
Fas を介する細胞死誘導シグナルと
細胞増殖および分化誘導シグナル間相互作用の解析

(課題番号 16370086)

平成 16 年度～平成 17 年度科学研究費補助金
(基盤研究 (B)) 研究成果報告書

京 都 大 学 図 書



1060666347

附 属 図 書 館

戊 18 年 5 月

研究代表者 米原 伸

京都大学大学院生命科学研究科教授

科研

2005

159

付図

Fas を介する細胞死誘導シグナルと
細胞増殖および分化誘導シグナル間相互作用の解析
(課題番号 16370086)

平成 16 年度～平成 17 年度科学研究費補助金 (基盤研究 (B))
研究成果報告書

平成 18 年 5 月

研究代表者 米原 伸
(京都大学大学院・生命科学研究科・教授)

研究組織

研究代表者：米原 伸 （京都大学大学院生命科学研究科・教授）

研究分担者：李 慶權 （京都大学大学院生命科学研究科・助手）

研究経費

	直接経費	間接経費	合計
平成 16 年度	7,100 千円	0 千円	7,100 千円
平成 17 年度	6,200 千円	0 千円	6,200 千円
総計	13,300 千円	0 千円	13,300 千円

研究 発表 表

(1) 学会誌等

Okamoto K, Fujisawa J, Reth M, and Yonehara S. 2006. 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.

Takahashi K, Kawai T, Kumar H, Sato S, Yonehara S, and Akira S. 2006. Cutting edge: Roles of caspase-8 and caspase-10 in innate immune responses to double-stranded RNA. *J Immunol*. 176, 4520-4524.

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. 2006. The membrane-bound chemokine CXCL16 expressed on follicle-associated epithelium and M cells mediates lympho-epithelial interaction in GALT. *J Immunol*, 176, 43-51.

Nakagiri S, Murakami A, Takada S, Akiyama T, and Yonehara S. 2005. Viral FLIP enhances Wnt signaling downstream of stabilized beta-catenin, leading to control of cell growth. *Mol Cell Biol*, 25, 9249-9258.

Ohgushi M, Kuroki S, Fukamachi H, O'Reilly LA, Kuida K, Strasser A, and Yonehara S. 2005. Transforming growth factor β -dependent sequential activation of Smad, Bim, and caspase-9 mediates physiological apoptosis in gastric epithelial cells. *Mol Cell Biol*, 25, 10017-28.

Watanabe K, Okamoto K, and Yonehara S. 2005. Sensitization of osteosarcoma cells to death receptor-mediated apoptosis by HDAC inhibitors through downregulation of cellular FLIP. *Cell Death Differ*, 12, 10-18.

Nanki T, Shimaoka T, Hayashida K, Taniguchi K, Yonehara S, and Miyasaka N. 2005. Pathogenic role of the CXCL16-CXCR6 pathway in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 52, 3004-3014.

Yoneyama M, Kikuchi M, Matsumoto K, Imaizumi T, Miyagishi M, Taira K, Foy E, Loo YM, Gale M Jr, Akira S, Yonehara S, Kato A, and Fujita T. 2005. Shared and unique functions of the DExD/H-box helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in antiviral innate immunity. *J Immunol*, 175, 2851-2858.

Jiang X, Shimaoka T, Kojo S, Harada M, Watarai H, Wakao H, Ohkohchi N, Yonehara S, Taniguchi M, and Seino K. 2005. Cutting edge: Critical role of CXCL16/CXCR6 in NKT cell trafficking in allograft tolerance. *J Immunol*, 2005 175, 2051-2055.

Kuninaka S, Nomura M, Hirota T, Iida S, Hara T, Honda S, Kunitoku N, Sasayama T, Arima Y, Marumoto T, Koja K, Yonehara S, and Saya H. 2005. The tumor suppressor WARTS activates the Omi / HtrA2-dependent pathway of cell death. *Oncogene*, 24, 5287-5298.

Tabata S, Kadowaki N, Kitawaki T, Shimaoka T, Yonehara S, Yoshie O, and Uchiyama T. 2005. Distribution and kinetics of SR-PSOX/CXCL16 and CXCR6 expression on human dendritic cell subsets and CD4⁺ T cells. *J Leukoc Biol*, 77, 777-786.

Mai A, Jung SK, and Yonehara S. 2004. hDKIR, a human homologue of the *Drosophila* kelch protein, involved in a ring-like structure. *Exp Cell Res*, 300, 72-83.

Kotone-Miyahara Y, Yamashita K, Lee KK, Yonehara S, Uchiyama T, Sasada M, and Takahashi A. 2004. Short-term delay of Fas-stimulated apoptosis by GM-CSF as a result of temporary suppression of FADD recruitment in neutrophils: evidence implicating phosphatidylinositol 3-kinase and MEK1-ERK1/2 pathways downstream of classical protein kinase C. *J Leukoc Biol*, 76, 1047-1056.

Fukumoto N, Shimaoka T, Fujimura H, Sakoda S, Tanaka M, Kita T, and Yonehara S. 2004. Critical roles of CXC chemokine ligand 16/scavenger receptor that binds phosphatidylserine and oxidized lipoprotein in the pathogenesis of both acute and adoptive transfer experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*, 173, 1620-1627.

Yoshino O, Matsuno H, Nakamura H, Yudoh K, Abe Y, Sawai T, Uzuki M, Yonehara S, and Kimura T. 2004. The role of Fas-mediated apoptosis after traumatic spinal cord injury. *Spine*, 29, 394-404.

Yajima N, Sakamaki K, and Yonehara S. 2004. Age-related thymic involution is mediated by Fas on thymic epithelial cells. *Int Immunol*, 16, 1027-1035.

Zhang L, Shimizu S, Sakamaki K, Yonehara S, and Tsujimoto Y. 2004. A caspase-8-independent signaling pathway activated by Fas ligation leads to exposure of the Bak N terminus. *J Biol Chem*, 279, 33865-73384.

Shimaoka T, Nakayama T, Hieshima K, Kume N, Fukumoto N, Minami M, Hayashida K, Kita T, Yoshie O, and Yonehara S. 2004. Accelerated publications: Chemokines generally exhibit scavenger receptor activity through their receptor-binding domain. *J Biol Chem*, 279, 26807-26810.

Yamauchi R, Tanaka M, Kume N, Minami M, Kawamoto T, Togi K, Shimaoka T, Takahashi S, Yamaguchi J, Nishina T, Kitaichi M, Komeda M, Manabe T, Yonehara S, and Kita T. 2004. Upregulation of SR-PSOX/CXCL16 and recruitment of CD8⁺ T cells in cardiac valves during inflammatory valvular heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 24, 282-287.

Shimaoka T, Nakayama T, Fukumoto N, Kume N, Takahashi S, Yamaguchi J, Minami M, Hayashida K, Kita T, Ohsumi J, Yoshie O, and Yonehara S. 2004. Cell surface-anchored SR-PSOX/CXC chemokine ligand 16 mediates firm adhesion of CXC chemokine receptor 6-expressing cells. *J Leukoc Biol*, 75, 267-274.

(2) 口頭発表

◎ 招待あるいは選択された口頭発表

Shin Yonehara. "Death receptor-mediated apoptosis and its signaling molecules" Kyoto University-NUS International Symposium "Regulation of cell fate and cell function", Singapore, January 27-29, 2005.

米原 伸：「Fas 誘導細胞死シグナル分子の多様な生理機能」臨床研 30 周年記念シンポジウム「新しい生命科学の潮流 ー臨床研 OB を招いてー」、東京都、1 月 21 日、2005

米原 伸：「細胞死から見た生命」生命科学研究科シンポジウム、京都市、7 月 1 日、2005.

米原 伸：「Fas/FADD/FLIP と細胞の増殖・分化」平成 17 年 生理学研究所研究会「細胞死の新たな生理機能とそのシグナル伝達」、岡崎市、10 月 17 日、2005.

小林洋平、米原 伸：「M 期染色体凝縮の異常によって eEF1A1/EF-1 α の発現低下を介する新しい細胞死が誘導される」平成 17 年 生理学研究所研究会「細胞死の新たな生理機能とそのシグナル伝達」、岡崎市、10 月 17 日、2005.

米原 伸：「Death Receptor Fas の生理機能とシグナル伝達調節」兵庫医科大学セミナー、西宮市、1 月 20 日、2004.

米原 伸：「細胞死と発生・発がん・免疫」生命科学研究科シンポジウム、京都市、6 月 30 日、2004.

Masatoshi Ohgushi, Shunsuke Kuroki, Hiroshi Fukamachi and Shin Yonehara. "TGF- β activates Smads, Bim and caspase-9 to initiate apoptosis that contributes physiological turnover of gastric epithelial cells" The 3rd International Student Seminar, Kyoto University 21st Century COE Program "COE Formation in

Frontier Life Science by Unifying Interactions”, Kyoto, November 25, 2004.

米原 伸：「細胞死シグナル分子と増殖・分化シグナル間ネットワーク」平成 16 年 生理学研究所研究会「細胞死の新たな生理機能とそのシグナル伝達」、岡崎市、11 月 29 日、2004.

大串雅俊、米原 伸：「TGF- β の Bim/caspase-9 を介する細胞死誘導シグナルは同時に異なったシグナルによって阻害されている」平成 16 年 生理学研究所研究会「細胞死の新たな生理機能とそのシグナル伝達」、岡崎市、11 月 29 日、2004.

島岡猛士、清野研一郎、谷口克、米原 伸：「SR-PSOX/CXCL16 ノックアウトマウスは肝臓の NKT 細胞が減少し ConA 誘導肝炎も抑制される」第 34 回日本免疫学会学術総会 ワークショップ「NKT 細胞」、札幌市、12 月 3 日、2004.

米原 伸：「細胞死のシグナル伝達分子」第 27 回日本分子生物学会シンポジウム「細胞機能と運命決定のシグナル伝達」、神戸市、12 月 8 日、2004.

◎ 一般演題としてのポスター発表

Masatoshi Ohgushi, Shunsuke Kuroki, Hiroshi Fukamachi and Shin Yonehara. “TGF- β activates Smads, Bim and caspase-9 to initiate apoptosis that contributes to physiological turnover of gastric epithelial cells” Kyoto University-NUS International Symposium “Regulation of cell fate and cell function”, Singapore, January 27-29, 2005.

Shunsuke Kuroki and Shin Yonehara. “Double knockout mice of caspase-8 and -9 exhibit complete inhibition of caspase activation but significant elimination of cells during embryogenesis” The 58th Annual Meeting of Japan Society for Cell Biology, Omiya, June 16, 2005.

Iku Sasaki and Shin Yonehara. "Potent enhancement of the neuronal differentiation of PC12 cells by expression of the death receptor Fas" The 58th Annual Meeting of Japan Society for Cell Biology, Omiya, June 16, 2005.

Yohei Kobayashi and Shin Yonehara. "Failure of chromosome condensation in metaphase induces a novel type of cell death through down-regulating the expression of eukaryotic translation elongation factor 1 α " The 58th Annual Meeting of Japan Society for Cell Biology, Omiya, June 16, 2005.

小林洋平、米原 伸：「M期染色体凝縮の異常によってeEF1A1/EF-1 α の発現低下を介する新しい細胞死が誘導される」第28回日本分子生物学会、福岡市、12月8日、2005.

中桐志保、村上昭、高田慎治。秋山徹、米原 伸：「v-FLIP/E8はWntシグナルを β -catenin安定化の下流で増強し、それによって細胞増殖を制御する」第28回日本分子生物学会、福岡市、12月9日、2005.

Iku Sasaki and Shin Yonehara. "Potent enhancement of the neuronal differentiation by expression of the death receptor Fas" The 57th Annual Meeting of Japan Society for Cell Biology, Osaka, May 27, 2004.

Kazuo Okamoto, Jun-ichi Fujisawa and Shin Yonehara. "HTLV-1 oncoprotein Tax inhibits Fas-mediated apoptosis principally by up-regulating expression of c-FLIP" The 57th Annual Meeting of Japan Society for Cell Biology, Osaka, May 27, 2004.

Kozo Watanabe, Kazuo Okamoto and Shin Yonehara. "Sensitization of osteosarcoma cells to Fas-induced apoptosis by the HDAC inhibitor FR901228 through down-regulation of cellular FLIP" The 57th Annual Meeting of Japan Society for Cell Biology, Osaka, May 27, 2004.

「研究成果による工業所有権の出願・取得状況」 特になし

研 究 成 果

[具体的研究目的]

アポトーシスを誘導する細胞表層レセプターFas は、がん細胞やウイルス感染細胞の除去・自己反応性免疫担当細胞の末梢における除去に深く関わる分子である。Fas 誘導アポトーシスは、アダプター分子である FADD と caspase-8 が Fas の細胞内領域に会合して DISC (death-inducing signaling complex) と呼ばれる複合体を形成し、DISC 内で caspase-8 が活性化されることによって誘導される。そして、細胞は Fas を介するアポトーシスから免れるために c-FLIP という FADD や caspase-8 と結合できる阻害分子の存在が知られている。一方、Fas KO マウスは個体の発生には異常をしめさないが、Fas シグナルに必要な不可欠な FADD や caspase-8 の KO マウスは胎生致死であり、心臓・神経管・血管等の形成に異常が認められる。また、Fas シグナルを抑制する c-FLIP の KO マウスも心臓に異常が認められて胎生致死となる。

本研究では、(A) 細胞の増殖を制御する様々なシグナルが、Fas を介するアポトーシス誘導シグナルを抑制する分子機構を明らかにし、増殖シグナルが細胞死誘導シグナルを抑制する実態とメカニズムを分子レベルから個体レベルまでの各段階で明らかにする。また、(B) Fas からのシグナル伝達を抑制するウイルス由来の v-FLIP (viral FLIP)が、個体発生に重要なシグナル伝達系である Wnt シグナルを強く増強することを見いだしたので、その分子機構と生理機能を解明する。

【研究成果】

1. レンチウイルスベクターと Cre-loxP システムを用いた新しい発現誘導システムを構築し、これを用いてヒト T 細胞白血病ウイルスのがん遺伝子産物 Tax をヒト T 細胞株 CEM-C7 に発現誘導した。また、レンチウイルスベクターを用いた shRNA 発現システムを用いて、Fas 誘導アポトーシスを抑制する分子 c-FLIP の発現抑制系を構築した。これらのシステムを用いることにより、T 細胞においては Tax の発現誘導によって NF- κ B の活性化を介する c-FLIP の発現が誘導され、これによって Fas を介するアポトーシスが阻害されることを証明した。

2. ウマγヘルペスウイルスがコードする viral FLIP E8 は Fas を介するアポトーシスを阻害するが、同時に Wnt シグナルを増強することを見いだした。この活性は、広い範囲の細胞株において認められ、 β -catenin 安定化より下流で働くことを明らかとした。また、E8 によって増強された Wnt シグナルによって、KB 細胞では細胞増殖の増強が認められ、3T3 細胞や胎児線維芽細胞では細胞増殖の強い抑制が認められた。Wnt シグナルが細胞種によっては細胞増殖に対して正反対の効果を付与すること、正常細胞に近い細胞種では細胞増殖抑制や細胞死を誘導することを明らかにした。さらに、E8 に会合するタンパク質の同定を行った。E8 を恒常的に発現する細胞株では、Fas を介するアポトーシス抑制機能は安定して保たれるのに対し、Wnt シグナル増強活性は失われていくことが明らかとなったので、上記レンチウイルスベクターを用いた発現誘導系を用いた。そして、発現誘導を行った E8 と会合するタンパク質を、共免疫沈降→SDS-PAGE→LC-MS/MS 解析を行うことによって三種類同定した。これらの E8 会合タンパク質の Wnt シグナルに対する影響を現在解析中である。