

33

助成番号 0133

海洋性藻類由来血管新生抑制多糖の探索及び作用解析に関する研究

助成研究者：松原 主典(岡山県立大学保健福祉学部栄養学科)

共同研究者：森 將晏(岡山県立大学保健福祉学部看護学科)

海洋性藻類(海藻)は高塩濃度という特殊な環境下で生息しているため、陸上植物には見られない特異な生体成分を有している。そのため、新規生理活性物質や医薬品のリード化合物資源として注目されている。海藻成分の内、海藻多糖類はゲル化剤や増粘剤として最も良く利用されている。また、コレステロール低下作用や血液凝固抑制作用等の生理活性作用も有していることから、機能性食品素材としての応用が期待されている。これら生理作用を有する海藻多糖類のほとんどが酸性多糖類である。最近、酸性多糖類の新規生理作用として高い関心を集めているのが血管新生抑制作用である。血管新生とは、既存の血管から新しい血管を形成することで、がんの成長に必要な栄養を供給するためにがん組織で起きることは良く知られている。血管新生抑制物質は、がんの予防や治療をはじめ血管新生を伴う種々の疾患治療に応用できるため、その探索が世界中で盛んに行われている。海藻には多種多様な酸性多糖類が存在することから、血管新生抑制作用を有する多糖類の資源として有望であると考えられる。本研究では、血管新生抑制作用を有する海藻多糖の探索を行い、その作用機構を明らかにすることを目的に研究を行った。

海藻には、多種多様な酸性多糖類が存在するために、その全てについて血管新生抑制作用を検討することは極めて困難である。そこで、血液凝固抑制作用を有する酸性多糖に焦点を絞り検討した。今回の研究では血液凝固抑制作用を示した3種類の海藻、イギス、シオグサ、ナガミルから抗血液凝固多糖類を調製し、血管新生抑制作用を検討した。血管新生測定方法は、ラット動脈片をコラーゲンゲル中で培養し生じる微小血管の長さを比較することにより検討した。本血管新生測定方法において、ナガミル由来抗血液凝固多糖は微小血管の成長を抑制した。一方、イギス及びシオグサ由来抗血液凝固多糖は微小血管の成長に影響を与えなかった。次に、*in vitro* 血管形成のモデルであるヒト血管内皮細胞(HUVEC)の管腔形成への影響を検討した。ナガミル由来抗血液凝固多糖のみがHUVECの管腔形成を阻害し、先ほどの結果と一致した。ナガミル由来抗血液凝固多糖のHUVEC増殖への影響を検討したが、明確な抑制作用は見られなかった。従って、ナガミル由来抗血液凝固多糖による血管新生抑制は、主として血管内皮細胞の管腔形成阻害によるものと推察された。

本研究により、海藻多糖類は血管新生抑制物質資源として有用であることが示された。現在、引き続き血管新生抑制作用を有する海藻多糖類を探索すると共に、ナガミル由来抗血液凝固多糖の構造と生物活性との相関について検討している。

3 3

助成番号 0133

海洋性藻類由来血管新生抑制多糖の探索及び作用解析に関する研究

助成研究者：松原 主典 (岡山県立大学保健福祉学部栄養学科)

共同研究者：森 將晏 (岡山県立大学保健福祉学部看護学科)

1. 研究目的

海洋性藻類は高塩濃度という特殊な環境下で生息しているため、陸上植物には無い特異な生体成分を有している。そのため、新規生理活性物質や医薬品のリード化合物資源として注目されている。また、日本を含む東アジア地域では大型海洋性藻類(以下、海藻)を食糧資源として利用しており、最近では健康食品素材として注目されている。

研究助成者らは、海藻に含まれている血液凝固・線溶系に作用する生理活性物質について研究を行ってきた。その結果、血小板凝集阻害物質¹⁾、血栓溶解酵素²⁻⁴⁾、抗血液凝固多糖類^{5, 6)}等を見出した。血液凝固・線溶系とがんとの関連性は高く、がん患者において血液凝固・線溶系の異状が起きること、がん細胞の成長・転移において線溶系酵素が重要な役割を果たすこと等はよく知られている⁷⁾。最近では、血栓溶解酵素プラスミンの前駆体プラスミノーゲンのフラグメント(アンジオスタチン)による血管新生抑制作用が報告され注目されている⁸⁾。がん細胞は正常細胞に比べ急速に成長するために大量の栄養素や酸素を必要とし、それらを供給するためにがん組織の周囲に新しい血管を形成する(血管新生)。がんによる血管新生を抑制すれば、がんは十分な栄養分が得られず、成長できない状態になる(休眠状態)。この血管新生抑制方法は、がん治療方法の一つとして脚光を浴びており⁹⁾、血管新生抑制物質の探索が盛んに行われている。血管新生抑制物質の一つとして酸性多糖類が知られている。海藻には多様な酸性多糖類が存在することから、血管新生抑制作用を有する多糖類資源として有望であると考えられる。しかし、海藻多糖類の血管新生抑制作用に関する研究はあまり行われてこなかった。

そこで、本研究では血管新生抑制作用を有する新規多糖を海藻から見出すと共に、その作用機構をヒト血管内皮細胞を用いて明らかにすることを目的とした。

2. 研究方法

海藻より抽出、分画した多糖類の全てについて血管新生抑制作用をスクリーニングすることは、困難である。そこで、まず血液凝固を抑制する酸性多糖類を分画し、それらについて血管新生抑制作用を検討した。

2.1. 抗血液凝固多糖類の調製

凍結乾燥し、粉末化した各種海藻試料に10もしくは20倍容の蒸留水を加え、多糖類を抽出した。抽出液は遠心分離により不溶物を除き、粗抽出液とした。この粗抽出液の抗

血液凝固作用について、フィブリノーゲンとトロンピンを用いて血液凝固測定装置 (SANCLLOT ST, 三光純薬) で測定した。抗凝固作用を示した試料については、更にDEAE イオン交換クロマトグラフィーとゲルろ過により抗凝固多糖を分画した。分画した抗凝固多糖は、セルロースアセテート膜電気泳動により単一性を確認すると共に GC-MS (QP-5000, 島津) により中性糖組成を測定した。APTT, PT, TTについては、正常ヒト血漿と各凝固測定試薬 (三光純薬) あるいはヒトトロンピン (Sigma) を使用して血液凝固測定装置で測定した。

2.2. ラット動脈片を用いた血管新生抑制作用の測定

共同研究者の森らが報告したラット動脈片をコラーゲンゲル中で培養する血管新生測定方法^{10, 11)}に従い、単離した海藻多糖の血管新生抑制作用を検討した。ラットより胸部大動脈を取り出し、培養液 (RPMI 1640, Gibco) で血液などを洗い流した後、動脈を 1-1.5mm の長さに切断した。この動脈片を 6 ウェル培養プレートに移し、コラーゲンゲル溶液 (Cellmatrix Ia, 新田ゼラチン, 10 X Eagle's MEM, Gibco, 80 mM NaOH+200 mM HEPES を 8 : 1 : 1 で混合したもの) を加え、37°C でゲル化させた。ゲル化後、培養液 (1% ITS+, Becton Dickinson Labware を含む RPMI 1640) を 2 ml 加えた。試料溶液はコラーゲン溶液あるいは培養液に加えた。培養は CO₂ インキュベーター中で 2 週間行い、培養液は 7 日目に交換した。5、7、10、14 日目に倒立顕微鏡下でデジタルカメラ (COOLPICKS 950, ニコン) を用いて撮影した。データをコンピューターに移し、画像ソフトにより生じた微小血管の平均の長さを測定し、比較検討した。

2.3. ヒト血管内皮細胞の管腔形成への影響

ヒト血管内皮細胞はヒトさい帯静脈由来血管内皮細胞 (human umbilical vein endothelial cells, HUVEC) を HuMedia EG2 (クラボウ) 培地で 2 もしくは 3 代継代培養したものを使用した。96 ウェル培養プレートに再構成基底膜ゲル溶液 (Chemicon International, Inc.) を 50 μ l 加え、CO₂ インキュベーター中で十分にゲル化させた。HUVEC を 1×10^3 cells/ml になるように、種々の濃度の海藻多糖を含む HuMedia EG2 培養液で調製した。この細胞懸濁液 100 μ l を再構成基底膜ゲル上加え、CO₂ インキュベーター中で 12 時間培養した。HUVEC の管腔形成は倒立顕微鏡下でデジタルカメラを用いて撮影した。データをコンピューターに移し、画像ソフトにより形成された管腔の長さを測定し、比較検討した。

2.4. ヒト血管内皮細胞増殖への影響

HUVEC を 1.25×10^4 cells/ml になるように、0 - 30 μ g/ml 濃度の海藻多糖を含む HuMedia EG2 培養液で調製した。この細胞懸濁液 100 μ l を 96 ウェル培養プレートに巻き、CO₂ インキュベーター中で 4 日培養した。培地交換は一日おきに行った。細胞数は WST-1 ホルマザン法 (Cell Counting Kit, 同仁化学研究所) により測定した。

3. 実験結果

今回の研究では血液凝固抑制作用を示した3種類の海藻、イギス (*Ceramium kondoi*)、シオグサ (*Cladophora rudolphiana*)、ナガミル (*Codium cylindricum*) から抗血液凝固多糖類を調製し、血管新生抑制作用を検討した。

3.1. ラット動脈片を用いた血管新生への影響

精製した各海藻多糖を 0 - 10 $\mu\text{g/ml}$ になるようにコラーゲンゲルに加え、ラット動脈片を培養し微小血管の形成を比較検討した。海藻多糖を含まないコントロールでは、培養5日目頃にラット動脈片の端から微小血管が生じ、成長していった。コントロールに比べナガミル由来抗血液凝固多糖を含むゲル中では、微小血管の成長が明らかに抑制された (Fig. 1, 2)。一方、イギス及びシオグサ由来抗血液凝固多糖は微小血管の成長抑制作用を示さなかった (Fig. 1)。

3.2. ヒト血管内皮細胞の管腔形成への影響

HUVEC を 0 - 30 $\mu\text{g/ml}$ の海藻多糖を含む培地に分散し、再構成基底膜ゲル上に巻き管腔形成への影響を検討した。コントロールでは、HUVEC が管腔様構造を形成し、網目状になった。ナガミル由来抗血液凝固多糖は HUVEC の管腔形成を阻害したが、イギス及びシオグサ由来抗血液凝固多糖類は抑制作用を示さなかった (Fig. 3)。ナガミル由来抗血液凝固多糖は、HUVEC の管腔形成をほぼ濃度依存的に阻害した (Fig. 4, 5)。

3.3. ヒト血管内皮細胞増殖への影響

HUVEC を 0 - 30 $\mu\text{g/ml}$ のナガミル由来抗血液凝固多糖を含む培地で培養し、HUVEC 増殖への影響を検討したが、明確な抑制作用は認められなかった。

3.4. ナガミル由来抗血液凝固多糖の生化学的性状

血管新生抑制作用を示したナガミル由来抗血液凝固多糖は、ガラクトースを主成分 (90 mol %) とする酸性多糖である。硫酸基は約 15%含まれていた。抗血液凝固作用は、APTT と TT では強い抗凝固作用を示したが、PT にはほとんど影響を与えなかった。また、糖の結合様式は、メチル化分析より分岐構造をもつ複雑なものと推測された。

4. 考察

本研究により、緑藻ナガミル由来の抗血液凝固多糖に血管新生抑制作用があることが明らかになった。これは、緑藻由来のものとしては初めてであり、褐藻や紅藻に比べ多糖類資源としての研究が遅れていた緑藻類の研究に弾みがつくものと思われる。ナガミル由来抗血液凝固多糖は HUVEC の管腔形成を強く阻害したことから、血管形成において重要な接着因子等の作用を阻害することによるものであると推察される。最近、ガレクチン-3 が血管新生に重要な役割を果たすことが報告されたこと¹²⁾、ナガミル由来抗血液凝固多糖は

ガラクトタンであることから、ガレクチン-3の機能をナガミル由来抗血液凝固多糖が阻害した可能性が考えられる。また、他のタイプのガレクチンが細胞増殖やその他の機能に参与していることも明らかにされつつあることから、ガレクチン-3以外のガレクチンへの影響も考えられる。ナガミル由来抗血液凝固多糖存在下での HUVEC の増殖を検討したが、明確な抑制作用は見られなかった。血管内皮細胞増殖には VEGE や bFGF が重要な役割を果たしていることから、ナガミル由来抗血液凝固多糖の血管内皮細胞増殖への影響についてはこれらの細胞成長因子との関連において、より詳細な検討が必要であると考えられる。しかし、今回の研究から、ナガミル由来抗血液凝固多糖の血管新生抑制作用は、主として血管内皮細胞の管腔形成阻害作用によるものであると考えられる。

5. 今後の課題

海藻由来の血管新生抑制多糖として知られているのはフコイダン^{13, 14)}と硫酸化ラミナリン¹⁵⁾のみであったが、今回の研究により緑藻ナガミル由来のガラクトタンも加わることになった。海藻には未解明の複雑な構造を持つ酸性多糖類がまだ多く存在していることから、継続的に血管新生抑制多糖を探索すれば新規な血管新生抑制多糖を見出すことができると思われる。また、本研究により血管新生抑制作用が明らかになったナガミル由来抗凝固多糖の詳細な化学構造と生物活性との関係を明らかにする必要がある。最終的には、*in vivo*での血管新生抑制作用を検討し、その有効性を示すことができれば医薬品リード化合物や機能性食品素材としての応用が期待できる。

参考文献

1. Matsubara, K., H. Sumi, and K. Hori. 1996. Platelet aggregation is inhibited by phycolectins. *Experientia* 52: 540-543.
2. Matsubara, K., H. Sumi, K. Hori, and K. Miyazawa. 1998. Purification and characterization of two fibrinolytic enzymes from a marine green alga, *Codium intricatum*. *Comp. Biochem. Physiol.* 119B: 177-181.
3. Matsubara, K., K. Hori, Y. Matsuura, and K. Miyazawa. 1999. A fibrinolytic enzyme from a marine green alga, *Codium latum*. *Phytochemistry* 52: 993-999.
4. Matsubara, K., Y. Matsuura, K. Hori, and K. Miyazawa. 2000. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme and identification of fibrinogen clotting enzyme in a marine green alga, *Codium divaricatum*. *Comp. Biochem. Physiol.* 125B: 137-143.
5. Matsubara, K., Y. Matsuura, K. Hori, and K. Miyazawa. 2000. An anticoagulant proteoglycan from the marine green alga, *Codium pugniformis*. *J. Appl. Phycol.* 12: 9-14.
6. Matsubara, K., Y. Matsuura, A. Bacic, M.L. Liao, K. Hori, and K. Miyazawa. 2001. Anticoagulant properties of a sulfated galactan preparation from a marine green alga, *Codium cylindricum*. *Int. J. Biol. Macromol.* 28: 395-399.

7. Rickles, F. R. and Falanga, A. 2001. Molecular basis for the relationship between thrombosis and cancer. *Thromb. Res.* **102**: V215-224.
8. O'Reilly, M.S., L. Holmgren, Y. Shing, C. Chen, R.A. Rosenthal, W.S. Lane, Y. Cao, E.H. Sage, and J. Folkman. 1994. Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell* **79**: 315-328.
9. Folkman, J. 1995. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat. Med.* **1**: 27-31.
10. Mori, M., Sadahira, Y., Kawasaki, S., Hayashi, T., Notohara, K. and Awai, M. 1988. Capillary growth from reversed rat aortic segments cultured in collagen gel. *Acta Pathol. Jpn.* **38**: 1503-1512.
11. Kawasaki, S., Mori, M. and Awai, M. 1989. Capillary growth of rat aortic segments cultured in collagen gel without serum. *Acta Pathol. Jpn.* **39**: 712-718.
12. Nangia-Makker, P., Y. Honjo, R. Sarvis, S. Akahani, V. Hogan, K.J. Pienta, and A. Raz. 2000. Galectin-3 induces endothelial cell morphogenesis and angiogenesis. *Am. J. Pathol.* **156**: 899-909.
13. Hahnenberger, R. and A. Jakobson. 1991. Antiangiogenic effect of sulphated and nonsulphated glycosaminoglycans and polysaccharides in the chick embryo chorioallantoic membrane. *Glycoconjugate J.* **8**: 350-353.
14. Soeda, S., Y. Shibata, and H. Shimeno. 1997. Inhibitory effect of oversulfated fucoidan on tube formation by human vascular endothelial cells. *Biol. Pharm. Bull.* **20**: 1131-1135.
15. Hoffman, R., D.H. Paper, J. Donaldson, and H. Vogl. 1996. Inhibition of angiogenesis and murine tumor growth by laminarin sulphate. *Br. J. Cancer* **73**: 1183-1186.

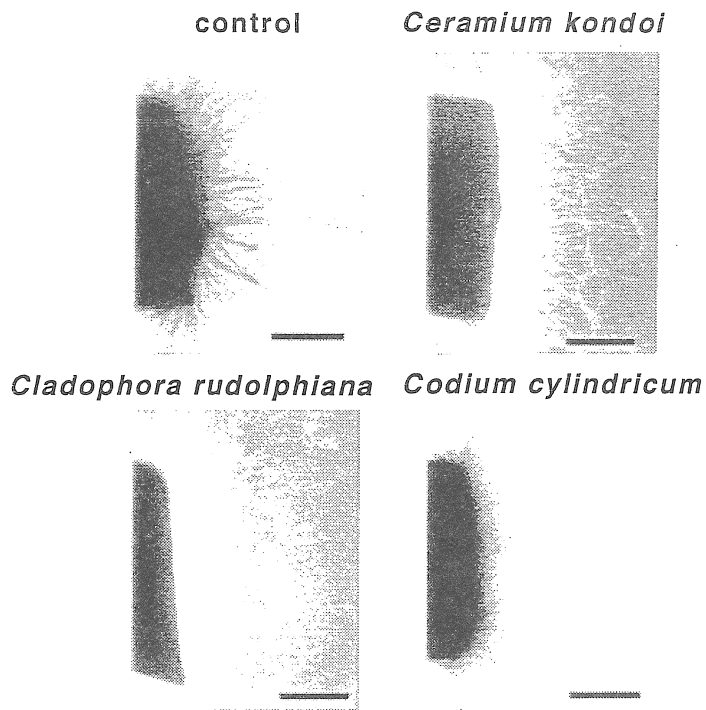


Fig. 1 Effect of algal anticoagulant polysaccharides (10 $\mu\text{g/ml}$) on angiogenesis in rat aortic ring assay.

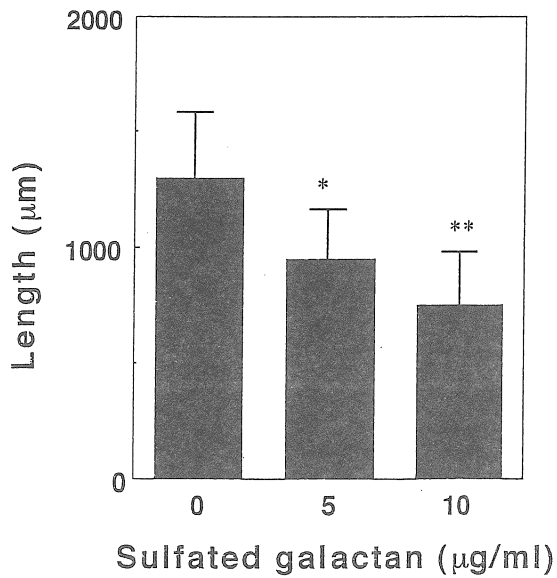


Fig. 2 Effect of sulfated galactan from *C. cylindricum* on angiogenesis in rat aortic ring assay.

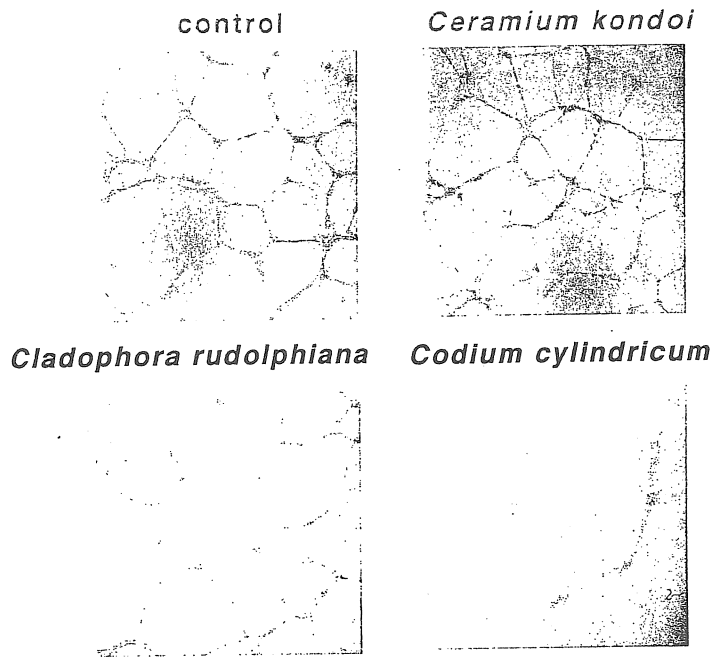


Fig. 3 Effect of algal anticoagulant polysaccharides (20 $\mu\text{g/ml}$) on HUVEC tube formation.

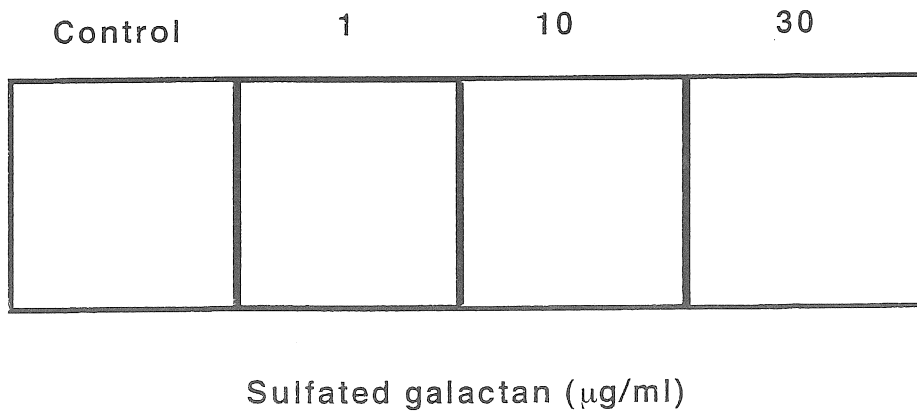


Fig. 4 Inhibition of HUVEC tube formation by sulfated galactan from *C. cylindricum*.

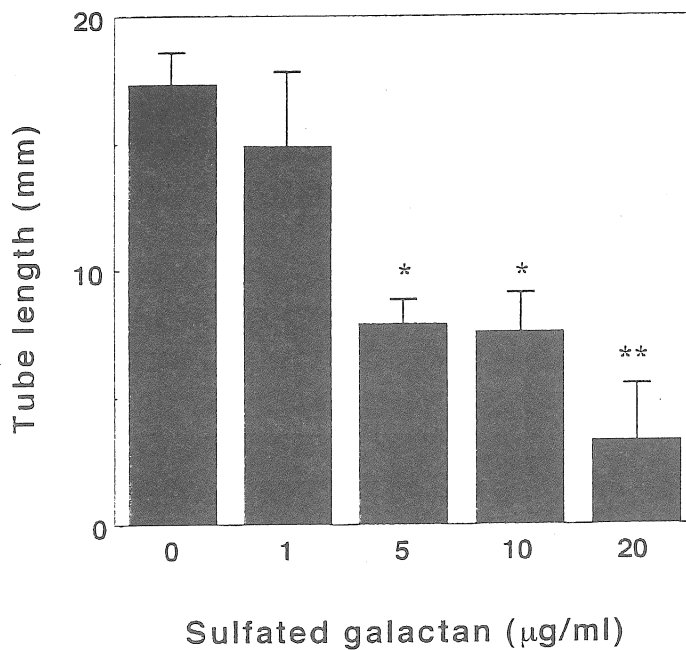


Fig. 5 Effect of sulfated galactan from *C. cylindricum* on HUVEC tube formation. Values are means \pm SD (n=3). Means with asterisk (*; $p < 0.05$) and double asterisk (**; $p < 0.01$) are significantly different from control.

Screening of antiangiogenic polysaccharides from marine algae and the mechanism of inhibitory effect

Kiminori Matsubara, Masaharu Mori

Departments of Nutritional Science and Nursing, Okayama Prefectural University

Summary

Angiogenesis is forming new blood vessels from existing blood vessel and has important role in physiological processes. In addition, angiogenesis is involved in several pathological conditions, including tumor growth and metastasis, atherosclerosis and diabetic retinopathy. Inhibitory agents for angiogenesis are very useful to prevent such diseases. Some sulfated polysaccharides are potent antiangiogenic agents. Marine algae have been recognized as valuable resource of sulfated polysaccharides and some of them have strong anticoagulant activity. However, there are few reports on their antiangiogenic effect. We screened the activity of anticoagulant polysaccharides isolated from marine algae using an *in vitro* rat aortic ring assay. Three anticoagulant polysaccharides were isolated, and one polysaccharide from a marine green alga, *Codium cylindricum* showed antiangiogenic activity. The anticoagulant was sulfated galactan. We also examined their effect on human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) tube formation assay. Sulfated galactan from *C. cylindricum* inhibited HUVEC tube formation, however others had no effect. The sulfated galactan completely inhibited HUVEC tube formation at 30 µg/ml. At the inhibitory concentrations on HUVEC tube formation, the sulfated galactan had almost no effect on HUVEC proliferation. Therefore, the sulfated galactan exerts its antiangiogenic activity through inhibiting endothelial cell tube formation. These results show that sulfated galactan from *C. cylindricum* could be a valuable algal polysaccharide to design new antiangiogenic agents and to be used as functional food material.