HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	癌細胞における細胞増殖抑制とアポトーシス
Author(s)	表山, 和樹; 井上, 勝一; サラウディン, アラディン
Citation	CYTOMETRY RESEARCH, 12(1), 83-91
Issue Date	2002
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/886
Type	article (author version)
Note(URL)	http://www.meteo-intergate.com/index.html
File Information	CR12-1.pdf ()

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

癌細胞における細胞増殖抑制とアポトーシス

表山和樹　井上勝一　アラディン=サラウディン

北海道大学大学院地球環境科学研究科
環境情報医学講座

住所
郵便番号 060－0810　北海道札幌市北区北１０条西５丁目
北海道大学大学院地球環境科学研究科環境情報医学講座　井上勝一

Cell Growth Inhibition and Apoptosis in Cancer Cells

Kazuki Omoteyama, Shoichi Inoue

and Alaa-eldin Salah-eldin

Department of Environmental Medicine and Informatics, Graduate School of Environmental Earth science, Hokkaido University, Sapporo, Japan

Although the pathways of cell growth and apoptosis have been extremely investigated, it seems still unclear how cell growth inhibition and apoptosis are controlled or switched over. Cancer cells enter the cell cycle by being stimulated by a growth factor, such as epidermal growth factor (EGF) and insulin-like growth factor (IGF). Recently, vascular endothelial growth factor (VEGF) known as an inducer of angiogenesis is focused on, because of its function of growth factor. In fact, all human lung cancer cell lines we maintain secrete VEGF, and VEGF is similary suspected to function as a growth factor.

On the other hand, anticancer chemotherapeutic agents induce cell growth inhibition or apoptosis. DNA-damaging anticancer agents stimulate wild type p53 production, and p53 has a key role in the control of G_1/S check point and then decides the outcome of cells to apotosis or cell growth inhibition. Thus, p53 is very important to assess the efficiency of chemotherapeutic agents. DNA damage reaches apoptosis through two pathways, mitochondrial pathway initiated by Bcl-2 family and death receptor pathway stimulated by TNF-receptor superfamily activation. However, we found that all human lung cancer cell lines we maintained expressed Fas, a member of TNF-receptor superfamily. Fas was localized in the cytoplasm in exponentially growing cells and in the membrane in confluent cells. Interestingly, Fas levels in confluent cells were significantly correlated with their doubling times ($r = 0.757$, $p = 0.0088$). Moreover, growth factor stimulation such as EGF, IGF, and VEGF induced Fas internalization. From these results we suppose that Fas may function as a cell growth inhibitor as well as a death receptor just like p53.

Key Words: Apoptosis, Cancer, Fas, Growth inhibition,

1. はじめに

細胞増殖と細胞死のメカニズムを知ることは、がん化学療法を行う上に必須である。細胞増殖は成長因子の刺激を受けた細胞がG_1期からS期やG_2期を経てM期の細胞分裂迄を含むが、この主体を担っているのはcyclinとcyclin-dependent kinase (cdk)である。細胞周期には各期特有のcyclinが存在し、D1、E、A、Bなどが知られているが、これがCdkと結合し、Cdkがリン酸化され細胞周期が進行する。一方、cyclinやCdkの複合体の働きをp21、p17、p16やさらに上流のp53 などが抑制する。これらのがん抑制遺伝子産物とは逆にがん遺伝子（myc、ras、fos、junなど）産物は細胞増殖を促進する。このように、細胞周期の進行は一見単純なようだが、実は複雑な機構によって調節されている[20]（Fig 1)。このため、細胞周期の進行に対するチェック機構が存在し、正しく進行しない場合は、細胞周期の停止、あるいは、細胞死へと進む。本稿では、このうち特に成長因子、細胞増殖抑制機構やアポトーシス機構に焦点を絞って、われわれの成績を中心に概説する。

2. 成長因子

成長因子としては、epidermal growth factor (EGF)、insulin-like growth factor (IGF)、transforming growth factor-β (TGF-β)が良く知られているが、最近、非小肺癌細胞[23, 32, 41]、頭頸部扁平上皮癌[39]、肝細胞癌[40]、結腸直腸癌[15]、卵巣癌[6]、子宮内膜癌[16]、前立腺癌細胞[22]、神経芽細胞腫[13]や多発性骨髄腫をはじめ他の血液系悪性腫瘍[3]が血管内皮細胞増殖因子vascular endothelial growth factor (VEGF)やその受容体を発現していることが報告された。VEGFそのものは腫瘍血管の増生に役立つと考えられるが、それではこれに対する受容体の発現を説明することはできない。Masoodら[35]はVEGF受容体を発現している腫瘍ではVEGFがautocrineにより増殖因子として働いていることを示した。このことは胃癌培養細胞株[50]でも同様であった。興味深いことに、正常前立腺、高度前立腺上皮内腫瘍 (PIN)、前立腺癌を比較すると、正常前立腺ではVEGFもVEGF受容体も増殖性の基底細胞層に限局してみられるが、高度前立腺上皮内腫瘍ではこの局在性は失われ広く腫瘍性分泌細胞にみられるようになり、癌になると全ての細胞にVEGFもVEGF受容体もみられる[27]。このように、細胞の脱分化と共に両者がみられることからもVEGFが癌細胞にあっては血管誘導因子として働くと共にautocrineにより癌細胞の増殖因子として働いていることは間違いないようである。われわれが維持している10種類のヒト肺癌細胞で検討した結果、全ての細胞がVEGFを分泌していた。一方、後述するFasは対数増殖期の細胞では細胞質内に、同一細胞でもconfluentになった状態では細胞膜にみられる。このことから、成長因子で刺激すれば細胞膜上に発現しているFasも細胞質内に移動する可能性が推定されたので、EGFやIGFで刺激したところFasは細胞質内に取込まれた。VEGF刺激でも同様な現象がみられ、どの成長因子で

Fasの細胞内取込みが誘導されるかは細胞型により異なっていた（Fig 2)。このことは各細胞株によって反応する成長因子が異なっていることを示し、Fasの細胞内取込みをみることは各細胞株にとって有効な成長因子を推定するのに役立つと思われる。事実、各細胞株の培養液中VEGF濃度とVEGF刺激後のFasの発現量との相関性をみると、培養液へ多量にVEGFを分泌する細胞はVEGF刺激によるFasの細胞内取込みが起きにくく、逆にVEGF分泌量の少ない細胞はVEGF刺激によりFasの細胞内取込みが顕著で、細胞内でのFasの分解量も多かった(r=0.956, p=0.002)（Fig 3)。このように培養液中へのVEGF分泌量が少ないのはその細胞がautocrineやparacrineで消費したためであると考えられる。今後、VEGFを含めた成長因子の研究は癌細胞の増殖の面からの新しい展開が得られるものと推定される。

3. アポトーシス

細胞増殖とは逆にアポトーシスはがん化学療法に有利に働くと考えがちである。しかし、Bcl-2 familyにみられるように、このfamilyにはアポトーシスを誘導するタンパク（Bax、Bcl-XS、Bad、Bakなど）とアポトーシスを抑制するタンパク（Bcl-2、Bcl-XL、A1、Mcl-1、BAG-1 など）があり[21]、さらに、作用が相反するタンパクがお互いにheterodimerを形成しお互いの作用を干渉するため、アポトーシスの過程は非常に複雑な様相を呈している。アポトーシスの過程により、①ミトコンドリアが主要な役割を果たす場合と、②ミトコンドリアが余り関係しない場合に大別されるが、前者の過程ではBcl-2 familyによって、後者の過程ではTNF-receptor superfamilyによってアポトーシスが進行する[21]。ミトコンドリアを介する系を、Kroemerらは導入期、作動因子期、分解期に分けた[30]。この分類はアポトーシスの分子生物学的な一連の変化を理解する上に必須であるが、ここでは実用的なHannunの分類について述べたい[18]。彼は化学療法によって誘導されるアポトーシスの過程を、I期（障害発生)、II期（刺激伝導)、III期（方向決定と細胞死の完結）に分け（Fig 4)、各種抗がん剤との関係について述べている。Doxorubicin、bleomycine、mitomycin Cなどの抗生物質や5-fluorouracil、methotrexate、ara-Cなどの代謝拮抗剤、およびCPT-11 やetoposideなどのtopoisomerase I & II阻害剤はDNAを損傷し、p53 の産生を刺激し、結果として野生型のp53 量が増加する。核タンパクであるp53 はDNAの一定の配列に特異的に結合し、転写調節因子として作用する。特に、*mdm2*や*p21*^{WAF1}はp53 が直接標的とする遺伝子であり、p21 はp53 の刺激を仲介して細胞周期の運行を抑制する[18]。また、p53 はアポトーシス誘導因子である*bax*をupregulateし、アポトーシス抑制因子である*bcl-2* をdownregulateしている[47]。さらに、がん原遺伝子*c-myc*の発現を抑制する[37]。このようにp53 の役割は複雑であるが、野生型p53 は放射線照射後などではG_1/S check pointを制御し、G_1期での細胞増殖の停止とアポトーシスを誘導する[31]。G_2M check pointの制御はcdc2 やcyclin B1 に関係し、G_2M期での細胞増殖の停止とアポトーシスを誘導する[48]。この刺激

伝導期にはdecision pointは存在しないので、アポトーシスの回避はこの時点で起きやすいと考えられる。decision pointを経過すると、Bcl-2 familyが活動を開始し、アポトーシスも不可逆的方向へと向かう。Bcl-2 familyの作用の主座はミトコンドリア膜上である[10, 46]。ミトコンドリアの内膜と外膜が接触する部位にはポリタンパクがあって、透過性変換孔複合体permeability transition pore complex (PTPC)を形成している[34]。PTPCの中心となっているタンパク質の１つがadenine nucleotide translocator (ANT)で、ミトコンドリアの内膜に豊富に存在する。ANTの本来の役割はATPとADPの特異的なcarrierであるが、時に非特異的poreを形成し、この時は致死的な役割を果たす[33]。外膜には電位依存性陰イオンチャンネルvoltage-dependent anion channel (VDAC)があり、チトクロームCはここから放出される。アポトーシスに向かう場合は、ミトコンドリアの膜電位が低下し、チトクロームCの放出、細胞内活性酸素の上昇と細胞膜リン脂質の酸化が引き続き惹起される[19, 29]。細胞膜リン脂質が酸化された細胞は食細胞に貪食され、*in vivo*では*in vitro*でみられるようなクロマチンの核縁への編在性やDNAラダーなどの所見は認め難い。

① Bcl-2 family

Bcl-2 やBaxがそれぞれの作用を発揮するためには、Bcl-2 とBaxの相対量が重要で、Bcl-2 とBaxがheterodimerを形成している状態から、Bcl-2 が過剰になりBcl-2 homodimerが形成されれば細胞は生き延び、Baxが過剰になりBax homodimerが形成されればアポトーシスに向かうといわれる[43]。従って、遺伝子導入によりBaxを抗がん剤耐性細胞に過剰発現させると耐性が克服される[49]。しかし、西田ら[42]は、Baxを過剰に核に発現しているヒト肺がん細胞はアポトーシス誘導刺激をしてもアポトーシスを回避することを見出している。このように本来アポトーシス誘導タンパクであっても、その局在が変化することによりアポトーシスが回避されることは興味深い現象でる。また、Bcl-2 の過剰発現は抗がん剤により誘導されるアポトーシスから細胞を回避させ、抗がん剤に耐性にさせる[8, 36]。

一方、Bcl-2 と同様な働きをもつタンパクにBcl-X_Lがある。Bcl-2 の過剰発現もBcl-X_Lの過剰発現も共にチトクロームCの放出やcaspase-3 活性化を阻止するが[25]、どちらが過剰発現するかは耐性株の種類によって異なっているようである[11]。

②FasL、Fas 受容体系

TNF-receptor superfamilyに属するTNF受容体やFas (APO-1、CD95) 受容体あるいはステロイド受容体をTNFやFas ligand (FasL; CD95L)やdexamethasoneで刺激した時にもアポトーシスが誘導される[38, 40]が、この場合チトクロームCの放出はみられず[9]、caspase-8 を介してICE proteaseのカスケードを誘導することが共通してみられる。従って、前述の系とは別に考えなければならない。

FasLないしは抗Fas抗体がFas受容体に結合すると、Fas受容体はoligomerを形成し、アポトーシス刺激が伝導される[26]。一方、種々のがん細胞も細胞表面にFas受容体を発現し、自己抗体の産生を誘導し、また、殺細胞性T細胞やNK細胞

の標的となり、細胞死へと向かう[17, 20]。このことは細胞表面のFas受容体の発現の有無がアポトーシスを介した耐性に関係することを示唆する。事実、細胞表面にFas受容体を発現している親株やTNF耐性株はDXR感受性であるが、DXR耐性MCF7乳がん細胞では細胞表面のFas受容体の発現がみられず、Fas遺伝子を移入し、Fas受容体を過剰発現させることにより耐性が克服される[7]ことによっても裏付けられる。しかし、このFas受容体の発現はGADD45、p21[WAF1]、Bax、cyclin G、MDM2、TGF-α、IGF-binding proteinなどと同様p53により調節されている[44]ので、p53との関連が重要であり、場合によってはp53の変化をみている可能性もある。

しかし、一方で、正常細胞はともかく、なぜがん細胞にFas受容体が発現するかについては疑問が残る。Fas系はもともとリンパ球の恒常性の維持に必要であるので、pre-B ALLのアポトーシスがFasLや細胞障害性Tリンパ球により誘導されるとすれば理解しやすい。しかし、実際には、小児のB細胞系ALL細胞はほとんどFasLが誘導するアポトーシスに耐性であるといわれる[45]。しかも、この耐性はDXR、Ara-C、MTX、6-MPなどの抗がん剤により軽減されるが、それは、Fas受容体の発現を増加し、アポトーシスのシグナルの閾値を下げるためと考えられる。従って、正常細胞と悪性細胞におけるFas系の働きには違いがある可能性がある。Fas受容体の発現は、乳癌、腎癌、胃癌、結腸癌、子宮内膜癌、前立腺癌、膵癌、肝細胞癌、肺大細胞癌や扁平上皮癌などの上皮性癌にもみられる[5]。しかも、Fas受容体とFasLを同時に発現している培養癌細胞も多い[14, 28]。しかもこれらは予想に反してアポトーシスにはむしろ耐性である。このように、がん細胞におけるFasの役割はまだ不明な点が多い。

4. 細胞増殖抑制

p53 がアポトーシスや細胞増殖抑制への方向を決定するのに重要な役割を果たしていることは前述の通りであるが、細胞増殖抑制の方向に向かった細胞はやがてDNA修復が行われ、薬剤耐性を示す[18] (Fig 4)。このdecision pointの詳細を理解することは、化学療法を行う上に必須と考えられるが、まだ十分明らかになっていない。最近、Yamaguchiら[51]はDNA傷害の程度の強さによりp53 がアポトーシスや細胞増殖抑制への方向を決定する道筋を示したが、さらに詳細な検討が必要に思われる。一方、進行がんの細胞では、Fasはdown-regulateされていたり[24]、あるいはnon-functionである[4]といわれる。

成長因子刺激がFasをdown-regulateするが、静止期細胞の細胞膜に局在したFasが対数増殖期細胞では細胞質に局在する (Fig 5)、即ち、細胞膜上にあったFasが細胞質に移動する形で行われており、二重の意味で、進行がんが免疫回避する理由の一つと考えられる。われわれはEGF、IGFおよび血管造成因子であるVEGFを用い、ヒト肺癌培養細胞株のFasに与える影響をフローサイトメーターを用いて検討したが、いずれの細胞も成長因子刺激直後ではFasの発現量は減少し、この低下は時間の経過とともに回復した。このFasの発現量と各細胞株の倍加時

間との相関をみたところFasの発現量が多い細胞株ほど倍加時間が長くなる傾向が認められた（r = 0.757, p = 0.0088)。即ち、Fasが細胞増殖の抑制と密接な関係があることが推定された。そこで、細胞障害活性がある抗Fas IgM(clone: CH-11）と細胞障害活性が極めて低い抗Fas IgG_1（clone: APO-1）を用い、Fasと細胞増殖抑制効果を検討したところ、確かに抗Fas IgG_1よりも抗Fas IgMの方がより細胞増殖抑制効果は高かった。この細胞増殖抑制効果がapoptosisによるものなのかを検討するため細胞周期とcaspaseの活性を検討した。さらに抗Fas IgMおよび抗Fas IgG_1で処理をした細胞を成長因子で刺激し、Fasの局在を共焦点レーザー顕微鏡で観察したところ抗Fas IgG_1で処理をした細胞のFasは成長因子刺激により細胞質に移動したが、抗Fas IgMで処理をした細胞のFasは成長因子で刺激しても細胞膜にとどまったままであった。このとき、細胞周期制御因子であるp16 の局在を共焦点レーザー顕微鏡で観察したところ、抗Fas IgM抗体処理後約一時間でp16 が誘導され 1 時間半後には核へ移行した。われわれの結果は、がん細胞ではFasはdeath receptorとして働いているというよりは、むしろ細胞増殖抑制性に働いていることを示し、アポトーシスの誘導のためには、作用部位である細胞膜上に留まる必要があるものと考えられた。

5. まとめ

がん細胞の細胞増殖抑制とアポトーシスについて概説した。細胞増殖抑制は、がん細胞の化学療法耐性に関係するため特に重要と考えられる。本稿では、特に、がん細胞が分泌する成長因子自体が直接がん細胞の増殖を促進するとともに、Fas を分解して Fas による増殖抑制を回避し、さらに免疫からの攻撃をも回避していることを示した。がん細胞の Fas の局在は増殖抑制、ひいてはアポトーシスを決定する重要な因子であり、Fas の細胞内取込みを阻止することは新たながん治療法を開発する糸口となることが期待される。

1) Arase H, Arase N, and Saito T: Fas-mediated cytotoxicity by freshly isolated natural-killer cells. J Exp Med. 181: 1235-1238, 1995.
2) Ashkenazi A, Dixit VM: Death receptors: signaling and modulation. Science (Washington DC) 281: 1305-1308, 1998.
3) Bellamy WT: Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in multiple myeloma and other hematopoietic malignancies. Semin Oncol 28: 551-559, 2001.
4) Bernstorff WV, Spanjaard RA, Chan AK, et al.: Pancreatic cancer cells can evade immune surveillance via nonfunctional Fas (APO-1/CD95) receptors and aberrant expression of functional Fas ligand. Surgery, *125:* 73-84, 1999.
5) Bodey B, Bodey B Jr, Siegel SE, et al: Fas (Apo-1, CD95) receptor expression in childhood astrocytomas. Is it a marker of the major apototic pathway or a signaling receptor for immune escape of neoplastic cells? In Vivo 13: 357-373, 1999.
6) Brustmann H, Naude S: Vascular endothelial growth factor expression in serous ovarian carcinoma: relationship with high mitotic activity and high FIGO stage. Gynecol Oncol 84: 47-52, 2002.
7) Cai Z, Stancou R, Korner M, et al: Impairment of Fas-antigen expression in adriamycin-resistant but not TNF-resistant MCF7 tumor cells. Int J Cancer 68: 535-546, 1996.
8) Campos L, Rouault J-P, Sabido O, et al: High expression of bcl-2 protein in acute myeloid leukemia cells is associated with poor response to chemotherapy. Blood 81: 3091-3096, 1993.
9) Chauhan D, Pandey P, Ogata A, et al: Cytochrome C-dependent and -independent induction of apoptosis in multiple myeloma cells. J Biol Chem. 272: 29995-29997, 1997.
10) Costatini P, Jacotot E, Decaudin D, et al: Mitochondrion as a novel target of anticancer chemotherapy. J Natl Cancer Inst. 92; 1042-1053, 2000.
11) Datta R, Manome Y, Taneja N, et al: Overexpression of Bcl-XL by cytotoxic drug exposure confers resistance to ionizing radiation-induced internucleosomal DNA fragmentation. Cell Growth Differ. 6: 363-370, 1995.
12) El-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, et al: WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. Cell 75: 817-825, 1993.
13) Fakhari M, Pullirsch D, Abraham D, et al.: Selective upregulation of vascular endothelial growth factor receptor neuropilin-1 and -2 in human neuroblastoma. Cancer 94: 258-263, 2002.
14) Ferreira CG, Tolis C, Span SW, et al: Drug-induced apoptosis in lung cancer cells is not mediated by the Fas/FasL (CD95/APO1) signaling pathway. Clin Cancer Res. 6: 203-212, 2000.

15) George ML, Tutton MG, Janssen F, et al.: VEGF-A, VEGF-C, and VEGF-D in colorectal cancer progression. Neoplasia 3: 420-427, 2001.
16) Giatromanolaki A, Sivridis E, Brekken R, et al.: The angiogenic "vascular endothelial growth factor/flk-1 (KDR) receptor" pathway in patients with endometrial carcinoma: prognostic and therapeutic implications. Cancer 92: 2569-2577, 2001.
17) Hanabuchi S, Koyanagi M, Kawasaki A, et al: Fas and its ligand in a general mechanism of T-cell-mediated cytotoxicity. Proc Natl Acad Sci USA. 91: 4930-4934, 1994.
18) Hannun YA: Apoptosisand the dilemma of cancer chemotherapy. Blood 89: 1845-1853, 1997.
19) Hockenbery DM, Oltvai ZN, Yin XM, et al: Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. Cell 75: 241-251, 1993.
20) Hunter T, Pines J: Cyclins and Cancer II: Cyclin D and CDK inhibitors come of age. Cell, 79: 573-582,1995.
21) 井上勝一:アポトーシスと薬剤耐性.癌の薬剤耐性とその克服ー基礎と臨床- , 大沼尚夫, 他 (編), 宇宙堂八木書店, 東京, 105-118, 2001.
22) Jackson MW, Roberts JS, Heckford SE, et al.: A potential autocrine role for vascular endothelial growth factor in prostate cancer. Cancer Res 62: 854-859, 2002.
23) Kajita T, Ohta Y, Kimura K, et al.: The expression of vascular endothelial growth factor C and its receptors in non-small cell lung cancer. Br J Cancer 85: 255-260, 2001.
24) Keane MM, Ettenberg SA, Lowrey GA, et al.: Fas expression and function in normal and malignant breast cell lines. Cancer Res 56: 4791-4798,1996.
25) Kharbanda S, Pandey P, Schofield L, et al: Role for Bcl-XL as an inhibitor of cytosolic cytochrome C accumulation in DNA damage-induced apoptosis. Proc Natl Acad Sci USA. 94: 6939-6942, 1997.
26) Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, et al: Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. EMBO J. 14: 5579-5588, 1995.
27) Kollermann J, Helpap B: Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptor Flk-1 in benighn, premalignant, and malignant prostate tissue. Am J Clin Pathol 116: 115-121, 2001.
28) Kornmann M, Ishiwata T, Kleeff J, et al: Fas and Fas-ligand expression in human pancreatic cancer. Ann Surg. 231: 368-379, 2000.
29) Korsmeyer SJ, Yin XM, Oltvai ZN, et al: Reactive oxygen species and the regulation of cell death by the Bcl-2 gene family. Biochim Biophys Acta 1271: 63-66,1995.
30) Kroemer G, Petit P, Zamzami N, et al.: The biochemistry of programmed

cell death. FASEB J 9: 1277-1287, 1995.
31) Kuerbitz SJ, Plunkett BS, Walsh WV, et al: Wild-type p53 is a cell cycle checkpoint determinant following irradiation. Proc Natl Acad Sci USA. 89: 7491-7495, 1992.
32) Liao M, Wang H, Lin Z, et al.: Vascular endothelial growth factor and other biological predictors related to the postoperative survival rate on non-small cell lung cancer. Lung Cancer 33: 125-132, 2001.
33) Marzo I, Brenner C, Zamzami N, et al: Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis. Science 281: 2027-2031, 1998.
34) Marzo I, Brenner C, Zamzami N, et al: The permeability transition pore complex: a target for apoptosis regulation by caspases and bcl-2-related proteins. J Exp Med. 187: 1261-1271, 1998.
35) Masood R, Cai J, Zheng T, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) is an autocrine growth factor for VEGF receptor-positive human tumors. Blood 98: 1904-1913, 2001.
36) Miyashita T, Reed JC: *bcl-2* gene transfer increases relative resistance of S49.1 and WEHI17.2 lymphoid cells to cell death and DNA fragmentation induced by glucocorticoids and multiple chemotherapeutic drugs. Cancer Res. 52: 5407-5411, 1992.
37) Moberg KH, Tyndall WA, Hall DJ: Wild-type murine p53 represses transcription from the murine c-myc promoter in a human glial cell line. J Cell Bioch. 49: 208-215, 1992.
38) Nagata S: Apoptosis by death factor. Cell 88: 355-365, 1997.
39) Neuchrist C, Erovic BM, Handisurya A, et al.: Vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGF 2) expression in squamous of cell carcinomas of the head and neck. Laryngoscope 111: 1834-1841, 2001.
40) Ng IO, Poon RT, Lee JM, et al.: Microvessel density, vascular endothelial growth factor and its receptors and its receptors Flt-1 and Flk-1/KDR in hepatocellular carcinoma. Am J Clin Pathol 116: 838-845, 2001
41) Nikilinska W, Burzykowski T, Chyczewski L, et al.: Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in non-small cell lung cancer (NSCLC): association with p53 gene mutation and prognosis. Lung Cancer 33: 59-64, 2001
42) Nishita M, Inoue S, Tsuda M, et al: Nuclear translocation and increased expression of Bax and disturbance in cell cycle progression without prominent apoptosis induced by hyperthermia. Exp Cell Res. 244: 357-366, 1998.
43) 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.
44) Owen-Schaub LB, Zhang W, Cusack JC, et al: Wild-type human p53 and a

temperature-sensitive mutant induce FAS/APO-1 expression. Mol Cell Biol. 15: 3032-3040, 1995.

45) Posovszky C, Friesen C, Herr I, et al: Chemotherapeutic drugs sensitize pre-B ALL for CD95- and cytotoxic T-lymphocyte-mediated apoptosis. Leukemia 13: 400-409, 1999.

46) Salah-eldin A, Inoue S, Tsuda M, et al: Abnormal intracellular localization of Bax with a normal membrane anchor domain in human lung cancer cell lines. Jpn J Cancer Res 91: 1269-1277, 2000.

47) Selvakumaran M, Lin HK, Miyashita T, et al: Immediate early up-regulation of bax expression by p53 but not TGFb1: a paradigm for distinct apoptotic pathways. Oncogene 9: 1791-1798, 1994.

48) Shimizu T, O'Connor PM, Kohn KW, et al: Unscheduled activation of cyclin B1/cdc2 kinase in human promyelocytic leukemia cell line HL60 cells undergoing apoptosis induced by DNA damage. Cancer Res. 55: 228-231, 1995.

49) Sugimoto C, Fujieda S, Seki M, et al: Apoptosis-promoting gene (*bax*) transfer potentiates sensitivity of squamous cell carcinoma to cisplatin *in vitro* and *in vivo*. Int J Cancer 82: 860-867, 1999.

50) Tian X, Song S, Wu J, et al.: Vascular endothelial growth factor: acting as an autocrine growth factor for human gastric adenocarcinoma cell MGC803. Biochem Biophys Res Commun 286: 505-512, 2001.

51) Yamaguchi T, Matsuda K, Sagiya Y, et al.: p53R2-dependent pathway for DNA synthesis in a p53-regulated cell cycle checkpoint. Cancer Res 61: 8256-8262, 2001.

Figure Legend

Figure 1. Cell cycle regulators implicated in cancer. Shown here is highly schematic view of action of mammalian cyclin-CDK complexes in the cell cycle. Stippled are those components implicated in cancer through mutation or overexpression (e.g., p53 and cyclin D) or through their absebce in tumers or transformed cells (e. g., p16 and p21). (Hunter T, Cell, 79, 1995)

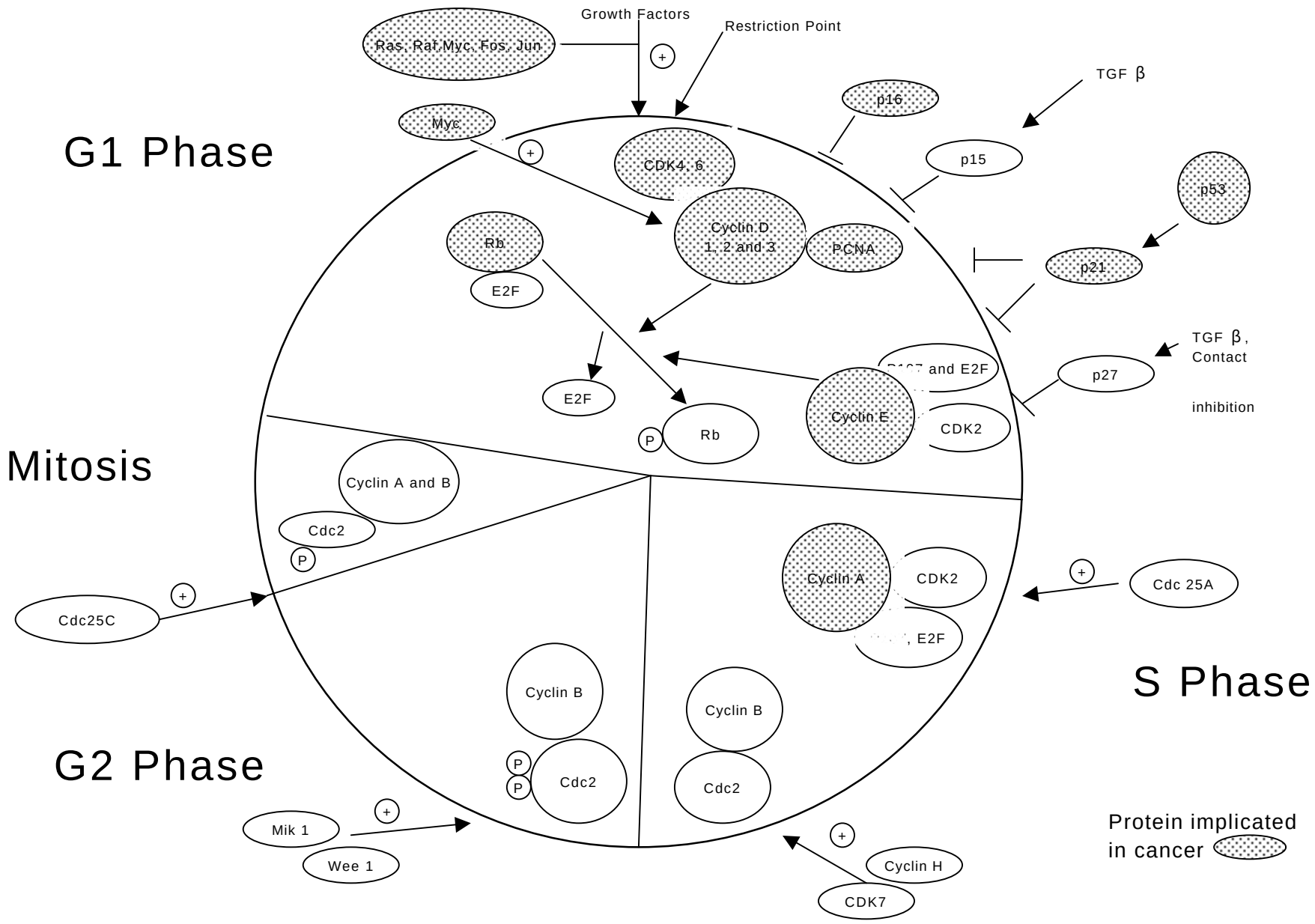
Figure 2. Fas expression levels after 1 h growth factor stimulation. Cells stimulated by 10 ng/ml EGF, 10 ng/ml IGF or 5 ng/ml VEGF were stained with anti-human Fas mouse Ab and measured by flow cytometry. Vertical axis indicates %control of Fas expression level.

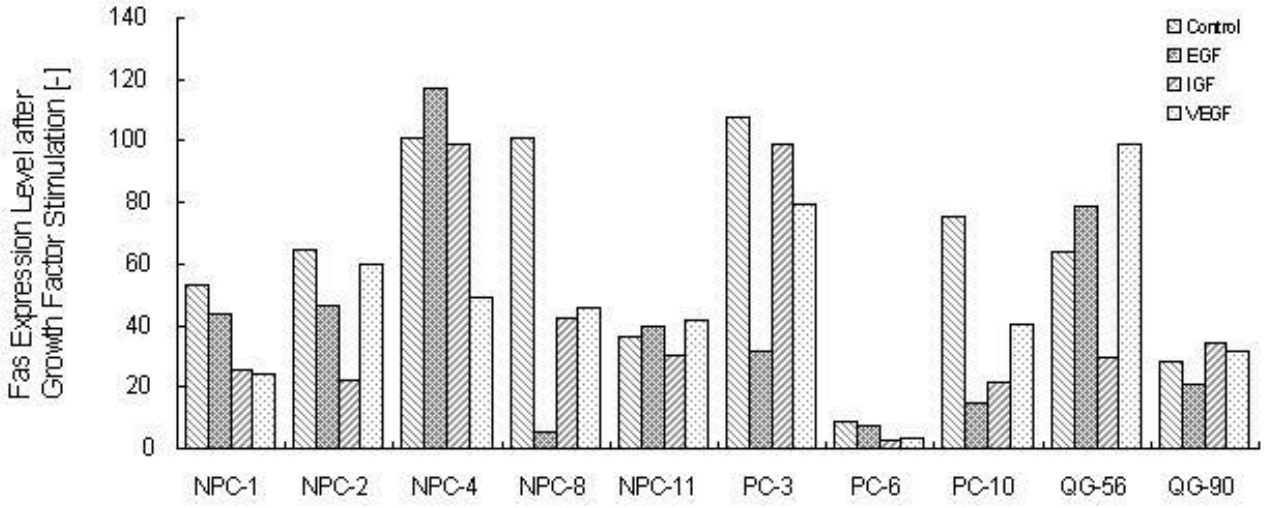
Figure 3. The correlation of Fas expression Levels after VEGF stimulation with VEGF levels in cultured medium. VEGF levels secreted into cultured medium for 48 h by human lung cancer cells were measured by ELISA. As Fas levels after VEGF stimulation decreased as compared with those before VEGF stimulation, the difference was calculated from the histograms by flow cytometry.

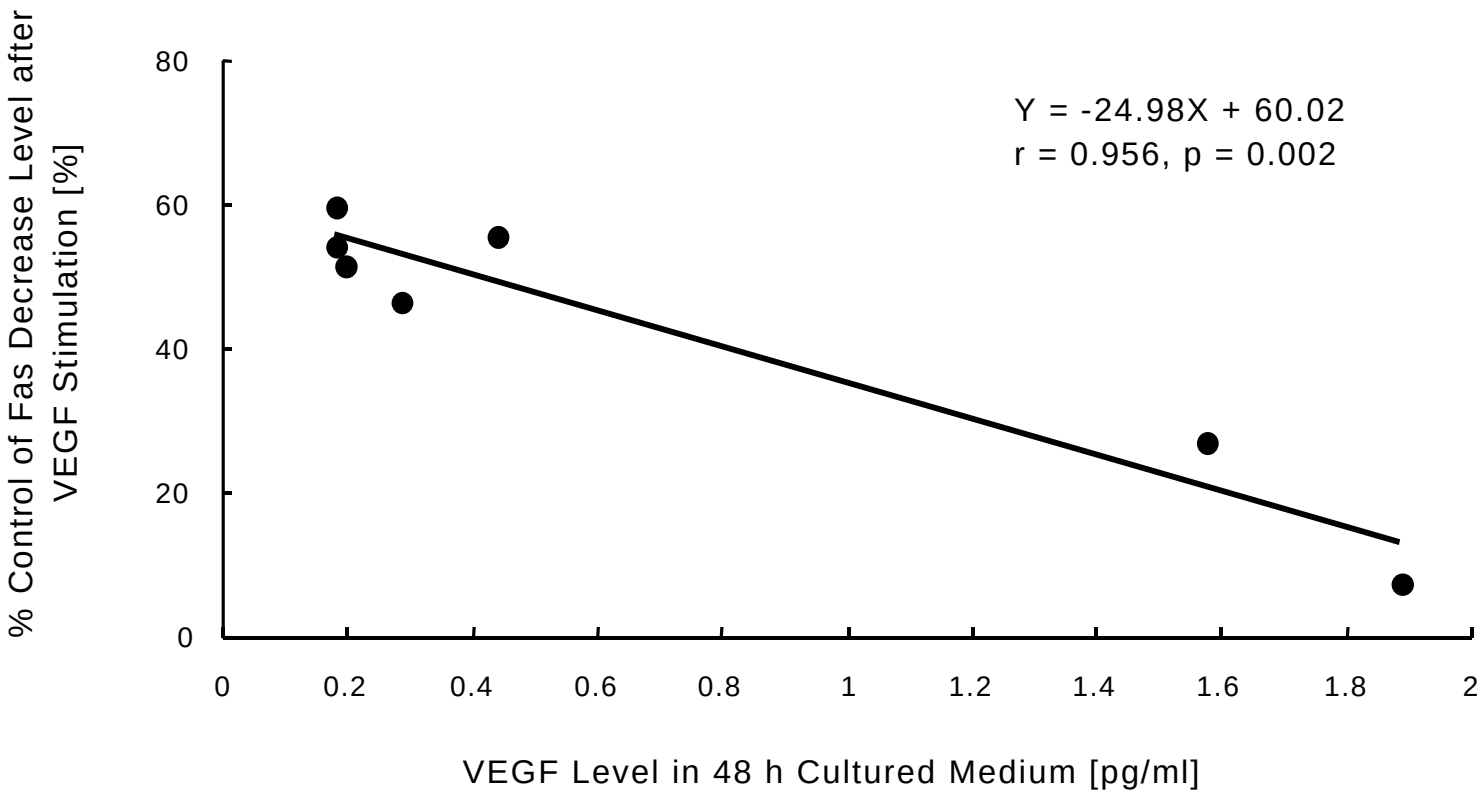
Figure 4.
Hypothesized phases in the induction of apoptosis in response to chemotherapeutic agents. In phase I, cytotoxic agents impart damage to a critical component of the cell such as DNA or microtubules. In phase II, the cell recognizes the damage and its degree of severity through poorly characterized signaling mechanisms. In phase III, the cell assesses the extent of damage and decides on the appropriate response. In many cancer cells, the preferred response is the induction of apoptosis, whereas in most normal cells and in many cancer cells, the response may involve growth arrest to allow for repair. It is also possible that certain cells may react to damage by undergoing senescence or terminal cell differentiation. Cancer cells may acquire resistance to apoptosis at several points in this pathway. For example, mutant p53 may impart resistance to DNA-damaging agents; mutations may exist in the signaling phase (phase II) or in the apoptotic phase III such as with mutant Bcl-2, mutant ras, or hyperactive protein kinase C (PKC). (Hannun YA, Blood 89, 1997)

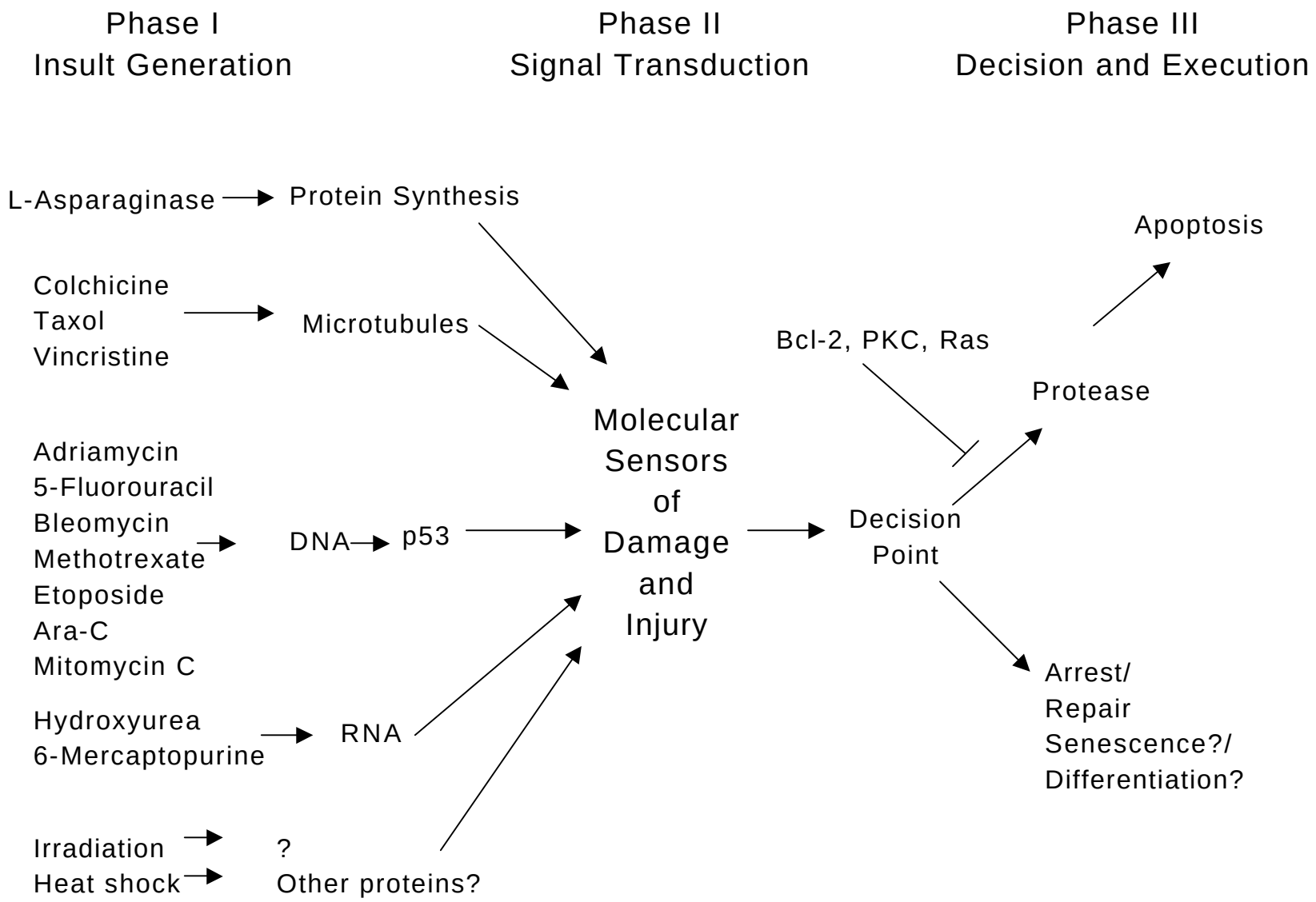
Figure 5. Localization of Fas in NPC-2 squamous cell carcinoma cells. Cells in

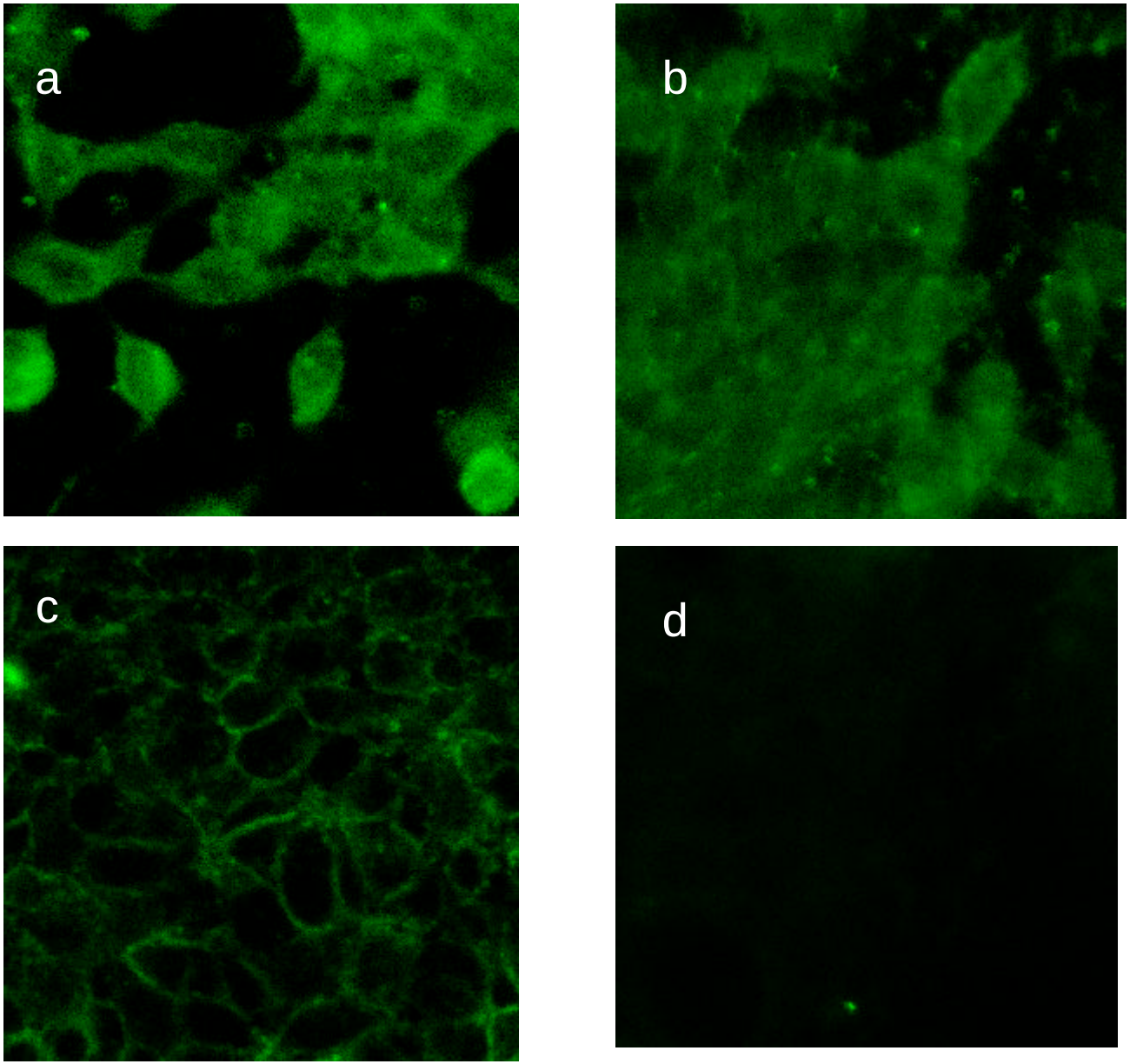
early (a) and late (b) stages of logarithmic growth, confluent cells (c) and unstained cells (d) were stained with anti-human Fas mouse Ab and FITC-conjugated anti-mouse Ig. The Fas was localized in the cytoplasm (a and b) and on cell membrane (c).


Growth Factors
Restriction Point
Ras, Raf,Myc, Fos, Jun
+
TGF β
p16
Myc
G1 Phase
+
CDK4, 6
p15
p53
Cyclin D
1, 2 and 3
PCNA
Rb
p21
E2F
TGF β,
Contact
inhibition
and E2F
p27
E2F
Cyclin E
CDK2
P
Rb
Mitosis
Cyclin A and B
Cdc2
P
+
Cdc25C
Cyclin A
CDK2
+
Cdc 25A
, E2F
S Phase
Cyclin B
Cyclin B
G2 Phase
P
P
Cdc2
Cdc2
+
Mik 1
Wee 1
+
Cyclin H
CDK7
Protein implicated
in cancer


Fas Expression Level after Growth Factor Stimulation [-]
140
120
100
80
60
40
20
0
Control
EGF
IGF
VEGF
NPC-1
NPC-2
NPC-4
NPC-8
NPC-11
PC-3
PC-6
PC-10
QG-56
QG-90


% Control of Fas Decrease Level after VEGF Stimulation [%]
80
60
40
20
0
Y = -24.98X + 60.02
r = 0.956, p = 0.002
0
0.2
0.4
0.6
0.8
1
1.2
1.4
1.6
1.8
2
VEGF Level in 48 h Cultured Medium [pg/ml]


Phase I
Insult Generation
Phase II
Signal Transduction
Phase III
Decision and Execution
L-Asparaginase
Protein Synthesis
Colchicine
Taxol
Vincristine
Microtubules
Adriamycin
5-Fluorouracil
Bleomycin
Methotrexate
Etoposide
Ara-C
Mitomycin C
DNA
p53
Hydroxyurea
6-Mercaptopurine
RNA
Irradiation
Heat shock
?
Other proteins?
Molecular Sensors of Damage and Injury
Decision Point
Bcl-2, PKC, Ras
Protease
Apoptosis
Arrest/
Repair
Senescence?/
Differentiation?


a
b
c
d