野生型p53遺伝子導入とカフェイン併用によるヒト骨肉腫細胞の抗癌剤感受性の増強

メタデータ	言語: jpn
	出版者:
	公開日: 2017-10-04
	キーワード (Ja):
	キーワード (En):
	作成者:
	メールアドレス:
	所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/9385

野生型p53遺伝子導入とカフェイン併用による ヒト骨肉腫細胞の抗癌剤感受性の増強

金沢大学医学部医学科整形外科学講座（主任：富田勝郎教授）
毛　利　良　彦

癌抑制遺伝子*p53*の状態が異なる3種類のヒト骨肉腫細胞株に野生型p53遺伝子をリポフェクション法で導入し，p53蛋白の発現量，細胞増殖能，およびシスプラチンによる殺細胞効果の変化を検討した．さらに，DNA修復阻害物質であるカフェイン併用時のp53蛋白の発現抑制効果と殺細胞効果増強に与える影響についても検討した．正常p53蛋白を発現するOST細胞株では，野生型*p53*遺伝子の導入前後でp53蛋白の発現量，細胞増殖能，およびシスプラチンの殺細胞効果に変化は認められなかった．また，野生型*p53*遺伝子導入前から認められていたカフェイン併用時のp53蛋白の発現抑制効果，ならびに殺細胞効果増強に関して変化は認められなかった．変異型p53蛋白を発現するHOS細胞株では，野生型*p53*遺伝子の導入後に細胞増殖速度の低下が認められたが，p53蛋白の発現量，細胞増殖能，およびシスプラチンの殺細胞効果に変化は認められず，さらに，カフェイン併用時のp53蛋白の発現抑制効果および殺細胞効果増強に関しても変化は認められなかった．*p53*遺伝子が欠失し，p53蛋白の発現を全く認めないSaos2細胞株では，野生型*p53*遺伝子導入後のSaos2/p53細胞株において，p53蛋白の発現が認められるようになり，細胞増殖速度の低下，およびシスプラチンの殺細胞効果の増強が認められた．また，カフェイン併用時のp53蛋白の発現抑制効果ならびに殺細胞効果の増強も認められた．さらに，Saos2/p53細胞株ではSaos2細胞株に比べ，シスプラチン単独処理時，およびカフェイン併用時のいずれにおいても，ターミナル・デオキシヌクレオチジル・トランスフェラーゼ加ビオチン-デオキシウリジン-5'-三リン酸ニック末端標識 (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridin-5'-triphosphate-biotin nick end-labeling, TUNEL) 法ならびにDNAラダーの観察によりアポトーシス誘導の増強が認められた．以上の結果から，正常型p53蛋白は細胞周期の調節およびシスプラチン処理時のアポトーシス誘導を含む多機能な作用を有することが確認された．さらに，カフェイン併用時のシスプラチンに対する殺細胞効果の増強には，正常p53蛋白の発現が必要であることが明らかとなった．このことから，*p53*遺伝子の異常のため，化学療法に抵抗性を示すヒト骨肉腫症例に対して，野生型*p53*遺伝子を用いた遺伝子治療とカフェイン併用化学療法により，さらに抗癌剤感受性が増強される可能性が示唆された．

Key words　wild-type p53, transfection, cisplatin, caffeine, human osteosarcoma

骨肉腫は若年者の四肢に発生し，悪性骨腫瘍の中で最も頻度が高い．従来は，発見と同時に四肢の切断・離断術が行われており，5年生存率も20%以下と極めて不良であったが[1]，近年の化学療法の導入に伴い治療成績は飛躍的に向上した．最近ではシスプラチンの術前動脈内投与が有効とされ[2)3)]，5年生存率は50～60%までになっている[4)-6)]．しかしながら，20～30%の骨肉腫は抗癌剤に抵抗性を示し，その克服のためには既存の抗癌剤の効果を増強する工夫や新たな抗癌剤の開発，発見が求められている．

近年，癌抑制遺伝子として注目されている*p53*遺伝子は，多くの悪性腫瘍でその変異が報告されている[7)8)]．DNA損傷により過剰発現するp53蛋白は，DNA損傷が軽度の時には細胞周期をG1期で停止してDNA損傷を修復するが，DNA損傷が高度で修復不能時には細胞をアポトーシスに誘導する機能がある[9)10)]．このようにp53は細胞増殖の調節やアポトーシス誘導において重要な役割を担っており，p53の変異が悪性腫瘍の予後にも悪影響を与えるといわれている[11)]．すなわち抗癌剤や放射線は腫瘍細胞のDNA損傷を起こし，その損傷がアポトーシス性細胞死をもたらすが[12)]，悪性腫瘍細胞はp53の変異によりアポトーシスを回避し，化学療法や放射線療法に対して抵抗性を有するようになっていると考えられている[13)]．骨肉腫においてもp53は高率に変異が認められ[14)-16)]，*p53*遺伝子の異常が予後と相関すると言われている[17)-20)]．また，ヒト骨肉腫細胞に野生型*p53*遺伝子を導入すると，細胞増殖は抑制され，放射線感受性が増

平成10年11月12日受付，平成10年12月10日受理

Abbreviations：A.U., angstrome unit; CDDP, cisplatin, cis-diamminedichloroplatinum; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase; IC_{50}, concentration of CDDP that inhibits cell growth by 50%; PBS, phosphate-buffered saline; RT, reverse transcription; TdT, terminal deoxynucleotidyl transferase; TUNEL, terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end-labeling; U, unit

強することも報告されている[21)22)]．しかし，ヒト骨肉腫細胞に野生型*p53*遺伝子を導入して，抗癌剤に対する感受性の変化を検討した報告は未だない．本研究では，ヒト骨肉腫細胞に野生型*p53*遺伝子を導入することによる細胞増殖能，および骨肉腫に対する重要な抗癌剤であるシスプラチンの殺細胞効果の変化ついて検討した．さらに，DNA修復阻害物質であるカフェイン併用時のp53蛋白の発現抑制効果と殺細胞効果増強に与える影響についても検討した．

対象および方法

Ⅰ．実験に用いた培養細胞株

ヒト骨肉腫培養細胞株OST，HOS，Saos2の3株を用いた．OSTについては当教室で樹立，継代培養したものを用い，HOSとSaos2については米国標準培養株保存機関 (Rockville, USA) より入取した．OSTでは*p53*遺伝子は野生型で，正常型p53蛋白を発現し，HOSでは*p53*遺伝子は変異型で，変異型p53蛋白を発現し，Saos2では*p53*遺伝子は欠失し，p53蛋白の発現は全く認めないことが報告されている[23)24)]．各細胞株は，加熱失活処理した10%仔牛胎児血清 (fetal bovine serum) (大日本製薬，大阪)，100単位 (unit, U) /ml ペニシリン (萬有製薬，東京)，100 μg/ml ストレプトマイシン (明治製薬，東京) を含んだダルベッコ変法イーグル培地 (Dulbecco's modified Eagle's medium) (日水製薬，東京) を用いて，湿潤37℃，5%CO2の条件下で培養した．細胞浮遊液の調整にはトリプシン (0.25%溶液) のみ，またはトリプシン-EDTA溶液を用いた．

Ⅱ．薬剤

薬剤としてシスプラチン (cisplatin，CDDP) (日本化薬，東京) とカフェイン (無水カフェイン) (和光純薬，大阪) を用いた．

Ⅲ．pcDNAとp53発現プラスミドpNSXR

ネオマイシン耐性遺伝子をコードする発現ベクターpcDNA (pcDNA3.1 (+), Invitrogen, San Diego, USA) とネオマイシン耐性遺伝子，および野生型*p53*cDNAを担うpNSXR (金沢大学癌研究所，病態生理部，山本健一教授より供与された) を使用した．pcDNAとpNSXRはともにサイトメガロスウイルスプロモーター/ エンハンサーとSV_{40}プロモーターをコードし，両プラスミドのネオマイシン耐性遺伝子はSV_{40}プロモーターの下流に，一方，*p53*cDNAはサイトメガロスウイルスプロモーター/エンハンサーの下流に挿入されている．pNSXRの大量調整にあたって，大腸菌JM109にDNAをトランスフェクションし，150 ml LB培地 (トリプトン 10g，イーストイクストラクト 5g，塩化ナトリウム 5g，アンピシリン 50 μg/ml，pH7.6) で37℃，12時間培養した．集菌後，ペレットを緩衝液I [50mM Tris-HCl (pH 8.0)，10mM EDTA，100 μg/ml RNase A (Sigma, St. Louis, USA)] 10mlに懸濁した．アルカリ液 (200mM 水酸化ナトリウム，1% SDS) 10mlを加え，室温で5分静置した．この溶液に3M酢酸カリウム (pH5.5) 10mlを加え，氷冷20分後，ベックマン60Tiローター (Beckman Instr., Fullerton, USA) を用いて，4℃，35,000rpm，30分間遠心をおこなった．上清を取り，プラスミド精製用キットQIAGEN-tip 500 (QIAGEN, Valencia, USA) カラムで分画した．溶出は緩衝液II [50mM Tris-HCl (pH 8.5)，15% エタノール，1.25M NaCl] 13mlで行った．プラスミド溶出液 (12ml) に8.4mlのイソプロパノールを混合後，直ちに4℃，2,000rpm，30分間遠心を行った．沈殿を70%エタノールで1回リンスして風乾した．少量のTE [10mM Tris-HCl (pH 8.0)，1mM EDTA] に溶解し，濃度4mg/mlに調整した．

Ⅳ．野生型p53遺伝子の安定導入

各骨肉腫細胞株を2×10^5個/mlの密度で60mmシャーレ (Corning, Cambridge, USA) に播種し，24時間培養後，リポフェクション法で野生型*p53*遺伝子の導入を行った．リン酸緩衝生理食塩水 (phosphate-buffered saline, PBS) 1mlに，pNSXR 20 μgを溶解し，1 μmolのカチオニックリポソーム (ジーントランスファー，和光純薬) と混合して作ったリポソーム懸濁液を各々100 μlずつディシュに添加し，さらに16時間培養した．対照プラスミドとしてpcDNAを同様に導入した．16時間培養後に新鮮培地に交換し，さらに24時間培養後，細胞を25cm²のフラスコ (Corning) に移し換え，最終濃度500 μg/mlのG418 (Geneticin, Sigma) 添加培地で4週間選択培養した．それぞれ生じた3～8個のG418耐性コロニーから単一コロニーを分離した．得られた細胞株を親細胞株と区別して，p53発現プラスミドpNSXRを導入した細胞株をOST/p53，HOS/p53，Saos2/p53とし，一方，対照プラスミドpcDNAを導入した細胞株をOST/pcDNA, HOS/pcDNA, Saos2/pcDNAとして以下の実験に用いた．

Ⅴ．逆転写-PCR(reverse transcription-PCR, RT-PCR) 法を用いたp53 mRNA発現の検索

総RNAの抽出精製は，Chomczynskiら[25)]の方法に基づいて調整されたRNA抽出用試薬，アイソジェン (ニッポンジーン，東京) を用いた．RT-PCR反応は，DNase処理後5 μgのRNAを鋳型とし，ランダムヘキサマーをプライマーとして逆転写酵素 (Life Technologies Inc., Rockville, USA) によりcDNAを合成した．次にアポトーシス関連遺伝子群増幅用キットAPO-M050 (MBI, San Francisco, USA) を用いて，Taq EX DNAポリメラーゼ (宝酒造，草津) でcDNA断片の増幅を行った．内部コントロールにはグリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素 (glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase, GAPDH) を用い，プライマーとしては既製品 (CLONTECH Laboratories Inc., Palo Alto, USA) を使用した．その塩基配列として，センスプライマーは5'-TGAAGGTCGGAGTCAACGGATTTGGT-3'，アンチセンスプライマーは5'-CATGTGGGCCATGAGGTCCACCAC-3'であった．PCR反応にはサーマル・コントローラーPTC-100 (MJ Resarch, Watertown, USA) を用いて，94℃で5分間の熱変性後，94℃で1分間，60℃で1分間，72℃で2分間の3ステップを1サイクルとして35回増幅した．増幅後のPCR反応産物を2%アガロースゲルで電気泳動し，エチジウムブロマイドで染色後，紫外線照射装置FN-2660-00 (フナコシ，東京) を用いて検出した．各バンドの同定には，上記キットの陽性対照を用いた．

Ⅵ．ウエスタンブロット

各細胞株の細胞数を1×10^7/mlに調節し，PBSで洗浄後，細胞溶解液A [50mM Tris-HCl (pH7.5)，150mM塩化ナトリウム，1% ノニデットP-40，1% デオキシコール酸ナトリウム，0.05% SDS] 500 μlに溶解後，超音波処理し，0℃，15,000回転，10分間遠心した．得られた上清を採取し，一部をプロテインアッセイキット (Bio-Rad Laboratories, Richmond, USA) を用いて蛋白定量を行った．電気泳動はLaemmliら[26)]のSDS-PAGE法で行った．得られた蛋白 (5 μg) を試料溶解液 [50mM Tris-HCl (pH6.8)，10%グリセロール，2%SDS, 0.03%ブロモフェノールブルー，6% β-メルカプトエタノール] と混合し，90℃，5分間の

熱変性を加え，15% SDS-PAGEを行った．電気泳動終了後，アクリルアミドゲル上に分離された蛋白をニトロセルロース膜(Clear Blot Membrane-P，アトー，東京)へ転写し，1%スキムミルクを溶解した0.05%ツイーン20添加PBSでブロッキングを行った．1次抗体として10,000倍に希釈したウサギ抗ヒトp53ポリクローナル抗体RSP53 (ニチレイ，東京) を4℃で24時間反応させた．反応後，膜を0.05%ツイーン20添加PBSで洗浄し，ビオチン標識抗ウサギIgG抗体を室温で1時間反応させた．膜を0.05%ツィーン20 添加PBSで洗浄した後，化学発光基質キット (Supersignal, Pierce, USA) で反応させ，3分間感光フィルムへ露光し検出した．蛋白分子量マーカーとしてPrestained SDS-PAGE Standards (Low Range, Bio-Rad Laboratories) を用いた．

Ⅶ．細胞増殖曲線と細胞倍加時間

各細胞株からの単離細胞浮遊液 (1×10^5/ml) を調整し，直径100mmのシャーレ (Corning) に播種してから，12時間後より5日間培養した．培養開始から24時間毎にトリプシン-EDTA処理より，単離細胞を回収し，トリパンブルーで染色し，非染細胞を生細胞として血球計算板でカウントした．細胞倍加時間は各細胞1日につき3枚のシャーレの生細胞数から平均値を求めて片対数グラフにプロットし，対数増殖期のグラフの傾きから求めた．

Ⅷ．抗癌剤感受性試験

対数増殖期にある細胞をトリプシン-EDTA処理後，1×10^4/mlに調整し，この細胞浮遊液を96穴平底マイクロプレート (岩城硝子，東京) に各穴100 μlずつ分注した．24時間後にシスプラチンの希釈系列を加えた系と薬剤を加えないコントロールを湿潤37℃，5%CO2存在下で1時間培養後，培養液を捨て，新たに培養液のみおよび0.5mMのカフェインを含んだ培養液を加え，湿潤37℃，5%CO2存在下で72時間培養した．培養後にWST-1溶液 (セル・カウンティング・キット，和光純薬) を各穴10 μlずつ加え，90分処理後に各穴の吸光度を自動吸光度計EAR340AT (SLT-Labinstruments, Vienna, Austria) を用いて測定波長450nm，対象波長630nmで測定した．薬剤を含まないものの吸光度をコントロール (100%) とし，シスプラチンの希釈系列を加えた系の吸光度をコントロールに対する百分率で表し，薬剤感受性を求めた．各シスプラチン濃度に対する生存率をプロットして細胞生存曲線を描き，生存率を50%減少させる薬剤の濃度 (concentration of CDDP that inhibits cell growth by 50%, IC_{50}) を求め，薬剤感受性の指標とした．薬剤感受性試験はすべて6回行い，それぞれの試験ごとに求めたIC_{50}値の算術平均を，各細胞株の各薬剤に対するIC_{50} (±SD) とし各細胞株間で比較検討した．

Ⅸ．酵素免疫測定法 (ELISA) によるp53蛋白の定量

各細胞株の細胞1×10^7個を150cm²培養フラスコ (Corning) に播種し，24時間後に濃度5.0 μg/mlのシスプラチンを加え，湿潤37℃，5%CO2存在下で1時間培養した．培養液を捨て，新たに培養液のみおよび0.5mMのカフェインを含んだ培養液を加えた．それぞれ6時間培養後にトリプシン-EDTA処理を行い，細胞を回収した．PBSで洗浄後，細胞溶解液A500 μlに溶解後，超音波処理し，0℃，15,000回転，10分間遠心した．得られた上清 (蛋白抽出液) を採取し，プロテインアッセイキットを用いて総蛋白量を定量した．p53蛋白の定量測定としてp53EIAキット (ニチレイ，東京) を用い，キットの手順に従って操作をすすめた．まず，キットに添付の96穴マイクロプレートの各穴に蛋白抽出液を10 μlずつ分注し，次に酵素標識抗体液を100 μlずつ加え混和後，室温で一晩反応させた．マイクロプレートを生理食塩水で十分洗浄し，発色液を100 μlずつ加え，室温で2時間反応させてから反応停止液を加えた．各穴の吸光度を自動吸光度計EAR340ATを用いて測定波長450nm，対象波長650nmで測定した．マニュアルに従い，あらかじめ測定しておいた検量線からp53蛋白濃度オングストローム・ユニット (angstrom unit, A.U.) /mlを求め，抽出した蛋白mgあたりのp53蛋白濃度A.U./mg蛋白 (protein) に換算した (検出限界は10A.U./mg 蛋白)．1回の実験は2穴の吸光度の平均値をもってその実験におけるp53蛋白濃度A.U./mg 蛋白の値とした．試験はすべて6回行い，それぞれの試験ごとに求めたp53蛋白濃度A.U./mg 蛋白の算術平均を各細胞株間で比較検討した．

Ⅹ．アポトーシスの観察

1．ターミナル・デオキシヌクレオチジル・トランスフェラーゼ加ビオチン-デオキシウリジン-5'-三リン酸ニック末端標識 (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridin-5'-triphosphate-biotin nick end-labeling, TUNEL)法

TUNEL法[27]はアポトーシスとそれに伴うDNA鎖切断を定量化する方法で，DNA3'末端標識を生体内局所アポトーシス検出キット (Oncor, Gaithersburg, USA) を用いて行った．細胞1×10^4個を直径60mmのシャーレに播種し，24時間後に5 μg/mlの濃度のシスプラチンを加えて1時間処理してから培養液を吸引し，それぞれ培養液のみおよび0.5mMのカフェインを加えた培養液で72時間培養した．また対照としていずれの薬剤も作用させなかったものと，カフェインのみを加えた培養液で72時間培養したものを作成した．トリプシン処理をして回収した単離細胞浮遊液を1，500 回転で遠心後，沈殿をPBS2mlに浮遊させ，1mlの2% アガロースゲルを加えて固化させた．さらに，70%エタノールで24時間脱水後，パラフィン包埋して薄切切片を作製した．脱パラフィン後，マニュアルに従い，蛋白消化と内因性ペルオキシダーゼの不活性化を行いTdTを37℃，1時間作用させた．反応停止後，ペルオキシダーゼ標識抗ジゴキシゲニン抗体を室温で30分間反応させた．発色は3, 3'-ジアミノベンチジン・テトラヒドロクロライド (3, 3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride) (和光純薬) で行った．陽性対照にはヒト扁桃を用い，陰性対照にはTdTを含まずにTdT緩衝液のみで処理した切片を用いた．細胞数200個中のTUNEL染色陽性細胞の数を求め，その百分率をアポトーシス指数とした．各検体につき，6つの異なる視野で計測し平均値を求めた．

2．DNA抽出とDNAラダーの観察

細胞1×10^4個を直径60mmのシャーレに播種し，24時間培養後5 μg/mlの濃度のシスプラチンを加えて1時間培養してから培養液を吸引し，それぞれ培養液のみ，および0.5mMのカフェインを加えた培養液で72時間培養した．また，対照としてシスプラチンとカフェインのいずれも作用させなかったものと，シスプラチンを作用させずに0.5mMのカフェインを加えた培養液で72時間培養したものを作成した．トリプシン処理をして回収した単離細胞浮遊液を遠心後，細胞溶解液B [50mMトリス塩酸 (pH8.0)，100mM EDTA，100mM塩化ナトリウム，1%SDS] を用い，核酸を抽出した．その後，プロティナーゼK (Sigma) を加え37℃，16時間の蛋白消化とRNase Aによる2時間のRNA分解を行い，フェノール-クロロホルム抽出

[フェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール＝25：24：1] とエタノール沈殿によりDNAのペレットを得た．各ペレットは風乾後TE溶液20 μlに溶解し，各10 μlを2%アガロースゲル上で100V，30分間電気泳動した．電気泳動後ゲルをエチジウムブロマイドにて30分間染色し，紫外線照射下で写真撮影してDNAラダーを観察した．

XI．統計学的分析

2群間の有意差はStudent'sのt検定を用いて判定し，測定値はすべて平均値±標準偏差 ($\bar{x}$ ± SD) で示した．危険率1%未満をもって有意差ありと判定した．

成　　績

I．RT-PCR

*p53*mRNAの発現をRT-PCRで解析した (図1) 各細胞株においてp53とGAPDHのRT-PCR生成物は，それぞれ200塩基対と983塩基対の単一のバンドとして検出された．*p53*遺伝子の欠失しているSaos2 (レーン3) では，200塩基対のバンドは認められなかったが，野生型*p53*遺伝子を導入後のSaos2/p53 (レーン4) では，200塩基対のバンドが認められるようになった．データとしては示していないが，*p53*遺伝子を組み込んでいないベクターpcDNAを導入した細胞株は，親細胞株とバンドの発現に差を認めなかった．

II．ウエスタンブロット

薬剤を負荷しない状態における各細胞株のp53蛋白の発現を，ウエスタンブロット法で検討した (図2)．各細胞株において正常型，変異型とも53kDaのバンドとして認められ，*p53*遺伝子導入前後で発現量に明らかな差は認められなかった．*p53*遺伝子が欠失しているSaos2細胞株ではバンドは認められなかったが，*p53*遺伝子導入後のSaos2/p53細胞株ではバンドが認められるようになり，p53の蛋白レベルでの発現が確認された．データーとしては示していないが，それぞれの親細胞株とp53が組み込まれていないプラスミドベクターpcDNAを導入した細胞株とでは全く差を認めなかった．

III．増殖曲線と細胞倍加時間

増殖曲線より求めた細胞倍加時間を比較すると，いずれも約25時間でありOST，OST/p53，およびOST/pcDNA間では有意差は認められなかった．またSaos2，Saos2/p53およびSaos2/pcDNAの細胞倍加時間はそれぞれ39.4±2.6時間，59.1±1.9時間，40.3±2.4時間であり，Saos2/p53において有意に増殖速度の低下が認められた ($p<0.01$)．さらにHOS，HOS/p53およびHOS/pcDNAの細胞倍加時間はそれぞれ31.3±2.3時間，39.2±2.3時間，32.6±2.7時間とHOS/p53においても有意に増殖速度の低下が認められた ($p<0.01$) (図3)．

IV．薬剤感受性の変化

OST，Saos2，HOS細胞株と*p53*遺伝子を導入した各細胞株を用いて，シスプラチン単独，またはシスプラチンにカフェインを併用した場合の細胞生存率を調べ (図4)，シスプラチンに対するIC_{50}値で整理した成績を表1に示した．シスプラチンに対する殺細胞効果を比較するとOST，OST/p53およびOST/pcDNA間ではいずれも有意差を認めなかった．またHOS，HOS/p53およびHOS/pcDNA間においても有意差は認められなかった．Saos2とSaos2/pcDNA間では有意差がみられなかったが，Saos2とSaos2/p53の比較では有意差が認められ ($p<0.01$)，Saos2/p53はSaos2に比べてシスプラチンに対する殺細胞効果が2.2倍増大していた．さらに，カフェインを併用した場合の殺細胞効果についてもSaos2/p53ではSaos2，Saos2/pcDNAと比較して有意に増大していた ($p<0.01$)．OST/p53，HOS/p53ではいずれもOST，OST/pcDNAおよびHOS，HOS/pcDNAと比較して殺細胞効果の増強に有意差は認められなかった．

V．薬剤によるp53蛋白発現量の変化

親細胞株と野生型*p53*遺伝子を導入した細胞株について，シスプラチン単独，またはシスプラチンにカフェインを併用した場合のp53蛋白の発現量をELISA法を用いて定量した (図5)．OSTではシスプラチンのみを作用させた場合，p53蛋白の発現量は100.8±5.7A.U./mg蛋白であり，カフェインを併用した場合は，88.0±6.8A.U./mg 蛋白とp53の発現量が有意に抑制された ($p<0.01$)．OST/p53においても同様にカフェインによってp53の発現量が有意に抑制された ($p<0.01$)．Saos2ではシスプラチンのみ作用させた場合およびカフェインを併用した場合のいずれも検出限界以下の値であった．Saos2 /p53ではシスプラチンのみ作用させた場合，p53蛋白は120.1±10.3A.U./mg 蛋白と発現が認められ，カフェインを併用した場合は，94.6±10.3A.U./mg 蛋白とp53の発現量が有意に抑制された ($p<0.01$)．HOSおよびHOS/p53ではカフェインによるp53の発現量の抑制は認められなかった．

VI．抗癌剤効果増強に対するアポトーシスの関与

野生型p53遺伝子の導入により，シスプラチンによる殺細胞

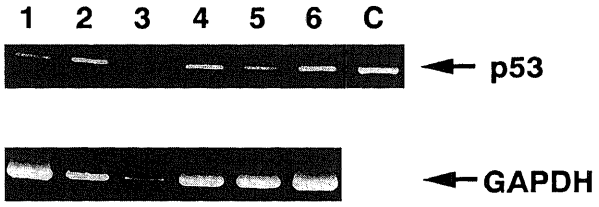

Fig. 1. Reverse transcriptation-PCR analysis of p53 mRNA in human osteosarcoma cells and a control sample. Expression of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was also studied as an internal control. p53 and GAPDH were subjected to 35 cycles of PCR, and products were resolved on 2% agarose gel and visualized by ethidium bromide staining. Lane 1, OST; lane 2, OST/p53; lane 3, Saos2; lane 4, Saos2/p53; lane 5, HOS; lane 6, HOS/p53; lane C, control sample.

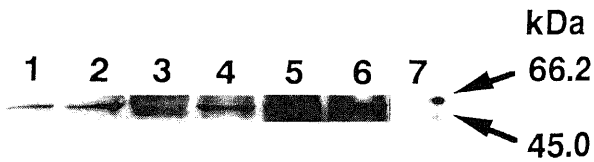

Fig. 2. Western blot analysis of p53 protein in osteosarcoma cell lines. Cell lysates were loaded on 15% polyacrylamide gel, transferred onto nitrocellulose membrane, and detected by rabbit polyclonal antibody against p53. Lane 1, OST; lane 2, OST/p53; lane 3, Saos2; lane 4, Saos2/p53; lane 5, HOS; lane 6, HOS/p53; lane 7, protein size markers.

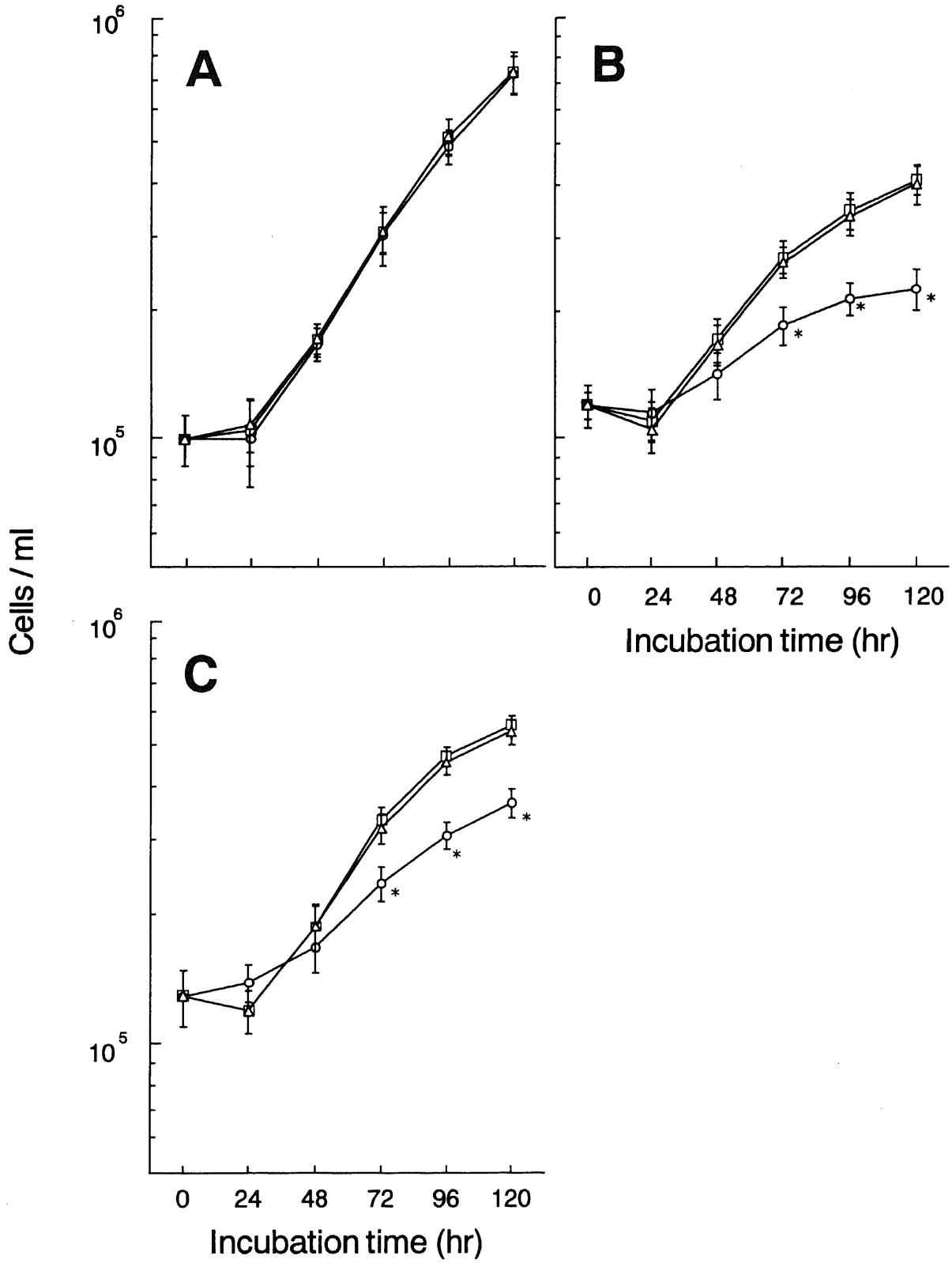

Fig. 3. Growth curve of osteosarcoma cell lines. OST cell lines (A), Saos2 cell lines (B), HOS cell lines (C). □, parental cells; ○, wild-type p53 transfected cells; △, pcDNA transfected cells. $\bar{x} \pm$ SD of the values in three independent experiments were shown. *$p<0.01$ by Student's t test.

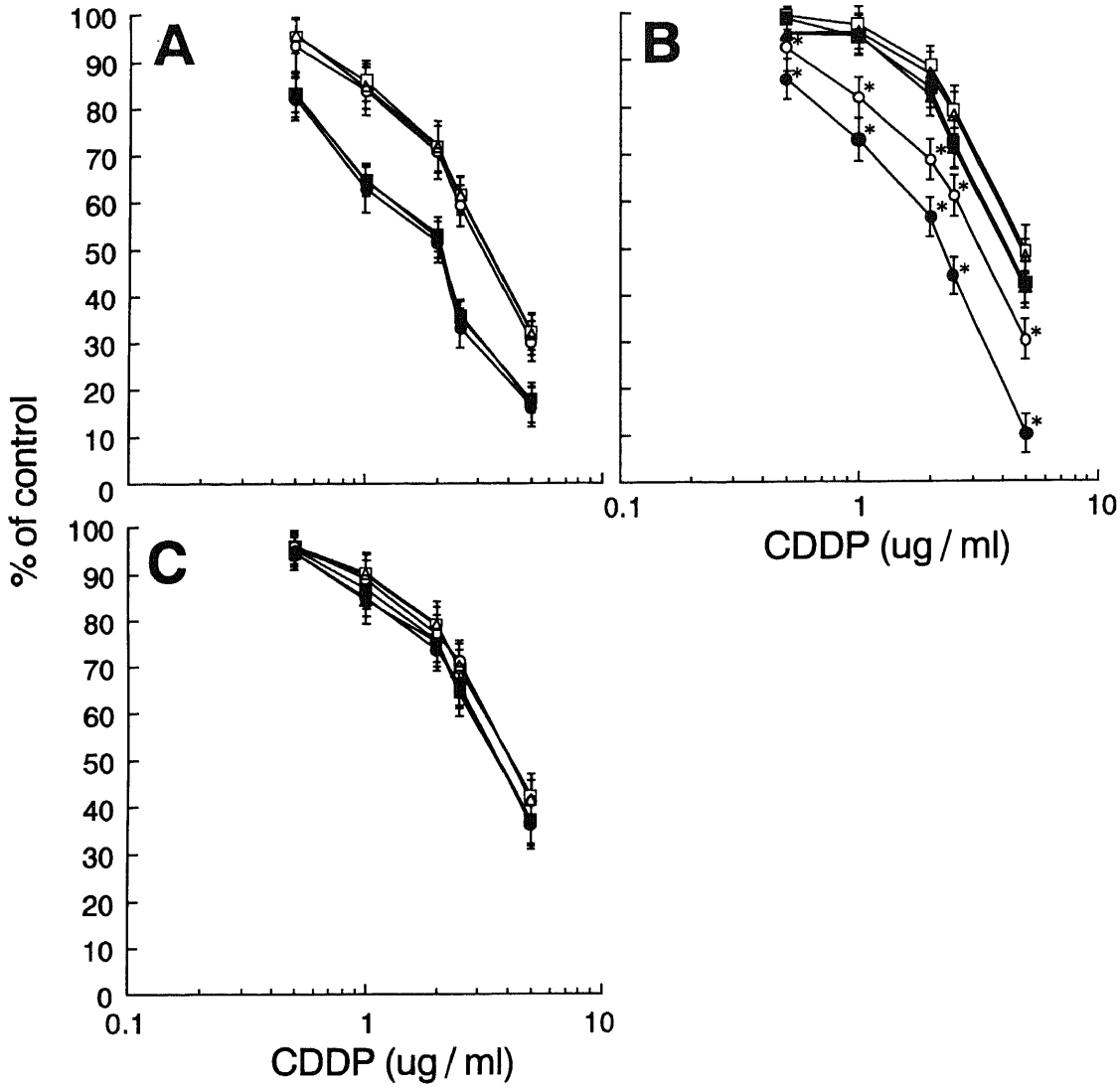

Fig. 4. Cytotoxic effect of osteosarcoma celll ines as a function of cisplatin concentration. After 1hr exposure to cisplatin, OST (A), Saos2 (B), and HOS (C) cell lines were cultured in the absence (open symboles; □, ○, and △) and presence (closed symboles; ■, ●, and ▲)of caffeine for 72hr. Survival of parental (□, ■), wild-type p53 transfected (○, ●), and pcDNA transfected (△, ▲) cells were measured by WST-1 assay as described in Materials and Methods. Relative survival was expressed as the percentage of the control cultures without cisplatin treatment. The $\bar{x} \pm$ SD of the values in six independent experiments were shown. *p<0.01 by Student's t test.

Table 1. Sensitivity of human osteosarcoma cell lines to CDDP

Cell lines	CDDP IC_{50}[a] (ug/ml)
OST	2.67±0.33[b]
OST/p53	2.59±0.10
OST/pcDNA	2.41±0.33
Saos2	5.10±0.48*
Saos2/p53	2.31±0.34*
Saos2/pcDNA	5.04±0.41
HOS	3.32±0.43
HOS/p53	2.96±0.42
HOS/pcDNA	3.06±0.41

a) IC_{50}, concentration of cisplatin (CDDP) that inhibits cell growth by 50%.
b) Each value is $\bar{x} \pm$SD of six experiments.
* P<0.01

効果，およびカフェイン併用による殺細胞効果の増強が認められるようになったSaos2/p53について，アポトーシス誘導の増強が認められるかどうかを検討した．TUNEL法においてシスプラチン単独，およびカフェインを併用した場合の陽性細胞の割合は，Saos2/p53では，それぞれ平均14.5%，13.8%であり，Saos2の平均7.0%，6.8%と比較して有意に増大した (p<0.01) (図6)．さらにSaos2，およびSaos2/p53のいずれもシスプラチン単独，およびカフェインを併用した場合，アポトーシスを反映する約180塩基対の整数倍のDNAラダーが観察され，Saos2/p53とSaos2の比較ではSaos2/p53の方のDNAラダーが明らかに増強していた．シスプラチン単独，およびカフェインを併用した場合の比較では，DNAラダーの程度に差は認められなかった (図7)．

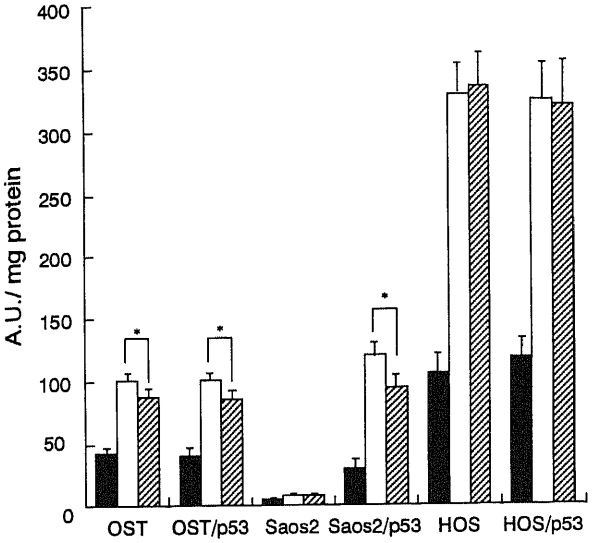

Fig. 5. ELISA analysis with the level of p53 protein: ■, control; □, treated with cisplatin (CDDP) alone; ▨, treated with CDDP and caffeine. The $\bar{x} \pm$ SD of the values in six independent experiments were shown. *p<0.01 by Student's t test.

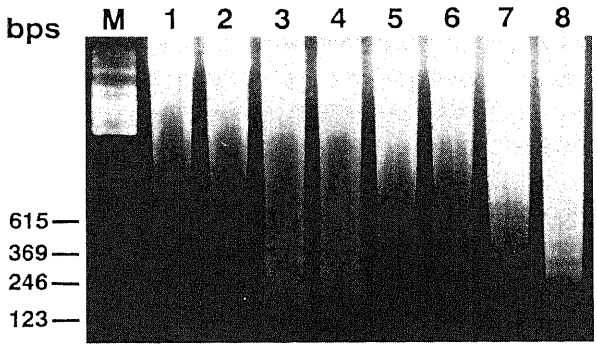

Fig. 7. Agarose gel electrophoresis of DNA fragmentation in Saos2 (lane 1, 2, 3, 4) and Saos2/p53 (lane 5, 6, 7, 8) cells undergoing apoptosis. Lane 1 and lane 5, untreated controls; lane 2 and 6, incubated in the medium with 0.5mM caffeine for 72hr; lane 3 and lane 7, incubated in the medium for 72hr after treatment with 5ug/ml CDDP for 1hr; lane 4 and lane 8, incubated in the medium with 0.5mM caffeine for 72 hr after treatment with 5ug/ml CDDP for 1hr. Lane M, molecular size marker. DNA from cells was isolated as described in Materials and Methods.

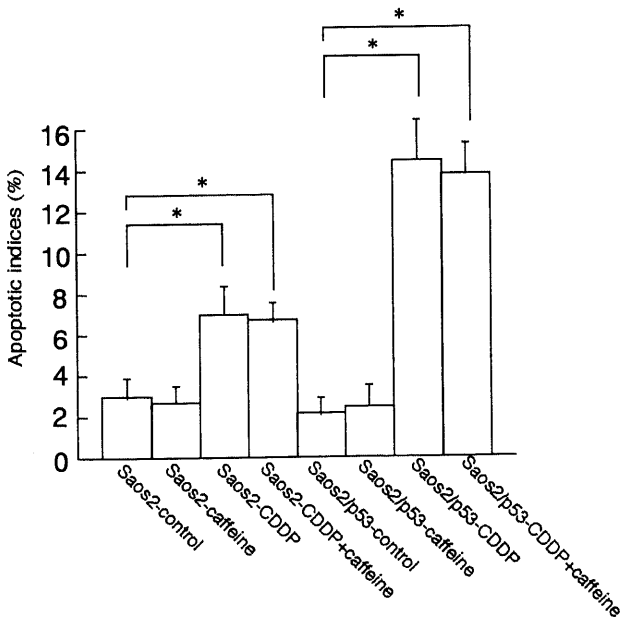

Fig. 6. Apoptotic indices of Saos2 and Saos2/p53 cells following 5ug/ml of CDDP treatment for 1hr and 5ug/ml CDDP treatment for 1hr followed by 0.5mM of caffeine treatment for 72hr. Apoptotic indices were obtained as percentage of terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end-labeling positive cells relative to the total number of cells. The $\bar{x} \pm$ SD of the values in six independent experiments were shown. *p<0.01 by Student's t test.

考　　察

キサンチン誘導体であるカフェインは，放射線や紫外線および抗癌剤で損傷されたDNAが修復されるのを障害し，それ自身では細胞毒性を持たない低濃度で作用させても，殺細胞効果の増強が認められることが試験管内実験や臨床試験で報告されている[28)~31)]．当講座の土屋は，ヒト骨肉腫細胞を用いた実験で，カフェインを抗癌剤と併用することにより，殺細胞効果が増強されることを報告した[32)33)]．その成果を1990年より臨床応用し，術前にはカフェイン併用動注化学療法，術後にはカフェイン併用静注化学療法という従来なかった方法を行い，初診時に遠隔転移のない骨肉腫の症例では，局所有効率100%，5年生存率は90%と良好な成績を得ている[34)]．しかしながら，初診時にすでに遠隔転移を有している症例では，局所有効率は低く，全例が2年以内に死亡している[35)]．このように，骨肉腫の症例の中には，治療開始時から抗癌剤に抵抗性を示すものがあり，その克服のためには既存の抗癌剤の効果を増強する薬剤や，新たな抗癌剤の開発，発見が求められている．

近年，癌抑制遺伝子として注目されている*p53*はしばしば乳癌，肺癌，大腸癌，膀胱癌，脳腫瘍，骨・軟部肉腫，血液腫瘍を含む多くの悪性腫瘍で変異が報告されている[7)8)]．この遺伝子が異常を起こして正常p53蛋白の機能が失われると，DNA損傷が生じた場合に細胞周期上G1期停止が起こらなかったり，アポトーシス誘導が阻害されることが報告されている[9)10)]．このことが細胞の癌化や細胞増殖を促すだけでなく，放射線治療や抗癌剤治療などの感受性にも影響を及ぼすとされている[13)]．骨肉腫に関しては，臨床研究におけるp53の変異の頻度が18-42%[14)~16)]であり，*p53*遺伝子が異常な場合や免疫染色が陽性，すなわち変異型p53蛋白が発現している場合には予後が不良であると報告されている[17)~19)]．変異型*p53*遺伝子を有していたり，*p53*遺伝子が欠失しているために正常なp53蛋白が機能しない

細胞に野生型*p53*遺伝子を導入し，正常型p53蛋白を過剰発現させることにより細胞増殖が抑制されることが肺癌[36]，乳癌[37]，大腸癌[38]，神経膠腫[39]，前立腺癌[40]などの培養細胞を用いた実験で報告されている．骨肉腫細胞においても野生型*p53*遺伝子を導入し，細胞増殖に対する影響や放射線感受性の変化について検討した報告がなされている．Diller ら[21]は*p53*遺伝子が欠失したヒト骨肉腫細胞Saos2に野生型と変異型の*p53*遺伝子を導入し，野生型*p53*遺伝子を導入した細胞において増殖抑制が認められたと報告した．また，Miyakoshi ら[22]は*p53*遺伝子が欠失しているヒト骨肉腫細胞Saos2に野生型*p53*遺伝子を導入した場合，親細胞に比べて 放射線に対する感受性が増加したクローンと低下したクローンが生じたことから，正常型p53蛋白の発現が放射線に対する感受性を決定する一つの因子であると報告した．これまで，ヒト骨肉腫細胞に野生型*p53*遺伝子を導入し，抗癌剤感受性の変化について検討した報告はない．そこで本研究では，ヒト骨肉腫細胞に野生型*p53*遺伝子を導入し，正常p53蛋白を発現させることにより，細胞増殖能，シスプラチンによる殺細胞効果の変化，さらにDNA修復阻害物質であるカフェイン併用時のp53蛋白の発現抑制効果と殺細胞効果増強に与える影響について検討した．

今回の実験において，p53蛋白が欠失しているSaos2に野生型*p53*遺伝子を導入した場合に，正常型p53蛋白の発現が認められるようになり，シスプラチンによる殺細胞効果の増強およびアポトーシス誘導の増強が認められた．しかしながら，HOSとOSTについては野生型*p53*遺伝子を導入してもシスプラチンによる殺細胞効果の増強は見られなかった．これはOSTとHOSでは，すでにそれぞれ野生型，変異型*p53*遺伝子を有し，p53蛋白を発現していることによりp53蛋白の過剰発現が生じず，特にHOSではドミナント・ネガティブ効果[41]の影響が考えられた．すなわち，元来存在する変異型p53蛋白と遺伝子導入によって発現するようになった正常型p53蛋白が結合することにより，正常型p53蛋白の機能が失われるという効果である．抗癌剤の殺細胞効果とp53蛋白の状態の関係については，正常型p53蛋白が発現しているとアポトーシス誘導により殺細胞効果が増強されるという報告[42][43]もあれば，逆に正常型p53蛋白が発現しているとG1停止が誘導され，DNA修復が行われるために殺細胞効果が減弱するという報告[44][45]もある．Weller[46]は抗癌剤によるDNA損傷が生じた場合に，G1停止を誘導してDNA修復を行うか，アポトーシスを誘導するかは，抗癌剤の種類，DNA損傷の程度ならびに細胞の種類によって異なると報告している．

正常型p53蛋白は細胞周期上のチェックポイント監視，アポトーシス誘導以外に，DNA複製，DNA修復，遺伝子の転写修飾ならびに安定性維持など多くの機能を有することが明らかとなってきている[47]が，DNA損傷後において，細胞周期はG1期だけでなくG2期でも停止し，DNA修復のために細胞周期の進行を止めることが知られている[48]．G2期停止については不明な点が多いが，最近，p53蛋白の誘導がG2期停止も引き起こすことから，p53依存のG2期停止機構の存在を示唆する報告がされている[49]~[52]．カフェインはこれまで放射線，紫外線や抗癌剤によるDNA損傷が生じた際にG2期停止を阻止し，細胞周期を進行させ，未成熟分裂から細胞死を導くことが報告されている[53]．p53とカフェインの関係についてKastan ら[54]は野生型*p53*遺伝子を有し，正常型p53蛋白を発現するヒト骨髄芽球白血病細胞にカフェインを加えてから放射線照射したところ，p53蛋白の過剰発現が抑制されたと報告した．本研究においても，シスプラチン処理後にカフェインを作用させることにより，正常型p53蛋白を発現している細胞株では，p53蛋白の発現が有意に抑制された．そのため，生じたDNA障害がG1期でもG2期でも修復されずに細胞周期が進行し，シスプラチン単独処理に比べて殺細胞効果の増強につながったと考えられた．カフェインとアポトーシスの関係について，Efferth ら[55]は野生型p53蛋白を発現しているが，c-Fos，c-Myc，ならびにBcl-2などのアポトーシス関連蛋白の発現状態が異なる種々のヒト骨髄性白血病細胞株を用いた研究を行った結果，放射線照射またはシスプラチンにカフェインを併用した場合のアポトーシス誘導の増強には，p53蛋白以外のアポトーシス関連蛋白の影響が示唆されると報告した．今回の実験から，野生型*p53*遺伝子の導入により，p53蛋白を発現するようになったSaos2/p53において，シスプラチンのみを作用させた場合とシスプラチンにカフェインを併用した場合を比較すると，アポトーシス陽性細胞の割合に有意差は認められなかった．これはカフェインによりp53蛋白の発現が抑制され，p53蛋白を介するアポトーシスは抑制されたが，シスプラチンとカフェインを併用した場合には，逆にp53蛋白を介さないアポトーシスが増強するため，全体としてアポトーシス陽性細胞の割合に差がなかったと推測された．今後はc-Fos，c-Myc，ならびにBcl-2などのp53蛋白以外のアポトーシス関連蛋白の発現状態についても解析していく必要がある．

骨肉腫において，個々の細胞の*p53*遺伝子の状態とシスプラチンに対する薬剤感受性は異なると考えられる．p53蛋白の状態に関わらず，もともとシスプラチン対する感受性が高い細胞では，シスプラチン単独でも十分な殺細胞効果が期待できる．次に*p53*遺伝子が野生型でシスプラチンに対する感受性が低い場合は，シスプラチンによるDNA損傷が軽度であり，細胞周期を停止しDNA修復が行われる．この場合，カフェインを併用することにより正常型p53蛋白の発現を抑制し，DNA修復のためのG1停止およびG2停止を抑制して未成熟分裂を誘導したり，カフェイン併用によるp53蛋白を介さないアポトーシスを誘導することにより殺細胞効果の増強が期待できる．*p53*遺伝子が変異または欠失していてシスプラチンに対する感受性が低い場合は，野生型*p53*遺伝子を導入して正常型p53蛋白を発現させることにより，シスプラチンに対する感受性を高めたり，カフェインを併用することにより，さらに殺細胞効果の増強が期待できると考えられた．以上より，全体としての殺細胞効果を考えた場合，p53蛋白の機能が正常である細胞にシスプラチンとカフェインを併用した場合が，最も殺細胞効果が高いということが予想された．

本研究から，正常型p53蛋白を発現していないヒト骨肉腫細胞に野生型*p53*遺伝子を導入し，正常型p53蛋白を発現させることにより，細胞増殖を抑制したり，シスプラチンによるDNA損傷に対してp53を介するアポトーシスを誘導して，殺細胞効果を高められることが示された．さらに，シスプラチンにカフェインを併用することで殺腫瘍細胞効果をさらに増強させることが可能であることが明らかとなった．

結　　論

癌抑制遺伝子*p53*の状態が異なる3種類のヒト骨肉腫細胞に，野生型*p53*遺伝子を導入し，p53蛋白の発現量，細胞増殖能，

シスプラチンによる殺細胞効果の変化，さらにDNA修復阻害物質であるカフェイン併用時のp53蛋白の発現抑制効果と殺細胞効果増強に与える影響について検討し，以下のような結果を得た．

1．正常p53蛋白を発現するOST細胞株では，野生型*p53*遺伝子の導入前後でp53蛋白の発現量，細胞増殖能，およびシスプラチンの殺細胞効果に変化は認められなかった．また，野生型*p53*遺伝子導入前から認められていたカフェイン併用時のp53蛋白の発現抑制効果ならびに殺細胞効果増強に関して変化は認められなかった．

2．変異型p53蛋白を発現するHOS細胞株では，野生型*p53*遺伝子の導入後に細胞増殖速度の低下が認められたが，p53蛋白の発現量，細胞増殖能，およびシスプラチンの殺細胞効果に変化は認められず，さらに，カフェイン併用時のp53蛋白の発現抑制効果および殺細胞効果増強に関しても変化は認められなかった．

3．*p53*遺伝子が欠失し，p53蛋白の発現を全く認めないSaos2細胞株では，野生型*p53*遺伝子導入後のSaos2/p53細胞株において，p53蛋白の発現が認められるようになり，細胞増殖速度の低下，およびシスプラチンの殺細胞効果の増強が認められた．また，カフェイン併用時のp53蛋白の発現抑制効果ならびに殺細胞効果の増強も認められた．

4．殺細胞効果の増強が認められたSaos2/p53細胞株では，Saos2細胞株に比べ，シスプラチン単独処理時，およびカフェイン併用時のいずれにおいても，TUNEL法ならびにDNAラダーの観察によりアポトーシス誘導の増強が認められた．

以上の結果から，正常型p53蛋白は，細胞周期の調節，およびシスプラチン処理時のアポトーシス誘導を含む多機能な作用を有することが確認された．さらに，カフェイン併用時のシスプラチンに対する殺細胞効果の増強には，正常p53蛋白の発現が必要であることが明らかとなった．このことから，*p53*遺伝子の異常のため，化学療法に抵抗性を示すヒト骨肉腫症例に対して，野生型*p53*遺伝子を用いた遺伝子治療とカフェイン併用化学療法により，さらに抗癌剤感受性が増強される可能性が示唆された．

謝　　辞

稿を終えるにあたり，御指導，御校閲を賜りました金沢大学医学部整形外科学講座富田勝郎教授に深甚なる謝意を表します．本研究に関し終始直接の御指導をいただきました同講座土屋弘行講師に心から感謝いたします．本研究の遂行に際し，多大な御助言と御協力いただきました金沢医科大学第二病理学教室上田善道助教授，金沢大学癌研究所免疫生物部岡田源作博士，整形外科腫瘍班の先生方に感謝の意を表します．なお，本論文の要旨は，The 9th International Symposium of Limb Salvage (1997年，New York) および第12回日本整形外科学会基礎学術集会 (1997年，新潟)，第3回日米加欧整形外科基礎学会合同会議 (1998年，浜松) において発表した．

文　　献

1) Friedman MA, Carter SK. The therapy of osteogenic sarcoma: current status and thoughts for the future. J Surg Oncol 4: 482-510, 1972

2) Jaffe N, Raymond AK, Ayala A, Carrasco CH, Wallace S, Robertson R, Griffiths M, Wang YM. Effect of cumulative courses of intraarterial cis-diamminedichloroplatin-II on the primary tumor in osteosarcoma. Cancer 63: 63-67, 1989

3) Bacci G, Picci P, Avella M, Ferrari S, Casadei R, Ruggieri P, Brach del Prevert A, Tienghi A, Battistini A, Mancini A. Effect of intra-arterial versus intravenous cisplatin in addition to systemic adriamycin and high-dose methotrexate on histologic tumor response of osteosarcoma of the extremities. J Chemother 4: 189-195, 1992

4) Tomita K, Tsuchiya H. Intermediate results and functional evaluation of limb-salvage surgery for osteosarcoma; An intergroup study in Japan. J Surg Oncol 41: 71-76, 1989

5) Tsuchiya H, Tomita K. Prognosis of osteosarcoma treated by limb-salvage surgery: the ten-year intergroup study in Japan. Jpn J Clin Oncol 22: 347-353, 1992

6) Bacci G, Picci P, Ferrari S, Ruggieri P, Casadei R, Tienghi A, Brach del Prever A, Gherlinzoni F, Mercuri M, Monti C. Primary chemotherapy and delayed surgery for nonmetastatic osteosarcoma of the extremities. Cancer 72: 3227-3238, 1993

7) Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. p53 mutations in human cancers. Science 253: 49-53, 1991

8) Harris CC, Hollstein M. Clinical implications of the p53 tumor-suppressor gene. N Engl J Med 329: 1318-1327, 1993

9) Levine AJ, Monand J, Finlay CA. The p53 tumour suppressor gene. Nature 351: 453-456, 1991

10) Vogelstein B, Kinzler KW. p53 function and dysfunction. Cell 70: 523-526, 1992

11) Goh HS, Yao J, Smith DR. p53 mutation and survival in colorectal cancer patients. Cancer Res 55: 5217-5221, 1995

12) Fisher DE. Apoptosis in cancer therapy: crossing the threshold. Cell 78: 539-542, 1994

13) Hamada M, Fujiwara T, Hizuta A, Gochi A, Naomoto Y, Takakura N, Takahashi K, Roth JA, Tanaka N, Orita K. The p53 gene is a potent determinant of chemosensitivity and radiosensitivity in gastric and colorectal cancers. J Cancer Res Clin Oncol 122: 360-365, 1996

14) Toguchida J, Yamaguchi T, Ritchie B, Beauchamp RL, Dayton SH, Herrera GE, Yamamuro T, Kotoura Y, Sasaki MS, Little JB, Weichselbaum RR, Ishizaki K, Yandell DW. Mutation spectrum of the p53 gene in bone and soft tissue sarcoma. Cancer Res 52: 6194-6199, 1992

15) Andreassen A, Oyjord T, Hoving E, Holm R, Florenes VA, Nesland JM, Myklebost O, Hoie J, Bruland OS, Borresn AL, Fodstadt O. p53 abnormalities in different subtypes of human sarcomas. Cancer Res 53: 468-471, 1993

16) Ueda Y, Dockhorn- Dworniczack B, Blasius S, Mellin W, Wuisman P, Bocker W, Roessner A. Analysis of mutant P53 protein in osteosarcomas and other malignant and benign lesions of bone. J Cancer Res Clin Oncol 119: 172-178, 1993

17) 西川哲夫，山本哲司，水野耕作，藤盛孝博，前田　盛，鵜飼和浩．骨肉腫における癌抑制遺伝子p53蛋白発現についての検討．日整会誌 68: 400-406, 1994

18) Wadayama B, Toguchida J, Yamaguchi T, Sasaki MS, Yamamuro T. p53 expression and its relationship to DNA alterations in bone and soft tissue sarcomas. Br J Cancer 68: 1134-1139, 1993

19) Mousses S, McAuley L, Bell RS, Kandel R, Andrulis IL.

Molecular and immunohistochemical identification of p53 alterations in bone and soft tissue sarcomas. Mod Pathol 9: 1-6, 1996

20) Lonardo F, Ueda T, Huvos AG, Healey J, Ladanyi M. p53 and MDM2 alterations in osteosarcomas. Cancer 79: 1541-1547, 1997

21) Diller L, Kassel J, Nelson CE, Gryka MA, Litwak G, Gebhardt M, Bressac B, Ozturk M, Baker SJ, Vogelstein B, Friend SH. p53 functions as a cell cycle control in osteosarcomas. Mol Cell Biol 10: 5772-5781, 1990

22) Miyakoshi J, Yamagishi N, Ohtsu S, Takebe H. Changes in radiation sensitivity of human osteosarcoma cells after p53 introduction. Jpn J Cancer Res 86: 711-713, 1995

23) Masuda H, Miller C, Koeffler HP, Battifora H, Cline MJ. Rearrangement of the p53 gene in human osteogenic sarcomas. Proc Natl Acad Sci USA 84: 7716-7719, 1987

24) 朝田尚宏, 土屋弘行, 富田勝郎. 骨肉腫に対するカフェイン併用化学療法の分子生物学的検討 ーカフェインによるシスプラチン増強効果におけるp53蛋白の役割ー. 臨床整形外科 32: 31-37, 1997

25) Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem 162: 156-159, 1987

26) Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685, 1970

27) Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. J Cell Biol 119: 493-501, 1992

28) Fraval, HNA, Roberts, JJ. Effects of cis-platinum(II) diamminedichloride on survival and the rate of DNA synthesis in synchronously growing HeLa cells in the absence and presence of caffeine. Chem Biol Interact 23: 111-119, 1978

29) Painter RB. Effect of caffeine on DNA synthesis in irradiated mammalian cells. J Mol Biol 143: 289-301, 1980

30) Lau CC, Pardee, AB. Mechanism by which caffeine potentiates lethality of nitrogen mustard. Proc Natl Acad Sci USA 79: 2942-2946, 1982

31) Schlegel R, Pardee, AB. Caffeine-induced uncoupling of mitosis from the complication of DNA replication in mammalian cells. Science 232: 1264-1266, 1986

32) 土屋弘行, 富田勝郎. ヒト骨肉腫培養細胞におけるシスプラチンとカフェインの併用効果. 癌と化学療法 14: 3125-3130, 1987

33) 土屋弘行. カフェインによる制癌剤の効果増強に関する研究. 十全医会誌 97: 543-556, 1988

34) Tsuchiya H, Tomita K, Mori Y, Asada N, Kitano S, Morinaga T, Yamamoto N. Caffeine-assisted chemotherapy and minimized tumor excision for nonmetastatic osteosarcoma. Anticancer Res 18: 657-666, 1998

35) Tsuchiya H, Tomita K, Sugihara M, Katsuo S, Tokuumi Y, Sunayama C, Matsuda E, Asada N. Intra-arterial chemotherapy combined with caffeine and conservative surgery for osteosarcoma. Proc Int Cancer Cong 16: 2453-2456, 1994

36) Takahashi T, Carbone D, Takahashi T, Nau MM, Hida T, Linnoila I, Ueda R, Minna JD. Wild-type but not mutant p53 suppresses the growth of human lung cancer cells bearing multiple genetic lesions. Cancer Res 52: 2340-2343, 1992

37) Casey G, Lo-Hsueh M, Lopez ME, Vogelstein B, Stanbridge EJ. Growth suppression of human breast cancer cells by the introduction of a wild-type p53 gene. Oncogene 6: 1791-1797, 1991

38) Baker SJ, Markowitz S, Fearon ER, Willson JKV, Vogelstein B. Suppression of human colorectal carcinoma cell growth by wild-type p53. Science 249: 912-915, 1990

39) Mercer WE, Shields MT, Amin M, Sauve GJ, Appella E, Romano JW, Ullrich SJ. Negative growth regulation in a glioblastoma tumor cell line that conditionally expresses human wild-type p53. Proc Natl Acad Sci USA 87: 6166-6170, 1990

40) Isaacs WB, Carter BS, Ewing CM. Wild-type p53 suppresses growth of human prostate cancer cells containing mutant p53 alleles. Cancer Res 51: 4716-4720, 1991

41) Milner J, Medcalf EA, Cook AC. Tumor suppressor p53: analysis of wild-type and mutant p53 complexes. Mol Cell Biol 11: 12-19, 1991

42) Fajac A, Da Silva J, Ahomadegbe JC, Rateau JG, Bernaudin JF, Riou G, Benard J. Cisplatin-induced apoptosis and p53 gene status in a cisplatin-resistant human ovarian carcinoma cell line. Int J Cancer 68: 67-74, 1996

43) Blagosklonny MV, El-Deiry WS. Acute overexpression of wt p53 facilitates anticancer drug-induced death of cancer and normal cells. Int J Cancer 75: 933-940, 1998

44) Fan S, Smith ML, Rivet DJ 2nd, Duba D, Zhan Q, Kohn KW, Fornace AJ Jr, O'Connor PM. Disruption of p53 function sensitizes breast cancer MCF-7 cells to cisplatin and pentoxifylline. Cancer Res 55: 1649-1654, 1995

45) Hawkins D, Demers W, Galloway D. Inactivation of p53 enhances sensitivity to multiple chemotherapeutic agents. Cancer Res 56: 892-898, 1996

46) Weller M. Predicting response to cancer chemotherapy: the role of p53. Cell Tissue Res 292: 435-445, 1998

47) Elledge RM, Lee WH. Life and death by p53. Bioessays 17: 923-930, 1995

48) Elledge SJ. Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis. Science 274: 1664-1672, 1996

49) Agarwal ML, Agarwal A, Taylor WR, Stark GR. p53 controls both the G2/M and the G1 cell cycle checkpoints and mediates reversible growth arrest in human fibroblasts. Proc Natl Acad Sci USA 92: 8493-8497, 1995

50) Pellegata NS, Antoniono RJ, Redpath JL, Stanbridge EJ. DNA damage and p53-mediated cell cycle arrest: a reevaluation. Proc Natl Acad Sci USA 93: 15209-15214, 1996

51) Busse PM, Bose SK, Jones RW, Tolmach LJ. The action of caffeine on X-irradiated HeLa cells. III. Enhancement of X-ray-induced killing during G2 arrest. Radiat Res 76: 292-307, 1978

52) Fingert HJ, Chang JD, Pardee AB. Cytotoxic, cell cycle, and chromosomal effects of methylxanthines in human tumor cells treated with alkylating agents. Cancer Res 46: 2463-2467, 1986

53) Lau CC, Pardee AB. Mechanism by which caffeine potentiates lethality of nitrogen mustard. Proc Natl Acad Sci USA 79: 2942-2946, 1982
54) Kastan MB, Onyekwere O, Sidransky D, Vogelstein B, Craig RW. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. Cancer Res 51: 6304-6311, 1991
55) Efferth T, Fabry U, Glatte P, Osieka R. Expression of apoptosis-related oncoproteins and modulation of apoptosis by caffeine in human leukemic cells. J Cancer Res Clin Oncol 121: 648-656, 1995

Changes in the Cytotoxity of Cisplatin and Synergistic Antitumor Effect of Caffeine Caused by the Introduction of the Wild-type *p53* Genes into Human Osteosarcoma Cell Lines

Yoshihiko Mori, Department of Orthopeadic Surgery, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 — J. Juzen Med Soc., **107,** 493 — 503 (1998)

Key words wild-type p53, transfection, cisplatin, caffeine, human osteosarcoma

Abstract

The p53 tumor suppressor gene product is an important participant in the cellular response to DNA damage. This response results in either G1 cell cycle arrest or cell death by apoptosis. Therefore the status of p53 can be expected to affect the cellular response to DNA-damaging cytotoxic agents. The present study was performed to investigate whether introduction of the wild-type *p53* gene into human osteosarcoma cells could change growth rates and enhance the cytocidal effect of cisplatin and the synergistic antitumor effect of caffeine. Three human osteosarcoma cell lines, OST (wild *p53* alleles), Saos2 (both *p53* alleles deleted), and HOS, (both mutant *p53* alleles) were used. Wild-type *p53* expression plasmid were transfected into each of the osteosarcoma cell lines by using the lipofection method. The transfected cells, Saos2/p53 and HOS/p53, showed a reduction in growth rate compared with their parent cells. WST-1 assay, performed to assess the cytocidal effect of cisplatin and the synergistic antitumor effect of caffeine, showed that Saos2/p53 cells were twice as sensitive to cisplatin alone in IC_{50} as the original Saos2 cells. The synergistic antitumor effect of was caffeine also enhanced in the Saos2/p53 cell line. The other two transfected cells revealed no significant differences from their respective parent cells. Furthermore, use of terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end-labeling assay to analyze apoptotic events in Saos2 and Saos2/p53 cells after treatment with either cisplatin alone or with cisplatin and caffeine revealed that, compared with the parent Saos2 cell line, Saos2/p53 become more sensitive to both cisplatin alone and to cisplatin with caffeine. OST/p53 and HOS/p53 cell lines did not show any significant increase in sensitivity to either cisplatin alone or to cisplatin with caffeine. These results demonstrate that the cytocidal effect of cisplatin and the synergistic antitumor effects of caffeine are enhanced by introduction of the wild-type *p53* gene in a human osteosarcoma cell line with deleted *p53* alleles, indicating the possibility of gene therapy using the *p53* gene for human osteosarcomas with abnormal p53 status.