

オキナワモズク (*Cladosiphon okamuranus* TOKIDA) 由来
アセチルフコイダンの構造特性と生理活性に関する研究

照屋 武志

2009

目次

第 1 章 序論	1
第 2 章 オキナワモズク由来アセチルフコイダンの構造特性と その過硫酸化物の調製	8
2.1 緒言	8
2.2 材料および実験方法	9
2.2.1 材料および試薬	9
2.2.2 オキナワモズクから CAF の調製	9
2.2.3 全糖量測定	10
2.2.4 ウロン酸量測定	10
2.2.5 硫酸含量測定	11
2.2.6 脱硫酸化	12
2.2.7 脱アセチル化	12
2.2.8 過硫酸化	12
2.2.9 構成糖分析	13
2.2.10 赤外吸収スペクトル	14
2.2.11 ¹ H-核磁気共鳴吸収法	14
2.2.12 メチル化分析	14

2.3	結果	16
2.3.1	化学組成	16
2.3.2	赤外吸収スペクトル	18
2.3.3	¹ H-NMR スペクトル	19
2.3.4	メチル化分析	21
2.4	考察	23
	小括	26

第3章 過硫酸化アセチルフコイダンの U937 細胞における

	アポトーシス誘導作用	27
3.1	緒言	27
3.2	材料および実験方法	29
3.2.1	材料および試薬	29
3.2.2	オキナワモズクから CAF の調製	30
3.2.3	過硫酸化	30
3.2.4	脱硫酸化	31
3.2.5	細胞培養	31
3.2.6	細胞傷害活性試験	31
3.2.7	形態観察	32
3.2.8	アポトーシス細胞の検出	32

3.2.9	カスパーゼ 3 活性の測定	33
3.2.10	イムノプロット分析	33
3.2.11	統計分析	35
3.3	結果	35
3.3.1	U937 細胞におけるネイティブ、脱硫酸化および 過硫酸化 CAF の細胞傷害活性	35
3.3.2	形態的变化	35
3.3.3	過硫酸化 CAF のアポトーシス誘導作用	37
3.3.4	カスパーゼ 3 および 7 の活性化と PARP の開裂	38
3.4	考察	42
	小括	46
第 4 章 オキナワモズク由来アセチルフコイダンの		
	マクロファージ活性化作用	47
4.1	緒言	47
4.2	材料および実験方法	51
4.2.1	材料および試薬	51
4.2.2	オキナワモズクから CAF の調製	52
4.2.3	脱硫酸化	52
4.2.4	脱アセチル化	53

4.2.5	細胞培養	53
4.2.6	NO 産生量の評価	53
4.2.7	TNF- α および IL-6 産生量の評価	54
4.2.8	CAF のマクロファージ活性化作用における ポリミキシン B の影響	54
4.2.9	CAF のマクロファージ活性化作用における抗 TLR4、 抗 CD14、抗 CR3 および抗 SRA 中和抗体の影響	55
4.2.10	イムノプロット分析	55
4.2.11	統計分析	56
4.3	結果	57
4.3.1	マクロファージにおける CAF の NO、TNF- α および IL-6 産生誘導作用	57
4.3.2	エンドトキシン混入に対する考慮	59
4.3.3	CAF のマクロファージ活性化作用における硫酸基 およびアセチル基の関与	60
4.3.4	CAF のマクロファージ活性化作用における TLR4、CD14、 CR3 および SRA の関与	62
4.3.5	CAF のマクロファージ活性化作用における MAPK の関与	63
4.4	考察	66

小括 70

第 5 章 総括 71

参考文献 75

謝辞 88

第 1 章 序論

多糖類とは、数十以上の単糖がグリコシド結合によって重合した糖の総称である。多糖類は生命体の支柱や被覆となるセルロース、ペクチン、キチン、コンドロイチン硫酸、アルギン酸やフコイダンなどの構造多糖や、エネルギー源となるデンプン、イヌリン、ラミナランやグリコーゲンなどの貯蔵多糖として、自然界に幅広く存在する。多糖の構造はそれを構成する単糖の種類こそさほど多くはないものの、糖組成、配列、結合様式、アノマー配位および電荷密度において、極めて変化に富んでいる。これらはその物理化学的・生理学的特性に影響を及ぼす。

多糖類はその多様な特性が様々な分野で利用されている。例えば、食品工業分野では、増粘安定剤としてカラギーナン、キサントガム、ガラクトマンナンやローカストビーンガムなどが、ゲル化剤としてアガロース、ペクチン、ジェランガムやカードランなどが利用されている [国崎ら, 2001]。また、医薬品分野では血液凝固抑制剤としてヘパリン、人工皮膚の材料としてキチン、免疫賦活剤として β -グルカンなどが利用されている [岩瀬ら, 1994]。その他には、培地や電気泳動の支持体としてアガロース、ゲルろ過剤としてアガロースの誘導体が用いられている。

沖縄県は四方を海に囲まれまた亜熱帯気候に位置することから、多種の海藻資源に恵まれている。そのため、沖縄県では以前よりその周辺に自生していたオキナワモズク、イトモズク、フノリ、イバラノリ、クビレオゴノリ、トゲキリンサイ、クビレズタやヒトエグサなどを食材として利用してきた。近年では、オキナワモズク、イトモズク、クビレズタやヒトエグサの養殖技術が確立し、安定的に市場へ供給されている。海藻は脂質や易消化性の糖質が少なく低カロリーであり、また、食物繊維を多く含む [山田, 2000]。食物繊維は消化酵素によって消化することが出来ない難消化性成分の総称で、主として植物、海藻や菌類の細胞壁を構成している多糖類である。食物繊維は小腸内の余分な糖分、コレステロールやナトリウムなどを吸着して体外に排出する働きがあり、糖尿病、動脈硬化、高脂血症や高血圧など生活習慣病の予防効果や、大腸内の善玉菌を増殖させる事による腸内菌叢の改善効果などが期待できる。したがって、海藻は健康を維持するという点において大変優れた食材であるといえるだろう。

海藻類からは様々な多糖が見出されている。特に代表的な海藻由来の多糖として、緑藻類に含まれるキシロアラビノガラクトンやグルクロノキシロラムナン、紅藻類に含まれる寒天、カラギーナンやポルフィラン、褐藻に含まれるフコイダンやアルギン酸などがある [山田, 2000]。これまでに、沖縄県周辺に自生している様々な海藻に含まれて

いる多糖についても研究が行われてきた。緑藻であるヒトエグサからラムナン硫酸 [山城ら, 2005] が分離・同定された。紅藻であるクビレオゴノリから寒天 [田幸, 1994]、ユミガタオゴノリから高メトキシル寒天 [Tako *et al.*, 1999a]、イバラノリから κ -カラギーナン [Qi *et al.*, 1997a and 1997b; Tako *et al.*, 1998]、トゲキリンサイから ι -カラギーナン [Lin *et al.*, 2000 and 2001] が分離・同定された。褐藻であるヒジキからフコイダンおよびアルギン酸 [Shiroma *et al.*, 2003 and 2007] が、イトモズクからもフコイダンおよびアルギン酸 [Tako *et al.*, 1999b and 2001] が分離・同定された。

フコイダンは褐藻類の細胞壁間、ウニ卵子の卵外被やナマコ体壁中に存在する硫酸化多糖の一種で、熱水や希塩酸で抽出することが出来る。フコイダンは、1913年に Killing によって褐藻から初めて分離された多糖で [Killing, 1913]、*Fucus* (ヒバマタ属) がその名前の由来である。フコイダンは一般的に、L-フコースを主構成糖とし、また硫酸を置換基として有するが、その他に D-マンノース、D-ガラクトース、D-キシロースや D-グルクロン酸などを有する場合もあり、その構造特性は海藻の種類によって異なっている。フコイダンは藻体表面についた傷から微生物の侵入を防ぐことで、さらには、藻体が空気中に曝されることによる乾燥を防ぐことで藻体を守るといった役割を担っていると考えられている [西沢ら, 1988]。

一方、フコイダンには多様な生理活性があることも知られており、これまでに抗腫瘍作用 [Itoh *et al.*, 1993]、血液凝固抑制作用 [Nishino *et al.*, 1991]、抗 HIV 作用 [McClure *et al.*, 1992]、平滑筋細胞の増殖抑制作用 [Religa *et al.*, 2000] やリンパ腫由来細胞株へのアポトーシス誘導作用 [Aisa *et al.*, 2005] などが報告されている。すなわち、フコイダンは食物繊維としての活性だけではなく多くの有用な生理活性が期待されており、現在、健康食品や栄養補助食品として利用されている。また、医薬品としての応用も検討されている。

オキナワモズク (*Cladosiphon okamuranus* TOKIDA) は褐藻植物門 (Phaeophyta)、褐藻綱 (Phaeophyceae)、ナガマツモ科 (Chordariaceae) に属する海藻で、生息域は奄美大島を北限とし西表島を南限とする、琉球列島特産種である。藻体は長さ 25 ~ 30 cm、幅 1 ~ 3.5mm で、枝が不規則に分岐している。オキナワモズクは沖縄県の方言で「すぬい」と称されており、酢の物、吸い物の具やてんぷらの具などとして食されている。かつては地域的、季節的に限られた食材であったが、1978年にはその養殖技術が確立し、大量に生産されるようになった。オキナワモズクの養殖は種付けした養殖ネット (1.5×20 m) を 11 月頃に干潮時の水深約 2 m の海底に設置して行われ、翌年の 3 月から 6 月にかけて収穫される。収穫されたオキナワモズクは冷凍、塩蔵または乾燥した状態で、さらには調味液付きのパック詰め商品として日本全国に出

荷されている。現在では、国内に流通するオキナワモズクのほとんどが沖縄県産である。沖縄県におけるオキナワモズクの年間生産量は、最盛期で 20,000 トンにも達した。しかし、最近では需要が減少し、市場価格を維持する為に生産調整を迫られている。直近の年間生産量は 10,000 トン以下と、最盛期の半分以下にまで減少しており、需要拡大が望まれている。

これまでに、沖縄県で養殖されているオキナワモズクからアセチルフコイダンが分離・同定された [田幸ら, 1996; Tako *et al.*, 2000]。オキナワモズク由来アセチルフコイダン (CAF) の収量は対湿潤藻体で約 2.0% (対乾燥藻体では約 40%) と極めて高い。また、一般的に、褐藻類は多量のアルギン酸を有しているが、オキナワモズクはその含量が比較的少なく、CAF の約 1/10 程度である。このことから、オキナワモズクでは純度の高い高品質な CAF を効率よく抽出することが比較的容易である。したがって、フコイダンの工業的抽出の点において、オキナワモズクは極めて優れた原材料であるといえよう。実際に、沖縄県では 4 社が、他県では 2 社が CAF を工業的に抽出しており、その生産物は健康食品や飲料、さらには化粧品の原材料として利用されている。また、CAF は流動性に優れた特異なレオロジー特性を有しており [Tako, 2003]、その応用にも期待が持たれる。

CAF の基本構造は α -1,3-結合の L-フコース残基を主鎖とし、側鎖と

して D-グルクロン酸残基が主鎖の L-フコース残基の C-2 に置換している。また、硫酸基が D-グルクロン酸残基が置換していない主鎖の L-フコース残基の C-4 に置換している [Sakai *et al.*, 2003]。さらに、CAF はアセチル基が置換しているフコイダンとして初めて報告され、物質特許が取得されている [田幸, 2002]。しかし、その置換位置についてはこれまでに明らかにされていない [Nagaoka *et al.*, 1999; Tako *et al.*, 2000; Sakai *et al.*, 2003]。また、CAF には肝臓コレステロールの上昇抑制作用 [上原ら, 1996]、*Helicobacter pylori* の胃細胞への接着防止作用 [Shibata *et al.*, 1999 and 2000] やマウスの慢性的大腸炎の治癒作用 [Matsumoto *et al.*, 2004] など、様々な生理活性が既に報告されており、今後、さらなる未知の生理活性の発見も期待できるだろう。しかし、CAF の詳細な構造特性や、その生理活性における分子レベルでの作用機構については未解明な点が多くある。そのため、現在の所、CAF の利用は健康食品、栄養補助食品や化粧品の原材料に限定されている。したがって、CAF の構造特性を解析し、また、新たな生理活性を探索してその作用機構を詳細に解明することは、CAF の新たな利用の創出・拡大に繋がると考えられる。

そこで、本研究では、CAF の構造特性と生理活性について検討することとした。ところで、多糖の有する硫酸基は血管新生阻害作用、血液凝固抑制作用および細胞増殖阻害作用に対して、重要な働きをして

いることが知られており、その硫酸化度と生理活性強度には相関性がある [Ferial *et al.*, 2000; Koyanagi *et al.*, 2003]。そこで、第 2 章では、CAF とその脱硫酸化-脱アセチル化物をメチル化分析し、構造特性を解析した。また、CAF の過硫酸化物 (過硫酸化 CAF) を調製し、その化学特性についても検討した。

第 3 章では、ヒトリンパ腫由来細胞株である U937 を用いて、過硫酸化 CAF の細胞傷害活性とその作用機構について検討した。

第 4 章では、マウス由来マクロファージ様細胞株である RAW 264.7 を用いて、CAF のマクロファージ活性化作用とその作用機構について検討した。

第2章 オキナワモズク由来アセチルフコイダンの構造特性 とその過硫酸化物の調製

2.1 緒言

先に、沖縄県で養殖されているオキナワモズク (*Cladosiphon okamuranus* TOKIDA) からアセチルフコイダンが分離・同定された [田幸ら, 1996; Tako *et al.*, 2000]。オキナワモズク由来アセチルフコイダン (CAF) は α -1,3-結合の L-フコース残基を主鎖とし、側鎖として主鎖の L-フコース残基の C-2 に D-グルクロン酸残基が置換している。また、硫酸基が D-グルクロン酸残基が置換していない主鎖の L-フコース残基の C-4 に置換している [Sakai *et al.*, 2003]。さらに、CAF にはアセチル基が置換していることが分かっているが、その置換位置についてはこれまで明らかにされていない [Nagaoka *et al.*, 1999; Tako *et al.*, 2000; Sakai *et al.*, 2003]。

近年、多糖の有する硫酸基は血管新生抑制作用、血液凝固抑制作用および細胞増殖阻害作用に対して重要な働きをしており、その硫酸化度と生理活性強度には相関性があることが報告された [Ferial *et al.*, 2000; Koyanagi *et al.*, 2003]。これら 2 つの報告は、硫酸基を化学的に導入することによって、多糖の性質や生理活性が制御可能であることを示している。CAF は、硫酸基が主鎖の L-フコース 2 残基に 1 残基の

割合でその C-4 に置換している程度で、その硫酸化度は他の海藻に由来するフコイダンと比較して高くはない [Patankar *et al.*, 1993; Tako *et al.*, 1999b; Sakai *et al.*, 2003; Shiroma *et al.*, 2003]。すなわち、CAF を過硫酸化することで、その生理活性を容易に制御出来るのではないかと考えた。

そこで、本章ではまず CAF の構造特性を解析した。次に、過硫酸化 CAF を調製し、その化学特性についても検討した。

2.2 材料および実験方法

2.2.1 材料および試薬

オキナワモズクは沖縄県南城市知念で 2003 年に養殖されたものを用いた。藻体は湿潤状態で冷凍保存し (-18℃)、抽出前に解凍した。本実験に用いた試薬はすべて特級品を使用した。

2.2.2 オキナワモズクから CAF の調製

オキナワモズクから CAF を抽出する方法は Tako らの方法に従って行った [Tako *et al.*, 2000]。まず、藻体 100 g をミキサーで 5 分間粉碎し、全量が 500 mL になるように 0.05 M HCl を加え、室温で 3 時間攪拌した。懸濁液を吸引ろ過し、ろ液を 0.05 M 水酸化ナトリウムで中

和した後、セライト 545 層に通した。ろ液を濃縮して 2 倍量エタノールを加え、沈殿物を得た。得られた沈殿物は数回エタノールで脱水し、減圧乾燥して粗 CAF を得た。得られた粗 CAF は 0.1 M 塩化カルシウム水溶液に溶解し、それを吸引ろ過して、ろ液を一晩透析した。その内液を陽イオン交換樹脂 (Dowex 50W×4, Dow Chemical Co., MI, USA) に通して陽イオン交換し、0.05 M 水酸化ナトリウムで中和して、透析した。この透析内液を凍結乾燥し、精製 CAF を得た。

2.2.3 全糖量測定

試料の全糖量はフェノール硫酸法 [Dubois *et al.*, 1956] により定量した。試料 10 mg を精秤してこれを蒸留水に溶解し、100 mL になるように調製して試料溶液とした。この 1 mL を試験管に取り、5% フェノール溶液 1 mL を加えてよく混合した。これに濃硫酸 5 mL を速やかに加えて十分に混合し、室温で 30 分間放置した後、490 nm の波長で吸光度を測定した。フコースを標品として検量線を作成し、それを用いて試料の全糖量を算出した。

2.2.4 ウロン酸量測定

試料のウロン酸量はカルバゾール硫酸法により定量した [Bitter *et al.*, 1962]。2.2.3 で調製した試料溶液 0.8 mL を試験管に取り、それに

4 M スルファミン酸カリウム水溶液 0.1 mL および 1 M ホウ酸水溶液 0.1 mL を加え、よく攪拌した。これに濃硫酸 5 mL を穏やかに加え、攪拌した。その後、沸騰湯浴中で 5 分間加熱した後、直ちに氷冷して室温に戻した。次に、カルバゾール-エタノール溶液 0.2 mL を加えて攪拌し、再び沸騰湯浴中で 10 分間加熱した。その後、直ちに氷冷して室温に戻し、530 nm の波長で吸光度を測定した。グルクロン酸を標品として検量線を作成し、それを用いて試料のウロン酸量を算出した。

2.2.5 硫酸含量測定

試料の硫酸含量は Dodgson らの方法に従って、硫酸バリウムゼラチン比濁法で行った [Dodgson *et al.*, 1962]。試料 10 mg を蒸留水に溶解し、これに終濃度 2 M なるようにトリフルオロ酢酸を加え、100 で 2 時間加熱して加水分解した。その後、これに窒素を吹き付けて濃縮乾固した後、1-プロパノールを数滴加え、再度窒素を吹き付けて濃縮乾固した。得られた加水分解物に蒸留水 1 mL を加えて再溶解し、硫酸含量測定用の試料とした。その試料 200 μ L を取り、4% トリクロ酢酸水溶液 3.8 mL を加えよく攪拌した後、1% ゼラチン-2% 塩化バリウム水溶液を 1 mL 加えて混合した。これを室温で 20 分間静置した後、360 nm の波長でその濁度を求めた。硫酸カリウムを標品として検量線を作成し、それを用いて試料の硫酸含量を算出した。

2.2.6 脱硫酸化

脱硫酸化はソルボリシス法により行った [Nagasawa *et al.*, 1977]。まず、CAF 500 mg を蒸留水 50mL に溶解し、陽イオン交換樹脂 (Dowex 50W×4) に供して陽イオン交換し、これをピリジンで中和して、透析した。その内液を凍結乾燥して、CAF のピリジニウム塩を調製した。これを 90%ジメチルスルフォキシド-10%メタノール 50 mL に溶解し、窒素気相下、80 °C で 4 時間攪拌した。これを一晩透析し、その内液を凍結乾燥して脱硫酸化 CAF を得た。

2.2.7 脱アセチル化

蒸留水 100 mL に CAF 500 mg を溶解し、これに終濃度が 0.1% になるように塩化ナトリウムを加えた。さらに、終濃度が 0.05 M になるように水酸化ナトリウム水溶液を加え、窒素気相下、室温で 13 時間攪拌した。その後、これを塩酸で中和して、透析した。この透析内液を凍結乾燥して、脱アセチル化 CAF を得た。

2.2.8 過硫酸化

過硫酸化 CAF の調製は Soeda らの方法 [Soeda. *et al.*, 1992] に従って行った。すなわち CAF の水酸化テトラ-*n*-ブチルアンモニウム塩を調製し、その 200 mg を *N,N'*-ジメチルホルムアミド 20 mL に十分に分

散させ、三酸化硫黄トリメチルアミン複合体を加えて 50 ℃ で 24 時間
攪拌した。その後、反応液を室温になるまで自然放冷し、酢酸ナトリ
ウム飽和エタノール 3 mL を加えた。さらに、これに冷エタノール
(4 ℃) を等量加えて沈殿を得た。得られた沈殿はエタノールで十分に
脱水・洗浄し、減圧乾燥して CAF の過硫酸化物 (過硫酸化 CAF) を得
た。得られた過硫酸化 CAF を蒸留水に溶解し、陽イオン交換樹脂
(Dowex 50W×4) に供してイオン交換し、0.05 M 水酸化ナトリウムで中
和した。これを透析し、この透析内液を凍結乾燥した。

2.2.9 構成糖分析

CAF を超純水 20 mL に溶解し、濃硫酸を終濃度 2 M になるように加
え、100 ℃ で 3 時間加熱して加水分解した。その後、60 ℃ に保ちながら
炭酸バリウムで中和した。次に、沈殿物をろ過し、加水分解物を含む
液を得た。得られた加水分解物は陰イオン高速液体クロマトグラフ
(DX-500, Dionex Co., CA, USA) でクロマトグラフィーを行うことによ
り糖を検出し、その比率を算出した。カラムは CarboPac PA1 (4×250
mm) を、糖の検出にはパルスアンペロメトリー検出器を用いた。溶離
液は、中性糖の場合は 15 mM 水酸化ナトリウム水溶液を、ウロン酸の
場合は 100 mM 水酸化ナトリウム水溶液/150 mM 酢酸ナトリウム水溶
液を用い、流速 1 mL/分、35 ℃ の条件で分析した。

2.2.10 赤外吸収スペクトル

赤外吸収スペクトルはフーリエ変換赤外分光光度計 (FTS-3000, BioRad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) を用いて測定した。試料を臭化カリウム粉末によく分散させ、それを加圧してディスクを形成した。これを赤外吸収スペクトルの測定に供した。

2.2.11 ¹H-核磁気共鳴吸収法

¹H-核磁気共鳴 (NMR) 吸収スペクトルは核磁気共鳴装置 (JNM - α 500、日本電子、東京、日本) を用いて 500.005 MHz で測定した。CAF を重水に溶解し、60 °C で測定した。内部標準として 3-(Trimethylsilyl) propionic-2,2,3,3-*d*₄ acid, salt (TSP, 0.00 ppm) を用い、化学シフト (ppm) で表示した。

2.2.12 メチル化分析

CAF および脱硫酸化-脱アセチル化 CAF のメチル化は Hakomori 法で行った [Hakomori, 1964]。すなわち、窒素気相下で試料 5 mg をジメチルスルフォキシド 15 mL に溶解し、メチルスルフィニルカルバニオン 2 mL を加えて、室温で 6 時間攪拌した。メチルスルフィニルカルバニオンは次のように調製した。まず、水素化ナトリウム 1.5 g を、*n*-ヘプタンで洗浄した後、窒素気相下でジメチルスルフォキシド 15 mL に溶

解した。その後、これが清澄な青色になるまで攪拌し (50 ℃、1.5 時間)、室温になるまで冷却してメチルスルフィニルカルバニオンを得た。次に、反応液を氷浴することにより 20 ℃まで冷却し、ヨウ化メチル 1.5 mL を穏やかに加え、室温で 1 時間攪拌した後、透析を行った。その内液を回収し、これにクロロホルム 2 mL を加え、激しく攪拌してメチル化糖を抽出し、蒸留水 2 mL を加えて洗浄した (静置して水層とクロロホルム層に分離した後、水層を除去した。これを 5 回繰り返して行った)。得られたクロロホルム層に窒素を吹き付けて濃縮乾固した後、2 M トリフルオロ酢酸 2 mL を加えて密封し、定温乾燥機内において 120 ℃で 2 時間加熱して加水分解した。その後、得られた加水分解物に窒素を吹き付けて濃縮乾固した。これに 1 M 水酸化アンモニウム 0.5 mL、水素化ホウ素ナトリウム 10 mg の順で加えて室温で 4 時間攪拌し、酢酸で中和した。これにメタノール 3 mL を加え、その後、濃縮乾固することでホウ素化水素ナトリウム由来のホウ素を除去した。これに無水酢酸：ピリジン = 1 : 1 の混合液 1 mL を加え、100 ℃で 1 時間反応させアセチル化を行った。その後、蒸留水 1 mL を加えて反応を停止させ、窒素を吹き付けて濃縮乾固した。これに蒸留水を加えて再溶解し、再び窒素を吹き付けて濃縮乾固することで、洗浄した (この操作を三回繰り返して行った)。次に、これにクロロホルム 2 mL を加えて、メチル化糖を抽出し、蒸留水 1 mL を加えて 3 回洗浄した。得られたク

クロロホルム層に硫酸ナトリウムを加えて脱水した（クロロホルム層に水分が残っていると、硫酸ナトリウムがこれを吸収して固まり状になるため、これに加えても固まり状にならず、さらさらになるまで）。これをろ過して沈殿物を除き、ろ液に窒素を吹き付けて濃縮乾固した。これにクロロホルム 0.5 mL を加えて、得られたメチル化糖を分析に供した。メチル化糖の分析はガスクロマトグラフ質量分析計（GCMS-QP 5000, 株式会社島津製作所, 京都, 日本）を、カラムは DB-1 (30 m × 0.25 mm, J&W Scientific Inc., Folsom, CA, USA) を用いた。インジェクション温度は 210 °C、インターフェイス温度は 270 °C、カラム温度は 150 °C (5 分) → 250 °C (5 °C/分) → 250 °C (5 分) の条件で、キャリアーガスにはヘリウム (125 kPa) を使用して分析した。

2.3 結果

2.3.1 化学組成

CAFの全糖量およびウロン酸含量はそれぞれフェノール硫酸法とカルバゾール硫酸法にて測定し、それぞれ 67.1% および 12.1% と算出された。CAF の硫酸含量は硫酸バリウムゼラチン比濁法により測定し、13.5% と算出された。CAF の加水分解物の液体クロマトグラム (Figure 2-1) から、フコースとキシロースが同定され、それぞれのピーク面積

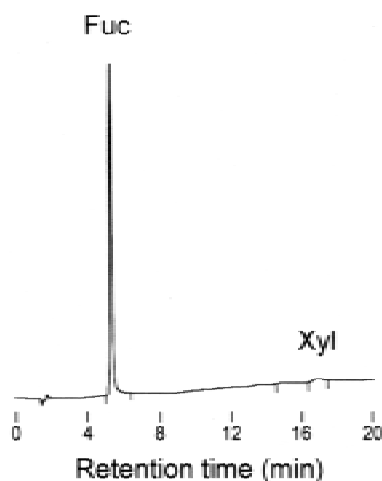


Figure 2-1. Liquid chromatogram of hydrolysate of CAF.

比からそれらのモル比は 4.0 : 0.03 であることが明らかとなった。また、液体クロマトグラフィーによりグルクロン酸が検出された（クロマトグラムは示していない）。L-フコース残基およびアセチル基のモル比は、CAF の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルにおけるそれらのメチルプロトンのシグナル面積比から、4.0 : 1.0 であることが明らかとなった。以上の結果から、CAF は L-フコース、D-キシロース、D-グルクロン酸、硫酸および酢酸が、4.0:0.03:1.0:1.8:1.0 のモル比で構成されていることが分かった（Table 2-1）。一方、過硫酸化 CAF の全糖量、ウロン酸量および硫酸含量は CAF のそれらと同様に測定し、それぞれ 51.2%、9.8% および 32.8% と算出された。

Table 2-1. Chemical composition of CAF.

	Total carbohydrate (%)	Uronic acid (%)	Compositions (molar ratio)				
			Fuc	Xyl	GlcA	Sulfate	Acetate
CAF	67.1	12.1	4.0	0.03	1.0	1.8	1.0

2.3.2 赤外吸収スペクトル

ネイティブ、脱硫酸化および過硫酸化 CAF の赤外吸収スペクトルを Figure 2-2 に示した。それぞれのスペクトルにおいて、3400、2900 および 1255 cm^{-1} 付近にそれぞれ OH 基の O-H 伸縮振動、CH 基の C-H 伸縮振動および硫酸基の S-O 伸縮振動 [Patanka *et al.*, 1993] に由来する吸収が確認された。 1730 cm^{-1} 付近の吸収はアセチル基、 1620 cm^{-1} 付近の吸収はグルクロン酸残基、 960 cm^{-1} 付近の吸収はフコース残基に由来する吸収である。 850 cm^{-1} から 800 cm^{-1} 付近に現れる吸収から硫酸基の配向を知ることができるが、この領域は α -結合を有する糖由来の吸収領域 ($852\sim 836\text{ cm}^{-1}$) と重なる。そこで、ネイティブ CAF と脱硫酸化 CAF のスペクトルを比較したところ、ネイティブ CAF に見られた、 840 cm^{-1} 付近の僅かなショルダーピークが脱硫酸化 CAF では完全に消失した。この領域の吸収はアキシアルに配向している硫酸基に由来するものである。過硫酸化 CAF では、 840 cm^{-1} 付近の吸収とは別に、ネイティブ CAF には見られなかったエクソトリアルに配向している硫酸基に由来すると思われる 820 cm^{-1} 付近の吸収が見られた。

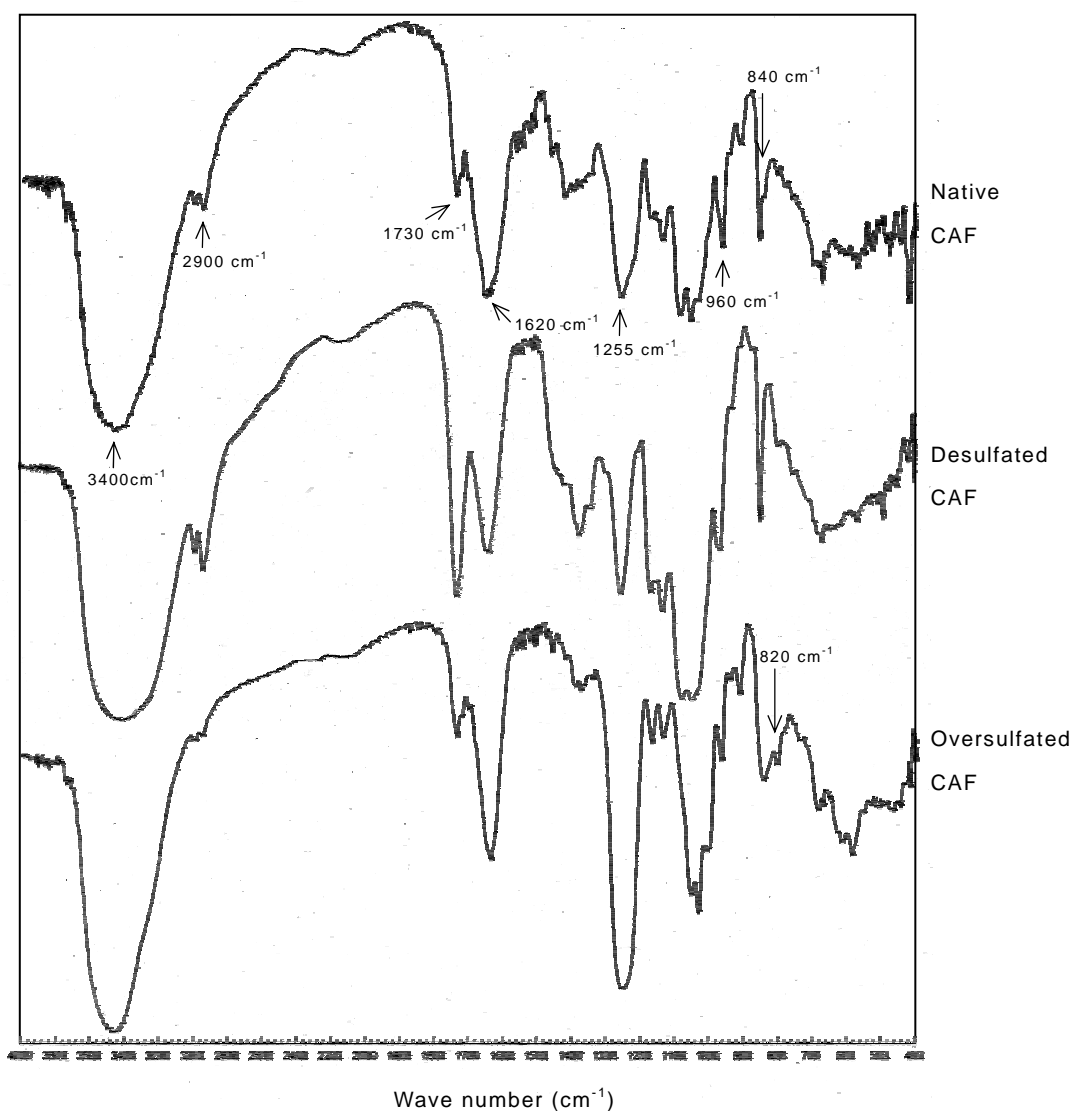


Figure 2-2. Infrared spectra of native, desulfated and oversulfated CAF.

2.3.3 ¹H-NMR スペクトル

Figure 2-3 にネイティブおよび過硫酸化 CAF の ¹H-NMR スペクトルを示した。ネイティブ CAF のスペクトルにおける 5.10 および 4.79 ppm の化学シフトはそれぞれ 4-モノ-O-スルフォ-L-フコース残基のアノメリックプロトンおよび H-4 の化学シフトとよく一致した [Mulloy *et*

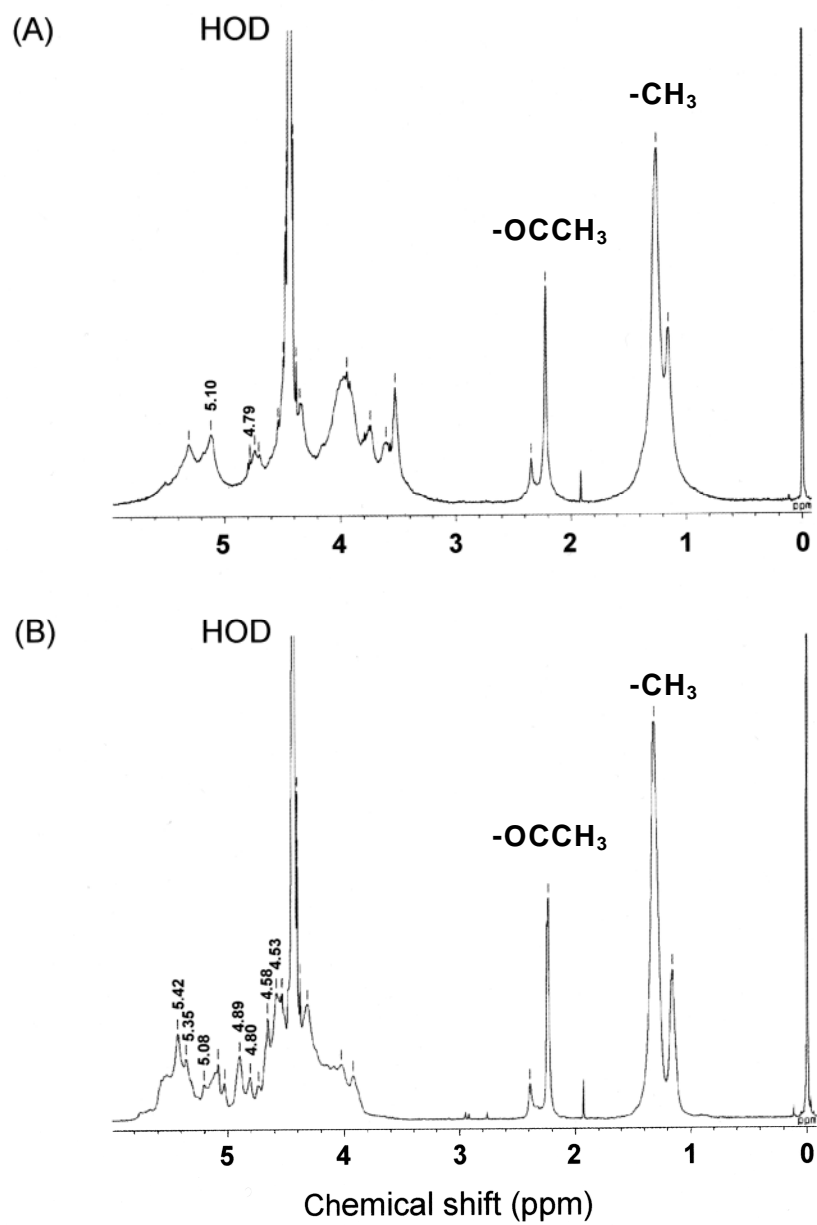


Figure 2-3. ¹H-NMR spectra of native (A) and oversulfated (B) CAF.

al., 1994; Ribeiro *et al.*, 1994]。一方、過硫酸化 CAF のスペクトルにおける 5.42、5.35 および 5.08 ppm の化学シフトはそれぞれ 2,4-ジ-O-スルフォ-L-フコース残基、2-モノ-O-スルフォ-L-フコース残基および 4-モノ-O-スルフォ-L-フコース残基のアノメリックプロトンの化学シフトとよく一致した [Mulloy *et al.*, 1994; Ribeiro *et al.*, 1994]。また 4.58 および 4.53 ppm の化学シフトは 2,4-ジ-O-スルフォ-L-フコース残基および 2-モノ-O-スルフォ-L-フコース残基の H-2 の化学シフトとよく一致した [Mulloy *et al.*, 1994; Ribeiro *et al.*, 1994]。さらに、4.89 および 4.80 ppm の化学シフトは 2,4-ジ-O-スルフォ-L-フコース残基および 4-モノ-O-スルフォ-L-フコース残基の H-4 の化学シフトとよく一致した [Mulloy *et al.*, 1994; Ribeiro *et al.*, 1994]。これらの結果から、ネイティブ CAF には L-フコース残基の C-4 に、過硫酸化 CAF には L-フコース残基の C-2 および C-4 に置換する硫酸基の存在が示唆された。

2.3.4 メチル化分析

CAF の主要な構造については、先に、Nagaoka らおよび Sakai らが報告しているが [Nagaoka *et al.*, 1999; Sakai *et al.*, 2003]、アセチル基の置換位置については明らかにされていない。その置換位置を決定するために、ネイティブおよび脱硫酸化-脱アセチル化 CAF のメチル化分析を行った (Table 2-2)。ネイティブ CAF のメチル化物からそれぞれ

Table 2-2. Methylation analysis of the native, and desulfated-deacetylated CAF.

Derivatives	Deduced linkage pattern	Molar ratio	
		Native CAF	Desulfated-deacetylated CAF
2,3,4-tri- <i>O</i> -methyl-D-glucuronic acid	D-glucuronic acid-(1→	1.0	1.0
2,4-di- <i>O</i> -methyl-L-fucose	→3)-L-fucose-(1→	trace	3.0
2-mono- <i>O</i> -methyl-L-fucose	→3,4)-L-fucose-(1→	3.0	0.2
4-mono- <i>O</i> -methyl-L-fucose	→2,3)-L-fucose-(1→	0.7	1.0

1-結合の D-グルクロン酸残基、1,3,4-結合の L-フコース残基および 1,2,3-結合の L-フコース残基に由来する 2,3,4-トリ-*O*-メチル-D-グルクロン酸、2-モノ-*O*-メチル-L-フコース および 4-モノ-*O*-メチル-L-フコースが 1.0:3.0:0.7 のモル比で検出された。一方、脱硫酸化-脱アセチル化 CAF のメチル化物からは 1-結合の D-グルクロン酸残基、1,3-結合の L-フコース残基、1,3,4-結合の L-フコース残基および 1,2,3-結合の L-フコース残基に由来する、2,3,4-トリ-*O*-メチル-D-グルクロン酸、2,4-ジ-*O*-メチル-L-フコース、2-モノ-*O*-メチル-L-フコースおよび 4-モノ-*O*-メチル-L-フコースが 1.0:3.0:0.2:1.0 のモル比で検出された。CAF を脱硫酸化-脱アセチル化することにより、2,4-ジ-*O*-メチル-L-フコースは増大したが、2-モノ-*O*-メチル-L-フコースは減少した。これらの結果は、1,3-結合した L-フコース残基の C-4 に硫酸基およびアセチル基が置換していることを示めている。

2.4 考察

本章では、まず、オキナワモズクから分離した CAF の構造特性を明らかにした。CAF は、L-フコース、D-キシロース、D-グルクロン酸、硫酸および酢酸が、4.0:0.03:1.0:1.8:1.0 のモル比で構成されていた (Table 2-1)。赤外吸収スペクトル分析の結果から、CAF にはアキシヤルに配向している硫酸基の存在が示唆された。¹H-NMR スペクトル分析の結果から、CAF には 4-モノ-O-スルフォ-L-フコース残基の存在が示唆された。メチル化分析の結果から、CAF は 1,3-結合の L-フコース残基を主鎖とし、側鎖として D-グルクロン酸残基が主鎖の L-フコース残基の C-2 に置換し、また硫酸基およびアセチル基が D-グルクロン酸残基が置換していない主鎖の L-フコース残基の C-4 に置換していることが分かった。この結果と文献から [Nagaoka *et al.*, 1999; Sakai *et al.*, 2003]、CAF の修正構造を Figure 2-4 の様に提案した。本研究により、CAF のアセチル基の置換位置を含む化学構造が初めて明らかとなった。

次に、過硫酸化 CAF を調製し、その化学特性を検討した。CAF は過硫酸化することによって、その硫酸含量が 13.5% から 32.8% に増大した。赤外吸収スペクトル分析の結果から、過硫酸化 CAF にはアキシヤルおよびエカトリアルに配向している硫酸基の存在が示唆された。¹H-NMR スペクトル分析の結果から、過硫酸化 CAF には 2,4-ジ-O-スルフォ-L-フコース残基、2-モノ-O-スルフォ-L-フコース残基および 4-モ

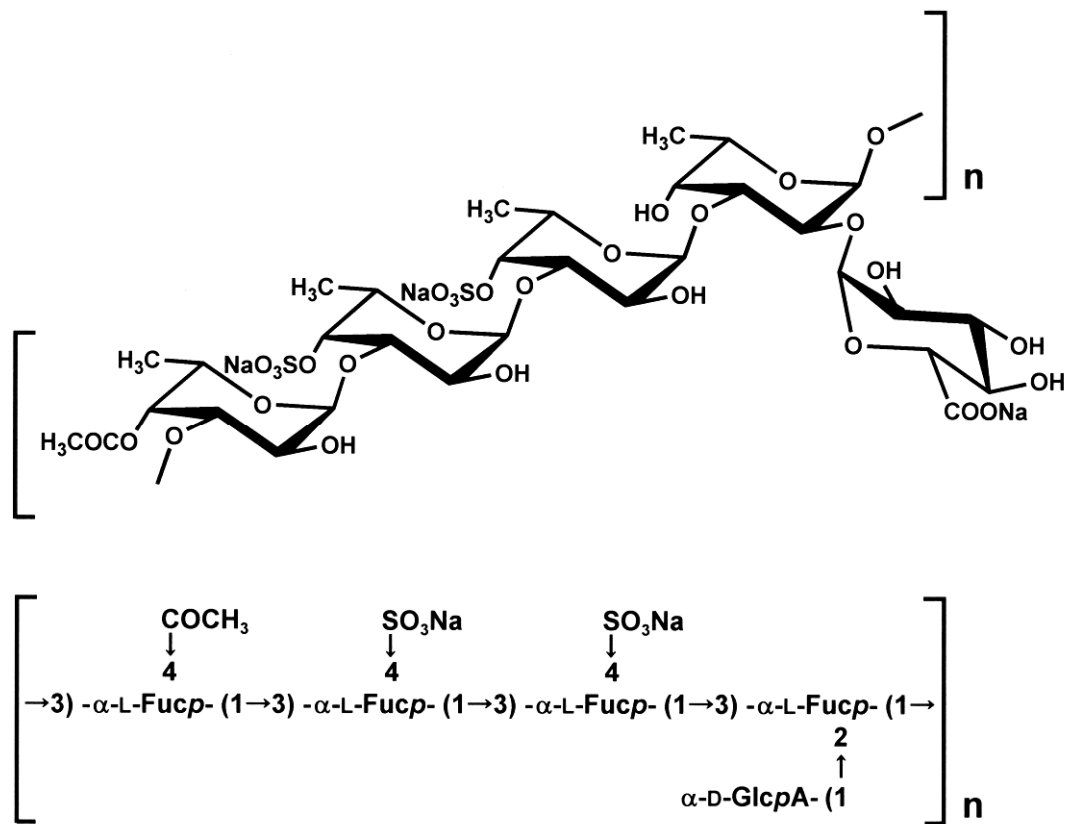


Figure 2-4. The modified structure of CAF. CAF consisted of α -1,3-linked L-fucosyl residues where D-glucuronic acid residues substituted at the C-2 and sulfate and acetyl groups at the C-4.

N-*O*-スルフォ-L-フコース残基の存在が示唆された。CAF は主鎖の L-フコース残基の C-4 のみに硫酸基が置換しているが、過硫酸化 CAF では、さらに、主鎖の L-フコース残基の C-2 に硫酸基が置換していることが示唆された。

多糖の構造特性はその物理化学的・生理学的特性と相関性がある。また、多糖の有する硫酸基は、血管新生抑制作用、血液凝固抑制作用

および細胞増殖阻害作用に対して重要な働きをしており、その硫酸化度と生理活性強度には相関性があることが知られている [Ferial *et al.*, 2000; Koyanagi *et al.*, 2003]。本章では、CAF の構造特性を明らかにした。また、過硫酸化 CAF を調製し、その化学特性を明らかにした。今後、それらの生理活性や構造と生理活性の相関性解明が期待される。

小括

本章では、まず、CAF の構造特性を明らかにした。CAF の全糖量、ウロン酸含量、硫酸含量はそれぞれ 67.1%、12.1% および 13.5% であった。CAF は、L-フコース、D-キシロース、D-グルクロン酸、硫酸および酢酸が、4.0:0.03:1.0:1.8:1.0 のモル比で構成されていた。また、CAF は α -1,3-結合の L-フコース残基を主鎖とし、側鎖として D-グルクロン酸残基が主鎖の L-フコース残基の C-2 に置換し、硫酸基およびアセチル基は D-グルクロン酸残基が置換していない主鎖の L-フコース残基の C-4 に置換していることが明らかとなった。この結果と文献から [Nagaoka *et al.*, 1999; Sakai *et al.*, 2003]、CAF の化学構造を提案した。次に、過硫酸化 CAF を調製し、その化学特性を明らかにした。CAF は過硫酸化することによって、その硫酸含量が 32.8% に増大した。過硫酸化 CAF では、さらに、主鎖の L-フコース残基の C-2 に硫酸基が置換していることが示唆された。

第 3 章 過硫酸化アセチルフコイダンの U937 細胞における アポトーシス誘導作用

3.1 緒言

硫酸化多糖は動物および植物に幅広く見られ、主に細胞外マトリクスとして細胞外の空間を充填する物質である。動物ではヘパリン、ヘパラン硫酸、デルマタン硫酸やコンドロイチン硫酸などのグリコサミノグリカンが存在し、プロテオグリカンの多糖部分を構成している。これらの主要な機能は細胞接着や細胞間情報交換に留まらず、増殖因子の貯蔵や病原体に対する防御に関わっている [Linhardt *et al.*, 1997]。植物では海藻類に、フコイダン、アガロースやカラギーナンなどの硫酸化多糖が見られるが、これらも構造の維持だけではなく外部因子に対する防御に関わっていると考えられている。硫酸化多糖は様々な物理化学的・生理学的特性を示すが、その機能の多くは硫酸基の存在によるものである。

第 2 章では、オキナワモズク (*Cladosiphon okamuranus* TOKIDA) から分離・精製したアセチルフコイダン [田幸ら, 1996; Tako *et al.*, 2000] の化学構造を提案した。オキナワモズク由来アセチルフコイダン (CAF) には肝臓コレステロールの上昇抑制作用 [上原ら, 1996]、*Helicobacter pylori* の胃細胞への接着防止作用 [Shibata *et al.*, 1999 and

2000] やマウスの慢性的大腸炎の治癒作用 [Matsumoto *et al.*, 2004] など、様々な生理活性が報告されている。近年、フコイダンの硫酸化度と生理活性強度の相関性に関する報告があり、Ferial らはフコイダンの硫酸化度の増大に伴って血液凝固抑制作用および細胞増殖阻害作用が高くなることを報告した [Ferial *et al.*, 2000]。また、Koyanagi らは、フコイダンを化学的に過硫酸化処理することでその血管新生抑制作用が増大し、その結果、ネイティブのフコイダンと比較して腫瘍の成長を抑制する作用が高くなると報告した [Koyanagi *et al.*, 2003]。これら二つの報告は、硫酸化多糖の生理活性がその硫酸基に強く依存していることを示している。すなわち、硫酸基を化学的に導入することによって、多糖の性質や生理活性を制御出来る。CAF は、硫酸基が主鎖の L-フコース 2 残基に 1 残基の割合でその C-4 に置換している程度で、その硫酸化度は他の海藻に由来するフコイダンと比較して高くはない [Patankar *et al.*, 1993; Tako *et al.*, 1999b; Sakai *et al.*, 2003; Shiroma *et al.*, 2003]。このことから、CAF についても、過硫酸化処理を行うことにより、その生理活性を制御することが出来ると考えた。そこで、第 2 章ではまた、過硫酸化 CAF を調製した。

一般的に、アポトーシスは正常な発生や組織の恒常性維持に見られる、遺伝的に制御された生理的な細胞死である。細胞においてアポトーシスが誘導されると、細胞は縮小し、また核内ではクロマチンが凝

縮して核が断片化する。そして、細胞自体が断片化し、アポトーシス小体が形成される。アポトーシス小体はマクロファージなどの食細胞や隣接する細胞によって貪食除去されるため、細胞内容物が流出せず炎症は起こらない。一方、ネクローシスは高度に制御された細胞死であるアポトーシスとは異なり、物理的、化学的刺激や虚血などによる偶発的な病理的細胞死である。ネクローシスは細胞質、特にミトコンドリアが膨張し、細胞全体も徐々に膨張していくことから始まる。エネルギーを生産するミトコンドリア機能が失われると、細胞膜のイオン輸送系が崩壊し、浸透圧調整能は失われ細胞溶解が起こる [Majio *et al.*, 1995; Van Cruchten *et al.*, 2002]。そして、細胞内容物が流出して炎症が起こる。この様な点で、現在、腫瘍細胞に特異的にアポトーシス誘導させるアポトーシス誘導療法は副作用の少ない理想的な治療法であるとして期待されている

本章では、ヒトリンパ腫由来細胞株である U937 を用いて、過硫酸化 CAF の細胞傷害活性とその作用機構について検討した。

3.2 材料および実験方法

3.2.1 材料および試薬

オキナワモズクは 2003 年に沖縄県南城市知念で養殖されたものを

用いた。RPMI1640 培地、牛胎児血清 (FBS) およびペニシリン・ストレプトマイシンは Gibco BRL (Grand Island, NY, USA) から購入した。カスパーゼ 3 活性測定キット (CaspACE Assay system Colorimetric) は Promega (Madison, WI, USA) から購入した。アポトーシス細胞検出キット (APOPercentageTM apoptosis Assay) は Biocolor (Belfast, Northern Ireland) より購入した。モノクローナル抗カスパーゼ 3 抗体 (マウス IgG)、モノクローナル抗カスパーゼ 7 抗体 (マウス IgG) およびモノクローナル抗 poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) 抗体 (マウス IgG) は BD Pharmagen (San Diego, CA, USA) より購入した。西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ポリクローナル抗マウス IgG 抗体 (ヤギ IgG) は、GE Healthcare Biosciences (Piscataway, NJ, USA) より購入した。

3.2.2 オキナワモズクから CAF の調製

オキナワモズクから CAF の調製は Tako らの方法 [Tako *et al.*, 2000] に従って、第 2 章に記述した通りに行った。

3.2.3 過硫酸化

CAF の過硫酸化は Soeda らの方法に従って [Soeda *et al.*, 1992]、第 2 章に記述した通りに行った。

3.2.4 脱硫酸化

CAF の脱硫酸化はソルボリシス法により [Nagasawa *et al.*, 1977]、第 2 章に記述した通りに行った。

3.2.5 細胞培養

ヒトリンパ腫由来細胞株である U937 (JCRB9021) は、ヒューマンサイエンス研究資源バンク (大阪、日本) より入手した。細胞を 10% の非動化済み FBS、100 IU/mL のペニシリンおよび 100 μ g/mL のストレプトマイシンを添加した RPMI1640 培地に分散し、37 $^{\circ}$ C、5% CO₂-95% 空気気相下で培養した。以降に示す細胞傷害活性試験、形態観察、アポトーシス細胞の検出、カスパーゼ 3 活性の測定および活性型カスパーゼと開裂 PARP の検出においては 2% の非動化済み FBS を添加して実験を行った。継代は 5 日ごとに細胞がコンフルエントになる前に行った。なお、継代回数を重ねることによる細胞の形質変化を避けるために、継代 15 回目までの細胞を本実験には供した。

3.2.6 細胞傷害活性試験

細胞傷害活性は WST-1 法により評価した。96 穴マイクロプレートに 1.0×10^5 個/mL になるように U937 細胞を播き、24 時間前培養した。その後、試料を添加し、U937 細胞を 72 時間処理した。処理終了後に、

5 mM 2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium (WST-1) および 2 mM 1-Methoxy-5-methylphenazinium methyl sulfate (同仁化学研究所、熊本、日本) を含む HEPES バッファ―溶液を各ウェルに 10 μ L ずつ添加し 4 時間、37 $^{\circ}$ C、5% CO₂-95% 空気相下で培養した。そして、マイクロプレートリーダー (Model 650, Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) で吸光度 (測定波長 450 nm および参照波長 620 nm) を測定した。細胞傷害活性は、対照群の吸光度に対する試料添加による吸光度の変化を比較することで評価した。

3.2.7 形態観察

U937 細胞を 1.0×10^5 個/mL になるように 60 mm ディッシュに播き、24 時間前培養した。その後、CAF を 20 μ g/mL になるように添加し、U937 細胞を 48 時間処理した。その後、倒立位相差顕微鏡 (TS-100F、株式会社ニコン、東京、日本) を用いて観察した。撮影にはデジタルカメラ (COOLPIX Microsystem、株式会社ニコン) を用いた。

3.2.8 アポトーシス細胞の検出

アポトーシス細胞の検出は、市販の検出キットである APOPercentageTM Apoptosis Assay を用いて行った。このキットに含ま

れている APOPercentageTM 色素は、アポトーシスに特異的な構造の変化が生じた細胞膜のみを通過することが出来る。60 mm ディッシュに 1.0×10^5 個/mL になるように U937 細胞を播き、24 時間前培養した。その後、U937 細胞を過硫酸化 CAF で 48 時間処理した。APOPercentageTM 色素で染色された細胞を、検出キットのプロトコールに従って測定した。

3.2.9 カスパーゼ 3 活性の測定

カスパーゼ 3 活性の測定は、市販の測定キットである CaspACE Assay system を用いて行った。この測定キットはカスパーゼ 3 の活性を、発色色素である *p*-ニトロアニリン (pNA) で標識された基質 (Ac-DEVD-pNA) が活性型カスパーゼ 3 により切断され、その結果基質から遊離した pNA 産物 (黄色を呈する) の吸光値 (405 nm) を指標とすることで測定出来る。まず、U937 細胞を過硫酸化 CAF で処理し、カスパーゼ 3 の活性を測定キットのプロトコールに従って測定した。

3.2.10 イムノプロット分析

過硫酸化 CAF で処理した U937 細胞 (1.0×10^5 個/mL) を遠心分離 ($180 \times g$ 、5 分間) により回収した。細胞はあらかじめ氷冷した D-PBS で洗浄後、2-メルカプトエタノール不含の SDS サンプルバッファー

(0.05 M Tris-HCl、2% SDS、10% グリセロール) を加えて溶解した。これを 95 °C で 5 分間加熱した後、遠心分離 (15,000 × g、5 分間) し、上清の全細胞溶解液を回収した。その一部をタンパク質定量用試料として取り分けた。全細胞溶解液中のタンパク質含量は、DC Protein assay kit (Bio-Rad Laboratories, Inc.) を用いて、牛血清アルブミンを標品として検量線を作成し、それを用いて算出した。得られた全細胞溶解液に最終濃度 10% になるように 2-メルカプトエタノールを加えてよく撹拌した。これを 95 °C で 5 分間加熱した後、遠心分離 (15,000 × g、5 分間) して上清を回収し、これを SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動用の試料とした。この試料を各々等量のタンパク質含量になるように調製し、10%の SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動によってタンパク質を分離した。分離したタンパク質を PVDF メンブレン (Millipore Co., Billerica, MA, USA) に転写した。その後、メンブレンを 5%スキムミルクおよび 0.1%Tween 20 を含む Tris-HCl バッファー (pH 7.6) で 1 時間ブロッキングした。そして、一次抗体として抗-カスパーゼ 3、抗カスパーゼ 7 および抗 PARP 抗体をそれぞれ反応させた。次に、二次抗体として西洋ワサビペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG 抗体をそれぞれに反応させた。免疫反応バンドの検出には ECL Plus Western Blotting Detection kit (GE Healthcare Biosciences Ltd.) を用いて、化学発光法で行った。

3.2.11 統計分析

測定値は平均値±標準誤差で表した。各群の比較は Dunnett 検定に従って分散分析を行い、 $p<0.05$ を有意差とした。

3.3 結果

3.3.1 U937 細胞におけるネイティブ、脱硫酸化および過硫酸化 CAF の細胞傷害活性

U937 細胞におけるネイティブ、脱硫酸化および過硫酸化 CAF の細胞傷害活性を Figure 3-1 に示した。高濃度のネイティブ CAF で処理すると僅かに細胞傷害活性が認められたが、 $20 \mu\text{g}/\text{mL}$ 以下では全く認められなかった。また、脱硫酸化 CAF $1\text{-}100 \mu\text{g}/\text{mL}$ で処理しても全く細胞傷害活性が認められなかった。しかしながら、過硫酸化 CAF で処理すると、低濃度でも細胞傷害活性が顕著に認められ、濃度依存的な細胞傷害活性を示した。

3.3.2 形態的变化

アポトーシスは、細胞膜の変化を伴う細胞サイズの縮小と核内の構造変化から始まる。そして、細胞自体が開裂してアポトーシス小体 (apoptotic body) を形成する [Kerr *et al.*, 1972 and 1997]。そこで、過硫

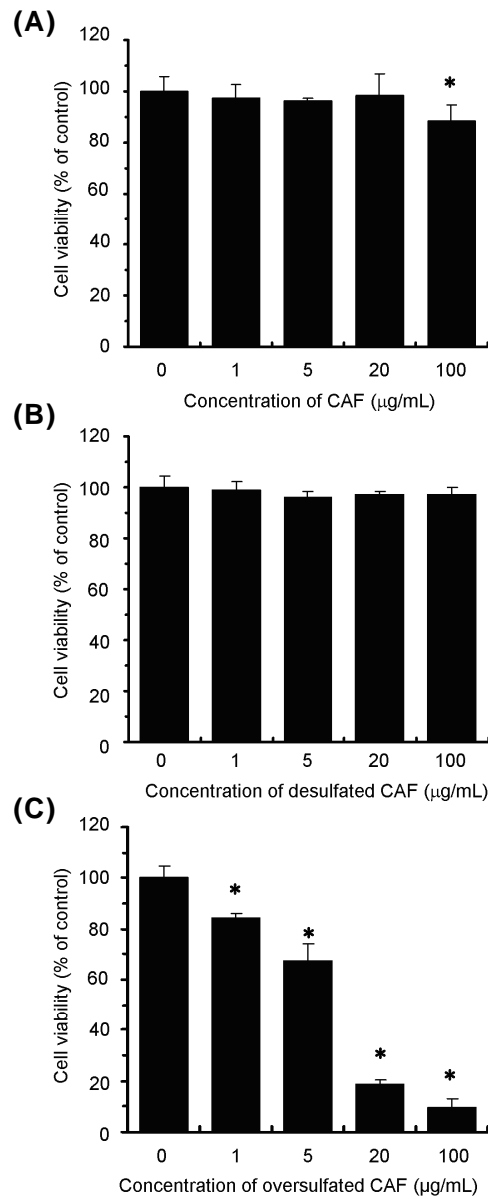


Figure 3-1. Effect of treatment with native (A), desulfated (B) and oversulfated CAF (C) on cell viability in U937 cells. U937 cells were treated with native, desulfated or oversulfated CAF (1-100 µg/mL) for 72 h. Data were means ± S.E.M. of three independent experiments. Asterisks show statistically significant differences from the untreated (control) group ($p < 0.05$).

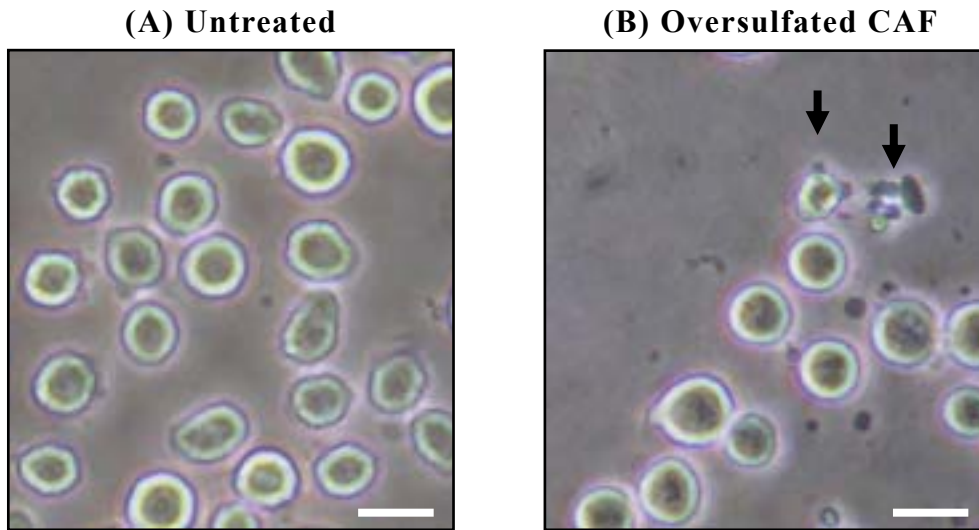


Figure 3-2. Microscopic appearance of U937 cells treated without (A) or with 20 µg/mL of oversulfated CAF (B) for 48 h. At the end of each culture period, cells were imaged using a phase contrast microscope and digital camera. Calibration bar is 25 µm.

酸化 CAF 20 µg/mL で 48 時間 U937 細胞を処理し、その形態を観察した。過硫酸化 CAF で処理した U937 細胞ではアポトーシス小体様の像が観察され、その形態は未処理の細胞と大きく異なっていた (Figure 3-2)。

3.3.3 過硫酸化 CAF のアポトーシス誘導作用

アポトーシス細胞内に特異的に移行する APOPercentage™ 色素を用いて、過硫酸化 CAF が U937 細胞にアポトーシスを誘導したかどうかを評価した (Figure 3-3)。その結果、過硫酸化 CAF 1 µg/mL で処理す

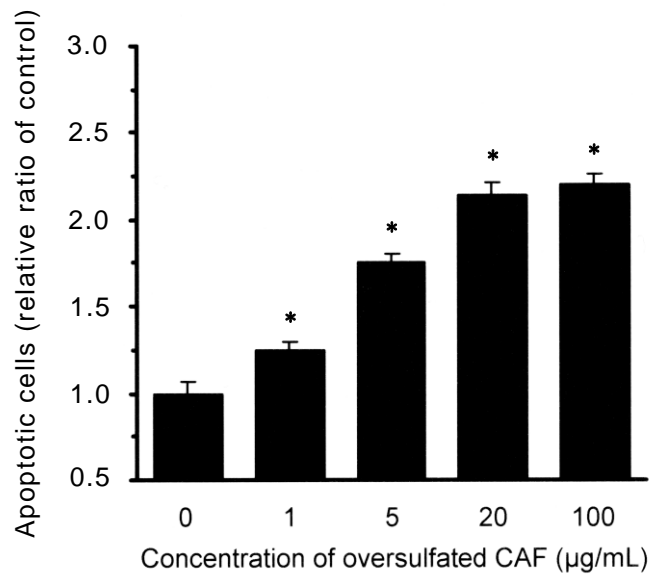


Figure 3-3. Effect of oversulfated CAF on induction of apoptosis in U937 cells. U937 cells were treated with oversulfated CAF (1-100 µg/mL) for 48 h. Data were means ± S.E.M. of three independent experiments. Asterisks show statistically significant differences from the untreated (control) group ($p<0.05$).

ると有意にアポトーシス細胞が増加し、過硫酸化 CAF 5 µg/mL 以上で処理するとアポトーシス細胞が著しく増加した。すなわち、過硫酸化 CAF は濃度依存的に U937 細胞にアポトーシスを誘導したことが明らかとなった。

3.3.4 カスパーゼ 3 および 7 の活性化と PARP の開裂

カスパーゼは、細胞内の様々な基質を分解することにより、アポトーシス反応を進行させる重要な役割を担っている。市販の測定キット

を用いて、過硫酸化 CAF で処理した U937 細胞におけるカスパーゼ 3 の活性を測定した (Figure 3-4)。その結果、カスパーゼ 3 の活性は、過硫酸化 CAF 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で処理を開始してから 3 時間目以降から 48 時間まで高い状態を維持した。また、過硫酸化 CAF 1-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で処理すると、カスパーゼ 3 の活性は濃度依存的に増大した。次に、イムノブロット法により過硫酸化 CAF で処理した U937 細胞における活性型カスパーゼ 3 および 7 と開裂 PARP を検出した。カスパーゼ 3 および 7 はそれぞれ 32 kDa および 35kDa の不活性型であるプロカスパーゼとして存在するが、アポトーシスが誘導された細胞においては他のプロテアーゼによって限定的に分解され、それぞれが 21 kDa および 20 kDa の活性型カスパーゼとして働く。PARP は 116 kDa の DNA 修復に関わる酵素で、カスパーゼ 3 および 7 による分解を受け 89 kDa と 25 kDa のサブユニットに開裂する。この PARP の分解はアポトーシス細胞に特異的な現象である [Nosseri *et al.*, 1994]。Figure 3-5A に過硫酸化 CAF 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で処理した U937 細胞における活性型カスパーゼ 3 および 7 と開裂 PARP の経時変化を示した。過硫酸化 CAF で処理を開始してから 0~6 時間においてはプロカスパーゼ 3 のみが検出されたが、12 時間目以降に 21 kDa の活性型カスパーゼ 3 が検出されたことから、その活性化が明らかとなった。また、カスパーゼ 7 についても同様に、過硫酸化 CAF で処理を開始してから 12 時間目以降に 20 kDa の活性型カ

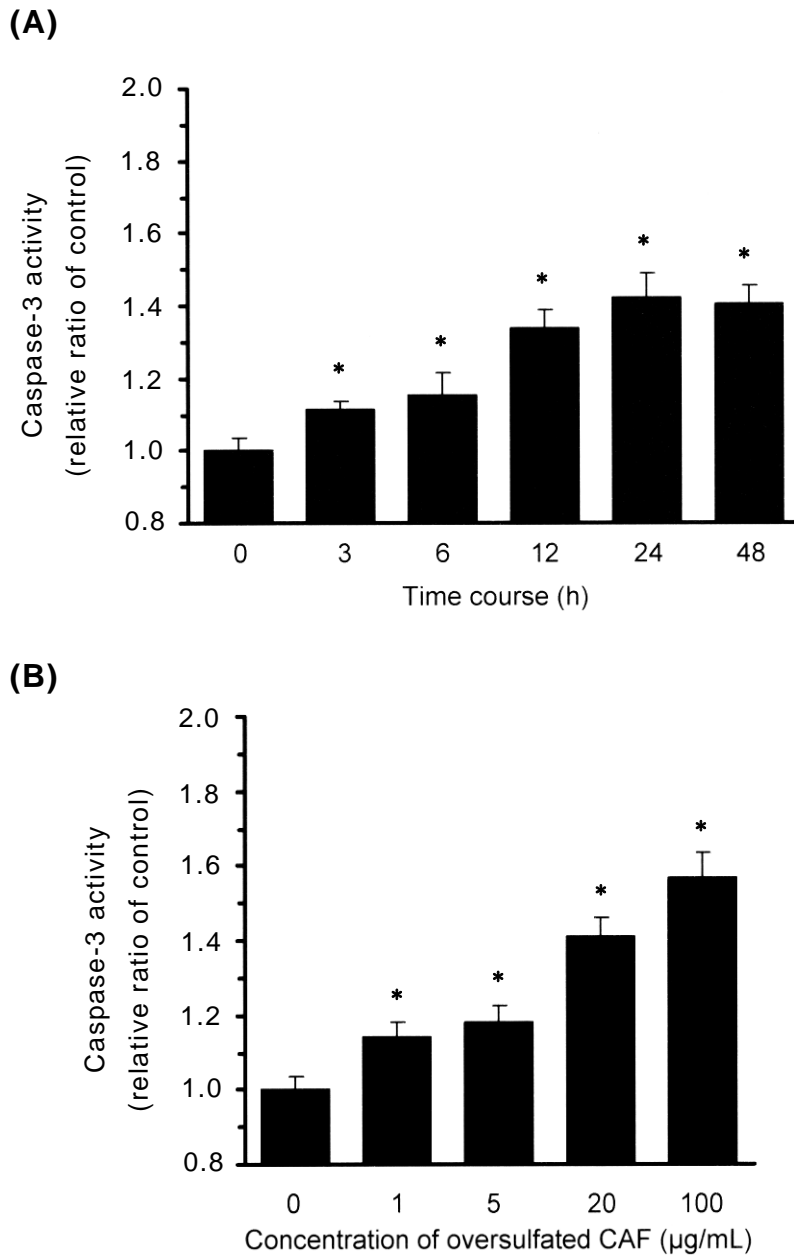


Figure 3-4. Induction of caspase-3 activity in U937 cells treated with oversulfated CAF in time (A) and dose (B) -dependent manners. Data were means \pm S.E.M. of three independent experiments. Asterisks show statistically significant differences from the untreated (control) group ($p < 0.05$).

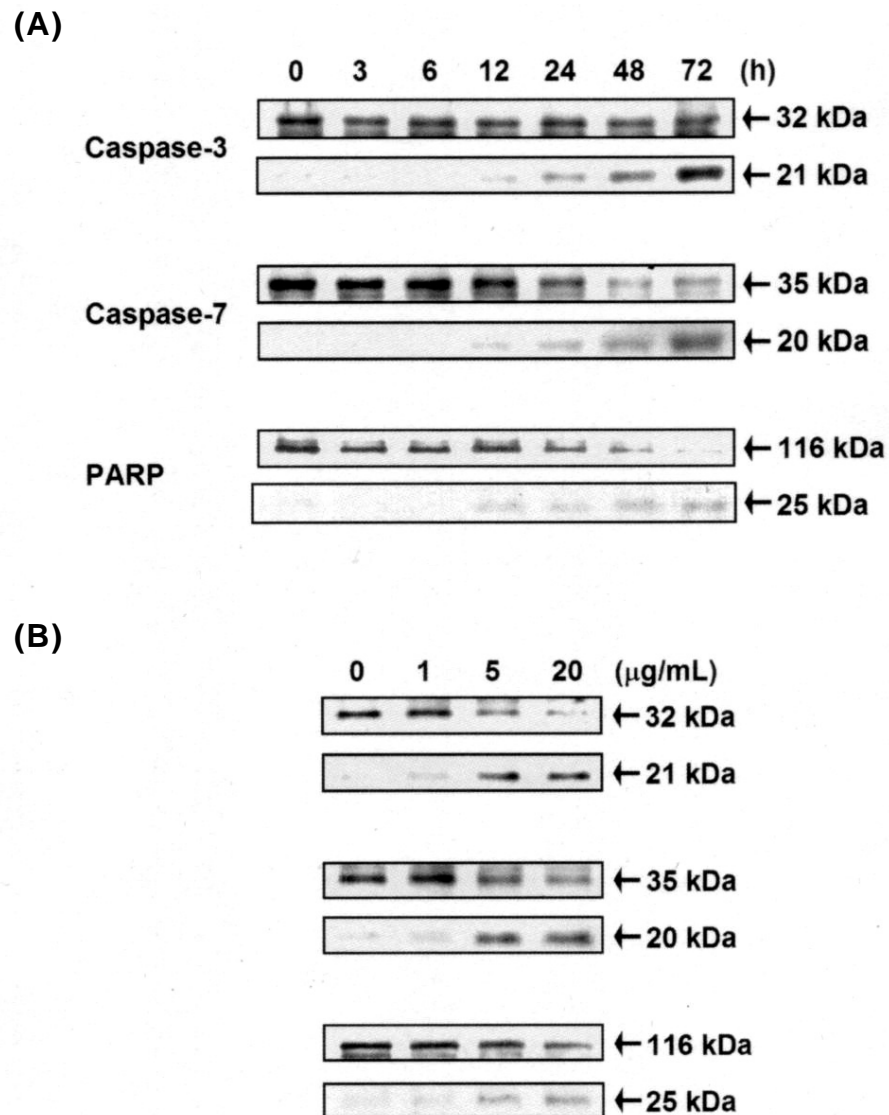


Figure 3-5. Induction of caspase-3, 7 activity and PARP cleavage in U937 cells treated with oversulfated CAF in time (A) and dose (B) -dependent manners. Immunoblot analysis with anti-caspase-3 for 32 kDa pro-caspase-3 and 21 kDa subunit; anti-caspase-7 for 35 kDa pro-caspase-7 and 20 kDa subunit; anti-PARP for 116 kDa full-length and 25 kDa fragment.

スパーゼ 7 が検出されたことから、その活性化が明らかとなった。また、PARP はカスパーゼ 3 および 7 の活性化に伴って 12 時間以降から開裂が生じ、116 kDa の PARP が時間の経過に伴って減少し、25 kDa の開裂 PARP が増大した。Figure 3-5B に、過硫酸化 CAF 1-20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で 48 時間処理した U937 細胞における活性型カスパーゼ 3 および 7 と開裂 PARP の濃度依存的変化を示した。過硫酸化 CAF 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で処理すると活性型カスパーゼ 3 および 7 がわずかに検出され、さらに、過硫酸化 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上で処理すると顕著に検出された。また、それによって開裂 PARP が増大した。

3.4 考察

フコイダンは硫酸化多糖の一種で多様な生理活性を有している。フコイダンの硫酸基はその生理活性の多くにおいて重要な働きをしていることが知られている [Ferial *et al.*, 2000; Koyanagi *et al.*, 2003]。本章では、まず、過硫酸化 CAF の U937 細胞に対する細胞傷害活性を評価した。硫酸化 CAF は U937 細胞に対して顕著に細胞傷害活性を示した。しかしながら、ネイティブ CAF は細胞傷害活性が僅かにしか認められず、さらに、脱硫酸化 CAF ではそれが全く認められなかった。過硫酸化 CAF の U937 細胞に対する細胞傷害活性において、硫酸基は活性部位として作用するか、または CAF 分子鎖のコンフォメーションを、生

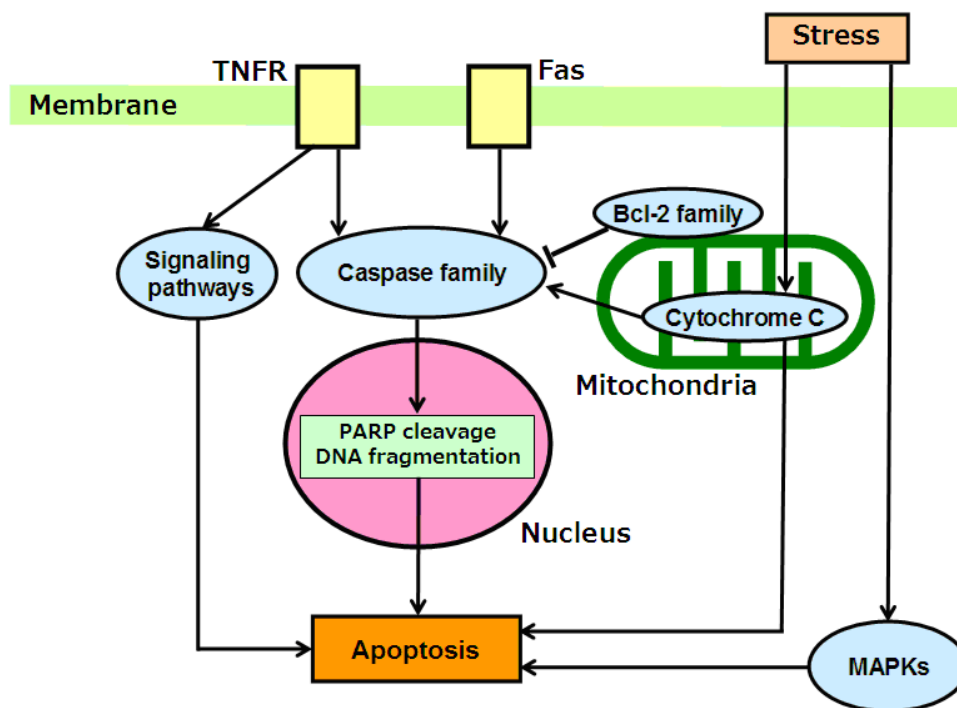


Figure 3-6. Schematic model of signaling pathways involved in apoptosis.

理活性を示す状態に安定または変移させる働きがあると考えられる。

次に、過硫酸化 CAF がどのような作用機構で U937 細胞を傷害しているか検討した。過硫酸化 CAF で処理した U937 細胞は、アポトーシス細胞に特徴的な形態的变化が認められた。また、APOPercentageTM アッセイによりアポトーシス細胞の増加が認められた。アポトーシスは腫瘍壊死因子受容体 (Tumor necrosis factor receptor; TNFR) や Fas 受容体に死のシグナルが伝わると、細胞内シグナル伝達系により死の決定が伝達され実行される (Figure 3-6)。また、放射線や化学物質などのストレスもアポトーシスを誘導する。カスパーゼは特定のタンパク質

を限定的に分解することにより、アポトーシスを実行する中心的な役割を担っている。カスパーゼは主に TNFR および Fas 経路と、ミトコンドリアのシトクロム C 経路の二つの経路によって活性化される。ミトコンドリア上の B cell lymphoma/leukemia-2 (Bcl-2) はカスパーゼの活性化を抑制している。カスパーゼは活性化すると、種々の基質を切断することによりアポトーシスの実行を行う [Reed, 2000]。また、アポトーシスはマイトジェン活性化プロテインキナーゼ (mitogen-activated protein kinase; MAPK) 経路が関与する場合もあり、複数のシグナル伝達経路によって複雑に制御されている。イムノブロット分析の結果から、過硫酸化 CAF で U937 細胞を処理するとカスパーゼ 3 および 7 が活性化し、それに伴って PARP が開裂していることが確認された。これらの結果は、過硫酸化 CAF は U937 細胞に対して、カスパーゼ 3 および 7 を活性化してアポトーシスを誘導したことを示している。すなわち、過硫酸化 CAF は U937 細胞に対してアポトーシスを誘導することにより、細胞傷害活性を示すことが明らかとなった。

腫瘍細胞に特異的にアポトーシスを誘導するアポトーシス誘導療法は副作用の少ない理想的な治療法であり、実際に、ガン治療に用いられている 4'-dimethyl epipodophyllotoxin 9-(4,6-O-ethylidene-β-D-glucopylanoside) (etoposide)、cis-platinum II diamine dichloride (cisplatin) や Cytosine arabinoside (Ara-C) など、抗ガン剤の多くが腫瘍細胞に対

してアポトーシスを誘導することが明らかになっている [Kaufman, 1989; Hannaun, 1997; Kanno *et al.*, 2004]。この点から推測するに、過硫酸化 CAF は抗ガン剤や、その開発におけるモデル物質として利用出来る可能性が推測された。また、CAF の過硫酸化はその生理活性を制御することが可能であることから、今後更なる応用が期待できる。

小括

本章では、U937 細胞における過硫酸化 CAF の細胞傷害活性とその機構について検討した。過硫酸化 CAF では U937 細胞に対する細胞傷害活性が顕著に認められたが、ネイティブ CAF では僅かにしか認められなかった。また、脱硫酸化 CAF ではほとんどそれが認められなかった。過硫酸化 CAF で U937 細胞を処理すると、アポトーシス細胞に特徴的な形態が認められた。さらに、APOPercentageTM アッセイによりアポトーシス細胞の増加が検出された。免疫ブロット分析により、過硫酸化 CAF で処理した U937 細胞では、カスパーゼ 3 および 7 の活性化と PARP の開裂が認められた。すなわち、過硫酸化 CAF は U937 細胞に対してカスパーゼ 3 および 7 が関与するアポトーシスを誘導することにより、細胞傷害活性を示していた。

第4章 オキナワモズク由来アセチルフコイダンの マクロファージ活性化作用

4.1 緒言

ヒトの宿主防御反応は複数の段階を有する複雑なもので、多種の細胞がこれに関わっている。マクロファージは多機能性免疫細胞の一種で、侵入してきた病原体を貪食し、また、炎症性メディエーターやサイトカインを産生することで宿主に侵入した病原体を排除する。一酸化窒素 (NO) は炎症性メディエーターの一種として知られており、誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS) により L-アルギニンから生成される [Palmer *et al.*, 1988]。NO は細胞傷害、病原体の殺傷や殺腫瘍などに貢献している [Dennys *et al.*, 1989; Farias-Eisner *et al.*, 1994; Xie *et al.*, 1995]。サイトカインは細胞から分泌されるタンパク質で、特定の細胞に情報伝達する働きを有する。腫瘍壊死因子 (Tumor necrosis factor; TNF) やインターロイキン (Interleukin; IL) など、特に炎症や免疫応答を複雑に制御しているものが多い [Balkwill *et al.*, 1989]。

一方、植物や海藻由来の多糖がマクロファージを活性化することがよく知られている [Han *et al.*, 1998 and 2001; Jeon *et al.*, 2000 and 2001; Pugh *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2004; Iwamoto *et al.*, 2005; Nakamura *et al.*, 2006; Leiroa *et al.*, 2007]。多糖によるマクロファージ活性化の機構につ

いて、Figure 4-1 に概略図を示した。多糖がマクロファージを活性化する過程は、まず、それがマクロファージの膜レセプターによって認識されることから始まる [Jeon *et al.*, 2000; Han *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2004; Nakamura *et al.*, 2006]。膜レセプターは、初期の免疫応答において宿主外部に由来する糖質、脂質およびペプチドなどを認識するパターン認識分子であり、Toll 様レセプター-4 (TLR4)、CD14、Complement receptor 3 (CR3) および Scavenger receptor class A (SRA) は主要な膜レセプターとして知られている。TLR4 は膜貫通型の糖タンパク質で、先天的および後天的免疫応答において病原体の特異的な分子パターンを認識するという重要な働きを担っている [Lemaitre *et al.*, 1996; Werling *et al.*, 2003]。CD14 は膜結合型の糖タンパク質で単球、好中球やマクロファージなどの細胞膜表面に多く発現しており、また TLR4 の共役レセプターでもある [Da Silva *et al.*, 2001]。これら二つの膜レセプターはリポ多糖 (Lipopolysaccharide; LPS) と LPS 結合タンパク質の複合体や多糖などを認識することが報告されている [Wright *et al.*, 1990; Da Silva *et al.*, 2001]。CR3 はヘテロダイマーを形成する膜貫通型の糖タンパク質レセプターで、 β -グルカンなどを認識することが報告されている [Thornton *et al.*, 1996]。SRA type I/II は 3 回膜貫通型の糖タンパク質レセプターで、細胞接着や病原体の認識に関わっており、陰イオン性のポリマー、 β -グルカンや LPS などを認識することが報告され

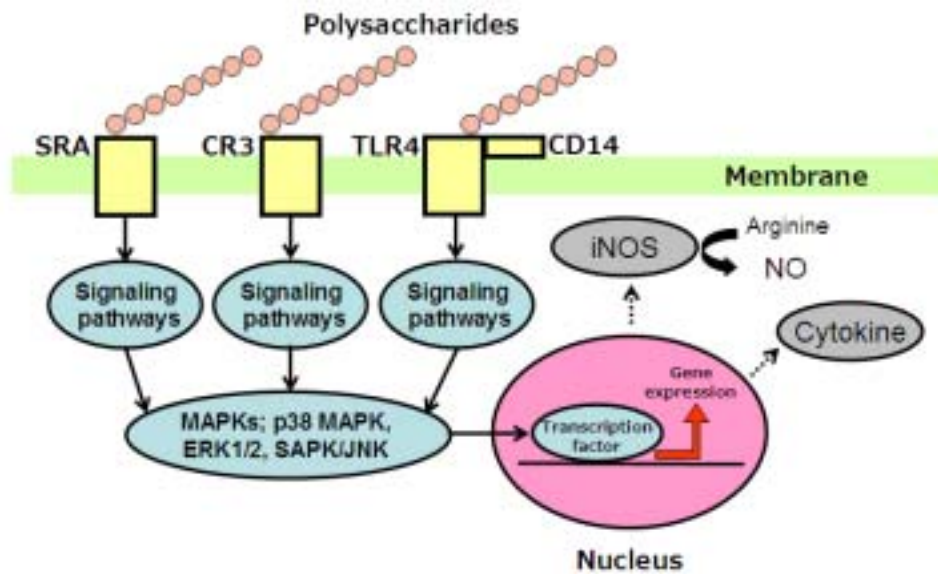


Figure 4-1. Schematic model of signaling pathways involved in macrophage activation by polysaccharides.

ている [Krieger *et al.*, 1994; Rice *et al.*, 2002]。これら膜レセプターはリガンドを認識すると細胞内シグナル伝達因子を活性化し、結果的にマクロファージが活性化する [Jeon *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2004; Nakamura *et al.*, 2006]。セリン/スレオニンプロテインキナーゼファミリーであるマイトジェン活性化プロテインキナーゼ (mitogen-activated protein kinase; MAPK) は、細胞の分化、成長、アポトーシスや炎症などを制御する代表的な細胞内シグナル伝達因子であり、酵母から高等植物、哺乳類に至るまで高度に保存されている [Chang *et al.*, 2001; Kyriakis *et al.*, 2001; Pearson *et al.*, 2001]。MAPK は、p38 MAPK、細胞外シグナル制御キナーゼ (extracellular signal-regulated

kinase; ERK) 1/2 およびストレス活性化プロテインキナーゼ/c-Jun N 末端キナーゼ (stress-activated protein kinase/c-Jun-N-terminal kinase; SAPK/JNK) ファミリーに分類することが出来る。各々の MAPK は MAPK キナーゼ (MAPKK) によってリン酸化され、MAPKK はその上流の MAPKK キナーゼ (MAPKKK) によってリン酸化される。このように MAPK は MAPKKK→MAPKK→MAPK と活性化され、活性化 MAPK はさらに転写因子を活性化し、様々な遺伝子発現を誘導する。

先に、沖縄県で養殖されているオキナワモズク (*Cladosiphon okamuranus* TOKIDA) からアセチルフコイダンが分離・同定された [田幸ら, 1996; Tako *et al.*, 2000]。オキナワモズク由来アセチルフコイダン (CAF) の主要な化学構造を Nagaoka らおよび Sakai らが報告した [Nagaoka *et al.*, 1999; Sakai *et al.*, 2003]。第 2 章では、さらに、そのアセチル基の置換位置を特定し、化学構造を提案した。CAF には肝臓コレステロールの上昇抑制作用 [上原ら, 1996]、*Helicobacter pylori* の胃細胞への接着防止作用 [Shibata *et al.*, 1999 and 2000] やマウスの慢性的大腸炎の治癒作用 [Matsumoto *et al.*, 2004] など、様々な生理活性が報告されている。CAF の新たな生理活性やその機構の解明は、その利用の創出・拡大に繋がると考える。

第 3 章では、U937 細胞における過硫酸化 CAF の細胞傷害活性とその作用機構について検討した。その結果、過硫酸化 CAF はカスパーゼ

3 および 7 の関与するアポトーシスを誘導することにより、細胞傷害活性を示していることが明らかとなった。

本章では、CAF のマクロファージ活性化作用について、マウス由来マクロファージ様細胞株である RAW 264.7 を用いて評価した。また、その作用機構についても検討した。

4.2 材料および実験方法

4.2.1 材料および試薬

オキナワモズクは沖縄県南城市知念で 2003 年に養殖されたものを用いた。ダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM)、牛胎児血清 (FBS) およびペニシリン・ストレプトマイシンは Gibco BRL (Grand Island, NY, USA) より購入した。*Escherichia coli* (O2) 由来の LPS はナカライテスク (京都、日本) より購入した。ポリクローナル抗 iNOS 抗体 (ウサギ IgG) およびモノクローナル抗 β -アクチン抗体 (ウサギ IgG) は SIGMA (St Luis, MO, USA) より購入した。モノクローナル抗 TLR4 中和抗体 (ラット IgG_{2a})、モノクローナル抗 CD14 中和抗体 (ラット IgG_{2b})、モノクローナル抗 CR3 中和抗体 (ラット IgG_{2b}) およびモノクローナル抗 SRA type I/II 中和抗体 (ラット IgG_{2b}) はそれぞれ SantaCruz Biotechnology (Santa cruz, CA, USA)、BD Pharmagen (San Diego,

CA, USA)、SouthernBiotec (Birmingham, AL, USA) および AbD Serotec (Raleigh, NC, USA) より購入した。ラット正常 IgG_{2a} および IgG_{2b} は Biologend (San Diego, CA, USA) より購入した。モノクローナル抗リン酸化 p38 MAPK 抗体 (ウサギ IgG)、モノクローナル抗 p38 MAPK 抗体 (ウサギ IgG)、モノクローナル抗リン酸化 ERK1/2 抗体 (ウサギ IgG)、モノクローナル抗 ERK1/2 抗体 (ウサギ IgG)、モノクローナル抗リン酸化 SAPK/JNK 抗体 (ウサギ IgG)、モノクローナル抗 SAPK/JNK 抗体 (ウサギ IgG)、西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ポリクローナル抗ウサギ IgG 抗体 (ヤギ IgG) および U0126 は Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA) より購入した。SB203580 および SP600125 は BIOMOL International (Plymouth Meeting, PA, USA) より購入した。

4.2.2 オキナワモズクから CAF の調製

オキナワモズクから CAF の調製は Tako らの方法 [Tako *et al.*, 2000] に従って、第 2 章に記述した通りに行った。

4.2.3 脱硫酸化

CAF の脱硫酸化はソルボリシス法により [Nagasawa *et al.*, 1977]、第 2 章に記述した通りに行った。

4.2.4 脱アセチル化

CAF の脱アセチル化はアルカリ処理することにより、第 2 章に記述した通りに行った。

4.2.5 細胞培養

マウス由来マクロファージ様細胞株である RAW 264.7 (ATCC TIB-71) は、American Type Culture Collection (Bethesda, MD, USA) より入手した。細胞は 10% の非動化済み FBS、ペニシリン 100 IU/mL およびストレプトマイシン 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を添加した DMEM 培地を用いて 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 -95% 空気気相下で培養した。継代は 5 日ごとに細胞がコンフルエントになる前に行った。なお、継代回数を重ねることによる細胞の形質変化を避けるために、継代 15 回目までの細胞を本実験に供した。

4.2.6 NO 産生量の評価

RAW 264.7 細胞の産生した NO は、それに由来する培養上清中の NO_2^- を Griess 法で定量することにより評価した。RAW 264.7 細胞を 5.0×10^5 個/mL になるように 48 穴マイクロプレートに播き、24 時間前培養した。その後、培養液中に試料を添加して 24 時間処理し、直ちに培養上清を回収した。回収した培養上清と等量の Griess 試薬 (1% スル

ファニルアミド、0.1%*N*-1-ナフチルエチレンジアミン二塩酸塩、2%リン酸)を混合し、室温で10分間静置した。その後、マイクロプレートリーダー (Model 650, Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA)を用いて、混合液の吸光度を550 nmの波長で測定した。培養上清中のNO₂⁻濃度は、亜硝酸ナトリウムの標準曲線を作成し、それを用いて算出した。

4.2.7 TNF- α および IL-6 産生量の評価

RAW 264.7 細胞を 5.0×10^5 個/mL になるように48穴マイクロプレートに播き、24時間前培養した。その後、培養液中にCAFを添加して24時間処理し、直ちに培養上清を回収した。回収した培養上清中のTNF- α および IL-6 濃度は市販のELISAキットを用いて測定し、これをRAW 264.7 細胞のTNF- α および IL-6 産生量として評価した。

4.2.8 CAFのマクロファージ活性化作用におけるポリミキシンBの影響

CAFおよびLPSをそれぞれ100 IU/mLのポリミキシンBで1時間処理した。次に、ポリミキシンB処理CAF 50 μ g/mLまたはポリミキシンB処理LPS 1 μ g/mLでRAW 264.7細胞を処理した。RAW 264.7細胞のNO産生量は、その培養上清中のNO₂⁻をGriess法で測定することに

より評価した。

4.2.9 CAF のマクロファージ活性化作用における抗 TLR4、抗 CD14、抗 CR3 および抗 SRA 中和抗体の影響

RAW 264.7 細胞を 5.0×10^5 個/mL になるように 48 穴マイクロプレートに播き、24 時間前培養した。次に、RAW 264.7 細胞は正常 IgG_{2a} または IgG_{2b} (10 μ g/mL)、もしくは、抗 TLR4、抗 CD14、抗 CR3 または抗 SRA 中和抗体 (10 μ g/mL) で 2 時間前処理した。その後、RAW 264.7 細胞を CAF 50 μ g/mL で 24 時間処理した。RAW 264.7 細胞の NO 産生量は、その培養上清中の NO₂⁻ を Griess 法で測定することにより評価した。

4.2.10 イムノプロット分析

CAF で処理した RAW 264.7 細胞を、セルスクレイパーを用いて回収した。細胞はあらかじめ氷冷した D-PBS で洗浄後、2-メルカプトエタノールを含まない SDS サンプルバッファー (0.05 M Tris-HCl、2% SDS、10% グリセロール) を加えて溶解した。これを 95 °C で 5 分間加熱した後、遠心分離 (15,000 \times g、5 分間) し、上清の全細胞溶解液を回収した。その一部をタンパク質定量用の試料として取り分けた。全細胞溶解液中のタンパク質含量は DC Protein assay kit (Bio-Rad Laboratories

Inc.) を用いて、牛血清アルブミンを標品として検量線を作成し、それを用いて算出した。得られた全細胞溶解液に終濃度 10% になるように 2-メルカプトエタノールを加えてよく攪拌した。これを 95 °C で 5 分間加熱した後、遠心分離 (15,000 × g, 5 分間) して上清を回収し、これを SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動用の試料とした。この試料を各々等量のタンパク質量になるように調製し、10% の SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動によってタンパク質を分離した。分離したタンパク質を PVDF メンブレン (Millipore, Billerica, MA, USA) に転写した。その後、メンブレンを 5 % スキムミルクおよび 0.1% Tween 20 を含む Tris-HCl バッファー (pH 7.6) で 1 時間ブロッキングした。そして、一次抗体として抗 iNOS、抗 β-アクチン、抗リン酸化 p38 MAPK、抗 p38 MAPK、抗リン酸化 ERK1/2、抗 ERK1/2、抗リン酸化 SAPK/JNK および抗 SAPK/JNK 抗体をそれぞれ反応させた。次に、二次抗体として西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ポリクローナル抗ウサギ IgG 抗体をそれぞれに反応させた。免疫反応バンドの検出には ECL Plus Western Blotting Detection kit (GE Healthcare Biosciences Ltd.) を用いて、化学発光法で行った。

4.2.11 統計分析

測定値は平均値±標準誤差で表した。各群の比較は Student の *t* 検定

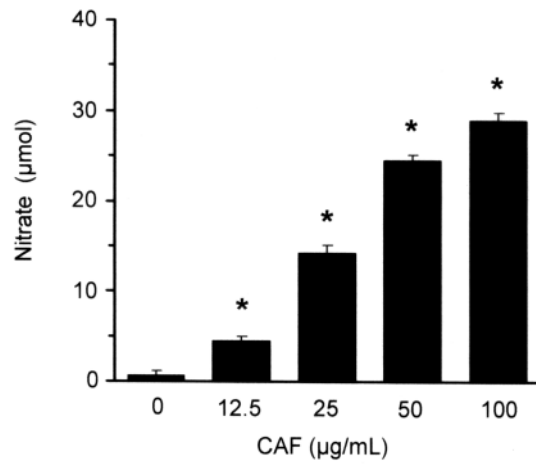
または Dunnett 検定に従って分散分析を行い、 $p < 0.05$ を有意差とした。

4.3 結果

4.3.1 マクロファージにおける CAF の NO、TNF- α および IL-6 産生誘導作用

まず初めに、CAF の NO 産生誘導作用について検討した。マクロファージの NO 産生量はその活性化のよい指標となる。RAW 264.7 細胞の NO 産生量は、未処理の細胞においては低い状態に留まったが、CAF で処理するとその処理濃度の増加に伴って著しく増大した (Figure 4-2A)。この NO 産生には iNOS が関与しているか否かを確認するために、イムノブロット分析で iNOS の検出を行った。その結果、iNOS は未処理の細胞においてはほとんど検出されなかった。一方、CAF で処理した細胞ではその処理濃度に依存して iNOS レベルが著しく増大した (Figure 4-2B)。次に、CAF の TNF- α および IL-6 産生誘導作用について検討した。RAW 264.7 細胞の TNF- α および IL-6 産生量は、未処理の細胞においては低い状態に留まったが、CAF で処理するとその処理濃度の増加に伴って著しく増大した (Figure 4-3)。これらの結果から、CAF はマクロファージを活性化し、その結果、NO、TNF- α および IL-6 産生を誘導したことが明らかとなった。

(A)



(B)

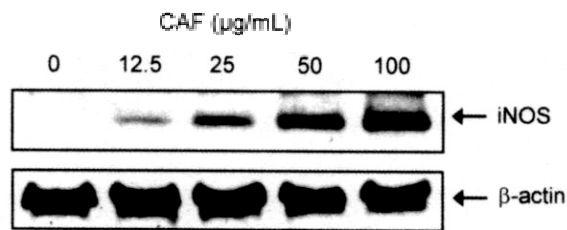


Figure 4-2. Increases of NO production (A) and iNOS induction (B) in RAW 264.7 cells treated with CAF (1-100 µg/mL) for 24 h. NO production was determined using Griess reaction. Data were means ± S.E.M. of three independent experiments. Asterisks show statistically significant differences from the untreated (control) group ($p < 0.05$). Cell lysates were prepared and subjected to immunoblot analysis for iNOS and β-actin. The equal loading in each lane was demonstrated by the similar levels of β-actin.

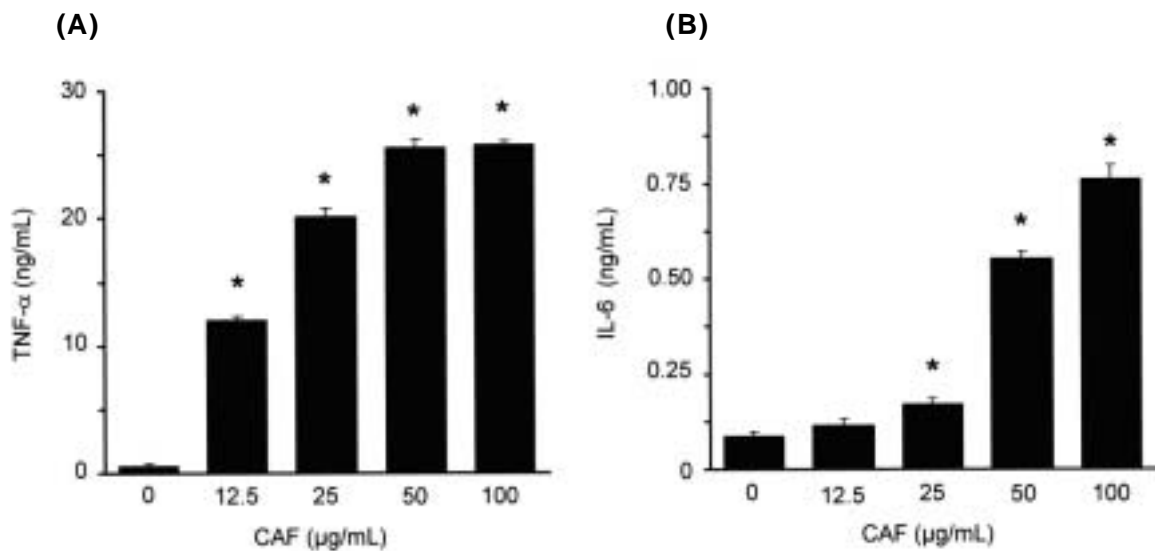


Figure 4-3. Increases of TNF- α (A) and IL-6 (B) production in RAW 264.7 cells treated with CAF (1-100 $\mu\text{g/mL}$) for 24 h. TNF- α and IL-6 production were determined using ELISA. Data were means \pm S.E.M. of three independent experiments. Asterisks show statistically significant differences from the untreated (control) group ($p < 0.05$).

4.3.2 エンドトキシン混入に対する考慮

エンドトキシンは極微量であってもマクロファージを刺激・活性化することが知られているが、試料を調製する際にその極微量な混入が度々起こる。そのため、CAFのマクロファージ活性化作用が、それに混入したエンドトキシンによるものではないことを確認した。まず、CAFをエンドトキシンのアンタゴニストであるポリミキシンBで処理し、未処理およびポリミキシンB処理CAFのNO産生誘導作用を比較した。その結果、両者間に有意差は見られなかった (Figure 4-4)。一方、

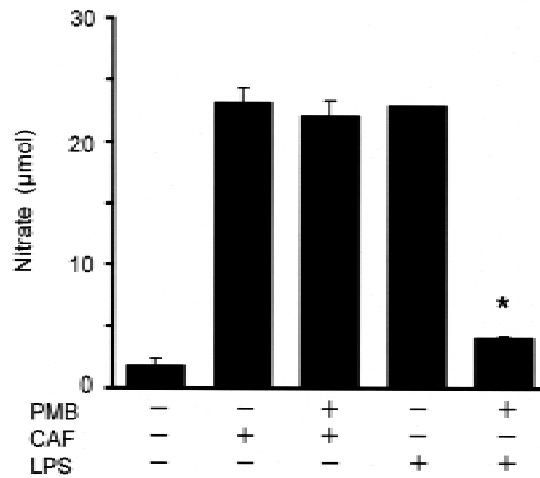


Figure 4-4. Effect of Polymyxin B (PMB) on CAF- or LPS-induced NO production in RAW 264.7 cells. CAF and LPS were pretreated with PMB (100 IU/mL) for 1 h. RAW 264.7 cells were treated with PMB-treated CAF (50 µg/mL) or LPS (1 µg/mL) for 24 h. NO production was determined using Griess reaction. Data were means ± S.E.M. of three independent experiments. Asterisk shows statistically significant difference from the CAF or LPS treated groups ($p < 0.05$).

ポリミキシン B 処理 LPS の NO 産生誘導作用は未処理のそれと比較して著しく低下した。以上の結果から、CAF のマクロファージ活性化は CAF に混入したエンドトキシンによるものではなく、CAF 自体の生理活性によって引き起こされていることが示された。

4.3.3 CAF のマクロファージ活性化作用における硫酸基およびアセチル基の関与

CAF のマクロファージ活性化作用における硫酸基およびアセチル基

の関与を検討するために、脱硫酸化、脱アセチル化および脱硫酸化-脱アセチル化 CAF を調製し、それらの NO 産生誘導作用を評価した (Figure 4-5)。脱硫酸化 CAF および脱アセチル化 CAF の NO 産生誘導作用は、ネイティブ CAF のそれと比較して有意に低かった。さらに、脱硫酸化-脱アセチル化 CAF の NO 産生誘導作用はほとんど認められなかった。これらの結果は、CAF のマクロファージ活性化には硫酸基およびアセチル基が関与していることを示している。

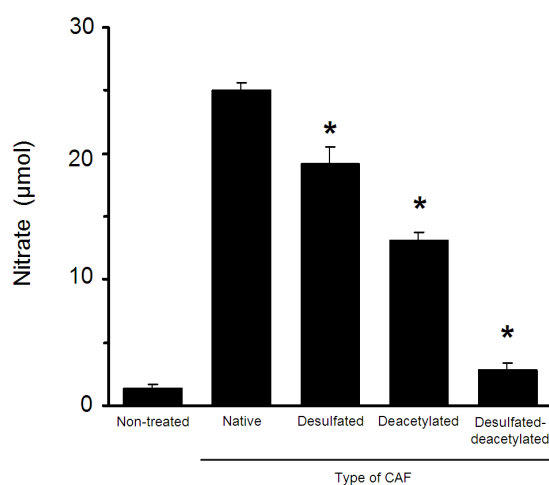


Figure 4-5. Effect of desulfated, deacetylated and desulfated-deacetylated CAF on induction of NO production in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were treated with desulfated, deacetylated or desulfated-deacetylated CAF (50 µg/mL) for 24 h. NO production was determined using Griess reaction. Data were means ± S.E.M. of three independent experiments. Asterisks show statistically significant differences from the native CAF treated group ($p < 0.05$).

4.3.4 CAF のマクロファージ活性化作用における TLR4、CD14、CR3 および SRA の関与

CAF のマクロファージ活性化における TLR4、CD14、CR3 および SRA の関与を検討するために、抗 TLR4、抗 CD14、抗 CR3 および抗 SRA 中和抗体を用いてレセプターをそれぞれブロックし、CAF の NO 産生

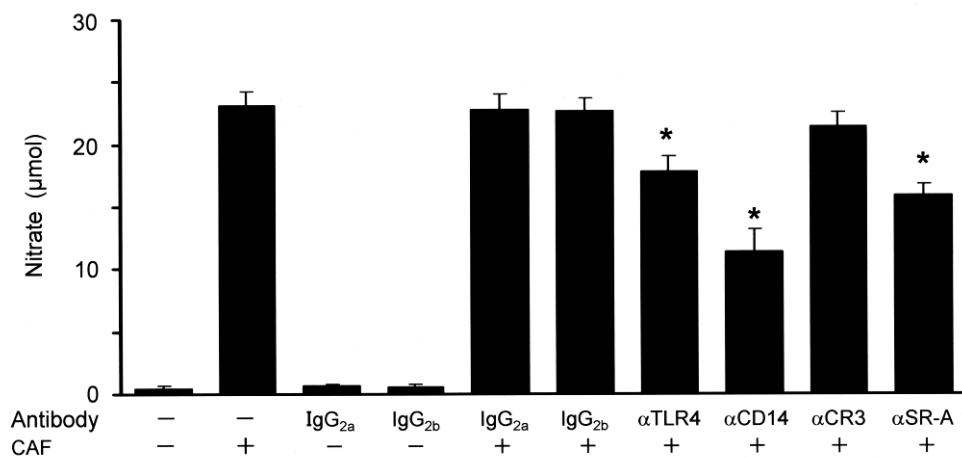


Figure 4-6. Receptor mediated NO production induced by CAF in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were pretreated with neutralizing anti-TLR4 (α TLR4), anti-CD14 (α CD14), anti-CR3 (α CR-3) or anti-SRA (α SRA) antibodies (10 μ g/mL) for 2 h, and then treated with CAF (50 μ g/mL) for 24 h. The control groups were pretreated with rat normal IgG_{2a} or IgG_{2b} (10 μ g/mL) for 2 h, and then treated with CAF (50 μ g/mL) for 24 h. NO production was determined using Griess reaction. Data were means \pm S.E.M. of three independent experiments. Asterisks show statistically significant differences from the IgG_{2a} or IgG_{2b} isotype-matched control groups ($p < 0.05$).

誘導作用へ与える影響を調べた。RAW 264.7 細胞において、TLR4、CD14 および SRA をブロックすることにより、CAF の NO 産生誘導作用が有意に減少した (Figure 4-6)。一方、CR3 をブロックしても、CAF の NO 産生誘導作用はほとんど影響を受けなかった。以上の結果から、CAF は TLR4、CD14 および SRA に認識されることによりマクロファージを活性化していることが示唆された。

4.3.5 CAF のマクロファージ活性化作用における MAPK の関与

CAF のマクロファージ活性化において、MAPK シグナル伝達因子である p38 MAPK、ERK1/2 および SAPK/JNK が関与しているか否かを検討するために、抗リン酸化 p38 MAPK、抗 p38 MAPK、抗リン酸化 ERK1/2、抗 ERK1/2、抗リン酸化 SAPK/JNK および抗 SAPK/JNK 抗体を用いてイムノブロット分析を行い、これらの活性化を評価した (Figure 4-7A)。CAF で RAW 264.7 細胞の処理を開始してから 10 分後から 30 分後までにおいて、活性型であるリン酸化 p38 MAPK、リン酸化 ERK1/2 およびリン酸化 SAPK/JNK が検出されたが、60 分以降ではそれらは検出されなかった。すなわち、MAPK は CAF で処理を開始すると短時間の内に活性化し、その後、すぐに活性が低下することが分かった。次に、SB203580 (特異的 p38 MAPK 阻害剤)、U0126 (特異的 MAPK/ERK キナーゼ 1/2 阻害剤) および SP600125 (特異的 SAPK/JNK

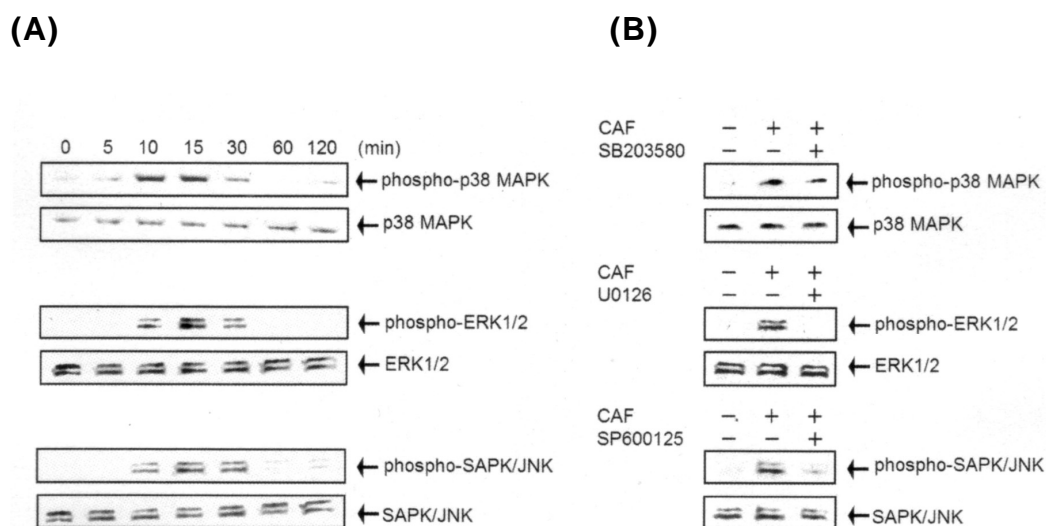


Figure 4-7. (A) Time course of CAF-induced MAPKs phosphorylation in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were treated with CAF (50 µg/mL) for the indicated time. Cell lysates were prepared and subjected to immunoblot analysis for phospho-p38 MAPK, p38 MAPK, phospho-ERK1/2, ERK1/2, phospho-SAPK/JNK and SAPK/JNK. (B) Effect of MAPK inhibitors on CAF-induced MAPKs phosphorylation. RAW 264.7 cells were pretreated with SB203580 (30 µM), U0126 (10 µM) or SP600125 (30 µM) for 1 h before the onset of treatment with CAF (50 µg/mL) for 15 min. Cell lysates were prepared and subjected to immunoblot analysis for phospho-p38 MAPK, p38 MAPK, phospho-ERK1/2, ERK1/2, phospho-SAPK/JNK and SAPK/JNK.

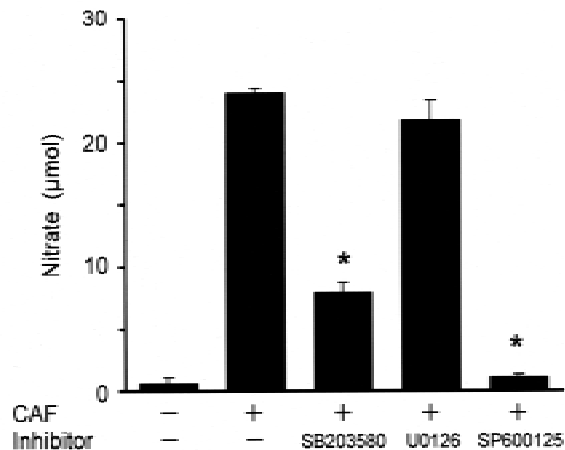


Figure 4-8. Effect of MAPK inhibitors on CAF-induced NO production in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were pretreated with SB203580 (30 µM), U0126 (10 µM) or SP600125 (30 µM) for 1 h, and then treated with CAF (50 µg/mL) for 24 h. The NO production was determined using Griess reaction. Data were means ± S.E.M. of three independent experiments. Asterisks show statistically significant differences from treated with CAF alone ($p < 0.05$).

阻害剤) を用いて、p38 MAPK、ERK1/2 および SAPK/JNK のそれぞれの活性化 (リン酸化) を阻害し、CAF の NO 産生誘導作用に与える影響を調べた。SB203580、U0126 および SP600125 は、CAF が誘導する p38 MAPK、ERK1/2 および SAPK/JNK の活性化をそれぞれ阻害した (Figure 4-7B)。また、CAF の NO 産生誘導は SB203580 および SP600125 によって著しく阻害された。しかし、U0126 でほとんど阻害されなかった (Figure 4-8)。これらの結果から、CAF のマクロファージ活性化には p38 MAPK および SAPK/JNK の細胞内シグナル伝達経路が深く関

与していることが明らかとなった。

4.4 考察

本章では、まず、CAFのマクロファージ活性化作用を評価した。CAFはマクロファージに対して炎症メディエーターであるNOや炎症性サイトカインであるTNF- α およびIL-6の産生を誘導した。これより、CAFはマクロファージを活性化することが明らかとなった。CAFを脱硫酸化および脱アセチル化すると、そのマクロファージ活性化作用が有意に減少した。これら置換基は、自身が活性中心となるかCAF分子鎖のコンフォメーションを、活性を示す状態に安定化することでCAFのマクロファージ活性化に寄与していることが考えられる。硫酸基およびアセチル基がマクロファージ活性化にどのような機構で関与しているか、今後更なる研究が必要である。

次に、CAFがどのような作用機構でマクロファージを活性化するか検討した。一般的に、多糖は細胞膜に存在する様々なパターン認識レセプターに認識されることでマクロファージを活性化する。CAFはTLR4、CD14やSRAなどに認識されることによりマクロファージを活性化することが分かった。多糖のマクロファージ活性化作用において、これに関与する膜レセプターの種類には、多糖の種類によって差異がある [Jeon *et al.*, 2000; Han *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2004; Nakamura *et al.*,

2006]。これは多糖の構造特性に起因していると推測されるが、その詳細についてはよく分かっていない。

多糖を認識したパターン認識レセプターは、細胞内の様々なシグナル伝達経路を活性化し、その結果、マクロファージを活性化する。そこで、CAFのマクロファージの活性化における、TLR4、CD14およびSRAの下流の細胞内シグナル伝達経路であるMAPKの関与について検討した [Schumann *et al.*, 1996; Muzio *et al.*, 1998; Hsu *et al.*, 1998 and 2001]。これまでに、RAW 264.7細胞において、MAPKシグナル伝達経路を介した多糖のNO産生誘導作用が既にいくつか報告されている [Jeon *et al.*, 2000 and 2001; Lee *et al.*, 2004; Yoon *et al.*, 2004; Hsu *et al.*, 2006; Nakamura *et al.*, 2006]。しかし、多糖の種類によって活性化されるMAPKシグナル伝達因子に違いが見られる。これも多糖の構造特性に起因していると推測される。CAFはp38 MAPK、ERK1/2およびSAPK/JNKの活性化を誘導することが分かった。しかし、CAFのNO産生誘導作用においてp38 MAPKおよびSAPK/JNKが深く関与していることが明らかとなったが、これにERK1/2の関与は認められなかった。既に、マクロファージのNO産生においてはERK1/2を除くp38 MAPKおよびSAPK/JNKが関与し、またサイトカインの産生においてはp38 MAPK、ERK1/2およびSAPK/JNKが関与していることが報告されている [Yoon *et al.*, 2004]。すなわち、CAFが誘導したERK1/2の活

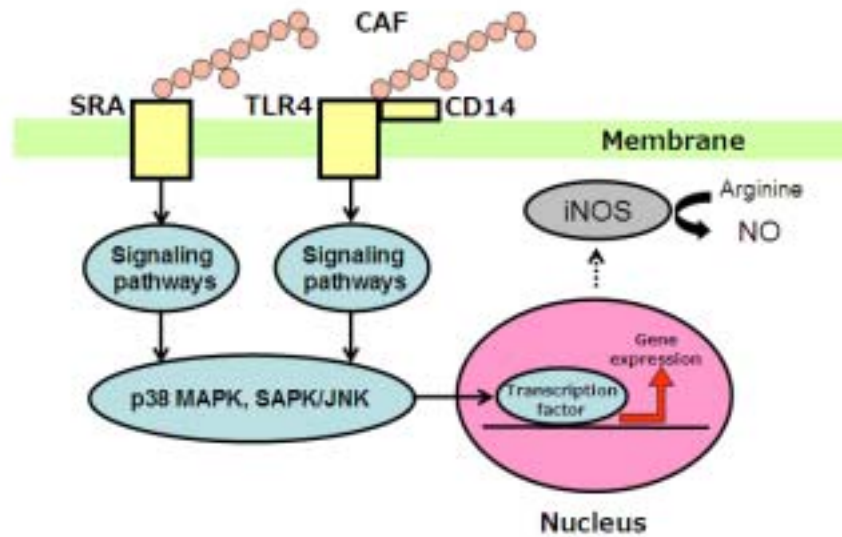


Figure 4-9. Schematic model of signaling pathways involved in macrophage activation by CAF.

性化は、マクロファージ活性化において、NO 産生以外の、サイトカインの産生を含む他の応答を制御しているのであろう。以上の結果から、CAF はマクロファージの TLR4、CD14 および SRA によって認識されることが分かった。そして、CAF を認識したこれらのレセプターは、下流のいくつかの細胞内シグナル伝達因子を経て MAPK を活性化することにより、マクロファージの活性化を誘導することが明らかとなった。しかし、これは CAF のマクロファージ活性化作用におけるシグナル伝達経路の一部であると考えられる (Figure 4-9)。

ところでシイタケ (*Lentinus edodes*) 由来のレンチナン [Taguchi *et al.*, 1985; Taguchi, 1987; Tari *et al.*, 1994; Nakano *et al.*, 1999; Kimura *et*

al., 2003] やスエヒロタケ (*Schizophyllum commune*) 由来のシゾフィラン [Okamura *et al.*, 1986] は免疫賦活作用を有する代表的な多糖として知られている。これら多糖は肺ガン [Tsang *et al.*, 2003]、胃腸ガン [Taguchi *et al.*, 1985]、前立腺ガン [Tari *et al.*, 1994] ならびに子宮頸部ガン [Okamura *et al.*, 1986] など様々なガンの放射線療法 [Okamura *et al.*, 1986]、化学療法 [Taguchi *et al.*, 1985; Taguchi, 1987; Nishiwaki *et al.*, 1990; Tari *et al.*, 1994; Saji *et al.*, 1999; Kimura *et al.*, 2003; Ito *et al.*, 2004] および内分泌療法 [Kosaka *et al.*, 1987; Tari *et al.*, 1994] におけるアジュバントとして、臨床で利用されている。すなわち、本研究により証明された CAF のマクロファージ活性化作用を活用した上での新規免疫賦活剤として、CAF が利用可能であると思われる。

小括

本章では、CAFのマクロファージ活性化作用とその機構について検討した。CAFはマクロファージを活性化し、NO、TNF- α およびIL-6産生を誘導した。また、TLR4、CD14またはSRAをブロックすることにより、それぞれでCAFのNO産生誘導作用が低下した。そして、CAFで処理したRAW 264.7細胞においてはp38 MAPK、ERK1/2およびSAPK/JNKの活性化が認められた。CAFのNO産生誘導作用は、SAPK/JNKまたはp38 MAPKの活性化を阻害することで低下したが、ERK1/2を阻害してもほとんど影響が認められなかった。以上の結果から、CAFはTLR4、CD14およびSRAに認識され、MAPK（p38 MAPKおよびSAPK/JNK）シグナル伝達経路を介してマクロファージを活性化することが示された。これらはCAFのマクロファージ活性化作用におけるシグナル伝達経路の一部であると考えられる。

第 5 章 総括

多糖は動植物の支柱や被覆をなす構造多糖、またエネルギーを貯蔵する貯蔵多糖として自然界に幅広く存在する。多糖は、それを構成する主要な単糖の種類こそさほど多くはないものの、糖組成、配列、結合様式、アノマー配位や電荷密度において変化に富み、実に多様な物理化学的・生理学的特性を示す。したがって、多糖の構造特性を解明することは、その物理化学的・生理学的特性の機構理解や、利用の創出・拡大に繋がるだろう。

先に、沖縄県で養殖されているオキナワモズク (*Cladosiphon okamuranus* TOKIDA) からアセチルフコイダンが分離された [田幸ら, 1996; Tako *et al.*, 2000]。オキナワモズク由来アセチルフコイダン (CAF) には肝臓コレステロールの上昇抑制作用 [上原ら, 1996]、*Helicobacter pylori* の胃細胞への接着防止作用 [Shibata *et al.*, 1999 and 2000] やマウスの慢性的大腸炎の治癒作用 [Matsumoto *et al.*, 2004] など、様々な生理活性が報告されている。

本研究では、CAF の構造特性を解析し、新たな生理活性について探索を行った。CAF は α -1,3-結合の L-フコース残基を主鎖とし、側鎖として主鎖の L-フコース残基の C-2 に D-グルクロン酸残基が置換している。また、硫酸基が D-グルクロン酸残基の置換していない主鎖の L-

フコース残基の C-4 に置換している。さらに、CAF にはアセチル基が置換していることが分かっている。しかし、その置換位置についてはこれまで明らかにされていなかった [Nagaoka *et al.*, 1999; Tako *et al.*, 2000; Sakai *et al.*, 2003]。そこで、第 2 章では CAF とその脱硫酸化-脱アセチル化物をメチル化分析し、その化学構造を提案した (Figure 2-4)。この化学構造は、先に Nagaoka らおよび Sakai らによって提案された構造とよく類似しているが [Nagaoka *et al.*, 1999; Sakai *et al.*, 2003]、新たに、CAF のアセチル基は D-グルクロン酸残基が置換していない主鎖の L-フコース残基の C-4 に置換していることが示された。

多糖の有する硫酸基は血管新生抑制作用、血液凝固抑制作用および細胞増殖阻害作用に対して重要な働きをしていることが知られており、その硫酸化度と生理活性強度には相関性があることが分かっている [Ferial *et al.*, 2000; Koyanagi *et al.*, 2003]。CAF は、硫酸基が主鎖の L-フコース 2 残基に 1 残基の割合でその C-4 に置換している程度であり、その硫酸化度は他の海藻に由来するフコイダンと比較して高くはない [Patankar *et al.*, 1993; Tako *et al.*, 1999 b; Sakai *et al.*, 2003; Shiroma *et al.*, 2003]。したがって、CAF を過硫酸化することにより、その生理活性を制御することが出来ると考えた。そこで、第 2 章ではさらに、過硫酸化 CAF を調製してその化学特性を検討した。CAF は主鎖の L-フコース残基の C-4 のみに硫酸基が置換しているが、過硫酸化 CAF は、さら

に、主鎖の L-フコース残基の C-2 へ硫酸基が置換していることが示唆された。

次に、第 3 章では、U937 細胞における過硫酸化 CAF の細胞傷害活性とその作用機構について検討した。その結果、過硫酸化 CAF はカスパーゼ 3 および 7 の関与するアポトーシスを誘導することにより、細胞傷害活性を示していることが明らかとなった。一般的に、多くの抗ガン剤は腫瘍細胞にアポトーシスを誘導することで抗ガン作用を示すことが知られている [Kaufman, 1989; Hannaun, 1997; Kanno *et al.*, 2004]。したがって、過硫酸化 CAF は抗ガン剤やその開発におけるモデル物質として利用することが出来る可能性が推測された。

さらに、第 4 章では、RAW 264.7 細胞を用いて CAF のマクロファージの活性化作用とその作用機構について検討した。その結果、CAF はマクロファージを活性化し、NO、TNF- α および IL-6 の産生を誘導することが分かった。また、CAF は細胞の膜レセプターである TLR4、CD14 および SRA によって認識され、細胞内の MAPK シグナル伝達経路を介してマクロファージを活性化することが明らかとなった。現在、レンチナンやシゾフィランなどの多糖は、ガン治療において免疫賦活剤として既に利用されている [Taguchi *et al.*, 1985; Kosaka *et al.*, 1987; Taguchi, 1987; Tari *et al.*, 1994; Nakano *et al.*, 1999; Kimura *et al.*, 2003]。すなわち、本研究により証明された CAF のマクロファージ活性化作用

を活用した上での新規免疫賦活剤として、CAF が利用可能であると思われる。

ところで、本研究では、CAF の硫酸基およびアセチル基はその生理活性に深く関与していることが示された。これら置換基は、自身が活性中心となるか、または CAF 分子鎖のコンフォメーションを、生理活性を示す状態に安定または変移させることで、CAF の生理活性に関与している可能性がある。多糖の化学修飾によりこれら置換基を付加、または除去することは、その生理活性の機構を解明する上での一つの手法である。また、多糖の生理活性を制御し、さらには、新たな生理活性を付加することができる手法でもある。要するに、多糖の化学修飾は、多糖の工業的利用や医薬品開発などにおいて有用である。今後、多糖の構造と生理活性の相関性について更なる研究が必要であると考えられる。

以上のように、本研究では CAF の構造特性を明らかにし、また、その生理活性と作用機構を示した。多糖の構造特性解明は、その物理化学的・生理学的特性の機構理解に重要である。また、多糖の生理活性と作用機構を明らかにすることは、これらの新たな利用に繋がる可能性がある。最後に、本研究が CAF の利用開発や需要拡大への一助となることを期待する。

参考文献

- Aisa, Y., Miyakawa, Y., Nakazato, T., Shibata, H., Saito, K., Ikeda, Y., Kizaki, M. (2005) Fucoidan induces apoptosis of human HS-Sultan cells accompanied by activation of caspase-3 and down-regulation of ERK Pathways. *Am. J. Hematol.*, **76**, 7-14.
- Balkwill, F.R., Burke, F. (1989) The cytokine network. *Immunol. Today*, **10**, 299-304.
- Bitter, T., Muir, H.M. (1962) A modified uronic acid carbazole reaction. *Anal. Biochem.*, **4**, 330-334.
- Chang, L., Karin, M. (2001) Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature*, **410**, 37-40.
- Da Silva, C.J., Soldau, K., Christen, U., Tobias, P.S., Ulevitch, R.J. (2001) Lipopolysaccharide is in close proximity to each of the proteins in its membrane receptor complex. *J. Biol. Chem.*, **276**, 21129-21135.
- Dennys, J.S., Carl, F.N. (1989) NO, A macrophage product responsible to cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. *J. Exp. Med.*, **169**, 1343-1355.
- Dodgson, K.S., Price, R.G. (1962) A note on the determination of the ester sulphate content of sulphated polysaccharides. *Biochem. J.*, **84**, 106-110.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Reber S.R.A., Smith, F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances., *Anal. Chem.*, **28**, 350-356.
- Farias-Eisner, R., Sherman, M.P., Aeberhard, E., Chaudhuri, G. (1994) Nitric oxide is an important mediator for tumoricidal activity *in vivo*.

- Proc. Natl. Acad. Sci.*, **91**, 9407-9411.
- Ferial, H.B., Mostafa, E., Corinne, S., Catherine, B.V. (2000) Relationship between sulfate groups and biological activities of fucans. *Thromb. Res.*, **100**, 453-459.
- Hakomori, S.I. (1964) A rapid permethylation of glycolipid and polysaccharide catalyzed by methylsulfinyl carbanion in dimethyl sulfoxide. *J. Biochem.*, **55**, 205-208.
- Han, S.B., Kim, Y.H., Lee, C.W., Park, S.M., Lee, H.Y., Ahn, K.S., Kim, I.K. and Kim, H.M. (1998) Characteristic immunostimulation by angelan isolated from *Angelica gigas* Nakai. *Immunopharmacol.*, **40**, 39-48.
- Han, S.B., Park, H., Lee, K.H., Lee, C.W., Lee, S.H., Kim, H.C., Kim, Y.S., Lee, H.S., Kim, H.M. (2001) Polysaccharide isolated from the radix of *Platycodon grandiflorum* selectively activates B cells and macrophages but not T cells. *Int. Immunopharmacol.*, **1**, 1969-1978.
- Hannaun, Y.A. (1997) Apoptosis and the dilemma of cancer chemotherapy. *Blood*, **89**, 1845-1853.
- Hsu, H.Y., Hajjar, D.P., Khan, K.M., Falcone, D.J. (1998) Ligand binding to macrophage scavenger receptor-A induces urokinase-type plasminogen activator expression by a protein kinase-dependent signaling pathway. *J. Biol. Chem.*, **273**, 1240-1246.
- Hsu, H.Y., Chiu, S.L., Wen, M.H., Chen, K.Y., Hua, K.F. (2001) Ligands of macrophage scavenger receptor induce cytokine expression via differential modulation of protein kinase signaling pathways. *J. Biol. Chem.*, **276**, 28719-28730.
- Hsu, H.Y., Hua, K.F., Su, Y.C., Chu, L.C., Su, S.C., Chiu, H.W., Wong, C.H., Chen, S.T., Shieh, C.W., Yang, S.S., Chen, Y.M., Chao, L.K. (2006)

- Alkali-soluble polysaccharides of *Rhizoclonium riparium* alga induce IL-1 gene expression via protein kinase signaling pathways. *J. Agric. Food. Chem.*, **254**, 3558-3365.
- Itoh, H., Noda, H., Amano, H., Zhuaug, C., Mizuno, T., Ito, H. (1993) Antitumor activity and immunological properties of marine algal polysaccharides, especially fucoidan, prepared from *Sargassum thunbergii* of Phaeophyceae. *Anticancer Res.*, **13**, 2045-2052.
- Ito, K., Nakazato, H., Koike, A., Takagi, H., Saji, S., Baba, S., Mai, M., Sakamoto, J.I., Ohashi, Y. (2004) Long-term effect of 5-fluorouracil enhanced by intermittent administration of polysaccharide K after curative resection of colon cancer; A randomized controlled trial for 7-year follow-up. *Int. J. Colorectal. Dis.*, **19**, 157-164.
- Iwamoto, M., Kurachi, M., Nakashima, T., Kim, D., Yamaguchi, K., Oda, T., Iwamoto, Y., Muramatsu, T. (2005) Structure-activity relationship of alginate oligosaccharides in the induction of cytokine production from RAW264.7 cells. *FEBS Lett.*, **579**, 4423-4429.
- Jeon, Y.J., Han, S.B., Ahn, K.S., Kim, H.M. (2000) Differential activation of murine macrophages by angelan and LPS. *Immunopharmacol.*, **49**, 275-284.
- Jeon, Y.J., Han, S.B., Leea, S.H., Kima, H.C., Ahna, K.S., Kim, H.M. (2001) Activation of mitogen-activated protein kinase pathways by angelan in murine macrophages. *Int. Immunopharmacol.*, **1**, 237-245.
- Kanno, S., Shouji, A., Hirata, R., Asou, K. Ishihara, M. (2004) Effects of naringin on cytosine arabinoside (Ara-C)-induced cytotoxicity and apoptosis in P388 cells. *Life sci.*, **75**, 353-365.

- Kaufman, S.H. (1989) Induction of endonucleolytic DNA cleavage in human acute myelogenous leukemia cells by etoposide, camptothecin, and other cytotoxic anticancer drugs. *Cancer Res.*, **49**, 5870-5878.
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H., Currie, A.R. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer*, **26**, 239-257.
- Kerr, J.F., Grobe, G.C., Winterford, C.M., Harmon, B.V. (1997) Anatomical method in cell death, *Methods Cell Biol.*, **46**, 1-27.
- Killing H. (1913) Zur biochemie der Meersalgen. *Zeitschrift für Physiologische Chemie*, **83**, 171-197.
- Kimura, Y., Iijima, S., Kato, T., Tsujie, M., Naoi, Y., Hayashi, T., Tanigawa, T., Yamamoto, H., Kurokawa, E., Kikkawa, N., Matsuura, N. (2003) Usefulness of TS-1 and lentinan combination immunochemotherapy in advanced or recurrent gastric cancer pilot study aiming at a randomized trial. *Gan To Kagaku Ryoho*, **30**, 1125-1130.
- Kosaka, A., Kuzuoka, M., Yamafuji, K., Imaizumi, A., Hattori Y., Yamashita, A. (1987) Synergistic action of lentinan (LNT) with endocrine therapy of breast cancer in rats and humans. *Gan To Kagaku Ryoho*, **14**, 516-522.
- Koyanagi, S., Tanigawa, N., Nakagawa, H., Soeda, S., Shimeno, H. (2003) Oversulfation of fucoidan enhances its anti-angiogenic and antitumor activities. *Biochem. Pharmacol.*, **65**, 173-179.
- Krieger, M., Herz, J. (1994) Structures and functions of multiligand lipoprotein receptors: macrophage scavenger receptors and LDL receptor-related protein (LRP). *Annu. Rev. Biochem.*, **63**, 601-637.
- Kyriakis, J.M., Avruch, J. (2001) Mammalian mitogen-activated protein

kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol. Rev.*, **81**, 807-869.

- Lee, K.Y., You, H.J., Jeong, H.G., Kang, J.S., Kim, H.M., Rhee, S.D., Jeon, Y.J. (2004) Polysaccharide isolated from *Poria cocos* sclerotium induces NF- κ B/Rel activation and iNOS expression through the activation of p38 kinase in murine macrophages. *Int. Immunopharmacol.*, **4**, 1029-1038.
- Leiroa, J.M., Castro, R., Arranz, J.A., Lamas, J. (2007) Immunomodulating activities of acidic sulphated polysaccharides obtained from the seaweed *Ulva rigida* C. Agardh. *Int. Immunopharmacol.*, **7**, 879-888.
- Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J.M., Hoffmann, J.A. (1996) The dorsoventral regulatory gene cassette spätzle/TOLL / cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*, **86**, 973-983.
- Lin, L.-H., Tako, M., Hongo, F. (2000) Isolation and characterization of ι-carrageenan from *Eucheuma serra* (Togekirinsai). *J. Appl. Glycosci.*, **47**, 303-310.
- Lin, L.-H., Tako, M., Hongo, F. (2001) Molecular origin for the rheological characteristics of ι-carrageenan isolated from Togekirinsai (*Eucheuma serra*). *Food Sci. Technol.*, **7**, 176-180.
- Linhardt R.J., Toida, T. (1997) In *Carbohydrate in Drug Designing*, Zbigniew J. W., Karl A. N, eds. Marcel Dekker, Inc., New York, pp277-341
- Majio G., Joris, I. (1995) Apoptosis, oncosis and necrosis. An overview of cell death. *Am. J. Pathol.*, **146**, 3-15.
- Matsumoto, S., Nagaoka, M., Hara, T., KimuraTakagi, I., Mitsuyama, K.,

- Ueyama, S. (2004) Fucoidan derived from *Cladosiphon okamuranus* TOKIDA ameliorates murine chronic colitis through the down-regulation of interleukin-6 production on colonic epithelial cells. *Clin. Exp. Immunol.*, **136**, 432-439.
- McClure, M.O., Moore, J.P., Blanc, D.F., Scotting, P., Cook, G.M., Keynes, R.J., Weber, J.N., Davies, D., Weiss, R.A. (1992) Investigations into the mechanism by which sulfated polysaccharides inhibit HIV infection *in vitro*. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.*, **8**, 19-26.
- Mulloy, B., Ribeiro, A.C., Alves, A.P., Vieira, R.P., Mourao, P.A.S. (1994) Sulfated fucans from echinoderms have a regular tetrasaccharide repeating unit defined by specific patterns of sulfation at the 0-2 and 0-4 positions. *J. Biol. Chem.*, **269**, 22113-22123.
- Muzio, M., Natoli, G., Sacconi, S., Levrero, M., Mantovani, A. (1998) The human Toll signaling pathway: Divergence of nuclear factor κ B and JNK/SAPK activation upstream of tumor necrosis factor receptor associated factor 6 (TRAF6). *J. Exp. Med.*, **187**, 2097-2101.
- Nagaoka, M., Shibata, H., Kimura-Takagi, I., Hashimoto, S., Kimura, K., Makino, T., Aiyama, R., Ueyama, S., Yokokura, T. (1999) Structural study of fucoidan from *Cladosiphon okamuranus* Tokida. *Glycoconj. J.*, **16**, 19-26.
- Nagasawa, K., Inoue, Y., Kamata, T. (1977) Solvolytic desulfation of glycosaminoglycuronan sulfates with dimethyl sulfoxide containing water or methanol. *Carbohydr. Res.*, **58**, 47-55.
- Nakamura, T., Suzuki, H., Wada, H., Kodama, T., Doi, T. (2006) Fucoidan induces nitric oxide production via p38 mitogen-activated protein kinase and NF-[kappa]B-dependent signaling pathways through

- macrophage scavenger receptors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **343**, 286-294.
- Nakano, H., Namatame, K., Nemoto, H., Motohashi, H., Nishiyama, K., Kumada, K. (1999) A multi-institutional prospective study of lentinan in advanced gastric cancer patients with unresectable and recurrent diseases: effect on prolongation of survival and improvement of quality of life. *Hepatogastroenterology*, **46**, 2662-2668.
- Nishino, T., Aizu, Y., Nagumo, T. (1991) The Relationship between the molecular weight and the anticoagulant activity of two types of fucan sulfates from the brown seaweed *ecklonia kurome*. *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 791-796.
- Nishiwaki, Y., Furuse, K., Fukuoka, M., Ota, M., Niitani, H., Asakawa, M., Nakai, H., Sakai, S., Ogawa, N. (1990) A randomized controlled study of PSK combined immuno-chemotherapy for adenocarcinoma of the lung. *Gan To Kagaku Ryoho*, **17**, 131-136.
- Nosseri, C., Coppola, S., Ghibelli, L. (1994) Possible involvement of poly (ADP-Ribosyl) polymerase in triggering stress-induced apoptosis. *Exp. Cell Res.*, **27**, 774-448.
- Okamura, K., Suzuki, M., Chihara, T., Fujiwara, A., Fukuda T., Goto S., Ichinohe, K., Jimi, S., Kasamatsu, T., Kawai, N., Mizuguchi K., Mori, T., Nakano, H., Noda, K., Sekiba, K., Suzuki, K., Suzuki, T., Takahashi, K., Takeuchi, K., Takeuchi, S., Yajima, A., Ogawa N (1986) Clinical evaluation of schizophyllan combined with irradiation in patients with cervical cancer. A randomized controlled study. *Cancer*, **58**, 865-872.

- Palmer, R.M.J., Ashton, D.S., Moncada, S. (1988) Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature*, **333**, 664-666.
- Patankar, M.S., Oehninger, S., Barnett, T., Williams, R.L., Clark, G.F. (1993) A revised structure for fucoidan may explain some of its biological activities. *J. Biol. Chem.*, **268**, 21770-21776.
- Pearson, G., Robinson, F., Beers, G.T., Xu, B.E., Karandikar, M., Berman, K., Cobb, M.H. (2001) Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: Regulation and physiological functions. *Endocr. Rev.*, **22**, 153-183.
- Pugh, N., Ross, S.A., ElSohly, H.N., ElSohly, M.A., Pasco, D.S. (2001) Isolation of three high molecular weight polysaccharide preparations with potent immunostimulatory activity from *Spirulina platensis*, *Aphanizomenon flos-aquae* and *Chlorella pyrenoidosa*. *Planta. Med.*, **67**, 737-742.
- Qi, Z.-Q., Tako, M., Toyama, S. (1997a) Chemical characterization of κ -carrageenan of Ibaranori (*Hypnea charoides* Lamouroux). *J. Appl. Glycosci.*, **44**, 137-143.
- Qi, Z.-Q., Tako, M., Toyama, S. (1997b) Molecular origin for the rheological characteristics of κ -carrageenan isolated from *Hypnea charoides* LAMOROUX. *J. Appl. Glycosci.*, **44**, 531-536.
- Reed, J.C (2000) Mechanism of Apoptosis. *Am. J. Pathol.*, **157**, 1415-1430.
- Religa, P., Kazi, M., Thyberg, J., Gaciong, Z., Swedenborg, J., Hedin, U. (2000) Fucoidan inhibits smooth muscle cell proliferation and reduces mitogen-activated protein kinase activity. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.*, **20**, 419-426.
- Ribeiro, A.C., Vieira, R.P., Mourão, P.A.S., Mulloy, B.A. (1994) Sulfated

- α -L-fucan from sea cucumber. *Carbohydr. Res.*, **255**, 225-240.
- Rice, P.J., Kelley, J.L., Kogan, G., Ensley, H.E., Kalbfleisch, J.H., Browder, I.W., Williams, D.M. (2002) Human monocyte scavenger receptors are pattern recognition receptors for (1 \rightarrow 3)- β -D-glucans. *J. Leukoc. Biol.*, **72**, 140-146.
- Saji, S., Sakamoto, J., Teramukai, S., Kunieda, K., Sugiyama, Y., Ohashi, Y., Nakazato, H. (1999) Impact of splenectomy and immunotherapy on survival following gastrectomy for carcinoma: covariate interaction with immunosuppressive acidic protein, a serum marker for the host immune system. *Surg. Today*, **29**, 504-510.
- Sakai, T., Ishizuka, K., Shimanaka, K., Ikai, K., Kato, I. (2003) Structures of oligosaccharides derived from *Cladosiphon okamuranus* fucoidan by digestion with marine bacterial enzymes. *Mar. Biotechnol.*, **5**, 536-544.
- Schumann, R.R., Pfeil, D., Lamping, N., Kirschning, C., Scherzinger, G., Schlag, P., Karawajew, L., Herrmann, F. (1996) Lipopolysaccharide induces the rapid tyrosine phosphorylation of the mitogen-activated protein kinases Erk-1 and p38 in cultured human vascular endothelial cells requiring the presence of soluble CD14. *Blood*, **87**, 2805-2814.
- Shibata, H., KimuraTakagi, I., Nagaoka, M., Hashimoto, S., Sawada, H., Ueyama, S., Yokokura, T. (1999) Inhibitory effect of *Cladosiphon* fucoidan on the adhesion of *Helicobacter pylori* to human gastric cells. *J. Nutr. Vitaminol.*, **45**, 325-336.
- Shibata, H., Iimuro, M., Uchiya, N., Kawamori, T., Nagaoka, M., Ueyama,

- S., Hashimoto, S., Yokokura, T., Sugimura, T., Wakabayashi, K. (2000) Preventive effects of *Cladosiphon* fucoidan against *Helicobacter pylori* infection in Mongolian gerbils. *Helicobacter*, **8**, 59-65.
- Shiroma, R., Uechi, S., Taira, T., Ishihara, M., Tawata, S., and Tako, M. (2003) Isolation and characterization of fucoidan from *Hizikia fusiformis* (Hijiki). *J. Appl. Glycosci.*, **50**, 361-365.
- Shiroma, R., Uechi, S., Tawata, S., and Tako, M. (2007) Isolation and characterization of alginate from *Hizikia fusiformis* and preparation of their oligosaccharides. *J. Appl. Glycosci.*, **54**, 85-90
- Soeda, S., Sakaguchi, S., Shimeno, H., Nagamatsu, A. (1992) Fibrinolytic and anticoagulant activities of highly sulfated fucoidan. *Biochem Pharmacol.*, **43**, 1853-1858.
- Taguchi, T., Furue, H., Kimura, T., Kondo, T., Hattori T., Itoh I., Ogawa, S. (1985) Results of phase III study of lentinan. *Gan To Kagaku Ryoho*, **12**, 366-378.
- Taguchi, T. (1987) Clinical efficacy of lentinan on patients with stomach cancer: end point results of a four-year follow-up survey. *Cancer Detect Prev. Suppl.*, **1**, 333-349.
- Tako, M., Qi, Z.-Q., Yoza, E., Toyama, S. (1998) Synergistic interaction between κ -carrageenan isolated from *Hypnea charoides* LAMOROUX and galactomannan on its gelation. *Food Res. Int.*, **31**, 543-548.
- Tako, M., Higa, M., Medoruma, K., Nakasone, Y. (1999a) A highly methylated agar from red seaweed, *Gracilaria arcuata*. *Botanica Marina*, **42**, 513-517.
- Tako, M., Nakada, T., Hongo, F. (1999b) Chemical characterization of

- fucoidan from commercially cultured *Nemacystus decipiens* (Itomozuku). *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **63**, 1813-1815.
- Tako, M., Yoza, E., Thoma, S. (2000) Chemical characterization of acetyl fucoidan and alginate from commercially cultured *Cladosiphon okamuranus*. *Botanica Marina*, **43**, 393-398.
- Tako, M., Kiyuna, S., Hongo, F. (2001) Isolation and characterization of alginic acid from commercially cultured *Nemacystus decipiens* (Itomozuku). *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **65**, 654-657.
- Tako, M. (2003) Rheological characteristics of fucoidan isolated from commercially cultured *Cladosiphon okamuranus*. *Botanica Marina*, **46**, 461-465.
- Tari, K., Satake, I., Nakagomi, K., Ozawa, K., Oowada, F., Higashi, Y., Negishi, T., Yamada, T., Saito, H., Yoshida, K. (1994) Effect of lentinan for advanced prostate carcinoma. *Hinyokika Kyo*, **40**, 119-123.
- Thornton, B.P., Vetvicka, V., Pitman, M., Goldman, R.C., Ross, G.D. (1996) Analysis of the sugar specificity and molecular location of the β -glucan-binding lectin site of complement receptor type 3 (CD11D/CD18). *J. Immunol.*, **156**, 1235-1246.
- Tsang, K.W., Lam, C.L., Yan, C., Mak, J.C., Ooi, G.C., Ho, J.C., Lam, B., Man, R., Sham, J.S., Lam, W.K. (2003) Coriolus versicolor polysaccharide peptide slows progression of advanced non-small cell lung cancer. *Respir. Med.*, **97**, 618-624.
- Van Cruchten S., Van den Broeck S. (2002) Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. *Anat. Histol. Embryol.*, **31**, 214-223.

- Werling, D., Jungi, T.W. (2003) TOLL-like receptors linking innate and adaptive immune response. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **91**, 1-12.
- Wright, S.D., Ramo, S.R.A., Tobias, P.S., Ulevitch, R.J., Mathison, J.C. (1990) CD14, A receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science*, **249**, 1431-1433.
- Xie, K., Huang, S., Dong, Z., Juang, S.H., Gutman, M., Xie, Q.W., Nathan, C., Fidler, I.J. (1995) Transfection with the inducible nitric oxide synthase gene suppresses tumorigenicity and abrogates metastasis by K-1735 murine melanoma cells. *J. Exp. Met.*, **181**, 1333-1343.
- Yoon, Y.D., Kang, J.S, Han, S.B., Park, S.K., Lee, H.S, Kang. J.S., Kim, H.M. (2004) Activation of mitogen-activated protein kinases and AP-1 by polysaccharide isolated from the radix of *Platycodon grandiflorum* in RAW 264.7 cells. *Int. Immunopharmacol.*, **4**, 1477-1487.
- 岩瀬 仁勇, 木曾 真, 山本 憲二, 大西 正健, 平林 義雄 (1994) 糖鎖の科学入門, 培風社, 東京都, p25-29.
- 上原 めぐみ, 田幸 正邦, 川島 由次, 福永 隆生, 尚 弘子, 知念 功, 本郷 富士弥 (1996) オキナワモズクから分離したフコイダンが高コレステール給与ラットの血清コレステロール濃度に及ぼす影響. *応用糖質科学*, **43**, 149-153.
- 国崎 直道, 佐野 征男 (2001) 食品多糖類-乳化・増粘・ゲル化の知識, 幸書房, 東京都, p11-23.
- 田幸 正邦 (1994) クビレオゴノリから寒天の分離とそのゲル化特. *応用糖質科学*, **41**, 305-310.
- 田幸 正邦, 上原 めぐみ, 川島 由次, 知念 功, 本郷 富士弥 (1996) オキナワモズクからフコイダンの分離・同定. *応用糖質科学*, **43**,

143-148.

田幸 正邦(2002)養殖オキナワモズクを原料とするアセチルフコイダ
ンおよびその製造法. 日本国特許第 3371124 号.

西沢 一俊, 村杉幸子 (1988) 海藻の本, 研成社, 東京, p215.

山田 信夫 (2000)、海藻利用の科学, 成山堂書店, 東京, p5.

山城 陽一, 上地 俊徳, 田幸 正邦 (2005) 日本農芸化学会大会講演要
旨.

謝辞

本研究の遂行ならびに本論文をまとめるにあたり、終始ご親切なるご指導・ご鞭撻を賜りました琉球大学農学部亜熱帯生物資源科学科 田幸 正邦 教授に心より感謝の意を表します。また、ご指導とご協力をいただきました鹿児島大学農学部生物資源化学科 藤井 信 教授ならびに琉球大学農学部亜熱帯農林環境科学科 建本 秀樹 准教授に厚く御礼申し上げます。

さらに、本研究を行うにあたりご教示、ご支援いただきました琉球大学農学部亜熱帯生物資源科学科 小西 照子 准教授、ならびに糖鎖科学研究室の皆様にご感謝申し上げます。

また、本論文をまとめるにあたり、種々ご教示下さいました佐賀大学農学部生命機能科学科 光富 勝 教授、ならびに琉球大学農学部亜熱帯生物資源科学科 多和田 真吉 教授に深謝申し上げます。