

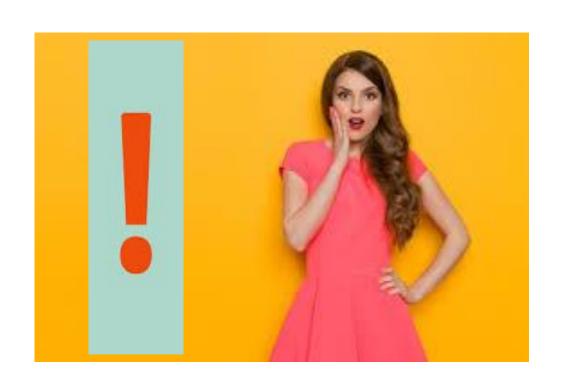
Mamdooh Ghoneum博士

米国カリフォルニア州ロスアンゼルス、 チャールズ・R・ドリュー医科理科大学外科部

がんこ



がん治療のために、効果的で 毒性のない新しい物質が必要 とされている。

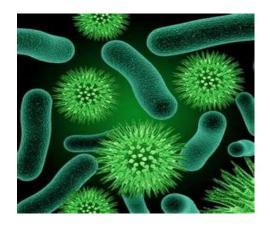


ケフィア製品: PFT

「プロバイオティクス 発酵技術 (Probiotics Fermentation Technology)」

プロバイオティクスとは?

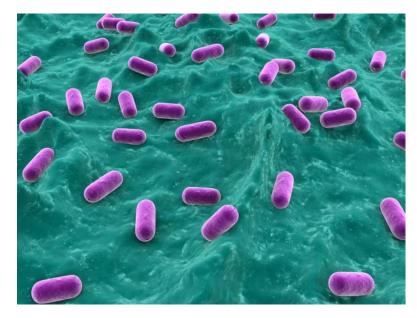
宿主に利益をもたらす微生物(細菌や真菌) は全て、プロバイオティクスと考えられる。



プロバイオティクスの例

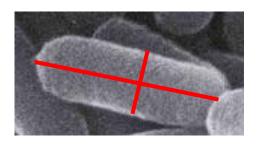
人の健康に役立つプロバイオティクスには数多くの種類がある。

我々の研究では、<u>乳酸菌</u>に着目する。



乳酸菌

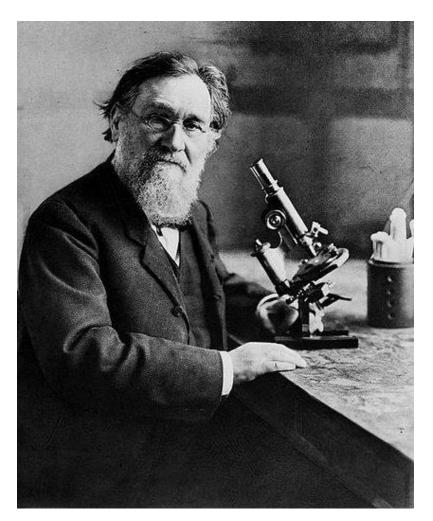
細胞のサイズ: 0.9 x 3.0 マイクロン (μm)



プロバイオティクスの歴史 Eli Metchinkoff

(1845 - 1916)

- •1908年にノーベル医学・生理学賞(免疫)を受賞したロシア人科学者
- •1世紀以上も前に、乳酸菌には延命効果があるかもしれないと、言っていた。



PFT(プロバイオティクス 発酵技術)とは?

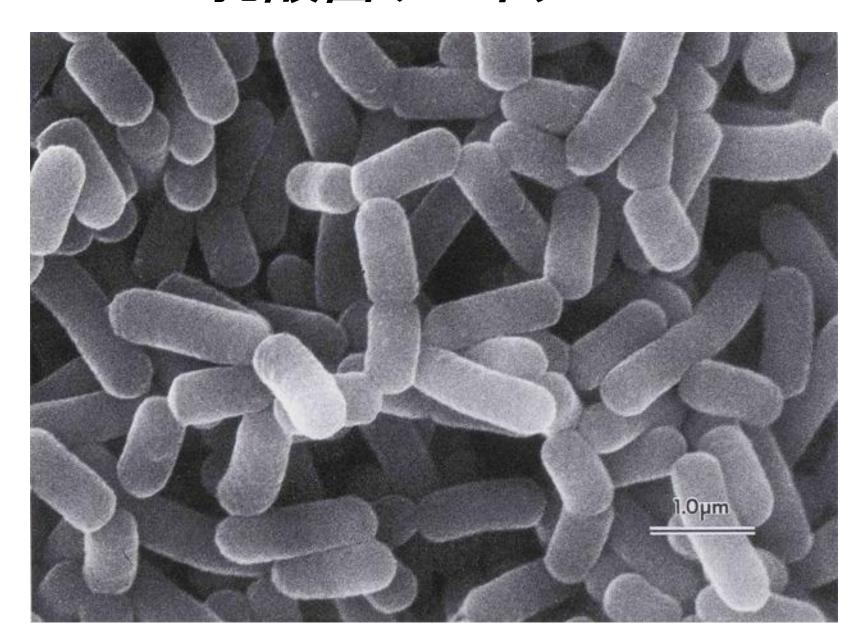


PFTの起源

ケフィアの起源は、ロシアとあるにあった。これでは、カフカス山がある。

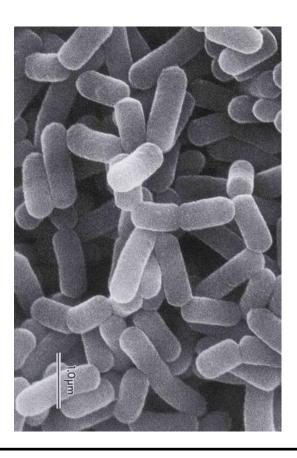


乳酸菌ケフィリP-IF



乳酸菌ケフィリP-IF

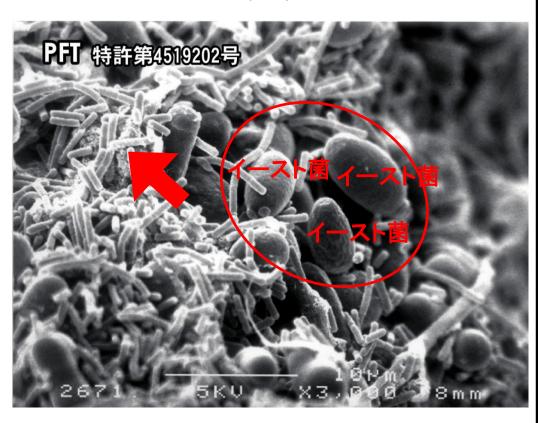
•乳酸菌ケフィリP-IF (90 %)



PFT

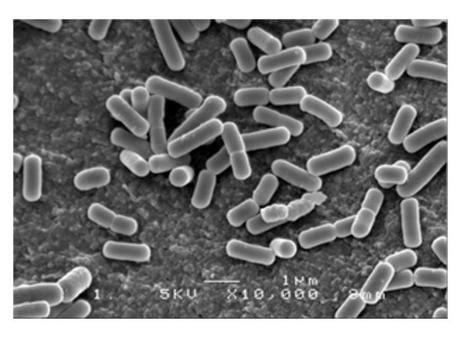
PFT* は以下の菌から成り立つプロバイオティクスである。

- 2種類の細菌:赤い矢印
- ・乳酸菌ケフィリP-IF (90%)(太い赤い矢印)
- ・乳酸菌ケフィリP-B1 (2-3%)
- 3 種類のイースト菌:
- ・カザツタニア ツリセンシス (2-3%)
- ・カザツタニア ユニスポラ(2-3%)
- ・クリュイベロミセス マルシアヌス (2-3%)



P-IF 独自の特性

- ・独自の細胞壁組成により、3次元に成長する。
 - •この特別な細胞壁が、プロバイオ ティクスとしての効果に貢献してい る可能性がある。
- ・低pHの中で成長し、酸を作り出す。
 - ・酸を作り出すことが、病原菌を殺すことに役立つ。
- ・ガラクトースをエネルギー源として用いる。
 - •P-IF はガラクトースの毒性レベル の抑制に役立つ。



乳酸菌ケフィリP-IF 株の電子顕微鏡イメージ (Ghoneum と Gimziewski、2014年)

PFTは抗がん作用を発揮するのか?

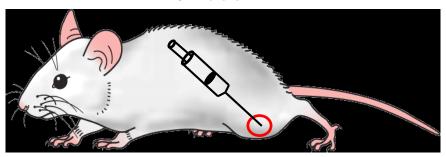


実験のデザイン

腫瘍の接種

エーリッヒ腹水がんは、乳がんから派生する未分化悪性腫瘍である。

メスのスイス白ネズミ



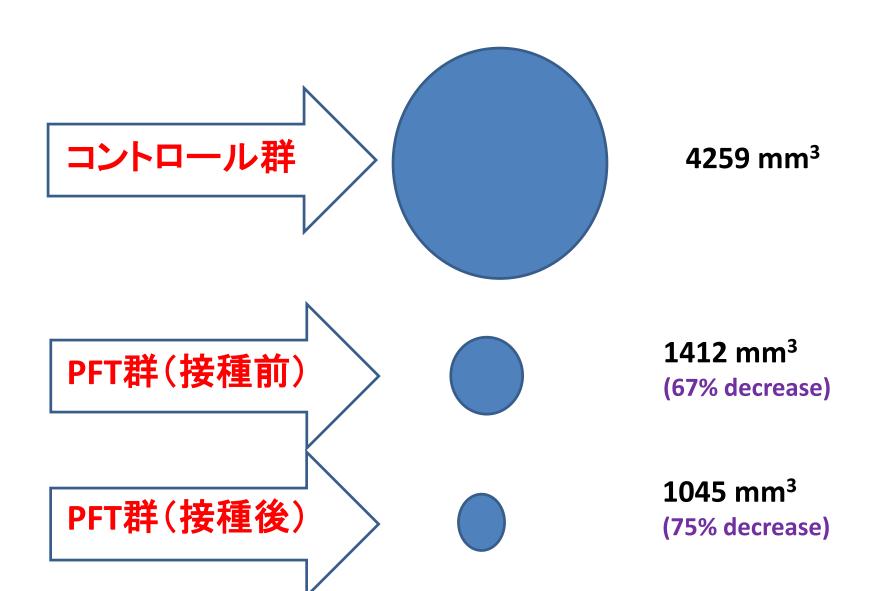


- 1. 0日目、ネズミ内に固形腫瘍を育てるため、ネズミの下肢右腿にエーリッヒ腹水がん細胞(**2.5 x 10**⁶ 細胞)を筋肉内投与で接種した。
- 2. 固形腫瘍((~300 mm³)を持つネズミに対し、がん細胞接種の2日前、または9日後に、乳酸菌ケフィアP-IF (2mg/kg/日)を経口で一週間に6日、投与した。

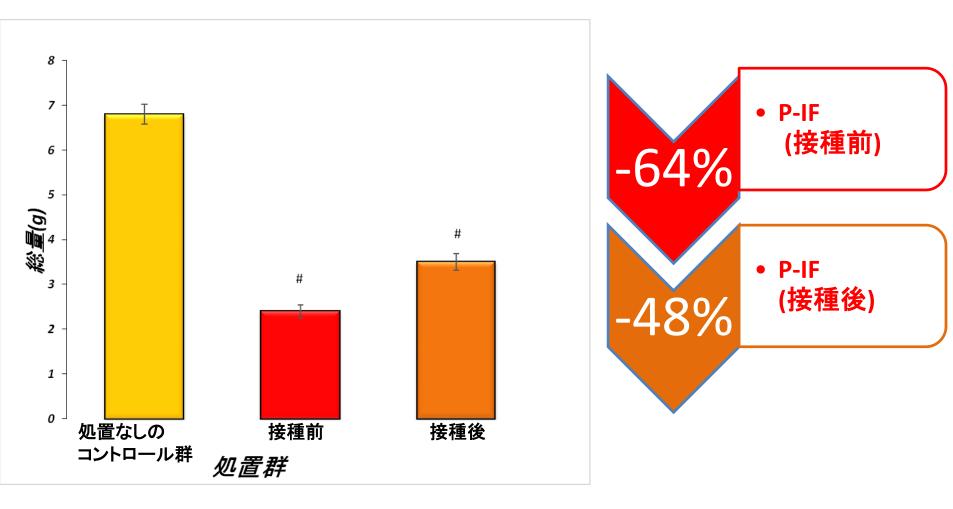


結果

腫瘍容積

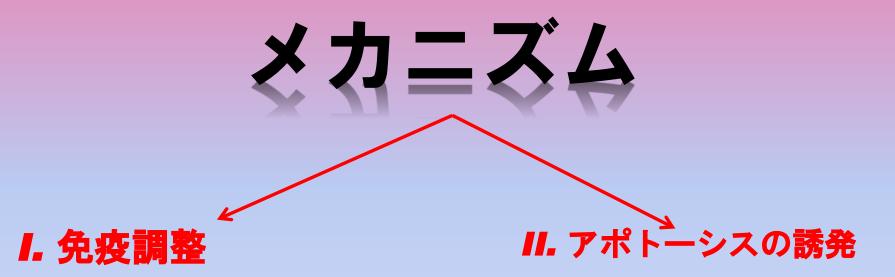


2. 腫瘍の重さ/g



各値は、平均±標準偏差を表している。 各群のネズミの数: 処置無しのコントロール群 (11), 接種前の処置(10), 接種後の処置! (16). # はコントロール群の総量に比べ、p<0.01 水準で、有意差があったことを示している。

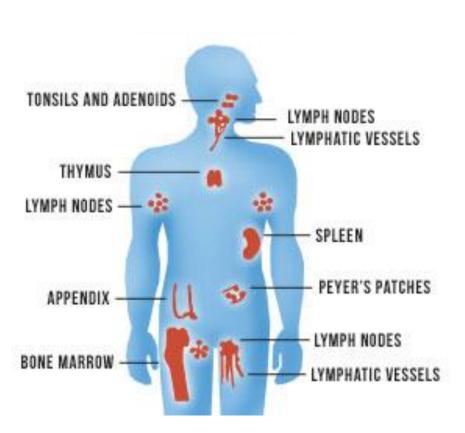
17



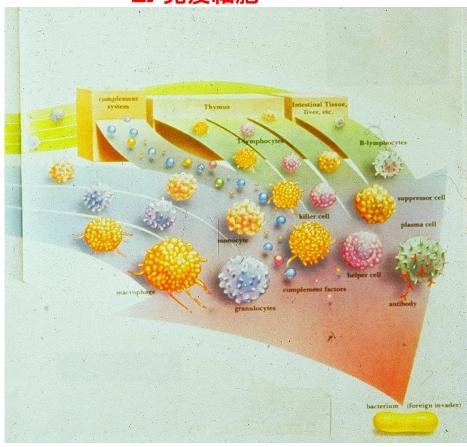
4,

免疫調整としてのPFT (免疫システムを活性化する)

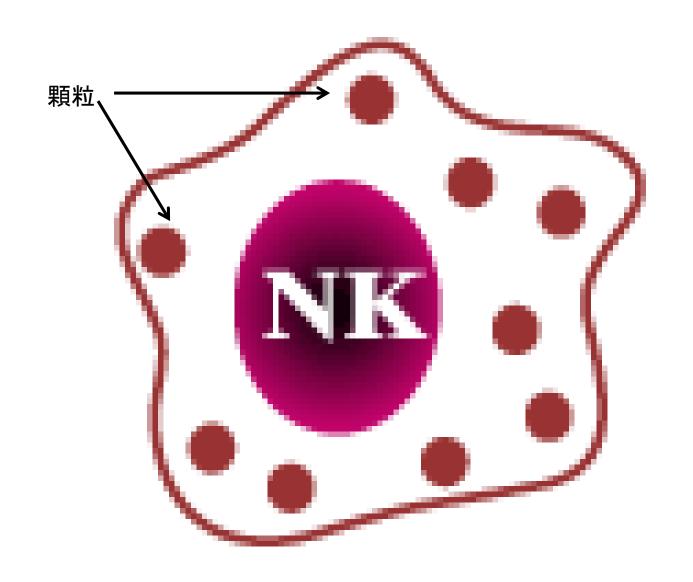
1. 免疫組織



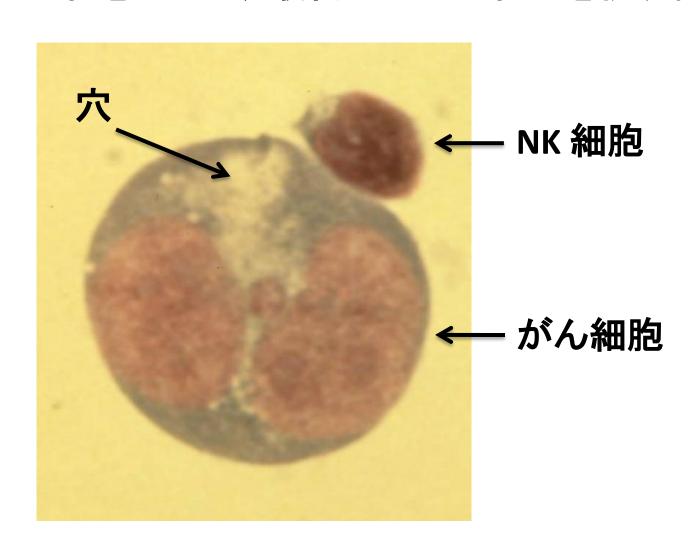
2. 免疫細胞



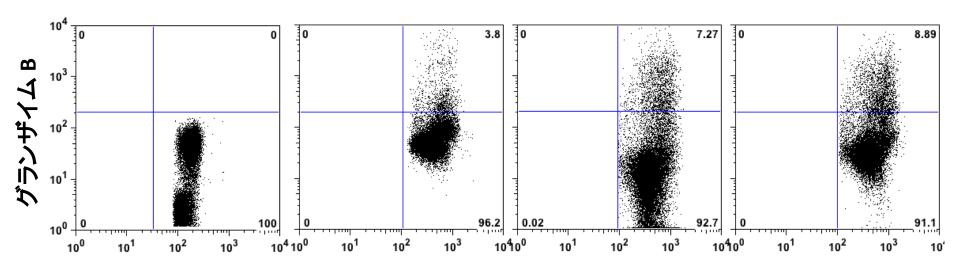
ナチュラルキラー(NK) 細胞



NK 細胞は、がん細胞と結びつき、穴開けを誘導する顆粒を注入し、最終的にがん細胞を殺す。



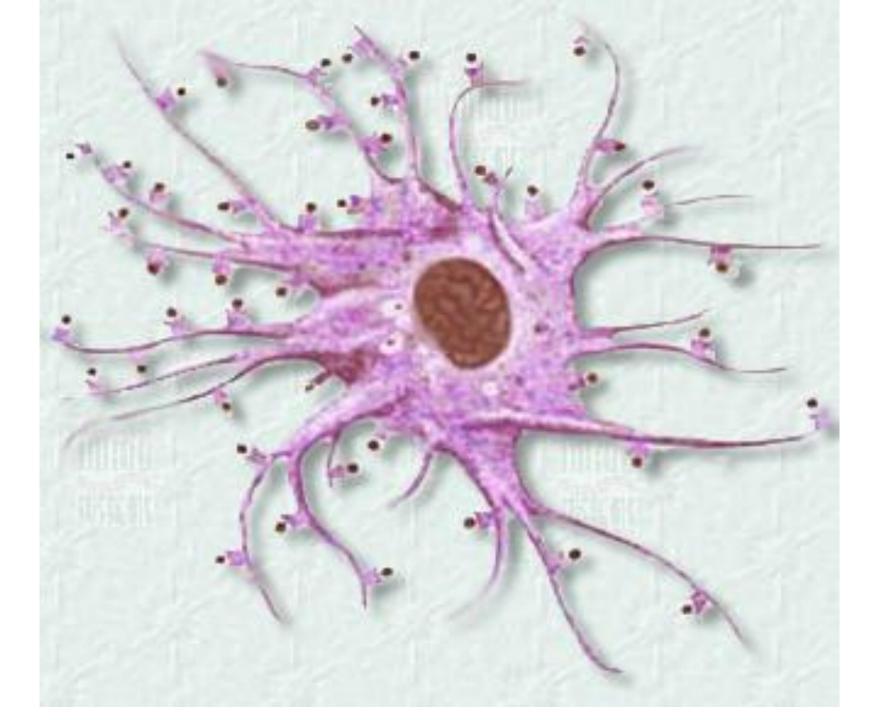
PFTはCD8陽性T細胞に グランザイムBを誘発する。



PFTが主にCD8陽性T細胞を活性化するため全樹状細胞を刺激した。樹状細胞はPFT(50と100 mg/ml)で24時間刺激を受け、その後、7日間、CD8陽性T細胞とともに培養した。CD8陽性T細胞は、グランザイムBで染色した。一つの代表的実験は3つの個々の実験を表している。

樹状細胞

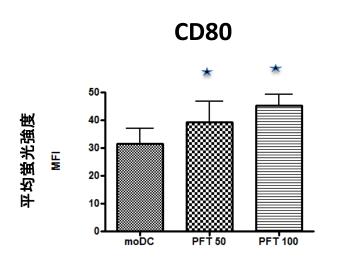
(最も効率的な抗原を示す細胞)

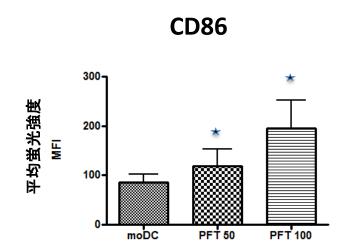


樹状細胞に対するPFTの効果:

- A. 樹状細胞の成熟を誘発する。
- B. サイトカインを作り出す。

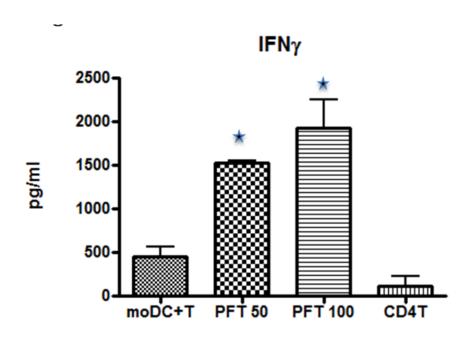
PFTは共刺激と成熟マーカーであるCD80、CD86、そして HLADR発現を増加させる。





単球由来樹状細胞を、24時間PFT (50 と100 μg/ml)で処置した。陰性コントロールとして、アイソタイプ抗体を用いた。細胞の表面のマーカーの出現は、フローサイトメトリーで決定した。A) 一つの代表的蛍光プレートリーダーは、四つの実験を表している。B) PFT処置ありと、なしの場合の樹状細胞における CD80、CD86 とHLA の平均 蛍光強度 (MFI)を示す。データは四つの実験の平均値+/- 標準偏差を表している(★は、樹状細胞のみの場合と比較した時のp<0.01 を表す。)

インターフェロンーγを分泌するために CD4陽性T細胞をPFTで刺激した。



PFTが樹状細胞主要制御タイプCD4陽性T細胞と分泌IFN-γ、IL-10とTNF-αに刺激を与えた。データは五つの個々の実験の平均値+/- 標準偏差を表している。

★は、樹状細胞一CD4陽性T細胞のみの場合と比較した時のp<0.05を表す。

SSAGE journals

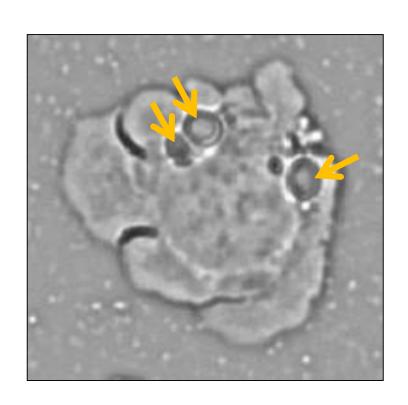
International Journal of Immunopathology and Pharmacology

Ghoneum M, Felo N, Agrawal S, Agrawal A.

A novel kefir product (PFT) activates dendritic cells to induce CD4+T and CD8+T cell responses in vitro. (新ケフィア製品(PFT)が体内でCD4陽性T細胞と CD8陽性T細胞を誘発するために樹状細胞を活性 化する)

Int J Immunopathol Pharmacol. (国際病理学実験 協会ジャーナル) 28:488-96 (2015)

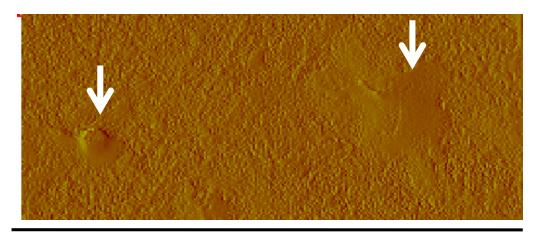
PFT は抗がん剤耐性がん細胞に穴を作り出す。



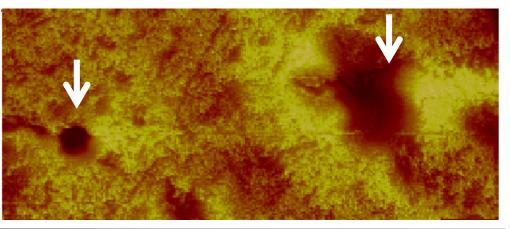
PFT は抗がん剤耐性がん細胞に穴を作り出す。 (ピーク時の力の画像)



画像はカリフォルニア大学ロスアンゼルス校の CNSI施設にて、原子間力顕微鏡を用いて撮影した。

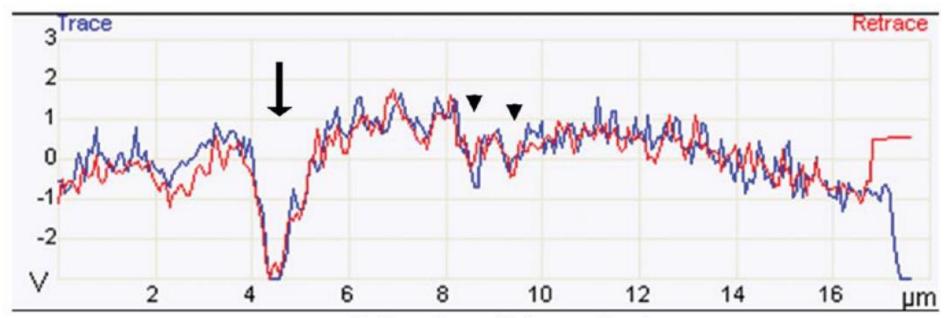


8.8um



8.8um

穴の特徴: 深さ(単位:μm)と数字



Cell surface distance (µm)

PFTによって引き起こされた穴の深さを計測した。赤と青の線はPFT 処置された抗がん剤耐性細胞の表面の輪郭を示している。矢印はSNL チップによって検知された大きな穴を示し、矢印の頭はより小さな穴を示している。この図は、PFT 処置中の多くの抗がん剤耐性細胞を代表するものである。



MAMDOOH GHONEUM & JAMES GIMZEWSKI

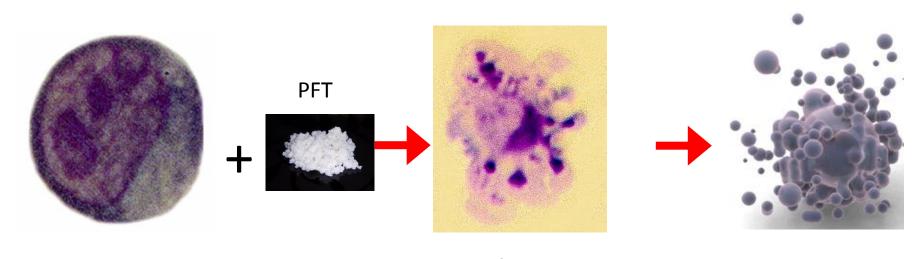
Apoptotic effect of a novel kefir product, PFT, on multidrugresistant myeloid leukemia cells via a hole-piercing mechanism. (新ケフィア製品であるPFTの穴あけによる多剤耐性骨髄性白血病細胞に対するアポトーシス効果。)

<u>Int J Oncol</u>. (国際腫瘍学ジャーナル) 2014 Mar; 44(3): 830–837

2,

アオポトーシス剤として のPFT (細胞死プログラム)

アポトーシス



生きたがん細胞

アポトーシス

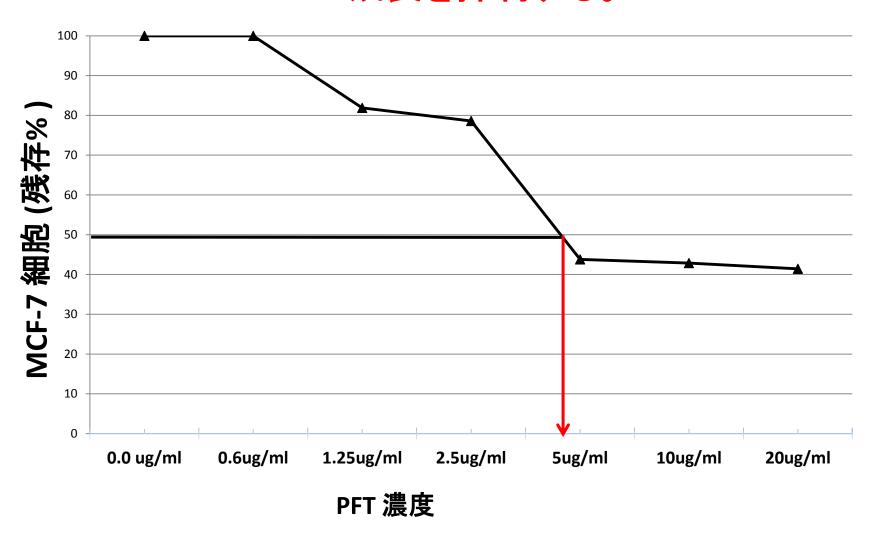
PFT は異なるがん細胞株を殺すことができる。

がん細胞株に含まれるのは;

- ヒト乳がん、
- ヒト前立腺がん、
- ヒト胃がん、
- ヒト肝臓がん、
- 多剤耐性がん細胞
- ネズミのエーリッヒ腹水がん細胞

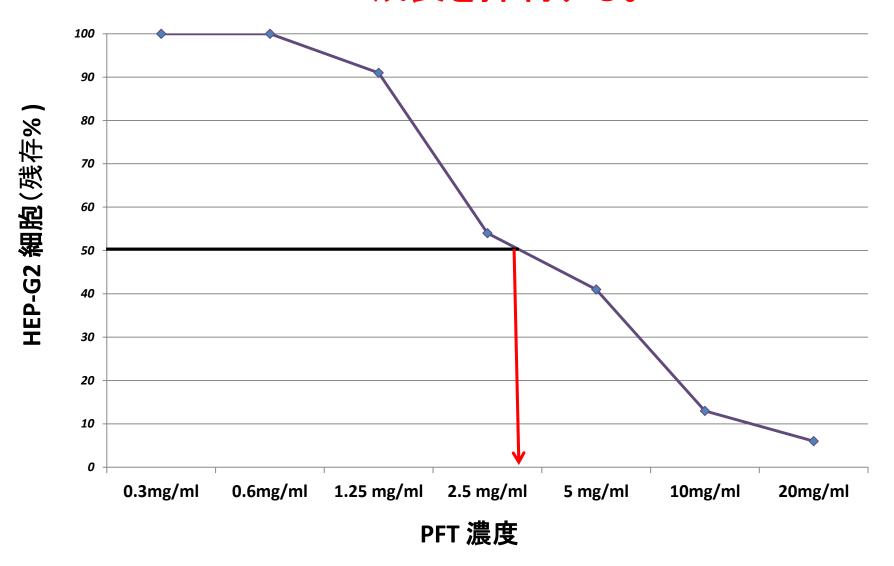


PFTはヒト乳がんMCF-7の成長を抑制する。



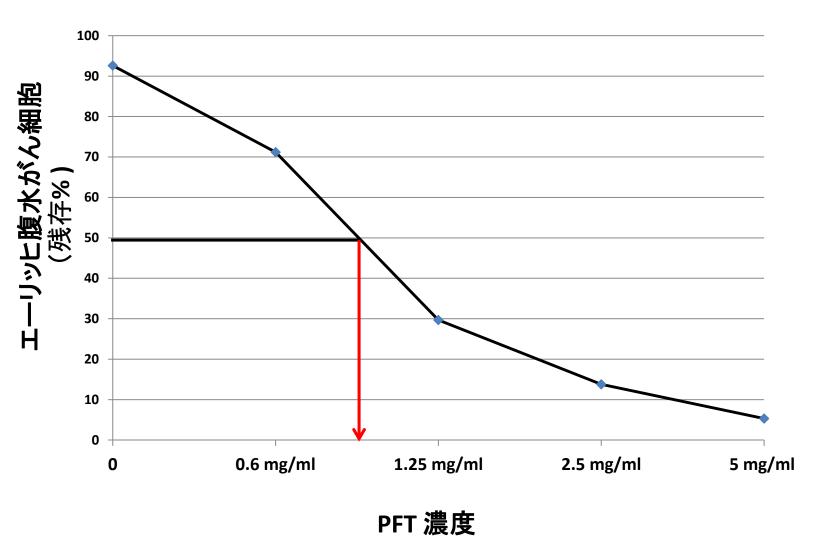
24時間、MTT アッセイ

PFTはヒト肝細胞がん(HEP-G2) の成長を抑制する。



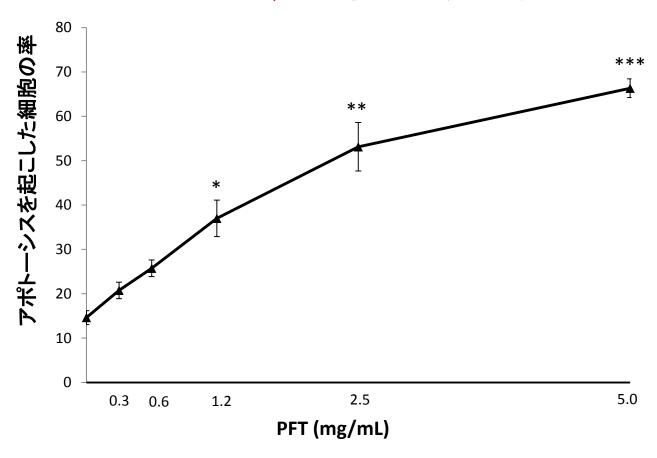
24時間、MTT アッセイ

PFT はエーリッヒ腹水がんの成長を抑制する。



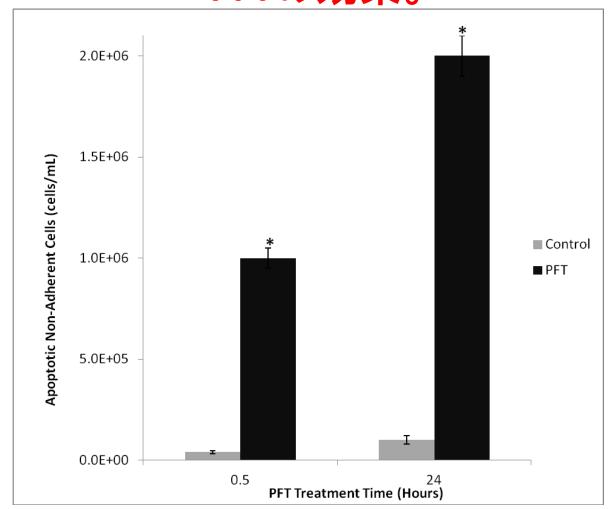
24時間、MTT アッセイ

PFT はヒト胃がん(AGS) の成長を抑制する。



フローサイトメトリーによるアポトーシスを起こしたがん細胞率対するPFTの効果。濃度0-5 mg/ml のPFTで3日間、ヒト胃がん(1x10⁵)を培養した。細胞死は7AAD染色を用いたフローサイトメトリーによって計測した。データは各濃度の4種の実験の平均+/- 標準偏差を表している。 *p<0.05, **p<0.001, ***p<0.0001。

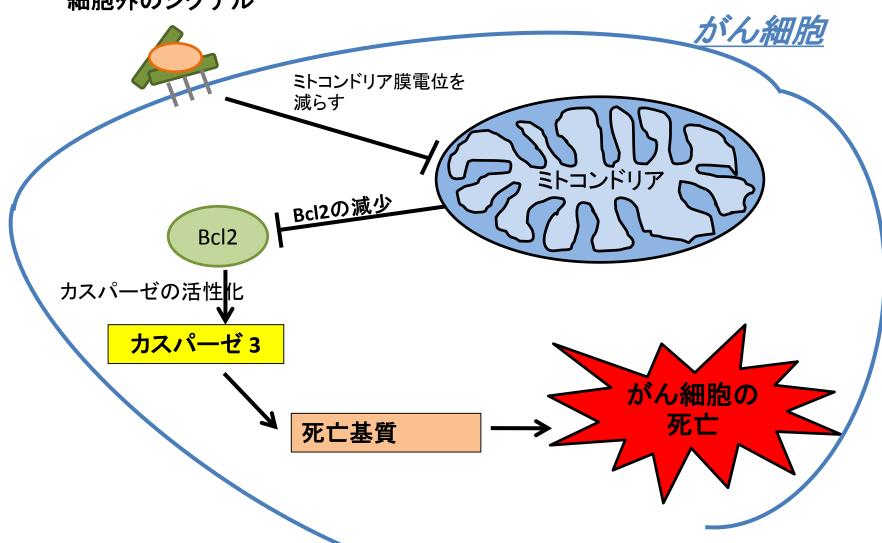
ヒト胃がんに対する、早ければ30分後の PFTの効果。



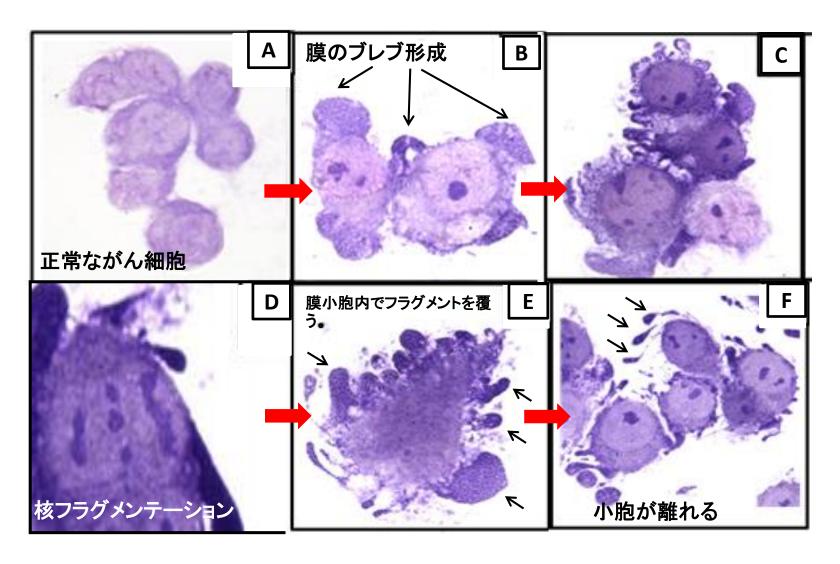
PFT処置(5.0 mg/ml)での培養後にアポトーシスを起こした非接着性の胃がん細胞数。PFT処置なし(グレー)とあり(黒)に分けて、腫瘍細胞を培養した。血球計を用い、0.5時間と24 hours時間後に非接着性のアポトーシスを起こした胃がん細胞数を決定した。データは各濃度の3種の実験の平均+/-標準偏差を表している。*p < 0.001はコントロール群の処置を受けていない細胞との比較。

II. アポトーシスの誘発 プログラム化された細胞死のメカニズム

細胞外のシグナル



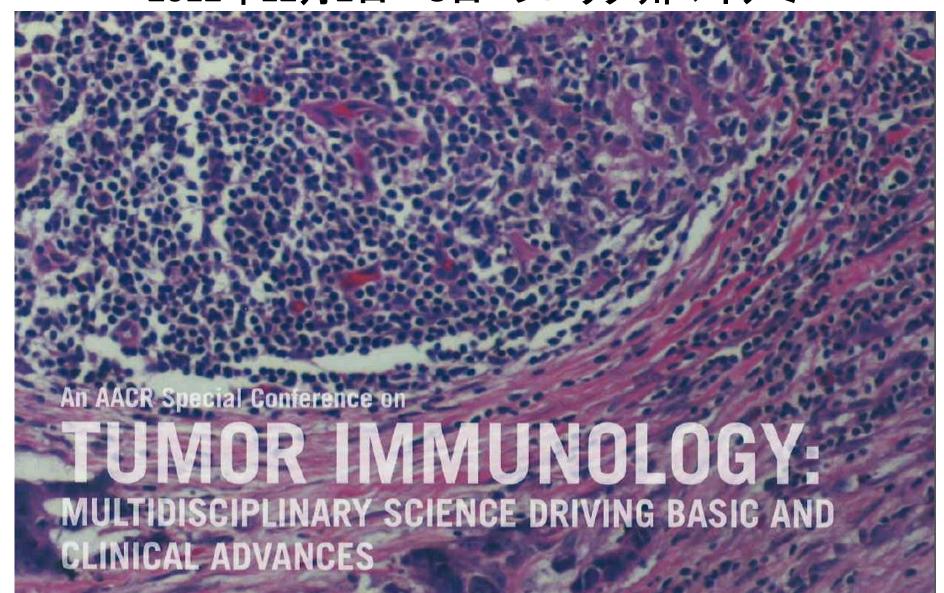
PFTにさらされた後、胃がん細胞がアポトーシスを起こす様子



接着性胃がん細胞をサイトスピン調整すると、PFT処置後にアポトーシスの兆候が見られる。カバーグラス上で育てられた単層胃がん細胞を24時間PFT(5.0 mg/ml)で培養し、ギムザで染色した。

米国がん学会

(American Association for Cancer Research、以下AACR) 2012年12月2日~5日 フロリダ州マイアミ

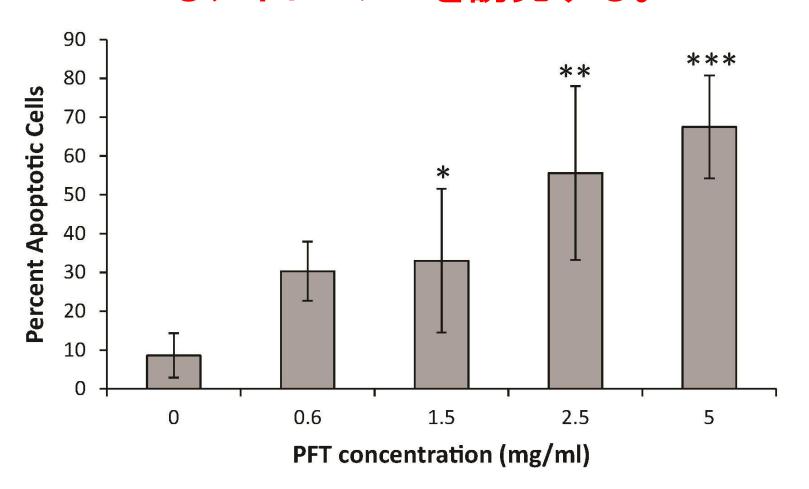


著者: Mamdooh Ghoneum と Nouran Felo

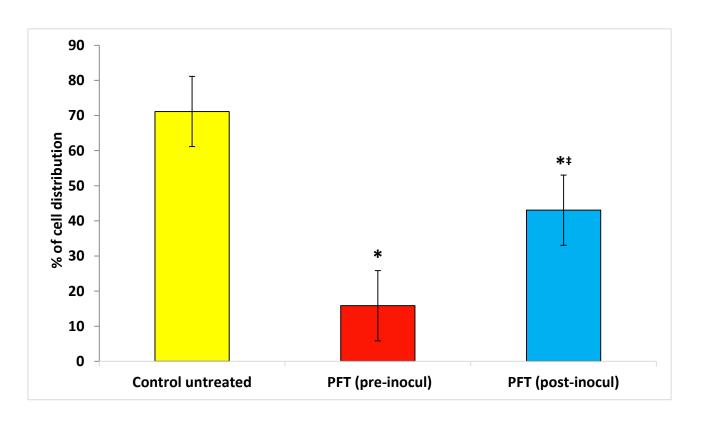
Selective induction of apoptosis in human gastric cancer cells by *Lactobacillus kefiri* (PFT), a novel kefir product (新ケフィア製品である乳酸菌ケフィリ(PFT)によるヒト胃がん細胞におけるアポトーシスの選択的誘発)

Oncol Rep.(腫瘍学レポート) 2015年10;34(4):1659-66

PFT はヒト骨髄性白血病細胞HL60/AR に対するアポトーシスを誘発する。



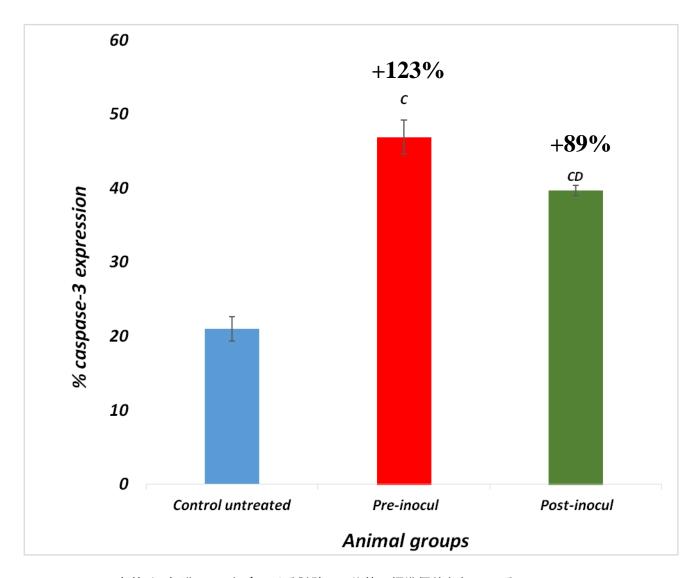
1- ミトコンドリア膜電位 (Mitochondrial Membrane Potential、以下MMP)



腫瘍組織内の、MMPに対するPFTの効果。各値は、各群6匹のネズミによる試験の平均値 土標準偏差を表している。

- *接種コントロール群と比較し、有意差があった (p ≤0.01)。
- ‡接種前PFT処置群と比較し、有意差があった(p ≤0.01)。

2- カスパーゼ3 タンパク質の発現



各値は、各群6匹のネズミによる試験の平均値±標準偏差を表している。

- C 処置無しコントロール群と比較し、有意差があった (p <0.01)。
- D 接種前PFT処置群と比較し、有意差があった (p<0.05)。

エーリッヒ腹水がん細胞に対する新ケフィア製品である乳酸菌ケフィリP-IFの化学予防的効果の可能性。



AACR

American Association

for Cancer Research







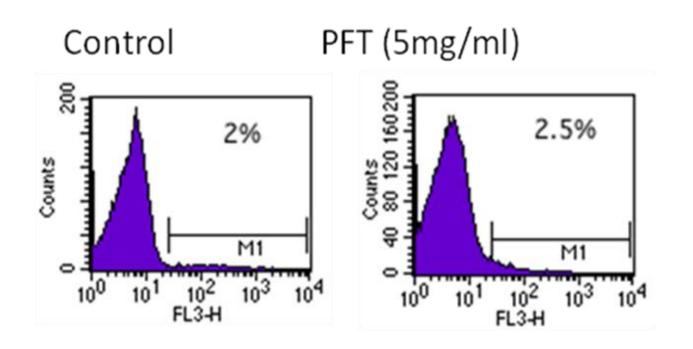
PFTが、がん細胞を殺すメカニズム



第3部: PFTは安全か。



PFTはヒトの末梢血単核球に対してはアポトーシスを誘発しない。



末梢血単核球のアポトーシスに対するPFTの効果。末梢血単核球(1x106 細胞/ml)をPFT処置無しと3日間のPFT処置ありに分けて、培養した。

PI 技術により、FACSカリバーフローサイトメーターを用い、アポトーシス細胞を決定した。

ネズミの研究においての毒性

PFT剤には毒性がないことが示された。

PFT処置を受けたネズミの結果から、処置後の 様々な組織の中に、顕微鏡上の異常や病理 組織学的な異常は見つからなかった。

🗎 AH21研究結果



▼マウスによる乳酸菌並行複合発酵産生物質の生体影響 および安全性に関する検討

Toshiyuki Hayakawa, Koyubi Takatoshi Suzuki

Shingon

Original Jikei University School of Medicine International Bio transgenic graphics Institute Seitoku Mitsubishi SMBC El

Asari, Masao Ichihara trust Hisashi Murayama Satomi

Azabu University Veterinary Medicine Azabu University Veterinary Medicine Azabu University Veterinary Medicine

結果

新種の共生微生物である乳酸菌ケフィリP-IFには、ネズミにおいて腫瘍の発生を減らし、腫瘍の成長を抑える化学予防の可能性がある。

この効果の根底にあるメカニズムには、以下の点が含まれる可能性がある:

- •免疫システムを活性化する。
- ・がん細胞に於けるアポトーシスを含む。
- ・安全で毒性のない物質である。

乳酸菌ケフィリP-IF は、神奈川県横浜市の Paitos株式会社の提供による。



論文審査のある専門誌 に掲載された論文



Apoptotic effect of a novel kefir product, PFT, on multidrug-resistant myeloid leukemia cells via a hole-piercing mechanism. (新ケフィア製品であるPFTの穴あけメカニズムによる多剤耐性骨髄性白血病細胞に対するアポトーシス効果。)

¹Mamdooh Ghoneum と ²James Gimzewski.

1米国カリフォルニア州、ロスアンゼルス(90059)、チャールズ・R・ドリュー医科理科大学、耳鼻咽喉学部

2米国カリフォルニア州、ロスアンゼルス(90059)、カリフォルニア大学ロスアンゼルス校、化学・生化学部

国際 腫瘍学ジャーナル44: 830-837, 2014

プロジェクト関連文献

- 1. Ghoneum M, Gill G, Stein E, Salem F and Cooper E. Phagocytosis of large granular lymphocytes and other leukocytes by tumor cells. Abstracts in: Nat. Immunity and Cell Growth Regul. 4(5):249-250 (1985) presented at Int. Symp. Nat Immunity and biol response modification for th therapy of cancer and other diseases. Honolulu, Hawaii, Nov. 10-12, (directed by R. Herberman).*
- 2. Ghoneum, M., Gill, G., Stein, E., Salem, F. and Cooper, E. In vitro tumor cell phagocytosis of large granular lymphocytes and other leukocytes. <u>In Natural Immunity, Cancer and Biological Response Modification</u> (Lotzova, E. and Herberman, RB., Eds.) pp.104-113, Karger Basel (1986).
- 3. Ghoneum M, Gill G, Stein E, Ansari A and Cooper E. Bacterial phagocytosis by tumor cell in vitro. 6th Int. Symp. Immunol., Toronto, Canada, July 1-6 (1986).*
- 4. Ghoneum, M., Salem, F., Shum, ST., Perry, L., and Gill, G. In situ lymphophagocytosis by nonlympho-reticular neoplasms. Nat. Immun. Cell Growth Reg. 6(2) 77-87 (1987).
- 5. Ghoneum, M., Salem, F., Allen, H. and Gill, G. Phagocytosis of autologous lymphocytes by cervical preneoplastic and neoplastic cells. <u>Nat. Immuntity.</u> <u>Cell Growth Regul</u>. 7(4):239-248 (1988).
- 6. Ghoneum, M. and Grewal, I. Change in tumor cell-lymphocyte interactions with age. Hemat. Oncol. 8,71-80 (1990).
- 7. Ghoneum, M., Vojdani, A., Suzuki, K. and Gill, G. Phagocytic natural killer cells. Int. J. Immunopath & Pharmac. 6(1) 21-34 (1993).
- 8. Ghoneum, M. and Jewett, A. Production of tumor necrosis factor- α and interferon- γ from human peripheral blood lymphocytes by MGN-3, a modified arabinoxylan from rice bran, and its synergy with interleukin-2 in vitro. <u>Cancer Detec & Preven.</u> 24(4): 314-324 (2000).
- 9. Ghoneum M, Grewal I, Osborne R, Kanamori G and Tsao J. Phagocytosis of candida albicans by lymphatic tumor cells in vitro. Triological Society Western Section Meeting. Pasadena, CA. Feb. 1-3, 2002.*
- 10. Ghoneum, M., Grewal, I., Osborne, R., Brown J., Elembabi H, Gill G, Phagocytosis of candida albicans by lymphatic tumor cells in vitro. <u>Acta Histochemica</u> 105:127-133 (2003).
- 11. Ghoneum M, Golapudi S, Hamilton J, Brown J and Ninomiya K. Human Squamous Cell Carcinoma of the Tongue Exhibits Phagocytosis against Baker's Yeast. Annual Meeting of the American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery Foundation in New York, New York, September 19-22, 2004.*
- 12. Ghoneum M, Gollapudi S. Phagocytosis of candida albicans by metastatic and non-metastatic human breast cancer cell lines in vitro. <u>Cancer Detec.& Preven.</u> 28:17-26 (2004).
- 13. Ghoneum M, Gollapudi S. Phagocytosis of Saccharomyces Cerevisiae, the Baker's Yeast, Induces Apoptosis of Human Metastatic and Non-metastatic breast cancer cells in vitro. Anti-Cancer Res. 24:1455-1464 (2004).
- 14. Ghoneum M, Gollapudi S. Induction of Apoptosis in Breast Cancer Cells by Saccharomyces Cerevisiae, the Baker's Yeast, In Vitro. <u>Anticancer Res</u>. 24:1455-1464 (2004).
- 15. Ghoneum M, Golapudi S, Hamilton J, Brown J and Ninomiya K. Human Squamous Cell Carcinoma of the Tongue Exhibits Phagocytosis against Baker's Yeast. Annual Meeting of the American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery Foundation in New York, New York, September 19-22, 2004.*

プロジェクト関連文献 続き

- 16. Ghoneum M, Gollapudi S. Modified arabinoxylan rice bran (MGN-3/Biobran) enhances yeast-induced apoptosis in human breast cancer cells in vitro. <u>Anticancer Res</u>. 25:859-870 (2005).
- 17. Ghoneum M, Gollapudi S, Hamilton J, and Brown J. Human squamous cell carcinoma of the tongue and colon undergoes apoptosis upon phagocytosis of *Saccharomyces cerevisiae*, the baker's yeast, *in vitro*. Anticancer Res. 25:981-90 (2005).
- 18. Ghoneum M, Gollapudi S. Synergistic role of arabinoxylan rice bran (MGN-3/Biobran) in *S. cerevisiae*-induced apoptosis of monolayer breast cancer MCF-7 Cells. <u>Anticancer Res</u>. 25:4187-4196 (2005).
- 19. Ghoneum M, Gollapudi S. Apoptosis of breast cancer MCF-7 cells In Vitro is Induced specifically by yeast and not by fungal mycelia. Anticancer Res. 26:2013-2022 (2006).
- 20. Ghoneum M, Wang L, Agrawal S and Gollapudi S. Yeast therapy for the treatment of breast cancer: A Nude mice model study. In Vivo. 21:251-258 (2007).
- 21. Ghoneum, M., Brown, J., and Gollapudi, S. Yeast therapy for the treatment of cancer and its enhancement by MGN-3/Biobran, an arabinoxylan rice bran. In: Cellular signaling and apoptosis research. Editor: Alex R. Demasi, Chapter VI. pp. 185-200. 2007. Nova Science Publishers, Inc. New York. (*book chapter).
- 22. Ghoneum M, Badr El-Din N.K., Noaman E, Tolentino L. Saccharomyces Cerevisiae, the Baker's Yeast, Suppresses the Growth of Ehrlich Carcinoma-Bearing Mice. <u>Cancer Immunol Immunoth</u>..57;581-592 (2008).
- 23. Ghoneum M, Matsuura M, Braga M, and Gollapudi S. *S. cerevisiae* induces apoptosis of human metastatic breast cancer by altering intracellular Ca²⁺ and the ratio of Bax and Bcl-2. <u>Int.J. Oncololgy Onco</u>l. 33(3); 533-539. 2008.
- 24. Ghoneum M. Baker's yeast, *S. cerevisiae*, exerts anti-metastatic effects on skin cancer in lungs of mice. The American Association of Cancer Research (AACR), special Conference on Cell Death Mechanisms and Cancer Therapy, San Diego, CA, February 1-4, 2010.*