1-β-D-アラビノフラノシルチトシンによるヒト骨髄性白血病細胞株のアポトーシスの誘導に関する研究：Fas抗原量,Bcl-2蛋白発現および細胞周期との関連

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: 武島, 稔
	メールアドレス:
	所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/9326

金沢大学十全医学会雑誌　第106巻　第2号　276－287（1997）

1-β-D-アラビノフラノシルチトシンによるヒト骨髄性白血病細胞株のアポトーシスの誘導に関する研究

－Fas抗原量，Bcl-2蛋白発現および細胞周期との関連－

金沢大学医学部医学科内科学第三講座（主任：松田　保教授）
武　島　　稔

1-β-D-アラビノフラノシルチトシン（1-β-D-Arabinofuranosylcytosine, Ara-C）による白血病細胞のアポトーシス誘導機序とアポトーシス関連蛋白であるFas抗原，Bcl-2蛋白および細胞周期との関係を検討した．ヒト骨髄性白血病細胞株HL60細胞に対して種々の濃度のAra-CとIgM抗Fas抗体を併用添加し，その際に誘導されるアポトーシスの程度をギムザ染色による形態的観察とDNA電気泳動を用いて観察した．また，フローサイトメトリー法を用いてAra-C添加時のHL60細胞のFas抗原，Bcl-2蛋白および細胞周期の変化を観察した．臨床で使用される大量Ara-C療法の血漿濃度に相当する10μMないし30μMの高濃度Ara-CをHL60細胞に添加すると6時間後に明瞭なアポトーシスが誘導されたが，通常頻用される投与量ないし少量Ara-C療法の際の血漿濃度である0.1μMから1μMの低濃度のAra-Cでは，1μMにおいて30時間後にわずかなアポトーシスの誘導がみられたのみであった．Ara-CとIgM抗Fas抗体を併用添加することでアポトーシスの発現頻度は増加した．このアポトーシス増強は，低濃度Ara-C添加24時間後にIgM抗Fas抗体を添加した場合に著しく，その作用は相乗的であった．一方，高濃度Ara-Cでは，併用添加によるアポトーシス増強作用は相加的であった．フローサイトメトリーによる検討では，低濃度のAra-Cを24時間作用させた後にHL60細胞のFas抗原量の増加がみられ，反復添加によりこの作用はさらに増強した．一方，Bcl-2蛋白は，Ara-C添加で変化しなかった．細胞周期の観察においては，高濃度のAra-C添加はS期細胞に選択的にアポトーシスを誘発し，低濃度Ara-Cによる30時間処理は，S期延長作用ないしG1-S移行期への細胞の蓄積作用をもたらした．さらにIgM抗Fas抗体を低濃度Ara-Cに併用添加すると細胞周期非依存性に著明にアポトーシスが誘導された．これらの結果より，Ara-Cによるアポトーシスは低濃度ではFas抗原-Fasリガンド系によって相乗的に促進される可能性が示され，その機序としては，Ara-C投与によるFas抗原量の増加が関与すると考えられた．一方，高濃度では，主にAra-Cの直接作用によりS期にある細胞にアポトーシスが生ずるものと考えられた．アポトーシスを効率よく誘導する抗癌剤の投与法やFas抗原-Fasリガンド系の利用は，将来の白血病化学療法の改善に寄与するものと思われる．

Key words arabinofuranosylcytosine, apoptosis, Fas, Bcl-2, cell cycle

アポトーシスは，細胞の死に方の一つであり，個体発生の器官形成過程での細胞死や，胸腺での自己反応性Tリンパ球の排除等のような生理的な過程で生じる不要な細胞の自殺として定義され，外的刺激による壊死（ネクローシス）と区別して論じられてきた[1)-3)]．形態的観察ではアポトーシスを生じた細胞は，核クロマチンの核膜周辺への濃縮に始まり，核の断片化および細胞膜の突起形成を生じ，最終的には細胞膜で包まれた断片化した核を有するアポトーシス小体に分裂して周辺のマクロファージによって貪食される[1-3)]．生化学的には，初期に核DNAのヌクレオゾーム間の結合部位での二重鎖切断が生じ，これがDNAの電気泳動によって約180塩基対の整数倍の断片（ラダー）として観察される[1-3)]．アポトーシスは，細胞外からの刺激に応じて細胞内の信号伝達機構を介してエンドヌクレアーゼの活性化が生じ，自らDNAを切断することにより生じる能動的な細胞死であると考えられている[1)-4)]．

一方，悪性腫瘍の化学療法は，どのようにして腫瘍細胞を損傷し，破壊するかに主眼をおいて研究が進められ，抗癌剤の作用機序もその観点から代謝拮抗剤，トポイソメラーゼ阻害剤あるいはアルキル化剤など，腫瘍細胞を障害する第一の作用点によって分類されてきたが，これらの第一の作用点から細胞の死に至るまでの最終経路はこれまで明かではなかった．しかし，アポトーシス研究の進展により，本来非生理的な刺激で，かつそれぞれ作用点が異なるはずの種々の抗癌剤投与も生体外の実験においては，ほとんどの場合最終的にはアポトーシスによって細胞を死滅させることが明かとなった[5)-10)]．近年白血病の化学療法時においても生体内の白血病細胞にアポトーシスが生じていることが報告され，抗癌剤処理によるアポトーシスは，治療効果に直接結び付く現象であることが知られている[11)]．生体では投与可能な抗癌剤の濃度に限界があること，また，有効な新規抗癌剤の開発が進んでいないことを考えると，抗癌剤によ

平成9年2月5日受付，平成9年3月18日受理

Abbreviations：Ara-C, 1-β-D-arabinofuranosylcytosine; FCS, fetal calf serum; PBS, phosphate-buffered saline; FITC, fluorescein isothiocyanate; MoAb, monoclonal antibody

るアポトーシス誘導の機序をさらに検討し，既存の抗癌剤を用いて効率よく癌細胞にアポトーシスを誘導する手段を開発することは，今後の悪性腫瘍の治療に新たな可能性をもたらすものと思われる．

1-β-D-アラビノフラノシルチトシン(1-β-D-Arabinofuranosylcytosine, Ara-C)は急性骨髄性白血病治療の中心薬剤として頻用される代謝拮抗剤であり，人体の核酸成分であるシチジンとは糖部分のみを異にするヌクレオシドである．Ara-Cの抗腫瘍作用はDNAに取り込まれてDNA合成を延長させたり，複製を阻害することで発揮されると考えられていたが，最終的にはアポトーシスで細胞を死滅させることがGunjiら[7]の研究で明かとなった．したがって，白血病の化学療法を検討する上でAra-Cのアポトーシス誘導機序を研究することは重要と思われる．これまでの生体外での実験では，Ara-Cによるアポトーシスは時間および濃度に依存性であり，10μM以上の高濃度では，4ないし6時間で骨髄性白血病細胞株に明瞭なアポトーシスを誘導するが，1μM以下の低濃度では24時間以上の接触でようやくわずかにDNAのラダーが観察されるのみである[7)12)13)]．しかし，臨床においては通常のAra-Cの投与法で得られる血漿中濃度は1μMをはるかに下回るものであるにもかかわらず，体内の腫瘍細胞は減少し，一定の治療効果が得られている[14)15)]．このことから，Ara-Cによる直接のアポトーシス誘導機構に加えて，生体内では更に何らかの腫瘍細胞除去機構が関連する可能性も考えられる．

アポトーシス関連蛋白の一つであるFas抗原は，アポトーシスの信号を細胞内に伝達する特異な細胞表面蛋白であり，これに結合するIgM抗Fas抗体をFas抗原を発現する細胞に作用させるとアポトーシスが誘導される[16)]．近年Sudaら[17)]により，IgM抗Fas抗体に相当するFasリガンドが生体内では活性化細胞障害性Tリンパ球表面などに発現されていることが発見され，Fas抗原-Fasリガンド系が自己反応性T細胞の除去や肝炎の際の肝細胞の破壊などに主要な役割をはたすことが明かとなっている[18)19)]．Ara-Cによる骨髄性白血病細胞のアポトーシスの際には*c-jun*などのアポトーシス関連遺伝子の発現が亢進することは報告されているが[7)]，Fas抗原がAra-Cによるアポトーシスに何らかの関係を有するか否かは不明である．

一方，アポトーシスは様々なアポトーシス関連遺伝子あるいは蛋白によって抑制的にも調節されていることが知られているが[20)]，特にアポトーシス抑制遺伝子である*bcl-2*の産物であるBcl-2蛋白は，抗癌剤によるアポトーシスやFas抗原を介するアポトーシスにも抑制的に関与することが報告されており[21)22)]，Ara-Cによるアポトーシス誘導との関連を調べることは興味深い．また，フローサイトメトリーを用いたアポトーシスの解析では，抗癌剤誘発性のアポトーシスの一部は特定の細胞周期に特異的にアポトーシスを誘発することが報告されている[23)24)]．Ara-Cは代謝拮抗剤としての性質よりS期に作用すると考えられているが，Ara-Cによるアポトーシスと細胞周期の関係はいまだに明かになっていない．

本研究はAra-Cによる白血病細胞のアポトーシス誘導機序を，主にFas抗原とともにBcl-2蛋白や細胞周期との関連からも明かにすることを目的として行った．そのためにヒト骨髄性白血病細胞株に種々の濃度のAra-Cと抗Fas抗体を併用添加してアポトーシス誘導の程度を形態学的，生化学的に観察するとともに，Ara-C添加時のFas抗原，Bcl-2蛋白の変化，および細胞周期の変化とアポトーシスの関係をフローサイトメトリー法を用いて検討した．

材料および方法

Ⅰ．細胞および薬剤

ヒト急性骨髄性白血病細胞株としてHL60細胞を使用した．HL60細胞は理化学研究所細胞銀行（つくば）より提供を受け，10%牛胎児血清（fetal calf serum, FCS）(Gibco BRL, New York, USA)添加RPMI1640培地（Gibco BRL）に浮遊し，37℃，5%CO_2の条件下で培養した．細胞は細胞密度が定常期に達したときに新たな培地に継代し，実験には全て対数増殖期にある細胞を使用した．Ara-C（日本新薬，京都）は10%FCS添加RPMI1640培地に100μMおよび1 mMの濃度で溶解し，使用時まで－80℃に保存した．IgM抗Fas抗体（clone CH11, 医学生物学研究所，名古屋）は10%FCS添加RPMI1640培地に20μg/mlの濃度で溶解し，使用時まで－80℃に保存した．

Ⅱ．アポトーシスの誘導実験

HL60細胞を300個/μlの濃度に調整し，5 mlないし10 mlずつ培養フラスコに分注し，薬剤を添加した．Ara-CとIgM抗Fas抗体の併用によるアポトーシスの誘導を検討するために単剤による予備実験を行い，各薬剤の作用濃度と作用時間を下記の如く決定した．すなわち，Ara-Cの投与濃度を高濃度群（10μM, 30μM）と低濃度群（0.1μM, 0.5μM, 1μM）に設定し，IgM抗Fas抗体の投与濃度は0.1μg/mlとした．高濃度群ではAra-C単剤ないしIgM抗Fas抗体0.1μg/mlを同時に併用して，37℃，5%CO_2の条件下で6時間培養し，アポトーシスを観察した．低濃度群では，Ara-Cを培地に添加して37℃，5%CO_2の条件下で24時間培養した後，10%FCS添加RPMI1640培地にて再度細胞数を300個/μlに調整し，次にIgM抗Fas抗体0.1μg/mlを添加して更に6時間（合計30時間）培養し，アポトーシスを観察した．各実験は少なくとも3回施行した．

Ⅲ．アポトーシスの観察および定量

1．形態学的観察と定量

HL60細胞を300個/μlに調整し，検体100μlを800回転，10分間サイトスピン2（Shandon, Pittsburgh, USA）を用いて遠心塗抹し，風乾後ギムザ染色を施した．光学的顕微鏡下で対物レンズ油浸系100倍で順に500細胞を観察し，この中で核クロマチンの濃縮および核の分断化など，典型的なアポトーシスの特徴を示すものを数えた．なお，複数のアポトーシス小体が，その大きさおよび位置関係から一つの細胞に由来すると考えられる場合は，1個のアポトーシスとして計数した．500細胞中のアポトーシスの発現率をパーセントで表した[8)25)]．この際，コントロール培養で観察されるアポトーシスの自然発現率を差し引いて算定した．

2．DNA抽出とDNAラダーの観察

抽出時の操作によってDNAが断裂することを極力防止するため，細胞を低融点アガロースに封入した後に細胞質を融解し，DNAラダーを含む低分子量DNAのみを抽出する操作を行った．

HL60細胞をリン酸緩衝生理的食塩水（phosphate-buffered saline, PBS）(pH 7.3～7.65)（日水製薬，東京）で2回洗浄後2×10^4個/μlに調整した．細胞浮遊液150μlを当量の融解した低融点アガロース（アガロースGB, 和光純薬，大阪）と混合し，容量100μlのプラスチックモールドに分注し，1×10^6個の細胞

を含むアガロースブロックを作製した．各ブロックを250 μ lのESP液 (EDTA 5 mM, 0.5% SDS, Tris 10 mM, プロティネースK 50 μ g/ml)を満たしたエッペンドルフチューブ中で50℃，48時間震盪した．次に，ESP液各200 μ lをセファデックス G-50 (Pharmacia, Uppsala, Sweden)を充填したカラムに分注し，3000回転10分間遠心して濾過し，DNAを分離した (spun-column chromatography)．この濾過液に10 M酢酸アンモニウム (和光純薬)1/4量を添加し，2倍量の純エタノールを加え，4℃で5分間静置後－20℃で1時間エタノール沈殿して低分子量DNAのペレットを得た．各ペレットは風乾後TE液 (Tris 10 mM, EDTA 1 mM) 20 μ lに溶解し4℃にて保存した．このDNA溶解液10 μ lに400 μ g/mlのRNase A (Sigma, St. Louis, USA)2 μ lを加えて37℃1時間処理し，各6 μ lを1.5%アガロースゲル上で100 V，35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．

Ⅳ．Ara-C添加によるFas抗原量およびBcl-2蛋白発現の変化の解析

薬剤非添加のコントロール，Ara-C 10 μ Mないし30 μ Mを添加して4ないし6時間培養した群，Ara-C 0.1 μ M, 0.5 μ Mないし1 μ Mを添加して6ないし24時間培養した群，およびAra-C 0.05 μ Mないし0.1 μ Mを24時間毎に3回添加して計72時間培養した群を作成し，下記の解析を行った．

1．Fas抗原量の解析

HL60細胞をPBSにて3回洗浄し，5×10^5個ずつエッペンドルフチューブに分注．上清を吸引後，100倍希釈IgG抗Fas抗体 (clone: UB2/mouse IgG1，医学生物学研究所)30 μ lを加え，氷上で30分間混和した．0.1%アジ化ナトリウム (和光純薬)および2%FCSを添加したPBSにて2回洗浄後，再び上清を吸引し，10倍希釈フルオレスセイン・イソチオシアン酸 (fluorescein isothiocyanate, FITC)結合ウサギ抗マウスIgG1抗体 (DAKO, Glostrup, Denmark)30 μ lを加え，同様に氷上で30分間混和した．0.1%アジ化ナトリウムおよび2%FCSを添加したPBSにて2回洗浄後，細胞浮遊液として解析に供した．解析はEPICS-XLフローサイトメーター (Coulter Electronics, London, UK)にて5000個の細胞を測定して行った．なお，アイソタイプのコントロールとしてマウスIgG1 (DAKO)を使用した．

2．Bcl-2蛋白発現の解析

1.と同様にHL60細胞を3回洗浄後，Tamaruらの方法[26]に従い，4%パラホルムアルデヒド (和光純薬)添加PBSにて室温20分間固定した．次に0.1%トリトンX-100 (和光純薬)添加50 mMトリスクロル緩衝液にて5分間処理した．0.1%アジ化ナトリウムおよび2%FCSを添加したPBSにて3回洗浄後，5×10^5個ずつエッペンドルフチューブに分注した．抗Bcl-2抗体 (DAKO)を4 μ g/mlの濃度となるように添加し，氷上で20分間混和した後，0.1%アジ化ナトリウムおよび2%FCSを添加したPBSにて2回洗浄した．上清を吸引し，10倍希釈FITC結合ウサギ抗マウスIgG1抗体30 μ lを加えて，氷上で30分間混和した．0.1%アジ化ナトリウムおよび2%FCSを添加したPBSにて2回洗浄の後に，EPICS-XLフローサイトメーターを用いて5000個の細胞を解析した．アイソタイプのコントロールとしてマウスIgG1を使用した．

Ⅴ．Ara-C投与による細胞周期の変化とアポトーシスの関係の検討

実験Ⅱと同じように，HL60細胞にAra-C 10 μ Mないし30 μ Mを添加して6時間培養した群，Ara-C 0.5 μ Mないし1 μ Mを添加して30時間培養した群，およびAra-C 0.5 μ Mないし1 μ Mを添加して24時間培養後IgM抗Fas抗体0.1 μ g/mlを添加し，更に6時間 (計30時間)培養した群の3つの群を作成した．それぞれの細胞をPBSにて3回洗浄し，70%エタノールにて－20℃，30分間固定した．その後，再度PBSにて1回洗浄し，RNase A 1 mg/mlを加えて37℃，20分間静置し，次にPBSにて1回洗浄後，ヨウ化プロピジウム (Sigma)5 μ g/mlを加え，室温暗所にて30分間染色した．更にPBSにて1回洗浄し，細胞浮遊液を作成した．EPICS-XLフローサイトメーターにて20000個の細胞を測定して，DNAヒストグラムを得た．

Ⅵ．統計処理

Ara-CとIgM抗Fas抗体の併用によるアポトーシス誘導効果を検討するために，Ara-C単独添加時およびIgM抗Fas抗体単独添加時のアポトーシス細胞発現頻度の合計とAra-CおよびIgM抗Fas抗体の併用添加時のアポトーシス細胞発現頻度を対応のあるt検定を用いて比較した．両者間で有意差があれば併用によるアポトーシス誘導効果は相乗的，有意差がなければ相加的と判定した．

成　　績

Ⅰ．Ara-C，IgM抗Fas抗体，および両者の添加によるアポトーシスの誘導

1．形態学的観察

薬剤を添加しないコントロールではアポトーシスを示す細胞はほとんど認められない (図1A)が，IgM抗Fas抗体単独添加 (図1B)および高濃度Ara-Cの単独添加 (図1C)では6時間後にクロマチンの濃縮，核の断片化やアポトーシス小体の形成など，典型的なアポトーシスを示す細胞が出現した．また，高濃度Ara-CとIgM抗Fas抗体の両者の添加によってアポトーシス細胞は更に増加した (図1D)．一方，低濃度のAra-C投与においては，単独添加ではAra-C 1 μ Mの30時間の曝露でも誘導されるアポトーシスはごくわずかであった (図1E)．しかし，IgM抗Fas抗体を24時間後から添加して6時間，計30時間培養するとアポトーシス細胞が著しく増加した (図1F)．

2．DNA電気泳動

IgM抗Fas抗体単独 (図2C)あるいは高濃度Ara-Cの単独添加 (図2JおよびL)では，6時間でアポトーシスを生化学的に反映する約180塩基対の整数倍のラダーが明瞭に観察された．一方，低濃度のAra-Cの単独添加では，30時間後でも極く淡いラダーがみられるのみであった (図2D, F, H)．Ara-CとIgM抗Fas抗体の両者の添加では，それぞれラダーの増強が観察されたが，形態学的な変化と同様に低濃度のAra-CとIgM抗Fas抗体の両者を添加し30時間培養した群で，より強い増強がみられた (図2E, G, I)．

3．アポトーシスの発現率

高濃度Ara-C群では，10 μ M単独添加6時間後に平均7.0%，30 μ M添加では平均18.1%のアポトーシスが誘導され，IgM抗Fas抗体の併用で更に増強した (表1)．しかし，両者の添加で得られたアポトーシスの発現頻度は，Ara-CおよびIgM抗Fas抗体のそれぞれ単独添加で誘導されるアポトーシスの発現頻度の合計と比較すると，統計学的に有意な差はなかった．一方，低濃度Ara-C添加群においては，0.1 μ Mの30時間単独添加で

はアポトーシスは誘導されず，0.5 μ Mおよび1 μ Mの添加においてそれぞれ平均1.7%および7.2%のアポトーシスが観察された．しかし，Ara-Cを24時間添加した後にIgM抗Fas抗体を添加した際のアポトーシス誘導効果は著しく，Ara-C 0.1 μ Mで平均14.6%，0.5 μ Mで平均30.5%，1 μ Mで平均37.5%のアポトーシスが観察された．この発現頻度は，Ara-CおよびIgM抗Fas抗体のそれぞれ単独添加で観察されるアポトーシス発現頻度の合計を有意に上回った(表2)．

II. Ara-C添加時のFas抗原量およびBcl-2蛋白発現の変化

図3に対数増殖期のHL60細胞のFas抗原およびBcl-2蛋白の発現パターンを示す．両者ともに恒常的な発現が観察された．低濃度Ara-C (0.1 μ M, 0.5 μ Mおよび1 μ M)を添加し24時間培養するとFas抗原量は増加傾向を示したが，低濃度Ara-Cの6時間添加および高濃度Ara-C (10 μ Mおよび30 μ M)の4，6時

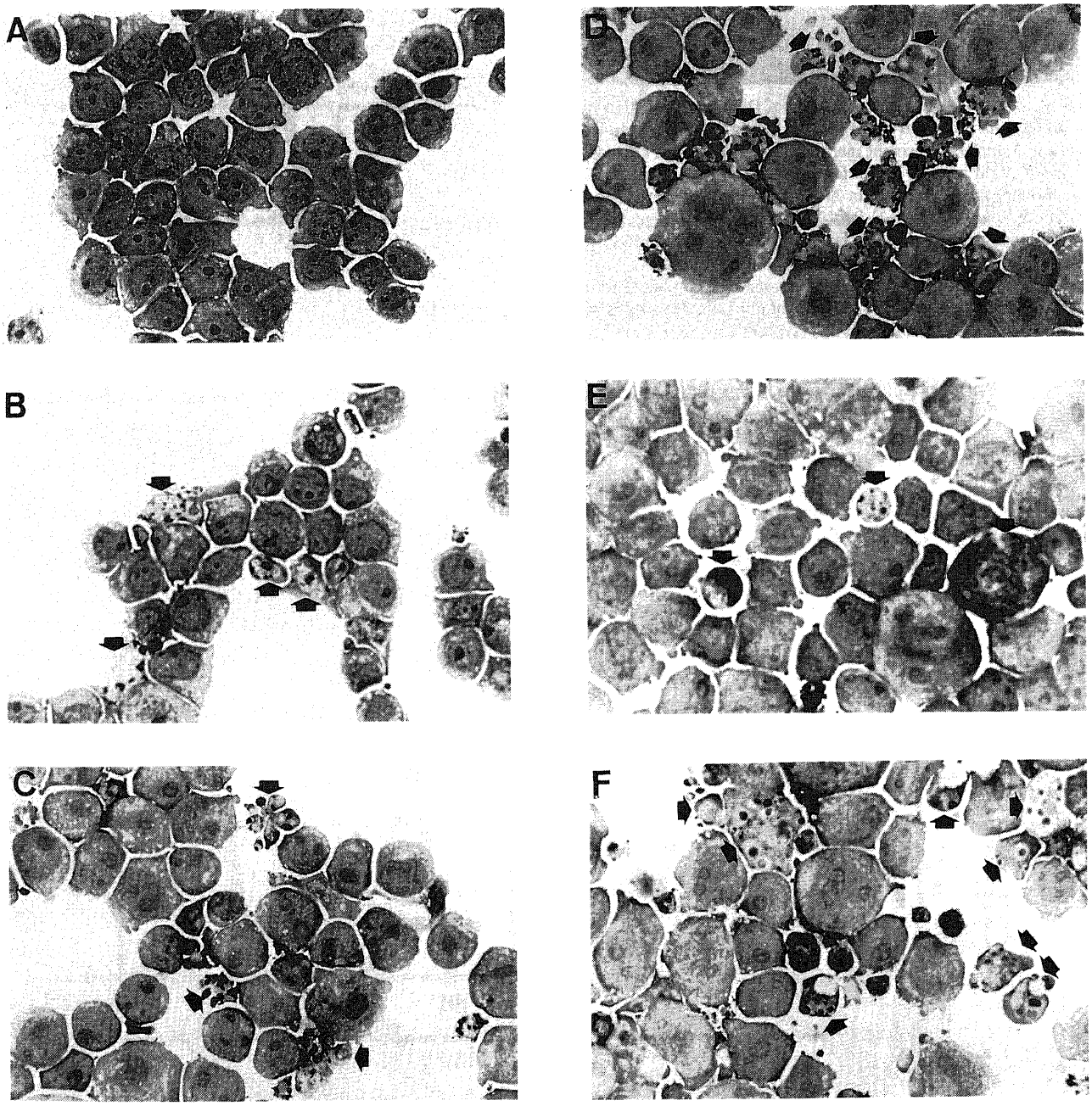

Fig. 1. Morphological analysis of HL60 cells treated with Ara-C and/ or IgM anti-Fas MoAb. (A) Control culture. (B) Cells treated with IgM anti-Fas MoAb. (A) Control culture. (B) Cells treated with IgM anti-Fas MoAb for 6hr. (C) Cells treated with 30 μ M of Ara-C for 6hr. (D) Cells treated with 30 μ M of Ara-C combined with the MoAb. (E) Cells treated with 1 μ M of Ara-C for 30hr. (F) Cells treated with 1 μ M of Ara-C for 30hr combined with the MoAb. Original magnification, × 400. The arrows represent apoptotic cells with membrane blebbing, and condensed and fragmented nuclei.

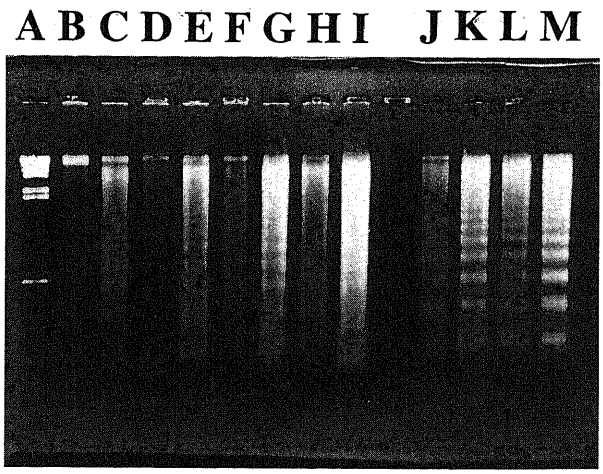

Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of DNA fragmentation in HL60 cells produced by Ara-C and/ or IgM anti-Fas MoAb. Lane A, molecular weight marker ; lane B, untreated control ; lane C, IgM anti-Fas MoAb for 6hr ; lane D, 0.1 μ M of Ara-C for 30hr ; lane E, 0.1 μ M of Ara-C combined with the MoAb ; lane F, 0.5 μ M of Ara-C for 30hr ; lane G, 0.5 μ M of Ara-C combined with the MoAb ; lane H, 1 μ M of Ara-C for 30hr ; lane I, 1 μ M of Ara-C combined with the MoAb ; lane J, 10 μ M of Ara-C for 6hr ; lane K, 10 μ M of Ara-C combined with the MoAb ; lane L, 30 μ M of Ara-C for 6hr ; lane M, 30 μ M of Ara-C combined with the MoAb.

Table 1. Apoptosis of HL60 cells treated with high-dose of Ara-C for 6 hr combined with IgM anti-Fas MoAb

Conditions	% apoptosis[a)] ($\bar{x}\pm$SD, n=3)
IgM anti-Fas MoAb alone	8.7±1.3
Ara-C 10 μ M alone	7.0±1.7
Ara-C 10 μ M combined with IgM anti-Fas MoAb	23.2±1.4
Ara-C 30 μ M alone	18.1±3.5
Ara-C 30 μ M combined with IgM anti-Fas MoAb	35.7±3.5

HL60 cells were exposed to 10 or 30 μ M Ara-C and/ or 0.1 μ g/ml IgM anti-Fas MoAb for 6 hr simultaneously.
a) Frequency of apoptosis was expressed as percent of 500 cells counted. Apoptosis (%) of control culture was subtracted from each value.

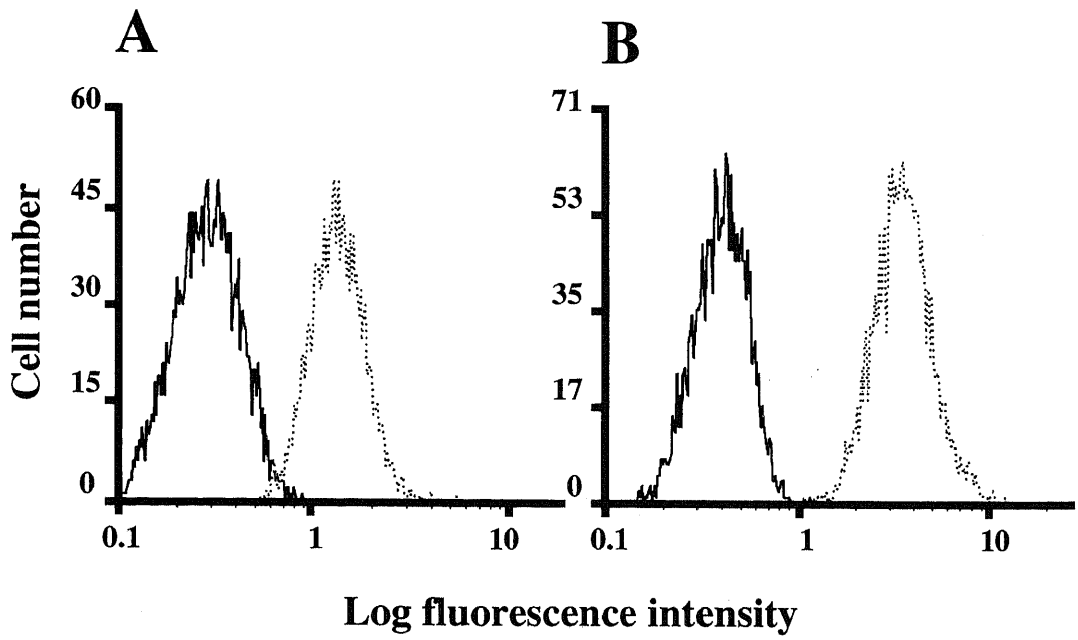

Fig. 3. Fas antigen and Bcl-2 protein expression on HL60 cells. (A) HL60 cells stained with IgG anti-Fas MoAb and control IgG1. (B) HL60 cells stained with IgG anti-Bcl-2 MoAb and control IgG1. Dotted lines, histograms of IgG anti-Fas MoAb or anti-Bcl-2 MoAb staining ; real lines, histograms of control staining.

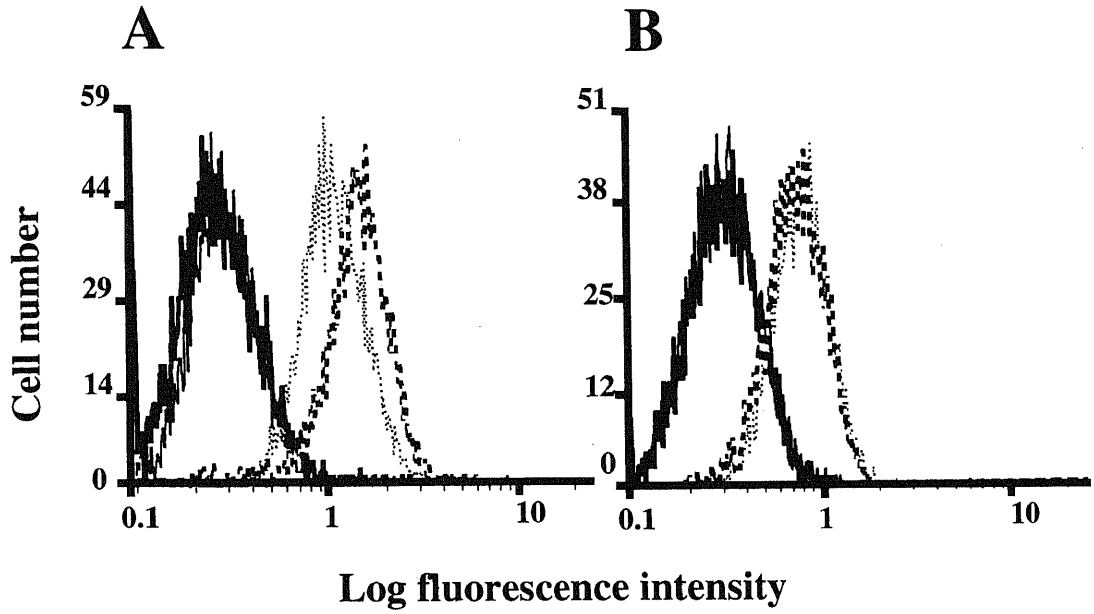

Fig. 4. Fas antigen expression on HL60 cells treated with Ara-C. (A) HL60 cells treated with 1 μ M of Ara-C for 24hr. (B) HL60 cells treated with 30 μ M of Ara-C for 6hr. Thickly dotted lines, histograms of Ara-C-treated cells stained with IgG anti-Fas MoAb ; thinly dotted lines, histograms of untreated cells stained with IgG anti-Fas MoAb ; real lines, histograms of control IgG1 staining

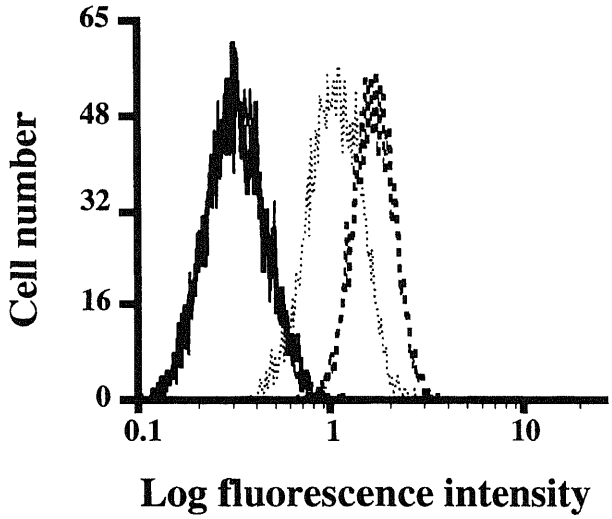

Fig. 5. Fas antigen expression on HL60 cells treated with repeating administration of 0.1 μ M of Ara-C 3 times every 24hr. Thikly dotted line, histogram of Ara-C-treated cells stained with IgG anti-Fas MoAb ; thinly dotted line, histogram of untreated cells stained with IgG anti-Fas MoAb ; real line, histogram of control IgG1 staining.

Table 2. Apoptosis of HL60 cells treated with low-dose of Ara-C for 30 hr combined with IgM anti-Fas MoAb

Conditions	% apoptosis[a] ($\bar{x}\pm$SD, n=3)
IgM anti-Fas MoAb alone	9.9±1.3
Ara-C 0.1 μ M alone	0.0±0.0
Ara-C 0.1 μ M combined with IgM anti-Fas MoAb	14.6±1.4*
Ara-C 0.5 μ M alone	1.7±2.2
Ara-C 0.5 μ M combined with IgM anti-Fas MoAb	30.5±5.0*
Ara-C 1 μ M alone	7.2±6.1
Ara-C 1 μ M combined with IgM anti-Fas MoAb	37.5±8.1*

HL60 cells were pre-incubated for 24 hr with 0, 0.1, 0.5 or 1 μ M Ara-C and then exposed to none or 0.1 μ g/ml of IgM anti-Fas MoAb for 6 additional hr.

[a]Frequency of apoptosis was expressed as percent of 500 cells counted. Apoptosis (%) of control cluture was subtracted from each value.

*Values significantly different ($p<0.05$ by paired *t*-test) from the sum of those seen in cells treated with Ara-C alone and IgM anti-Fas MoAb alone.

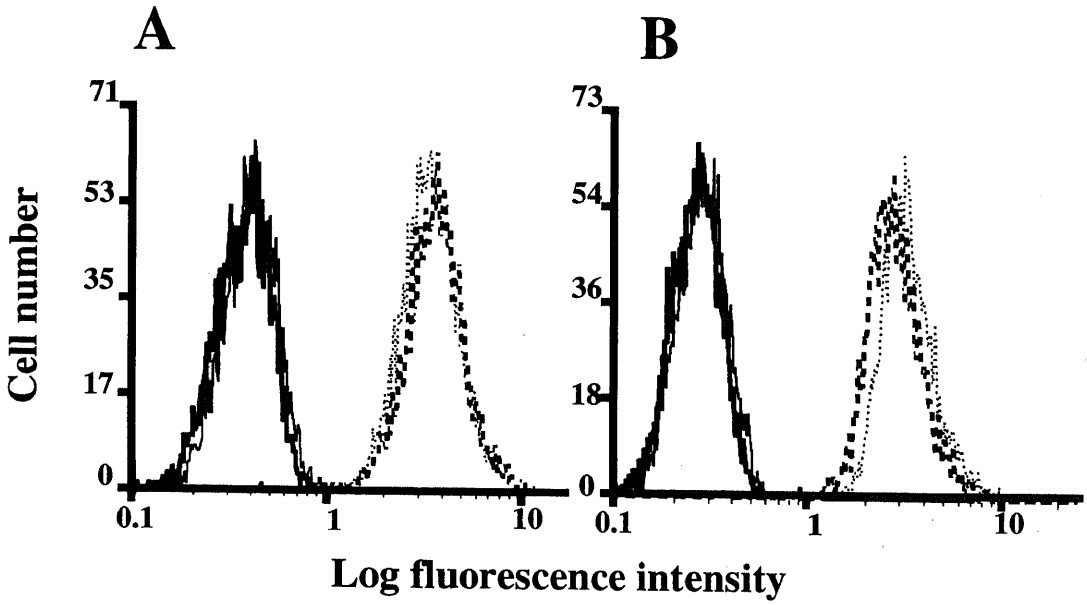

Fig. 6. Bcl-2 protein expression on HL60 cells treated with Ara-C. (A) HL60 cells treated with 1 μM of Ara-C for 24hr. (B) HL60 cells treated with 30 μM of Ara-C for 6hr. Thickly dotted lines, histograms of Ara-C-treated cells stained with IgG anti-Bcl-2 MoAb ; thinly dotted lines, histograms of untreated cells stained with IgG anti-Bcl-2 MoAb ; real lines, histograms of control IgG1 staining.

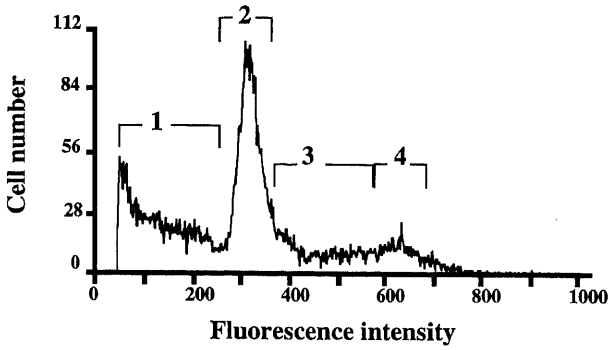

Fig. 7. DNA histogram of HL60 cells analized using flow cytometry. 1, sub-G_1 peak which represents apoptotic cells ; 2, cells in G_1 or G_0 phase ; 3, cells in S phase ; 4, cells in G_2 or M phase.

間添加では明らかな変化は認めなかった．図4AにAra-C 1 μMを添加し24時間培養した際のFas抗原量の変化を，図4Bに30 μM添加6時間後の変化を示す．前者ではコントロールと比較して蛍光強度の増強を認め，後者ではコントロールと差がなかった．24時間毎に3回0.05 μMないし0.1 μMのAra-Cを培地中に添加するとFas抗原量は著明に増加した．図5にAra-C 0.1 μMを24時間毎に3回添加した際のFas抗原量の変化を示すが，コントロールと比較して著明な蛍光強度の増加を認めた．一方，Bcl-2蛋白の発現にはいずれの濃度のAra-C添加においても明らかな変化を認めなかった．図6にAra-C 1 μM添加24時間後および30 μM添加6時間後のHL60細胞のBcl-2蛋白発現の変化を示すが，いずれもコントロールと比較して変化はなかった．

Ⅲ．Ara-Cによる細胞周期の変化とIgM抗Fas抗体同時添加時のアポトーシス誘導との関連性

図7に示すように培養細胞のDNAヒストグラムにおいては蛍光強度の低い方から順にG0G1期およびM期を示す二つのピークが形成され，その間の部分がS期に相当した．アポトーシスを生じた細胞はDNA含量の減少のため，G0G1期よりも蛍光強度の弱い部分にピーク（sub-G1ピーク）を形成した．

高濃度Ara-Cを添加して6時間培養したHL60細胞では，S期細胞の減少とともにsub-G1ピークが出現した（図8）．一方，低濃度Ara-Cを添加して30時間培養すると図9に示すように，コントロール（図9A）と比較してAra-C 0.5 μM添加群（図9C）ではS期の延長効果，Ara-C 1 μM添加群（図9E）ではG1-S移行期への細胞の蓄積を認めた．コントロールにIgM抗Fas抗体を単独で添加すると，sub-G1ピークが出現した（図9B）が細胞周期には大きな変化はなかった．低濃度Ara-Cに24時間後からIgM抗Fas抗体を添加した群（図9D, F）ではsub-G1ピークが著明に増加した．しかし，この際のsub-G1ピーク以外のDNAヒストグラムの形態は，Ara-C単独添加時とほぼ同様であった．

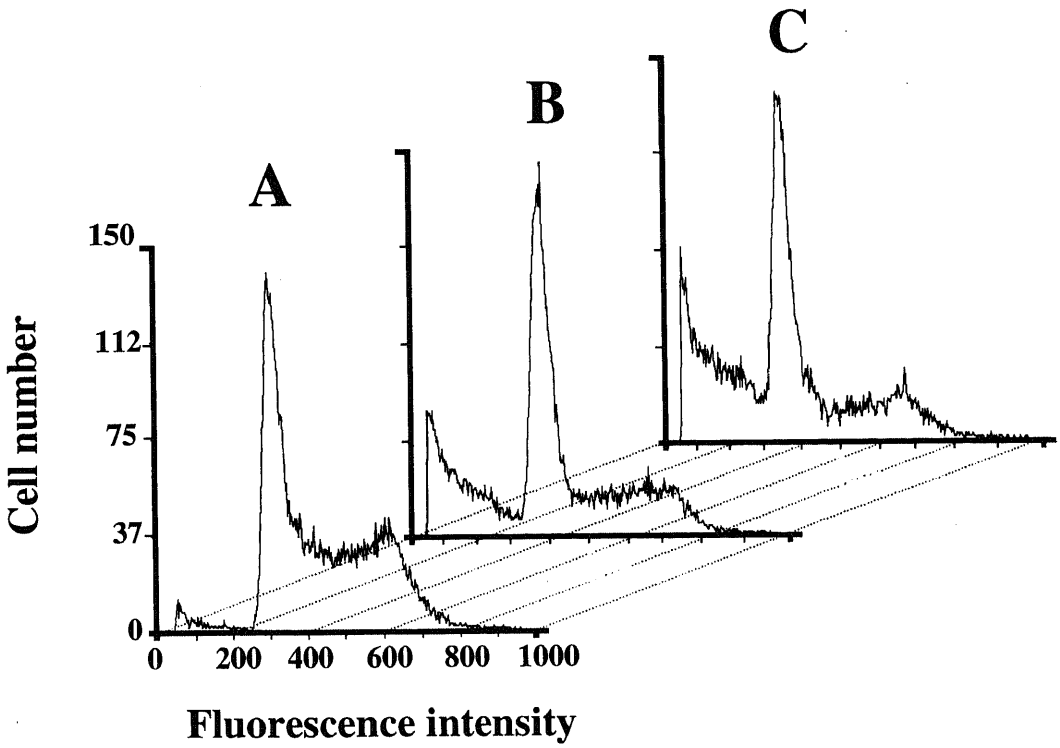

Fig. 8. DNA histograms of HL60 cells treated with high-dose of Ara-C. (A) Control cells. (B) HL60 cells treated with 10 μ M of Ara-C for 6hr. (C) HL60 cells treated with 30 μ M of Ara-C for 6hr.

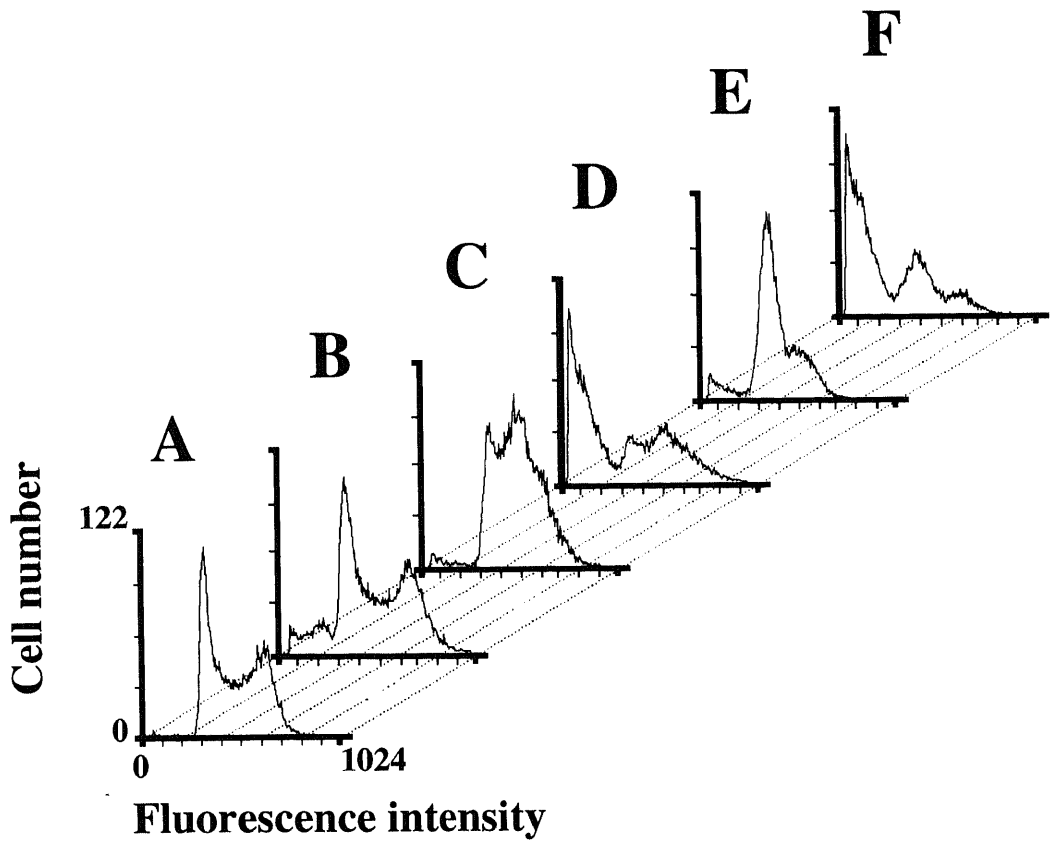

Fig. 9. DNA histograms of HL60 cells treated with low-dose of Ara-C and/ or IgM anti-Fas MoAb. (A) Control cells. (B) HL60 cells treated with IgM anti-Fas MoAb for 6hr. (C) HL60 cells treated with 0.5 μ M of Ara-C for 30hr. (D) HL60 cells treated with 0.5 μ M of Ara-C combined with the MoAb. (E) HL60 cells treated with 1 μ M of ara-C for 30hr. (F) HL60 cells treated with 1 μ M of ara-C combined with the MoAB.

考 察

Ara-Cは，これまでU937，HL60，KG1等の骨髄性白血病細胞株にアポトーシスを誘導することが知られている[7)12)13)]．従来の報告ではAra-Cによるアポトーシスの誘導は濃度および時間に依存性であり，10 μ M以上のAra-Cの添加で4から6時間後にこれらの細胞に明瞭なアポトーシスが誘導される．しかし，1 μ Mの濃度ではアポトーシスの誘導が遅れ，24時間以降になってはじめてアポトーシス細胞が出現し，それ以下の濃度ではアポトーシスの誘導は困難とされている[7)12)13)]．今回の実験においてもAra-C単独添加によるHL60細胞のアポトーシス誘導の程度は，10 μ Mおよび30 μ Mの高濃度では6時間添加においてそれぞれ平均7.0%および18.1%であったのに対し，0.1 μ M，0.5 μ Mおよび1 μ Mの低濃度Ara-Cの添加では30時間後でもそれぞれ平均0%，1.7%および7.2%と低く，これまでの報告[7)12)13)]と同様であった．

臨床上のAra-C投与法と血漿濃度との関係をみると，難治性白血病に用いられるAra-C大量療法（3ないし5日間Ara-C 500ないし3000 mg/m²/回を一日2回急速静脈内投与する方法）では10 μ Mないし100 μ Mの血漿濃度が達成できる．しかし，通常に急性白血病の初回治療に用いられている100 mg/m²/日を7日ないし10日間静脈内持続点滴する方法では，Ara-Cの最高血漿中濃度は1 μ M以下である[14)27)]．また，近年，高齢者の白血病症例や骨髄異形成症候群から移行した白血病症例に対して試みられるAra-C少量療法は1日量20 mg/m²のAra-Cを14日ないし21日間皮下注射ないし持続静脈内注入する治療法であるが，この場合の最高血漿中濃度は持続静注では0.01 μ Mないし0.1 μ Mに過ぎないし，皮下注射でも30分後に最高血漿濃度は0.5 μ Mないし1 μ Mに達するものの，6時間後には測定感度以下にまで低下する[15)]．それにも関わらず，通常のAra-C投与量でも体内の白血病細胞は数日の経過で著しく減少し，Ara-C少量療法でも20%ないし30%程度の症例に寛解が得られている．このことから実際の化学療法ではAra-Cの直接的な効果以外の腫瘍除去作用が存在することも考えられる．また，極めて低い血漿中濃度しか得られないことからAra-C少量療法の作用機序として殺細胞効果よりも分化誘導効果が提唱されている[28)29)]が，正確な腫瘍除去機序は未だに不明である．今回の実験ではIgM抗Fas抗体を同時に添加することでAra-CによるHL60細胞のアポトーシス誘導を増強することができた．このことは，Fas抗原を介したアポトーシス誘導機構がHL60細胞のAra-C誘発性アポトーシスに促進的に作用することを示している．Fas抗原は臨床検体から得られた多くの白血病細胞表面にも発現していることが確認されているので[30)]，Ara-Cによる生体内での白血病細胞の減少にもFas抗原-Fasリガンド系を介するアポトーシス誘導機序が促進的に関与している可能性が考えられる．

今回の実験では常用量の化学療法ないし少量Ara-C療法の血漿濃度に相当する1 μ M以下の低濃度のAra-C添加において時間経過とともにFas抗原量の増加が誘導され，その状態にIgM抗Fas抗体を併用することで著明で相乗的なアポトーシスが誘導できた．また，0.05 μ Mから0.1 μ Mという極めて低濃度のAra-Cにおいても反復投与によってFas抗原の発現は増強した．このことは生体内でのAra-C投与時の腫瘍細胞除去機構を推定する上で興味深い現象である．ある種の刺激によってFas抗原量が増加し，その結果としてIgM抗Fas抗体によりアポトーシスが増強することは他の実験系でも認められている[16)31)-33)]．骨髄から分離された造血幹細胞はFas抗原をほとんど発現していないが，インターフェロン-γやTNF-αを添加して培養すると時間依存性にFas抗原の発現が誘導され，IgM抗Fas抗体によるアポトーシス誘導が増強され，結果として造血コロニーの形成が抑制されることが報告されている[32)33)]．このことは，Fas抗原-Fasリガンド系がサイトカインによる造血の抑制に関与していることを強く示唆する所見であると考えれている[32)33)]．また，癌治療の分野では，低線量の放射線照射が肺癌細胞や造血前駆細胞のFas抗原発現を増強し，その結果IgM抗Fas抗体によるアポトーシスが増強されることが報告されている[34)]．低濃度のAra-Cの長期投与が，生体内において腫瘍細胞のFas抗原の発現を亢進させ，結果的にFas抗原-Fasリガンド系を介した腫瘍細胞の除去が行われる可能性も考えられる．また，Fas抗原は造血前駆細胞から成熟顆粒球への分化の過程で発現が増強することが知られ，一種の分化抗原であるとの考え方もある[22)33)35)]．従って上述の現象はAra-C少量療法の分化誘導療法としての側面を示唆する所見とも考えられる．一方，Ara-C大量療法に相当する濃度では，Fas抗原量の増加は認められず，IgM抗Fas抗体との併用効果は相加的なものであった．この結果は，Ara-Cが直接的に白血病細胞のアポトーシスに関与している可能性を示唆していると思われる．今後，化学療法施行中の症例においてフローサイトメトリー等を用いて白血病細胞のFas抗原量の変動を検討することで今回得られた生体外での成績の裏付けができるものと考える．

一方，アポトーシスを調節する因子は単一ではなく，アポトーシスの誘導は，Fas抗原などのアポトーシスを促進する因子とBcl-2，Bcl-Xなどのアポトーシス抑制因子との複雑なバランスによって決定されると考えられている[20)]．今回のフローサイトメトリーによる検討では，いずれの濃度においてもAra-Cの投与によるBcl-2蛋白の明らかな変化は認めなかったので，本実験系ではBcl-2蛋白がAra-CによるアポトーシスやIgM抗Fas抗体併用によるアポトーシス増強効果に関与した可能性は少ないと思われる．

抗癌剤の投与が細胞周期に変化をもたらすことはよく知られている．一般にAra-Cをはじめとする代謝拮抗剤は，低濃度ではS期の延長作用を有し，高濃度になるにつれG1-S 移行期からG1期に細胞が蓄積するとされている[36)]．近年，フローサイトメトリーを用いて核DNA量を測定することにより，細胞周期の変化とアポトーシスの発現を同時に観察することができるようになった．この様な手法を用いた研究によりエトポシドやフォストリエシンなどのトポイソメラーゼ阻害性抗癌剤によるアポトーシスは，S期細胞に特異的に生じることが明かとなっている[23)]．今回の実験では，低濃度Ara-C添加時に観察された細胞周期の変化はこれまで知られているようにS期の延長とG1-S期への細胞の蓄積であった．低濃度Ara-C添加時はsub-G1ピークとして認識されるアポトーシスの発現は極めてわずかであったが，高濃度のAra-C添加時にはS期細胞の減少とともにアポトーシスが誘導されることが明かとなった．すなわち高濃度のAra-Cによって誘発されるアポトーシスは，トポイソメラーゼ阻害剤と同様に主としてS期にある細胞に発現すると考えられる．従来指摘されていた高濃度Ara-CによるG1期の細胞蓄積は，S期細胞がアポトーシスを生ずることによる見かけ上の変化である可能性がある．一方，Fas抗原を介して誘導され

るアポトーシスに，細胞周期依存性があるか否かは明かになっていないが，もしあるとすれば，Ara-Cによる細胞周期の変化が低濃度Ara-CとIgM抗Fas抗体との併用で生じるアポトーシス増強効果に関係している可能性がある．本研究では，低濃度Ara-C添加による細胞周期の変化とIgM抗Fas抗体のアポトーシス誘導との関連についても検討した．0.5 μMのAra-C添加によるS期細胞の増加，1 μMのAra-C添加によるG1-S移行期の細胞の蓄積が認められる状態の下でIgM抗Fas抗体を添加すると，いずれの場合にもアポトーシス細胞を示す著明なsub-G1ピークがみられた．また，この際のsub-G1ピーク以外のDNAヒストグラムの形態は，Ara-C単独添加時とほぼ同様であった．このことより，IgM抗Fas抗体の併用により誘発されたアポトーシスはG1期と同様にS期にも生じていると考えられ，今回の実験ではFas抗原を介したアポトーシスに特有な細胞周期依存性は観察されなかった．

本研究の結果は，今後の新しい悪性腫瘍の治療法の開発にいくつかの示唆を与えている．第一はIgM抗Fas抗体の癌治療への応用である．Morimotoら[37]は実験的にではあるが，アドリアマイシンあるいはシスプラチンとIgM抗Fas抗体の併用が相乗的な抗腫瘍効果をもたらし，多剤耐性腫瘍細胞株にたいしても有効であることを報告し，IgM抗Fas抗体の癌治療への応用の可能性を示唆した．しかし，生体内では正常細胞，特に肝細胞にも高度にFas抗原が発現しており，IgM抗マウスFas抗体を投与されたマウスは肝細胞のアポトーシスに起因する激症肝炎様の病態で死亡することが知られている[38]．従ってIgM抗Fas抗体の抗腫瘍剤としての臨床応用は，現在のところ困難であると考えられる．しかし，今後Fas抗原に関する研究の進展，あるいはより腫瘍特異性の高い同種抗原の発見によっては，比較的少量の抗癌剤とアポトーシス誘導蛋白の併用によるより効果的な治療法の開発が期待できる．第二は抗癌剤の投与法への応用である．抗腫瘍剤の投与量を多くして腫瘍の根絶を図る試みは，近年の自家造血幹細胞移植の成績からも明らかなように限界がある[39]．また，細胞周期特異性のある抗癌剤も，休止期にある細胞には効果がない．抗癌剤の投与法の選択は極めて難しいが，今回の実験で示唆されたような抗癌剤の濃度によるアポトーシス誘導機序の差異を利用することも有用な方法であると考えられる．また，腫瘍細胞のFas抗原量の増加をより効率よく誘導する抗癌剤の投与法の研究，さらにはFas抗原量の増加を誘導するサイトカインや抗癌剤と，Fasリガンドを持つ細胞障害性T細胞を活性化する方法との組み合わせによるアポトーシスの誘導も今後の癌治療の新しい手段の一つになると考えられる．

結　　論

代謝拮抗性抗癌剤であるAra-Cによるアポトーシスの誘導とFas抗原量およびBcl-2蛋白の発現量の変化，およびこれらと細胞周期の関係を明かにするために，ヒト骨髄性白血病細胞株であるHL60細胞を用いて検討した．HL60細胞に種々の濃度のAra-Cと抗Fas抗体を添加して培養し，誘導されるアポトーシスを形態学的ならびに生化学的に観察するとともに，フローサイトメトリー法を用いてAra-C投与時のFas抗原量，Bcl-2蛋白の発現，および細胞周期の変化を解析し，以下の結果を得た．

1．10 μMないし30 μMの高濃度Ara-Cでは，添加6時間後に著明なアポトーシスが誘導された．一方，0.1 μMから1 μMの低濃度のAra-C添加では，1 μMにおいて30時間後にわずかなアポトーシスがみられたのみであった．

2．Ara-CとIgM抗Fas抗体との併用添加では，いずれの濃度のAra-Cにおいてもアポトーシスの発現頻度は増加したが，その程度は低濃度Ara-Cにおいて著しく，相乗的であった．

3．低濃度のAra-C添加24時間後にHL60細胞のFas抗原量に増加がみられ，このことが併用添加によるアポトーシスの増強に関与しているものと考えられた．

4．Ara-C投与によりBcl-2蛋白の発現量に変化はみられなかった．

5．細胞周期の検討では，0.5 μMのAra-C添加でS期の延長，1 μMではG1-S移行期への蓄積がみられ，この状態にIgM抗Fas抗体を添加すると細胞周期非依存性にアポトーシスが誘導された．10 μM以上の濃度ではAra-C単独でもS期にある細胞でアポトーシスが観察された．

6．以上の結果より，Ara-C添加によるアポトーシスの発現には，高濃度ではその直接作用が関与し，低濃度ではFas抗原の誘導を介して促進される可能性が示された．

謝　　辞

稿を終えるにあたり，御指導と御校閲を賜わりました恩師松田保教授に深遠なる謝意を表します．また本研究に関し貴重な御助言をいただき，かつフローサイトメトリー実験に際し多大なる御協力をいただいた金沢大学薬学部生物薬品化学教室大場義樹教授，中西義信助教授，原田記子先生に深く感謝致します．さらに終始直接の御指導を賜わりました金沢大学医学部内科学第三教室中村忍助教授に深謝致します．また，技術的御指導をいただいた金沢大学医学部内科学第三教室中村喜久先生，望月康弘先生に深くお礼を申し上げます．なお本研究の要旨は第58回日本血液学会総会（1996年，宇都宮）にて発表した．

文　　献

1） 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

2） Kerr JFR, Winterford CM, Harmon BV. Apoptosis: Its significance in cancer and cancer therapy. Cancer 73: 2013-2026, 1994

3） Duvall E, Wyllie AH. Death and the cell. Immunol Today 7: 115-119, 1986

4） Wyllie AH. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. Nature 284: 55-556, 1980

5） Walker PR, Smith C, Youdale T, Leblanc J, Whitfield JF, Sikorska M. Topoisomerase II-reactive chemotherapeutic drugs induce apoptosis in thymocytes. Cancer Res 51: 1078-1085, 1991

6） Kaufmann SH. Induction of endonucleolytic DNA cleavage in human acute myelogenous leukemia cells by etoposide, camptothecin, and other cytotoxic anticancer drugs: A cautionary note. Cancer Res 49: 5870-5878, 1989

7） Gunji H, Kharbanda S, Kufe D. Induction of internucleosomal DNA fragmentation in human myeloid leukemia cells by 1-β-D-arabinofuranosylcytosine. Cancer Res 51: 741-743, 1991

8） Lotem J, Sachs L. Hematopoietic cytokines inhibit apoptosis by transforming growth factor β1 and cancer

chemotherapy compounds in myeloid leukemic cells. Blood 80: 1750-1757, 1992

9) Eastman A. Activation of programmed cell death by anticancer agents: cisplatin as a model system. Cancer Cells 2: 275-280, 1990

10) 武島 稔，中村 忍．抗癌剤誘発性アポトーシスの特徴．医学のあゆみ 173：818-823，1995

11) Gorczyca W, Bigman K, Mittelman A, Ahmed T, Gong J, Melamed MR, Darzynkiewicz Z. Induction of DNA strand breaks associated with apoptosis during treatment of leukemias. Leukemia 7: 659-670, 1993

12) Bhalla K, Tang C, Ibrado AM, Grant S, Tourkina E, Holladay C, Hughes M, Mahoney ME, Huang Y. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor / interleukin-3 fusion protein (pIXY 321) enhances high-dose ara-C-induced programmed cell death or apoptosis in human myeloid leukemia cells. Blood 80: 2883-2890, 1992

13) Bouffard DY, Momparler RL. Comparison of the induction of apoptosis in human leukemic cell lines by 2', 2'-difluorodeoxycytidine (gemcitabine) and cytosine arabinoside. Leukemia Res 19: 849-856, 1995

14) Ho DHW, Frei III E. Clinical pharmacology of 1-β-D-arabinofuranosyl cytosine. Clin Pharmacol Ther 12: 944-954, 1971

15) Spriggs D, Griffin J, Wisch J, Kufe D. Clinical pharmacology of low-dose cytosine arabinoside. Blood 65: 1087-1089, 1985

16) 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

17) Suda T, Takahashi T, Golstein P, Nagata S. Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. Cell 75: 1169-1178, 1993

18) Watanabe-Fukunaga R, Brannan CI, Copeland NG, Jenkins NA, Nagata S. Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. Nature 356: 314-317, 1992

19) 梁 京賢，鴨川由美子，山内克巳，林 直諒．劇症肝炎の発症機序とFas / Fasリガンドの関与．日本臨床 54：239-243，1996

20) Williams GT, Smith CA. Molecular regulation of apoptosis: Genetic control on cell death. Cell 74: 777-779, 1993

21) Miyashita T, Reed JC. Bcl-2 oncoprotein blocks chemotherapy-induced apoptosis in a human leukemia cell line. Blood 81: 151-157, 1993

22) 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

23) Darzynkiewicz Z, Bruno S, Bino GD, Gorczyca W, Hotz MA, Lassota P, Traganos F. Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. Cytometry 13: 795-808, 1992

24) Bino GD, Darzynkiewicz Z. Camptothecin, teniposide, or 4'-(9-acridinylamino)-3-methanesulfon-m-anisidide, but not mitoxantrone or doxorubicin, induces degradation of nuclear DNA in the S phase of HL-60 cells. Cancer Res 51: 1165-1169, 1991

25) Lennon SV, Martin SJ, Cotter TG. Dose-dependent induction of apoptosis in human tumor cell lines by widely diverging stimuli. Cell Prolif 24: 203-214, 1991

26) Tamaru Y, Miyawaki T, Iwai K, Tsuji T, Yachie A, Yonehara 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

27) Van Prooijen HC, Dekker AW, Punt K. The use of intermediate dose cytosine arabinoside (ID Ara-C) in the treatment of acute non-lymphocytic leukaemia in relapse. Brit J Haematol 57: 291-299, 1984

28) Craig RW, Frankfurt OS, Sakagami H, Takeda K, Bloch A. Macromolecular and cell cycle effects of different classes of agents inducing the maturation of human myeloblastic leukemia (ML-1) cells. Cancer Res 44: 2421-2429, 1984

29) Griffin J, Munroe D, Major P, Kufe D. Induction of differentiation of human myeloid leukemia cells by inhibitors of DNA synthesis. Exp Hematol 10: 774-781, 1982

30) 藤森好啓．CD34細胞とアポトーシス．医学のあゆみ 173：832-835，1995

31) Maciejewski J, Selleri C, Anderson S, Young NS. Fas antigen expression on CD34+ human marrow cells is induced by interferon γ and tumor necrosis factor α and potentiates cytokine mediated hematopoietic suppression in vitro. Blood 85: 3183-3190, 1995

32) Nagafuji K, Shibuya T, Harada M, Mizuno S, Takenaka, K, Miyamoto T, Okamura T, Gondo H, Niho Y. Functional expression of Fas antigen (CD95) on hematopoietic progenitor cells. Blood 86: 883-889, 1995

33) 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

34) 高仲 強．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．十全医学会誌 105：450-461，1996

35) 長藤宏司，竹中克斗，仁保喜之．造血細胞（骨髄系）のアポトーシス機構：造血前駆細胞に発現するFas抗原とその誘導機構．日本臨床 54：1790-1796，1996

36) 高本 滋，太田和雄．抗癌剤の作用：作用機序の解析．フローサイトメトリー：手技と実際（太田和雄，野村和弘，高本 滋編），改訂第3版，450-467頁，癌と化学療法社，東京，1990

37) Morimoto H, Yonehara S, Bonavida B. Overcoming tumor necrosis factor and drug resistance of human tumor cell lines by combination treatment with anti-Fas antibody and drugs or toxins. Cancer Res 53: 2591-2596, 1993

38) Ogasawara J, Watanabe-Fukunaga R, Adachi M, Matsuzawa

A, Kasugai T, Kitamura Y, Itoh N, Suda T, Nagata S. Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice. Nature 364: 806-809, 1993
39) Prince HM, Imrie K, Crump M, Stewart AK, Girouard C, Colwill R, Brandwein J, Tsang RW, Scott JG, Sutton DMC, Pantalony D, Carstairs K, Sutcliffe SB, Keating A. The role of intensive therapy and autologus blood and marrow transplantation for chemotherapy-sensitive relapsed and primary refractory non-Hodgkin's lymphoma: identification of major prognostic groups. Brit J Haematol 92: 880-889, 1996

A Study on Apoptosis of Human Myeloid Leukemia Cells Induced by 1-β-D-Arabinofuranosylcytosine - Correlation with Fas Antigen, Bcl-2 Protein and Cell Cycle

Minoru Takeshima, Department of Internal Medicine (III), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920 — J. Juzen Med Soc., **106,** 276 — 287 (1996)

Key words arabinofuranosylcytosine, apoptosis, Fas, Bcl-2, cell cycle

Abstract

The present study was performed to clarify the relationship between the apoptosis of leukemic cells induced by 1-β-D-arabinofuranosylcytosine (Ara-C) and apoptosis-related proteins, Fas antigen and Bcl-2 protein, as well as the cell cycle. Human myeloid leukemia cell line HL60 cells were treated with various concentrations of Ara-C and/ or IgM anti-Fas monoclonal antibody (MoAb), and then proportions of apoptosis were evaluated by morphology of Giemsa's stain and DNA electrophoresis. Simultaneously, changes in expressions of the Fas antigen and Bcl-2 protein, and in cell cycle of Ara-C-treated cells were investigated with flow cytometry. Distinct apoptosis was observed when cells were treated with a high-dose of Ara-C (10 or 30 μM) for 6 hr, which is comparable to plasma concentration obtained in high-dose Ara-C therapy. However, little apoptosis was observed when cells were treated for 30 hr with a low-dose of Ara-C (0.1, 0.5, or 1 μM), which is comparable to plasma concentration obtained in conventional or low-dose Ara-C therapy. With the addition of IgM anti-Fas MoAb, the induction of apoptosis by Ara-C was enhanced. Moreover, by the combination with the MoAb after the pretreatment with low-dose of Ara-C for 24 hr, the induction of apoptosis was enhanced synergistically, while the induction of apoptosis by the combination of a high-dose of Ara-C and the MoAb was enhanced additively. Flow cytometric study revealed that the expression of cell surface Fas antigen increased when cells were treated with a low-dose of Ara-C for 24 hr, and this effect was enhanced by repeating the administration. The expression of Bcl-2 protein did not change after the treatment with Ara-C. Cell cycle analysis showed that the treatment with a high-dose of Ara-C for 6 hr induced S phase-specific apoptosis, and the treatment with a low-dose of Ara-C for 30 hr induced S phase prolongation or G1-S boundary block. Addition of IgM anti-Fas MoAb to the cells treated with a low-dose of Ara-C induced prominent apoptosis cell cycle independently. The result of this study indicated that apoptosis induced by a low-dose of Ara-C was accelerated with Fas-Fas ligand system through the increase in expression of Fas antigen, and a high-dose of Ara-C induced S phase specific apoptosis by its direct effect. These findings show that not only modifications of the schedule of treatment and the dose of anticancer drugs but also the application of Fas-Fas ligand system in vivo may effectively induce apoptosis of cancer cells, and contribute to improved cancer chemotherapy.