

**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 types of 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) Identification of functional regions defining different activity between caspase-3 and caspase-7 within cells: H. NAKATSUMI and S. YONEHARA**

Caspases are central to apoptosis, and the principal executioner caspases, caspase-3 and caspase-7, were reported to be similar in activity, primary structure and 3-dimensional structure. Here we identified different activity between caspase-3 and caspase-7 within cells and examined the relationship between their structure and function by using human cells expressing almost equal amounts of exogenous caspase-3, caspase-7 and/or chimeric constructs after downregulation of endogenous caspase-3 and caspase-7 expression. Caspase-3, produced in human cells, showed much stronger cleaving activity than caspase-7 against a low molecular weight substrate in vitro dependent on four specific amino acid regions. Within cells, however, additional three regions were required for caspase-3 to exert much stronger protease activity than caspase-7 against cellular substrates. Three of the former four regions and the latter three regions were shown to form two different 3-dimensional structures that located at the interface of the homo-dimer of procaspase-7 on opposite sides. In addition, procaspase-3 and 7 revealed specific homo-dimer-forming activity within cells dependent on five amino acid regions, which were included in the regions critical to the cleaving activity within cells. Thus human caspase-3 and 7 exhibit differences in protease activity, specific homo-dimer-forming activity and 3-dimensional structural features, all of which are closely interrelated.

**2) Proapoptotic regulator Fas and Bim co-operatively play an important role in regulation of systemic autoimmune disease: S. TAKAHASHI, P. BOUILLET, A. STRASSER and S. YONEHARA**

Apoptosis has an important role to control development, morphogenesis, and homeostasis in multicellular organisms. There are two different pathways inducing apoptosis; the membrane death receptor-mediated extrinsic pathway and the mitochondria-mediated intrinsic pathway. Fas is one of the most important membrane death receptor, which is essential for maintenance of immune system as shown in *lpr* and *gld* mice with mutation in Fas and Fas ligand genes, respectively. On the other hand, the mitochondrial pathway also has a significant role to keep homeostasis in immune system as demonstrated by Bim or Bax/Bak knockout mice, both of which show severe defects in immune homeostasis. We have produced Fas and Bim double knockout mice in C57BL/6 background to reveal whether apoptosis is necessary and/or sufficient for preventing development of systemic autoimmune disease. Importantly, C57BL/6 mice have been shown to never develop glomerulonephritis by a single mutation in Fas or Bim gene. We show that Fas/Bim double knockout mice suffer from glomerulonephritis even in C57BL/6 background. While splenic T cells from wild-type C57BL/6 mice are deleted after 5 days administration of the superantigen SEB, splenic T cells from Fas/Bim double knockout C57BL/6 mice were not deleted after 5 days administration of SEB. These results indicate that proapoptotic regulators Fas and Bim co-operatively play an important role in elimination of activated peripheral T cells, by which Fas and Bim would co-operatively regulate immune tolerance.

**3) Novel caspase-independent cell death by downregulation of eEF1A1/EF-1 $\alpha$  expression in tetraploids with chromosome aberrations: Y. KOBAYASHI and S. YONEHARA**

When duplicated sister chromatids are not properly compacted in mitosis, chromosomes are mis-segregated, inducing tetraploidy known to facilitate aneuploid malignancies. We show that tetraploid cells produced by impaired chromosomal condensation are generally eliminated by a novel type of cell death different from caspase-dependent apoptosis, while a small proportion of the tetraploid cells is eliminated by p53-dependent apoptosis. The novel type of caspase-independent cell death was associated with down-regulated expression of eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1 (eEF1A1/EF-1 $\alpha$ ), one of the typical housekeeping gene products, and the cell death was shown to be inhibited by expression of exogenous eEF1A1. In addition, the downregulation of eEF1A1 expression was associated with accumulation of its mRNA in Processing bodies (P bodies). Importantly, expression of exogenous eEF1A1 in normally growing cells was shown to significantly increase the number of spontaneously arising binucleated cells. Taken together, the novel cell death machinery should help to eliminate abnormal tetraploid cells.

**4) An essential role of Wnt8a signals in the mesoderm induction of mouse ES cells: A. MURAKAMI**

Wnt signals were reported to play an important role in mesoderm induction at the gastrulation stage during embryogenesis. We have been studying a role of the Wnt signals in the differentiation process of ES cells. Among Wnt family members, Wnt8a as well as Wnt3 were identified as signaling molecules essential for the mesoderm induction. As little has been reported about a role of Wnt8a, we are focusing on the analysis of its function.

Knock down of Wnt8a expression by introducing the siRNAs repressed the expression of Wnt3 and Brachyury, one of the key transcription factors for the mesoderm induction. However, knock down of Wnt3 also resulted in the repression of Wnt8a as well as Brachyury expression. Thus, it is likely that Wnt8a and Wnt3 mutually activate their expression and that either or both of them activate the Brachyury expression. In situ hybridization experiments revealed that all of Wnt3, Wnt8a, and Brachyury are expressed at a localized area of embryoid bodies, aggregates of differentiated ES cells. Since the expression pattern of Brachyury is more similar to that of Wnt8a than to that of Wnt3, Wnt8a seems to be mainly responsible for the Brachyury expression.

## **LIST OF PUBLICATIONS**

### **Department of Viral Oncology**

### **Laboratory of Tumor Biogenesis**

Kamijuku, H, Nagata, Y, Jiang, X, Ichinohe, T, Tashiro, T, Mori, K, Taniguchi, M, Hase, K, Ohno, H, Shimaoka, T, Yonehara, S, Odagiri, T, Tashiro, M, Sata, T, Hasegawa, H, and Seino, K.I. Mechanism of NKT cell activation by intranasal coadministration of alpha-galactosylceramide, which can induce cross-protection against influenza viruses. *Mucosal Immunol.* 1, 208-218, 2008.

Kobayashi, Y, and Yonehara, S. Novel cell death by downregulation of eEF1A1 expression in tetraploids. *Cell Death Differ*, advance online publication, September 26, 2008.

---

Yonehara, S: Novel caspase-independent cell death by downregulation of eEF1A1/EF-1 $\alpha$  expression in tetraploids with chromosomal aberrations. The 15th East Asia Joint Conference on Biomedical Research. Seoul, Korea, July 20-23, 2008.

Yonehara, S: Physiological roles of Fas. Independent Symposium: Future Prospective New Drug, MEDICAL-EXPO 2008 in APLAR's World: The 13th Congress of the Asia Pacific League of Associations for Rheumatology, Yokohama, September 23-26, 2008.

Yonehara, S: Novel types of cell death identified in 1989 and 2008. Argenes Sponsored Symposium: Apoptotic Therapy in RA, MEDICAL-EXPO 2008 in APLAR's World: The 13th Congress of the Asia Pacific League of Associations for Rheumatology, Yokohama, September 23-26, 2008.

Yonehara, S: A novel type of caspase-independent cell death in tetraploids with chromosome aberrations. International Symposium 7: Cell death and autophagy, The 38th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology, Kyoto, December 1-3, 2008.

米原 伸：「アポトーシスと非アポトーシス細胞死の分子機構と生理機能」、筑波大学大学院人間総合科学研究科 第36回免疫学セミナー、つくば市、5月23日、2008.

米原 伸：「染色体の凝縮異常によって生じる多核細胞に誘導される新しい細胞死」、第10回京都大学生命科学研究科シンポジウム、京都市、6月26日、2008.

米原 伸：「Death Receptor Fasと自己免疫疾患・炎症」、第29回日本炎症・再生医学会シンポジウム「アポトーシスは炎症の終息と再生の始まりである」、東京都、7月9日、2008.

米原 伸：「細胞死研究の歴史と現状」、松戸市医師会講演会、松戸市、10月15日、2008.

今年は、生命科学研究科を卒業した小林洋平が博士の学位を取得し、当研究室で研究を続けている。生命科学研究科修士過程を修了した佳山満宏は小林製菓株式会社に、堀内伸一郎は金融系企業に就職した。一方、生命科学研究科の修士一回生として中西育久、宍戸慶子、牛山愛子の三名が入学し、修士二回生の伊藤亮が博士後期課程に進学した。研究室の秘書業務は中橋直子が執り行い研究室内の円滑な運営を助けてくれている。また、高村綾子は第38回日本免疫学会学術集会の秘書業務や国際学生セミナーの実施をサポートしてきた。研究室全体としての研究も、新しい流れをつくりつつあるが、その土台をもとに発展していくことが必要な時期となっている。

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。

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ともうのがん化の重大な原因となる）→EF-1 $\alpha$ （eEF1A1）の発現低下→caspase に依存しない新しい細胞死の誘導」という新しく発見した経路の分子機構をさらに明らかにすべく研究を進展させている。伊藤亮は、p53 が機能しない細胞（多くのがん化しつつある細胞の状態）では、染色体に傷害を受けた後に細胞が増殖を続けると、caspase に依存しない新規の細胞死が誘導されるという現象を見だし、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 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、FLASH に会合する興味深い分子を同定し、この分子と FLASH の会合が S 期進行に必要であることを明らかにした。南田は、FLASH の conditional KO マウスや KO 誘導可能な ES 細胞株を作製し、FLASH の個体レベルと発生初期段階での生理機能を明らかにしている。

一方、アポトーシスに必要不可欠の caspase 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 の違いを、様々な（膨大な量の）キメラ分子の発現と機能の解析を行い、細胞内での活性の違い、ホモダイマーの選択的形成能、そして三次元構造の微妙な違いが、互いに相関しているという興味ある現象を明らかにしている。黒木俊介は、開始 caspase-8 と 9 のダブルノックアウトマウスの解析を行い、結果をまとめる段階にいたっている。菊池弥奈は、マウス T 細胞株の増殖と生存維持に caspase-8 前駆体のプロテアーゼ活性が必要である現象の分子機

構を明らかにすべく、caspase-8 前駆体の基質を探索する研究を行っている。また、caspase-8 は神経細胞の初期分化に関わる可能性を示唆する結果を得ていたので、福岡あゆみが ES 細胞を用いて、caspase-8 のノックダウンやノックアウトの誘導系を作製し、神経分化への影響を解析している。

また、Fas や Fas と caspase-8 間のアダプター分子である FADD が、神経分化や神経突起伸長に関わる現象を解析すべく、染田真孝が ES 細胞に Fas や FADD のドミナントネガティブフォームを発現誘導する系を作製し、解析を進めている。さらに、アダプター分子 FADD のアポトーシス誘導を調製する機能を明らかにすべく、戸田雅人は FADD と会合する分子を質量分析法を用いて解析を行っている。

異なったアポトーシス誘導機構に関わる Fas と Bim は免疫系で重要な機能を有しているが、Fas と Bim のダブルノックアウトマウスがマウスの遺伝的背景に依存せずに糸球体腎炎という全身性の自己免疫疾患を発症することを示した高橋涼香は、このダブルノックアウトマウスでは caspase に依存しない細胞死が誘導されることを見だし、その分子機構と生理機能の解析を開始している。高園園は、B 細胞を抗原刺激で活性化させる際に CD40 を共刺激するとアポトーシスが阻害されるという著名な系を更に発展させ、この共刺激を 3 日以上続けるとアポトーシスが誘導されてくることを見だし、その分子機構と生理機能の解析を行っている。

Kuang Wan-Fen は、Fas 誘導アポトーシスを強力に阻害するウイルス由来 FLIP が同時に Wnt シグナルを増強するという我々が見いだした系の研究を発展させるべく、FLIP 会合分子と Wnt シグナルの関係を明らかにする解析を行っている。

助教の李慶權は、アポトーシス実行時に活性化する分子として同定したプロテインキナーゼ MST1 と MST2（相同分子）の機能解析を続けており、アポトーシスと細胞増殖の調節機能の相関関係を、新たな観点から解析している。

准教授の酒巻和弘は、様々なモデル生物を用いた caspase の機能解析、数理モデルを組み込んだ caspase の活性化と生理機能の関連解析を行い、新たに同定している caspase-8 特異的な基質タンパク質の機能解析も行っている。

助教の村上昭は、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を、胚性幹細胞（ES 細胞）の分化を誘導する系を用いて解析している。中胚葉誘導については、Wnt、Nodal、Fgf 等のシグナル伝達系と Brachyury を始めとするいくつかの転写因子が、重要な役割を果たすものとして報告されている。それらの発現を活性化あるいは抑制した ES 細胞を解析することにより、それらの機能を明らかにしようと試みている。最近では、Wnt シグナル、特に、Wnt8a の役割に焦点を絞って解析している。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や、神経細胞の誘導につながる分子機構として、Wnt シグナルの解析を行い、従来示されていない種類の Wnt 分子の重要性を示しつつある。