

1. 研究課題名：アルギン酸及びアルギン酸加水分解産物の生理活性の探索
2. 研究機関：科学技術振興事業団長崎研究室
(現長崎大学医学部原研放射 luna@net2.nagasaki-u.ac.jp)
3. 研究者：森田直子(長崎大学医学部原研放射)
4. 研究協力者：児玉靖司、鈴木啓司、渡邊正己(長崎大学薬学部放射線生命科学教室)
松田尚樹(長崎大学アイソトープ総合センター)
竹下哲史(長崎大学医学部原研放射)
山下晶子、横山兼久(科学技術振興事業団長崎研究室)
柳瀬 浩(倉敷紡績・技術研究所)
5. 研究期間：平成9年～11年

6. 要約

アルギン酸は数多くの海洋資源の中でも、主に褐藻類に多く含まれる酸性多糖である。ヒトはこのアルギン酸を食物として摂取するが消化することは出来ない。しかし、良質の食物繊維として体内のナトリウム排泄等の作用を有することが知られている。一方、哺乳類動物細胞に対する生理活性作用については未だ不明であるため、本研究では癌細胞の転移・浸潤において必須の原動力となる細胞の運動性に対して、アルギン酸とその分解物がどのような作用を有するか各種癌細胞に対する影響を調べた。また、癌細胞のコロニー形成率に及ぼすアルギン酸分解物の影響を調べた。その結果、マンヌロン酸は Saos-2 (ヒト骨肉腫) の運動性を抑制することが分かった。また、Saos-2 細胞のコロニー形成率はマンヌロン酸を加えた場合約 20%程度抑えられていた。以上のことより、アルギン酸が癌細胞の運動性を抑制し、またその他に癌細胞の増殖性にも影響を及ぼす可能性が示唆された。

7. 研究目的

海洋に成育するコンブやワカメ等の褐藻類の構造多糖であるアルギン酸は、工業的にも安定に生産・供給され、これまで医薬品や食品添加物など広範囲で利用されている。アルギン酸は、マンヌロン酸(M)とグルロン酸(G)の1,4-glucoside結合による共重合体であり、MまたはGのホモポリマー部位と、MとGの両方がランダムに結合した部位から構成されており、大変複雑な分子構造をとっている。図1にこれらの分子構造を示す。

アルギン酸を加水分解することにより重合度 20～30 程度のマンヌロン酸ホモポリマー (Poly M) とグルロン酸ホモポリマー (Poly G) を得ることができる。

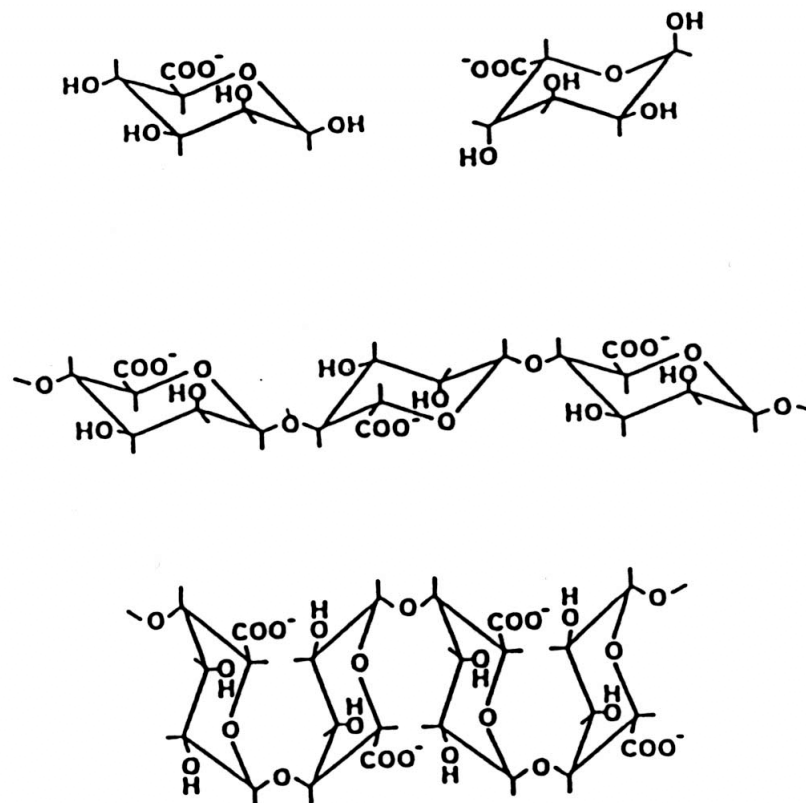


図1 アルギン酸の分子構造

(上左) マンヌロン酸、(上右) グルロン酸、(中) マンヌロン酸ホモポリマー (Poly M)、
(下) グルロン酸ホモポリマー (Poly G)

我々はアルギン酸を食物として日常的に摂取しており、生体内における血中コレステロールの低下や血圧降下作用など有益な効果が知られている。しかし、アルギン酸は生体内には存在しないため、アルギン酸及びその分解物が哺乳類動物細胞に対して、どのような生理活性を有するのか詳細は明らかではない。しかし、近年の様々な研究の結果、何らかの生理作用を示すことが分かってきた。ある報告によると、マンヌロン酸含有率の高いアルギン酸がヒト単球における腫瘍壊死因子 (TNF)、インターロイキン(IL)-1、IL-6 といったサイトカインの産生を高レベルで誘導することが確認された^{1,2)} ほか、アルギン酸が EGF の補助因子として作用し、ケラチノサイトの増殖を活性化することが明らかになった³⁾。ごく最近ではアルギン酸がビタミン C と同様の抗酸化活性を有する⁴⁾ との新たな作用も見い出され、さらに他の多くの生理活性を有することが期待される。

一方、細胞の持つ様々な生命現象、即ち、増殖、分化、機能発現などにおける最初のシグナルは、細胞膜表面に存在する糖鎖 (グリコサミノグリカンなど) がアンテナとなっており、細胞の生物機能の担い手として重要な役割を果たしていることが分かってきた^{5,6)}。これらのこと

から、この細胞膜表面の糖鎖とアルギン酸を構成する糖とが相互作用を持つことにより、細胞に対して何らかの生理活性を誘導するのではないかと考えられる。

その他に、糖鎖の持つ多くの生物機能のうち細胞の接着・識別に機能している代表的な例として癌の転移が知られている。癌の転移には、癌細胞の原発巣からの離脱、脈管系への浸入、転移臓器の血管内皮細胞への接着と脈管からの離脱、転移臓器での生着と癌細胞の増殖という多くの過程があるが、これらの過程において必要な細胞のファンクションは、細胞運動をはじめ、細胞間接着の喪失やマトリックスプロテアーゼ産生などがあげられる。癌化した細胞では必ず表層膜糖鎖の異常がみられ^{7,8)}、それらの変化が癌細胞の浸潤・転移能(運動性)と深く関連していることが解ってきた^{9,10)}。これらのことから、アルギン酸及びその分解物においても癌の転移の過程において様々な生理活性を有する可能性が考えられる。

以上のことを踏まえ、本研究では癌細胞の転移・浸潤の過程において必須の生物学的性状であり原動力となる細胞の運動性に対して、アルギン酸が何らかの作用を有するのではないかとこの視点から、癌細胞の運動性に対するアルギン酸及びその加水分解物の添加の影響を chemotaxis assay 法により調べた。また一方で、癌細胞の増殖性におけるアルギン酸及びその加水分解物の効果をコロニーフォーメーション法により調べた。

8. 材料と方法

【アルギン酸加水分解産物の調製】

マンヌロン酸ホモポリマー (Poly M) 及びグルロン酸ホモポリマー (Poly G) の調製は、Smidsrod らの方法により行った¹¹⁾。150g の市販アルギン酸ナトリウム (Na-Alginate, ナカライテスク社製、アウメ由来、M/G=1.163 より M=53.7%、G=46.3%含有) を、1M しゅう酸に溶解し 100、20 時間の加水分解後、遠心分離し、得られた沈殿を 1M しゅう酸で数回洗浄後、沈殿を水に懸濁し全て溶解させた (pH7~7.5)。その後、ろ紙でろ過し、ろ液に 0.5% になるように NaCl を加え、これを攪拌しながら 2 倍量のエタノールを加え、沈殿させた。遠心分離後、沈殿を少量のエタノールで洗浄し減圧乾燥を行った。この粉末試料をグルロン酸ホモポリマー及びマンヌロン酸ホモポリマーの混合物 (各々、平均重合度 20~30) とし、70g (回収率 46.67%) を得た。次に、この粉末試料 5g を 0.1M NaCl に溶解し、pH2.85 に調整後、低温室で 1 晩静置した。これを遠心分離により上清 (Poly M) と沈殿 (Poly G) に分離し、上清をメンブレンフィルターでろ過後、pH7.0 に中和し、攪拌しながら 2 倍量のエタノールを加え沈殿させた。その後遠心分離を行い、沈殿を少量のエタノールで洗浄し減圧乾燥を行った。この粉末試料を Poly M とした。一方、pH2.85 に調整後の沈殿を再び 0.1M NaCl に溶解し、pH7.0 に中和して完全に溶解後、更に pH2.85 に調整し (この作業を 2 回繰り返す)、中和後 Poly M と同様にエタノール沈殿を行い、得られた粉末試料を Poly G とした。

【細胞培養】

本研究にて用いた各種ヒト癌細胞すなわち、NCI-H1299 (ヒト肺腫瘍)、Saos-2 (ヒト骨肉腫)、HT1080 (ヒト線維肉腫)、RKO (ヒト大腸癌) は、長崎大学薬学部・渡邊研究

室にて凍結保存されていたものを分与戴き、培養を開始した。培養液には Eagle's MEM / 10%FBS を用い、37℃、5%CO₂ インキュベーターで培養した。細胞の回収は 0.05% trypsin - 0.53mM EDTA を用いて行った。実験毎の細胞の状態にばらつきが生じないように培養条件を統一し、 1×10^6 cells / 100mm dish で播種後、培養 2 日目の細胞を用いることとした。また、正常細胞はヒト胎児由来正常細胞 (HE49) を用いた。培養液及び細胞の回収は同様に用い、継代は 1 : 4 split ratio で行った。

【細胞走化性実験 (chemotaxis assay)】

細胞の運動性を測定する走化性実験には、癌の転移・浸潤実験で一般的に用いられる 48well Boyden Chamber による chemotaxis assay を行った¹²⁾。各細胞を 0.05% trypsin-0.53mM EDTA を用いて回収後、0.1、1、10 及び 100 μ g/ml のアルギン酸ナトリウム、Poly M または Poly G をそれぞれ含む 0.1%BSA / MEM 溶液にて 1×10^6 cells / ml になるように調製し、Polycarbonate filter (pore size : 8 μ m) によって上下に仕切られたチャンバーの上室 (well) に加えた。この時、チャンバーの下室には走化性物質 (chemoattractant) として 10 μ g/ml Fibronectin、10ng/ml EGF または 1%FBS を満たした。CO₂ インキュベーター内にて 6 時間静置後フィルターを剥がし、その上部表面に残った非移動細胞を取り除き、フィルターの小孔をくぐり抜け裏面に付着した細胞をディフクイック溶液を用いて染色した。その後、顕微鏡観察により細胞数をカウントし、コントロールと比較した。

【アルギン酸分解物によるコロニー形成率への影響】

細胞は Saos-2 (ヒト骨肉腫) を用い、培養液に 0.1、1、10 及び 100 μ g/ml の Poly M または Poly G を含む Eagle's MEM / 10%FBS を用いた。200cells / 100mm dish にて細胞播種後、CO₂ インキュベーター内にて 10 日間静置後、ギムザ染色を行い細胞のコロニー数をコントロールと比較した。

9. 結果

【アルギン酸加水分解産物の調製】

アルギン酸ナトリウム (Na-Alginate) より得られた加水分解産物の収量は、Poly M=1.87g、Poly G=2.58g であった。各々の平均重合度は 20~22 であった。これらは、以降の全ての実験に用いた。

【細胞走化性実験 (chemotaxis assay)】

3 種の走化性物質を用いた時の、各細胞の運動性測定の結果を図 2 に示す。走化性物質を用いないコントロールでは、HT1080 (ヒト線維肉腫) のみ、また 10ng/ml の EGF では、RKO (ヒト大腸癌) のみが僅かに運動性を示したが、他の細胞の運動性は見られなかった。一方、10 μ g/ml Fibronectin または 1%FBS では、細胞ごとに差はあるものの、全ての細胞が運動性を示した。

	Number of migrated cells / 50,000 cells (mean ± S.E.)			
	chemoattractant in lower well			
	control	10ng/ml EGF	10μg/ml FN	1% FBS
HE49	0		10.73 ± 4.49	
RKO	0	2.4 ± 0.32	31.31 ± 4.56	1.8 ± 0.42
HT1080	4.8 ± 0.54	0	18.87 ± 3.07	49.6 ± 8.54
H1299	0	0	29.79 ± 3.19	93.6 ± 12.84
Saos-2	0	0	18.8 ± 4.58	60.37 ± 2.93

図2 ヒト正常細胞及び各種癌細胞を用いた運動性試験

これらのうち、10μg/ml Fibronectin を走化性物質として用いることを以後の実験のコントロールとして設定し、さらに各種アルギン酸を添加した際の細胞運動性を比較した。それらの結果を図3に示す。さらに、各々についてのまとめを図4に示す。

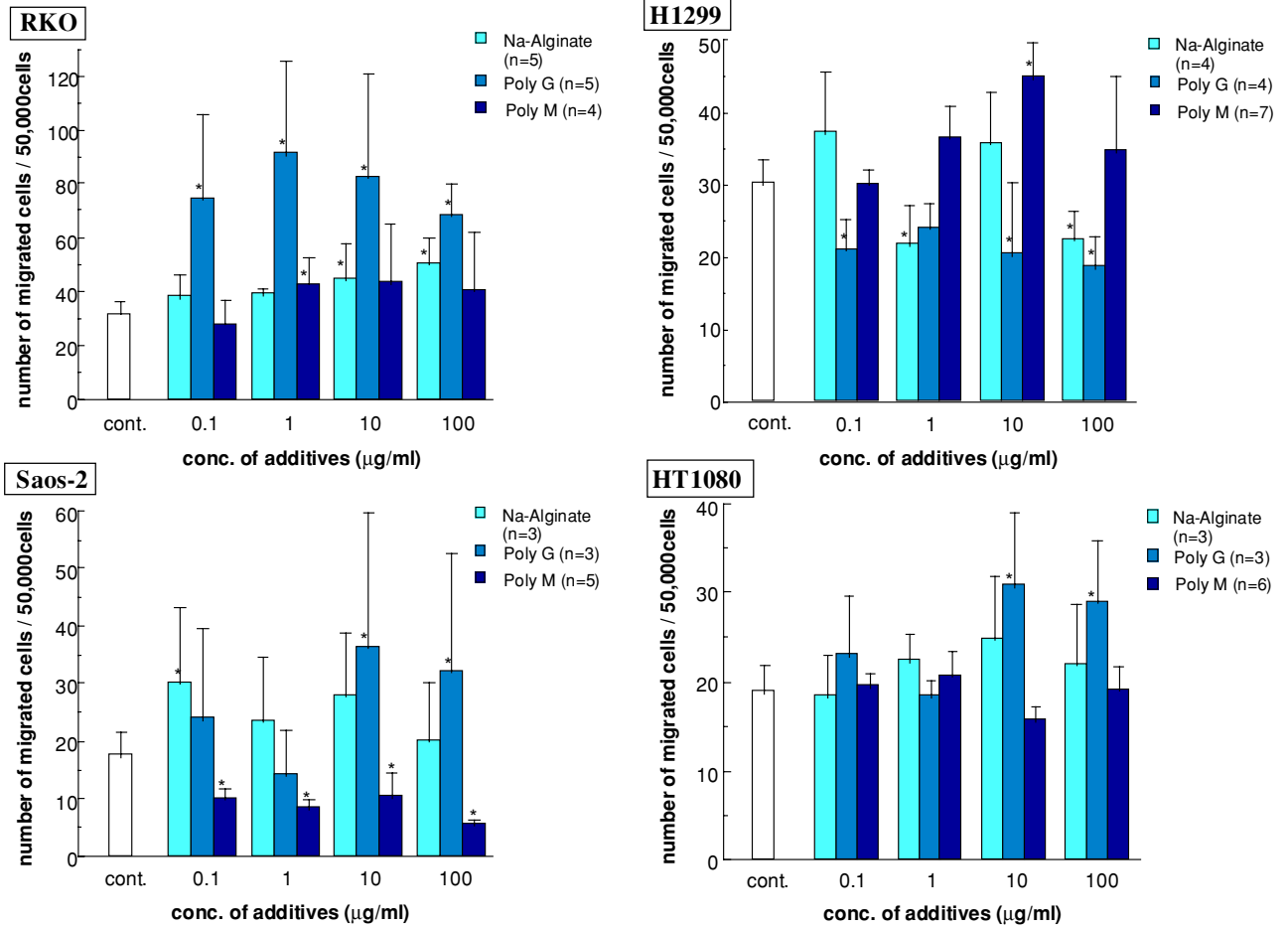


図3 細胞運動性に及ぼす各種アルギン酸添加の影響
 48 well Boyden chamber にて 6 時間培養後、pore size 8µm の
 フィルターを通り抜けた細胞を染色し顕微鏡下でカウントした
 (*P<0.05; コントロールとの有意差)

Cell Line	(+ 促進、- 抑制)											
	+ Na-Alginate				+ poly G				+ poly M			
Conc. (µg/ml)	0.1	1	10	100	0.1	1	10	100	0.1	1	10	100
RKO	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Saos-2	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-
H1299	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+
HT1080	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+

- + : コントロールとの有意差がP<0.05であったことを示す

図4 癌細胞の運動性に及ぼす各種アルギン酸の影響

これらの結果より、RKO 細胞では各種アルギン酸によりその運動性が促進され、特に Poly G の添加では、いずれの濃度でも有意に運動性が上昇した。また、Saos-2 細胞ではアルギン酸ナトリウムまたは Poly G では運動性が促進される傾向にあったが、Poly M の添加では一転して有意に運動性が抑制されることが分かった。そして、H1299 及び HT1080 細胞においては、それぞれのアルギン酸の添加により、ある一定の濃度で運動性が抑制されるかまたは促進される結果となった。

次に、Saos-2 細胞のコロニー形成において Poly M 及び Poly G の添加の影響を比較した。細胞を播種後 10 日間培養を行いコロニー数をカウントすると、図 4 に示すように Poly M 存在下ではコロニー形成率が抑制されたが、Poly G 存在下ではコロニー数の変化は見られなかった。

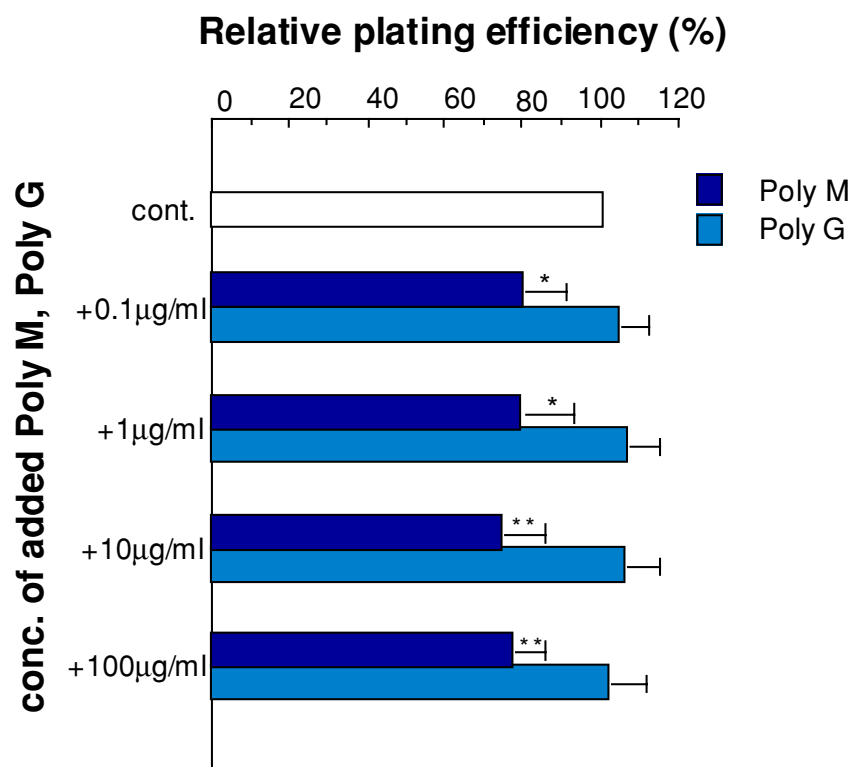


図 4 Saos-2 細胞のコロニー形成における Poly M または Poly G の影響
Saos-2 を 200cells/100cm dish にて播種し、各濃度の Poly M または Poly G を添加し培養したときのコロニー形成率の比率を示す (*P<0.05,** P<0.01 ; コントロールとの有意差)

10. 考察

本実験の結果より、各種細胞の運動性に及ぼすアルギン酸添加による運動性の促進・抑制には、各細胞各アルギン酸及びその濃度で異なっており、また、全く作用しないアルギン酸もあることが分かった。即ち、細胞、アルギン酸とも厳密な特異性を有する作用である可能性が示唆された。このような反応に対して、添加物の濃度依存性が考えられたが、Na-Alginate、Poly M 及び Poly G とも殆ど見られず、ある濃度でピークを持つものが多く見られた。用いた細胞の中で転移能を有すると報告されているものは HT1080 細胞のみであったが、今回の実験系においては HT1080 以上に高い運動性を有する細胞もあり、運動性が高いことが転移能を有することと直接的には結びつかないとも考えられる。用いた細胞のうち Saos-2 細胞に各濃度の Poly M を添加したとき、有意にその運動性が抑制されることが分かった。このことは、細胞が走化性物質である Fibronectin に反応して示した運動性を、Poly M が何らかの作用で阻止したと推察される。また、Poly M は Saos-2 細胞の増殖（コロニー形成）を促進する作用があることが示唆されたが、同細胞の増殖性に対しては、 5×10^4 cells / 35mm dish にて播種し、コロニー形成率の実験と同様に Poly M または Poly G が存在するか否かでの差を調べたところ、両者間の差はみられなかった（データには示さず）。しかし今回、図 4 で示したように、コロニー形成法では播種する細胞数が少ないため、増殖の際 Poly M に対して反応性を持つ細胞が検出されやすくなった結果、形成されるコロニー数に差が生じたものと考えられる。増殖に関する活性発現においては、増殖因子がそのレセプターと反応し増殖シグナルを伝達する際に、細胞膜糖鎖が重要であることから、それらの相互作用にアルギン酸が関与しているのではないかと考えられる。

癌細胞の転移には、糖鎖を有する各種接着分子やそのリガンドを介した数多くのステップが存在している。即ち、それらの結合が癌細胞の動きを支配していると言える。そしてまた、次の段階へ進むためには、それらの結合を解き放つことも必要である。本研究の結果では、アルギン酸がある癌細胞の動きを抑制する一方、他の癌細胞では全く逆の作用を示すことがあることも分かった。このことは、各癌細胞により発現している糖鎖が異なっており、その変化がまた、アルギン酸分子の構造の違いにより作用を異にしているとも考えられる。今後はアルギン酸がどの場面でどのような接着分子と相互作用を示すのか、詳細を明らかにする必要がある。

11. 今後の展開

癌細胞が転移・侵潤する際の第一のきっかけは、細胞自身が何かを介してどこかに足場を作り「くっつく」ことから始まると言われている。従って、癌細胞側の接着分子とそのリガンドの作用がきっかけとなり、その運動性を制御しているのではないかと考えられる。癌細胞が他臓器に転移する過程においては、原発巣から離脱し、細胞外マトリックスや基底膜を破壊しながら血管内へ浸入し血流によって運搬された後、今度は転移巣の血管内皮に接着し、そこで血管外へ脱出し転移臓器にて再び増殖する。このような過程において関与が示唆されている接着分子が、フィブロネクチンやラミニンなどの細胞外マトリックス成分をリガンドとするカドヘリンやインテグリン、そして CD44 などである。なかでも、インテグリンに関

する報告が多く^{13,14)}、ある癌細胞においては発現の低下など特異的な異常を有しており、細胞が浸潤能を獲得し転移を引き起こす要因であると報告されている。アルギン酸がこのような接着分子とリガンドと相互作用し、機能発現を制御する可能性も十分に考えられる。

また、アルギン酸と細胞膜表面の様々な分子との相互作用に関して、リポ多糖の結合分子である CD14 にマンヌロン酸が結合し、ヒト単球の TNF の産生を促進させることが分かっている。その際、マンヌロン酸の形状が重要であり、側鎖が無く、直鎖状であることが生来の免疫機構を活性化させ、感染からの保護に大きな役割を果たしており、また、より低分子量であるほうが効果的であると報告されている¹⁵⁾。その他にも、マンヌロン酸を与えたマウスは、致死的な X 線照射からの生存率を大幅に上昇させることが分かり¹⁶⁾、マンヌロン酸は X 線照射によりダメージを受けた免疫系の細胞の発生など、造血機能を促進することが明らかとなった。このことは、マンヌロン酸が免疫システムの活性化に大変有効であることを示唆するものである。

以上のことより、マンヌロン酸をはじめとするアルギン酸は、様々な場面における生体機能をサポートしていることが証明されてきており、未だ多くの可能性の潜在を思わせる物質である。今後もさらに研究が発展し、生体における有効な作用の解明を期待するものである。

12. 参考文献

1. Soon-Shiong P, Feldman E, Nelson R, et al. Long-term reversal of diabetes by the injection of immunoprotected islets., *Proc Natl Sci USA.*, 90, 5843-5847, 1993
2. Espevik T. Otterlei M. Skjåk-Bræk G. The involvement of CD14 in stimulation of cytokine production by uronic acid polymers., *Eur.J.Immunol.*, 23, 255-261, 1993
3. Akira Kawada. Nozomi Hiura. Masakazu Shiraiwa et al. Stimulation of human keratinocyto growth by alginate oligosaccharides, a possible co-factor for epidermal growth factor in cell culture., *FEBS Letters.*, 408, 43-46, 1997
4. Changhu Xue. Guangli Yu. Takashi Hihara et al. Antioxidative activities of several marine polysaccharides evaluated in a phosphatidylcholine - liposomal suspension and organic solvents., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 62(2), 206-209, 1998
5. Olwin BB. Rapraeger A. Repression of myogenic differentiation by aFGF, bFGF, and K-FGF is dependent on cellular heparan sulfate. *J.Cell.Biol.*, 118(3), 631-639, 1992
6. Higashiyama S. Abraham JA. Klagsbrun M. Heparin-binding EGF-like growth factor stimulation of smooth muscle cell migration : dependence on interactions with cell surface heparan sulfate. *J. Cell. Biol.*, 122(4), 933-940, 1993
7. Sobue M. Takeuchi J. Yoshida K et al. Isolation and characterization of proteoglycans from human nonepithelial tumors. *Cancer Res.*, 47(1), 160-168, 1987
8. Santer UV, DeSantis R, et al. N-linked oligosaccharide changes with oncogenic transformation require sialylation of multiantennae., *Eur J. Biochem.*, 181, 249-260, 1989

- 9 . Collard JG, Schijven JF, et al. Cell surface sialic acid and the invasive and metastatic potential of T-cell hybridomas., *Cancer Res.*, 46, 3521-3527, 1986
- 10 . Dennis JW, Laferte S, et al. Beta 1-6 branching of Asn-linked oligosaccharides is directly associated with metastasis., *Science.*, 236, 582-585, 1987
11. Smidsrod ø, Haug A, Larsen B, The influence of pH on the rate of hydrolysis of acidic polysaccharides. *Acta.Chem.Scand*, 20, 1026-1034, 1966
- 12 . Albini A. Iwamoto Y. et al. A rapid in vitro assay for quantitating the invasive potential of tumour cells., *Cancer Res.*, 47, 3239-3245, 1987
- 13 . Qian F. Vaux DL. Weissman IL. Expression of the integrin alpha 4 beta 1 on melanoma cells can inhibit the invasive stage of metastasis formation. *Cell.*,77(3), 335-347, 1994
- 14 . Harning R, Myers C. et al. Monoclonal antibodies to lymphocyte function-associated antigen-1 inhibit invasion of human lymphoma and metastasis of murine lymphoma. *Clin.Exp Metastasis.*, 11(4), 337-342. 1993
- 15 . Berntzen G. Flo TH. Medvedev A. et al. The tumor necrosis factor – inducing potency of lipopolysaccharide and uronic acid polymers is increased when they are covalently linked to particles. *Clin.Diag. Lab.Immunol.*, 5(3), 355-361, 1998
- 16 . Halaas ø. Olsen WM.Veiby OP. et al. Survival of lethally irradiated mice and stimulates murine haematopoiesis in vitro. *Scand. J. Immunol.*,46, 358-365, 1997

13 . 研究業績

- 13-1. 原著論文：なし
- 13-2. 総説など：なし
- 13-3. 国際学会発表：なし
- 13-4. 国内学会発表：なし
- 13-5. 新聞など：なし
- 13-6. 特許申請：なし

14 .

- (1) Exploration of physiological activity of Na-alginate and its hydrodigested polymer, Poly G and Poly M.
- (3) Naoko Morita (Nagasaki University School of Medicine)
Naoki Matsuda, PhD. (Nagasaki University Radioisotope Center)
Seiji Kodama, PhD. Masami Watanabe, PhD. Keiji Suzuki, PhD.
(Nagasaki University
School of Pharmaceutical Sciences)
Satoshi Takeshita, PhD. (Nagasaki University School of Medicine)

Akiko Yamashita, Kanehisa Yokoyama (JST at Nagasaki)
Hiroshi Yanase (Kurabo Industries Ltd.)

(5) 1997 ~ 1999

(6) Abstract

(Na⁺)Alginate is acidic polysaccharide which has including of two different components, guluronate and mannuronate. They are exist as polysaccharide of cell wall and intercellular filling compound. Alginate prompt natriuretic, decrease cholesterol in blood and hypertension. But, alginate and their hydrolysate is absence in human body, so their bioactivity for mammalian cells is unknown. In this study, we examined effect of their alginates for motility of cells has become basic essential action of metastasis and invasion of cancer cells useing method of chemotaxis assay. And Next, we evaluated colonization of cancer cells that effect of adding alginates when cells adheres to some substrate, in case of added alginates befor adhered or after. As a result of that, mannuronate polymer inhibited the motility of Saos-2, but the other side, some alginates promoted the motility of cells. The result of colony formation, mannuronate polymer inhibit the colony formation of Saos-2 about 20%, both mannuronate polymer added befor and after its adheres to dish. Guluronate polymer has no effect of their growth. Taken together, mannuronate polymer inhibit the motility and growth of Saos-2 cells.