

2017年9月3日

第11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、白畑 實隆



KYUSHU UNIVERSITY



本日のトピックス

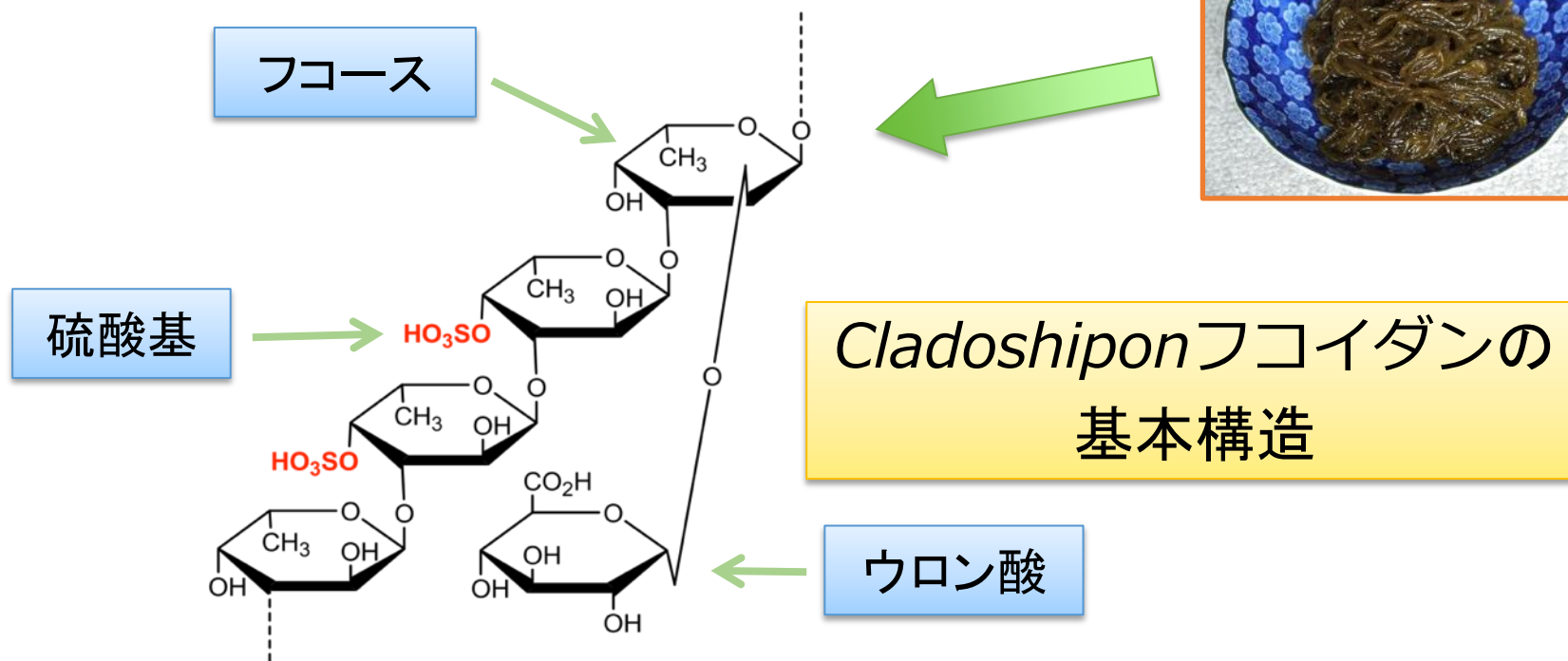
- LMF、LMF-CGについて
- がん細胞スフェロイドに対するLMFの効果
- がん形質関連遺伝子の発現変化誘導
- LMFと抗がん剤の併用によるがん抑制効果



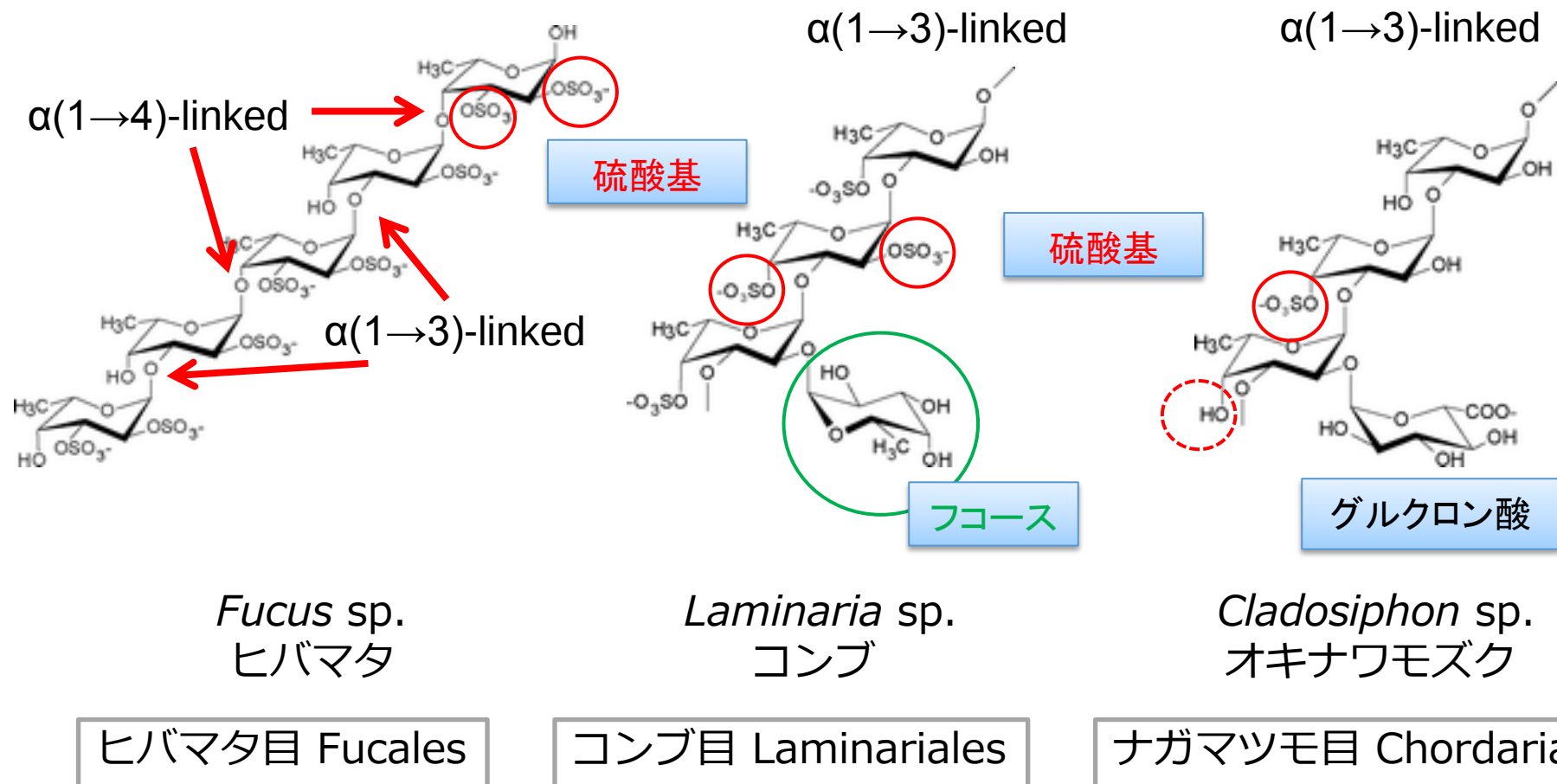
LMF、LMF-CGについて

フコイダン

- 1913年にスウェーデン・ウプサラ大学のH. Z. Kylin教授によって発見された成分
- モズクやコンブ、ワカメといった褐藻類の海藻から抽出されるぬめり成分(**フコース**を大量に含む多糖類)



種によるフコイダンの違い



低分子化フコイダン(LMF)

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

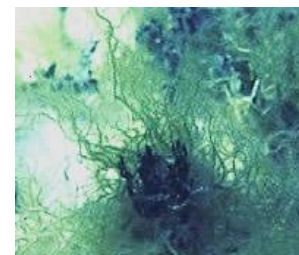
(平均分子量：約 20万～80万)



酵素消化

酵素消化低分子化フコイダン(LMF)

(LMFはモズク由来の色素、アミノ酸、ミネラルなどを含む)



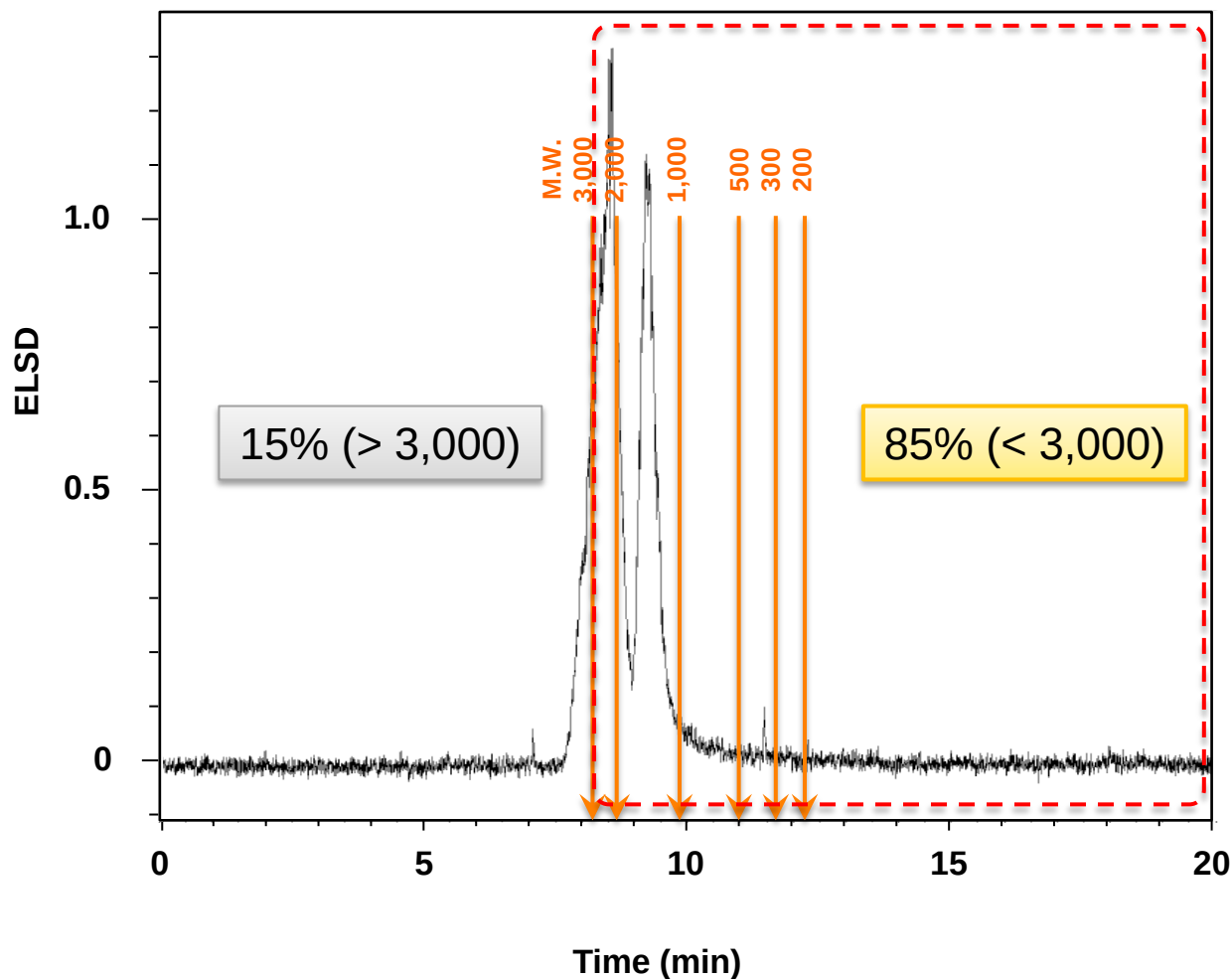
トンガ王国産モズク

LMFを構成する糖

フコース	73 %
キシロース	12 %
マンノース	7 %
グルコース	4 %
ガラクトース	4 %

他、硫酸基(14.5 %)
やウロン酸を含む

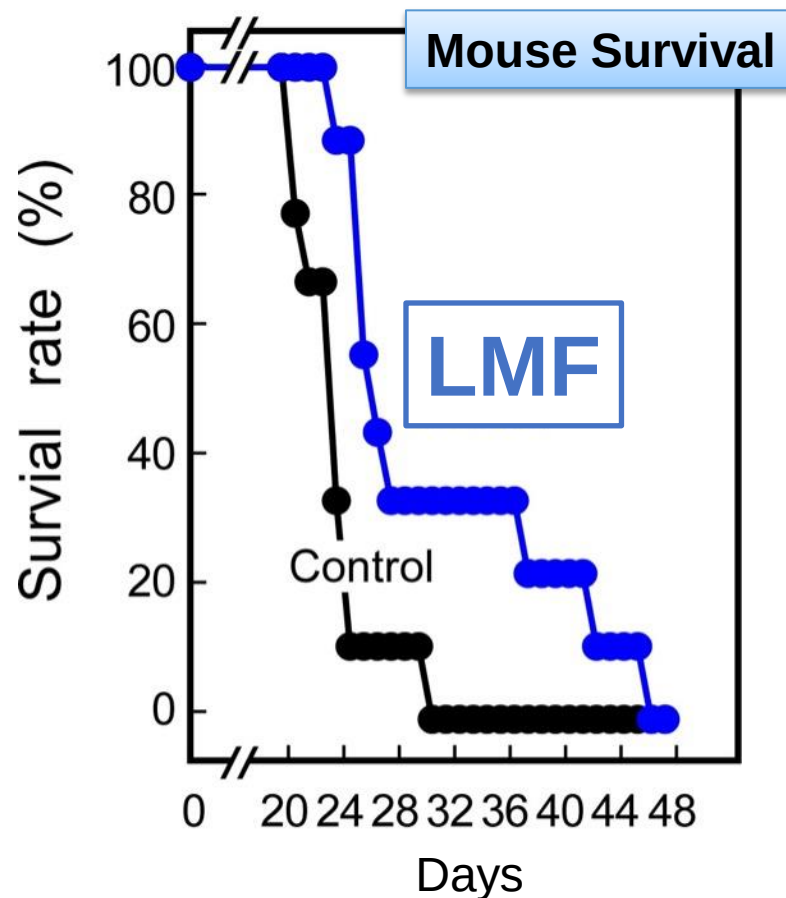
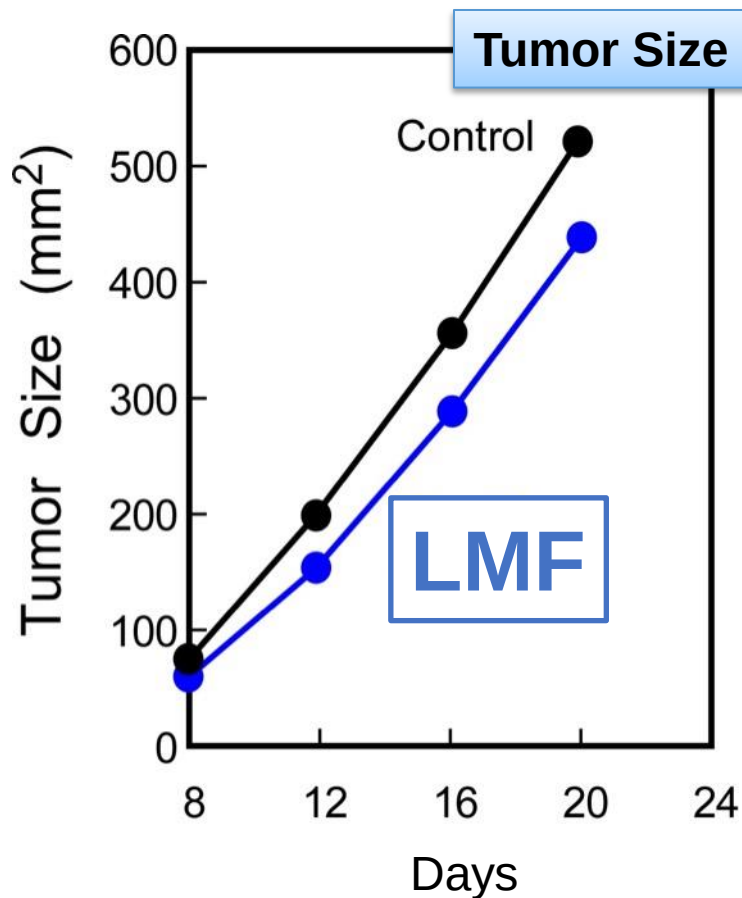
ゲルろ過によるLMFの分子量測定



Column:
TOSOH TSKgel SuperOligoPW
(I.D. 6.0 mm X 150 mm)
Exclusion limit: 6,000
Separation range: 100 to 3,000

Mobile Phase: Water
Flow Rate: 0.2 mL min⁻¹
Column Temperature: 40°C

LMFは*in vivo*でマウス大腸がん細胞の増殖を抑制する



Balb/cマウス(9匹を使用)、Colon-26細胞をマウス背部皮下に移植 (Day 0)、
LMF を経口投与(2週間、700 μ g/day)

ナタマメエキス添加低分子化フコイダン(LMF-CG)



ナタマメ
(*Canavalia gladiata*)

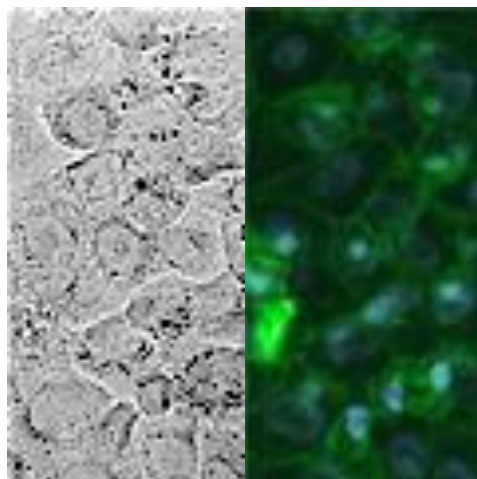
LMF処理した細胞の表面を調べる

HT1080

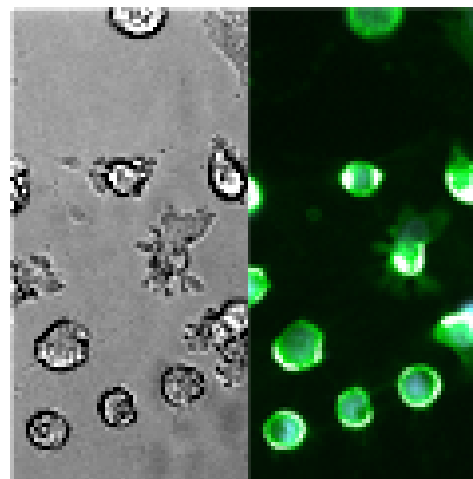
ヒト線維肉腫細胞

緑色：
コンカナバリンA

水色：
細胞の核



0



1

LMF (mg/mL)

緑色蛍光標識コンカ
ナバリンAで処理

低分子化フコイダンはがん細胞とコンカナバリンAの結合を増強し、細胞死を誘導する

ナタマメエキス調製法

焙煎ナタマメ(約5 mm刻み) 1 kg
水(常温) 14 kg(対原料14倍)



抽出90~95°C(2時間攪拌)
Brix 2.6%、pH 5.18



30メッシュパス
液量 9.6 kg、残渣4.94 kg
Brix 2.8%、pH 5.11



pH 4.5調整、50°C
クエン酸 12 g添加(対原料1.2%)
pH 5.11→pH 4.51



酵素処理50°C、4時間攪拌(×2)
セルラーゼ・ペクチナーゼ添加
液量 9.42 kg、Brix 3.0%、pH 4.12



↓
#2濾紙濾過



酵素失活90~95°C(30分)
液量 9.36 kg、Brix 3.0%、pH 4.09



濾過助剤添加、1 μm(ハウジング)濾過
液量 10.36 kg、Brix 2.4%、pH 4.10、
固形分2.5%



減圧濃縮60°C、55分
液量 3.0kg、Brix 8.4%、pH 4.12、
固形分8.1%

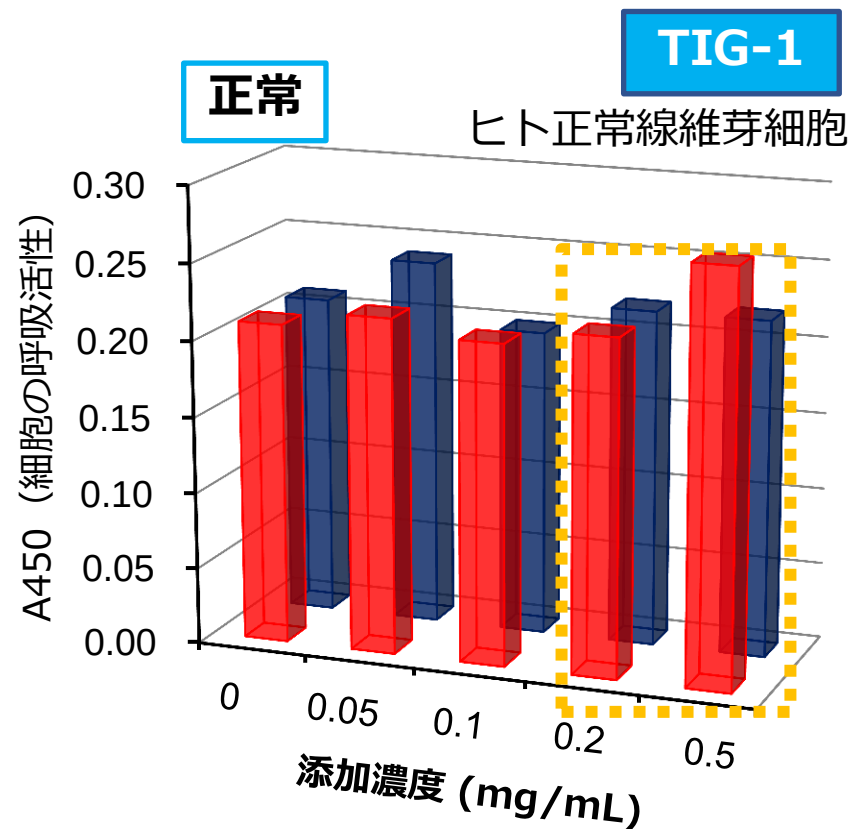
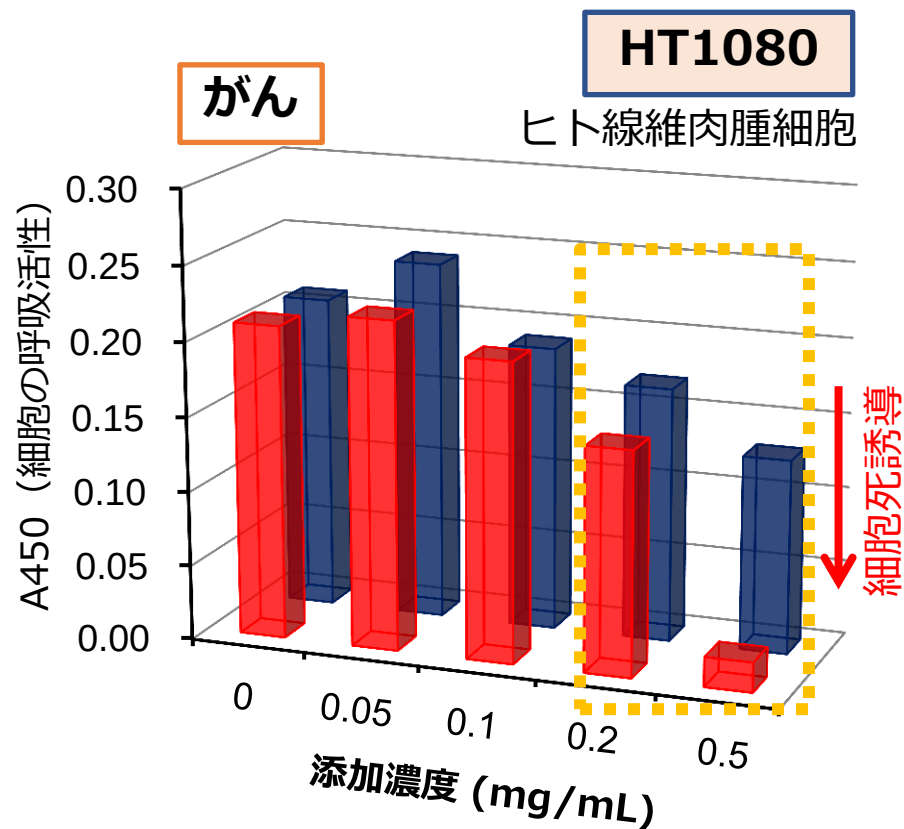
・ナタマメエキス乾燥物収率24.3%



ナタマメ (*Canavalia gladiata*)

LMF-CG(ナタマメエキス5%添加LMF)

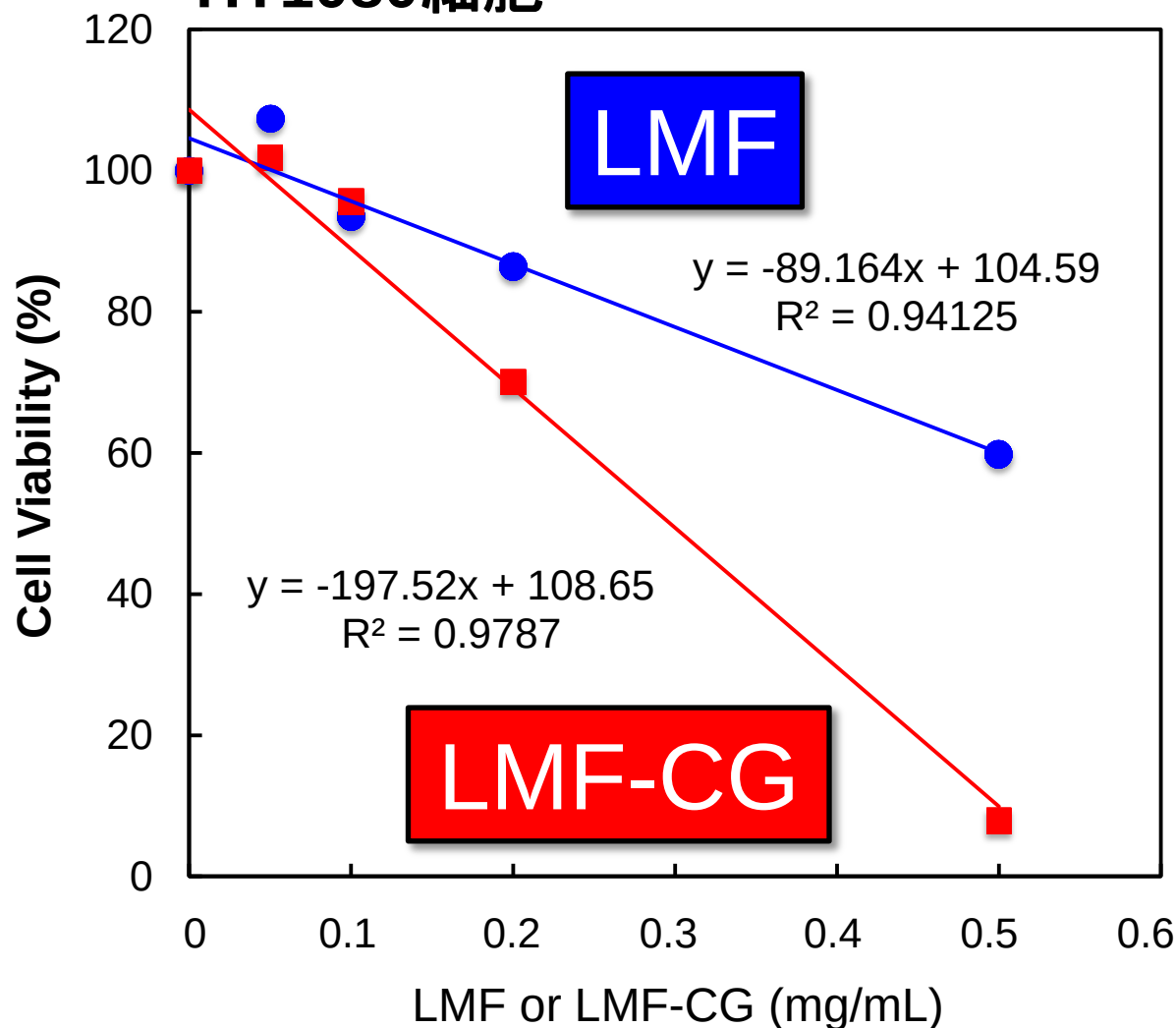
LMF-CG(ナタマメエクス添加低分子化フコイダン)



- :低分子化フコイダン
- :低分子化フコイダン+ナタマメエクス

LMF-CGによる細胞死誘導効果

HT1080細胞

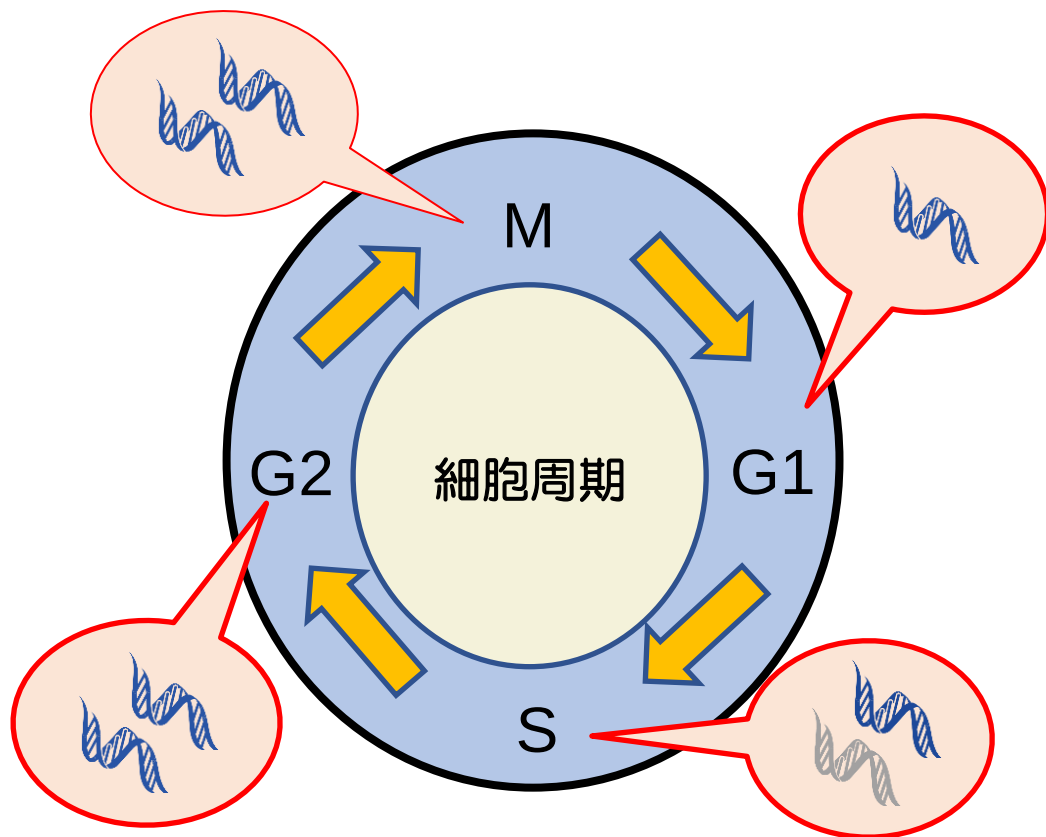


$IC_{50}: 0.61 \text{ mg/mL}$

2.1倍活性が高い

$IC_{50}: 0.30 \text{ mg/mL}$

細胞周期解析によるLMFとナタマメエキスの併用効果の検討



◆方法

細胞播種(前培養24時間)



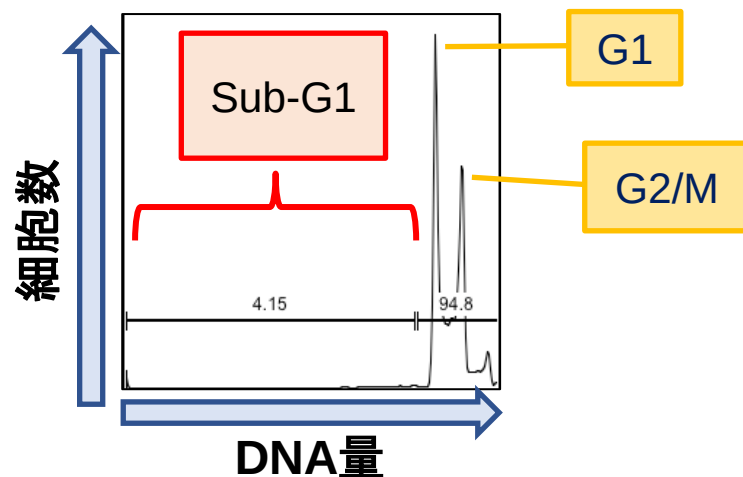
サンプル処理(48時間)



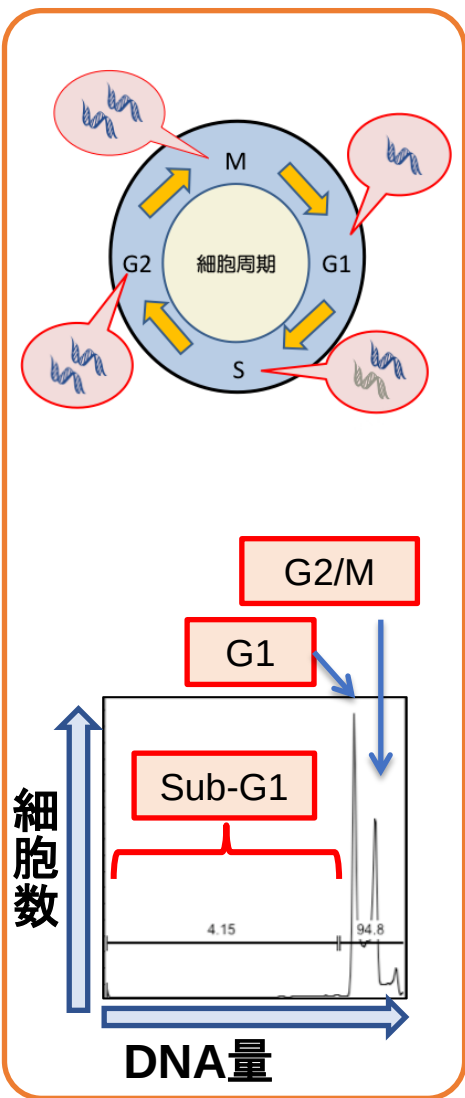
エタノール固定、RNA分解、
PI染色



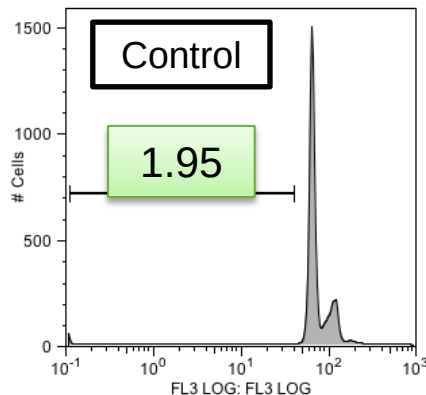
フローサイトメトリーによる
細胞周期解析



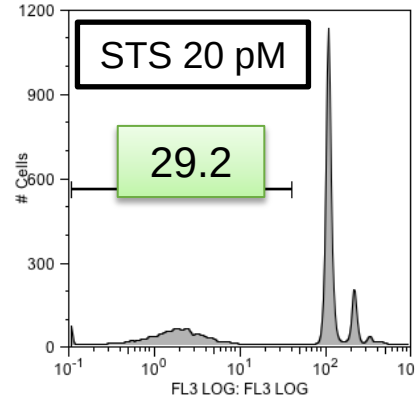
LMFとナタマメエキスの併用による細胞周期への影響



Z0082063.LMD

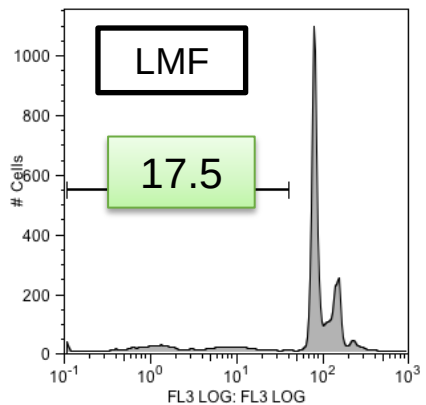


Z0082064.LMD

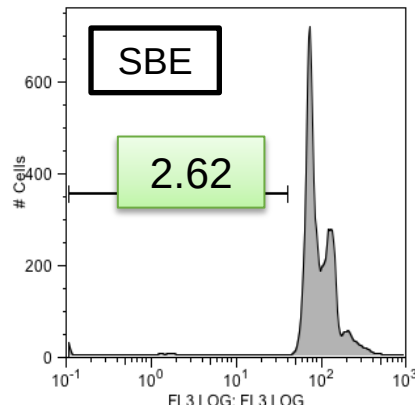


HT1080細胞

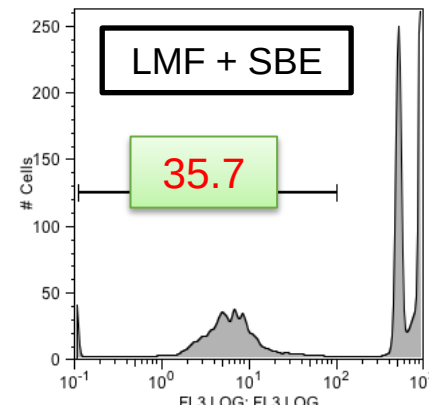
Z0082065.LMD



Z0082049.LMD



Z0081949.LMD



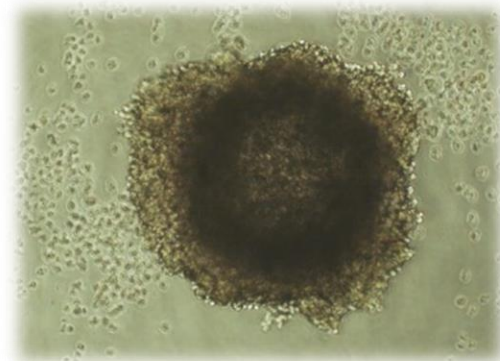
LMF 0.5 mg/mL、ナタマメエキス(SBE) 200 µg/mL

がん細胞スフェロイドに対するLMF の効果

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

(Prime Surface®(住友ベークライト)を使用して培養)



スフェロイド培養による 評価系

がんの周辺微小環境と多様性を再構築



がん細胞スフェロイドに対するLMFの効果： 試験方法1 (WST-1アッセイ)

スフェロイド形成用PrimeSurface® 96Uプレート(住友ベークライト)に
HT1080細胞 を2,500 cells/wellで播種



インキュベート (72 h、37°C、5% CO₂)



LMF、**CBDCA** を加えた培地に交換



インキュベート (**2日間**、37°C、5% CO₂)



WST-1を添加



インキュベート (**24時間**、37°C、5% CO₂)

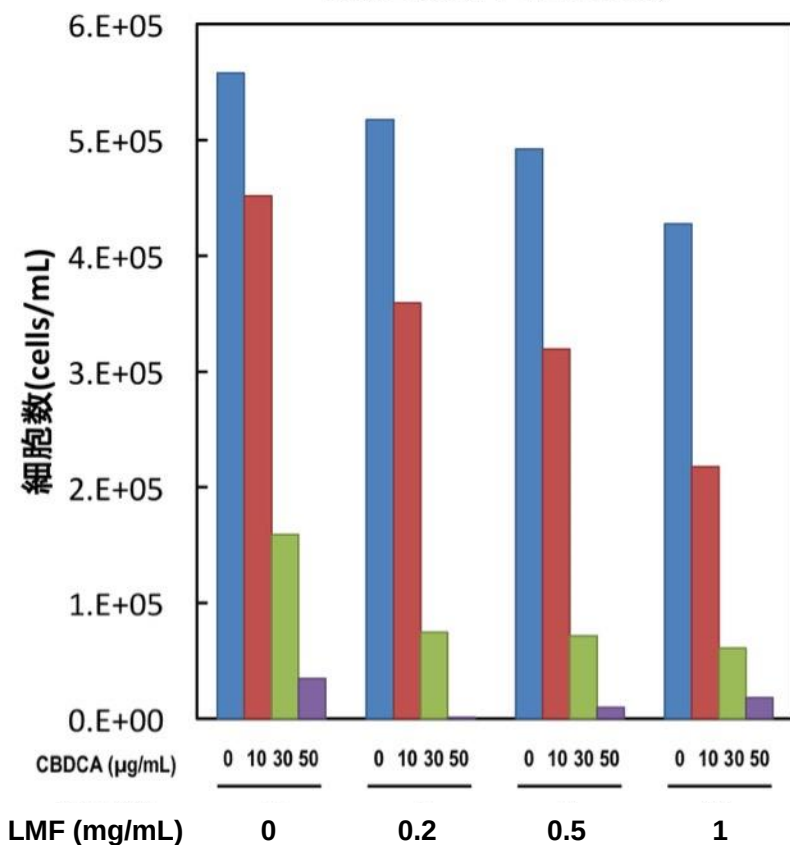


プレートリーダーで測定 (WST-1)

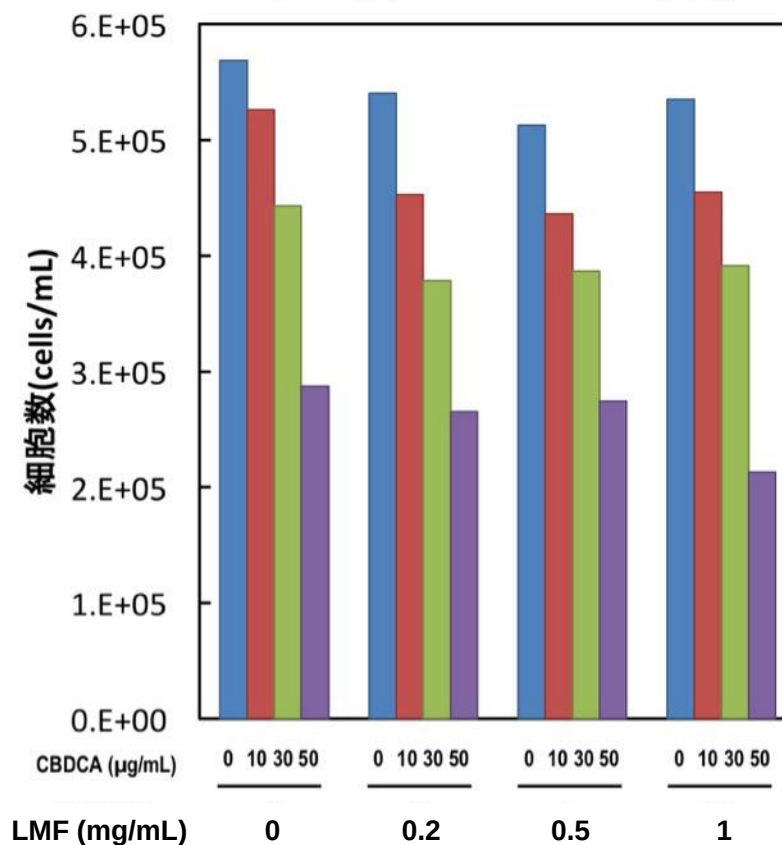


がん細胞スフェロイドに対するLMFの効果1

細胞数(単層培養)



細胞数(スフェロイド培養)



がん細胞スフェロイドに対するLMFの効果： 試験方法2(蛍光染色)

スフェロイド形成用PrimeSurface® 96Uプレート(住友ベークライト)にHT1080細胞を2,500 cells/wellで播種



インキュベート (72 h、37°C、5% CO₂)



LMF、**CBDCA**を加えた培地に交換



インキュベート (**2日間**、37°C、5% CO₂)



蛍光色素で染色

(2 μM Calcein AM、16 μM EthD-1/PBS(-)試薬)

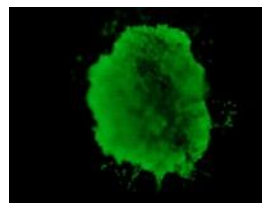
・Calcein AM

Calceinを細胞膜透過性としたもので、細胞内のエステラーゼによる加水分解によって膜不透過性のCalceinとなり、強い**黄緑色の蛍光**を示す。

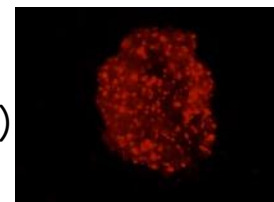
・Ethidium homodimer-1 (EthD-1)

死細胞の膜損傷部分から透過し、核酸と結合することにより**赤色の蛍光**を示す。
無傷である生細胞では排除される。

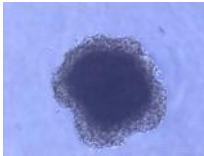
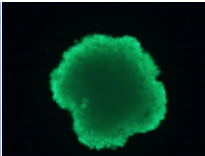
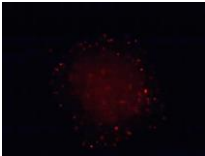
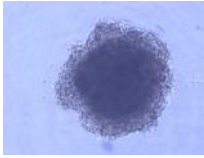
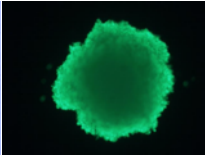
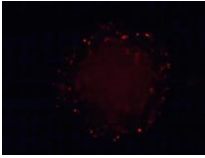
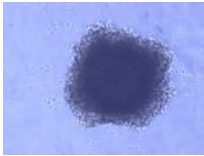
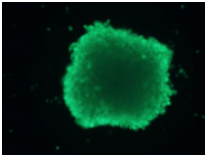
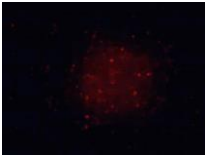
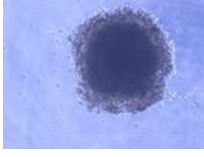
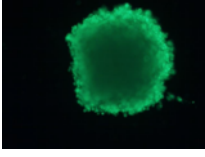
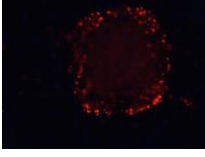
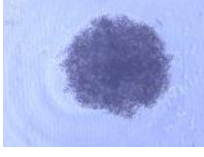
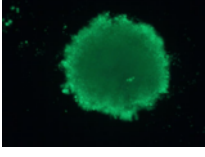
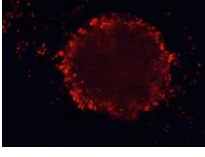
生細胞
(Calcein AM)



死細胞
(EthD-1)

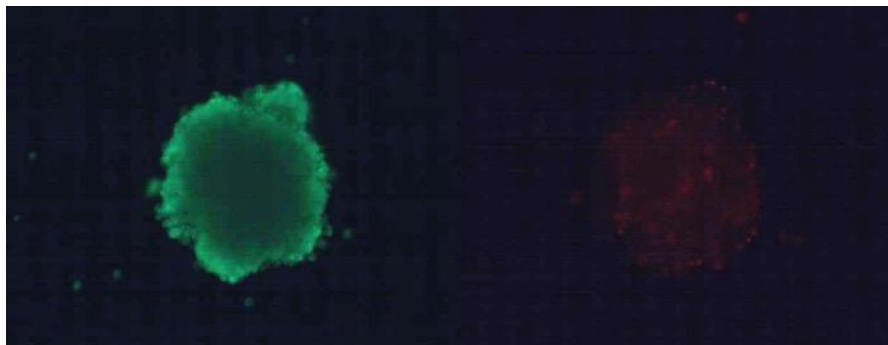


がん細胞スフェロイドに対するLMFの効果： 試験方法2(蛍光染色)

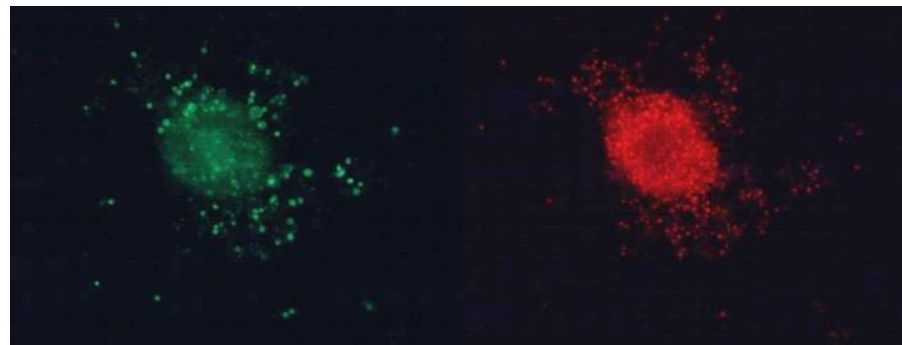
			LMF (mg/mL)	CBDCA (μ g/mL)	明視野	生細胞 (Calcein AM)	死細胞 (EthD-1)
LMF CBDCA (mg/mL) (μ g/mL)			0.2	0			
0 0			0.5	0			
明視野	生細胞 (calcein AM)	死細胞 (EthD-1)	0	10			
			0	30			
			0	50			

がん細胞スフェロイドに対する効果(CBDCA)

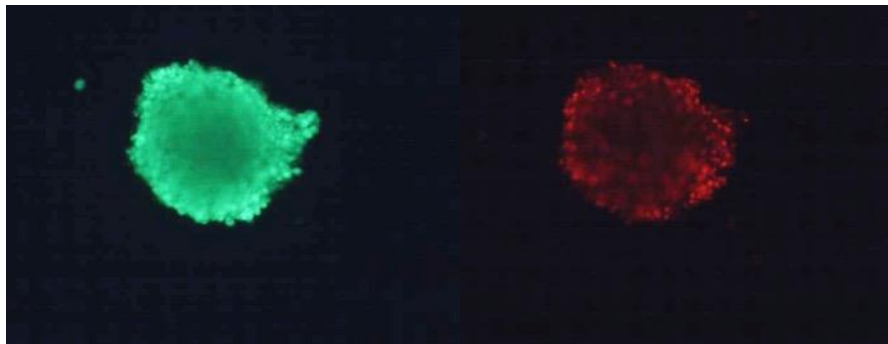
CBDCA 0 / LMF 0



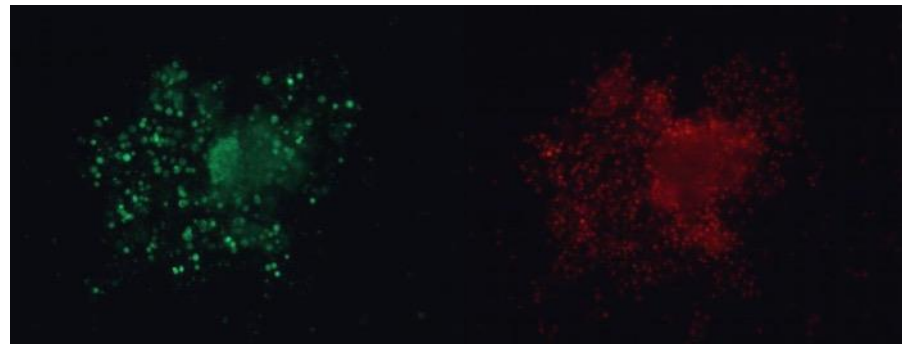
CBDCA 50 / LMF 0



CBDCA 0 / LMF 1



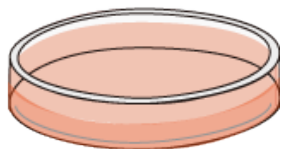
CBDCA 50 / LMF 1



CBDCA ($\mu\text{g/mL}$) / LMF (mg/mL)

がん形質関連遺伝子の発現変化 誘導

LMF処理によるがん悪性化関連遺伝子mRNAの発現量変化: 方法



HT1080細胞を60 mm dishに播種



インキュベーション (1日)

サンプル処理

LMF 0, 1, 10, 100 $\mu\text{g/mL}$



インキュベーション (1日)

細胞から全RNAを回収し、cDNA合成

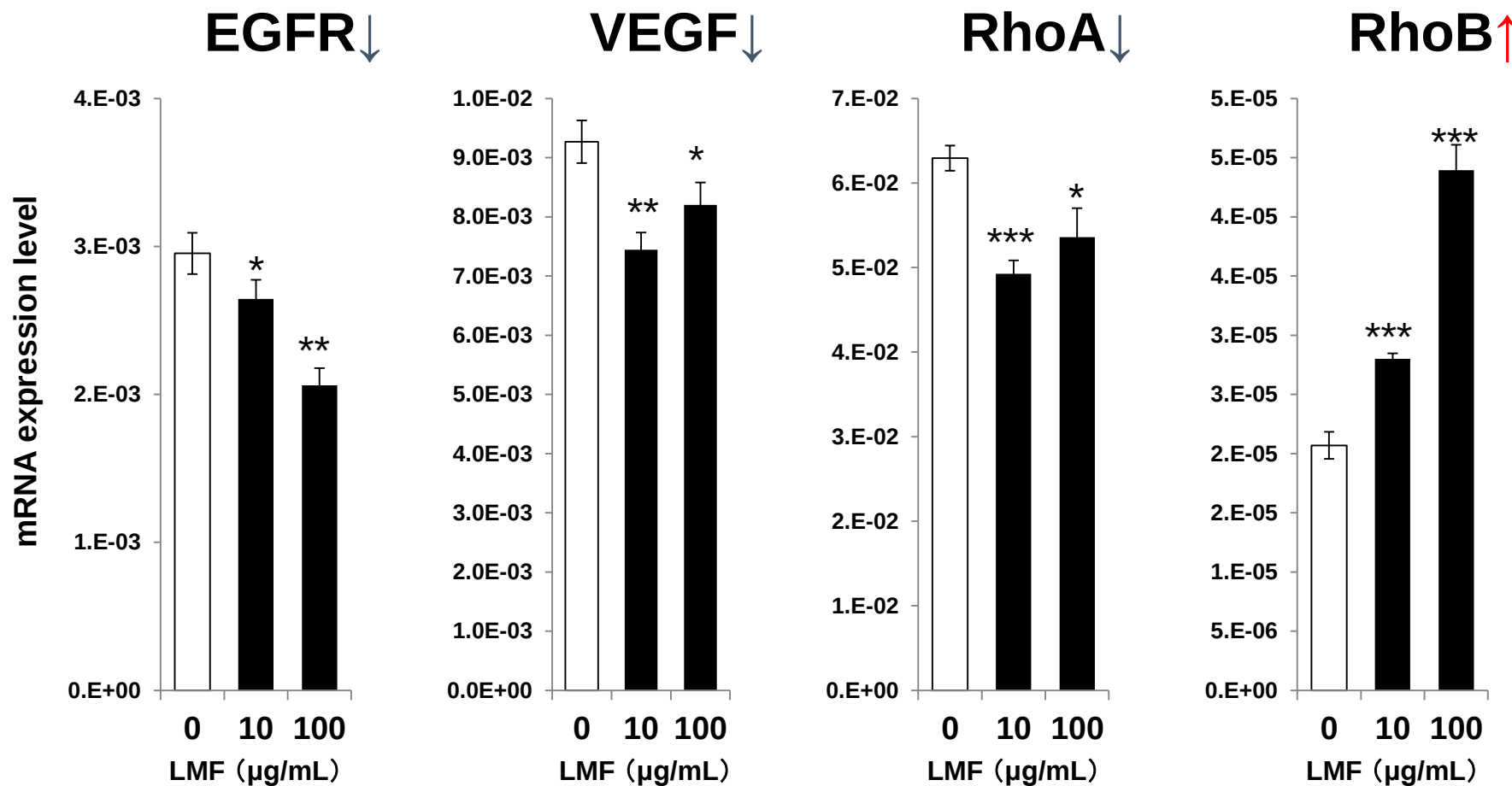
サンプル処理条件設定
細胞死を誘導しない



定量 RT-PCR法

・がん悪性化関連遺伝子群、PD-L1, PD-L2

LMF処理によるがん悪性化関連遺伝子mRNAの発現量変化

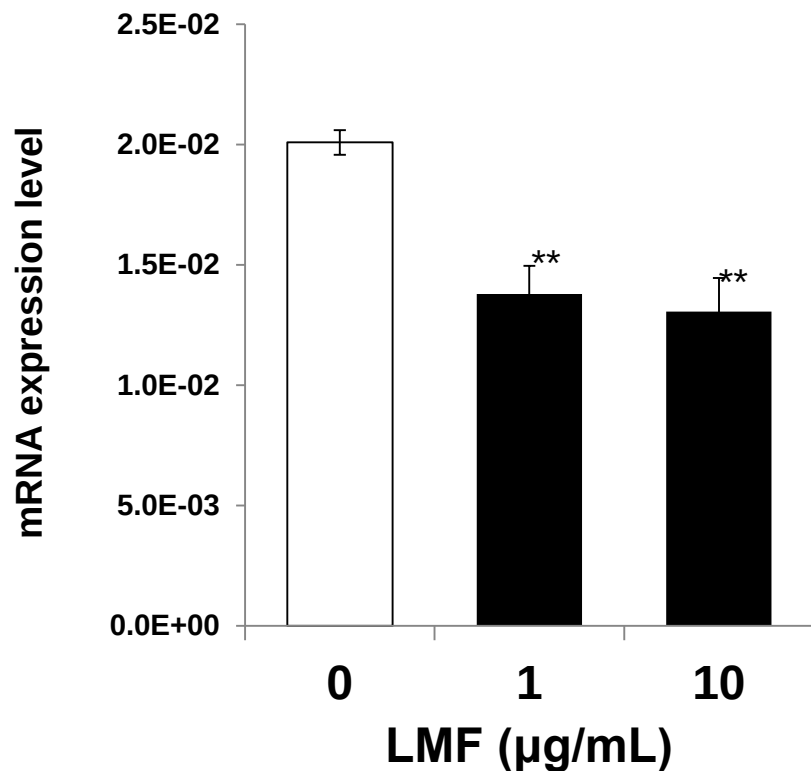


(*: $p < 0.05$ vs 未処理、**: $p < 0.01$ vs 未処理、***: $p < 0.001$ vs 未処理)

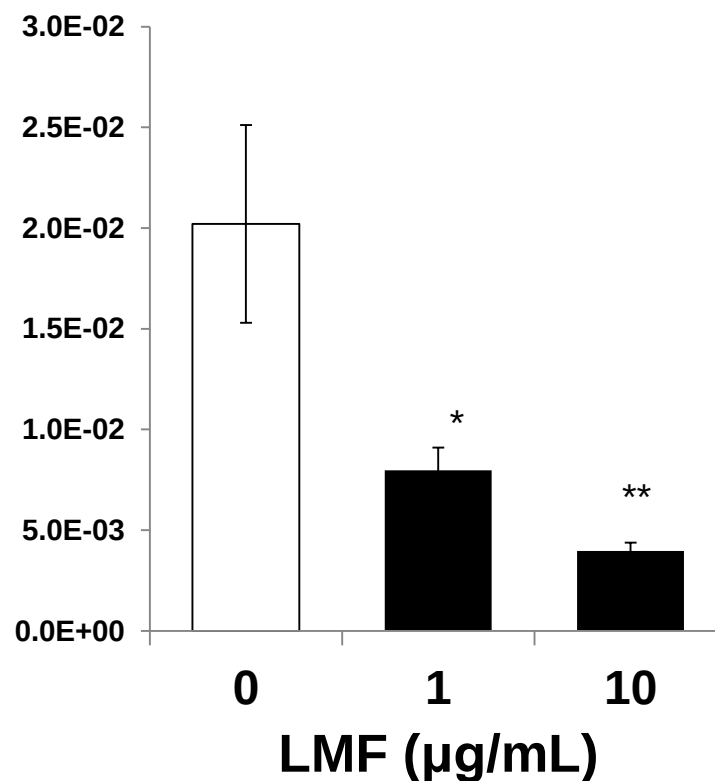


LMF処理によるPD-L1, PD-L2 mRNAの発現量変化

PD-L1

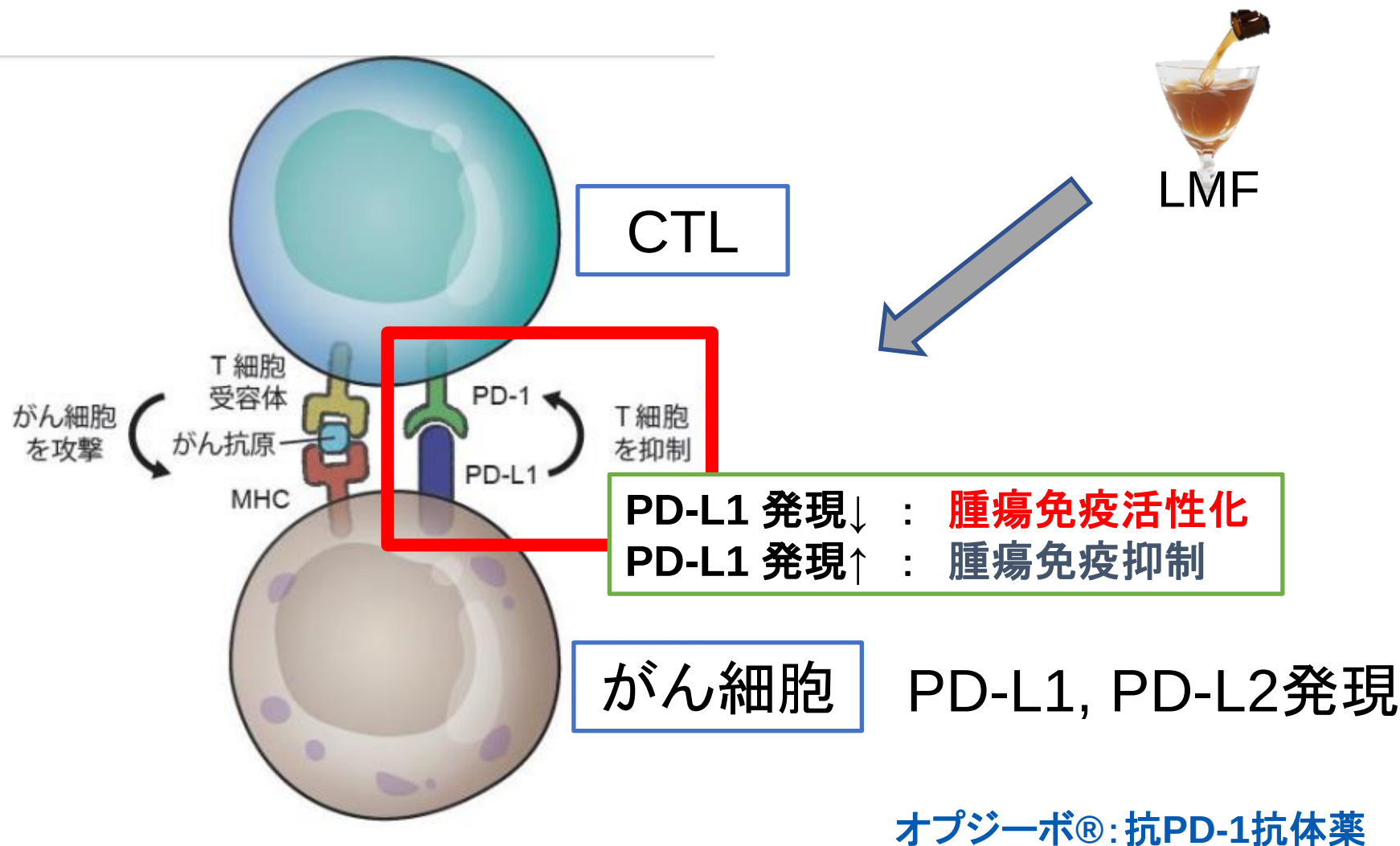


PD-L2



(*: $p < 0.05$ vs 未処理、**: $p < 0.01$ vs 未処理、***: $p < 0.001$ vs 未処理)

がん細胞の免疫チェックポイント



LMF処理によるPD-L1タンパク質発現変化: 方法

Flow cytometry



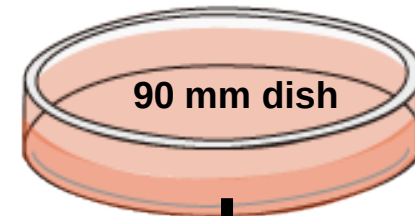
サンプル処理

細胞固定、抗体処理

Flow cytometry

PD-L1タンパク質発現変化を測定

Western blotting



サンプル処理

細胞からタンパク質回収、SDS-PAGE

Western blotting

PD-L1タンパク質発現量を測定

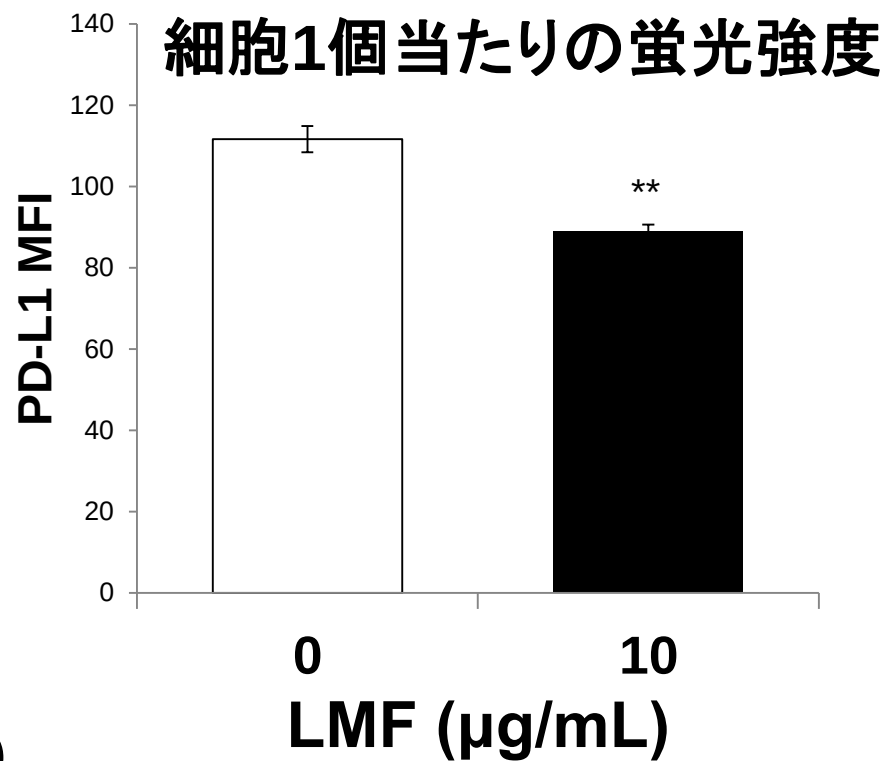
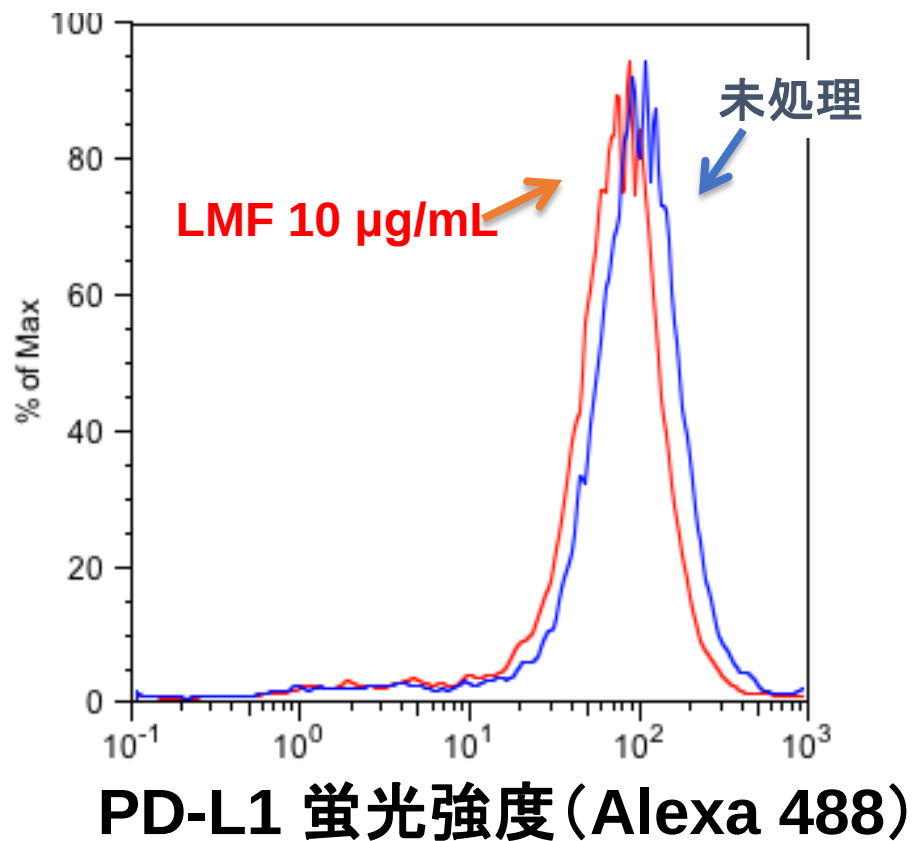
HT1080細胞を播種
インキュベーション (1日)

LMF 0, 10 $\mu\text{g/mL}$

細胞死を誘導しない

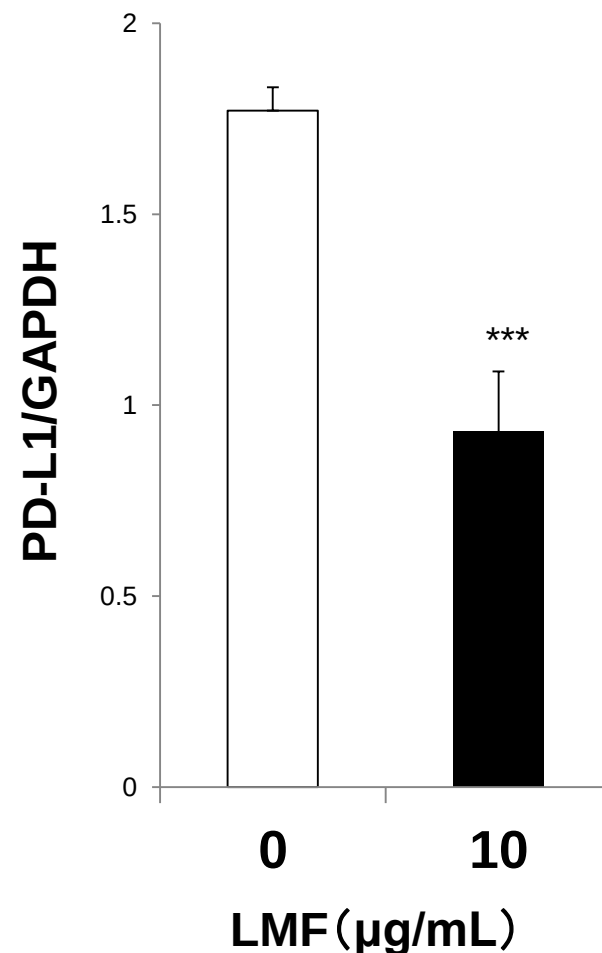
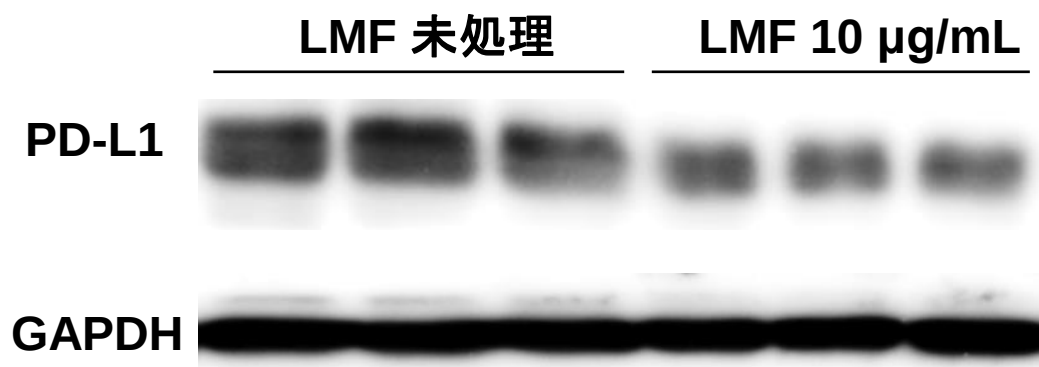
インキュベーション (5日)

LMF処理によるPD-L1タンパク質発現変化



**; $p < 0.01$ vs 未処理

LMF処理によるPD-L1タンパク質発現量変化



(***: $p < 0.001$ vs 未処理)



LMFと抗がん剤の併用によるがん抑制 効果

主要な抗がん剤の種類

分類	抗がん剤
1. アルキル化薬	(1) マイトマイシンC (MMC) (※抗腫瘍性抗生物質)
2. 白金製剤	(1) シスプラチン (CDDP) (2) カルボプラチン (CBDCA)
3. 代謝拮抗剤	(1) フルオロウラシル (5-FU) ピリミジン代謝阻害・チミジル酸シンターゼ阻害薬 (2) シタラビン (Ara-C) ヌクレオチド・ピリミジンアナログ (3) ゲムシタビン (GEM) ヌクレオチド・ピリミジンアナログ
4. トポイソメラーゼ阻害剤	(1) ドキソルビシン (DXR) (※抗腫瘍性抗生物質) (アントラサイクリン系) (2) エトポシド (VP-16) (エピポドフィロトキシン系)
5. 微小管脱重合阻害薬	(1) パクリタキセル (PTX) (タキサン系)

LMFと抗がん剤併用によるがん細胞死誘導効果1:試験方法

96-well plateに細胞を100 μ L/wellで播種

(MDA-MB-231: 3×10^3 cells/well、HCT116細胞: 4×10^3 cells/well、
PANC-1: 3×10^3 cells/well)



インキュベート (Overnight、37°C、5% CO₂)



LMF、LMF-CG、**パクリタキセル(TXL)**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

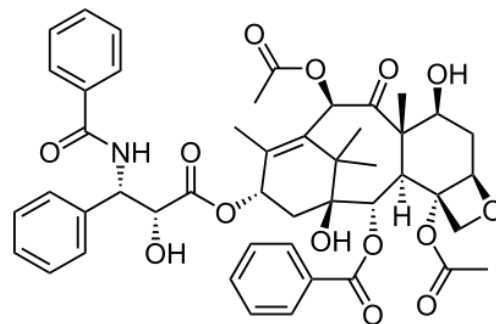


インキュベート (1時間、37°C、5% CO₂)



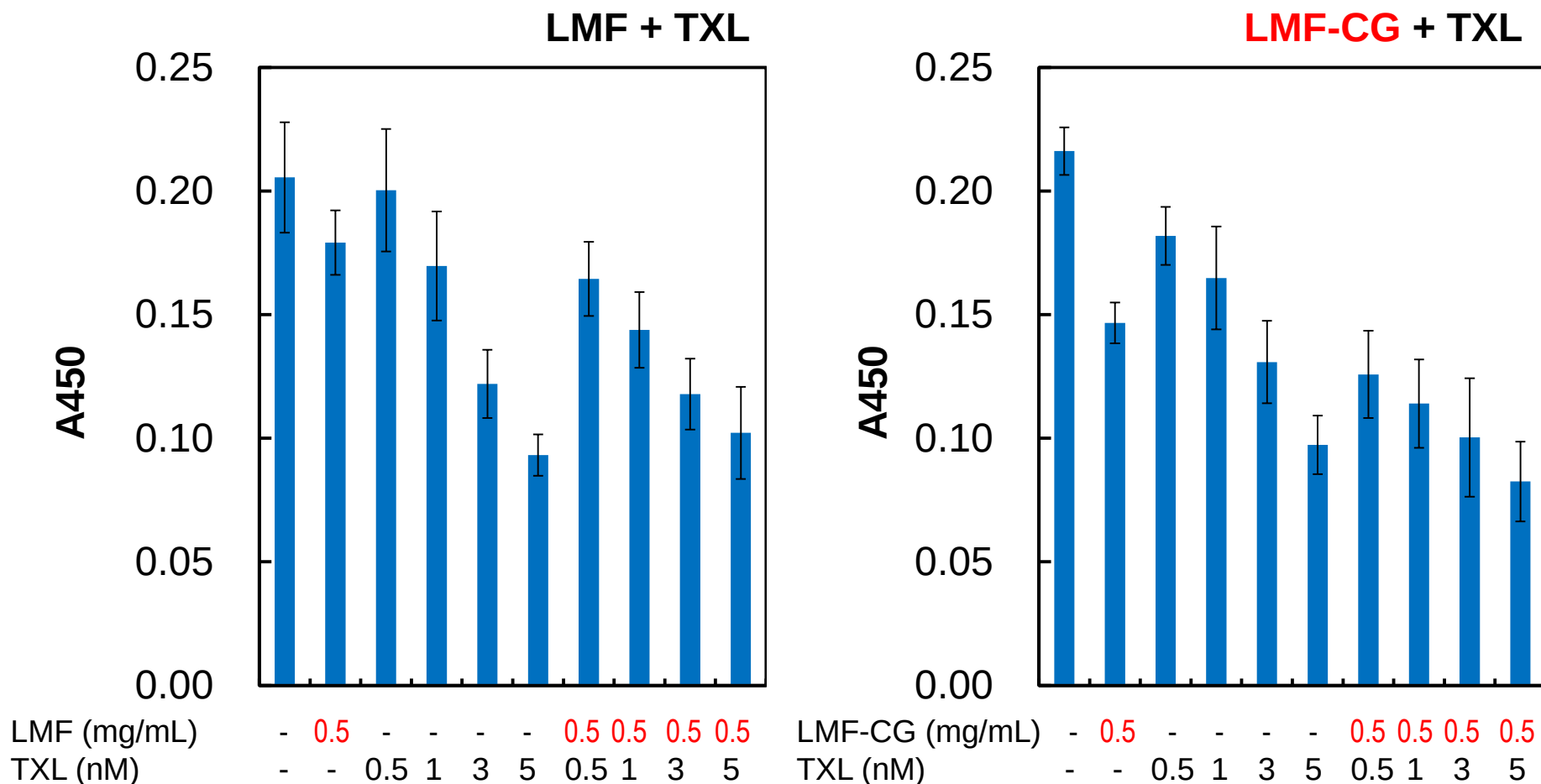
プレートリーダーで測定 (WST-1)

パクリタキセル(TXL)
有糸分裂阻害剤



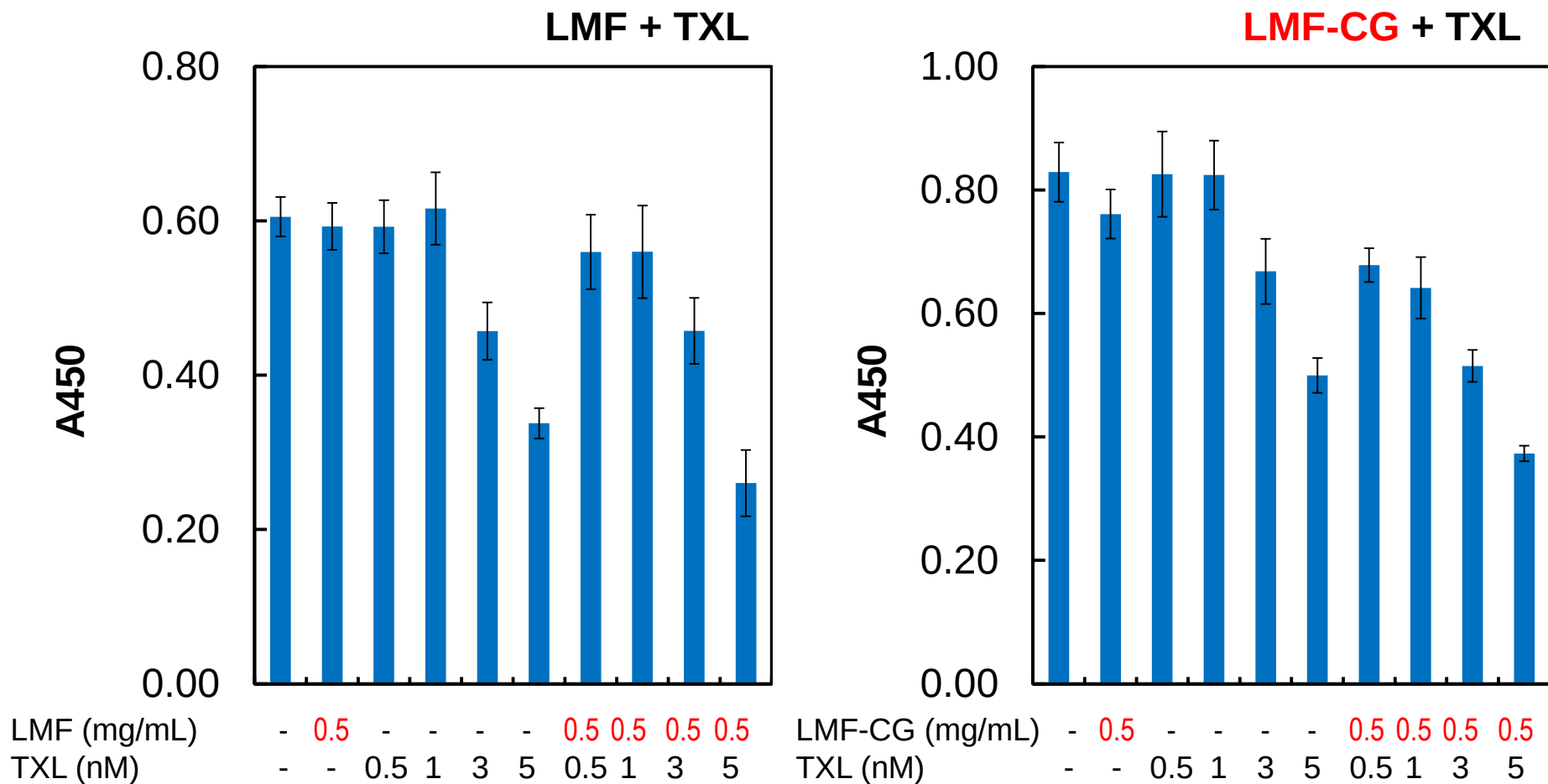
LMF-CGとTXL併用によるがん細胞死誘導効果

MDA-MB-231細胞(乳がん由来):3日間処理



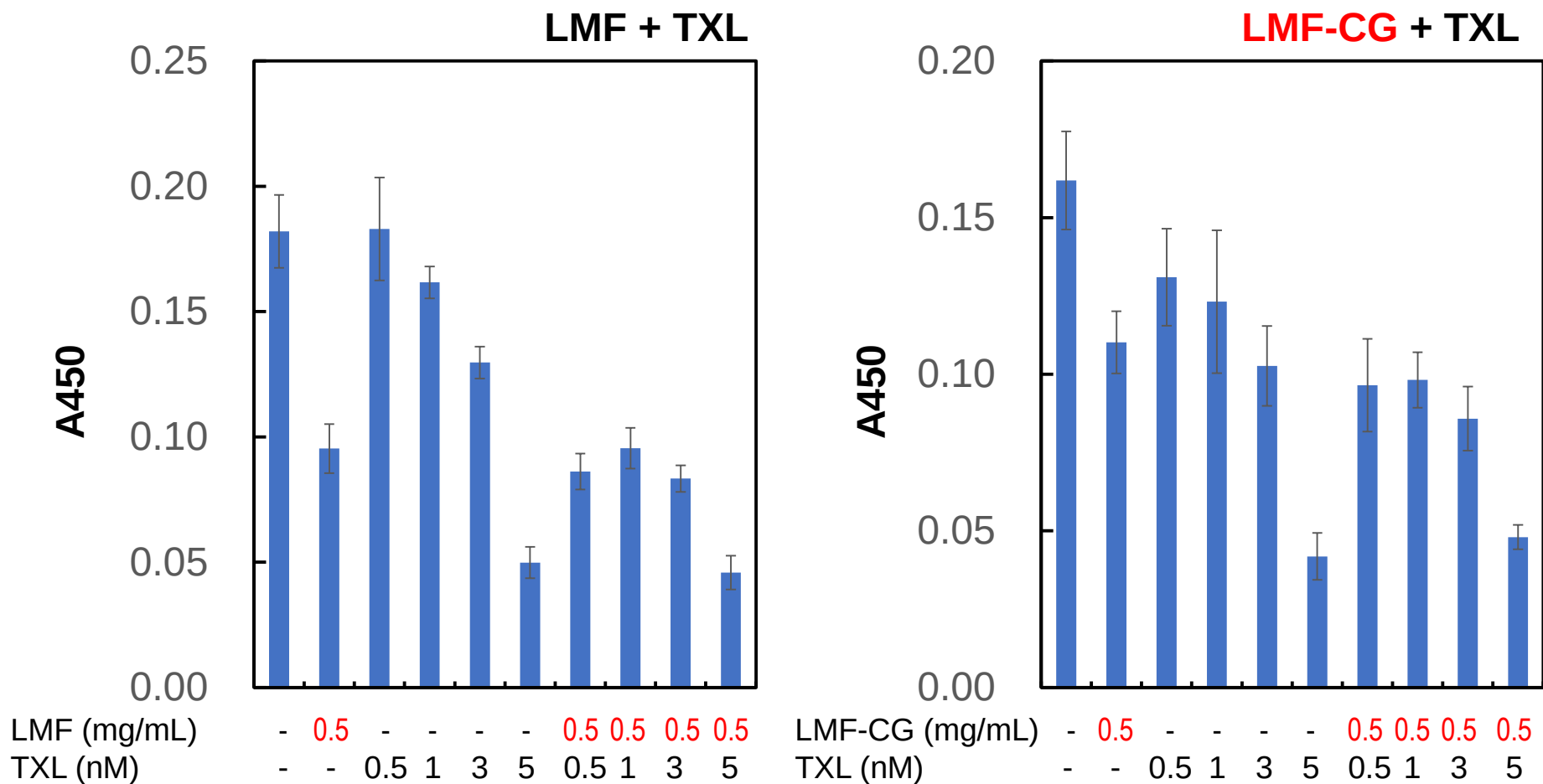
LMF-CGとTXL併用によるがん細胞死誘導効果

HCT-116細胞(大腸がん由来):3日間処理



LMF-CGとTXL併用によるがん細胞死誘導効果

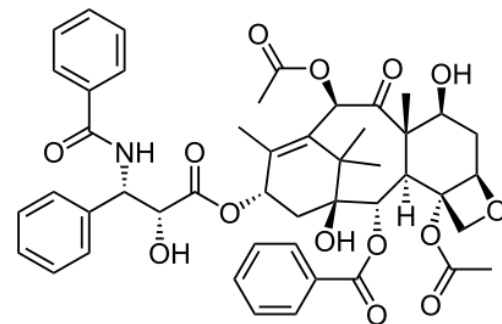
PANC-1細胞(膵がん由来): 3日間処理



LMFと抗がん剤併用によるがん細胞死誘導 効果2: 試験方法

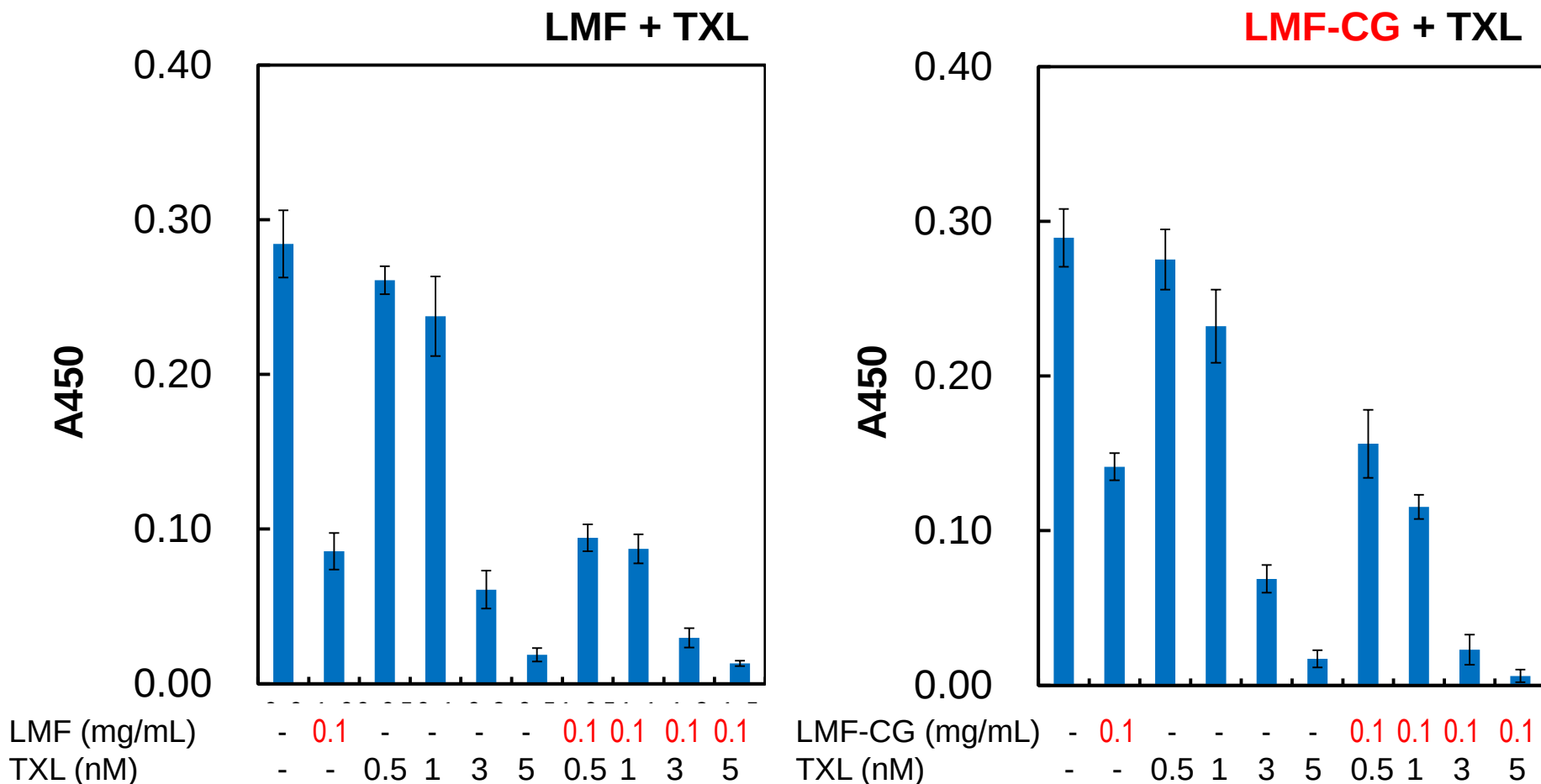
96-well plateに細胞を100 μ L/wellで播種
(MDA-MB-231: 1×10^3 cells/well、HCT116細胞: 4×10^3 cells/well)
↓
インキュベート (Overnight、37°C、5% CO₂)
↓
LMF、LMF-CG、**パクリタキセル(TXL)**を加えた培地に交換
↓
インキュベート (**6日間**、37°C、5% CO₂)
↓
WST-1を添加
↓
インキュベート (1時間、37°C、5% CO₂)
↓
プレートリーダーで測定 (WST-1)

パクリタキセル(TXL)
有糸分裂阻害剤



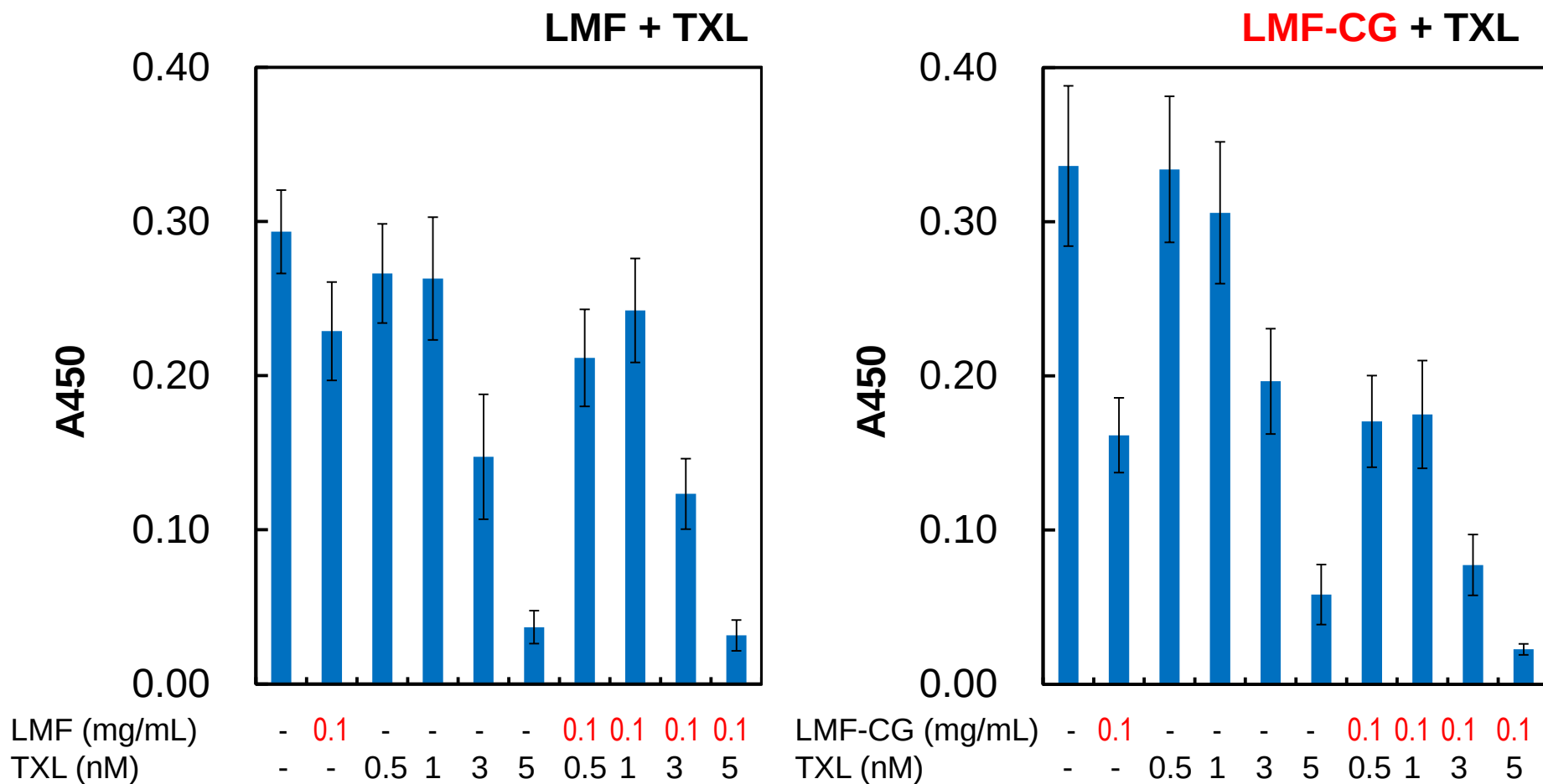
LMF-CGとTXL併用によるがん細胞死誘導効果

MDA-MB-231細胞(乳がん由来):6日間処理



LMF-CGとTXL併用によるがん細胞死誘導効果

HCT-116細胞(大腸がん由来):6日間処理



LMFと抗がん剤併用によるがん細胞死誘導効果3: 試験方法

96-well plateに細胞を100 μ L/wellで播種
(HT1080細胞: 7.5×10^2 cells/well、TIG-1細胞: 3×10^3 cells/well)



インキュベート (Overnight、37°C、5% CO₂)



LMF、LMF-CG、**ドキソルビシン(DXR)**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

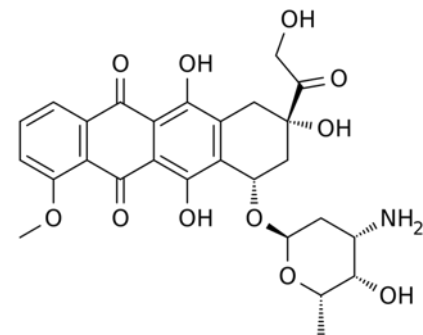


インキュベート (1時間、37°C、5% CO₂)



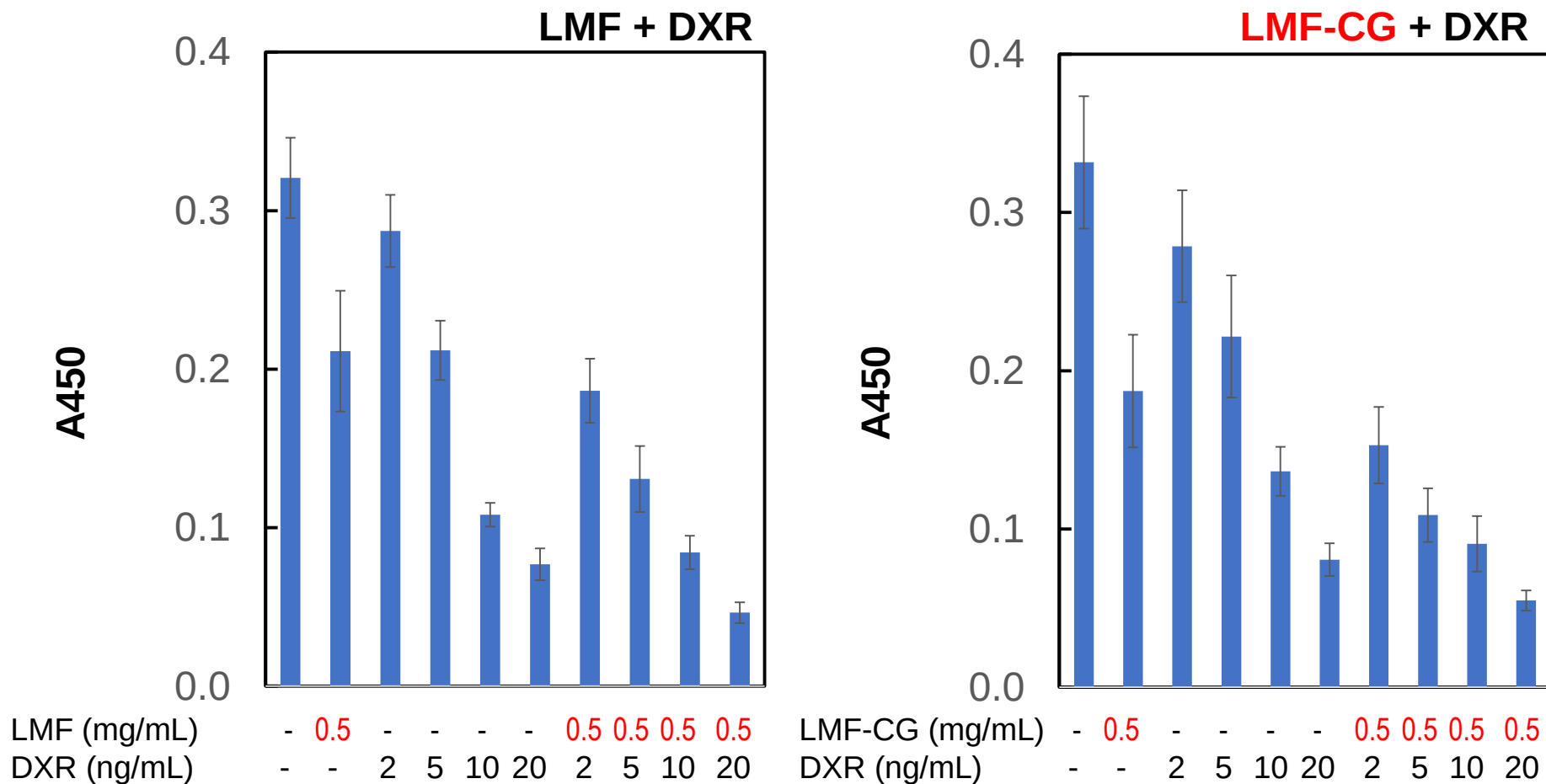
プレートリーダーで測定 (WST-1)

ドキソルビシン(DXR)
トポイソメラーゼ阻害剤



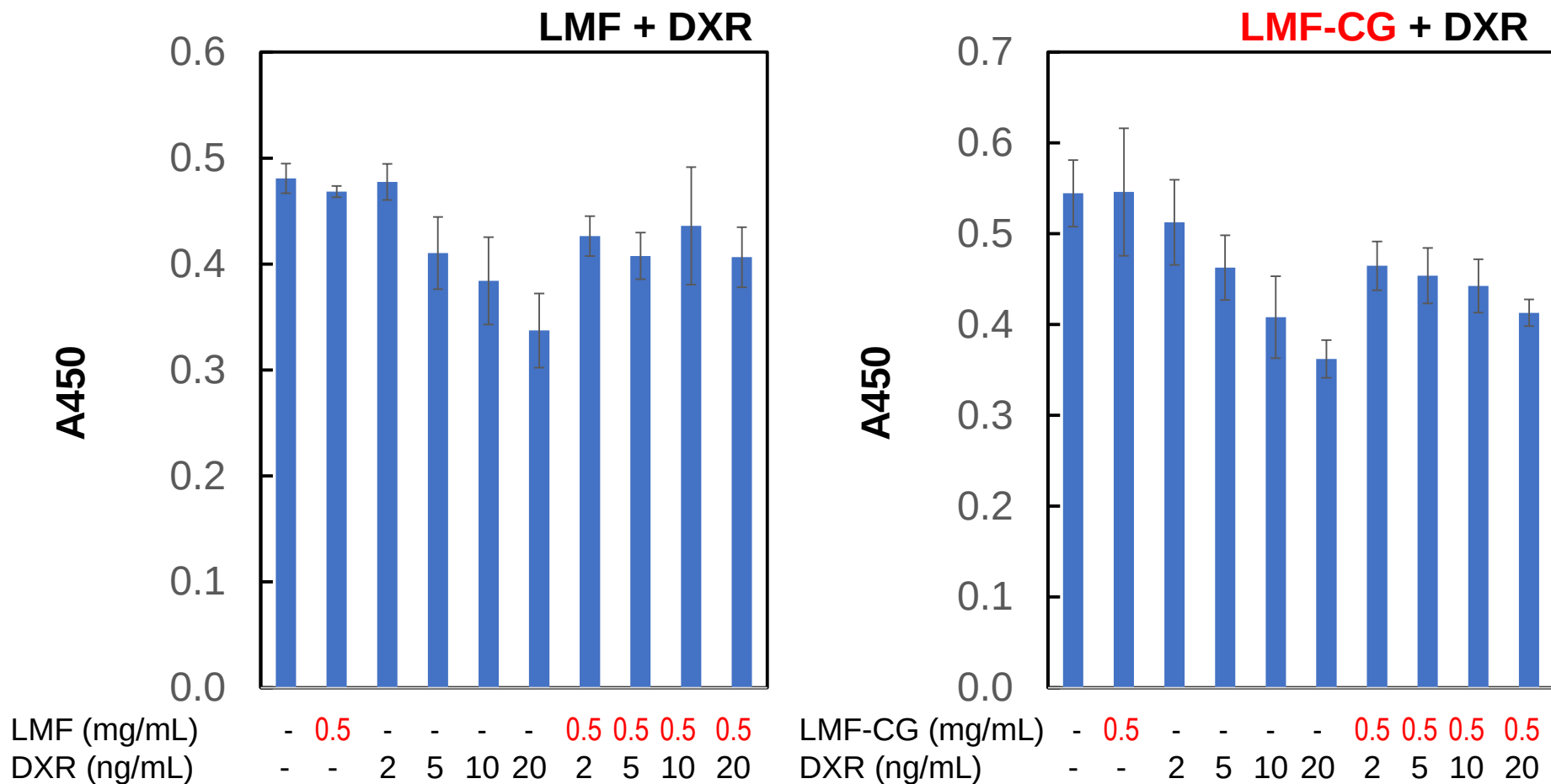
LMF-CGとDXR併用によるがん細胞死誘導効果

HT1080細胞(線維肉腫由来):3日間処理



LMF-CGとDXR併用によるがん細胞死誘導効果

TIG-1細胞(正常線維芽細胞):3日間処理



LMFと抗がん剤併用によるがん細胞死誘導 効果4: 試験方法

96-well plateに細胞を100 μ L/wellで播種
(HT1080細胞: 7.5×10^2 cells/well、TIG-1細胞: 2×10^3 cells/well)



インキュベート (Overnight、37°C、5% CO₂)



LMF、LMF-CG、**ゲムシタビン(GEM)**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)

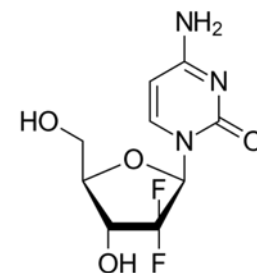


プレートリーダーで測定 (WST-1)

ゲムシタビン(GEM)

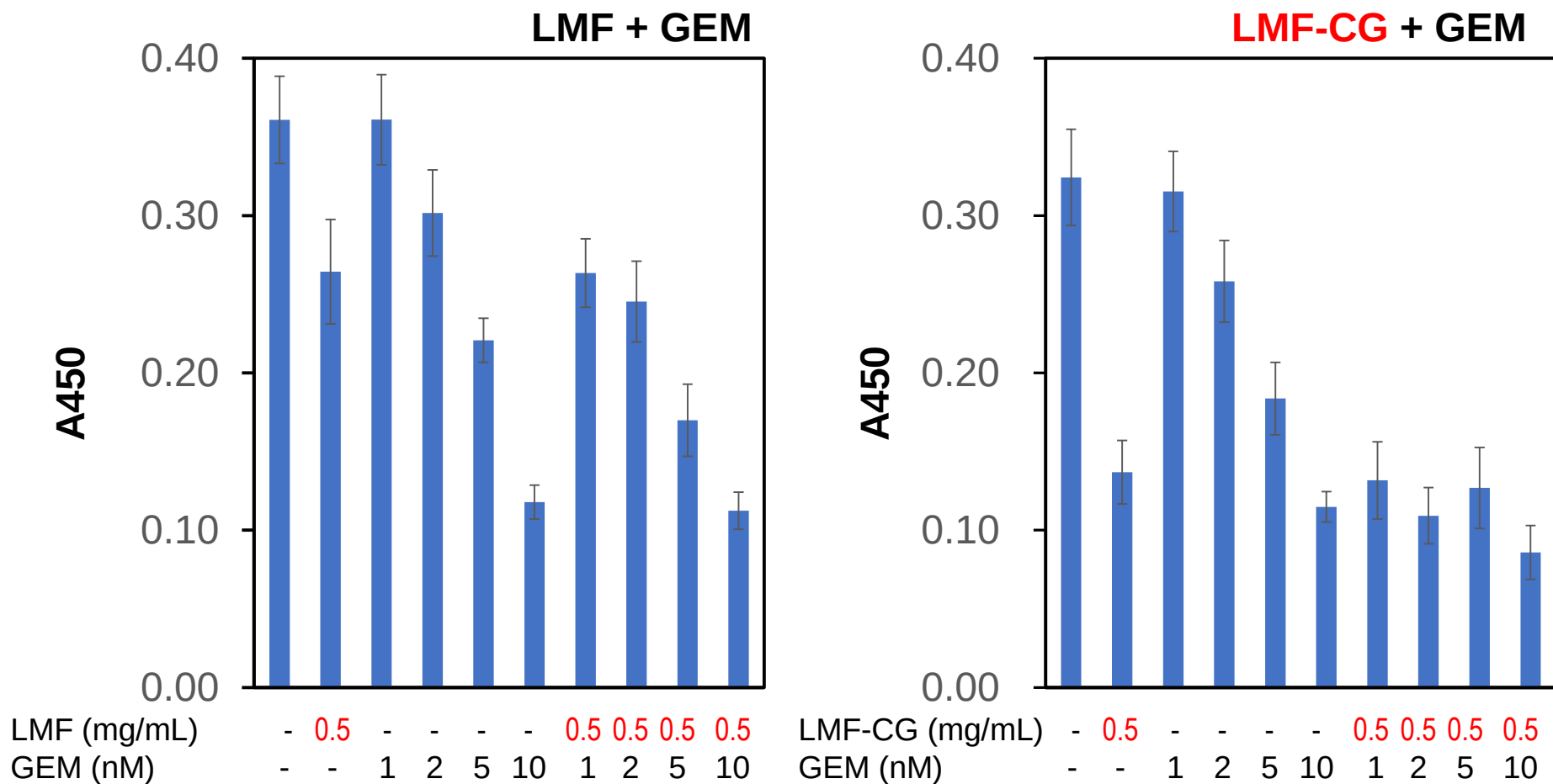
代謝拮抗剤

ピリミジンアナログ



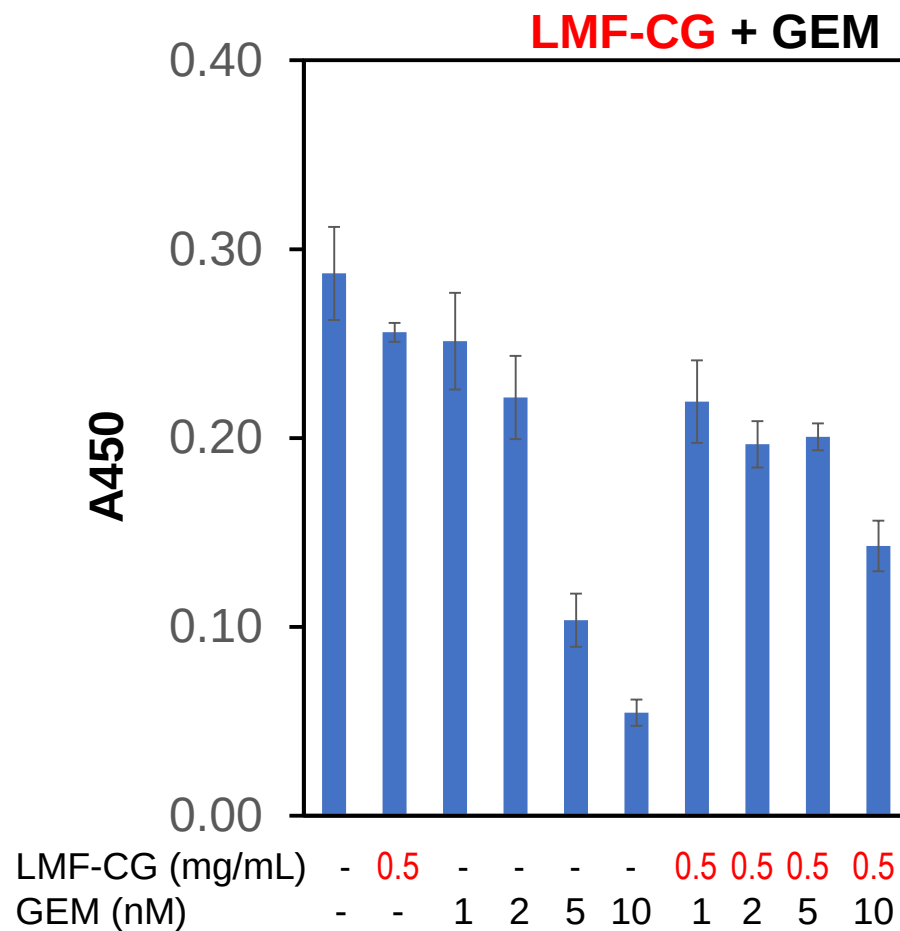
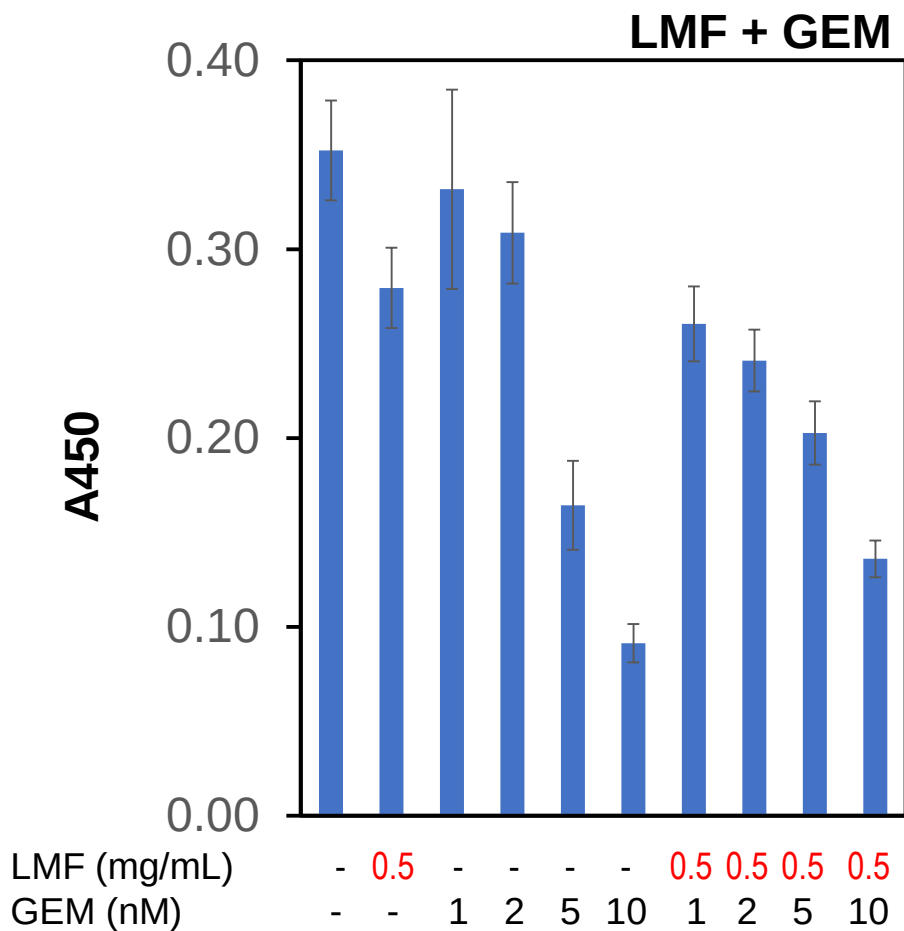
LMF-CGとGEM併用によるがん細胞死誘導効果

HT1080細胞(線維肉腫由来):3日間処理



LMF-CGとGEM併用によるがん細胞死誘導効果

TIG-1細胞(正常線維芽細胞):3日間処理



まとめ

- HT1080細胞より作成したがん細胞スフェロイドにおいてLMFとCBDCA併用による細胞死誘導効果が確認された。
- LMF処理はHT1080細胞にがん細胞悪性化関連遺伝子の発現を良性方向に変化させた。
- LMFの低濃度処理でPD-L1の発現低下が確認された。
- LMF-CGと抗がん剤（パクリタキセル、ドキソルビシン、ゲムシタビン）併用によるがん細胞死誘導増強効果が確認された。感受性は抗がん剤やがん細胞の種類により異なることが確認された。

今後の予定

- 担がんマウスにおけるLMF(LMF-CG)の効果
- LMF(LMF-CG)と抗がん剤の併用効果

抗がん剤種類: マイトマイシンC(MMC)、シスプラチン(CDDP)、カルボプラチン(CBDCA)、フルオロウラシル(5-FU)、シタラビン(Ara-C)、ゲムシタビン(GEM)、ドキシソルビシン(DXR)、エトポシド(VP-16)、パクリタキセル(TXL)

細胞種類: 肺がん、乳がん、卵巣がん、膵がん、大腸がん、肝がん、胃がん、白血病、線維肉腫

- がん幹細胞に対する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
- 皮膚創傷治癒過程に対するLMFの効果