

肺癌細胞における放射線誘発アポトーシスの研究 Fas抗原及びBcl-2蛋白との関連

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/2297/9221

肺癌細胞における放射線誘発アポトーシスの研究

—Fas 抗原および Bcl-2 蛋白との関連—

金沢大学医学部医学科放射線医学講座 (主任: 高島 力教授)

高 仲 強

肺癌細胞株および組織における放射線誘発アポトーシスの発現とアポトーシス関連遺伝子である Fas 抗原および Bcl-2 蛋白の放射線誘発アポトーシスの発現に対する関与の有無の検討を行うことを本研究の目的とした。細胞株として人肺小細胞癌細胞由来の SBC-1, SBC-3 および人腺癌細胞由来の RERF-LC-MS を本研究に用いた。10Gy および 20Gy 照射, 抗 Fas 抗体 200ng/ml の添加, 10Gy 照射と抗 Fas 抗体 200ng/ml の添加併用の各処置後の各細胞株における細胞死亡率の変化と形態的变化を調べ, アポトーシス発現の有無および発現量を検索した。また, 肺小細胞癌患者および腺癌患者から得られた照射された肺癌組織におけるアポトーシス発現の有無を DNA ニック末端標識法を用いて検索した。さらに, 各細胞株における Fas 抗原および Bcl-2 蛋白の発現を 10Gy 照射前後で調べ, 放射線誘発アポトーシスに対するこれらアポトーシス関連遺伝子の関与の有無につき検討した。結果として, 放射線誘発アポトーシスは SBC-1, SBC-3 に発現し, その最大発現頻度は SBC-1 において 10Gy 照射48時間後 $17.9 \pm 0.1\%$ ($\bar{x} \pm SD$), SBC-3 において 20Gy 照射72時間後 $9.6 \pm 2.3\%$ ($\bar{x} \pm SD$) であった。また, 放射線誘発アポトーシスの発現は, 照射された小細胞癌患者から得られた生検腫瘍組織においても確認された。一方, Fas 抗原の発現は SBC-3 および RERF-LC MS に, Bcl-2 蛋白の発現は全細胞株に認められた。10Gy 照射後 SBC-3 において Fas mRNA 発現の増加とそれに伴う Fas 抗原発現の増加があり, 抗 Fas 抗体によるアポトーシスの誘発が促進された。また, 10Gy 照射後 SBC-1 における Bcl-2 蛋白発現の減少があり, 放射線誘発アポトーシスに対する比較的高い感受性の一因となった。小細胞癌細胞とは対照的に RERF-LC-MS では放射線誘発アポトーシスは認められず, Fas 抗原の発現を認めても抗 Fas 抗体によるアポトーシスの誘発も認められなかった。また, 照射された腺癌組織でも放射線誘発アポトーシスの発現は認められなかった。この結果は, 肺小細胞癌と肺腺癌の放射線感受性の差にアポトーシス発現の有無が一因となっていることを示した。また, Fas 抗原や Bcl-2 蛋白の発現が放射線誘発アポトーシス発現の調節因子となっていること, さらに, 小細胞癌細胞においては照射がこれらの調節因子の発現を変化させることによってアポトーシス発現を変化させうることを示した。

Key words radiation, apoptosis, lung carcinoma, Fas antigen, Bcl-2 protein

細胞死は形態的にネクロシスとアポトーシスに分類される^{1)~4)}。ネクロシスは補体反応や重篤な虚血時等に細胞に認められる病理的反応と考えられており, これらの刺激因子は細胞膜の透過性を亢進させ, 結果として不可逆性の細胞腫大と細胞融解をもたらす⁵⁾。一方, アポトーシスは胎発生や加齢あるいは腫瘍退縮などにおける正常な細胞回転時に認められる生理的な過程と考えられている⁶⁾。アポトーシスは細胞容積の減少と細胞質およびクロマチンの濃縮を伴い, 結果としてヌクレオソーム単位での DNA の規則的な断片化が生ずることを特徴としている²⁾³⁾。

放射線生物学において, 放射線誘発細胞死は増殖死と間期死に分類し論じられてきた⁷⁾。増殖死は増殖性細胞における放射線による増殖機能の停止として定義される細胞死であり, 一般的に放射線誘発細胞死は増殖死を意味している。一方, 間期死はリンパ球や胸腺細胞などの非増殖性細胞に認められる増殖機能に依存しない特殊な細胞死である。これら非増殖性細胞に認

められる間期死が形態的にアポトーシスであることが知られ⁸⁾, 間期死研究が放射線誘発アポトーシス研究の端緒となった。しかし, 増殖性細胞における放射線誘発細胞死とアポトーシスとの関連性は不明な点が多く, 放射線高感受性の血液細胞由来の増殖性細胞に放射線誘発アポトーシスが認められることがわずかに知られているのみである^{9)~11)}。増殖性細胞における放射線誘発アポトーシスの関連を調べるために, 増殖性細胞として肺癌細胞における放射線誘発アポトーシスの有無を肺癌細胞株および肺癌患者からの生検材料を用いて検討することを本研究の第一の目的とした。

一方, アポトーシスの生化学的变化はエンドヌクレアーゼの活性化による DNA のヌクレオソーム単位への断片化であるが¹²⁾, アポトーシスの発現は種々の遺伝子産物によって調節されていることが知られている¹³⁾。この内, 細胞内にアポトーシス信号を伝達しうる細胞表面構造として Fas 抗原が同定された¹⁴⁾。また, 他にユニークな遺伝子として, 人濾胞性 B 細胞リ

平成 8 年 4 月 19 日 受付, 平成 8 年 5 月 16 日 受理

Abbreviations: ER, experimental release; PBS, phosphate-buffered saline; SR, spontaneous release; TDT, terminal deoxynucleotidyl transferase; TR, total release

ンパ腫に認められる t(14; 18) 染色体転座の解析を通して Bcl-2 遺伝子が発見された¹⁵⁾。Bcl-2 の遺伝子産物はアポトーシスを抑制することにより血液細胞の生存を左右することが知られている¹⁶⁾¹⁷⁾。しかし、これらのアポトーシス関連遺伝子と増殖性細胞における放射線誘発アポトーシスとの関連性についてはほとんど知られていない。増殖性細胞としての肺癌細胞株における放射線誘発細胞死、特にアポトーシスに対するこれら遺伝子の関連性の有無の検討を本研究の第二の目的とした。

材料および方法

I. 細胞株および培養法

細胞株として人肺小細胞癌細胞由来の SBC-1, SBC-3 および人腺癌細胞由来の RERF-LC-MS を本研究に用いた。各細胞株は、37℃、5%二酸化炭素のインキュベーター内で、10%牛胎児血清 (fetal bovine serum, FBS) (Gibco Brl, Grand Island, USA) を加えたイーグル MEM 培地 (日水, 東京) を用い、ペトリディッシュ (Corning, Oneonta, USA) 内で培養された。各細胞株は細胞密度がコンフルエント (confluent) に達したとき、0.1%トリプシン-0.04%EDTA を用いて細胞を剥離し、新たな培地に継代培養した。

II. 照射

各培養細胞を0.1%トリプシン-0.04%EDTA 処理にて単一細胞に調製し、適当な細胞数をディッシュに附着させた後対数増殖期に照射を行った。線質は⁶⁰Co 照射装置 RCR-120-CI (東芝, 東京) から得られるγ線を用い、線量率約 50cGy/min, 室温, 空气中にて照射した。細胞の照射中、非照射コントロール細胞も同時間空气中に放置した。

III. ⁵¹Cr 標識法による細胞死判定

細胞死判定は⁵¹Cr 標識法にて行った¹⁸⁾。2×10⁶個の培養細胞をペトリディッシュに単層附着させた後、20μCi の⁵¹Cr-クロム酸ナトリウム (400-1200Ci/g, Du Pont, Boston, USA) を添加しインキュベーター内で3時間培養した。培養後リン酸緩衝液 (phosphate-buffered saline, PBS) (pH7.4) にて3回洗浄し、5ml の新鮮培地を加え測定試料とした。10Gy および 20Gy 照射、抗 Fas 抗体 (マウス IgM 型, MBL, 名古屋) 200ng/ml の添加、10Gy 照射と抗 Fas 抗体 200ng/ml の併用の各処置後、24時間毎72時間まで 100μl の培養上清をコントロールおよび細胞処置を行った各ペトリディッシュより採取し、1000×g、5分間の遠沈後上清を採取しその放射活性をガンマカウンターで測定した。⁵¹Cr 特異的放出率は実験放出値 (experimental release, ER), 自然放出値 (spontaneous release, SR), 全放出値 (total release, TR) を測定し、100×[ER (cpm)-SR (cpm)]/[TR (cpm)-SR (cpm)] として求めた¹⁸⁾。全放出値を求めるため観察時間終了後各ペトリディッシュを数回凍結解凍処理することにより細胞を破壊し、その培養上清 100μl を上と同様に遠沈して得られた上清の放射活性を測定した。実験は少なくとも3回繰り返して行い、その平均 ($\bar{x} \pm SD$) を細胞死亡率とした。

IV. 形態観察

0.1%トリプシン-0.04%EDTA 処理にて細胞をペトリディッシュより剥離し、PBS で2回洗浄し遠沈集液後 0.1M カンジル酸ナトリウム緩衝液 (pH7.2) で調製した2.5%グルタルアルデヒドで3時間前固定、PBS で調製した2%四酸化オスミウム (TAAB, Berks, U.K.) で1時間後固定した。次に、エタノール系列で順に脱水し、酸化プロピレン (和光, 大阪) に置換後エ

ポソ樹脂に包埋した。1μm の薄切片は0.5%トルイジンブルー染色後光学顕微鏡にて観察し、超薄切片はウランウム・鉛二重染色後電子顕微鏡日立 H-300 (日立, 東京) で観察した。

V. アポトーシス細胞数の計測

各細胞株中のアポトーシス細胞数の計測は、光学顕微鏡において200倍観察下で5視野を任意に選択し、細胞数400個中のアポトーシス細胞数を計測することにより行い、細胞数400個中の平均発現率をパーセント ($\bar{x} \pm SD$) で表した。この際、コントロール細胞におけるアポトーシスの自然発現率を差し引いた。ここで、アポトーシスとして典型的なクロマチン凝集像やその断片化像をもつ細胞をアポトーシス細胞として計測したが、アポトーシス後の変化と考えられる細胞破片像はアポトーシス細胞として計測しなかった。

VI. フローサイトメトリー

0.04%EDTA 液処理のみにて細胞をピペッティングによりペトリディッシュから剥離させ、PBS で洗浄後 PBS で調製した1%パラホルムアルデヒドで20分間室温で固定し、PBS で2回洗浄した。Fas 抗原の発現の評価には、Miyawaki ら¹⁹⁾の方法に従い1次抗体として抗 Fas 抗体を1%牛血清アルブミンを含む PBS で濃度 2.5μg/ml になるよう添加し、PBS で洗浄後2次抗体としてフィコエリスリン (phycoerythrin, PE) 標識抗マウス IgM 抗体 (Southern Biotechnology Associates, Inc., Birmingham, USA) で反応させ Cytron Absolute フローサイトメーター (Ortho Diagnostic Systems, 東京) で検索した。Bcl-2 蛋白の発現の評価には、Tamaru ら²⁰⁾の方法に従い細胞を50mM トリスクロル緩衝液 (pH7.4) で調製した0.1%トリトン X-100 (和光) に5分間浸透させた後、1次抗体として抗 Bcl-2 抗体 (ダコ・ジャパン, 京都) を濃度 3.0μg/ml になるよう添加し、PBS で洗浄後2次抗体としてフルオレスセイン・イソチオシアネ酸 (fluorescein isothiocyanate, FITC) 標識抗マウス IgG 抗体 (ダコ・ジャパン) で反応させ EPICS ELITE ESP フローサイトメーター (Coulter Corporation, Miami, USA) で検索した。

VII. ノザンプロット法

全 RNA を細胞より酸性グアニジンチオシアネート法²¹⁾により抽出した後、1%アガロース-ホルマリンゲル電気泳動で分離し常法²²⁾に従ってニトロセルロース膜 (BA 85, Schleicher & Schuell, Dassel, Germany) に転写した (以下ノザンプロット膜と略称)。ノザンプロット膜に対して5倍濃度 SSC (1倍濃度 SSC: 0.15M 塩化ナトリウム, 0.015M クエン酸ナトリウム), 5倍濃度デンハルト液 (0.1%ポリビニルピロリドン, 0.1%牛血清アルブミン, 0.1%フィコール), 0.1%SDS, 100μg/ml 変性サケ精子 DNA (Boehringer Mannheim, 東京) からなるプレハイブリダイゼーション液で68℃, 4時間反応させ、次にランダムプライマー法²³⁾によって³²P-dCTP (3000Ci/mmol, Amersham International, Buckinghamshire, U.K.) で標識した人 Fas-cDNA をプローブにして16時間ハイブリダイゼーションを行った。ノザンプロット膜を2倍濃度 SSC-0.1%SDS および0.1倍濃度 SSC-0.1%SDS にて順次洗浄後、X線フィルム (Fuji New RX X-Ray films, 富士フィルム, 東京), イメージアナライザー (Fujix Bio-Imaging Analyzer IPR1000, 富士フィルム) を用いてオートラジオグラフィーを行い、Fas mRNA を検出および定量した。

VIII. DNA ニック末端標識法

患者から生検で得られた組織切片を用い、DNA断片化の染色を従来法^{24,25)}に従った。ホルマリン固定パラフィン包埋された組織切片を脱パラフィンし、蒸留水で洗浄後10mM トリスクロール緩衝液 (pH7.4) に溶解した 20 μ g/ml プロテナーゼ K (和光) 溶液で室温で20分間反応させた。次に蒸留水で洗浄後2%過酸化水素水で20分間処理し、さらに蒸留水で洗浄後ターミナル・デオキシヌクレオチジル・トランスフェラーゼ (terminal deoxynucleotidyl transferase, TDT) (Gibco Brl) 0.3U/ μ l とビオチン-16-2'-デオキシウリジン-5'-三リン酸 (biotin-16-2'-deoxyuridine-5'-triphosphate, biotin-16-dUTP) (Boehringer Mannheim) 0.04nmol/ μ l を含む TDT 緩衝液を適量滴下し、各組織切片にカバーガラスをかけ37 $^{\circ}$ Cの加湿器で60分

間反応させた。次にカバーガラスをはずし、2倍濃度 SSC で15分間処理し、蒸留水、PBS、10% 兔血清で順次洗浄後30分間アビジン・ビオチン化ペルオキシダーゼ複合体 (Vecstatin ABC Kit, Vector Laboratories, Inc., Burlingame, USA) を反応させ、PBS で洗浄後ジアミノベンチジン (diamino-benzidine tetrahydrochloride, DAB) (同仁化学研究所, 熊本) 過酸化水素溶液で発色させた。最後にヘマトキシリンにて核染色を行った。TDT 処理前にカコシル酸ナトリウム緩衝液 (pH7.2) に溶解した 1 μ g/ml DNase 1 (Sigma, St. Louis, USA) 溶液で10分間処理した組織切片を陽性コントロールとして、TDT を含まずに TDT 緩衝液のみで処理した組織切片を陰性コントロールとして用い比較対照した。

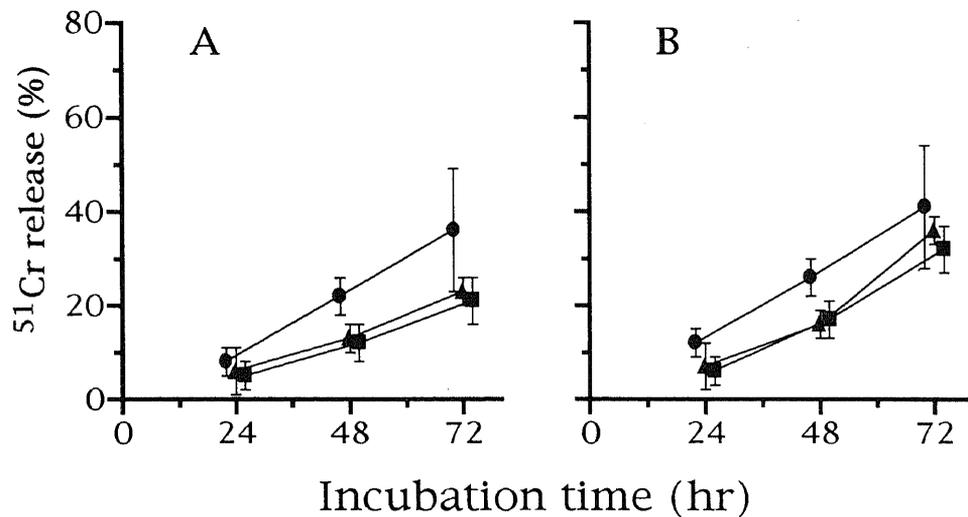


Fig. 1. Effect of irradiation on cell death in each cell line. Cell mortality was monitored by ^{51}Cr release every 24 hr up to 72 hr. Values are $\bar{x} \pm \text{SD}$. The data were obtained from at least three separate experiments. (A) Cell mortality after 10 Gy irradiation. (B) Cell mortality after 20 Gy irradiation. ●, SBC-1; ■, SBC-3; ▲, RERF-LC-MS.

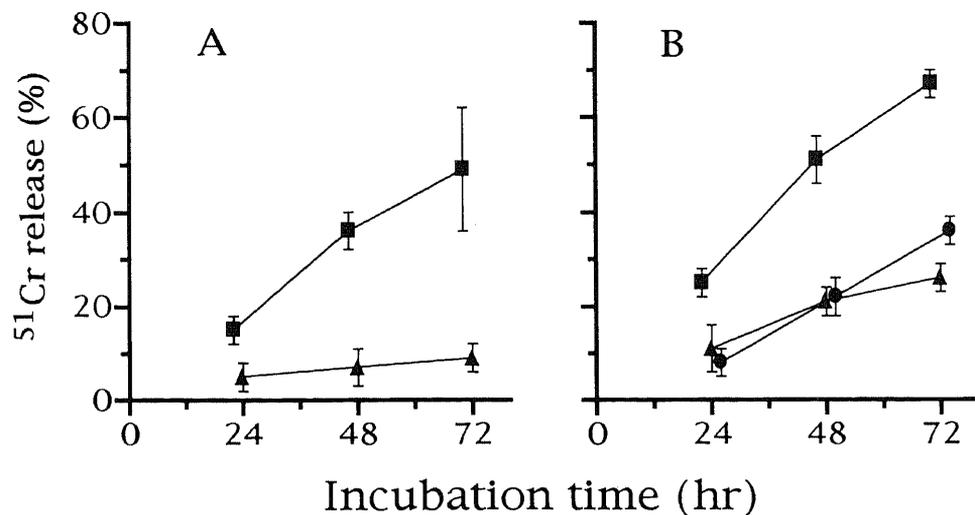


Fig. 2. Effect of anti-Fas antibody on cell death in each cell line. Cell mortality was monitored by ^{51}Cr release every 24 hr up to 72 hr. Values are $\bar{x} \pm \text{SD}$. The data were obtained from at least three separate experiments. (A) Cell mortality after 200 ng/ml anti-Fas antibody addition. (B) Cell mortality after 10 Gy irradiation and 200 ng/ml anti-Fas antibody addition. ●, SBC-1; ■, SBC-3; ▲, RERF-LC-MS. The figure of cell mortality after anti-Fas antibody addition in SBC-1 cells was not drawn because of no induction of cell death.

成 績

I. 細胞死亡率の経時的变化

1. 照射による細胞死亡率の変化

10Gy および 20Gy 照射後の各細胞株における細胞死亡率の

経時的变化を図1に示した。観察は24時間毎72時間まで行った。各細胞株とも経時的に死亡率の増加を認めたが、細胞株の内では SBC-1 が最も放射線感受性が高く 10Gy 照射72時間後で $36 \pm 13\%$, 20Gy 照射72時間後で $41 \pm 5\%$ の死亡率を示した。SBC-3 および RERF-LC-MS は同程度の死亡率の変化を示し、

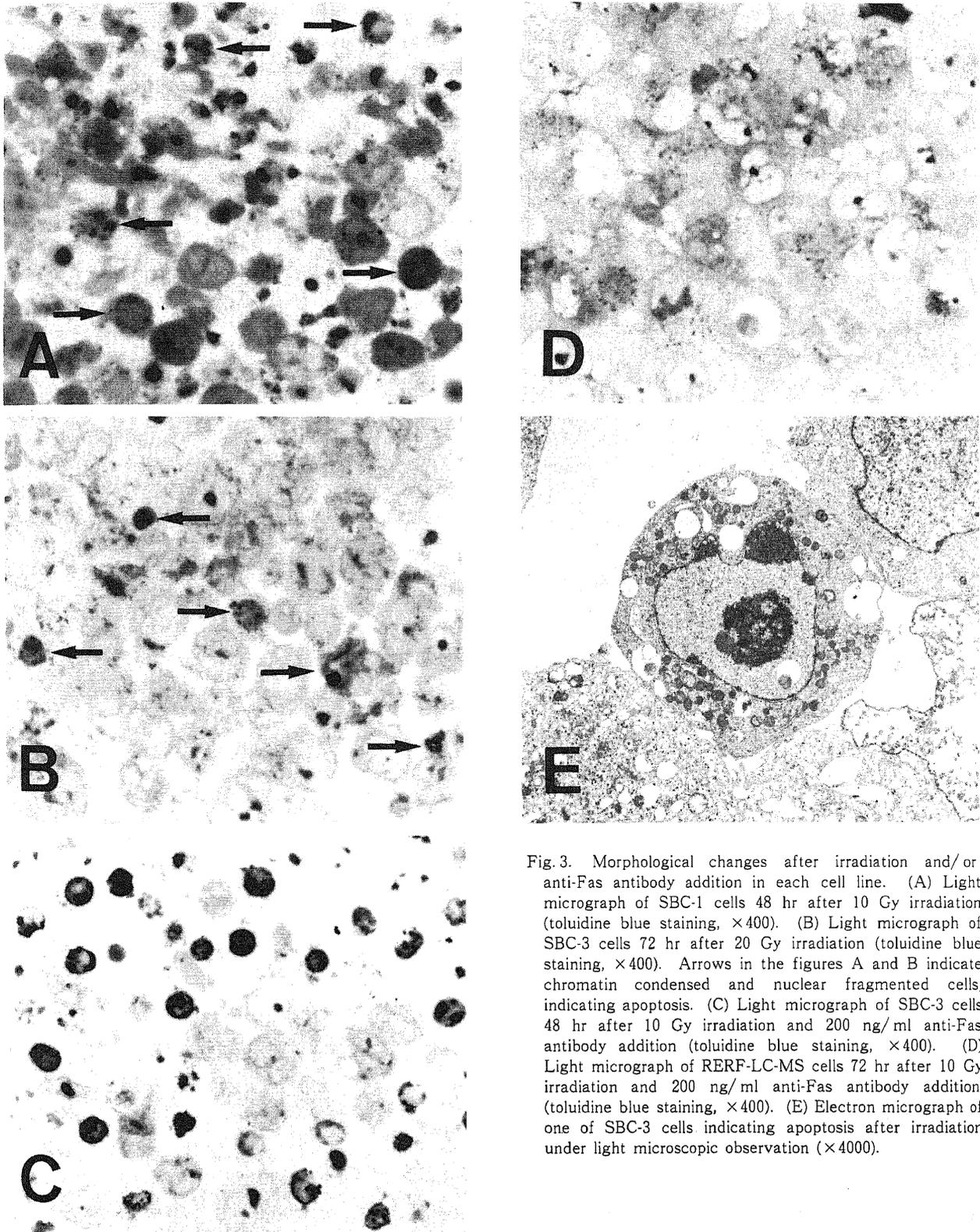


Fig. 3. Morphological changes after irradiation and/or anti-Fas antibody addition in each cell line. (A) Light micrograph of SBC-1 cells 48 hr after 10 Gy irradiation (toluidine blue staining, $\times 400$). (B) Light micrograph of SBC-3 cells 72 hr after 20 Gy irradiation (toluidine blue staining, $\times 400$). Arrows in the figures A and B indicate chromatin condensed and nuclear fragmented cells, indicating apoptosis. (C) Light micrograph of SBC-3 cells 48 hr after 10 Gy irradiation and 200 ng/ml anti-Fas antibody addition (toluidine blue staining, $\times 400$). (D) Light micrograph of RERF-LC-MS cells 72 hr after 10 Gy irradiation and 200 ng/ml anti-Fas antibody addition (toluidine blue staining, $\times 400$). (E) Electron micrograph of one of SBC-3 cells indicating apoptosis after irradiation under light microscopic observation ($\times 4000$).

10Gy 照射72時間後で SBC-3 では $21 \pm 5\%$, RERF-LC-MS では $23 \pm 2\%$, 20Gy 照射72時間後で SBC-3 では $32 \pm 3\%$, RERF-LC-MS では $36 \pm 3\%$ の死亡率を示した。

2. 抗 Fas 抗体添加による細胞死亡率の変化

抗 Fas 抗体 200ng/ml の添加および 10Gy 照射と抗 Fas 抗体 200ng/ml 添加併用による細胞死亡率の変化を図 2 に示した。観察は照射による場合と同様に 24時間毎 72時間まで行った。抗 Fas 抗体の添加では SBC-3 に明らかな細胞死が誘発され、添加 72時間後で細胞死亡率は $49 \pm 4\%$ に達した。RERF-LC-MS ではわずかに細胞死の増加が認められたが、SBC-1 では細胞死の誘発は認められなかった。10Gy の照射と抗 Fas 抗体 200ng/ml 添加の併用を行うと SBC-3 では著明な細胞死の増加を認め、72時間後に $67 \pm 2\%$ に達した。RERF-LC-MS でも若干の細胞死の増加が認められたが、SBC-1 では照射による細胞死以上の増加は認められなかった。

II. 形態変化

1. 光学顕微鏡観察

図 3 に照射および抗 Fas 抗体添加による各細胞株の形態変化を示した。10Gy 照射48時間後の SBC-1 では、細胞破片像を示す細胞に混じて細胞の凝縮像と核辺縁にクロマチン凝縮像やクロマチン断片化像を伴うアポトーシス細胞と考えられる細胞の増加を認めた(図 3A)。20Gy 照射72時間後の SBC-3 においても形態的に変化の少ない細胞に混じて同様にクロマチン凝縮像を伴うアポトーシス細胞の出現が認められ(図 3B)、また抗 Fas 抗体併用 10Gy 照射48時間後においては著明なアポトーシス細胞の出現があり、形態変化を示す細胞のほとんどがアポトーシス細胞となっていた(図 3C)。一方、RERF-LC-MS における形態変化は、照射後あるいは抗 Fas 抗体併用後であっても核および細胞輪郭の不鮮明な腫大を特徴としアポトーシス細胞の出現はなく、むしろネクローシスが主体と考えられた(図

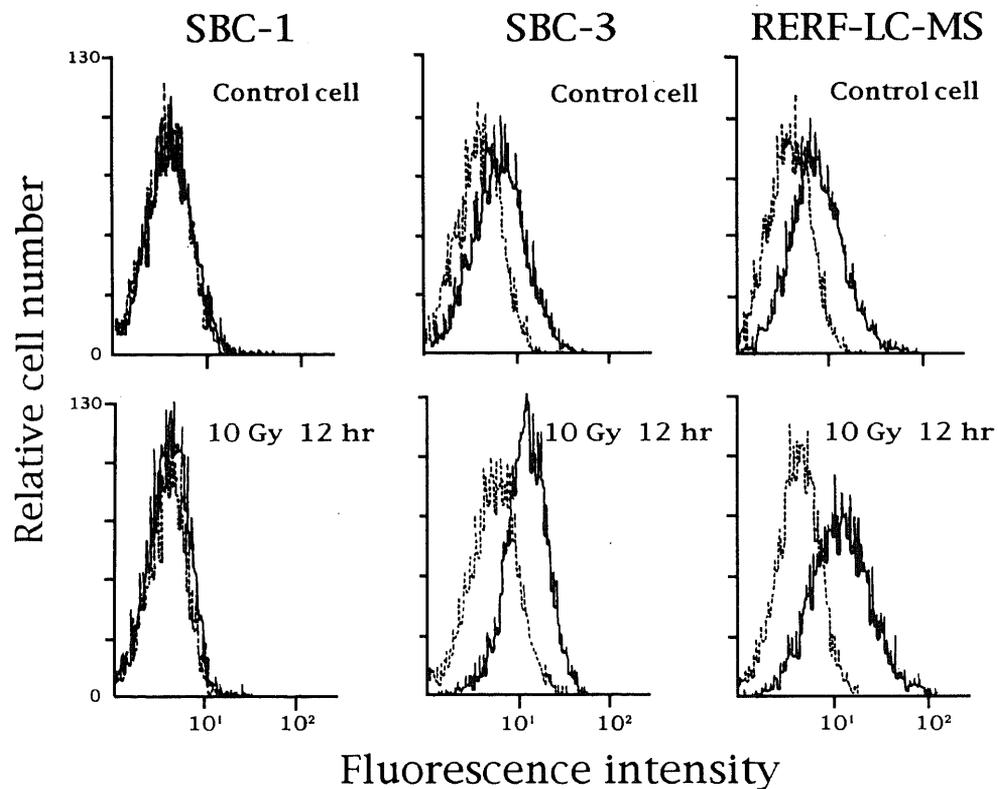


Fig. 4. Expression of Fas antigen on each cell line by flow cytometric analysis. Upper figures show the expression of Fas antigen on each non irradiated control cell line, lower figures show the expression of Fas antigen on each cell line 12 hr after 10 Gy irradiation. Solid lines indicate the profiles of each cell line and dashed lines indicate the profiles of the control with irrelevant antibody. Note the increased Fas antigen expression on SBC-3 cells and RERF-LC-MS cells after 10 Gy irradiation.

Table 1. Incidence of apoptosis after irradiation and/or anti-Fas antibody addition

Treatment	Incidence of apoptotic cells (%) in									
	SBC-1 cells incubated for					SBC-3 cells incubated for				
	6 hr	12 hr	24 hr	48 hr	72 hr	6 hr	12 hr	24 hr	48 hr	72 hr
10 Gy	ND	1.2 ± 0.4	4.9 ± 0.3	17.9 ± 0.1	7.4 ± 1.6	ND	0.3 ± 0.1	0.7 ± 0.2	1.8 ± 0.2	3.6 ± 0.9
20 Gy	NE	NE	3.8 ± 0.7	9.4 ± 1.3	NE	ND	0.9 ± 0.8	1.1 ± 0.2	4.6 ± 0.6	9.6 ± 2.3
Fas 200 ng/ml	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1.8 ± 0.2	14.1 ± 4.4	34.0 ± 0.6	NE
10 Gy + Fas 200 ng/ml	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	47.3 ± 3.5	NE

Values are $\bar{x} \pm SD$. Fas, anti-Fas antibody; ND, not detectable; NE, not examined.

3D). RERF-LC-MS における抗 Fas 抗体によるわずかな細胞死誘発は、アポトーシス誘発ではなく非特異的作用によるネクローシス誘発と考えられた。

2. 電子顕微鏡観察

光学顕微鏡において照射後核膜辺縁へのクロマチン凝縮像やクロマチンの断片化像などのアポトーシス像を呈した細胞を電子顕微鏡にて観察すると(図 3E), 核膜辺縁へのクロマチン凝縮像と細胞質構造の保持はアポトーシスとしての特徴的な形態変化を示し, 光学顕微鏡観察におけるアポトーシス細胞が電子顕微鏡的にもアポトーシス細胞として確認された。

III. アポトーシス細胞発現頻度の経時的変化

表 1 に 10Gy 照射, 抗 Fas 抗体 200ng/ml の添加, 10Gy 照射と抗 Fas 抗体 200ng/ml 添加併用後の SBC-1 および SBC-3 におけるアポトーシス細胞発現頻度の経時変化を示した。照射後においては SBC-1 および SBC-3 ともアポトーシス細胞は照射12時間後より発現を認め, 時間の経過とともにその増加を認めた。しかし, SBC-1 における発現頻度は, 10Gy 照射後に高く 20Gy 照射後ではむしろ低下し72時間後においても低下した。一方, SBC-3 における発現頻度は, 20Gy 照射後および72時間後に高く SBC-1 との相違が認められた。最大発現頻度は SBC-1 において 10Gy 照射48時間後 $17.9 \pm 0.1\%$, SBC-3 において 20Gy 照射72時間後 $9.6 \pm 2.3\%$ であり, SBC-1 の方が放射線誘発アポトーシスに対しより感受性が高いと考えられた。抗 Fas 抗体の添加では SBC-1 においては経過中アポトーシス細胞の発現は認められず, SBC-3 において抗 Fas 抗体添加後照射と同様に12時間後よりアポトーシス細胞の発現が認められ時間の経過とともに増加した。また, 10Gy 照射と抗 Fas 抗体 200ng/ml の添加併用では, SBC-3 におけるアポトーシス細胞の発現頻度は48時間後 $47.3 \pm 3.5\%$ で, 10Gy 照射あるいは抗

Fas 抗体 200ng/ml 添加単独による発現頻度の合計よりアポトーシス細胞の発現増加が認められた。この結果は, 照射と抗 Fas 抗体の併用では照射がアポトーシス細胞の発現増加に関与している可能性を示唆した。

IV. Fas 抗原と Bcl-2 蛋白の発現

1. Fas 抗原の発現

各細胞株におけるフローサイトメトリーによる Fas 抗原の発現についての結果を図 4 に示した。Fas 抗原の発現は SBC-3, RERF-LC-MS に認められたが SBC-1 には認められなかった。SBC-1, SBC-3 における抗 Fas 抗体添加による細胞形態の変化の結果は, このフローサイトメトリーの結果を示唆した。しかし, Fas 抗原の発現は RERF-LC-MS にも同様に認められた。抗 Fas 抗体を添加してもこの細胞には形態的にアポトーシスは誘発されず, Fas 抗原の発現を認めても抗 Fas 抗体は必ずしもアポトーシスを誘発しないことが示された。特徴的に 10Gy 照射12時間後 SBC-3, RERF-LC-MS における Fas 抗原の発現は照射前に比較して増加した。ノザンプロット法による Fas mRNA 発現の検討では照射前コントロールとしての SBC-3, RERF-LC-MS には Fas mRNA の発現を認めたが, 10Gy 照射後両細胞株に明らかに Fas mRNA の発現増加があり, SBC-3 における Fas mRNA の発現は12時間後6.7倍, RERF-LC-MS における Fas mRNA の発現は照射6時間後1.9倍に増加した(図 5)。この結果は, SBC-3 における照射と抗 Fas 抗体の併用後のアポトーシスの誘発の促進は照射による Fas mRNA の発現増加を介しての Fas 抗原の発現増加があり, その結果抗 Fas 抗体によるアポトーシスの誘発が促進されることを示しているが, RERF-LC-MS においては照射により同様に Fas 抗原の発現の増加が認められても依然として抗 Fas 抗体には不応であることも示した。

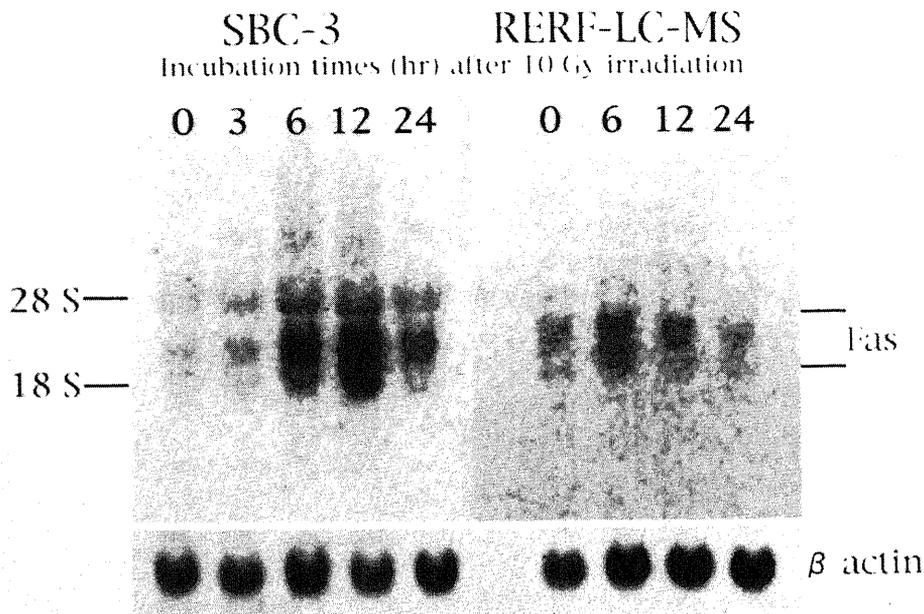


Fig. 5. Transient increase of Fas mRNA in SBC-3 and RERF-LC-MS cells after 10 Gy irradiation. RNA from irradiated cells was prepared at the times indicated in the figure and was examined by Northern blotting with a human Fas cDNA probe. The amount of Fas mRNA were quantified using an image analyzer. The same membrane was rehybridized with a human β -actin cDNA probe.

2. Bcl-2 蛋白の発現

各細胞株における Bcl-2 蛋白の発現についての結果を図 6 に示した。Bcl-2 蛋白の発現はコントロールとしての各細胞株に同程度に認められたが、10Gy 照射48時間後において SBC-1 に Bcl-2 蛋白の発現の減少した細胞の出現が認められた。SBC-3,

RERF-LC-MS では照射による Bcl-2 蛋白の発現に変化はなかったが、SBC-1 では照射が Bcl-2 蛋白の発現を減少させていることが示された。

V. 照射組織における DNA 断片化

図 7 に照射された肺癌組織におけるニック末端標識法を用い

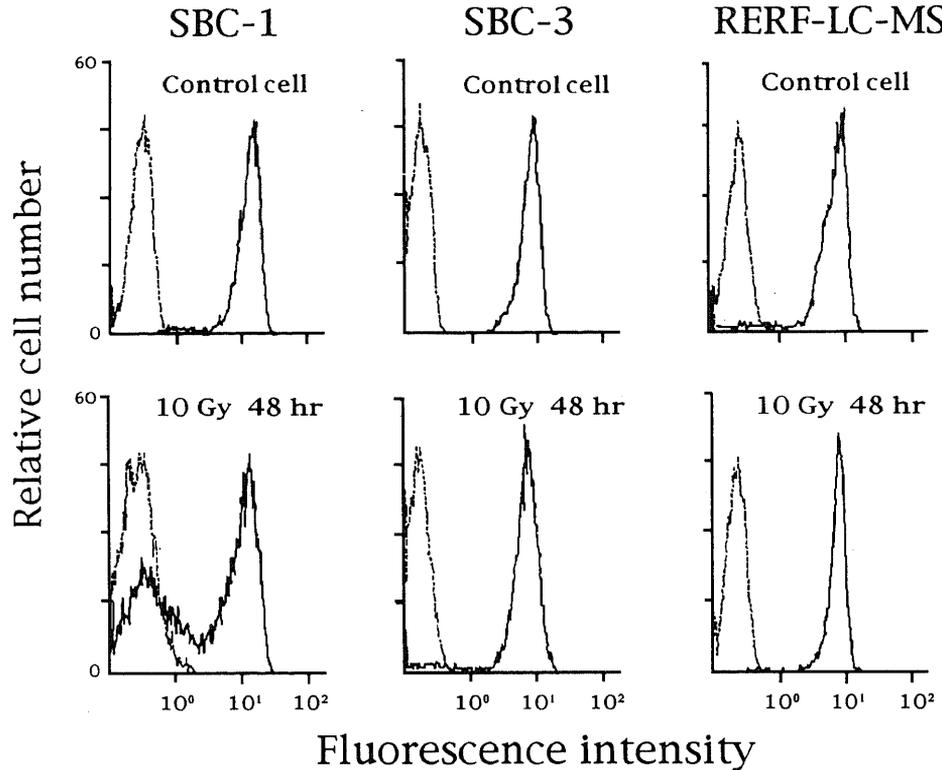


Fig. 6. Expression of Bcl-2 protein on each cell line by flow cytometric analysis. Upper figures show the expression of Bcl-2 protein on each non irradiated control cell line, lower figures show the expression of Bcl-2 protein on each cell line 48 hr after 10 Gy irradiation. Solid lines indicate the profiles of each cell line and dashed lines indicate the profiles of the control with irrelevant antibody. Note the appearance of downregulated level of Bcl-2 expression on SBC-1 cells after irradiation.

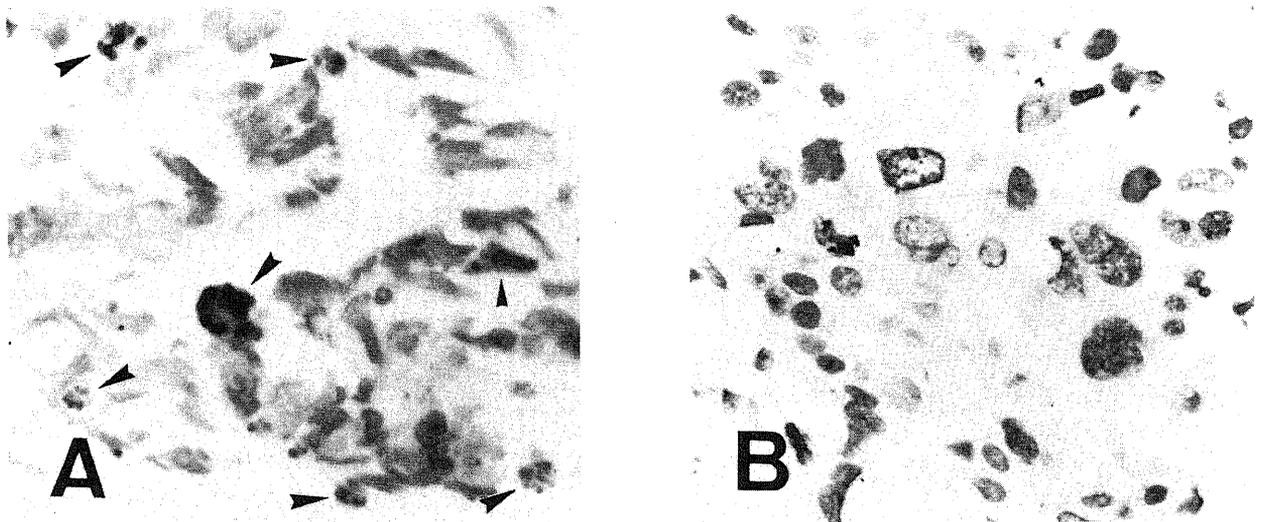


Fig. 7. DNA nick end labeling of tissue sections. (A) A small cell carcinoma tissue after 18 Gy irradiation ($\times 400$). (B) An adenocarcinoma tissue after 48 Gy irradiation ($\times 200$). Each tissue was obtained by biopsy during radiation therapy. DNA fragmentation was stained as described in Methods and observed under a light microscope. DNA fragmented cells (arrow heads), indicating apoptosis, are shown in the small cell carcinoma tissue.

た DNA 断片化の検索の結果を示した。症例 1 は 66 歳の男性で、手術後の再発小細胞癌のため縦隔、右肺門に放射線治療を受けた。18Gy 照射時点で気管支鏡により生検組織を腫瘍から採取し、生検標本に対しニック末端標識を行った。この時点で縦隔の再発腫瘍は部分寛解以上の縮小を呈していた。HE 染色では広範囲なネクロシス像と核の濃染した腫瘍細胞の多発を認め照射の効果を示したが、ニック末端標識では非ネクロシス部に核内の DNA 断片化が染色される陽性細胞の多発が認められた (図 7A)。この DNA 断片化を示す陽性細胞は腫瘍縮小とともに放射線で誘発されたアポトーシス細胞と考えられた。症例 2 は 60 歳の女性で、肺腺癌の右鎖骨上窩リンパ節転移に対し放射線治療を受けた。48Gy 照射時点で切除し、切除標本に対しニック末端標識を行った。この時点で腫瘍の縮小はほとんどなく不変の状態であった。HE 染色でも放射線治療の明らかな効果は認められず、ニック末端標識においても陽性細胞はほとんど認められなかった (図 7B)。放射線誘発アポトーシスの発現が腫瘍縮小とともに小細胞癌において認められたのに対し、腫瘍の縮小を認めなかった腺癌ではアポトーシスの発現は認められず対比性を示した。

考 察

従来、放射線誘発細胞死は増殖死と間期死に分類し論じられてきた⁹⁾。増殖死は増殖機能の停止に伴う細胞のコロニー形成能の停止、間期死は細胞膜の透過性の亢進による生体色素の染色性の増加として定義される。これらの細胞死は細胞の持つ生理的な機能の放射線による変化を定義したものであり、個々の細胞の形態的变化を捉えたものではない。しかし、非増殖性細胞である胸腺細胞やリンパ球に生ずる間期死が形態的および生化学的にアポトーシスであることが判明⁹⁾して以来、放射線誘発アポトーシスの種々の特徴が明らかになり²⁰⁾²⁷⁾、特徴的な形態変化を示すアポトーシスの観点からの放射線誘発細胞死の研究が盛んに行われるようになった²⁸⁾。一方、アポトーシスとして特徴的な性格を有する間期死に対して増殖性細胞における放射線誘発アポトーシスの関与の有無は明らかでなかったが、近年 Radford ら²⁹⁾³⁰⁾は増殖性の血液細胞株を用いて増殖性細胞における放射線誘発アポトーシスを、1) 早期間期死型、2) 分裂を伴わずに G2 期ブロックとして生ずる遅発間期死型、3) G2 期ブロックの回復後に生ずる増殖死型の 3 型に分類し論じている。早期間期死型は胸腺細胞などに見られる従来の間期死に相当し他の放射線高感受性の増殖性血液細胞などにも認められる³¹⁾³²⁾。遅発間期死型あるいは増殖死型は比較的放射線抵抗性細胞に認められたとしているが放射線高感受性血液細胞でも増殖死型が観察され⁹⁾、またある種の細胞では照射線量を変化させることによって早期間期死型と増殖死型の両者が観察されている¹⁰⁾。これらの報告は増殖性細胞における放射線誘発アポトーシスの関与を確認したものであるが、これら血液細胞由来の増殖性細胞株における放射線誘発アポトーシスは血液細胞自体が有しているアポトーシス能の反映とも考えられ、他の多くの増殖性細胞における放射線誘発アポトーシスの関与の有無は依然として不明である。

本研究は、上皮性増殖性細胞として肺癌細胞を選択し肺癌細胞における放射線誘発アポトーシスの有無を調べることを第一の目的とした。肺癌細胞の放射線誘発アポトーシスに関する本研究の結果は、以下の如くである。10Gy および 20Gy 照射後形

態的にアポトーシス細胞は小細胞癌細胞株である SBC-1、SBC-3 に発現した。その発現は照射 12 時間後より認められた。最大発現頻度は SBC-1 では 10Gy 照射 48 時間後 17.9±0.1%、SBC-3 では 20Gy 照射 72 時間後 9.6±2.3% で、SBC-1 の方がよりアポトーシス感受性であった。組織切片においても小細胞癌にその発現が認められた。腺癌細胞株である RERF-LC-MS ではアポトーシスの発現はなく、組織切片においても認められなかった。これらの結果は、放射線高感受性の血液細胞におけるアポトーシス発現と比較すると遅発性で低頻度なアポトーシス発現である。実験結果として呈示していないが、10Gy および 20Gy 照射後の SBC-1、20Gy 照射後の SBC-3 における細胞数の変化は間期死型を呈しており、Radford らの分類によればこのアポトーシス発現は遅発間期死型として分類される。早期間期死型では数 Gy の小線量照射後早期にアポトーシス発現が生ずるのを特徴とするが³⁰⁾、本研究においては高線量照射後に間期死をおこした小細胞癌細胞が遅発性にアポトーシス発現を呈したものと考えられる。このような照射後 G2 期ブロックから生ずる間期死が遅発性にアポトーシス像を呈するという報告は他の細胞にも認められ³¹⁾³²⁾、放射線誘発アポトーシスの一つの発現機序を示している。SBC-1 と SBC-3 では照射線量、経過時間によるアポトーシス発現に相違が認められ、20Gy 照射後あるいは 72 時間経過後の SBC-1 ではアポトーシスの発現頻度は低下している。照射線量に比例してアポトーシスの発現量も多くなるという報告が多いが³⁰⁾³²⁾³⁴⁾、大線量照射では逆にネクロシスをもたらしという報告も認められる³⁵⁾。本研究においても SBC-3 に比し放射線誘発アポトーシスに比較的感受性の高い SBC-1 においては 20Gy 照射するとアポトーシスよりむしろネクロシスが生ずるのかもかもしれない。個々の細胞にとってのアポトーシス発現のための至適線量の検討が今後必要であろう。一方、小細胞癌細胞に対し腺癌細胞の放射線に対する反応の相違が示されている。すなわち、組織を含めた小細胞癌細胞は放射線誘発アポトーシス能を有しているのに対し、腺癌細胞は同程度の細胞死亡率を示す細胞株においても、また組織においても放射線誘発アポトーシス能を有していない。すべての腺癌細胞がアポトーシス能を有していないわけではないが³⁶⁾、本研究の結果は小細胞癌と腺癌における腫瘍の縮小過程の相違にアポトーシス発現の有無が関与し、放射線感受性の差となっていることを示唆している。

しかし、放射線誘発アポトーシスの発現を認めても小細胞癌細胞株における発現頻度は高くなくむしろ低感受性であること、各細胞間で放射線誘発アポトーシスの発現能に差があることはアポトーシス発現を調節している因子の存在を窺わせており、アポトーシス関連遺伝子としての Fas 抗原や Bcl-2 蛋白の放射線誘発アポトーシスに対する関与の有無の検索が本研究の第二の目的である。Fas 抗原および Bcl-2 蛋白に関する本研究の結果は以下の如くである。Fas 抗原の発現は SBC-3 および RERF-LC-MS に認められた。しかし、抗 Fas 抗体は SBC-3 のみにアポトーシスを誘発した。Bcl-2 蛋白の発現はすべての細胞株に認められた。10Gy 照射後 SBC-3、RERF-LC-MS に Fas 抗原の発現の増加と SBC-1 に Bcl-2 蛋白の発現の減少が認められた。Bcl-2 蛋白は血液細胞においてアポトーシス発現を抑制する機能を持つと認められ¹⁶⁾¹⁷⁾、また Bcl-2 蛋白を過剰発現させた SBC-3 においてはある種の抗癌剤に対しアポトーシス抵抗性になるという報告は³⁷⁾、Bcl-2 蛋白の発現が本研究におけ

る放射線誘発アポトーシスの発現頻度を低下させた一つの原因である可能性を示している。照射後 Bcl-2 蛋白の発現の減少があり結果としてアポトーシスへの感受性が増加している SBC-1 における結果はこの可能性を示唆すると同時に、Bcl-2 蛋白発現が肺癌細胞においても放射線誘発アポトーシスの重要な調節因子であることを示すものである。特徴的なことは Bcl-2 蛋白の発現が照射により変化することで、Bcl-2 蛋白の発現が照射により変化し結果としてアポトーシスへの感受性が増加するという同様の結果が白血病細胞を用いた研究でも報告されている³⁹⁾。一方、Fas 抗原の発現は SBC-3, RERF-LC-MS に認めるも抗 Fas 抗体によるアポトーシス誘発は SBC-3 のみに認めた。Fas 抗原を介しての Fas 抗原誘発アポトーシスが、放射線誘発アポトーシスには比較的低感受性の SBC-3 におけるアポトーシス発現の促進的な調節因子となっていると考えられる。特徴的なことは SBC-1 における Bcl-2 蛋白の発現が照射後変化すると同様に、SBC-3 における Fas 抗原の発現が照射後増加し、結果として抗 Fas 抗体によるアポトーシス発現が増加していることである。ある種の刺激によって Fas 抗原の発現増加があり結果として抗 Fas 抗体によるアポトーシス発現が増加するという報告は、結腸癌細胞³⁹⁾や白血病細胞⁴⁰⁾を用いた研究やウイルス感染時⁴¹⁾などでも認められる。本研究の結果を含めたこれらの報告は Fas 抗原を介してのアポトーシス発現の調節を示しているが、さらに照射を含めた種々の刺激因子が Fas 抗原誘発アポトーシスの発現を変化させようということも示している。照射によるこれら調節因子の発現の変化はアポトーシス発現に対する照射の間接的な促進作用を示しており、これらの変化が臨床的に放射線感受性の高い小細胞癌細胞株に生じていることは注目すべきことと考えられる。しかし、RERF-LC-MS では SBC-3 と同様に Fas 抗原の発現と照射によるその増加が認められても抗 Fas 抗体によるアポトーシス誘発はなく、SBC-3 と対比性を呈している。血液細胞では Bcl-2 蛋白の発現が抗 Fas 抗体の作用を抑制するという報告もあり⁴²⁾、Bcl-2 蛋白の発現が RERF-LC-MS におけるアポトーシス発現の抑制因子になっている可能性はある。しかし、SBC-3 でも同様に Bcl-2 蛋白の発現が認められることや Fas 抗原の発現を認めても抗 Fas 抗体は必ずしもアポトーシスを誘発せずこの際抗 Fas 抗体の作用と Bcl-2 蛋白の発現は必ずしも相関しないという報告は⁴³⁾、RERF-LC-MS におけるアポトーシス発現の抑制が Bcl-2 蛋白の発現のみでは説明できないことを示している。実験結果として呈示していないが、蛋白合成阻害剤であるシクロヘキシミドを少量添加すると RERF-LC-MS は早期にアポトーシスにおちいる。この結果は RERF-LC-MS においても基本的にはアポトーシス能を有していることを示すと同時に、Bcl-2 蛋白を含めた他のアポトーシス発現の調節因子によりアポトーシス不応性になっていることを示している。最近、Bcl-2 蛋白の機能は Bcl-2 関連蛋白としての Bax, Bcl-xL, Bcl-xS などにさらに調節されることが知られており⁴⁴⁾、また p53 や c-myc などの他の遺伝子あるいはサイトカインなどがアポトーシス発現の調節因子となっていることも知られている⁴⁵⁻⁴⁸⁾。これら種々の調節因子が RERF-LC-MS や他の細胞株におけるアポトーシス発現に影響を与えていると考えられる。

小線量の照射でも放射線高感受性血液細胞では高率にアポトーシス発現が認められ³⁹⁾、放射線感受性にアポトーシス発現が密接に関連していることを窺わせる。また動物を用いた放射

線誘発アポトーシスに関するいくつかの研究でもアポトーシス発現量と腫瘍反応に正の相関があること、さらに腫瘍制御にも相関があることが報告されている^{49,51)}。しかし、腫瘍内異質性のためアポトーシス発現に制限があることも同時に報告されている⁵²⁾。本研究においても小細胞癌と腺癌の放射線治療後の腫瘍縮小過程にアポトーシス発現の有無が関連することと同時に細胞株においては放射線誘発アポトーシス発現には感受性の差があり種々の調節因子の存在が示された。この調節因子として肺癌細胞においても Fas 抗原や Bcl-2 蛋白発現がアポトーシス発現に影響を与えることも同時に示された。興味深い点は照射がこのような調節因子の発現を変化させ結果としてアポトーシス発現を変化させよう可能性があることで、特に肺小細胞癌との関連が目される。アポトーシス発現の癌治療に対する関連性の研究⁵³⁾はまだ緒についたばかりだが、アポトーシス発現のさらなる理解が肺癌等の放射線治療において治療成績を向上させることを期待したい。

結 論

肺癌細胞における放射線誘発アポトーシスの発現とアポトーシス関連遺伝子である Fas 抗原と Bcl-2 蛋白の放射線誘発アポトーシスの発現に対する関与の有無の検討を行い、以下の結果を得た。

1. 放射線誘発アポトーシスは小細胞癌細胞株である SBC-1, SBC-3 に発現し、その最大発現頻度は SBC-1 において 10Gy 照射 48 時間後 17.9±0.1%、SBC-3 において 20Gy 照射 72 時間後 9.6±2.3% であった。
2. 放射線誘発アポトーシスの発現は照射された小細胞癌患者から得られた生検腫瘍組織においても確認された。
3. Fas 抗原の発現は SBC-3 および腺癌細胞株である RERF-LC-MS に、Bcl-2 蛋白の発現は全細胞株に認められた。
4. 10Gy 照射後 SBC-3 において FasmRNA 発現の増加とそれに伴う Fas 抗原発現の増加があり、抗 Fas 抗体によるアポトーシスの誘発が促進された。また 10Gy 照射後 SBC-1 に Bcl-2 蛋白の発現の減少があり、SBC-1 の放射線誘発アポトーシスに対する比較的高い感受性の一因となった。
5. RERF-LC-MS では放射線誘発アポトーシスは認められず、Fas 抗原の発現を認めても抗 Fas 抗体によるアポトーシスの誘発も認められなかった。照射された腺癌組織でも放射線誘発アポトーシスの発現は認められなかった。

この結果は、肺小細胞癌と肺腺癌の放射線感受性の相違にアポトーシス発現の有無が一因となっていることを示した。また Fas 抗原や Bcl-2 蛋白発現が放射線誘発アポトーシス発現の調節因子となっていること、さらに小細胞癌細胞においては照射がこれらの調節因子の発現を変化させることによってアポトーシス発現を変化させようことも示した。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導と御校閲を賜りました恩師高島 力教授に深甚なる謝意を表します。本研究の機会と多大なる御助力を賜りました金沢大学生化学第一教室福田龍二教授、並びに金沢大学病理学第二教室中沼安二教授に心から感謝致します。直接御指導頂きました愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所生化学部滝沢剛則博士（前 金沢大学生化学第一教室）に深謝致します。本研究に対し御助言と御指導を頂きました富山医科薬科大学小児科学教室宮脇利男教授（前 金沢大学小児科学教室）、並びに金沢大学第三内科学教室中村 忍助教授に深謝致し

ます。また、技術的御指導を頂いた金沢大学第三内科学教室武島 稔先生、金沢大学生化学第一教室砂原恵利子博士、電子顕微鏡写真作成に多大なる御協力を頂きました金沢大学病理学第二教室河野尚子博士に深くお礼を申し上げます。

なお、本論文の要旨の一部は、第36回日本肺癌学会総会(1995年、千葉)、第8回日本放射線腫瘍学会学術大会(1995年、東京)にて発表した。

文 献

- 1) Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26: 239-257, 1972
- 2) Wyllie AH, Kerr JFR, Currie AR. Cell death: The significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 68: 251-306, 1980
- 3) Duvall E, Wyllie AH. Death and the cell. *Immunol Today* 7: 115-119, 1986
- 4) Kerr JFR, Harmon BV. Definition and Incidence of Apoptosis: An Historical Perspective. *In* LD Tomei, FO Cope (eds), *Apoptosis: The Molecular Basis of Cell Death*, 1st ed, p5-29, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1991
- 5) Okada S. Radiation-Induced Death. *In* KI Altman, GG Gerber, S Okada (eds), *Radiation Biochemistry*, 1st ed, p247-307, Academic Press Inc, New York, 1970
- 6) Yamada T, Ohyama H. Radiation-induced interphase death of rat thymocytes is internally programmed (apoptosis). *Int J Radiat Biol* 53: 65-75, 1988
- 7) Umansky SR. Apoptotic Process in the Radiation-induced Death of Lymphocytes. *In* LD Tomei, FO Cope (eds), *Apoptosis: The Molecular Basis of Cell Death*, 1st ed, p193-208, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1991
- 8) Igarashi T, Yoshida S, Miyamoto T. Radiation-induced interphase death observed in human T-cell lymphoma cells established as a nude mouse tumor line. *Exp Hematol* 18: 824-831, 1990
- 9) Warters RL. Radiation-induced apoptosis in a murine T-cell hybridoma. *Cancer Res* 52: 883-890, 1992
- 10) Shinohara H, Nakano H. Interphase death and reproductive death in X-irradiated Molt-4 cells. *Radiat Res* 135: 197-205, 1993
- 11) Nakano H, Shinohara K. X-ray induced cell death: Apoptosis and necrosis. *Radiat Res* 140: 1-9, 1994
- 12) Cohen JJ, Duke RC. Glucocorticoid activation of a calcium dependent endonuclease in thymocyte nuclei leads to cell death. *J Immunol* 132: 38-42, 1984
- 13) Williams GT, Smith CA. Molecular regulation of apoptosis: Genetic control on cell death. *Cell* 74: 777-779, 1993
- 14) Itoh N, Yonehara S, Ishii A, Yonehara M, Mizushima S, Sameshima M, Hase A, Seto Y, Nagata S. The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell* 66: 233-243, 1991
- 15) Tsujimoto Y, Croce, CM. Analysis of the structure, transcripts, and protein products of bcl-2, the gene involved in human follicular lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 5214-5218, 1985
- 16) Vaux DL, Cory S, Adams JM. Bcl-2 promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* 335: 440-442, 1988
- 17) Korsmeyer SJ. Bcl-2 initiates a new category of oncogenes: Regulators of cell death. *Blood* 80: 879-886, 1992
- 18) Blakely A, Gorman K, Ostergaard H, Svoboda K, Liu C-C, Young JD-E, Clark WR. Resistance of cloned cytotoxic T lymphocytes to cell-mediated cytotoxicity. *J Exp Med* 166: 1070-1083, 1987
- 19) Miyawaki T, Uehara T, Nibu R, Tsuji T, Yachie A, Yonehara S, Taniguchi N. Differential expression of apoptosis-related Fas antigen on lymphocyte subpopulations in human peripheral blood. *J Immunol* 149: 3753-3758, 1992
- 20) Tamaru Y, Miyawaki T, Iwai K, Tsuji T, Nibu R, Yachie A, Koizumi S, Taniguchi N. Absence of Bcl-2 expression by activated CD45RO⁺ T lymphocytes in acute infectious mononucleosis supporting their susceptibility to programmed cell death. *Blood* 82: 521-527, 1993
- 21) Chomczynski P, Sacchi N. Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156-159, 1987
- 22) Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed, p737-757, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989
- 23) Feinberg AP, Vogelstein B. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* 132: 6-13, 1983
- 24) Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 119: 493-501, 1992
- 25) Hiraishi K, Suzuki K, Hakomori S, Adachi M. Le^x antigen expression is correlated with apoptosis (programmed cell death). *Glycobiology* 3: 381-390, 1993
- 26) Sellins KS, Cohen JJ. Gene induction by γ -irradiation leads to DNA fragmentation in lymphocytes. *J Immunol* 139: 3199-3206, 1987
- 27) Story MD, Stephens LC, Tomasovic SP, Meyn RE. A role for calcium in regulating apoptosis in rat thymocytes irradiated in vitro. *Int J Radiat Biol* 61: 243-251, 1992
- 28) Dewey WC, Ling CC, Meyn RE. Radiation-induced apoptosis: Relevance to radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 33: 781-796, 1995
- 29) Radford IR, Murphy TK, Radley JM, Ellis SL. Radiation response of mouse lymphoid and myeloid cell lines. Part II. Apoptotic death is shown by all cell lines examined. *Int J Radiat Biol* 65: 217-227, 1994
- 30) Radford IR, Murphy TK. Radiation response of mouse lymphoid and myeloid cell lines. Part III. Different signals can lead to apoptosis and may influence sensitivity to killing by DNA double strand breakage. *Int J Radiat Biol* 65: 229-239, 1994
- 31) Macklis RM, Beresford BA, Palayoor S, Sweeney S, Humm JL. Cell cycle alterations, apoptosis, and response to

- low-dose-rate radioimmunotherapy in lymphoma cells. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 27 : 643-650, 1993
- 32) Tauchi H, Sawada S. Analysis of mitotic cell death caused by radiation in mouse leukaemia L5178Y cells: Apoptosis is the ultimate form of cell death following mitotic failure. *Int J Radiat Biol* 65 : 449-455, 1994
- 33) Stephens LC, Hunter NR, Ang KK, Milas L, Meyn RE. Development of apoptosis in irradiated murine tumors as a function of time and dose. *Radiat Res* 135 : 75-80, 1993
- 34) Olive PL, Flazer G, Banath JP. Radiation-induced apoptosis measured in TK6 human B lymphoblast cells using the comet assay. *Radiat Res* 136 : 130-136, 1993
- 35) Akagi Y, Ito K, Sawada S. Radiation-induced apoptosis and necrosis in Molt-4 cells: a study of dose-effect relationships and their modification. *Int J Radiat Biol* 64 : 47-56, 1993
- 36) Milas L, Stephens LC, Meyn RE. Relation of apoptosis to cancer therapy. *In vivo* 8 : 665-674, 1994
- 37) Ohmori T, Podack ER, Nishio K, Takahashi M, Miyahara Y, Takeda Y, Kubota N, Funayama Y, Ogasawara H, Ohira T, Ohta S, Saijo N. Apoptosis of lung cancer cells caused by some anti-cancer agents (MMC, CPT-11, ADM) is inhibited by Bcl-2. *Biochem Biophys Res Commun* 192 : 30-36, 1993
- 38) Chen M, Quintans J, Fuks Z, Thompson C, Kufe DW, Weichselbaum RR. Suppression of Bcl-2 messenger RNA production may mediate apoptosis after ionizing radiation, tumor necrosis factor α , and ceramide. *Cancer Res* 55 : 991-994, 1995
- 39) Yonehara S, Ishii A, Yonehara M. 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, 1989
- 40) Mapara MY, Bargou R, Zugck C, Döhner H, Ustaoglu F, Jonker RR, Krammer PH, Dörken B. Apo-1 mediated apoptosis or proliferation in human chronic B lymphocytic leukemia: correlation with bcl-2 oncogene expression. *Eur J Immunol* 23 : 702-708, 1993
- 41) Takizawa T, Fukuda R, Miyawaki T, Ohashi K, Nakanishi Y. Activation of the apoptotic Fas antigen-encoding gene upon influenza virus infection involving spontaneously produced beta-interferon. *Virology* 209 : 288-296, 1995
- 42) Itoh N, Tsujimoto Y, Nagata S. Effect of bcl-2 on Fas antigen-mediated cell death. *J Immunol* 151 : 621-627, 1993
- 43) Iwai K, Miyawaki T, Takizawa T, Konno A, Ohta K, Yachie A, Seki H, Taniguchi N. Differential expression of bcl-2 and susceptibility to anti-Fas-mediated cell death in peripheral blood lymphocytes, monocytes, and neutrophils. *Blood* 84 : 1201-1208, 1994
- 44) Owen-Schaub LB, Radinsky R, Kruzel E, Berry K, Yonehara S. Anti-Fas on nonhematopoietic tumors: Levels of Fas/Apo-1 and bcl-2 are not predictive of biological responsiveness. *Cancer Res* 54 : 1580-1586, 1994
- 45) Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 74 : 609-619, 1993
- 46) Boise LH, Gonzalez-Garcia M, Postema CE, Ding L, Lindsten T, Turka LA, Mao X, Nunez G, Thompson CB. bcl-x, a bcl-2 related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell* 74 : 597-608, 1993
- 47) Yonish-Rouach E, Resnitzky D, Lotem J, Sachs L, Kimchi A, Oren M. Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6. *Nature* 352 : 345-347, 1991
- 48) Evan GI, Wyllie AH, Gilbert CS, Littlewood TD, Land H, Brooks M, Waters CM, Penn LZ, Hancock DC. Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. *Cell* 69 : 119-128, 1992
- 49) McConkey DJ, Hartzell P, Chow S, Orrenius S, Jondal M. Interleukin-1 inhibits T cell receptor-mediated apoptosis in immature thymocytes. *J Biol Chem* 265 : 3009-3011, 1990
- 50) Stephens LC, Ang KK, Schultheiss TE, Milas L, Meyn RE. Apoptosis in irradiated murine tumors. *Radiat Res* 127 : 308-316, 1991
- 51) Meyn RE, Stephens LC, Ang KK, Hunter NR, Brock WA, Milas L, Peters LJ. Heterogeneity in the development of apoptosis in irradiated murine tumours of different histologies. *Int J Radiat Biol* 64 : 583-591, 1993
- 52) Meyn RE, Stephens LC, Voehringer DW, Story MD, Mirkovic N, Milas L. Biochemical modulation of radiation-induced apoptosis in murine lymphoma cells. *Radiat Res* 136 : 327-334, 1993
- 53) Kerr JFR, Harmon BV. Apoptosis Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 73 : 2013-2026, 1994

A study on Radiation-induced Apoptosis in Lung Carcinoma Cells -Correlation with Fas Antigen and Bcl-2 Protein Tsuyoshi Takanaka, Department of Radiology, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920-J. J. J. Med. Soc., **105**, 450-461 (1996)

Key words radiation, apoptosis, lung carcinoma, Fas antigen, Bcl-2 protein

Abstract

The purpose of the present study was to investigate radiation-induced apoptosis in lung carcinoma cells *in vitro* and *in vivo*, as well as the influences of the Fas antigen and Bcl-2 protein on apoptosis *in vitro*. Two human small lung carcinoma cell lines, SBC-1 and SBC-3, and one adenocarcinoma cell line, RERF-LC-MS were investigated in this study. To investigate the induction of apoptosis, cell mortality and morphological changes in each cell line were examined after 10 or 20 Gy irradiation and/or the addition of 200 ng/ml anti-Fas antibody. Apoptotic DNA fragmentation in tumor specimens, obtained from lung carcinoma patients who had received radiotherapy, was also examined using a nick end labeling method. Furthermore, the expression of Fas antigen and Bcl-2 was investigated before and after 10 Gy irradiation in order to determine their influences on radiation-induced apoptosis. Radiation-induced apoptotic cells were observed in the small carcinoma cell lines, but not in the adenocarcinoma cell line. However, the peak incidence was only $17.9 \pm 0.1\%$ ($\bar{x} \pm SD$) 48 hr after 10 Gy irradiation in SBC-1 cells, and $9.6 \pm 2.3\%$ ($\bar{x} \pm SD$) 72 hr after 20 Gy irradiation in SBC-3 cells. Although the expression of Fas antigens increased in both SBC-3 and RERF-LC-MS cells after 10 Gy irradiation, apoptosis was only induced in SBC-3 cells after the addition of 200 ng/ml anti-Fas antibody. Although the expression of Bcl-2 proteins was detected in all cell lines examined, 10 Gy irradiation downregulated the level of Bcl-2 expression in SBC-1 cells. Apoptotic DNA fragmentation was observed in irradiated small carcinoma tissues, but not in irradiated adenocarcinoma tissues. In conclusion, the results of this study indicated that the differences in radioresponse of small carcinoma and adenocarcinoma cells were due to the inducibility of apoptosis in these cells, and also indicated that radiation can enhance the induction of apoptosis, especially in small carcinoma cells, by modulating expression of cellular factors such as Fas antigens and Bcl-2 proteins.