

海洋性藻類由来血管新生抑制多糖類の構造と機能に関する研究

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 将晏 (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、陸上植物には見られない特異な生体成分を有しているため、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。海藻成分のうち、海藻多糖類はゲル化剤や増粘剤として最も利用されている。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。更には、牛海綿状脳症(BSE)問題の影響により、動物由来コラーゲンやヘパリンの代替素材としても研究が進められている。これら海藻多糖類の新規生理作用として注目され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・転移をはじめ糖尿病性網膜症やリュウマチ等種々の病態悪化とも深く関連している。そのため血管新生抑制物質の探索は世界中で盛んに行われているが、我々は本財団助成により緑藻ミル属から初めて血管新生抑制多糖を見出した。本研究では、緑藻ミル属(ナガミル)由来血管新生抑制多糖の詳細な化学構造を決定すると共に、その構造と生物活性との関連を明らかにすることを目的に研究を行った。

前回報告した方法に従って、ナガミルから抗血液凝固多糖類(ガラクトサン)を調製した。更に、ゲルろ過を行い精製したところ、抗血液凝固多糖の二つのピークを得た(F-1, 2)。両多糖画分の血管新生抑制作用を検討した結果、血管新生抑制作用はF-1のみに認められ、F-2は同作用を示さなかった。両画分をメチル化分析したところ、F-1及びF-2の構成糖の結合は1, 3, 6-Gal, 1, 3, 4-Gal, 1, 3-Galの3種類であることが明らかになった。そして、脱硫酸化後のメチル化分析と比較した結果、1, 3, 6-GalのC4に硫酸基が結合していることが明らかになった。F-1とF-2の大きな違いは、1, 3-Galの量比であった。血管新生抑制作用を示さないF-2では、1, 3-Galの量が多く構造的にやや直鎖であり、そのことが血管新生抑制作用を示さない要因の一つであると考えられた。NMR分析の結果、本多糖類は α 結合のみであることが推定できた。更に、脱硫酸化後の抗血液凝固活性と血管新生抑制作用を検討したところ、F-1とF-2共に抗血液凝固活性を失った。また、F-1は脱硫酸化により著しく血管新生抑制作用が低下した。従って、本多糖類の硫酸基は生物活性を示す上で極めて重要であることが明らかになった。

本研究により、血管新生抑制作用を有するナガミル由来抗血液凝固多糖の化学構造と生物活性との関係が明らかになった。最近の研究から血管新生には幹細胞から分化した血管内皮細胞が関与していることが明らかになっている。そこで、本多糖が幹細胞から血管内皮細胞への分化に影響を与えるか否か発生工学的手法により検討を進めている。

29

助成番号 0229

海洋性藻類由来血管新生抑制多糖類の構造と機能に関する研究

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 将晏（岡山県立大学保健福祉学部看護学科）

1. 研究目的

高塩濃度という特殊な環境下で生息している海洋性藻類は、陸上植物には無い特異な生体成分を有しているため、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。更には、本財団の助成研究により、抗血液凝固多糖に血管新生抑制作用を見出し報告した⁷⁾。血管新生とは、既存の血管から新しい血管が生じる現象で、がんの成長・転移をはじめ、糖尿病性網膜症、リュウマチなど多くの病態悪化と深く関連していることから、血管新生抑制物質の探索は世界中で精力的に行われている。血管新生抑制作用を有する海藻多糖類は、フコイダン^{8、9)}、硫酸化ラミナリン¹⁰⁾、そして我々が見出したガラクトランのみである。しかし、これら海藻多糖類の血管新生抑制作用機構は十分には明らかにされていない。また、その構造と活性との相関についてもほとんど検討されていない。そこで、本研究では、我々が見出した新規ガラクトランの血管新生抑制機構をその構造との関連で明らかにすることを目的とした。

2. 研究方法

血管新生抑制作用を有する海藻多糖（ガラクトラン）を緑藻ナガミル（*Codium cylindricum*）から精製する。そして、メチル化分析、FT-IR、NMRによりその化学構造を決定し、化学構造と機能相関について検討した。

2.1. 血管新生抑制多糖の精製

凍結乾燥したナガミル（*Codium cylindricum*）を粉末化し、10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。この粗抽出液をDEAE-イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過により分画した。ナガミル由来血管新生抑制多糖は抗血液凝固作用を有することから、抗血液凝固作用を指標に分画した。抗血液凝固作用は、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（SANCLUST, 三光純薬）で測定した。分画した抗血液凝固多糖は、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。多糖の抗血液凝固活性（APTT）については、正常ヒト血漿と凝固測定試薬（三光純薬）を使用して血液凝固測定装置で測定した。

2.2. *In vitro* 血管新生測定

ナガミル由来血管新生抑制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によるものであることが明らかとなっていることから、ヒト血管内皮細胞を用いた *in vitro* 管腔形成モデルを使用した。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から5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 1×10^5 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。

2.3. 血管新生抑制多糖の構造解析

血管新生抑制多糖のメチル化は、NaOH-ヨードメチル法により行った。メチル化多糖はトリフルオロ酢酸（TFA）で加水分解し、アセチル化後 GC-MS（QP-5000, 島津）により測定した。主な構成糖であるガラクトースの立体配置は、D-ガラクトース脱水素酵素を用いて確定した。FT-IR は全反射吸収法により JIR-SPX60 で測定した。NMR は ¹H、¹³C、HMQC を JNM-ECA400 により測定した。

2.4. 脱硫酸多糖の生物活性

メタノール-塩酸法により海藻多糖の硫酸基を除いた。脱硫酸した多糖の抗血液凝固活性と血管新生抑制作用を上述した方法により検討した。

3. 実験結果

緑藻ナガミル（*Codium cylindricum*）から血管新生抑制作用を有する抗血液凝固多糖を精製し、その化学構造解析を行った。また、同多糖に存在する硫酸基の生物活性における役割を検討した。

3.1. 血管新生抑制多糖の精製

抗血液凝固活性を指標に緑藻ナガミル（*Codium cylindricum*）から抗血液凝固多糖を精製した。ゲルろ過において抗血液凝固活性が二つのピークとして現れたので、高分子量

製した。ゲルろ過において抗血液凝固活性が二つのピークとして現れたので、高分子量側を F-1、低分子量側を F-2 とした (Fig 1)。F-1 と F-2 の抗血液凝固作用と血管新生抑制作用を検討したところ、抗血液凝固活性は F-1 の方がやや強いことが分かった (Table 1)。一方、血管新生抑制作用については F-1 のみに認められ、F-2 には同活性が見られなかった (Fig 2)。両者は共にガラクトサンであることから、その構造の違いが生物活性の差に繋がっているものと考えられた。

3.2. ナガミル由来ガラクタンの化学構造

ナガミル由来ガラタン F-1, 2 をメチル化分析した。また、脱硫酸化したものについても同様にメチル化分析した。その結果を Table 2 にまとめた。F-1 と F-2 の構造上の共通点は、1,3,6-Gal, 1,3,4-Gal, 1,3-Gal の3種類の結合により構成されていること、1,3,6-Gal のC4に硫酸基が結合していることである。硫酸基の結合位置に関しては、FT-IR 測定の結果とも矛盾しないことが確認できた (Fig 3)。また、量的には少ないがC4とC6に硫酸基が結合した1,3-Gal もあると推察された。一方、大きな違いは、F-2 には1,3-Gal が多いことである。なお、これらガラタンにはカラギーナンで見られる3,6-anhydro 体は存在していなかった。また、加水分解して得られた Gal を D-ガラクトース脱水素酵素にて反応させたところ、完全に脱水素反応を受けた。また、NMR による分析から本ガラタンは α 結合したガラクトースから構成されていると推察できた (Fig 4)。以上の結果から、本ガラタンの基本的な化学構造は Fig 5 に示す通りであると推察された。

3.3. 化学構造と生物活性

化学構造と生物活性との関連性を検討した。まず、硫酸基の有無と抗血液凝固活性、そして、血管新生抑制作用との関連について検討した。F-1 及び F-2 共に脱硫酸化することにより完全に抗血液凝固活性が消失した (Table 1)。また、F-1 の血管新生抑制作用も脱硫酸化により消失した (Fig 2)。従って、ナガミル由来抗血液凝固多糖の生物活性は硫酸基が重要であることが明らかとなった。また、F-1 は血管新生抑制作用を有するが、F-2 には同活性が認められなかったことから、血管新生抑制作用には1,3-Gal の割合が少ない複雑な分岐構造が必要であると考えられた。

4. 考察

研究助成者らは、昨年度本財団の助成研究により緑藻ナガミル由来抗血液凝固多糖に血管新生抑制作用があることを明らかにし報告した⁷⁾。海藻多糖類の血管新生抑制作用についての報告はまだ少なく、研究助成者らの報告は緑藻由来としては最初のものである。本研究では、その多糖の詳細な化学構造と生物活性との相関について検討した結果、基本的な化学構造をほぼ解明できた。本多糖は、D-ガラクトースが α 結合し、分岐構造をした多糖であることが明らかとなった。また、抗血液凝固活性と血管新生抑制作用の

機能発現には、硫酸基が必須であることも明らかとなった。本多糖の血管新生抑制機構として、血管内皮細胞による血管様の管腔形成を阻害することが昨年度の研究により明らかになっている⁷⁾。その分子機構として、血管形成における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ていた。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、その標的分子として血管新生に重要な役割を果たすガレクチン-3¹¹⁾の機能阻害が考えられた。しかし、ガレクチン-3は β -ガラクトシドを認識すること、ナガミル由来ガラクトタンは α 結合のみで β 結合したガラクトースを含まないこと、そして脱硫酸化により血管形成阻害作用を失うことから、ガレクチン-3は本多糖により機能阻害を受けないと考えられた。従って、本多糖による血管新生抑制機構は未同定の作用機序によるものであると考えられる。

5. 今後の課題

血管新生抑制作用を有する海藻多糖として緑藻から初めて見いだされたナガミル由来ガラクタンの化学構造がほぼ明らかとなった。しかし、その作用機構については更に分子レベルでの解析が必要である。また、最近の研究から血管新生には前駆細胞から分化した血管内皮細胞が関与していることが明らかとなったことから¹²⁻¹⁴⁾、血管新生抑制作用を有する海藻多糖が幹細胞から血管内皮細胞への分化を抑制するかどうか検討することも重要である。海藻多糖類はゲル化剤、増粘剤、安定化剤として食品、化粧品、医薬品工業に広く使われてきているが、最近、牛海綿状脳症 (BSE) 問題で動物由来へパリンやコラーゲンの代替素材としても注目されている。海藻多糖類の新規機能を明らかにすることにより、その応用性が高まることが期待される¹⁵⁾。

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. Matsubara, K., M. Mori, H. Matsumoto, K. Hori, and K. Miyazawa. 2003. Antiangiogenic properties of a sulfated galactan isolated from a marine green alga, *Codium cylindricum*. *J. Appl. Phycol.* **15**: 87-90.
8. 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.
9. 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.
10. Hoffnan, 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.
11. 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.
12. Asahara, T., T. Murohara, A. Sullivan, M. Silver, R. van der Zee, T. Li, B. Witzenbichler, G. Schatteman, and J.M. Isner. 1997. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* **275**: 964-966.
13. Nishikawa, S.I., S. Nishikawa, M. Hirashima, N. Matsuyoshi, and H. Kodama. 1998. Progressive lineage analysis by cell sorting and culture identifies FLK1+VE-cadherin+ cells at a diverging point of endothelial and hemopoietic lineage. *Development* **125**: 1747-1757.
14. Reyes, M., A. Dudek, B. Jahagirdar, L. Koodie, P.H. Marker, and C.M. Verfaillie. 2002. Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow. *J. Clin. Invest.* **109**: 337-346.
15. Matsubara, K. 2003. Anticoagulants from marine algae. In *Recent Advances in Marine Biotechnology*, volume 9; *Biomaterials and Bioprocessing*, pp 127-141, M. Fingerman and R. Nagabhushanam eds, Science Publishers, New Hampshire (USA).

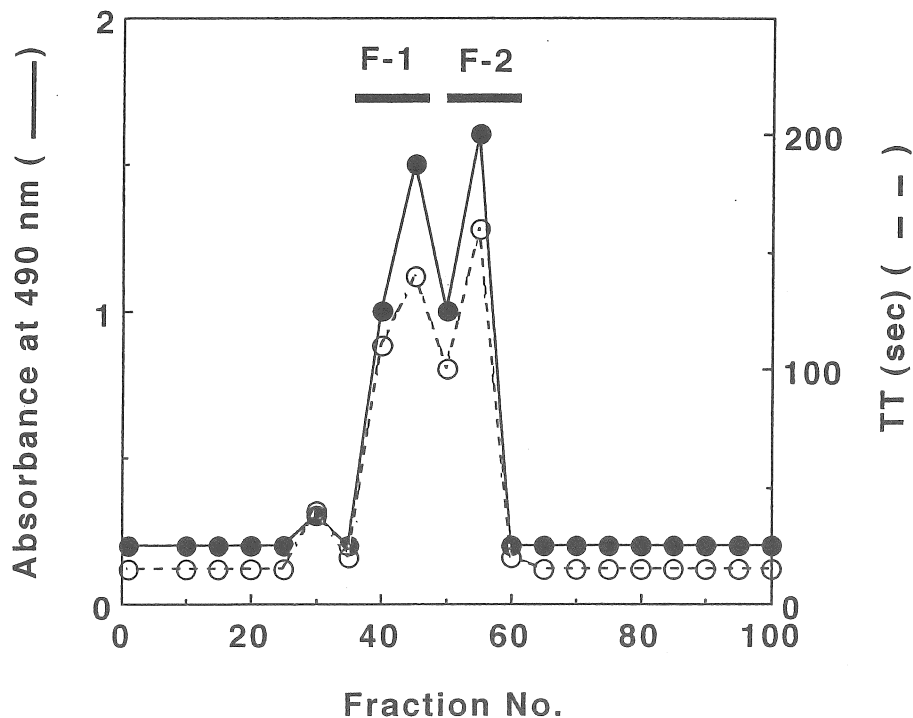


Fig 1 Gel filtration of anticoagulant polysaccharide from *C. cylindricum* on Sephacryl S-400 (2.4 cm X 95 cm).

Table 1 Anticoagulant activity of *C. cylindricum* anticoagulants and their desulfated forms. The final concentrations of the polysaccharides were 10 µg/ml.

| | APTT (sec) |
|----------------|------------|
| Control | 30.9 |
| F-1 | 195.4 |
| Desulfated F-1 | 31.1 |
| F-2 | 90.5 |
| Desulfated F-2 | 31.1 |

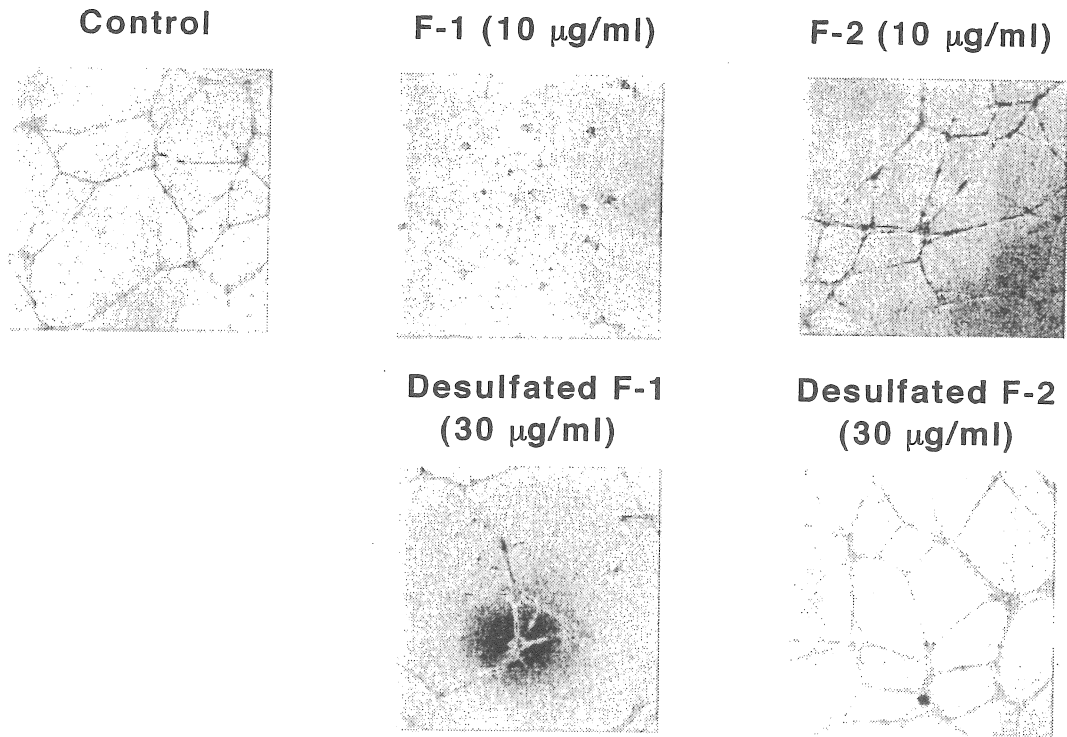


Fig 2 Effect of the galactans on in vitro angiogenesis assay (HUVEC tube formation).

Table 2 Linkage analysis of *C. cylindricum* galactans.

| Deduced linkage | mol % | | | |
|-----------------|--------|------------|--------|------------|
| | F-1 | | F-2 | |
| | Native | Desulfated | Native | Desulfated |
| Galp | | | | |
| 1, 3, 4, 6- | 37 | 0 | 22 | 2 |
| 1, 3, 6 - | 2 | 23 | 0 | 14 |
| 1, 3, 4 - | 49 | 43 | 61 | 41 |
| 1, 3 - | 10 | 26 | 17 | 43 |
| Others | 2 | 8 | 0 | 0 |

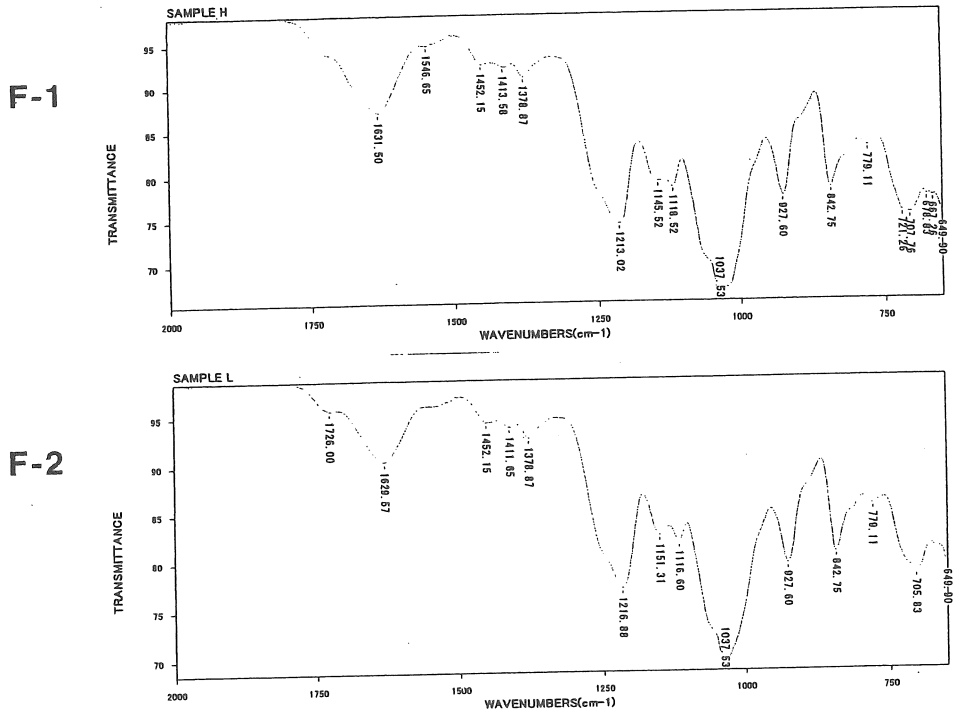


Fig 3 Infrared absorption spectrum of galactans (F-1 and F-2)

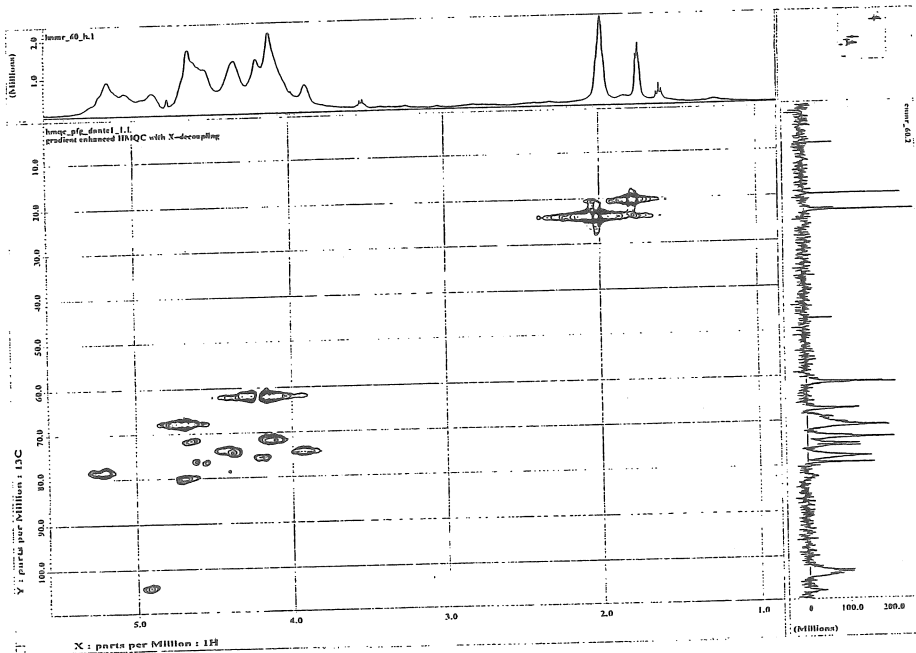


Fig 4 HMQC spectrum of antiangiogenic galactan (F-1)

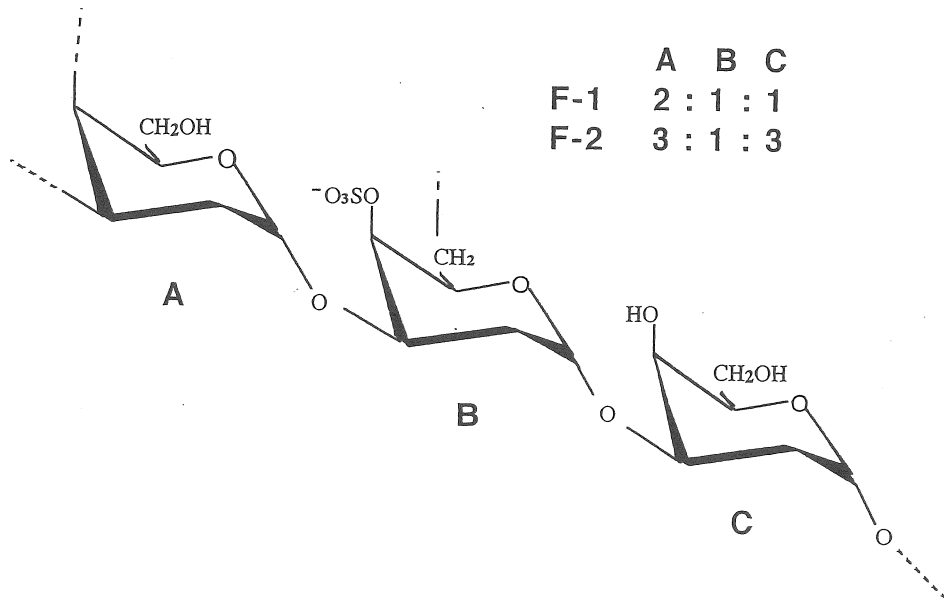


Fig 5 Structure of the sulfated galactan of *C. cylindricum*.

Structural analysis of antiangiogenic algal polysaccharide, and the relationship between the structure and biological function

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 an 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 found the activity of anticoagulant polysaccharides from a marine green alga, *Codium cylindricum*. The anticoagulant was sulfated galactan. The fraction was separated into two fractions, F-1 and F-2, on gel filtration. F-1 had both anticoagulant and antiangiogenic activities, however F-2 had only anticoagulant activity. Linkage analysis of the polysaccharides revealed that the polysaccharides were composed of 3, 6 -, 3, 4 -, and 3 - galactosyl residues, and 3, 6 - galactosyl residue was sulfated. They had no 3, 6 - anhydro galactosyl residue. F-2 had higher amount of 3 - galactosyl residue than F-1. Thus, F-1 had more complex structure than F-2, and this difference would affect their antiangiogenic activity. Desulfated F-1 and F-2 lost the anticoagulant activity, and the antiangiogenic activity of desulfated F-1 also disappeared. Therefore, the sulfate modification is critical to exert their biological activities. In this study, we clearly demonstrate the relationship between the structure of antiangiogenic polysaccharide and its activity.