

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 12 月 27 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2010～2014

課題番号：22590511

研究課題名(和文)血管新生阻止および骨転移抑制作用を兼ね備えた物質の探索と開発

研究課題名(英文) Search and development of materials which can suppress both angiogenesis and bone metastasis

研究代表者

芦野 洋美 (Ashino, Hiromi)

千葉大学・医学(系)研究科(研究院)・特任講師

研究者番号：40222608

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：海藻に特有な成分による血管新生阻止作用の探索を行なった。全6種から脂溶性画分の抽出と多糖画分の溶出を行い、生きたまま血管のネットワークを観察できる鶏胚漿尿膜(CAM)を用いて、血管新生阻害活性を検討した。その結果、種によって阻害効果に差はあるものの、6種全ての酸性多糖画分に血管新生阻害活性が存在し、また脂溶性画分にも血管新生阻止活性が認められることを検出した。更に酸性多糖画分には、微小血管内皮細胞の運動能を抑制する作用が存在することも明らかにした。また間接的な方法を用いてこの画分による骨転移への作用を検討し、抑制活性を有する可能性を見出した。

研究成果の概要(英文)：To search for the inhibitory activity of angiogenesis on the specific components derived from seaweeds, we treated chicken embryo chorioallantoic membrane (CAM), in which the network of live vascular vessels can be observed, with acidic polysaccharides fraction or fat-soluble compound fraction extracted from six species of seaweeds. The result revealed that inhibitory activity of angiogenesis exists in both fractions of acidic polysaccharides and fat-soluble compound, although each efficacy is different according to the species. Additionally, it was revealed that the migration in the microvascular endothelial cells was suppressed by the treatment with the fraction of acidic polysaccharides. Moreover, the effect of acidic polysaccharides fraction on bone metastasis was studied by using an indirect method in vitro. The result suggested a potentiality that acidic polysaccharides fraction derived from seaweeds exerts a suppressive effect on bone metastasis.

研究分野：血管生物学

キーワード：血管新生 酸性多糖 骨転移

1. 研究開始当初の背景

我が国ではがんが死亡率の第一位を占め、年間死者数は30万人を越えている。そこでがん栄養を補給する血管新生の阻止が新規治療法として注目され、社会的要請も極めて高まっていた。しかし血管新生過程の機序解明に関する研究は近年急速に進歩を遂げているものの、実用化はまだわずかに端緒に就けたかどうか、という段階に過ぎなかった。医療向上に必須でありながら、臨床で血管新生阻害薬として使用可能な物質は、出血等場合によっては致命的な副作用をもたらす血管新生因子 VEGF の抗体のみであった。また血管新生阻害物質は、がんの増殖阻止に用いるばかりではなく、失明に直結する糖尿病性網膜症や黄斑変性といった血管新生性疾患の治療にも使えるので、本物質の開発は、難治疾患に苦しむ多くの患者に適応可能である。このような状況の下、身体に負担の少ない血管新生阻害剤や予防物質の研究開発は立ち遅れていた。

いまや骨転移は全てのがん種における問題点として捉えられており、骨転移阻止の基礎研究は近年盛んに行なわれてきてはいるものの、ビスホスホネート以外の治療薬はまだわずかであった。骨転移関与細胞の増殖や分化を調節できる実用に供する物質の開発は遅れていた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、強力な血管新生阻害能を有する物質を探索し、腫瘍血管新生および血管新生性疾患の治療と予防に道を開くこと、更にこれらの物質が骨転移阻害物質として有効となり得るかどうかを明らかにし、原発巣と骨転移巣の両抑制を兼ね備えた、付加価値の高い優れた物質を示すことである。

我々は合成酸性多糖に血管新生阻害活性を見出したので、特有な酸性多糖が多種類、大量に存在する海藻に着目し、その血管新生への作用を検討することにした。また殆ど解析されていない海藻の抗酸化成分が、血管新生にどのように作用するかという点にも注目した。

骨転移関与細胞の増殖や分化に、血液凝固を阻止する酸性多糖が作用しているという報告から、海藻の酸性多糖を用いた骨転移の制御を思いついた。血管新生を阻害する酸性多糖をがん患者に投与し、原発がんの増殖を抑制すると同時に骨転移予防が実現できるのではないかと、という発想に基づいて、付加価値の高い物質となり得る可能性を検証するため、血管新生を抑制し骨転移関与細胞の増殖や分化を阻止できる酸性多糖の探索を行なった。

3. 研究の方法

(1) 海藻特異成分の抽出と分画

まず乾燥藻体を碎片化する。次にエタノールなどの溶媒還流下で色素、粗脂質(脂溶性)

成分を取り出し濃縮・乾燥する。脂質を除いた破砕藻体を繰り返し水抽出、アセトン沈澱、減圧乾燥する。更にイオン交換樹脂カラムクロマトグラフィーを用いて溶出する。溶出画分を脱塩後、減圧乾燥して酸性糖画分を得る。

(2) 鶏胚漿尿膜(CAM)を用いた血管新生阻害活性の検出

CAM 血管のアッセイ系 - 4日目の胚を用い促進物質の無い条件 -

鶏受精卵4日目の胚のCAMの上に直径3mmのシリコンリングをのせ、1%メチルセルロースに溶かした検討物質をその内側に入れる。6日目のCAM内にイントラリピッドを注入し、生きたままの血管ネットワークを撮影し、無血管領域が3mmあれば、血管新生阻害と判断する。

CAM 血管のアッセイ系 - 11日目の胚を用い促進物質の有る条件 -

鶏受精卵11日目の胚のCAMの上に、VEGFまたはbFGFを含むマトリゲルをのせ、血管新生を促進させる。このとき検討する物質も共存させ、血管新生因子による促進を阻止するかどうか13日目のCAM内にイントラリピッドを注入し、生きたままの血管ネットワークを撮影して、因子による促進が見られなくなっているかどうか判断する。

(3) 培養微小血管内皮細胞運動能のアッセイ系

ウシ肺微小血管内皮細胞を24 Well Plateに撒き、細胞がまんべんなくWellをカバーしたら、チップの先で傷をつけ、0hrにおける写真を撮影する。その後上記イオン交換樹脂カラムクロマトグラフィー後の分画を添加し、CO2インキュベーターに入れる。約16hr後、内皮細胞の運動能に変化があるかどうかを調べるため撮影し、傷の修復の度合いを測定する。これが遊走の解析となる。

(4) マウス背部皮下における血管新生因子誘導性血管新生を用いたアッセイ系

DIVAA アッセイキット(CULTREX Trevigen, Inc.)の小型カップにゲル化した基底膜成分と血管新生因子 VEGF、bFGF、または検討する成分を入れ、これをマウス背部皮下に埋め込み、2週間後の血管新生の有無を観察する。

(5) 骨転移抑制活性を検出するための間接的なアッセイ

象牙片を用いるアッセイ系

初代培養マウス骨芽細胞と、分化すれば骨破壊に関与する骨髄細胞の共存培養系により、象牙片を用いて、細胞の分化および骨破壊活性を検討した。象牙切片上の破壊部分をヘマトキシリン染色し、その数、形状、面積を基に骨破壊能を評価する。骨破壊が抑制されることは、骨転移の阻止につながる。

人工骨基質を用いるアッセイ系

無機結晶性リン酸カルシウムをコーティ

ングし骨構造を模倣した合成表面を持つオステオアッセイ 96 well プレート(Corning Osteo Assay Surface Plate)を用い、ラット由来で分化すれば骨破壊に關与する骨髓細胞を培養し、骨破壊活性を検討した。1~2週間あまり培養し、人工骨表面の破壊部分の変化を調べ、その面積を基に骨破壊能を評価する。

4. 研究成果

(1)促進物質を用いた血管新生阻害アッセイ系の確立

研究方法(2)の を用い、血管新生促進活性と促進した条件下での阻害活性との両方を解析できるアッセイ系を確立した(Biochem. Biophys. Res. Commun. 399 (2010) 699-704)。即ち血管新生阻害を解析するための従来型 から発展させて、促進の解析も、促進させた状態を阻害できるかの解析も、共に可能にした。 に記した方法で血管新生促進因子 VEGF を含むマトリゲルを1日目のCAMにのせ、13日目にCAM上の血管の変化を調べた。同時に血管新生阻害活性を有する物質を含むマトリゲルで処理すると、VEGFによる血管の変化が抑制された。この方法により、1日目のCAMにおいてマトリゲルを用いた血管新生判定のための改変アッセイ系が可能となった。

(2)抽出法の確立

研究方法(1)に記したような手順で行い、分厚い形状で糊状成分の多い藻類でも抽出が出来るような方法を確立した。特に高収率が望めるイオン交換樹脂を検討し、DIAION SEPABEADS を用いることとした。糖分画は0.1M~2.0MのNaClで溶出し、透析、ろ過後、凍結乾燥し、アッセイに用いた。

(3) 酸性多糖画分に存在する血管新生阻害活性の検出

各藻類から抽出した糖画分の血管新生阻害作用を検討した。その結果、糖画分のうち、酸性多糖の溶出される1.0M~2.0Mの間に、活性の強弱はあるものの、阻害活性が認められた。とりわけ1.5Mの画分が強い効果を有した。緑藻ミルと他の緑藻2種、褐藻1種、紅藻はクロハギンナンソウおよび他1種、に血管新生阻害作用が認められた。また、同じアッセイ系で、ギンナンソウ由来の純化した酸性多糖、 α -カラゲナンに血管新生阻害効果が認められた。一方、血管新生阻害作用が知られているスラミンを等重量で比較検討したところ、藻由来酸性多糖画分による抑制活性の方が強力であった。

(4)酸性多糖による血管内皮細胞運動能への作用

方法(3)に記したようにウシ微小血管内皮細胞を用いて、溶出した酸性多糖画分が、血管新生の重要なプロセスのひとつである

運動能(遊走能)にどのような作用を及ぼすか、検討した。その結果、やはり活性に多少の差はあるものの、遊走は概ね抑制された。

(5)DIVAA アッセイによる血管新生への作用

方法(4)により今後の *in vivo*アッセイに有用なマウスの皮下を用いた血管新生阻害活性の検討を試みた。基底膜成分とbFGF、VEGFを小カップに入れ、これをマウス皮下に挿入し血管新生を誘導するが、ここにまず既に血管新生阻害活性を有することを明らかにしている合成酸性多糖(CAMにおいて強い阻止作用を発揮)などを含ませて検討した。その結果、本アッセイにおいて2週間後の血管新生阻害活性は、ごく微弱な抑制のみか、または明瞭な抑制が認められない場合があった。げっ歯類特有の炎症か、あるいは投与量の不足も考えられるが、この原因究明が必要となった。

(6)粗脂質(脂溶性成分)画分中の血管新生阻害活性の検出

緑藻ミルを含む緑藻3種、および褐藻1種、紅藻2種から抽出濃縮・乾燥した粗脂質画分の血管新生阻害作用を、方法(2)の方法で検討した。その結果、粗脂質画分にも阻害効果の存在することが明らかになった。この結果から作用機序の異なると推察される2つの画分両者による、相加効果、あるいは相乗効果も見込めると考えられた。

(7)骨転移抑制活性の検討

まず方法(5)の実験方法により合成酸性多糖の骨破壊に与える作用を調べた。その結果、骨破壊は70%前後抑制された。また、強い血管新生阻害作用を有する紅藻由来 α -カラゲナンにも強力な抑制作用が認められた。一方、血管新生阻害物質として知られているスラミンには、骨破壊抑制効果は認められなかった。次にのアッセイ系は象牙片を用いるため、高頻度の実験は困難であると考えた。そのため、本実験で抽出した各藻類由来の酸性多糖画分の骨破壊アッセイは、主にの方法で行った。種により差はあるものの、どの藻類からの酸性多糖画分も概ね骨破壊の抑制活性を示した。従って、藻類由来の酸性多糖は、固形がんの増殖を阻止し、骨転移を抑制する作用を兼ね備えた付加価値の高い、治療に有効な物質として期待できると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Tsukamoto, I., Sakakibara, N., Maruyama, T., Igarashi, J., Kosaka, H., Kubota, Y., Tokuda, M., Ashino, H., Hattori, K., Tanaka, S., Kawata, M., and Konishi, R. A novel nucleic acid analogue shows strong angiogenic

activity. Biochem. Biophys. Res. Commun. 査読有、399、2010、699-704.

DOI:10.1016/j.bbrc.2010.08.003

[学会発表](計 22 件)

芦野洋美 他、Luteolin regulates angiogenesis of chorioallantoic membranes and NF- κ B activity of vascular endothelial cells.

第 87 回日本生化学会大会、2014 年 10 月 17 日、国立京都国際会館(京都府京都市)

芦野洋美、Suppressive effects of CK2 inhibitors on the degradation of I κ B and the permeability in vascular endothelial cells. The 73rd Annual Meeting of the Japanese Cancer association. 2014 年 9 月 28 日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

Ashino, H.、Regulation of luteolin on angiogenesis and NF- κ B activation.

The 18th International Vascular Biology Meeting. 2014 年 04 月 15 日、京都市勧業館みやこめっせ(京都府京都市)

芦野洋美 他、Effect of CK2 inhibitor on NF- κ B activation and migration of vascular endothelial cells. The 72th annual meeting of the Japanese cancer association. 2013 年 10 月 4 日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

芦野洋美 他、Effects of CK2 inhibitor on accumulation of I κ B and permeability in vascular endothelial cells. 第 21 回日本血管生物医学会学術集会. 2013 年 9 月 26 日、千里阪急ホテル(大阪府豊中市)

芦野洋美 他、CK2 阻害物質による血管内皮細胞の I κ B 分解と遊走、鶏胚漿尿膜上血管新生の抑制効果. 第 86 回日本生化学会大会. 2013 年 9 月 11 日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

Tsukamoto, I., Ashino, H. 他、2-Cl-C.OXT-A stimulates angiogenesis both in vitro and in vivo. The international pharmaceutical federation (FIP) 2013 world congress. 2013 年 8 月 31 日、ダブリン(アイルランド)

芦野洋美 他、血管新生における CK2 とポリアミンの関与. 第 85 回日本生化学会大会, 2012 年 12 月 14 日、マリンメッセ福岡(福岡県福岡市).

Ashino, H. 他、Anti-angiogenic and NF- κ B suppressive function of CK2 inhibitor in vascular endothelial cells. The 10th Korea-Japan Joint Symposium on vascular Vascular Biology. 2012 年 12 月 6 日、あわぎんホール(徳島県徳島市).

Ashino, H. 他、Suppressive effects of CK2 inhibitor on degradation of I κ B in

vascular endothelial cells and angiogenesis in CAM. The 71th annual meeting of the Japanese cancer association, 2012 年 9 月 21 日、ロイトン札幌(北海道札幌市).

Kunimasa, K., Ashino, H. 他、Antiangiogenic effects of nocapryrone B, an Actinomyces-derived cell differentiation modulator. The 71th annual meeting of the Japanese cancer association, 2012 年 9 月 21 日、ロイトン札幌(北海道札幌市).

Ashino, H. 他、CK2 inhibitors attenuate angiogenesis. 2012 World Cancer Congress. 2012 年 8 月 29 日、モントリオール市(カナダ).

塚本郁子、芦野洋美 他、新規核酸誘導体 2Cl-C.OXT-A(COA-CI) と血管新生. 第 132 回日本薬学会年会, 2012 年 3 月 30 日、北海道大学(北海道札幌市).

Ashino, H. 他、Role of protein kinase CK2 in the regulation of angiogenesis. The 19th Annual Meeting of the Japanese Vascular Biology and Medicine Organization/ The 1st Asia-Pacific Vascular Biology Meeting. 2011 年 12 月 8 日、東京ステーションコンファレンス(東京都千代田区).

Ashino, H. 他、Regulation of CK2 in angiogenesis. The 70th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. 2011 年 10 月 3 日、名古屋国際会議場(愛知県名古屋市).

芦野洋美 他、CK2 阻害物質は血管新生を抑制する. 第 84 回日本生化学会大会、2011 年 9 月 22 日、国立京都国際会館(京都府京都市).

塚本郁子、芦野洋美 他、アデノシンアナログ 2Cl-C.OXT-A の生理活性. 第 84 回日本生化学会大会、2011 年 9 月 22 日、国立京都国際会館(京都府京都市).

塚本郁子、芦野洋美 他、新規核酸誘導体 2Cl-C.OXT-A の血管新生作用. 第 131 回日本薬学会年会、2011 年 3 月 30 日、ツインメッセ静岡(静岡県静岡市).

芦野洋美 他、I κ B キナーゼ阻害剤による in vivo 血管新生の抑制. 第 83 回日本生化学会大会、第 33 回日本分子生物学会年会合同大会. 2010 年 12 月 9 日、神戸国際会議場(兵庫県神戸市).

Ashino, H. 他、Regulation of angiogenesis by CK2 inhibitor. The 18th Annual Meeting of the Japanese Vascular Biology and Medicine Organization, The 8th Korea-Japan Joint Symposium on Vascular Biology. 2010 年 12 月 2 日、大阪梅田スカイビル(大阪府大阪市).

21 塚本郁子、芦野洋美 他、2Cl-C.OXT-A stimulates angiogenesis both in vitro

and in vivo. The 18th Annual Meeting of the Japanese Vascular Biology and Medicine Organization, The 8th Korea-Japan Joint Symposium on Vascular Biology. 2010年12月1日、大阪梅田スカイビル(大阪府大阪市).

- 22 Ashino, H., 他、Suppression of angiogenesis by CK2 inhibitor. The 69th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. 2010年9月22日、大阪国際会議場(大阪府大阪市).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

芦野 洋美 (ASHINO, Hiromi)
千葉大学・大学院医学研究院・特任講師
研究者番号：40222608

(2) 研究分担者

小野 富男 (ONO, Tomio)
(公財) 東京都医学総合研究所・基盤技術研究センター・基盤技術研究職員
研究者番号：60231239

(3) 連携研究者

入江 敦 (IRIE, Atsushi)
(公財) 東京都医学総合研究所・生体分子先端研究分野・主任研究員
研究者番号：10280786

(4) 研究協力者

横浜 康継 (YOKOHAMA, Yasutsugu)
中島 宏 (NAKAJIMA, Hiroshi)
向井 克之 (MUKAI, Katsuyuki)