

## 秋季シンポジウム (1999) 「藻類の安全性と健康への効用」

## 加藤郁之進・佐川裕章：海藻食物繊維による癌リスク軽減

## 1. はじめに

食生活の欧米化につれて、肉食とパンや砂糖で代表されるような精製食品が好んで消費されるようになり、日本人の腸ガンや糖尿病の発生率が高まったと考えられている。現在では、世界中で腸などの癌リスクを軽減させるためには、野菜類つまり食物繊維の摂取が望ましいというコンセプトが広く認知されるようになってきた。しかし食物繊維の摂取がなぜ健康保持に良いのかという疑問には、まだまだ十分な科学的解答が与えられていないと思われる。

現在、一般に信じられている説明は、「食物繊維はヒトの酵素によって分解を受けないので、その未消化物が有害な腸内生成物やコレステロールなどを吸収、結合して糞便量を増やし、結果的に便秘をなくし腸内に健全な細菌叢の形成を促し、腸の健康が保持される」というものであろう。そこで食物繊維の含有量の多いものを調べてみると、寒天を筆頭に、きくらげ、ひじき、ほししいたけ、あおのり、わかめ、こんぶ等が並び、海藻類が圧倒的に多い。しかしながら、1990年にアメリカ国立ガン研究所を中心に発表された、ガン予防のための「デザイナーズフーズ・プロジェクト」の中で推奨されている食品群には、奇妙なことに海藻類は一切含まれていないのである。つまり西洋の習慣に基づいたガン予防食品群といえよう。

いずれにせよ、食物繊維の機能は上記の説明のように、腸内の清掃係的なものだけなのであろうか。われわれが解明しようと考えたのは、実はこの点なのである。現在までの研究は栄養面(カロリーやビタミンなど)と食品の化学組成などの分析に集中しているように見える。つまり植物性食品中の成分、たとえばビタミン類、カロチン類、フラボノイド類、クロロフィル類等の諸成分が、どのような役割を果たすのかといった問題を中心に研究され、本当の意味での食物繊維の機能性研究はなされてきていないといえよう。

食用海藻には褐藻類、紅藻類、緑藻類等があるが、特に褐藻類は古くから中国においてガンの治療に使われ、多くの研究者達によって褐藻類とくに昆布類の抗ガン作用物質を同定しようといういろいろな研究が行われてきた(山本, 丸山 1996)。昆布類の熱水抽出物を様々

な方法で分画し、抗ガン作用を追跡すると、結局フコイダンを主成分とする画分につき当たり、フコイダンは昆布類に含まれる抗ガン物質として以前からの最有力候補であった。われわれは1996年に、ガゴメコンブのフコイタン画分にウロン酸を含有するU-フコイタン(U-Fd)の化学構造を同定し(Sakai *et al.* 1996)、このフコイタンがガン細胞を特異的にアポトーシスさせる作用をもつことを突き止め、従来からいわれられていた昆布類がもつ抗ガン活性の一部を裏付けた(Yu *et al.* 1996)。既に、われわれはU-Fd以外に、フコイタン分子群の主成分である、硫酸化フコースからなるF-フコイタン(F-Fd)、さらにガラクトースを主成分とするG-フコイタン(G-Fd)と、合計3種類のフコイタンを単離し、それぞれの化学構造も決定した(Sakai *et al.* 1999)。さらに今年に入って、F-FdがHGFの産生を誘導するという、U-Fdとは異なった機構での抗ガン活性を発見したので、その結果を紹介したい(佐川ほか 1999)。

少し話題はそれるが、食物は当然のことながら調理の際に加熱を受けることが多い。とくにある種のスープ類や、煮込み料理では特にそうである。食物繊維の機能性研究以外に、食物繊維が調理過程(加熱など)でどのように変化するのかといった問題も看過され、充分科学的な吟味を受けてきたとは思えない。すでに、前田浩らによって、いろいろな野菜は、いったん茹でたほうが、ある種の抗ガン活性が顕著に増大することも報告されている(前田 1995)。われわれは、こうした観点に立って食物繊維の加熱変化の研究を約5年前から始めた。すでに野菜や、果物類、褐藻類に含まれる植物性食物繊維の主成分のひとつであるペクチンやアルギン酸や、動物性食物繊維であるコンドロイチン硫酸やデルマトン硫酸をはじめとするウロン酸含有多糖類を加熱処理すると、DHCP(4,5-dihydroxy-cyclopenten-1-one)と呼ばれるトポイソメラーゼIIの阻害活性を持った非常に強い抗ガン性物質が生成されることを発見した(大野木ほか 1998)。最も一般的な食物繊維が加熱調理の結果、新しい生理的機能を発現するという従来予想もされなかった、世界で初めての証明であった(小山ほか 1997)。この発見は、古来中国において健康によいとされる、いわゆる"不老長寿薬"と称される食



瘍の増殖，進行，転移などを助長する作用を持つことになる(Chin *et al.* 1997)。

固形ガンの進行にとってガン細胞周辺の血管新生は必須である。リンパ腺に転移したガン細胞は，非常に高いNOS活性を持っている。この細胞をウサギの角膜に移植すると，著しい血管新生が認められた。ところが，この状態において，一酸化窒素合成酵素(NOS)の阻害剤(L-NAME)を添加すると血管新生は認められなくなった(Tsurumi *et al.* 1997)。このように，一酸化窒素がガンの増殖にとって欠かせないものであることが，明らかになってきた。

マウスの腹腔マクロファージを一酸化窒素の誘導剤であるリポポリサッカライド(LPS)とインターフェロンガンマ(INF  $\gamma$ )で処理すると，一酸化窒素が誘導される。この状態でアガロビオースを添加すると，添加量に比例して誘導される一酸化窒素量が低下した(図2)。つまりアガロビオースは誘導型一酸化窒素合成酵素(iNOS)を阻害することが明らかとなった(榎ほか1999)。一方，マウスのマクロファージ細胞株RAW 264.7を一酸化窒素の誘導剤で処理するとやはりNOが誘導されるが，NOの誘導剤の添加前にアガロビオースを反応させておくと，同時添加よりもさらに約40%ほど強くNOの産生を抑制していた。

このようにアガロビオースは誘導型NOの産生を抑制することがわかったが，誘導型一酸化窒素合成酵素(iNOS)の産生が実際に抑制されているのかどうかを確かめた。NOを誘導後100 $\mu$ Mのアガロビオースを加え，12時間後に抗iNOSモノクローナル抗体を用いたウェスタンブロッティングによってiNOSの産生量を調べた(図3)。明らかに，iNOSの産生が抑制されている。一方，100 $\mu$ MのアガロビオースをiNOS誘導前，それぞれ1時間，5時間に添加し，iNOS誘導後6時間目にmRNAを抽出してRT-PCRを行い，発現しているmRNAの量を調べた。アガロビオースの添加時間が早

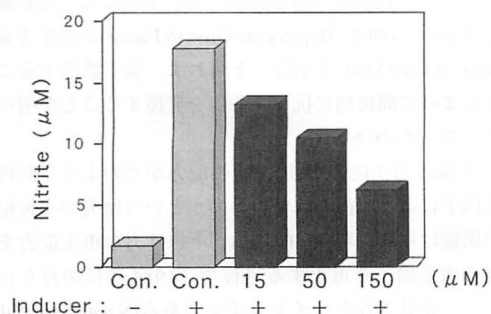


図2. アガロビオースによるマウス腹腔マクロファージのNO産生抑制 Inducerは，LPS 100 ng/ml および IFN- $\gamma$  50 U/ml

いほどiNOSのmRNA量が少なく(図4)，アガロビオースはiNOS遺伝子の発現を抑制していることが明らかになった。

### 2-3. アガロオリゴ糖はプロスタグランジン E2 (PGE2)の産生を抑制し，TPAで誘発される浮腫を抑制する

マウスのマクロファージ細胞株RAW264.7と100 $\mu$ Mのアガロヘキサオースを5時間培養後LPSでPGE2を誘導し，18時間後にPGE2量を測定すると，PGE2量はコントロールの約20%にまで低下していた。しかし，アラキドン酸を同時に添加すると，全体的にはPGE2の産生量が増大することから，アガロヘキサオースはシクロオキシゲナーゼ2の酵素作用を阻害しているのではなさそうである。

一方，TPAは細胞リン脂質代謝を亢進させ，発癌プロモーションにつながる重要な作用を持っており，

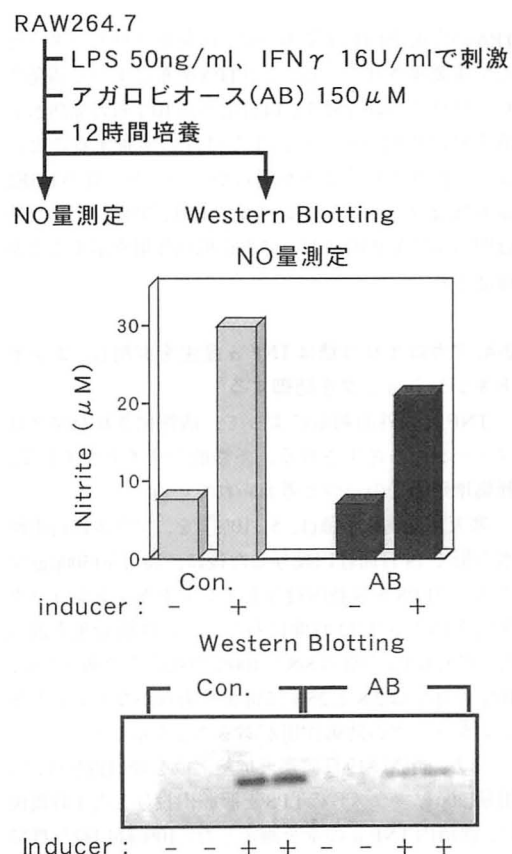


図3. アガロビオースによるiNOS発現抑制(Western Blotting)

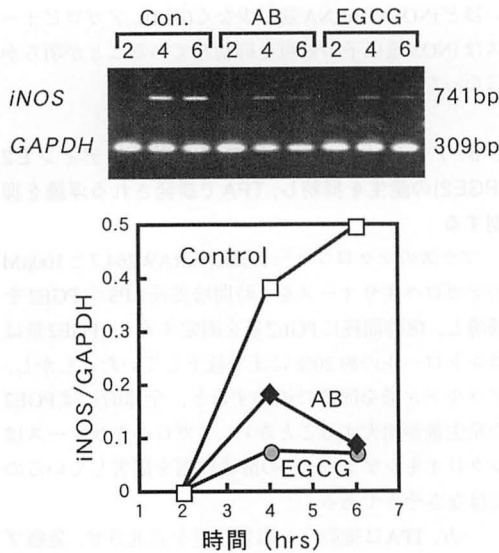


図4. アガロビオースによる iNOS 発現抑制 (RT-PCR)

TPAの作用を抑制するものは、抗発癌プロモーターとして重要視されている。このTPA塗布によって誘発されるマウスの耳浮腫を、14日前から10%寒天加熱水溶液を経口摂取させるか、または耳に塗布することによって抑制されることが明らかとなった。耳のPGE2量もほぼコントロールレベルであり、アガロオリゴ糖は明らかに生体内において炎症抑制作用を示すことが確認された。

#### 2-4. アガロオリゴ糖はTNF $\alpha$ 産生を抑制し、エンドトキシンショックを防御する

TNF $\alpha$ は外的刺激によって、活性化されたマクロファージから産生される、多機能のサイトカインで、腫瘍増殖因子の一つと考えられている。

寒天加熱物水溶液(1, 5, 10%)を、マウスに自由飲水で19日間経口投与した後、高用量(300 $\mu$ g/マウス)のLPSを腹腔内投与しエンドトキシンショックを引き起こさせ72時間にわたって、防御効果を調べた。寒天液1%の群は8/8と100%の死亡率であったが、10%の群では2/8と25%に留まり明らかなエンドトキシンショックの防御作用があることを示した。

一方、同様に19日間寒天加熱溶液を経口投与後、低用量(20 $\mu$ g/マウス)のLPSを腹腔内投与した1時間後に、血清内TNF $\alpha$ の量を測定した。10%経口投与群ではコントロールに対して、約30%の低下が認められた。エンドトキシンショックによって誘発されるNO産生は、血管拡張によって急激な血圧低下が引き起こ

す。すでに述べたように、アガロオリゴ糖は誘導型のNO産生及び炎症性のプロスタグランジンE2産生を抑制する結果、エンドトキシンショックによる死を防ぐと考えられる。

#### 2-5. アガロオリゴ糖の作用メカニズム

寒天はその精製過程においてアルカリに曝される工程があるが、その化学構造は変化することなく比較的安定である。しかし、アガロオリゴ糖を常温で5分間、アルカリ性(pH11)にした後、pH5に戻してもアガロオリゴ糖が本来持っていた還元性が消失するとともに、今まで述べてきたような生理活性は消失してしまった。この現象は強いアルカリ性にする必要はなく、中性のpHでも引き起こされ、さまざまなAssayに用いている細胞培養の培地中(pH7.5)でも、図に示すような新化合物(L-glycero-1, 5-epoxy-1 $\alpha$ , 6-dihydroxy-cis-hex-3-en-2-one)が生成していた(図5)。

一般に、 $\alpha$ -カルボニール基と $\beta$ 不飽和結合を持った化合物は抗ガン活性があるとされている。ウロン酸を加熱することによって生成されるDHCPも同様の化学構造を持っている。DGEはDHCPと同様に反応性に富んでおり、グルタチオンと反応して図のような化合物を生成する。従って、一見、不活性のように見えるアガロオリゴ糖はpHが中性状態にある細胞内に取り込まれた瞬間、DGEが生成しiNOS遺伝子に関与するタンパク質などと反応し、その結果iNOSの発現を抑制するものと考えられる。

#### 3. 褐藻類の抗ガン活性

##### 3-1. フコイダンは肝細胞増殖因子HGFの産生を誘導する

U-Fdは既に述べたようにガン細胞特異的にアポトーシスさせる。しかし主成分のF-フコイダン(F-Fd)にはそのような作用は見られず、抗ガン作用には関与していないのかと一時思われたが、今年に入って肝細胞増殖因子(HGF: Hepatocyte Growth Factor)の産生を*in vivo*, *in vitro*(MRC-5細胞)を問わず、強く誘導することによって間接的に抗ガン作用を発揮することが明らかとなった(図6)。

肝臓は再生能力が強く、その能力がどのような肝再生因子によって担われているのかという研究が半世紀の間続けられていた。HGFは、その強力な再生能力を司る再生因子を追求する過程で、1984年に中村らによって発見されたサイトカインである(Nakamura *et al.* 1984)。今では、HGFは急性並びに慢性疾患に対する、

顕著な傷害防止、機能改善、治癒効果を持つ、本来の生体修復因子であると考えられている。蛇足ながら、HGFは発毛促進作用も報告されており(Jindo *et al.* 1998), 結果的に民間で伝承されている海藻摂食による養毛作用をも裏付けている。すでに報告されているHGFの生理作用は非常に広く、抗ガン作用(Tsunoda *et al.* 1998), アルコール性肝炎の治療作用(Tahara *et al.* 1999), 肝硬変の治療(Ueki *et al.* 1999)なども報告されている。この有用なサイトカインの産生をF-フコイダンが経口投与で促進することは、将来、治療薬となる可能性を示している。

F-FdのHGF誘導能力は、既に知られていたヘパリンのそれとほぼ同程度であったが、U-FdにはHGF誘導活性が殆ど認められなかった(図6)。他の褐藻類のフコイダン画分でも調べてみると、ワカメ、日本海産のモズク、南米産のレッスンニア等にはHGF誘導活性が認められたが、分類学上はモズクではない沖縄モズクには、その活性が殆ど認められなかった(図7)。この結果はこの活性を誘導するためには、なんらかの特殊な化学構造の必要性を示唆している。

3-2.HGFの変異体NK4による抗ガン作用

HGFは北欧のクリングルビスケットに似た化学構造(クリングル構造と呼ばれる)を4個連ねた分子量約9万の重鎖と、プラスミノゲンと40%相同性を持つ分子量約3万の軽鎖がS-S結合で繋がった構造をしている。タンパク質分解酵素によって分解すると、アミノ末端のヘアピンループと1から4番目までのクリングル構造からなる変異体NK4が生じ、この誘導体が非常に強い腫瘍抑制作用を持つことがあきらかとなった。

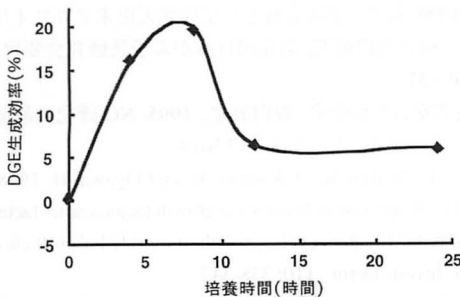
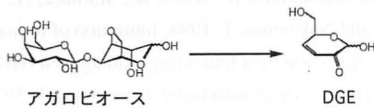


図5. アガロビオースのDGEへの変換

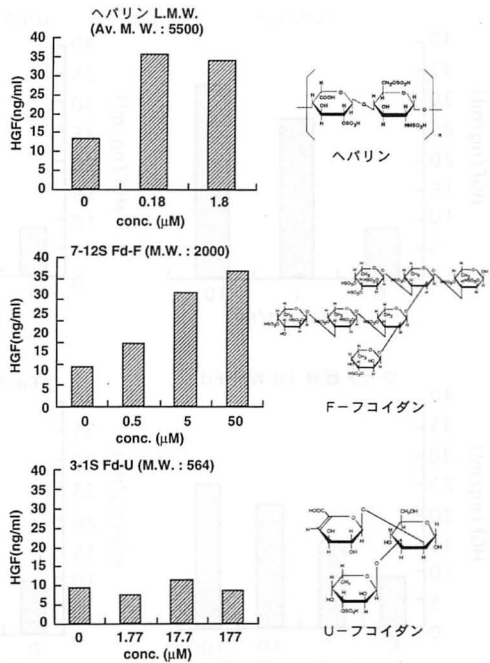


図6. F-フコイダン, U-フコイダンによるHGF産生誘導

このNK4はHGFの拮抗作用を持っており(Date *et al.* 1998), ガン細胞が成長するために必要な、血管新生作用を抑制することによって、ガン細胞の増殖を抑制するものと考えられている。

3-3.F-Fdの抗ガン作用

ヌードマウスにヒト大腸ガン細胞を移植した状態で、F-FdとU-Fdの混合物水溶液を水の代わりに飲ませ続けると、5匹中2匹のマウスで、瘡蓋のように崩落するのが認められた。このような現象は硫酸化オリゴ糖による、HGF誘導の結果引き起こされる腫瘍細胞の血管新生抑制作用によるものと考えられる。マルトテトラオース(グルコース4糖)やマルトヘキサオース(グルコース6糖)の硫酸化物が強力に血管新生を抑制すると同時に、ガン細胞の転移を抑制すると報告されている(Parish *et al.* 1999)。ただ彼らはこれらの硫酸化オリゴ糖が、ヘパラーゼを阻害する結果血管新生を抑制するのであり、HGFの産生誘導に起因するものとは考えていないようである。

3-4. ガゴメコンプ由来のフコイダンの化学構造とその酵素分解物

既に少しふれたように、ガゴメコンプには3種類の

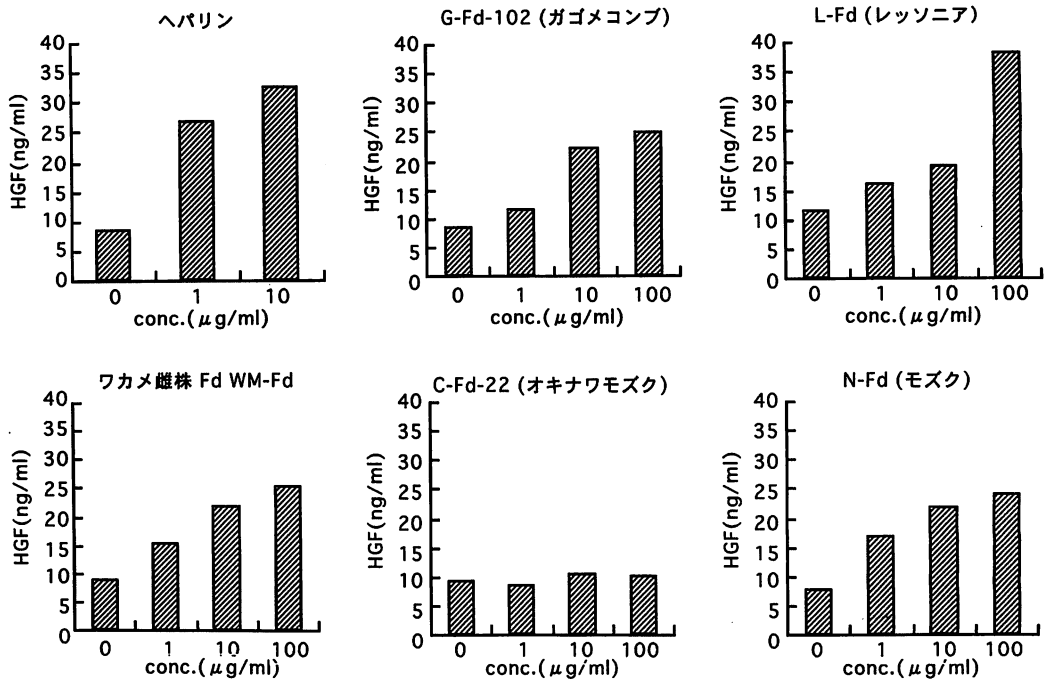


図7. 各種フコイダンによるHGF産生誘導

フコイダンが単離されている。ここではF-Fdの基本的繰り返し化学構造だけを示す(図6)。この構造は、精製したF-Fdを我々がある種の海洋バクテリアから単離したフコイダナーゼで分解したときに生成する7糖12硫酸の断片である。つまり、ガゴメコンブのF-Fdはこの7糖のオリゴ糖が直鎖状に100以上繋がった硫酸化多糖と考えられる。

この7糖12硫酸のHGF生産誘導能力は非常に高く、ヘパリンのそれにほぼ匹敵する(図6)。しかも肝切除処理をしたマウスに経口投与すると、HGFの血中濃度が上昇することが明らかとなり、将来ガンの治療や肝臓病の治療に用いられる経口投与薬剤になる可能性を示唆している。

#### 4. まとめ

紅藻類の寒天由来のアガロオリゴ糖や、褐藻類のガゴメコンブ由来のフコイダンやそのオリゴ糖の食品機能性について述べてきたが、海藻が生体の免疫調整剤として働く有用な食品であることについては疑問の余地がないと思われる。結果的に、ガン細胞の増殖や転移活性を抑制することによって、ガンリスクを下げるように働くものと考えられる。アガロオリゴ糖やフコイダンあるいはそれらのオリゴ糖は、将来優れた医

薬品として開発されていくものと予想される。今後、われわれの研究所において、海藻食品のさらなる機能性探求の努力を続けていくつもりである。

#### 参考文献

- Chin, K., Kurashima, Y., Ogura, T., Tajiri, H., Yoshida, S. and Esumi, H. 1997. Induction of vascular endothelial growth factor by nitric oxide in human glioblastoma and hepatocellular carcinoma cells. *Oncogene*, 15: 437-442.
- Date, K., Matsumoto, K., Kuba, K., Shimura, H., Tanaka, M. and Nakamura, T. 1998. Inhibition of tumor growth and inversion by a four-kringle antagonist (HGF/NK4) for Hepatocyte growth factor. *Oncogene*, 17: 3045-3054.
- 榎竜嗣, 奥田真治, 富永隆生, 佐川裕章, 加藤郁之進. 1999. 発ガン予防食材としての寒天由来アガロオリゴ糖の基礎研究. 第6回日本がん予防研究会要旨, P-37.
- 江角浩安, 渋谷克栄, 谷口直之. 1995. NO研究の最前線. *実験医学 増刊* 13 No.8.
- Jindo, T., Tsuboi, R., Takamori, K. and Ogawa, H. 1998. Local injection of hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF) alters cyclic growth of murine hair follicles. *J. Invest. Derm.*, 110: 338-342.
- 加藤郁之進. 1998. 寒天とアガロオリゴ糖の機能性. 食

- 品と開発. 33: 44-46.
- 小山信人, 佐川裕章, 小林英二, 榎竜嗣, 務華康, 萩屋道雄, 猪飼勝重, 加藤郁之進. 1997. ウロン酸及びウロン酸含有多糖の加熱により生ずる生理活性物質. 第19回糖質シンポジウム要旨. B3-06. 西宮
- 前田浩. 1995. 野菜はガン予防に有効か(酸素ラジカルを巡る諸問題) 一体に有害な酸素ラジカルを除きガン予防・老化防止をめざして-, 菜根出版. p. 23-32.
- Nakamura, T., Nawa, K. and Ichihara, A. 1984. Partial purification and characterization of Hepatocyte Growth Factor from serum of hepatectomized rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 122(3): 1450-1459.
- 大野木宏, 小林英二, 榎竜嗣, 栗津和子, 加藤郁之進. 1998. DHCPのトポイソメラーゼII阻害活性と癌細胞のG2/M期停止, 第71回日本生化学会大会要旨, 3H-W22-10. 名古屋.
- Parish, C. R., Freeman, C., Brown, K. J., Francis, D. J. and Cowden, W. D. 1999. Identification of Sulfated Oligosaccharide - based Inhibitor of tumor growth and metastasis using novel in vitro assays for angiogenesis and heparanase activity, *Cancer Research.*, 59: 3433 - 3441.
- 佐川裕章, 明山香織, 大野木宏, 酒井武, 加藤郁之進. 1999. 褐藻類フコイダンのHepatocyte Growth Factor誘導作用. 第72回日本生化学会大会要旨. 2P-002. 横浜.
- Sakai, T., Kimura, H., Kojima, S., Nakayama, S., Katamaya, K., Nakanishi, Y., Ikai, K. and Kato, I., 1996. Two types of fucoidans (Sulfated Fucose - Containing polysaccharides), Two types of Fucoidan - degrading enzymes, and their products., *Abstracts of XVIIIth Jap. Carbohydr. Symp.*, 159.
- Sakai, T., Kimura, H., Shimanaka, K., Ikai, K. and Kato, I. 1999. Three kinds of enzymes that degrade sulfated fucose-containing polysaccharide from brown seaweeds, fucoidanase, sulfated fucoglucuronomannan-lyase, and fucogalactanase. *Glycoconjugate journal*, 16: 4/5 S122.
- Tahara, M., Mastuumoto, K., Nukiwa, T. and Nakamura, T. 1999. Hepatocyte growth factor leads to recovery from alcohol - induced fatty liver in rats. *J. Clinical Investigation*, 103: 313-320.
- Tsunoda, Y., Shibusawa, M., Tsunoda, A., Gomi, A., Yatsuzuka, M. and Okamoto, T. 1998. Antitumor Effect of Hepatocyte Growth Factor on Hepatoblastoma, *Anticancer Res.*, 18: 4339-4342.
- Tsurumi, Y., Murohara, T., Krasinski, K., Chen, D., Witzenbichler, B., Kearney, M., Couffinhall, T. and Isner, J. M. 1997. Reciprocal relation between VEGF and NO in the regulation of endothelial integrity. *Nature Medicine*, 3(8): 879-886.
- Ueki, T., Kaneda, Y., Tsutsui, H., Nakanishi, K., Sawa, Y., Morishita, R., Matsumoto, K., Nakamura, T., Takahashi, H., Okamoto, E. and Mujimoto, J. 1999. Hepatocyte growth factor gene therapy of liver Cirrhosis in rats. *Nature Medicine*, 5: 226-230.
- 山本一郎, 丸山弘子 1996. 海藻からの抗癌物質, p. 233-248. 21世紀の海藻資源 大野(編), 緑書房.
- Yu, F.-G., Kitano, H., Sakai, T., Katayama, K., Nakanishi, Y., Ikai, K. and Kato, I. 1996. Apoptosis of human carcinoma cell lines induced by fucoidan (sulfated fucose-containing polysaccharide) and its degraded fragments by fucoidanase and end-fucoidan-lyase., *Abstracts of XVIIIth Jap. Carbohydr. Symp.*, 93-94.

(宝酒造株式会社バイオ研究所)

