

〔原 著〕

細胞内TNFは口腔癌細胞のTNFアポトーシス  
シグナルに対して抵抗因子として働いている

萩野 司, 奥村 一彦, 富岡 敬子, 金澤 正昭

北海道医療大学歯学部口腔外科科学第一講座

(主任: 金澤 正昭教授)

Expression of endogenous tumor necrosis factor functions  
as a resistance factor against TNF-induced apoptotic  
cell death in oral squamous carcinoma cells

Tsukasa HAGINO, Kazuhiko OKUMURA,  
Keiko TOMIOKA, and Masaaki KANAZAWA

First Department of Oral Maxillofacial Surgery, School of Dentistry,  
Health Sciences University of Hokkaido

(Chief : Prof. Masaaki KANAZAWA)

**Abstract**

The tumor necrosis factor (TNF) is known for potent antitumor activity both in vitro and in vivo. However, certain kinds of tumor cells are reported to be resistant even to TNF. Based on previous findings that endogenous TNF (en TNF) acts as an intracellular resistance factor against exogenous TNF by scavenging oxygen free radicals with induced manganous superoxide dismutase (MnSOD). The present study examined the involvement of caspase and en TNF in apoptotic cell death of TNF resistant oral squamous cell carcinoma cells (OSCC). The results were as follows: T. T cells were more TNF-highly sensitive than other OSCC; T. T cells displayed lower expression of MnSOD activity and en TNF protein; a nonsecretory human TNF gene transfected into T. T cells was highly MnSOD active and inhibited TNF-induced apoptotic cell death; Parent T. T cells mediated TNF-induced apoptotic cell death by the reactive oxygen species (ROS) downstream caspase-3. These findings suggest that en TNF exerts a protective effect against TNF-induced apoptotic cell death by inducing MnSOD

to scavenge ROS downstream caspase-3.

**Key words :** Oral squamous carcinoma cells, endogenous TNF, MnSOD, Trasfection, apoptotic signal.

## I. 緒 言

TNF (腫瘍壊死因子: Tumor Necrosis Factor) は当初, マクロファージ/単球に由来する抗腫瘍性サイトカインとして発見されたが, その後, 腫瘍細胞に限らず正常細胞に対しても多彩な生理活性を有し, 炎症や免疫監視機構において重要な役割を担っていることが明らかとなった. TNFは, インターフェロンなど他の抗腫瘍性サイトカインと比較して, 強力な腫瘍細胞傷害活性を有している<sup>1)</sup>. その機序として, TNF分子が腫瘍細胞膜表面に存在するレセプターに結合したのち, シグナル伝達が起こり,  $\text{Ca}^{2+}$ の細胞内への流入, 活性酸素の産生, ライソゾーム酵素の活性化, 膜の過酸化, エンドヌクレアーゼ活性化, などが惹起され, 細胞を崩壊させると想定されている<sup>2-3)</sup>. しかし, これらの抗腫瘍活性は腫瘍細胞の種類によってその表現の様式が異なり, 顕著な壊死が主体となるものの, 増殖抑制効果のみを示すものなどさまざまである<sup>4)</sup>. また, 抗腫瘍活性が全く認められない腫瘍も, 少数ながら存在するのも事実である<sup>5)</sup>. これまで, 組換えヒトTNFの臨床試験では, 皮膚腫瘍や肝癌, 膵癌への腫瘍内投与<sup>6)</sup>および脳腫瘍への動注療法<sup>7)</sup>では有効性が確認されたが, 全身投与では, 発熱, 血圧低下などの副作用に加え, 奏効率は5%前後と低く<sup>8)</sup>, 満足できる成績を得ることができなかった. その要因として, TNF受容体の欠如やTNFの攻撃から細胞を防御する因子の存在が考えられた. これらの腫瘍細胞では, 細胞内グルタチオン (GSH) や活性酸素の消去酵素 (superoxide dismutase: SOD) の一つであるMnSOD, 抗酸化

物質がTNFの細胞傷害性を低下させることから, TNFにより産生される活性酸素を消去することで, 耐性因子として機能すると考えられている<sup>9-10)</sup>.

一方, これまで, 抗腫瘍サイトカインを産生分泌する細胞は, 決して自らを傷害しないという事実から, 細胞内に存在するTNF (endogenous TNF: enTNF) が防御因子として働いている可能性が検討されてきた. その結果, TNF耐性細胞では実際にenTNFが恒常的に発現しており, TNF感受性細胞ではそれがみられないこと, またTNF感受性細胞でもTNF刺激によりenTNFの誘導が起きることが報告された<sup>11)</sup>. 以上の事実は, enTNFがTNFの耐性に関与する主要な因子の一つであることを裏付けている.

また近年, Satoら<sup>12)</sup>によってTNFの細胞傷害作用の本体は, TNFが細胞表面に存在するレセプターに結合した後, カスパーゼが活性化されることにより惹起されるアポトーシスであることが報告された. しかしながら, このカスパーゼを介したアポトーシスシグナルとTNFに対する防御シグナルの関連について検討した報告はこれまでみられない.

そこで本研究では, 口腔癌治療の一助となすべく, 顎口腔領域における癌細胞のTNFによるアポトーシス誘導作用に対して, enTNFが実際に抵抗性因子として働いているのか, さらに, アポトーシスシグナルにおいて, どのような機序で抵抗性因子として作用しているかについて解析した.

**Table 1** Characteristics of oral carcinoma cell lines.

Strain	Origin and establish	Histological type
T. T	esophagus / mandibular bone metastasis	SCC
HSC-3	tongue / cervical lymph node metastasis	SCC
Ca9-22	gingiva / primary site	SCC
BSC-OF	floor of mouth / primary site	SCC
SAS	tongue / primary site	SCC

SCC : squamous cell carcinoma

## II. 材料と方法

### 1. 細胞

対照として、5種類のヒト口腔癌細胞株、T. T細胞<sup>13)</sup>、HSC-3細胞<sup>14)</sup>、Ca9-22細胞<sup>15)</sup>、BSC-OF細胞<sup>16)</sup>およびSAS細胞<sup>17)</sup>を用いた (Table 1). 食道癌の下顎骨転移巣から樹立した扁平上皮癌細胞株T.Tの他は、いずれも口腔由来の扁平上皮癌細胞である。BSC-OF細胞は、当教室で樹立継代しているものを使用し、その他の細胞はJapanese cancer research resources bank (JCRB) より供与された。細胞の培養は、T. T, BSC-OF および SAS は10%牛胎児血清 (fetal bovine serum, FBS, Flow Laboratories Inc. MA, USA) を加えたDulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F-12; Gibco BRL, Grand Island, USA) で、また、HSC-3 およびCa9-22は10% FBSを加えたDulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Gibco BRL) で培養した。FBSは、56°C, 30分で加温し非働化後使用した。なお、いずれの培養液にもペニシリンG (100U/ml) およびストレプトマイシン (100μg/ml) を添加した。培養は37°C, 5%CO<sub>2</sub>下のインキュベーター中で行った。すべての継代培養に際しては、0.1%トリプシン・0.1mMエチレンジアミン4酢酸溶液 (T/E) で細胞を分散し、75cm<sup>2</sup>組織培養フラスコ (Falcon3110, Becton Dickinson, MA, USA) に播種した。

なお、活性酸素産生量を測定する実験系ではヒト白血病細胞株HL-60細胞を用いた。

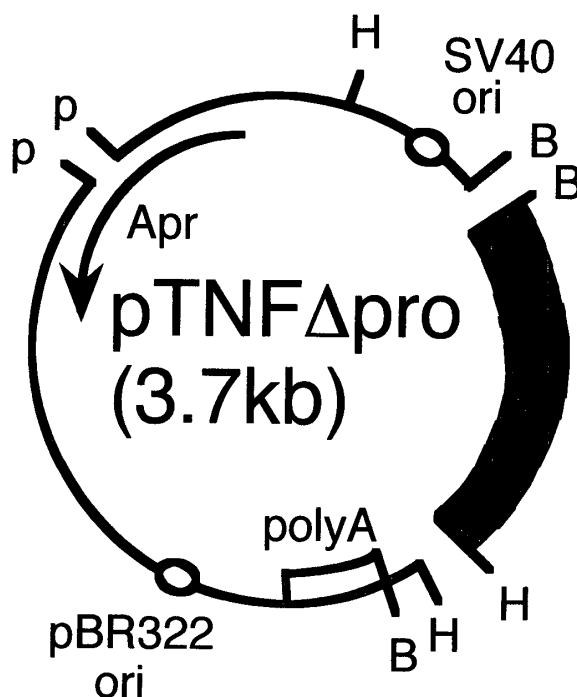
### 2. プラスミド

TNF発現ベクターであるpcDV-TNF (pTNFΔpro) およびネオマイシンG418耐性遺伝子をコードするpSV2neoは旭化成工業株式会社から供与を受けた。

今回使用した非分泌型TNF発現ベクター (pTNFΔpro) は、leader sequenceが欠失した構造となっているため、これによって発現したTNFは細胞外には分泌されないことを確認している (Fig.1)<sup>18)</sup>。

### 3. ヒトrecombinant tumor necrosis factor およびその抗体

ヒトrecombinant TNF (以下rhTNF) および抗rhTNFモノクローナル抗体とポリクローナ



**Fig. 1** TNF expression plasmid map. ■, mature human TNF sequence; SV40 ori, the region of SV40 origin containing the SV40 early promoter; poly A, SV40 polyadenylation site; Apr<sup>r</sup>, ampicillin resistance gene; B, Bam HI; H, Hind III; P, Pst I; kb, kilobases.

ル抗体（家兎）は旭化成工業株式会社から供与された。rhTNF濃度は、 $2.14 \times 10^7$  units (8.67 mg)/mlである。

#### 4. 遺伝子導入法

非分泌型TNF発現ベクター (pTNF $\Delta$ pro) の遺伝子導入はlipofection法により行った。すなわち、10%FBS添加DMEM/F-12で  $3 \times 10^5$ /ml に調整したT.T細胞 3 mlを35mmdishに加え18時間培養し細胞の接着を確認した後、Opti-MEM® I Reduced Serum (Gibco BRL) で洗浄し、同培養液 3 mlに交換した。次に、20% FBS 添加 DMEM/F-12培養液 3 mlと20 $\mu$ g pTNF $\Delta$ proまたはpSV2neo 1.5 $\mu$ g添加plasmid-lipofection reagent (Gibco BRL) 100 $\mu$ lで24時間、37°Cの培養を行った。その後、3 mlの20% FBS添加DMEM/F-12培養液を加え、さらに48時間培養した。さらに、10%FCS添加DMEM/F-12培養液と300 $\mu$ g/mlのG418 (Sigma, St. Louis, MA, USA)で14日間培養した後、安定な状態で発現した遺伝子導入細胞を選択した。

#### 5. 細胞傷害性の判定法

5種類のヒト口腔癌細胞株とpTNF $\Delta$ proを組み込んだT.T細胞のin vitroにおけるrhTNFに対する感受性を、dye-uptake法で判定した<sup>2)</sup>。すなわち、標的細胞を $1 \times 10^5$ /mlに調整し、96well培養プレート (Corning Coster3599, Tokyo, Japan) を用いて100 $\mu$ l/wellで播種し、0.01から1000U/ml濃度のヒトrhTNF溶液100 $\mu$ lを加え、37°C、5%CO<sub>2</sub>下で48時間培養した後、グルタルアルデヒド溶液20 $\mu$ lを加え30分間固定、水洗、乾燥し、0.05%メチレンブルー溶液で染色した。その後、0.03N HCl溶液200 $\mu$ lを加え、ELISA analyzer (日本インターメッド株式会社、東京、日本) を用いて波長620nmで吸光度を測定した。%cytotoxicityの計算には次の式を用いた。

$$\% \text{cytotoxicity} = [1 - (\text{TNF処理細胞の} A_{620} / \text{TNF非処理細胞の} A_{620})] \times 100\%$$

なお、TNF活性は細胞傷害性試験でマウス線維芽細胞由来のL-M細胞に対し50%cytotoxicityを示す濃度を1 unit (U) とした。

#### 6. MnSOD活性の測定法

Oberleyらの方法に準じ<sup>19)</sup>、NBT法により測定した。すなわち、 $2 \times 10^6$ 個のT.T細胞を1 mlのリン酸カリ緩衝液 (PPB, pH 7.8) に懸濁し、水中Biosonic超音波処理により凍結融解し、4°C、3000rpm、5分間遠心分離後、上清を回収し細胞懸濁液とした。この細胞懸濁液0.1mlに、1.33mM DETAPAC (ジエチレントリアミンペンタアセティックアシッド) 含有リン酸カリ緩衝液 (pH7.8)、1.8mMキサンチン添加PPB、0.33mM NaCN添加PPB、2.24mM NBT (ニトロブルーテトラゾリウム) 添加PPB、および40 unit/mlカタラーゼ添加PPBを混合した試薬を0.8ml加え、0.01unit/mlキサンチンオキシダーゼ添加DETAPAC含有リン酸カリ緩衝液0.1mlを加えて反応させ、MnSOD活性を測定した。

#### 7. enTNF発現量の測定法

細胞を $2 \times 10^5$ 個/mlに調整し、その100 $\mu$ lを96well培養プレート (Corning Coster 3599) に100 $\mu$ l/wellで播種し、これに4%パラホルムアルデヒド添加PBS溶液を150 $\mu$ lずつ加え、室温で10分間固定した。次に0.2%Triton添加PBS溶液100 $\mu$ lを加え、5分浸漬した後、1%羊血清添加PBS溶液100 $\mu$ lを加えた。その後、インキュベーター中で37°C、30分静置し、次に、FITC標識抗TNFモノクローナル抗体で反応後に洗浄した。これらの試料を、Titertek Fluoroscan II (Flow Laboratories, Helsinki, Finland) を用いて485-538nmの波長で蛍光強度を測定し、enTNFの発現量とした<sup>20)</sup>。

## 8. アポトーシスの検出法

アポトーシスの検出は、山田らのDNAの電気泳動(ラダー検出法)により行った<sup>21)</sup>。すなわち、100U/ml濃度のTNFで48時間処理した細胞  $2 \times 10^6$ 個と無処理の細胞  $2 \times 10^6$ 個からDNAを抽出して2.5%アガロースゲル電気泳動を行い、DNA断片化の有無を検討した。また、caspase 1 (ICE: interleukin-1  $\beta$  converting enzyme) の特異的阻害剤YVAD-CMK (100ng/ml) および、caspase 3 (CPP32) の特異的阻害剤DEVD-CHO (100ng/ml) を、TNF100U/mlと同時に添加し、DNA断片化について阻害剤の効果を検討した。

## 9. 活性酸素量の測定法

HL-60細胞を  $1 \times 10^6$ 個に対して、0.1mMジヒドロロードミン123 (DHR) と100ng/mlのTNFを添加して60分培養した。DHRは発生した活性酸素 ( $O_2^-$ ) によって酸化されて蛍光を発するので、これをFACScanのFL1で測定した。各サンプルの活性酸素量は、PBS添加のコントロール群を1とした平均値の相対比で表した。

## 10. caspase 3 (CPP32) 活性の測定法

100ng/mlのTNFで2時間処理した  $1 \times 10^6$ 個のT.T細胞と無処理の  $1 \times 10^6$ 個のT.T細胞に蛍光標識したペプチドとロードミンからなる基質を添加し、1時間37°Cでインキュベートした。これによりCPP32とペプチドが反応し、基質が切断されて発する蛍光波長をFACScanで測定し、caspase 3 (CPP32) 活性とした<sup>22)</sup>。

# III. 結 果

## 1. 各種ヒト口腔扁平上皮癌細胞株のTNF感受性

5種の口腔扁平上皮癌細胞株のTNF感受性をdye-uptake法で検討した。その結果、TNF感受性には細胞間で差が認められ、TNF 1 U/

mlの濃度で、T.Tは47.9%の細胞生存率を示しTNF高感受性であったが、SASではまったく感受性を認めず、全細胞が生存していた。また、HSC-3で98.4%、Ca9-22で93.6%、BSC-OFでは87.1%の細胞生存率を示した (Fig.2)。

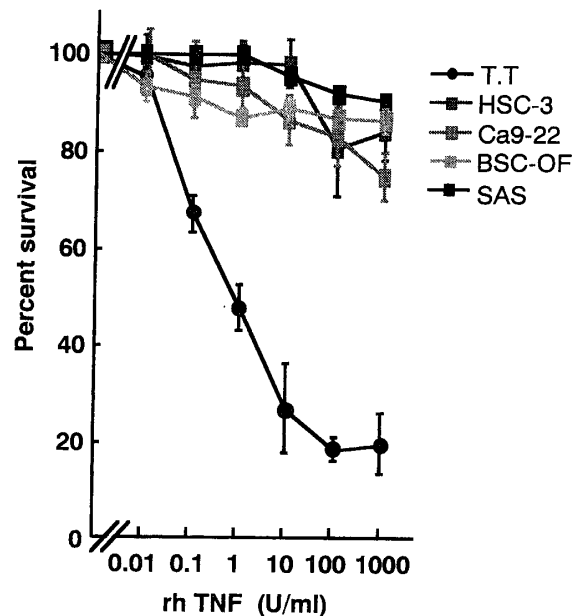


Fig.2 TNF-sensitivity of oral carcinoma cell lines.

## 2. 各種ヒト口腔扁平上皮癌細胞株のMnSOD

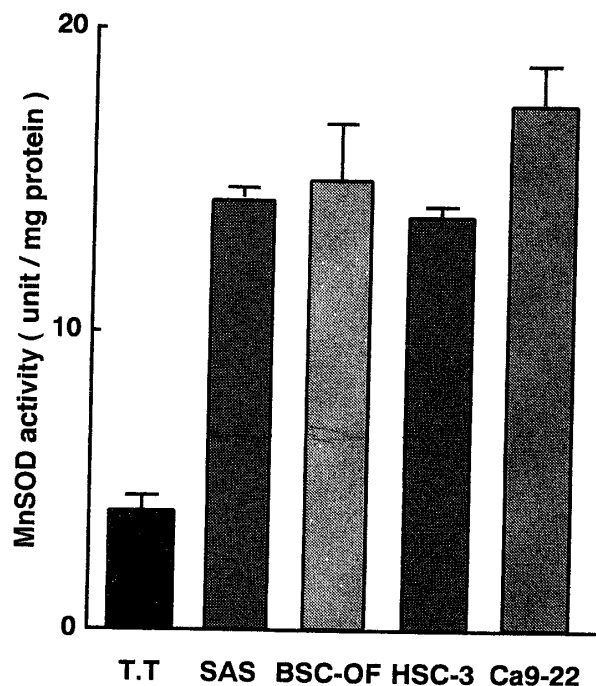


Fig.3 MnSOD activity of oral carcinoma cell lines.

### 活性

各細胞のMnSOD活性を測定したところ、TNFに最も高感受性のT.Tでは活性が3.9U/mg proteinであったが、TNFにまったく感受性を示さないSASでは、活性が14.7U/mg proteinと高値であった。また、TNF低感受性であるHSC-3、Ca9-22およびBSC-OFのMnSOD活性もT.Tに比べ3.0-4.4倍と高値であった (Fig.3)。

### 3. 各種ヒト口腔扁平上皮癌細胞株のenTNF発現量

ヒト口腔扁平上皮癌細胞株のenTNF発現量について検討したところ、MnSOD活性と同様に、TNF高感受性細胞のT.Tでは、SASをはじめとして他のTNF低感受性細胞であるHSC-3、Ca9-22およびBSC-OFに比べ、ほぼ1/2と低値を示した (Fig.4)。

### 4. TNF遺伝子導入クローンのenTNF発現量

TNF高感受性であるT.Tに、非分泌型TNF発現ベクターpTNF $\Delta$ proを導入し、G418で選択後、3つのenTNF高発現クローンT.T $\Delta$ pro 1,

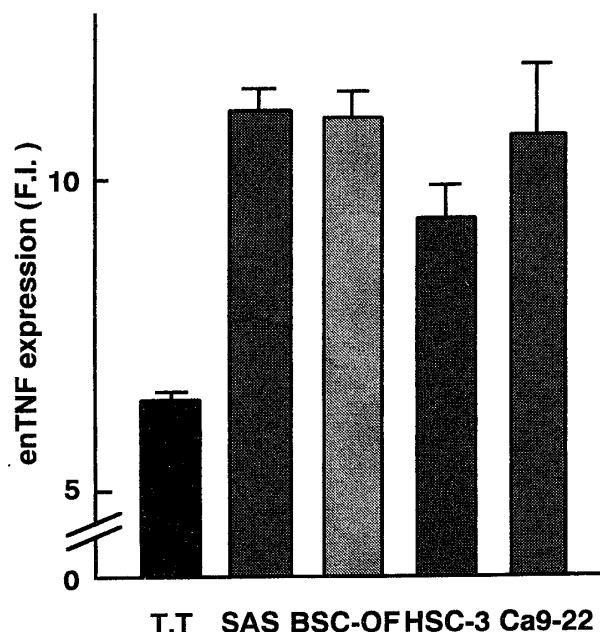


Fig. 4 enTNF expression of oral carcinoma cell lines.

2 および 3 を得た。次に、これらのクローンのenTNFの発現量について検討した。その結果、親細胞であるT.Tおよびneo遺伝子導入クローンと比べて、T.T $\Delta$ pro 1, 2 および 3 ではenTNFの発現量はそれぞれ1.5倍, 1.3倍および1.4倍と高い値を示した (Fig.5)。

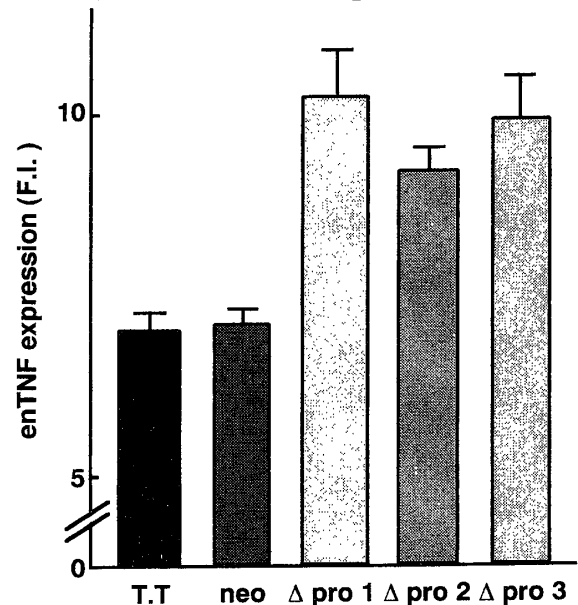


Fig. 5 enTNF expression in clones of TNF-gene transduced T.T cells.

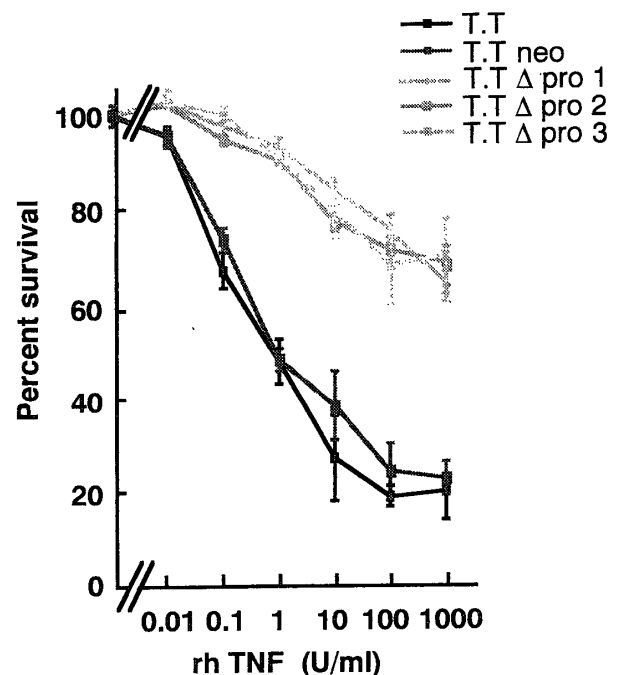


Fig. 6 Induction of TNF resistance by transduction of TNF-gene into T.T cells.

### 5. enTNF高発現クローンのTNF感受性

得られたクローンについて、TNFに対する感受性を検討した。その結果、TNF濃度が1 U/mlの際には、親細胞T.TおよびNeo遺伝子導入細胞の細胞生存率はそれぞれ47.9%と48.4%であったのに対し、T.T $\Delta$ pro 1, 2および3は、98%, 91%および93%と、いずれもTNFに対して高い生存率を示した (Fig.6)。

### 6. enTNF高発現クローンのMnSOD活性の変化

T.T細胞にTNF遺伝子を導入した際の細胞内MnSOD活性の変化を検討した。その結果、親細胞T.Tおよびneo遺伝子導入細胞と比べて、TNF遺伝子導入クローン $\Delta$ pro 1, 2および3では、いずれも細胞内MnSOD活性が6.6倍, 4.4倍および5.3倍と増加した (Fig.7)。

### 7. T.TにおけるTNF誘導アポトーシス

TNFによる細胞生存率の低下は、TNF感受性細胞の死を意味する。そこで、この細胞死がアポトーシスであるかどうかをDNA断片化によって検討した。その結果、TNF高感受性細胞であるT.Tでは、TNF100U/mlの処理によっ

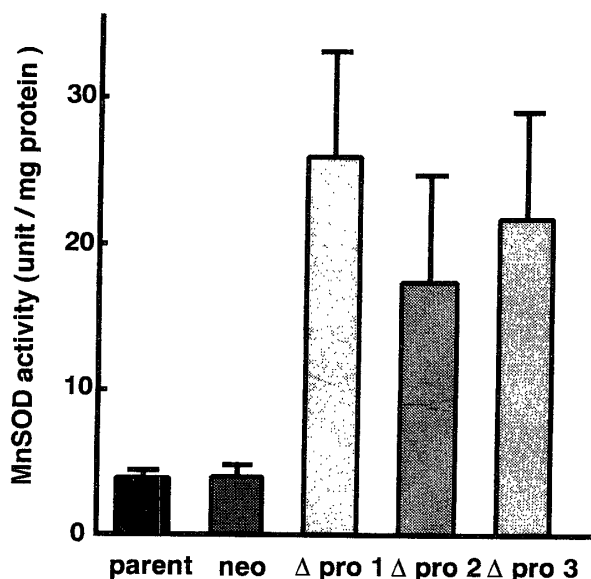


Fig. 7 MnSOD activity in clones of TNF-gene transduced T.T cell.

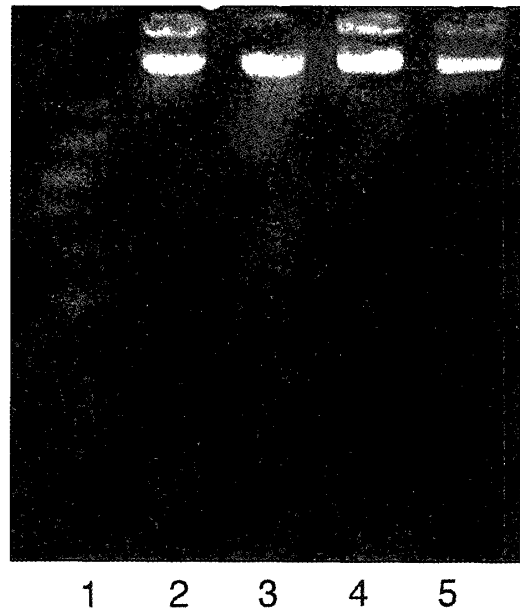


Fig. 8 DNA fragmentation on T.T cells by TNF (100U/ml) and apoptosis inhibitor. 1: marker; 2: TNF(-); 3: TNF(+); 3: TNF(+); 4: TNF+YVAD; 5: TNF+DEVD. YVAD: caspase 1 inhibitor(YVAD-CMK); DEVD: caspase 3 inhibitor(DEVD-CHO)

て、明らかなDNA断片化が観察された。しかし、TNF未処理のT.TではDNA断片化を認めなかった。さらに、caspase 1 (ICE: interleukin-1  $\beta$  converting enzyme) の特異的阻害剤 YVAD-CMKおよびcaspase 3 (CPP32) の特異的阻害剤DEVD-CHOを添加することにより、TNFにより惹起されるDNA断片化が抑制され

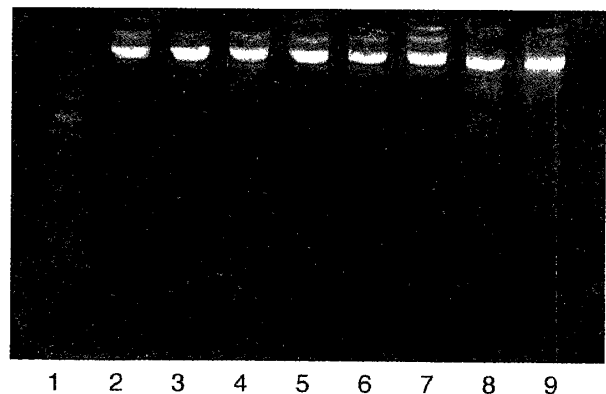


Fig. 9 DNA fragmentation by TNF. 1: marker; 2: T.T  $\Delta$  pro 2; 3: T.T  $\Delta$  pro 1; 4: TNF + T.T  $\Delta$  pro 2; 5: TNF +  $\Delta$  pro 1; 6: neo; 7: parent; 8: TNF + neo; 9: TNF + parent.

た (Fig.8).

### 8. enTNF遺伝子導入細胞におけるアポトーシスの抑制

親細胞T.Tとneo遺伝子導入細胞をTNF 100 U/mlで処理すると、DNA断片化が認められたが、enTNF遺伝子導入細胞であるpTNF $\Delta$ pro 1 および 2 をTNFで処理してもDNA断片化は、ほとんどみられなかった (Fig.9).

### 9. TNF処理における活性酸素とcaspase 3 活性の関連

本研究に用いた口腔扁平上皮癌細胞は、いずれも比較的活性酸素の産生量が少ないため、活性酸素の測定に必要な産生量が得られなかった。そこで、活性酸素の産生量が比較的多いHL-60細胞を用いて、TNF処理による活性酸素の産生量を検討した。その結果、TNF0.1ng/mlの処理から濃度依存的に活性酸素の産生が上昇し、TNF 100ng/mlの処理の時点でプラトーとなることが示された (Fig.10)。このことから、以後の実験では100ng/ml濃度でTNF処理を行った。

まず、TNF処理による活性酸素産生能に

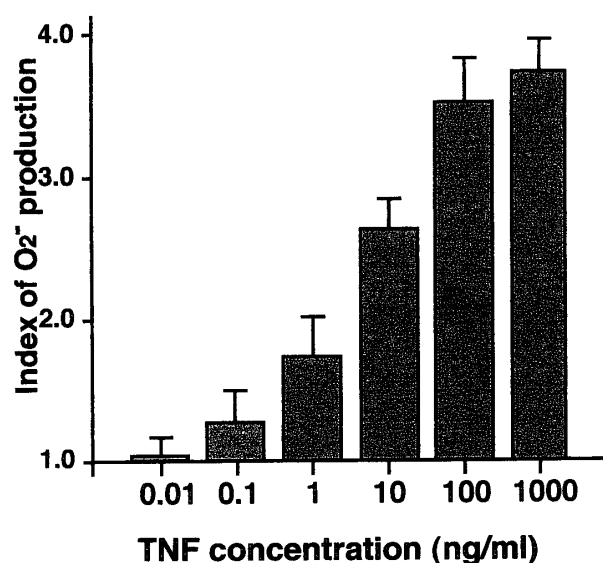


Fig.10 O<sub>2</sub> production induced by TNF. Incubation time 60 minutes.

caspase 3 が関与するか否かを検討するため、TNF処理HL-60細胞にcaspase 3 活性の特異的阻害剤DEVD-CHOを添加した。その結果、DEVD-CHOの濃度が増強するにつれて、HL-60細胞の活性酸素の産生量は減少した (Fig.11)。次に、HL-60細胞をTNF100ng/mlで処理すると、caspase 3活性は無処理HL-60細胞

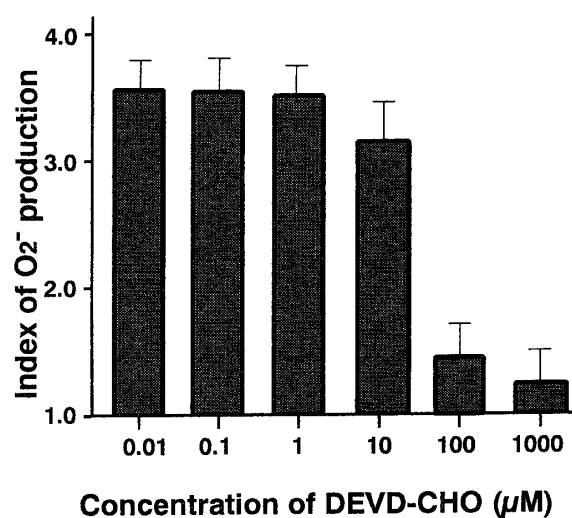


Fig.11 Effects of caspase 3 inhibitor(DEVD-CHO) on TNF-induced O<sub>2</sub> Production.

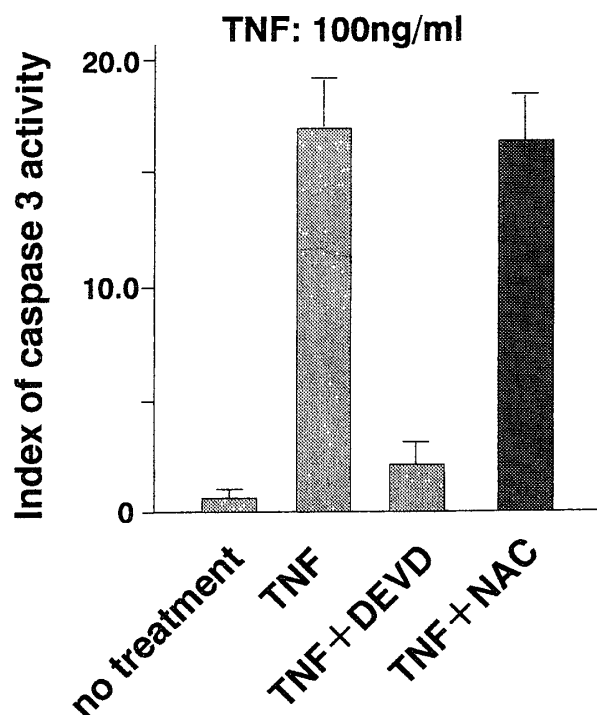


Fig.12 Effects of caspase 3 inhibitor(DEVD-CHO) and antioxidant(NAC)on caspase 3 activity induced by TNF.

胞に比し30倍に上昇したが、これに100 $\mu$ MのDEVD-CHOを添加すると、caspase 3 活性は約1/7に低下した。また、抗酸化剤であるNAC(N-アセチルシステイン)により、活性酸素の産生能を阻害したHL-60細胞をTNFで処理すると、caspase 3 活性は上昇した (Fig.12)。

#### 10. enTNF高発現クローンのカスパーゼ活性

enTNF高発現クローンを用いて、enTNFがcaspase 3 活性に与える影響を検討した。その結果、TNF 100ng/ml処理により親細胞T.TおよびenTNF高発現クローンのいずれにおいてもcaspase 3 活性が上昇したが、両者の間に差は認められなかった (Fig.13)。

### IV. 考 察

周知の如く、腫瘍細胞とくに悪性腫瘍細胞は自律性の発育を示し、浸潤性増殖さらには転移を来し、生体を死に至らしめる。近年の癌研究は、癌細胞の増殖、分化、薬剤耐性といった分野を中心に進められ、癌細胞の増殖抑制、分化を誘導する新しい抗癌剤が開発されてきている。しかし、多くの固形癌においては、抗癌剤はその進行をある程度抑えるにとどまり、完治

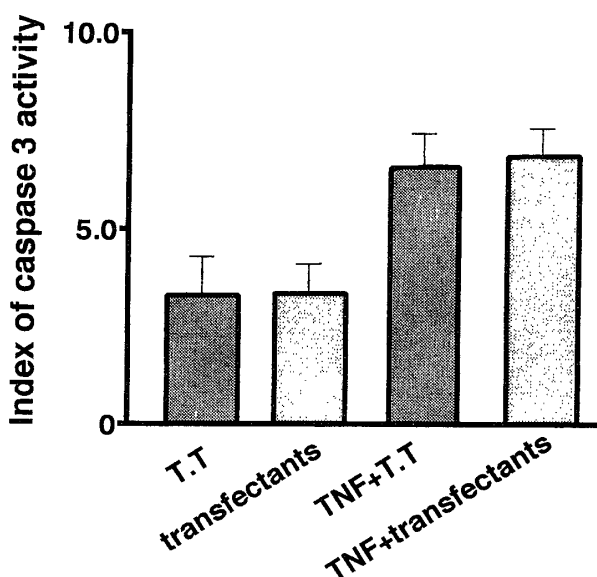


Fig.13 Caspase 3 activity of T.T cells and enTNF transfectants induced by TNF.

に至るまでの効果はあまり期待できないのが現状である。

TNFは、強力な抗腫瘍活性を有することから、制癌剤としての臨床応用に期待がもたれたが、必ずしも満足すべき効果 (奏功率) は得られていない。その原因として、TNFの全身投与により惹起される発熱、血圧低下、血小板減少などの副作用のため、十分な抗腫瘍効果が得られる量を投与できないことと、腫瘍細胞のTNF傷害活性に対する抵抗因子の存在が考えられている<sup>23)</sup>。

TNFは受容体を介して作用を発揮する抗腫瘍性サイトカインであることから<sup>1,3-5,23-30)</sup>、その細胞傷害作用の特異性は、まずはじめに受容体との相互作用によって規制されている。Niitsuら<sup>31)</sup>は、受容体に受け渡されたシグナルが細胞内に伝達されると様々な酵素反応が惹起された結果、細胞が致死反応を引き起こすと報告している。また、Watanabeら<sup>32)</sup>は正常細胞にもTNFの受容体があるため、細胞傷害シグナルは細胞内へ伝達されるが、先に述べた酵素反応が弱い、あるいはそれを阻止するような機構が存在するため細胞は死に至らないと報告している。換言すれば、TNFの細胞障害特異性を規制する第2の関門は酵素反応を引き起こす感受性の差によることが示唆される。このような酵素反応の一つに活性酸素の産生が挙げられるが、この活性酸素が細胞を傷害することによりTNFは抗腫瘍効果を発揮するといわれている<sup>2)</sup>。

しかしながら、Tsujimotoら<sup>33)</sup>とSugarmanら<sup>34)</sup>によると、TNFの標的細胞の感受性スペクトラムは必ずしも受容体の有無によって規定されないことを報告している。同様に、ShepardとLewis<sup>35)</sup>も、細胞の種類によっては、受容体を有していながらもTNFの傷害を受けないものがあることを示した。このような細胞 (正常細胞および一部の腫瘍細胞) は、いわば自然耐性の状

態にあると考えられる。

さらに, Himeno ら<sup>18)</sup>, Hanada and Shimoyama<sup>36)</sup>は, TNF感受性細胞を低濃度のTNF存在下で繰り返し培養すると次第にTNFに対する耐性(抵抗性)を獲得し, TNF感受性細胞は, TNF非感受性細胞となると報告している。以上のことから, TNF耐性には, 自然耐性と獲得耐性の両者が存在する。しかし, どのような抵抗性が, どのような機序によって発現するのかという点については, これまでのところ, 明確な結論が得られていないが, 腫瘍細胞のTNF受容体の欠如や, TNFの攻撃に対する防御因子の存在が推測される。これら防御因子としては, GSHやMnSOD, 抗酸化物質などが, TNFにより産生される活性酸素を消去することで, 耐性因子として機能すると考えられている<sup>9-10)</sup>。一方, Niitsu ら<sup>11)</sup>は, 抗腫瘍性サイトカインを産生分泌する細胞は, 決して自らを傷害しないという事実に着目し, 細胞内に存在するTNF(enTNF)が防御因子として働いていることを明らかにした。実際にTNF耐性細胞において, enTNFが構成的に発現し, 抵抗性因子として作用することを, ヒト線維肉腫細胞やヒト子宮頸癌細胞を用いて, TNF発現ベクターおよびantisense TNF発現ベクター遺伝子導入実験により示された<sup>18)</sup>。しかし, TNFのアポトーシスシグナル伝達経路中でenTNFがどのように作用して, TNFに対する抵抗性獲得をもたらすのかは未だ解明されていない。

そこで本研究では, この点を明らかにするため, ヒト口腔扁平上皮癌細胞株を用いて遺伝子導入法によりenTNF誘導可能な細胞を樹立した。さらに, この樹立細胞について, enTNFを介したTNF抵抗性獲得に対するMnSODの関与と, アポトーシスシグナル伝達経路におけるenTNFの役割を検討した。

## 1. 各種ヒト口腔扁平上皮癌細胞株について

本研究で用いた5種類のヒト口腔扁平上皮癌細胞株は, 既に各施設で樹立され, これらの細胞株を用いた種々な研究がなされている<sup>13-17, 37-39)</sup>。このうち, とくに臨床的にも口腔扁平上皮癌の代表といわれている舌癌からの樹立細胞であるSAS細胞については数多くの研究がみられる<sup>37-39)</sup>。

Okumura ら<sup>37)</sup>は, SAS細胞から, RLE (Rat Lung Endothelial) monolayer (単一層) への浸潤能の異なるクローンである高浸潤クローンSAS-H1細胞と低浸潤クローンであるSAS-L1細胞を樹立し, Muramatsu ら<sup>38)</sup>は, それらの細胞内SOD活性を測定するとともにその運動能についても検討している。また, 奥村ら<sup>39)</sup>は, 培養ヒト口腔扁平上皮癌細胞8株を用いて, 癌細胞が産生する活性型TGF- $\beta$ 1がオートクリン・ループを形成し, その浸潤能を増強する可能性について検討しているが, その際用いられた細胞は, 本研究で用いた細胞とほぼ同様の細胞である。

さらに, これらの細胞については他にも各種の研究結果が報告されており<sup>40)</sup>, 顎口腔領域の腫瘍に関する実験に用いるには, 適切な細胞株であると考えられる。

## 2. 各種ヒト口腔扁平上皮癌細胞株のMnSOD活性とenTNFについて

活性酸素のなかのスーパーオキシド( $O_2^-$ )の消去剤であるSODは, McCordとFridovich<sup>41)</sup>によって発見され, その後の活性酸素に関する研究を飛躍的に発展させた。これらのSODは, そのなかに含まれている金属によって, 3つに分類される。すなわち, Cu-ZnSOD, MnSODおよびFeSODである。WongとGoeddel<sup>10)</sup>は, A549(ヒト肺癌)細胞を対象とし, TNF刺激後の各種抗酸化酵素(MnSOD, Cu-ZnSOD, カタラーゼ, グルタチオンペルオキシダーゼ, チトクロームCオキシダーゼ)のmRNA量の変化を

調べたところ、MnSODのmRNAのみが増加していたと報告している。また、TNF感受性の有無にかかわらず、各種の細胞をTNFで刺激すると、いずれの細胞もMnSODのmRNA量が増加し、その増加率はTNF感受性の腫瘍細胞に比べ、非感受性の腫瘍細胞および正常細胞でとくに高いことから、MnSODの増加が腫瘍細胞のTNFに対する抵抗性獲得因子の一つであると報告している。

そこで、ヒト口腔扁平上皮癌細胞株について、この点に着目し検討した。その結果、TNF感受性細胞ではMnSOD活性は低く、TNF非感受性細胞ではMnSOD活性が高いことが確認された。このことから、ヒト口腔扁平上皮癌細胞株においてもMnSODはTNFに対して抵抗性因子として働くことが示唆された。

さらに本研究では、Niitsuら<sup>11,24)</sup>が報告した抵抗性因子の一つであるenTNFに注目し、ヒト口腔扁平上皮癌細胞株のenTNF発現量を測定した結果、TNF感受性であったT.T細胞に比べ、TNF非感受性細胞ではenTNF発現量は高値を示した。このことはTNFの感受性とenTNFの間に負の相関関係があることを示唆した。従って、enTNFも、先のMnSODとともに、ヒト口腔扁平上皮癌細胞においてTNF抵抗性因子として重要な働きを有することが示唆された。

### 3. TNF遺伝子導入クローンのTNFに対する感受性について

そこで、enTNFとTNF抵抗性との関係をより明らかにするために、5種類のヒト口腔扁平上皮癌細胞中、最もenTNF発現量が少なく、TNFに対する感受性が高いT.T細胞に非分泌型TNF発現ベクター (pTNFΔpro) をlipofection法で導入し、発現したenTNFがTNF抵抗性因子となり得るか否かを検討した。その結果、TNF遺伝子導入クローンの細胞傷害性は、親細

胞T.Tおよびneo遺伝子導入クローンに比べそれぞれ減少し、enTNFの発現と細胞傷害性の間に負の相関関係が認められた。本研究で用いたTNF発現ベクターは、細胞膜貫通ドメインを欠失させてあるため、発現したTNFはenTNFとして、細胞内に蓄積されることになる。この蓄積されたenTNFがTNFに対して抵抗性に働くことが示された。

### 4. enTNF高発現クローンのenTNF誘導に伴うMnSOD活性の変化について

TNF遺伝子導入クローンのMnSOD活性について検討したところ、enTNFを発現している3つのクローンのMnSOD活性は、親細胞T.Tおよびneo遺伝子導入クローンに比べいずれも高値を示していた。すなわち、TNF遺伝子導入クローンでは細胞内のenTNFによってMnSODが誘導され、このMnSODがTNFによって産生される活性酸素を消去し、TNFに対して抵抗性を示すと考えられた。

### 5. アポトーシスシグナルと活性酸素の関連について

近年、WongとGoeddel<sup>42)</sup>により、TNFは細胞にアポトーシスを誘導すること、GreenblattとElias<sup>43)</sup>により、アポトーシスの誘導はTNFの2つのレセプターのうち、主としてR55レセプターによって担われること、さらにEnariら<sup>44)</sup>により、このアポトーシスはカスパーゼの活性化によって惹起されることが報告された。TNFのアポトーシスシグナルは、TNFの刺激が細胞内に入ると、TNFレセプター細胞内領域のC末端付近にあるdeath domainと呼ばれる部位に伝達される。そして、このdeath domainにTRADD (TNFR1 associated death domain protein) が結合し、このTRADDは、FADD (Fas associating protein with a novel death domain)/MORT-1 (mediator of receptor-in-

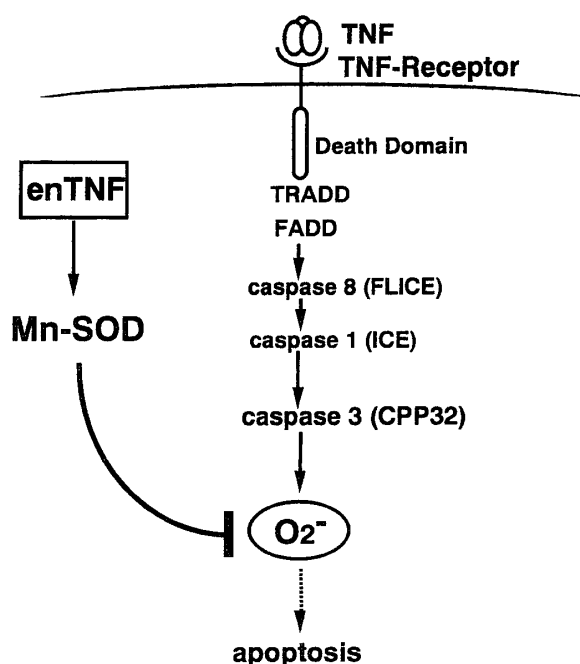


Fig.14 Transmission of apoptosis signal induced by TNF.

duced toxicity 1) とさらに結合して, FLICE (FADD-like ICE)/MACH (MORT 1-associated CED-3 homologue) を介し, caspase 1 (ICE) および caspase 3 (CPP32) などのカスパーゼを活性化し, アポトーシスを引き起こすと想定されている<sup>45-50)</sup> (Fig.14).

本研究では, 口腔扁平上皮癌細胞のTNFによる細胞死がアポトーシスであるか否かを確認するため, DNA断片化によって検討した. その結果, 口腔扁平上皮癌細胞はTNFにより明らかなDNA断片化がみられ, 細胞死はアポトーシスであることが確認された. しかしながら, このDNA断片化は, カスパーゼの阻害剤により減弱されたことから, アポトーシスの誘導にはカスパーゼの活性化が重要な役割を果たしていることが明らかとなった. 一方, enTNF発現クローンでは, 親細胞T.Tおよびneo遺伝子導入クローンに比べ, DNAの断片化が減弱したことから, enTNFはTNFによるアポトーシスを抑制することが明らかとなった.

本研究によって, TNFにより惹起される口腔扁平上皮癌細胞のアポトーシスでは, カスパー

ゼの活性化の関与が明らかになったが, このアポトーシスシグナルに活性酸素が関連しているか否かについては, これまで不明であった. そこで, 本研究ではTNF刺激時の活性酸素と caspase 3 活性の関連について検討した. その結果, TNF刺激により, 活性酸素の産生と caspase 3 活性の増加が認められた. 一方, この caspase 3 活性を caspase 3 の特異的阻害剤で抑制すると, 活性酸素の産生が減少した. しかし, 抗酸化剤であるNACで活性酸素を消去しても caspase 3 活性に変化はみられなかった. これらのことから, TNFのアポトーシス誘導経路では, 活性酸素が caspase 3 の下流で作用することが推測された.

## 6. enTNFとアポトーシスとの関連について

そこで, enTNFのcaspase活性に与える影響を調べる目的で, enTNF高発現クローンT.TΔproのcaspase 3 の活性を測定したところ, 親細胞T.TにenTNF 遺伝子を導入しても, 刺激時に caspase 3 活性の上昇の程度には, 変化がないことが示された. 以上のことから, enTNFは, caspase 3 の下流で作用することでアポトーシスシグナルを停止させていることが示唆された. すなわち, 口腔癌細胞株では, TNFは, カスパーゼの活性化により活性酸素を産生するが, 一方, enTNFがMnSODを誘導して, この活性酸素を消去してしまい, その結果, TNFが誘導するアポトーシスに対し, 抵抗性因子として作用していることが示唆された.

## V. 結 論

口腔扁平上皮癌細胞株 (T.T, HSC-3, Ca9-22, BSC-OF および SAS細胞) の, TNFによるアポトーシス誘導作用に対して enTNFが抵抗性因子として働いているか否か, また, その際enTNFが, どのような機序で抵抗性因子として作用しているかについて検討し, 以下の

結果を得た。

1. 各細胞のTNF感受性は、T.T細胞のみ高かった。
2. T.T細胞のMnSOD活性およびenTNFの発現量は、他のTNF低感受性細胞に比し、低かった。
3. T.T細胞に、非分泌型TNF遺伝子の発現ベクターであるpTNF $\Delta$ proをリポフェクション法で導入して、3つのenTNF高発現クローンを得た。これらの細胞は、親細胞T.TやT.T neo遺伝子導入細胞に比し、TNFに抵抗性を示した。
4. enTNF高発現クローンにおけるMnSOD活性は、親細胞T.TやT.T neo遺伝子導入細胞と比較して高値であった。
5. 親細胞T.TをTNFで処理すると、アポトーシスが惹起された。さらに、TNFシグナル伝達機構において、caspase 1 と caspase 3 を介してアポトーシスが生じることが示された。
6. enTNF遺伝子導入細胞は、親細胞T.Tに比し著明にアポトーシスが抑制された。
7. enTNF高発現クローンをTNF処理しても、caspase 3 活性に変化はみられなかった。

以上の結果から、enTNFは、TNF誘導アポトーシスに対して抵抗性因子として働くことが示された。また、この際enTNFは、TNFのシグナル伝達経路を介してMnSODを誘導するが、このMnSODはcaspase 3 の下流で作用し、活性酸素を消去するため、アポトーシスが回避されることが推察された。

## VI. 謝 辞

本研究を遂行するにあたり多大なるご教示を賜りました札幌医科大学医学部内科学第四講座新津洋司郎教授、札幌医科大学医学部付属病院検査部渡辺直樹教授に深謝いたします。終始ご指導ご鞭撻くださいました札幌清田病院副院長

山内尚文博士に感謝申しあげるとともにお礼申しあげます。また幾多にもわたり実験をご指導くださいました札幌医科大学医学部付属病院検査部小林大介博士にお礼申しあげます。並びにご助言くださいました札幌医科大学医学部内科学第四講座教室員の皆様に感謝いたします。

## VII. 文 献

1. Carswell, E. A., Old, L. J., Kassel, R. L., et al. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72 : 3666-3670, 1975.
2. Yamauchi, N., Kuriyama, H., Watanabe, N., et al. Intracellular hydroxyl radical production induced by recombinant human tumor necrosis factor and its implication in the killing of tumor cells in vitro. Cancer Res. 49 : 1671-1675, 1989.
3. Watanabe, N., Niitsu, Y., Umeno, H., et al. Synergistic cytotoxic and antitumor effects of recombinant human tumor necrosis factor and hyperthermia. Cancer Res., 48 : 650-653, 1988.
4. Niitsu, Y., Watanabe, N., Umeno, H., et al. Synergistic effects of recombinant human tumor necrosis factor and hyperthermia on in vitro cytotoxicity and artificial metastasis. Cancer Res., 48 : 654-657, 1988.
5. Watanabe, N., Niitsu, Y., Neda, H., et al. Antitumor effects of tumor necrosis factor against various primarily cultured human cancer cells. Jpn. J. Cancer Res., 76 : 1115-1119, 1985.
6. Watanabe N. Yamauchi N. Maeda M. et al. Recombinant human tumor necrosis factor causes regression in patients with advanced malignancies. Oncology. 51(4) : 360-5, 1994.
7. 吉田 純：悪性脳腫瘍に対するTNF動注療法の有効性と安全性 Biotherapy 5 : 1660-1667, 1991.
8. 渡辺直樹：腫瘍壊死因子(TNF) 医薬ジャーナル 29(5) : 945-950, 1993.
9. Yamauchi, N., Watanabe, N., Kuriyama, H., et al. Suppressive effects of intracellular glutathione on hydroxyl radical production induced by tumor necrosis factor. Int. J. Cancer 46 : 884-888, 1990.
10. Wong, G. H. W. and Goeddel, D.V. Induction of

- manganous superoxide dismutase by tumor necrosis factor: possible protective mechanism. *Science* 242 : 941-944, 1988.
11. Niitsu, Y., Watanabe, N., Neda, H., et al. Induction of synthesis of tumor necrosis factor in human and murine cell lines by exogenous recombinant tumor necrosis factor. *Cancer Res.*, 48 : 5407-5410, 1988.
  12. Sato T. Yamauchi N. Sasaki H. et al. An apoptosis-inducing gene therapy for pancreatic cancer with a combination of 55-kDa tumor necrosis factor (TNF) receptor gene transfection and mutein TNF administration. *Cancer Res.* 58(8) : 1677-83, 1998.
  13. Takahashi, K., Kanazawa, H., Chan, C.T. et al. A case of esophageal carcinoma metastatic to the mandible and characterization of two cell lines (T.T and T.Tn) established from the oral tumor. *Jpn. J. Oral Maxillofac. Surg.* 36 : 307-316, 1990. (in Japanese)
  14. Momose, F., Araida, T., Negishi, A., et al. Variant sublines with different metastatic potentials selected in nude mice from human oral squamous cell carcinomas. *J. Oral Pathol. Med.* 18 : 391-395, 1989.
  15. Horikoshi, M., Kimura, Y., Nagura, H., et al. A new human cell line derived from human carcinoma of the gingiva. *Jpn. J. Oral Maxillofac. Surg.* 20 : 100-106, 1974. (in Japanese)
  16. Abiko, Y., Okumura, K., Ohuchi, T., et al. Basaloid-squamous cell carcinoma of the floor of the mouth: characterization of a cell line. *J. Oral Pathol. Med.* 26 : 367-370, 1997.
  17. Takahashi, K., Kanazawa, H., Akiyama, Y. et al. Establishment and characterization of a cell lines (SAS) from poorly differentiated human squamous cell carcinoma of the tongue. *J. Jpn. Stomatol. Soc.* 38 : 20-28, 1989. (in Japanese)
  18. Himeno, T., Watanabe, N., Yamauchi, N., et al. Expression of endogenous tumor necrosis factor as a protective protein against the cytotoxicity of exogenous tumor necrosis factor. *Cancer Res.*, 50 : 4941-4945, 1990.
  19. Oberley, L.W., and Spitz, D.R. Nitroblue tetrazolium. In: R. Greenwald (eds.), *Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*, pp. 217-225. Boca Raton, Florida: CRC Press, Inc., 1985.
  20. Kobayashi, D., Watanabe, N., Yamauchi, N., et al. Endogenous tumor necrosis factor as a predictor of doxorubicin sensitivity in leukemic patients. *Blood*, 89 : 2472-2479, 1997.
  21. 辻本賀英, 刀祢重信, 山田 武: 最新アポトーシス実験法. 61-67, 1995.
  22. Enari, M., Talanian, H. V. and Nagata, S. Sequential activation of ICE-like and CPP32-like proteases during Fas-mediated apoptosis. *Nature*, 380 : 723-726, 1996.
  23. 岡本哲郎: 腫瘍壊死因子 (TNF) カレントテラピー 13(3) 94-99, 1993.
  24. Niitsu, Y., Watanabe, N., Sone, H., et al. Mechanism of the cytotoxic effect of tumor necrosis factor. *Jpn. J. Cancer Res.*, 76 : 1193-1197, 1985.
  25. Kull, F. C., Jr., Jacobs, S., Jr. and Cuatrecasas, P. Cellular receptor for 125I-labeled tumor necrosis factor: specific binding, affinity labeling and relationship to sensitivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82 : 5756-5760, 1985.
  26. Niitsu, Y., Watanabe, N., Sone, H., et al. Analysis of the TNF receptor on KYM cells by binding assay and affinity cross-linking. *J. Biol. Response Mod.* 7 : 276-282, 1988.
  27. Watanabe, N., Kuriyama, H., Sone, H., et al. Continuous internalization of tumor necrosis factor receptors in a human myosarcoma cell line. *J. Biol. Chem.* 263 : 10262-10266, 1988.
  28. Helson, L., Helson, C. and Green, S. : Effect of murine tumor necrosis factor on heterotransplanted human tumor. *Exp. Cell Biol.* 47 : 53-60, 1979.
  29. Watanabe, N., Niitsu, Y., Sone, H., et al. Inhibitory effect of tumor necrosis serum on the metastasis of B-16 melanoma cells. *Jpn. J. Cancer Res.*, 76 : 989-994, 1985.
  30. Watanabe, N., Niitsu, Y., Umeno, H., et al. Toxic effect of tumor necrosis factor on tumor vasculature in mice. *Cancer Res.*, 48 : 2179-2183, 1988.
  31. Niitsu, Y., Koshita, Y., Mahara, K., et al. Growth promoting activity of PDGF, EGF and TGF- $\beta$  on highly metastatic subline of Meth A

- cells. *Immunopharmacol. and Immunotoxicol.*, 10 : 67-78, 1988.
32. Watanabe, N., Neda, H., Ohtsuka, Y., et al. Signalling pathway of tumor necrosis factor in normal and tumor cells. *Cancer Immunol. Immunother.* 28 : 157-163, 1989.
  33. Tsujimoto, M., Yip, Y. K. and Vilcek, J. : Tumor necrosis factor : Specific binding and internalization in sensitive and resistant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82 : 7626-7630, 1985.
  34. Sugarman, B. J., and Aggarwal. Recombinant human tumor necrosis factor- $\alpha$  : effects on proliferation of normal and transformed cells in vitro. *Science* 230 : 943-945, 1985.
  35. Shepard, H.M. and Lewis, G.D. : Resistance of tumor cells to tumor necrosis factor. *J. Clin. Immunol.* 8 : 333-341, 1988.
  36. Hanada, M. and Shimoyama, M. Potential limitation of growth-inhibitory action of recombinant human tumor necrosis factor (PAC-4D) due to easy induction of resistance : Evidence in vitro. *Jpn. J. Cancer Res.*, 78 : 1266-1273, 1987.
  37. Okumura, K., Konishi, A., Tanaka, M. et al. Establishment of high and low-invasion clones derived from a human tongue squamous-cell carcinoma cell line SAS. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 122 : 243-248, 1996.
  38. Muramatsu, H., Kogawa, A., Tanaka, M. et al. Superoxide dismutase in SAS human tongue carcinoma cell line is a factor defining invasiveness and cell motility. *Cancer Res.* 55 : 6210-6214, 1995.
  39. 奥村一彦, 小西亮, 田中真樹ら培養ヒト口腔扁平上皮癌細胞の浸潤における Transforming growth Factor- $\beta$ 1 (TGF $\beta$ -1) のオートクリン作用. *日口外誌* 92 : 962-968, 1996.
  40. 河野 峰, 柴田敏之, 永易裕樹, 他 : EGF (Epidermal Growth Factor) オートクリン作用によるヒト口腔扁平上皮癌細胞の運動能促進. *日口外誌* 44 : 16-21, 1998.
  41. McCord, J. M. and Fridovich, I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocytation (hemocuprin). *J. Biol. Chem.* 244 : 6049-6055, 1969.
  42. Wong, G. H. W., and Goeddel, D. V. Fas antigen and p55 TNF receptor signal apoptosis through distinct pathways. *J. Immunol.*, 152 : 1751-1755, 1994.
  43. Greenblatt, M. S., Elias, L. The type B receptor for tumor necrosis factor  $\alpha$  mediates DNA fragmentation in HL-60 and U-937 cells and differentiation in HL-60 cells. *Blood*, 80 : 1339-1346.
  44. Enari, M., Hug, H., and Nagata, S. Involvement of an ICE-like protease in Fas-mediated apoptosis. *Nature*, 375 : 78-81, 1995.
  45. Tartaglia, L.A., Ayres, T.M., Wong, G.H.W. et al. : A novel domain within the 55 kD TNF receptor signals cell death. *Cell* 74 : 845-853, 1993.
  46. Hsu, H., Xiong, J. and Goeddel, D.V. : The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF- $\kappa$ B activation. *Cell* 81 : 495-504, 1995.
  47. Chinnaiyan, M. A., O'Rourke, K., Tewari, M. et al. : FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* 81 : 505-512, 1995.
  48. Hsu, H., Shu, H.-B., Pan, M.G. et al. : TRADD-TRAF-2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. *Cell* 84 : 299-308, 1996.
  49. Boldin, M.P., Goncharov, T.M., Goltsev, Y.V. et al. : Involvement of MACH, a novel MORT 1/FADD-interacting protease, in FAS/APO-1 and TNF receptor-induced cell death. *Cell* 85 : 803-815, 1996.
  50. Muzio, M., Chinnaiyan, A.M., Kischkel, F.C. et al. : FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD 95 (FAS/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell* 85 : 817-827, 1996.