

学 位 論 文

口腔扁平上皮癌におけるp27^{Kip1}の発現およびp27^{Kip1}をターゲットとした遺伝子治療の可能性に関する
基礎的研究

学位申請者 工藤 保誠

広島大学歯学部口腔病理学講座

(主任：二階 宏昌教授)

1999年

謝 辞

本研究に際して、終始ご懇篤なるご指導を賜りました広島大学歯学部口腔病理学講座、二階宏昌教授、高田 隆助教授に心から感謝の意を表します。また、本論文の作成に当たり、ご教示、ご校閲を賜りました本学口腔外科学第一講座岡本哲治教授ならびに本学歯科薬理学講座土肥敏博教授に深甚なる謝意を表します。

さらに本研究の遂行および論文の作成に当たり、ご指導、ご助言を賜りました広島大学医学部病理学第一講座、田原榮一教授、安井 弥助教授、横崎宏講師に謹んでお礼を申し上げますとともに、多くのご支援を頂きました本学歯学部附属病院小川郁子講師ならびに宮内睦美講師を始めとする本学口腔病理学講座の皆様方、呉共済病院臨床病理科谷山清己先生、佐々木なおみ先生、広島鉄道病院中央検査室病理科国安弘基先生、せいぶ歯科医院小林讓治先生に感謝いたします。

最後に、両親と妻、美喜子に心から感謝します。

なお、本研究には、本学附属病院第一および第二口腔外科における症例の貴重な臨床データを使用させていただきました。ここに謹んで厚く御礼申し上げます。

本論文内容の一部は、下記の雑誌に掲載された。

Kudo Y, Takata T, Yasui W, Ogawa I, Miyauchi M, Takekoshi T, Tahara E and Nikai H. Reduced Expression of Cyclin-dependent Kinase Inhibitor p27^{Kip1} is an Indicator of Malignant Behavior of Oral Squamous Cell Carcinomas. *Cancer*, 83:2447-2455, 1998.

目次

I. 緒言.....	1
II. 材料と方法	
1. 材料.....	3
2. 方法.....	5
(1) p27 ^{Kip1} の免疫組織化学的検討	
(2) p27 ^{Kip1} の発現と臨床病理学的所見との相関性に関する検討	
(3) Northern blot法によるp27 ^{Kip1} mRNAの発現に関する検討	
(4) Western blot法によるp27 ^{Kip1} タンパクの発現に関する検討	
(5) プロテアソーム阻害剤処理によるp27 ^{Kip1} タンパクの発現誘導に関する検討	
(6) プロテアソーム阻害剤投与によるアポトーシス誘導に関する検討	
(a) 電子顕微鏡によるアポトーシスの確認	
(b) DNA ladder formationによるアポトーシスの確認	
(c) フローサイトメトリー解析	
(d) cdk2 kinase assay	
(e) cell cycle, apoptosis関連タンパクの発現の検討	
(f) p27 ^{Kip1} antisenseoligonucleotide処理	
(7) p27 ^{Kip1} 遺伝子導入に関する検討	
III. 結果.....	12
1. 口腔扁平上皮癌におけるp27 ^{Kip1} の発現に関する検討	
(1) 口腔扁平上皮癌における免疫組織化学的検討によるp27 ^{Kip1} の発現	
(2) 口腔扁平上皮癌細胞株におけるp27 ^{Kip1} mRNA, タンパクの発現	
(3) プロテアソーム阻害剤投与によるp27 ^{Kip1} タンパクの発現誘導	
2. p27 ^{Kip1} をターゲットとした遺伝子治療の可能性に関する検討	
(1) プロテアソーム阻害剤投与によるアポトーシスの誘導	
(2) p27 ^{Kip1} 遺伝子導入	

IV. 考察.....	30
1. 口腔扁平上皮癌におけるp27 ^{Kip1} の発現低下の意義について	
2. 口腔扁平上皮癌におけるp27 ^{Kip1} の発現低下の機序について	
3. p27 ^{Kip1} をターゲットとした遺伝子治療の可能性について	
V. 結論.....	40
VI. 文献.....	41

I. 緒言

細胞の増殖は、細胞分裂によっておこり、細胞分裂は細胞周期に従って進行する。細胞周期の進行は、cyclin/cyclin dependent kinase(CDK)複合体によるRb蛋白などの標的蛋白のリン酸化によって制御されており^{1,2)}、高等動物の場合、10種類を越えるcyclinと8種類のCDKが同定されている。なかでも細胞周期のG1期で働くcyclin/CDK複合体であるcyclin D/CDK4およびcyclin E/CDK2は、増殖シグナルの標的としてS期への進行に重要な役割を果たすことが知られている^{1,2)}。このようなcyclin/CDK複合体の活性化には、CDK-activating kinase(CAK)によるリン酸化とCDC25による脱リン酸化が必須であるが、一方でp15^{Ink4b}、p16^{Ink4a}、p21^{Waf1/Cip1}、p27^{Kip1}などのCDK inhibitorにより不活化されることも明らかにされている³⁻¹²⁾。CDK inhibitorは、構造や機能的特徴からInk4 familyとCip1/Kip1 familyの2つのfamilyに大別され、アンキリンリピート構造を共有する前者にはp16^{Ink4a}、p15^{Ink4b}、p18^{Ink4c}、p19^{Ink4d}が、後者にはCDK阻害領域と呼ばれる相同性の高い領域を共有するp21^{Waf1/Cip1}、p27^{Kip1}、p57^{Kip2}が属している。

p27^{Kip1}は、最近クローニングされたCDK inhibitorの1つで、cyclin D1/CDK4複合体やcyclin E/CDK2複合体を不活化し、p21^{Waf1/Cip1}と同様に細胞増殖の停止に関与すると考えられている^{7,8)}。しかし、p27^{Kip1}はp53やp21^{Waf1/Cip1}とは違い、DNA損傷修復、DNA複製との関与は示されていない。p27^{Kip1}は、G0期停止した細胞において、発現量は高く、増殖因子の添加など

により細胞がG1/S期に進行する際に、ユビキチン化を経てプロテアソームにより分解され、発現量が低下することが知られている¹³⁾。また、p27^{Kip1}は特定のBリンパ球系、あるいは神経系の細胞株において、細胞分化、アポトーシスの誘導に関与しうることも示されている^{14,15)}。さらに、p27^{Kip1}ノックアウトマウスの解析では、個体が巨大化し、特に胸腺の肥大、下垂体腫瘍、網膜形成異常が認められ、p27^{Kip1}欠失による成長停止の破壊が記載されている¹⁶⁻¹⁸⁾。最近、種々の悪性腫瘍において、p27^{Kip1}タンパクの発現低下が、癌の悪性度や予後と相関することが明らかにされ¹⁹⁻²³⁾、p27^{Kip1}の発現低下を認める大腸癌では、p27^{Kip1}の分解活性が高いことも報告されている²¹⁾。このようにp27^{Kip1}は、細胞増殖の抑制因子として重要な役割を果たし、癌の発生、進展に密接に関連することが次第に明らかにされつつある。

口腔扁平上皮癌の頭頸部悪性腫瘍における頻度は高く、最も重要な位置を占める悪性腫瘍であるが、その病態はきわめて多様で、従来の臨床病理学的データのみからその予後を判定することは難しいことが多い。これまで、その生物学的態度と関連する因子を解明するため、臨床病理学的な研究が数多くなされてきたが、口腔扁平上皮癌の発生・進展・予後に関わると考えられる遺伝子の解析は、他臓器の悪性腫瘍にくらべて未だ遅れている。そこで、本研究では口腔扁平上皮癌におけるp27^{Kip1}の関与を明らかにするために、p27^{Kip1}の発現を免疫組織化学的手法により検索し、臨床病理学的事項との相関性を比較検討した。さらに、p27^{Kip1}の発現低下の機序およびp27^{Kip1}をターゲットにした遺伝子治療の可能性についても検討した。

Ⅱ. 材料と方法

1. 材料

口腔扁平上皮癌におけるp27^{Kip1}の発現状況を明らかにするとともに、発現程度と臨床病理学的所見との相関性を検討するため、広島大学歯学部附属病院において1976年から1997年までに外科的切除された口腔扁平上皮癌70例ならびに正常口腔粘膜上皮20例、上皮異形成症22例のパラフィン包埋切片を用いた。なお、原発部位や治療による影響を避けるため、70例の口腔扁平上皮癌症例はすべて舌原発で、化学療法および放射線療法を受ける以前のものを選んだ。患者の年齢および性別については、表1に示す通りである。

表1. 免疫組織化学的検討に用いた検体の年齢と性別

	症例数	年齢		性別	
		平均	範囲	男性	女性
正常口腔粘膜上皮	20	55.85	31-80	12	8
上皮異形成症	22	59.91	29-83	14	8
口腔扁平上皮癌	70	58.67	24-88	36	34

また、p27^{Kip1}の発現低下の機序について検討するため、ヒト口腔扁平上皮癌由来細胞株6株(HSC2, HSC3, HSC4, Ca9-22, Ho-1-N-1, Ho-1-U-1)を用いた。

これらの細胞株は、いずれもJapanese Cancer Research Resources Bank (JCRB)

より供与された。各細胞は, 10 %ウシ胎児血清 (FBS)(Boehringer Mannheim K. K.)を含むRPMI 1640 (極東製薬工業)メディウムで, 37 °C, 5 % CO₂の条件下で継代培養し, 実験に用いた。

2. 方法

(1) p27^{Kip1}の免疫組織化学的検討

免疫組織化学的検討は、抗ヒトp27^{Kip1} monoclonal antibody (Transduction Laboratories)およびヒストファイン SAB-PO(M)キット(ニチレイ)を用いて、SAB法により行った。免疫組織化学的検討の手順は、下記の通りである。

-
1. 脱パラフィン, 水洗
 2. 0.3%過酸化水素水を含むメタノール(室温, 30分)
 3. マイクロウェーブ処理(クエン酸バッファー, 10分, 3回)
 4. 10%ウサギ正常血清(室温, 30分)
 5. 一次抗体(1:100に希釈, 4℃, 一晚)
 6. ウサギビオチン標識抗マウス免疫グロブリン(室温, 30分)
 7. ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン(室温, 30分)
 8. 3, 3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB)による発色
 9. ヘマトキシリンによるcounter staining
-

染色の評価は、上皮細胞あるいは癌細胞の核におけるp27^{Kip1}陽性細胞を数え、30%以上の細胞が陽性を示すものをHigh, 5から30%の細胞が陽性を示すものをMedium, 5%以下のものをNegativeとした。

(2) p27^{Kip1}の発現と臨床病理学的所見との相関性に関する検討

p27^{Kip1}の発現程度と口腔扁平上皮癌の分化度, 病期の進行, 転移および予

後などの臨床病理学的所見との相関性を検討した。Fisher's exact testにより統計処理を行った。また、70例の口腔扁平上皮癌症例のうち、予後を知ることのできた51例について、p27^{Kip1}の発現程度と生存率について、Kaplan-Meier法により検討し、Mantel-Cox testにより統計処理を行った。いずれの検討においても、P valueが0.05以下を有意差があるとみなした。

上記検討において、p27^{Kip1}タンパクの発現低下が多数の口腔扁平上皮癌症例で認められたことから、p27^{Kip1}タンパクの発現低下の機序を調べるため、口腔扁平上皮癌細胞株を対象に以下の実験 [(3)-(5)]を行った。

(3) Northern blot法によるp27^{Kip1} mRNAの発現に関する検討

口腔扁平上皮癌細胞6株を回収し、mRNAをQuickPrep Micro mRNA Purification Kit (Pharmacia Biotech Inc.)を使用し、抽出した。次いで、2 µg poly A⁺ RNAをホルムアルデヒド法にて電気泳動し、ナイロンメンブレンフィルターに転写した。ヒトp27^{Kip1} cDNAプローブは、Dr. J. Massague (Howard Hughes Medical Institute, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center)より供与していただき、pCMV5 plasmidの0.69 kilobase(kb)のfragment⁸⁾を用いた。p27^{Kip1} cDNAプローブは³²P標識後、ハイブリダイズした。洗浄後、X線フィルム上でオートラジオグラフィーを行った。

(4) Western blot法によるp27^{Kip1}タンパクの発現に関する検討

口腔扁平上皮癌細胞6株より、lysis buffer [50 mM Tris-HCl (pH7.4), 125

mM NaCl, 0.1 % Nonidet P-40 (NP-40; Sigma Chemical Co.), 5 mM EDTA, 0.1 M NaF, 10 µg/ml leupeptin (Sigma Chemical Co.), 0.1 µg/ml trypsin inhibitor (Sigma Chemical Co.), 0.1 µg/ml aprotinin (Sigma Chemical Co.), 50 µg/ml phenylmethylsulfonyl fluoride (和光純薬)] を用いて, タンパクを抽出した。タンパク濃度は, Bradford protein assay (Bio-rad)により測定した。50 µgのタンパクを Laemmli's sample buffer に溶かし, 10 % sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel で電気泳動し, ニトロセルロースメンブレンに転写した。フィルターは, 5 % スキムミルクを含む PBS buffer (137 mM NaCl, 8.1 mM Na₂HPO₄·12 H₂O, 2.68 mM KCl, 1.47 mM KH₂PO₄) で 4°C, 1 時間インキュベートした。次に, 抗ヒト p27^{Kip1} monoclonal antibody (Transduction Laboratories) を 5 % スキムミルクを含む PBS buffer に希釈(1:100)し, 室温で 1 時間インキュベートした。2 次抗体は, peroxidase-coupled goat anti-mouse antibody (MBL) を用い, 室温で 1 時間インキュベートした。ECL western blotting detection system (Amersham) を用いて, X 線フィルム上でオートラジオグラフィを行った。

実験(3), (4)において, mRNA レベルで発現低下がみられないにもかかわらず, タンパクの発現低下を示す細胞が認められたため, タンパクの発現低下に翻訳後のプロテアソームによる分解が関与するかについて実験(5)を行った。

(5) プロテアソーム阻害剤処理によるp27^{Kip1}タンパクの発現誘導に関する検討

タンパクの発現低下に翻訳後のプロテアソームによる分解が関与するかについて検討するため、実験(4)の結果よりp27^{Kip1}タンパクの発現のみられなかったHSC2細胞と発現の高かったCa9-22細胞を用いて、プロテアソームの特異的な阻害剤であるN-Carbobenzoxy-L-leucyl-L-leucyl-L-norvalinal (LLnV)(ペプチド研究所)を投与した。LLnVはDMSOに溶かし、50 μ Mの濃度になるようにメディウムに加え、0から24時間インキュベート後、細胞を回収し、p27^{Kip1}タンパクの発現を実験(4)と同様にwestern blot法で解析した。

次にp27^{Kip1}をターゲットにした遺伝子治療の可能性に関する基礎的検討を目的に以下の実験を行った。

(6) プロテアソーム阻害剤投与によるアポトーシス誘導に関する検討

(a) 電子顕微鏡によるアポトーシスの確認

細胞を2.5% glutaraldehydeによる前固定ならびに1% osmium tetroxydeで後固定し、epoxy resinに包埋した。薄切切片を酢酸ウラニールとクエン酸鉛で二重染色後、透過型電子顕微鏡(日立H500H)にて観察した。

(b) DNA ladder formationによるアポトーシスの確認

DNAは、回収した細胞を細胞溶解buffer [10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 10 mM EDTA, 0.1% Triton X-100]で溶解し、RNase Aとproteinase Kを加え、37℃で

60分インキュベートした。遠心後、DNAをエタノール沈殿による精製後、2%アガロースゲルで電気泳動を行い、ethidium bromideで染色し、UV上でDNA ladder formationを観察した。

(c) フローサイトメトリー解析

DNA含量による細胞周期の解析あるいはアポトーシス細胞の判定をするためにフローサイトメトリー解析を行った。細胞を70%エタノールで固定後、50 mg/mlの濃度でPBSに溶かしたpropidium iodideで染色し、1 mg/ml RNase (RNase A type I-A, Sigma Chemical Co.)を加えて、遮光した状態で30分間、室温でインキュベートした。フローサイトメーター(FACScan, Becton-Dickinson)でDNA含量を測定した。

(d) cdk2 kinase assay

cdk2 kinase assayには、100 μ gのlysateを使用し、40 μ lのprotein A-agarose (Oncogene Research Products)を含んだlysis bufferで4 $^{\circ}$ C, 30分インキュベートした。サンプルを1 μ gのanti-cdk2 rabbit polyclonal antibody(Santa Cruz)で4 $^{\circ}$ C, 3時間インキュベート後、遠心した。沈殿物をlysis bufferおよびkinase buffer[50 mM Tris-HCl(pH7.4), 10 mM MgCl₂, 1mM DTT]で3回洗浄し、6 μ gのhiston H1(Sigma, type III-S)を含んだ35 μ lのkinase bufferに溶かした。5 μ lの60 μ M[γ -³²P]ATP solution(3 μ Ci)を加え、30 $^{\circ}$ C, 10分間kinase反応を行った。20 μ lのLaemmli's sample bufferを加えて反応を止め、10% SDS-PAGE [実験(4)参照]後、X線フィルム上でオートラジオグラフィーを行った。

(e) cell cycle, apoptosis関連タンパクの発現の検討

次に示す抗体を用いて、実験(4)と同様にwestern blot解析を行った。

p27^{Kip1} mouse monoclonal antibody (K25020, Transduction Laboratories)

p21 mouse monoclonal antibody (sc-6246, Santa Cruz Biotechnology)

p53 mouse monoclonal antibody (DO-7, DAKO)

cyclin D mouse monoclonal antibody (sc-246, Santa Cruz Biotechnology)

cyclin E monoclonal antibody (14591A, Pharmingen)

cdk2 rabbit polyclonal antibody (sc-163, Santa Cruz Biotechnology)

cdk4 mouse monoclonal antibody (C18720, Transduction Laboratories)

CDC25A rabbit polyclonal antibody (sc-97, Santa Cruz Biotechnology)

phospho Rb (Ser 780) rabbit polyclonal antibody (MBL)

CPP32 mouse monoclonal antibody (C31720, Transduction Laboratories)

Bcl-2 mouse monoclonal antibody (M0887, DAKO)

(f) p27^{Kip1} antisense oligonucleotide処理

p27^{Kip1} antisense oligonucleotideは、5'-GACACTCTGACGTTTGACAT-3'の配列で、開始コドン付近の20 merの配列を使用した^{8,24)}。オリゴヌクレオチドの合成は、グライナージャパンに受託した。p27^{Kip1} sense oligonucleotide (5'-CTGTGAGAGTGCAAAGTGTGTA-3')は、コントロールとして使用した。oligonucleotideは、細胞への取り込み率をあげるために、phosphorothioate処理をした。oligonucleotide(100 μM)は、lipofectin (GIBCO BRL) とともに37℃で15分インキュベート後、血清を含まないRPMI 1640メディウムに加え、

1 μ Mの濃度になるようにした。4日間処理した後、実験に使用した。Cell viabilityは、Trypan blue染色により染色された死細胞を血球計算板で数えた。

(6) p27^{Kip1}遺伝子導入に関する検討

p27^{Kip1}発現ベクターであるpCMV5とneomycin耐性遺伝子マーカを有するpcDNA I/Neo (Invitrogen)を用いてco-transfectionを行った。p27^{Kip1}発現ベクターは、Dr. J. Massague (Howard Hughes Medical Institute, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center)より供与していただいた。2 μ gの p27^{Kip1}発現ベクターと 0.2 μ gの pcDNA I/Neo を混ぜ合わせ、lipofection 法にてtransfectionを行った。20 μ lのlipofectin reagent (Gibco BRL)とともに血清を含まないRPMI 1640メディウムに加え、6時間後、血清を含んだRPMI 1640メディウムに換え、さらに48時間インキュベートした。その後、400 mg/ml G418 (Gibco BRL)をメディウムに加えて、約3週間、薬剤選択を行い、p27^{Kip1}発現クローンを得た。

III. 結果

1. 口腔扁平上皮癌におけるp27^{Kip1}の発現に関する検討

(1) 口腔扁平上皮癌におけるp27^{Kip1}の免疫組織化学的検討

口腔扁平上皮癌におけるp27^{Kip1}の関与を明らかにするために、p27^{Kip1}の発現程度を免疫組織化学的に検索するとともに、p27^{Kip1}の発現状況と臨床病理学的所見との比較検討を行った。その結果、20例の正常口腔粘膜上皮では、すべての症例でp27^{Kip1}の強い発現が認められた(図1A, 表2)。正常口腔粘膜上皮におけるp27^{Kip1}の発現は、上皮細胞の核に認められ、増殖活性の高い基底層の細胞では、p27^{Kip1}の発現はみられなかった。上皮異形成症では、軽度および中等度の異型性を有する症例では16例中13例(81%)が強い発現を示したが、高度の異型性を有する症例では6例中3例(50%)が強い発現を示していた(図1B, 表2)。正常口腔粘膜上皮および上皮異形成症例では、p27^{Kip1}-negative症例は全く認められなかった。ところが、口腔扁平上皮癌では、p27^{Kip1}の発現は70例中9例(13%)で強い発現を認めるのみで、87%の症例でp27^{Kip1}の発現低下を認め、p27^{Kip1}-negative症例は28例(40%)であった。

次に、口腔扁平上皮癌におけるp27^{Kip1}の発現と臨床病理学的事項との関連を検討したところ、p27^{Kip1}の発現低下はステージの進行および転移と有意に相関していた(表2)。癌の分化度とは、有意な相関は認められなかった。

さらに、予後の知ることできた55例の口腔扁平上皮癌患者について、p27^{Kip1}の発現と生存率との相関を検討したところ、p27^{Kip1}-negative症例では、

p27^{Kip1}-mediumおよび-high症例にくらべて有意に予後不良であった(図2)。

表2. 正常口腔粘膜上皮, 上皮異形成症, 口腔扁平上皮癌におけるp27^{Kip1}の発現

	症例数	p27 ^{Kip1} の発現 ^{b)}			p value ^{c)}
		High	Medium	Negative	
正常口腔粘膜上皮	20	20(100%)	0(0%)	0(0%)] <0.0001
上皮異形成症					
軽度~中等度	16	13(81%)	3(19%)	0(0%)	
高度	6	3(50%)	3(50%)	0(0%)	
口腔扁平上皮癌	70	9(13%)	33(47%)	28(40%)] 0.3360
組織型 ^{a)}					
高分化	30	5(17%)	16(53%)	9(30%)	
中分化	33	4(12%)	15(45.5%)	14(42.5%)	
低分化	7	0(0%)	2(29%)	5(71%)	
病期 ^{a)}] 0.0149
1	15	3(20%)	10(67%)	2(13%)	
2	19	3(16%)	11(58%)	5(26%)	
3	2	1(50%)	1(50%)	0(0%)	
4	34	2(6%)	11(32%)	21(62%)	
転移] 0.0055
あり	34	6(17.5%)	21(62%)	7(20.5%)	
なし	36	3(8%)	12(33%)	21(58%)	

a) 頭頸部癌取扱い規約²⁵⁾による。

b) p27^{Kip1}の発現は、30%以上の細胞が陽性を示すものをHigh、5-25%の細胞が陽性を示すものをMedium、5%以下をNegativeとした。

c) p valuesは、Fisher's exact testにより解析した。p valuesが0.05以下のものを有意差有りと判定した。

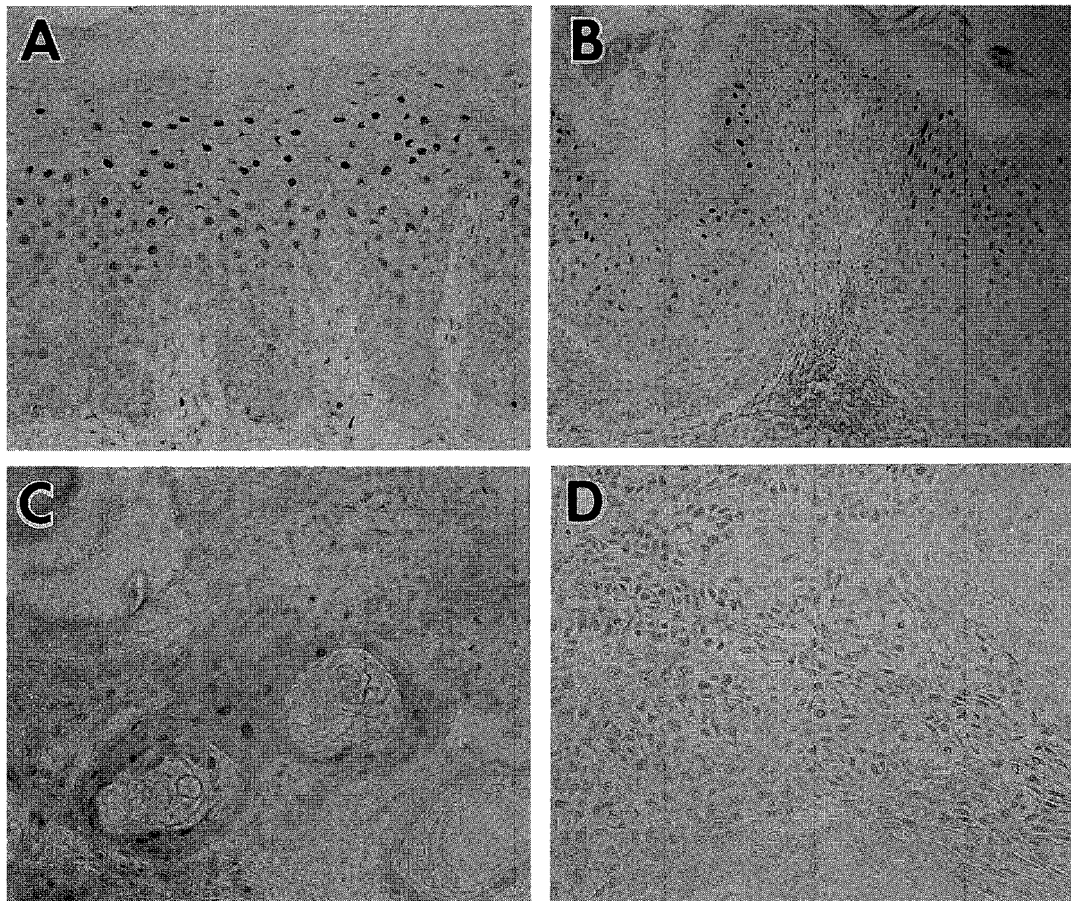


図1. 正常口腔粘膜上皮, 上皮異形成症および口腔扁平上皮癌における p27^{Kip1}タンパクの発現

- A. 正常口腔粘膜上皮 (x150), p27^{Kip1}の発現-High.
- B. 上皮異形成症 (x100), p27^{Kip1}の発現-High.
- C. 口腔扁平上皮癌 (x150), p27^{Kip1}の発現-Medium.
- D. 口腔扁平上皮癌 (x100), p27^{Kip1}の発現-Negative.

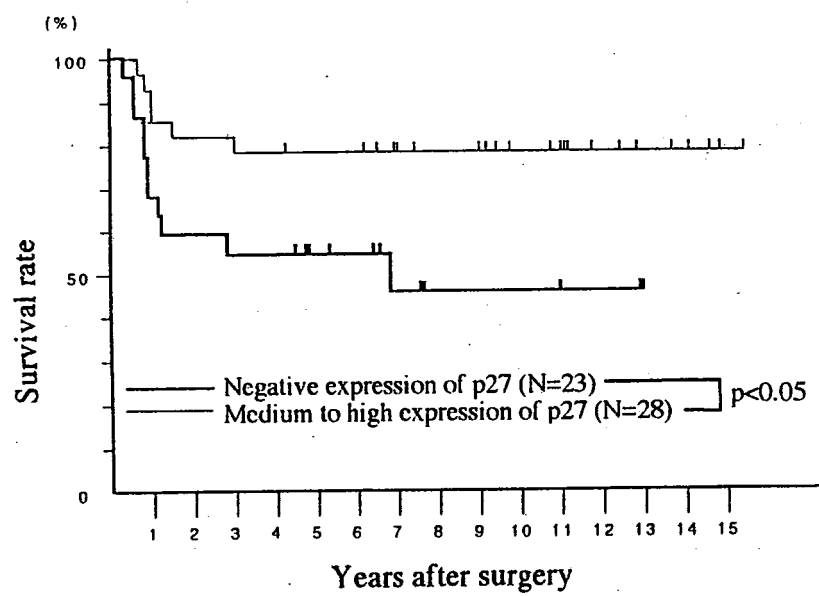


図2. p27^{Kip1}タンパクの発現と生存率の関係

(2) 口腔扁平上皮癌細胞株におけるp27^{Kip1} mRNAおよびタンパクの発現
口腔扁平上皮癌におけるp27^{Kip1} タンパクの発現低下の機序を調べるため、6株の口腔扁平上皮癌細胞株(HSC2, HSC3, HSC4, Ca9-22, Ho-1-N-1, Ho-1-U-1)におけるp27^{Kip1} mRNAおよびタンパクの発現をnorthern blot法, western blot法により検討した。口腔扁平上皮癌細胞6株においてmRNAの発現レベルは、図3に示すようにすべての細胞において発現が認められた。しかし、タンパクの発現は4株の細胞(HSC2, HSC3, Ho-1-N-1, Ho-1-U-1)で低い発現レベルを示していた。

(3) プロテアソーム阻害剤投与によるp27^{Kip1} タンパクの発現誘導

p27^{Kip1} タンパクは、翻訳後にユビキチンを介したプロテアソームにより分解されることが知られていることから¹³⁾、タンパクの発現低下に翻訳後のプロテアソームによる分解が関与しているかを調べるために、p27^{Kip1} タンパクの発現のみられなかったHSC2細胞と発現の高かったCa9-22細胞を用いて、プロテアソームの特異的阻害剤であるLLnVを投与した。その結果、HSC2細胞は、無処理ではp27^{Kip1} タンパクの発現がみられなかったが、LLnV処理によってその発現が誘導された(図4)。しかし、Ca9-22細胞ではLLnV処理でその発現にほとんど変化は認められなかった。デンシトメトリーにより、p27^{Kip1} タンパクの発現程度を定量化したところ、HSC2細胞において、LLnV処理によりp27^{Kip1} タンパクの発現レベルは、経時的に増加しており、24時間後では約5倍になっていた。

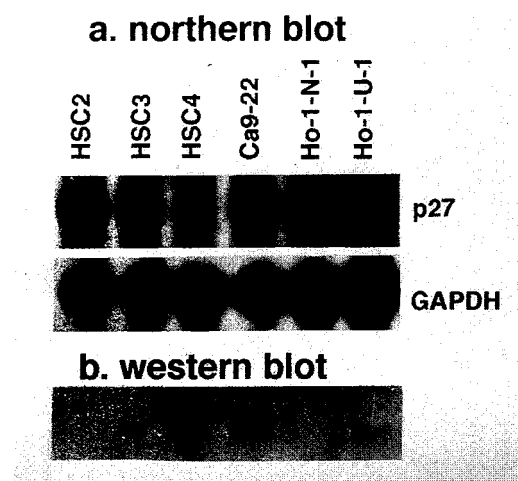


図3. 口腔扁平上皮癌細胞におけるp27^{Kip1} mRNAおよびタンパクの発現

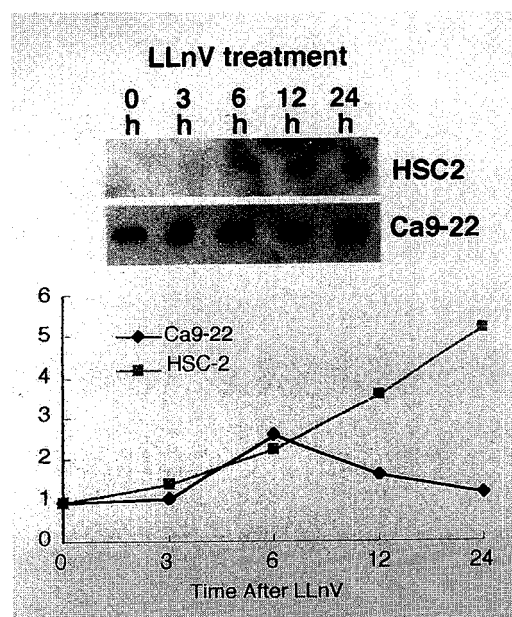


図4. LLnV処理によるp27^{Kip1}タンパクの発現誘導

2. p27^{Kip1}をターゲットとした遺伝子治療の可能性に関する検討

多くの口腔扁平上皮癌症例においてp27^{Kip1}の発現低下が認められ、癌の悪性度や転移とよく相関していたことから、口腔扁平上皮癌の治療としてp27^{Kip1}をターゲットにした遺伝子治療の可能性を検討する目的で

- (1) p27^{Kip1}の発現低下が翻訳後にプロテアソームにより分解されることから、その分解を阻害することによるp27^{Kip1}発現低下の抑制
- (2) p27^{Kip1}遺伝子導入によるp27^{Kip1}発現の回復

の2つのアプローチを試みた結果、以下の所見が得られた。

(1) プロテアソーム阻害剤投与によるアポトーシスの誘導

p27^{Kip1}タンパクの発現のみられなかったHSC2細胞を用いて、プロテアソーム阻害剤であるLLnV投与によってp27^{Kip1}タンパクの分解を阻害したところ、LLnVで12時間処理したHSC2細胞では、位相差顕微鏡下およびHE染色において、アポトーシスを示唆する所見が認められた(図5A-D)。また、電子顕微鏡により観察したところ、アポトーシス小体の形成が認められた(図5E)。さらに、DNAを抽出し、電気泳動を行ったところ、DNAの断片化を示すladder formationがみられた(図5F)。フローサイトメトリー解析においても、DNAの含有量の低いアポトーシス細胞の増加が認められた(図5G)。

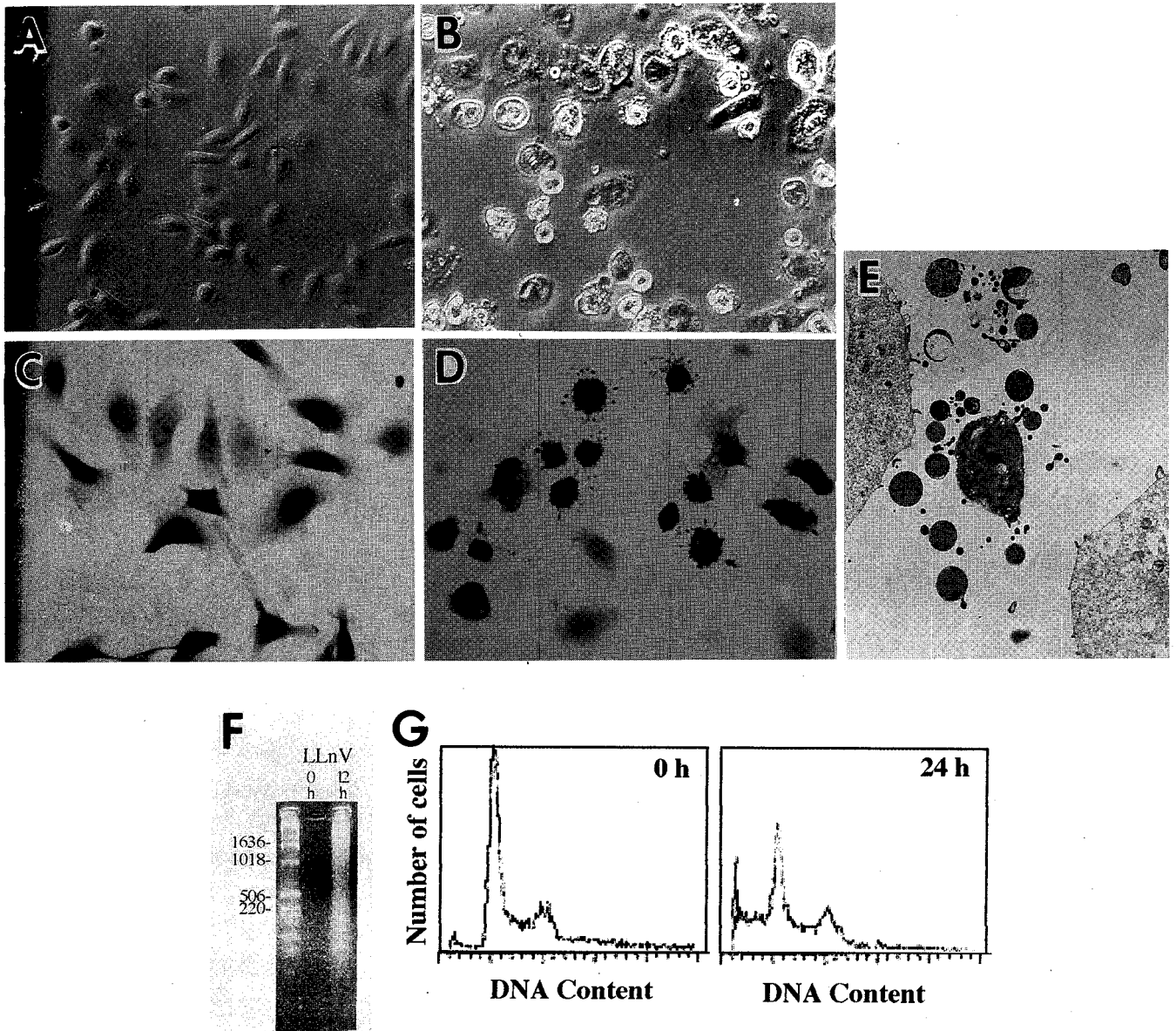


図5. HSC2細胞におけるプロテアソーム阻害剤投与によるアポトーシスの誘導

- A. 位相差顕微鏡下の無処理細胞.
- B. 位相差顕微鏡下のLLnV 12時間処理細胞.
- C. HE染色後の無処理細胞.
- D. HE染色後のLLnV 12時間処理細胞.
- E. 電子顕微鏡下のLLnV 12時間処理細胞.
- F. LLnV処理細胞におけるDNA ladder formationの検討.
- G. LLnV処理細胞におけるフローサイトメトリー解析.

また、プロテアソーム阻害剤投与によるアポトーシス誘導における細胞周期調節因子の変化について検討したところ、LLnV投与によりp27^{Kip1}タンパクの発現増加、cyclin DおよびCDC25Aタンパクの発現低下がみられた(図6)。p21, p53, cyclin E, cdk2, cdk4タンパクには変化がみられなかった(図6)。

これらのタンパクの変化は、細胞周期の進行阻害がおこっていることを示唆する所見であるため、次いでcdk2 kinase活性について検討した。無処理のHSC2細胞では、強いcdk2 kinase活性をもつものに対して、LLnVを12時間処理するとcdk2 kinase活性の消失がみられた(図7)。また、cyclin D/cdk4複合体にRbタンパクが特異的にリン酸化される部位であるser780を認識する抗体を用いて、Rbタンパクのリン酸化を検討したところ、リン酸化型Rbタンパクの発現はLLnV処理によって消失した(図7)。以上の結果より、cyclin D、CDC25Aの発現低下を伴うp27^{Kip1}の発現増加が、細胞周期の進行を阻害していることが考えられた。

また、アポトーシスシグナルの下流には、caspase familyの活性化がみられ、アポトーシスの誘導をBcl-2が阻害していることが知られているため、caspase familyの1つであるCPP32とアポトーシスの抑制に働くBcl-2の発現を検討した。図8に示すとおり、LLnV処理によりCPP32のinactive formである32KDのタンパクの減少がみられ、CPP32の活性化が認められた。Bcl-2タンパクもLLnV処理により発現低下していた。

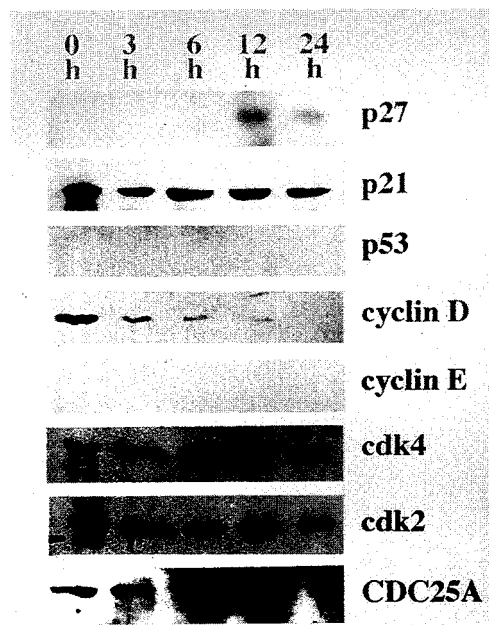


図6. HSC2細胞におけるプロテアソーム阻害剤投与による細胞周期調節因子の発現

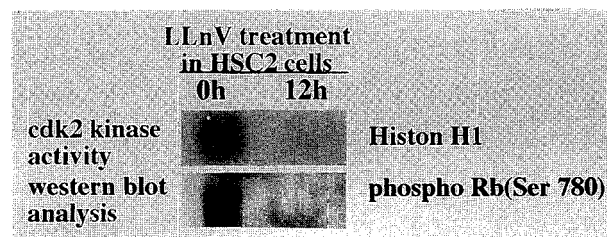


図7. HSC2細胞におけるプロテアソーム阻害剤投与による細胞周期進行阻害

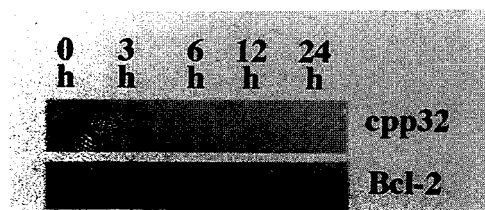


図8. HSC2細胞におけるプロテアソーム阻害剤投与によるアポトーシス関連タンパクの発現

さらに、プロテアソーム阻害剤投与によるアポトーシス誘導に、 $p27^{Kip1}$ が直接に関与していることを証明するために、HSC2細胞に $p27^{Kip1}$ antisense oligonucleotideを導入し、アポトーシス誘導が阻害されるかについて検討した。コントロールとして $p27^{Kip1}$ sense oligonucleotideを使用した。LLnV12時間処理で、無処理細胞および $p27^{Kip1}$ sense導入株では $p27^{Kip1}$ の発現が誘導されたが、 $p27^{Kip1}$ antisense導入株では完全に $p27^{Kip1}$ の発現の誘導が阻害されており、 $p27^{Kip1}$ の発現は認められなかった(図9A)。また、これらの細胞を用いてLLnV投与によるアポトーシス誘導を調べたところ、無処理株および $p27^{Kip1}$ sense導入株がLLnV 24時間処理で約80%の細胞が死んでいるのに対して、 $p27^{Kip1}$ antisense導入株では約30%しか死んでおらず、アポトーシス誘導の阻害が認められた(図9B)。よって、プロテアソーム阻害剤投与によるアポトーシス誘導に、 $p27^{Kip1}$ が直接に関与していることが示された。

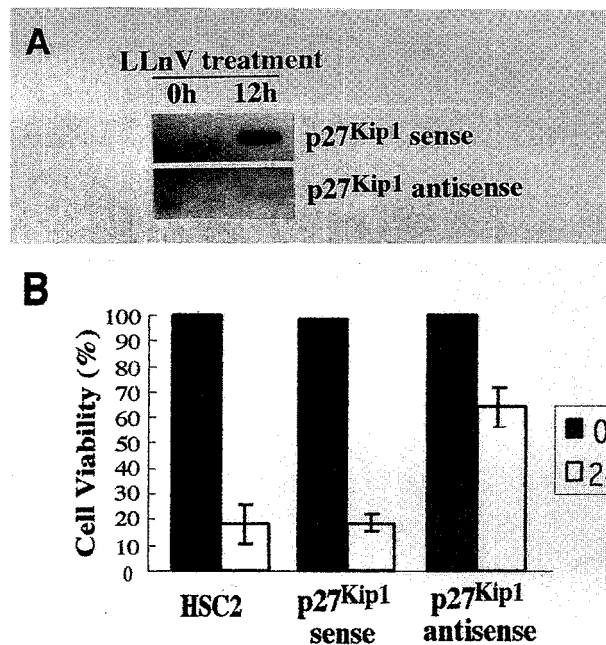


図9. HSC2細胞におけるp27^{Kip1} antisense oligonucleotide処理によるアポトーシス誘導の阻害

A. p27^{Kip1} antisense oligonucleotide処理したHSC2細胞におけるLLnV投与後のp27^{Kip1}の発現

B. p27^{Kip1} antisense oligonucleotide処理したHSC2細胞におけるLLnV投与後のcell viability

(2) p27^{Kip1}遺伝子導入

次に、p27^{Kip1}タンパクの発現のなかったHSC2細胞と発現の高かったCa9-22細胞を用いて、p27^{Kip1}遺伝子導入による影響について検討した。Ca9-22細胞にp27^{Kip1}遺伝子導入し、薬剤選択後、得られたCa9-22 transfectant 1およびCa9-22 transfectant 2細胞では、親株に比べてp27^{Kip1}の過剰発現がみられ(図10A)、形態の大きい細胞が観察された(図10B)。また、Ca9-22 transfectant 1およびCa9-22 transfectant 2細胞では、図11に示すように増殖抑制が認められた。さらに、Ca9-22 transfectant 1およびCa9-22 transfectant 2細胞では、フローサイトメトリー解析でG1期の細胞の増加がみられ、G2期の細胞の減少がみられた(図12)。cdk2 kinase活性も低下あるいは消失していた(図13)。しかしながら、HSC2細胞ではp27^{Kip1}遺伝子導入によってもp27^{Kip1}タンパクの発現増加はみられず、増殖抑制効果も認められなかった。

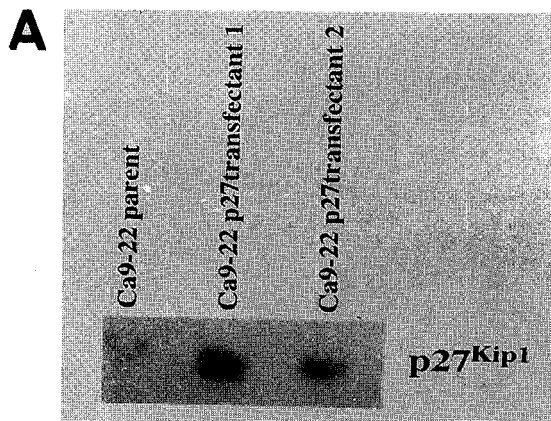


図10. p27^{Kip1}遺伝子導入による細胞の形態変化とp27^{Kip1}の発現

A. p27^{Kip1}遺伝子導入したCa9-22細胞におけるp27^{Kip1}の発現.

B. 位相差顕微鏡下での細胞形態の観察

上段; Ca9-22親株

下段; p27^{Kip1}遺伝子導入したCa9-22細胞.

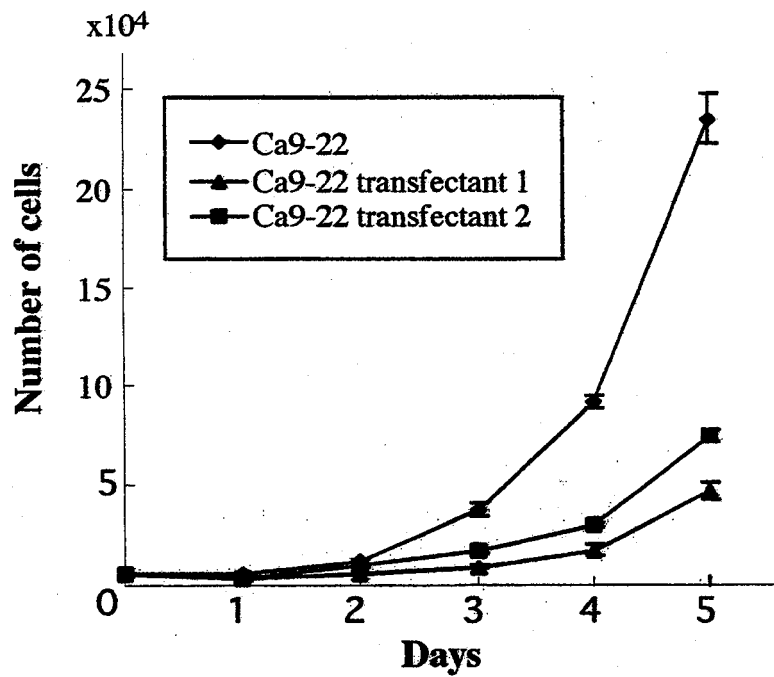


図11. p27^{Kip1}遺伝子導入の細胞増殖に対する影響

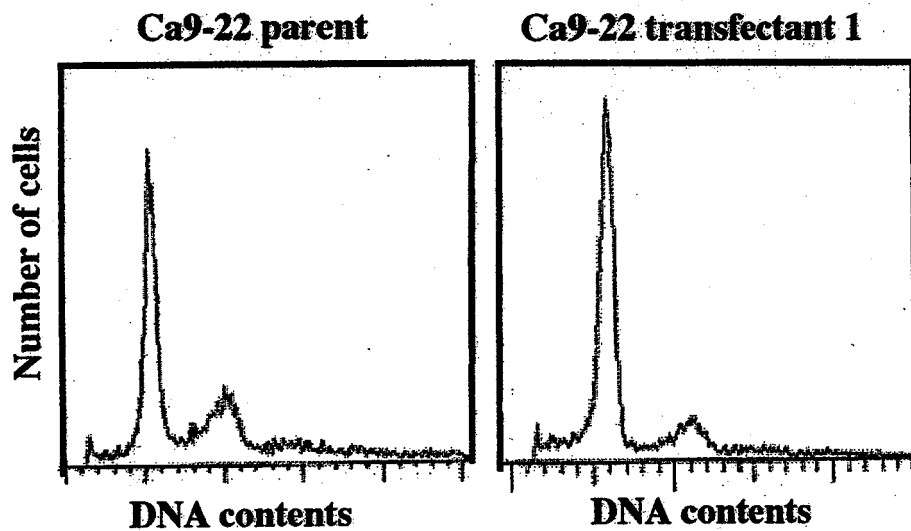


図12. p27^{Kip1}遺伝子導入の細胞周期に対する影響

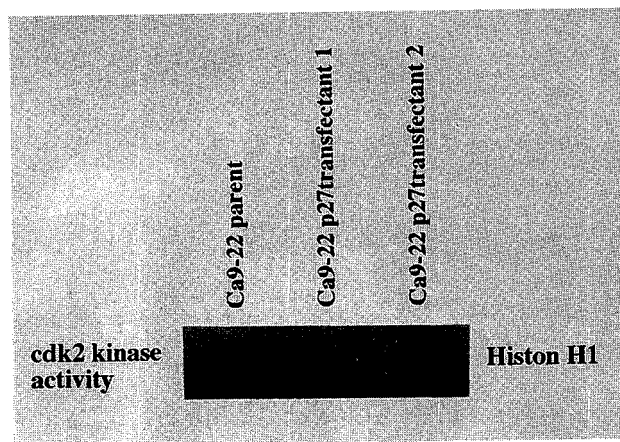


図13. p27^{Kip1}遺伝子導入による細胞周期の進行阻害

IV. 考 察

1. 口腔扁平上皮癌におけるp27^{Kip1}の発現低下の意義について

癌の発生および進展には、様々な細胞周期調節因子の異常が関与すると考えられている^{1,2)}。乳癌および大腸癌の多くの症例でp27^{Kip1}タンパクの発現低下がみられ、癌の悪性度や予後と相関することが報告されていることより¹⁹⁻²³⁾、本研究では、口腔扁平上皮癌におけるp27^{Kip1}タンパクの発現を免疫組織化学的手法により検索し、臨床病理学的所見との相関性を検討した。その結果、正常口腔粘膜上皮では、全例においてp27^{Kip1}の強い発現を有するのに対して、口腔扁平上皮癌では87%の症例において発現低下がみられることが示された。癌における遺伝子異常に関する検討のうち、p53遺伝子の異常は頻度が高く、口腔扁平上皮癌では約60-80%の症例で認められ²⁶⁻²⁹⁾、我々もまた、64%の症例でp53の異常がみられることを見出している。しかし、p27^{Kip1}タンパクの発現低下の頻度は、p53の異常の頻度に比べても高いものであった。また、p27^{Kip1}タンパクの発現低下は、乳癌、大腸癌、胃癌など様々な悪性腫瘍において約70-80%の高頻度に認められることも報告されており¹⁹⁻²³⁾、p27^{Kip1}タンパクの発現低下は、癌における共通のeventであることが示唆された。

また、高度の異型性を有する上皮異形成症において50%の症例でp27^{Kip1}タンパクの発現低下がみられたことより、p27^{Kip1}タンパクの発現低下は発癌過程の初期に関与していることが示唆されたが、口腔扁平上皮癌の病期の

進行や転移ともよく相関していたことから、癌の進展にも関与していることが考えられた。さらに、p27^{Kip1}タンパクの発現のない症例では、p27^{Kip1}タンパク発現症例に比べて生存率が低かったことは、p27^{Kip1}タンパクの発現が予後判定因子として有用であることが示唆された。

発癌過程における遺伝子異常には、p53遺伝子変異、p16^{Ink4a}遺伝子のメチル化や欠失、cyclin D, Eの遺伝子増幅などのDNAレベルでの異常が関与していると考えられている^{1,2,30}。しかし、p27^{Kip1}遺伝子は白血病をはじめとした種々のヒト癌において、比較的高頻度に染色体異常がみられるヒト染色体12p13に存在し、実際にこの染色体領域に異常をもつ癌細胞において高頻度に欠失していることが報告されているが、これらの症例においても、残されたもう一方のp27^{Kip1}遺伝子に異常はみられないことが報告されており³²⁻³⁵、後述するように、DNAレベルでの異常というよりもposttranscriptionalな異常によりp27^{Kip1}タンパクの発現低下がおこると考えられている。細胞におけるp27^{Kip1}タンパクの発現低下は、異常な増殖をひきおこし、癌化に関与すると考えられる。

p27^{Kip1}タンパクの発現低下と癌の転移がよく相関していたことは、p27^{Kip1}の細胞接着に対する関与が推測される。それは、ヒトおよびマウス癌細胞において、p27^{Kip1} antisense処理によりp27^{Kip1}の発現を低下させると、細胞間の接着能が低下し、細胞増殖が促進されるという報告があることから推測される³¹。p27^{Kip1}がカドヘリンやインテグリンなどの細胞接着因子との相互関係により細胞接着に直接的あるいは間接的に関与しているかもしれない。今後、p27^{Kip1}タンパクの発現低下と癌の転移に関する詳細な解析が必

要であると考えられる。

著者が行った予備実験の結果、口腔扁平上皮癌の手術切除組織を用いたwestern blot法による検討においても、約半数の症例でp27^{Kip1}タンパクの発現低下が認められたが、免疫組織化学的検討でみられた結果(87%)よりも低い結果であった。これは、p27^{Kip1}が正常の口腔粘膜上皮やリンパ球に強い発現を示すことから、手術切除組織を用いたwestern blot法による解析では、組織中の癌組織の割合やリンパ球浸潤の程度に解析結果が左右されやすいことによるものとみなされた。

今後、病理診断業務における遺伝子診断が、益々応用範囲を広げるものと考えられ、p27^{Kip1}タンパクの発現低下を検討することも、口腔扁平上皮癌における癌の悪性度や予後判定に重要な因子として位置づけられるものと考えられる。

2. 口腔扁平上皮癌におけるp27^{Kip1}の発現低下の機序について

口腔扁平上皮癌におけるp27^{Kip1}タンパクの発現低下の機序を解明するために、口腔扁平上皮癌細胞6株におけるp27^{Kip1} mRNAおよびタンパクの発現を調べたところ、すべての細胞株でp27^{Kip1} mRNAの高い発現がみられたにもかかわらず、p27^{Kip1}タンパクの発現は4株で低下していた。これらの細胞株には、いずれもSouthern blot法によるDNAレベルでの異常は検出されなかったことから、p27^{Kip1}タンパクの発現低下はp27^{Kip1}の遺伝子変異や転写の抑制によっておこるのではないことが判明した。

さらに、p27^{Kip1}タンパクの発現のない口腔扁平上皮癌細胞株で、プロテアソームの特異的な阻害剤であるLLnVを投与したところ、p27^{Kip1}タンパクの発現が誘導されたことから、p27^{Kip1}タンパクの発現低下には、p27^{Kip1}の遺伝子変異や転写の抑制よりもむしろ、翻訳後のプロテアソームによる分解の関与が推測された。口腔扁平上皮癌組織についても、一部の手術切除組織材料を用いて、p27^{Kip1} mRNAの発現をRT-PCR法により検討したが、検討したすべての症例で高い発現を示していた。p27^{Kip1}タンパクは、増殖刺激により、細胞がG1/S期に進行する際に、ユビキチン化を経てプロテアソームにより分解され、発現量が低下することが知られている¹³⁾。また、大腸癌においても、p27^{Kip1}タンパクの発現低下した症例で、精製したp27^{Kip1}タンパクをcell lysate中に入れるとそのタンパクが分解され、その分解活性は、癌組織におけるp27^{Kip1}タンパクの発現低下と相関することが報告されている²¹⁾。p27^{Kip1}の187番のスレオニン残基がリン酸化されるとp27^{Kip1}が不安定になり、分解

されやすくなることが知られていることから³⁶⁾, 癌細胞におけるp27^{Kip1}タンパクの分解には, 他の因子によるp27^{Kip1}のリン酸化あるいはリン酸化を認識するユビキチンシステムの異常が考えられる。しかしながら, p27^{Kip1}タンパクの分解については, 未だよくわかっておらず, p27^{Kip1}タンパクの分解の詳細なメカニズムを解明することが, 今後の課題として重要である。

3. p27^{Kip1}をターゲットとした遺伝子治療の可能性について

口腔扁平上皮癌の多くの症例においてp27^{Kip1}の発現低下が認められ、癌の悪性度や転移とよく相関していたことから、p27^{Kip1}をターゲットにした口腔扁平上皮癌の遺伝子治療の妥当性が支持された。そこで、本研究ではプロテアソーム阻害剤投与によるp27^{Kip1}タンパクの分解阻止およびp27^{Kip1}遺伝子導入の口腔扁平上皮癌細胞に対する影響について検討をした。

p27^{Kip1}やp53を含めた様々な細胞周期調節因子が、生理的にユビキチンを介したプロテアソームによって分解され、他にも様々な癌原タンパクや転写調節因子(c-Myc, c-Fos, c-Jun, NF- κ B/I κ B)もプロテアソームによって分解されることが知られている^{13, 37-40}。そこでまず、プロテアソーム阻害剤を口腔扁平上皮癌細胞に投与したところ、cyclin DおよびCDC25Aの発現低下およびp27^{Kip1}の発現増加による細胞周期進行の阻害が認められ、アポトーシスの誘導が認められた。これまでにプロテアソーム阻害剤投与によるp53の発現増加により、アポトーシスが誘導されることが報告されているが^{41,42}、本研究ではp53タンパクの発現増加はみられなかった。これは、おそらく今回用いた口腔扁平上皮癌細胞株が、p53遺伝子に異常をもっていることによるものと考えられる²⁶。このことは、p53遺伝子に異常をもたせた線維芽細胞ではプロテアソーム阻害剤の影響を受けなかったというWhitesellらの報告に矛盾しない⁴³。よって、口腔扁平上皮癌細胞におけるプロテアソーム阻害剤投与によるアポトーシス誘導は、p53 independentなpathwayで

あると考えられる。

本研究では、プロテアソーム阻害剤投与によって、cyclin DおよびCDC25Aの発現低下およびp27^{Kip1}の発現増加がみられ、cdk2, cdk4, cyclin E, p21, p53には変化が認められなかった。p27^{Kip1}の発現増加は、プロテアソーム阻害剤の直接的影響であると考えられるが、cyclin DおよびCDC25Aの発現は、プロテアソーム阻害剤投与によりかえって低下したことより、分解阻害による直接的な影響とは考えにくい。これらのタンパク発現量の変化は、いずれも細胞周期進行の阻止を示唆する所見であり、cdk2 kinase活性の消失およびphospho pRbの発現低下からも確認された。また、プロテアソーム阻害剤投与によるアポトーシス誘導が、p27^{Kip1} antisense導入により阻害されたことから、これらのタンパクの変化のなかでも特にp27^{Kip1}の発現増加は、細胞周期進行の阻害に重要な役割を果たしているだけでなく、アポトーシスの誘導にも関与していると考えられる。p27^{Kip1}とアポトーシスの関係については、p27^{Kip1}遺伝子導入による過剰発現によって、乳癌や子宮頸部癌などの細胞株にアポトーシスが誘導されるという報告とよく一致する^{44,45)}。

プロテアソーム阻害剤投与によるアポトーシスの誘導には、caspase familyであるCPP32の活性化およびアポトーシスの抑制に関わるBcl-2の発現低下が関与していた。プロテアソーム阻害剤投与によるアポトーシスの誘導に、CPP32 (caspase 3)の活性化が関与しており、ICE (caspase 1)の活性化はみられないことがすでに報告されている⁴⁶⁾。CPP32の活性化が、プロテアソーム阻害剤の直接的影響かどうかについては、まだよくわかっていないが、CPP32の活性化をBcl-2が阻害することが知られているので⁴⁷⁾、Bcl-2

の発現低下が認められたことは、アポトーシス誘導に矛盾しない。アポトーシス誘導におけるp27^{Kip1}の関連に関する詳しいメカニズムについても、今後の検討課題の1つである。

口腔扁平上皮癌の遺伝子治療のもう1つのアプローチとして、p27^{Kip1}遺伝子導入について検討した。p27^{Kip1}の発現の高かったCa9-22細胞とp27^{Kip1}の発現のなかったHSC2細胞を用いて遺伝子導入を行い、p27^{Kip1}発現クローンを得た。p27^{Kip1}遺伝子を導入したCa9-22細胞では、増殖の抑制およびp27^{Kip1}過剰発現によるcdk2 kinase活性の消失およびG1 arrestが認められ、細胞周期の進行が阻害されたが、HSC2細胞ではこの様な現象はみられなかった。その原因としては、HSC2細胞において、遺伝子導入されたp27^{Kip1}が分解されてしまったためであると考えられる。p27^{Kip1}遺伝子導入法として、今回はリポフェクション法を用いたが、この方法は遺伝子導入効率が低いため、アデノウイルスなどの比較的導入効率の高い方法を選択し、強い遺伝子発現を誘導するベクターを用いることが必要であると考えられる。アポトーシスの誘導については、もしかするとp27^{Kip1}遺伝子を導入したCa9-22細胞において、p27^{Kip1}の過剰発現によって誘導されたかもしれないが、本研究では、p27^{Kip1}発現クローンを得る目的で薬剤選択を行っているため、今回は生き残った細胞を解析することしか検討できなかった。アデノウイルスベクターを用いて、p27^{Kip1}遺伝子導入により、乳癌や子宮頸部癌などの細胞株にアポトーシスを誘導できることが報告されているので^{44,45)}、今後、OSCC細胞においても遺伝子導入効率の高いアデノウイルスベクターを用いて一過性に遺伝子導入するかあるいは、テトラサイクリンによる遺伝子発現の制御できる

ベクターを用いて、アポトーシスの誘導について検討することが必要と考えられる。

本研究では、p27^{Kip1}をターゲットとした遺伝子治療の可能性として、プロテアソーム阻害剤投与によりp27^{Kip1}の分解を阻止する方法とp27^{Kip1}遺伝子導入を検討したが、いずれの方法もp27^{Kip1}を過剰発現させることによって、アポトーシスあるいは増殖抑制を誘導できることが判明した。それぞれの方法には、上記に考察したように改良すべき点はいくつかあげられたが、いずれの方法もp27^{Kip1}をターゲットとした遺伝子治療として有用であることが示唆された。

p27^{Kip1}タンパクは、正常の細胞において、細胞が増殖する際に、ユビキチン化を経てプロテアソームにより分解され、発現量が低下することが知られており¹³⁾、p27^{Kip1}の187番のスレオニン残基がリン酸化されるとp27^{Kip1}が不安定になり、分解されやすくなることも明らかになっている³⁶⁾。しかし、癌において、なぜp27^{Kip1}タンパクが分解されやすくなっているかは、未だわかっていない。プロテアソームによって分解されるタンパクは、数多く存在していることから、プロテアソーム自身の異常によりp27^{Kip1}タンパクだけが分解されることは考えにくい。ユビキチンによる認識機構は、それぞれのタンパクによって特異的であるため、ユビキチンによる認識機構の異常あるいはp27^{Kip1}タンパクを分解させやすくする他の因子の存在が考えられる。

また、EBウイルス(Epstein-Barr virus)は、核抗原に含まれる内在性のグリシン-アラニン(GA)反復配列を利用して、ユビキチン-プロテアソーム経路での分解を逃れることが知られている⁴⁸⁾。Sharipoらは、ユビキチン-プロテ

アソーム介在性タンパク質分解によって制御されることが知られている I κ Bの分解が, アミノ酸配列8個分のGA反復配列の挿入によって防止することを報告している⁴⁹⁾。よって, p27^{Kip1}タンパクにGA反復配列の挿入により, 分解を防止することができるかもしれない。癌におけるp27^{Kip1}タンパク分解のメカニズムを解明することによって, p27^{Kip1}タンパクをターゲットとした遺伝子治療の可能性が高まることと思われる。

V. 結 論

口腔扁平上皮癌におけるp27^{Kip1}の関与およびp27^{Kip1}をターゲットとした遺伝子治療の可能性に関して検討を行った結果、以下の結論を得た。

1. 口腔扁平上皮癌の多くの症例においてp27^{Kip1}の発現低下が認められ、癌の悪性度および予後とよく相関していたことから、p27^{Kip1}の発現低下が予後判定因子として有用であるとともに口腔扁平上皮癌の発生や進展に重要な役割を果たしていると考えられた。

2. p27^{Kip1}の発現低下した口腔扁平上皮癌細胞株でプロテアソーム阻害剤によりp27^{Kip1}の発現が誘導されたことから、口腔扁平上皮癌におけるp27^{Kip1}タンパクの発現低下には、翻訳後のプロテアソームによる分解が関与していると推測された。

3. プロテアソーム阻害剤投与によるp27^{Kip1}タンパクの分解阻害によりアポトーシスの誘導がみられた。また、p27^{Kip1}遺伝子導入により細胞の増殖抑制が認められた。これらの結果から、プロテアソーム阻害剤投与およびp27^{Kip1}遺伝子導入は、p27^{Kip1}をターゲットとした口腔扁平上皮癌の新しい治療法として有用であることが示唆された。

VI. 文 献

- 1) Sherr CJ. G1 phase progression: cycling on cue. *Cell*, 79:515-555, 1994.
- 2) Hunter T and Pines J. Cyclins and cancer II: cyclin D and CDK inhibitors come of age. *Cell*, 79:573-582, 1994.
- 3) Sherr CJ. Mammalian G1 cyclins. *Cell*, 73:1059-1065, 1993.
- 4) El-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Persons R, Trent JM, et al. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell*, 75:817-825, 1993.
- 5) Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell*, 75:805-816, 1993.
- 6) Polyak K, Kato JY, Solomon MJ, Sherr CJ, Massague J, Roberts JM, et al. p27^{Kip1}, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor- β and contact inhibition to cell cycle arrest. *Gene Dev*, 8:9-22, 1994.
- 7) Toyoshima H, Hunter T. p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-Cdk protein kinase activity, is related to p21. *Cell*, 78:67-74, 1994.
- 8) Polyak K, Lee MH, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Massague J. Cloning of p27^{Kip1}, a cyclin-Cdk inhibitor and potential mediator of extracellular antimitogenic signals. *Cell*, 78:59-66, 1994.
- 9) Kamb A, Gruis NA, Weaver-Feldhaus J, Liu Q, Harshman K, Tavitgian SV, et

al. A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science*, 264:436-440, 1994.

10) Hannon GJ, Beach D. p15^{INK4B} is a potent effector of TGF- β -induced cell cycle arrest. *Nature*, 371:257-261, 1994.

11) Nobori T, Miura K, Wu DJ, Lois A, Takabayashi K, Carson DA. Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers. *Nature*, 368:753-756, 1994.

12) Serrano M, Hannon GJ, Beach D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature*, 366:704-707, 1993.

13) Pagano M, Tam SW, Theodoras AM, Beer-Romero P, Del Sal G, Chau V, et al. Role of the ubiquitin-proteasome pathway in regulating abundance of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *Science*, 269:682-685, 1995.

14) Kranenburg O, Scharnhorst V, Van der Eb AJ and Zantema A. Inhibition of cyclin-dependent kinase activity triggers neuronal differentiation of mouse neuroblastoma cells. *J Cell Biol*, 131:227-234, 1995.

15) Brorson K, Brunswick M, Ezhevsky S, Wei DG, Berg R, Scott D, Stein KE. *xid* affects events leading to B cell cycle entry. *J Immunol*, 159:135-143, 1997.

16) Fero ML, Rivkin M, Tasch M, Porter P, Carow CE, Firpo E, Polyak K, Tsai LH, Broudy V, Perlmutter RM, Kaushansky K, Roberts JM. A syndrome of multiorgan hyperplasia with features of gigantism, tumorigenesis, and female sterility in p27^{Kip1}-deficient mice. *Cell*, 85:733-44, 1996.

17) Kiyokawa H, Kineman RD, Manova-Todorova KO, Soares VC, Hoffman ES, Ono M, Khanam D, Hayday AC, Frohman LA, Koff A. Enhanced growth of mice lacking the cyclin-dependent kinase inhibitor function of p27^{Kip1}. *Cell*, 85:721-32, 1996.

18) Nakayama K, Ishida N, Shirane M, Inomata A, Inoue T, Shishido N, Horii I, Loh DY, Nakayama K. Mice lacking p27^{Kip1} display increased body size, multiple organ hyperplasia, retinal dysplasia, and pituitary tumors. *Cell*, 85:707-20, 1996.

19) Porter PL, Malone KE, Heagerty PJ, Alexander GM, Gatti LA, Firpo EJ, et al. Expression of cell-cycle regulators p27^{Kip1} and cyclin E, alone and in combination, correlates with survival in young breast cancer patients. *Nat Med*, 2:222-225, 1997.

20) Catzavelos C, Bhattacharya N, Ung YC, Wilson JA, Roncari L, Sandhu C, et al. Decreased levels of the cell-cycle inhibitor p27^{Kip1} protein: prognostic implications in primary breast cancer. *Nat Med*, 2:227-230, 1997.

21) Loda M, Cukor B, Tam SW, Lavin P, Fiorentino M, Draetta GF, et al. Increased proteasome-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in aggressive colorectal carcinomas. *Nat Med*, 2:231-234, 1997.

22) Fredersdorf S, Burns J, Milne AM, Packham G, Fallis L, Gillett CE, et al. High level expression of p27^{Kip1} and cyclin D1 in some human breast cancer cells: Inverse correlation between the expression of p27^{Kip1} and degree of malignancy in human breast and colorectal cancers. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94:6380-6385, 1997.

- 23) Yasui W, Kudo Y, Semba S, Yokozaki H, Tahara E. Reduced expression of cyclin-dependent kinase inhibitor p27^{Kip1} is associated with advanced stage and invasiveness of gastric carcinomas. *Jpn J Cancer Res*, 88:625-629, 1997.
- 24) Kondo S, Tanaka Y, Kondo Y, Hitomi M, Barnett GH, Ishizaka Y, Liu J, Haqqi T, Nishiyama A, Villeponteau B, Cowell JK and Barna BP. *FASEB J*, 12:801-811, 1998.
- 25) Japan Society for Head and Neck Cancer. General Rules for Clinical and Pathological Studies on Head and Neck Cancer, 2nd Edition. Tokyo: Kanehara, 1991.
- 26) Sakai E and Tsuchida N. Most human squamous cell carcinomas in the oral cavity contain mutated p53 tumor-suppressor genes. *Oncogene*, 7: 927-933, 1992.
- 27) Kusama K, Okutsu S and Takeda K. p53 gene alteration and p53 protein in oral epithelial dysplasia and squamous cell carcinoma. *J Pathol*, 178:415-421, 1996.
- 28) Heinzl PA, Balaram P and Bernard H-U. Mutation and polymorphism in the p53, p21 and p16 genes in oral carcinomas of indian betelquid chewers. *Int J Cancer*, 68:420-423, 1996.
- 29) De Araujo VC, Loyola AM, Santos Pinto Jr DD, Borra RC, De Araujo NS: p53 in biopsies of oral squamous cell carcinoma. A comparative study with a malignancy grading system. *Oral Oncol*, 33:5-9, 1997.
- 30) Goodger NM, Gannon J, Hunt T and Morgan PR. Cell cycle regulatory proteins-an overview with relevance to oral cancer. *Oral Oncol*, 33:61-73, 1997.

- 31) St Croix S, Florenes VA, Rak JW, Flanagan M, Bhattacharya N, Slingerland JM, et al. Impact of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27^{Kip1} on resistance of tumor cells to anticancer agents. *Nat Med*, 2:1204-1210, 1996.
- 32) Pietenpol JA, Bohlander SK, Sato Y, Papadopoulos N, Liu B, Friedman C, Trask BJ, Roberts JM, Kinzler KW, Rowley JD, et al. Assignment of the human p27^{Kip1} gene to 12p13 and its analysis in leukemia. *Cancer Res*, 55:1206-1210, 1995.
- 33) Ponce-Castaneda MV, Lee MH, Latres E, Polyak K, Lacombe L, Montgomery K, Mathew S, Krauter K, Sheinfeld J, Massague J, et al. p27^{Kip1}: chromosomal mapping to 12p12-12p13.1 and absence of mutations in human tumors. *Cancer Res*, 55:1211-1214, 1995.
- 34) Kawamata N, Morosetti R, Miller CW, Park D, Spirin KS, Nakamaki T, Takeuchi S, Hatta Y, Simpson J, Wilczynski S, et al. Molecular analysis of the cyclin-dependent kinase inhibitor gene p27/Kip1 in human malignancies. *Cancer Res*, 55:2266-2269, 1995.
- 35) Cave H, Gerard B, Martin E, Guidal C, Devaux I, Weissenbach J, Elion J, Vilmer E and Grandchamp B. Loss of heterozygosity in the chromosomal region 12p12-13 is very common in childhood acute lymphoblastic leukemia and permits the precise localization of a tumor-suppressor gene distinct from p27^{Kip1}. *Blood*, 86:3869-3875, 1995.
- 36) Vlach J, Hennecke S and Amati B. Phosphorylation-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27^{Kip1}. *EMBO J*, 16; 5334-5344, 1997.

- 37) Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. *Cell*, 79:13-22, 1994.
- 38) Goldberg AL. The mechanism and functions of ATP-dependent proteases in bacterial and animal cells. *Eur J Biochem*, 203:9-23, 1992.
- 39) Rolfe M, Chiu MI and Pagano M. The ubiquitin-mediated proteolytic pathway as a therapeutic area. *J Mol Med*, 75:5-17, 1997.
- 40) Maki CG, Huijbregeste JM and Howley PM. In vivo ubiquitination and proteasome-mediated degradation of p53. *Cancer Res*, 56:2649-2654, 1996.
- 41) Shinohara K, Tomioka M, Nakano H, Tone S, Ito H and Kawashima S. Apoptosis induction resulting from proteasome inhibition. *Biochem J*, 317:385-388, 1996.
- 42) Lopes UG, Erhardt P, Yao R and Cooper GM. p53-dependent induction of apoptosis by proteasome inhibitors. *J Biol Chem*, 272:12893-12896, 1997.
- 43) Whitesell L, Sutphin P, An WG, Schulte T, Blagosklonny MV and Neckers L. Geldanamycin-stimulated destabilization of mutated p53 is mediated by the proteasome in vivo. *Oncogene*, 14:2809-2816, 1997.
- 44) Wang X, Gorospe M, Huang Y and Holbrook NJ. p27^{Kip1} overexpression causes apoptotic death of mammalian cells. *Oncogene*, 15:2991-2997, 1997.
- 45) Katayose Y, Kim M, Rakkar ANS, Li Z, Cowan KH and Seth P. Promoting apoptosis: A novel activity associated with the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *Cancer Res*, 57:5441-5445, 1997.
- 46) Drexler HCA. Activation of the cell death program by inhibition of

proteasome function. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94:885-860, 1997.

47) Armstrong RC, Aja T, Xiang J, Gaur S, Krebs JF, Hoang K, Bai X, Korsmeyer SJ, Karanewsky DS, Fritz LC and Tomaselli KJ. Fas-induced activation of the cell death-related protease CPP32 is inhibited by Bcl-2 and by ICE family protease inhibitors. *J Biol Chem*, 271:16850-16855, 1996.

48) Letvitskaya J, Sharipo A, Leonchiks A, Ciechanover A and Masucci MG. Inhibition of ubiquitin/proteasome-dependent protein degradation by the Gly-Ala repeat domain of the Epstein-Barr-virus antigen 1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94:12616-12621, 1997.

49) Sharipo A, Imreh M, Leonchiks A, Imreh S and Masucci MG. A minimal glycine-alanine repeat prevents the interaction of ubiquitinated I κ B α with the proteasome: a new mechanism for selective inhibition of proteolysis. *Nat Med*, 4:939-944, 1998.