インターフェロン- γ による口腔扁平上皮癌細胞株の Fas 誘導アポトーシスへの感受性増強

竹味利晃・滝沢邦生・岩瀬正泰・南雲正男

Enhanced susceptibility to Fas-mediated apoptosis by interferon- γ in an oral squamous cell carcinoma cell line

TAKEMI Toshiaki · TAKIZAWA Kunio · IWASE Masayasu · NAGUMO Masao

Abstract: Fas is widely expressed on the cell surface of many normal and neoplastic cells and induces apoptotic cell death in the presence of Fas ligand (FasL) or Fas-agonistic antibody CH11 (Fas-mediated apoptosis). Cancer cells constitutively expressing Fas are generally resistant to Fas-mediated apoptosis. Recently, it has been reported that interferon- γ (IFN- γ) enhances Fas-mediated apoptosis. An oral squamous cell carcinoma cell line, NA, also constitutively expresses Fas on the plasma membrane and shows low susceptibility to Fas-agonistic antibody-induced apoptosis. This study was conducted to examine the effects of IFN- γ on Fas-mediated apoptosis, the expression of Fas and FasL, and the production of soluble Fas (sFas) in NA cells. The results revealed that a Fas-agonistic antibody, CH11, induced apoptosis of NA cells and IFN- γ enhanced susceptibility of NA cells to CH11-induced apoptosis. Further more, IFN- γ up-regulated Fas expression on NA cells without affecting the expression of FasL. A slight decrease in sFas expression was induced by treatment with IFN- γ . These results suggest that IFN- γ may enhance the susceptibility of NA cells to Fas-mediated apoptosis through the up-regulation of Fas.

Key words: oral squamous cell carcinoma (口腔扁平上皮癌), interferon- γ (インターフェロン γ), Fas (Fas), Fas-mediated apoptosis (Fas 誘導アポトーシス), enhanced susceptibility (感受性増強)

緒 言

Fas (APO-1/CD95) は, TNF (tumor necrosis factor, 腫瘍壊死因子) /NGF (nerve growth factor, 神経成長因子) レセプターファミリーに属し, 免疫担当細胞のアポトーシスを誘導する 45kD の細胞膜貫通型レセプター蛋白である¹⁾. その細胞内ドメインには I 型 TNF レセプター (P55) と類似した細胞死シグナルに関わるデスドメイン構造が存在し, Fas リガンド (FasL) や Fas 抗体と結合することにより細胞内に細胞死シグナルを伝達してアポトーシスを誘導する^{1~3)}. Fas は末梢の活性化 T 細胞や B 細胞の除去に関与し, Fas/FasL システムは AIDS, GVHD, 自己免疫疾患の発症などに関与していることが指摘され, 病態との関

連が注目されている^{4, 5)}. また, Fas は免疫系以外の正常細胞や種々の悪性腫瘍細胞にも発現しており⁶⁾, 正常細胞では発生・分化や生体恒常性維持に関与しているとされているが⁴⁾, 悪性腫瘍細胞での Fas 発現の意義についてはまだ明確になっていない.

一方, インターフェロン γ (Interferon- γ , IFN- γ) は抗ウイルス効果をはじめ, 細胞増殖抑制作用, 抗腫瘍作用, NK 細胞の活性増強, マクロファージの活性化, 免疫応答調節作用, 分化誘導の調節作用などさまざまな機能を調整することが明らかになっている^{7, 8)}. また最近 IFN- γ が, 大腸癌^{9, 10)}, 肝細胞癌^{11, 12)}, 白血病¹³⁾, 横紋筋肉腫²⁾, ケラチノサイト¹⁴⁾ などの細胞で Fas 誘導アポトーシスを増強することが報告されている. しかし, 口腔癌細胞でも IFN- γ による Fas 誘導アポトーシスの増強が起こるのかどうかはまだ明らかになっていない. そこで今回われわれは, 当教室で樹立したヒト口腔扁平上皮癌細胞株 (NA 細胞) を用いて, IFN- γ による Fas 誘導アポトーシスの増強の有無と Fas 関連分子の発現について検討した.

昭和大学歯学部顎口腔疾患制御外科学教室
(主任: 南雲正男教授)

Department of Oral and Maxillofacial Surgery, School of Dentistry, Showa University (Chief: Prof. NAGUMO Masao)

受付日: 2004 年 3 月 18 日

採択日: 2004 年 8 月 24 日

実験材料と方法

1. 試薬および抗体

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) および胎児牛血清 (FBS) は、GIBCO BRL (Gaithersburg, MD) のものを、IFN- γ は大日本製薬 (大阪) から供与されたものを使用した。マウス抗ヒト Fas モノクローナル抗体 [CH11, UB2 (FITC 標識)], FITC 標識ハムスター抗ヒト FasL モノクローナル抗体 (4H9), FITC 標識マウス IgG, FITC 標識ハムスター IgG, FITC 標識アネキシン V (アネキシン V-FITC) を用いる MEBCYTO アポトーシスキット、および可溶性 Fas (sFas) (S) ELISA キットは MBL (名古屋) から購入した。その他の試薬についてはすべて純品を用い、主として Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) から購入した。

2. 細胞

細胞として当教室で樹立した舌由来扁平上皮癌細胞株 (NA 細胞) を用いた。培養液は 10 % 熱不活化 FBS を含む DMEM (100U/ml ペニシリン, 100 μ g/ml ストレプトマイシン添加) を用い、5 % CO₂ インキュベーター内で培養して、サブコンフルエントの状態で実験に使用した。NA 細胞が恒常的に Fas を発現していることはすでに確認している¹⁵⁾。

なお、以下の実験はすべてトリプリケートに行い、2-3 回実験を繰り返した。

3. NA 細胞に対する Fas 抗体 (CH11) の細胞障害性

Fas のアゴニスト抗体である CH11 を用いて NA 細胞に対する細胞障害性をクリスタルバイオレット法で検討した¹⁶⁾。すなわち、NA 細胞を 96 穴の平底マイクロプレートに 1×10^4 個/ウェル (0.2ml) 播種後、種々の濃度 (1-1000ng/ml) の CH11 を添加した。24 時間培養後 PBS で 2 回洗浄後 0.2 % クリスタルバイオレットを含む 2 % エタノールで固定・染色した。その後、結合した色素を 100 μ l の 1 % SDS で溶出し、570nm での吸光度をマイクロプレートリーダー MR5000 (Dynatech) で計測し、死滅した細胞の割合 (% cytotoxicity) を算出した。

4. NA 細胞に対する Fas 抗体 (CH11) と IFN- γ の細胞増殖抑制効果

NA 細胞に対する Fas 抗体および IFN- γ の増殖抑制効果をトリパンブルー法で検討した。すなわち、まず 1000U の IFN- γ 存在あるいは非存在下で 24 時間培養した後、 1×10^4 個/ml に調整した細胞浮遊液 1 ml を 24 穴の平底マイクロプレートのウェルにまき、100ng/ml の CH11 を各ウェルに添加して培養した。そして、経時的に細胞を採取し、0.01 % トリプシン処理によって細胞を浮遊させた後、

0.4 % トリパンブルーで染色して生細胞数を顕微鏡下で算定した。

なお、IFN- γ の濃度および処理時間は、既報¹⁷⁾ を参考に予備実験を行い、細胞増殖抑制効果が強くみられる条件 (濃度: 1000U, 処理時間: 24 時間) を設定した。

5. フローサイトメーターによるアネキシン V-FITC 結合の検討

アネキシン V-FITC の結合は、アポトーシスの早期の段階を検出する高感度の方法であり、既報¹⁵⁾ に準拠して早期アポトーシスを検討した。すなわち、 5×10^5 個の NA 細胞を IFN- γ (1000U/ml) で 24 時間処理した後、4 °C の PBS で 3 回洗浄し、CH11 (100ng/ml) を 6 時間作用させた。そして細胞を PBS で 2 回洗浄後、結合用の緩衝液 (10 mM Hepes, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl₂, pH7.4) 中でアネキシン V-FITC および propidium iodide (PI) と室温で 15 分反応させ染色した。反応後フローサイトメーター (FACSCalibur; Becton Dickinson, Mountain View, CA) で測定し、Cell Quest Software (Becton Dickinson) を用いて解析した。

6. NA 細胞における Fas 発現のフローサイトメーターによる解析

IFN- γ による NA 細胞表面上の Fas 発現変化を既報¹⁸⁾ に準拠して検討した。すなわち、 5×10^5 個の NA 細胞を IFN- γ (1000U/ml) を添加して 37 °C 24 時間培養後、4 °C PBS で 3 回洗浄し、4 °C の条件下で FITC 標識抗ヒト Fas 抗体 UB2 (10 μ g/ml) を 60 分間作用させた。PBS にて 3 回洗浄後、200 μ l の 1 % パラホルムアルデヒドを含む PBS で固定し、FACSCalibur にて解析した。

なお、陰性コントロールとして UB2 のかわりに FITC 標識マウス IgG を用いた。

7. NA 細胞における FasL 発現のフローサイトメーターによる解析

5×10^5 個の NA 細胞に IFN- γ (1000U/ml) を添加し、37 °C 24 時間培養後 4 °C の PBS で 3 回洗浄し、FITC 標識抗ヒト FasL モノクローナル抗体 (4H9) 20 μ l を 4 °C 60 分間反応させ、PBS で 3 回洗浄した後 200 μ l の 1 % パラホルムアルデヒドを含む PBS で固定し、FACSCalibur にて解析した。

なお、陰性コントロールとして FITC 標識ハムスター IgG を用いた。

8. NA 細胞培養液中の sFas の測定

sFas の測定は、sFas (S) ELISA キットを用い、メーカーの指示に従って行った。すなわち、 5×10^5 個の NA 細胞を IFN- γ (1000U/ml) 存在下あるいは非存在下に 37 °C 24 時間培養後、その培養上清を反応用緩衝液で 5 倍に希釈した。その 100 μ l を ELISA プレートに分注して 1 時間室

図1 NA細胞に対する Fas 抗体 (CH11) の細胞障害性
NA細胞に対する CH11 の細胞障害性をクリスタルバイオレット法で検討した。値は3検体の平均値。

写真1 核染色によるアポトーシス細胞の検出
NA細胞を Hoechst 33258 で染色し、蛍光顕微鏡で観察した。倍率: $\times 400$

温で反応させ、洗浄液で4回洗浄後二次抗体として酵素標識抗体溶液を $100\mu\text{l}$ ずつ添加した。室温で1時間反応させた後に洗浄し、酵素基質液を $100\mu\text{l}$ ずつ添加した。室温で30分間作用させた後に反応停止液で反応を止め、吸光度 (450nm) をマイクロプレートリーダーで計測した。そして検量曲線を作成し、sFas の濃度を求めた。

9. 統計学的解析

統計処理は Student の t 検定を行い、 $p < 0.05$ を有意とした。

図2 NA細胞に対する Fas 抗体 (CH11) と IFN- γ の細胞増殖抑制効果

NA細胞を IFN- γ 存在下あるいは非存在下で24時間培養後、CH11 を添加して培養し、経時的に細胞を採取してトリパンプルー法で生細胞数を算定した。値は3検体の平均値 $\pm$ SD。* CH11 単独処理に対して $P < 0.05$ で有意。

結 果

1. NA細胞に対する CH11 の殺細胞効果

CH11 は、 20ng/ml 以下の低い濃度では NA 細胞に対して殺細胞効果を示さなかった。しかし、それ以上の濃度では濃度依存的に殺細胞効果を示し、 1000ng/ml の CH11 ではほとんどの NA 細胞は死滅していた (図1)。CH11 を添加した NA 細胞の核染色 (bis benzimide trihydrochloride, Hoechst 33258) を行ったところ、クロマチンの濃縮や核の断片化などアポトーシスに特徴的な形態変化を示していた (写真1)。

なお、50%の殺細胞効果を示す CH11 の濃度は 100ng/ml であったので、以後の実験ではすべてこの濃度の CH11 を用いて行った。

2. NA細胞に対する CH11 と IFN- γ の細胞増殖抑制効果

CH11 (100ng/ml) 単独では、培養2および3日目で細胞増殖の抑制がみられたが、4日目以降では細胞増殖の抑制はほとんど認められなかった。IFN- γ (1000U/ml) 単独では、NA細胞の増殖はわずかに抑制されたのみであった。しかし、IFN- γ で24時間前処理後に CH11 を作用させると、培養4日目以降細胞増殖は CH11 単独処理と比較して有意に抑制された ($p < 0.05$) (図2)。

図3 NA細胞におけるアネキシン V-FITC 結合による早期アポトーシスの検出

NA細胞を IFN- γ で 24 時間処理後、CH11 を 6 時間作用させアネキシン V (ANX) -FITC および propidium iodide (PI) で染色し、フローサイトメーターで解析した。

図4 NA細胞の Fas 発現に対する IFN- γ の効果

NA細胞を IFN- γ で 24 時間処理後、FITC 標識抗ヒト Fas 抗体 UB2 を作用させ、Fas 発現をフローサイトメーターで解析した。実験例のうちの代表例を表示。control: FITC 標識マウス IgG で処理。untreated: IFN- γ 無処理。

3. アネキシン V-FITC 結合による早期アポトーシスの検索

CH11 あるいは IFN- γ 単独でもアネキシン V-FITC 陽性細胞の増加がみられたが、両者の併用でさらにアネキシン

V-FITC を結合した細胞の増加が認められた (図 3)。したがって、CH11、IFN- γ および両者の併用でアポトーシス早期の変化が起きており、CH11 と IFN- γ を併用するとアポトーシスが增強されることが明らかになった。

なお、CH11 あるいは IFN- γ それぞれ単独での PI 染色ではほとんど変化が認められなかったが、CH11、IFN- γ 併用では PI 染色陽性細胞のわずかな増加がみられた。これは、CH11 および IFN- γ 併用でアポトーシスが增強されたため、PI 染色陽性となるアポトーシス後期段階の細胞が増加したためと考えられた。

4. NA細胞における Fas 発現とそれに対する IFN- γ の効果

NA細胞を IFN- γ (1000U/ml) で 24 時間処理し、その細胞表面の Fas の発現をフローサイトメーターにて解析した。その結果、NA細胞上に Fas は恒常的に発現しており、Fas の発現は IFN- γ で処理することにより增強された (図 4)。

5. NA細胞における Fas L の発現に対する IFN- γ の効果

NA細胞表面には恒常的な Fas L の発現はみられず、NA細胞を IFN- γ で処理しても FasL の発現誘導は認められなかった (図 5)。

6. NA細胞の sFas 産生に対する IFN- γ の効果

NA細胞を IFN- γ (1000U/ml) で 24 時間処理し、その

図5 NA細胞のFasL発現に対するIFN- γ の効果

NA細胞をIFN- γ で24時間処理後、FITC標識抗ヒトFasL抗体4H9を作用させ、フローサイトメーターで解析した。実験例のうちの代表例を表示。

control: FITC標識ハムスターIgGで処理。untreated: IFN- γ 無処理。

図6 NA細胞のsFas産生に対するIFN- γ の効果

NA細胞をIFN- γ で24時間処理後、培養上清中のsFas量をELISA法で測定した。値は3検体の平均値 $\pm$ SD。control: IFN- γ 無処理。

培養上清中のsFasのレベルをELISA法にて検討した。その結果、IFN- γ で処理していないNA細胞の培養上清中にsFasの存在が確認された。IFN- γ で処理すると、sFas量の減少がみられたが、IFN- γ 無処理と比較して有意の減少ではなかった(図6)。

考 察

近年、IFN- γ が種々の癌細胞のFas誘導アポトーシスを増強することが報告されている⁹⁻¹³⁾。その機序として、IFN- γ が癌細胞のFas発現を増強することによるとする報告が多くみられるが^{10, 11, 19-22)}、一方でIFN- γ によるFas誘導アポトーシスの増強がFas発現増強と関連しないとの報告も散見されている^{12, 23)}。今回使用した口腔扁平上皮癌細胞株NAには、Fasが恒常的に発現しているが、Fas誘導アポトーシスに感受性が低いことから¹⁵⁾、IFN- γ によってNAのFas誘導アポトーシスが增強されるのか、またその際Fas、FasLおよびsFasがどのように変化するかを検討した。

その結果、Fasアゴニスト抗体であるCH11はNA細胞に対して殺細胞作用とともに増殖抑制効果を示し、IFN- γ を併用するとその増殖抑制効果はCH11単独に比較して培養4日目以降有意に增強されていた。しかし、CH11単独の場合は、死滅しなかった細胞が増殖してきたためか、4日目以降では細胞増殖抑制効果はほとんどみられなかった。一方、CH11・IFN- γ 併用群では4日目以降も増殖抑制効果が認められ、これはIFN- γ 併用によってCH11単独よ

りも多くの細胞が死滅することによって増殖抑制効果が增強されたものと考えられた。実際にアポトーシスを核染色およびアネキシンV-FITC結合で検出したところ、CH11を添加するとアポトーシスによって細胞が死滅し、それがIFN- γ 併用によって增強されることが明らかになった。この際、IFN- γ によってNA細胞のFas発現が增強されたことから、IFN- γ によるFas発現増強を介してFas誘導アポトーシスが增強されていることが示唆された。なお、IFN- γ で処理してもFasLの発現は誘導されず、sFasの産生にも有意の変化はみられなかった。

IFN- γ が種々の悪性腫瘍細胞やケラチノサイト^{2, 9-14)}などの正常細胞のFas誘導アポトーシスに対する感受性を増強することについては多く報告されているが、その機序についてはまだ明確になっていない。これまでIFN- γ がFas誘導アポトーシスを増強する機序として、Fas発現の増強^{10, 11, 19-22)}、Bcl-2あるいはBcl-xLの発現抑制^{24, 25)}、BaxあるいはBakの発現増強^{24, 26)}、カスパーゼ1をはじめとするカスパーゼ(3, 4, 7, 8)の発現増強あるいは活性上昇²⁶⁻²⁸⁾、さらにはアポトーシスを抑制する蛋白すなわちFas associated phosphatase-1 (FAP-1)、cellular FADD-like interleukin I-converting enzyme inhibitory protein (cFLIP)の産生抑制などさまざま報告されている^{29, 30)}。しかし、これらは限られた細胞株を使った結果であり、またそれらの結果についても異論のあるところである¹¹⁾。ただし、IFN- γ によるFas発現の増強が、Fas誘導アポトーシスの増強と直接相関するかどうかは別として、また他の機序の関与の可能性もあるものの、Fas誘導アポトーシス

に対する感受性を高める主要な機序であることに対しては現在肯定的である¹¹⁾。今回のわれわれの検索結果でも、口腔癌細胞に対しても IFN- γ が主として Fas 発現を介して Fas 誘導アポトーシスを増強することが示唆された。

先に述べたように IFN- γ によって種々の悪性腫瘍細胞や正常細胞での Fas 発現増強が報告されているが、その機序について言及した報告は少ない。IFN のシグナル伝達系である JAK-STAT が関与することは予測されるところであるが、この点に関しては、わずかに Xu ら²⁰⁾ がヒト大腸癌(腺癌)細胞 HT-29 を用いて Fas 発現の増強について検討し、Fas 発現には STAT1 蛋白の発現と活性化が必要と報告しているにすぎない。したがって、今後 IFN- γ による Fas 発現の増強機序について明らかにしていきたいと考えている。

今回の検索結果で sFas の産生が IFN- γ 処理によって軽度減少した。sFas は、FasL や CH11 に Fas に競合的に結合することによって Fas 誘導アポトーシスを抑制する Fas の decoy receptor である^{31, 32)}。有意ではないが、IFN- γ によって sFas の産生が減少していることから、Fas 誘導アポトーシスの増強が一部 sFas 産生の減少を介しているという可能性も全くは否定できないので、この点についてもさらに検討したいと考えている。

最近共著者の Iwase ら¹⁵⁾ は、頭頸部扁平上皮癌に最も広く使われている 5-FU と CDDP が cFLIP の発現を抑制することによって、NA 細胞の Fas 誘導アポトーシスへの感受性を増強することを明らかにした。今回の結果から、IFN- γ は Fas 発現を介して Fas 誘導アポトーシスを増強することが強く示唆されたことにより、これら抗癌剤に IFN- γ を併用することにより Fas 誘導アポトーシスがさらに増強される可能性があり、頭頸部癌において抗癌剤の効果をあげる 1 つの戦略となり得るのではないかと考えている。

結 語

IFN- γ は、Fas 発現の増強を介して口腔扁平上皮癌細胞株 NA の Fas 誘導アポトーシスに対する感受性を増強していることが示唆された。

引 用 文 献

- 1) Itoh, N., Yonehara, S., et al.: The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell* 66: 233-243 1991.
- 2) Yonehara, S., Ishii, A., et al.: 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.

- 3) Trauth, B.C., Klas, C., et al.: Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. *Science* 245: 301-305 1989.
- 4) 李 慶権, 米原 伸: Fas の機能とシグナル伝達機構. 秋山 徹, 宮園浩平編; シグナル伝達研究 2003. 実験医学 21: 72-76 2003.
- 5) 米原 伸: Fas を介するシグナル伝達. 西田栄介編; シグナル伝達ネットワーク. 東京化学同人, 東京, 2000, 53-60 頁.
- 6) Leithaser, F., Dhein, J., et al.: Constitutive and induced expression of APO-1, a new member of the new growth factor/tumor necrosis factor receptor superfamily, in normal and neoplastic cells. *Lab Invest* 69: 415-429 1993.
- 7) 渡辺好彦: IFN. 笹倉新平編; サイトカイン. 第二版, 日本医学館, 東京, 1997, 236-246 頁.
- 8) Stark, G.R., Kerr, Z.H., et al.: How cells respond to interferon. *Ann Rev Biochem* 67: 227-264 1998.
- 9) Liu, K. and Abrams, S.L.: Coordinate regulation of IFN consensus sequence-binding protein and caspase-1 in the sensitization of human colon carcinoma cells to Fas-mediated apoptosis by IFN- γ . *J Immunol* 170: 6329-6337 2003.
- 10) Tillman, D.M., Harwood, F.G., et al.: Expression of genes that regulate Fas signaling and Fas-mediated apoptosis in colon carcinoma cells. *Cell Death Differ* 5: 450-457 1998.
- 11) Shin, E-C., Shin, W-C., et al.: Effect of interferon- γ on the susceptibility to Fas (CD95/APO-1)-mediated cell death in human hepatoma cells. *Cancer Immunol Immunother* 50: 23-30 2001.
- 12) Yano, H., Fukuda, K., et al.: Expression of Fas and anti-Fas-mediated apoptosis in human hepatocellular cell lines. *J Hepatol* 25: 454-464 1996.
- 13) Jedema, I., Barge RMY., et al.: High susceptibility of human leukemic cells to Fas-induced apoptosis is restricted to G1 phase of the cell cycle and can be increased by interferon treatment. *Leukemia* 17: 576-584 2003.
- 14) Matsue, H., Kobayashi, H., et al.: Keratinocytes constitutively express the Fas that mediates apoptosis in IFN- γ -treated cultured keratinocytes. *Arch Dermatol Res* 287: 315-320 1995.
- 15) Iwase, M., Watanabe, H., et al.: Enhanced susceptibility of oral squamous cell carcinoma cell lines to Fas-mediated apoptosis by cisplatin and 5-fluorouracil. *Int J Cancer* 106: 619-625 2003.
- 16) Takizawa, K., Kamijo, R., et al.: Synergistic induction of ICAM-1 expression by cisplatin and 5-fluorouracil in a cancer cell line via a NF- κ B independent pathway. *Brit J Cancer* 80: 954-963 1999.
- 17) Hori, M., Kamijo, R., et al.: Downregulation of c-myc expression by tumor necrosis factor- α in combination with transforming factor- β or interferon- γ with concomitant inhibition of proliferation in human cell lines. *J Interf Res* 14: 49-55 1994.
- 18) Ohashi, M., Iwase, M., et al.: Changes in susceptibility

- ty to Fas-mediate apoptosis during differentiation of HL-60 cells. *J Leukoc Biol* 67: 374-380 2000.
- 19) Lee, J-K., Sayers, T.J., et al.: IFN- γ -dependent delay of in vitro tumor progression by Fas overexpression on murine renal cancer cells. *J Immunol* 164: 231-239 2000.
 - 20) Xu, X., Fu, X-Y., et al.: IFN- γ induces cell growth inhibition by Fas-mediated apoptosis: Requirement of STAT1 for upregulation of Fas and FasL expression. *Cancer Res* 58: 2832-2837 1998.
 - 21) Ahn, E-Y., Pan, G., et al.: IFN- γ upregulates apoptosis-related molecules and enhances Fas-mediated apoptosis in human cholangiocarcinoma. *Int J Cancer* 100: 445-451 2002.
 - 22) Nonomiya, N., Miki, T., et al.: Fas/APO-1-mediated apoptosis of human renal cell carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun* 229: 945-951 1996.
 - 23) Owen-Schaub, L.B., Radinsky, R., et al.: Anti-Fas on nonhematopoietic tumors: level of Fas/APO-1 and bcl-2 are not predictive of biological responses. *Cancer Res* 54: 1580-1586 1994.
 - 24) Koshiji, M., Adachi, Y., et al.: Apoptosis of colorectal adenocarcinoma (COLO 201) by tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) and/or interferon-gamma (IFN- γ), resulting from down-modulation of Bcl-2 expression. *Clin Exp Immunol* 111: 211-218 1998.
 - 25) Spanaus, K.S., Schlapbach, R., et al.: TNF-alpha and IFN-gamma render microglia sensitive to Fas ligand-induced apoptosis by induction of Fas expression and down-regulation of Bcl-2 and Bcl-xL. *Eur J Immunol* 28: 4398-4408 1998.
 - 26) Ossina, N.K., Cannas, A., et al.: Interferon-gamma modulates a p53-independent apoptotic pathway and apoptosis-related gene expression. *J Biol Chem* 272: 16351-16357 1997.
 - 27) Tamura, T., Ueda, S., et al.: Interferon- γ induces *Ice* gene expression and enhances cellular susceptibility to apoptosis in the U937 leukemia cell line. *Biophys Res Commun* 229: 21-26 1996.
 - 28) Tomita, Y., Bilm, V., et al.: Role of IRF-1 and caspase-7 in IFN- γ enhancement of Fas-mediated apoptosis in ACHN renal cell carcinoma cells. *Int J Cancer* 104: 400-408 2003.
 - 29) Sato, T., Irie, S., et al.: FAP-1: a protein tyrosine phosphatase that associates with Fas. *Science* 268: 411-415 1995.
 - 30) Irmeler, M., Thome, M., et al.: Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* 388: 190-195 1997.
 - 31) Cheng, J., Zhou, T., et al.: Protection from Fas-mediated apoptosis by a soluble form of the Fas molecule. *Science* 263: 1759-1762 1994.
 - 32) Pitt, R.M., Marsters, S.A., et al.: Genomic amplification of a decoy receptor for Fas ligand in lung and colon cancer. *Nature* 396: 699-703 1998.