

ヒト精巣腫瘍由来セミノーマ細胞株 (JKT-1) の cis-diamminedichloroplatinum (II) による細胞死誘導について

松木 孝和

ヒトセミノーマ細胞株を cis-diamminedichloroplatinum (II) (以下 CDDP と省略) で処理して、その細胞死の様子を観察した。CDDP 処理により細胞は濃度依存性に速やかに数の低下が認められ、CDDP のセミノーマ細胞に対する強い抗腫瘍作用が確認された。形態的には腫瘍細胞核の断片化が高濃度群により強く認められた。また CDDP 処理時の細胞周期の解析では細胞は S 期、続いて G₂/M 期に集積した後に約 12 時間後から hypoploid の部分が増えており、この部分がアポトーシスに陥った細胞であろうと考えられた。最終的に電気泳動で経時的に発現する DNA の断片化が証明されたため、セミノーマ細胞は CDDP 投与によりアポトーシスが誘導されて死んでいくことが証明された。

(平成 9 年 5 月 24 日受理)

Induction of Cell Death by Cis-diamminedichloroplatinum (II) in a Human Testicular Seminoma Cell Line (JKT-1)

Takakazu MATSUKI

A human testicular seminoma cell line was treated with cis-diamminedichloroplatinum (II) (CDDP). Treatment with CDDP resulted in rapid and concentration-dependent cell death or decrease in cell numbers, confirming that CDDP has a strong anticancer activity against seminoma cells. The tumor cell nuclei showed fragmentation that was more pronounced at a high CDDP concentration. Cell cycle analysis after CDDP treatment showed that cells accumulated in the S and G₂/M phases, and that there was an increase in the number of hypoploid cells after approximately 12 hours. The hypoploid cells were thought to have undergone apoptosis. Demonstration of DNA fragmentation by electrophoresis confirmed that CDDP caused the death of seminoma cells by inducing apoptosis. (Accepted on May 24, 1997) *Kawasaki Igakkaishi* 23(1): 35-43, 1997

Key Words ① Seminoma ② Apoptosis
③ CDDP

緒 言

我々は世界初のヌードマウス移植可能なヒト精巣腫瘍由来セミノーマ細胞株の樹立に成功した¹⁾。この細胞株はすでに300継代以上を経て安定増殖しており、その間他の胚細胞腫瘍への分化は見られていない。精巣腫瘍は若年男性に多く発生するため臨床上重要で、なかでもセミノーマは最も高頻度である²⁾。一方セミノーマは抗癌剤に対する感受性が極めて高い固形癌としても良く知られており³⁾、CDDPの出現によりその予後は飛躍的に改善した。一般に固形癌は抗癌剤に対する感受性が低いので、このような抗癌剤に感受性が高い細胞は非常に興味深いところである。しかし、セミノーマは細胞株樹立が大変困難で⁴⁾、安定増殖する細胞株も存在しなかったことから現在までその抗癌剤による作用機序の過程は全く観察されていない。一方、最近いくつかの細胞、特に抗癌剤に感受性の高い造血器腫瘍を中心に、抗癌剤投与により腫瘍細胞がアポトーシスに陥り細胞死をきたす現象が報告されている^{5)~9)}。抗癌剤に感受性の高い固形癌であるセミノーマ細胞のCDDP投与時の細胞死の様子を、観察することは非常に意味のあることと考えられる。今回の実験ではこれらの変化を *in vitro* で観察したので報告する。

材 料 と 方 法

細胞株と培養

細胞株は我々が樹立したヒト精巣腫瘍由来セミノーマ細胞株(JKT-1)を用いた¹⁾。この細胞は現在300継代を越えて *in vitro* で安定増殖しており、他の胚細胞腫瘍への分化を認めていない。この細胞を10%非動化FCSと2mMのグルタミン、60 μ g/mlカナマイシンを含むMEM培地で37.0°C、5%CO₂の条件下で培養した。なお今回用いた細胞にマイコプラズマ感染は認めない。

抗癌剤処理と細胞毒性

細胞を90mmのdishに 1×10^4 ずつまき込み、無血清培地を用いて、最終濃度がそれぞれ0.5, 1, 2, 5, 10, 25, μ MになるようにCDDP(日本化薬 東京)で処理、遮光下で再び37°C、5%CO₂の条件で培養、2時間後にCDDPを洗い流した後、もとのMEM培地に培地交換を行った。処理よりそれぞれ1, 3, 5, 7, 9日後に細胞数を数え、生細胞率を計算した。

形態観察

CDDP処理より6, 12, 18, 24, 36, 48, 72時間後の細胞を集めて洗浄した後、1%グルタルアルデヒドで4時間固定、洗浄したのちPBSで希釈、0.2mMのHoechst 23258で染色し、蛍光顕微鏡にて、細胞核の様子を観察した。

細胞周期の解析

細胞を90mmのdishに 1×10^4 ずつまき込み、対数増殖期にある3日後に無血清培地に培地交換を行った後、同様にCDDPで処理、培養した。処理より同時間後に細胞を集めたのちPBSにて洗浄し、70%エタノールで4°C、5時間固定、一度洗浄を行い上清を完全に除去した後PBS 100 μ lに浮遊させ、RNase A (200 μ g/ml)を1 μ l加えて50分間、37°Cにて処理、洗浄後にPBS 1mlに浮遊させ、Propidium iodide(40 μ g/ml)を50 μ l加えて染色し、FACScaliber(Cell Quest)にて 1×10^4 個の細胞の核DNA量を測定、解析した。なお各細胞周期の割合は基準線に従って算定した。

DNA ladder 検出

1×10^6 個の細胞をCDDP処理より0, 4, 6, 12, 24, 48時間後に集めてPBSで洗浄した後、細胞融解バッファー(10mM EDTA および0.5% Triton X-100を含む10mM Tris-HCl バッファー, pH:7.4)を100 μ l加え4°C、10分間処理し細胞を融解、処理後16,000rpm、20分間遠心し、上清を集めた。この上清にRNase A (20mg/ml)を2 μ l加えて37°C、60分間処理し、続いてProteinase K (20mg/ml)を2 μ lを加えて同様に37°C、60分間処理、最後に20 μ lの5M NaClと120 μ lのイソプロパノールを加え、-20°C、一晚置いてDNAを沈澱させた。回収さ

れたDNAはTEバッファー(1mM EDTAを含む10mM Tris-HClバッファー, pH: 7.4) 10 μ lに溶かし, 3%アガロースゲル(NuSieve: Sea-kem 3:1)で10V/cmで電気泳動を行い, エチジウムブロマイド染色にてトランスイルミネーターでDNAの蛍光を検出した。

ウエスタンブロッティング解析

CDDP処理より0, 6, 12, 24, 48時間後の細胞を集めてRIPA buffer (150mM NaCl, 1% NP-40(ナカライテスク社製), 1%デオキシコール酸ナトリウム(SIGMA社製), 1%SDS(ナカライテスク社製)を含む50mM Tris-HCl (pH: 7.2))に懸濁, -20°Cで凍結-融解を3回繰り返したのち0°C, 15,000rpmで10分間遠沈し, 上清を蛋白質分画サンプルとして用いた。蛋白質定量用試薬(Bio-Rado社製)でそれぞれの総蛋白質量を産出, それぞれ20 μ gずつSDS-PAGEにて分離, また分子量マーカーとしてレインボーマーカー(Amersham社製)を同様に泳動した後ニトロセルロース膜に転写し, 12時間ブロッキング液(5%スキムミルク)でブロックしたのち洗浄, 100倍p53一次抗体(オンコジーンサイエンス社製)を2時間反応させた。再び洗浄した後, 二次抗体としてHRP結合抗マウスIgG抗体(ZYMID Labo inc.)を

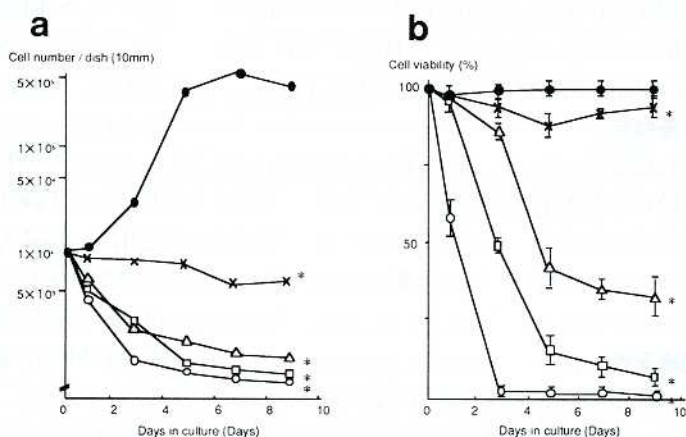


Fig. 1. Effect of CDDP on cell growth (a) and viability (b) of JKT-1 cells (● control, × 0.5 μ M, △ 2 μ M, □ 10 μ M, ○ 25 μ M). Data are displayed as means \pm SD (n = 4). *P < 0.05: versus control

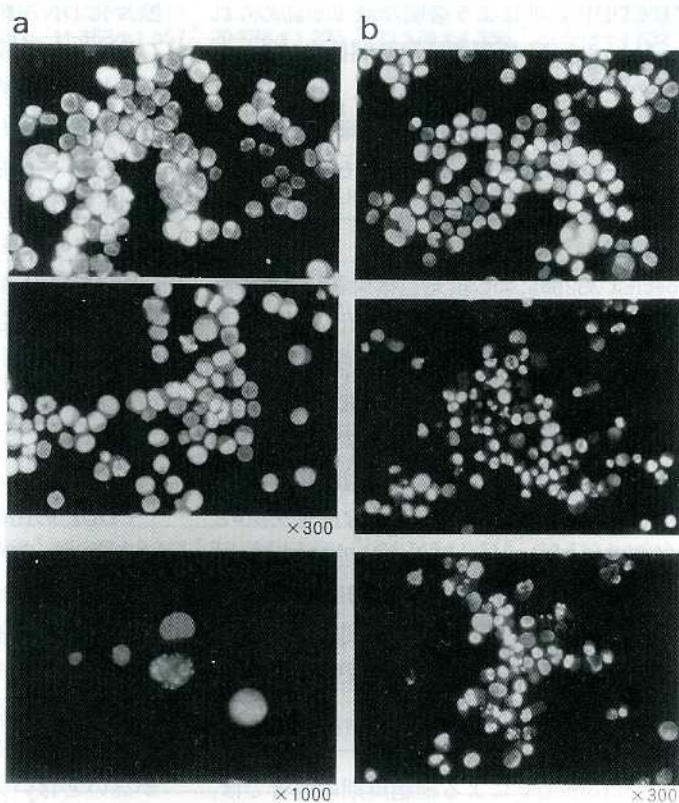


Fig. 2. Morphological analysis of JKT-1 cells treated with CDDP. Cells were stained with Hoechst 33258. (a) upper: control Oh, middle: control 48h, lower: apoptotic cell (arrow). (b) upper: 1 μ M, middle: 5 μ M, lower: 25 μ M after 48h.

30分間反応させた。洗浄後 ECL (Amersham 社製, RPN2106) を反応させて Hyper-film ECL (Amersham 社製) に写して可視化した。

有意差検定

得られたデータは、全て Mann-Whitney 検定を用いて有意差検定を行った。

結 果

薬剤感受性

未処理群では細胞数の増加が認められたのに対して、CDDP 処理群において細胞数の増加は認められず、 $2\mu\text{M}$ 以上の濃度で細胞数は処理後速やかに減少していった (Fig. 1a)。最小濃度である $0.5\mu\text{M}$ 処理群においても細胞増殖能力はほとんど抑制されていた (Fig. 1a)。また生細胞率も CDDP 処理により著明な減少が認められ (Fig. 1b)、 $25\mu\text{M}$ 処理では72時間後にはほとんど全ての生細胞が死に至っていた。 $2\mu\text{M}$ あるいは $10\mu\text{M}$ 処理でも一週間後の生細胞の割合はコントロール群に比べるといずれも有意差をもって低かった (Fig. 1a, b)。

形態の観察

Hoechst 33258による蛍光色素染色による細胞核の観察でも濃度依存性に核の変化の様子が見られた (Fig. 2b)。約12時間後から細胞核は著明な凝集と分葉化を起こし、急速に細胞膜辺縁部に集まっていく様子が観察された (Fig. 2b)。高濃度処理群ではその変化は一層著明で、約48時間後には殆どの細胞がこのような変化を認め、一方低濃度処理群においても未処理群に比べて変化した細胞は多い傾向にあった (Fig. 2b)。未処理群においてもまき込み後48時間後になると、わずかではあるが核の変化した細胞が出現していた (Fig. 2a)。

細胞周期の解析

Flow cytometry による細胞周期の解析では、CDDP 処理後経過とともに S 期、続いて G2/M 期の細胞増加が観察された。72時間後にそれぞれの細胞周期の割合をみると (Table 1)、 0.5 から $10\mu\text{M}$ の範囲では濃度依存性に G1期の細胞が

減少し、S 期の細胞が増加していることが分かった。しかし、 $25\mu\text{M}$ 処理においては G1期細胞の増加と、S 期および G2/M 期の細胞の減少が認められた。さらにそれぞれの様子を詳しく検討してみると (Table 2) 0.5 から $10\mu\text{M}$ 処理の範囲では全て最初に G2/M 期の細胞が増加した後、hypoploid の部分が増加していた。一方 $25\mu\text{M}$ 処理では S 期の細胞が増えた後速やかに hypoploid の部分が増えていた。 $10\mu\text{M}$ 投与においても G2/M 期の細胞は未処理細胞群よりは増加していたものの、予想された様な G2/M 期の増加は示さなかった。その変化を、ヒストグラムにより観察してみると (Fig. 3)、約12時間後から G1期より左に少しずつ、いわゆる hypoploid の部分が増加しており、高濃度群でその傾向はより顕著であった。

断片化 DNA の検出

DNA の電気泳動でも同様に $0.5\mu\text{M}$ を除く全ての処理量で約12時間後から DNA の断片化が顕著に認められ (Fig. 4)、CDDP の投与によりセミノーマ細胞はアポトーシスに陥っていることが証明された。

p53蛋白の検索

p53蛋白の発現の解析は CDDP 処理より 6 時間後に p53蛋白の発現はピークに達し (Fig. 5)、以後発現が続いた。

考 察

CDDP の出現により精巣腫瘍の予後は飛躍的に改善し、CDDP を中心にした多剤併用療法は進行症例を含めても80%以上有効率が報告されている³⁾。その組織型はほとんどが胚細胞腫瘍で、中でも大多数を占めるセミノーマは特に化学療法剤に感受性が高いことが知られている。精巣腫瘍は悪性腫瘍全体から見ると決してその頻度が高いとはいえないが、比較的若年層に発生することから泌尿器科領域での重要な悪性腫瘍の一つである。

現在、悪性腫瘍に対する抗癌化学療法は臨床的に広く用いられており、いくつかの腫瘍にお

Table 1. Percentage of cells in each cell cycle phase in JKT-1 cells treated with various concentration of CDDP for 72h (a) and 6, 12, 18, 24, and 72h (b). Data are displayed as means±SD (n=6). *P<0.05: versus control

CDDP CONCENTRATION (μM)	Cell cycle phases			
	HYPOPLOID	G1	S	G2/M
25	70.067±3.431*	15.920±1.689*	15.790±2.163*	0.957±0.219*
10	39.210±2.568*	8.097±0.904*	47.113±1.994*	8.408±2.057*
5	21.792±2.335*	27.118±2.335*	39.492±5.494*	17.620±2.460*
2	17.952±0.769*	27.677±1.553*	41.031±3.444*	17.227±4.453*
1	12.613±0.683*	49.578±1.420*	32.773±1.023*	7.183±0.555*
0.5	13.089±1.362*	56.877±3.678*	28.188±2.025*	3.273±1.540
CONTROL	9.548±2.013	62.648±2.456	25.204±0.156	2.558±0.243

Table 2.

CDDP (μM)	Time after administered (hours): HYPOPLOID					
	6	12	18	24	36	48
25	9.587±3.593	11.518±0.586*	17.000±2.714*	32.713±4.533*	52.508±8.555*	28.222±2.692*
10	8.963±0.852	8.450±0.467	11.368±1.557*	20.738±1.235*	23.578±4.356*	22.548±4.632*
5	7.378±1.367	7.560±1.119	9.588±0.572	15.650±2.617*	19.418±2.115	13.382±1.020*
2	6.918±0.533	6.367±0.516	9.345±0.638	10.657±1.411*	14.314±2.136*	12.590±2.472*
1	8.488±2.664	7.563±1.357	8.628±0.750	9.162±1.524	14.543±4.020*	10.027±1.516*
0.5	7.335±1.178	6.670±0.471	10.660±2.957	8.887±0.499	12.498±2.155	10.817±1.799*

CDDP (μM)	Time after administered (hours): G1 phase					
	6	12	18	24	36	48
25	46.217±2.090*	39.410±1.854*	26.517±3.210*	29.867±2.628*	24.743±2.685*	34.740±4.063*
10	41.087±2.196*	38.700±4.501*	17.320±2.658*	20.223±2.175*	26.760±4.582*	19.058±2.989*
5	43.085±3.775*	34.105±1.830*	19.992±2.161*	17.397±2.451*	20.227±3.141*	13.000±1.764*
2	45.502±2.758*	37.823±1.925*	29.765±3.892*	25.067±4.428*	26.955±1.861*	23.233±3.377*
1	45.952±2.966*	40.157±1.480*	36.467±3.676*	37.710±2.567*	37.518±4.158*	43.718±4.122*
0.5	47.368±2.439	41.808±1.143*	43.083±5.942	50.550±3.773	45.527±2.214*	48.333±3.214

CDDP (μM)	Time after administered (hours): S phase					
	6	12	18	24	36	48
25	40.883±4.621*	38.425±2.158*	49.237±2.344*	33.788±1.561*	24.745±6.518	39.710±4.940*
10	37.015±1.121*	43.980±3.057*	57.215±1.515*	48.560±1.725*	49.543±4.878*	55.778±3.234*
5	35.615±1.380*	48.742±2.000*	54.965±2.069*	52.115±3.658*	54.860±2.063*	62.592±1.919*
2	30.473±0.854*	40.372±3.345*	44.043±6.247*	45.330±3.930*	50.003±1.617*	58.598±3.085*
1	26.912±2.824	37.817±1.964*	36.907±3.544*	37.637±4.903*	37.933±2.590*	32.008±2.646*
0.5	23.997±0.860	34.972±1.786*	30.365±2.809*	32.012±3.224*	34.765±2.523*	30.688±3.430*

CDDP (μM)	Time after administered (hours): G2/M phase					
	6	12	18	24	36	48
25	5.527±1.186	8.498±0.630*	5.897±1.184	2.938±0.232*	1.788±0.384*	2.247±1.063*
10	8.002±0.608*	6.713±1.811	7.712±0.536*	5.123±0.484	4.615±1.624	5.527±1.465
5	8.985±0.994*	6.718±0.496	8.513±1.558*	6.465±0.844*	8.462±2.360*	13.540±3.302*
2	11.192±0.862*	8.088±0.800*	8.910±2.126*	9.610±1.868*	11.108±1.717*	13.267±3.272*
1	11.418±0.618*	8.012±0.473*	9.635±0.608*	9.170±2.027*	12.448±1.152*	9.777±2.101*
0.5	12.295±0.725*	9.545±1.405*	8.240±1.402*	9.113±0.906*	8.857±1.467*	6.477±1.345*

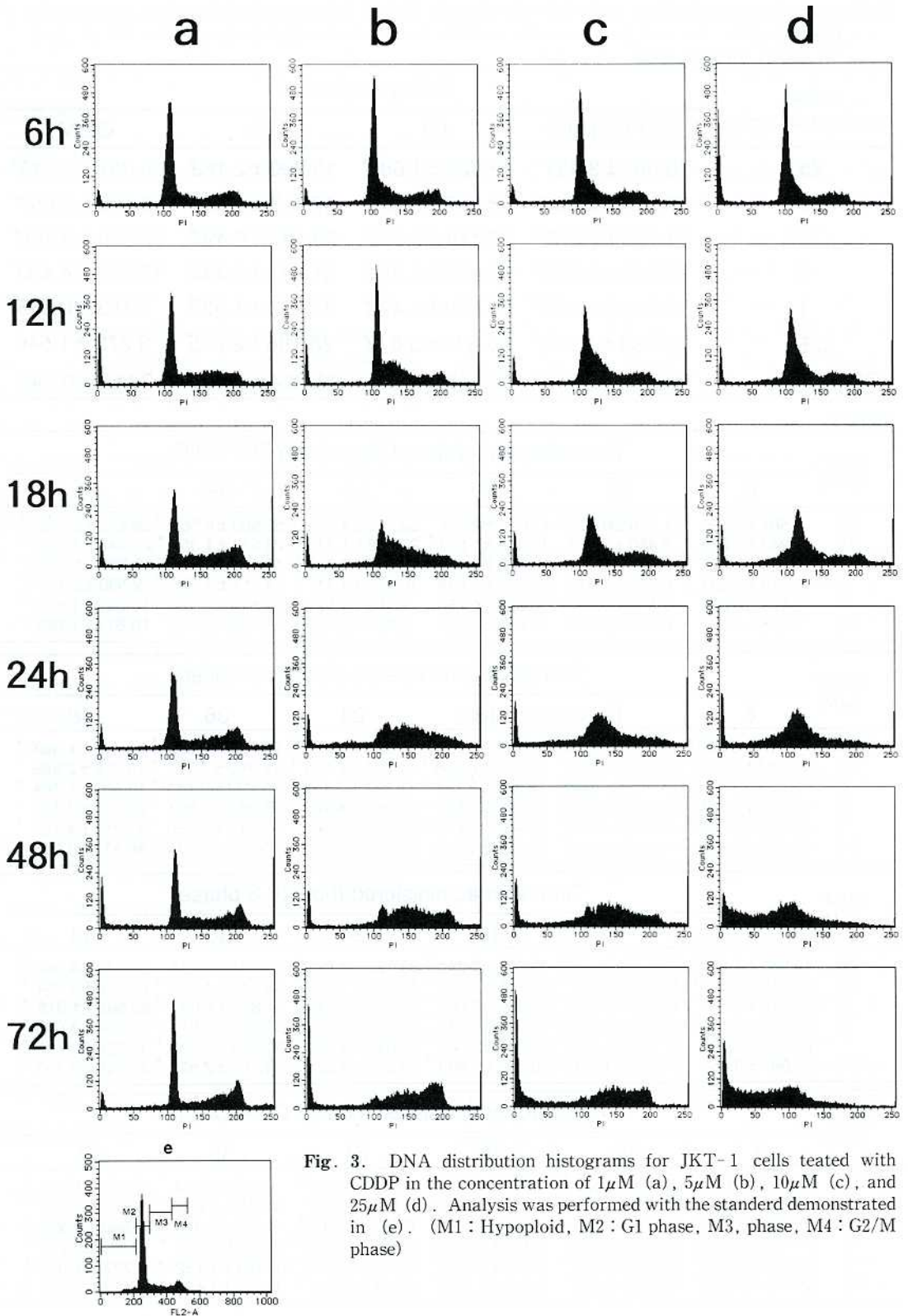


Fig. 3. DNA distribution histograms for JKT-1 cells treated with CDDP in the concentration of $1\mu\text{M}$ (a), $5\mu\text{M}$ (b), $10\mu\text{M}$ (c), and $25\mu\text{M}$ (d). Analysis was performed with the standard demonstrated in (e). (M1 : Hypoploid, M2 : G1 phase, M3, phase, M4 : G2/M phase)

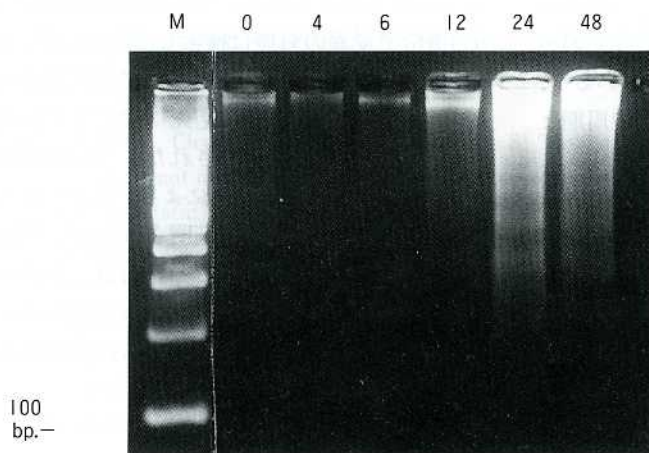


Fig. 4. Agarose gel electrophoresis of DNA extracted from JKT-1 cells following CDDP treatment. Low molecular DNA was prepared at the times indicated (h) after CDDP treatment. M: DNA weight marker. (CDDP: $10\mu\text{m}$)

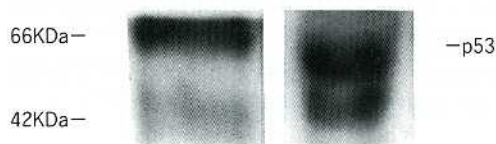


Fig. 5. Western blot analysis of p53 obtained from 6 h. (CDDP: $10\mu\text{m}$)

いては劇的な効果を示すものもある。しかし、そのほとんどは造血腫瘍が中心で、セミノーマのように抗癌剤に対して高い感受性を示す固形腫瘍は稀である。今回の実験では我々が樹立したセミノーマ細胞株を用いて、CDDPの細胞レベルにおける作用機序の解析を試みた。すなわち最近、種々の癌細胞において治療によりアポトーシスが惹起されることがわかっている⁵⁾⁻⁹⁾が全ての癌細胞において観察あるいは証明されているわけではなく、精巣腫瘍においては細胞株が樹立されている胎児性癌や奇形腫などの細胞株においてその現象が観察されているのみであった^{10), 11)}。臨床的に最も抗癌剤感受性の高いセミノーマにおいては、純粋な細胞株の樹立が極めて困難であったため⁹⁾ 今日までその抗癌剤による細胞死の様子は *in vitro* においては全く観察されていなかった。

現在までの他の悪性腫瘍細胞株の抗癌剤処理によるアポトーシス誘導の報告から、セミノーマが抗癌剤に対して感受性の高い理由のひとつにアポトーシスが関与しているためではないかと想定した。今回の実験で、CDDP処理によりセミノーマ細胞がDNAの断片化を起していることが、蛍光色素染色による核の形態変化の様子と、電気泳動法によるDNA ladderの検出で確認された。DNA ladder構造の形成は現在、アポトーシスの定義として広く受け入れられており¹²⁾⁻¹⁴⁾、この確認によりセミノーマ細胞はCDDP処理に

より速やかにアポトーシスが誘導されることが証明された。

FACSによる抗癌剤処理時の細胞周期の解析では、高濃度処理群とそれ以外の処理群に若干の違いが認められた。25 μM 処理群を除くいずれの処理群でも処理後S期の細胞は増加しており、それに伴い順次G2/M期の細胞が増加する様子が観察された。しかし、最も高濃度である25 μM においてはG2/M期の細胞増加は認められず、むしろ未処理細胞より低い数であった。CDDP処理後早期においてS期の細胞は同様に増加していることや、10 μM 処理時にもややG2/M期細胞数が低いことなどから、高濃度処理においてはG2/M期に細胞が集積したのち、より速やかに細胞死に至っているためであろうと推察された。

CDDPはDNAに共有結合し、DNAに傷害を与えるとされる¹⁵⁾。しかしこのDNAとの結合のみでは細胞死を引き起こすのに充分と言えず、ひとつの重要なステップであるのみと考えられている¹⁶⁾。最近の研究でDNA修復能を持った細胞ではCDDP曝露により細胞はG2/M期に集積するもののそれは一過性であり、さらにDNA修復能の欠如した細胞ではG2/M期に停止後最終

的に細胞は生き残るとの報告があり¹⁷⁾, これらのことから G2/M 期における他の本質的な要因が細胞死に関与していることが示唆されている¹⁷⁾. 今回の結果も CDDP 処理濃度により細胞周期と細胞死の間に相違が認められ, これらの報告に一致する.

精巣腫瘍は p53 遺伝子の変異の頻度が少ないことが報告されている¹⁸⁾⁻²⁰⁾. セミノーマ以外の精巣腫瘍における最近の報告によると, 変異が認められない理由は p53 遺伝子が休止期にあるため, 化学療法剤の投与による DNA 損傷に対して休止していた p53 遺伝子が目覚めて p53 蛋白が産生される様子が観察されている. このことも精巣腫瘍が他の固形癌に比して抗癌剤や放射線療法に感受性が高い理由の一つではないかと推定されている²¹⁾. また heat shock protein 27 (HSP27) の発現低値が抗癌剤感受性の高い理由であるとも報告されている²²⁾. さらに bcl-2 とそのファミリー遺伝子である bax の比が, エトポシドによって引き起こされる精巣腫瘍のアポトーシスに関与していることを指摘する論文もあり²³⁾, これらの報告からも精巣腫瘍が極めて良く治療に反応する理由には多数の要因が関与

していると考えられる. 今回の細胞株において p53 遺伝子変異の有無は検索していないが, p53 蛋白の発現は CDDP 処理によって強く認められており, セミノーマの細胞死に対してこれが関与している可能性も示唆された. 今回の実験でセミノーマは CDDP 投与によりアポトーシスを起こして死に至ることが証明されたが, 今後さらに細胞死に関するこれらの蛋白質, あるいは遺伝子を解析し, 抗癌剤投与によるセミノーマの細胞死誘導についてさらに詳しい検討が必要と思われる.

稿を終えるにあたり, ご指導とご校閲を賜りました川崎医科大学衛生学教室 植木絢子教授に深甚なる謝意を捧げます. また細胞株を樹立, 今回の実験に御提供くださった現川崎医科大学泌尿器科学教室 絹川敬吾講師ならびに御協力いただいた組織培養センターの方々に感謝致します.

なお, 本論文の要旨は第55回日本癌学会(平成8年10月, 横浜)において発表した.

本研究の一部は川崎医科大学プロジェクト研究費(No.8-508)の援助により行われた.

文 献

- 1) Kinugawa K, Hyodo F, Matsuki T, Jo Y, Furukawa Y, Ueki A, Tanaka H: Establishment and characterization of a new human testicular seminoma cell line (JKT-1). *Int J Urol* in preparation
- 2) Sandberg AA, Meloni AM, Suijkerbuijk RF: Reviews of chromosome studies in urological tumors. III. Cytogenesis and genes in testicular tumors. *J Urol* 155: 1531-1556, 1996
- 3) Kantoff PW, Kalish LA, McDowell BP, Canellos GP, Gibbs R, Richie JP, Garnick MB: Long-term follow up of 150 patients with testicular cancer treated at a single institution. *J Urol* 147: 82-88, 1992
- 4) Olie RA, Boersma AWM, Dekker MC, Nooter K, Looijenga LHJ, Oosterhuis JW: Apoptosis of human seminoma cells upon disruption of their microenvironment. *Br J Cancer* 73: 1031-1036, 1996
- 5) Eric S, Richard B, Kurt WK, Yves P: Differential induction of apoptosis undifferentiated and differentiated HL-60 cells by topoisomerase I and II inhibitors. *Blood* 81: 1359-1368, 1993
- 6) Daniel RC, Bernad WS: Etoposid-induced cytotoxicity in two human T-cell leukemic lines: Delayed loss of membrane permeability rather than DNA fragmentation as an indicator of programmed cell death. *Cancer Res* 53: 4287-4296, 1993
- 7) Wojciech G, Jianping G, Barbara A, Frank T, Zbigniew D: The cell cycle related differences in susceptibility of HL-60 cell to apoptosis induced by various antitumor agents. *Cancer Res* 53: 3186-

3192, 1993

- 8) Bertrand R, Sarang M, Jenken J, Kerrigan D, Pommier Y : Differential induction of secondary DNA fragmentation by topoisomerase II inhibitors in human tumor cell lines with amplified *c-myc* expression. *Cancer Res* 51 : 6280–6285, 1991
- 9) Markus MB, Charles EM, Oliver S, Yoshitatsu S, Toshiyuki T, Jane BT, Erasmus S : Drug-induced apoptosis is not necessary dependent on macromolecular synthesis or proliferation in the p53-negative human prostatic cancer cell line PC-3. *Cancer Res* 55 : 2122–2128, 1995
- 10) Yamada T, Suzuki N, Hiraoka N, Matsuoka K, Fukushima S, Hashiguchi A, Hata J : Apoptosis of human embryonal carcinoma cells with in vitro differentiation. *Cell Struct Funct* 21 : 53–61, 1996
- 11) Huddat RA, Titley J, Robertson D, Williams GT, Horwich A, Cooper CS : Programmed cell death in response to chemotherapeutic agents in human germ cell tumour lines. *Eur J Cancer* 31A : 739–746, 1995
- 12) Wyllie AH : Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activity. *Nature* 284 : 555–556, 1980
- 13) Cohen JJ, Duke RC : Glucocorticoid activity of a calcium-dependent endonuclease in thymocyte nuclei leads to cell death. *J Immunol* 132 : 38–42, 1984
- 14) Tepper CG, Studzinski GP : Teniposide induces nuclear but not mitochondrial DNA degradation. *Cancer Res* 52 : 3384–3390, 1992
- 15) Zweeling LA, Kohn KW : Mechanism of action of cis-diamminedichloroplatinum (II). *Cancer Treat Rep* 63 : 1439–1444, 1979
- 16) Eastman A : Activation of programmed cell death by anticancer agents : Cisplatin as a model system. *Cancer Cells* 2 : 275–280, 1990
- 17) Sorensen CM, Eastman A : Influence of cis-diamminedichloroplatinum (II) on DNA synthesis and cell cycle progression in excision repair proficient and deficient chinese hamster ovary cells. *Cancer Res* 48 : 6703–6707, 1988
- 18) Bartkova J, Bartek J, Lucas J, Vojtesek B, Staskova Z, Rejthar A, Kovaric J, Midgley CA, Lane DP : p53 protein alternations in human testicular cancer including pre-invasive intratubular germ-cell neoplasia. *Int J Cancer* 49 : 196–202, 1991
- 19) Riou G, Barrois M, Prost S, Terrior MJ, Theodore C, Levine AJ : The p53 and mdm-2 genes in human testicular germ-cell tumors. *Mol Carcinog* 12 : 124–131, 1995
- 20) Schenkman NS, Sesterhenn IA, Washington L, Tong YA, Weghorst CM, Buzard GS, Strvastava S, Moul JW : Increased p53 protein does not correlate to p53 gene mutation in microdissected human testicular germ cell tumors. *J Urol* 154 : 617–621, 1995
- 21) Stuart GL, Arnold JL : A functionally inactive p53 protein in teratocarcinoma cells is activated by either DNA damage or cellular differentiation. *Nat Med* 2 : 804–810, 1996
- 22) Elaine HR, Eileen H, Lee W, John RWM : Effect of overexpression of the small heat shock protein HSP27 on the heat and drug sensitivities of human testis tumor cells. *Cancer Res* 56 : 2446–2451, 1996
- 23) Chresta CM, Masters JR, Hickman JA : Hypersensitivity of human testicular tumors to etoposide-induced apoptosis is associated with functional p53 and a high Bax : Bcl-2 ratio. *Cancer Res* 56 : 1834–1841, 1996