

DEPARTMENT OF VIRAL ONCOLOGY
LABORATORY OF TUMOR BIOGENESIS

Apoptosis, or programmed cell death, plays an important role in many biological processes, including embryogenesis, development of immune system, maintenance of tissue homeostasis, and elimination of virus-infected and tumor cells. We found cell surface Fas antigen (Fas) which can directly mediate apoptosis-inducing signals into cells by stimulation with agonistic anti-Fas mAbs or Fas ligand. Our main research project is to understand the intracellular signal transduction mechanism of cell death including apoptosis and caspase-independent novel cell death, and the biological significance/physiological role of cell death and cell death-regulating molecules. Investigations of molecular mechanisms and physiological roles of cell death are important for a better understanding of mammalian immune system, embryogenesis and tumorigenesis.

1) TGF- β regulates cell survival or death by activating Slug and Bim: M. OHGUSHI, T. YMAMOTO, P. BOUILLET, A. STRASSER, E. NISHIDA, and S. YONEHARA

Transforming Growth Factor- β (TGF- β) can activate pro- or anti-apoptotic signals depending on the target cells. The molecular mechanisms determining the fate of TGF- β -stimulated cells, life or death, have not been defined. Here, we found that pre-treatment with IFN- γ or JNK-specific inhibitors sensitized several B cell lines or splenic B cells to TGF- β -induced apoptosis. Slug, a homologue of *C. elegans* anti-apoptotic Ces-1, was found to be induced by TGF- β and this induction was diminished by treatment with either IFN- γ or JNK-specific inhibitors. Analyses of Slug-knockdown cells indicated that Slug is required for survival of TGF- β -stimulated cells. Furthermore, analyses of Bim-deficient B cells revealed that this BH3-only protein is essential for TGF- β -induced apoptosis in the absence of Slug. Collectively, these results demonstrate that TGF- β regulates cellular survival or death by activating and/or regulating opposing signaling pathways.

2) Novel cell death by CNBP-mediated downregulation of eEF1A1 expression in tetraploids with chromosomal aberrations: Y. KOBAYASHI, and S. YONEHARA

When two duplicated sister chromatids are not properly compacted in mitosis, chromosomes are mis-segregated, inducing genetically unstable tetraploidy known to facilitate aneuploid malignancies. Therefore, tetraploid cells should be eliminated in vivo. Here we show that tetraploid cells induced by impaired mitotic chromosomal condensation are eliminated by a novel type of cell death different from caspase-dependent apoptosis. The cell death was executed by the downregulation of eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1 (eEF1A1/EF-1 α), a typical housekeeping gene products, because expression of exogenous eEF1A1 inhibited the cell death. The

downregulation of eEF1A1 was induced by cellular nucleic acid binding protein (CNBP)-mediated translational inhibition, and the cell death was also inhibited by expression of short hairpin RNA specific for CNBP. Furthermore, human mammary gland adenocarcinoma-derived MCF-7 cells were shown to impair the cell death machinery in tetraploids by abnormally over-expressing eEF1A2, a homologue of eEF1A1, which might have accelerated tumorigenesis.

3) Rapid up-regulation of c-FLIP expression by BCR signaling through the PI3K/Akt pathway inhibits simultaneously induced Fas-mediated apoptosis in murine B lymphocytes: H. MORIYAMA, and S. YONEHARA

Cross-linking of BCR rapidly induces protection of B cells from Fas-mediated apoptosis, which has been assumed one of the important survival mechanisms of B cells during antigen stimulation. In the mouse B cell line A20, which is sensitive to Fas-mediated apoptosis, stimulation of BCR inhibited apoptosis induced via Fas upstream of caspase-8 activation with an associated rapid increase in the expression of both short and long forms of cellular caspase-8/FLICE-inhibitory protein (c-FLIP). The c-FLIP competitively inhibited the recruitment of caspase-8 to the death-inducing signaling complex (DISC), which took as long as 3 h to form after the stimulation of Fas in A20 cells. Knockdown of c-FLIP by a short hairpin RNA-expressing method rendered BCR-stimulated A20 cells sensitive to Fas-mediated apoptosis. The BCR-induced rapid expression of c-FLIP was not affected by inactivation of NF- κ B, but was inhibited by either treatment with a PI3K inhibitor, LY294002, or expression of a dominant negative PI3K p85 subunit, both of which suppressed phosphorylation of Akt and sensitized BCR-stimulated A20 cells to Fas-mediated apoptosis. Overexpression of constitutively active Akt was shown not only to up-regulate c-FLIP expression but also to render A20 cells resistant to Fas-mediated apoptosis. Moreover, treatment with LY294002 also suppressed BCR-induced up-regulation of c-FLIP expression in spleen B cells. Taken together, BCR-stimulation was shown to rapidly trigger a survival signal against simultaneously or ongoingly stimulated Fas-mediated apoptosis by promoting a PI3K/Akt signaling pathway-mediated up-regulation of c-FLIP expression.

4) Activation of Brachyury transcription by Wnt signals in mesoderm induction of mouse ES cells: A. MURAKAMI

Brachyury, a sequence specific transcription factor, has been believed to play an important role in mesoderm formation during gastrulation of mouse embryos. Wnt signaling pathways have been also shown to be essential for the mesoderm induction. In R1 ES cells differentiated through the embryoid body formation, Brachyury transcription was up-regulated immediately after the induction of differentiation and ceased by day 6 with a peak at day 4. A similar expression pattern

was observed for Wnt3 and Wnt8a among the Wnt family. Introduction of a Wnt3 or Wnt8a signal into R1 cells resulted in up-regulation of the Brachyury expression. On the other hand, repression of Wnt3 or Wnt8a expression by RNA interference led to suppression of the Brachyury expression. These results suggest that both signaling pathways by Wnt3 and Wnt8a are likely to play an essential role in the activation of Brachyury transcription. Interestingly, the repression of Wnt3 and Wnt8a also suppressed the Wnt8a and Wnt3 expression, respectively. Thus, the Wnt3 transcription depends on a Wnt8a signal and vice versa. It is likely that the coordinated Wnt signals by Wnt3 and Wnt8a activate Brachyury expression in the mesoderm induction of ES cells.

5) The initiator caspase, caspase-10 β , and the BH-3-only molecule, Bid, demonstrate evolutionary conservation in *Xenopus* of their pro-apoptotic activities in the extrinsic and intrinsic pathways: K. KOMINAMI, C. TAKAGI, T. KURATA, A. KITAYAMA, M. NOZAKI, T. SAWASAKI, K. KUIDA, Y. ENDO, N. MANAB, N. UENO, and K. SAKAMAKI

Two major apoptotic signaling pathways have been defined in mammals, the extrinsic pathway, initiated by ligation of death receptors, and the intrinsic pathway, triggered by cytochrome c release from mitochondria. Here, we identified and characterized the *Xenopus* homologs of caspase-10 (xCaspase-10 β), a novel initiator caspase, and Bid (xBid), a BH3-only molecule of the Bcl-2 family involved in both the extrinsic and intrinsic pathways. Exogenous expression of these molecules induced apoptosis of mammalian cells. By biochemical and cytological analyses, we clarified that xCaspase-10 β and xBid exhibit structural and functional similarities to their mammalian orthologues. We also detected xCaspase-10 β and xBid transcripts during embryogenesis by whole-mount in situ hybridization and RT-PCR analysis. Microinjection of mRNA encoding a protease-defect xCaspase-10 β mutant into embryos resulted in irregular development. Enforced expression of active xBid induced cell death in developing embryos. Using transgenic frogs established to allow monitoring of caspase activation in vivo, we confirmed that this form of cell death is caspase-dependent apoptosis. Thus, we demonstrated that the machinery governing the extrinsic and intrinsic apoptotic pathways are already established in *Xenopus* embryos. Additionally, we propose that the functions of the initiator caspase and BH3-only molecule are evolutionarily conserved in vertebrates, functioning during embryonic development.

LIST OF PUBLICATIONS

Department of Viral Oncology

Laboratory of Tumor Biogenesis

- Okamoto K, Fujisawa J, Reth M, and Yonehara S. Human T-cell leukemia virus type I oncoprotein Tax inhibits Fas-mediated apoptosis by inducing cellular FLIP through activation of NF- κ B. *Genes Cells*, 11, 177-191, 2006.
- Yamamoto T., Ebisuya M., Ashida F., Okamoto K., Yonehara, S., and Nishida E. Continuous ERK activation downregulates antiproliferative genes throughout G1 phase to allow cell-cycle progression. *Curr Biol*, 16, 1171-1182, 2006.
- Takahashi K, Kawai T, Kumar H, Sato S, Yonehara S, and Akira S. Cutting edge: Roles of caspase-8 and caspase-10 in innate immune responses to double-stranded RNA. *J Immunol*, 176, 4520-4524, 2006.
- Hase K, Murakami T, Takatsu H, Shimaoka T, Iimura M, Hamura K, Kawano K, Ohshima S, Chihara R, Itoh K, Yonehara S, and Ohno H. The membrane-bound chemokine CXCL16 expressed on follicle-associated epithelium and M cells mediates lympho-epithelial interaction in GALT. *J Immunol*, 176, 43-51, 2006.
- Kominami K, Takagi C, Kurata T, Kitayama A, Nozaki M, Sawasaki T, Kuida K, Endo Y, Manabe N, Ueno N, and Sakamaki K. The initiator caspase, caspase-10 β , and the BH-3-only molecule, Bid, demonstrate evolutionary conservation in *Xenopus* of their pro-apoptotic activities in the extrinsic and intrinsic pathways. *Genes Cells*, 11, 701-17, 2006.
- 米原 伸. 「特集I／アポトーシス研究の最近の進歩:序」、炎症と免疫 Vol. 14, No. 3, p1-2, 先端医学社、2006.
- 米原 伸. 「デスレセプター研究の新しい流れ」、「特集I／アポトーシス研究の最近の進歩」、炎症と免疫 Vol. 14, No. 3, p3-11, 先端医学社、2006.
- 米原 伸. 「デスレセプターによる細胞生死決定」、「細胞死・アポトーシス集中マスター」、羊土社、2006.

Masatoshi Ohgushi, Takuya Yamamoto, Andreas Strasser, Eisuke Nishida, and Shin Yonehara.

“TGF- β -induced activation of Smad and JNK regulates cellular responses between death and survival” The 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology, Kyoto, June 21, 2006.

Shunsuke Kuroki, Keisuke Kuida and Shin Yonehara. “Double nokcoute mice of caspase-8 and -9 exhibit normal elimination of cells without caspase activation during embryogenesis” The 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology, Kyoto, June 21, 2006.

Maria Kiriya, Yohei Kobayashi, and Shin Yonehara. “Inducible downregulation of FLASH/CASP8AP2 provokes complete cell cycle arrest in S-phase and enhances Fas-mediated apoptosis” The 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology, Kyoto, June 23, 2006.

Masatoshi Ohgushi, and Shin Yonehara. “TGF- β -induced expression of Slug antagonizes simultaneous activation of Bim-mediated apoptosis-inducing program.” 第36回日本免疫学会総会・学術集会、大阪市、12月11～13日、2006.

米原 伸：「細胞死シグナルと増殖・分化シグナルとの新しいクロストーク機構」第2回ゲノムネットワーク公開シンポジウム「転写制御ネットワーク解析の最前線」、東京都、1月26日、2006.

米原 伸：「アポトーシスから新しい細胞死へ：細胞死シグナル分子の多様な機能」京都大学医学研究科内分泌代謝内科セミナー、京都市、6月7日、2006.

米原 伸：「アポトーシスから新しい細胞死へ：caspaseに依存しない新しい細胞死」生命科学研究所シンポジウム、京都市、7月8日、2006.

米原 伸：「〈細胞と染色体・脳と神経発生・がんと生体防御〉の融合研究と国際的教育」京都大学21世紀COEフォーラム平成14年度採択拠点成果発表会、京都市、9月6日、2006.

米原 伸：「染色体凝縮異常によって生じる四倍体細胞は典型的ハウスキーピング遺伝子産物eEF1A/EF-1 α の発現低下による新規細胞死で除去される」、岡崎市、10月31日、2005.

今年は、生命科学研究科の大学院生として博士の学位を岡本一男、中桐志保、大串雅俊の3名が取得した。岡本は東京医科歯科大学、中桐は大阪バイオサイエンス研究所の博士研究員として巣立ち、大串は当研究室で博士研究員として研究を完成させるべく頑張っている。また、博士後期課程三回生の菅沼舞は毎日新聞社に就職し、新聞記者へと転身した。また、酒巻助教授と三年間研究を共にやってきた研究技術員の小南勝也も日本シェリング株式会社に転出した。そして、生命科学研究科修士過程を修了した吉岡亮介は、第一アスビオファーマ株式会社に就職し、五年前に理学博士の学位を取得し当研究室を卒業した後、同じ会社で研究を行っている村川正男博士の指導を受けることになった。一方、生命科学研究科の修士一回生として伊藤亮、佳山満宏、堀内伸一郎、田原和仁の四名が入学し、修士二回生の菊池弥奈が博士後期課程に進学した。研究室の事務を一手に取り仕切る秘書である中橋直子は三年目を迎え、大学院生の姉御として研究室がうまく運営されるよう頑張ってくれている。また、21世紀COEプログラムの秘書である高村綾子は、優しさと芯の強さを兼ね備え、一週間に約50講座も開講するCOEの英語講座やレベルチェック試験等の業務の全てを一人で実行して21世紀COEプログラムを支えている。研究室をウイルス研本館から、医学・生命科学総合研究棟に移動して1年が経過したが（学生は、種々の機器の使用やマウスの飼育のために、ウイルス研には頻繁に出入りをさせてもらっています）、新しい環境のなかで、大学院生とともに成長していく研究室でありたいと希望している。

本研究分野では、米原らが見いだしたアポトーシス誘導レセプター分子Fasの研究を出発点とし、アポトーシスやそれ以外の新しい細胞死に関する研究、細胞死関連分子の多様な生物活性に関する研究を行っている。各個人の研究内容について簡単に紹介する。

博士研究員の大串雅俊は、B細胞株や正常の脾臓B細胞を用いて、TGF- β がBimを活性化するアポトーシス誘導シグナル（Samdが支配）と同時に、アポトーシスを阻害するシグナル（JNKが支配）を導入することを明らかにしてきたが、JNK下流の生存シグナルを担う分子として、Slug（*C. elegans*の抗細胞死遺伝子ces-1の哺乳類ホモログ）を同定し証明した。また、IFN- γ の処理によって、TGF- β の下流でのSlugの発現誘導が阻害され、TGF- β がアポトーシスを誘導するようになることも示した。TGF- β という発生・発がん・免疫で重要な機能を持つサイトカインの作用を調節する細胞の生死を決定する重要なシグナル伝達経路を見いだすことができた。修士一回生の堀内伸一郎は、大串と共同で、ソノックヘッジホッグシグナルが細胞死を抑制する分子機構を明らかにすることを目的とする研究を開始した。

大学院生の小林洋平は「染色体凝縮不全→二核細胞の出現→細胞増殖の進行（染色体の不安定かをとまなうのがん化の重大な原因となる）→caspaseに依存しない新しい細胞

死の誘導」という新しいシステムを立ち上げ、この新しい細胞死がハウスキーピング遺伝子の代表とされる EF-1 α (eEF1A1) の発現低下によって引き起こされることを証明していた。そして、この eEF1A1 の発現抑制が、CNBP という eEF1A1 の 5' UTR に結合するタンパク質による翻訳阻害によって誘導されることを証明した。修士一回生の伊藤亮は、小林と共同で、染色体の凝縮を異なった方法で誘導したときに、小林が明らかにした物とは異なった細胞死が誘導されるという現象の解析を開始した。

一方、アポトーシスに必要不可欠の caspase カスケード(開始 caspase である caspase-8 と 9 が実行 caspase である caspase-3 や 7 を切断して活性するカスケード) に関する研究も行っている。中津海洋一は、相同性が高い実行 caspase-3 と 7 を RNAi 法でノックダウンすることにより、これらの分子に機能の異なる点を示した。さらに、両分子のキメラ分子を作成することにより、特異的な機能発現の責任部位を明らかにしつつある。黒木俊介は、caspase-8 と 9 のダブルノックアウトマウスの解析と、caspase-9 ノックアウトマウスの遺伝的背景の違いによる表現系の解析を行うと同時に、開始 caspase の存在しない線維芽細胞株を作製し、caspase に依存しない細胞死を解析できる系を作製した。高田顕徳は、吉岡の研究を引き継ぎ、ヒト T 細胞において caspase-8 に類似の構造を有する caspase-10 (マウスには存在しない) の発現抑制を誘導する系 (shRNA 発現誘導系) を用いて、caspase-10 が細胞増殖に関わる非常に興味深い現象を見だし解析を進めている。修士一回生の佳山満宏は、マウス T 細胞株を用いて caspase-8 の発現抑制誘導系を作製し、ヒト caspase-10 と類似した活性を見だし解析を行っている。

桐山真利亜と南田佳孝は、我々が Fas シグナルとの関連で見いだした巨大分子 FLASH について、それぞれ細胞を用いた系とマウス個体を用いた系の解析を行っている。桐山は、FLASH の発現抑制を誘導する系 (shRNA 発現誘導系) をいくつかのヒト細胞株で作製し、FLASH が付着細胞の細胞周期 S 期の進行に必要不可欠であることを示し、各種欠失変異分子を用いて FLASH の構造と機能の関係を解析し、興味深い結果を得ている。南田は、FLASH のプロモーター変異マウスが発生の初期に死滅することを明らかにし、次にその生理機能を明らかにするために conditional KO マウスの作製を試み、キメラマウスの作製にいたっているので、今後の研究の展開が楽しみである。

田中喜一は、ヒト神経芽腫由来 SK-N-SH 細胞が神経幹細胞用の性質を持つこと、これに Fas を強発現させると神経細胞にコミットした細胞が発現する転写因子 Mash1 の発現が誘導され、レチノイン酸の処理によって神経突起を伸長させる能力を獲得するという興味深い現象を見いだすと同時に、この Fas の作用は caspase-8 の活性かを介することを示しており、新しい研究の展開を感じさせている。修士一回生の田原和仁は、田中とは異なる系での Fas による神経突起伸長への影響解析を開始した。

高橋涼香は、末梢 T 細胞の activation-induced cell death に Fas を介するアポトーシスと、それとは全く異なる Bim \rightarrow ミトコンドリアを介するアポトーシスが両方とも重要であると報告されている点に注目し、Fas KO と Bim KO さらに両遺伝子のダブル KO マウスを用いて解析を行い、Fas システムで死に陥る細胞集団と Bim システムで死に陥る細胞集団

を区別することができることを見だし、今後の解析に期待を持たせている。

菊池弥奈は、助手の李慶權がアポトーシス実行時に活性化すると同定したプロテインキナーゼ MST1 と MST2 (相同分子) の機能解析を RNAi 法を用いて行っており、MST1 と 2 が異なった生理機能を有しており、MST2 が細胞周期の進行に重要な役割を持つことを明らかにした。現在その分詞機構の解析を行っており、研究の発展が期待される。李慶權は、MST の機能を別の観点から解析し、また MST と結合する Nore-I という分子と MST の機能を細胞生物学的かつ生化学的に解析している。

助教授の酒巻は、Fas・FADD・caspase-8 について様々なモデル生物を用いた解析を試みると同時に、caspase-8 や caspase-3 の活性化を可視化して蛍光顕微鏡下に観察する方法を FLET 法を応用して開発し、解析を続けている。

助手の村上昭は、マウスの胚発生初期、特に原腸陥入期において、中胚葉が誘導される機構の解明を試みている。胚性幹細胞 (ES 細胞) の分化を誘導する系を用いて、中胚葉マーカーとして用いられている転写因子 Brachyury の発現を制御する機構と Brachyury が転写を活性化する標的遺伝子群による細胞の構造・機能の変化を中心に解析している。特に、前者では Wnt を、後者では FGF を介したシグナル伝達系の役割に焦点を絞っている。



2006 年 2 月 26 日 送別会