

発表番号 36 (0323)

海洋性藻類由来血管新生抑制多糖類の ES 細胞分化系における作用

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)

高塩濃度という特殊な環境で生息している海洋性藻類(海藻)は、新規生理活性物質や医薬品のリード化合物資源として研究されている。また、海藻に多く含まれている多糖類はゲル化剤や増粘剤として広く利用されている。海藻多糖類には、コレステロール低下作用や血液凝固抑制作用等の生理作用があることが知られており、機能性食品素材としての研究も進められている。海藻多糖類の新規生理作用として血管新生抑制作用が最近注目されている。血管新生抑制物質は、がんの成長・転移、糖尿病性網膜症、リュウマチ等種々の病態悪化を抑えることができ、最近では肥満予防やアルツハイマー病の予防にも有効であることが示唆されている。我々は本財団助成により緑藻ミル属のナガミル(*Codium cylindricum*)から初めて血管新生抑制多糖を見出し、その詳細な化学構造解析を行い、構造と生物活性との相関を明らかにしてきた。一方、血管新生には体内を循環している血管前駆細胞が関与していることが明らかになってきている。そこで、血管新生抑制物質がこれら血管前駆細胞からの血管形成に与える影響を検討する必要がある。本研究では、マウス胚性幹細胞(embryonic stem cells, ES 細胞)を用いた発生工学的手法により、ES 細胞からの血管形成系におけるナガミル由来血管新生抑制多糖の影響を検討した。

ナガミル由来血管新生抑制多糖は既に報告した方法により精製した。マウス ES 細胞からの血管形成方法として、まず ES 細胞から胚様体(embryoid body, EB)を形成した。そして、EB をコラーゲンコートした培養プレートに移して血管形成を行った。EB を固定化後、蛍光標識した血管内皮細胞特異的抗体 anti-CD31 を用いて染色し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。また、EB をコラーゲンゲル中に包埋し、EB から生じる微小血管への影響についても検討した。その結果、ナガミル由来血管新生抑制多糖は 5 μ g/ml 以上の濃度で ES 細胞からの血管形成を抑制することが明らかとなった。また、コラーゲンゲルに包埋した EB からの血管形成も抑制することが明らかとなった。

本研究により、ナガミル由来血管新生抑制多糖は幹細胞からの血管形成も抑制することが明らかとなった。しかし、本多糖が前駆細胞からの血管内皮細胞への分化効率に影響を与えるか否かについては、今回の実験では明らかにできなかった。今後、フローサイトメトリーや FACS を利用した測定系を確立し、分化効率への影響についても明らかにしたい。また、本財団の助成により得られた知見をもとに、海洋生物資源の有効利用研究をさらに発展させたいと考えている。

24

助成番号 0323

海洋性藻類由来血管新生抑制多糖類のES細胞分化系における作用

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

研究助成者らは、海洋という特殊な環境に生育する大型藻類（以下、海藻）に含まれる血液凝固・線溶系および血管に作用する生理活性物質について研究を行ってきた¹⁾。そして、本財団の研究助成により緑藻類より初めて血管新生抑制多糖を見出し²⁾、その化学構造と生物活性との相関についても明らかにしてきた³⁾。血管新生はがんの成長・転移をはじめ糖尿病性網膜症やリュウマチ、そして最近では生活習慣病の原因となる肥満にも関係していることが明らかになり^{4、5)}、血管新生抑制物質によるそれらの疾病予防が期待されている。本財団の助成により明らかになったナガミル由来血管新生抑制多糖は硫酸化ガラクトサンであり、その作用機構は血管内皮細胞の管腔形成阻害によるものであることが判明している。最近、血管新生には体内を循環している血管前駆細胞が関与していることが明らかになっている⁶⁾。そこで、血管新生を抑制するには血管前駆細胞からの血管形成も抑制する必要がある⁷⁾。従来の *in vitro* 血管新生測定系では、既に分化した血管あるいは血管内皮細胞を使用しているために、血管前駆細胞からの血管形成阻害については検討できない。一方、血液中から血管前駆細胞を取り出して検討することは極めて困難である。そこで、胚性幹細胞からの血管形成系を用いれば、血管前駆細胞からの血管形成への影響について検討することは可能である。本研究では、研究助成者らが見出した血管新生抑制作用を有する緑藻ナガミル由来硫酸化ガラクトサンについて、マウス胚性幹細胞（ES細胞）を用いた血管形成系における作用を検討した。

2. 研究方法

血管発生モデルとしてES細胞からの血管形成を用いて、血管新生抑制作用を有する緑藻ナガミル (*Codium cylindricum*) 由来硫酸化ガラクトサンの血管形成に与える影響について検討した。

2.1. 血管新生抑制硫酸化ガラクトサン

血管新生抑制作用を有する硫酸化ガラクトサンは、既に報告した方法により凍結乾燥したナガミル (*Codium cylindricum*) から抽出・精製した²⁾。

2.2. ES 細胞からの血管形成

マウス ES 細胞(129SV)は大日本製薬より購入した。分化誘導培地は 10% FBS (Sigma), 10 ng/ml VEGF (R&D systems), 0.1 mM 2-mercaptoethanol, 50 U/ml penicillin, 50 µg/ml streptomycin を含むαMEM (Gibco)を用いた。ES 細胞から血管を形成させる方法として、ES 細胞の集合体である胚様体 (embryoid body, EB) を形成させ、その EB 中で血管形成を行う方法を用いた⁸⁾。つまり、ES 細胞を分化誘導培地に分散し、ハンギングドロップ法 (5×10^3 cells/drop) により EB を形成させた。次に、これらの EB を type I コラーゲンをコートした培養プレートに移し、さらに 5-8 日間培養を続け血管形成を誘導した (Fig. 1)。培養終了後、EB をエタノール/アセトンで固定し、蛍光標識した抗 platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1, CD31)で染色し、共焦点レーザー顕微鏡 (Carl Zeiss LSM 410) にて血管形成を観察した。なお、血管新生抑制多糖は EB をコラーゲンコートした培養プレートに移し 1 日培養後に加えた。また、EB をコラーゲン type I ゲル (新田ゼラチン) 中に包埋し、EB から生じる血管形成法も検討した⁹⁾ (Fig. 1)。

3. 実験結果

マウス ES 細胞からの血管形成方法として、ES 細胞から EB を形成させた後、EB 中で血管形成を行う方法と、EB をコラーゲングル中で培養する方法を用いた。これらの系における緑藻ナガミル (*Codium cylindricum*) 由来血管新生抑制硫酸化ガラクトンの作用を検討した。

3.1. ES 細胞からの血管形成におけるナガミル由来硫酸化ガラクトンの作用

マウス ES 細胞を Fig. 1 に示した方法に従って培養することにより、ES 細胞から血管内皮細胞を分化誘導し血管様構造を形成させることが出来た (Fig. 2A)。Fig. 2A に見られるように CD31 陽性の血管内皮細胞が血管様の網目構造を有する EB をポジティブとした。次に、ナガミル由来硫酸化ガラクトン存在下で血管形成を行ったところ、Fig. 2B に示すように血管形成が抑制された。Fig. 2B の様に明確な血管様構造を示さない EB をネガティブとした。血管様構造を有する EB の形成率とナガミル由来硫酸化ガラクトンの濃度との関係は Fig. 3 に示した。その結果、ナガミル由来硫酸化ガラクトンは濃度依存的に EB 中での血管形成を抑制することが明らかとなった。

3.2. コラーゲングル中で培養した EB からの血管形成への影響

ES 細胞から形成した EB をコラーゲングル中に包埋することにより、分化した血管内皮細胞によって形成される血管がコラーゲングル中に成長してくることが知られている。この系は、血管前駆細胞から血管系細胞への分化、そして血管形成をより生体に近い環境で行える点で優れている。そこで、この方法でもナガミル由来硫酸化ガラクトンの影響を検討した。その結果を Fig. 4 に示した。ナガミル由来硫酸化ガラクトン非存

在下では、Fig. 4A に示すように、EB 表面の全体から微小血管がコラーゲンゲル中に成長してきた。一方、ナガミル由来硫酸化ガラクトン存在下では、微小血管の形成数も少なく、またその成長も強く抑制されていた (Fig. 4B)。

4. 考察

研究助成者らは、これまでの本財団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、その詳細な化学構造を明らかにしてきた^{2、3})。緑藻ナガミル由来抗血液凝固多糖は、硫酸化ガラクトンであり抗血液凝固活性と血管新生抑制作用には硫酸基が必須である。本多糖の血管新生抑制機構は、主として血管内皮細胞の血管様構造形成阻害によるものであることを明らかにしている²)。近年の再生医学研究の発展から、血管新生には体内を循環している血管内皮細胞前駆細胞が関与していることが示され、血管新生を抑制するためには前駆細胞の分化抑制も重要なターゲットであると考えられている。血中から血管系前駆細胞は僅かにしか分離出来ないことから、単離した血管系前駆細胞を用いた *in vitro* での研究は困難である。そこで、前駆細胞から血管内皮細胞への分化、そして血管形成を *in vitro* で測定できる系として ES 細胞を用いた実験系で検討した。胚性幹細胞である ES 細胞は基本的には全ての体細胞の前駆細胞であり、ES 細胞から血管が形成されれば、必ず血管内皮前駆細胞を経ているはずである。本研究では、まず ES 細胞より ES 細胞の集合体である EB を形成させ、EB 中で血管形成を行った。その結果、緑藻ナガミル由来硫酸化ガラクトンは ES 細胞からの血管形成を抑制した。また、EB をコラーゲンゲル中で培養し、EB 表面から生じる微小血管の形成も本多糖は抑制することが明かとなった。これらの結果は、本多糖が生体内においても血管前駆細胞からの血管形成を抑制することを示唆するものである。本多糖は前駆細胞からの血管形成と既に分化している血管細胞による血管新生を共に抑制することから、血管新生 (形成) 抑制物質としての応用が期待される。

5. 今後の課題

本研究によりナガミル由来硫酸化ガラクトンが ES 細胞からの血管形成も抑制することが明らかになった。一方、本研究で用いた ES 細胞から EB を経て血管を形成させる方法では、血管内皮細胞への分化効率については測定出来ない。本多糖が ES 細胞から血管内皮細胞への分化効率にどのような影響を与えるのかは、フローサイトメトリーや FACS を用いて検討する必要がある。そのためには ES 細胞をコラーゲンコートした培養プレートに播種し、血管内皮細胞に分化させる必要がある。しかし、本研究で用いた ES 細胞は、フィダー細胞を用いずコラーゲンコートしたプレート上では十分に増殖出来ず、細胞数を増やすと EB を形成した。EB からシングルセルまで分散することは困難であることから、分化効率測定方法については今後さらに検討が必要である。

本財団の継続的支援を得て、緑藻ナガミル由来抗血液凝固多糖の新規機能としての血管新生抑制作用、その化学構造と生物活性との相関、そして幹細胞からの血管形成阻害作用を明らかにすることが出来た。血管新生抑制物質は、がんの成長・転移抑制をはじめ種々の病態悪化抑制に応用出来る。さらについ最近、血管新生抑制物質により肥満やアルツハイマー病が予防できる可能性が示された^{5、10}。肥満は高血圧や糖尿病など生活習慣病の原因となっていることから、その予防や解消は先進国では特に重要な課題である。また、高齢化社会を迎えアルツハイマー病等脳疾患の増加も予想されており、その対策が求められている。海藻のみならず海洋生物は高塩濃度という特殊な環境に生息していることから、ユニークな生体成分を有している。また、海洋生物を食糧資源として利用してきている日本人は長寿である。高度不飽和脂肪酸などのように、海洋生物はヒトの健康維持に役立つ物質を含んでいる。一方、既に知られている海洋生物由来機能物質でも未解明の作用がまだあると考えられる。その作用対象が幹細胞である。海洋生物由来生理活性物質で幹細胞を対象にしたものはほとんど皆無である。本財団からの支援で得られた研究成果をもとに、海洋生物に含まれる機能成分を見い出すと共に、未解明の作用機構を明らかにし健康維持に役立つ食糧資源開発研究に発展させたいと考えている。

参考文献

1. Matsubara, K. (2004) Recent advances in marine algal anticoagulants. *Curr. Med. Chem. Cardio. Hematol. Agents.*, **2**: 13-19.
2. Matsubara, K., Mori, M., Matsumoto, H., Hori, K., Miyazawa, K. (2003) Antiangiogenic properties of a sulfated galactan isolated from a marine green alga, *Codium cylindricum*. *J. Appl. Phycol.* **15**: 87-90.
3. 松原主典、森將晏 (2004) 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、平成14年度ソルト・サイエンス研究財団研究助成報告集、335-344.
4. Folkman, J. (1995) Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat. Med.* **1**: 27-31.
5. Rupnick, MA., Panigrahy, D., Zhang, CY., Dallabrida, SM., Lowell, BB., Langer, R., Folkman, J. (2002) Adipose tissue mass can be regulated through the vascular. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**: 10730-10735.
6. Asahara, T., T. Murohara, A. Sullivan, M. Silver, R. van der Zee, T. Li, B. Witzendichler, G. Schatteman, and J.M. Isner. (1997) Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* **275**: 964-966.
7. Rafii, S., Lyden, D., Benezra, R., Hattori, K. and Heissig, B. (2002) Vascular and

- haematopoietic stem cells: novel targets for anti-angiogenesis therapy? *Nat. Rev. Cancer* **2**: 826-835.
8. Wartenberg, M., Günther, J., Hescheler, J. and Sauer, H. (1998) The embryoid body as a novel in vitro assay system for antiangiogenic agents. *Lab. Invest.* **78**: 1301-1314.
 9. Feraud, O., Cao, Y., Vittet, D. (2001) Embryonic stem cell-derived embryoid bodies development in collagen gels recapitulates sprouting angiogenesis. *Lab. Invest.* **81**: 1669-1681.
 10. Vagnucci Jr., Li, WW. (2003) Alzheimer's disease and angiogenesis. *Lancet* **361**: 605-608.

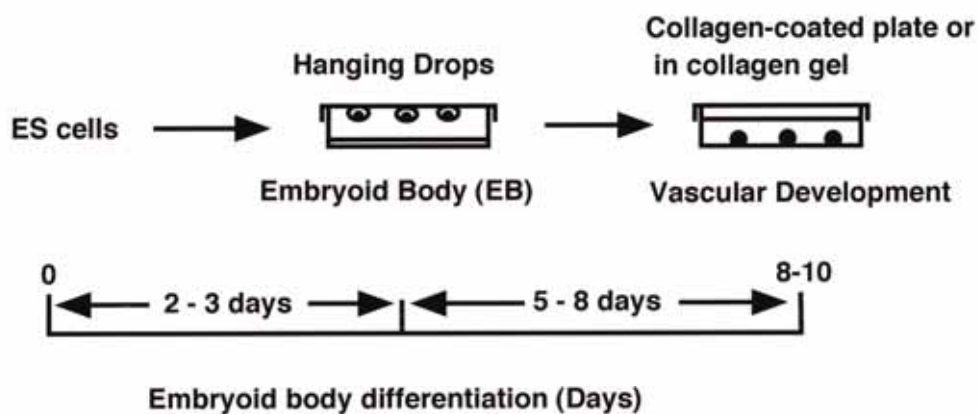


Fig. 1. Schematic representation of the experimental protocol for in vitro vasculogenesis in EBs.

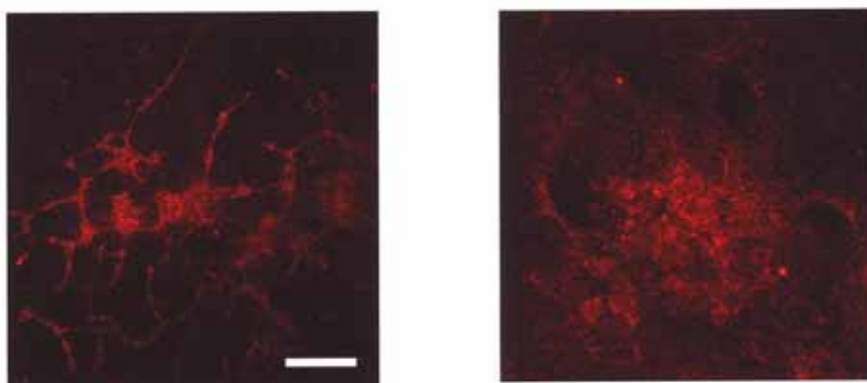


Fig. 2. EB subcultured on collagen gel at day 8. Blood vessel-like structures developed (A). EB subcultured on collagen gel in the presence of 20 µg/ml of sulfated galactan (B). Formation of blood vessel-like structures was suppressed. The scale bar equals 100 µm.

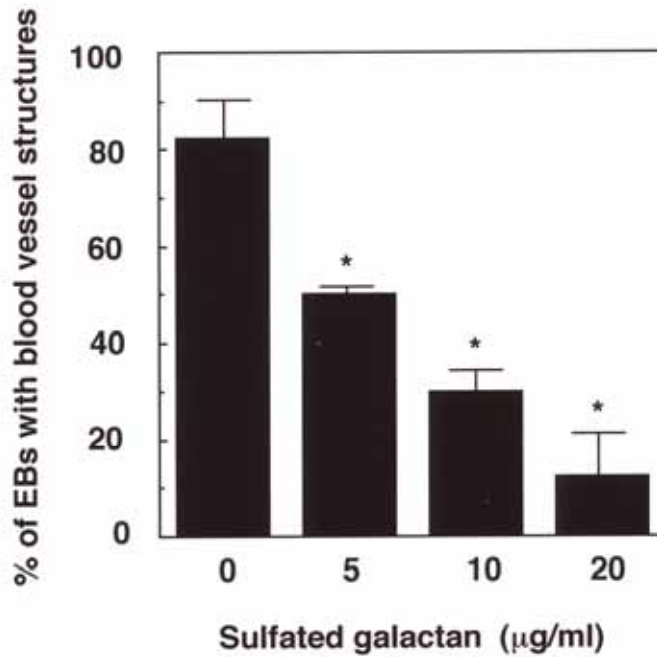


Fig. 3. Effect of sulfated galactan on *in vitro* vasculogenesis. The percentage of EBs with blood vessel-like structures at day 8. The mean percentage (\pm SE) was derived from three independent experiments. Data were analyzed by Student's *t*-test. Means with an asterisk (*; $p < 0.01$) are significantly different from control. EBs at each concentration, $n = 11 - 21$.

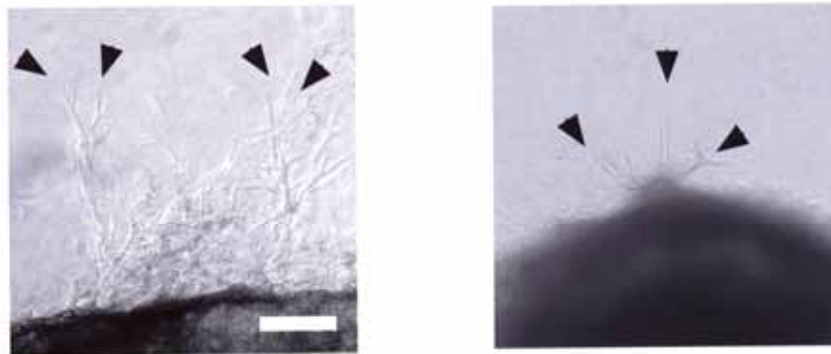


Fig. 4. Vascular formation from 11-day-old EBs embedded into type I collagen gel in the absence of sulfated galactan (A) or the presence of 20 µg/ml of sulfated galactan (B). Arrowheads point microvessels developed from EBs. The scale bar equals 100 µm.

Effect of algal anti-angiogenic polysaccharide on differentiation of stem cells

Kiminori Matsubara, Masaharu Mori

Departments of Nutritional Science and Nursing, Okayama Prefectural University

Summary

Angiogenesis, forming new blood vessels, is involved in tumor growth and metastasis, atherosclerosis and diabetic retinopathy. Various anti-angiogenic substances including marine algal sulfated polysaccharides have been extensively studied. Recently it has been indicated that endothelial progenitor cells from bone marrow participate into forming vascular (vasculogenesis). Thus, it is important to examine whether the anti-angiogenic substances affect vasculogenesis in which endothelial progenitor cells participate. Although anti-angiogenic activity of sulfated galactan isolated from *Codium cylindricum* has been demonstrated, its effect on vasculogenesis from endothelial progenitor cells remained unclear. In this study, the effect of sulfated galactan on *in vitro* vasculogenesis was examined using mouse embryonic stem (ES) cells. As an *in vitro* vasculogenesis model, embryoid body (EB) model was used. EBs were formed by a hanging-drop method, and vascular-like structures developed in EBs. In the model, development of vascular-like structure was confirmed by PECAM-1 antibody (anti-CD31), and more than 80 % of EBs displayed the vascular-like structure. The effect of anti-angiogenic sulfated galactan was examined in the model. Consequently, inhibitory effect of the sulfated galactan on vasculogenesis was revealed. The sulfated galactan also suppressed development of microvessels from EBs cultured in collagen gel. These results show that anti-coagulant and anti-angiogenic sulfated galactan from *C. cylindricum* is a unique bioactive polysaccharide to prevent vasculogenesis from stem cells.