

# 緑膿菌クオラムセンシング分子ホモセリンラクトンの 肺癌細胞増殖への影響

鳥取大学医学部統合内科医学講座分子制御内科学分野 (主任 清水 英治教授)

牧野晴彦, 千酌浩樹

## Effects of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing molecule N-3-oxo-dodecanoyl homoserine lactone on lung cancer cell lines

Haruhiko MAKINO, Hiroki CHIKUMI

*Division of Medical Oncology and Molecular Respiriology,  
Department of Multidisciplinary Internal Medicine, Faculty of Medicine,  
Tottori University, 36-1 Nishicho, Yonago, Tottori 683-8504, JAPAN*

### ABSTRACT

Quorum sensing system is a signaling process used by many bacterial species to coordinate gene expression in response to changes in cell density. In this system, small-molecules called autoinducer play an important role for bacteria to monitor one another's presence and modulate gene expression. *Pseudomonas aeruginosa* autoinducer, N-3-oxo-dodecanoyl homoserine lactone (3-O-C<sub>12</sub>HSL), is a small molecule that is essential in regulation of many *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors, and it also affects eukaryotic cells. In this report, we demonstrate that 3-O-C<sub>12</sub>HSL induces G1 cell cycle arrest and blocks proliferation in human lung cancer cell lines. Analyses of the cell cycle regulators that mediate these effects reveal that 3-O-C<sub>12</sub>HSL decreases cyclin D3 expression, which leads to dephosphorylation of Rb protein followed by G1 cell cycle arrest. These results support the notion of 3-O-C<sub>12</sub>HSL as a bioactive molecule in eukaryotic systems and a paradigm for a novel class of antiproliferative compounds. (Accepted on January 9, 2007)

**Key words :** homoserine lactone, G1 arrest, Rb, cyclin D3

### はじめに

緑膿菌は、敗血症、創傷、肺感染症など急性および、慢性的の様々な感染症の原因菌となり、特に免疫不全患者においては、肺炎の21%、尿路感染

症の10%、敗血症の3%と臨床から分類される頻度の高い起炎菌の一つである<sup>1)</sup>。さらに嚢胞性肺線維症、びまん性汎細気管支炎、肺癌といった呼吸器疾患を持つ患者にとっては、この菌が慢性的に感染することが臨床上大きな問題となってい

る<sup>2,3)</sup>。細菌が宿主に対して優位な環境を作り出すためには、宿主の生体防御機構に感知されること無く十分に菌密度が高まってから、種々の病原因子をいっせいに産生して組織破壊を図り安住の場所を作る必要がある。クオラムセンシング機構とは生体内で細菌が自らの数が優位な状況になった事を細菌相互間の情報伝達物質で感知し、病原因子の発現をいっせいに開始するシステムであり、この機構の中で細菌間の情報伝達分子としての役割を担っているのが自己誘導物質 (autoinducer) と呼ばれる小分子である。細菌のクオラムセンシング機構を担うautoinducer は、homoserine lactone (HSL) 誘導体, oligopeptide, furanon誘導体に分けられる。緑膿菌はこの中でもHSL誘導体を産生することが知られている。緑膿菌の産生するHSLはラクトン環の横につく側鎖が長いN-3-oxododecanoyl homoserine lactone (3-O-C<sub>12</sub>HSL) と側鎖の短いN-butyl-L-homoserine lactone (C<sub>4</sub>-HSL) の二種類である<sup>4,5)</sup>。これらのautoinducer分子は、それぞれ対応するI-遺伝子によりコードされているautoinducer合成酵素により合成され、転写活性化因子 (R蛋白) と結合した後、ターゲット遺伝子の上流に結合しその発現を高め病原性を発揮する。こうして細菌がお互いの菌密度を知る上での情報伝達を担っている。

近年この情報伝達分子であるautoinducer分子の中でも長い側鎖を持つ3-O-C<sub>12</sub>HSLは、細菌間のみならず宿主生体細胞に対しても影響を及ぼすことが明らかになった。DiMangoらは緑膿菌の生成する3-O-C<sub>12</sub>HSLが肺線維芽細胞や気道上皮細胞においてインターロイキン8の生成を促すことを報告し<sup>6)</sup>、Smithらは炎症状態にあるヒトの肺線維芽細胞においてシクロオキシゲナーゼ2やプロスタグランジンE<sub>2</sub>の産生を誘導すると報告した<sup>7)</sup>。さらに本邦のTatedaらは好中球やマクロファージに対して、3-O-C<sub>12</sub>HSLがアポトーシスを誘導することを報告している<sup>8)</sup>。加えて最近では3-O-C<sub>12</sub>HSLの癌細胞に対する増殖抑制効果について検討されており、Li Liらは3-O-C<sub>12</sub>HSLがヒト乳がん細胞においてアポトーシスを誘導し、それはSTAT3 (signal transducer and activator of transcription 3) を抑制することと関連していると報告し<sup>9)</sup>、Dolnickらはヒト大腸癌細胞において3-O-C<sub>12</sub>HSLが抗がん剤である5-fluorouracilの感受性をあげることを報告している<sup>10)</sup>。しかし、

臨床上緑膿菌と共存する確率が最も高い肺癌細胞への影響を報告したものは未だかつていない。そこで我々は緑膿菌の生成するクオラムセンシング分子である3-O-C<sub>12</sub>HSLの肺癌細胞に対する影響を検討した。その結果3-O-C<sub>12</sub>HSLは、肺癌細胞株においても細胞増殖を抑制し、そのメカニズムとしてG1期からS期へ促進的に働くD typeサイクリンの一つであるサイクリンD3の発現を3-O-C<sub>12</sub>HSLがmRNAレベルで抑制し、この結果として癌抑制遺伝子であるRb蛋白の脱リン酸化を介しての細胞周期停止が起こることを見出したのでここに報告する。

### 材料および方法

**細胞** ヒト肺腺癌細胞であるA549細胞はAmerican Type Culture Collection, Ma-10細胞は大阪府立羽曳野病院から入手した。細胞は10%牛胎児血清 (Fetal bovine serum; FBS) (Life technologies, New York, USA) と抗生物質 (ペニシリン100 U/mlとストレプトマイシン100 µg/ml) を添加したDulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM) (ニッスイ製薬, 東京) を用いて、37°C, 5%CO<sub>2</sub>下で培養した。

**試薬** N-3-oxododecanoyl homoserine lactone (3-O-C<sub>12</sub>HSL) は京都薬科大学微生物学教室後藤直正教授から分与頂いた。3-O-C<sub>12</sub>HSLはDimethyl Sulfoxide (DMSO) に溶解し50 mMのストック溶液として-80°Cに保存した。MG132はSigma-Aldrich (St.Louis, MO) より購入した。

**細胞数測定** 3-O-C<sub>12</sub>HSLの肺癌細胞増殖抑制効果の検討はCell Counting Kit 8を用いて行った。本キットは新規テトラゾリウム塩WST-8が生細胞に吸収され細胞内脱水素酵素により還元されると水溶性ホルマザンが生成され、このホルマザンの450 nmの吸光度を測定することにより生細胞数を計測するものである<sup>11,12)</sup>。この吸光度を3-O-C<sub>12</sub>HSL存在下で培養した場合とDMSOで培養した場合とで比較した。20,000個/mlの癌細胞を含む細胞浮遊液を10%FBS添加DMEMで作成し、96穴プレートに90µlずつ播種し1晩培養した。その後各濃度の3-O-C<sub>12</sub>HSLかDMSOを培養液に加え48時間培養した後、Cell Counting Kit 8試薬を10µl加え、さらに4時間培養し吸光度をマイクロプレートリーダー; Model 680 (Bio Rad, California, USA) で測定した。DMSOのみで培

養した場合の吸光度を1として3-O-C<sub>12</sub>HSLを含む場合の吸光度をこれに対する比率で表した。

**アポトーシス測定** 10 cmディッシュに50-70%コンフルエントまで培養した肺癌細胞に100 μMの3-O-C<sub>12</sub>HSLを加え、一定時間培養した後、細胞を抽出しアポトーシスをAPOPCYTO, Annexin V-azami-Green Apoptosis detection kit (MBL, 名古屋) とフローサイトメトリー (FACS Calibur, Becton Dickinson, USA) にて検出した。蛍光たんぱく質Azami-Greenを結合させたAnnexinVとヨウ化プロピジウム (Propidium Iodide; PI) を用いて生細胞 (AnnexinV陰性, PI陰性), 初期アポトーシス細胞 (AnnexinV陽性, PI陰性), 後期アポトーシス細胞 (AnnexinV陽性, PI陽性), 死細胞 (AnnexinV陰性, PI陽性) に判定した。コントロールとして0.2% DMSOを含むDMEM培養液で48時間培養した細胞を用いた。

**細胞周期解析** 10 cmディッシュで50%コンフルエントに達したA549細胞とMa-10細胞を3-O-C<sub>12</sub>HSL (10 μM, 100 μM) もしくは0.2% DMSOを含むDMEM培養液 (コントロール: C) で24時間培養後トリプシン処理し、回収した細胞をエタノールで一晩冷凍固定してから, PBS (phosphate buffered saline: pH 7.4) で2度洗浄した後にPI染色液 (PI 10 μg/ml, EDTA 20 mM, Tween 20 0.05%, DNase free RNase 20 μg/ml) で15分間染色して単離細胞浮遊液 (0.5 × 10<sup>6</sup>個/ml) を作成した。これをフローサイトメトリーを用いてDNA含有量を測定し, システムに付属のCell questを用いて分析しDNAヒストグラムを得た。同実験を3回行い各細胞周期の細胞数の割合をグラフ化した。

**p53レポーターアッセイ** A549細胞とMa-10細胞を6 well-plateで抗生物質を含まないDMEM培養液にて50%コンフルエントになるまで培養し, p53-Lucプラスミド (STRATAGENE, California, USA) とpcDNA3-β-galactosidaseプラスミドをLipofecamine 2000 (Invitrogen, 東京) を用いてトランスフェクションした。12時間後, 培地を10% FBS, 抗生物質 (ペニシリン100 U/mlとストレプトマイシン100 μg/ml), 3-O-C<sub>12</sub>HSL (10 μM, 100 μM) もしくは0.2% DMSOを含む培地 (コントロール: C) に変え24時間培養した。PBSで1回洗浄後, 1 × Passive Lysis Buffer

(Promega, WI, USA) 200 μlを加え, ドライアイスの上に1分間放置し細胞融解させた。細胞融解液を12,000 rpmにて2分間遠心分離を行い, 上清20 μlに対してLuciferase Assay Reagent (Promega, WI, USA) 100 μlを加え, 発光量をMinilumat LB9506 (Berthold, Germany) にて測定した。また同時にそれぞれのサンプルについてβ-galactosidaseアッセイを行い, ルシフェラーゼ発光量をβ-galactosidase吸光度で除し, トランスフェクション効率補正を行った。ポジティブコントロールとしてpFC-p53 positive control plasmid (STRATAGENE, California, USA) をトランスフェクションした細胞での発光量を用いた。

**Western blot** 0.2% DMSO (コントロール: C) と各濃度の3-O-C<sub>12</sub>HSLを含むDMEM培養液で24時間培養したA549細胞のRbのリン酸化, 各種蛋白の発現を検出するのにWestern blot法を用いた。70-90%コンフルエントに達した各細胞からタンパク質を抽出しBradford試薬 (BioRad, California, USA) を使用してタンパク質量を測定した。20 μgのタンパク質をアクリルアミドゲルで泳動後, 5% non-fat milk もしくは5% FBSでblockingした後, 1次抗体として抗phospho Rb (Ser795) 抗体, p15, p16, p21, p27, cyclinD1, cyclinD2, cyclinD3, cyclin dependent kinase (CDK) 4, CDK6抗体 (Cell Signaling Technology, Massachusetts, USA) を使用し, それぞれ4℃で12時間反応後, 2次抗体としてhoarse radish peroxidase (HRP) 標識goat anti-rabbit IgGもしくはgoat anti-mouse IgG (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, England) を使用し室温で60分間反応させECL™ Western Blotting Detection Reagents (Amersham Biosciences) を用いて検出した。

**リアルタイムPCR法を用いたmRNA相対発現量の定量化** 10 cmシャーレで50%コンフルエントとなったA549細胞を, 100 μMの3-O-C<sub>12</sub>HSLを含むDMEM培養液で各時間 (0~18時間) 培養しQIAGEN RNeasy Mini Kit (Qiagen, 東京) を用いてtotal RNAを抽出した。この際, 抽出したRNAに微量に含まれているDNAを除去するために, RNase-Free DNase Set (Qiagen) でDNase I処理をした。抽出したRNAは測定時まで-80℃で保存した。cDNAの合成は, RNA 1 μg, random hexamer 10 μg, 1 × first strand buffer (In-

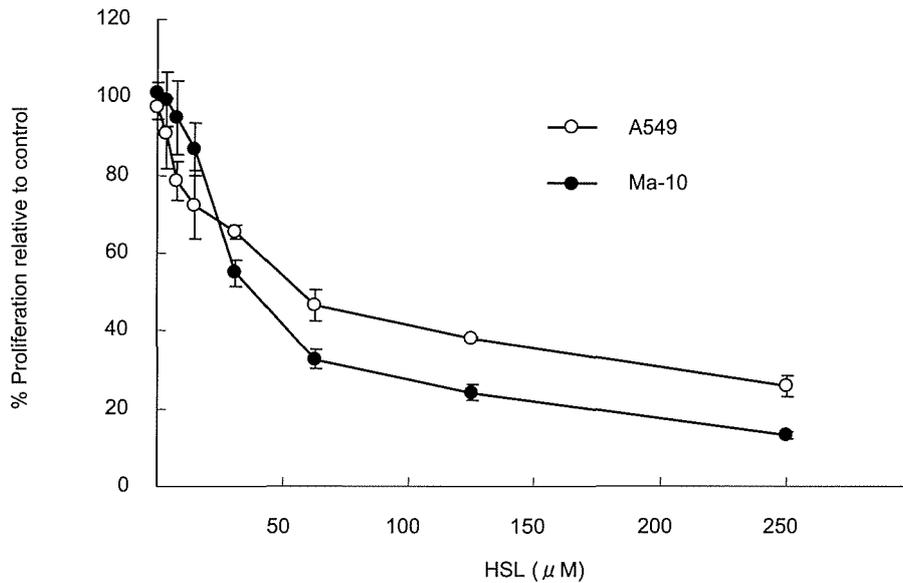


図1. ヒト肺癌細胞における3-O-C<sub>12</sub>HSLの細胞増殖抑制効果の検討.

横軸に3-O-C<sub>12</sub>HSL濃度, 縦軸に各濃度の3-O-C<sub>12</sub>HSLを含む培養液で肺癌細胞を48時間培養した場合の吸光度をDMSOを含む培養液で48時間培養した場合の吸光度で割った値 (% Proliferation) を表す. (○: A549 ●: Ma-10). 値は3回の平均値と標準偏差 (mean ± SD) を示す.

vitrogen, 東京), dNTP 0.5 mM, RNase inhibitor (Invitrogen) 10 U, Super Script II (Invitrogen) 200 Uを用いてTAKARA PCR Thermal Cycler (Takara, 京都) にて指定の方法により行った. 抽出DNAの濃度はパーソナルスペクトルモニター (Amersham Biosciences) を用いて260 nmの吸光度を測定することにより測定し, DNA濃度0.01 μg/μlにそれぞれ調整してPCRに供した. ユニバーサルプロープライブラリー (Roch Diagnostics, 東京) により入手した目的遺伝子に対する加水分解プローブ10 μM (最終濃度100 nM), Forward primer (FW) 20 μM (最終濃度200 nM), Reverse primer (REV) 20 μM (最終濃度200 nM) (Sigma genosys, 石狩) とLight-Cycler®TaqMan®Master 5倍溶液 (Roch Diagnostics) を含む反応溶液でライトサイクラーシステム (Roche Diagnostics) によりリアルタイムPCR法を行った. 使用した遺伝子特異的プライマーは次のとおりである. cyclin D1:(FW) 5'-gaagatcgtcgccacctg-3', (REV) 5'-gacctctctctcgacttct-3', cyclin D3:(FW) 5'-ggagatcaagcgcacat-3', (REV) 5'-agcgtctctctcacatac, GAPDH:(FW) 5'-

agccacatcgctcagacac-3', (REV) 5'-cgccaatacagacaaat-3'. PCR条件は, 初期熱変性を95℃, 10分間, サイクリングは熱変性を95℃, 15秒間, アニーリングを55℃, 5秒間, 伸長反応を72℃, 10秒間で45サイクルとした. 蛍光強度と増幅産物の融解曲線の解析は, Light Cycler Software version 3.5により行った.

## 結 果

### 3-O-C<sub>12</sub>HSLの増殖抑制効果

まず, 3-O-C<sub>12</sub>HSLが肺癌細胞 (A549細胞とMa-10細胞) の増殖能に与える影響を検討した. 図1は, 各種濃度のDMSOを含むDMEM培養液で48時間培養した場合の吸光度をコントロールとしそれに対する各種濃度の3-O-C<sub>12</sub>HSLを含むDMEM培養液で培養した場合での吸光度の割合を縦軸に, 培養液に含まれる3-O-C<sub>12</sub>HSL濃度を横軸に表したものである. 濃度が増加するに従いコントロールに対する吸光度比 (% Proliferation), すなわち3-O-C<sub>12</sub>HSL処理を行った生細胞数が減少を示したことから, 3-O-C<sub>12</sub>HSLは濃度依存的に細胞増殖抑制効果を持つことが示された. 50%阻害濃度 (Inhibitory Concentration 50;

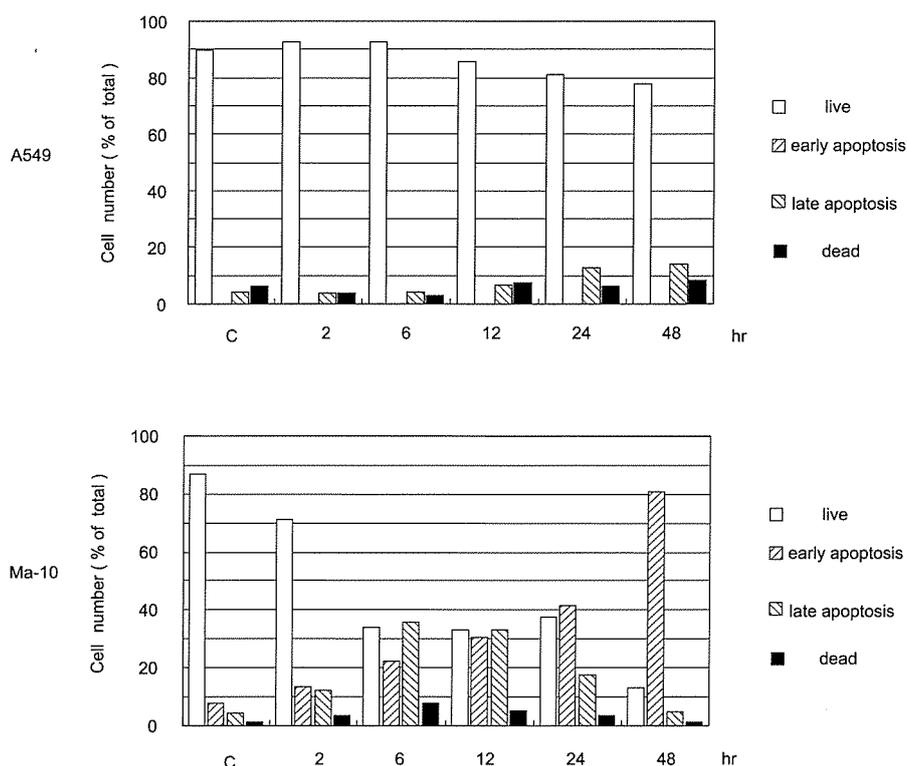


図2. Annexin-VとPI染色による3-O-C<sub>12</sub>HSLによるアポトーシス誘導の検討.

A549細胞およびMa-10細胞を3-O-C<sub>12</sub>HSL 100μMを含む培養液で各時間 (2, 6, 12, 24, 48 時間) 培養した場合と0.2%DMSOを含む培養液で48時間培養した場合 (コントロール: C) のアポトーシスの状態を表す. (上図 A549細胞 下図 Ma-10細胞) □: 生細胞 (AnnexinV陰性, PI陰性), ▨: 初期アポトーシス細胞 (AnnexinV陽性, PI陰性), ▩: 後期アポトーシス細胞 (AnnexinV陽性, PI陽性), ■: 死細胞 (AnnexinV陰性, PI陽性) に分け, それぞれの細胞数割合を示す.

IC<sub>50</sub>) はA549では60μM, Ma-10では40μMであった.

### 3-O-C<sub>12</sub>HSLによるアポトーシス誘導

3-O-C<sub>12</sub>HSLは好中球, マクロファージにおいてアポトーシスを誘導することが報告されている<sup>8,9)</sup>. そこで, 測定した3-O-C<sub>12</sub>HSLの肺癌細胞に対する細胞増殖抑制効果がアポトーシス誘導によるものかどうかについて検討した. 図2に3-O-C<sub>12</sub>HSLを含むDMEM培養液で肺癌細胞を培養した場合のアポトーシスの状態を経時的に測定したものを示す. 細胞のアポトーシスの状態を次のように分類し縦軸にそれぞれの細胞数割合を示す. (□: 生細胞, ▨: 初期アポトーシス細胞, ▩: 後期アポトーシス細胞, ■: 死細胞) 100μMの3-O-C<sub>12</sub>HSLを含むDMEM培養液で肺癌細胞を培養したところMa-10細胞では6時間以降に顕著な

アポトーシスの誘導が見られた (図2下). 一方A549細胞では48時間培養したがアポトーシスはほとんど誘導されなかった (図2上). この結果から, 3-O-C<sub>12</sub>HSLの肺癌細胞に対する細胞増殖抑制効果はMa-10細胞においてはアポトーシス誘導による可能性があるが, A549細胞においてはアポトーシス以外のメカニズムが存在する可能性が示唆された.

### 3-O-C<sub>12</sub>HSLの細胞周期に及ぼす影響

次に, 3-O-C<sub>12</sub>HSLの肺癌細胞に対する細胞増殖抑制効果のアポトーシス誘導以外の機序として, 細胞周期に与える影響について検討した. A549細胞とMa-10細胞をそれぞれ10μMと100μMの2種類の濃度の3-O-C<sub>12</sub>HSLを含むDMEM培養液と0.2%DMSOを含むDMEM培養液 (コントロール: C) で24時間培養後, フローサイトメトリー

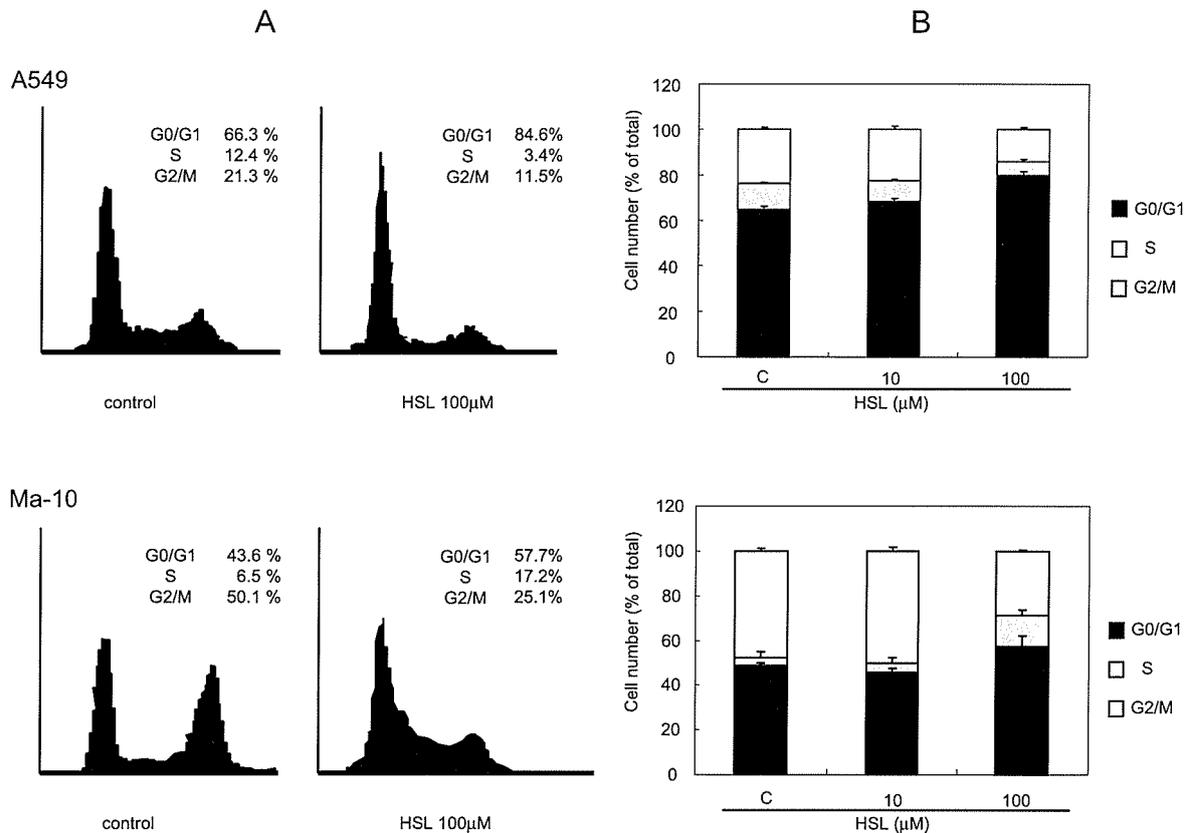


図3. フローサイトメトリーによる3-O-C<sub>12</sub>HSLの細胞周期停止の検討.

A: 各肺癌細胞を3-O-C<sub>12</sub>HSL 100μMを含む培養液と0.2% DMSOを含む培養液(コントロール: C)で24時間培養後, PI染色を行いフローサイトメトリーでDNA含有量を測定した(上図A549 下図Ma-10). 横軸はDNA含有量, 縦軸は細胞数を表す. B: 各々の細胞を3-O-C<sub>12</sub>HSL (10, 100μM)の存在下, もしくは0.2% DMSOを含む培養液(コントロール: C)で24時間培養した場合のG0/G1, S, G2/M期の細胞数割合を示す. それぞれの棒グラフは3回の平均値と標準偏差(mean ± SD)を示す(上図A549 下図Ma-10).

にて細胞周期を解析した. 図3Aにそれぞれの細胞におけるコントロールと100μM 3-O-C<sub>12</sub>HSL処理による代表的な細胞周期のヒストグラムを示す. A549細胞, Ma-10細胞ともに100μMの3-O-C<sub>12</sub>HSL処理によってG0/G1期の細胞数が増加していた. 同様な実験を3回行い各細胞周期の細胞数割合をグラフ化したものを図3Bに示す. コントロールと3-O-C<sub>12</sub>HSL処理したものを比較するとA549細胞においてはG0/G1期の細胞数は66.3%から84.6%まで増加し, S期の細胞数は12.4%から3.4%, G2/M期の細胞数は21.3%から11.5%まで減少した. 同様にMa-10細胞ではG0/G1期の細胞数は43.6%から57.7%まで増加し, G2/M期の細胞数は50.1%から25.1%まで減少した. 以

上の結果より3-O-C<sub>12</sub>HSLは肺癌細胞株A549細胞, Ma-10細胞のいずれに対してもG1期での細胞周期の停止を引き起こすことが示された. つまり, Cell Countig kit 8を用いて測定した3-O-C<sub>12</sub>HSLの細胞増殖抑制効果は, A549細胞では主にこのG1期細胞周期停止により, Ma-10細胞ではG1期細胞周期停止とともにアポトーシス誘導によることが示唆された.

#### 3-O-C<sub>12</sub>HSLのp53遺伝子活性に及ぼす影響

3-O-C<sub>12</sub>HSLが肺癌細胞株に対してアポトーシス誘導とともにG1期細胞周期停止効果を持つことから, その作用標的としてp53遺伝子に注目した. p53遺伝子は種々の生体ストレスに反応し, 細胞のG1期からS期への移行を制御するとともに

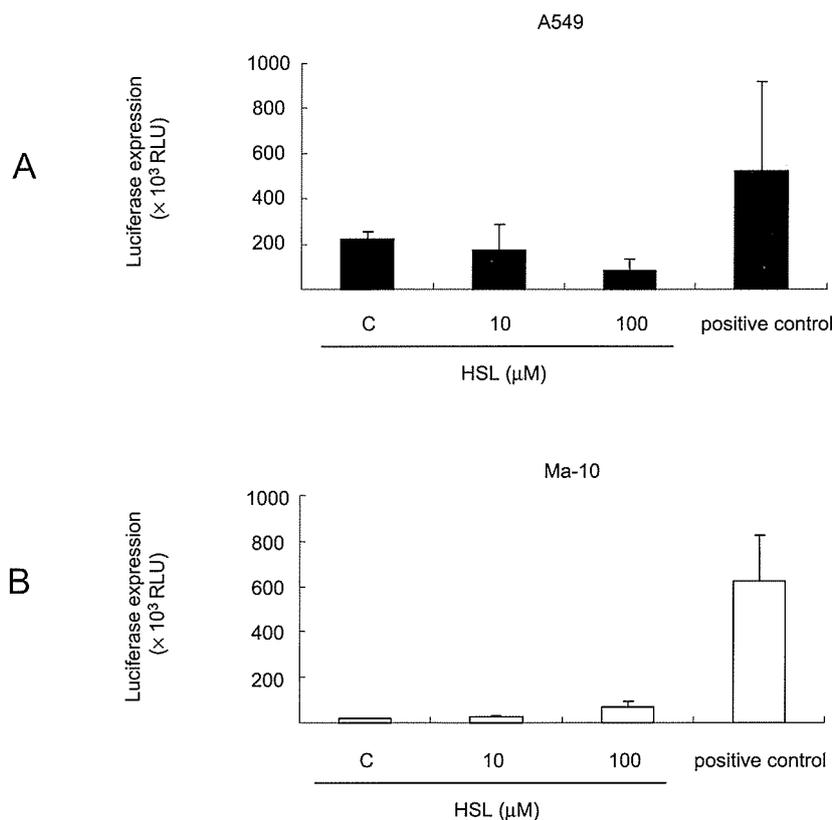


図4. *p53*レポーターアッセイによる3-O-C<sub>12</sub>HSLの*p53*遺伝子活性に及ぼす影響の検討.  
*p53*応答配列とルシフェラーゼ遺伝子を含むレポータープラスミドをトランスフェクションした各肺癌細胞を3-O-C<sub>12</sub>HSL (10, 100 μM) を含む培養液もしくは0.2% DMSOを含む培養液 (コントロール: C) で24時間培養した場合のルシフェラーゼ発光量を測定し, それぞれのサンプルについてβ-galactosidaseアッセイで得られたβ-galactosidase吸光度で除しトランスフェクション効率補正を行った発光量の比率 (relative light unit ; RLU) を求めた (縦軸). *p53*発現プラスミドを共導入した時の発光量をpositive controlとした. 3回の平均値と標準偏差 (mean ± SD) を示す. (上図A549 下図Ma-10)

アポトーシス誘導にも関与している癌抑制遺伝子産物である<sup>13,14</sup>). ヒト癌細胞では*p53*遺伝子変異をもつものがあり, そのような癌細胞では*p53*機能が欠損しているが, A549細胞株, Ma-10細胞株はともに野生型*p53*遺伝子を持ち, *p53*機能は保たれている. そこで3-O-C<sub>12</sub>HSL処理により両肺癌細胞の*p53*機能が活性化されるかどうかをレポーターアッセイにて検討した. レポーターアッセイにて得られた発光量をβ-galactosidaseによって得られた吸光度で除したrelative light unit (RLU) を図4に示す (上段 A549: 下段 Ma-10). 両細胞とも*p53*発現プラスミドを共導入したポジティブコントロールと比較して, 細胞周期停止効果をもたらした100 μMの3-O-C<sub>12</sub>HSL処理によっ

ても*p53*活性が増強されることは無かった. この結果より3-O-C<sub>12</sub>HSLは肺癌細胞の*p53*活性には影響を与えず, その細胞周期停止の作用は*p53*経路以外のメカニズムが存在するものと考えられた.

#### 3-O-C<sub>12</sub>HSLの細胞周期制御蛋白に与える影響

G0/G1期からS期への移行を直接制御している最も重要な分子はRb蛋白である. そこで次に3-O-C<sub>12</sub>HSLのRb蛋白への影響について検討した. Rb蛋白はG0/G1期には転写因子であるE2Fと結合することでこれを不活化し, S期への移行を抑制しているが, いくつかのサイクリン-CDK複合体によりリン酸化を受けることでE2Fとの結合能を失い, 遊離したE2Fが増殖関連遺伝子の転写を促進し細胞周期はS期へと進行する<sup>15</sup>). Rb蛋白

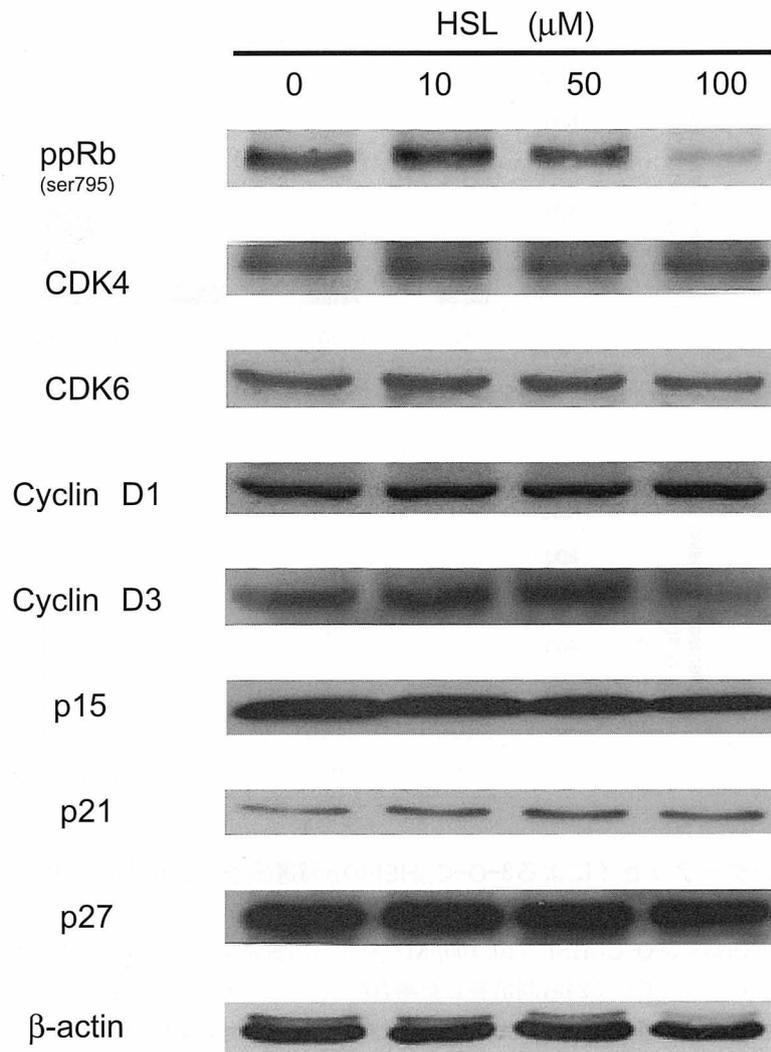


図5. 3-O-C<sub>12</sub>HSLの細胞周期制御蛋白に与える影響。

A549細胞を各濃度の3-O-C<sub>12</sub>HSL (10, 50, 100μM) を含む培養液と0.2%DMSOを含む培養液 (コントロール: C) で24時間培養し, Western blotにてRb蛋白のリン酸化 (Ser 795残基) と各種細胞周期制御蛋白の発現量を求めた。

は複数のリン酸化部位をもつが, 中でもSer795残基がE2Fとの複合体生成に最も重要であるといわれている<sup>16)</sup>. まず3-O-C<sub>12</sub>HSLがRb蛋白Ser795残基リン酸化に与える影響について検討した. アポトーシスによる影響を除外し, 純粹に細胞周期停止効果を検討するために, 本実験は3-O-C<sub>12</sub>HSLによってアポトーシスが誘導されなかったA549細胞について行った. 各濃度の3-O-C<sub>12</sub>HSL存在下で24時間培養した細胞から蛋白を抽出し, Rb蛋白のSer795部位のリン酸化状態を, リン酸化部位特異的抗体 (Phospho-Rb (Ser795) 抗体) を用いたWestern blotにて検討した. コントロー

ル, 10μM, の3-O-C<sub>12</sub>HSL存在下で培養したA549細胞ではRb蛋白はリン酸化されていたが, 50μM, 100μMと3-O-C<sub>12</sub>HSLの濃度が増すに従って, A549細胞のRb蛋白の脱リン酸化が見られた (図5). 従って3-O-C<sub>12</sub>HSLによるG1期細胞周期停止はこのRb蛋白の脱リン酸化によるものと推察された. Rb蛋白のリン酸化はG1期の早い段階において, サイクリンDとCDK4/6が複合体を形成することでおこり<sup>15)</sup>, 逆にこの複合体形成を阻害するCDK阻害因子もいくつか知られている<sup>17)</sup>. そこで次にこれらRb蛋白のリン酸化を制御しているサイクリンD (D1, D2, D3), CDK4/6,

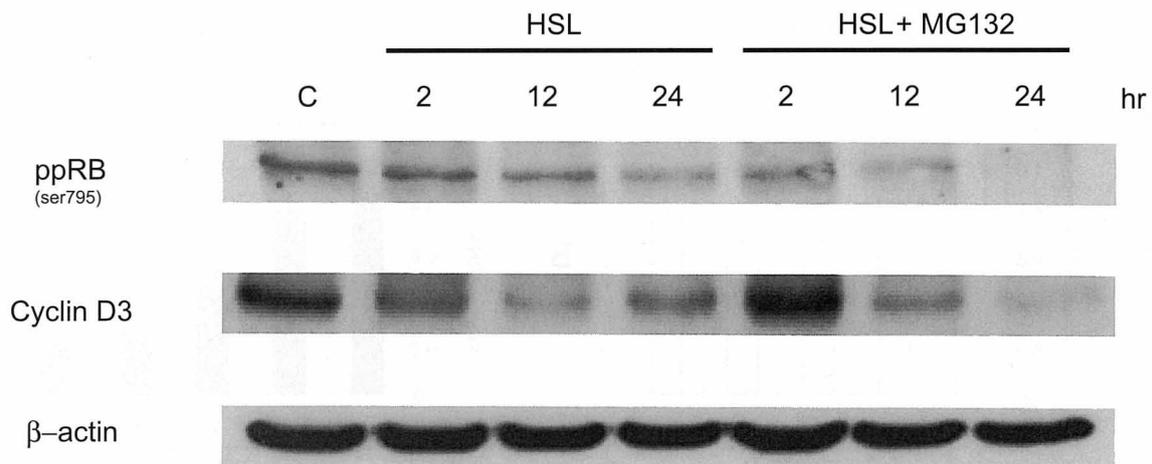


図6. 3-O-C<sub>12</sub>HSLのサイクリンD3蛋白分解に及ぼす影響.

A549細胞を3-O-C<sub>12</sub>HSL (100μM) のみを含む培養液で24時間培養した場合と3-O-C<sub>12</sub>HSL (100 μM) を含む培養液にプロテアソーム阻害薬MG132 (5μM) を加えて培養した場合で、Rbのリン酸化 (Ser 795残基) とサイクリンD3蛋白の発現量への影響をWestern blotにて経時的に比較検討した. 0.2%DMSOを含む培養液で24時間培養したときの蛋白発現量をコントロール (C) とした.

CDKインヒビター (p15, p21, p27) 発現へ与える3-O-C<sub>12</sub>HSL処理の影響を検討した. その結果, 3-O-C<sub>12</sub>HSL はサイクリンD3に対して濃度依存的にその発現を抑制したが, その他の細胞周期関連蛋白サイクリンD1, D2, CDK4, CDK6, CDKインヒビター (p15, p21, p27) の蛋白発現量には影響を及ぼさなかった. 今回図5には示していないが, サイクリンD2はA549において蛋白発現が認められなかった. 以上の結果から, 3-O-C<sub>12</sub>HSL が肺癌細胞株A549細胞においてサイクリンD3の蛋白発現を抑制し, これがRbの脱リン酸化を引き起こし, 細胞周期をG0/G1期で停止する可能性が示唆された.

#### 3-O-C<sub>12</sub>HSLのサイクリンD3蛋白分解に及ぼす影響

一般にサイクリンは種々の刺激によりその蛋白発現量が増加するが, これは蛋白合成のみならず, ユビキチン-プロテアソーム系による分解によっても調節を受けている<sup>18)</sup>. そこで次に3-O-C<sub>12</sub>HSLによるサイクリンD3の蛋白発現量の減少がユビキチン-プロテアソーム系による分解亢進によるものかどうかを検討した. 本検討では26Sプロテアソーム阻害薬であるMG132を用い, MG132処理が3-O-C<sub>12</sub>HSLのサイクリンD3蛋白発現抑制, RB脱リン酸化効果へ与える影響を

Western blotにて経時的に検討した. 図6に示すように, 5μMのMG132処理の有無にかかわらず100μMの3-O-C<sub>12</sub>HSL によってサイクリンD3はその蛋白発現量が減少し, Rbの脱リン酸化を起こした. これらのことから3-O-C<sub>12</sub>HSLによるサイクリンD3蛋白発現量抑制にはユビキチン-プロテアソーム系による蛋白分解亢進は関与していないことが示された.

#### 3-O-C<sub>12</sub>HSLがサイクリンD3 mRNAに及ぼす影響

以上のことから3-O-C<sub>12</sub>HSLは肺癌細胞において, 蛋白合成抑制によりサイクリンD3の蛋白発現量抑制を行っている可能性が考えられる. このことを確認するため, 3-O-C<sub>12</sub>HSLがサイクリンD3 mRNA転写に与える影響を定量的RT-リアルタイムPCR法を用いて検討した. 図7に示すように, サイクリンD3 mRNAは3-O-C<sub>12</sub>HSL処理により18時間まで経時的に減少したが, サイクリンD1ではこのような変化を認めなかった. 3-O-C<sub>12</sub>HSLが肺癌細胞株A549細胞においてサイクリンD3のmRNAレベルでの発現抑制を引き起こしていることが示唆された.

#### 考 察

本研究において我々は緑膿菌のクオラムセンシ

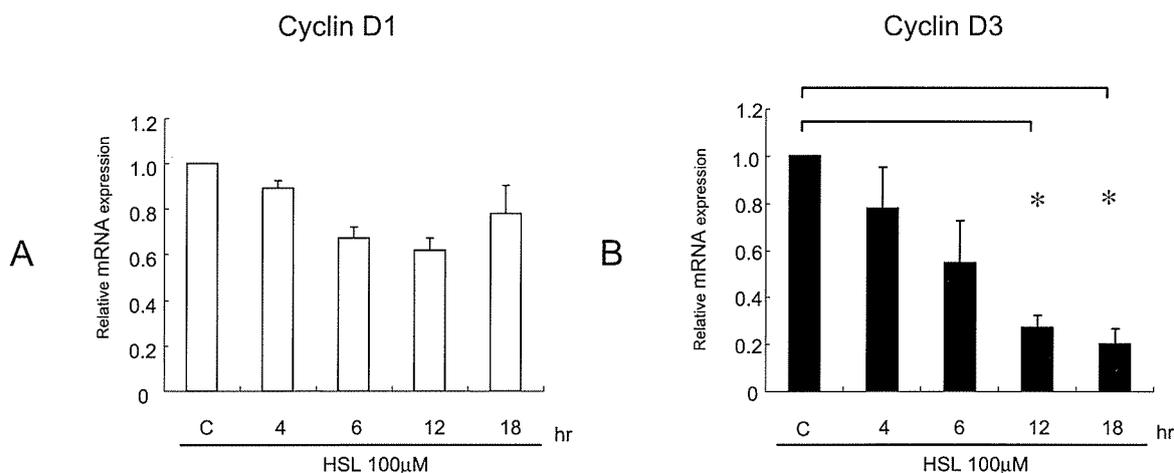


図7. リアルタイムPCR解析によるA549細胞のサイクリンD1, D3 mRNA発現への3-O-C<sub>12</sub>HSL処理の影響.

3-O-C<sub>12</sub>HSL (100μM) 処理によるA549細胞におけるサイクリンD1とサイクリンD3のmRNA発現量の経時的 (4, 6, 12, 18時間) 変化をリアルタイムPCR解析によって検討した. 0.2%DMSOを含む培養液で18時間培養したときのmRNA発現量をコントロール (C) とし, 各mRNA発現量をこれに対する相対値で表した. また各mRNA量はGAPDH mRNA量で除しサンプル間のDNA含有量差の補正を行った. 値は3回の平均値と標準偏差を示す. \*: p < 0.005

ング分子である3-O-C<sub>12</sub>HSLが, 肺癌細胞に対して増殖抑制効果をもつことを見出した. さらにその機序が, 従来から3-O-C<sub>12</sub>HSLのヒト細胞への効果として報告されているアポトーシスの誘導以外にもG0/G1細胞周期停止が関与していることを明らかにした. このG0/G1細胞周期停止は3-O-C<sub>12</sub>HSLによるサイクリンD3のmRNAレベルでの発現抑制とそれに引き続くRb蛋白の脱リン酸化によることが示唆された. これらの知見は我々の知る限り従来報告されたことのない3-O-C<sub>12</sub>HSLのヒト細胞への新しい効果である.

1994年, Fuquaらが初めてクオラムセンシングの語を使用して以来<sup>19)</sup>, 種々の菌において固有の自己誘導物質 (autoinducer) が発見されている. 緑膿菌以外にも*Burkholderia*属, *Enterobacter*属, *Vibrio*属, *Serratia*属, *Salmonella*属など临床上重要な多くの細菌が, それぞれアシル基の長さやカルボニル基の付加の有無などが違うHSLをautoinducerとして生成していることが知られており, その数は50を越す<sup>20)</sup>. これらHSLはもっぱら細菌相互間における情報伝達物質として機能しているが, その中でも今回我々が注目した緑膿菌の産生する3-O-C<sub>12</sub>HSLは, 宿主であるヒト細胞

に対しても重要なシグナルを送るという点で特異であり且つ重要である. 我々の今回の結果も含めると緑膿菌の3-O-C<sub>12</sub>HSLを感知したヒト細胞はインターロイキン8の産生<sup>6)</sup>, プロスタグランディン産生の重要な酵素であるシクロオキシゲナーゼ活性の亢進<sup>21)</sup>, 等を通じて炎症を惹起し菌排除に働くが, 一方で緑膿菌側は3-O-C<sub>12</sub>HSLを用いてヒト好中球やマクロファージにアポトーシスを誘導したり<sup>8)</sup>, ヒト細胞の細胞周期停止による増殖抑制を行う (本研究結果) ことで, 環境を自らの増殖に好都合なように作り変えているものと考えられる. 最近になって, ヒト気道上皮細胞や今回本実験に用いたA549細胞が3-O-C<sub>12</sub>HSLを効率的・特異的に分解する酵素をもつとの報告がなされた<sup>22)</sup>. このことは, 緑膿菌とヒトが古くから3-O-C<sub>12</sub>HSLを通して病原体-宿主間のせめぎあいを行ってきた証拠であり, 今回の我々の研究はこの関係の新たな一面を明らかにしたものと考えられる.

従来3-O-C<sub>12</sub>HSLが種々の細胞においてアポトーシスを引き起こすことが報告されていた. Tatedaらは3-O-C<sub>12</sub>HSLがマウス好中球やマクロファージなどに対してアポトーシスを引き起こ

し<sup>8)</sup>, Li Liらはヒト乳がん細胞に対してアポトーシスを引き起こすことを報告している<sup>9)</sup>. Kravchenkoらは3-O-C<sub>12</sub>HSLが骨髄由来細胞に対しアポトーシスを誘導するが, 上皮由来細胞ではアポトーシスは誘導しなかったと報告している<sup>23)</sup>. 今回我々の研究においても, 同じ肺腺癌細胞株でもMa-10ではアポトーシスを誘導したが, A549ではアポトーシスはほとんど誘導せず, 細胞周期停止を引き起こした. 加えて細胞周期停止作用と強いアポトーシス誘導の両作用を合わせ持つ癌抑制遺伝子p53は3-O-C<sub>12</sub>HSLによる影響は受けないことが示された. これらのことから, 3-O-C<sub>12</sub>HSLによるアポトーシス誘導がどのような機序でなされるかは未だ不明であるものの, 3-O-C<sub>12</sub>HSLがアポトーシス誘導に働く際の作用点と, 細胞周期停止に働く際の作用点は全く別であることが示唆された. 換言すると, 3-O-C<sub>12</sub>HSLはヒト細胞において少なくとも2カ所以上の作用点を持ち, それらが何であるのか, またそれらに共通に影響を及ぼす分子, すなわち3-O-C<sub>12</sub>HSLのヒト細胞内レセプターが何であるのか今後の精力的な解析が期待される.

サイクリンとサイクリンに結合して活性化されるリン酸化酵素 (CDK) は細胞周期の進行において中心的な役割を果たしている. なかでもサイクリンDは, 細胞周期のG1中期から後期に発現し, CDK4 およびCDK6 と結合し, 主ながん抑制遺伝子産物として知られるRbタンパク質をリン酸化することでG1期からS期への移行を制御している<sup>17)</sup>. サイクリンDにはD1~D3の3つのサブファミリーが同定されているが, ノックアウトマウスでの解析からD1は網膜細胞, 乳腺上皮細胞<sup>24)</sup>, D2は卵巣, 精巣<sup>25)</sup>, D3は胸腺細胞<sup>26)</sup>で機能していることが示され, 細胞や組織系によって発現しているサブタイプとその果たす機能が異なっていることが明らかになっている. 癌細胞においてはサイクリンD1について多くの癌種で過剰発現していることが知られており, その細胞周期進行作用が発癌において重要な役割を果たすことが明らかとなっているが<sup>27)</sup>, サイクリンD2, サイクリンD3の役割についてはほとんど明らかになっていない. ただ, 最近頭頸部癌<sup>28)</sup>, メラノーマ<sup>29)</sup>においてサイクリンD3がD1とは独立にG1-S細胞周期進行を制御していることが報告されており, サイクリンD3もサイクリンD1とは異なった

機序で癌細胞の細胞周期進行に関与している可能性が示唆される. 本研究において, 緑膿菌クオラムセンシング分子3-O-C<sub>12</sub>HSLはサイクリンD1, D2には影響を与えず, 直接サイクリンD3の発現量を減少させRbの脱リン酸化とそれ以降の細胞周期の停止, 細胞増殖抑制を引き起こした. このことは, 肺癌細胞株においてもサイクリンD3がサイクリンD1とは独立に機能し, 癌細胞の細胞周期進行に重要な働きをしている可能性を示している. 今後, 肺癌細胞におけるサイクリンD3の機能解明をさらに進めていく必要があると考えられる.

今回, 3-O-C<sub>12</sub>HSLがA549細胞に対して細胞周期のG1期での停止と細胞増殖抑制を引き起こすことが明らかになったが, 同様な細胞周期の停止を標的にしている抗癌剤がいくつか存在する. Carlsonらは, 熱帯や亜熱帯に生息するMeliaceae属マホガニー科の*Dysoxylum binectariferum*の樹皮から抽出されるフラボノイド成分であるflavopiridolが, CDK2, 4, 6と複合体を作り細胞周期を停止させることを報告し<sup>30)</sup>, Kawakamiらは, *Streptomyces sp.*培養液から単離精製されたUCN-01は, 肺腺癌細胞に対してCDKインヒビター, p21を誘導し, CDK2の脱リン酸化とRbの脱リン酸化を引き起こし, G1期での細胞周期停止とアポトーシスを誘導することを報告している<sup>31)</sup>. その他コケムシ (*Bugula neritina*) から得られたマクロライド系化合物であるBryostatin-1がリンパ腫や骨髄腫に対して細胞周期の停止と細胞増殖抑制を引き起こす<sup>32)</sup>ことも報告されており, G1期細胞周期停止を誘導する分子は抗癌治療の注目すべき標的となっている. このことから今後3-O-C<sub>12</sub>HSLあるいはその類似構造物質の抗癌薬としての検討を重ねていく必要があると考えられる.

緑膿菌が感染している肺局所での3-O-C<sub>12</sub>HSLの濃度についてCharltonらは緑膿菌の形成するバイオフィルムの中では300-600 $\mu$ Mであると報告している<sup>33)</sup>. 従って本研究で3-O-C<sub>12</sub>HSLの明かな細胞周期停止効果がみられた100 $\mu$ Mは肺の緑膿菌感染局所では十分到達しうる濃度であり, 今回示された細胞周期停止やアポトーシスによる肺がん細胞株増殖抑制は生体内でも実際に起こりうる可能性がある. しかしながら, 3-O-C<sub>12</sub>HSLの抗腫瘍効果として見た場合そのIC<sub>50</sub>は40~60 $\mu$ M

であり, cisplatin  $1.7\mu\text{M}^{34}$ ), paclitaxel  $2\text{ nM}^{35}$ ), チロシンキナーゼ阻害薬であるGleevec  $2\sim 3\mu\text{M}^{36}$ ), 細胞周期のG1期での停止による抗癌作用をもつflavopiridolの $2.5\mu\text{M}^{37}$ )など多くの抗癌剤と比較して決して低いものとはいえない. Chunらは気道上皮細胞やA549細胞などを3-oxo-C<sub>12</sub>HSLを含む培養液で培養すると培養液中の3-oxo-C<sub>12</sub>HSLの濃度が著しく減少することを報告し, A549細胞が3-oxo-C<sub>12</sub>HSLを分解する酵素を生成している可能性があることを報告している<sup>22)</sup>. 未だその正体は明らかになっていないが, 今回のA549細胞に対する高いIC<sub>50</sub>はこのホモセリンラクトン分解酵素によるものかもしれない. このホモセリンラクトン分解酵素とそのホモセリンラクトンにおける作用点が同定されれば, 分解酵素を持たない癌細胞のみを治療標的とすることや, 分解酵素阻害あるいは作用点の改変により3-O-C<sub>12</sub>HSLにさらに強い抗腫瘍効果を与えることができる可能性がある. さらに, Kravchenkoらはホモセリンラクトンのアシル側鎖の長さの改変, ホモセリン環をラクタム環への変更, ホモセリン環の水酸化などにより, 各種ホモセリンラクトン誘導体を生成して, その構造的違いがストレス応答キナーゼp38や転写開始因子eukaryotic translation initiation factor 2 $\alpha$ の活性に影響を与えることを報告している<sup>23)</sup>. このことはこれら構造改変により3-O-C<sub>12</sub>HSLにより強い細胞増殖抑制効果を付加できる可能性を示しており, 今後の検討課題であろう.

今回我々は緑膿菌がクオラムセンシング分子として生成している3-O-C<sub>12</sub>HSLが, サイクリンD3のmRNAレベルでの発現抑制とRb蛋白の脱リン酸化を引き起こし, 細胞周期をG1期で停止することによって肺癌細胞に対して増殖抑制効果をもつことを見出した. 今後その作用機序のさらなる解明とともに, 3-O-C<sub>12</sub>HSLそのものあるいはその誘導体による抗腫瘍効果の検討が必要であると考えられる.

稿を終えるにあたり, 終始懇切なる御指導, 御校閲を賜りました鳥取大学医学部統合内科医学講座分子制御内科学分野清水英治教授, また御校閲を賜りました鳥取大学医学部病態解析医学講座薬物治療学分野長谷川純一教授, 同機能形態統御学講座適応生理学分野河合康明教授に深謝いたします. また, ご協力いただき

ました同分子制御内科学分野教室の諸先生方に厚く御礼申し上げます.

## 文 献

- 1) Richards MJ, Edwards JR, Culver DH, and Gaynes RP. Nosocomial infections in medical intensive care units in the United States. *Crit Care Med* 1997; 27: 887-892.
- 2) Berghmans T, Sculier JP, and Klastersky J. A prospective study of infections in lung cancer patients admitted to the hospital. *chest* 2003; 124: 114-120.
- 3) Hoiby N. Diffuse panbronchiolitis and cystic fibrosis: East meets West. *thorax* 1994; 49: 531-532.
- 4) Pearson JP, Passador L, Iglewski, BH and Greenberg EP. A second N-acylhomoserine lactone signal produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 1490-1494.
- 5) Pearson JP, Gray KM, Passador L, Tucker KD, Eberhard A, Iglewski BH and Greenberg EP. Structure of the autoinducer required for expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 197-201.
- 6) DiMango E, Zar HJ, Bryan R and Prince A. Diverse *Pseudomonas aeruginosa* gene products stimulate respiratory epithelial cells to produce interleukin-8. *J Clin Invest* 1995; 96: 2204-2210.
- 7) Smith RS, Kelly R, Iglewski BH and Phipps RP. The pseudomonas autoinducer N-(3-oxododecanoyl)homoserine lactone induces cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 production in human lung fibroblasts: implication for inflammation. *J Immunol* 2002; 169: 2636-2642.
- 8) Tateda K, Ishii Y, Horikawa M, Matsumoto T, Miyairi S, Pechere J C, Standiford T J, Ishiguro M and Yamaguchi K. The *Pseudomonas aeruginosa* autoinducer N-3-oxododecanoyl homoserine lactone accelerates apoptosis in macrophages and neutrophils. *Infect Immun* 2003; 71: 5785-5793.

- 9) Li Li, Hooi D, Chhabra SR, Pritchard D and Shaw PE. Bacterial N-acylhomoserine lactone-induced apoptosis in breast carcinoma cells correlated with down-modulation of STAT3. *Oncogene* 2004; **23**: 4894-4902.
- 10) Dolnick R, Wu Q, Angelino NJ, Stephanie LV, Chow KC, Sufrin JR and Dolnick B J. Enhancement of 5-fluorouracil sensitivity by an rTS signaling mimic in H630 colon cancer cells. *Cancer Res* 2005; **65**: 5917-5924.
- 11) Yoshimura K, Tanimoto A, Abe T, Ogawa M, Yutsudo T, Kashimura M and Yoshida S. Shiga toxin 1 and 2 induce apoptosis in the amniotic cell line WISH. *J Soc Gynecol Investig* 2002; **9**: 22-26.
- 12) Maekawa Y, Yagi K, Nonomura A, Kuraoku R, Nishiura E, Uchibori E and Takeuchi K. A tetrazolium-based colorimetric assay for metabolic activity of stored blood platelets. *Thromb Res* 2003; **109**: 307-314.
- 13) el-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW and Vogelstein B. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *cell* 1993; **75**: 817-825.
- 14) Liu G, Parant JM, Lang G, Chau P, Chavez-Reyes A, El-Naggar AK, Multani A, Chang S and Lozano G. Chromosome stability, in the absence of apoptosis, is critical for suppression of tumorigenesis in Trp53 mutant mice. *Nature Genet* 2004; **36**: 63-68.
- 15) Weinberg RA. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *cell* 1995; **81**: 323-330.
- 16) Dimberg A, Karlberg I, Nilsson K and Oberg F. Ser727/Tyr701-phosphorylated Stat1 is required for the regulation of c-Myc, cyclins, and p27Kip1 associated with ATRA-induced G0/G1 arrest of U-937 cells. *Blood* 2003; **102**: 254-261.
- 17) Sherr CJ and Roberts JM. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* 1993; **13**: 1501-1512.
- 18) Hu X, Bryington M, Fisher AB, Liang X, Zhang X, Cui D, Datta I and Zuckerman KS. Ubiquitin/Proteasome-dependent degradation of D-type cyclins is linked to tumor necrosis factor-induced cell cycle arrest. *The Journal of Biological Chemistry* 2002; **277**: 16528-16537.
- 19) Fuqua WC, Winans SC and Greenberg EP. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J Bacteriol* 1994; **176**: 269-275.
- 20) Miller MB and Bassler BL. Quorum sensing in bacteria. *Ann Rev Microbiol* 2001; **55**: 165-199.
- 21) Smith RS, Fedyk ER, Springer TA, Mukaida N, Iglewski BH and Phipps RP. IL-8 production in human lung fibroblasts and epithelial cells activated by the *Pseudomonas* autoinducer N-3-oxododecanoyl homoserine lactone is transcriptionally regulated by NF- $\kappa$ B and activator protein-2. *J Immunol* 2001; **167**: 366-374.
- 22) Chun CK, Ozer EA, Welsh MJ, Zabner J and Greenberg EP. Inactivation of a *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal by human airway epithelia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; **101**: 3587-3590.
- 23) Kravchenko VV, Kaufmann GF, Mathison JC, Scott DA, Katz AZ, Wood MR, Brogan AP, Lehmann M, Mee JM, Iwata K, Pan Q, Fearn C, Knaus UG, Meijler MM, Janda KD and Ulevitch RJ. N-(3-OXO-ACYL) homoserine lactones signal cell activation through molecular pattern recognition receptor pathways. *J Biol Chem* 2006; **281**: 28822-28830.
- 24) Sicinski P, Donaher JL, Parker SB, Li T, Fazeli A, Gardner H, Haslam SZ, Bronson RT, Elledge SJ and Weinberg RA. Cyclin D1 provides a link between development and oncogenesis in the retina and breast. *Cell* 1995; **82**: 621-630.
- 25) Sicinski P, Donaher JL, Geng Y, Parker SB, Gardner H, Park MY, Robker RL, Richards JS, McGinnis LK, Biggers JD, Eppig JJ, Bronson RT, Elledge SJ and Weinberg RA.

- Cyclin D2 is an FSH-responsive gene involved in gonadal cell proliferation and oncogenesis. *Nature* 1996; **384**: 470-474.
- 26) Sicinska E, Aifantis I, Le Cam L, Swat W, Borowski C, Yu Q, Ferrando AA, Levin SD, Geng Y, von Boehmer H and Sicinski P. Requirement for cyclin D3 in lymphocyte development and T cell leukemias. *Cancer Cell* 2003; **4**: 451-461.
  - 27) Malumbres M and Barbacid M. To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nat Rev Cancer* 2001; **1**: 222-231.
  - 28) Pruneri G, Pignataro L, Valentini S, Fabris S, Maisonneuve P, Carboni N, Pece S, Capra M, Del Curto B, Neri A and Viale G. Cyclin D3 immunoreactivity is an independent predictor of survival in laryngeal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2005; **11**: 242-248.
  - 29) Spofford L S, Abel EV, Boisvert-Adamo K and Aplin AE. Cyclin D3 expression in melanoma cells is regulated by adhesion-dependent phosphatidylinositol 3-kinase signaling and contributes to G1-S progression. *J Biol Chem* 2006; **281**: 25644-25651.
  - 30) Carlson BA, Dubay MM, Sausville EA, Brizuela L and Worland PJ. Flavopiridol induces G1 arrest with inhibition of cyclin-dependent kinase (CDK) 2 and CDK4 in human breast carcinoma cells. *Cancer Res* 1996; **56**: 2973-2978.
  - 31) Kawakami K, Futami H, Takahara J and Yamaguchi K. UCN-01, 7-hydroxylstaurosporine, inhibits kinase activity of cyclin-dependent kinase and reduces the phosphorylation of the retinoblastoma susceptibility gene product in A549 human lung cancer cell line. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; **219**: 778-783.
  - 32) Mutter R and Wills M. Chemistry and clinical biology of the bryostatins. *Bioorg Med Chem Lett* 2000; **8**: 1841-1860.
  - 33) Charlton TS, de Nys R, Netting A, Kumar N, Hentzer M, Givskov M and Kjelleberg S. A novel and sensitive method for the quantification of N-3-oxoacyl homoserine lactones using gas chromatography-mass spectrometry: application to a model bacterial biofilm. *Environ. Microbiol* 2000; **2**: 530-541.
  - 34) Perez EA, Hack FM, Webber LM and Chou TC. Schedule-dependent synergism of edatrexate and cisplatin in combination in the A549 lung cancer cell line as assessed by median-effect analysis. *Cancer Chemother Pharmacol* 1993; **33**: 245-250.
  - 35) Pasquier E, Honore S, Pourroy B, Jordan MA, Lehmann M, Briand C and Braguer D. Antiangiogenic concentrations of paclitaxel induce an increase in microtubule dynamics in endothelial cells but not in cancer cells. *Cancer Res* 2005; **65**: 2433-2440.
  - 36) Zhang P, Gao WY, Turner S and Ducatman BS. Gleevec (STI-571) inhibits lung cancer cell growth (A549) and potentiates the cisplatin effect in vitro. *Mol Cancer* 2003; **2**: 1-9.
  - 37) Kaiser A, Nishi K, Gorin FA, Walsh DA, Bradbury EM and Schnier JB. The cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitor flavopiridol inhibits glycogen phosphorylase. *Arch Biochem Biophys* 2001; **386**: 179-187.