

新規ケフィア製品 *Lactobacillus kefir*(PFT)は *in vitro* で
ヒトの胃の腺癌 AGS 細胞に対してアポトーシス効果を発揮する

マンドー・ゴーナム¹、ノウラン・フェロ²

^{1,2} チャールス・ドゥリユー医科学大学耳鼻咽喉科学科(米国、カリフォルニア州 90059, ロサンゼルス)

対応先 : Dr Mamdooh Ghoneum, Department of Otolaryngology, Charles R. Drew University of
Medicine and Science, 1621 E. 120th Street, Los Angeles, CA 90059. USA

キーワード : *Lactobacillus kefir*、胃癌、アポトーシス、ミトコンドリアの分極

要旨

本研究は、新規ケフィア製品 *Lactobacillus kefir*(PFT)のヒトの胃腺癌細胞(AGS)に対するアポトーシス誘導効果を評価する目的で行った。癌細胞を、PFT 濃度 0, 0.3, 0.6, 1.2, 2.5, 5.0 mg/ml の共存下でそれぞれ 3 日間培養した。そして、アポトーシスした癌細胞の率を、7AAD 染色を使ったフローサイトメトリーとギムザ染色調製したサイトスピン細胞遠心分離によって定量した。

PFT による 3 日後の癌細胞に対するアポトーシスの誘導は用量依存的であった。

アポトーシス率は、濃度 0.3mg/ml で 20.8%、0.6mg/ml で 25.8%、1.2mg/ml で 37.0%、2.5mg/ml で 53.1%、5.0mg/ml で 66.3%に達した。

加えて、形態学的観察により PFT の AGS 細胞に対するアポトーシス誘導能力を確かめた。

アポトーシスの誘導は、PFT 処理をした後早くも 30 分後に検出され、24 時間後にピークを迎えた。

PFT 処理した細胞は、アポトーシスの兆候を示し、膜の水膨れが起き、クロマチン⁽¹⁾の凝縮がギムザ染色で調製したサイトスピンではっきり認められた。PFT は AGS 胃癌細胞のアポトーシスを、ミトコンドリア膜電位(MMP)の分極の減少、Bcl2 発現の減少で示されるようにミトコンドリア回路を經由して誘導した。

Lactobacillus kefir(PFT)は、正常細胞に対しては毒性の無いことが判った。

これ等の結果から、PFT は胃癌の治療に使える可能性があることを示唆している。

(1)クロマチン……細胞核内の染色されやすい物質。染色質。真核細胞内の DNA と蛋白質の複合体。

序論

世界的に胃癌は癌の中でも 7%と 5 番目に多く、癌の死因の中で 9%と 3 番目を占める[1]。2012 年には 95 万人が発症し、72.3 万人が死んでいる[1]。米国では 2014 年に推定で 22,220 人が発症し、10,990 人が胃癌で死んでいる[2]。成果はしばしば貧弱で、世界的には 5 年生存率が 10%未満、米国でも 5 年生存率は 28%である[3]。胃癌は多因子性疾患である。ヘリコバクター・ピロリ感染が主な危険因子であり、胃癌の 65~80%に見られる。最も一般的な原因は、細菌ヘリコバクター・ピロリ[4]による感染である。しかし、遺伝・喫煙・食事特に野菜の酢漬けなどの他の要因も癌の進行に重要な役割を演じていることが示されている。この病気の治療には、手術、化学療法・放射線療法・標的療法が一般的

に使われ[5]、もし治療が遅れると、緩和ケアが推奨されることになる[4]。

化学療法は、胃癌細胞にアポトーシスを引き起こすことを狙う[6,7]。

しかしながら、これらの薬には毒性がある。故に、最近の研究では副作用のより少ない代替療法を模索する努力がなされている。乳酸菌(LAB)は癌の治療に有用な方策となるかもしれない。乳酸菌は、ヨーグルトの様に多くの食品に存在しており、抗腫瘍効果を顕在化して示している。一方プロバイオティクスは癌動物や *in vitro* の研究で発癌を予防する効果が示されている。

例えば、齧歯動物で異なるタイプの癌の増殖を阻止する効果を種々の乳酸菌が発揮していることを数々の研究が示している[8-11]。

加えて、*in vitro* の研究で、乳酸菌の異なる系統がヒトの癌細胞株に対して増殖阻止効果があることが明らかとなっている。例えば、*Lactococcus lactis* ssp. *lactis*(L.lac CF)はヒトの結腸癌細胞 SNUC2A に対してアポトーシスを惹起する[12]。また *Lactobacillus casei rhamnosus* がヒトの単球的白血病細胞株 THP-1 のアポトーシスを惹起する[13]。*Lactobacillus reuteri* がヒトの慢性骨髄性白血病由来の細胞に対して腫瘍壊死因子(TNF)で惹起されるアポトーシスを高める[14]。更に、疫学的研究によって示されたように、プロバイオティクスの消費が結腸癌の発症率の減少に関係しているかもしれない[15]。これ等のデータは、発酵乳製品が又は発酵微生物自身が、従来からの治療薬が持つ毒性の副作用無しに、化学予防効果を有することを示唆している。

新規プロバイオティクス発酵技術(PFT)のケフィア製品は、主として *Lactobacillus kefir* P-IF から成る自然の混合物で、*Lactobacillus kefir* P-IF は *L. kefir* の特殊な系統で、独特の増殖様式を有する。その結果は、我々は最近 PFT がヒトの多剤耐性(MDR)骨髄性白血病(HL60/AR)細胞に対し *in vitro* でアポトーシスを誘導することを示した[16]。これ等の知見が動機づけとなり、PFT が他のタイプの癌であるヒトの胃癌細胞 AGS に対してアポトーシス効果を発揮する可能性を *in vitro* で調べ、その効果の基本となるメカニズムを解明せんとする今回の研究に繋がった。

材料と方法

腫瘍細胞株

AGS はヒトの胃の腺癌細胞株で、今回の研究に使った。細胞はアメリカ培養細胞系統保存機関(ATCC) (Manassas, VA, 米国)から購入した。腫瘍細胞は、ダルベッコ変法イーグル培地(DMEM)(Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, 米国)に 10%のウシ胎児血清(FBS)及び 2mM のグルタミン、100 μ g/ml のストレプトマイシンとペニシリンを加えて保管した。

細胞は、加湿した培養機内で 37°C、CO₂ 濃度 5%の下、常に対数増殖期に維持した。

プロバイオティクス発酵技術(PFT)ケフィア製品

PFT は主として(90%以上)加熱殺菌した *L. kefir* P-IF を凍結乾燥したものを含んだ混合物である。

加えて、PFT はそれぞれ 2~3%の *Lactobacillus kefir* P-BI 及び 3 種の酵母、*Kazachstania turicensis*, *Kazachstania unispora*, 及び *Kluyveromyces marxianus* を含む。*L. kefir* P-IF は乳酸菌の中でも特殊な系統であり、独特な DNA 配列を有し、PET スキャン(?)では標準の *L. kefir* 菌と 99.6%の相同性を示す。その特徴は、最近[16]により報告されている。

PFT はパイトス株(日本国神奈川県横浜市)より提供された。

(?)……PET スキャン(乳癌等の検診用に使われるもの?)で DNA 配列のチェックができるとは思えない。誤記?

PFT は AGS 癌細胞に対しアポトーシスを誘導する—フローサイトメトリーによる研究

7-Aminoactinomycin D (7-AAD 染色) を使って癌細胞の生存力を調べた。

AGS 細胞を、PFT の異なる濃度(0, 0.3, 0.6, 1.2, 2.5, 5mg/ml)の下で 3 日間培養し、死んだ癌細胞の率を 7 AAD (BD biosciences, San Diego)技法で FACS Calibur フローサイトメトリーを使って調べた。簡単に言えば、細胞を暗所で室温の下 30 分間 5 μ l の 7AAD で染色し、FACS Calibur (Becton-Dickinson, San Jose, CA, 米国)によって解析した。

PFT は AGS 癌細胞に対しアポトーシスを誘導する—形態学的な解析

PFT に誘導されアポトーシス化した癌細胞を調べるのに、ギムザ染色したサイトスピン調製を使った。アポトーシス化した細胞の同定にはいくつかの形態学的な特徴、細胞の膨張、膜の水泡化、クロマチン(染色質)の凝縮を利用した[17]。

A. 6-ウェルプレート⁽²⁾における単層 AGS 細胞の増殖

PFT の共存下で培養した単層 AGS 細胞のアポトーシスを調べるために、以前我々が使ったモデル分析システム[18]に従って行った。付着した AGS 細胞及び付着していない AGS 細胞のアポトーシスを調べた。癌細胞は、6-ウェルプレート(各 25×36mm)(CELLSTAR, Greiner Bio-One, Monroe, NC, 米国)内で増殖するに任せた。各ウェルの底にカバーガラスを置いた。

1×10⁵の AGS 細胞/ml の 2ml をピペットで各ウェルに注ぎ、付着し 50-60%合流するに任せた。

PFT(5.0mg/ml)を各ウェルに加え、37°C、CO₂濃度 5%の条件下で 0.5 時間及び 24 時間培養した。

両方の付着していない及び付着した細胞について以下のように調べた。

B. 付着していない細胞

付着していない癌細胞を含む上澄液(1ml)に 100 μ l のトリパンブルーを混合し、サイトスピン調製 (Shandon Southern Instruments, Sewickly, PA, 米国)に使った。調製は、100%メタノールで固定し、風乾し、4%ギムザで 20 分間染色し、油浸及び 100 倍の対物レンズ(ライカ DMLB 顕微鏡及びライカ DFC310FX デジタルカラーカメラ、ドイツ)の光学顕微鏡を使って調べた。

上澄液はまたヘモサイトメーター(血球計算盤)を使って、付着していない癌細胞のアポトーシス化数の計数に用いた。

C. 付着した細胞

付着した細胞を含むカバーガラスを注意深く取り除き、風乾し、スライド上に乗せ、メタノールで固定し上述のようにギムザで染色した。細胞は油浸と 100 倍の対物レンズ(ライカ顕微鏡)の光学顕微鏡を使って形態学的に解析した。加えて、付着した癌細胞のアポトーシス化率を計算する準備をした。

付着した細胞数は、カバースリップ上のそれぞれが 80 細胞以上を含む 5 つの異なった場面の観察により計算した。細胞のアポトーシス化率は、アポトーシス化した細胞数を集計した全細胞数で割って決定した。

(2)ウェルプレート……多数のくぼみ(ウェル)の付いた平板から成る実験検査器具。各ウェルを試験管又はシャーレとして使う。ウェルの数には、6, 24, 96 などがある。ウェルの容量は、数 μ l～数ml。

効果の根底にあるメカニズム

A. Bcl-2 の発現

Bcl-2 の検出のために、初めは細胞を固定し冷 70%メタノールで透過性にする。次に細胞を FITC で

ラベルした Bcl-2 抗体又はアイソタイプ・コントロール⁽³⁾(Dako Corp., Carpinteria, CA, 米国)で染色し、洗浄した後に FACS Calibur で解析した。Bcl-2 を発現した細胞の率及び平均の蛍光強度(細胞中の分子数の比率の濃さの指標)を調べた。

(3)アイソタイプ・コントロール……一次抗体の反応が、サンプル細胞の表面上のレセプターを介する等の非特異的なものではなく、特異的な抗原認識の結果であることを確認するために用いる。

B. ミトコンドリア膜電位(MMP)の検出

アポトーシスの間のミトコンドリアの膜内外電位差の変化($\Delta\psi_m$)を tetramethylrhodamine ethylester (TMRE, Molecular Probes, Eugene, OR, 米国)を使って調べた。

PFT で 3 日間処理した後、癌細胞(5×10^5 細胞/ml)を 50nM の TMRE と共に 37°C で 30 分間培養し、生理的食塩水で洗浄した後、FACS Calibur を使って解析した。

側方散乱はゲートで制御し細胞の破片を除外するために FACS Calibur を用いた。細胞は、488nm で励起し、放出は FL2 チャンネルに集められた。5 千個の細胞を解析した。

データを獲得して、CellQuest ソフトウェア(Becton-Dickinson)を使って解析した。

PFT のヒト末梢血単核細胞(PBMCs)に対する影響

3 人の健常な提供者のヒト末梢血単核細胞(PBMCs)(チャールス・ドゥリユー大学、ロサンゼルス、CA, 米国の治験審査委員会(IRB)で承認された)を、Ficoll-hypaque 密度勾配遠心分離器で分離した。

細胞(1×10^6 /ml)を PFT(5mg/ml)共存下と不在下で 3 日間培養し、細胞のアポトーシスの率を調べた。

統計的解析

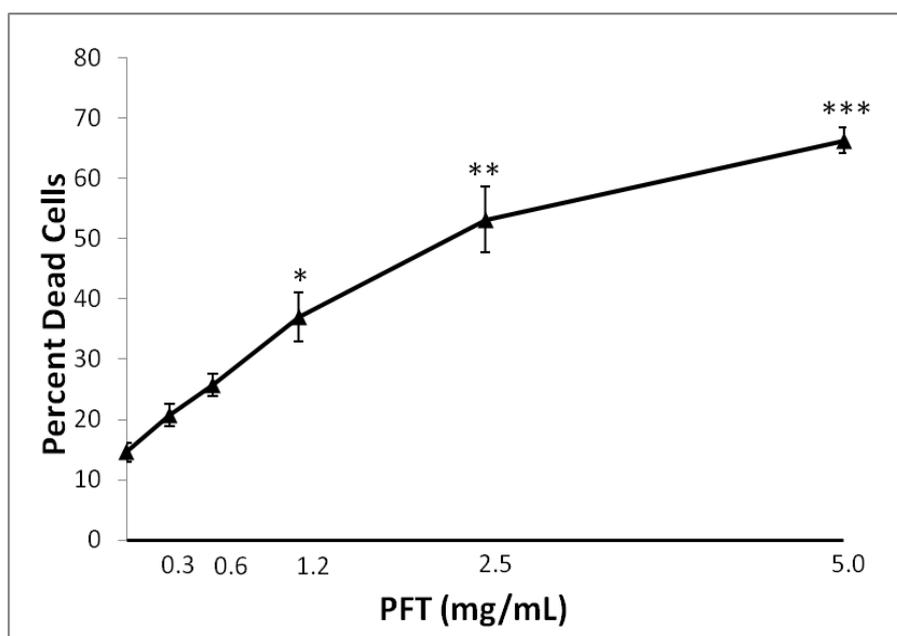
Student の t-検定を用い、PFT 共存下での培養後に、アポトーシスした癌細胞とヒト末梢血単核細胞(PBMCs)の率の変化について、未処理の対照の細胞群との有意差を調べた。

有意差のレベルは、 $P < 0.05$ に設定した。

結果

フローサイトメトリーによる癌細胞のアポトーシス化率

AGS 細胞を、濃度 0~5mg/ml の PFT の共存下で 3 日間培養し、7AAD 染色を使ってフローサイトメトリーでアポトーシス化した癌細胞の率を調べた。図 1 に示されたデータは、アポトーシスの誘導が用量依存的であることを示している。アポトーシス化した細胞の率は、低濃度の PFT(0.3 及び 0.6 mg/ml)から見られた。アポトーシス化した細胞の率は 1.2mg/ml(37.0%, $p < 0.05$)で有意差を生じ、2.5 mg/ml(53.1%, $p < 0.001$)で更に増加し、5mg/ml(66.3%, $p < 0.0001$)で最大となった。



【図 1】フローサイトメトリーによるアポトーシス化した癌細胞の率に対する PFT の効果
 AGS 細胞(1×10^5)を濃度 0~5mg/ml の PFT と共に 3 日間培養した。
 細胞の死は、7AAD 染色色素を使って、フローサイトメトリーによって測定した。
 データは、それぞれの濃度の 4 例の平均値 \pm SE 標準誤差を表す。
 * $P < 0.05$ ** $P < 0.001$ *** $P < 0.0001$

ギムザ染色による癌細胞アポトーシス化の形態学的な解析

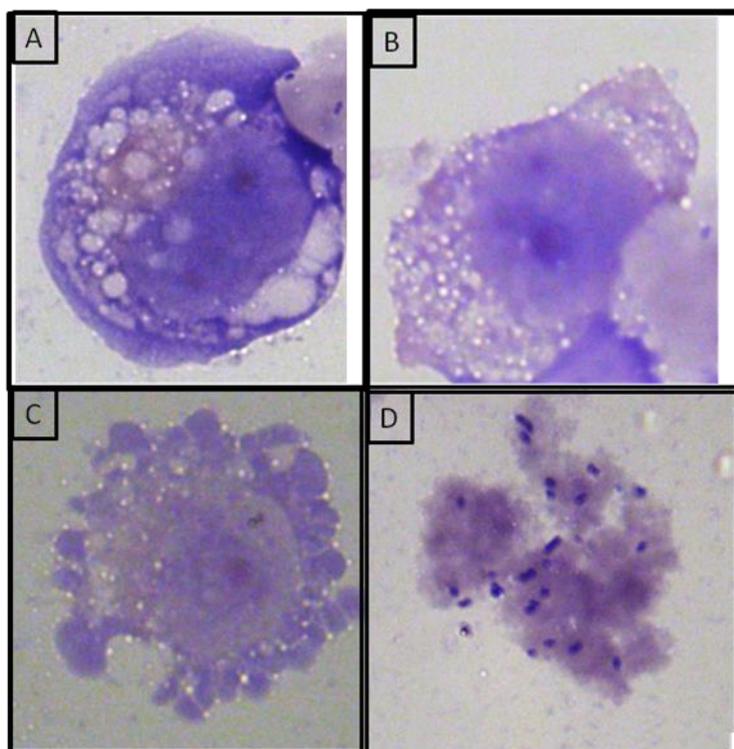
癌細胞を、5.0mg/ml の PFT と共に培養し、付着しないレベルと単層に付着するアポトーシス化した癌細胞を調べた。

A. 付着しないアポトーシス化した癌細胞

癌細胞を PFT 共存下で培養し、付着しない細胞を含む上澄みを集め、集細胞遠心装置で集め、ギムザ染色し、癌細胞を形態学的に調べた。上澄みの他の部分は、ヘモサイトメーター(血球計算盤)でアポトーシス化した癌細胞の率を調べた。

i-形態学的特徴

PFT は 30 分で AGS 癌細胞に穴を開けることが判った。図 2A~C は、アポトーシス化した癌細胞が多数の小さな空胞に加えて、膜の水泡化とクロマチン(染色質)の凝集を起こしていることを示している。最終的には、アポトーシス化した細胞は Trypan blue の取り込みに示されるように死ぬ。図 2D は、を含み濃い青色に染まった PFT 菌を含む死んだ癌細胞を示す。



【図 2】 付着しないアポトーシス化した AGS 癌細胞のサイトスピン調製

AGS 細胞を PFT(5.0mg/ml)の共存下で 30 分間培養し、上澄の付着しない細胞を集め、集細胞遠心分離し、ギムザ染色した。 図 2 A-D ギムザ倍率：1000 倍

A~C：アポトーシス化した細胞の調製は、多数の小さな空胞を示す。

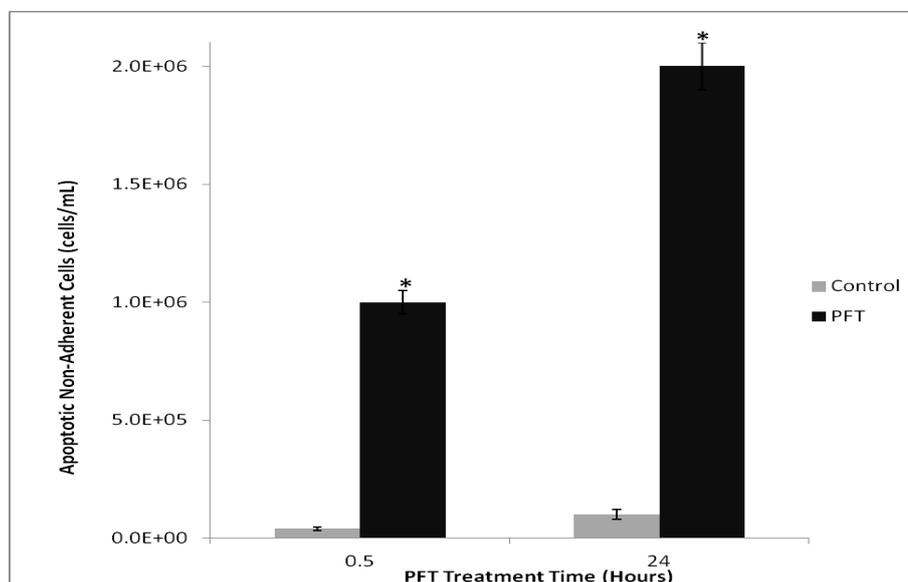
A, B：癌細胞はクロマチン(染色質)の凝集を起こし、

C：膜が水泡化し、 D：Trypan blue で染色した死んだ癌細胞の調製。

PFT が死んだ癌細胞の中で濃い青色に染まっていることに注目。

ii - Trypan blue 染色によるアポトーシス化した細胞の率

付着しない AGS 細胞を含む上澄は Trypan blue 染色した。細胞は PFT で処理した後 30 分後と 24 時間後にヘモサイトメーター(血球計算盤)を使って計数した。30 分後に付着しない細胞のアポトーシスレベルの有意な増加に注目した。アポトーシス化した癌細胞の率は 30 分後に較べて 24 時間後には 2 倍の増加を示した(図 3)。



【図 3】 5.0mg/ml の PFT と共に培養した後の付着しない AGS 細胞のアポトーシス化した癌細胞を、PFT の不在下(灰色)又は存在下(黒色)で培養し、付着しないアポトーシス化した癌細胞の数を 30 分後と 24 時間後にヘマトサイトメーターを使って計数した。
データは 3 例の平均値±SD(標準偏差)を表す。*P<0.001 (対照の未処理の細胞との比較)

B. 単層で付着しアポトーシス化した AGS 細胞

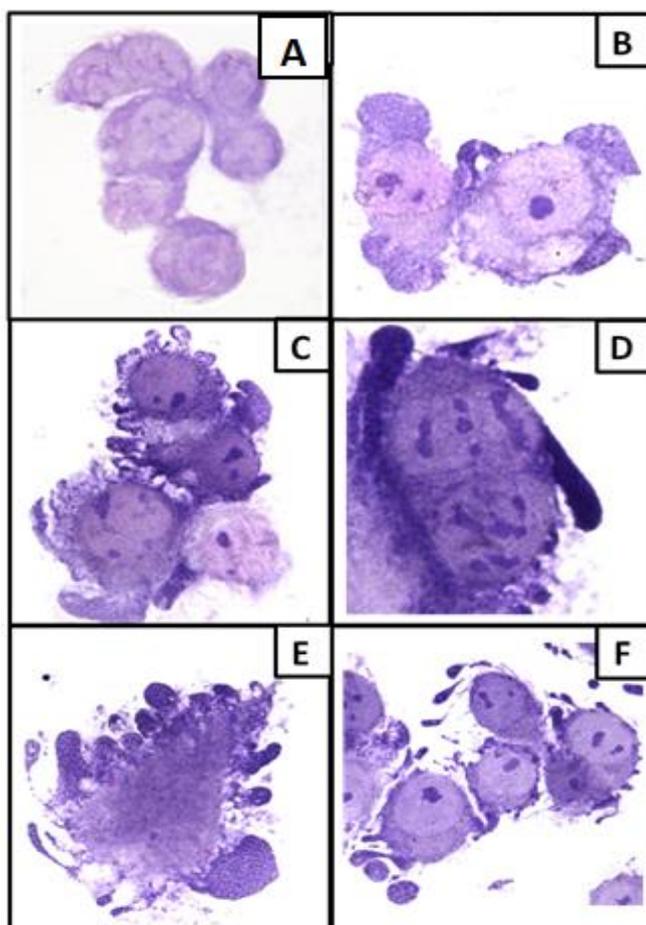
i-形態学的特徴

我々は、PFT(5.0mg/ml)共存下で 24 時間培養した後のカバーガラス上に増殖した単層 AGS 細胞のギムザ染色した中にアポトーシス化した AGS 癌細胞を確認することができた。

PFT は、細胞の膨張、膜の水泡化、クロマチン(染色質)の凝縮を含む一般的なアポトーシスの形態学的な特徴を惹起する。図 4 A は、アポトーシスしていない付着した AGS 細胞を示す。クロマチンの凝縮が無く、膜の水泡化もない。アポトーシスを受ける癌細胞はクロマチンの凝縮に始まり、その際に萎縮して半分の大きさになる(図 4 B)。その後膜が水泡化し(図 4 C)、核が破碎する(図 4 D)。

そしてついに核の破片が膜小胞に包まれる(図 4 E)。続いてこれ等の小胞は細胞から離れる。

注意すべきは、球状の卵型した小胞はアポトーシスした細胞から完全に離れ自律する点である(図 4 F)。

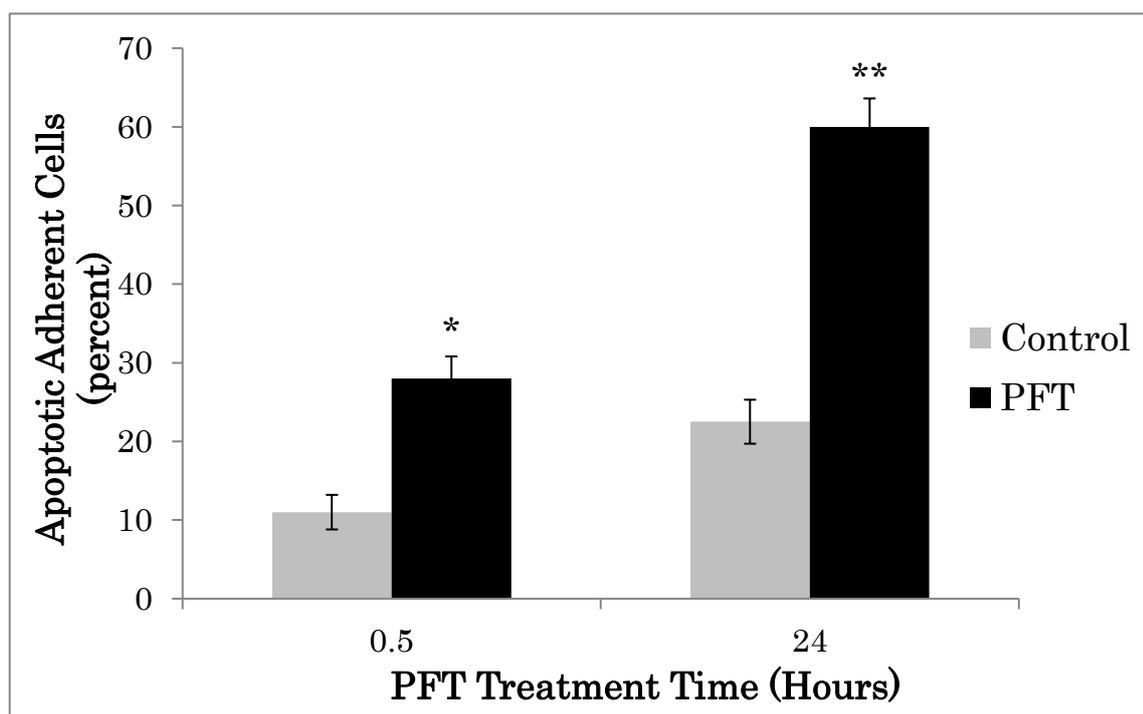


【図 4】 PFT 処理後にアポトーシスの兆候を示す付着した AGS 癌細胞のサイトスピン調製
カバーガラス上に増殖した単層の AGS 細胞は PFT(5.0mg/ml)と共に 24 時間培養され、
ギムザで染色された。調製を以下に示す。 図 4 A-F ギムザ倍率：1000 倍
(A)アポトーシスしていない細胞 (B~F)アポトーシス化した付着細胞
(B)クロマチン(染色質)凝縮

- (C)膜の水泡化
- (D)核の破碎と移動
- (E)核の破片が膜小胞に包まれる
- (F)続いて小胞が細胞から離れる

ii-単層アポトーシス化細胞の率

形態的なアポトーシスの特徴を持った付着 AGS 細胞の率に関する PFT の効果は、30 分後と 24 時間後に調べた。図 5 は、有意なアポトーシス率が 30 分後に早くも検出されたことを示す(対照の 8%に較べて 27%、 $p<0.01$)。アポトーシス効果は 24 時間後には更に増加した(対照の 17%に較べて 65%、 $p<0.001$)。PFT 処理後のアポトーシス化した癌細胞の率は、24 時間後には 30 分後の率の 2.4 倍以上となった。



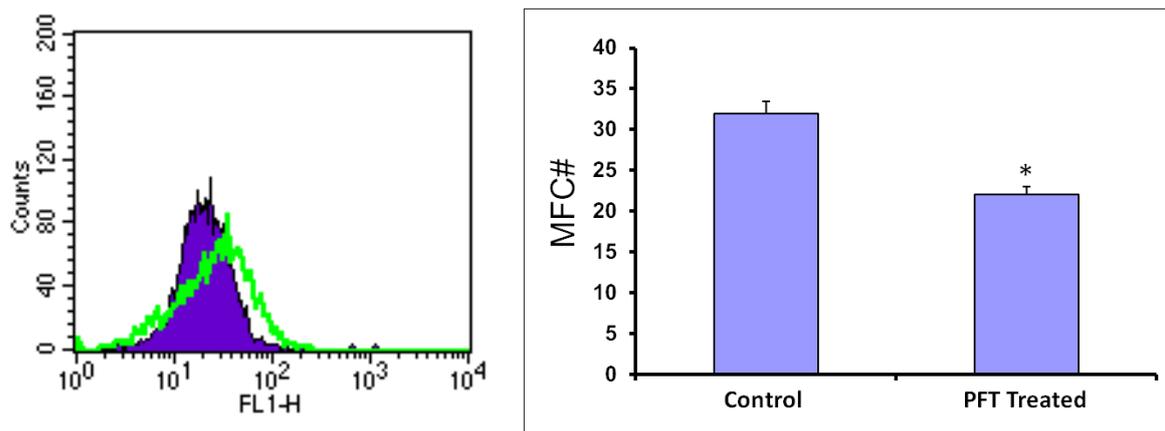
【図 5】異なる時間幅における付着した AGS 細胞のアポトーシス化率
癌細胞を、PFT の不在下(灰色)または存在下(黒色)で培養した。付着しアポトーシス化した癌細胞の率を、サイトスピン調製により 30 分後と 24 時間後に調べた。
データは、3 例の平均値±SD(標準偏差)を表す。* $P<0.01$, ** $P<0.001$ (対照の非処理細胞と較べて)

PFT の効果の根底にあるメカニズム

A. Bcl-2 の発現

PFT(2.5mg/ml)の共存下で 3 日間培養した後の AGS 細胞の Bcl-2 発現を調べた。フローサイトメトリーによる研究では、無処理の癌細胞に較べて PFT で処理した結果、AGS 細胞における有意な Bcl-2 の発現の抑制($P=0.004$)が見られた。図 6 (A)に代表的な流れのヒストグラム⁽⁴⁾と、(B)に棒グラフで 3 回の実験の平均値±SD(標準偏差)を示す。

(4)ヒストグラム……個々の細胞の測定パラメーターをチャンネル値に従ってチャンネル軸上にプロットしていくと得られる細胞数頻度分布のグラフ。



【図 6】 Bcl-2 発現に対する PFT の効果

AGS 細胞(1×10^5)を 2.5mg/ml の濃度の PFT と共に 3 日間培養した後、FITC でラベルした抗 Bcl-2 又は基準対照で染色し、洗浄後、FACS Calibur で解析した。

Bcl-2 を発現している細胞の率及び平均の蛍光強度を調べた。

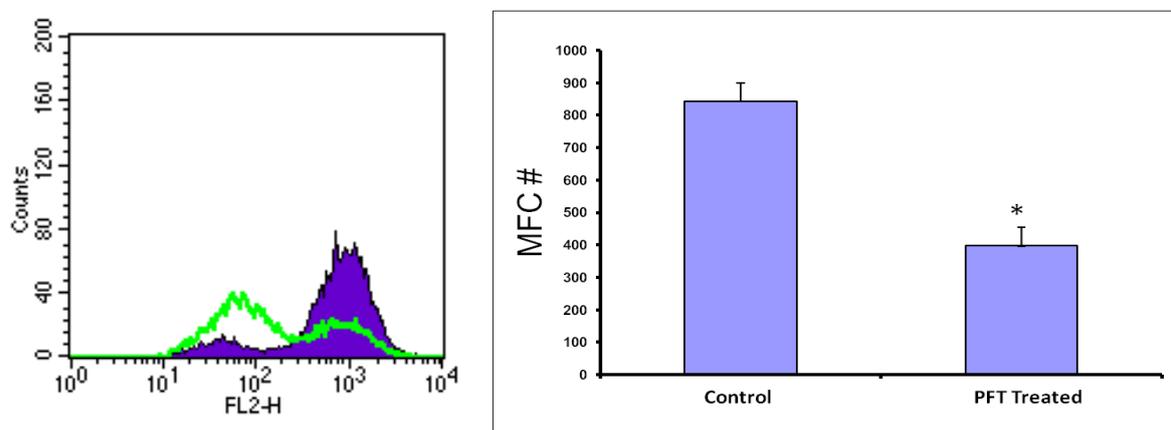
(*P=0.004 緑色：対照 紫色：PFT 処理)

B. ミトコンドリア膜電位(MMP)

AGS 細胞の MMP に対する PFT(2.5mg/ml)の効果フローサイトメトリーにより調べた。

図 7 のデータは AGS 癌細胞に 3 日間 PFT を共存させる処理の結果、対照の無処理の細胞と較べてミトコンドリアの分極に有意な減少が起きた(P=0.007)ことを示している。

図 7(A)は代表的なフローヒストグラムを示しており、(B) は棒グラフで 3 回の実験の平均値±SD(標準偏差)を示す。



【図 7】 ミトコンドリア膜電位に対する PFT の効果

AGS 癌細胞(1×10^5)を 2.5mg/ml の濃度の PFT と共に 3 日間培養し、FACS Calibur により MMP を検出した。蛍光強度の増加により、脱分極が示された。

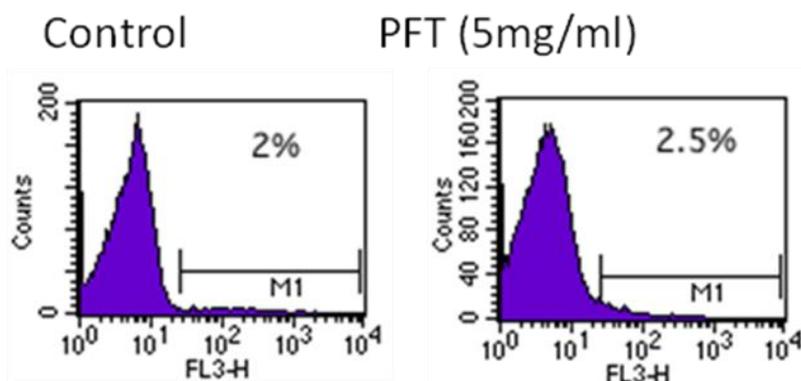
(*P=0.007 紫色：対照 緑色：PFT 処理)

ヒトの末梢血単核細胞(PBMC)に対する PFT の影響

ヒトの末梢血単核細胞(PBMC)に対する PFT 処理の影響について、アポトーシス化細胞の率の変化に関して調べた。ヒトの末梢血単核細胞(PBMC)を PFT(5.0mg/ml)の共存下で 3 日間培養し、アポトー

シス化した細胞の率をフローサイトメトリーで調べた。

図 8 は、PBMC を PFT で処理してもアポトーシス化した PBMC の率は対照の未処理の細胞と比べて有意な変化を起こさなかったことを示している。



【図 8】ヒトの末梢血単核細胞(PBMC)のアポトーシスに対する PFT の影響

PBMC(1×10^6 細胞/ml)を PFT(5.0mg/ml)の不在下または存在下で 3 日間培養した。

アポトーシス化した細胞を FACS Calibur フローサイトメーターを使って、7AAD 染色技法により測定した。

討議

乳酸菌(LAB)は、数千年も前から乳製品中に存在することが知られており、腐敗細菌の増殖を阻止することに関連してきた。更に最近、科学者たちはこれら乳酸菌の抗癌剤としての付加的な可能性を明らかにしてきた。いくつかの報告によれば、発酵乳製品及び又は発酵菌それ自体が、癌に対して従来からの治療薬の毒性の副作用無しに化学予防効果を持つ可能性を示唆している。

この研究で我々は、新規のケフィア製品で、その中の主成分が *Lactobacillus kefir* P-IF であるプロバイオティクス発酵技術(PFT)を使用した。P-IF は多くの際立った特徴を有しており、独特の糖鎖をその表面に有し、他の *L. kefir* 菌は長手方向に増殖するのに対し、三次元方向に増殖するのを可能にしている。更にガラクトースを炭素源として資化することができ、その培養液を振動し時に炭酸ガスを発生する[19]。これ等の特徴は抗癌剤としての P-IF の効果に貢献しているかもしれない。我々の最近の研究では PFT が(MDR)骨髄性白血病細胞(HL60/AR)に対しアポトーシスを誘導することを示した[16]。これ等の結果は、他のタイプの癌細胞に対する PFT のアポトーシス効果を調べることを我々に促し、その結果は PFT がヒトの胃癌細胞(AGS)に対し、有意なアポトーシス効果を発揮することを示した。乳酸菌は、アポトーシスを含むメカニズムによって癌細胞の死を誘導することができる。

広範囲に述べられた文献によれば、アポトーシスには二つの主な回路がある。外因性と内因性である。前者は死の受容体とカスパーゼ 8 の活性化が介在し、後者はミトコンドリアとカスパーゼ 9 を含む[20]。Bcl-2 ファミリーの蛋白質は、ミトコンドリア回路と MMP の維持に重要な役割を演じていることが示されている。本研究では、PFT で処理することにより、AGS 癌細胞の Bcl-2 レベルに有意な低下調節を引き起こした。更に我々は AGS 細胞のミトコンドリア分極の減少を発見した。このことは、カスパーゼの活性化を引き起こし結局はアポトーシスに誘導する予備アポトーシス的な分子の放出の結果なのかもしれない[21,22]。同様の効果は PFT 処理後の HL60/AR 細胞についても注目されている[23,16]。5-フルオロウラシル(5-FU)、シスプラチン、ドキソルビシンなどの化学療剤は、しばしば胃癌の治療に使われる。これ等の薬は胃癌細胞のアポトーシスを開始させることを目的としている [6,7]。

PFT のアポトーシス効果は、投与量依存的及び時間依存的であった。フローサイトメトリーによる研究では、PFT はアポトーシスの誘導を 0.3mg/ml の濃度で検出し、5.0mg/ml で 66% のピークを示した。ギムザ染色したサイトスピン調製による形態学的な検査を通じた更なる研究で、AGS 細胞に対する PFT のアポトーシス効果が確かめられた。即ちアポトーシス化した細胞の特徴である細胞の膨張、膜の水疱化、クロマチン(染色質)の凝縮がはっきりと認められた。PFT によるアポトーシスの誘導は、処理後 30 分で検出され、アポトーシス化細胞率は 24 時間後に 2 倍に増加した。

乳酸菌(*L. Lac* CF)に誘導された DNA 断片及びクロマチンの凝縮は他のヒト胃腺癌細胞 SNU-1 についても報告されている[24]。

様々なタイプのプロバイオティクスによる胃癌細胞に対するアポトーシス誘導の主なルートは、ミトコンドリア回路と見られる。例えば、プロピオン酸菌(*Propionibacterium freudenreichii*)による発酵乳の効果[25]、及び *L. paracasei* IMPC2.1 及び *L. rhamnosus* GG(L.GG) [26]など。

同様に、ミトコンドリア回路を経由したアポトーシスの誘導は、プロバイオティクスで処理された結腸癌細胞でも注目され、プロピオン酸細菌[27,28]、*Lactobacillus rhamnosus*、*Bifidobacterium latiss* [29]、*Lactobacillus delbrueckii*[30]などの例がある。

更に、乳酸菌は同様に骨髄性白血病のミトコンドリア回路のアポトーシスも誘導する。

例えば、ヒト多剤耐性骨髄性白血病(HL60/AR)に対する PFT のアポトーシスを誘導[16]、ヒトの慢性骨髄性白血病由来細胞に対する *Lactobacillus reuteri* [14]、*Lactobacillus casei rhamnosus* [13]など。

いくつかの研究で、PFT は毒性のない薬剤であることが示されている。

本研究で我々は、PFT(5.0mg/ml)で 3 日間処理したヒトの末梢血単核細胞(PBMC)のアポトーシス化率に有意な変化が起きなかったことに注目している。加えて、動物実験で PFT を投与したマウスに体重の変化が無く、様々な器官における顕微鏡的な又は組織病理学的な異常は見られなかった[31]。

これ等の結果は、PFT が胃癌の治療に安全で、毒性が無く、有力な治療薬として効くかもしれないことを示唆している。

謝辞

著者は、パイトス株式会社(日本国、神奈川県、横浜市)に対し、認可番号 T0099108 について感謝する。我々はまた同僚に感謝し、我々の協力者である S. Gollapudi 博士(カリフォルニア大学アーヴィン校)の厳密な洞察と本研究に対する指導に感謝する。我々はまた我々の協力者である D. Pan 氏にも感謝する。氏は、部分的に NIH-NIMHD 承諾 U54MD007598(以前は U54RR026138)及び NIH/NIMHD 承諾 S21MD000103(CDU Life Sciences Institute)により支援してくれた。部分的支援はまた AXIS 5U54MD007598-06 によっても提供された。

最終的に、我々は図や筆写の作成を助けてくれた Ben Winjum 博士の援助に大いに感謝する。

参考文献

1- Chapter 1.1". World Cancer Report 2014. World Health Organization. 2014. ISBN 9283204298.

- 2- "Stomach (Gastric) Cancer". NCI. Retrieved 1 July 2014.
- 3- SEER Stat Fact Sheets: Stomach Cancer". NCI. Retrieved 18 June 2014.
- 4- World Cancer Report 2014. World Health Organization. 2014. pp. Chapter 5.4. ISBN 9283204298.
- 5- Gastric Cancer Treatment (PDQ®)". NCI. 2014-04-17. Retrieved 1 July 2014
- 6- Sugamura K, Makino M, Shirai H, Kimura O, Maeta M, Itoh H, Kaibara N. Enhanced induction of apoptosis of human gastric carcinoma cells after preoperative treatment with 5-fluorouracil. *Cancer*. 79:12-7, 1997.
- 7- Matsushashi N, Saio M, Matsuo A, Sugiyama Y, Saji S. The evaluation of gastric cancer sensitivity to 5-FU/CDDP in terms of induction of apoptosis: time- and p53 expression-dependency of anti-cancer drugs. *Oncol Rep*. 14:609-15, 2005.
- 8- Singh, J., Rivenson, A., Tomita, M., Shimamura, S., Ishibashi, N. and Reddy, B. S. *Bifidobacterium longum*, a lactic acid-producing intestinal bacterium inhibits colon cancer and modulates the intermediate biomarkers of colon carcinogenesis. *Carcinogenesis* 18:833-41, 1997.
- 9- Reddy, B. S. and Rivenson, A. Inhibitory effect of *Bifidobacterium longum* on colon, mammary, and liver carcinogenesis induced by 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline, a food mutagen. *Cancer Res*. 53: 3914-18, 1993.
- 10- Fukui M, Fujino T, Tsutsui K, Maruyama T, Yoshimura H, Shinohara T, Fukui M, Nada O. The tumor-preventing effect of a mixture of several lactic acid bacteria on 1,2-dimethylhydrazine-induced colon carcinogenesis in mice. *Oncol Rep*. 8:1073-8, 2001.

- 11- Abd El-Gawad, I. A., El-Sayed, E. M., Hafez, S. A., El-Zeini, H. M. and Saleh, F. A. Inhibitory effect of yoghurt and soya yoghurt containing bifidobacteria on the proliferation of Ehrlich ascites tumour cells in vitro and in vivo in a mouse tumour model. *Br. J. Nutr.* 92: 81-6, 2004.
- 12- Kim, J. Y., Woo, H. J., Kim, Y. S., Kim, K. H. and Lee, H. J. Cell cycle dysregulation induced by cytoplasm of *Lactococcus lactis* ssp *lactis* in SNUC2A, a colon cancer cell line. *Nutr. Cancer* 46: 197-201, 2003.
- 13- Chiu YH, Hsieh YJ, Liao KW and Peng KC: Preferential promotion of apoptosis of monocytes by *Lactobacillus casei rhamnosus* soluble factors. *Clin Nutr* 29: 131-40, 2010.
- 14- Iyer C, Kusters A, Sethi G, Kunnumakkara AB, Aggarwal BB and Versalovic J: Probiotic *Lactobacillus reuteri* promotes TNF-induced apoptosis in human myeloid leukemia-derived cells by modulation of NF-kappaB and MAPK signalling. *Cell Microbiol* 10: 1442-52, 2008.
- 15- McIntosh GH, Le Leu RK. The influence of dietary proteins on colon cancer risk. *Nutr Res.* 21:1053-66, 2001.
- 16- Ghoneum M, Gimzewski J. Apoptotic effect of a novel kefir product, PFT, on multidrug-resistant myeloid leukemia cells via a hole-piercing mechanism. *Int J Oncol.* 44:830-7(2014).
- 17- Ghoneum M, Gollapudi S. Induction of apoptosis in breast cancer cells by *Saccharomyces cerevisiae*, the baker's yeast, in vitro. *Anticancer Res.* 24:1455-63, 2004.
- 18- Ghoneum M, Gollapudi S. Modified arabinoxylan rice bran (MGN-3/Biobran) enhances yeast-induced apoptosis in human breast cancer cells in vitro. *Anticancer Res.* 25:859-70, 2005.

- 19- Suzuki K, Tani H, Yabumoto T, Yabumoto Y and Yoshida Y: Novel fermented milk product and use thereof. US Patent No. US 20110123640 A1. May (2011).
- 20- Elmore S. Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 35: 495–516, 2007.
- 21- Green DR. Apoptotic pathways: ten minutes to dead. *Cell*. 121: 671- 674 2005.
- 22- Finkel E. The mitochondrion: is it central to apoptosis? *Science*. 292: 624-626 2001.
- 23- Ghoneum M, Henary M, Seto Y. Apoptosis of Human Multidrug-Resistant Myeloid Leukemia (HL60/AR) Cells by Thymax Plus *Lactobacillus Kefiri* P-IF. *J Blood Disord*. 1(4):3 2014.
- 24- Kim SY, Lee KW, Kim JY, Lee HJ. Cytoplasmic fraction of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* induces apoptosis in SNU-1 stomach adenocarcinoma cells. *Biofactors*. 22:119-22, 2004.
- 25- Cousin FJ, Jouan-Lanhouet S, Dimanche-Boitrel MT, Corcos L, Jan G. Milk fermented by *Propionibacterium freudenreichii* induces apoptosis of HGT-1 human gastric cancer cells. *PLoS One*. 7(3):e31892, 2012.
- 26- Orlando A, Refolo MG, Messa C, Amati L, Lavermicocca P, Guerra V, Russo F. Antiproliferative and proapoptotic effects of viable or heat-killed *Lactobacillus paracasei* IMPC2.1 and *Lactobacillus rhamnosus* GG in HGC-27 gastric and DLD-1 colon cell lines. *Nutr Cancer*. 64:1103-11, 2012.
- 27- Jan G, Belzacq AS, Haouzi D, Rouault A, Metivier D, et al. Propionibacteria induce apoptosis of colorectal carcinoma cells via short-chain fatty acids acting on mitochondria. *Cell Death Differ* 9: 179–88, 2002.

28- Lan A, Lagadic-Gossmann D, Lemaire C, Brenner C, Jan G. Acidic extracellular pH shifts colorectal cancer cell death from apoptosis to necrosis upon exposure to propionate and acetate, major end-products of the human probiotic propionibacteria. *Apoptosis* 12: 573–91, 2007.

29- Altonsy MO, Andrews SC, Tuohy KM. Differential induction of apoptosis in human colonic carcinoma cells (Caco-2) by *Atopobium*, and commensal, probiotic and enteropathogenic bacteria: mediation by the mitochondrial pathway. *Int J Food Microbiol.* 28;137(2-3):190-203, 2010.

30- Wan Y, Xin Y, Zhang C, Wu D, Ding D, Tang L, Owusu L, Bai J, Li W. Fermentation supernatants of *Lactobacillus delbrueckii* inhibit growth of human colon cancer cells and induce apoptosis through a caspase 3-dependent pathway. *Oncol Lett.* 7:1738-42, 2014.

31- Paitos Co., Ltd. Yokohama, Kanagawa, Japan. Increase the good bacteria held by nature, ideal AH21 is a functional food, consider preventive medicine and food. <http://www.bio-j.net/ken00.html>. Accessed June 14, 2013.