

新型ケフィア製品、ラクトバチルス・ケフィア (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

MAMDOOH GHONEUM, NOURAN FELO

アメリカ合衆国カリフォルニア州ロサンジェルス 90059
Charles R. Drew University of Medicine and Science 耳鼻咽喉学科

DOI: 10.3892/or.2015.4180

要約

本研究は新型ケフィア製品であるラクトバチルス・ケフィア (PFT) の胃がん細胞 (AGS)、乳がん細胞 (4T1)、及びヒトの抹消血単核細胞 (PBMCs) のアポトーシスに対する効果を調べるために行われた。各細胞にPFTを加えて培養した後、7AAD染色とサイトスピン (集細胞遠心装置) を用いた標本を使い、フローサイトメトリーによりアポトーシスを計測した。ミトコンドリアの機能不全と Bcl2 の発現をフローサイトメトリーにより観察した。結果、PFT は AGS 胃がん細胞において容量依存的にアポトーシスを誘発することが分かった。アポトーシスは PFT の濃度 0.3 mg/ml (15%) で検知でき、0.6 mg/ml では 21.5%、1.2 mg/ml では 42%、2.5 mg/ml では 55.3% に増加し、5.0 mg/ml でピークの 71% となった。アポトーシスはミトコンドリア膜電位の分極減少と関連しており、Bcl2 の発現を減少させた。PFT 処理された AGS 胃がん細胞の場合、サイトスピンで細胞を遠心分離し、ギムザ染色した標本において膜プレブ形成、核凝縮と断片化が見られた。一方、フローサイトメトリー分析では、4T1 乳がん細胞及びヒトの PBMCs に対する PFT によるアポトーシス誘発は見られなかった。これらの結果は、PFT が白血球細胞に対して安全であり、選択的に胃がん細胞に対してアポトーシス効果をもたらすことを示している。故に PFT は胃がんの治療方法としての可能性を秘めている。

はじめに

世界的に胃がんは、最もよく見られるがんの第五位で、がんによる死亡原因の第三位である。また、がん患者の 7% が胃がんであり、がんによる死亡の 9% が胃がんである (1)。2012 年には、世界中で 95 万人が胃がんにかかり、胃がんによる死亡数は 72 万 3 千件であった (1)。2014 年アメリカにおける新規胃がん患者数は推定 22,220 人であり、胃がんによる死亡者数は 10,990 人と報告されている (2)。胃がんの治療結果は良くなく、世界のがん患者の 5 年生存率は 10% 未満であり、アメリカでの 5 年生存率は 28% である (3)。胃がんは多因子疾患である。最も多くみられる原因はヘリコバクター・ピロリ菌の感染によるもので、胃がんの原因の 65% ~ 80% はこれによるものであるが (4)、遺伝、喫煙、食生活 (特に、酢漬けの野菜を食べること) といったその他の要因も、胃がんの発症に重要な役割を果たしていることが分かっている。外科手術、化学療法、放射線療法及び標的療法が胃がんの治療に最も良く使われる治療法であるが (5)、治療の開始が遅れた場合、患者には緩和ケアが勧められることもある (4)。

化学療法は胃がん細胞にアポトーシスを誘発することを目的としている (6, 7)。しかし、これらの薬物には毒性がある場合があるため、近年の研究では副作用が少ない又は弱い代替治療法が模索されてきた。乳酸菌は、がんの治療に有効的な手法である可能性がある。乳酸菌はヨ

ーグルトといった多くの食品に含まれており、抗がん作用を導き出すことが示されている。過去の体外研究や、腫瘍のある動物を用いた研究から、プロバイオティクスには発ガン過程において予防的な作用があることが示されている。例えば、様々な乳酸菌株が、齧歯類の異なる種類の腫瘍の成長に対し、阻害効果を及ぼすことが複数の研究で報告されている(8-11)。

先行研究から、様々な乳酸菌株にはヒトのがん細胞株に対する反増殖効果があることも分かっている。例えば、乳酸連鎖球菌はヒトの結腸がん株である SNUC2A に対してアポトーシスを誘発し(12)、ラクトバチルス・カセイ・ラムノース菌はヒトの単核白血球細胞株である THP-1 に対してアポトーシスを誘発し(13)、ラクトバチルス・ロイテリ菌はヒトの慢性骨髄性白血病細胞株に対し、腫瘍壊死要因を誘発するアポトーシスを増やす(14)ことが分かっている。さらに、疫学研究が示しているように、プロバイオティクスを摂取することは結腸腫瘍発症の減少に関連している可能性がある(15)。これらのデータは発酵乳製品と(あるいは)発酵菌自身が、従来の治療薬剤が持つ有毒な副作用をもたらすことなく、がんに対して科学的予防作用をもたらす可能性を示唆している。

プロバイオティクス発酵技術から産まれたケフィアグレイン製品 (Probiotics Fermentation Technology、以下 PFT という) は、特定のラクトバチルス・ケフィリ株に独特の成長特性を備えており、主にラクトバチルス・ケフィア P-IF から成る天然混合物である。我々は、近年の研究において PFT が、体外でのヒトの多剤耐性骨髄白血病 (HL60/AR) 細胞に対してアポトーシスを誘発できることを示した(16)。本研究は体外で、PFT がその他の種類のがん、特にヒトの AGS 胃がん細胞とネズミの 4T1 乳がん細胞に対して、アポトーシス効果をもたらす可能性を調べることが目的とした。PFT が、AGS 細胞に対してはアポトーシス効果をもたらすが、4T1 細胞には同効果をもたらさない、という選択的な作用を及ぼしたことは興味深い結果である。また PFT はヒトの抹消血単核細胞 (PBMCs) にもアポトーシス効果をもたらさなかった。PFT の効果の発現のメカニズムを研究した。

材料と方法

腫瘍細胞株

本研究では、ヒト胃腺がん細胞株である AGS とネズミ乳がん細胞株である 4T1 の二種類のがん細胞株を用いた。細胞は American Tissue and Culture Collection (ATCC) (アメリカ、バージニア州マナサス) から購入した。AGS がん細胞は、10% のウシ胎仔血清 (fetal bovine serum、以下 FBS) と 2mM のグルタミン及び 100µg/ml のストレプトマイシンとペニシリンを加えたダルベッコ変法イーグル培地 (Dulbecco's modified Eagle's medium、以下 DMEM) (アメリカ、カリフォルニア州カールスバード、Invitrogen 社) で培養した。4T1 がん細胞は 10% の FBS と 2mM のグルタミン及び 100µg/ml のストレプトマイシンとペニシリンを加えた PRMI-1614 (Invitrogen 社) で培養した。細胞は対数増殖期には、二酸化炭素 5%、摂氏 37 度に保った加湿培養器において、日常的に維持した。

プロバイオティクス発酵技術から産まれたケフィア株製品 (PFT)

PFT は主に (~90%) 凍結乾燥した加熱死菌ラクトバチルス・ケフィリ P-IF から成る混合物であり、ラクトバチルス・ケフィリ P-B1 の菌株一種と、カザクスタニア・トゥリセンシス、カザクスタニア・ユニスボラ及びクレイヴェロマイシス・マーシアヌスをそれぞれ 2% から 3% 含んでいる。P-IF は独特の DNA 配列をした乳酸菌の特定株で、放射断層撮影法スキャンでは一般のケフィリと 99.6%

の類似性が示される。この特性については、最近になって報告されている(16)。PFTは神奈川県横浜市にある Paitos 株式会社のものである。

PFTによるがん細胞に対するアポトーシス誘発-フローサイメトリー研究

がん細胞の生存能力を検知するために、7-アミノアクチオマイシン D(以下、7-AAD 染色)を用いた。AGS 細胞を異なる濃度の PFT を加えた溶液と加えない溶液(濃度は 0.0、0.3、0.6、1.2、2.5、5 mg/ml)において三日間培養し、7-AAD(アメリカ、カリフォルニア州サンディエゴ、BD Biosciences 社)と FACS Calibur(アメリカ、カリフォルニア州サンホゼ、Becton-Dickinson 社)を用いて死んだがん細胞率を調べた。細胞を 5 μ l の 7-AAD を用いて 30 分間暗室室温の中で染色し、FACS Calibur を用いて分析した。

PFTによるAGSがん細胞に対するアポトーシス誘発-形態学的分析

ギムザで染色したサイトスピン 標本により、PFT によるがん細胞に対するアポトーシス誘発を調べることができた。アポトーシス細胞を見分けるために、細胞の膨張、膜ブレブ形成及びクロマチン凝縮といった幾つかの形態学的特徴を用いた(17)。

6ウェルプレート内での単層がん細胞の成長

我々の先行モデルの測定法(18)に従い、PFT で培養した後の単層 AGS 細胞 のアポトーシス形成を調べた。接着性 AGS 細胞と非接着性 AGS 細胞のアポトーシスを観察した。がん細胞を 6 ウェルプレート(各 25x36mm、Cell Star、アメリカ、ノースカロライナ州モンロー、Greiner Bio-One 社)で増殖させた。各ウェルの底にはカバーグラスを置いた。AGS 細胞/ml (1×10^5) (2ml) を各ウェルにピペットで入れ、50%から 60%の密集度になるまで接着させた。その後、各ウェルに PFT (5.0mg/ml)を加え、二酸化炭素 5%、摂氏 37 度で培養した。30 分後と 24 時間後に、接着性 AGS 細胞と非接着性 AGS 細胞を以下のように調べた。

ア)非接着性細胞

サイトスピン標本を作成するために、非接着性がん細胞を含んだ上清(1ml)を 100 μ l のトリパンブルー (アメリカ、ペンシルバニア州セウィックリー、Shandon Southern Instruments 社)と混ぜた。その標本を 100%メタノールに固定し、空気乾燥させ、20 分間 4%のギムザ(Giemsa) (アメリカ、ミズーリ州セントルイス、Sigma-Aldrich 社)で染色した後、油浸と 100 倍の対物レンズを付けた光学顕微鏡(ドイツ、Leica DMLB 顕微鏡と Leica DFC310FX デジタルカラーカメラ)を用いて観察した。この上清は、血球計でアポトーシス非接着性がん細胞数を数えるためにも用いた。

イ)接着性細胞

接着性細胞を含んだカバーグラスを慎重に取り外し、空気乾燥させ、メタノールで固定し、上記と同様にギムザを用いて染色した。この細胞を油浸と 100 倍の対物レンズを付けた光学顕微鏡(Leica 顕微鏡)を用いて、形態学的に分析した。さらに、アポトーシス接着性がん細胞率を計算するためにもこの標本を用いた。接着性がん細胞数は、カバーの 5 カ所の観察から計算した。それぞれ 80 ほどの細胞を含んでいた。アポトーシス細胞率は、アポトーシス細胞数を全体の細胞数で割って計算した。

乳酸菌効果の発現のメカニズム

ア)Bcl-2 の発現

Bcl-2 を検知するために、細胞をまず固定し、氷のように冷たい 70%メタノールで透過処理した。次に細胞を FITC 標識の抗 Bcl-2 またはアインタイプコントロール (アメリカ、カリフォルニア州カービンテリア、Dako 社) で染色し、洗浄した後、FACS Calibur を用いて分析した。Bcl-2 を発現した細胞の割合と平均蛍光強度 (分子/細胞の密度の指標) を計測した。

イ) ミトコンドリア膜電位の検知

アポトーシス中のミトコンドリア膜透過電位 $\Delta\Psi_m$ の変形をテトラメチルローダミン エチルエステル (アメリカ、オレゴン州ユージーン、Molecular Probes 社 TMRE) を用いて調べた。PFT で三日間処理したがん細胞 (5×10^5 細胞/ml) を 50nM の TMRE で摂氏 37 度で 30 分間培養し、PBS で洗浄した後、FACS Calibur を用いて分析した。FACS Calibur を用いて細胞の残屑を囲い除くために、側方錯乱を行った。細胞を 488nm で励起し、FL2 チャンネルで発光を収集した。5 千細胞を分析した。データは CellQuest ソフトウェア (Becton-Dickinson 社) を用いて入力、分析した。赤蛍光の減少は、膜電位 $\Delta\Psi_m$ が失われていることを意味している。

ヒト抹消血単核細胞 (PBMCs) に対する PFT の効果

正常で健康なドナー (アメリカ、カリフォルニア州ロサンジェルス Charles Drew 大学施設内治験審査委員会の承認済み) から得た PBMCs をフィコール・ハイパック密度比重差遠心機にかけて分離した後、細胞 (1×10^6 /ml) を PFT (5.0mg/ml) ありと無しに分けて三日間培養した。その後、細胞におけるアポトーシスの割合を調べた。

統計分析

スチューデントの t 検定を用いて、PFT を用いて培養した後のアポトーシスがん細胞と PBMCs の変化率と、PFT 無しのコントロール群の細胞との差の有意性を調べた。有意差は $p < 0.05$ とした。

結果

フローサイトメリーのによるアポトーシスがん細胞の割合

AGS 細胞と 4T1 細胞を三日間、濃度 0-5mg/ml の PFT で培養した。アポトーシスがん細胞の割合は 7-AAD 染色を用いたフローサイトメリーによって計測した。図 1 は乳酸菌ケフィアが AGS 細胞においてアポトーシスを容量依存的に誘発していることを示している。低い濃度 (0.3mg/ml と 0.6mg/ml) の乳酸菌ケフィアでもアポトーシス AGS 細胞の割合が増加していることが分かった。濃度 1.2mg/ml (37.0%, $p < 0.05$) ではアポトーシス細胞の割合は著しく増え、濃度 2.5mg/ml (53.1%, $p < 0.001$) ではその割合はさらに増え、濃度 5mg/ml (66.3%, $p < 0.0001$) で最大となった。注目すべきことに、濃度 5mg/ml 以下では PFT は 4T1 がん細胞においてアポトーシスを誘発しなかった。

Giemsa 染色によるアポトーシス細胞の形態学的分析

がん細胞を PFT (5mg/ml) で培養し、非接着性がん細胞と単層接着性がん細胞におけるアポトーシス細胞の割合と数を調べた。

ア) 非接着性アポトーシス AGS がん細胞

AGS がん細胞を乳酸菌ケフィア濃度で 30 分と 24 時間培養した後、非接着性細胞を含んだ上清を収集して、トライパンブルー染色と血球計を用いてアポトーシスがん細胞の数を調べた。図 2 にあるデータは 30 分後のアポトーシス非接着性細胞の著しい増加レベルを示している。アポ

トーシスががん細胞の数は 24 時間後にはさらに増え、その数は 30 分後の数と比較すると 2 倍であった。

イ) 単層接着性アポトーシス AGS がん細胞

1) 形態学的特徴

カバーガラス上で PFT (5mg/ml) を用いて 24 時間培養した単層 AGS 細胞をギムザ染色すると、アポトーシス AGS がん細胞が見いだされた。PFT はアポトーシスに共通である細胞の膨張、膜ブレブ形成及びクロマチン凝縮といった幾つかの形態学的特徴を誘発する。図 3A は非アポトーシスな接着性 AGS 細胞を示している。クロマチン凝縮と膜ブレブ形成が見られないことに注目したい。アポトーシス化するがん細胞はクロマチン凝縮から始まり、核が細胞の半分のサイズにまで凝縮される(図 3B)。その後、膜ブレブ形成が起こり(図 3C)、核の断片化が起こる(図 3D)。最後に、核断片が膜小胞にすっぽりと包まれ(図 3E)、これらの小胞が細胞から分離する。球形や卵形の膜小胞がアポトーシス細胞から完全に分離し、自立していることに注目したい(図 3F)。一方、PFT で処理した後の 4T1 がん細胞にはクロマチン凝縮や膜ブレブ形成が見られなかった(図 4)。

2) 単層アポトーシス AGS 細胞の割合

アポトーシスの形態学的特徴を備えた接着性 AGS 細胞の割合を、PFT でがん細胞を培養してから 30 分後と 24 時間後に調べた。図 5 は AGS 細胞を PFT で培養後、30 分後にはすでに著しい割合のアポトーシスが検知されたことを示している ($p < 0.01$)。PFT のアポトーシス効果は時間の経過と共に増え、24 時間後には非常に高いものとなった ($p < 0.001$)。PFT で培養したアポトーシスがん細胞の割合は 24 時間後には、30 分間後の標本に比べて、2.4 倍も高かった。

PFT 効果の発現のメカニズム

ア) ミトコンドリア膜電位

AGS 細胞と 4T1 細胞のミトコンドリア膜電位に対する PFT (2.5mg/ml) の効果をフローサイトメトリーで調べた。図 6 のデータは、PFT 処理しなかったコントロール群の AGS がん細胞に比べて、PFT で三日間処理した AGS がん細胞は、ミトコンドリア電位が著しく低いことを示している ($p = 0.007$)。図 6A は代表的なフローの柱状グラフを示しており、図 6B は三種の異なった実験による平均標準偏差を棒グラフで示したものである。対照的に、図 7 のデータは PFT が 4T1 細胞のミトコンドリア膜電位に全く効果を及ぼさなかったことを示している。

イ) Bcl2 発現

PFT (2.5mg/ml) で三日間処理した後の AGS 細胞における Bcl2 発現を調べた。フローサイトメトリーで調べたところ、コントロール群である PFT 処理を行わなかった AGS 細胞に比べ、PFT 処理を行った AGS 細胞では Bcl2 発現が著しく下方修正された ($p = 0.004$)。図 8A は代表的なフローの柱状グラフを示しており、図 8B は三種の異なった実験による平均標準偏差を棒グラフで示したものである。

ヒトの PBMC に対する PFT の効果

アポトーシス細胞の割合の変化に関して PBMC に対する PFT の効果を調べた。PBMC を三日間 PFT (5.0 mg/ml) と共に培養し、フローサイトメトリーでアポトーシス細胞の割合を調べた。図 9 は PFT によって処理した PBMC のアポトーシス PBMC は、PFT 処理しなかったコントロール群の細胞と比較して、その割合の変化に有意な差異は見られなかったことを示している。

考察

乳酸菌は何千年も前から乳製品に見られており、損傷物質の成長の妨げと関連している。最近では科学者等が乳酸菌の抗がん剤としてのさらなる可能性を明らかにしてきている。複数の報告により発酵乳製品や(あるいは)発酵性のある菌自身に、従来の治療薬剤がもつ有毒な副作用をもたらすことなく、がんに対して科学的効果をもたらすことが示されている。本研究では、プロバイオティクス発酵技術を用いた新型ケフィア製品で、乳酸菌ケフィア P-IF がその主な成分である PFT を用いた。P-IF が強力な抗がん剤として作用するための幾つかの特徴がある。これらの特徴の一つには、P-IF がその表面にある炭水化物鎖によって 3 次元的に成長する一方、ラクトバチルス・ケフィリ株は縦方向に成長することが挙げられる。さらに、P-IF はガラクトースを炭素源として用い、炭素酸を作り出すことができる(19)。我々の最近の研究で PFT がヒトの多剤耐性骨髄白血病 (HL60/AR) 細胞に対してアポトーシスを誘発することが分かった(16)。これらの結果から、我々はその他の種類のがんに対する PFT のアポトーシス効果を調べることにした。今回の研究で得られたデータから、PFT はヒトの AGS がん細胞に対しては選択的アポトーシス効果を発揮するが、4T1 細胞にはアポトーシス効果を発揮しないことが明らかになった。

乳酸菌はアポトーシスのメカニズムを通じてがん細胞の死を誘発することができる。文献でよく見られるアポトーシスの経路には、主に外因性と内因性という二通りある。外因性的の場合、アポトーシスは死受容体とカスパーゼ 8 の活性化を介して起こり、内因性的の場合ミトコンドリアとカスパーゼ 9 が関係する(20)。Bcl-2 ファミリータンパク質がミトコンドリアの経路や MMP の維持において重要役割を果たすことはこれまでに報告されている。本研究において、PFT を用いることにより、AGS がん細胞の Bcl-2 の水準が著しく下方修正されており、これは AGS 細胞のミトコンドリア電位の減少と関連していた。これがカスパーゼの活性化と最終的にはアポトーシスにつながる原因となるアポトーシス促進分子の放出を引き起こす。同様の効果が PFT 処理後の HL60/AR 細胞にも見られている(16)。

胃がんの治療によく用いられる 5-フルオロウラシル(5-FU) やシスプラチン、ドキシソルピシンといった化学療法は、胃がん細胞にアポトーシスを誘発することを目的としている(6, 7)。本研究の結果は、PFT のアポトーシス効果は AGS 細胞に対して、用量依存的及び時間依存的な効果があることが示唆している。フローサイトメトリーを用いた検査では PFT が濃度 0.3mg/ml でアポトーシスを誘発し、濃度 5.0mg/ml では 66% のピークを示した。ギムザ染色したサイトスピン標本を用いた形態学的分析では、細胞膨張や膜プレブ形成、クロマチン凝縮といったアポトーシス細胞の特徴が明らかに見られ、AGS 細胞に対する PFT のアポトーシス効果が確認できた。PFT によるアポトーシスの誘発は、処理から 30 分後には確認でき、24 時間後にはアポトーシス細胞の割合は 2 倍にまで増えた。先行研究では L.lac CF といった乳酸菌が、ヒトの胃腺がんに対して DNA の断片化やクロマチン凝縮を誘発することが報告されている(21)。

ミトコンドリア経路が、プロピオン酸菌フロイデンライシイ(22) や、乳酸菌ラクトバチルス・パラカゼイ IMPC2.1 やラクトバチルス・ラムノサス GG (L.GG)(23) といった異なる種類のプロバイオティクスによる胃がん細胞に対するアポトーシスの誘発における主な経路であると思われる。同様に、ミトコンドリア経路を通じたアポトーシス誘発は、プロピオン酸菌(24, 25) やラクトバチルス・ラムノサス、ピフイロバクテリウム・ラティス(26) 及びラクトバチルス・デルブリュッキー(27) 等のプロバイオティクスで処理された結腸がんでも発見されている。さらに乳酸菌は骨髄性白血病においてもアポトーシスのミトコンドリア経路を誘発している。例えば、PFT はヒトの多剤耐性骨髄白血病 (HL60/AR) (16) に対してアポトーシスを誘発し、ラクトバチルス・ロイテリ菌(14) とラク

トバチルス・カセイ・ラムノース菌 (13) はヒトの単球性白血病細胞に対してアポトーシスを誘発することが報告されている。

乳酸菌によるアポトーシスの誘発のメカニズムを説明するには二つの仮説が提案できるであろう。第一に乳酸菌が、がん細胞上で Toll 様受容体と結合してアポトーシスを誘発している可能性が挙げられる。この仮説は、全てではないが幾つかの Toll 様受容体が、がん細胞にアポトーシスを誘発することを示した報告に基づいている (28-30)。次に、貪食された乳酸菌がアポトーシスを誘発する可能性が挙げられる。この仮説はがん細胞が微生物を貪食した後 (31-33) 細胞自然死を遂げる (17, 34, 35) という我々や他の研究者による研究結果に基づいている。この二つの仮説は決して相互排他的なものではない。PFT が 4T1 細胞においてアポトーシスを誘発できない理由は、PFT を結合するのに適切な Toll 様受容体が不足しているためか、あるいは 4T1 細胞が PFT を貪食した後にアポトーシスを誘発することができないためと考えられる。

PFT には毒性がないことは幾つかの過去の研究が示している。本研究では我々は PFT (5.0 mg/ml) で三日間処理したヒト PBMCs のアポトーシスの割合に著しい変化がなかったことを指摘している。さらに、過去の体外研究で、PFT 処理されたネズミにおいて体重に変化がなく、様々な臓器において顕微鏡上及び病理組織学的に異常は見られなかったことが報告されている (36)。これらの結果は PFT ががんに対する選択的アポトーシス誘導因子であり、同時に PFT が胃がんの治療にとって安全で毒性がない療法の可能性があることを意味している。

謝辞

著者等は神奈川県横浜市の Paitos 株式会社 (認可番号 T0099108) に謝意を表す。また、同僚であり協力者であるカリフォルニア大学アーバイン校の S. Gollapudi 博士に対しても、本研究に対する貴重な意見とガイダンスを下さったことに感謝する。また NIH-NIMHD grant U54MD007598 (前 U54RR026138) と NIH/NIMHD grant S21 MD000103 (CDU Life Sciences Institute) によって部分的に支援を受けた協力者の D. Pan にも謝意を表す。AXIS 5U54MD007598-06 からも部分的な支援を受けた。最後に図や原稿の準備を手伝ってくれた Ben Winjum 博士に感謝する。

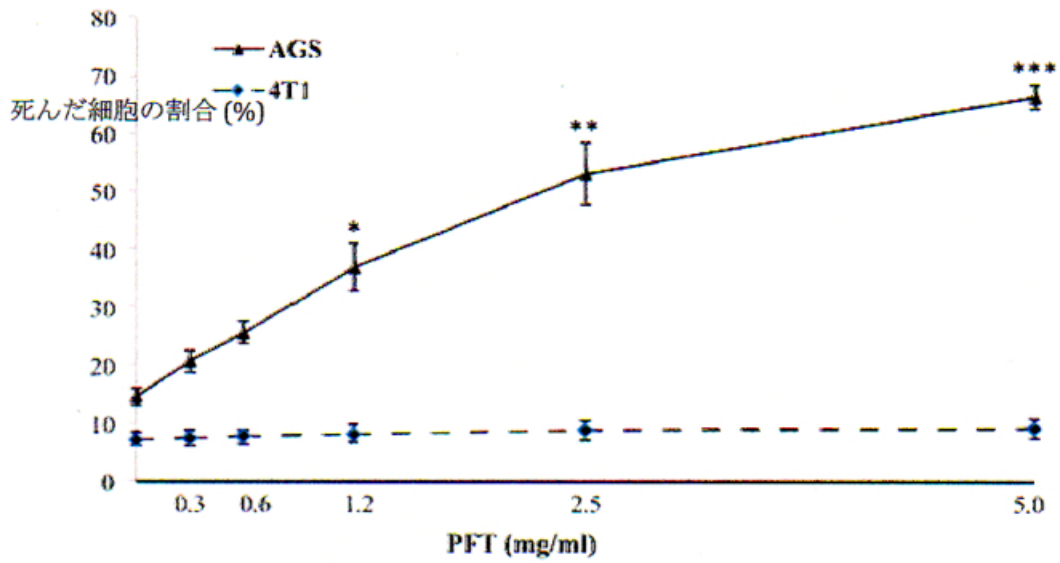


図1. フローサイメトリーに

よるPFTのアポトーシスががん細胞の割合に対する効果。

AGS細胞と4T1細胞 (1x10⁵) を濃度0-5 mg/ml のPFTで3日間培養した。細胞死は7AADを用いたフローサイメトリーによって計測した。データは各濃度の4実験の平均標準偏差を表している。

*p<0.05, **p<0.001, ***p<0.0001.

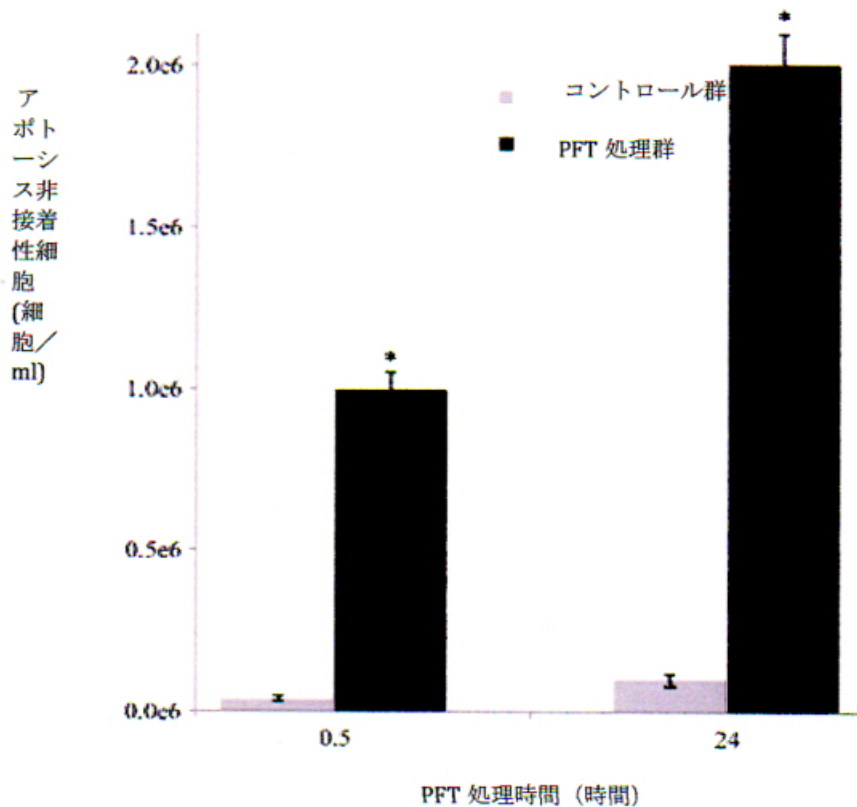


図2. PFT濃度(5.0 mg/ml)で培養後のアポトーシス非接着性AGS細胞の数。
 がん細胞をPFT無し(灰色)とPFTあり(黒)で培養した。非接着性アポトーシスがん細胞の数を、
 血球計を用いて培養から30分後と24時間後に数えた。データは3実験の平均標準偏差を表し
 ている。

*PFT処理されていないコントロール群の細胞と比較して $p < 0.001$ 。

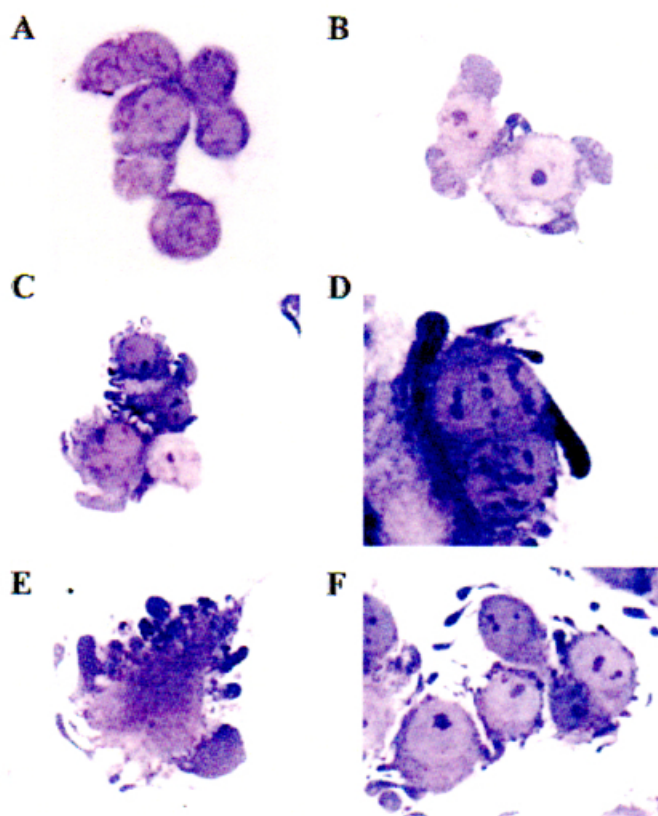


図3. PFTで処理後、アポトーシスの兆候を見せる接着性AGSがん細胞のサイトスピン標本。
 カバーグラス上で成長した単層 AGS 細胞をPFT (5.0 mg/ml) で24時間培養後、ギムザで染色
 した。1,000倍。

標本は次のことを示している。(A) 非アポトーシス接着性細胞。(B-F) : (B)クロマチン凝縮した
 アポトーシス接着性細胞膜、(C) プレブ形成、(D) 核の断片化と移動、(E) 膜小胞内で断片が
 包み込まれる、(F) 小胞が細胞から分離。

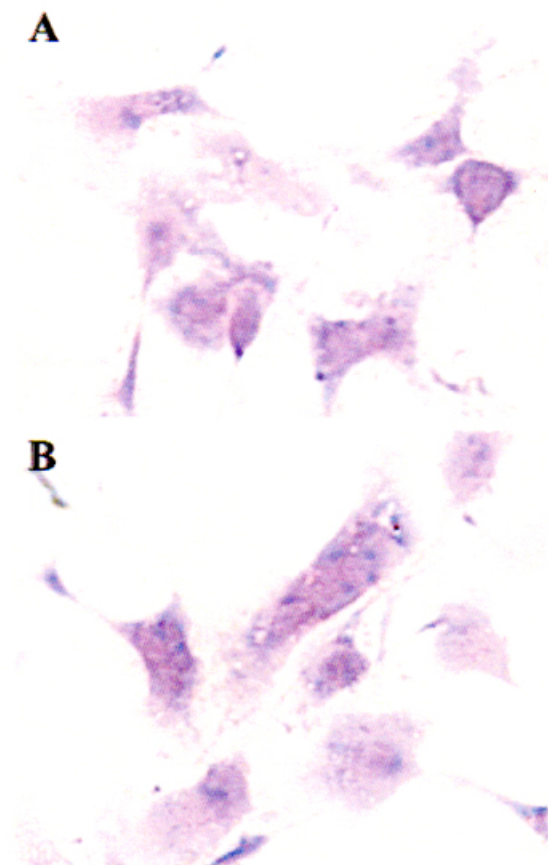


図4. PFTで処理後、アポトーシスの兆候を見せる接着性4T1がん細胞のサイトスピン 標本。
カバーガラス上で成長した単層 4T1 細胞をPFT (5.0 mg/ml) で24時間培養後、ギムザで染色した。1,000倍。
標本は次のことを示している。(A)PFT処理されていないコントロール群の接着性 4T1 細胞、
(B) PFT処理された接着性 4T1 細胞。クロマチン凝縮や膜プレブ形成がないことに着目。

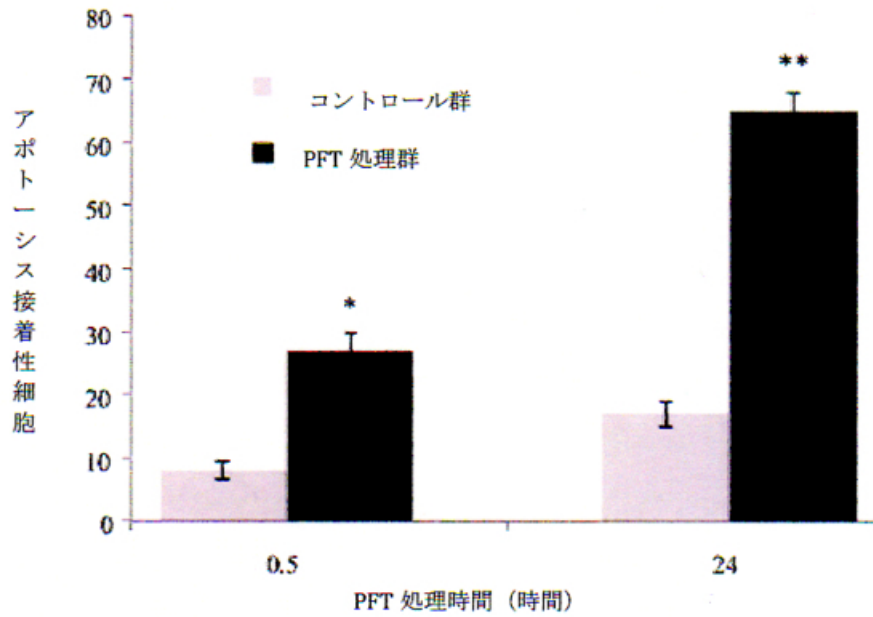


図5. 30分後と24時間後のアポトーシス接着性AGS 細胞の割合。
 がん細胞をPFT無し(灰色)とPFTあり(黒)で培養した。接着性アポトーシ스가ん細胞の割合を、
 サイトスピン標本を用いて計測した。データは3実験の平均標準偏差を表している。
 *PFT処理されていないコントロール群の細胞と比較して*p<0.01と**p<0.001。

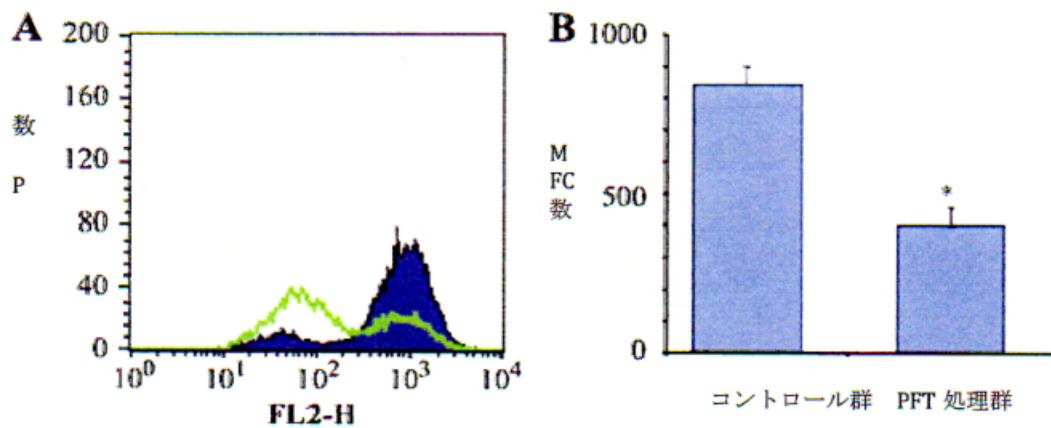


図6. AGS細胞のミトコンドリア膜電位に対するPFTの効果。
 AGS がん細胞 (11x10⁵) を濃度2.5 mg/ml のPFT で3日間培養した後、TMRE染色とフローサイ
 トメトリーでミトコンドリア膜電位を検知した。(A) FL2 の減少は脱分極を示している(紫:コントロ

ール群; 緑: PFT処理群)。(B) 平均蛍光経路数に著しい変化があることに着目。これはPFTがAGS がん細胞において膜電位の減少を引き起こしたことを示唆している (* $p=0.007$)。

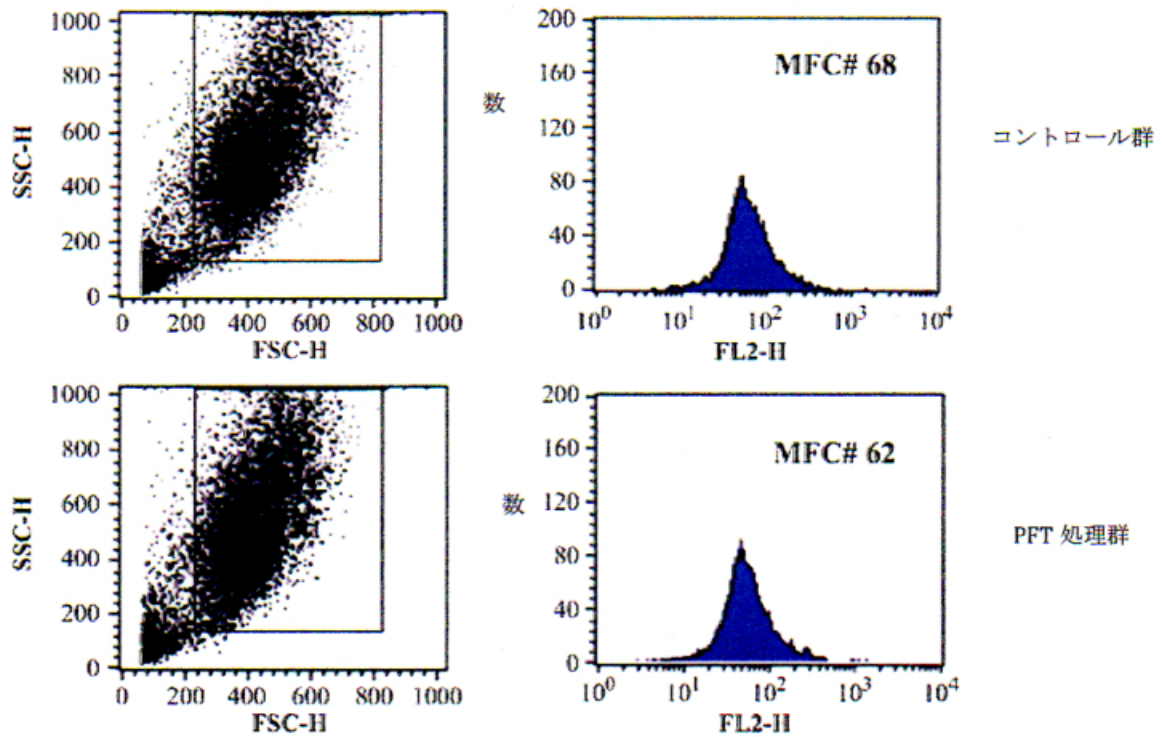


図7. 4T1細胞のミトコンドリア膜電位に対するPFTの効果。

4T1がん細胞 (1x10⁵) 濃度2.5 mg/ml のPFT で三日間培養した後、TMRE染色とフローサイトメトリーでミトコンドリア膜電位を検知した。FL2の減少は脱分極を示している。平均蛍光経路数に著しい変化がないことに着目。これはPFTが4T1がん細胞の膜電位に対して効果がなかったことを示唆している。

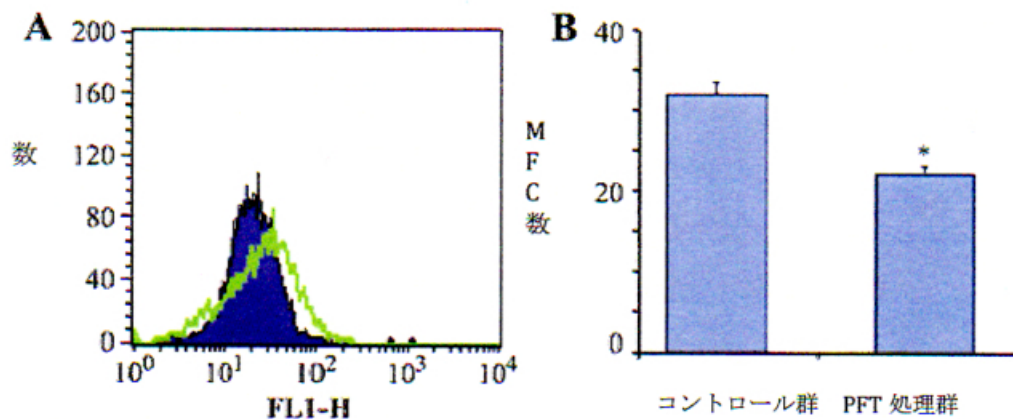


図8. Bcl2発現に対するPFTの効果。

AGS がん細胞 (11x10⁵) を濃度2.5 mg/ml のPFT で三日間培養した。その後、細胞をFITC標識の抗Bcl-2またはアイソタイプコントロールで染色した後、洗浄し、FACSCaliburを用いて分析した。Bcl2を発現している細胞の割合と平均蛍光強度を測定した (*p=0.004; 緑: コントロール群; 紫: PFT処理群)。

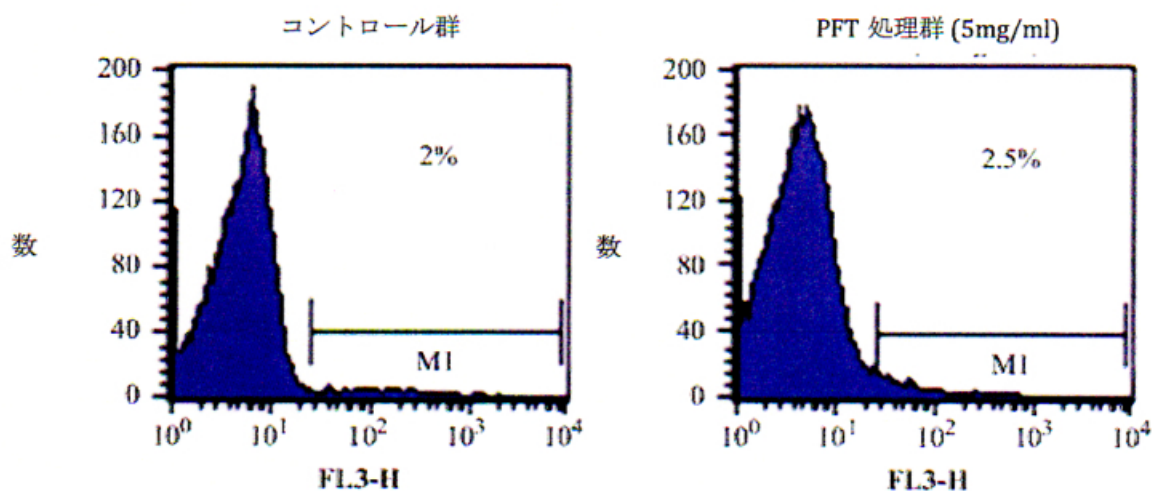


図9. PBMCのアポトーシスに対する PFTの効果。

PBMC (1x10⁶ cell/ml) をPFT (5.0 mg/ml) 有り無しで三日間培養した。FACSCalibur フローサイトメトリーを用いて、PI技術によりアポトーシス細胞を測定した。