

頭頸部腫瘍由来細胞株の放射線照射によるアポトーシスの基礎的検討

宇野 雅子

目的：臨床的に問題となる放射線治療後の抵抗性獲得の基礎的検討として、放射線照射後の2種類の頭頸部由来扁平上皮癌細胞株のアポトーシスについて検討した。

材料と方法：口腔底由来のKB株と喉頭由来のHEp-2株に放射線照射を行い、その放射線感受性を軟寒天コロニー法で検討した。次にアポトーシスの出現をTUNEL法で検出した。さらに膜表面Fas分子(mFas)の発現をフローサイトメトリーにて検討し、MP-RT-PCR法によりmRNAレベルでアポトーシス関連遺伝子の発現を比較検討した。

結果：放射線感受性はHEp-2株に比べKB株の方が良好であった。照射後のアポトーシスはKB株では線量依存性に、HEp-2株では時間依存性に出現を認めしたが、KB株の方が早期より出現していた。mFasは両株とも通常の維持培養下で陽性であったが、照射後には時間依存性の増強が認められた。アポトーシス関連遺伝子はFlice, TNFR-1, Baxの発現がKB株で亢進していた。また、KB株でdecoy receptor 3(DcR3)遺伝子の発現も認められた。

結論：放射線はp53の発現亢進によって癌細胞にアポトーシスを誘導すると考えられるが、Fas関連アポトーシスと膜表面Fasの発現量の増加も放射線誘発アポトーシスに重要な働きをしていると考えた。

(平成12年8月10日受理)

Analysis of Apoptotic Cell Death Following Irradiation in SCC Malignant Cell Lines Derived from The Head and Neck

Masako UNO

To explore radiation-resistance in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC), two HNSCC lines, KB derived from the oral floor and HEp-2 from the larynx, were used to clarify the cellular biological alterations related to apoptotic cell death induced by irradiation. Both cell lines revealed ultrastructural apoptotic morphological changes and showed dose- and time-dependent increase in to the apoptotic fraction examined by the TUNEL method using flow cytometry. The KB cells showed time- and dose-dependent upregulation of membrane Fas (mFas) expression after irradiation. Analysis of alteration in the mRNA expression levels of apoptosis-related genes demonstrated slight upregulation of Fas, Flice, Bax, and TNFR1 genes in KB cells and of the Fas ligand gene in HEp-2 cells. In addition, the DcR3 gene, which completes Fas-Fas ligand binding and inhibits Fas-mediated apoptosis, was upregulated in KB cells after irradiation. Based on these

results, Fas-mediated apoptotic pathway may be involved in irradiation-induced apoptosis via p53 upregulation. Further investigations are required to resolve questions regarding the radiation-resistancy which often occurs after radiotherapy for head and neck malignancies. (Accepted on August 10, 2000) *Kawasaki Igakkaishi* 26(3):147-154, 2000

Key Words ① Radiation ② Apoptosis ③ Head and neck carcinoma

はじめに

頭頸部腫瘍の大部分は扁平上皮癌であり^{1)~3)}, その治療は, 外科的治療, 化学療法, 放射線療法である。頭頸部には嚥下, 発声等の日常生活に欠くことのできない機能が多く存在しており, その機能温存という面から, また中等度の放射線感受性があるという点から放射線療法は非常に有用^{4)~6)}である。しかし, 放射線治療後の抵抗性の獲得と再発は, 臨床的にも大きな問題となっており, 機序の解明が期待されている。

1972年に Kerr⁶⁾によりアポトーシスの概念が発表されて以来, その研究は盛んに行われるようになった^{7)~9)}, 特に放射線によるDNA損傷がアポトーシスを誘発する^{10)~12)}ことはよく知られており, これに関する諸事実が集積されつつある。今回, 2種類の頭頸部由来の扁平上皮癌細胞株を用いてアポトーシスに関連した細胞性質の解析を行い, 将来の放射線抵抗性獲得の究明に向けての基礎的検討を試みた。

材料と方法

細胞: 口腔底由来ヒト扁平上皮癌細胞株 KB および喉頭由来ヒト扁平上皮癌細胞株 HEP-2 を用いた。細胞は10%牛胎児血清を含む MEM で37度, 5% CO₂ で培養した。

放射線感受性: 放射線照射は4

MV Liniac X線(線量率100 cGy/min)で行った。照射後, 35mm培養皿の下層に0.5%軟寒天(Difco, Detroit, USA)培地, 上層には0.33%軟寒天培地に 2×10^3 個の細胞をまき, 7日後にコロニー数を計測した。コロニーは顕微鏡下に50細胞以上のものを計測した。

アポトーシス細胞の検出: 形態学的には走査電子顕微鏡にてアポトーシスを確認した。また, TUNEL (TdT-mediated dUTP nick end labeling) 法 (in situ 細胞死検出キット, Boehringer Mannheim Biochemica, Mannheim, Germany) で反応後, FACS キャリバー (Becton Dickinson Immunocyt-

Table 1. Primer, and strategies for RT-PCR amplifications

Gene	Primer sequences	Ta(°C)	Product size(bp)
Fas	5'-TTTCACCTGGAGGATTTACT-3' & 3'-GGTGTATGCGCAGAAATTCGGG-3'	56	212
Fas-L	5'-CTTGAGCAGTCCAGCAACAGG-3' & 3'-ATGATGCTATGTCAGATTCGG-3'	61	470
Bcl-2	5'-ACAGTGAAGATCTGGCTTCC-3' & 3'-CCAGGTTCCATGTCATCATCC-3'	57	375
TNF- α	5'-TCTTCTGACGCTCTCTCC-3' & 3'-TATCTCTGACCTCAGGAGG-3'	60	274
TNF- β	5'-TCCAGGAAAGACAGGACAGG-3' & 3'-AGGCACAACTCTCTGCACTC-3'	57	369
I κ B	5'-TCTTCTGACAGAGCTTCC-3' & 3'-GGATGCTCTCTCTCTCC-3'	61	364
AnnF1	5'-TCTTCTGACAGAGCTTCC-3' & 3'-GGATGCTCTCTCTCTCC-3'	61	364
Bax	5'-CTGGACATCGACTTCTCC-3' & 3'-CTTCTCCAGATGGTCAAGG-3'	60	167
Bcl-1	5'-GTACTTCCGATCCAGGAGG-3' & 3'-CTTCCAGACATTCGGAGAGG-3'	60	193
Dc33	5'-TCAATGTCGAGGCTCTTC-3' & 3'-GCTCTGTATGAGAGAGTCC-3'	56	144
β -actin	5'-TGAGGGGCTCACCCACATCTGCGGATTA-3' 3'-GTAGAGCATTGGGGTGTGAGGATGGAGGG-3'	60	661

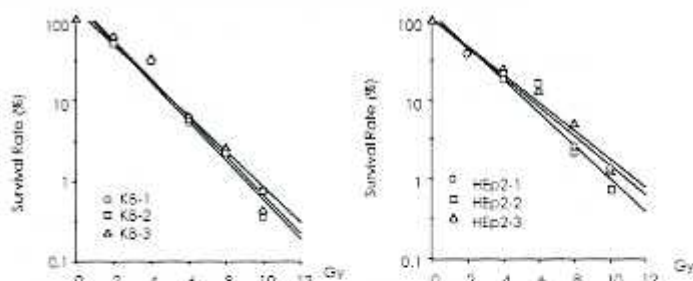


Fig. 1. Survival rate (%) for the KB (left) and HEP-2 (right) squamous cell carcinoma cell lines after irradiation. Radiation sensitivity was analyzed by cloning efficiency. The figure shows the results of triplicate independent experiments and the D_{10} values that were calculated showed KB to be 1.84 = 0.10 and HEP-2 was 0.53 = 0.23 Gy. ($p = 0.0211$)

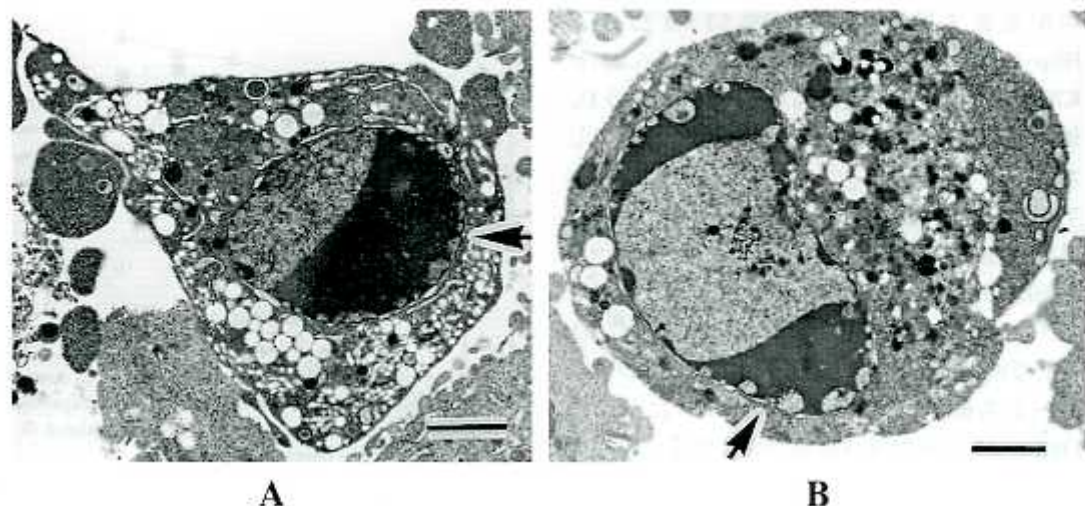


Fig. 2. Both figures are ultrastructural morphologies of KB cells (A) and HEp-2 cells (B) cultured for 36h after 10Gy irradiation. Intranuclear chromatin which has accumulated on the internal edge of the nuclear membrane (arrows) have a typical crescent appearance. Bars represent 2.5 μ m.

tometry Systems, Mansfield, MA, USA)にて解析した。無照射細胞群および、2, 4, 6, 8, 10 Gy 照射後48時間と、8 Gy 照射後24, 48, 72, 96時間でのアポトーシス細胞の出現を、両細胞株で検討した。

膜表面 Fas (mFas) の発現：KB 株では 2, 4, 6, 8, 10 Gy 照射後 3, 4, 5 日に mFas の発現を FITC (fluorescein-isothiocyanate) 標識 Fas モノクローナル抗体 (MBL 社製, 日本) で反応させ、FACS にて解析した。反応は細胞数 1×10^6 個あたり抗体 20μ l で行った。コントロールは cell only intensity とした。

mRNA 発現：各アポトーシス関連遺伝子の発現は multiplex-reverse transcriptase-polymerase chain reaction (MP-RT-PCR) 法を用いて解析した。各々の細胞株に 8 Gy 照射後、0, 3, 6, 12, 24, 36, 48 時間に TRIzol reagent (GIBCO BRL Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA) を用いて全 RNA を抽出した。1 μ g の全 RNA と oligo (dT) 18 primer (最終濃度 1 μ M) を 12.5 μ l の diethyl pirocarbonate (DEPC) 処理 H₂O に溶解し、70℃で 2 分間処理後、氷冷した。cDNA 合成は 200 μ l の recombinant MMLV (moloney-murine leukemia virus) reverse transcriptase (逆転写酵素) にて開始され、42℃、

60 分間行われた。反応は 94℃、5 分間の加熱で終了し、80 μ l の DEPC 処理 H₂O を添加することにより最終 100 μ l に溶解した。発現比の解析に供するため、多くの細胞で均一に発現すると考えられる housekeeping 遺伝子である β -actin 遺伝子の特異的プライマーと各アポトーシス関連遺伝子 (Fas, Fas-L, Flice, TNF- α , TNFR-1, Bid, Apaf-1, Bax, Bcl-2, DcR3) の特異的プライマーを単一反応に入れ、両者が対数的に発現しているポイントを解析する半定量的な MP-RT-PCR 法を使用した。MP-RT-PCR にて増幅された産物を 1.2% アガロースゲル上で電気泳動し、エチジウムブロマイド染色にて可視化後、Fas II image analyzer、および Quantity One™ version 2.5 を用いて相対的発現度を解析した。各遺伝子の各細胞株での相対的発現度は各遺伝子の増幅産物の量を β -actin 増幅産物の量で除して求めた。プライマーの塩基配列、反応温度、産物のサイズは Table 1 に示す。

結 果

放射線感受性：Figure 1 に照射後の生存率曲線を示す。生存率の傾きは KB が -0.233, HEp-2 が -0.188。また D₀ 値 (生存率曲線の

勾配を表す指標)はKBが 0.53 ± 0.23 Gy, HEP-2が 1.84 ± 0.10 Gyと有意に ($p = 0.0211$) KB株の放射線感受性が高かった。(両株の D_{50} 値の差はMann-Whitney's U-testにて検討した。)

アポトーシス細胞の出現: Figure 2に10 Gy照射後の両株の電顕像を示す。AはKB株, BはHEP-2株である。KB, HEP-2ともに核辺縁にクロマチンの濃縮を認め、アポトーシスに特異的な所見であった。次にTUNEL法でのアポトーシス細胞の出現率を Figure 3に示す。Figure 3Aは照射後48時間の線量変化に伴うアポトーシス細胞の出現率を表している。KBでは無照射細胞群で15.0%のアポトーシス細胞の出現を認め、10 Gyでは38.8%と線量依存性の増加を認めた。一方HEP-2は無照射細胞群で21.2%であるが6 Gyで33.2%となり、10 Gyでは29.9%であった。また、8 Gy照射後の時間変化による出現率を Figure 3Bに示す。KBでは24時間で21.8%、48時間45.2%、72時間67.0%、96時間59.8%と72時間までは時間依存性であった。一方HEP-2では24時間11.3%、48時間27.9%、72時間39.0%、96時間81.2%と時間依存性にアポトーシス細胞が出現していたが、両者を比べるとKB株の方が早期から出現していた。

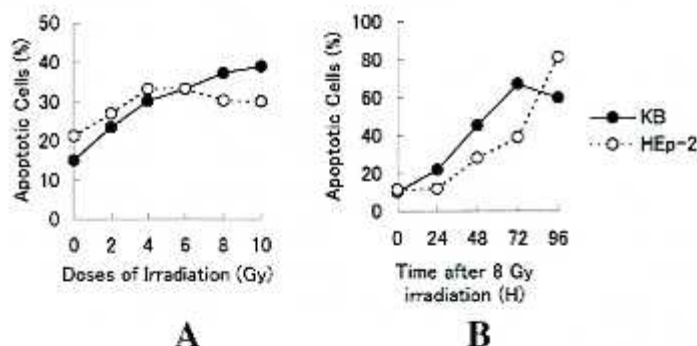


Fig. 3. A. The percentages of the apoptotic cell fractions of KB and HEP-2 cells cultured for 48h after various doses of irradiation (0, 2, 4, 6, 8, 10Gy) were analyzed by the TUNEL method and revealed by contour presentation. B. The percentages of the apoptotic cell fractions of both cell lines cultured for 24 to 96 hours after 8Gy irradiation in time course.

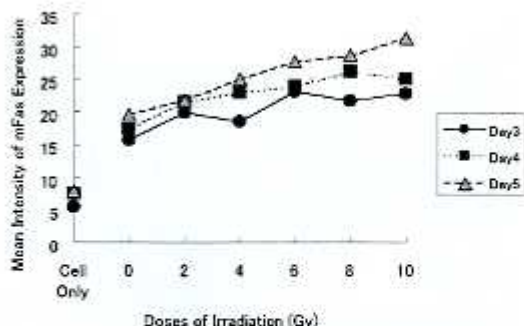


Fig. 4. The alteration of membrane Fas expression in KB cells cultured for three to five days after various doses of irradiation with dose manner. The mFas expression presented as the mean intensity was upregulated in a dose- and time- dependent manner.

膜表面 Fas (mFas) の出現: HEP-2 に比べ、放射線感受性が高かった KB 株について調べた mFas の発現を Figure 4 に示す。mean cell only intensity が 5.42 ないし 7.88 に比べ、無照射対照の細胞では mean intensity 15.2 ないし 19.66、陽性細胞 93.82% と、KB 細胞は通常維持培養下で mFas を発現していた。この intensity は照射後 5 日目の細胞で 2 Gy 21.83、4 Gy 25.11、6 Gy 27.66、8 Gy 28.75、10 Gy 31.41 と線量依存性の増加傾向であり、これは 3 日目、4 日目でも同様の傾向であった。また、mFas の発現ほどの線量でも時間経過に伴って発現の増加を認めた。つまり、KB 株では照射によって、

mFas 発現の線量および時間依存性の増加が認められた。

mRNA 発現: MP-RT-PCR 法の結果を Figure 5 に示す。A はゲルイメージ、B は相対的発現度である。HEP-2 細胞に比し、KB 細胞では Fas、Flice および TNFR 1 の軽度の発現亢進が認められた。一方、HEP-2 細胞では、Fas ligand (FasL) の発現亢進が 24 時間以後に誘導されていた。TNF α は両株共に早期の発現のあとは発現減弱が起こっていた。また、Bid、Apaf 1、および Bcl-2 では両細胞株に発現は認めたが大きな違いは

なかった。しかし、Bax ではKBのほうが照射後12~48時間に強い発現の亢進を認めた。

Figure 6に6 Gy照射後のDcR3遺伝子の発現をKB株につき検討した結果を示す。Aはゲルイメージ、Bに相対的発現度を示す。無照射細胞群を1とすると、照射後1から18時間に発現の亢進を認めた。

考 察

両株共に、放射線照射に伴ってアポトーシスに陥った細胞が出現し、それは形態学的に、またTUNEL法によって確認された。両株の放射線感受性は、他の組織由来の悪性腫瘍細胞に比して^{13)~15)}、十分に高感受性であったが、KB株の方がHEp-2株よりも高感受性であった。

また両株間では、アポトーシス出現の時間経過、感受性、関連遺伝子の発現の変化等で、差異も認められた。今回の検討では同じ組織型の頭頸部癌由来細胞株でも、細胞株の種類によって、放射線照射後の細胞形質が異なることを確認した。このことが、放射線治療後の再発の原因のひとつになる可能性がある。そこで臨床的に問題となる放射線治療後の再発癌における抵抗性獲得の基礎的検討として、これらの結果を踏まえた上で、放射線耐性株の樹立をし、その細胞形質との比較検討を行うことが必要であろう。

放射線はp53を介して腫瘍にアポトーシスを誘導するといわれており¹⁶⁾、未発表データながら、KB株では照射後にp53の発現の増加を認めている。またKB株、HEp-2株ともにp53はwild type (p53 WT)であった。

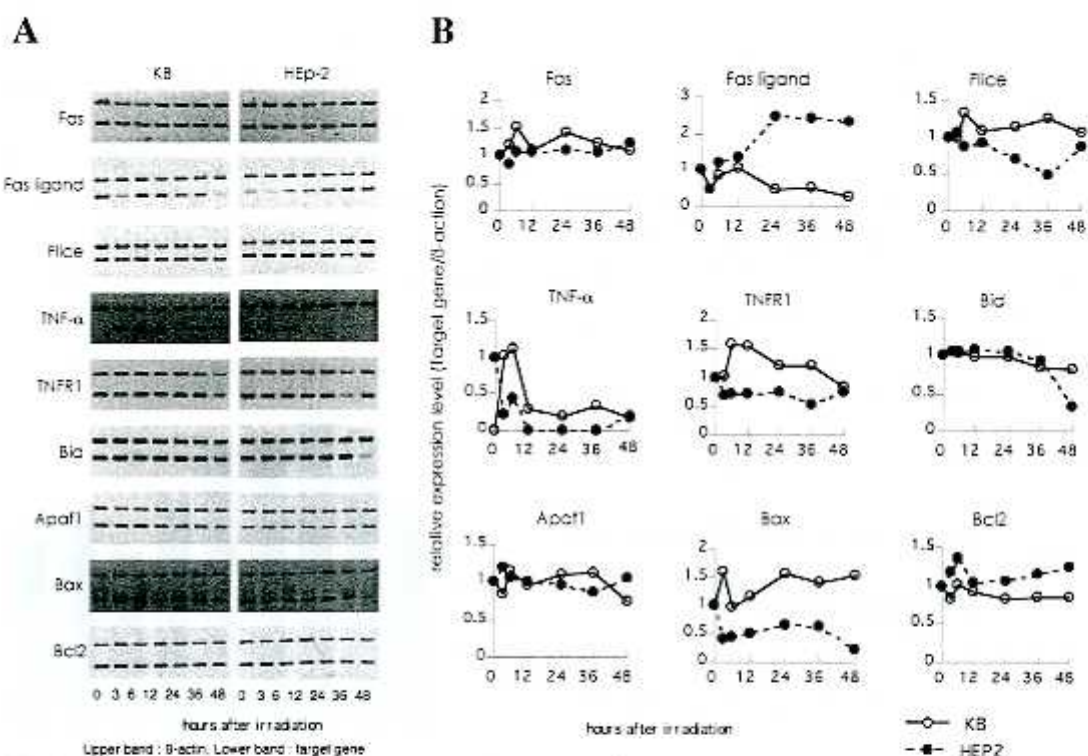


Fig. 5. The MP-RT-PCR products of the apoptosis-related genes and β -actin, a housekeeping control gene, in KB and HEp-2 cells cultured for 0 to 48h after 6Gy irradiation were electrophoresed on 1.2% agarose gels and visualized by staining with ethidium bromide. An inverted presentation was adopted for better visualization (A). The gel images shown in panel A were obtained using a FAS-II UV-image analyzer, and the densities of the products were quantitated using the Quantity OneTM version 2.5. The relative expression levels were calculated as the density of the product of target genes divided by that of the β -actin gene obtained from the same cDNA. The alteration of relative expression levels according to the time course was calculated with the relative expression level in each gene at T = 0 being 1.0 (B).

1989年に Yonehara ら¹⁷⁾, Trauth ら¹⁸⁾ によって Fas (Apo-1) が発見されて以来, Fas を介するアポトーシスの研究は広く報告されている。また最近ではそのシグナル伝達も解明されてきており, 種々の刺激により惹起される細胞内アポトーシスシグナルは最終的に共通経路に流れ込むことがわかっている。また, 腫瘍細胞における Fas を介するアポトーシスの研究も多数報告されている。Sheared ら¹⁹⁾ は乳癌細胞株 MCF7 は放射線によって, 膜表面 Fas と p53 の発現の亢進を認めたと報告している。また p53 WT の腫瘍細胞では膜表面 Fas の発現の増加を認めるが, p53 null もしくは p53 mutated では認めなかったと報告している。

一方, 抗癌剤による細胞障害についての報告もされている。Belka ら²⁰⁾ や Euchs ら²¹⁾ は p53 WT 細胞では抗癌剤投与により同様の Fas の発現の増加をおこすが, p53 mutated では起こさなかったとしている。このことは p53 への反応エレメントが Fas 遺伝子の第一イントロンに存在するためであると述べている²²⁾。今回用いた細胞株は2種類とも p53 WT であり, Figure 4 に示すように照射後に mFas の発現の増加も認められた。このことはこれまでの報告に矛盾しない結果であった。ただし, この発現亢進が遺伝子発現と密接には関連しておらず, 蛋白レベルでの細胞内での Fas 分子の移行あるいは変性機構の解析も必要であろうと思われる。

また, アポトーシスの伝達経路としてミトコ

ンドリア系がある, これに属する Bcl-2 遺伝子ファミリーとその付随する蛋白は細胞の生もしくは死を決定する^{23)~25)}。なかでも, Bcl-2 は抗アポトーシス機能に働き, Bax はアポトーシス促進に働くといわれている。Figure 5 に示すように KB 株では HEp-2 株に比べ, 著明な Bax 遺伝子の発現の亢進を認めた。しかし, 対照的に Bcl-2 遺伝子は HEp-2 株のほうの発現が亢進していた。つまり, KB 株で早期より起こったアポトーシス細胞の出現はこれら遺伝子の動きと関連があるのかもしれない。

アポトーシス誘導に働く経路として Fas を介するものとは別に TNF/TNF 受容体によるものがある^{26), 27)}。TNF 受容体には TNFR-1 および TNFR-2 がある。今回アポトーシスに深く関与しているといわれる TNFR-1 について, TNF α とともにその発現を検討した。TNF α は両細胞株でめだつた動きは認めなかったが, TNFR-1 は KB 株で発現の亢進を認めた。この意義は今回の結果からのみで云々することはできないが, やはり KB 株の早期からのアポトーシス出現に一役かっているのではないかと考えられる。

Pitti らは²⁸⁾ 大腸癌細胞株で decoy receptor 3

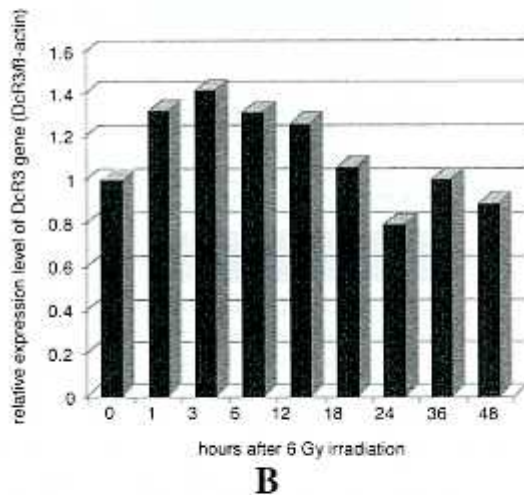
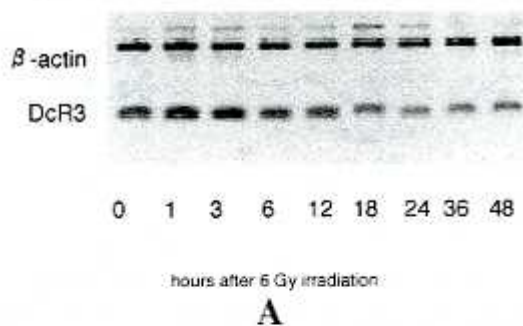


Fig. 6. MP-RT-PCR products of DcR3 gene and β -actin in KB cells cultured for 0 to 48h after 6Gy irradiation were electrophoresed on 1.2% agarose gels and visualized by staining with ethidium bromide (A). Alteration of the relative expression level of the DcR3 gene according to time course was calculated with the relative expression level at T = 0 being 1.0 (B).

(DeR3)を報告している。これは可溶性分子として Fas ligand と反応して mFas のシグナル伝達の進行を妨げる。すなわち、腫瘍細胞自身が外部からの刺激に対して自分自身を守るためのものようである。KB 株では照射後 1～18 時間に mRNA レベルで発現亢進を認め、これは照射後アポトーシスの出現開始時間とほぼ一致している。つまり、KB 株では放射線により誘発されるアポトーシスから自分を守ろうとする機構も働いているのかもしれない。

今回の検討では頭頸部由来ヒト扁平上皮癌細胞株 KB, HEp-2 において放射線によりアポトーシスが誘導されることを証明した。しかし、その出現は両株によって若干の違いを認め、その違いは mRNA レベルで観察された。今後は蛋白レベルでの変化も加えて検討することが必要であると思われる。

結 語

頭頸部由来ヒト扁平上皮癌細胞株 KB および HEp-2 に対する放射線の影響についてアポトーシスを中心に検討し、以下の結果を得た。

(1)放射線感受性は HEp-2 株に比して KB 株の

ほうが高かった。

(2)照射後 KB 株では線量依存性にアポトーシスの出現を認め、HEp-2 株では時間依存性の出現を認めた。また KB 株のほうがアポトーシスは早期から出現していた。

(3)KB では照射後、膜表面 Fas 分子の発現を時間および線量依存性に認め、アポトーシス出現に Fas を介する経路の関連が示唆された。

(4)mRNA レベルのアポトーシス関連遺伝子の発現は両者で相違が認められ、この違いがアポトーシスの出現の違いと関連があるのではないかと思われた。

謝 辞

稿を終えるにあたり、終始御指導と御鞭撻を賜りました川崎医科大学放射線医学(治療)教室 今城吉成教授に深甚なる謝意を表します。また御校園頂きました川崎医科大学衛生学教室 大槻剛巳助教授およびご協力頂いた同放射線医学(治療)教室 平塚純一助教授に深く感謝します。なお、本研究の一部は、大学院重点特別経費(平成10年度)および川崎医科大学プロジェクト研究費(10-801, 11-802)の援助によって行われたことを付記し深謝します。

文 献

- 1) Shemen LJ : Malignant disease of the oral cavity and salivary glands. Textbook of Otolaryngology and Head and Neck Surgery. Lee KJ. 1989, pp 384-406
- 2) Weber AL, Kiwak MG : Radiology of the pharynx, neck, and esophagus. Textbook of Otolaryngology and Head and Neck Surgery. Lee KJ. 1989, pp 543-577
- 3) Shumrich KA : Malignant lesions of the larynx. Textbook of Otolaryngology and Head and Neck Surgery. Lee KJ. 1989, pp 647-657
- 4) Robin PE, Olofsson J : Tumors of the larynx. Scott-Brown's Otolaryngology Fifth Edition. Kerr AG. 1987, pp 186-234
- 5) Wynder EL, Covey LS, Mabuchi K, Mushinski M : Environmental factors in cancer of the larynx. Cancer 38 : 1591-1601, 1976
- 6) Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR : Apoptosis : a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer 26 : 239-257, 1972
- 7) Li WX, Franklin WA : Radiation- and heat -induced apoptosis in PC-3 prostate cancer cells. Radiat Res 150 : 190-204, 1998
- 8) Yount GL, Haas Kogan DA, Levine KS, Aldape KD, Israel MA : Iozining radiation inhibits chemotherapy-induced a

- apoptosis in cultured glioma cells. *Cancer Res* 58 : 3819-3825, 1998
- 9) Langley RE : Effect of cell cycle stage, dose rate and repair of sublethal damage on radiation-induced apoptosis in F9 teratocarcinoma cells. *Radiat Res* 144 : 90-96, 1995
 - 10) Mitsuhashi M, Ishikawa H, Saito Y, Sakurai H, Nozaki M, Akimoto T, Hasegawa M, Maebayashi K, Niibe H : A quantitative study of radiation-induced apoptosis in two rat yolk sac tumor cell lines with different radiosensitivities in vitro. *Anticancer Res* 17 : 3605-3608, 1997
 - 11) Dullea RG, Robinson JF, Bedford JS : Nonrandom degradation of DNA in human leukemic cells during radiation-induced apoptosis. *Cancer Res* 59 : 3712-3718, 1999
 - 12) Kobayashi T, Ruan S, Jabbur JR, Consoli U, Clodi K, Shinku H, Owen Schaub LB, Andreeff M, Reed JC, Zhong W : Differential p53 phosphorylation and activation of apoptosis-promoting genes Bax and Fas/APO-1 by irradiation and ara-C treatment. *Cell Death Differ* 5 : 584-591, 1998
 - 13) Martin JMC, Balkenende A, Verschoor T, Lallemand F, Michalides R : Cyclin D1 overexpression enhances radiation-induced apoptosis and radiosensitivity in breast tumor cell line. *Cancer Res* 59 : 1134-1140, 1999
 - 14) Larsen RH, Akabani G, Welsh P, Zalutsky MR : The cytotoxicity and microdosimetry of astatine-211-labeled chimeric monoclonal antibodies in human glioma and melanoma cells in vitro. *Radiat Res* 149 : 155-162, 1998
 - 15) Zolzer F, Doz P : Radiation and/or hyperthermia sensitivity of human melanoma cells after several days of incubation in media lacking serum or certain serum components. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 46 : 491-497, 2000
 - 16) Allen SL, Theodore SL : Recent advances in radiation oncology. *Med Prog* 332 : 371-379, 1995
 - 17) Yonehara S, Ishii A, Yonehara M : A cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor. *J Exp Med* 169 : 1747-1756, 1989
 - 18) Trauth BC, Klas C, Peters AM, Matzku S, Moller P, Falk W, Krammer PH : Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. *Science* 245 : 301-305, 1989
 - 19) Sheard MA, Vojtesek B, Janakova L, Kovarik J, Zaloudik J : Up-regulation of Fas (CD95) in human p53 wild-type cancer cells treated with ionizing radiation. *Int J Cancer* 73 : 757-762, 1997
 - 20) Belka C, Marini P, Budach W, Osthoff KS, Lang F, Gulbins E, Bumberg M : Radiation-induced apoptosis in human lymphocytes and lymphoma cells critically relies on the up-regulation of CD95/Fas/APO-1 ligand. *Radiat Res* 149 : 588-595, 1998
 - 21) Fach EJ, McKenna KA, Bedi A : p53-dependent DNA damage-induced apoptosis requires Fas/APO-1-Independent activation of CPP32b. *Cancer Res* 57 : 2550-2554, 1997
 - 22) Munsch D, Fukunaga RW, Bordon JC, Nagata S, May E, Rouach EY, Reisdorf P : Human and mouse Fas (APO-1/CD95) death receptor genes each contain a p53-responsive element that is activated by p53 mutants unable to induce apoptosis. *J Biol Chem* 275 : 3867-3872, 2000
 - 23) Adams JM, Cory S : The Bcl-2 protein family : arbiters of cell survival. *Science* 281 : 1322-1326, 1998
 - 24) Antonsson B, Conti F, Ciavatta A : Inhibition of Bax channel-forming activity by Bcl-2. *Science* 277 : 370-372, 1997
 - 25) Chinnayan AM, Orth K, O'Rourke K, Duan H, Poirier GG, Dixit VM : Molecular ordering of the cell death pathway : Bcl-2 and Bcl-xL function upstream of the Ced-3-like apoptotic proteases. *J Biol Chem* 271 : 4573-4576, 1996
 - 26) Cleveland JL, Ihle JN : Contenders in FasL/TNF death signaling. *Cell* 81 : 479-482, 1995
 - 27) Liu Z, Hsu H, Goeddel DV, Karin M : Dissection of TNF receptor 1 effector functions : JNK activation is not linked to apoptosis while NF- κ B activation prevents cell death. *Cell* 87 : 565-576, 1996
 - 28) Pitti RM, Marsters SA, Lawrence DA, Roy M, Kischkel FC, Dowd P, Huang A, Donahue CJ, Sherwood SW, Baldwin DT, Godowski PJ, Wood WI, Hillan KJ, Cohen RL, Goddard AD, Botstein D, Ashkenazi A : Genomic amplification of a decoy receptor for Fas ligand in lung and colon cancer. *Nature* 396 : 699-703, 1998