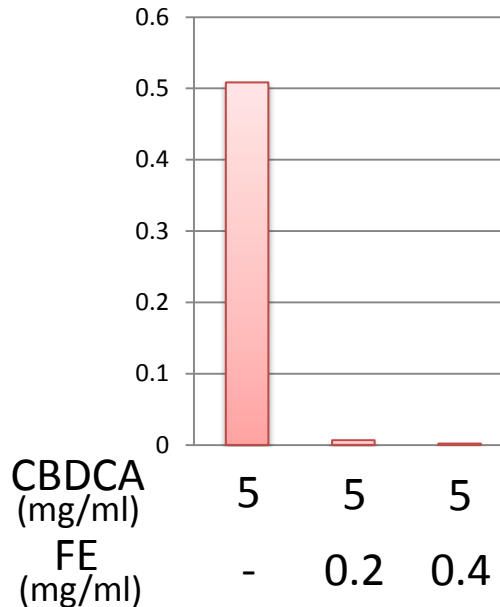
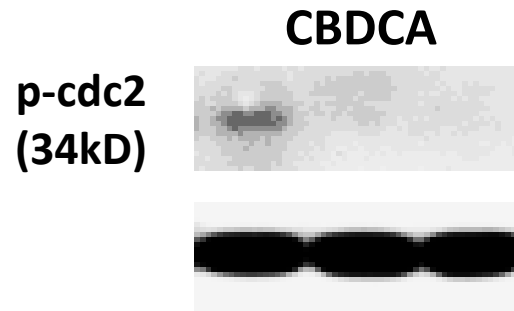
0.03
- 0.2 0.4

p-cdc2/ β -actin

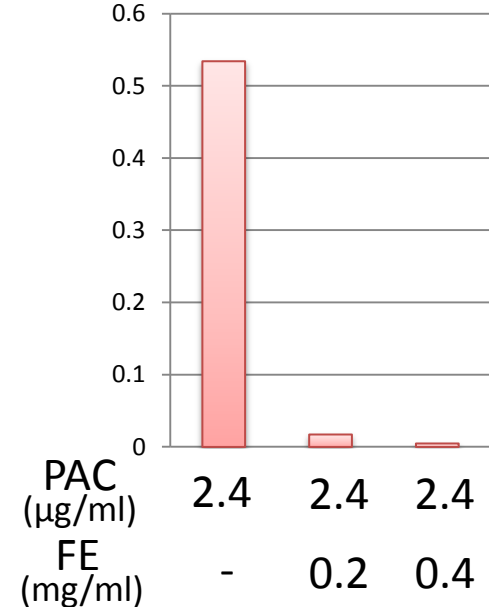
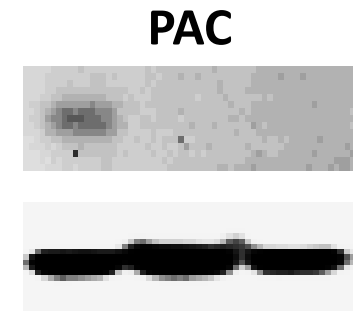
TIG-1細胞における細胞周期関連タンパク質の発現



p-p53/β-actin



p-cdc2/β-actin



小括

【A549細胞】

FE及び各種抗ガン剤との併用において細胞周期関連タンパク質であるp-cdc2の上昇が確認できた。PACに関してはFEの濃度依存的にp-cdc2の上昇が確認できた。

【TIG-1細胞】

- ・FE及びCBDCA(5 mg/ml)との併用において、FE濃度依存的にp-p53の減少を確認することができた。
- ・FE及びCBDCA、PACとの併用においてp-cdc2の発現がほとんど見られなかった。

総括

【A549細胞】

- ・FE及び各種抗ガン剤との併用において抗腫瘍作用増強効果が確認できた。細胞周期関連タンパク質であるcdc2のリン酸化上昇がこの現象の原因の一つとして考えられる。
- ・臨床において化学療法の1つとして各種抗ガン剤を使用する際に、FEを併用することで、抗ガン作用を増強させる可能性が示唆された。

【TIG-1細胞】

- ・FE及びCBDCA、5-FUとの併用において細胞毒性軽減効果ができた。CBDCAに関してはFEを併用させることによるp53、cdc2のリン酸化減少が原因の一部であると考えられる。5-FUに関しても同様のことが示唆された。
- ・PACに関しては、FEを併用させることによりcdc2のリン酸化減少を確認することができたが、それ以上に違う経路における細胞毒性が強く出ているため細胞保護効果が示されないと考える。