

# 沖縄モズク由来アセチルフコイダンの癌抑制効果\*

Key words : アセチルフコイダン、腫瘍細胞、アポトーシス

石渡一夫<sup>1)</sup> Kazuo ISHIWATA  
盛 英三<sup>2)</sup> Hidezo MORI

静岡 徹<sup>1)</sup> Toru SHIZUMA  
福山直人<sup>1)</sup> Naoto FUKUYAMA

中澤博江<sup>1)</sup> Hiroe NAKAZAWA

◆東海大学医学部生体機能構造部門<sup>1)</sup>、国立循環器病センター研究所心臓生理部<sup>2)</sup>  
Physiology Department, Tokai University School of Medicine, Isehara, Japan<sup>1)</sup>  
Department of Cardiac Physiology, National Cardiovascular Center<sup>2)</sup>

【目的】海藻に含まれるフコイダンは種々の有用な生物活性を持つが、沖縄モズク由来アセチルフコイダンの癌に対する作用は不明である。本研究において我々は沖縄モズク由来アセチルフコイダンの癌抑制作用について検討を行った。

【対象及び方法】動物実験モデルとして、マウス大腸癌細胞移植モデルを用いた。実験群は癌細胞移植後に通常水を飲水させたコントロール群と、通常水に5%フコイダンを混ぜて飲水させたフコイダン群に分け、マウスの体重を経時的に計測し腫瘍量を計測した。腫瘍組織は採取後、組織学的に腫瘍の浸潤とアポトーシス細胞の有無を検討した。

【結果及び考察】マウスの有意な体重減少抑制効果をフコイダン投与群で認め、腫瘍量もフコイダン投与群で有意に低下していた。組織学的にもフコイダン投与群で腫瘍の浸潤が抑制され、癌細胞のアポトーシスも認められた。

【結論】沖縄モズク由来アセチルフコイダンは癌細胞にアポトーシスを誘導し腫瘍発育を抑制すると考えられた。

## 目 的

フコイダンはコンブ、ワカメ、モズク、ヒジキ等の褐藻綱に属する海藻より見いだされ、L-フコースを主要構成糖とする酸性多糖の一種で、抗血液凝固作用<sup>1)</sup>や抗腫瘍作用<sup>2)</sup>を有することが知られている。フコイタン含量は海藻の種によって構

成糖、硫酸基などが異なり、1種の海藻でも数種類のフコイタンが含まれているので、分離・同定は困難である(表1)。

一方、モズクは褐藻類の一種で多量のフコイタンを含有し、古くから日本人の食材として頻繁に使用されてきた。モズクにはモズク(*Nemacystus decipiens* KUCK)や、フトモズク(*Tinocladia crassa* KYLIN)、沖縄モズク(*Cladosiphon okamuranus*

\*CANCER-SUPPRESSING EFFECT OF ACETYL FUCOIDAN DERIVED FROM OKINAWA MOZUKU (*Cladosiphon okamuranus* TOKIDA)

受付日:2007年8月20日 採用決定日:2007年11月5日

表1 各種海藻のフコイダン含有量

| 海藻                         | フコイダン含有量<br>(g/kg乾燥重量) |
|----------------------------|------------------------|
| コンブ目海藻                     |                        |
| ガゴメ                        | 40                     |
| マコンブ                       | 15                     |
| ワカメ (葉状部)                  | 15                     |
| ワカメ (胞子葉部)                 | 80                     |
| アラメ                        | 70                     |
| <i>Ecklonia maxima</i>     | 40                     |
| <i>Lessonia nigrescens</i> | 46                     |
| ヒバマタ目海藻                    |                        |
| <i>Fucus vesiculosus</i>   | 70                     |
| <i>Ascophyllum nodosum</i> | 110                    |
| ナガマツモ目海藻                   |                        |
| オキナワモズク                    | 250                    |
| モズク                        | 250                    |

藻類Jpn. J. Phycol. (Sorui) 51: 19-25, Mar. 10, 2003より

TOKIDA)、などがあり、多量のフコイダンが存在することが明らかとなっている<sup>3)</sup>。沖縄モズクは九州南端から台湾の北東部に至って分布する褐藻類の一種で、近年、沖縄県で養殖技術が確立され、日本全国の需要の95%を供給している。田幸らは沖縄モズクからのフコイダンを分離・同定し、得られたフコイダンをアセチルフコイダンと総称し、その分離方法を確立した<sup>4)</sup>。

一方、Yu らは、北海道南西部で採取される昆布科の海藻であるガゴメ昆布 (*Kjellmaniella crassifolia*) よりF-フコイダン及びU-フコイダンの2種類のフコイダンを分離生成し、U-フコイダンには癌細胞に対してアポトーシスを誘導し癌抑制作用があると報告している<sup>5)</sup>。しかしながら、沖縄モズク由来アセチルフコイダンの、癌細胞抑制効果は明らかにされていない。

本研究で我々は、アセチルフコイダンの癌抑制効果を示すために、BALB/cマウス colon 26大腸癌細胞移植モデルを用い、通常水を飲水させたコントロール群とフコイダン含有水を飲水させたアセチルフコイダン投与群で、①体重、②腫瘍体積を計測比較し、さらに③腫瘍組織をHE染色して、腫瘍の浸潤を観察し、④アポトーシス細胞の有無をTACS 2 TdT-DABを用いて免疫組織学的に検討した。

## 対象及び方法

### フコイダン

フコイダンは田幸らの方法で抽出されたアセチルフコイダン (株式会社日商ファインライフより供与) を使用した。

### 動物

雌の9週 of SPF BALB/cマウスはCLEA Japan Inc (東京) より購入した。マウスは試験開始まで1週間馴化させた後、プラスチックゲージで温度  $21 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度  $45 \pm 10\%$ 、12時間の照明、12時間の暗室の環境下で飼育した。マウスには通常の餌 (MF, Oriental Yeast Industry Co., Tokyo) を投与し、5%のアセチルフコイダンを加えた水と加えていない水が与えられた。アセチルフコイダン含有水の飲水量は約1mL/day/匹であった。各実験群のマウスは8匹使用した。実験のプロトコールは東海大学医学部における実験動物の取り扱いガイドラインに基づいて行った。

### Colon 26 細胞の調整

マウス由来大腸癌細胞 colon 26を RPMI1640 (Invitrogen Japan K.K., Tokyo) にウシ胎仔血清 (FBS, Invitrogen Japan K.K.) 10%、及びカナマイシン  $100 \mu\text{g/mL}$  (Sigma-Aldrich Japan Co., Tokyo) を添加して、 $37^\circ\text{C}$  の培養室において、5%のCO<sub>2</sub>を含む空気中で培養した。プラスチックディッシュ (Asahi Techno Glass Co., Tokyo) 上の単層培養細胞をPBSで1回洗浄後、1mLの細胞分離液 (Sigma-Aldrich Japan Co.) でインキュベーションした後に細胞を採取した。この浮遊細胞を洗浄の後、FBSを添加せず、カナマイシン  $100 \mu\text{g/mL}$  を加えたRPMI1640により  $5 \times 10^7 \text{ cells/mL}$  の密度で懸濁した。

### マウスへのColon 26細胞移植

マウスは手術の24時間前より絶食とした。手術開始時に、30%の酸素と70%の笑気を含む5%のイ

ソフルレンで麻酔を導入し、手術時はイソフルレン2%まで引き下げ、手術終了まで持続した。手術はまず、腹部中央切開し、colon 26 ( $5 \times 10^6$  cells/ $30 \mu\text{L}/\text{mouse}$ ) 細胞を5回に分けて小腸にマイクロニードル ( $10\text{--}100 \mu\text{L}$ , Terumo Co., Ltd., Japan) で注入した。Colon 26細胞移植の後、傷口は3/0のナイロン糸で縫合した。マウスはcolon 26細胞移植後2週間でペントバルビタールoverdoseにより犠死後、開腹し、腫瘍サイズを計測後摘出した。腫瘍体積は以下の公式で計算した。

$$\text{Tumor volume (mm}^3\text{)} = \text{length (mm)} \times \text{width}^2 \text{ (mm}^2\text{)} \times 1/2$$

### 組織学的分析

組織は腫瘍サイズを計測後、小腸組織を取り除き4%のparaホルムアルデヒド溶液を用い室温で10分間固定した。固定後組織は長径中心部で連続切片を作成し、H.E.染色とアポトーシス細胞を検出した。アポトーシスは、TACS (Trevigen Apoptotic Cell System) 2 TdT-DAB kitを用い、DNAを標識した。具体的には切片はPBSで3回洗浄の後、CytoPoreで30分間透過した。内因性のペルオキシターゼは3%過酸加水素と40%メタノール混合液に5分間浸すことにより消去した。切片はTdT labeling mixture で37°Cで1時間インキュベートし、TACSでラベルした。核染色はメチルグリーン染色を用いた。

### 統計

データは平均値 $\pm$ 標準偏差であらわし、有意差はスチューデントt検定を用いて検討した。

## 結 果

本研究において用いた実験動物モデルでは、colon26癌細胞を移植後、平均生存期間が3.5週目で、1週間後よりマウスの体重が減少することが明

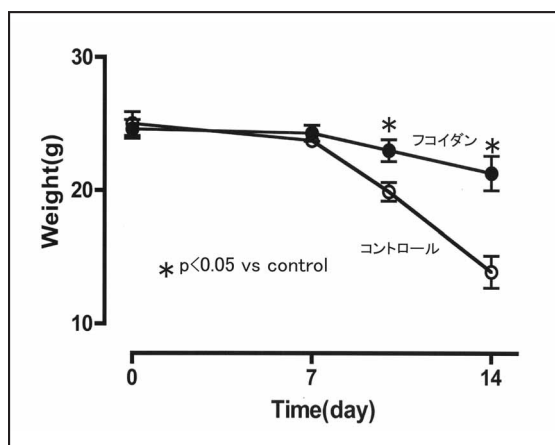


図1 腫瘍細胞移植後の体重変化

フコイダン投与群ではコントロール群にくらべて有意に体重減少が抑制された。

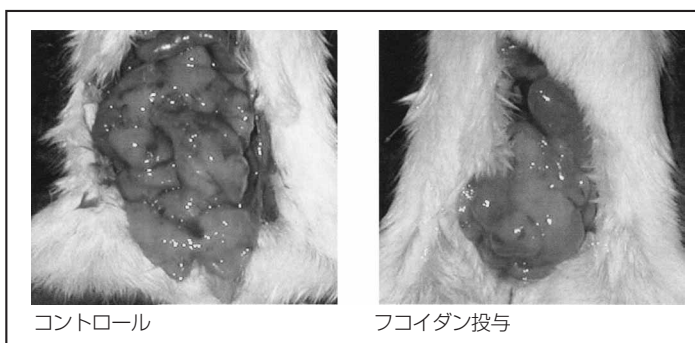
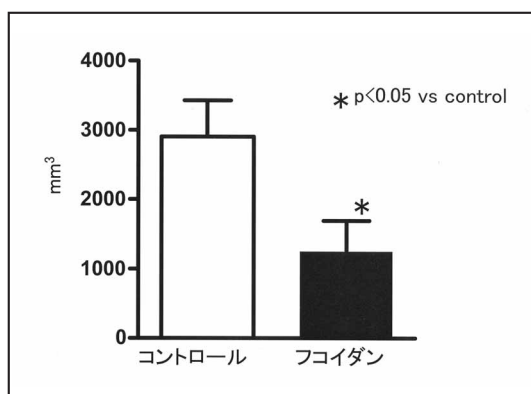


図2 腫瘍の肉眼像

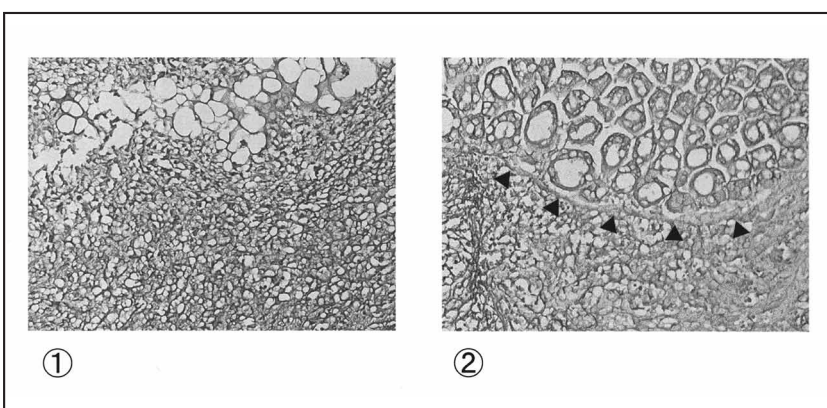
フコイダン投与群ではコントロール群にくらべて腫瘍の発育が抑制されていた。

らかとなっている。そこで、はじめにフコイダンを投与することにより、マウスの体重減少を抑制することが出来るのかどうか検討を行った。マウスの体重は癌細胞移植後7日目まではコントロール群とフコイダン投与群で差を認めなかったが、2週間後にはコントロール群で14.5 $\pm$ 3.42gとフコイダン投与群 (20.7 $\pm$ 3.4g) に比較して有意な体重減少を認めた (図1、\* $p < 0.05$  vs コントロール群)。

腫瘍の発育も肉眼的な観察でコントロール群 (図2) に比較して、フコイダン投与群 (図2) は明らかに腫瘍の発育が抑制されていると考えられ、腫瘍体積の計測においてもコントロール群の2902 $\pm$ 524.7mm<sup>3</sup>に対しフコイダン投与群では1250 $\pm$ 440.1mm<sup>3</sup>と有意に腫瘍の発育を抑制していた (図3、\* $p < 0.05$  vs コントロール群)。組織学的検討において、コントロール群では腫瘍細胞の周辺



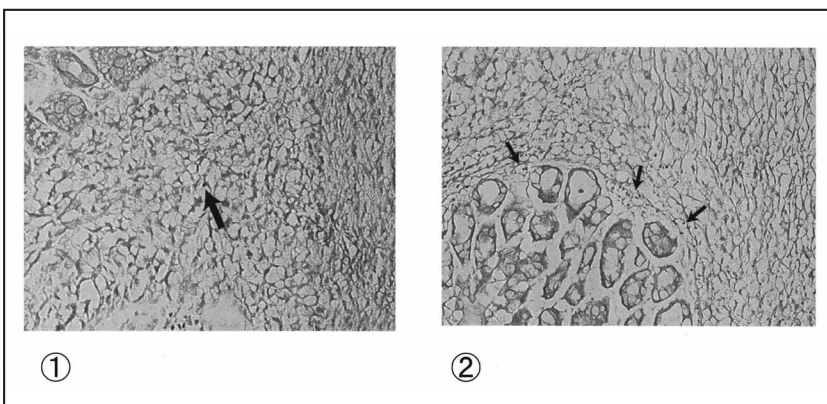
**図3 腫瘍体積**  
フコイダン投与群ではコントロール群にくらべ腫瘍体積が減少していた。



**図4 腫瘍組織のH・E染色 (①コントロールと②フコイダン投与)**

図4-① 腸上皮に接種した腫瘍細胞が正常組織へ強く浸潤している。

図4-② 黒印 (▲) 上部が正常組織との境界であり、腸上皮下に接種した腫瘍細胞による正常組織への浸潤が抑制されている。



**図5 腫瘍の免疫組織化学染色 (①コントロールと②フコイダン投与)**

図5-① 黒印 (↓) がアポトーシスを示す。アポトーシス染色陽性細胞はほとんど見られない。

図5-② 腫瘍の免疫組織化学染色 (フコイダン投与)

黒印 (↓) がアポトーシス細胞を示す。腫瘍細胞でアポトーシス染色陽性細胞が見られる。特に正常細胞との境界で多い。

組織への浸潤が著明であったが (図4-①)、フコイダン投与群では腫瘍細胞の浸潤が著明に抑制されていた (図4-②、矢頭)。

以上の結果から、フコイダンの投与が腫瘍の発育を抑制することが明らかとなった。そこで我々は、腫瘍発育のメカニズムとしてアポトーシスが関与するのではないかと考えTACS 2 TdT-DABによる免疫組織化学的染色を行い、腫瘍細胞におけるアポトーシスの発現を検討した。図5に示すように、コントロール群では腫瘍細胞内でアポトーシスの発現はごくわずかにしか見られなかったが (図5-①) フコイダン投与群では、腫瘍の浸潤部位におい

て著明な腫瘍細胞のアポトーシスの発現を認め (図5-②)、フコイダンの腫瘍抑制メカニズムとして腫瘍細胞のアポトーシスへの誘導が関係あるように思われた。

## 考 察

本研究において我々は、マウス大腸癌移植モデルを用いて沖縄モズク由来アセチルフコイダンの投与が、大腸癌の発育を抑制し、そのメカニズムとして腫瘍細胞へのアポトーシス誘導作用がある事を明らかにした。

フコイダンには感染防御作用<sup>6)</sup>や創傷治癒促進作用<sup>7)</sup>などのほかさまざまな生理活性作用を有していることが知られており、なかでもフコイダンの腫瘍に関する研究は近

年盛んに行われている。フコイダンがリンパ腫由来細胞であるHS-Sultan細胞にcaspase-3やERK経路を介しアポトーシスを誘導すること<sup>8)</sup>、フコイダンの摂取がマクロファージにヒドロキシルラジカルやスーパーオキシドなどの活性酸素種の産生とリソゾーム内の酵素誘導を引き起こし、また、リンパ球からのサイトカイン産生を誘導することが報告されている<sup>9)</sup>。さらに、血管内皮前駆細胞のCXCR4の発現を増加すること<sup>10)</sup>や腺癌細胞の接着因子を低下させる<sup>11)</sup>ことなどのさまざまなメカニズムにより腫瘍の発育が抑制されることも報告されている。しかし、沖縄モズク由来のアセチルフコイダンの腫瘍に対する治療効果は明らかとなっていない。

今回の我々の研究で、沖縄モズク由来フコイダンの経口投与により、マウス大腸癌細胞の発育が抑制されることが明らかとなった。その有効性のメカニズムとして、アセチルフコイダンの経口投与により癌細胞にアポトーシスが誘導されることが考えられた。アポトーシスは、TNFなどのサイトカイン<sup>12)</sup>やFasリガンドなどの細胞外からのシグナル<sup>13)</sup>を介するか、または、DNA損傷などによりcaspase-3が活性化し誘導されることはすでに明らかになっている。本研究では、フコイダンを投与することによりどの経路で癌細胞にアポトーシスが誘導されたのか解明できていないが、我々が行ったヒト由来の大腸癌細胞での検討では、大腸癌部位にスーパーオキシドやパーオキシナイトライトなどの活性酸素種が誘導されていることは確認できており、誘導された活性酸素種によりサイトカインが誘導されアポトーシスを引き起こした<sup>14)</sup>可能性がある。しかしながら活性酸素種には直接的なDNA損傷作用もあるため本研究における腫瘍細胞のアポトーシスへの誘導がサイトカイン以外の経路により生じた可能性もあり今後継続して研究を行う必要があると考えられる。

---

## 結 論

沖縄モズク由来のアセチルフコイダン経口投与が大腸癌の腫瘍発育を阻止することが示された。そのメカニズムとして腫瘍細胞のアポトーシスが関与していると考えられた。

---

## 謝 辞

本研究は、独立行政法人日本学術振興会科学研究費補助金（萌芽、基盤研究B）及び厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業：身体機能解析・補助・代替機器開発研究）の援助を受け行われた研究でありここに謝意を表します。

## 参考文献

- 1) Nishino T, Aizu Y, Nagumo T. The relationship between the molecular weight and the anticoagulant activity of two types of fucan sulfates from the brown seaweed *Ecklonia kurume*. *Agric. Biol. Chem.* 55(3): 791-796, 1991.
- 2) Ellouali M, Biosson-Vidal C, Durand P, et al. Antitumor activity of low molecular weight fucans extracted from brown seaweed *Ascophyllum nodosum*. *Anticancer Res.* 13: 2011-2020, 1993.
- 3) Fujikawa T, Wada M. Schleim aus der Braunalge *Nemacystus decipiens*, Mozukul. Mitt. Bestandteile des Schleims und ihre Eigenschaften. *Agric. Biol. Chem.* 39(5), 1109-1114, 1975.
- 4) Tako M, Yoza E, Tohma S. Chemical characterization of acetyl fucoidan and alginate from commercially cultured *Cladosiphon okamuranus*. *Botanica Marina* 43: 393-398, 2000.
- 5) Yu F.-g., Kitano H, Sakai T, et al. Apoptosis of human carcinoma cell lines induced by fucoidan (sulfated fucose-containing polysaccharide) and its degraded fragments by fucoidanase and endo-fucoidan lyase. Abstracts of XV III th Jap. Carbohydr. Symp., 93-94, 1996.
- 6) Doh-Ura K, Kuge T, Uomoto M, et al. Prophylactic effect of dietary seaweed fucoidan against enteric prion infection. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007 Jun; 51(6): 2274-2277, Epub 2007 Apr 16.
- 7) Sezer AD, Hatipoğlu F, Cevher E, et al. Chitosan film containing fucoidan as a wound dressing for dermal burn healing: preparation and in vitro/in vivo evaluation. *AAPS PharmSciTech.* 8(2): Article 39, 2007.
- 8) Aisa, Y. Miyakawa, Y. Nakazato T et al. Fucoidan induces apoptosis of human HS-sultan cells accompanied by activation of caspase-3 and down-regulation of ERK pathways. *Am J Hematol.* 78(1): 7-14, 2005.
- 9) Choi E-M, Kim A-J, Kim Y-O, et al. Immunomodulating activity of arabinogalactan and fucoidan *in vitro*. *J Med Food* 8(4): 446-453, 2005.
- 10) Irhimeh MR, Fitton JH, Lowenthal RM. Fucoidan ingestion increases the expression of CXCR4 on human CD34+ cells. *Exp Hematol.* 35(6): 989-994, 2007.
- 11) Liu JM, Bignon J, Haroun-Bouhedja F, et al. Inhibitory effect of fucoidan on the adhesion of adenocarcinoma cells to fibronectin. *Anticancer Res.* 25: 2129-2133, 2005.
- 12) Chanana V, Majumdar S, Rishi P. Involvement of caspase-3, lipid peroxidation and TNF-alpha in causing apoptosis of macrophages by coordinately expressed *Salmonella* phenotype under stress conditions. *Mol Immunol.* 2007 Mar; 44(7): 1551-1558. Epub 2006 Oct 6.
- 13) Yang Z, Gagarin D, Ramezani A, et al. Resistance to Fas-Induced Apoptosis in Cells from Human Atherosclerotic Lesions: Elevated Bcl-X(L) Inhibits Apoptosis and Caspase Activation. *J Vasc Res.* 44(6): 483-494, 2007.
- 14) Fukuyama N, Shizuma T, Ishiwata K, et al. Kurozu moromimatsu inhibits tumor growth of Lovo cells in a mouse model in vivo. *Nutrition* 23(1): 81-86, 2007.

# **CANCER-SUPPRESSING EFFECT OF ACETYL FUCOIDAN DERIVED FROM OKINAWA MOZUKU (*Cladosiphon okamuranus* TOKIDA)**

Key words : acetyl fucoidan, tumor cell, apoptosis

1)Kazuo ISHIWATA, 1)Toru SHIZUMA, 1)Hiroe NAKAZAWA, 2)Hidezo MORI, 1)Naoto FUKUYAMA

**【Purpose】** Fucoidan, a substance contained in seaweeds, has a wide range of useful biological activities, but the effects of acetyl fucoidan derived from Okinawa mozuku (*Cladosiphon okamuranus* TOKIDA) on cancer have not been investigated. In this study we evaluated the cancer-suppressing effects of acetyl fucoidan derived from Okinawa mozuku.

**【Material and Methods】** As an animal experiment model, a model of implanted mouse colorectal cancer cells was used. Following the implantation of the cancer cells, the experimental subjects were given tap water (control) or water containing 5% acetyl fucoidan. Changes in the mean body weight over time were measured, and tumor volume was measured. After the excision of the tumor tissues, histochemical examination was used to investigate the infiltration of the tumors and the presence or absence of apoptotic cells.

**【Results and discussion】** A statistically significant weight loss suppression effect was found in the fucoidan group, and tumor volume was statistically significantly reduced in the fucoidan group. Histochemically as well, tumor infiltration was found to be inhibited in the fucoidan group, and apoptotic cells were observed.

**【Conclusions】** Acetyl fucoidan derived from Okinawa mozuku was found to induce apoptosis in cancer cells and suppress tumor growth.

---

1) Physiology Department, Tokai University School of Medicine, Isehara, Japan

2) Department of Cardiac Physiology, National Cardiovascular Center