

## 論文内容要旨

題目 ベスナリノンによるヒト唾液腺癌細胞 (TYS) の増殖抑制機構の解析

著者 中城 公一

## 内容要旨 (和文約 1,500 字)

唾液腺癌は化学療法、放射線療法に抵抗性で局所再発、遠隔転移の多い予後不良の悪性腫瘍である。ベスナリノンは強心剤として開発されたが、その副作用である無顆粒球症発症の原因究明の過程で多くの悪性腫瘍細胞に対して分化・アポトーシス誘導活性を有することが明らかにされ、唾液腺癌を含む多くの悪性腫瘍に対して分化誘導療法が試みられている。本研究ではベスナリノン処理により G1 arrest が誘導されるヒト唾液腺癌細胞 (TYS) を用いてベスナリノンによる細胞増殖抑制作用の分子機構の解明を試みた。

解析は (1) ベスナリノン処理 TYS 細胞より調製した mRNA を用い anti-sense oriented expression cDNA library を構築し、その library を TYS 細胞にトランスフェクション後、ベスナリノン耐性株を選択し、挿入されている cDNA 断片を回収する anti-sense expression cloning 法と、(2) 上記 library をランダムにシーケンスし分化、増殖に関与すると考えられる遺伝子のベスナリノンによる発現誘導を検索し、up-regulation があれば、その分子を中心にそのシグナルを上流、下流へと追っていく candidate gene searching 法にて行った。

その結果、anti-sense expression cloning 法にて ribosomal protein L21 cDNA を得た。ribosomal protein L21 anti-sense cDNA を強制発現させた細胞はベスナリノンに対する感受性が低下していたが、その作用はおそらくある種のタンパク合成の阻害によるものであり、ribosomal protein L21 タンパクの特異的な発現抑制がベスナリノン抵抗性の原因とは考え難かった。一方、candidate gene searching 法でマウスあるいはラットの細胞において transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) あるいは follicle-stimulating hormone (FSH) により誘導される遺伝子として報告されている TGF- $\beta$ 1-stimulated clone 22 (TSC-22) cDNA 断片を得た。TSC-22 遺伝子は TYS 細胞においてベスナリノン処理にて明らかな発現誘導が認められたため、ヒト TSC-22 cDNA の全長のクローニング、構造解析、機能解析を試みた。5'-RACE 変法で open reading frame を含むほぼ完全長 1.6 kb のヒト TSC-22 cDNA を得た。全塩基配列を決定したところ予想されるアミノ酸配列はマウス、ラットに 98.6% の相同性が認められた。またロイシンジッパー構造が認められたが、その近傍に DNA 結合領域あるいは核移行シグナルが存在しないことより、bZIP 転写因子と結合しその転写活性を抑制する dominant negative 転写制御因子である可能性が示唆された。TSC-22 遺伝子は TYS 細胞において細胞密度に依存しその発現が増加し、ベスナリノンはその発現を更に増強した。タンパク合成阻害剤シクロヘキシミドを用いた実験によりベスナリノンによる TSC-22 遺伝子の発現増強は間接作用であることが示唆された。次に TSC-22 の上流、下流のシグナルを解析する目的で TGF- $\beta$ 1、p21WAF1 の発現を検索した。ベスナリノンは TYS 細胞において TGF- $\beta$ 1 をわずかに誘導し、p21WAF1 を著明に誘導した。また p21WAF1 の誘導は直接作用であることが明らかとなった。更に TGF- $\beta$ 1 は p21WAF1、TSC-22 の発現を誘導した。次に TSC-22 アンチセンスオリゴヌクレオチドの TYS 細胞に対する影響を検索すると、対数増殖期には全く影響を与えないが、細胞密度が上がり増殖を止めるべき時期になると細胞増殖促進作用が認められた。また TSC-22 アンチセンスオリゴヌクレオチドはベスナリノンによる TYS 細胞の増殖抑制作用を阻害した。

以上の結果より、ベスナリノンは TYS 細胞において TGF- $\beta$ 1 あるいは他のタンパク質を介した TSC-22 遺伝子の誘導、更に直接作用あるいは TGF- $\beta$ 1 を介した p21WAF1 の誘導により細胞周期を G1 期に止め、細胞増殖抑制作用を示すことが示唆された。

論文表題

ベスナリノンによるヒト唾液腺癌細胞 (TYS) の  
増殖抑制機構の解析

著者：中城 公一

所属：徳島大学大学院歯学研究科口腔外科学第二講座

(主任：佐藤光信教授)

論文表題

ベスナリノンによるヒト唾液腺癌細胞 (TYS) の  
増殖抑制機構の解析

著者：中城公一

所属：徳島大学大学院歯学研究科口腔外科学第二講座  
(主任：佐藤光信教授)

キーワード：ヒト唾液腺癌細胞、ベスナリノン、  
TSC-22、p21WAF1、G1 arrest

1) 原著論文

2) 英文抄録 2 枚、本文 41 枚、文献 15 枚、  
図の説明 5 枚、図 16 枚、表 1 枚

3) 連絡先：徳島大学歯学部口腔外科学第二講座

Analysis of the mechanism of an anti-proliferative effect of Vesnarinone  
on a human salivary gland cancer cell line, TYS

Koh-ichi NAKASHIRO

Second Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Tokushima University  
School of Dentistry

**Abstract:** We have previously demonstrated an anti-proliferative effect of a new anti-cancer drug, Vesnarinone (3, 4 dihydro-6-[4-(3, 4-dimethoxybenzoyl)-1-piperazinyl]-2-(1H)-quinolinone) on several human tumor cell lines *in vitro* and *in vivo*. We undertook the present study to clarify the molecular mechanism of the anti-proliferative effect of Vesnarinone on a human salivary gland cancer cell line, TYS. We isolated ribosomal protein L21 cDNA by an anti-sense expression cloning method using an anti-sense oriented expression cDNA library constructed from Vesnarinone-treated TYS cells. Moreover, we screened the anti-sense cDNA library by a random sequencing method, and isolated TSC-22 cDNA as a Vesnarinone-inducible gene. TSC-22 was reported as a TGF- $\beta$ 1 inducible transcriptional regulator containing a leucine zipper-like structure in mice and rats. Nucleotide sequence of human TSC-22 revealed that predicted human TSC-22 protein had 98% identity for mouse and rat TSC-22 protein.

We constructed a prokaryotic expression vector encoding Glutathione-S-transferase-TSC-22 fusion protein. When we induced the

expression of the recombinant protein in the transformed *E. coli*, putative open reading frame of human TSC-22 cDNA in the fusion gene produced the stable recombinant protein.

The expression of TSC-22 mRNA was up-regulated within a few hour after treatment with Vesnarinone, and was continued for 3 days in TYS cells. The level of TSC-22 mRNA in TYS cells was continuously increased until the cells reached confluency. Vesnarinone also up-regulated TGF- $\beta$ 1 and p21WAF1 mRNA, and exogenous TGF- $\beta$ 1 enhanced the expression of TSC-22 and p21WAF1 mRNA in TYS cells. However, the induction of p21WAF1 mRNA by Vesnarinone was not inhibited by the treatment with cycloheximide, but the induction of TSC-22 mRNA was inhibited by cycloheximide. Thus, the induction of TSC-22 by Vesnarinone may be mediated by the production of other proteins, such as TGF- $\beta$ 1, but the induction of p21WAF1 may be a direct effect of Vesnarinone.

When we treated the cells with an anti-sense oligonucleotide against TSC-22 mRNA at a quiescent condition, the anti-sense oligonucleotide stimulated the growth of TYS cells, however, at a growing condition, the anti-sense oligonucleotide did not affect the cell growth. Furthermore, the anti-sense oligonucleotide suppressed the anti-proliferative effect of Vesnarinone.

These results suggest that TSC-22 may be a negative growth regulator, and may play an important role in the anti-proliferative effect of Vesnarinone on a human salivary gland cancer cell line.

## 緒 言

日本人における悪性腫瘍の発症数は年間約 40 万例であり、口腔外科を受診する口唇、口腔、咽頭および唾液腺癌はその約 1.5 % で 6000 例あると推計されている<sup>1)</sup>。そのほとんどが粘膜上皮由来の扁平上皮癌で、約 90 % を占めている。唾液腺癌は残る 10 % を占め、病理組織学的には腺様嚢胞癌、腺癌、扁平上皮癌、悪性多形性腺腫等、多彩な組織像を示す。唾液腺癌は増殖能は低いが、放射線治療、化学療法に抵抗性で、組織学的にも周囲組織への浸潤が強く、手術後局所再発、遠隔転移が極めて多いとされている。このように従来の治療法に抵抗性を示す腫瘍に対して、近年新しい治療法として、分化誘導療法が試みられている。一般に、腫瘍細胞は発生起源となった細胞が分化過程のある段階でブロックされた状態にあると考えられており、このブロックされた状態を分化誘導剤で解除して分化を進行させると、腫瘍細胞の悪性度の低下に伴った増殖の抑制、あるいは終末分化の誘導による悪性腫瘍の治癒を導くことが可能である。

現在、臨床において最も効果が認められている分化誘導療法は、急性前骨髄性白血病（以下 APL と略記する）に対する all-trans retinoic acid（以下 ATRA と略記する）による治療である。ATRA による APL の治療効果は、従来 of 化学療法をしのぎ、完

全寛解率 80 ~ 90 % という高値が得られている (2-4)。頭頸部領域の固形癌に対しても種々の分化誘導剤が試みられており、13-cis レチノイン酸が口腔扁平上皮癌および白板症の治療に有効であること、更に second primary tumor の発生を抑制したことが報告されている (5,6)。

我々は新規分化誘導剤ベスナリノンがある種の唾液腺癌に対して治療効果があることを報告している (7)。ベスナリノンは 2-(1H)-キノリノン を基本骨格とする誘導体で、ジギタリスにかわる慢性心不全の経口治療薬として開発されたが (8)、臨床試験中に重篤な副作用である無顆粒球症の発現が明らかとなった。その副作用に対する研究過程で、ベスナリノンは *in vitro* および *in vivo* において多くの腫瘍細胞に対して分化・アポトーシス誘導活性、細胞増殖抑制活性を有することが明らかとなった (9,10)。また、我々もベスナリノンが *in vitro* および *in vivo* においてヒト唾液腺癌細胞 (TYS) に対して増殖抑制作用を有することを確認している (10-12)。前述の如くベスナリノンは臨床試験において、ある種の悪性腫瘍に対して治療効果が認められているにもかかわらず、その作用機序は不明であり、ベスナリノンによる治療に対して抵抗性を示す腫瘍も多く存在する。同一臓器に発生した悪性腫瘍で、組織学的な表現形質が類似していても、

その遺伝子変異の蓄積は多様であり、各種治療に対する反応性も一様ではない。APL はほとんどの症例において t (15 ; 17) (q22 ; q21) の相互転座が認められ<sup>13)</sup>、その結果レチノイン酸レセプター  $\alpha$  (RAR $\alpha$ ) 遺伝子と PML 遺伝子のキメラ遺伝子が形成され、そのキメラ遺伝子産物が PML, RAR $\alpha$  の機能を阻害し、APL 細胞の分化を阻止していると推察されている<sup>14-16)</sup>。そのような相互転座が認められる APL には ATRA が著効するが、そうでない症例には全く効果が認められない。従って、ベスナリノンによる治療に際しても治療前に各腫瘍のベスナリノンに対する感受性、あるいは治療後の効果判定の診断法の開発が必要である。そのためにはベスナリノンの腫瘍細胞に対する分化・アポトーシス誘導活性、あるいは増殖抑制活性の分子機構を明らかにする必要がある。

本研究ではベスナリノンに対して感受性を有するヒト唾液腺癌細胞 (TYS) を用いて、ベスナリノンの細胞増殖抑制作用のメカニズムを分子レベルで明らかにすることを目的とした。すなわち、ベスナリノンで処理を行った TYS 細胞より抽出した mRNA より anti-sense expression cDNA library を構築し、1) anti-sense expression cloning 法、あるいは 2) random sequencing 法による candidate gene searching によりベスナリノン

の細胞増殖抑制シグナルを伝える分子のクローニングを試み、その発現誘導、機能解析を行った。

## 実験材料ならびに実験方法

### 1) 細胞及び培養法

実験には当研究室で分離、樹立された TYS 細胞を用いた。TYS 細胞は口底部に発生した高分化型扁平上皮癌より樹立されたが、腺系の腫瘍マーカーである癌胎児性抗原 (CEA) を発現しており、また酪酸ナトリウムで前処理した TYS 細胞をヌードマウス背部皮下に移植すると腺房細胞癌を形成することより、口腔粘膜小唾液腺由来の腺扁平上皮癌細胞であると考えられている<sup>17)</sup>。TYS 細胞の培養は、10% (容量/容量、以下 V/V と略記する) 牛胎児血清 (以下 FCS と略記する, Bio-Whittaker, Walkersville, MD)、100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ストレプトマイシン (Gibco, Gaithersburg, MD)、100 U/ml ペニシリン (Gibco)、0.25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  アンホテリシン B (Gibco) を含むダルベッコ改変イーグル培地 (以下 DMEM と略記する, Gibco) を増殖培養液として用い、空気中に 5% の割合で炭酸ガスを含む培養器内で、37  $^{\circ}\text{C}$  にて行った。

### 2) 細胞増殖能の評価法

ベスナリノンは大塚製薬株式会社 (東京) より供与された。ベスナリノンは疎水性物質であり、増殖培養液には難溶性であるため培養液への添加は以下の様にし

て行った。まず、ベスナリノンを経メチルスルホキシド（以下 DMSO と略記する，Sigma，St. Louis，MO）にて 10 mg/ml の濃度になるように溶解し、それをベスナリノンの最終濃度がそれぞれ 0.1，1，10，50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  になるように DMEM にて希釈した。この様にして調製したベスナリノンを含む増殖培養液は、4  $^{\circ}\text{C}$  にて少なくとも 1 ヶ月間は細胞増殖抑制活性の低下が認められなかった（データは示していない）。TYS 細胞の増殖に対するベスナリノンの影響を MTT 法を用いて評価した<sup>18</sup>）。すなわち、96 ウェルマイクロプレート（Falcon，Oxnard，CA）に  $2 \times 10^3$  個の TYS 細胞を植え込み、24 時間後各濃度のベスナリノンを含む増殖培養液に交換した。更に、2 日間あるいは 4 日間培養した後、最終濃度が 1 mg/ml になるように 3-(3, 4-dimethyl-thiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide（以下 MTT と略記する，Sigma）を加え、37  $^{\circ}\text{C}$  で 4 時間反応させた後、形成された MTT formazan を 100  $\mu\text{l}$  の DMSO で溶解し、OD 590 nm にて吸光度を測定することにより生細胞数を評価した。

### 3) 細胞周期の解析法

100 mm プラスチックペトリ皿（Falcon）にて

24, 48, 72 時間培養したベスナリノン処理 (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) および未処理 TYS 細胞を回収し、70 % (V/V) エタノール (和光純薬, 大阪) にて固定した。固定した細胞を遠心後、 $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$  を含まないダルベッコのリン酸緩衝液 [以下 D-PBS (-) と略記する] にて洗浄後、100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の RNase A (Sigma) で処理し、40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  のヨウ化プロピジウム (Sigma) で染色し、デジタル全自動細胞解析装置 (EPICS XL-MCL System II, Coulter, Miami, FL) にて細胞周期の解析を行った。

#### 4) RNA 調製法

TYS 細胞からの cytoplasmic RNA は Nonidet P-40 (以下 NP-40 と略記する, Sigma) を含む低張緩衝液を用いて抽出した<sup>19)</sup>。すなわち、0.5 % (V/V) NP-40 を含む 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) 緩衝液にて細胞膜のみを溶解し、遠心により核画分を除去した上清を回収した。その上清を最終濃度 0.5 % (重量/容量, 以下 W/V と略記する) のドデシル硫酸ナトリウム (以下 SDS と略記する, 和光純薬) で処理し、混在する蛋白質を変性後、フェノールとクロロホルムを加え蛋白の抽出除去を 2 回行った。得られた上清よりエタノール沈殿にて核酸を回収し、0.1 % (V/V) diethyl

pyrocarbonate (Sigma) 水溶液 (以下 DEPC 処理水と略記する) に溶解した。この方法により細胞質に存在する核酸すなわち、rRNA, tRNA, mRNA とごくわずかのミトコンドリア DNA が回収できる。次に、この TYS 細胞から抽出した cytoplasmic RNA よりポリ (A)<sup>+</sup> RNA をオリゴ (dT) セファロースカラムを用いて精製した。すなわち、オリゴ (dT) セファロース (Pharmacia, Uppsala, Sweden) を結合緩衝液 [10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.5 M NaCl (Sigma)] 中で膨潤させた後、0.8 × 4 cm ポリプレップカラム (Bio-Rad, Hercules, CA) に充填し、DEPC 処理水で洗浄後、結合緩衝液でカラムの平衡化を行った。70 °C で 4 分間処理し二次構造を取り除いた cytoplasmic RNA (1.0 mg) に最終濃度 0.5 M になるように NaCl を添加後、オリゴ (dT) セファロースカラムに通した。結合緩衝液でカラムを洗浄した後、DEPC 処理水でオリゴ (dT) に結合した RNA をカラムより溶出させ、エタノール沈殿後、再び DEPC 処理水に溶解した。

#### 5) Anti-sense oriented expression cDNA library の構築法

ベスナリノンで 3 日間処理した TYS 細胞より調製

したポリ (A)<sup>+</sup> RNA から anti-sense oriented expression cDNA library を構築した<sup>20)</sup>。すなわち、精製したポリ (A)<sup>+</sup> RNA 5 μg を鋳型にしてオリゴ (dT) - Xho I リンカープライマー (Stratagene, La Jolla, CA) を用いて逆転写酵素 M-MuLV RT (Moloney-Murine leukemia virus reverse transcriptase, Stratagene) で single strand cDNA を合成した後、RNase H (Stratagene) で RNA を部分分解し、合成した single strand cDNA を鋳型にして DNA ポリメラーゼ I (Stratagene) で second strand cDNA を合成した。合成した cDNA の両端に EcoR I アダプター (Stratagene) を T4 DNA リガーゼ (Stratagene) で連結し、その 5' 端を T4 ポリヌクレオチドキナーゼ (Stratagene) でリン酸化後、Xho I (Stratagene) で消化し、EcoR I (宝酒造, 大津), Sal I (宝酒造) で消化した λZAP Express phage vector (Stratagene) に T4 DNA リガーゼで連結した。cDNA はサイトメガロウイルスアーリープロモーター (以下 CMV プロモーターと略記する) に対してアンチセンス方向に挿入された。cDNA が挿入された λZAP Express phage の *in vitro* packaging を Gigapack II Gold

packaging extract (Stratagene) を用いて行  
い original phage library とした。更に、その  
phage library を大腸菌株 XL1-Blue MRF'  
(Stratagene) に感染させ、大腸菌内で複製され溶  
菌により放出された phage を回収し、1st.  
amplified phage library とした。次に、1st.  
amplified phage library と ExAssist  
helper phage (Stratagene) を共に  
XL1-Blue MRF' に感染させ、切り出された一本鎖  
の filamentous phage を回収した。回収した  
filamentous phage を大腸菌株 XL0LR  
(Stratagene) に感染させ培養増殖させた後、大腸  
菌内で二本鎖環状 DNA として複製された  
phagemid を塩化セシウム密度勾配遠心法により回  
収、精製し、phagemid library を得た。

#### 6) Polymerase chain reaction (以下 PCR と略記する) 法

PCR は dNTPs mixture (宝酒造) とプライマー  
は最終濃度がそれぞれ 200  $\mu$ M と 1  $\mu$ M となるよ  
うに、Taq DNA ポリメラーゼ (宝酒造) は最終濃度  
が 0.05 U/ $\mu$ l となるように PCR 反応液に加え、  
サーマルシークエンサー (TSR-300, 岩城硝子, 千  
葉) にて以下の条件で行った<sup>21)</sup>。94  $^{\circ}$ C, 3 分間の

熱変性後、94℃、60秒、55℃、90秒、72℃、150秒を30サイクル、最後に72℃、240秒にてDNA断片の増幅を行った。

#### 7) Expression cloning 法

100 mm 径プラスチックペトリ皿 (Falcon) に  $5 \times 10^5$  個の TYS 細胞を植え込み、10% (V/V) FCS を含む DMEM にて 24 時間培養後、20  $\mu$ g の anti-sense oriented expression cDNA library をエタノール沈殿後にリポフェクション法<sup>22)</sup> [30% (V/V) リポフェクション (Gibco)] あるいはポリブレン法<sup>23)</sup> [10  $\mu$ g/ml ポリブレン (Aldrich, Milwaukee, WI)] にてトランスフェクションを行った。トランスフェクション後 72 時間培養し、G418 (700  $\mu$ g/ml, Gibco) を含む選択培地に交換し、その培地に最終濃度が 50  $\mu$ g/ml になるようにベスナリノンを追加した。更に、14 日間培養した後に G418 およびベスナリノン存在下でもコロニーを形成した細胞を分離した。分離された細胞のベスナリノンに対する感受性の変化を MTT 法を用いて検索し、実際にベスナリノンに対する感受性が低下していた細胞からゲノム DNA を調製した。次に、発現ベクター (pBK-CMV, Stratagene) 上に存在する RNA ポリメラーゼプ

ロモーター (T3, T7) に一致するプライマーを用いて PCR を行うことにより、ゲノム DNA にランダムに挿入された cDNA 断片を増幅し、回収した。その回収された cDNA 断片を EcoR 1, Pst 1 (宝酒造) で消化し、Gene Clean Kit II (Bio 101, Vista, CA) にて精製した後、同じく EcoR 1, Pst 1 で消化した pBK-CMV に連結し、その組み換えプラスミドで大腸菌株 XL1-Blue MRF' を形質転換した。その形質転換した大腸菌株からアルカリ法<sup>24)</sup>により、プラスミドの少量調製を行った後、挿入された cDNA 断片の塩基配列の一部を決定した<sup>25)</sup>。すなわち、FITC で蛍光標識した T7 プライマーと Thermo Sequenase Cycle Sequencing Kit (Amersham, Buckinghamshire, UK) を用いてジデオキシ法により cDNA 断片の一部の塩基配列を決定した。アルカリ法により少量調製したプラスミドを鋳型とし、FITC ラベル T7 プライマー、dNTPs mixture およびそれぞれの ddNTP と DNA ポリメラーゼ (T7 サーマシーケナーゼ) 存在下に PCR を行い、その PCR 産物を 7 M 尿素 (Sigma) 変性 10 % (V/V) シークエンスゲルにて分析した。電気泳動と読み取りはオートシーケンサー (Shimadzu DSQ-500 DNA sequencer, 島津製作所, 京都)

にて行った結果、約 200 ~ 300 bp の塩基配列の決定が可能であった。次に、インターネットを介して NIH の GenBank あるいは EMBL データベースより BLAST プログラムを用い、決定された塩基配列のホモロジー検索を行った。

#### 8) ランダムシーケンシング法

anti-sense oriented expression cDNA library により形質転換された大腸菌 XL0LR 株のコロニーをランダムに選択し、50  $\mu$ g/ml のカナマイシン（和光純薬）を含む LB 培地（Sigma）中で約 6 時間増菌後、アルカリ法により phagemid を調製した。その調製された半分量の phagemid をサイクルシーケンシングの鋳型として使用し、挿入された cDNA 断片の塩基配列を一部決定し、ホモロジー検索を行った。なお、残り半分の phagemid はノーザンプロット用の cDNA プローブの調製に用いた。

#### 9) ノーザンプロット法

cytoplasmic RNA (20  $\mu$ g) を 2.2 M ホルムアルデヒド（和光純薬）変性 1% (W/V) アガロースゲル（Bio-Rad）で 40 mM MOPS（Sigma）緩衝液中で電気泳動後、3 M NaCl, 0.3 M citric acid（Sigma）水溶液（以下 20 ×

SSC と略記する) 中でナイロンフィルター (Hybond-N+, Amersham) に RNA をトランスファーし、80 °C、3 時間ベーキングを行い RNA をフィルターに固定した。続いて、50 % (V/V) formamide (Sigma), 5 × Denhardt's 液 [1 % (W/V) bovine serum albumin (和光純薬), 1 % (W/V) ficoll (Sigma), 1 % (W/V) polyvinylpyrrolidone (Sigma)], 5 × SSPE [0.75 M NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 2.5 mM EDTA (和光純薬)], 0.1 % (W/V) SDS, 100 µg/ml ssDNA (Worthington, Freehold, NJ) 中で42 °C、4 時間プレハイブリダイゼーションを行った後に、ランダムプライマー (Amersham) と DNA ポリメラーゼ I クレノウ断片 (Amersham) にて <sup>32</sup>P-dCTP (Amersham) ラベルした cDNA プローブを含むハイブリダイゼーション液で42 °C、12 時間 ~ 16 時間ハイブリダイゼーションを行った<sup>26)</sup>。0.1 × SSC、0.5 % (W/V) SDS で室温 15 分間 2 回、50 °C で 30 分間 1 回洗浄後、乾燥しサランラップで包み Kodak X-OMAT AR フィルム (Kodak, Rochester, NY) で 4 時間 ~ 5 日間の感光を行った。各クローンの cDNA プローブはランダムシーケンシングに使用した phagemid の残りを EcoR

1, Pst 1 で消化し、切り出された cDNA 断片を Gene Clean Kit II にて精製することにより得た。また、ヒト TGF- $\beta$ 1 は pHTGFB-2 (American Type Culture Collection, Rockville, MD) から Sma 1 (宝酒造) で切り出される 592 bp の断片を、ヒト  $\beta$ -actin は pHF $\beta$ A-1 (American Type Culture Collection) から Xho 1 (宝酒造) で切り出される 2.1 kb の断片を、cDNA プローブとして使用した。ヒト p21WAF1 cDNA プローブの調製は以下の様にして行った。すなわち、TYS 細胞から NP-40 法にて抽出した cytoplasmic RNA を鋳型として p21WAF1 に特異的なプライマー (上流: 5' - cggagctggg cgcggattcg - 3', 下流: 5' - ggaggaagtagctggcatga - 3') を用いて RT-PCR を行い、増幅した PCR 産物を Pst 1 で消化した後、同じく Pst 1 で消化しウシ小腸由来アルカリフォスファターゼ (以下 CIAP と略記する, Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) にて脱リン酸化処理を行った pUC 19 プラスミドベクター (宝酒造) へクローニングし、Pst 1 により切り出される 208 bp の断片を cDNA プローブとして使用した。デンストメトリック分析は NIH イメージ 1.44 プログラムあるいは

BAS-2000 II イメージ分析システム (富士フィルム, 東京) により行った。

#### 10) 完全長ヒト TSC-22 cDNA のクローニング法

ランダムシーケンスで得られたヒト TGF- $\beta$ 1 stimulated clone 22 (TSC-22) cDNA (pBK-CMV-hTSC-22-3') は 1313 bp で open reading frame (以下 ORF と略記する) を完全には含んでいなかった。そこで、phagemid library の中に完全長ヒト TSC-22 cDNA を含むクローンが存在すると考え、ORF の 3' 側に存在する Pst I site 下流に DP-1 プライマー (5'-agccagtctgcagctgggcctgaa-3') を設定し、ベクター (pBK-CMV) 上に存在する T7 プライマーとで PCR を行った。更に、DP-1 プライマーより 6 bp 上流に DP-2 プライマー (5'-tctgcagctgggcctgaaactgggc-3') を設定し、上流はマウス TSC-22 cDNA の配列をもとに mUP プライマー (5'-atctagtttgaaccaggctg-3') を設定して 1st. PCR 産物を鋳型にして nested PCR を行った。増幅した約 450 bp の PCR 産物を T4 DNA ポリメラーゼ (宝酒造) にて平滑末端にした後、

pUC 19 を Sma I にて切断し、CIAP にて 5' 端の脱リン酸化を行った部位にクローニングした (pUC 19-hTSC-22-5')。クローニングされた PCR 産物はシーケンシングにてヒト TSC-22 cDNA 5' 側であることを確認した。

pBK-CMV-hTSC-22-3' を Pst I で消化し、切り出されたヒト TSC-22 cDNA 3' 側 Pst I 断片を、Pst I で消化し CIAP にて脱リン酸化処理を行った pUC 19-hTSC-22-5' へ T4 DNA リガーゼ (宝酒造) で連結することによりほぼ完全長のヒト TSC-22 cDNA を得た。

1.1) GST-TSC-22 融合蛋白質の発現と精製法  
pGEX 4T-2 ベクター (Pharmacia) 上のグルタチオン-S-トランスフェラーゼ (以下 GST と略記する) 遺伝子の下流にフレームを合わせてヒト TSC-22 cDNA ORF を挿入した。すなわち、EcoR I リンカーを有する ORF 上流の FP22-UP プライマー (5'-gGAATTCccatgaaatcccaatggtg-3')、および Sal I リンカーを有する ORF 下流の FP22-DW プライマー (5'-gGTCGACctatgcggttggtcctg-3') を設定し、pUC 19-hTSC-22 cDNA を鋳型として

PCR を行った。増幅した PCR 産物を EcoR 1, Sal 1 にて消化し、同じく EcoR 1, Sal 1 で消化した pGEX 4T-2 に T4 DNA リガーゼで連結した後、その組み換えプラスミドで大腸菌 MC 1061 recA<sup>-</sup> 株を形質転換した。形質転換した大腸菌株を LB 培地中で一晚増菌後、最終濃度 0.1 mM となるように

isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (以下 IPTG と略記する, 宝酒造) を添加し、融合蛋白質の発現誘導を行った。大腸菌を IPTG 存在下で 5 時間培養した後、遠心集菌し、大腸菌溶解物を調製した。すなわち、溶菌緩衝液 [50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 100 mM NaCl, 1 mM EDTA] で大腸菌を再懸濁させ、プロテアーゼ阻害剤である

phenylmethanesulphonyl fluoride (PMSF, 0.2 mM, 和光純薬) とアプロチニン (100 U/ml, Bayer, Leverkusen, Germany) を添加後、リゾチーム (0.25 mg/ml, 和光純薬) を添加し、氷上で 20 分間処理し細胞壁を破壊した。更に、氷上にて超音波処理 (1 分間, 5 回) を行い、細胞を完全に破壊し遠心することにより得られた上清を径 0.25  $\mu$ m のミリポアフィルターにて濾過し、大腸菌溶解物とした。次に、大腸菌溶解物より GST-TSC-22 融合蛋白質を精製した。すなわち、大腸菌溶解物をグル

タチオンセファロース 4B カラム (Pharmacia) に  
通し、カラムを D-PBS(-) で洗浄した後に還元型グル  
ルタチオン (10 mM, Sigma) 溶液にてグルタチオ  
ンに結合した GST-TSC-22 融合蛋白質を溶出した。

12) Anti-sense phosphorothioate  
oligodeoxynucleotides (以下アンチセンス-S  
-オリゴと略記する) の TYS 細胞の増殖に及ぼす影  
響の検索法

まず、アンチセンス-S-オリゴの TYS 細胞の対数増  
殖期における影響を検索した<sup>27)</sup>。約  $2 \times 10^3$  個  
の TYS 細胞を 96 ウェルマイクロプレートに植え込  
み、10% (V/V) FCS を含む DMEM にて 24 時  
間培養後、ヒト TSC-22 mRNA に対するアンチセ  
ンス-S-オリゴ

(5'-tg g g a t t t C A T g c a a t t g c a - 3')、センス-S-オ  
リゴ (5'-t g c a a t t g c A T G a a a t c c c c a - 3') を最終濃  
度 10  $\mu$ M になるように添加した 10% (V/V)  
FCS を含む DMEM に交換した。更にベスナリノン  
を添加する場合は最終濃度が 50  $\mu$ g/ml となるよう  
に添加した。2 日間培養後に S-オリゴを含む培養液  
を交換し、更に 2 日間培養した後、MTT 法にて細胞  
数を評価した。

次に、アンチセンス-S-オリゴの TYS 細胞の増殖静

止期における影響を検索した。約  $1 \times 10^4$  個の TYS 細胞を 96 ウェルマイクロプレートに植え込み、10% (V/V) FCS を含む DMEM にて 24 時間培養後、FCS を含まない DMEM に交換した。更に 24 時間培養し細胞がほぼコンフルエントになった段階で、ヒト TSC-22 mRNA に対するアンチセンス-S-オリゴ (5'-tgggatttCATgcaattgca-3')、センス-S-オリゴ (5'-tgcaattgcaATGaaatccca-3') を最終濃度 10  $\mu$ M 含む無血清 DMEM に交換した。更にベスナリノンを追加する場合は最終濃度が 50  $\mu$ g/ml となるように追加した。2 日間培養後に S-オリゴを含む培養液を交換し、更に 2 日間培養した後、MTT 法にて細胞数を評価した。

## 結 果

1) TYS 細胞の増殖に及ぼすベスナリノンの影響  
50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度のベスナリノンは処理後 4 日で著明に TYS 細胞の増殖を抑制したが、0.1 ~ 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度のベスナリノンではほとんど効果が認められなかった (図 1)。位相差顕微鏡下の観察により、50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  のベスナリノンで処理した TYS 細胞はやや膨化した状態で細胞増殖を止めるものの、培養 1 ~ 2 週間では浮遊してくる細胞はほとんど認められなかったことから、ベスナリノンの TYS 細胞に対する増殖抑制作用は cytocidal なものではなく、cytostatic なものであると考えられた。また、ベスナリノンの溶媒として用いた DMSO にも TYS 細胞に対する増殖抑制効果が若干認められたが、ベスナリノンによる増殖抑制効果よりは、はるかに低く、その影響は無視できるものであった。更に、100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度のベスナリノン添加増殖培養液は 4  $^{\circ}\text{C}$  で長期保存中あるいは 37  $^{\circ}\text{C}$  で培養中にもベスナリノンの結晶が析出してくるため、以後の実験は細胞増殖抑制作用を示しかつ、結晶化してこない最大の濃度である 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  のベスナリノン濃度にて行った。

2) ベスナリノンの TYS 細胞の細胞周期に及ぼす影響

未処理 TYS 細胞では増殖培養液交換後、24 時間目では盛んな DNA 合成が認められ、約 50 % の細胞が S 期、G2/M 期に存在していた。培養液交換後 48 時間、72 時間目では徐々に G0/G1 期の細胞の割合が増加し、S 期および G2/M 期の細胞の割合が低下してきた。これは血清中の増殖因子の消費あるいは接触阻止による細胞増殖の抑制の結果と考えられる。一方、ベスナリノン処理 TYS 細胞は未処理 TYS 細胞と比較すると、処理後 24 時間目で明らかに S 期、G2/M 期の細胞の割合が低下しており、48 時間後以降においては G1 arrest が認められた (図 2, 表 1)。

### 3) ベスナリノン処理 TYS 細胞からの anti-sense oriented expression cDNA library の構築

50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  のベスナリノンで 72 時間処理した TYS 細胞より精製した mRNA より、anti-sense oriented expression cDNA library を構築した。original  $\lambda$ ZAP Express phage library は約  $1.5 \times 10^5$  個のクローンを含んでおり、その約 90 % は組み換え体であった。original phage library を一回増幅し、*in vivo* excision を行い phagemid library を得た。phagemid

library を構成する pBK-CMV phagemid vector は哺乳類動物細胞において強い転写活性を示す CMV プロモーターを有しており、ベスナリノン処理 TYS 細胞より得られた cDNA 断片は CMV プロモーター下流にアンチセンス方向に挿入されている (図 3)。構築した library の各クローンに含まれる cDNA 断片の長さは 0.5 ~ 2.5 kb であった (データは示していない)。

4) Anti-sense expression cloning  
anti-sense oriented expression cDNA library を TYS 細胞にトランスフェクションし、G418 およびベスナリノン存在下でもコロニーを形成したトランスフェクタント (Vesnarinone resistant clone, 以下 VRC と略記する) を 8 クローン分離した。分離した全てのクローンのベスナリノンに対する感受性の変化を MTT 法にて検索した結果、VRC 4 と VRC 7 は明らかにベスナリノンに対する感受性が低下していた (図 4)。VRC 4 は親株 TYS 細胞に比較してその増殖能が極端に低下していたためトランスフェクションの影響、あるいは clonal heterogeneity での増殖能の変化と、それに伴う相対的なベスナリノン抵抗性の上昇の可能性が高いため、それ以上の解析は行わなかった。一方、

VRC 7 は親株 TYS 細胞と比較してその増殖能はほとんど変化しておらず、かつベスナリノンに対する抵抗性も再現性を有していたため、VRC 7 に導入された cDNA 断片を回収した。回収した cDNA 断片の一部の塩基配列を決定し、ホモロジー検索を行った結果、human ribosomal protein L21 であった。erythroleukemia 細胞 (K562) での分化・アポトーシス誘導あるいは myoblasts から myotubes への分化誘導での ribosomal protein の down-regulation の報告はあるが (28, 29)、我々のシステムにおいて単一の ribosomal protein の特異的な発現抑制のみが TYS 細胞におけるベスナリノン抵抗性の直接原因であるとは考え難かった。本研究では VRC 7 において実際に ribosomal protein L21 mRNA およびそのタンパク質の発現低下が見られるか否かの検索はしていないが、VRC 7 のベスナリノンに対する抵抗性は ribosomal protein L21 の発現抑制によるある種の蛋白質合成阻害の結果であると考えられた。

#### 5) Candidate gene searching

ベスナリノン処理 TYS 細胞より構築した anti-sense oriented expression cDNA library からランダムに選択した 107 クローンに

ついて挿入された cDNA 断片の塩基配列を決定し、ホモロジー検索を行った。その結果、約 64 % が既知の遺伝子で、約 18 % がデータベースに登録はされているが機能が未知の遺伝子、残る約 18 % が全く未知の遺伝子であった。その中で、既知の遺伝子の約 30 % が以下の様な細胞の増殖、分化あるいはアポトーシスに関与していると推測される遺伝子であった (TSC-22, HSC 70, CK 19, SOS, NGFR-related lymphocyte activation molecule, IL-6, TAFIIA, elongation factor-1 $\gamma$ , IL-1/TNF inducible EST, DNA-binding protein A, annexin II, DNA-dependent protein kinase catalytic subunit, rab-GDI, SUI 1 translation initiation factor, lysosomal protective protein, TNF- $\alpha$  inducible protein B12, ADP-ribosylation factor, phospholipase A2, and 13 kDa differentiation-associated protein)。次に、上記遺伝子の TYS 細胞におけるベスナリノン処理による発現誘導の有無をノーザンプロットにて検索した。ほとんどの遺伝子は経時的な変化は認めるものの、ベスナリノンによる明らかな発現誘導は認められなかった (データは示していない)。しかし、これらの遺伝

子の中で TSC-22 遺伝子は TYS 細胞において培養日数、すなわち細胞密度に比例してその発現増加が認められ、かつベスナリノンは著明にその発現を増強した (図 5, A, B)。

#### 6) 完全長ヒト TSC-22 cDNA のクローニングと全塩基配列決定

TSC-22 遺伝子は TGF- $\beta$ 1 および FSH により誘導される遺伝子として既にマウス、ラットでクローニングされており、ロイシンジッパー構造を有していると推測されている (30, 31)。ランダムシーケンシングで得た ヒト TSC-22 cDNA 断片 (1313 bp) は、完全な ORF を含んでいなかったため、library の中よりヒト TSC-22 cDNA 5' 側断片をクローニングし、既にクローニングされている 3' 側断片と連結することにより、ほぼ完全長のヒト TSC-22 cDNA をクローニングし、全塩基配列を決定した (図 6, A, B)。ヒト TSC-22 cDNA は 1600 bp より成り、432 bp の ORF を含んでいた。cDNA の全塩基配列はマウス、ラットと 79 % の相同性を有しており、ORF 内は 92 % の相同性を有していた。更に、予測されるヒト TSC-22 蛋白質のアミノ酸配列はマウス、ラットと 98 % の相同性を有していた。ヒト TSC-22 蛋白質は 144 残基

より成り、マウス、ラットと比較するとコドン 42 にセリンが挿入され、コドン 141 のセリンがプロリンに置換されていた。また、コドン 77 のロイシンからコドン 98 のロイシンまでの 7 残基ごとのロイシンの繰り返し配列、すなわちロイシンジッパー構造と推測される配列は保存されていた。更に、カゼインキナーゼ II によりリン酸化を受けると推測されるコドン 89 のセリンと、プロテインキナーゼ C によりリン酸化を受けると推測されるコドン 36 のセリンも保存されていた (図 6, B, C)。

#### 7) GST-TSC-22 融合蛋白質の発現と精製

ヒト TSC-22 cDNA 核酸配列より推測される

ORF が安定な蛋白質を発現し得るのか検索するため、あるいは今後の TSC-22 蛋白質の機能解析のために、大腸菌による組み換え TSC-22 蛋白質の発現と精製を行った。すなわち、pGEX 4T-2 vector 上の GST 遺伝子下流にフレームを合わせてヒト TSC-22 cDNA ORF を挿入し、大腸菌にて GST-TSC-22 融合蛋白質を発現させた (図 7, A)。IPTG で融合蛋白質の発現を誘導すると、分子量 44 kDa のところに GST-TSC-22 融合蛋白質と推測されるバンドが出現した (図 7, B)。GST の分子量が 26 kDa であることを考慮すると、TSC-22 の分子量は 18

kDa となり、ORF より推定される分子量と一致した。更に、GST がグルタチオンに結合する特性を利用し、グルタチオンアフィニティーカラムを用いて GST-TSC-22 融合蛋白質の精製を行った。その結果、銀染色と同程度の感度を有するサイプロオレンジ染色 (Bio-Rad) にて、分子量 44 kDa の GST-TSC-22 融合蛋白質がほぼ単一バンドとして認められるまで精製できた (図 7, C)。

8) ベスナリノン処理 TYS 細胞における TSC-22, TGF- $\beta$ 1, p21WAF1 の発現誘導

TSC-22 遺伝子はマウスにおいて TGF- $\beta$ 1 で発現誘導を受ける遺伝子としてクローニングされたこと (30)、更に p53 変異細胞では p53 非依存的に TGF- $\beta$ 1 が cyclin dependent kinase inhibitor p21WAF1 の発現を誘導し、G1 arrest を誘導すると報告されていることより (32)、TYS 細胞における TSC-22 の上流、下流のシグナルを検索する意味でベスナリノン処理による TGF- $\beta$ 1, p21WAF1 の発現を検索した。その結果、p21WAF1 はベスナリノンにより著明な発現誘導が認められ (処理後 1 日目 162%, 2 日目 179%, 3 日目 190%, 4 日目 298%)、TGF- $\beta$ 1 においても僅かな発現誘導が認められた (処理後 1 日目

116 % , 2 日目 101 % , 3 日目 109 % , 4 日目 121 % ) ( 図 8 , A , B ) 。

TSC-22 遺伝子は TGF- $\beta$ 1 処理後、immediate early gene である Jun や Fos と同じように約 2 時間で発現誘導を受け、TGF- $\beta$ 1 ばかりか他の増殖因子などにも反応して発現誘導されると報告されている<sup>30)</sup>。一方、p21WAF は wild type の p53 保有細胞では p53 遺伝子の誘導にひきつづいて p53 蛋白質により、その発現が誘導されると報告されているが<sup>33)</sup>、p53 変異細胞においては TGF- $\beta$ 1 あるいは EGF-STAT のシグナルを受けて直接誘導されると報告されている<sup>34, 35)</sup>。また、ある種のレチノイド、ビタミン D 誘導体も直接 p21WAF1 の転写調節をしているとされている<sup>36, 37)</sup>。そこで、ベスナリノンによる p21WAF1 と TSC-22 の発現がいかなる様式で誘導され、またその関連性があるか否か検索するために、まずベスナリノン、TGF- $\beta$ 1 処理後短時間での TSC-22, p21WAF1 の発現を検索した。ベスナリノンによる p21WAF1 の発現誘導は極めて短時間で著明に認められたが、TSC-22 の発現誘導は短時間で僅かに認められるものの処理後、24 時間で著明となった。一方、TGF- $\beta$ 1 による TSC-22, p21WAF1 の発現誘導は双方とも比較的早期より認められた ( 図 9 , A , B ) 。

次に、TYS 細胞におけるベスナリノンによる TSC-22, p21WAF1 の発現誘導に他の蛋白質の合成が必要であるか検索するために、シクロヘキシミド (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , Sigma) 存在下でのベスナリノン処理による TSC-22, p21WAF1 の発現誘導の変化を検索した。ベスナリノンによる TSC-22 の発現誘導は処理時間 2, 4, 6 時間でごく軽度認められたが、その発現誘導はシクロヘキシミドにより阻害された。一方、p21WAF1 の発現誘導は 2, 4, 6 時間で著明に認められ、その発現誘導はシクロヘキシミドにより阻害されなかった (図 10, A, B)。すなわち、ベスナリノンによる TSC-22 の発現誘導は、間に蛋白質の合成を必要とする間接作用が主体であり、p21WAF1 の発現誘導は直接作用が主体であることが示唆された。

9) TSC-22 アンチセンス-S-オリゴのTYS細胞の増殖に及ぼす影響

ヒト TSC-22 遺伝子に対するアンチセンス-S-オリゴはTYS細胞の増殖に対して、対数増殖期には全く影響を与えなかった(データーは示していない)。しかし、接触阻止が起こる細胞密度においては細胞増殖促進作用が認められた(図 11)。このことは細胞密度の低い条件では、TYS細胞においてTSC-22の発現

が低いこと、細胞密度が上がり増殖を止める時期になると TSC-22 の発現が高くなることとよく一致する。更に、ヒト TSC-22 遺伝子に対するアンチセンス-S-オリゴは、細胞密度が高い条件においてベスナリノンの TYS 細胞に対する増殖抑制作用を阻害した (図 11)。

## 考 察

本研究において、新規抗癌剤ベスナリノンにて誘導される遺伝子としてヒト TSC-22 遺伝子をクローニングした。TSC-22 遺伝子はロイシンジッパー構造を有する転写制御因子をコードしていると推測される。TSC-22 は既にマウス、ラットにおいて、それぞれ TGF- $\beta$ 1 あるいは FSH により誘導される遺伝子として報告されていたが(30, 31)、我々がヒト TSC-22 cDNA をクローニングした時点ではヒトのホモログの報告はなかった。マウスとラットの TSC-22 cDNA は 95% の相同性があり、その配列より予想されるアミノ酸配列は 100% 一致すると報告されている。またヒト TSC-22 cDNA は全体としてはマウス、ラットと 79% の相同性を有する程度であるが、ORF 内は 92% の相同性があり、予想されるアミノ酸配列はマウス、ラットと 98% の相同性を有しており、1 個のアミノ酸残基の挿入と 1 個のアミノ酸残基の置換が認められるのみであった。さらに最近報告されたニワトリの TSC-22 もマウス、ラット、ヒトと極めて高い相同性を有している。このようなアミノ酸配列の種を超えた高い相同性は、TSC-22 蛋白質が細胞の分化・増殖、アポトーシスのような生物活性の調節において重要な役割を果たしている可能性を示唆している。過去の報告において明確な TSC-22

蛋白質の発現あるいはその局在を示した報告はないが、Shibanumaらはマウスの細胞において細胞質、あるいは核にTSC-22蛋白質の存在を示唆する結果を報告している<sup>30)</sup>。また最近、我々も組み換えヒトTSC-22蛋白質に対する抗血清を作製し、その抗血清を用いたウェスタンブロットにてTYS細胞において約18 kDaの蛋白質の発現を確認している(データは示していない)。ヒトTSC-22 cDNA中のORFにコードされる蛋白質の予想される分子量は約18 kDaであることよりTSC-22遺伝子は実際にヒト細胞中で転写、翻訳され、我々が予想した構造の蛋白質を産生し機能発現していると考えられる。

TYS細胞におけるTSC-22 mRNAレベルは培養日数と高い相関性が認められた。すなわち、TSC-22 mRNAレベルはTYS細胞の対数増殖期においては低かったが、増殖を止める時期すなわち培養皿中でコンフルエントに達すると著明に上昇した(図5)。4日間の培養期間中に一度も増殖培養液を交換していないことより、培養液中の各種増殖因子の消費も一部影響していると考えられるが、TSC-22 mRNAの発現は細胞数の増加とほぼ平行して上昇していることより、そのmRNAレベルは細胞密度に相関していると考えられる。さらにベスナリノンでは低細胞密度でもTYS細胞においてTSC-22 mRNAの発現を誘導し細胞

周期を G1 期で止めることにより、その増殖能を抑制した。また TSC-22 mRNA に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドは TYS 細胞の増殖に対し、対数増殖期には何ら影響を与えないが、コンフルエントに達した後の TYS 細胞の増殖を促進させ、ベスナリノンの増殖抑制作用を阻害した。このことは内在性の TSC-22 mRNA の発現が対数増殖期には低く、細胞密度が上がると上昇することとよく一致した。このように TSC-22 は唾液腺癌細胞の増殖を抑制的に制御しており、TYS 細胞におけるベスナリノンの増殖抑制作用に重要な役割を演じている可能性が示唆された。

TSC-22 mRNA の発現はベスナリノン処理により数時間でわずかに誘導され、24 時間後で明らかに上昇し、その発現は少なくとも 3 日間は持続した。一方、TYS 細胞を TGF- $\beta$ 1 で処理すると、TSC-22 mRNA の発現は処理後直ちに誘導された。

Shibanuma らや Hamil らはマウス、ラットの細胞においては TGF- $\beta$ 1 あるいは FSH 処理により、TSC-22 mRNA の発現は核内オンコジーンであり転写因子をコードし、immediate early gene として知られている c-Jun や c-Fos のように直ちに誘導され、その発現誘導は一過性のものであったと報告している(30, 31)。しかし、我々の系においては TYS 細胞におけるベスナリノン処理による TSC-22

mRNA の発現誘導はベスナリノンによる直接作用ではなく、間にある種の蛋白質の合成（例えば TGF- $\beta$ 1）を必要とする間接作用が主体であるという結果が得られた。したがってベスナリノンによる TSC-22 の発現誘導は、まずベスナリノンが TSC-22 遺伝子を誘導しうる因子、例えば TGF- $\beta$ 1 などの遺伝子発現を誘導し、それら蛋白質が合成、活性化された後に TSC-22 遺伝子を誘導すると考えられる。したがって、TSC-22 は immediate early gene として報告されているにもかかわらず、ベスナリノンによっては処理後すぐに誘導されなかったのであろう。またベスナリノンと TSC-22 遺伝子の間に入る因子の発現誘導が持続的であるために（例えば TGF- $\beta$ 1）、TSC-22 の誘導も持続的に、少なくとも3日間は続いたものと考えられる。

最近、我々は TYS 細胞は癌抑制遺伝子 p53 がコドン 281 でアスパラギン酸からヒスチジンに変異していること、ベスナリノンあるいは TGF- $\beta$ 1 処理により p21WAF1 の mRNA および蛋白質の発現誘導が認められることを報告している<sup>38</sup>）。p21WAF1 は cyclin dependent kinase inhibitor として知られており、主に cdk 2 / cyclin E, A 複合体の活性を抑制し細胞周期を G1 期に止め、細胞分化、

アポトーシス誘導に関与していると報告されている (32, 36, 37, 39)。そこで、ベスナリノンによる TYS 細胞における p21WAF1 の発現誘導に TSC-22 の関与があるか否かを検索するために、TSC-22 アンチセンス-S-オリゴあるいは蛋白合成阻害剤シクロヘキシミドの影響を検索した。TSC-22 アンチセンス-S-オリゴ (データは示していない)、シクロヘキシミド (図 11) 共にベスナリノンによる p21WAF1 mRNA の発現誘導を阻害しなかった。したがって、ベスナリノンの細胞増殖抑制機構において TSC-22 は少なくとも p21WAF1 の上流には位置していないことが示唆された。

Shibanuma らや Hamil らがマウス、ラット TSC-22 蛋白質について報告しているように (30, 31)、ヒト TSC-22 蛋白質においてもロイシンジッパー構造の N 末側に塩基性の DNA 結合領域の存在は認められなかった。また明らかな核移行シグナルも認められなかった。一般に、bZIP (basic region-leucine zipper) 転写因子はロイシンジッパーを介してホモダイマーあるいはヘテロダイマーを形成し、ロイシンジッパーの N 末側にある塩基性の DNA 結合領域で DNA に結合し転写活性を発揮するとされている (40-42)。したがって、TSC-22 蛋白質は bZIP 転写因子へ結合するが DNA 結合能が欠如

しているため、結合した bZIP の転写活性を阻害する CHOP<sup>43)</sup> のような dominant negative 転写制御因子であると考えられた。CHOP は C/EBP ファミリーに属し、C/EBP 転写因子の dominant negative inhibitor として作用すると報告されている<sup>43, 44)</sup>。また、CHOP は増殖抑制あるいは DNA ダメージを引き起こす薬剤により誘導される遺伝子 GADD (Growth Arrest and DNA Damage)<sup>153</sup> としても知られている<sup>45, 46)</sup>。最近 は CHOP 遺伝子は染色体上 12q13 に位置しており<sup>46)</sup>、粘液様脂肪肉腫において染色体相互転座 t(12; 16)(q13; p11) が高頻度に認められると報告されている<sup>47-49)</sup>。この染色体相互転座によって産生されるキメラ蛋白質 (TLS-CHOP) は、本来 CHOP が有している細胞増殖抑制作用を発揮することはできないため脂肪細胞の異常増殖が起こると考えられている<sup>44)</sup>。更に、細胞の増殖、分化を制御する dominant negative 転写制御因子として Id ファミリー (Id1, Id2, Id3, Id4) が知られている<sup>50)</sup>。Id は HLH (Helix-Loop-Helix) を有しているが、塩基性の DNA 結合領域は存在せず、bHLH (basic region-helix loop helix) 転写因子 (MyoD, E2A, E12, E47 等) に HLH を介して結合し、その転写活性を阻害する<sup>50, 51)</sup>。

Id ファミリーは筋細胞、神経細胞、造血細胞を含む様々な細胞において増殖、分化を制御していることが報告されている(52-55)。以上のような報告と TSC-22 の予想される構造あるいは発現様式から考えると、TSC-22 も CHOP<sup>\*</sup> や Id ファミリーと同様の dominant negative 転写制御因子としての機能を持っている可能性が有り、現在その機能解析と同時にターゲット蛋白質の検索を行っている。また口腔扁平上皮癌あるいは唾液腺癌における TSC-22 遺伝子の染色体レベルでの異常、あるいは DNA レベルでのポイントミューテーションを検索し扁平上皮癌、唾液腺癌における発癌過程での TSC-22 遺伝子の関与についても検索している。

ベスナリノンが強心剤として一般臨床において使用されていた時に無顆粒球症を発症したことはよく知られており、また最近 Jay らは血球系の細胞には TSC-22 の発現が見られないと報告している(56)。これらの報告と我々のデータを合わせて考えると、ベスナリノンは顆粒球の前駆細胞あるいは顆粒球そのものに作用し TSC-22 の発現を誘導し、分化・アポトーシス誘導、増殖抑制をおこし無顆粒球症を発症した可能性が考えられる。また最近、我々はいくつかの唾液腺腫瘍は正常唾液腺に比較して著しく TSC-22 mRNA の発現が低下していることを明らかにした

(データは示していない)。そこでベスナリノンによる治療前に各腫瘍組織における TSC-22 の発現を mRNA レベルあるいは蛋白質レベルで明らかにし、ベスナリノンによる治療への反応性の予測、あるいは治療中、治療後の TSC-22 の発現の変動を検索することにより、ベスナリノンによる治療効果の判定が可能ではないかと考え、現在検索を進めている。

## 結 語

1) ヒト唾液腺癌細胞 (TYS) においてベスナリノンにより発現誘導される遺伝子として、ヒト TSC-22 cDNA (1600 bp) をクローニングし全塩基配列を決定した。

2) TSC-22 遺伝子は細胞密度に依存して発現が増加し、ベスナリノンはその発現を更に増強した。

3) ベスナリノンは TYS 細胞において TGF- $\beta$ 1, p21WAF1 遺伝子の発現を誘導した。

4) TGF- $\beta$ 1 は TYS 細胞において TSC-22, p21WAF1 遺伝子の発現を誘導した。

5) TYS 細胞におけるベスナリノンによる TSC-22 遺伝子の誘導は、間に蛋白質の合成を必要とする間接作用が主体であるが、p21WAF1 遺伝子の誘導は直接作用が主体であった。

6) ヒト TSC-22 遺伝子に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドは TYS 細胞の増殖に対し対数増殖期には全く影響を与えないが、接触阻止がおこる細胞密度になると細胞増殖促進作用が認められた。また、アンチセンスオリゴヌクレオチドはベスナリノンの TYS 細胞に対する増殖抑制作用を阻害した。

以上の結果より、ベスナリノンはヒト唾液腺癌細胞 (TYS) において TGF- $\beta$ 1 あるいは他の蛋白質を介した TSC-22 遺伝子の誘導、更に直接作用あるいは

TGF- $\beta$ 1 を介した p21WAF1 遺伝子の誘導により細胞周期を G1 期に止め細胞増殖抑制作用を示すことが示唆された。

#### 謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究に対し終始御指導を賜った口腔外科学第二講座佐藤光信教授、本研究の実施に際し御指導を戴いた口腔外科学第二講座川又均博士に心から謝意を表します。また、御校閲を戴いた口腔病理学講座林良夫教授、口腔生化学講座井上秀夫教授ならびに研究の円滑な発展のために特別の御配慮を戴いた口腔外科学第二講座の教室員の方々に深謝致します。

文 献

- 1) 垣添忠生, 清水 博, 北井暁子, 渡辺 昌, 椎名正樹, 中島正夫, 大河原 明, 小畑美知夫 : がんの統計 1995 年版, 第 1 版. 東京, 財団法人がん研究振興財団, 1995, 40-41
- 2) Huang M, Ye Y, Chen S, Chai J, Lu J-X, Zhoa L, Gu L, and Wang Z : Use of all-trans retinoic acid in the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Blood* 72 (2), 567-572 (1988)
- 3) Castaigne S, Chomienne C, Daniel M T, Ballerini P, Berger R, Fenaux P, and Degos L : All-trans retinoic acid as a differentiation therapy for acute promyelocytic leukemia. I. clinical results. *Blood* 76 (9), 1704-1709 (1990)
- 4) Warrell R P, Frankel S R, Miller W H, Scheinberg D A, Itri L M, Hittelman W N, Vyas R, Andreeff M, Tafuri A, Jakubowski A, Gabrilove J, Gordon M S, and Dmitrovsky E : Differentiation therapy of acute promyelocytic leukemia with tretinoin (all-trans-retinoic acid). *N Engl J Med* 324 (20), 1385-1393

(1991)

5) Hong W K, Endicott J, Itri L M, Doos W, Batsakis J G, Bell R, Fofonoff S, Byers R, Atkinson E N, Vaughan C, Toth B B, Kramer A, Dimery I W, Skipper P, and Strong S :

13-cis-retinoic acid in the treatment of oral leukoplakia. N Engl J Med 315

(24), 1501-1505 (1986)

6) Hong W K, Lippman S M, Itri L M, Karp D D, Lee J S, Byers R M, Schantz S P, Kramer A M, Lotan R, Peters L J, Dimery I W, Brown B W, and Goepfert H : Prevention of second primary tumors with isotretinoin in squamous-cell carcinoma of the head and neck. N Engl J Med 323 (12), 795-801 (1990)

7) Sato M, Harada K, Bando T, Iga H, Kawamata H, Azuma M, Yura Y, and Yoshida H : Induction of differentiation and apoptosis and Le<sup>Y</sup> antigen expression by Vesnarinone in salivary gland cancer. Proc Am Assoc Cancer Res 36, 637 (1995)

- 8) Asanoi H, Sasayama S, Iuchi K, and Kameyama T : Acute hemodynamic effects of a new inotropic agent (OPC-8212) in patients with congestive heart failure. J Am Coll Cardio 9 (4), 865-871 (1987)
- 9) Nakai S, Kawai K, Aihara K, Fujita F, Fujita M, Sakamoto Y, and Adachi M : Vesnarinone (3, 4-dihydro-6-[4-(3, 4-dimethoxybenzoyl)-1-piperazinyl]-2-(1H)-quinolinone) as an antitumor agent with differentiation or apoptosis inducing activity in human cancer xenografts in nude mice. Proc Am Assoc Cancer Res 35, 404 (1994)
- 10) Sato M, Harada K, Bando T, Okamoto M, Azuma M, Yura Y, Yoshida H, Nakai S, Kawai K, Aihara K, and Adachi M : Antitumor effect of 3, 4-dihydro-6-[4-(3, 4-dimethoxybenzoyl)-1-piperazinyl]-2-(1H)-quinolinone (Vesnarinone). Proc Am Assoc Cancer Res 35, 397 (1994)
- 11) Sato M, Harada K, and Yoshida H : Induction of Differentiation and

apoptosis, and LeY antigen expression by treatment with 3, 4-dihydro-6-[4-(3, 4-dimethoxybenzoyl)-1-piperazinyl]-2-(1H)-quinolinone (Vesnarinone) in a salivary cancer cell line. Acta Histochem Cytochem 27 (6), 591-599 (1994)

12) Sato M, Harada K, Bando T, Shirakami T, Nakashiro K, Yoshida H, Nakai S, Kawai K, and Adachi M : Characteristics of antitumor activity of 3, 4-dihydro-6-[4-(3, 4-dimethoxybenzoyl)-1-piperazinyl]-2-(1H)-quinolinone (Vesnarinone) against a human adenoid squamous carcinoma-forming cell line grown in athymic nude mice. Cancer Lett 91 (1), 1-9 (1995)

13) Larson R A, Kondo K, Vardiman J W, Butler A E, Golomb H M, and Rowley J D : Evidence for a 15;17 translocation in every patient with acute promyelocytic leukemia. Am J Med 76 (5), 827-841 (1984)

14) de The H, Chomienne C, Lanotte M, Degos L, and Dejean A : The t(15;17) translocation of acute promyelocytic leukemia fuses the retinoic acid receptor  $\alpha$  gene to a novel transcribed locus. Nature 347 (6293), 558-561 (1990)

15) Kaizuka A, Miller W H, Umesono K, Warrell R P, Frankel S R, Murty V V V S, Dmitrovsky E, and Evans R M : Chromosomal translocation t(15;17) in human acute promyelocytic leukemia fuses RAR $\alpha$  with a novel putative transcription factor, PML. Cell 66 (4), 663-674 (1991)

16) de The H, Lavau C, Marchio A, Chomienne C, Degos L, and Dejean A : The PML-RAR $\alpha$  fusion mRNA generated by the t(15;17) translocation in acute promyelocytic leukemia encodes a functionally altered RAR. Cell 66 (4), 675-684 (1991)

17) Yanagawa T, Hayashi Y, Yoshida H, Yura Y, Nagamine S, Bando T and Sato M

: An adenoid squamous carcinoma-forming cell line established from an oral keratinizing squamous cell carcinoma expressing carcinoembryonic antigen. Am J Pathol 124 (3), 496-509 (1986)

18) Carmichael J, DeGraff W G, Gazdar A F, Minna J D and Mitchell J B : Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay : Assessment of chemosensitivity testing. Cancer Res 47 (4), 936-942 (1987)

19) Berger S L, and Birkenmeier C S : Inhibition of intractable nucleases with ribonucleoside-vanadyl complexes : Isolation of messenger ribonucleic acid from resting lymphocytes. Biochemistry 18 (23), 5143-5149 (1979)

20) Gubler U, and Hoffman B J : A simple and very efficient method for generating cDNA libraries. Gene 25 (2-3), 263-269 (1983)

21) Scharf S J, Horn G T, and Erlich H A : Direct cloning and sequence analysis

of enzymatically amplified genomic sequences. Science 233 (4768), 1076-1078 (1986)

22) Lu L, Zeitlin P L, Guggino W B, and Craig R W : Gene transfer by lipofection in rabbit and human secretory epithelial cells. Pflugers Arch 415 (2), 198-203 (1989)

23) Rhim J S, Park J B, and Jay G : Neoplastic transformation of human keratinocytes by polybrene-induced DNA-mediated transfer of an activated oncogene. Oncogene 4 (11), 1403-1409 (1989)

24) Birnboim H C, and Doly J : A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res 7 (6), 1513-1523 (1979)

25) Sanger F, Nicklen S, and Coulson A R : DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci USA 74 (12), 5463-5467 (1977)

26) Alwine J C, Kemp D J, and Stark G

R : Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzylloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. Proc Natl Acad Sci USA 74 (12), 5350-5354 (1977)

27) Wagner R W : Gene inhibition using antisense oligodeoxynucleotides. Nature 372 (6504), 333-335 (1994)

28) Lin C-H, Palma J F, and Solomon W B : Phorbol ester induction of differentiation and apoptosis in the K562 cell line is accompanied by marked decreases in the stability of globin mRNAs and decreases in the steady state level of mRNAs encoding for ribosomal proteins L35, L31, L27, and L21. Cell Mol Biol Res 40 (1), 13-26 (1994)

29) Jacobs F A, Bird R C, Sells B H : Differentiation of rat myoblasts. Regulation of turnover of ribosomal protein and their mRNAs. Eur J Biochem 150 (2), 255-263 (1985)

30) Shibanuma M, Kuroki T, and Nose K

: Isolation of a gene encoding a putative leucine zipper structure that is induced by transforming growth factor  $\beta$ 1 and other growth factors. J Biol Chem 267 (15), 10219-10224 (1992)

31) Hamil K G, and Hall S H : Cloning of rat sertoli cell follicle-stimulating hormone primary response complementary deoxyribonucleic acid: Regulation of TSC-22 gene expression. Endocrinology 134 (3), 1205-1212 (1994)

32) Akagi M, Yasui W, Akama Y, Yokozaki H, Tahara H, Haruma K, Kajiyama G, and Tahara E : Inhibition of cell growth by transforming growth factor  $\beta$ 1 is associated with p53-independent induction of p21 in gastric carcinoma cells. Jpn J Cancer Res 87 (4), 377-384 (1996)

33) El-Deiry W S, Tokino T, Velculescu V E, Levy D B, Parsons R, Trent J M, Lin D, Mercer W E, Kinzler K W, and Vogelstein B : WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. Cell

75 (4), 817-825 (1993)

34) Datto M B, Li Y, Panus J F, Howe D J, Xiong Y, and Wang X-F :

Transforming growth factor  $\beta$  induces the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 through a p53-independent

mechanism. Proc Natl Acad Sci USA 92 (12), 5545-5549 (1995)

35) Chin Y E, Kitagawa M, Su W-C S, You Z-H, Iwamoto Y, and Fu X-Y : Cell growth arrest and induction of

cyclin-dependent kinase inhibitor

p21 WAF1/CIP1 mediated by STAT 1.

Science 272 (5262), 719-722 (1996)

36) Jiang H, Lin J, Su Z Z, Collart F R, Huberman E, and Fisher P B :

Induction of differentiation in human

promyelocytic HL-60 leukemia cells

activates p21, WAF1/CIP1, expression in

the absence of p53. Oncogene 9 (11),

3397-3406 (1994)

37) Liu M, Lee M-H, Cohen M,

Bommakanti M, and Freedman L P :

Transcriptional activation of the cdk

inhibitor p21 by vitamin D-3 leads to the induced differentiation of the myelomonocytic cell line U937. *Genes & Dev* 10 (2), 142-153 (1996)

38) Sato M, Kawamata H, Harada K, Nakashiro K, Ikeda Y, Gohda H, Yoshida H, Nishida T, Ono K, Kinoshita M, and Adachi M : Induction of cyclin-dependent kinase inhibitor, p21 WAF1, by treatment with 3, 4-dihydro-6-[4-(3, 4-dimethoxybenzoyl)-1-piperazinyl]-2-(1H)-quinolinone (Vesnarinone) in a human salivary cancer cell line with mutant p53 gene. *Cancer Lett* (in press)

39) Dulic V, Kaufmann W K, Wilson S J, Tlsty T D, Lees E, Harper J W, Elledge S J, and Reed S I : p53-dependent inhibition of cyclin-dependent kinase activities in human fibroblasts during radiation-induced G1 arrest. *Cell* 76 (6), 1013-1023 (1994)

40) Landschulz W H, Johnson P F,

McKnight S L : The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. Science 240 (4860), 1759-1764 (1988)

41) Chiu R, Boyle W J, Meek J, Smeal T, Hunter T, and Karin M : The c-Fos protein interacts with c-Jun/AP-1 to stimulate transcription of AP-1 responsive genes. Cell 54 (4), 541-552 (1988)

42) Curran T, and Franza B R J : Fos and Jun: the AP-1 connection. Cell 55 (3), 395-397

43) Ron D, and Habener J F : CHOP, a novel developmentally regulated nuclear protein that dimerizes with transcription factors C/EBP and LAP and functions as a dominant-negative inhibitor of gene transcription. Genes & Dev .6 (3), 439-453 (1992)

44) Barone M V, Crozat A, Tabae A, Philipson L, and Ron D : CHOP (GADD153) and its oncogenic variant, TLS-CHOP, have opposing effects on the

- induction of G1/S arrest. *Genes & Dev* 8 (4), 453-464 (1994)
- 45) Fornace A J, Nebert D W, Hollander M C, Luethy J D, Papathanasiou M, Fargnoli J, and Holbrook N J : Mammalian genes coordinately regulated by growth arrest signals and DNA-damaging agents. *Mol Cell Biol* 9 (10), 4196-4203 (1989)
- 46) Park J S, Luethy J D, Wang M G, Fargnoli J, Fornace A J, McBride O W, and Holbrook N J : Isolation, characterization and chromosomal localization of the human GADD153 gene. *Gene* 116 (2), 259-267 (1992)
- 47) Aman P, Ron D, Mandahl N, Fioretos T, Heim S, Arheden K, Willen H, Rydholm A, and Mitelman F : Rearrangement of the transcription factor gene CHOP in myxoid liposarcomas with t(12;16)(q13;p11). *Genes Chromosomes Cancer* 5 (4), 278-285 (1992)
- 48) Crozat A, Aman P, Mandahl N, and

Ron D : Fusion of CHOP to a novel RNA-binding protein in human myxoid liposarcoma. Nature 363 (6430), 640-644 (1993)

49) Rabbitts T H, Forster A, Larson R, and Nathan P : Fusion of the dominant negative transcription regulator CHOP with a novel gene FUS by translocation t (12;16) in malignant liposarcoma. Nat Genet 4 (2), 175-180 (1993)

50) Benezra R, Davis R L, Lockshon D, Turner D L, and Weintraub H : The protein Id: a negative regulator of helix-loop-helix DNA binding proteins. Cell 61 (1), 49-59 (1990)

51) Riechmann V, Cruchten I, and Sablitzky F : The expression pattern of Id4, a novel dominant negative helix-loop-helix protein, is distinct from Id1, Id2 and Id3. Nucleic Acids Research 22 (5), 749-755 (1994)

52) Kurabayashi M, Jeyaseelan R, and Keddes L : Doxorubicin represses the function of the myogenic

helix-loop-helix transcription factor  
MyoD. J Biol Chem 269 (8), 6031-6039  
(1994)

53) Nagata Y, and Tadokoro K :  
Activation of helix-loop-helix proteins  
Id1, Id2 and Id3 during neural  
differentiation. Biochem Biophys Res  
Commun 199 (3), 1355-1362 (1994)

54) Sun X-H : Constitutive expression  
of the Id1 gene impairs mouse B cell  
development. Cell 79 (5), 893-900  
(1994)

55) Barone M V, Pepperkok R, Peverali  
F A, and Philipson L : Id proteins  
control growth induction in mammalian  
cells. Proc Natl Acad Sci USA 91 (11),  
4985-4988 (1994)

56) Jay P, Ji J W, Marsollier C,  
Taviaux S, Berge-Lefranc J L, and Berta  
P : Cloning of the human homologue of  
the TGF $\beta$ -stimulated clone 22 gene.  
Biochem Biophys Res Commun 222 (3),  
821-826 (1996)

## 図の説明

(図1) TYS細胞の増殖に及ぼすベスナリノンの影響

生細胞数は MTT 法にて評価し、各点は 6 検体の平均値と標準偏差値を示している。†; 培養増殖液中のベスナリノン濃度 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )、\*; 未処理 TYS 細胞とベスナリノン  $50 \mu\text{g}/\text{ml}$  処理 TYS 細胞との間で有意差 ( $p < 0.01$ ) を認めたと (One way ANOVA)。

(図2) TYS細胞の細胞周期に及ぼすベスナリノンの影響

TYS細胞を 24 時間、48 時間、72 時間ベスナリノン ( $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) で処理した後、ヨウ化プロピジウム染色を行い相対的 DNA 量と細胞数をフローサイトメトリーにて測定した。

(図3) Anti-sense oriented expression cDNA library を構成する pBK-CMV phagemid vector

(図4) トランスフェクタントのベスナリノンに対する感受性の変化の検索

構築した anti-sense oriented expression cDNA library を TYS 細胞にトランスフェクシヨ

ンし、分離したトランスフェクタント (VRC) 8 クロンのベスナリノン (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) に対する感受性を MTT 法にて評価した。

(図 5) ベスナリノン処理による TYS 細胞における TSC-22 遺伝子の発現誘導

A : ベスナリノン (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 処理 TYS 細胞および未処理 TYS 細胞より cytoplasmic RNA を抽出し、 $^{32}\text{P}$  でラベルしたヒト TSC-22、ヒト  $\beta$ -actin cDNA プロブを用いてノーザンブロットを行った。

B : ノーザンブロットの結果をデンスitomーターにて測定し、未処理 Day 1 の TSC-22 mRNA 濃度の  $\beta$ -actin mRNA 濃度に対する比を 100 % とし、TSC-22 の mRNA の発現を表示した。

(図 6) 完全長ヒト TSC-22 cDNA のクローニング

A : 完全長ヒト TSC-22 cDNA のクローニング方法と PCR に用いたプライマーの位置。

B : 完全長ヒト TSC-22 cDNA の全塩基配列  
袋文字はロイシンジッパー構造を構成していると推測されているロイシンを、太文字はマウス、ラットと異なるアミノ酸を、斜体文字はプロテインキナーゼによ

りリン酸化を受けると推測されているセリンを、下線はポリAシグナルを示している。

C : ヒト TSC-22 のアミノ酸配列とラット、マウス、ニワトリとの比較。

(図7) GST-TSC 22 融合蛋白質の発現と精製

A : 大腸菌にて融合蛋白質を発現させるために用いたベクター (pGEX-4T-2) へのヒト TSC-22 cDNA ORF の組み換え。

B : IPTG (1 mM) 処理による融合蛋白質の発現誘導 (12.5 % ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動を行い、CBB 染色にて観察)。

C : グルタチオンアフィニティカラムによる融合蛋白質の精製 (12.5 % ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動を行い、サイプロオレンジ染色にて観察)。

(図8) ベスナリノン処理による TYS 細胞における p21WAF1, TGF- $\beta$ 1 の発現誘導

A : ベスナリノン (50  $\mu$ g/ml) 処理 TYS 細胞および未処理 TYS 細胞より cytoplasmic RNA を抽出し、 $^{32}$ P でラベルしたヒト p21WAF1、ヒト TGF- $\beta$ 1、ヒト  $\beta$ -actin cDNA プローブを用いてノーザンプロットを行った。

B : ノーザンプロットの結果をデンシトメーターに

て測定し、未処理 Day 1 の p21WAF1 あるいは TGF- $\beta$ 1 mRNA 濃度の  $\beta$ -actin mRNA 濃度に対する比を 100% として p21WAF1、TGF- $\beta$ 1 の mRNA の発現を表示した。

(図 9) ベスナリノン、TGF- $\beta$ 1 処理による TYS 細胞における短時間での p21WAF1、TSC-22 の発現誘導

A : ベスナリノン (50  $\mu$ g/ml) あるいは TGF- $\beta$ 1 (1 ng/ml) 処理 TYS 細胞および未処理 TYS 細胞より cytoplasmic RNA を抽出し、<sup>32</sup>P でラベルしたヒト p21WAF1、ヒト TSC-22、ヒト  $\beta$ -actin cDNA プローブを用いてノーザンブロットを行った。

B : ノーザンブロットの結果をデンシトメーターにて測定し、ベスナリノン処理 1 時間目の p21WAF1 あるいは TSC-22 mRNA 濃度の  $\beta$ -actin mRNA 濃度に対する比を 100% として p21WAF1、TSC-22 の mRNA の発現を表示した。

(図 10) ベスナリノン処理による TYS 細胞における TSC-22、p21WAF1 の発現誘導に及ぼすシクロヘキシミドの影響

A : シクロヘキシミド (10  $\mu$ g/ml) 存在下あるい

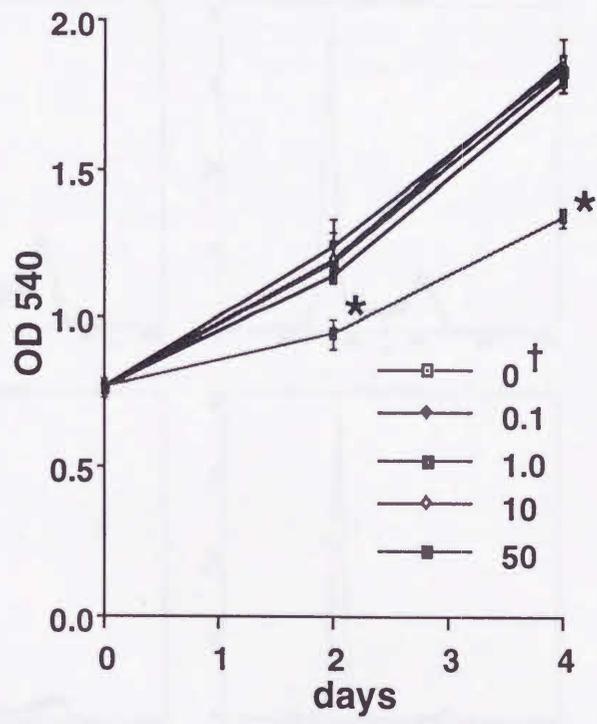
は非存在下でのベスナリノン (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 処理  
TYS 細胞および未処理 TYS 細胞より  
cytoplasmic RNA を抽出し、 $^{32}\text{P}$  でラベルした  
ヒト TSC-22、ヒト p21WAF1、ヒト  $\beta$ -actin  
cDNA プローブを用いてノーザンブロットを行った。

B: ノーザンブロットの結果をデンスitomーターにて  
測定し、未処理 0 時間の TSC-22 あるいは  
p21WAF1 mRNA 濃度の  $\beta$ -actin mRNA 濃度  
に対する比を 100% として TSC-22、p21WAF1  
の mRNA の発現を表示した。

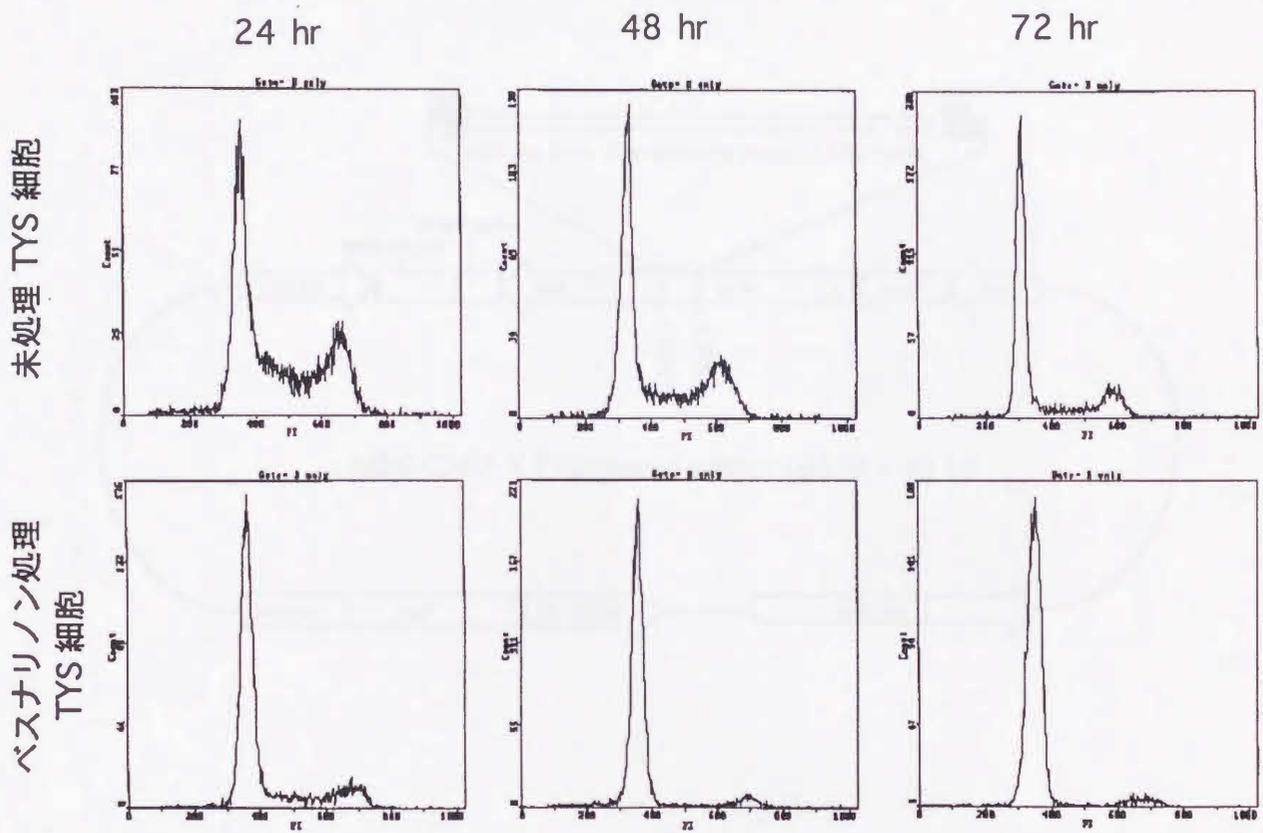
(図 1 1) TSC-22 アンチセンスオリゴの TYS 細胞  
の増殖に及ぼす影響

TYS 細胞がコンフルエントに達した後、無血清培養  
液中に TSC-22 アンチセンスオリゴあるいはセンス  
オリゴ (10  $\mu\text{M}$ ) を添加し、ベスナリノン (50  
 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 存在下あるいは非存在下にて 4 日間培養し、  
生細胞数を MTT 法にて評価した。

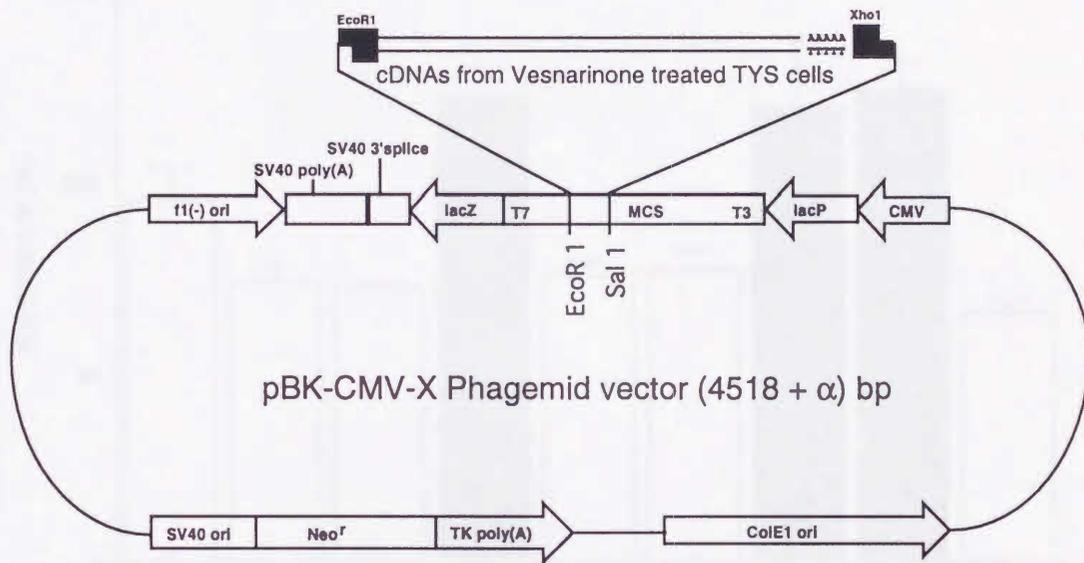
(图 1)



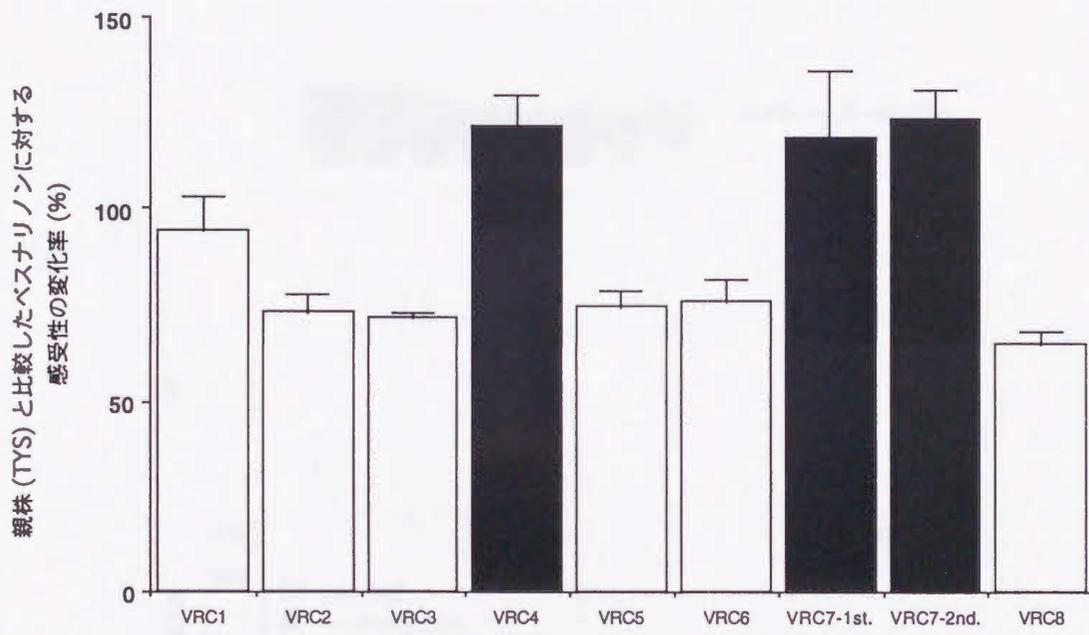
(図 2)



(图 3)

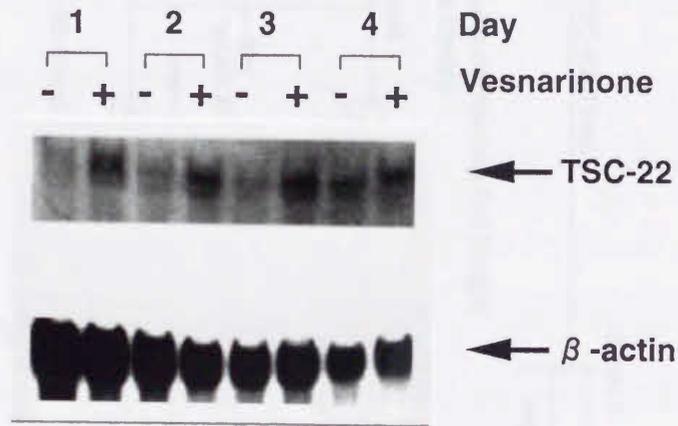


(図 4)

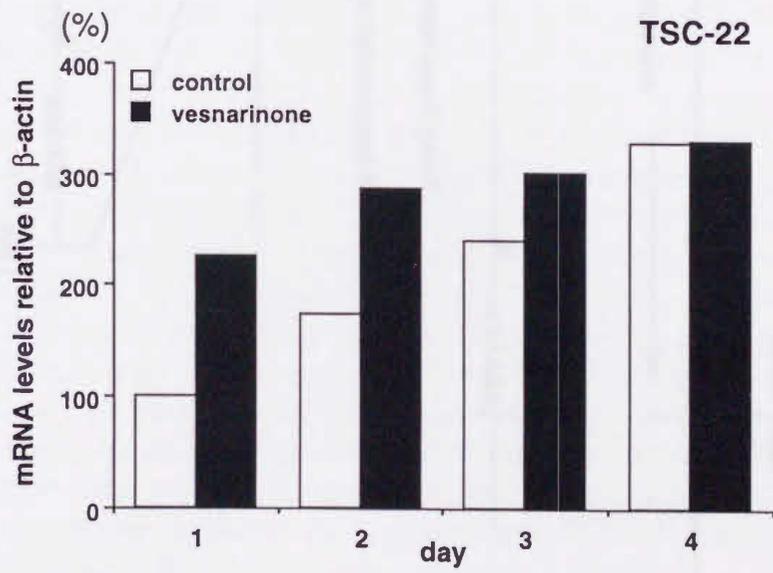


(图 5)

A

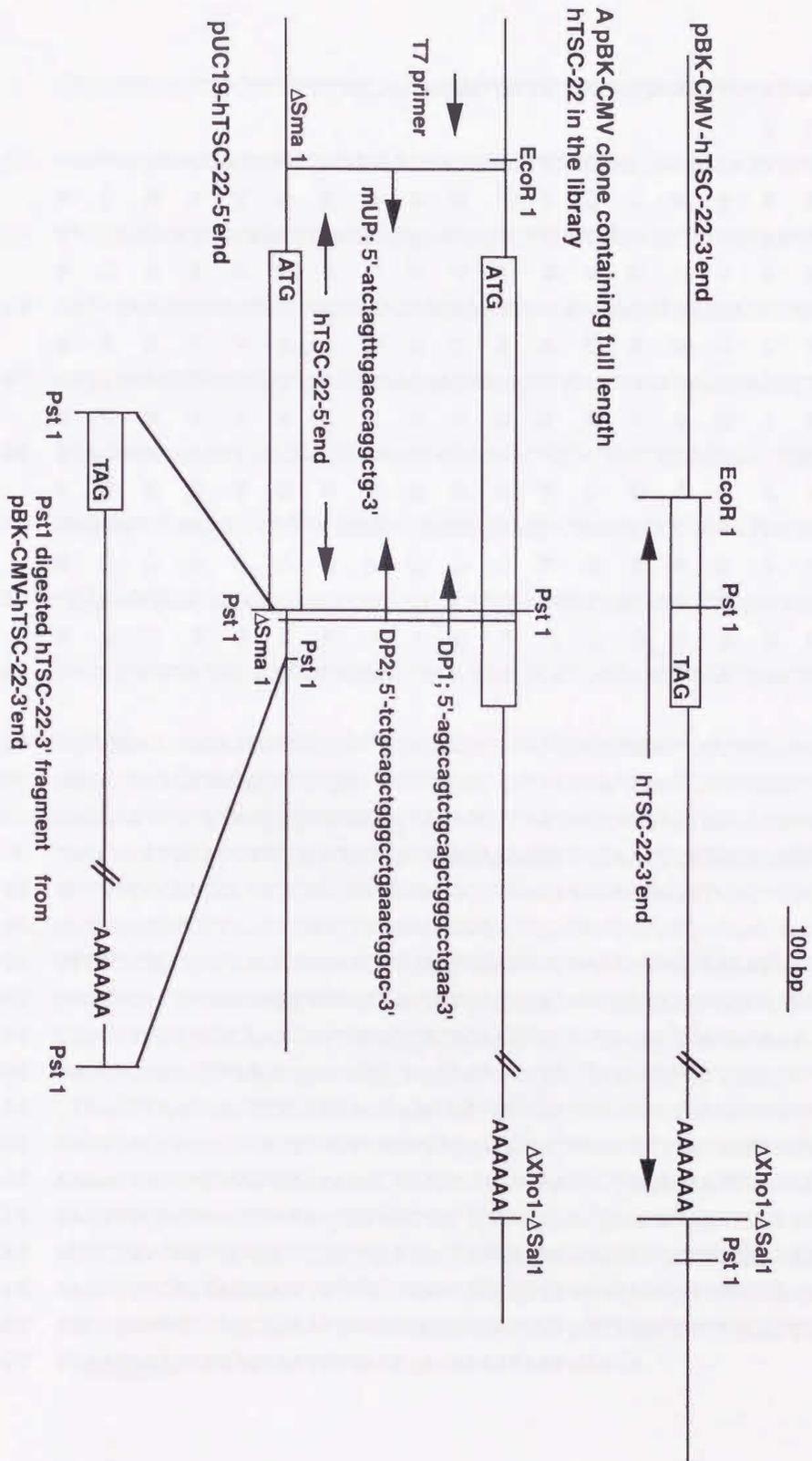


B



( 6 A)

A



A PBK-CMV clone containing full length HTSC-22 in the library

PUC19-htSC-22-5'end

Pst 1 TAG Pst 1 digested HTSC-22-3' fragment from PBK-CMV-htSC-22-3'end Pst 1 AAAAAA Pst 1

(图 6 B)

B

1 CTGGTGTTCCTCTTTTTTTTCCACGAGGGTGTTTTTTGGCTGCAATTGCATGAAATCCCAA  
M K S Q  
60 TGGTGTAGACCAGTGGCGATGGATCTAGGAGTTTACCAACTGAGACATTTTTCAATTTCT  
W C R P V A M D L G V Y Q L R H F S I S  
120 TTCTTGTCATCCTTGCTGGGGACTGAAAACGCTTCTGTGAGACTTGATAATAGCTCCTCT  
F L S S L L G T E N A S V R L D N S S S  
180 GGTGCAAGTGTGGTAGCTATTGACAACAAAATCGAGCAAGCTATGGATCTAGTAAAAGC  
G A S V V A I D N K I E Q A M D L V K S  
240 CATTGATGTATGCGGTCAGAGAAGAAGTGGAGGTCCCAAAGAGCAAATCAAAGAACTA  
H L M Y A V R E E V E V L K E Q I K E L  
300 ATAGAGAAAAATTCACAGCTGGAGCAGGAGAACAATCTGCTGAAGACACTGGCCAGTCTT  
I E K N S Q L E Q E N N L L K T L A S P  
360 GAGCAGCTTGCCCAGTTTCAGGCCAGCTGCAGACTGGCTCCCCCCTGCCACCACCAG  
E Q L A Q F Q A Q L Q T G S P P A T T Q  
420 CCACAGGGCACCACACAGCCCCCGCCAGCCAGCATCGCAGGGCTCAGGACCAACCGCA  
P Q G T T Q P P A Q P A S Q G S G P T A  
480 TAGCTGCCATGCCCCCGCAGAATGGCTGCTGCGTGTGAACGAACAGACGGAGAAGAT  
\*  
540 GTGCTAGGGAGAATCTGCCCTCCACAGTCAACCATTTTCATTGCTCGCTGCGAAAGAGACGT  
600 GAGACTGACATATGCCATATCTCTTTTTCCAGTATTAACACTCATATGCTTATGGCTTG  
660 GAGAAATTTCTTAGTTGGGTGAATTAAGGTTAATCCGAGAATTAGCATGGATATACCGG  
720 GACCTCATGCAGCTTGGCAGATATCTGAGAAATGGTTTAATTCATGCTCAGGAGCTGTGT  
780 GCCTTTCCATCCCTTCCGGCTCCCACCCCTCAC'TCCAAGGGTTCTCTCTCCTGCTTGC  
840 GCTTAGTGTCTACATGGGGTTGTGAAGCGATGGAGCTCCTCACTGGACTCGCCTCTCTC  
900 CTCTCCTCCCCCAGGAGGAAC'TGAAAGGAGGGTAAAAAGACTAAAATGAGGGGGAACA  
960 GAGTTCACGTGACAAAATTTGACAAC'TGCACCAAATTCATAAAAAACAATAGTACTGTG  
1020 CCTCTTTCTTCTCAAACAATGGATGACACAAAAC'TATGAGAGTGACAAAATGGTGACAGG  
1080 TAGCTGGGACCTAGGCTATCTTACCATGAAGGTTGTTTTGCTTATTGTATATTTGTGTAT  
1140 GTAGTGTAAC'TATTTTGTACAATAGAGGACTGTAAC'TACTATTTAGGTTGTACAGATTGA  
1200 AATTTAGTTGTTTCATTGGCTGTCTGAGGAGGTGTGGACTTTTATATATAGATCTACATA  
1260 AAAACTGCTACATGACAAAAACCACACCTAAAGAAATTTTAAGAATTTGGCACAGTACT  
1320 CACTTTGTGTAATCTGAAATCTAGCTGCTGAATACGCTGAAGTAAATCCTTGTTCACTGA  
1380 AGTCTTTCAATTGAGCTGGTTGAATACTTTGAAAAATGCTCAGTTCTAACTAATGAAATG  
1440 GATTTCCAGTAGGGGTTTCTGCATATCACCTGTATAGTAGTTATATGCATATGTTTCTG  
1500 TGCATGTTCTCTACACAATTGTAAGGTGTCACTGTATTTAACTGTTGCACTTGCAACTT  
1560 TCAATAAAGCATATAAATGTTAAAAA

(图 6 C)

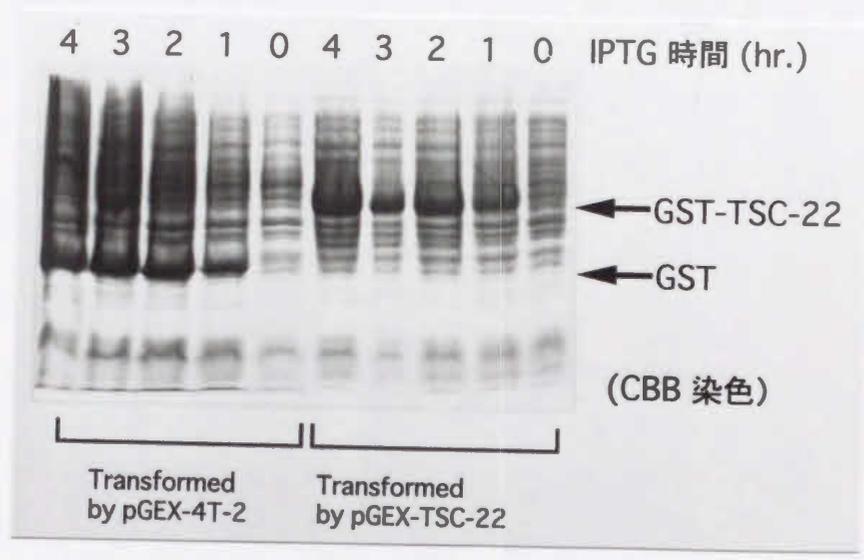
C

human	1	MKSQWCRPVAMDLGVYQLRHFSISFLSLLGTENASV
rat	1	MKSQWCRPVAMDLGVYQLRHFSISFLSLLGTENASV
mouse	1	MKSQWCRPVAMDLGVYQLRHFSISFLSLLGTENASV
chicken	1	MNAQCCRPAAMDLGVYHLRHSSISFPSSLLGTDSSSL
human	38	RLDNSSSGASVVAIDNKIEQAMD LVKSHLMYAVREEV
rat	38	RLDN-SSGASVVAIDNKIEQAMD LVKSHLMYAVREEV
mouse	38	RLDN-SSGASVVAIDNKIEQAMD LVKSHLMYAVREEV
chicken	38	RLDSSSSGVSVVAIENMIEQAMD LVKSHLMYAVREEV
human	75	EV LKEQIKE LIEKNSQ LEQENNL LKTLASPEQLAQFQ
rat	74	EV LKEQIKE LIEKNSQ LEQENNL LKTLASPEQLAQFQ
mouse	74	EV LKEQIKE LIEKNSQ LEQENNL LKTLASPEQLAQFQ
chicken	75	EV LKEQIKE LIEKNSQ LEQENTL LKTLASPEQLAQFQ
human	112	AQLQTGSPATTQPQGTTQPPAQPASQGS GP TA
rat	111	AQLQTGSPATTQPQGTTQPPAQPASQGS G ST A
mouse	111	AQLQTGSPATTQPQGTTQPPAQPASQGS G ST A
chicken	112	AQLQTGSPSSGQAQGT AQQPAQPASQGS G P SA



(図 7 B, C)

B

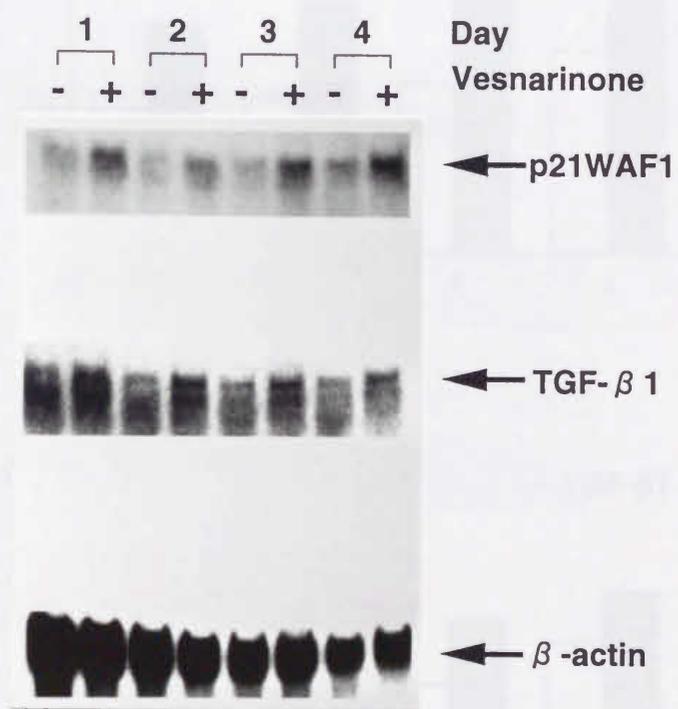


C



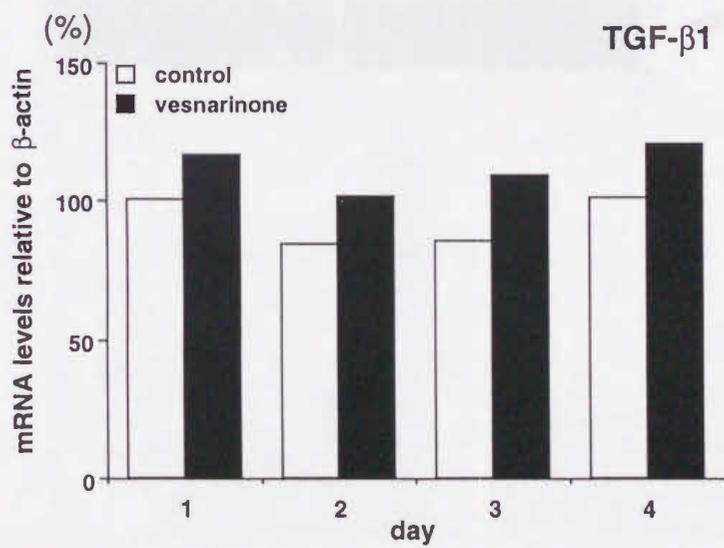
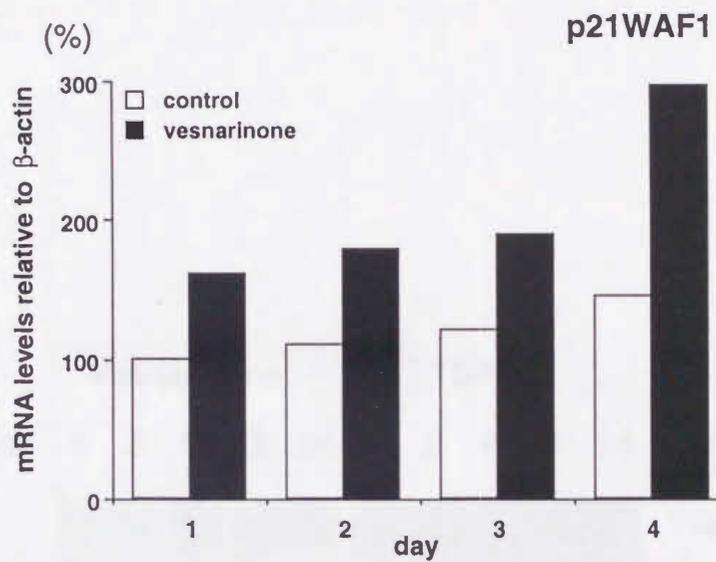
(图 8 A)

A



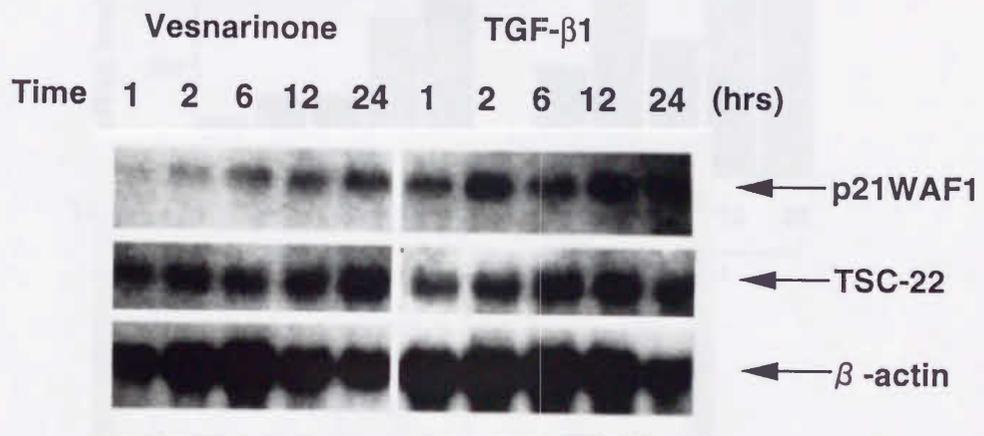
(图 8 B)

B



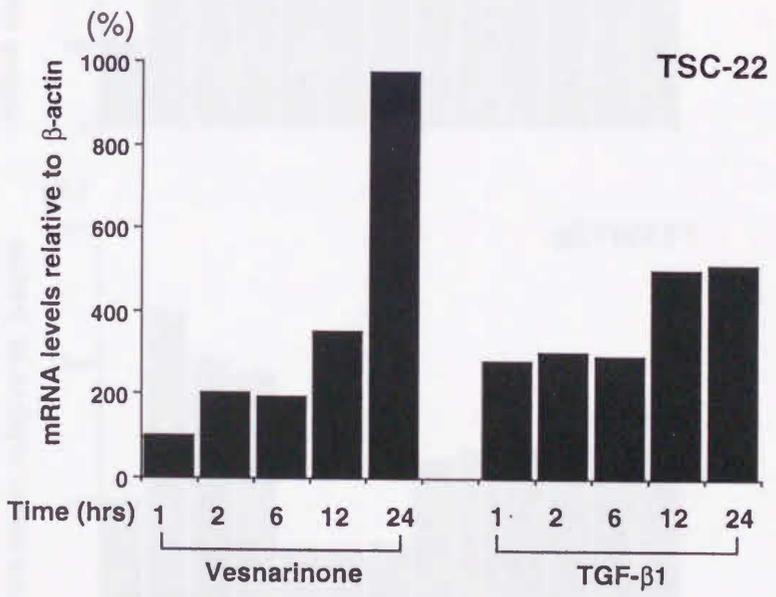
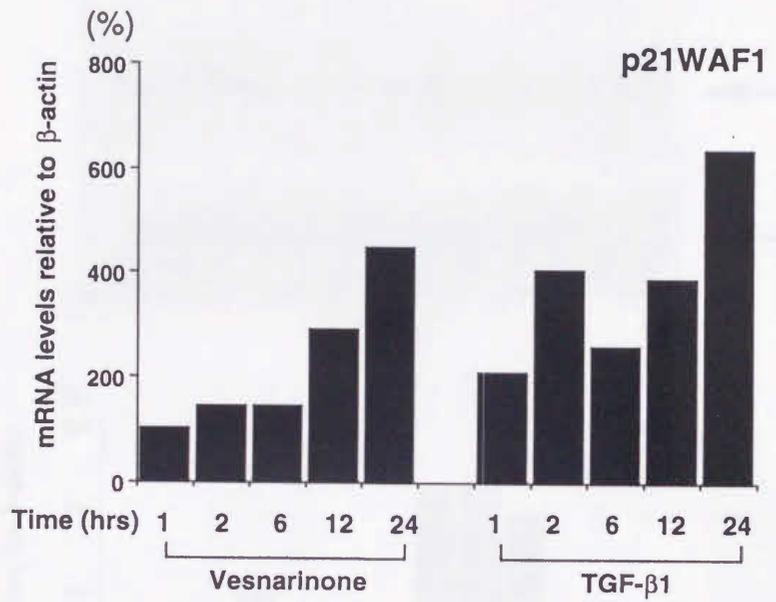
(图 9 A)

A



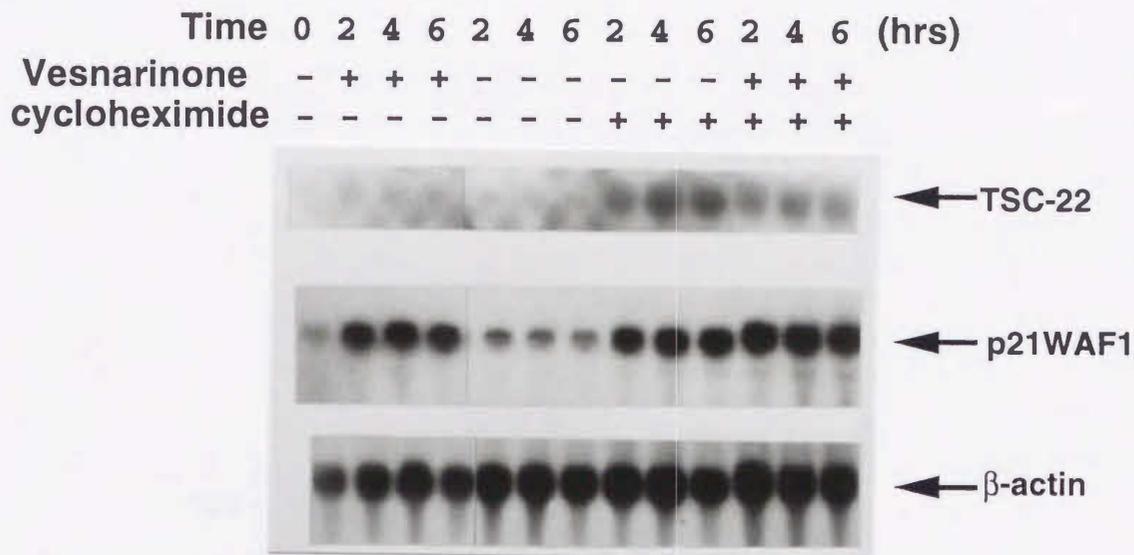
(图 9 B)

B

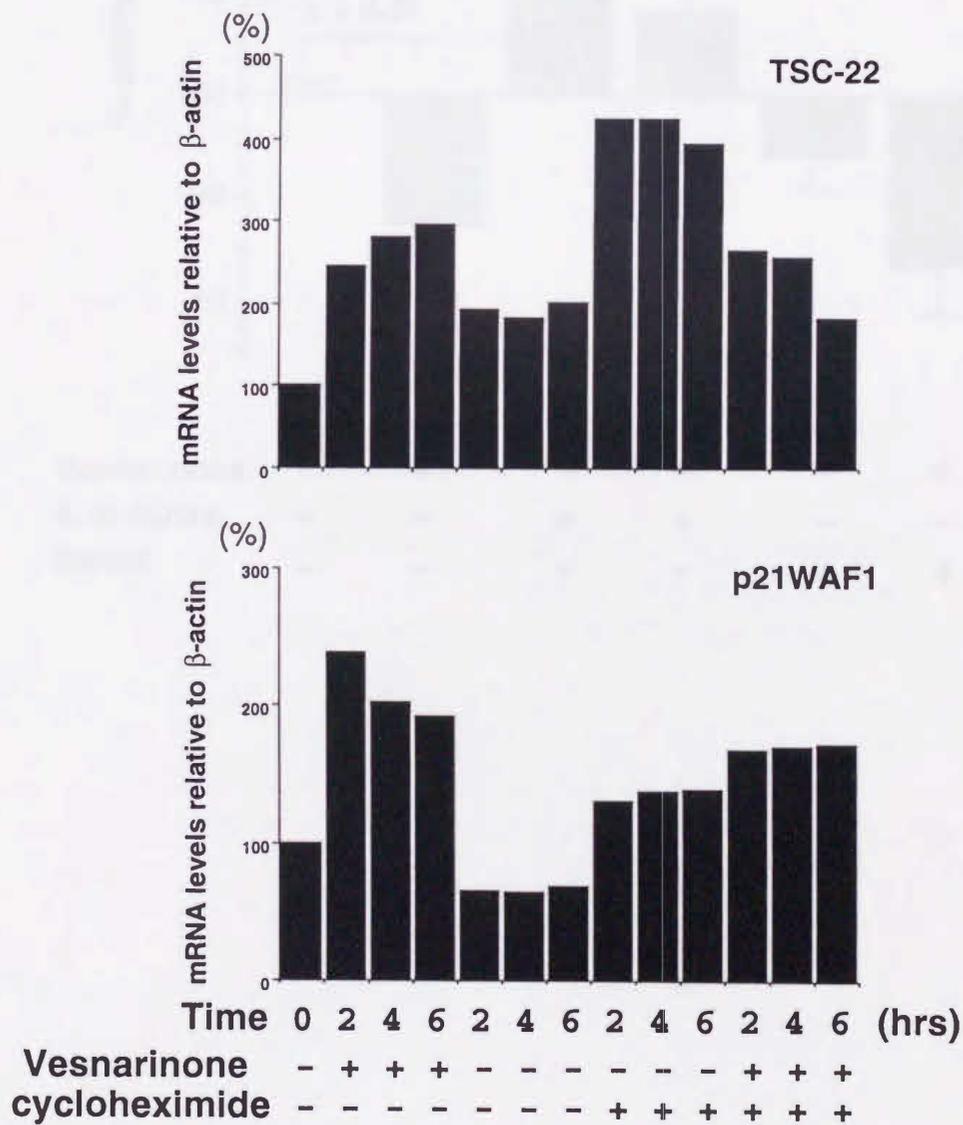


(图 10 A, B)

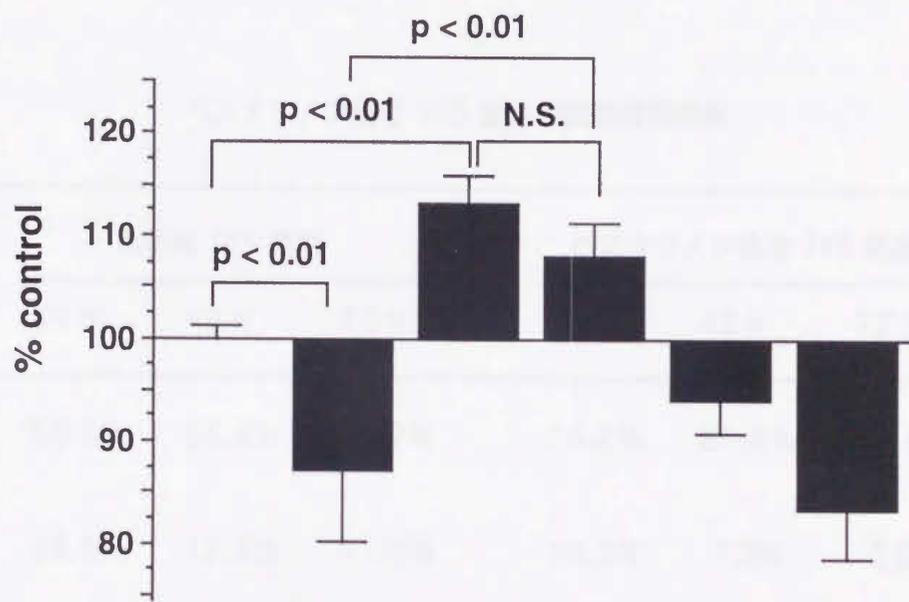
A



B



(图 11)



Vesnarinone	-	+	-	+	-	+
Anti-sense	-	-	+	+	-	-
Sense	-	-	-	-	+	+

(表 1)

ベスナリノン処理 TYS 細胞の細胞周期解析

	未処理 TYS 細胞			ベスナリノン処理 TYS 細胞		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
G0/G1	50.5%	56.5%	72.7%	76.2%	81.8%	92.0%
S	24.6%	17.6%	11.1%	10.3%	7.2%	2.0%
G2/M	20.3%	21.7%	13.3%	11.0%	6.4%	4.7%

ベスナリノン処理あるいは未処理 TYS 細胞の細胞周期をフローサイトメトリーにより解析した結果 (図 2) より、G0/G1, S, G2/M 期に存在する細胞数の割合を算定した。



論文審査の結果の要旨

報告番号	① 乙	歯第 110 号	氏名	中城公一
審査委員		主査	佐藤光信	
		副査	井上秀夫	
		副査	林良夫	

題目

ベスナリノンによるヒト唾液腺癌細胞 (TYS) の増殖抑制機構の解析

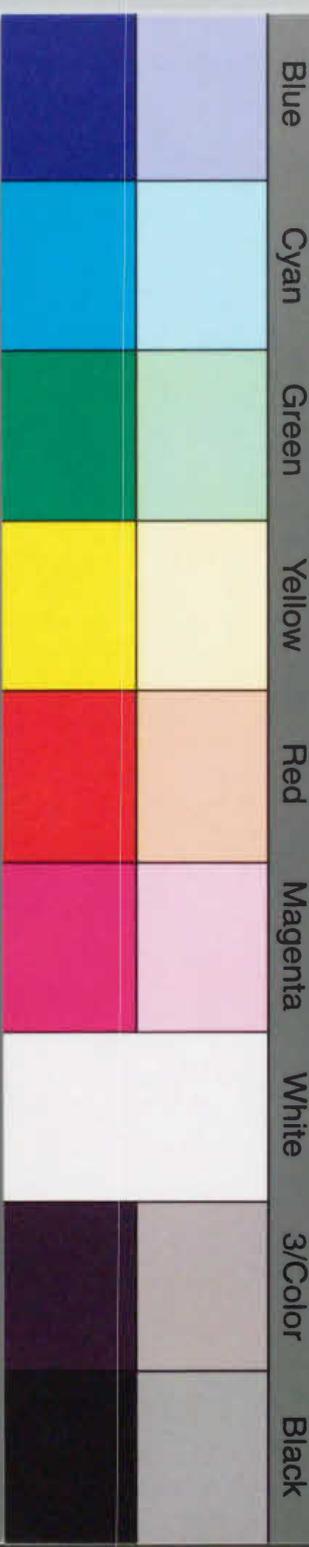
要旨

本研究において、著者は新規分化誘導剤ベスナリノン処理により増殖抑制を受け、また p53 癌抑制遺伝子がコドン 281 でアスパラギン酸からヒスチジンに変異しているヒト唾液腺癌細胞 (TYS) を用いてベスナリノンによる細胞増殖抑制作用の分子機構の解明を試み、以下の研究結果を得ている。すなわち、1) YYS 細胞はベスナリノン処理により G1 arrest が誘導される。2) YYS 細胞においてベスナリノンにより発現誘導される遺伝子として、ヒト TSC-22 cDNA (1600 bp) をクローニングし全塩基配列を決定した。3) TSC-22 遺伝子は細胞密度に依存して発現が増加し、ベスナリノンはその発現を更に増強した。4) ベスナリノンは YYS 細胞において TGF-β1, p21 WAF1 遺伝子の発現を誘導した。5) TGF-β1 は YYS 細胞において TSC-22, p21WAF1 遺伝子の発現を誘導した。6) YYS 細胞におけるベスナリノンによる TSC-22 遺伝子の発現誘導は、間に蛋白質の合成を必要とする間接作用が主体であるが、p21WAF1 遺伝子の発現誘導は直接作用が主体であった。7) ヒト TSC-22 遺伝子に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドは YYS 細胞の増殖に対し対数増殖期には全く影響を与えないが、接触阻止がおこる細胞密度になると細胞増殖促進作用が認められた。また、アンチセンスオリゴヌクレオチドはベスナリノンの YYS 細胞に対する増殖抑制作用を阻害した。以上の結果より、ベスナリノンは YYS 細胞において TGF-β1 あるいは他の蛋白質を介した TSC-22 遺伝子の発現誘導、更に直接作用あるいは TGF-β1 を介した p21WAF1 の発現誘導により細胞周期を G1 期に止め細胞増殖抑制作用を示すことが示唆された。本論文の著者は新規分化誘導剤ベスナリノンのヒト唾液腺癌細胞における増殖抑制機構において少なくとも二つの分子 (TSC-22, p21WAF1) が関与している可能性を明らかにしている。この研究は分化誘導剤の感受性マーカーの開発あるいはヒト唾液腺癌の分子診断において重要な示唆を与えるとともに、今後唾液腺癌を含む多くの固形癌に対する分化誘導療法の研究を進める上でも寄与するところ大であると考えられる。したがって、本研究は歯科医学の発展に貢献するところが極めて大であり、本論文は博士 (歯学) の学位授与に値するものとする。

INCHES 1 2 3 4 5 6 7 8  
CENTIMETERS 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

# Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM Kodak



Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black

# Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM Kodak

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19

