

## 抗癌剤による細胞増殖抑制効果, 細胞周期に及ぼす影響と HSP27 発現に関する研究

田中 泰雅

[目的] 抗癌化学療法時における効果機序の解明のために G2/M block を起こす各種抗癌剤について細胞増殖抑制効果および細胞周期に及ぼす影響と HSP27 発現との関連について検討した。[方法] 卵巣癌由来の BG-1 及び子宮癌由来の HeLa 細胞に 5 種類の抗癌剤 etoposide (topoisomerase II inhibitor), colcemid および vincristine (tubulin polymerization inhibitor), paclitaxel (tubulin depolymerization inhibitor), ET-18-OCH<sub>3</sub> (membrane-associated anticancer) を接触させ細胞増殖抑制効果のみた。細胞周期は Propidium Iodide (PI) による蛍光染色後, flow cytometer (FCM) により得られた DNA ヒストグラムの各周期の割合を Mod Fit により解析した。HSP27 発現量は間接蛍光抗体法にて染色し, FCM で得られた Fluorescein isothiocyanate (FITC) ヒストグラムの median channel number を求め, 抗癌剤接触群と無処理群との相対値で表した。[結果] 二つの細胞とも抗癌剤の用量依存性に細胞増殖抑制効果, G2/M phase の増加が認められた。そのうち etoposide, colcemid, vincristine ではいずれの細胞においても HSP27 発現が増加しており, G2/M phase との間にも相関が認められた。しかし paclitaxel ではいずれの細胞においても HSP27 発現は全く増加しなかった。また ET-18-OCH<sub>3</sub> によって BG-1 細胞では, HSP27 発現が認められたが, HeLa 細胞では HSP27 は増加しなかった。[結論] Etoposide, Colcemid, Vincristine は HSP27 発現を促進し, Paclitaxel は HSP27 発現を抑制する。ET-18-OCH<sub>3</sub> による HSP27 の誘導は細胞の種類によって異なっていた。 (平成12年9月14日受理)

### Association Between Overexpression of Heat Shock Protein (HSP27) and Anticancer Agents with Different Cytotoxic Mechanisms in BG-1 Ovarian Cancer Cells and HeLa Cervical Cancer Cells

Yasumasa TANAKA

Purpose: To determine the factors associated with overexpression of HSP27 in two gynecologic cell lines when treated with anticancer drugs which induce the G2/M block with different cytotoxic mechanisms.

Method: BG-1 ovarian cancer cells and HeLa cervical cancer cells were treated with a topoisomerase II inhibitor (etoposide), tubulin polymerization inhibitors (colcemid and vincristine), a tubulin depolymerization inhibitor (paclitaxel) or a membrane-associated anticancer drug (ET-18-OCH<sub>3</sub>). Growth arrest of the cells was evaluated by counting cell numbers. Propidium iodide staining and

flow cytometric analysis were applied for determination of cell cycle perturbation. HSP27 was stained by the indirect immunofluorescence technique and analyzed by a flow cytometer.

Results: Growth arrest and G2/M accumulation were dependent on the dose of each cytotoxic agent. There were positive correlations between HSP27 overexpression and G2/M accumulation when BG-1 cells were treated with etoposide, colcemid, vincristine, and ET-18-OCH<sub>3</sub> but not with paclitaxel. Similar results were seen with HeLa cells but ET-18-OCH<sub>3</sub> treatment did not induce overexpression of HSP27.

Conclusions: Overexpression of HSP27 was associated with etoposide, colcemid, and vincristine treatment. There was no correlation between paclitaxel treatment and HSP overexpression.

Expression of HSP27 by ET-18-OCH<sub>3</sub> was cell dependent. (Accepted on September 14, 2000)

Kawasaki Igakkaishi 26(4): 203-210, 2000

**Key Words** ① HSP27 ② Cell cycle ③ ET-18-OCH<sub>3</sub> ④ Paclitaxel  
⑤ Etoposide ⑥ Colcemid ⑦ Vincristine

## はじめに

HSP27は熱、抗癌剤などの刺激によって発現する27kDのストレス蛋白の一種である。HSP27を過剰発現させた細胞は抗癌剤に対して抵抗性を示し<sup>1)</sup>、HSP27発現を抑制した細胞では抗癌剤に対する抵抗性が減弱したと報告されている<sup>2)</sup>。またHSP27発現がアポトーシスを抑制し、癌細胞の排除を妨げるとの報告もある<sup>3)</sup>。臨床的には、乳癌のHSP27の発現と予後の相関をみた検討で、HSP27発現は予後不良因子であることが報告されている<sup>4)</sup>。しかし子宮内膜癌や卵巣癌では反対にHSP27の発現した症例は予後が良好であったと報告されており<sup>5),6)</sup>、その臨床的意義はまだ不明な部分が多いといえる。

HSP27を誘導させる因子としては熱<sup>7)</sup>、放射線<sup>8)</sup>、抗癌剤<sup>9)</sup>などが知られているが、抗癌剤についてはその作用機序との関連を検討した報告は少ない。我々はこれまでに異なった作用機序をもった2種類の抗癌剤(ET-18-OCH<sub>3</sub>, etoposide)をBG-1細胞に作用させた場合、異なったHSP27の発現様式を示すことを報告した<sup>10)</sup>。すなわち細胞膜作用型抗癌剤であるET-18-OCH<sub>3</sub><sup>11)</sup>をBG-1卵巣癌細胞<sup>12)</sup>に作用させると、細胞死が増加するとともに過剰発現した

HSP27の局在が細胞膜から核内に移動するが、etoposideでは細胞質内のHSP27の発現は増加するにもかかわらず局在の変化は認められなかった<sup>10)</sup>。ET-18-OCH<sub>3</sub>とetoposideはいずれもG2/M blockをおこす薬剤であるが、その作用機序は異なっている。このG2/M blockを引き起こすメカニズムの違いがHSP27発現様式の差に関与している可能性が考えられる。この点を明らかにするために、異なった作用機序によりG2/M blockを誘導する抗癌剤とHSP27発現との関連を2種類の婦人科癌細胞株を用いて検討した。

## 材料及び方法

### 細胞

卵巣癌(adenocarcinoma)由来のBG-1細胞と子宮癌由来のHeLa細胞を用いた。BG-1細胞は、10%仔牛血清に0.05% L-glutamine, 1% nonessential amino acids, 100 U/ml penicillin Gを加えたMcCoy's 5A mediumを、HeLa細胞は、10%仔牛血清に0.05% L-glutamine, 1% essential amino acids, 100 U/ml penicillin Gを加えたMEM mediumを75 cm<sup>2</sup>の培養フラスコに15 ml加えて培養した。両細胞は37℃, 5% CO<sub>2</sub> incubatorを使用し、5日目に継代を行った。



## 抗癌剤及び接触条件

実験に使用した抗癌剤は、細胞の脂質二重膜に作用する ET-18-OCH<sub>3</sub> (Dr. R. Nordström, Medmark Pharma GmbH, Munich, Germany より寄贈)、topoisomerase II の阻害剤である etoposide (Bristol-Myers-Squibb K.K., Japan)、tubulin の重合阻害剤である colcemid (Nakaraites, Japan) 及び vincristine (Shionogi, Japan)、tubulin の脱重合阻害剤である paclitaxel (Bristol-Myers-Squibb K.K., Japan) の 5 種類である。ET-18-OCH<sub>3</sub> は 99.9% ethanol を stock solution として加え、10 mg/ml に溶解し、-20℃ で保存した。ET-18-OCH<sub>3</sub>, etoposide, colcemid, vincristine, paclitaxel は PBS で直前に希釈して両細胞に接触させた。対数増殖期にある両細胞を培養第 5 日目 (Day 5) に confluent となるようにフラスコあたり  $1 \times 10^6$  個を植え付けて培養を開始した。それぞれの抗癌剤は day 3 より接触を開始し、規定時間接触後に培養液を廃棄し交換した。細胞は Day 5 に 0.1% trypsin で剥離した後、培養液も含めて回収した。抗癌剤の接触条件は表の通りである (Table 1)。

## 増殖抑制及び細胞周期の解析

抗癌剤による細胞増殖抑制は、抗癌剤処理群と無処理群の細胞数をコールターカウンターで測定し、無処理群との細胞数の割合から求めた。細胞周期の解析は 70% ethanol で 12 時間固定した後、PBS で 2 回洗浄し、RNase A (Sigma, Japan) 1 mg/ml を加え 37℃、30 分間反応させた後、100 µg/ml の propidium iodide (PI, Sigma, Japan) を用いて DNA を蛍光染色させ FCM で測定し、histogram を作成した。G2/M 期の割合は Mod Fit (Mod Fit LT version 1.01, Becton-Dickinson Immunocytometry Systems) を用いて DNA histogram から求めた。

## HSP27 定量法

HSP27 の定量は間接蛍光抗体法によって染

Table 1. Treatment dose and contact time.

Each agents were exposure on day 3 and each medium replaced after contact.

	Dose 1	Dose 2	Dose 3	Dose 4
ET-18-OCH <sub>3</sub> (µM) x 48 hour	2	4	8	12
Etoposide (µg/ml) x 4 hour	5	10	20	40
Colcemid (µg/ml) x 48 hour	0.001	0.01	0.1	1
Vincristine (µg/ml) x 24 hour	0.001	0.01	0.1	1
Paclitaxel (µg/ml) x 4 hour	0.01	0.1	1	10

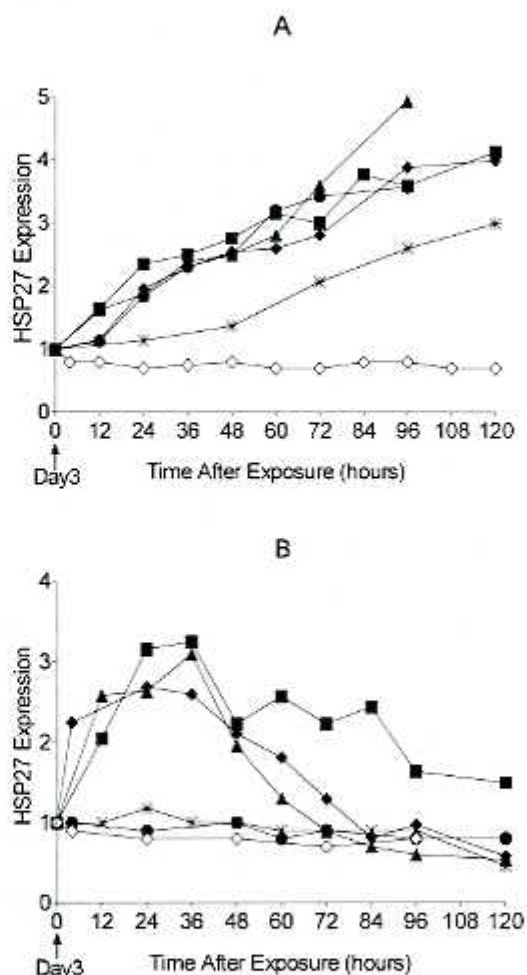


Fig. 1. Relative expression of HSP27 in BG-1 and HeLa cells with or without exposure to cytotoxic agents.

The following symbols indicate the time course of HSP27 expression in BG-1 (A) and HeLa cells (B) with or without exposure to cytotoxic agents: \*, Untreated; ■, 8 µg/ml of etoposide contact for 8 hours; ●, 8 µM of ET-18-OCH<sub>3</sub> contact for 48 hours; ▲, 1 µg/ml of colcemid contact for 48 hours; ◆, 1 µg/ml of vincristine contact for 24 hours; ◇, 0.1 µg/ml of paclitaxel contact for 4 hours.

色した薬剤処理群と無処理群の蛍光強度の比を計算して求めた。trypsinで剥離させた単細胞をPBSで2回洗浄し、70% ethanolで12時間固定。PBSで2回洗浄後、0.1% triton Xを加え10分間接触させた後、PBSで2回洗浄、1 µg/mlのanti-HSP27 immunoglobulin (Mouse Anti-Hsp27 Monoclonal Antibody, StressGen Biotechnologies Corp, Canada)を100 µl加え、60分間接触。PBSで2回洗浄し、2次抗体 (FITC-Conjugated Rabbit Anti-Mouse Immunoglobulins, F0261, DAKO, Japan)を20倍希釈して100 µl加え、遮光して60分間蛍光染色。PBSで2回洗浄し、FCMで無処理群と抗癌剤処理群のFITCのmedian channel numberを測定し、histogramを作成した。そしてそれぞれのhistogramのmedian channel numberを求め、無処理群を1とした相対値を計算してHSP27の発現量とした。

## 結 果

### HSP27発現の経時的な推移

BG-1細胞とHeLa細胞のHSP27発現の経時的な推移をFigure 1に示す。このグラフでは抗癌剤接触を開始した培養第3日目 (Day 3)を0時間として表した。BG-1細胞では無処理群がconfluentとなったday 5からHSP27の発現が急速に増加していた。ET-18-OCH<sub>3</sub>、etoposide、colcemid、vincristineでは接触後からHSP27の発現が直線的に増加していたが、paclitaxelでは120時間後まで追跡したにもかかわらずHSP27発現の増加は認めなかった。

一方、HeLa細胞のHSP27発現は、etoposide、vincristine、colcemidでは接触後24~48時間前後をpeakとした増加を示した後減少していたのに対し、無処理群やpaclitaxel、ET-18-OCH<sub>3</sub>では120時間後まで追跡したが、HSP27発現は増加しなかった。これらの結果から両細胞ともHSP27発現は抗癌剤接触48時間後に測定することとした。

細胞増殖抑制効果、細胞周期とHSP27発現の

### 用量関係

抗癌剤処理による細胞増殖抑制効果、G2/M phaseの割合、HSP27発現量について、それぞれの用量反応関係をFigure 2に示す。各抗癌剤濃度の上昇に伴い、細胞の増殖は一律に抑制された。抗癌剤濃度の上昇によるBG-1細胞のG2/M phaseの割合はET-18-OCH<sub>3</sub>、etoposideでは大きかったのに対し、paclitaxel、vincristine、colcemidでは中等度の集積にとどまった。HeLa細胞はetoposideのみが大きな集積を示したのに対し、ET-18-OCH<sub>3</sub>はpaclitaxel、vincristine、colcemidと同様に中等度の集積にとどまっていた。

HSP27発現は抗癌剤濃度の上昇に伴い、BG-1細胞ではET-18-OCH<sub>3</sub>、etoposide、colcemid、vincristineで増加し、paclitaxelでは増加しなかった。一方、HeLa細胞ではetoposide、colcemid、vincristineではHSP27の増加がみられていたが、ET-18-OCH<sub>3</sub>、paclitaxelでは増加が認められなかった。またHSP27の発現はetoposide、colcemidで強く、vincristineではやや弱い傾向がみられた。

### G2/M phaseの割合とHSP27発現の相関

G2/M phaseとHSP27発現の相関をBG-1細胞、HeLa細胞について検討した (Fig. 3)。BG-1細胞ではG2/M phaseの増加とHSP27発現はpaclitaxel以外では正の相関を示していた。HeLa細胞ではG2/M phaseの増加とHSP27発現はPaclitaxelとET-18-OCH<sub>3</sub>以外では正の相関を示していた。しかし、BG-1細胞ではG2/M Phaseの割合が25%を越えるとHSP27の発現がplateauに達する傾向が見られたのに対し、HeLa細胞では直線的な相関がみられており、HSP27とG2/M blockとの関係には細胞間で差がみられた。

## 考 案

本研究では異なった作用機序によりG2/M blockを起こす抗癌剤を、婦人科癌細胞株に作



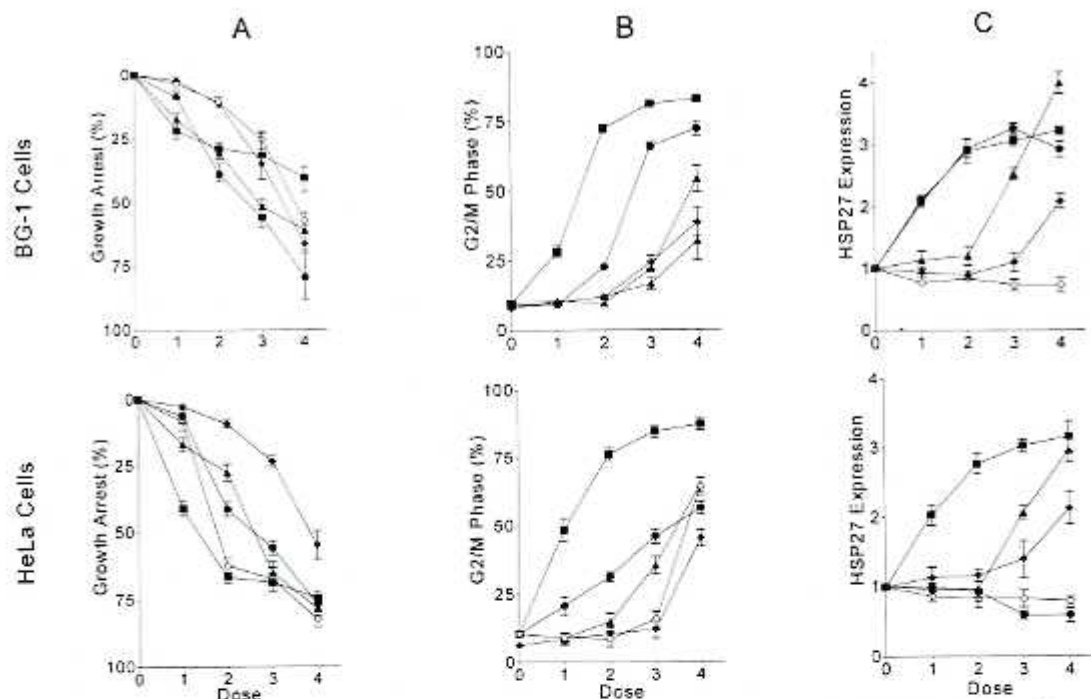


Fig. 2. Effect of cytotoxic agents on growth arrest and G2/M accumulation and HSP27 expression in BG-1 and HeLa cells. The effect of cytotoxic agents on growth arrest (A) and G2/M accumulation (B) and HSP27 expression (C) in BG-1 and HeLa cells was analyzed. The mean values ( $\pm$  SEM) of five experiments indicated by the symbols are given:  $\circ$ , untreated;  $\blacksquare$ , etoposide;  $\bullet$ , ET-18-OCH<sub>3</sub>;  $\blacktriangle$ , colcemid;  $\blacklozenge$ , vincristine;  $\diamond$ , paclitaxel.

用させた場合の HSP27 の発現の状態について検討した。その結果、etoposide, vincristine, colcemid では HSP27 の発現が誘導されたが、paclitaxel では HSP27 の発現は抑制され、ET-18-OCH<sub>3</sub> は細胞株により HSP27 の発現が異なることがわかった。

今回得られた結果で最も興味深いのは、tubulin の重合を阻害する colcemid<sup>13)</sup> 及び vincristine<sup>14)</sup> では HSP27 が強く発現したのに対し、tubulin の脱重合を阻害する paclitaxel<sup>15)</sup> では HSP27 の発現が抑制されたことである。過去の検討では、Richard らが vincristine を HSP27 の発現を抑制する抗癌剤として報告している<sup>16)</sup>。しかし今回の検討では少なくとも 0.1  $\mu$ g/ml 以上の接触濃度で発現がみられており、彼らは 0.01  $\mu$ g/ml の接触濃度で発現を検討したため vincristine の濃度が低く、発現が確認できなかったとも考えられる。一方、colcemid と paclitaxel による HSP27 発現作用に関する研究は過去にみられておらず、

本研究が最初の知見である。今回 HSP27 の発現が colcemid と vincristine の 2 種類の tubulin 重合阻害剤で誘導され、脱重合阻害剤 (paclitaxel) では抑制されたことから、HSP27 の発現/抑制機序が tubulin 分子の G2 期から M 期における会合と分離の際に起こっている生化学的変化と深く関わっている可能性が示唆された。この点に関してはさらに検討が必要と考えられるが、どのような機序にせよ paclitaxel が 2 種類の婦人科癌細胞株において HSP27 の発現を抑制した点は大きな意義がある。臨床的にも GOG111 や OV-10 などの大規模臨床試験において、paclitaxel を cisplatin と併用することによって、それまで進行卵巣癌に対する標準療法とされていた cyclophosphamide と cisplatin の併用療法よりも有意に生存率が良好となったことが示された<sup>17), 18)</sup>。この予後改善の理由は全く不明であるが、paclitaxel の HSP27 発現抑制効果によって cisplatin の感受性が高まったことにより奏効

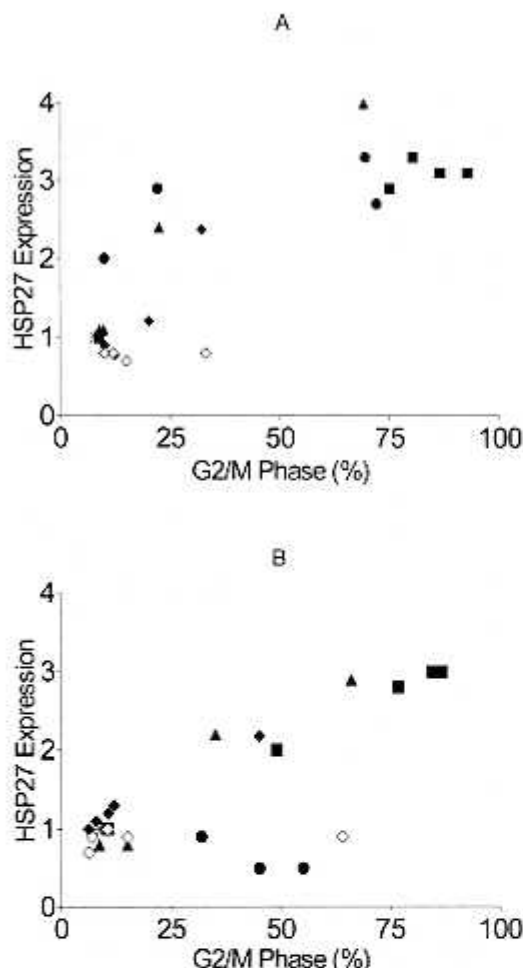


Fig. 3. Correlation between G2/M accumulation and HSP27 expression of BG-1 and HeLa cells.

The correlation between G2/M accumulation and HSP27 expression of BG-1 (A) and HeLa cells (B) was analyzed. \*, untreated; ■, etoposide; ●, ET-18-OCH<sub>3</sub>; ▲, colcemid; ◆, vincristine; ◇, paclitaxel.

率が改善し、ひいては長期予後の向上に貢献した可能性も考えられ、この点に関しては目下研究を進めている。

tubulin は G2/M 期における微小管の構成以外に、物理的な外力から細胞を保護する cytoskeleton の役割を持つ fiber の 1 種でもある<sup>19)</sup>。この cytoskeleton の役割を担うものには、actin filament、intermediate filament などがあり、これらは形態保持や物質輸送の働きを担っている<sup>19)</sup>。HSP27 との関連については、HSP27 の増加が actin filament の増加を誘導するなど、

HSP27 が actin filament の働きを制御していることが知られている<sup>20)</sup>。また細胞密度の増加とともに HSP27 発現が増加し、同時に HSP27 が細胞質内から核周囲へ移動していることが観察されているが<sup>21), 22)</sup>、この増加した HSP27 は核の物理的保護を担っているのではないかと考えられている<sup>22)</sup>。このようなことから cytoskeleton としての tubulin の役割と HSP27 の消退が関わっている可能性も示唆される。この関連についての研究は現在までに報告されておらず、この点を明らかにすることが、未だに不明な点が多い HSP27 発現/抑制機序の解明の鍵となる可能性がある。

さらに興味深いのは、ET-18-OCH<sub>3</sub> を作用させた場合、HSP27 の発現は BG-1 細胞では誘導されたが HeLa 細胞では抑制された点である。ET-18-OCH<sub>3</sub> は細胞膜に作用し MAP kinase シグナル伝達経路を阻害する薬剤<sup>11)</sup>であり、MAP kinase シグナル伝達経路は HSP27 の発現に関与する経路として知られている<sup>20)</sup>。これらの事実は MAP kinase シグナル伝達経路に関わる細胞膜 receptor の有無が HSP27 の発現を決定している可能性を示唆している。一方、estrogen は MAP kinase を活性化することが知られており<sup>23)</sup>。乳癌細胞では estrogen receptor 陽性細胞のほうが陰性細胞よりも HSP27 発現が高いことが基礎的にも臨床的にも示されている<sup>24), 25)</sup>。今回検討した BG-1 細胞は estrogen receptor や progesterone receptor を有しているが<sup>12)</sup>、HeLa 細胞はこれらの receptor を持っていない<sup>26)</sup>。ET-18-OCH<sub>3</sub> に対する HSP27 の発現の両細胞間の差は ET-18-OCH<sub>3</sub> が estrogen receptor に何らかの作用をしているために起こった可能性や、あるいは今までには知られていない ET-18-OCH<sub>3</sub> に特異的な receptor が存在している可能性が示唆される。

以上、本研究によって、癌化学療法時における HSP27 発現の多様性が明らかになった。薬剤耐性との関連などその意義については今後さらに研究を進めていく予定である。



## 謝 辞

稿を終えるにあたり、ご指導と御校閲いただいた川崎医科大学産婦人科学教室 河野 一郎教授に深謝いたします。また本研究で直接御指導頂きました藤原恵一

助教授に感謝いたします。さらに、本研究に御協力頂いた白藤博子女史、ならびに培養センターの皆様にも厚く御礼申し上げます。本研究は平成11年度川崎医科大学プロジェクト研究費、並びに平成10年、11年度大学院重点特別経費によった。

## 文 献

- 1) Huot J, Roy G, Lambert H, Chretien P, Landry J : Increased survival after treatments with anticancer agents of Chinese hamster cells expressing the human Mr 27,000 heat shock protein. *Cancer Res* 51 : 5245 - 5252, 1991
- 2) Horman S, Fokan D, Mosselmans R, Mairesse N, Galand P : Anti-sense inhibition of small-heat-shock-protein (HSP 27) expression in MCF-7 mammary-carcinoma cells induces their spontaneous acquisition of a secretory phenotype. *Int J Cancer* 82 : 574 - 582, 1999
- 3) Garrido C, Fromentin A, Bonnotte B, Favre N, Moutet M, Arrigo AP, Mehlen P, Solary E : Heat shock protein 27 enhances the tumorigenicity of immunogenic rat colon carcinoma cell clones. *Cancer Res* 58 : 5495 - 5499, 1998
- 4) Vargas Roig LM, Gago FE, Tello O, Aznar JC, Ciocca DR : Heat shock protein expression and drug resistance in breast cancer patients treated with induction chemotherapy. *Int J Cancer* 79 : 468 - 475, 1998
- 5) Geisler JP, Geisler HE, Tammela J, Miller GA, Wiemann MC, Zhou Z : A study of heat shock protein 27 in endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol* 72 : 347 - 350, 1999
- 6) Geisler JP, Geisler HE, Tammela J, Wiemann MC, Zhou Z, Miller GA, Crabtree W : Heat shock protein 27 : an independent prognostic indicator of survival in patients with epithelial ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol* 69 : 14 - 16, 1998
- 7) Wissing D, Jaatela M : HSP27 and HSP70 increase the survival of WEHI-S cells exposed to hyperthermia. *Int J Hyperthermia* 12 : 125 - 138, 1996
- 8) Santin AD, Hermonat PL, Ravaggi A, Chiriva Internati M, Hiserodt JC, Batchu RB, Pecorelli S, Parham GP : The effects of irradiation on the expression of a tumour rejection antigen (heat shock protein gp96) in human cervical cancer. *Int J Radiat Biol* 73 : 699 - 704, 1998
- 9) Fuqua SA, Oesterreich S, Hilsenbeck SG, Von Hoff DD, Eckardt J, Osborne CK : Heat shock proteins and drug resistance. *Breast Cancer Res Treat* 32 : 67 - 71, 1994
- 10) Fujiwara K, Shirafuji H, Fushitani K, Fujimoto K, Kohno I, Modest EJ : Change in the localization of heat shock protein 27 (HSP27) in BG-1 human ovarian cancer cells following treatment by the ether lipid ET-18-OCH<sub>3</sub>. *Anticancer Res* 19 : 181 - 187, 1999
- 11) Ahmad I, Filep JJ, Franklin JC, Janoff AS, Masters GR, Pattassery J, Peters A, Schupsky JJ, Zha Y, Mayhew E : Enhanced therapeutic effects of liposome-associated 1-O-octadecyl-2-O-methyl-sn-glycero-3-phosphocholine. *Cancer Res* 57 : 1915 - 1921, 1997
- 12) Geisinger KR, Kute TE, Pettenati MJ, Welander CE, Dennard Y, Collins LA, Berens ME : Characterization of a human ovarian carcinoma cell line with estrogen and progesterone receptors. *Cancer* 63 : 280 - 288, 1989
- 13) Sherwood SW, Sheridan JP, Schinke RT : Induction of apoptosis by the anti-tubulin drug colcemid : relationship of mitotic checkpoint control to the induction of apoptosis in HeLa S3 cells. *Exp Cell Res* 215 : 373 - 379, 1994
- 14) Mujagic H, Chen SS, Geist R, Occhipinti SJ, Conger BM, Smith CA, Schuette WH, Shackney SE : Effects of vincristine on cell survival, cell cycle progression, and mitotic accumulation in asynchronously growing Sarcoma 180 cells. *Cancer Res* 43 : 3591 - 3597, 1983
- 15) Gagandeep S, Novikoff PM, Ott M, Gupta S : Paclitaxel shows cytotoxic activity in human hepatocellular carcinoma

- cell lines. *Cancer Lett* 136 : 109-118, 1999
- 16) Whelan RD, Hill BT : Differential expression of steroid receptors, hsp27, and pS2 in a series of drug resistant human breast tumor cell lines derived following exposure to antitumor drugs or to fractionated X-irradiation. *Breast Cancer Res Treat* 26 : 23-39, 1993
  - 17) McGuire WP, Hoskins WJ, Brady MF, Kucera PR, Partridge EE, Look KY, Clarke Pearson DL, Davidson M : Cyclophosphamide and cisplatin compared with paclitaxel and cisplatin in patients with stage III and stage IV ovarian cancer [see comments]. *N Engl J Med* 334 : 1-6, 1996
  - 18) Piccart MJ, Bertelsen K, James K, Cassidy J, Mangioni C, Simonsen E, Stuart G, Kaye S, Vergote I, Blom R, Grimshaw R, Atkinson RJ, Swenerton KD, Trope C, Nardi M, Kaern J, Tumolo S, Timmers P, Roy JA, Lhoas F, Lindvall B, Bacon M, Birt A, Andersen JE, Zee B, Paul J, Baron B, Pecorelli S : Randomized intergroup trial of cisplatin-paclitaxel versus cisplatin-cyclophosphamide in women with advanced epithelial ovarian cancer : three-year results [see comments]. *J Natl Cancer Inst* 92 : 699-708, 2000
  - 19) 遠山 益 : 細胞骨格, 細胞 : 787-815, 1999
  - 20) Landry J, Huet J : Modulation of actin dynamics during stress and physiological stimulation by a signaling pathway involving p38 MAP kinase and heat-shock protein 27. *Biochem Cell Biol* 73 : 703-707, 1995
  - 21) Arrigo AP, Suhan JP, Welch WJ : Dynamic changes in the structure and intracellular locale of the mammalian low-molecular-weight heat shock protein. *Mol Cell Biol* 8 : 5059-5071, 1988
  - 22) Garrido C, Ottavi P, Fromentin A, Hammann A, Arrigo AP, Chauffert B, Mehlen P : HSP27 as a mediator of confluence-dependent resistance to cell death induced by anticancer drugs. *Cancer Res* 57 : 2661-2667, 1997
  - 23) Zhang CC, Shapiro DJ : Activation of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway by estrogen or by 4-hydroxytamoxifen is coupled to estrogen receptor-induced apoptosis. *J Biol Chem* 275 : 479-486, 2000
  - 24) Dunn DK, Whelan RD, Hill B, King RJ : Relationship of HSP27 and oestrogen receptor in hormone sensitive and insensitive cell lines. *J Steroid Biochem Mol Biol* 46 : 469-479, 1993
  - 25) Porter W, Wang F, Wang W, Duan R, Safe S : Role of estrogen receptor/Sp1 complexes in estrogen-induced heat shock protein 27 gene expression. *Mol Endocrinol* 10 : 1371-1378, 1996
  - 26) Castles CG, Oesterreich S, Hansen R, Fuqua SA : Auto-regulation of the estrogen receptor promoter. *J Steroid Biochem Mol Biol* 62 : 155-163, 1997