

豆乳の乳酸菌発酵物が示すがん細胞増殖抑制作用の解析

野嶽勇一*・深澤昌史・榊原隆三

長崎国際大学薬学部生化学研究室

Growth Inhibition Action of Lactic Acid Bacteria-Metabolic Products on Human Leukemia HL-60 Cells

Yuichi NODAKE*, Masashi FUKASAWA and Ryuzo SAKAKIBARA

Laboratory of Biochemistry, Department of Pharmacy, Faculty of Pharmaceutical Sciences,
Nagasaki International University, Nagasaki 859-3298

ABSTRACT

PS-B1 is a fermented product cultured from soybean milk using lactic acid bacteria. In this study, we found that PS-B1 significantly inhibited the growth of human leukemia HL-60 cells in dose-dependent manner; we also examined the mechanism of the anti-proliferation action of PS-B1 on HL-60 cells. Subsequently, several results suggesting that PS-B1 induced apoptosis in HL-60 cells were obtained from a spectrophotometrical analyses. In HL-60 cells treated with PS-B1, (1) an increase in intracellular reactive oxygen species; (2) a reduction of glutathione level and mitochondrial membrane potential; (3) an increase in caspase activity; and (4) DNA fragmentation were detected. *Soy Protein Research, Japan* **15**, 96-102, 2012.

Key words : lactic acid bacteria-metabolic product, PS-B1, growth inhibition action, apoptosis

乳酸菌発酵製品の摂取から導かれる保健効果の検証や、より高い食効を示す乳酸菌発酵製品の開発が古くから脚光を浴び、これらの分野に関する研究成果が世界中で蓄積されてきた。一方、メタボリックシンドロームや生活習慣病への画期的な対処法が強く求められるようになった昨今では、乳酸菌発酵製品を取り巻く環境も様変わりしてきている。すなわち、特定保健用食品の台頭に代表されるように、食品の摂取によって

期待される保健効果に対して、予防医学やバイオジェニックスの観点から「論拠」が求められるようになった。実際、市場や研究の関心は、乳酸菌発酵製品を構成する有用な機能性生理活性成分の一つ一つ（＝乳酸菌代謝生産物質）へとシフトし、これらの同定と作用機序の解明が活況を呈するに至っている。しかしながら、一部の機能性成分を除き、乳酸菌代謝生産物質を明確に同定し作用機序の解明を図る生化学・薬理学的研究は、未だ十分に掘り下げられていないのが現状である。乳酸菌代謝生産物質は、学術的には言わば「未

*〒859-3298 佐世保市ハウステンボス町2825-7

知物質の宝庫」のままである。

我々の研究グループにおいても、「食を介した健康増進・疾病予防への貢献」を命題として研究を推進する中で、乳酸菌代謝生産物質の有用性に早くから着目していた。*Bifidobacterium*属および*Lactobacillus*属のヒト常在乳酸菌を中心とした3段階の複合培養から調製した豆乳の新規乳酸菌発酵物PS-B1が示す有用作用を解析し、その“バイオジェニックス”としての可能性を明らかにする「乳酸菌代謝生産物質プロジェクト」に取り組んでいる¹⁾。これまでに、PS-B1ががん細胞増殖抑制作用²⁾、肝保全作用、肝機能・脂質代謝改善作用等³⁾、多岐にわたる生理作用を有することを明らかにしてきた⁴⁻⁷⁾。本プロジェクト研究は「予防医学」の観点から発案しており、PS-B1の摂取や投与によってもたらされる保健効果の理解はもとより、その作用機序を解明し、PS-B1のバイオジェニックスとしての可能性を検討するものである。実際、PS-B1中に含まれる生理活性の本質となる乳酸菌代謝生産物質の精製・同定を介して、PS-B1が有する有用作用の作用機序を多面的かつ包括的に解明することを最重要課題としている。最終的には、精製した乳酸菌代謝生産物質を用いて、我々の健康増進や生活習慣病の予防・治療に寄与する新規機能性食品の開発の基盤とする。

本報告書では、これまでに蓄積してきた乳酸菌発酵物PS-B1が示す有用作用に関するエビデンスの中から、財団法人不二たん白質研究振興財団助成期間中に新たに得られたがん細胞増殖抑制作用に関する研究成果を報告する。

方 法

PS-B1の調製

豆乳の乳酸菌発酵物であるPS-B1には、培養液である豆乳に含まれる成分およびこれらの成分が乳酸菌による代謝を受けて新たに産生された物質（乳酸菌代謝生産物質）を含有しており、その製法は既に確立されている⁷⁾。すなわち、予めMRS培地を用いて単菌培養しておいた*Lactobacillus*属（*L. gasseri*, *L. acidophilus*, *L. paracasei*, *L. brevis*, *L. casei*, *L. bulgaricus*, *L. delbrueckii*）および*Bifidobacterium*属（*B. longum*, *B. bifidum*, *B. adolescentis*）を、一定の菌数・組合せ・温度条件下で3段階の複合（共棲）培養に供した。この複合培養には、北海道産大豆の無農薬有機栽培大豆から調製した豆乳を栄養源として使用した。次いで、得られた発酵液をフィルター（0.3 μ m）を通過させて菌体を除去し、そのろ液をPS-B1とした。PS-B1の調

製には、計3週間を要した。本研究において使用したPS-B1は、すべてバイオジェノミクス社（長崎県大村市）において調製されたものである。各実験において使用した試薬は、すべて特級のものを使用した。

がん細胞増殖抑制作用の測定

10%ウシ胎児血清（FBS）を含むRPMI-1640培地を用いて、ラットリンパ球および6種類の培養がん細胞株（ヒト組織性リンパ腫 U937, 同急性ミエロイド白血病 KG-1, 同前骨髄球性白血病細胞 HL-60, 同B細胞白血病細胞 Ball-1, 同Tリンパ性白血病細胞 Jurkat および MOLT-4）を96穴マイクロプレート中に 1×10^4 cells/well（90 μ L）となるように播種した。次いで、培養液中にPS-B1を添加し、37℃に設定した5% CO₂ インキュベータ内で4時間培養した。生細胞数の測定は、MTTアッセイ法を改良したIshiyama Mらの細胞増殖アッセイ法に従い、培養細胞液中にCell Counting Kit-8（10 μ L/well）を添加し、37℃で4時間静置後、450 nmにおける吸光度を測定した。PS-B1未添加時の生細胞数を100%とした。

なお、同様の手法で 1×10^4 cells/wellのHL-60細胞に対して、PS-B1（終濃度500 μ g/mL）およびカスパーゼ阻害剤であるZ-VAD-FMK（終濃度0-40 μ M）を37℃で4時間作用させてアポトーシス誘導の可能性を検討する実験も行った。

細胞内活性酸素種産生量の測定

HL-60細胞内の活性酸素種（H₂O₂）をDCFH法に従って定量した。まず、 ϕ 35 mmディッシュを用いて、PS-B1（終濃度0-750 μ g/mL）をHL-60細胞および正常細胞に37℃で4時間作用させた。PS-B1処理した細胞（ 2.5×10^4 cells/mL）の培養液中に2',7'-dichlorofluorescein diacetate（DCFH；終濃度8 μ M）を添加し、37℃で15分間インキュベートした。培地を除去してPBSで洗浄後、Hanks液（1 mL）を添加して細胞をすべて破碎・回収した。この回収液の一部（100 μ L）を96穴プレートに分注し、蛍光強度を測定した（励起波長：485 nm, 蛍光波長：535 nm）。PS-B1未作用群の蛍光強度を100%とした。

還元型グルタチオン量の測定

PS-B1（500 μ g/mL）を37℃で4時間作用させたHL-60細胞について、株式会社ヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ（HMT, 山形県鶴岡市）が提供するメタボローム解析を利用した。検出したピークは質量電荷比（m/z）と泳動時間（MT）または保持時間（RT）の値を基にHMT代謝物質データベースに登録された全物質との照合・検索後、得られたピークの面積値から相対面積値（＝目的ピークの面積値／（内

部標準物質の面積値・試料量))を算出した。本研究では、得られたHL-60細胞内代謝物のデータより、還元型グルタチオン (GSH) 量および酸化型グルタチオン (GSSG) 量を算出した。

ミトコンドリア膜電位の測定

PS-B1 (終濃度0.750 $\mu\text{g/mL}$) をHL-60細胞および正常細胞に37℃で4時間作用させた。次いで、PS-B1処理した細胞 (90 μL , 5×10^5 cells/tube) をマイクロチューブに分取し、10 μL の蛍光色素5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide (JC-1) を添加した。37℃で30分間静置後、5分間の遠心 (400 $\times g$) 後に上清を除去し、kitに同梱のアッセイバッファーで2回洗浄した。最終的に、アッセイバッファー (100 μL) で再懸濁した細胞を蛍光測定用96穴マイクロプレートに分注し、蛍光強度を測定した。

カスパーゼ活性の測定

PS-B1 (終濃度500 $\mu\text{g/mL}$) をHL-60細胞に37℃で4時間作用させた。次いで、PS-B1処理した細胞 (2×10^5 cells) をマイクロチューブに分注し、5分間の遠心 (400 $\times g$) 後に上清を除去し、細胞溶解液 (50 μL) に懸濁した。10分間の氷冷後に5分間遠心 (20,000 $\times g$) し、kitに同梱の反応液 (50 μL) と混合した。最終的に、合成蛍光基質 (カスパーゼ-2:VDVAD-AMC, カスパーゼ-3:DEVD-AMC, カスパーゼ-8:IETD-AMC, カスパーゼ-9:LEHD-AMC) がwell中に添加されているApoAlert Caspase Assay Plates (Clontech) に混合液を分注し、37℃で2時間反応させ、蛍光強度 (励起波長: 380 nm, 蛍光波長: 460 nm) の測定により各カスパーゼの酵素活性を測定した。PS-B1未作用群の蛍光強度を100%とした。

ゲノムDNAの抽出およびアガロース電気泳動による分離

$\phi 100$ mmディッシュ内でPS-B1 (終濃度500 $\mu\text{g/mL}$) をHL-60細胞に37℃で4時間作用させた。次いで、培地を除去してHL-60細胞をPBSで洗浄後、ApopLadder Ex kit (Takara) を用いてDNAを抽出した。さらに、抽出DNAを1.8%アガロースゲルによる電気泳動に供与し、エチジウムブロマイドで染色後、紫外線照射下でDNAの断片化に伴うDNAラダーの有無を調べた。

統計処理

本研究より得られた結果は、すべて平均値 $\pm$ 標準誤差で示した。統計学的検定法として対応のある t 検定を用い、各実験の対照群に対する両側検定において、 $p < 0.05$ の場合を有意差ありと判定した。

結果と考察

PS-B1のがん細胞増殖抑制作用の特長

PS-B1 (終濃度1 mg/mL) は正常細胞 (リンパ球) に対しては特に有意な影響を及ぼさなかった (Fig. 1a)。一方、6種類の浮遊系がん細胞においては、程度に差はあるもののPS-B1によって細胞増殖が抑制されたことから、PS-B1に幅広いがん細胞増殖抑制スペクトルがあることが見出された。このPS-B1の「正常細胞には悪影響を与えず、がん細胞に対してのみ作用する」という性質は、今後、PS-B1を抗がん食品として実用化していく上で、極めて好ましい結果であると考えられた。

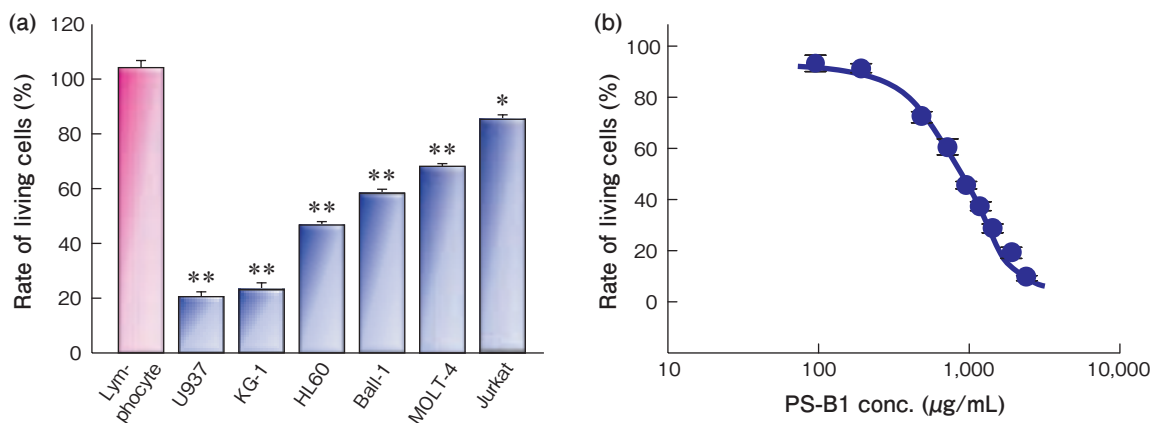


Fig. 1. Effect of PS-B1 (1 mg/mL) on proliferation of lymphocyte and 6 cancer cells (a) and dose-dependent curve of PS-B1 against proliferation of HL-60 cells (b). Cells (1×10^4 cells/well) were incubated at 37℃ for 4 h in a 5% CO_2 incubator with PS-B1. Asterisks indicates significant difference versus the control (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

PS-B1のがん細胞増殖抑制作用を深く理解するために、HL-60細胞をモデルとして異なる濃度のPS-B1（終濃度0-2.5 mg/mL）を作用させ、37℃で4時間培養した後の生細胞数の割合を求めた（Fig. 1b）。その結果、PS-B1の濃度に依存してHL-60細胞の生細胞数の割合が徐々に減少し、500 μ g/mL程度から生細胞数が大きく減少に転じた。なお、HL-60細胞に対するPS-B1の濃度依存曲線から算出した IC_{50} 値は0.99 mg/mLであり、抗がん剤等と比較して決して生理作用は強くなかった。しかしながら、PS-B1が多成分の集合体である食品ということを考慮すると、該当生理活性物質の精製・同定は急務である。

一方、HL-60細胞の生細胞の割合は、PS-B1 500 μ g/mL存在下では約70%に減少したが（Fig. 1bおよびFig. 2）、カスパーゼ阻害剤を共存させた場合、カスパーゼ阻害剤の濃度に依存してPS-B1のがん細胞増殖抑制作用が解除され、HL-60細胞の生細胞の割合が徐々に増大する結果を得た（Fig. 2）。このことにより、PS-B1がカスパーゼの活性化を介してHL-60細胞にアポトーシスを誘導している可能性が示唆された。

PS-B1を作用させたHL-60細胞内の変化

HL-60細胞に対するPS-B1のがん細胞増殖抑制作用の作用機序としては、アポトーシスの誘導、解糖系の不活化、あるいは細胞周期の停止（異常）等が考えられる。PS-B1ががん細胞にアポトーシスを誘導することが示唆されたことから、PS-B1を作用させたHL-60細胞を用いて以下の分光学的解析を中心とした5つの実験を行い、HL-60細胞内で生じている現象の把握を図った。

抗がん剤の中には、がん細胞の細胞内活性酸素種量を特異的に増大させることによって抗がん効果を示すものがある。PS-B1はがん細胞に対してのみ増殖抑制作用を示すことから、本生理作用の作用機序の第一段階としてがん細胞内活性酸素種産生量への影響が考えられた。そこで、HL-60細胞と正常細胞にPS-B1を作用させ、DCFH法にて細胞内活性酸素種量を測定した（Fig. 3）。その結果、正常リンパ球においてはPS-B1の添加量依存的に細胞内の活性酸素産生量が減少したが、がん化した細胞であるHL-60細胞内の活性酸素種産生量は異常に増大した。正常細胞とがん細胞間で真逆の結果を示した本研究結果は、「PS-B1ががん細胞に対してのみ作用するのはなぜか」という疑問を解く鍵の一つとなる研究結果であると示唆された。

次いで、PS-B1を作用させたHL-60細胞を対象としたメタボローム解析により、HL-60細胞内の代謝物質を網羅的に検出した。その結果、GSH量が低下した一

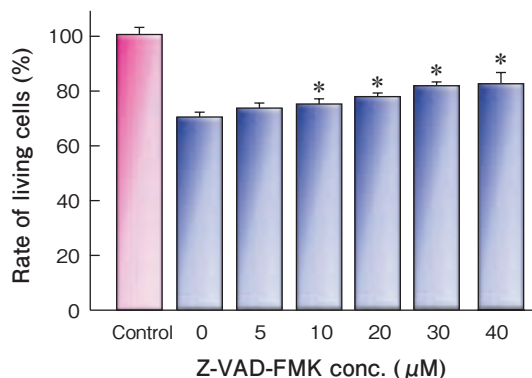


Fig. 2. Effect of caspase inhibitor on proliferation of HL-60 cells treated with PS-B1. HL-60 cells (1×10^4 cells/well) were incubated at 37℃ for 4 h in a 5% CO_2 incubator with 500 μ g/mL PS-B1 in the presence of caspase inhibitor, Z-VAD-FMK. An asterisk indicates significant difference versus the control ($p < 0.05$).

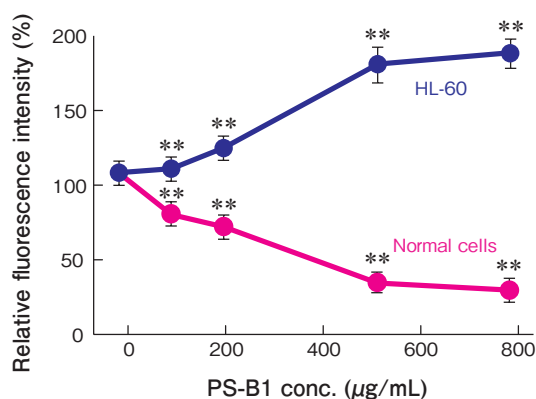


Fig. 3. Effect of PS-B1 on intracellular reactive oxygen species (ROS) levels in HL-60 cells and lymphocytes. Cells (2×10^5 cells/dish) treated with PS-B1 for 4 h were incubated with DCFH-DA for 15 min. The DCF produced by intracellular H_2O_2 were detected by measuring the fluorescent intensity at 505 nm with excitation at 485 nm. An asterisk indicates significant difference versus the control ($p < 0.01$).

方で（Fig. 4a）、GSSG量が増加していることが明らかになった（Fig. 4b）。特に、GSSGの蓄積量においては大きな変化を見出した。細胞には酸化ストレスを回避するための防御機構が存在することが一般に知られている。すなわち、GSHや一部のビタミン類等に代表される抗酸化低分子化合物や、カタラーゼ、グルタチオンペルオキシダーゼ、スーパーオキシドジスムターゼ

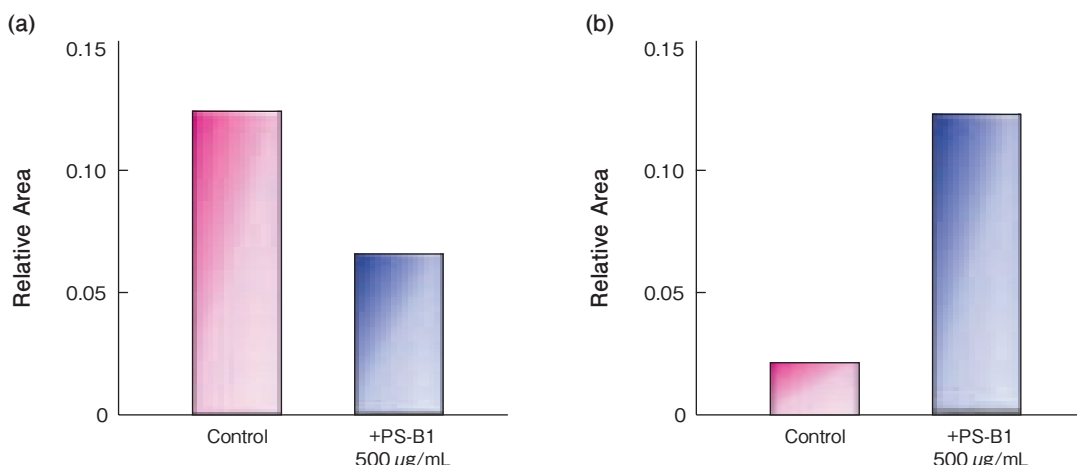


Fig. 4. Effects of PS-B1 on GSH (a) and GSSG (b). GSH and GSSG in HL-60 cells were detected by metabolomic analysis.

等の抗酸化系酵素群が該当する機構である。PS-B1を作用させたHL-60細胞内では活性酸素種が大量発生していることを示したが、本結果は、この活性酸素種の消去にGSHが積極的に消費され、GSSGが大量に発生したことを反映していると示唆された。

JC-1はミトコンドリアの膜電位の状態を反映して異なる色の蛍光を発するプローブであり、ミトコンドリアが正常な状態ではミトコンドリア中に進入し、赤色蛍光を発する（励起波長：560 nm, 蛍光波長：595 nm）。一方、アポトーシス条件下のミトコンドリアでは膜電位の喪失が起こり、JC-1がミトコンドリア内に蓄積されずに細胞質に留まって凝集体を形成するために緑色蛍光を発する（励起波長：485 nm, 蛍光波長：535 nm）。HL-60細胞にPS-B1を作用させた結果、正常状態のミトコンドリアを反映する蛍光強度が徐々に低下し、逆に、膜電位の低下したアポトーシス状態のミトコンドリアを反映する蛍光強度が徐々に増大した（Fig. 5）。図中の折れ線は両者の強度比を示しており、アポトーシスの初期段階として、PS-B1がHL-60細胞のミトコンドリアの膜電位を低下させることが示唆された。

PS-B1を作用させたHL-60細胞について、アポトーシスに関する情報伝達の上流で機能するイニシエーター型カスパーゼ（-2, -8, -9）、および下流で機能するエフェクター型カスパーゼ（-3）の活性を各々測定した（Fig. 6）。その結果、いずれのカスパーゼにおいてもPS-B1の作用により酵素活性が増大することが明らかになった。なお、PS-B1によるがん細胞増殖抑制作用を詳細に吟味する上では、イニシエーターカスパーゼ群の活性化の根拠に関する追加実験を要すると

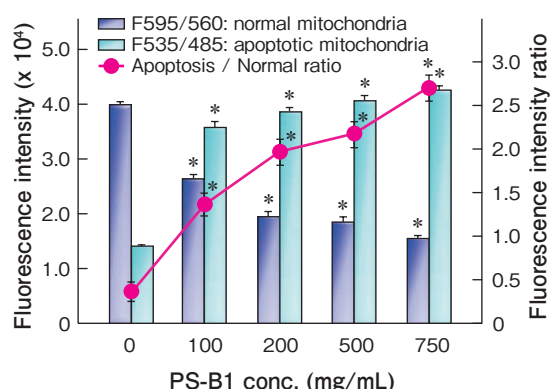


Fig. 5. Effect of PS-B1 on mitochondrial membrane potential of HL-60 cells. HL-60 cells (5×10^5 cells/well) treated with PS-B1 for 4 h were stained with JC-1 using Mitochondrial membrane potential assay kit (Cayman Chemical Co). The aggregates and monomers of JC-1 were detected by measuring the fluorescent intensity at 595 nm with excitation at 560 nm and at 535 nm with excitation at 485 nm, respectively. An asterisk indicates significant difference versus the control ($p < 0.05$).

考える。

HL-60細胞のゲノムDNAに対するPS-B1の影響を検討するために、PS-B1を作用させたHL-60細胞からDNAを抽出し、アガロースゲル電気泳動に供した際の泳動パターンを比較検討した（Fig. 6b）。その結果、PS-B1を作用させたHL-60細胞では、DNAの断片化が顕著に検出された。

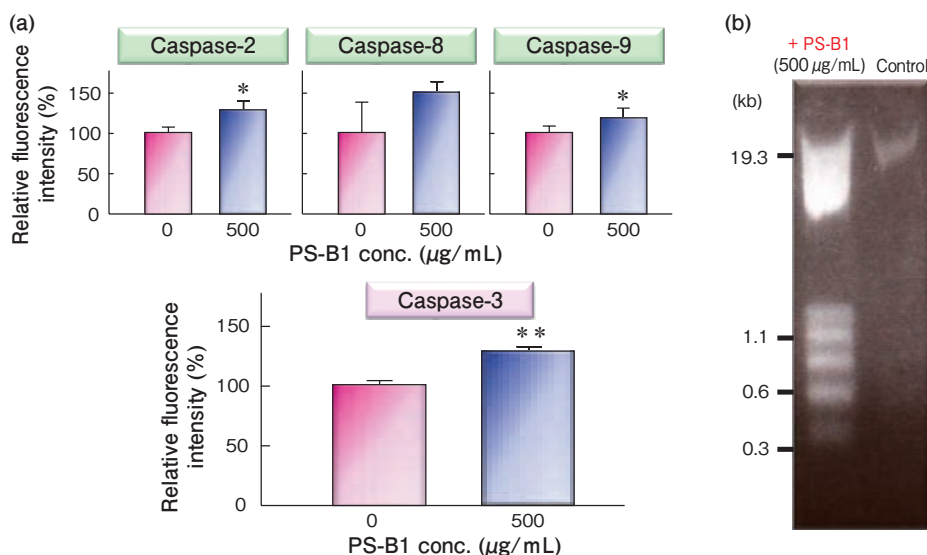


Fig. 6. Effect of PS-B1 on caspase activity of HL-60 cells (a) and DNA fragmentation in HL-60 cells treated with PS-B1 (b). The caspase activity of HL-60 cells (2×10^5 cells) incubated for 4 h in the presence and absence of 500 µg/mL PS-B1 measured using the ApoAlert Caspase Assay Plates (Clontech). DNA in HL-60 cells (1×10^5 cells/mL) incubated for 4 h in the presence of 500 µg/mL PS-B1 was extracted with ApopLadder Ex kit (TaKaRa BIO INC.) and DNA electrophoresis onto a 1.8% agarose gel was carried out at a constant voltage of 100 V for 30 min. Asterisks indicates significant difference versus the control (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

PS-B1のがん細胞増殖抑制作用の作用機序の推測

上記5つの実験で得られた結果から、PS-B1を作用させたHL-60細胞において誘導されるアポトーシスの作用機序の概略を推測した (Fig. 7)。

まず、PS-B1に含まれる成分の一部がHL-60細胞内に取り込まれ、細胞内で活性酸素種の産生量を異常に増大させた。PS-B1が正常細胞とがん細胞において抗酸化と酸化促進の逆の機能を示す根拠は不明のままであるが、これはがん細胞に対して有意な増殖抑制作用を示す茶カテキン等のポリフェノール類においても確認されている現象である⁸⁾。通常、細胞内に発生した活性酸素種はGSHの作用によって消去されるが、GSSGの異常蓄積が見出されたことから、PS-B1含有成分によって産生された活性酸素種量がおそらくがん細胞内GSHの有する消去能を越えたと考えた。さらに、がん細胞では活性酸素種の消去に寄与する酵素群の機能が一般に低下しており、ミトコンドリアがPS-B1によって過剰に産生された活性酸素種の影響を受け、膜電位の低下が生じた。さらに、機能が低下したミトコンドリアからはチトクロムc等のたん白質が放出され、これが刺激となってカスパーゼ-3が活性化し、DNAの断片化を経て細胞死に至ったと推察した。PS-B1が示すがん細胞増殖抑制作用については、上記のアポトー

シスの誘導以外にも「細胞周期の異常 (停止)」や「糖系酵素の阻害」等が作用機序の候補として挙げられる⁹⁾。これまでに、多くの食品抽出物において、これらに関する知見が発表されており、PS-B1においても検討を要する。

今後、PS-B1が示すがん細胞増殖抑制作用の本質となる生理活性物質の探索研究に取り組むとともに、生理活性物質を用いた生化学的、分子生物学的、薬理的解析を介して、新たに得られた知見に基づいた多面的かつ包括的な作用機序の解明を図る。

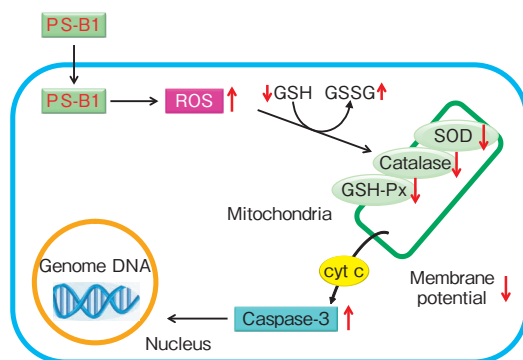


Fig. 7. Growth inhibition action of PS-B1 on HL-60 cells by induction of apoptosis.

要 約

PS-B1が正常細胞に対して有意な悪影響を及ぼさずに、幅広いガン細胞増殖抑制スペクトルを示すことを明らかにした。そこで、ヒト前骨髄性白血病細胞HL-60を対象としてその作用機序の解明を図った。HL-60細胞の培養液中へのカスパーゼ阻害剤の添加により、PS-B1が示すガン細胞増殖抑制作用が有意に解除されたことから、PS-B1がHL-60細胞に対してアポトーシスを誘導していることが示唆された。PS-B1を作用させたHL-60細胞を用いた分光学的解析から、①HL-60細胞内に取り込まれたPS-B1中の成分の影響により細胞内活性酸素種量が異常に増大、②増大した細胞内活性酸素種の影響を受けて還元型グルタチオンレベルが顕著に低下、③還元型グルタチオンの消去能を越えた過剰の細胞内活性酸素種が、シトクロムc等の放出を伴うミトコンドリアの不活化（膜電位の低下）を誘導、④エフェクター型カスパーゼ(-3)の活性の顕著な増大、⑤DNAの断片化、が判明した。これらのことが要因となり、HL-60細胞がアポトーシスに至ったと推察された。

文 献

- 1) 野嶽勇一, 深澤昌史, 榊原隆三 (2008): 最“西”端発「おなかにやさしい、からだにやさしい」最“先”端研究. 生化学, **80**, 444-6.
- 2) Nodake Y, Ogasawara M, Honda H, Fukasawa M and Sakakibara R (2008): Characterization and preliminary purification of the anti-cancer component in the fermented products cultivated from soybean milk using lactic acid bacteria. *Saito Ho-on Kai Mus. of Nat. Hist., Res. Bull.*, **73**, 17-21.
- 3) 野嶽勇一, 深澤昌史, 荒川正幸, 榊原隆三 (2011): 乳酸菌代謝生産物質PS-B1における肝機能および脂質代謝改善作用について. 日本食生活学会誌, **22**, 13-19.
- 4) 石橋源次, 本多英俊, 榊原隆三 (2011): 乳酸菌代謝生産物質 (PS-B1) の非肥満Ⅱ型糖尿病モデルラットに対する血糖上昇抑制効果. 九州共立大学総合研究所紀要, **4**, 71-76.
- 5) 石橋源次, 廣戸美絵, 本多英俊, 榊原隆三 (2011): 乳酸菌代謝生産物質 (PS-B1) の血圧上昇抑制作用. 九州共立大学総合研究所紀要, **4**, 77-80.
- 6) 石橋源次, 宮崎美絵, 本多英俊, 榊原隆三 (2012): アルコール投与されたラットのアルコール濃度に及ぼす乳酸菌生産物質 (PS-B1) 摂取の影響. 九州共立大学総合研究所紀要, **5**, 55-58.
- 7) 榊原隆三, 石橋源次, 野嶽勇一: 乳酸菌生産物質 (バイオジェニックス) の可能性, 権歌書房, 2009
- 8) 久保田芳美, 湯浅 (小島) 明子, 湯 浅 勲 (2003): 緑茶抽出物におけるヒト肝ガン細胞の増殖抑制効果におよぼすROS産生の役割. 生活科学研究誌, **2**, 1-9.
- 9) 野嶽勇一, 深澤昌史, 榊原隆三 (2010): 環状重合乳酸のガン細胞増殖抑制効果. 長崎国際大学論叢, **10**, 239-48.