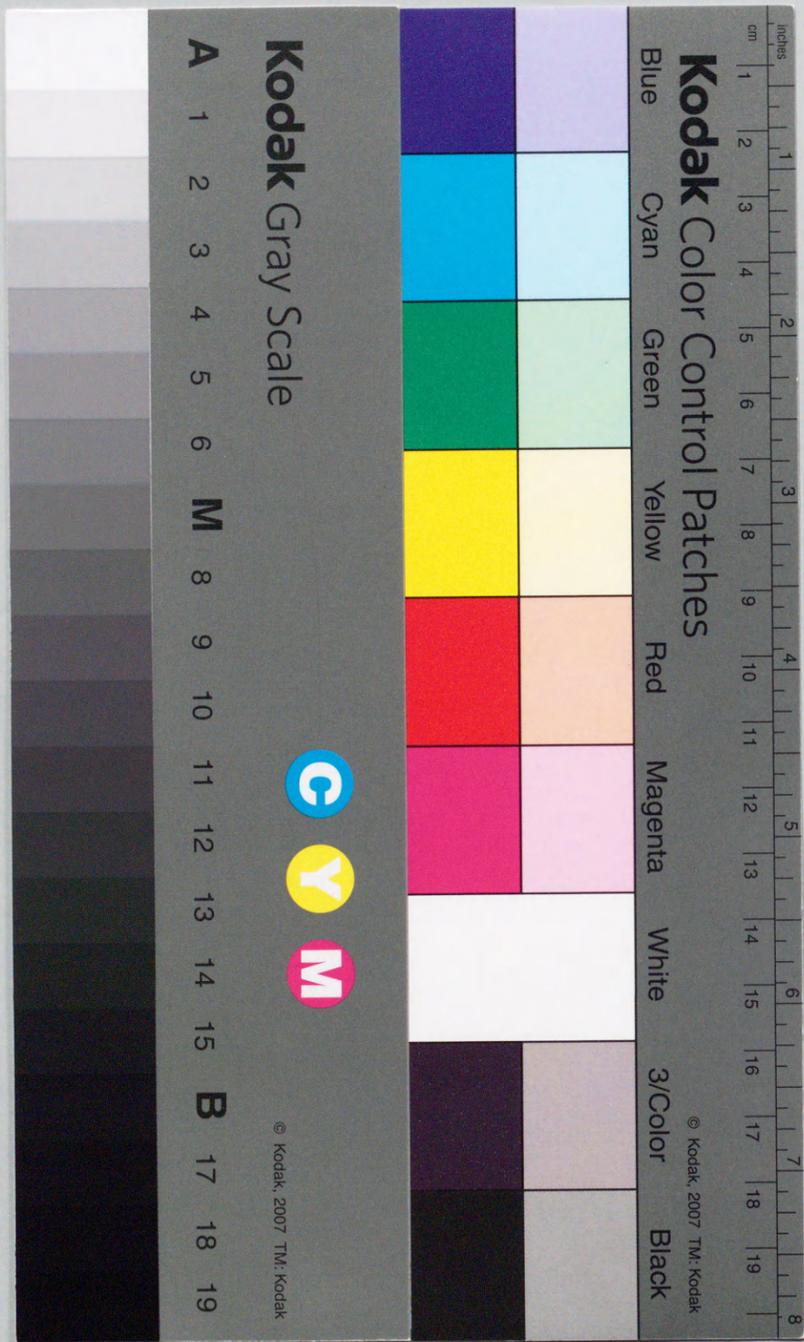


ベスナリノン (vesnarinone) のヒト大細胞肺癌細胞株に対する  
増殖抑制およびアポトーシス誘導作用に関する研究

山口 昭彦

鹿児島大学医学部内科学第一講座



## ベスナリノン (vesnarinone) のヒト大細胞肺癌細胞株に対する 増殖抑制およびアポトーシス誘導作用に関する研究

山口 昭彦

鹿児島大学医学部内科学第一講座 (主任: 鄭 忠和教授)  
(原稿受付日 平成11年10月5日)

### Vesnarinone Inhibits Growth of Large Cell Lung Cancer Cell Lines via Induction of Apoptosis

Akihiko YAMAGUCHI

First Department of Internal Medicine (Director: Prof. Chuwa Tei, M. D.)  
Faculty of Medicine, Kagoshima University, Kagoshima 890-8520, Japan

#### ABSTRACT

Vesnarinone is a positive inotropic agent that is used to treat for congestive heart failure. Recently, it has been shown to inhibit the growth of several cancer cells such as salivary cancer, pancreatic cancer and gastric cancer. Large cell lung cancer is known to be refractory to usual chemotherapy, and new effective therapy for this type of lung cancer is needed. In the present study, I have examined the effect of vesnarinone on large cell lung cancer cell lines. Three large cell lung cancer cell lines (LU 65 A, LU 65 B, LU 65 C) were examined. Growth inhibition of these cells by vesnarinone was assayed with <sup>3</sup>H-thymidine incorporation after 72-hrs culture. Apoptosis induction of LU 65 A cell was examined by the TUNEL method and DNA fragmentation. Expression of Bcl-2 and Fas antigen in the cell was detected by FACS analysis. Expression of *c-myc* mRNA was examined by Northern Blotting. Vesnarinone inhibited <sup>3</sup>H-thymidine incorporation in a dose dependent manner at concentrations from 0.1 to 20  $\mu$ g/ml in all cell lines. TUNEL method and gel electrophoresis showed vesnarinone-induced apoptosis in Lu 65 A cells. Vesnarinone induced expression of Fas antigen and *c-myc*, but did not affect the expression of Bcl-2 in Lu 65 A cells. These results suggest that Fas antigen and *c-myc* expression may be one pathway of apoptosis induction by vesnarinone in LU 65 A cells, and that vesnarinone may be useful to treat for lung cancer.

**Key words:** vesnarinone, lung cancer, large cell, apoptosis, Bcl-2, Fas-antigen, *c-myc*.

#### 緒 言

キノリノン誘導体であるベスナリノンは、Tominagaらにより合成された強心剤であり<sup>1,2)</sup>心不全の経口治療薬として使用されている<sup>3,4)</sup>。その作用機序として、心筋細胞におけるフォスホジエステラーゼの阻害<sup>5,6)</sup>、カリウム流出抑制<sup>6)</sup>およびカルシウムの流入の増加作用<sup>7,8)</sup>などが挙げられている。副作用として薬剤投与に伴う顆粒球減少が報告されており<sup>9-11)</sup>、その原因として顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) の産生抑制<sup>12)</sup>やストローマ細胞の増殖抑制が指摘されている<sup>13)</sup>。また、

最近各種サイトカイン (腫瘍壊死因子 (TNF)- $\alpha$ <sup>14,16)</sup>、インターフェロン (INF)- $\gamma$ <sup>14,15)</sup>、インターロイキン (IL)-1 $\beta$ <sup>14,15)</sup>、IL-2<sup>15)</sup>、IL-6<sup>16)</sup>) の産生抑制作用も報告され注目されている。さらに本剤は、唾液腺癌<sup>17)</sup>、肺癌<sup>18)</sup>、胃癌<sup>19)</sup>などの各種固形癌細胞や白血病細胞<sup>20)</sup>などに対し分化を誘導し、アポトーシスを惹起<sup>17,18,20)</sup>して増殖抑制効果を発揮することが明らかにされており、薬剤として新たな広がりを見せている。

一方、肺癌は近年増加傾向にあり、我が国では平成5年より男性においては悪性腫瘍死亡原因の第1位となっている<sup>21)</sup>。腺癌、扁平上皮癌、大細胞癌などに分類される非小細胞肺癌は肺癌全体の約80%を占めるが<sup>22)</sup>、薬剤

や放射線に対する感受性は低く、手術療法がその主体となっている。しかし、手術可能な症例は少なく、多くの症例では化学療法や放射線治療が行われているが、満足する治療効果は得られていない<sup>23,24)</sup>。その中でも特に大細胞癌には有効な薬剤がなく治療に苦慮している。大細胞癌ではしばしば白血球増多を伴い<sup>25)</sup>、その増殖には顆粒球コロニー刺激因子 (GCSF)、マクロファージコロニー刺激因子 (MCSF) などのサイトカインの関与が示唆されている<sup>26)</sup>。そこでサイトカイン産生抑制作用を有するベスナリノンが大細胞肺癌に有効である可能性が示唆され、本研究においてヒト大細胞肺癌細胞株を用い、ベスナリノンによる増殖抑制作用、アポトーシス誘導について検討した。

方法

(1) 細胞

ヒューマンサイエンス研究所資源バンク (東京) より供与されたヒト大細胞肺癌細胞株 3 株 (LU65A, LU65B, LU65C) を用いた<sup>27,28)</sup>。細胞株は10%ウシ胎児血清 (FCS) 添加、ペニシリン G 100U/ml、ストレプトマイシン 100μg/ml 入り RPMI-1640 培養液を用い、温度37℃、炭酸ガス5%下で培養した。

(2) ベスナリノン

ベスナリノンは大塚製薬株式会社 (徳島) に依頼し入手した。原末を塩酸で溶解し、水酸化ナトリウムで中和後、10% FCS 入り RPMI-1640 培養液で種々の濃度に希釈して用いた。

(3) サイミジン (<sup>3</sup>H-Thymidine) 取り込み

1 x 10<sup>4</sup>/200μl に調整した細胞を96穴平底マイクロプレートに入れ、同時にベスナリノンを最終濃度として0.1μg/ml から20μg/ml の濃度で添加し、72時間培養を行った。最終6時間にサイミジンを入れ、細胞をハーベストし、サイミジンの取り込みを液体シンチレーション法により測定した。

(4) 細胞増殖

細胞を 1 x 10<sup>5</sup>/ml に調整し、10% FCS 入り RPMI-1640 培養液で培養、24時間毎に細胞数をカウントした。3つの培養の平均値を求め、ベスナリノン未添加をコントロールとし、ベスナリノン添加の細胞数をコントロール値で割り、% of Control として示した。

(5) メイ-ギムザ (May-Giemsa) 染色

LU65A 株においてベスナリノン 20μg/ml を添加後のサイトスピン標本を作成した後、メイ-ギムザ染色を行い、光学顕微鏡により形態学的変化を検討した。

(6) TUNEL (TdT-mediated dUTP nick end labeling) 法<sup>29,30)</sup>

LU65A 株にベスナリノン 20μg/ml を添加し、それ

ぞれの時間培養した後、サイトスピン標本を作成した。サイトスピン標本を4%パラホルムアルデヒド入りリン酸緩衝食塩水 (PBS) で固定し、その後 TUNEL 反応液を加え、37℃で60分間反応させた。ファストバイオレットBで発色させ、光学顕微鏡を用いて検討し、核のみが染色された細胞をアポトーシス細胞とした。また、全細胞に占めるアポトーシス細胞の比率を算出し、経時的変化を観察した。

(7) 電気泳動

1 x 10<sup>6</sup>/ml の細胞に 20μg/ml のベスナリノンを添加し、12時間から72時間培養した細胞からフェノールクロロホルム法により DNA を抽出した。次に 10μg の DNA を2%アガロースゲルで電気泳動をおこなった。その後、3'末端標識法<sup>31)</sup>により発光させレントゲンフィルムの感光により、DNA の断片化を検討した。

(8) Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS) 法

ベスナリノン 20μg/ml 添加後の Bcl-2 と Fas 抗原の経時的変化について、FACS 法で検討した。200μl の PBS に浮遊した 1 x 10<sup>6</sup> の細胞に 200μl の4%パラホルムアルデヒドを加え、氷上で10分間冷やした後、400μl のサポニンを加えた<sup>32)</sup>。その後抗 Bcl-2 モノクローナル抗体を入れ、さらに2次蛍光抗体を加えた。Fas 抗原については抗 Fas モノクローナル抗体を用い、それぞれ FACS 法で解析した。

(9) c-myc mRNA

5 x 10<sup>7</sup> の細胞に 20μg/ml のベスナリノンを添加し6~48時間培養し、AGPC 法<sup>33)</sup>により RNA を抽出した。次に 20μg の RNA を1%アガロースゲルで電気泳動した後、ナイロン膜へ転写した。その後<sup>32</sup>Pでラベルした c-myc probe を加えた。また、ヒト β-actin probe をコントロールとして、ノザンプロット法により検討した。

結果

(1) ベスナリノンの細胞増殖抑制効果

検討した3株 (LU65A, LU65B, LU65C) において、ベスナリノンは0.1μg/ml から20μg/ml の範囲で濃度依存的に細胞増殖を抑制した。抑制率は20μg/ml の濃度で最大値を示し、それぞれ49.7%, 33.2%, 44.1%であった (Fig. 1)。

以下の検討は増殖抑制が最も強かった LU65A 株を用いて行った。

(2) 増殖曲線

ベスナリノン未添加をコントロールとし、添加時の細胞数を%で表した。ベスナリノン添加後、1日目92.1%、2日目76.0%、3日目62.3%と経時的にコントロールに

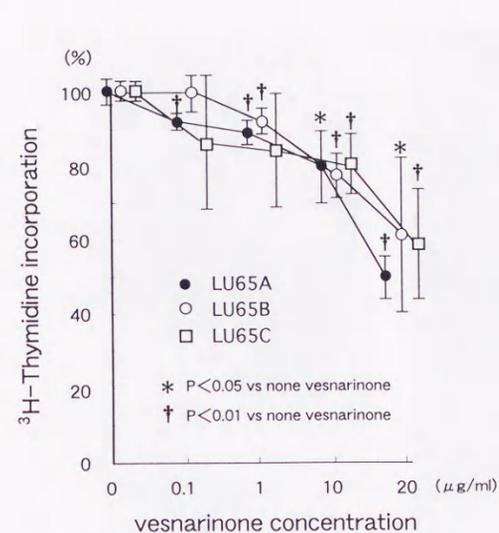


Fig. 1. Three cell lines (LU65A, LU65B, LU65C) were cultured with various doses of vesnarinone from 0.1 to 20 μg/ml for 72 hours. The incorporation of <sup>3</sup>H-thymidine was measured with a liquid scintillation method after cell harvest. Data are mean ± SD of triplicate cultures as a percent to control cultures. Control values of <sup>3</sup>H-thymidine incorporation of LU65A, LU65B, and LU65C are 38401dpm, 34534dpm, and 7750 dpm, respectively.

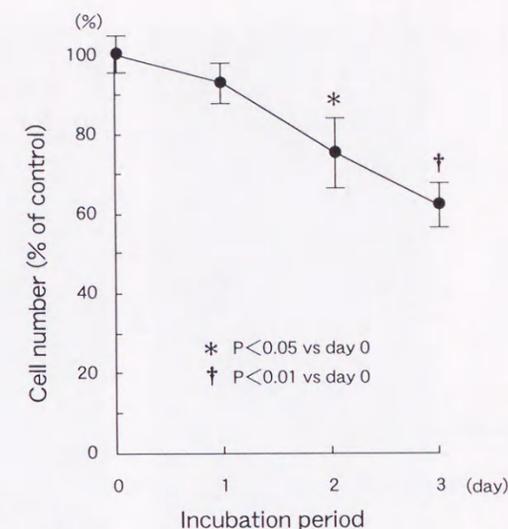


Fig. 2. LU65A cells were plated in 60mm plastic Petri dishes in the medium with or without 20 μg/ml of vesnarinone and were counted every day. The viable cell number of LU65A cells in the presence of vesnarinone are showed as a percentage to control (none vesnarinone).

(3) May-Giemsa 染色

ベスナリノン (20μg/ml) 添加後の24時間後のサイトスピン標本における May-Giemsa 染色の結果を Fig. 3 に示す。矢印に示すように DNA の断片化を伴うアポトーシス細胞 (Apoptotic cell) を認めた。

に対する細胞数が低下し、ベスナリノン添加による細胞増殖の抑制が観察された (Fig. 2)。

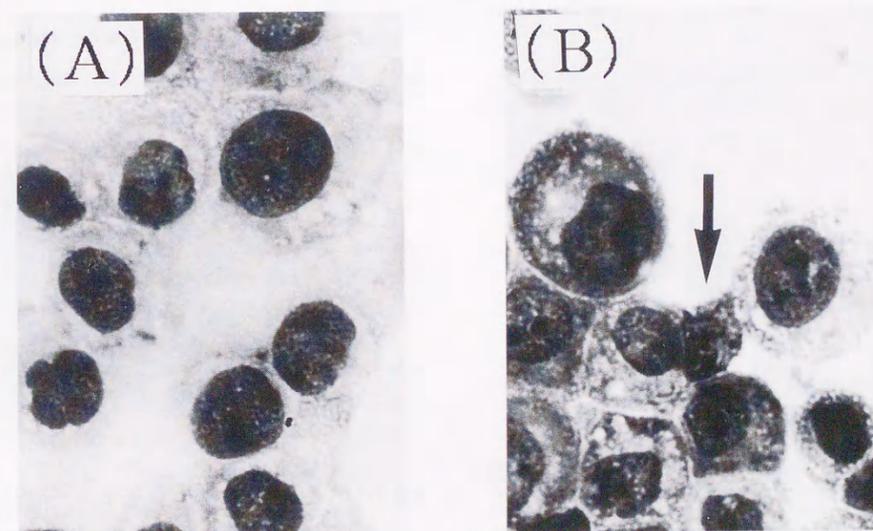


Fig. 3. Morphological changes of LU65A cells cultured with (B) or without (A) of 20 μg/ml of vesnarinone was examined by May-Giemsa staining using light microscopy. Condensation of nuclei was seen after addition of vesnarinone. Arrow indicates a typical apoptotic cell with fragmented nuclei (B). (x1000)

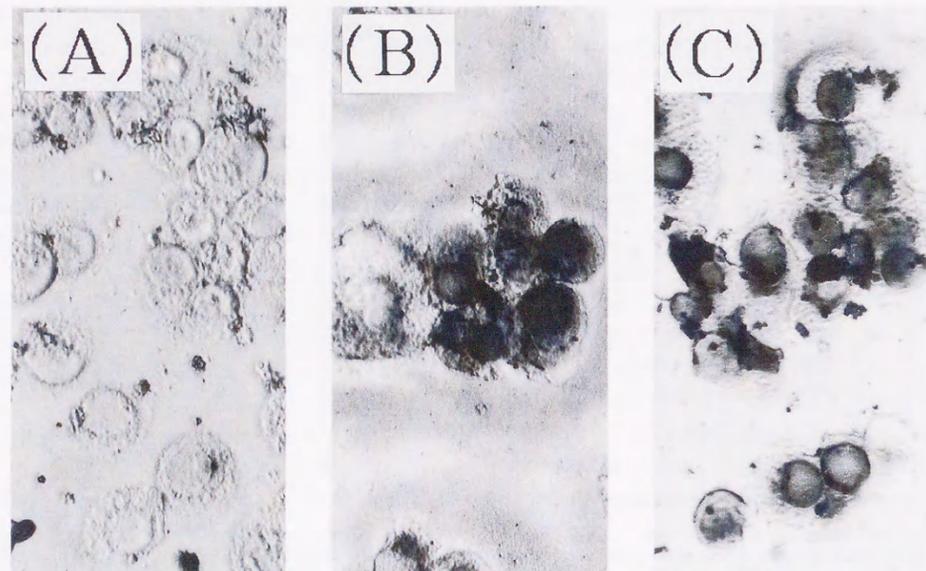


Fig. 4. Apoptotic cells were detected by the TUNEL method. (A); Ctyospine smear film of LU65A cells cultured without vesnarinone as a control. (B); LU65A cells cultured with 20 μg/ml of vesnarinone for 12 hours. (C); LU65A cells cultured with vesnarinone for 24 hours. Apoptotic cells stained by TUNEL method were exhibited dark nuclei.

(4) TUNEL 法

ベスナリノン 20 μg/ml 添加後のサイトスピン標本を作成し、TUNEL 法によりアポトーシス細胞を検討した。コントロール (Fig. 4 A) に比べ、添加12時間後 (Fig. 4 B) では、核が濃染された陽性細胞を認め、24時間 (Fig. 4 C) ではさらに陽性細胞が増加した。

全細胞数に対する陽性細胞の占める割合を経時的に検討した。陽性細胞の比率は経時的に増加し24時間では65%となった (Fig. 5)。

(5) 電気泳動法

24時間まではスメアの状態であるが、Fig. 6 に示すように36時間以降に核の断片化を示す Ladder を認めた。

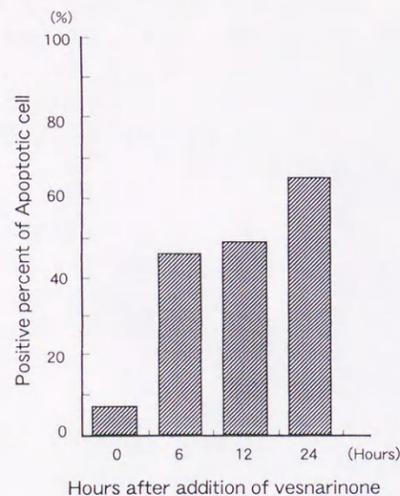


Fig. 5. Time dependent induction of apoptosis in LU65A cells cultured with 20 μg/ml of vesnarinone for various periods. Apoptotic cells were detected by TUNEL method. Apoptotic cells were counted and positive cell percent at various periods were shown.

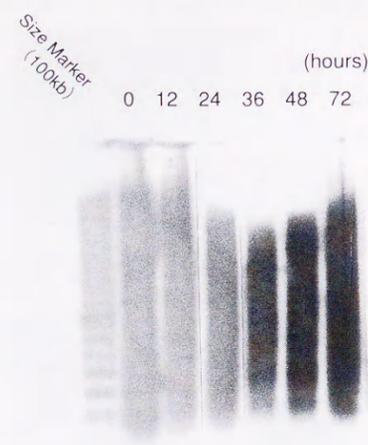


Fig. 6. Ten micrograms of DNA extracted from LU65A cells cultured with or without 20 μg/ml of vesnarinone for various periods were electrophoresed through agarose gel. Then DNA was transferred to a nylon membrane and was visualized by digoxigenin end labeling method.

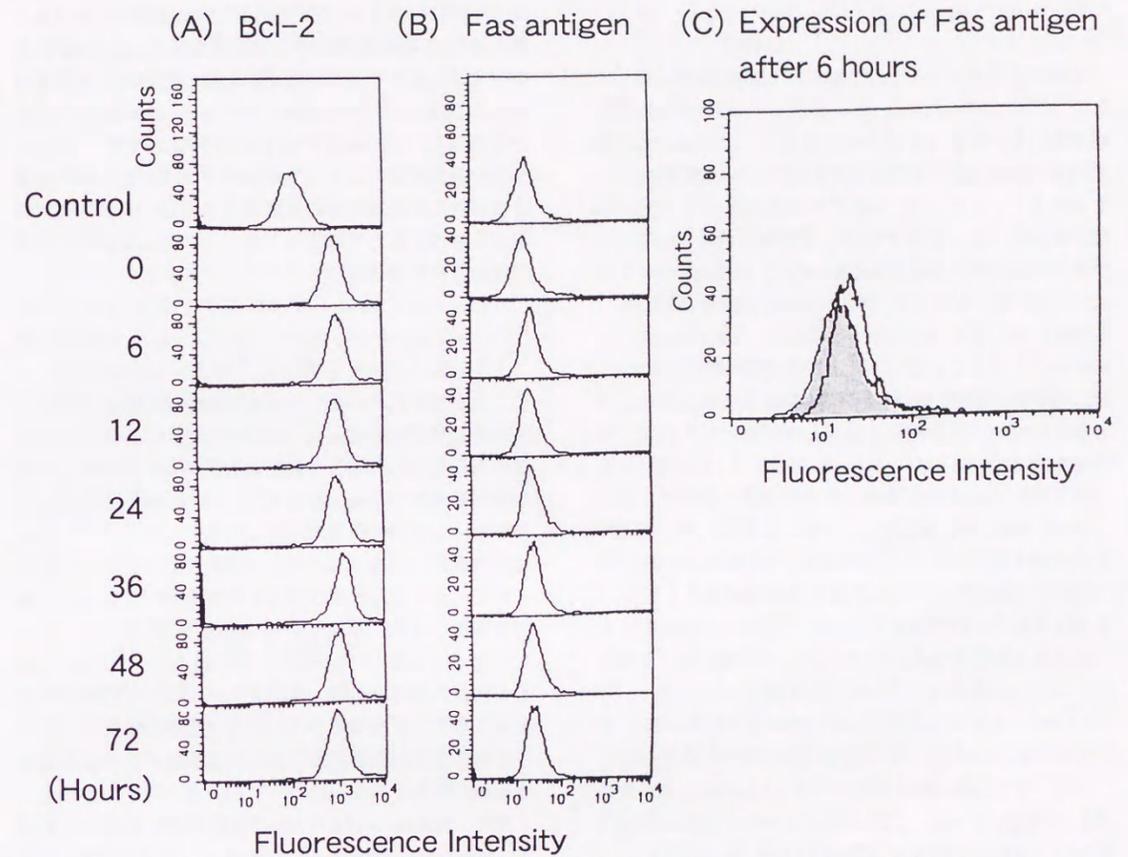


Fig. 7. Flow cytometric detection of Bcl-2 oncoprotein and Fas antigen in LU65A cells stimulated by vesnarinone. LU65A cells were cultured with or without 20 μg/ml of vesnarinone for various periods and reacted with Bcl-2 antibody (A) or Fas antigen (B) and FITC-labeled anti-mouse goat IgG antibody. Panel (C) indicates expression of Fas-antigen at 6 hours. Dark area indicates control.

以上の結果からベスナリノンは LU65A 株に対しアポトーシス誘導作用を有すると考えられた。

次にベスナリノンによるアポトーシス誘導の機序に関して以下の検討を行った。

(6) Bcl-2 および Fas 抗原の発現

アポトーシス誘導に対し抑制的に働くとして報告されている Bcl-2<sup>34,35)</sup> と、促進的に働きアポトーシス誘導作用が報告されている Fas 抗原<sup>36,37)</sup> について、ベスナリノン 20 μg/ml 添加後の経時変化を FACS 法で検討した。Bcl-2 はベスナリノン添加前より発現していたが、ベスナリノン添加による発現の変化 (減少) は見られなかった (Fig. 7 A)。しかしながら Fas 抗原は、ベスナリノン添加後、6 時間でわずかではあるが一過性に出現し、以後は減少した (Fig. 7 B, 7 C)。

(7) c-myc mRNA

ノザーンプロット法により c-myc mRNA の経時変化を検討したところ、ベスナリノン添加後、6 時

間から12時間で発現の増強が認められ、その後は徐々に減少した (Fig. 8)。この動態は Fas 抗原のそれと一致した。

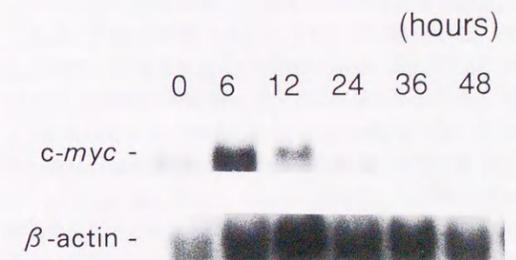


Fig. 8. Twenty micrograms of total RNA extracted from LU65A cells cultured with or without 20 μg/ml of vesnarinone for various periods were electrophoresed through agarose gel and transferred to a nylon membrane. The RNA dot was hybridized with radiolabeled c-myc or β-actin probe.

## 考 察

本研究で、ベスナリノンは大細胞肺癌細胞株に対して  $0.1 \mu\text{g/ml}$  から  $20 \mu\text{g/ml}$  の範囲で濃度依存的に細胞増殖を抑制することが明らかにされた。これは、他の組織由来の癌細胞株<sup>17,19)</sup>や白血病細胞<sup>20)</sup>と同じ傾向を示すものである。また、他の癌<sup>17,18)</sup>や白血病<sup>20)</sup>において、増殖抑制はアポトーシスを伴うことが報告されているが、本研究でも大細胞肺癌細胞株において、ベスナリノンによりアポトーシスが誘導されることを形態学的、TUNEL法、電気泳動法で示した。

ベスナリノンによるアポトーシス誘導の機序については、藤原らが白血病細胞について検討しているが<sup>20)</sup>、固形腫瘍について誘導機序を検討した報告はみられず、本論文が最初である。

ベスナリノンによるアポトーシス誘導の機序として、ベスナリノンの持つ細胞内カルシウム濃度の上昇作用<sup>18)</sup>の関与が考えられる。白血病細胞<sup>20)</sup>や大腸癌、乳癌の細胞株<sup>39)</sup>では細胞内カルシウム濃度の上昇がアポトーシスを誘導することが報告されている。また、Satoらはヒト唾液腺癌細胞株を用いてベスナリノン投与により細胞内カルシウム濃度は上昇したことを報告している<sup>17)</sup>。しかし、データとしては示さなかったが、LU65A株を用いてベスナリノン添加後の細胞内カルシウム濃度を検討した所、有意な変化は認めなかった。したがって少なくともLU65A株においては、アポトーシス誘導と細胞内カルシウム濃度の間に有意な相関はないものと考えられる。

次に、アポトーシスに対して抑制的に働く Bcl-2 に関して検討を加えた。肺癌では Bcl-2 の発現が強いほど予後が不良であると報告されている<sup>40)</sup>。また、白血病細胞では Bcl-2 の発現低下によりアポトーシスが誘導される<sup>34,35)</sup>。これらの報告よりベスナリノンの大細胞肺癌株に対するアポトーシス誘導作用は Bcl-2 の発現低下を介している可能性が示唆される。そこで、FACS法を用いて Bcl-2 の発現に関して検討した所、LU65A株では Bcl-2 は薬剤投与前より発現しており、ベスナリノン添加によるアポトーシスの誘導後も Bcl-2 の発現減少は認めなかった。したがって、ベスナリノンによるアポトーシス誘導には Bcl-2 の関与はないことが示唆される。

一方、Fas 抗原は TNF 受容体ファミリーに属する細胞表面受容体分子であるが、主に細胞を死に至らしめるために存在していると考えられている。最近、Fas 抗原に始まるアポトーシス誘導の刺激伝達系の解析が著しく進展し、それによると Fas 抗原と Fas リガンドとの結合によりカスパーゼと呼ばれる一連のプロテアーゼ群が活性化され、最終的にはカスパーゼ3が直接エンドヌク

レアーゼに作用し核の断片化をきたすことが明らかになってきた<sup>36,37)</sup>。神経芽細胞では抗癌剤投与により Fas 抗原を介するアポトーシスが誘導されることが報告されている<sup>41)</sup>。本研究でも細胞表面にわずかに Fas 抗原の発現が認められ、肺癌細胞でも Fas 抗原を介したアポトーシスの経路が存在することが示唆された。さらに興味深いことに、肺癌細胞では細胞表面に Fas リガンドが発現し、感作された T 細胞をアポトーシスに誘導することが報告されている<sup>42)</sup>。

次に、*c-myc* 遺伝子は核に局在し転写因子として DNA 結合蛋白をコードしているが、*c-myc* の過剰発現により p53 や BAX を介してアポトーシスが誘導されることが知られている<sup>43)</sup>。ヒト白血病細胞株においては抗癌剤投与により *c-myc* が過剰発現しアポトーシスが誘導されたことも報告されている<sup>44)</sup>。本研究ではベスナリノン投与後に *c-myc* が一時的に強く発現しており、アポトーシスへの影響が示唆される。

以上より、LU65A 株においてはベスナリノンによるアポトーシス誘導の機序として Fas 抗原と *c-myc* の関与が考えられる。藤原らの白血病細胞株 HL60 を用いた研究では Bcl-2、Fas 抗原に変化はなく、*c-myc* の減少が報告されている<sup>20)</sup>。ベスナリノンに限らず、各種薬剤のアポトーシス誘導の機序については不明な点が多く、同じ薬剤でも細胞の種類により作用機序が異なる可能性が示唆される。

また、Hueberらはマウスの線維芽細胞を用いた実験で、*c-myc* により誘導されたアポトーシスが Fas 抗原-Fas リガンド系を介していたことを報告している<sup>45)</sup>。これは Fas 抗原-Fas リガンド系の下流に *c-myc* が存在し、従来アポトーシスに関して別々の経路として考えられていた Fas 抗原と *c-myc* が、互いに関連しアポトーシスを誘導する経路の存在を示唆している。本研究の結果から肺癌においても Fas 抗原と *c-myc* が関連しアポトーシスを誘導した可能性が考えられる。両者の関連については、今後さらなる検討が必要である。

近年、前骨髄性白血病において *all-trans-retinoic acid* (ATRA) により分化誘導が起こり、高率に完全緩解に導入できることが報告され<sup>46)</sup>、癌治療法のひとつとして分化誘導療法が注目されてきている。肺癌などの固形癌では手術不能例の予後が悪いことを考えると、分化誘導効果のある薬剤の発見や開発が望まれる。Satoらはヒト唾液腺由来の腺様扁平上皮癌細胞株をヌードマウス皮下に移植し、ベスナリノンによる腫瘍組織の分化誘導を報告している<sup>17)</sup>。本研究の結果、ベスナリノンは *in vitro* における肺癌増殖抑制作用を示しており、分化誘導作用を有する抗腫瘍薬としても有望であることが示唆された。

本研究で使用したベスナリノンの濃度は、 $0.1 \mu\text{g/ml}$  から  $20 \mu\text{g/ml}$  であるが、この濃度は心不全治療の通常量である 1日 60mg を服用した際の血中濃度が  $6.9 \mu\text{g/ml}$  から  $9.4 \mu\text{g/ml}$  に達すること<sup>47,48)</sup>や、また重症例では 120mg まで増量可能であることを考え合わせると、臨床的に到達可能な濃度である。さらに心不全患者において、これらの使用量では顆粒球減少以外には重篤な副作用はみられていない。したがってベスナリノンは抗腫瘍薬として臨床応用される可能性は高いものと思われる。

## 結 論

大細胞肺癌細胞株 LU65A 株において、ベスナリノンにより細胞増殖抑制、アポトーシス誘導が認められた。アポトーシス誘導の機序として、Fas 抗原と *c-myc* の関与が考えられた。また、今回使用したベスナリノンの濃度は、臨床的にも充分到達可能な濃度である。本剤は心不全に対しては既に臨床応用されており、肺癌に対しても経口投与で治療効果が期待される。

## 謝 辞

稿を終るにあたり、御指導、御校閲を賜った鄭 忠和教授に深く感謝致します。また、終始懇切丁寧な御指導を頂きました有馬直道講師に御礼申し上げます。

本論文の要旨は第9回ヨーロッパ癌学会(1997年、ドイツ)で発表した。

## 文 献

- 1) Tominaga M, Yo E, Ogawa H, Yamashita S, Yabuuchi Y, Nakagawa K. Studies on positive inotropic agents. I. Synthesis of 3, 4-dihydro-6-[4-(3, 4-dimethoxybenzoyl)-1-piperazinyl]-2(1H)-quinolinone and related compounds. Chem Pharm Bull 1984; 32: 2100-10.
- 2) Yamashita S, Hosokawa T, Kojima M, Mori T, Yabuuchi Y. In vitro and in vivo studies of 3, 4-dihydro-6-[4-(3, 4-dimethoxybenzoyl)-1-piperazinyl]-2(1H)-quinolinone (OPC-8212), a novel positive inotropic drug, in various animals. Arzneim-Forsch/Drug Res 1984; 34: 342-6.
- 3) Inoue M, Hori M, Yasuda H, Takishima T, Sugimoto T, Sasayama S, et al. A multicenter study of a new inotropic agent, piperanometozine (OPC-8212) in congestive heart failure; clinical improvement during

short-term treatment. Cardiovasc Drug Ther 1987; 1: 169-75.

- 4) Feldman AM, Bristow MR, Parmley WW, Carson PE, Pepine CJ, Gilbert EM, et al. Effect of vesnarinone on morbidity and mortality in patients with heart failure. N Engl J Med 1993; 329: 149-55.
- 5) Taira N, Endoh M, Iijima T, Satoh K, Yanagisawa T, Yamashita S, et al. Mode and mechanism of action of 3, 4-dihydro-6-[4-(3, 4-dimethoxybenzoyl)-1-piperazinyl]-2(1H)-quinolinone (OPC-8212), a novel positive inotropic drugs, on the dog heart. Arzneim-Forsch/Drug Res 1984; 34: 47-55.
- 6) Masuoka H, Ito M, Sugioka M, Kozeki H, Konishi T, Tanaka T, et al. Two isoforms of cGMP-inhibited cyclic nucleotide phosphodiesterases in human tissues distinguished by their responses to vesnarinone, a new cardiostimulant. Biochem Biophys Res Commun 1993; 190: 412-7.
- 7) Iijima T, Taira N. Membrane current changes responsible for the positive inotropic effect of OPC-8212, a new positive inotropic agent, in single ventricular cells of the guinea pig heart. J Pharmacol Exp Ther 1987; 240: 657-62.
- 8) Endoh M, Yanagisawa T, Taira N, Blinks JR. Effects of new inotropic agents on cyclic nucleotide metabolism and calcium transients in canine ventricular muscle. Circulation 1986; 73 (suppl III): 50-66.
- 9) Feldman AM, Becker LC, Llewellyn MP, Baughman KL. Evaluation of a new inotropic agent, OPC-8212, in patients with dilated cardiomyopathy and heart failure. Am Heart J 1988; 116: 771-7.
- 10) Feldman AM, Pepine CJ, Bristow MR, Hendrix GH, Powers ER, Bertolet B, et al. Incidence of vesnarinone induced neutropenia. The U.S. experience (abstr). Circulation 1993; 88: I-301.
- 11) Bertolet BD, White BG, Pepine CJ. Neutropenia occurring during treatment with vesnarinone (OPC-8212). Am J Cardiol 1994; 74: 968-70.
- 12) Busch FW, Tillmann A, Becker EW, Owsianowski M, Berg PA. The inhibitory effects of a positive inotropic quinolinone derivative, 3, 4-dihydro-6-[4-(3, 4-dimethoxybenzoyl)-1-piperazinyl]-2(1H)-quinolinone (OPC-8212),

- on bone-marrow progenitor cells and peripheral lymphocytes. *Eur J Clin Pharmacol* 1992 ; 42 : 629-34.
- 13) Nabeshima R, Aizawa S, Nakano M, Toyama K, Sugimoto K, Kaidow A, et al. Effects of vesnarinone on the bone marrow stromal cell-dependent proliferation and differentiation of HL60 cells *in vitro*. *Exp Hematol* 1997 ; 25 : 509-15.
- 14) Matsumori A, Shioi T, Yamada T, Matsui S, Sasayama S. Vesnarinone, a new inotropic agent, inhibits cytokine production by stimulated human blood from patients with heart failure. *Circulation* 1994 ; 89 : 955-8.
- 15) Shioi T, Matsumori A, Matsui S, Sasayama S. Inhibition of cytokine production by a new inotropic agent, vesnarinone, in human lymphocytes, T cell line, and monocytic cell line. *Life Sciences* 1993 ; 54 : 11-16.
- 16) Maruyama I, Maruyama Y, Nakajima T, Kitajima I, Osame M, Zhao JQ, et al. Vesnarinone inhibits production of HIV-1 in cultured cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1993 ; 195 : 1264-71.
- 17) Sato M, Harada K, Yoshida H. Induction of differentiation and apoptosis, and Le<sup>x</sup> antigen expression by treatment with 3, 4-dihydro-6- [4-(3, 4-dimethoxybenzoyl) -1-piperaziny] -2 (1H) -quinolinone (vesnarinone) in a human salivary cancer cell line. *Acta Histochem Cytochem* 1994 ; 27 : 591-9.
- 18) Nio Y, Ohmori H, Minari Y, Hirahara N, Sasaki S, Takamura M, et al. A quinolinone derivative, vesnarinone (OPC-8212), significantly inhibits the *in vitro* and *in vivo* growth of human pancreatic cancer cell lines. *Anti-Cancer Drugs* 1997 ; 8 : 686-95.
- 19) Kawai K, Konishi Y, Izumi K, Sato M, Adachi M, Hozumi M. Enhancement of anticancer effects of radiation and conventional anticancer agents by a quinolinone derivative, vesnarinone : Studies on human gastric cancer tissue xenografts in nude mice. *Anticancer Res* 1998 ; 18 : 405-12.
- 20) Fujiwara H, Arima N, Otsubo H, Matsushita K, Hidaka S, Arimura K, et al. Vesnarinone exhibits antitumor effect against myeloid leukemia cells via apoptosis. *Exp Hematol* 1997 ; 25 : 1180-6.
- 21) 厚生省の指標「国民衛生の動向」1997 ; 44 : 52-55.
- 22) Bunn PA, Brotherton TW, Cella D, Ganz PA, Glatstein E, Hayman J, et al. Clinical practice guidelines for the treatment of unresectable non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 1997 ; 15 : 2996-3018.
- 23) 杉浦孝彦, 樋田豊明, 吉田公秀 非小細胞肺癌 癌の臨床 1999 ; 45 : 875-81.
- 24) Ihde DC. Chemotherapy of lung cancer. *N Engl J Med* 1992 ; 327 : 1434-41.
- 25) Ascensao JL, Oken MM, Ewing SL, Goldberg RJ, Kaplan ME. Leukocytosis and large cell lung cancer. A frequent association. *Cancer* 1987 ; 60 : 903-5.
- 26) Shijubo N, Inoue Y, Hirasawa M, Igarashi T, Mori M, Matsuura A, et al. Granulocyte colony-stimulating factor-producing large cell undifferentiated carcinoma of the lung. *Intern Med* 1992 ; 31 : 277-80.
- 27) Yamada T, Hirohashi S, Shimosato Y, Kodama T, Hayashi S, Ogura T, et al. Giant cell carcinomas of the lung producing colony-stimulating factor *in vitro* and *in vivo*. *Jpn J Cancer Res* 1985 ; 76 : 967-76.
- 28) Suzuki K, Miyasaka H, Ota H, Yamakawa Y, Tagawa M, Kuramoto A, et al. Purification and partial primary sequence of a chemotactic protein for polymorphonuclear leukocytes derived from human lung giant cell carcinoma LU65C cells. *J Exp Med* 1989 ; 169 : 1895-1901.
- 29) Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death *in situ* via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 1992 ; 119 : 493-501.
- 30) Gorczyca W, Gong J, Darzynkiewicz Z. Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by the *in situ* terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays. *Cancer Res* 1993 ; 53 : 1945-51.
- 31) Schmitz GG, Walter T, Seibl R, Kessler C. Nonradioactive labeling of oligonucleotides *in vitro* with the hapten digoxigenin by tailing with terminal transferase. *Anal Biochem* 1991 ; 192 : 222-31.
- 32) Knuutila S, Klefstrom J, Szymanska J, Lakkala T, Peltomaki P, Eray M, et al. Two novel human B-cell lymphoma lines of lymphatic follicle

- origine ; Cytogenetic, molecular genetic and histopathological characterisation. *Eur J Haematol* 1994 ; 52 : 65-72.
- 33) Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987 ; 162 : 156-9.
- 34) Tormo M, Tari AM, McDonnell TJ, Cabanillas F, Garcia-Conde J, Lopez-Berestein G. Apoptotic induction in transformed follicular lymphoma cells by Bcl-2 downregulation. *Leuk Lymphoma* 1998 ; 30 : 367-79.
- 35) Osorio LM, De Santiago A, Aguilar-Santelises M, Mellstedt H, Jondal M. CD6 ligation modulates the Bcl-2/Bax ratio and protects chronic lymphocytic leukemia B cells from apoptosis induced by anti-IgM. *Blood* 1997 ; 89 : 2833-41.
- 36) Itoh N, Yonehara S, Ishii A, Yonehara M, Mizushima S, Samashima M, et al. The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell* 1991 ; 66 : 233-43.
- 37) Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell* 1997 ; 88 : 355-65.
- 38) Yoshida A, Ueda T, Takauji R, Liu YP, Fukushima T, Inuzuka N, et al. Role of calcium ion in induction of apoptosis by etoposide in human leukemia HL-60 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1993 ; 196 : 927-34.
- 39) Brent PJ, Pang G, Little G, Dosen PJ, Van Helden DF. The sigma receptor ligand, reduced haloperidol, induces apoptosis and increases intracellular-free calcium levels [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in colon and mammary adenocarcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1996 ; 219 : 219-26.
- 40) Pezzella F, Turley H, Kuzu I, Tunekar F, Dunnill M, Pierce CB, et al. *bcl-2* protein in non-small cell lung carcinoma. *N Engl J Med* 1993 ; 329 : 690-4.
- 41) Fulda S, Sieverts H, Friesen C, Herr I, Debatin KM. The CD95 (APO-1/Fas) system mediates drug-induced apoptosis in neuroblastoma cells. *Cancer Res* 1997 ; 57 : 3823-9.
- 42) Niehans GA, Brunner T, Frizelle SP, Liston JC, Salerno CT, Knapp DJ, et al. Human lung carcinomas express Fas ligand. *Cancer Res* 1997 ; 57 : 1007-12.
- 43) Reynolds JE, Yang T, Qian L, Jenkinson D, Zhou P, Eastman A, et al. Mcl-1, a member of the Bcl-2 family, delays apoptosis induced by c-Myc overexpression in chinese hamster ovary cells. *Cancer Res* 1994 ; 54 : 6348-52.
- 44) Bertrand R, Sarang M, Jenkin 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* 1991 ; 51 : 6280-5.
- 45) Hueber AO, Zoernig M, Lyon D, Suda T, Nagata S, Evan GI. Requirement for the CD95 receptor-ligand pathway in c-Myc-induced apoptosis. *Science* 1997 ; 278 : 1305-.
- 46) Degos L, Dombret H, Chomienne C, Daniel MT, Miclea JM, Chastang C, et al. All-*trans*-retinoic acid as a differentiating agent in the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Blood* 1995 ; 85 : 2643-53.
- 47) 児玉和久, 南都伸介, 井上通敏 新しい経口強心剤 OPC-8212 : 3, 4-dihydro-6- [4-(3, 4-dimethoxybenzoyl) -1-piperaziny] -2 (1H) -quinolinone の第一相臨床試験 臨床薬理 1989 ; 20 : 709-18.
- 48) 中井哲, 河合一吉, 相原公徳, 足立正一 ベスナリノンの分化およびアポトーシス誘導作用と抗腫瘍効果 *Biotherapy* 1995 ; 9 : 889-97.

