

ヒト口腔由来扁平上皮癌培養細胞株におけるアポトーシスの誘導と  
アポトーシス関連蛋白質の発現に関する研究

鳥取大学医学部歯科口腔外科学教室 (主任 濱田 駿教授)  
鳥取大学医学部病理学第1教室 (主任 井藤久雄教授)

八 尾 正 己

---

米子医学雑誌 46 卷 1 号 別冊

平成 7 年 1 月

Reprinted from  
THE JOURNAL OF THE YONAGO MEDICAL ASSOCIATION

Vol. 46, No. 1, *January 1995*

ヒト口腔由来扁平上皮癌培養細胞株におけるアポトーシスの誘導と  
アポトーシス関連蛋白質の発現に関する研究

鳥取大学医学部歯科口腔外科学教室 (主任 濱田 駿教授)

鳥取大学医学部病理学第1教室 (主任 井藤久雄教授)

八 尾 正 己

Studies on induction of apoptosis and expression of  
apoptosis related proteins in cultured cells from  
human oral squamous cell carcinomas

Masami YAO

*Department of Oral and Maxillofacial Surgery, and 1st*

*Department of Pathology, Faculty of Medicine, Tottori*

*University, Yonago 683, Japan*

**ABSTRACT**

Apoptosis is a physiological process for the elimination of specific types of cells, described in embryogenesis, morphogenesis, hematogenesis, clonal selection of lymphocytes and tumorigenesis. This study examined the expression of bcl-2, c-myc and p53 proteins during apoptotic cell death induced by anti-Fas antibody in four cultured human oral squamous cell carcinomas. Anti-Fas antibody of 100ng/ml induced apoptotic cell death in the all cell lines examined. Growth-inhibitory effect of anti-Fas antibody was most prominent in HSC-3, followed by HSC-4, HSC-2 and Ca9-22. Apoptotic cell death was confirmed by the chromatin condensation stained with Hoechst Dye 33258 and the DNA fragmentation. No difference was detected in the basal level of Fas protein among four cell lines. C-myc protein was expressed higher in HSC-3 than in other three cell lines. P53 protein did not expressed in HSC-3. Expression of bcl-2 protein was apparently higher in Ca9-22 than in HSC-3. These results indicate that the proteins examined play a crucial role on the occurrence of apoptosis in the cultured oral squamous cell carcinomas, especially inhibitory effect of bcl-2 and mutated p53 protein.

(Accepted on November 7, 1994)

**Key words :** apoptosis

anti-Fas antibody

cultured cells from human oral squamous cell carcinoma

bcl-2, p53, c-myc

## 緒 言

細胞死には壊死(ネクローシス)と細胞自滅(アポトーシス)が区別される。前者のネクローシスは虚血、毒素、火傷などの病理的要因により、一群の細胞において生じるものである<sup>27)</sup>。形態的には細胞質内とくにミトコンドリアの膨化から始まり、エネルギー産生の不全による細胞の膨潤化、膜破壊、そして分解酵素の放出・活性化が進み炎症反応を引き起こす。他方、後者のアポトーシスは積極的かつ制御された細胞死であり、生理的細胞死、計画的細胞死(programmed cell death)あるいは制癌剤、放射線などで誘発される散在性細胞死が含まれる。

アポトーシスは胸腺をはじめ腸上皮、腎、乳腺などの多くの正常組織で観察され、細胞分裂(mitosis)に対し、細胞排除機構として1972年 Kerrら<sup>18)</sup>によって提唱された。アポトーシス細胞の形態的特徴は、核の濃縮、細胞膜の変形と細胞の萎縮、細胞核の断片化であり、引き続く細胞の崩壊すなわちアポトーシス小体の形成、食食による排除が挙げられる。アポトーシスの生化学的プロセスとメカニズムについては、細胞内カルシウム濃度の上昇、カルシウム依存性エンドヌクレアーゼの活性化、これによるヌクレオソーム単位のDNAの切断が示されている。アポトーシスは、ホルモン<sup>6)</sup>、形質転換成長因子(TGF- $\beta$ )<sup>29)</sup>、腫瘍壊死因子、抗Fas抗体<sup>30)</sup>、ある種の抗癌剤<sup>16)</sup>、放射線<sup>21)</sup>などの刺激で誘発される。

細胞がアポトーシスを呈する場合の特徴としては、生理的な死の形態をとるため周囲組織を炎症などの非生理的な状況に追い込まず、かつその反応が早期に終了することが挙げられる。癌細胞を選択的にアポトーシスに誘導することが可能ならば、速やかにかつ宿主への影響を最小限にした治療が可能となる。こうしたことから、近年癌細胞におけるアポトーシスの誘発が注目されている。薬物による誘発が可能となれば治療への臨床応用が期待されるからである。しかしながら、ヒト癌細胞におけるアポトーシスの発現に関する報告は少なく、わずかに悪性リンパ腫<sup>19)</sup>、前立腺癌<sup>1)</sup>、胃癌<sup>15)</sup>における検討が見い出されるのみである。各種組織におけるアポトーシスの発現、あるいは各種細胞株におけるアポトーシスの誘発が試みられているが、扁平上皮癌における研究は見あたら

ない。そこで、ヒトの口腔由来扁平上皮癌培養細胞株に抗Fas抗体を用いてアポトーシスを誘発し、その時のアポトーシス関連蛋白質の変化について検討した。

翻って、本研究の対象である口腔扁平上皮癌は5年累積生存率が約50%に達している<sup>28)</sup>。一般的には外科療法、制癌剤、放射線照射の三者併用療法が実施されるが、外科療法を適用した場合、明らかに治療成績の向上が認められるものの、顎口腔領域においては機能的、審美的に障害を残すことが多い。再建術式の進歩によりこれらの障害は大きく軽減されたが、未だ満足すべきものではない。保存的療法として期待されるものの一つとして、生物学的応答修飾物質(Biological Response Modifier, 以下BRM)を用いた免疫療法や、BRMと既存の化学療法薬との併用療法が考えられている<sup>25)</sup>。

口腔扁平上皮癌にアポトーシスを誘発することが可能となれば、その治療成績は大幅に改善されることが期待される。そこで、口腔扁平上皮癌におけるアポトーシス研究の第一歩として、本研究では株化ヒト扁平上皮癌を用い、アポトーシスの誘発を試みた。加えて、各種のアポトーシス関連蛋白質の発現を解析した。口腔扁平上皮癌のアポトーシス誘発における各種関連蛋白質の関与を解析することが本研究の目的である。

## 材料および方法

### 1. 培養細胞株および培養法

細胞バンク(Japanese Cancer Research Resources Bank:JCRB)より供与されたヒト口腔由来扁平上皮癌培養細胞株Ca9-22<sup>13)</sup>、HSC-2<sup>20)</sup>、HSC-3<sup>20)</sup>、HSC-4<sup>20)</sup>を用いた(表1)。

ダルベッコ変法イーグル最小必須培養液(日本製薬社製)と、ハムF12培養液(日本製薬社製)を1:1にて混合(以下DH培養液)し、8%牛胎児血清、ペニシリンGカリウム100単位/ml、ストレプトマイシン100 $\mu$ g/mlを添加し、上記細胞株を37 $^{\circ}$ C5%CO<sub>2</sub>存在下で培養した。

### 2. 増殖曲線

#### (1)細胞増殖に及ぼす抗Fas抗体の影響

上記培養細胞株を35mm径のプラスチックディッシュに5 $\times$ 10<sup>4</sup>個植え込み静置培養した。24時間後、 $\gamma$ 型インターフェロン(シオノギ製薬より供与、以下IFN- $\gamma$ )50国内標準単位(Japan Refer-

表1 口腔由来扁平上皮癌細胞株の性状

細胞株	Ca9-22	HSC-2	HSC-3	HSC-4
原発部位	歯肉	口底	舌	舌
培養株樹立部位	原発巣	リンパ節転移巣	リンパ節転移巣	リンパ節転移巣
分化度	高分化	高分化	低分化	高分化
p53遺伝子変異	変異型 (点突然変異)	変異型 (ストップコドン)	変異型 (挿入変異)	変異型 (点突然変異)

文献13), 14), 20) より引用

ence Unit, 以下JRU)/ mlを添加し, 前処理とした. 24時間後にCa<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>不含リン酸緩衝液(以下PBS(-))で2回洗浄し, 抗Fas抗体(医学生物学研究所製)100ng/mlを添加した. 24時間後に0.1%トリプシン-0.02%EDTAで細胞を剝離採取した. 0.02%トリパンブルー染色して生細胞数を血球計算板にて計測した. また, 経時の変化を検討するため, 上記と同様に24, 48, 72, 96時間後における生細胞数を計測した.

#### (2)細胞増殖に及ぼすIFN- $\gamma$ の影響

前処理に使用したIFN- $\gamma$ が細胞増殖に与える影響についての検討を行う目的で, 上記培養細胞株を35mm径のプラスチックディッシュに5×10<sup>4</sup>個植え込み静置培養した. 24時間後, IFN- $\gamma$ を添加しないDH培養液およびIFN- $\gamma$  50JRU/mlを添加したDH培養液と交換して静置培養した. さらに24時間後PBS(-)で2回洗浄した後, IFN- $\gamma$ 添加群および非添加群のそれぞれを, 抗Fas抗体を含まないDH培養液および抗Fas抗体100ng/mlを含有したDH培養液と交換した. それぞれを未処理群(a), IFN- $\gamma$ 単独処理群(b), 抗Fas抗体単独処理群(c), IFN- $\gamma$ および抗Fas抗体処理群(d)として静置培養した. 24時間後に細胞を剝離採取し, 0.02%トリパンブルー染色して生細胞数を血球計算板にて計測した.

#### 3. 蛍光色素染色

細胞死の形態を評価する目的で, 蛍光色素Hoechst Dye 33258で染色した. IFN- $\gamma$  50JRU/mlで24時間の前処理を行い, 抗Fas抗体100ng/mlを添加培養した. 24, 48, 72時間後に細胞を採取し, スライドガラスに塗抹しカルノア固定を施した. 0.075 $\mu$ g/mlに調整したHoechst Dye 33258(Sigma社製), 0.15 $\mu$ g/mlに調整したチメロサー

ルで30分間染色した後, 蛍光顕微鏡にて核の形態を観察した.

#### 4. アガロースゲル電気泳動

Ca9-22およびHSC-3については, 抗Fas抗体添加培養後にDNAを抽出しアガロースゲル電気泳動を施行した. IFN- $\gamma$  50JRU/mlで24時間前処理した後にPBS(-)で2回洗浄し, 抗Fas抗体100ng/mlを添加した. 12, 24, 48時間後に浮遊している細胞および付着している細胞を採取した.

採取した細胞を, 0.2%SDSおよびRNAase(100 $\mu$ g/ml)を含むlysis buffer(20mM Tris (pH 8.0), 5mM EDTA, 100mM NaCl)で50℃3時間インキュベートした. 次にproteinase K(100ng/ml)を添加し, さらに50℃1時間インキュベートして蛋白質を分解した. フェノールで除蛋白し, 100%エタノールでDNAを沈澱させて回収した. 抽出したDNAを5 $\mu$ g/laneに調整し, 2%アガロースゲルにて100V, 50分間電気泳動を行った. 1 $\mu$ g/mlの臭化エチチウムで染色した後, 紫外線励起下で観察した.

#### 5. ウェスタンブロット法

(1)Fas抗原およびアポトーシス関連蛋白質の解析

上記4系の細胞株について, 未処理細胞およびIFN- $\gamma$  50JRU/mlで24時間前処理を施した細胞におけるFas抗原, bcl-2蛋白質, p53蛋白質, c-myc蛋白質の発現をウェスタンブロット法で検索した. 未処理およびIFN- $\gamma$ で24時間処理した細胞を, 100mmディッシュに飽和状態(confluent)に達する直前まで培養し, 上清を除去しPBS(-)で2回洗浄した後, 付着細胞のみをセルスクレイパーで採取した. 細胞をlysis buffer(0.1% Nonidet 40, 50mM トリス塩酸緩衝液pH7.4,

125mM NaCl, 50mM NaF, 5mM EDTA, 0.5 mM Phenylmethylsulfonyl fluoride, 1  $\mu$ M Leupeptin, 1  $\mu$ M Aprotinin, 10 $\mu$ M Soybean trypsin inhibitor, 10 $\mu$ M tosyl phenylaminechlor-methylketone) 1 ml中に移し, Bortex mixerで攪拌後, 水中で30分間振盪した. 再度Bortex mixerで攪拌し, 水中で30分間振盪を行った. 4 $^{\circ}$ C, 15,000回転で5分間遠沈し, 上清を採取した. 蛋白質の定量はプロテインアッセイキット (Bio-Rad社製) を用いたBradford法により, 590nmの波長をマイクロプレートリーダー (model 450, Bio-Rad社製) を用いて測定した. 標準蛋白質としては, ウシ血清アルブミン (Sigma 社製) を用いた.

抽出した蛋白質は100 $\mu$ gを95 $^{\circ}$ Cで5分間熱処理した後, 10% SDS-ポリアクリルアミドゲル (SDS-PAGE) にて電気泳動した.

バッファータンク型転写装置 (マリソル社製) において, ゲルから孔径0.45 $\mu$ mのニトロセルロースフィルター (Schleicher & Schuell社製) に転写した. ニトロセルロースフィルターを乾燥し2.5%脱脂粉乳でブロッキングした後, 各種抗体を至適濃度に希釈して反応させた. なお, 使用した一次抗体の希釈濃度および入手先は表2に記した. 二次抗体は, ペルオキシダーゼ標識抗マウスIgG1抗体を500倍希釈して用いた. バンドの検出は, 非RI標識のEnhanced Chemiluminescence (ECL) ウェスタンブロッティング検出システム (アマシャム社製) を使用し, Scientific Imaging Film (Kodak社製) を感光させた. 露光時間は30秒, 1分, 5分, 15分, 12時間の5通りを行い, 最適な条件のものを選んだ. デンシトメトリーを用いて発現量の比較を行った.

(2)抗Fas抗体添加後のアポトーシス関連蛋白質の経時的变化

Ca9-22, HSC-3についてIFN- $\gamma$  50JRU/mlで

24時間前処理を施した後, 抗Fas抗体添加1, 2, 3, 6, 24時間後に上清を除去し, PBS(-)で2回洗浄, 付着細胞のみをセルスクレイパーにて採取した. 未処理細胞およびIFN- $\gamma$ 処理細胞の解析と同様にしてbcl-2蛋白質, p53蛋白質, c-myc蛋白質の経時的な変化を検索した.

## 結 果

### 1. 口腔扁平上皮癌細胞増殖に及ぼす抗Fas抗体の影響

抗Fas抗体100ng/ml添加24時間後における各細胞株の増殖率を検討した. IFN- $\gamma$ で24時間処理した細胞をコントロール群として, 抗Fas抗体添加群の生細胞数の百分率にて増殖率を求めた. 抗Fas抗体添加24時間後の増殖率はCa9-22では88.8 $\pm$ 2.7%, HSC-2では62.1 $\pm$ 7.2%, HSC-3では48.4 $\pm$ 8.2%, HSC-4では65.1 $\pm$ 5.3%であった. Ca9-22に比較し, HSC-2, HSC-3, HSC-4では有意 ( $p < 0.05$ ) に増殖が抑制されていた (図1).

次に, 各細胞株の24, 48, 72, 96時間後における増殖率の変化を検索した (図2). 各細胞株における時間的变化は, HSC-2, HSC-3, HSC-4では抗Fas抗体添加24時間後には増殖率の低下を示したが, Ca9-22では48時間後に増殖率の低下が著明になった. また, 4系全ての細胞株で72時間以後における増殖率の低下は減少傾向を示した. そこで各細胞株間の増殖率の差を比較検討した. Ca9-22とHSC-2は72時間後から増殖率に有意差 ( $p < 0.05$ ) を認め, 96時間後には差は増大した. Ca9-22とHSC-3は, 計測した全ての時間において増殖率に有意差 ( $p < 0.001$ ) があつた. Ca9-22とHSC-4は48時間後を除いて増殖率に有意差 ( $p < 0.001$ ) があつた. HSC-2とHSC-4は全ての時間で差はなかつた. HSC-3とHSC-2, HSC-4では72時間までは増殖率に有意差 ( $p < 0.05$ ) があつたが, 96時間後には差はなくなつた.

表2 一次抗体の希釈濃度と入手先

抗体名	希釈濃度	入手先
抗Fas抗体	(モノクローナル) 1 0 0 倍	MBL
抗bcl-2抗体	(モノクローナル) 5 0 倍	Dako
p53抗体	(モノクローナル) 3 0 倍	Novocastra
抗c-myc抗体	(モノクローナル) 1 2 0 倍	Oncogene Science

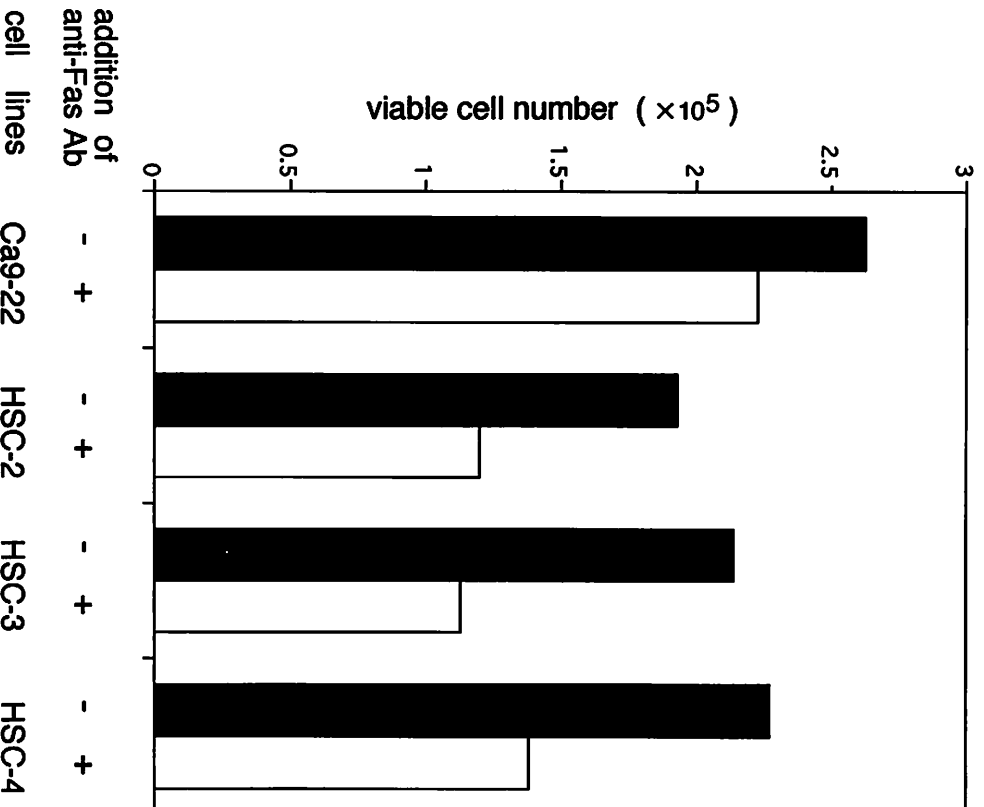


図1. 抗Fas抗体添加24時間後の生細胞数 (mean, n=12)  
 抗Fas抗体添加24時間後の増殖率では, Ca9-22とHSC-2, HSC-3, HSC-4の間に有意差 ( $p < 0.05$ )  
 がある (t-検定).

2. 抗Fas 抗体の細胞増殖抑制に及ぼすIFN- $\gamma$ 前  
 処理の影響

未処理群 (a)の生細胞数に対する抗Fas抗体単  
 独処理群 (c)の生細胞数の百分率 ( $c/a \times 100\% =$   
 A), IFN- $\gamma$ 単独処理群 (b)の生細胞数に対する  
 IFN- $\gamma$ および抗Fas抗体処理群 (d)の生細胞数の  
 百分率 ( $b/d \times 100\% = B$ )を比較して, 抗Fas抗体  
 の細胞増殖に及ぼすIFN- $\gamma$ 前処理の影響を検索し

た.

全ての細胞株において, IFN- $\gamma$ による前処理は  
 増殖率の軽度低下を示したが, 有意差はなかった  
 (図3).

3. 抗Fas抗体による増殖抑制細胞の形態とDNA  
 断片化

(1)蛍光色素染色

上記4系の細胞株のうち, 抗Fas抗体の添加培

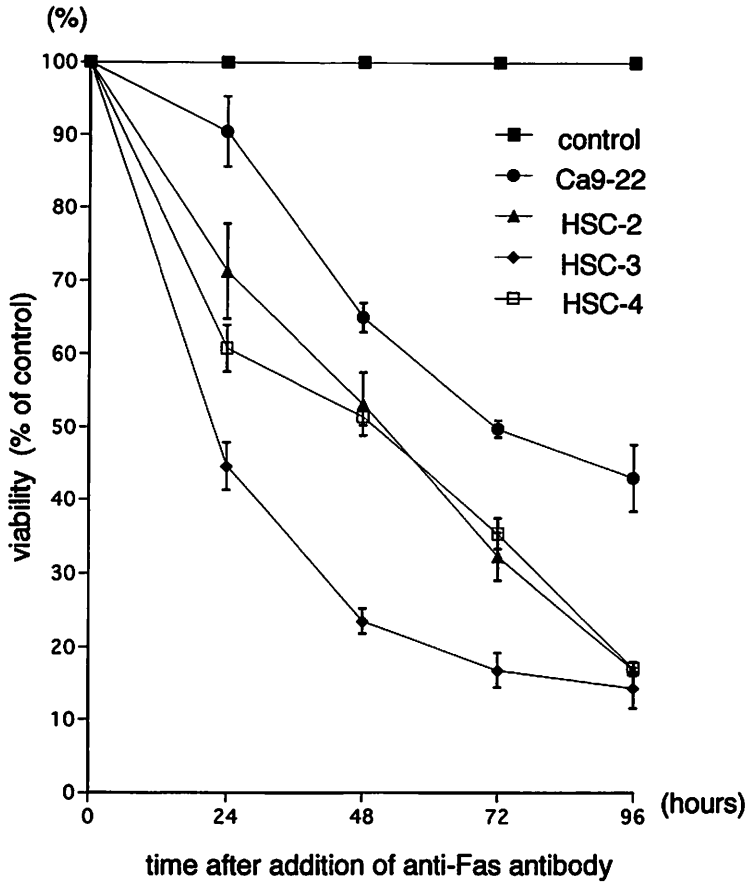


図2. 細胞増殖に及ぼす抗Fas抗体の時間的影響 (mean±SE, n=6)

経時的な増殖率の変化を検討すると、コントロールに比較してHSC-2 ( $p < 0.05$ ), HSC-3 ( $p < 0.01$ ), HSC-4 ( $p < 0.05$ ) では24時間後から有意な増殖率の低下がある。他方, Ca9-22では48時間後から増殖率が有意に低下している ( $p < 0.01$ )。

養による増殖抑制率が最低であったCa9-22, 最高であったHSC-3に蛍光色素染色を施行した。両者ともIFN- $\gamma$ で24時間前処理を行い, 抗Fas抗体添加24時間後に核の断片化によるアポトーシス小体が観察された(図4)。48, 72時間後においては破片化した核断片が遊離する傾向が見いだされた。また, 抗Fas抗体単独処理群にもアポトーシス小体を認めた。しかし, プラスティックディッ

シュ内にカバーガラスを置いて付着細胞のみを染色すると, アポトーシス小体の検出率は著しく減少した。他方, 未処理細胞およびIFN- $\gamma$ 単独処理細胞では24, 48, 72時間後の観察においてアポトーシス小体は認められなかった。

(2)アガロースゲル電気泳動

Ca9-22においては, 抗Fas抗体添加24, 48時間後の浮遊細胞に核DNAの断片化による梯子(lad-

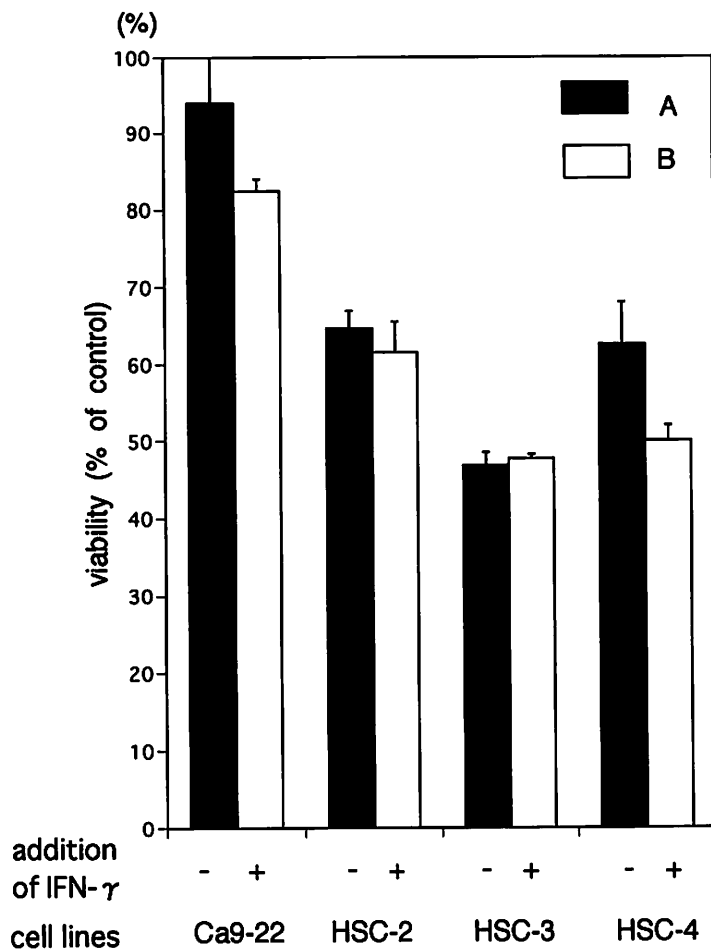


図3. 抗Fas抗体の細胞増殖抑制に及ぼすIFN- $\gamma$ 前処理の影響 (mean  $\pm$  SE, n=6)

- A: IFN- $\gamma$ による前処理を行わず抗Fas抗体を添加した細胞の増殖率
- B: IFN- $\gamma$ による前処理を行った後抗Fas抗体を添加した細胞の増殖率

4系すべての細胞株において、IFN- $\gamma$ による前処理は増殖率の軽度低下を示したが、有意差はない。

der) 状の泳動像が見いだされたが、前者の方がより鮮明であった。HSC-3では、24時間後の浮遊細胞に梯子状泳動像を認めたが、48時間後の浮遊細胞ではスメア状となっていた (図5)。

他方、Ca9-22, HSC-3の付着細胞ではいずれの処理においても梯子状泳動像は見いだされなかった。

#### 4. 未処理細胞およびIFN- $\gamma$ 処理細胞におけるア

#### ポトース関連タンパク質の発現

Fas抗原は上記4系のいずれの細胞株にも43キロダルトン (kilodalton, 以下kDa) のバンドがあったが、デンストメトリーによる計測で発現量に差はなかった (図6a)。bcl-2蛋白質は、Ca9-22においては発現が高く、HSC-2, HSC-4における発現は中等度、HSC-3においては極めて微弱な発現が見いだされた (図6b)。p53蛋白質は、



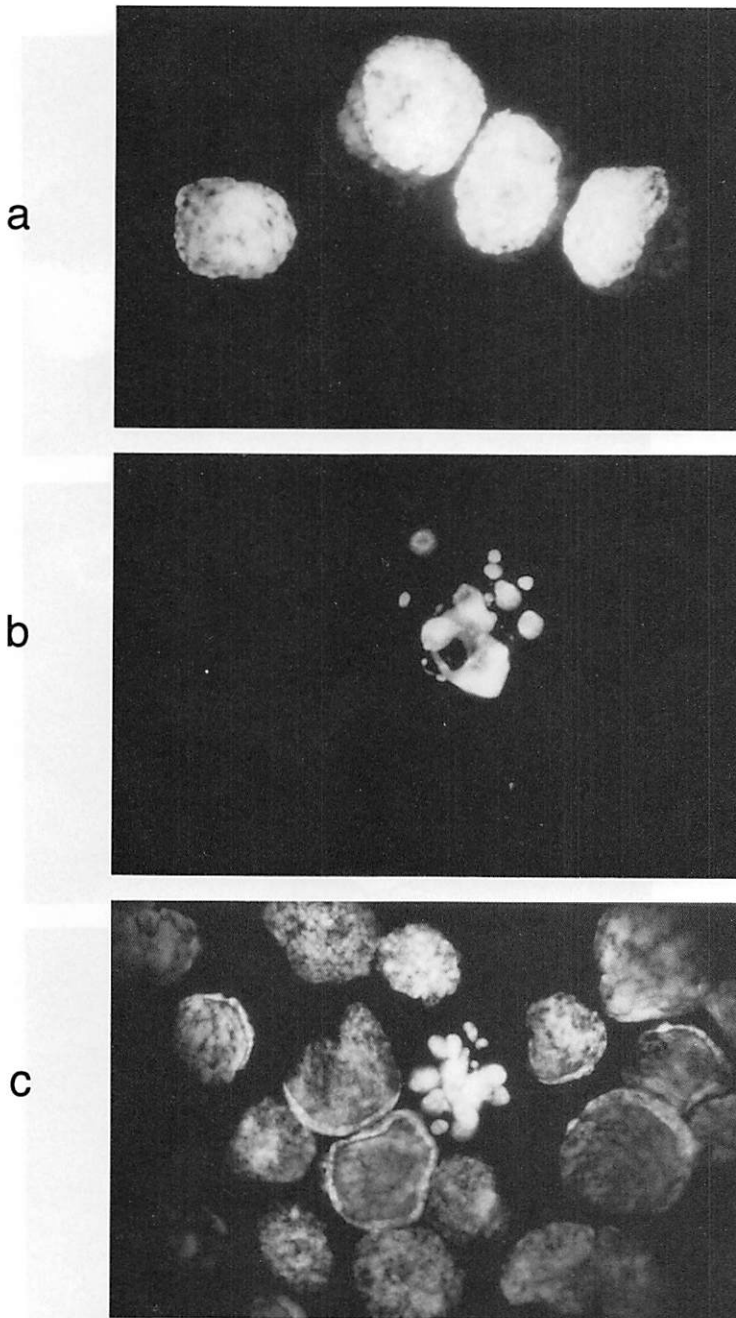
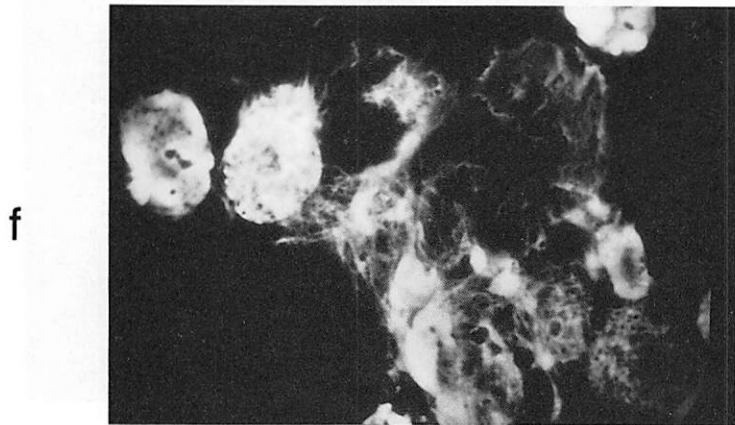
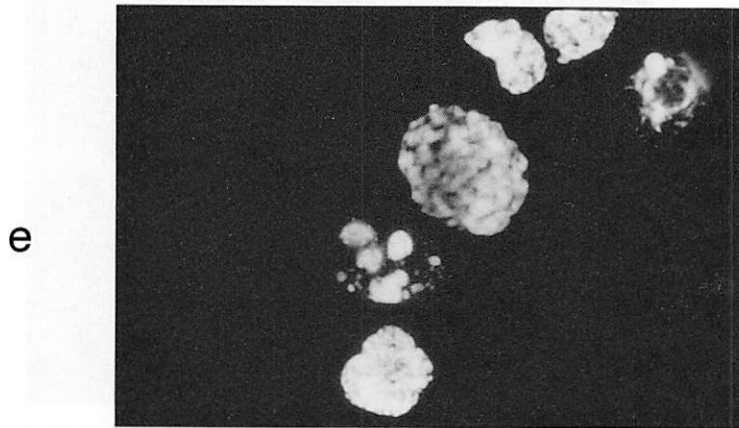
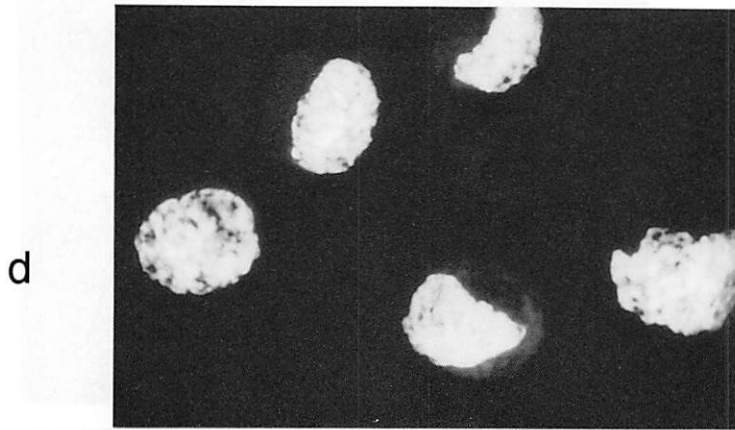


図4. 蛍光色素染色によるアポトーシス小体の検出

- a. Ca9-22 : 未処理細胞
- b. Ca9-22 : 抗Fas抗体添加24時間後
- c. Ca9-22 : 抗Fas抗体添加72時間後



d. HSC-3 : 未処理細胞

e. HSC-3 : 抗Fas抗体添加24時間後

f. HSC-3 : 抗Fas抗体添加72時間後

抗Fas抗体添加24時間後ではCa9-22, HSC-3に細胞核の断片化によるアポトーシス小体が見い出される。

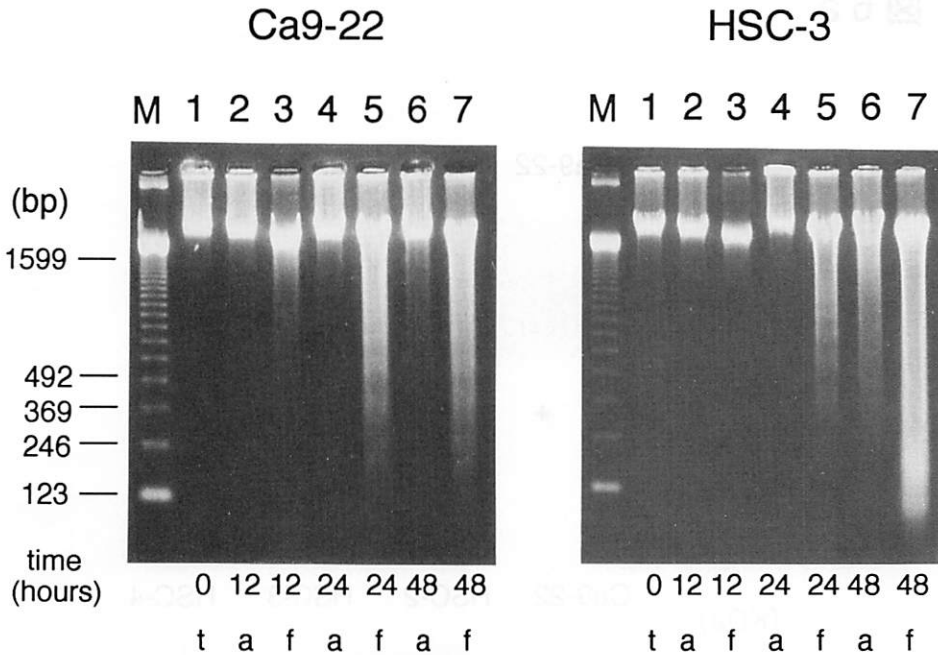


図5. アガロースゲル電気泳動によるDNA梯子 (ladder)状構造の発現

M:サイズマーカー,

- 1列: IFN- $\gamma$ 単独処理 (24時間) 後の全細胞
- 2列: 抗Fas抗体添加 (12時間) 後の付着細胞
- 3列: 抗Fas抗体添加 (12時間) 後の浮遊細胞
- 4列: 抗Fas抗体添加 (24時間) 後の付着細胞
- 5列: 抗Fas抗体添加 (24時間) 後の浮遊細胞
- 6列: 抗Fas抗体添加 (48時間) 後の付着細胞
- 7列: 抗Fas抗体添加 (48時間) 後の浮遊細胞

Ca9-22においては、抗Fas抗体添加24時間、48時間後の浮遊細胞でDNA断片化による梯子 (ladder) 状の泳動像が認められるが、前者の方がより鮮明である。HSC-3では、24時間後の浮遊細胞が梯子状泳動像を示すが、48時間後の浮遊細胞ではスメア状となっている。

Ca9-22, HSC-2, HSC-4にはほぼ同等な発現があったが、HSC-3には発現していなかった (図6c)。c-myc蛋白質は上記4系のいずれの細胞株にも67KDaと64KDaの位置に発現していたが、HSC-3では他の細胞株より発現がやや高かった (図6d)。また、IFN- $\gamma$ による前処理はこれら細胞株の蛋白質の発現に影響を及ぼさなかった。

#### 5. 抗Fas抗体添加後のアポトーシス関連蛋白質の経時的变化

Ca9-22およびHSC-3におけるbcl-2蛋白質の発現は、抗Fas抗体添加培養後に経時的变化を示さ

なかった (図7a)。

Ca9-22におけるp53蛋白質の発現は、抗Fas抗体添加3時間後から増加し、観察した24時間まで高いレベルを保った (図7b)。なお、Ca9-22におけるp53蛋白質の発現は細胞の増殖相において異なっており、対数増殖期における発現は低いが、飽和状態 (confluent) になると発現が高くなった (図7b, lane8)。他方、HSC-3では経時的観察においても発現は見い出せなかった。

Ca9-22におけるc-myc蛋白質の発現は抗Fas抗体添加3時間後から増加し24時間では高い発現を

図 6 a.

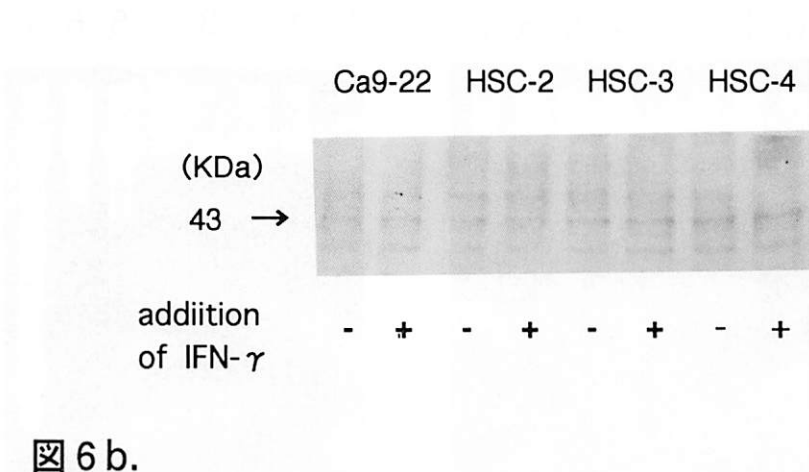


図 6 b.

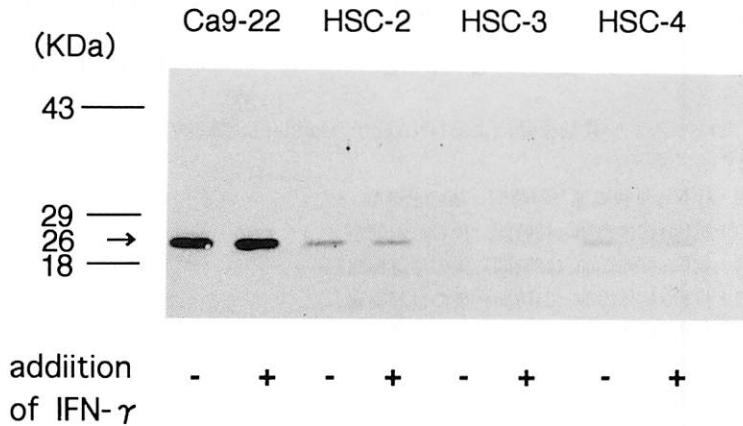


図 6 a, b, c, d. 未処理細胞およびIFN- $\gamma$ で前処理を施した細胞のアポトーシス関連タンパク質の発現

a. Fas抗原の発現

4系の細胞株の発現量に差はない。

b. bcl-2蛋白質の発現

Ca9-22では発現が高く、HSC-2, HSC-4の発現は中等度、HSC-3で極めて微弱な発現が見いだされた。

示していた。他方、HSC-3では発現に経時的变化はなかった (図7c)。

考 察

本研究において、口腔由来扁平上皮癌細胞株に抗Fas抗体100ng/mlを添加培養すると時間依存的に細胞増殖が抑制された。この時の増殖抑制率は

同じ扁平上皮癌でも細胞株により異なっていた。各細胞株における時間的变化は、HSC-2, HSC-3, HSC-4では抗Fas抗体添加24時間後から増殖抑制を示したが、Ca9-22では48時間後から増殖抑制が著明になった。すなわち、HSC-2, HSC-3, HSC-4では比較的早期に、Ca9-22ではやや遅れて増殖抑制が起こることが示唆された。また、

図 6 c.

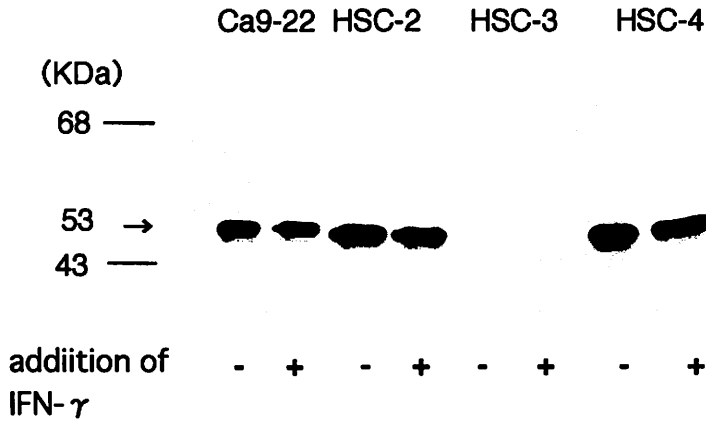
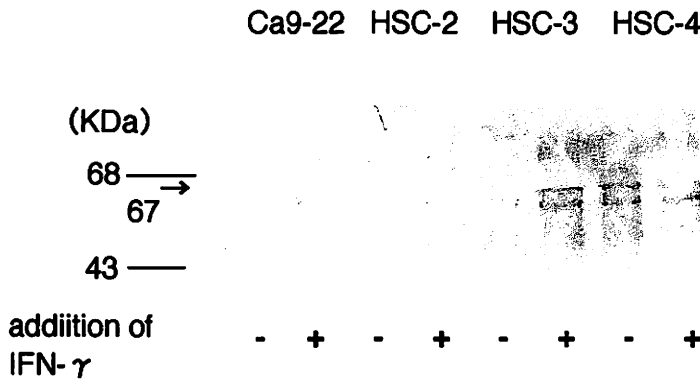


図 6 d.



c. p53蛋白質の発現

Ca9-22, HSC-2, HSC-4には発現が見い出されたが, HSC-3に発現はない。

d. c-myc蛋白質の発現

上記4系のいずれの細胞株にも67KDaと64KDaの位置に発現がある。HSC-3では他の細胞株より発現がやや高い。

4系全ての細胞株で72時間以後における増殖抑制率は低下傾向を示した。次に増殖抑制率の各細胞株間における差を比較検討した。Ca9-22の増殖抑制率は低かったがHSC-3の増殖抑制率は高く、両者には計測した全ての時間において有意差があった。HSC-2とHSC-4は両者とも中等度の増殖抑制率を示し、全ての時間で差はなかった。Ca9

-22とHSC-2は72時間後から有意差を認め、96時間後には差が増大した。Ca9-22とHSC-4は48時間後を除いて有意差があった。HSC-3とHSC-2, HSC-4では72時間までは有意差があったが、96時間後には差はなくなった。このように、抗Fas抗体の添加培養が細胞増殖に及ぼす影響は、細胞株の違いにより明らかな差のあることが示され

図7a.

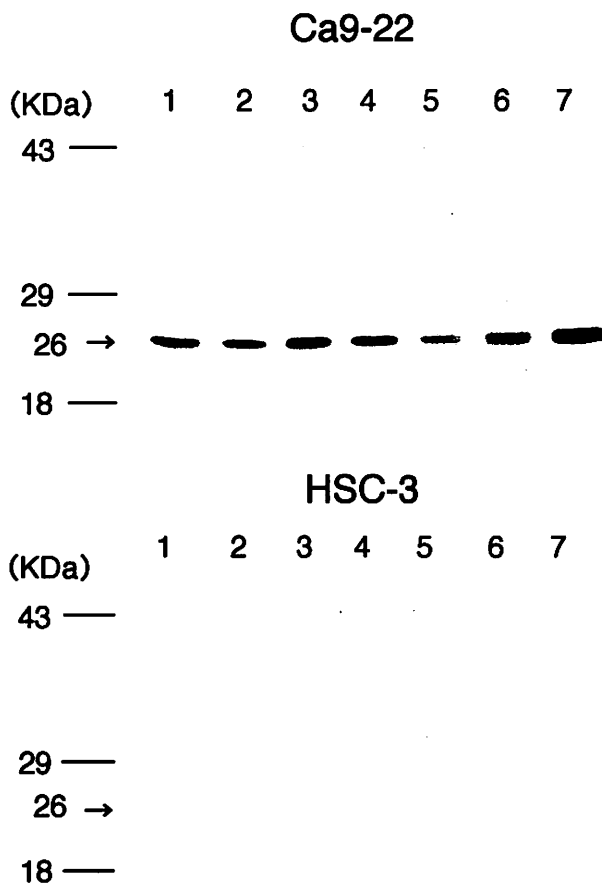


図7 a, b, c. 抗Fas抗体の添加培養によるアポトーシス関連タンパク質の経時的変化

1列：未処理（対数増殖期），2列：IFN- $\gamma$ 単独処理（24時間），3列：IFN- $\gamma$ 処理後，抗Fas抗体添加1時間後，4列：IFN- $\gamma$ 処理後，抗Fas抗体添加2時間後，5列：IFN- $\gamma$ 処理後，抗Fas抗体添加3時間後，6列：IFN- $\gamma$ 処理後，抗Fas抗体添加6時間後，7列：IFN- $\gamma$ 処理後，抗Fas抗体添加24時間後，8列：飽和状態においたCa9-22未処理細胞のp53蛋白質の発現

## a. bcl-2蛋白質の発現

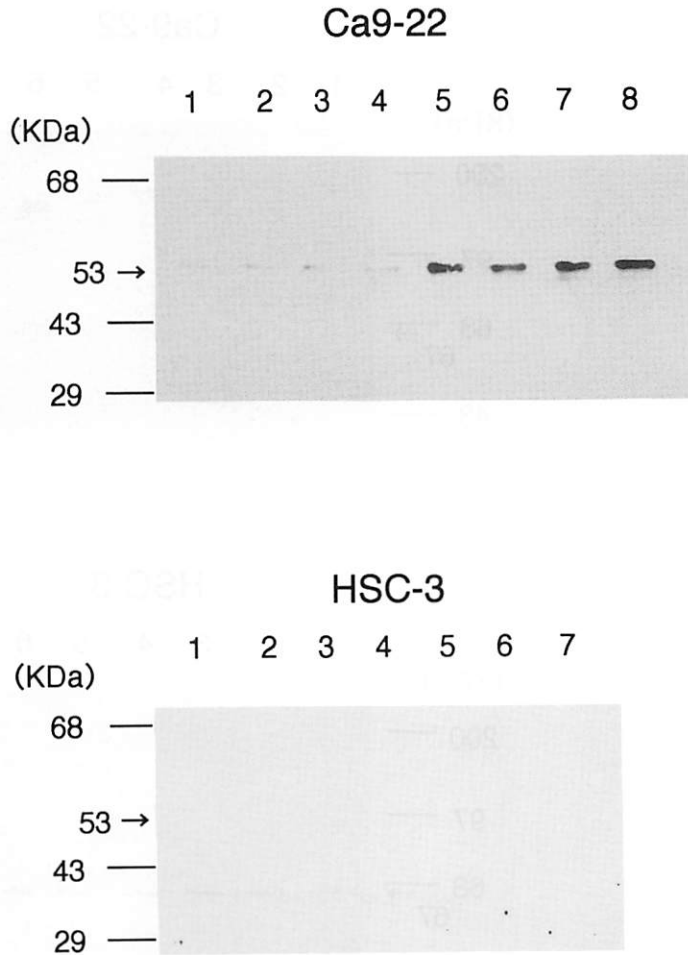
Ca9-22およびHSC-3では抗Fas抗体添加培養後にbcl-2蛋白質発現の経時的変化はない。

た。

抗Fas抗体が認識するFas抗原は，神経成長因子/腫瘍壊死因子レセプターファミリーに属する細胞表面蛋白質である．抗Fas抗体はアポトーシスを誘発する<sup>30)</sup>．IFN- $\gamma$ は，クラスII主要組織適合抗原の誘導を介して腫瘍関連表面抗原の表出を増強し，抗腫瘍効果のひとつを担うといわれてい

る<sup>24)</sup>．さらに，IFN- $\gamma$ はFas抗原の表出を増加させ大腸癌由来のHT-29，骨髄性白血病由来のHL60などの細胞株において抗Fas抗体の作用を増強することが示されている<sup>30)</sup>．しかし，本研究において使用した細胞株では，IFN- $\gamma$ の前処理は抗Fas抗体の増殖抑制に影響を及ぼさなかった．こうした違いは，IFN- $\gamma$ の添加濃度もしくは本研究

図7b.



## b. p53蛋白質の発現

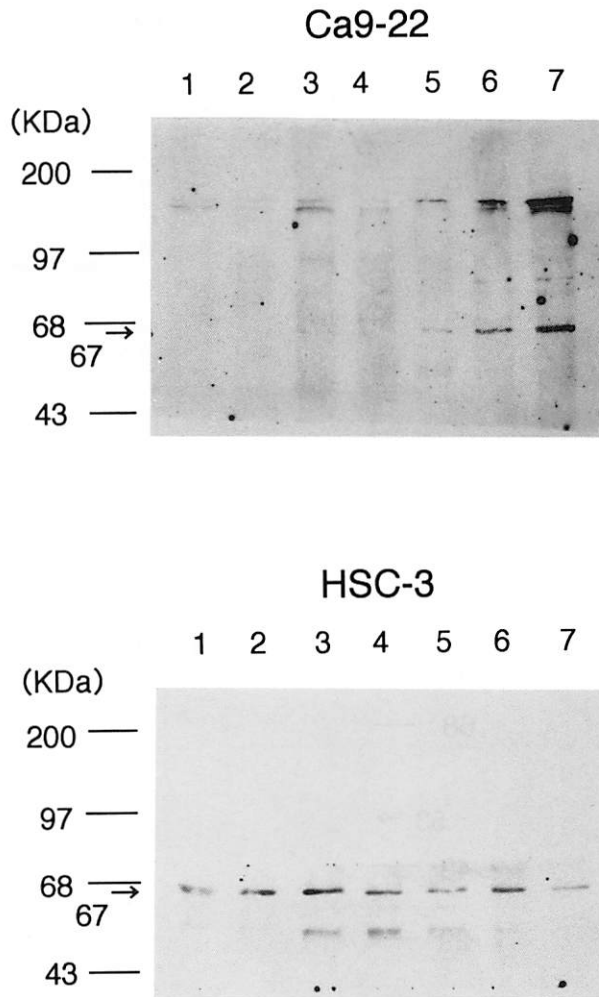
Ca9-22におけるp53蛋白質の発現は、抗Fas抗体添加3時間後から増加し、24時間まで高いレベルを保っている (図7b)。なお、Ca9-22におけるp53蛋白質の発現は細胞の増殖相において異なっており、対数増殖期における発現は低い、飽和状態 (confluent) になると発現が高い (図7b, lane8)。他方、HSC-3では経時的観察においても発現はない。

に使用した細胞株のIFN- $\gamma$ に対する感受性の差により生じることが考えられる。

細胞核形態の観察では、Ca9-22、HSC-3にIFN- $\gamma$ で前処理を行い、抗Fas抗体で24時間処理した細胞に核の断片化によるアポトーシス小体が観察された。また、IFN- $\gamma$ による前処理を行わず、抗Fas抗体だけで24時間処理をした細胞にも核の

断片化によるアポトーシス小体が観察された。このことから、今回使用した細胞株では、抗Fas抗体によるアポトーシスの誘発は必ずしもIFN- $\gamma$ による前処理を要しないことが示唆された。抗Fas抗体添加24時間以後では、アポトーシス小体の検出率は減少傾向を示した。生体内においては、アポトーシスに陥った一部の細胞はマクロフ

図7c.



### c. c-myc蛋白質の発現

Ca9-22におけるc-myc蛋白質の発現は抗Fas抗体添加3時間後から増加し24時間では高い発現を示した。他方、HSC-3では発現に経時的变化はない。

ァージや近傍の細胞に貪食されるが、培養系の細胞株ではこのような貪食機能を持った細胞は存在しない。したがって、アポトーシスに陥った細胞は時間の経過とともにアポトーシス小体の形態を保てなくなると考えられる。このことはアガロースゲル電気泳動においても示された。抗Fas抗体添加24時間後の浮遊している細胞ではDNAの梯

子状構造が見いだされたが、48時間後のCa9-22では不鮮明化し、HSC-3ではスメア化していた。アポトーシスに陥り長時間経過した細胞では、スクレオソームの破壊が生じると考えられる。抗Fas抗体の添加培養で高い増殖抑制率を示したHSC-3ではアポトーシスの進行がより速やかで、スクレオソームの破壊が早期に始まりスメア化し



た泳動像が観察されたと考えられる。付着細胞には梯子状およびスメア化した泳動像は観察されなかった。付着性細胞株の場合、DNAの断片化は細胞が浮遊してから生じることが示唆された。

興味あることに、Fas抗原の発現量は本研究に用いた4系の細胞株で差がなかったにもかかわらず、増殖抑制率が異なっていた。すなわち、それぞれの細胞株におけるアポトーシスへ至る細胞内シグナル伝達系の違いが存在する可能性が示唆される。あるいは、シグナル伝達系は同じでもアポトーシス抑制機構に質的、量的違いがあれば結果的に増殖抑制に差が生じることが考えられる。

本研究では、増殖抑制率の高かったHSC-3ではbcl-2蛋白質の発現は極めて微弱であったのに対し、増殖抑制率の低かったCa9-22ではbcl-2蛋白質の発現が高く、各細胞の増殖抑制率とbcl-2蛋白質発現には逆相関が見い出された。bcl-2蛋白質は増殖因子のない条件下でリンパ系細胞が起こすアポトーシスを抑制し、細胞死から免れる作用が示されている<sup>5, 26)</sup>。しかしこの活性は万能ではなく、細胞障害性T細胞による殺細胞の場合や、インターロイキン-2依存性T細胞株、インターロイキン-6依存性骨髄腫細胞株の増殖因子非存在下の場合には延命効果は認められないことが知られている<sup>22)</sup>。従って、アポトーシスの最終段階であるエンドヌクレアーゼの活性化に至る経路は複数存在し、bcl-2蛋白質はその一部を抑制すると考えられている。抗Fas抗体の添加培養による各細胞株の増殖抑制率とbcl-2蛋白質発現が逆相関していることは、扁平上皮癌細胞におけるアポトーシスの経路をbcl-2蛋白質が抑制することを示唆するものと考えられる。

p53蛋白質には野生型と変異型がある。野生型p53蛋白質は増殖関連遺伝子であるc-fosやc-junなどの転写を抑制し、細胞増殖やトランスフォーメーションを抑制する活性を持つことが示されている<sup>10)</sup>。また、放射線や紫外線、あるいは各種の薬剤によって細胞のDNAが損傷を受けた時に細胞周期をG<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>またはG<sub>2</sub>に停止させ、その間にDNAの修復を行う。変異型p53蛋白質は活性化rasとの協調作用によるトランスフォーム能を持ち<sup>7, 23)</sup>、アポトーシスにおいては抑制因子として機能することが示されている<sup>11, 31)</sup>。

本研究に用いた細胞株におけるp53遺伝子変異についてはすでに解析されている<sup>14)</sup>。Ca9-22は、

p53遺伝子のコドン248にCGG→TGGの変異があり、抗p53抗体に対し免疫組織化学的に陽性を示す。HSC-2はエクソン6のスプライシングドナーサイトに変異が起き、エクソン7でストップコドンが生じている。HSC-3はコドン305の後にTAAGの挿入があり、抗p53抗体に対し免疫組織化学的に陰性となる。HSC-4はコドン248にCGG→CAGの変異があり、抗p53抗体に対し免疫組織化学的に陽性を示す。このように各細胞株はいずれも変異型p53遺伝子を有している。本研究におけるウエスタンブロット法による検索では、Ca9-22、HSC-4およびHSC-2にもp53蛋白質のほぼ同等な発現が見い出されたが、HSC-3には発現していなかった。注目すべきは、増殖抑制率の低かったCa9-22ではp53蛋白質の発現があり、増殖抑制率の高かったHSC-3ではp53蛋白質の発現がなかったことである。変異型p53蛋白質の発現はbcl-2蛋白質と同様に、扁平上皮癌細胞におけるアポトーシスの誘発抑制性に作用していることの証左と考えられる。しかし、HSC-2、HSC-4はCa9-22と同等なp53蛋白質を発現していながら、HSC-2、HSC-4の増殖抑制率はCa9-22より高かった。これは、アポトーシス誘発におけるbcl-2蛋白質のp53蛋白質に対する優位性を示唆するかもしれない。

さらに、抗Fas抗体添加後の経時的なp53蛋白質の変化について検索すると、Ca9-22では抗Fas抗体添加3時間後よりp53蛋白質の発現が増加し、観察した24時間後まで高いレベルを保った。前述のごとく、変異型p53蛋白質はアポトーシスの抑制因子であり、この変異型p53蛋白質の増加がCa9-22をアポトーシスから回避させて、低い増殖抑制率を示した要因となったかもしれない。他方、変異型p53蛋白質は乳癌細胞MCF-7においてbcl-2蛋白質の発現を抑制しその機能を代償する<sup>11)</sup>といわれている。しかし、Ca9-22では抗Fas抗体添加3時間後から変異型p53蛋白質の発現が高くなったが、bcl-2蛋白質に発現の変化はなかった。従って、扁平上皮癌細胞では変異型p53蛋白質はbcl-2蛋白質の発現を抑制しない可能性がある。これは、アポトーシス関連蛋白質の発現、変化が由来組織により異なることを示唆するものと思われる。

Ca9-22を飽和状態で培養すると、対数増殖期よりも高度に変異型p53蛋白質を発現した。飽和

状態になると細胞分裂は減少または停止する傾向になる。そして、定状態から死滅期を迎える。それがアポトーシスによる死であるとする、変異型p53蛋白質を発現させることによってアポトーシスに拮抗しているものとも考えられる。

c-myc蛋白質は上記4系のいずれの細胞株にも67KDaおよび64KDaの位置に発現していたが、HSC-3では他の細胞株より発現がやや高かった。

c-myc蛋白質は、正常の細胞では64KDaと67KDaの2種類が存在し、64KDaのものはエクソン2のATGのコドンから始まり、67KDaのものはエクソン1の右端の近くにあるCTGのコドンから始まるとされている<sup>12)</sup>。今回使用した抗c-myc抗体は67KDaのc-myc蛋白質を認識するモノクローナル抗体であるが、64KDaの位置にも反応を示した。これは扁平上皮癌細胞のc-myc蛋白質にも64KDaと67KDaの蛋白質があり、両者に共通した構造部分を認識したためであると思われる。

c-myc蛋白質は核に局在し、転写促進因子として機能するDNA結合蛋白質である。従来はその発現によって細胞周期をG<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期からS期へ移行させ、細胞の増殖が正の方向に向けられると考えられていた<sup>17)</sup>。しかし、最近c-myc蛋白質の高発現によってアポトーシスが誘発されるということが明らかにされた<sup>9)</sup>。これは血清濃度を0.5%以下に減じて培養したNIH3T3細胞、トポイソメラーゼの阻害剤であるテニポシドで処理されたColo320細胞やHL60細胞などでも確認されている。Ca9-22とHSC-3におけるc-myc蛋白質の発現の差が、抗Fas抗体の添加培養による増殖抑制率の違いとなったとも考えられる。しかし、増殖抑制率に差があったCa9-22とHSC-2、HSC-4のc-myc蛋白質の発現はほぼ同等であったことから、c-myc蛋白質発現量の差だけが抗Fas抗体の添加培養による増殖抑制率の違いをもたらすとは見放し難い。また、これとは逆にc-myc蛋白質の発現の低下がアポトーシス誘発に関与しているという報告もある。IL-3依存的に増殖する骨髓細胞の培養におけるIL-3の除去<sup>3)</sup>、グルココルチコイド処理したB前駆細胞<sup>2)</sup>などがその例である。従って、細胞増殖がG<sub>1</sub>期で抑制された時にc-myc蛋白質の発現に急激な変化が生じれば、その細胞にアポトーシスが誘発される可能性が示唆される。

抗Fas抗体添加後の経時的なc-myc蛋白質発現

の変化について検索すると、未処理のCa9-22ではc-myc蛋白質発現量は低かったが、抗Fas抗体添加3時間後よりc-myc蛋白質の発現が高くなった。このようなc-myc蛋白質の発現増加がアポトーシスの進行に影響するのかもしれない。

また、アポトーシスの誘発はc-myc蛋白質発現の増加または減少の双方においても、bcl-2蛋白質によって抑制されるといわれている<sup>4, 26)</sup>。bcl-2蛋白質の発現が高かったCa9-22ではc-myc蛋白質の発現が低く、bcl-2蛋白質の発現が低かったHSC-3ではc-myc蛋白質の発現がやや高かった。このことも、扁平上皮癌細胞におけるbcl-2蛋白質とc-myc蛋白質の関連を示している。

シスプラチン、アドリマイシンなどの抗癌剤でもアポトーシスが誘発されると報告<sup>9)</sup>されている。本研究の結果から、抗癌剤によるアポトーシスの誘発も上記蛋白質の発現に関与している可能性が考えられる。扁平上皮癌の発現蛋白質を検索し、それにふさわしい抗癌剤の選択を行えば、口腔扁平上皮癌を選択的にアポトーシスを誘発出来る可能性もあろう。

## 結 語

ヒト口腔由来扁平上皮癌細胞株Ca9-22、HSC-2、HSC-3、HSC-4に、抗Fas抗体を添加培養し、その増殖に及ぼす影響およびその時のbcl-2蛋白質、p53蛋白質、c-myc蛋白質の発現について検討した。結果は以下のごとく要約される。

1. 抗Fas抗体100ng/mlの添加培養により、Ca9-22では軽度、HSC-2、HSC-4では中等度、HSC-3では高度な増殖抑制が見い出された。
2. IFN- $\gamma$  50JRU/mlによる前処理は、抗Fas抗体によるアポトーシス誘発に有意な影響を与えなかった。
3. 抗Fas抗体100ng/mlを添加培養した細胞は、Hoechst Dye 33258を用いた蛍光染色によりアポトーシス小体が検出され、アガロースゲル電気泳動ではDNAが断片化した。
4. ウエスタンブロット法による検討では、bcl-2蛋白質の発現と細胞増殖抑制率は明かな逆相関を示した。増殖抑制率が最高であったHSC-3ではp53蛋白質の発現がなく、c-myc蛋白質の発現がやや高かった。
5. Ca9-22に抗Fas抗体100ng/mlを添加培養すると、3時間後からp53蛋白質、c-myc蛋白質の発

現が増加した。

以上の結果より、扁平上皮癌細胞におけるアポトーシスの過程には、bcl-2 蛋白質、p53蛋白質、c-myc蛋白質の発現が関与していることが明らかとなった。

稿を終えるにあたり、終始懇切なる御指導御校閲を賜りました鳥取大学医学部歯科口腔外科学教室濱田 駿教授に深謝するとともに、直接御指導を賜りました本学病理学第一教室井藤久雄教授ならびに御校閲を賜りました本学細胞工学教室押村光雄教授に深甚なる謝意を表します。併せて終始御支援、御協力頂きました本学病理学第一教室安達博信助教授、および教室各位、ならびに本学歯科口腔外科学教室領家 和男助教授、および教室各位に厚く御礼を申し上げます。

尚、本論文の要旨は第8回国際細胞分化学会(1994, 10月, 広島)、第39回日本口腔外科学会総会(1994, 11月, 名古屋)において発表した。

## 文 献

- 1) Aihara, M., Truong, L. D., Dunn, J. K., Wheeler, T. M., Scardino, P. T. and Thompson, T. C. (1994). Frequency of Apoptotic Bodies Positively Correlates With Gleason Grade in Prostate Cancer. *Human Pathol* 25, 797-801.
- 2) Alnemri, E. S., Fernandes, T. F., Haldar, S., Croce, C. M. and Litwack, G. (1992). Involvement of BCL-2 in Glucocorticoid-induced Apoptosis of Human Pre-B-Leukemias. *Cancer Res* 52, 491-495.
- 3) Askew, D. S., Ashmun, R. A., Simmons, B. C. and Cleveland, J. L. (1991). Constitutive c-myc expression in an IL-3-dependent myeloid cell line suppresses cell cycle arrest and accelerates apoptosis. *Oncogene* 6, 1915-1922.
- 4) Bissonnette, R. P., Echeverri, F., Mahboubi, A. and Green, D. R. (1992). Apoptotic cell death induced by c-myc is inhibited by bcl-2. *Nature* 359, 552-554.
- 5) Borzillo, G. V., Endo, K. and Tsujimoto, Y. (1992). Bcl-2 confers growth and survival advantage to interleukin 7-dependent early pre-B cells which become factor independent by a multistep process in culture. *Oncogene* 7, 869-876.
- 6) Cohen, J. J. and Duke, R. C. (1984). Glucocorticoid activation of a calcium-dependent endonuclease in thymocyte nuclei leads to cell death. *J Immunol* 132, 38-42.
- 7) Eliyahu, D., Raz, A., Gruss, P., Givol, D. and Oren, M. (1984). Participation of p53 cellular tumor antigen in transformation of normal embryonic cells. *Nature* 312, 646-649.
- 8) Evan, G. I., Wyllie, A. H., Gilbert, C. S., Littlewood, T. D., Land, H., Brooks, M., Waters, C. M., Penn, L. Z. and Hancock, D. C. (1992). Induction of Apoptosis in Fibroblasts by c-myc Protein. *Cell* 69, 119-128.
- 9) 福田 実, 西條長宏 (1994). 抗癌剤とアポトーシス. *癌と化学療法* 21, 330-335.
- 10) Ginsberg, D., Mechta, F., Yaniv, M. and Oren, M. (1991). Wild-type p53 can down-modulate the activity of various promoters. *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 9979-9983.
- 11) Haldae, S., Negrini, M., Monne, M., Sabbioni, S. and Croce, C. M. (1994). Down-regulation of bcl-2 by p53 in breast cancer cells. *Cancer Res* 54, 2095-2097.
- 12) Hann, S. R., King M. W., Bentley, D. L., Anderson, C. W. and Eisenman, R. N. (1988). A Non-AUG Translational Initiation in c-myc Exon 1 Generates an N-Terminal Distinct Protein Whose Synthesis is Disrupted in Burkitt's Lymphomas. *Cell* 52, 185-195.
- 13) 堀越 勝, 木村義孝, 名倉英明, 小野富昭, 伊藤秀夫 (1974). 人の歯肉癌由来の細胞株の樹立 (第1報). *日口外誌* 20, 100-106.
- 14) 石井菜穂子 (1993). ヒト口腔扁平上皮癌におけるp53癌抑制遺伝子の発現の解析. *口病誌* 60, 131-147.
- 15) Kasagi, N., Gomyo, Y., Shirai, H., Tsujitani, S. and Ito, H. (1994). Apoptotic Cell Death in Human Gastric Car-

- cinoma: Analysis by Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-mediated dUTP-biotin Nick End Labeling. *Jpn J Cancer Res* 85, 939-945.
- 16) Kaufman, S. H. (1989). Induction of Endonucleolytic DNA Cleavage in Human Acute Myelogenous Leukemia Cells by Etoposide, Camptothecin, and Other Cytotoxic anti-cancer drugs: A Cautionary Note. *Cancer Res* 49, 5870-5878.
  - 17) Kelly, K., Cochran, B. H., Stiles, C. D. and Leder, P. (1983). Cell-Specific Regulation of the c-myc Gene by Lymphocyte Mitogens and Platelet-Derived Growth Factor. *Cell* 35, 603-610.
  - 18) Kerr, J. F. R., Wyllie, A. H. and Currie, A. R. (1972). Apoptosis: A basic biological phenomenon on with wide-range implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26, 239-257.
  - 19) Leoncini, L., Vecchio, M. T. D., Megha, T., Barbini, P., Gaieni, P., Pileri, S., Sabattini, E., Gherlinzoni, F., Tosi, P., Kraft, R. and Cottier, H. (1993). Correlations Between Apoptotic and Proliferative Indices Malignant Non-Hodgkin's Lymphomas. *Ame J Pathol* 142, 755-763.
  - 20) 百瀬文雄, 平田章二, 新井田俊雄, 田中信幸, 塩田重利 (1986). 3つの口腔扁平上皮癌由来細胞の性状について. *口科誌* 35, 485-496.
  - 21) Mori, N., Okumoto, M., Morimoto, J., Imai, S., Matsuyama, T., Takamori, Y. and Yagasaki, O. (1992). Genetic analysis of susceptibility to radiation-induced apoptosis of thymocytes in mice. *Int J Radiat Biol* 62, 153-159.
  - 22) Nunez, G., London, L., Hockenbery, D., Alexander, M., Mckeran, J. P. and Korsmeyer, S. J. (1990). Deregulated bcl-2 gene expression selectively prolongs survival of growth factor-deprived hemopoietic cell lines. *J Immunol* 144, 3602-3610.
  - 23) Parada, L. F., Land, H., Weinberg, R. A., Wolf, D. and Rotter, V. (1984). Cooperation between *gag* encoding p53 tumor antigen and *ras* in cellular transformation. *Nature* 312, 649-651.
  - 24) Schwartz, R., Momburg, F., Moldenhauer, G., Dorken, B. and Schirmacher, V. (1985). Induction of HLA class-II antigen expression on human carcinoma cell lines by IFN-gamma. *Int J Cancer* 35, 245-250.
  - 25) 鈴木紀夫, 酒井一夫, 松本義久 (1993). 癌細胞とApoptosis. *癌と化学療法* 20, 997-1005.
  - 26) Vaux, D. L., Cory, S. and Adams, J. M. (1988). Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* 335, 440-442.
  - 27) Wyllie, A. H., Kerr, J. F. R. and Currie, A. R. (1980). Cell death: The Significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 68, 251-306.
  - 28) 山城正弘, 藤井信男, 本村和弥, 金城孝, 中曾根康雄, 儀間裕 (1985). 口腔領域悪性腫瘍の臨床病理学的研究, 第2報: 過去10年間の実態と治療成績. *口科誌* 34, 357-363.
  - 29) Yanagihara, k. and Tsumuraya, M. (1992). Transforming Growth Factor  $\beta$ 1 Induces Apoptotic Cell Death in Cultured Human Gastric Carcinoma Cells. *Cancer Res* 52, 4042-4045.
  - 30) Yonehara, S., Ishii, A. and Yonehara, M. (1989). A cell killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor. *J Exp Med* 169, 1747-1756.
  - 31) 吉田弥太郎 (1994). 白血病細胞の分化とアポトーシス. *医学のあゆみ* 169, 775-779.