

ORIGINAL

ヒト顎下腺由来腺癌細胞株 (HSG) における 抗 Fas 抗体誘導アポトーシスシグナルへの HSP90 の関与

鬼頭典子 客本斉子[§] 帖佐直幸

岩手医科大学歯学部口腔生化学講座 (主任: 佐藤詔子教授)
020-8505 岩手県盛岡市内丸 19-1

[受付: 平成 15 年 12 月 1 日, 受理: 平成 16 年 2 月 18 日]

Involvement of HSP90 in Anti-Fas-induced Apoptosis Signaling
in the Human Salivary Gland Adenocarcinoma Cell Line HSG

Noriko Kito, Seiko Kyakumoto[§] and Naoyuki Chosa

Department of Biochemistry, Iwate Medical University School of Dentistry
(Chief: Prof. Nobuko Sato)

19-1 Uchimaru, Morioka, Iwate 020-8505, Japan

[Received on December 1, 2003; Accepted on February 18, 2004]

Key words : apoptosis/heat shock protein 90/geldanamycin/Fas/HSG cell

Abstract : It has been reported that heat shock protein (HSP)90 is involved in the regulation of signaling cascades including those resulting in cell proliferation and apoptosis. However, little is known about how HSP90 affects apoptosis signaling.

In this study, using a specific inhibitor of HSP90, geldanamycin (GDM), we investigated the relationship between HSP90 and anti-Fas antibody-induced apoptosis in HSG cells and concomitantly examined the apoptosis-inducing ability of GDM. We also sought to identify the target proteins of HSP90. When HSG cells were treated with GDM, a time-dependent increase in cell death was found. From the morphological features, the positive TdT-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) staining, and the cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP), we concluded that the induced cell death was apoptotic. The pretreatment with GDM prior to that with anti-Fas antibody (CH-11) significantly increased the cell death as compared with that obtained with GDM or CH-11 alone. Further, prolonged incubation with GDM prominently enhanced the cell death. The induced cell death was also apoptotic. The transfection of HSG cells with recombinant HSP90 α significantly inhibited the CH-11- and GDM-induced apoptosis. From the inhibition and overexpression experiments on HSP90 using GDM treatment and transfection with HSP90, respectively, we showed that HSP90 has an anti-apoptotic activity toward HSG cells. Immunoprecipitation with anti-human HSP90 antibody and subsequent Western blotting analysis of the precipitates detected bands for Caspase-8 and FADD-like ICE inhibitory protein (FLIP), which is known to regulate Fas cascade. Therefore, Caspase-8 and FLIP were shown to be target proteins of HSP90. These results suggest that HSP90 inhibits apoptosis by associating with Caspase-8 and FLIP and negatively regulating their functions.

[§] Corresponding author

E-mail : kyakumot@iwate-med.ac.jp

抄録：本研究では、HSP90 の特異的阻害剤であるゲルダナマイシン (GDM) を用いて、ヒト顎下腺由来腺癌細胞株 (HSG) へのアポトーシス誘導能を調べるとともに、抗 Fas 抗体誘導アポトーシスシグナル伝達経路への HSP90 の関与について検索した。また、Fas シグナル経路上での HSP90 のターゲットタンパクの同定を試みた。HSG 細胞を GDM で処理すると経時的に細胞死が誘導された。形態学的所見、TdT-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) 法における陽性染色、ならびに poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) の切断片の検出から、GDM で誘導された細胞死はアポトーシスであることが示された。GDM で前処理を行った後、抗 Fas 抗体 (CH-11) で処理すると、GDM あるいは CH-11 のそれぞれ単独処理に比べ、Fas を介したアポトーシス誘導は促進された。さらに、誘導される細胞死は GDM 前処理時間の延長により増強した。形態学的所見、TUNEL 染色、PARP の切断片の検出により、この細胞死についてもアポトーシスであることが確認された。一方、HSG 細胞への HSP90 リコンビナントタンパクの導入による HSP90 の過剰発現は、CH-11 ならびに GDM 誘導アポトーシスを有意に抑制した。GDM による HSP90 の阻害ならびに HSP90 の導入実験の結果から、HSP90 は HSG 細胞において抗アポトーシス (anti-apoptotic) 作用を有していることが明らかになった。次に、Fas シグナル経路上において HSP90 と相互作用する分子を免疫沈降-ウェスタンブロット法により検索したところ、Caspase-8 ならびに Fas カスケードの制御に関与する FADD-like ICE inhibitory protein (FLIP) が検出された。すなわち、これらの分子は HSP90 と複合体を形成するターゲット分子と考えられた。

以上より、HSP90 は Fas シグナル経路上において Caspase-8 や FLIP と結合し、これらターゲット分子を介してアポトーシスを制御していることが示唆された。

緒 言

ヒト顎下腺由来腺癌細胞株 (HSG) は、顎下腺導管上皮由来の腺癌細胞株である¹⁾が、多くの分化誘導剤により分化する幹細胞様の特性をもつ^{2,3)}。したがって、顎下腺癌をはじめとした口腔癌のうち、特に腺癌のモデル系として細胞増殖、分化やアポトーシスの制御の研究に適した細胞である。当教室ではこれまでに、HSG 細胞のオートクリン増殖機構とその制御について明らかにしてきた⁴⁻⁷⁾。さらに、筆者らは最近、HSG 細胞がデスレセプター Fas を発現し、Fas シグナルを介してアポトーシスが誘導されること、また、炎症性サイトカインである腫瘍壊死因子 (TNF) α により Fas を介したアポトーシスが増強されることを見だし⁸⁾、これらアポトーシス誘導のシグナル伝達系の解析を行った。このなかで、抗 Fas 抗体が Fas への結合後に活性化し、アポトーシス誘導システインプロテアーゼであるカスパーゼ経路を調べた結果、抗 Fas 抗体による細胞死誘導は、主として Caspase-8 ならびに Caspase-3 を介していること、また、TNF α によるアポトーシスの増強は nuclear factor κ B (NF κ B) を介した Fas 発現の誘導に起因することが明らかとなった。

最近、熱ショックタンパク (HSP) 90 が、増殖シグナルをはじめ多くのシグナル伝達分子をターゲットとし、シグナル伝達の制御に関与していることが明らかになってきた^{9,10)}。HSP90 は種々のタンパク質と相互作用する細胞質分子シャペロンで、ストレス負荷時にはすみやか

に誘導され、タンパク質の変性を防ぐ機能をもつ^{9,10)}。また平常時には、ステロイドレセプター、核内転写因子やキナーゼなど多くの細胞内機能タンパクと結合することにより、これらの分子の正常なコンフォメーションを維持し、機能発現に貢献している。当教室では以前、ラット顎下腺や肝臓において、ステロイドレセプターに HSP90 が結合していることを明らかにした¹¹⁾。また HSG 細胞には 2 つのアイソフォーム、HSP90 α と 90 β が発現していることを見いだした¹²⁾。そこで、HSG 細胞への熱ショック処理などのストレス処理がアイソフォーム発現へ及ぼす影響について検索したところ、熱ショックならびに亜硫酸処理により、HSP90 α が特異的に発現誘導されることが判明した^{12,13)}。その後、HSP90 遺伝子の機能部位の解析を試み、タンパクの機能発現との関連を検索した^{14,15)}。

これまでに、血清枯渇や紫外線処理などで誘導されるミトコンドリアを介したアポトーシス誘導系¹⁶⁾ならびに TNF α によるアポトーシスと生存シグナルの制御系において^{17,18)}、HSP90 がアポトーシスシグナル伝達分子と複合体を形成し、アポトーシスを制御しているとの報告がある。しかし、Fas を介したアポトーシス誘導シグナル伝達系に HSP90 が関与するとの報告はこれまでにない。一般的に、Fas を介したシグナルは 1) 細胞膜に存在する Fas レセプターへの Fas ligand (FasL)、あるいはアゴニステイック作用を有する抗 Fas 抗体の結合、2) Fas へのアダプター分子 Fas-associating protein with death domain (FADD) の結合と、続く FADD への pro-Caspase-8 の結合、3) pro-Caspase-8 の自己触媒的加

水分解による活性化と、Caspase-8によるCaspase-3をはじめとした下流の基質の分解の順で下流カスケードへと伝えられる¹⁹⁻²¹⁾。ここで述べたFas-FADD-pro-Caspase-8の複合体はdeath inducing signaling complex (DISC)と呼ばれ²²⁾、Fas誘導アポトーシスシグナルの開始に必須とされる。

本研究では、HSP90に結合することにより、そのシャペロン機能を抑制するHSP90に特異的な阻害剤であるゲルダナマイシン (GDM)^{23,24)}を用いて、はじめにHSG細胞に対するGDMのアポトーシス誘導効果を調べ、続いて、抗Fas抗体 (CH-11) 処理で誘導されるアポトーシスシグナル経路へのHSP90の関与を調べた。特にDISC形成へのHSP90の関与を知るため、HSP90と、Caspase-8さらにDISCに結合しアポトーシスを制御しているといわれるFADD-like ICE inhibitory protein (FLIP)²⁵⁾との相互作用の有無についても検討した。

材料と方法

1. 細胞培養

HSG細胞は、L-glutamine 300 mg/l, kanamycin 100 mg/l および5%仔ウシ血清 (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) を含むMinimum Essential Medium Eagle (Eagle's MEM, 日水製薬) 中で37°C, 5% CO₂存在下で培養した。培養3日目に培地を交換し、5日目にトリプシン-EDTA (1% trypsin, 0.05% EDTA, Gibco BRL) 含有phosphate-buffered saline (PBS) を用いて細胞を回収し、継代した。

2. 細胞死の誘導ならびに評価

12-ウェル デイッシュに 2.0×10^5 cells/well でHSG細胞を播種した。3日間培養後に培地交換を行い、 $1 \mu\text{M}$ あるいは $5 \mu\text{M}$ GDM (Calbiochem, San Diego, CA, USA), と100 ng/ml アゴニスティック抗ヒトFasモノクローナル抗体 (CH-11, 医学生物学研究所) を用いて、それぞれの単独処理ならびに $1 \mu\text{M}$ GDM添加後にCH-11を添加する両者処理を行い細胞死を誘導した。一定時間培養後、細胞は位相差顕微鏡 (ニコン社) を用いて形態観察を行うとともに、トリプシン-EDTAにより回収し、トリパンプルー排除法により血球計算盤を用いて生死細胞数の計測を行った。また細胞をPBS (-) にて洗浄後、sodium dodecyl sulfate (SDS)-sample buffer (4% SDS, 10% 2-mercaptoethanol, 20% glycerol, 0.25 M Tris-HCl, pH 6.8) を1ウェルあたり150 μl 加え、細胞を可溶化した。回収した可溶化物すなわちライ

ゼートは、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動-ウェスタンブロット用のサンプルとした。また、TdT-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) 法を行うために、HSG細胞をチャンバースライド (Nunc, NY, USA) に 2.0×10^5 cells/well で播種し、48時間後に細胞死誘導を行った。細胞はPBS (-) で洗浄し、4% paraformaldehyde 中にて室温で30分間固定した。反応ならびに染色は、*In Situ* 細胞死検出キット AP (alkaline phosphatase; Roche Diagnostic Corp., Mannheim, Germany) を用いて行った。前述した細胞の形態ならびにTUNEL染色像は、顕微鏡下で100倍ならびに200倍の倍率で撮影した。

3. ウェスタンブロット法

HSG細胞のライゼートを10%あるいは15% (w/v) ポリアクリルアミドゲルを用いて25 mA 定電流下で1.5時間泳動した。分子量マーカーには、レインボーマーカーと低分子量マーカー (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA) を用いた。泳動終了後、水平積層式ブロッティング装置ホライズブロット (アトー) を用い、8 V の定電圧にてImmobilon™ (PVDF メンブレン, 日本ミリポア) に転写を行った。転写終了後、膜は5%スキムミルクと0.05% Tween-20を含むTris-buffered saline (20 mM Tris-HCl, 137 mM NaCl, pH 7.6; TBS) 中に4°Cで一晩静置し、ブロッキングを行った。ブロッキング終了後、膜を0.4%ゼラチン-TBSにて1,000倍に希釈した各種抗体と、それぞれ室温で2時間インキュベートした。二次抗体以降タンパク質の検出までの一連の操作は、Western Blotting Immunodetection Kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) を用いてアビジン-ビオチン複合体 (ABC) 法により行った。発色基質は、5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate p-toluidine salt (BCIP)/nitroblue tetrazolium chloride (NBT) を用いた。一次抗体として、抗ヒトpoly (ADP-ribose) polymerase (PARP) モノクローナル抗体 (Santa Cruz Biotech., La Jolla, CA, USA), 抗ヒトFLIPモノクローナル抗体 (KAMIYA Biomed. Com., Seattle, WA, USA), 抗ヒトCaspase-8モノクローナル抗体 (Millennium Biotech., Ramona, CA, USA) を、抗ヒトHSP90モノクローナル抗体²⁶⁾はHSP90 α 特異的なK41009, 90 β 特異的なK3705を用いた。PARP, HSP90 α および90 β のタンパク発現量はNIH Image (National Institutes of Health, Bethesda, MD) を用いた画像解析により行った。すなわち、PARPに関しては切断片 (85 kDa) と非切断片 (116 kDa) のそれぞれのバンドの強度

の和を全体とし、全体に対する切断片強度の割合 (%) として示した。また HSP90 に関しては、測定した各バンドの強度を HSP90 α 、90 β ともそれぞれ“none”のバンドの強度に対する相対値 (fold) として示した。

4. RT-PCR 法

HSG 細胞より RNA 調製キット Isogen (ニッポンジーン) を用いて全 RNA を調製した。全 RNA 1 μ g から TrueScript II (サワデーテクノロジー) と random 9-mer primer を用いて 42°C, 60 分間逆転写反応を行い cDNA を合成した。これを鋳型に、95°C, 30 秒 (解離), 60°C, 60 秒 (プライマーとのアニーリング), 72°C, 90 秒 (伸長) を 1 サイクルとし、これを 22 サイクル繰り返し、cDNA の増幅を行った。用いたプライマーは以下の通りである。HSP90 α センスプライマー; 5'-GGTTGTGTCAAACCGATTGGTGAC-3' アンチセンスプライマー; 5'-CACTGGTATCATCAGCAGTAGGG-3', HSP90 β センスプライマー; 5'-GACAATCTCCAATAGACTTGTGTC-3' アンチセンスプライマー; 5'-CATTGGGTTCCTCTGCTGCCAC-3', ならびに GAPDH センスプライマー; 5'-TGGTATCGTGAAGGACTCATG-3' アンチセンスプライマー; 5'-TCTCTTCCTCTTGAGCTCTTGC-3'。増幅産物は 0.005% エチジウムブロマイド存在下で 2% アガロースゲルにて電気泳動を行い、紫外線照射により検出した。なお試料とともに 1kb DNA ladder (Gibco BRL) を泳動し、DNA サイズマーカーとした。HSP90 α および 90 β の mRNA 量は、NIH Image を用いた画像解析により測定したバンドの強度を、ハウスキーピング遺伝子である GAPDH のバンド強度に対して補正した相対的発現量 (%) として示した。

5. HSG 細胞への HSP90 α タンパクの導入

HSG 細胞を 12-ウェル ディッシュに 1.0×10^5 cells/well で播種し、2 日間培養後 Chariot Kit (Activemotif, Carlsbad, CA, USA) を用いてリコンビナントヒト HSP90 α タンパク (Calbiochem) を血清非存在下で導入した。すなわち、リコンビナントヒト HSP90 α タンパク 1 μ g/1 μ l TE を Chariot 3.5 μ l と室温で 30 分間インキュベートし、形成した Chariot-HSP90 α 複合体を血清不含 MEM 150 μ l とともにウェルに滴下後、CO₂ インキュベーターにて 37°C, 1 時間インキュベートし、導入を行った。ここで、HSP90 α タンパクを含まずに全く同様の導入操作を行った細胞をコントロール (mock) として用いた。導入後、血清含有 MEM 1 ml を加え、さらに

2 時間培養を行った後に細胞死誘導実験を行った。細胞死誘導は、GDM 単独 22 時間処理、CH-11 単独 20 時間処理、ならびに GDM 添加 2 時間後 CH-11 をさらに加え、20 時間処理を行う両者処理の 3 つの方法で行った。

6. 免疫沈降

HSG 細胞を 90 mm ディッシュ 3 枚に 1.5×10^6 cells/dish で播種し、4 日間培養を行った。次いで、Tris-saline [15 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 10 μ l/ml Protease Inhibitor Cocktail (Sigma)] で洗浄後、細胞を回収した。回収した細胞は 1 つに合わせ、これに免疫沈降用細胞抽出液 [25 mM 2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl] ethanesulfonic acid (HEPES)-KOH (pH 7.6), 5% glycerol, 2 mM dithiothreitol (DDT), 5 mM MgCl₂, 0.1% Triton X-100, 100 mM KCl, 1 mg/ml bovine serum albumin (BSA), 1 mM ATP, 10 μ l/ml Protease Inhibitor Cocktail] を 1 ml 加え、4°C, 30 分インキュベートした後 14,000 rpm で遠心を行い上澄を回収した。回収した上澄 100 μ l に非免疫ラットコントロール抗体 (IgG) を加え、4°C, 24 時間インキュベートした。これに Protein G Sepharose (Amersham Biosciences)-PBS (1:1) の懸濁液 20 μ l を加え 4°C, 30 分ローターを用いてインキュベート後、5,000 rpm, 10 秒間遠心し、上澄すなわち非結合画分を回収した。これを、スキムミルク (最終濃度 1%) 存在下にて 10 μ g の抗ヒト HSP90 α 抗体 (Stressgen, Victoria, BC, Canada) と 4°C, 24 時間インキュベート後、再び Protein G Sepharose 20 μ l を加え、さらに 4°C, 1 時間インキュベートした。結合した免疫複合体を SDS-sample buffer で樹脂から可溶化し、5,000 rpm, 10 秒間遠心を行い、得られた上澄をウェスタンブロット用サンプルとした。

結 果

1. GDM によるアポトーシスの誘導

HSG 細胞を GDM で処理し、細胞死誘導に対する効果を調べた (Fig. 1A)。はじめに、細胞死誘導に対する GDM の濃度依存性を調べたところ、濃度依存的に死細胞数は増加し、1–5 μ M でほぼ飽和した (Fig. 1A)。そこで 1 μ M ならびに 5 μ M GDM を用いて経時的变化を調べた。細胞を 1 μ M GDM で処理すると、死細胞数は経時的に増加し、処理 24 時間後では約 28%、48 時間後では約 42%、72 時間後では約 64% であった (Fig. 1A, ●)。また、GDM 濃度 5 μ M においても死細胞数は経時的に増加し、処理 24 時間後では約 20%、48 時間後では約

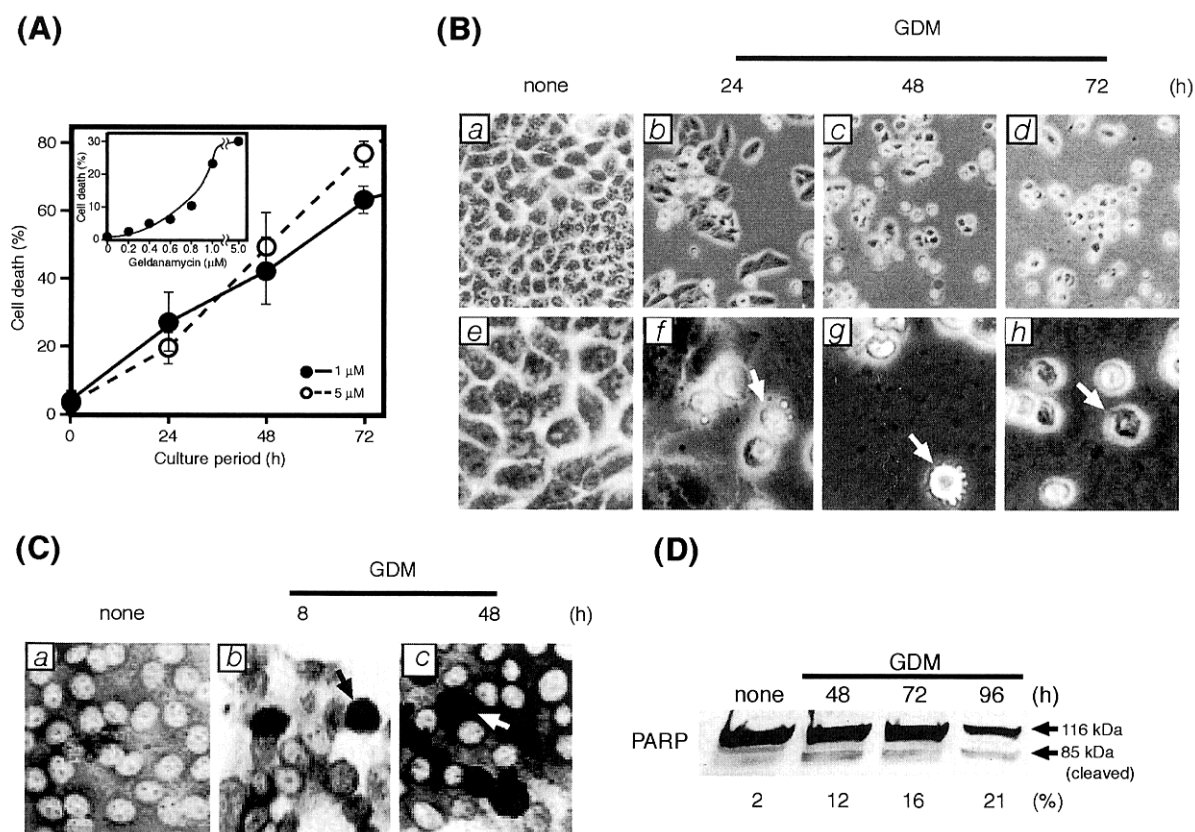


Fig. 1 Effect of GDM on HSG cell death

(A) HSG cells were seeded into 12-well dishes at an initial density of 2.0×10^5 cells/well. After cultivation for 3 days, the medium was changed and the cells were treated with GDM at 1 μ M (●) or 5 μ M (○) for the indicated periods of time. Cells were stained with 2% trypan blue solution. The number of dead and living cells were determined by measuring the dye-stained and -excluding cells, respectively. Cell death is shown as % of the total (dead plus living) cell number. Insert; Cells were treated with the indicated concentrations of GDM for 36 h. Data represent the mean $\pm$ SD from 5 determinations of 3 wells for each. (B) Cells were treated with GDM (1 μ M) for the indicated periods of time. Thereafter, microscopic observation was carried out using phase-contrast microscopy. The original magnifications were $\times 100$ (a–d) and $\times 200$ (e–h). Arrows show apoptotic cells (f, g) and necrotic cells (h). (C) Cells were seeded into chamber slides. After cultivation for 2 days, the medium was changed and cells were treated with GDM (1 μ M) for 8 h and 48 h. After fixation with 4% paraformaldehyde, TUNEL staining was done, as described in “Materials and Methods.” The original magnification: $\times 100$. (D) Cells were treated with GDM (1 μ M) for the indicated periods of time. Total cell lysates were prepared by harvesting the cells in 150 μ l of SDS-sample buffer containing β -mercaptoethanol and heating them at 100°C for 5 min. Samples (equivalent amount, each) were analyzed for the cleavage of PARP by Western blotting using anti-human poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) antibody (1:1,000) to confirm that the cell death was apoptosis. Relative expression levels of cleaved PARP are shown as % of each cleaved band based on total PARP (uncleaved plus cleaved) that were determined densitometrically.

53%, 72 時間後では約 78%であった (Fig. 1A, ○)。またデータには示さないが, 処理 96 時間において GDM 濃度 5 μ M ではほぼ全細胞が死にいたったのに対し, GDM 濃度 1 μ M では死細胞数の飽和がみられた。Fig. 1A に

おいて, 多少の誤差はあるものの 1 μ M, 5 μ M GDM とほぼ同様の経時的変化を示したことから, 以後の実験では GDM の処理濃度は 1 μ M とした。次に, GDM で誘導される細胞死がアポトーシスであるか否かを調べた。

GDM 処理後、経時的に光学顕微鏡にて形態観察を行ったところ、処理 24 時間で、細胞の blebbing、クロマチンの凝集、アポトーシス小体などがみられ、HSG 細胞は典型的なアポトーシス像を示した (Fig. 1B-b, f)。時間経過とともにアポトーシス細胞は増加した (Fig. 1B-b vs. c, d)。一方、アポトーシス細胞に混じって、より段階の進んだ二次的ネクロシス様を呈する細胞もみられた (Fig. 1B-h)。GDM 処理 8 時間ならびに 48 時間後の細胞を用いて TUNEL 染色を行った (Fig. 1C)。その結果、コントロール (none) では細胞のほとんどの核が染色されないのに対し、GDM 処理では、細胞死が顕著となる以前の誘導初期、すなわち処理 8 時間において核が陽性に染色された。また 48 時間では陽性細胞数は増加した。Caspase-3 の基質でアポトーシスのマーカーとして知られる PARP についてウェスタンブロットを行ったところ、経時的に成熟型 PARP (116 kDa) のバンドが減少し、それに伴い PARP 切断片 (85 kDa) のバンドの増加が認められた (Fig. 1D)。PARP 切断片の割合は、GDM 処理 72 時間後においても 16% と死細胞数の増加が約 64% であるのに比べ低かったが、PARP の切断を伴わないアポトーシスもある^{27,28)}ことから、GDM による細胞死には複数の経路が存在することが示唆された。これらの結果から、GDM 単独処理によって起こる細胞死は、アポトーシスであることが示された。以上の結果から、HSP90 は Intact な HSG 細胞において anti-apoptotic に作用している可能性が示唆された。

2. GDM の Fas 誘導アポトーシスに対する増強効果

次に、GDM による HSP90 阻害が Fas 誘導アポトーシスへ与える影響を調べた (Fig. 2A)。この実験では、Fas 誘導アポトーシスへの GDM の影響を明らかにするため、GDM は $1\mu\text{M}$ で、全処理時間は最大 28 時間とした。すなわち、GDM の処理開始は CH-11 処理開始 2 時間あるいは 8 時間前に行った。なお、各実験群の処理スケジュールの詳細は図中に示した。GDM 単独処理 22 時間では約 15% (Fig. 2A-2)、CH-11 単独処理 20 時間では約 23% (Fig. 2A-4) の細胞死が認められたのに対し、GDM 前処理 2 時間後に CH-11 を加える両者処理では著明な細胞死誘導 (約 46%) が認められた (Fig. 2A-5)。また、この GDM による細胞死の増強効果は前処理時間の延長 (8 時間) により顕著となり、約 80% の細胞が死にいたった (Fig. 2A-6)。次に、GDM で増強された細胞死がアポトーシスであるか否かを前述の GDM 単独処理の場合と同様に調べた。GDM 2 時間前処理後 Fas を添加し、20 時間両者処理を行った後の細胞は形態学的に

GDM 単独処理の場合と同様であり、典型的アポトーシス様を示す細胞が多数みられた (Fig. 2B-b)。GDM 全処理時間を 8 時間に延長した場合も、形態的には GDM 2 時間前処理の場合と同様のアポトーシス様細胞がみられ、その数は増加した (Fig. 2B-c)。また、細胞死が顕著となる以前、すなわち誘導初期の TUNEL 染色において陽性細胞が多数みられた (Fig. 2C-b)。これらの結果から誘導された細胞死はアポトーシスであることが強く示唆されたので、ウェスタンブロット法における PARP の切断片の検出を行った (Fig. 2D)。PARP 全体に対する切断片 (85 kDa) の割合は、GDM 単独処理 22 時間後で 5%、CH-11 単独処理 20 時間後で 32% に対し、両者処理では 67% に増加した。また GDM の処理時間の延長によりさらに 82% まで増加した。これらの結果から GDM で増強された細胞死はアポトーシスであることが確認された。また、これらの結果、すなわち GDM による HSP90 の阻害が Fas 誘導アポトーシスを増強するということは、HSP90 が HSG 細胞の Fas 誘導アポトーシス系に対し、抑制的すなわち anti-apoptotic に作用していることを示すものである。

3. HSP90 の過剰発現によるアポトーシスの抑制

Chariot Kit を用いて HSP90 α リコンビナントタンパクを HSG 細胞に導入した。はじめに、導入の確認のため細胞内 HSP90 量をウェスタンブロット法により調べたところ、コントロールとして用いた mock に比べ、HSP90 α 導入細胞では HSP90 α のプロットの強度はおよそ 1.5 倍に増加し、導入による HSP90 α レベルの上昇が確認された (Fig. 3A)。続いて導入細胞を GDM ならびに CH-11 で処理し、導入後の細胞内 HSP90 α 量の増加が Fas 誘導アポトーシスへ与える影響を調べた。Mock (black bar) に対し HSP90 α 導入細胞 (white bar) で、GDM、CH-11 それぞれ単独処理ならびに GDM、CH-11 両者処理のすべての場合において細胞死誘導の有意な抑制が認められた (Fig. 3B)。この結果は、HSP90 が HSG 細胞における Fas 誘導アポトーシスシグナル伝達に対し anti-apoptotic に作用しているとの Fig. 2 の結果に一致した。

4. GDM 処理による HSP90 の mRNA ならびにタンパクの発現誘導

GDM 処理による HSP90 の阻害が、HSP90 自身の発現に対して影響をもたらすか否かを mRNA ならびにタンパクレベルで調べた。はじめに、RT-PCR 法により mRNA の発現を調べた (Fig. 4A)。アガロース電気泳動

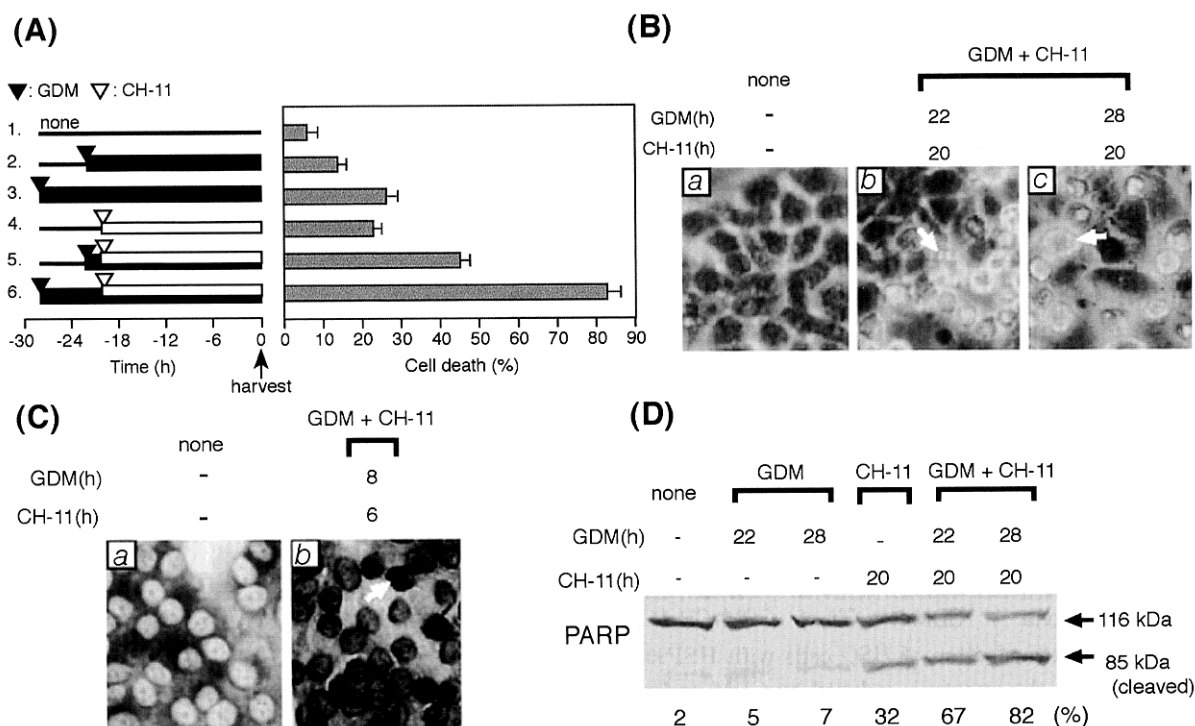


Fig. 2 Induction of apoptosis by treatment with GDM and CH-11 in HSG cells

(A) HSG cells were seeded into 12-well multi-dishes at an initial density of 2.0×10^5 cells/well. After cultivation for 3 days, the medium was changed, and the cells were treated with GDM ($1 \mu\text{M}$) alone, CH-11 (100 ng/ml) alone or a combination of both. The schedule of treatments is shown in the figure. After the indicated periods of incubation, the cells were stained with 2% trypan blue solution and the numbers of dead and living cells were measured. Cell death is shown as % of the total cell number, as described in the legend of Fig. 1A. Data represent the mean $\pm$ SD of 5 determinations for each experimental group. Experiments were repeated 3 times, and these experiments gave similar results. (B) Cells were treated with GDM ($1 \mu\text{M}$) and CH-11 (100 ng/ml) for the indicated periods of time. Photomicrographs were taken. The original magnification: $\times 200$. Arrows show apoptotic cells (b, c). (C) TUNEL staining was done after treatment with GDM ($1 \mu\text{M}$) for 8 h, concomitant with treatment for the final 6 h with CH-11 (100 ng/ml), as described in the legend of Fig. 1C. The original magnification: $\times 100$. (D) Cells were left untreated (none) or treated with GDM ($1 \mu\text{M}$) alone, CH-11 (100 ng/ml) alone or a combination of both for the indicated periods of time. Total cell lysates were prepared and analyzed by Western blotting using anti-human PARP antibody (1:1,000) as described in the legend of Fig. 1D. Relative expression levels of cleaved PARP are shown as % of each cleaved band based on total PARP (uncleaved plus cleaved).

にて検出した HSP90 α ならびに 90 β の増幅バンドを、同一サンプルを用いて得られた GAPDH のバンドに対する相対値 (%) として示した (Fig. 4B)。その結果、非処理 (none) に対し CH-11 単独処理で、mRNA の変化は HSP90 α ならびに 90 β アイソフォームともに CH-11 処理後 6 時間まで認められなかった。一方、GDM 単独処理では HSP90 α ならびに 90 β の mRNA の有意な増加が認められた。また、GDM と CH-11 両者処理では HSP 90 α 、90 β とも CH-11 処理後 6 時間において、GDM 単

独処理とほぼ同程度の増加であった。CH-11 処理後 1 時間において、GDM と CH-11 両者処理の値が GDM 単独処理に比べ高かったのは GDM が CH-11 処理 1 時間前に添加されるので、CH-11 処理後 1 時間の値は実際には GDM 処理後 2 時間を経過していることに起因すると考えられた。これらの結果から、GDM と CH-11 両者処理における HSP90 α と 90 β の mRNA の増加は、GDM 単独処理のみの効果を反映しているものと思われた。

そこで、GDM 処理による HSP90 α ならびに 90 β タン

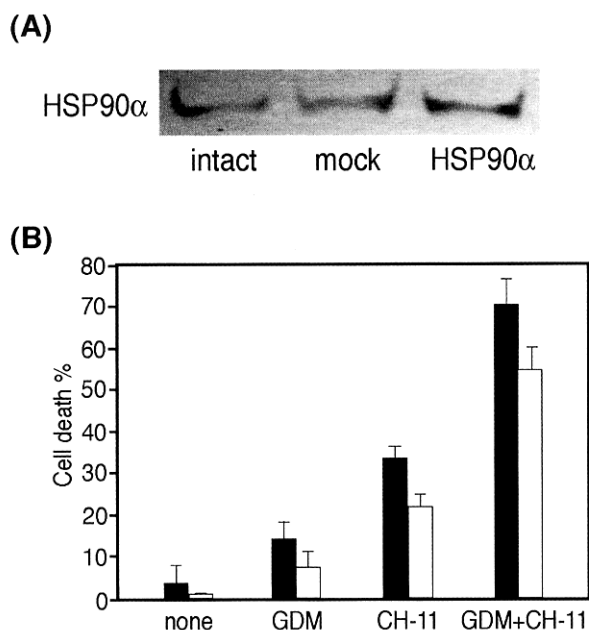


Fig. 3 Effect of transfection of HSG cells with HSP90 α protein on the apoptosis induced by GDM and/or CH-11

(A) HSG cells were transfected with recombinant HSP90 α for 1 h, and then cultured for 24 h in fresh MEM. Total cell lysates were prepared and equivalent amounts of samples were analyzed by Western blotting using anti-human HSP90 α (K41009). (B) HSG cells were seeded into 12-well dishes at an initial density of 1.0×10^5 cells/well. After cultivation for 2 days, the medium was changed, and cells were transfected with recombinant human HSP90 α (white bar) for 1 h using a Chariot kit as described in "Materials and Methods." Mock transfection (black bar) was done as a control. Cells were then left untreated (none) or treated with GDM ($1 \mu\text{M}$) alone, CH-11 (100 ng/ml) alone or a combination of both. Details are described in "Materials and Methods." After appropriate periods of incubation, the dead and living cell numbers were measured, and cell death was determined as described in the legend of Fig. 1A. Data represent the mean $\pm$ SE of 5 determinations in each experimental group. A typical result is shown. Experiments were repeated 3 times, and they produced similar tendencies.

パクの発現量をウェスタンブロット法で調べた (Fig. 5)。この結果, HSP90 α , 90 β ともに GDM 処理による経時的な発現の増加が認められた。HSP90 α では処理 72 時間後に非処理 (none) の約 11.3 倍, 90 β では処理 48 時間後に約 2.8 倍とそれぞれ最大発現を示し, タンパクレベルにおいても発現誘導が確認された。Fig. 4, 5 の結果か

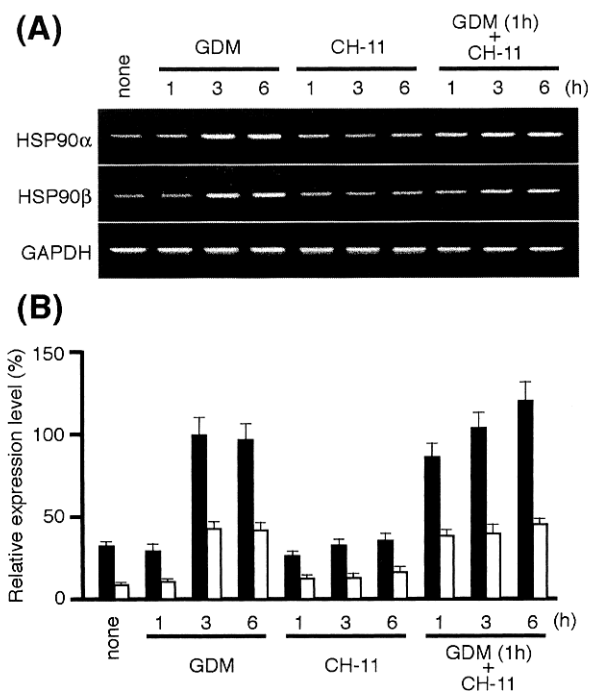


Fig. 4 Expression of HSP90 α and 90 β mRNAs

(A) cDNA was obtained by reverse-transcription reaction using the total RNA from untreated HSG cells (none) or those treated with GDM alone, CH-11 alone or a combination of both for the indicated times, and then subjected to PCR analysis as described in "Materials and Methods." (B) Relative expression levels of HSP90 α (black bar) and 90 β mRNAs (white bar) are shown as % of each blot based on GAPDH that was determined densitometrically from "A." Data represent the mean $\pm$ SD from 3 separate experiments.

ら, GDM による HSP90 の阻害が刺激となり, HSG 細胞内において代償的に HSP90 自身の発現誘導が引き起こされるものと考えられた。

5. HSP90 と複合体を形成する Fas 誘導アポトーシスシグナル分子

Fas シグナル関連分子について, 免疫沈降-ウェスタンブロット法により HSP90 のターゲットタンパクを検索した (Fig. 6)。HSG 細胞ライゼートを HSP90 の特異抗体で免疫沈降した後, 免疫沈降物について HSP90, FLIP, Caspase-8 それぞれの抗体でウェスタンブロットを行った。その結果, pro-Caspase-8 (52 kDa) と FLIP (55 kDa) に相当するプロットが得られ, Caspase-8 と FLIP が HSP90 とそれぞれ複合体を形成していることが示された。これらの結果から, Caspase-8 と FLIP が

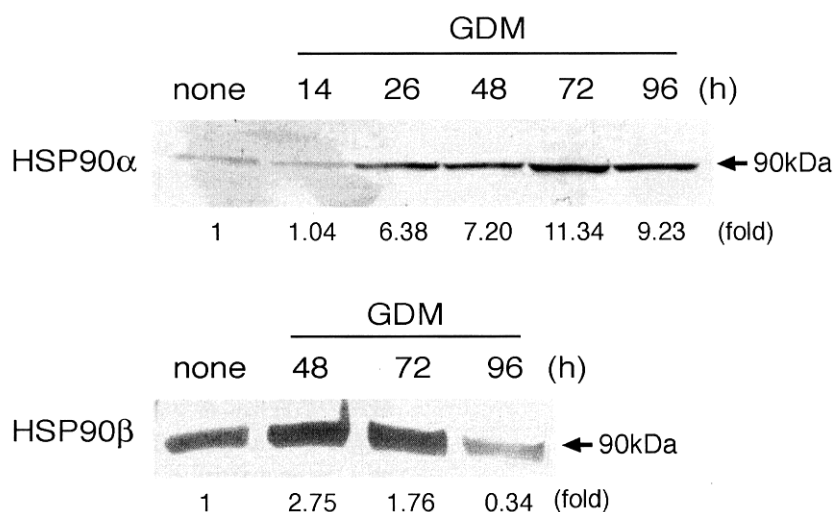


Fig. 5 Induction of HSP90 by treatment with GDM

HSG cells were seeded into 12-well dishes at an initial density of 2.0×10^5 cells/well. After cultivation for 24 h, the medium was changed, and the cells were left untreated (none) or treated with GDM ($1 \mu\text{M}$). After the indicated periods of incubation, total cell lysates were prepared and equivalent amounts of samples were analyzed by Western blotting using anti-human HSP90 α (K41009) and anti-human HSP90 β (K3705) monoclonal antibodies, respectively. Relative expression levels of HSP90 α and 90 β are shown, respectively, as a fold of each blot based on “none” that was determined densitometrically.

HSP90 のターゲットタンパクである可能性が示唆された。すなわち、HSP90 はこれらの分子を介して Fas 誘導アポトーシスシグナル伝達に関与していることが考えられた。

考 察

分子シャペロン HSP90 は、多くのシグナル伝達分子をターゲットタンパクとし、シグナル伝達の制御に関わっている。たとえば生存シグナルに関与する TNF receptor (TNFR) を介した NF κ B の活性化にかかわる Receptor Interacting Protein (RIP)¹⁷⁾や Inhibitor of κ B Kinase (IKK)¹⁸⁾、また、シスプラチンやアドリアマイシンなどの抗癌剤や紫外線で誘導されるアポトーシスに関与する癌抑制遺伝子 p53 などが、HSP90 のターゲットタンパクとしてシグナル制御を受けているとの報告がなされている²⁹⁾。

HSP90 阻害剤である GDM は代表的なアンサマイシン抗生物質で、HSP90 の ATP 結合領域に競合的に結合して HSP90 の ATP アーゼ活性を阻害することにより、あるいは HSP90 とコシャペロン p23 の結合を阻害

することにより、HSP90 を不活性化しそのシャペロン機能を失わせる^{24,30,31)}。その結果、ターゲットタンパクは不安定化あるいは分解されシグナル伝達系の変化が起こることが推測される。HSP90 のターゲットタンパクの多くは、増殖や細胞周期関連タンパクのため、細胞を GDM 処理すると正常あるいは癌細胞で増殖の停止やアポトーシスが誘導される^{23,32)}。またごく最近の報告では、癌細胞では正常細胞に比べ HSP90 のコシャペロン複合体形成状態が異なることにより、GDM に対する親和性が高く、またアポトーシスに対する感受性も高いことが示された³³⁾。したがって、GDM は次世代の抗癌剤としても有望な薬剤である³³⁻³⁶⁾。

HSG 細胞を GDM で処理するとアポトーシスが誘導された。HSG 細胞にはほかの多くの細胞と同様に、刺激により活性化される複数のアポトーシス経路が存在すると考えられるが、GDM 単独で誘導されたアポトーシスは、Fas との両者処理により誘導されるアポトーシスに比べ PARP の切断片の割合が低い (Fig. 1D vs. Fig. 2D) ことから、GDM により誘導されるアポトーシスに PARP の切断を伴わないほかの経路の存在が示唆された。アポトーシスには Caspase-8、-9 が活性化するカス

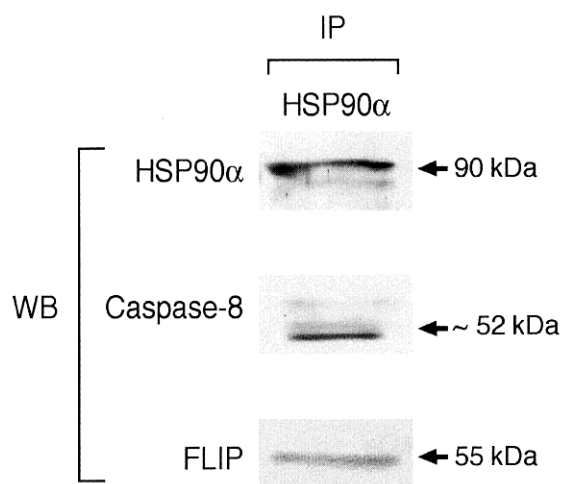


Fig. 6 Analysis of HSP90-interacting proteins in the Fas signaling pathway

HSG cells were homogenized in cell lysis buffer. Lysates were first absorbed to control IgG and separated by Protein G sepharose. The unbound fractions were then immunoprecipitated with anti-human HSP90 α monoclonal antibody. The resulting immunoprecipitates were separated by Protein G sepharose and analyzed by Western blotting with anti-human HSP90 α (K41009), anti-FLIP, and anti-Caspase-8 antibodies. Details are described in "Materials and Methods."

パーゼ系を経て PARP の切断を伴う経路のほかに、ミトコンドリアから Caspase-9 を経ずに Apoptosis Inducing Factor (AIF) を経て核内に情報が伝えられる経路²⁷⁾や、MAP キナーゼの一つである JUN キナーゼ (JNK) を介す経路²⁸⁾がある。これらの系では PARP の切断を伴わないことが知られている。Fig. 1D の結果は、GDM により誘導される HSG 細胞のアポトーシスには、カスパーゼを経る系のほかにこれらの系が関与している可能性も示唆している。GDM により阻害されるターゲットタンパクは多く、機能も多岐にわたること、すなわちそれらが多くの経路に関与していることから考えても、GDM 単独で誘導されるアポトーシスが単一のシグナル系ではないことは容易に予想されることであり、むしろ当然のようにも考えられる。HSG 細胞における GDM 単独処理で活性化されるアポトーシス誘導経路の検索は今後の課題となろう。

HSP90 のターゲットタンパクとしては、これまでに cSrc, AKT, PDK, c-Raf, MEK といった増殖シグナル経路上の分子のほか、Cdk4 や Rb, p53 といった細胞周期関連分子が多く報告されている^{23,29,34,37-39)}。一方ア

ポトーシス関連分子に対しては、間接的関与は多いものの、直接的関与については現在のところミトコンドリアを介したアポトーシスシグナル伝達系に存在する Apaf 1 に HSP90 が結合するとの報告のみである¹⁶⁾。Apaf 1 は、Caspase-9 とアポトゾームと呼ばれる複合体を形成し Caspase-9 を活性化させるが、HSP90 は Apaf 1 に結合することによりアポトーシス誘導に必要なアポトゾーム形成を阻害する⁴⁰⁾。間接的な関与は、TNFR と膜上で結合する RIP やその下流に存在する IKK に HSP90 が結合し安定化させることにより、RIP → IKK → NF κ B 経路の活性化に寄与することによりもたらされる^{17,18)}。生存シグナルである NF κ B 経路の活性化は、NF κ B 経路と同様 TNFR の下流に存在する TNFR → TNF receptor 1-associated death domain protein (TRADD) → FADD → Caspase-8 のアポトーシス誘導経路を間接的に抑制する。

本研究において、HSG 細胞の Fas 誘導アポトーシスシグナル伝達系における HSP90 の anti-apoptotic な関与が示された。そこで、GDM による HSP90 の阻害と HSG 細胞の Fas 誘導アポトーシスへの直接的な接点を分子レベルで解明するため、HSP90 のターゲットタンパクの同定を行った。HSG 細胞の Fas 経路における直接的ターゲットタンパクを検索し Caspase-8 と FLIP がターゲット、すなわちクライアントタンパクである可能性が示唆された (Fig. 6)。これまでに caspase が HSP90 のクライアントタンパクである報告は Berghe らによる Caspase-2 のみであるが⁴¹⁾、この Caspase-2 はアポトーシス誘導には関与していない。本研究において HSP90 に結合する分子として Caspase-8 がはじめて検出されたことは、Fas 経路のみならず TNFR の下流においても Caspase-8 を介するアポトーシス誘導系の制御に HSP が関与する可能性をはじめて示したことになる。したがって、免疫細胞による癌細胞やウイルス感染細胞の除去、また末梢における自己反応性 T 細胞の除去など、Fas-FasL 系が主要な経路となっているアポトーシス誘導系において、HSP90 が重要な役割をもつことになりたいへん興味深い。

Fas-FasL システムの異常と疾患の関連において自己免疫疾患が知られている。自己反応性 T 細胞の Fas 感受性の喪失は全身性エリテマトーデス、慢性関節リウマチ (RA) やシェーグレン症候群などの自己免疫疾患を引き起こす⁴²⁻⁴⁴⁾。RA では、異常に増殖した Fas を発現する関節滑膜細胞から産生されるサイトカインやプロテアーゼにより骨軟骨破壊が起こるとともに、FasL を発現する活性化 T 細胞や NK 細胞の浸潤がみられ、アポトーシ

スを誘導している⁴⁵⁾。現在、異常に増殖した滑膜細胞と自己反応性 T 細胞の除去の目的で抗 Fas 抗体を投与する治療が研究されている。今回の結果から、HSP90 阻害剤である GDM はこの Fas-FasL 系を増強させることにより、より強いアポトーシス誘導を起こしうると考えられる。すなわち、抗 Fas 抗体療法に対し GDM の併用はより良い治療効果が期待できるものとして有望である。

FLIP に関しては、DISC における caspase 活性の制御の役割が注目されている。cFLIP (cellular FLIP) には mRNA のスプライシング部位の違いにより形成される cFLIP_L (cFLIP-long) と cFLIP_S (cFLIP-short) が存在する²⁵⁾。cFLIP_L はきわめて Caspase-8 と構造が似ていて、Caspase-8 と同様に death effector domain (DED) を 2 つもちプロテアーゼドメインも類似している。しかし、その活性中心のシステイン残基が保存されていないため、プロテアーゼ活性は有していない。これに対し、cFLIP_S はプロテアーゼ様配列をもたず 2 つの DED のみからなる。cFLIP_L と cFLIP_S は DED を介し FADD や Caspase-8 と結合することができる。したがって、DISC 上に FLIP_L あるいは FLIP_S がリクルートされると Caspase-8 の FADD への結合が抑制され、その結果、Caspase-8 の自己分解による活性化が阻害されると考えられてきた。しかし、最近これまで定説とされてきた FLIP の Caspase-8 に対する抑制的作用^{25,46)}とは逆に FLIP が DISC 上へリクルートされることにより、Caspase-8 の DISC への結合と活性化が促進されることが報告された^{47,48)}。この 2 つの矛盾した結果は、FLIP に対して複雑な作用様式の存在を示唆するものである。現在のところ FLIP の作用様式に関する定説はないが、DISC を形成する分子の細胞ごとの相対的存在量が、DISC 形成後のシグナルの方向性を決定する因子となるのかもしれない。さらに、筆者らの結果から、Caspase-8 と FLIP の 2 つの分子が HSP90 のクライアントタンパクである可能性が示唆された。したがって、これらのことを考えあわせると、HSP90 は DISC 形成と DISC の下流のシグナル伝達に関して、その流れを決定する鍵を握っていると考えられる。一般に、HSP90 はアポトーシスに対して anti-apoptotic に作用する細胞が多いが、なかには pro-apoptotic に作用する細胞もある⁴⁹⁾。DISC による FLIP の Caspase-8 の活性化に対する制御の両方向性^{25,46-48)}は、HSP90 のアポトーシスに対して anti-apoptotic かあるいは pro-apoptotic かという相反する作用を説明できるのかもしれない。

HSP90 には、HSP90 α と 90 β の 2 つのアイソフォームが知られており一般的に熱ショックなどの刺激で発現

誘導されるのは HSP90 α である^{12,13)}。しかし、今回の実験、すなわち GDM による HSP90 阻害においては HSG 細胞の HSP90 α 、90 β が代償的に、ともに誘導された。このことは、熱ショックシグナルと、GDM による HSP90 阻害で誘導される HSP90 の枯渇シグナルにおいて、そのシグナル伝達と標的 HSP90 の発現誘導に違いがあることを示唆するもので、今後 HSP90 のアイソフォーム特異的発現誘導や生体内におけるアイソフォームの特異的役割などを調べていくうえで有益な知見となるだろう。

結 論

本研究では、HSG 細胞における Fas 誘導アポトーシスシグナルへの HSP90 の関与を調べ、Fas シグナル上における HSP90 のターゲットタンパクの検索を行った。その結果、Fas を介したアポトーシスへ HSP90 が抑制的 (anti-apoptotic) に関与すること、また HSP90 は FLIP や Caspase-8 をターゲットとし、これら分子を介してアポトーシスシグナルを制御している可能性が示された。

本論文の一部は第 44 回歯科基礎医学会学術大会 (平成 14 年 10 月 5 日, 東京), 第 45 回同大会 (平成 15 年 9 月 18 日, 盛岡) ならびに第 76 回日本生化学会大会 (平成 15 年 10 月 16 日, 横浜) において発表した。また、本研究は文部科学省研究費基盤研究 C14571772 同じく C11671850, 日本私学振興財団大学院重点研究費ならびに文部科学省私立大学ハイテク・リサーチ・センター事業補助金によった。

また、抗 HSP90 α 、90 β モノクローナル抗体各種ならびに HSP90 α 、90 β の発現ベクター各種を御供与下さいました長崎大学歯学部発生分化機能再建学口腔分子生化学講座 根本孝幸教授に感謝いたします。

文 献

- 1) Shirasuna, K., Sato, M. and Miyazaki, T.: A neoplastic epithelial duct cell line established from an irradiated human salivary gland. *Cancer* **48**: 745-752, 1981.
- 2) Sato, M., Azuma, M., Hayashi, Y., Yanagawa, T. and Yura, Y.: 5-azacytidine induction of stable myoepithelial and acinar cells from a human salivary intercalated duct cell clone. *Cancer Res.* **47**: 4453-4459, 1987.
- 3) Azuma, M., Kawamata, H., Kasai, Y., Nagamine, S., Yoshida, H., Yanagawa, T. and Sato, M.: Effects of

- retinoic acid on morphological features and biological markers of a neoplastic human salivary intercalated duct cell line in culture. *Cancer Res.* **48** : 7219—7225, 1988.
- 4) Kurokawa, R., Kyakumoto, S. and Ota, M. : Auto-crine growth factor in defined serum-free medium of human salivary gland adenocarcinoma cell line HSG. *Cancer Res.* **49** : 5136—5142, 1989.
 - 5) Kyakumoto, S., Kurokawa, R. and Ota, M. : Effect of glucocorticoid on epidermal growth factor receptor in human salivary gland adenocarcinoma cell line HSG. *Biochem. Biophys. Acta* **1053** : 204—212, 1990.
 - 6) Sato, N., Kyakumoto, S., Sawano, K. and Ota, M. : Proliferative signal transduction by epidermal growth factor (EGF) in the human salivary gland adenocarcinoma (HSG) cell line. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **38** : 597—606, 1996.
 - 7) Kyakumoto, S., Kito, N. and Sato, N. : Expression of cAMP response element binding protein (CREB)-binding protein (CBP) and the implication in retinoic acid-inducible transcription activation in human salivary gland adenocarcinoma cell line HSG. *Endocrine Res.* **29** : 277—289, 2003.
 - 8) Chosa, N., Kyakumoto, S., Kito, N., Kamo, M. and Sato, N. : Mechanism of Fas-mediated cell death and its enhancement by TNF- α in human salivary gland adenocarcinoma cell line HSG. *Eur. J. Oral Sci.* **112** : 2004, in press.
 - 9) Young, J. C., Moarefi, I. and Hartl, F. U. : Hsp90 : a specialized but essential protein-folding tool. *J. Cell Biol.* **154** : 267—273, 2001.
 - 10) Garrido, G., Gurbuxani, S., Ravagnan, L. and Kroemer, G. : Heat shock proteins : Endogenous modulators of apoptotic cell death. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **286** : 433—442, 2001.
 - 11) Ohara-Nemoto, Y., Nemoto, T., Sato, N. and Ota, M. : Characterization of the nontransformed and transformed androgen receptor and heat shock protein 90 with high-performance hydrophobic-interaction chromatography. *J. Steroid Biochem.* **31** : 295—304, 1988.
 - 12) 松坂朋典 : ヒト HSP90 アイソフォーム : 特異的モノクローナル抗体の作製とヒト顎下腺腺癌細胞における応用. *歯基礎誌* **38** : 633—646, 1996.
 - 13) Simon, M. C., Kitchener, K., Kao, H.-T., Hickey, E., Weber, L., Voellmy, R., Heintz, N. and Nevins, J. R. : Selective induction of human heat shock protein gene transcription by the adenovirus E1A gene products, including the 12S E1A product. *Mol. Cell. Biol.* **7** : 2884—2890, 1987.
 - 14) Nemoto, T., Ohara-Nemoto, Y., Ota, M., Takagi, T. and Yokoyama, K. : Mechanism of dimer formation of the 90-kDa heat-shock protein. *Eur. J. Biochem.* **233** : 1—8, 1995.
 - 15) Nemoto, T., Sato, N., Iwanari, H., Yamashina, H. and Takagi, T. : Domain structures and immunogenic regions of the 90-kDa heat-shock protein (HSP90). *J. Biol. Chem.* **272** : 26179—26187, 1997.
 - 16) Pandey, P., Saleh, A., Nakazawa, A., Kumar, S., Weichselbaum, R., Nalin, C., Alnemri, E. S., Kufe, D. and Kharbanda, S. : Negative regulation of cytochrome c-mediated oligomerization of Apaf-1 and activation of procaspase-9 by heat shock protein 90. *EMBO J.* **19** : 4310—4322, 2000.
 - 17) Lewis, J., Devin, A., Miller, A., Lin, Y., Rodriguez, Y., Neckers, L. and Liu, Z. : Disruption of Hsp90 function results in degradation of death domain kinase, receptor-interacting protein (RIP), and blockage of tumor necrosis factor-induced nuclear factor- κ B activation. *J. Biol. Chem.* **275** : 10519—10526, 2000.
 - 18) Chen, G., Cao, P. and Goeddel, D. V. : TNF-induced recruitment and activation of the IKK complex require Cdc37 and Hsp90. *Mol. Cell* **9** : 401—410, 2002.
 - 19) Nagata, S. : Fas-mediated apoptosis. *Adv. Exp. Med. Biol.* **406** : 119—124, 1996.
 - 20) Liu, X., Zou, H., Slaughter, C. and Wang, X. : DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell* **89** : 175—184, 1997.
 - 21) Strasser, A., O'Connor, L. and Dixit, V. M. : Apoptosis signaling. *Annu. Rev. Biochem.* **69** : 217—245, 2000.
 - 22) Nagata, S. : Apoptosis by death factor. *Cell* **88** : 355—365, 1997.
 - 23) Whitesell, L., Mimnaugh, E. G., De Costa, B., Myers, C. E. and Neckers, L. M. : Inhibition of heat shock protein HSP90-pp60v-src heteroprotein complex formation by benzoquinone ansamycins : essential role for stress proteins in oncogenic transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91** : 8324—8328, 1994.
 - 24) Prodromou, C., Roe, S. M., O'Bsien, R., Ladbury, J. E., Piper, P. W. and Pearl, L. H. : Identification and structural characterization of the ATP/ADP-binding site in the Hsp90 molecular chaperone. *Cell* **90** :

- 65—75, 1997.
- 25) Irmeler, M., Thome, M., Hahne, M., Schneider, P., Hofmann, K., Steiner, V., Bodmer, J. L., Schroter, M., Burns, K., Mattmann, C., Rimoldi, D., French, L. E. and Tschoopp, J. : Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* **388** : 125—126, 1997.
 - 26) Nemoto, T., Roi, R., Matsusaka, T., Iwanari, H., Yamashina, H., Kyakumoto, S. and Sato, N. : Isoform-specific monoclonal antibodies against HSP90. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **42** : 881—889, 1997.
 - 27) Susin, S. A., Lorenzo, H. K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B. E., Brothers, G. M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M., Larochette, N., Goodlett, D. R., Aebersold, R., Siderovski, D. P., Penninger, J. M. and Kroemer, G. : Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* **397** : 441—446, 1999.
 - 28) Ichijo, H., Nishida, E., Irie, K., ten Dijke, P., Saitoh, M., Moriguchi, T., Takagi, M., Matumoto, K., Miyazono, K. and Gotoh, Y. : Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways. *Science* **275** : 90—94, 1997.
 - 29) Sepehrnia, B., Paz, I. B., Dasgupta, G. and Momand, J. : Heat shock protein 84 forms a complex with mutant p53 protein predominantly within a cytoplasmic compartment of the cell. *J. Biol. Chem.* **271** : 15084—15090, 1996.
 - 30) Uehara, Y., Hori, M., Takeuchi, T. and Umezawa, H. : Phenotypic change from transformed to normal induced by benzoquinoid ansamycins accompanies inactivation of p60src in rat kidney cells infected with Rous sarcoma virus. *Mol. Cell Biol.* **6** : 2198—2206, 1986.
 - 31) Stebbins, C. E., Russo, A. A., Schneider, C., Rosen, N., Hartl, F. U. and Pavletich, N. P. : Crystal structure of an Hsp90-geldanamycin complex : targeting of a protein chaperone by an antitumor agent. *Cell* **89** : 239—250, 1997.
 - 32) Solit, D. B., Basso, A. D., Olshen, A. B., Scher, H. S. and Rosen, N. : Inhibition of heat shock protein 90 function down-regulates Akt kinase and sensitizes tumors to taxol. *Cancer Res.* **63** : 2139—2144, 2003.
 - 33) Kamal, A., Thao, L., Sensintaffar, J., Zhang, L., Boehm, M. F., Fritz, L. C. and Burrows, F. J. : A high-affinity conformation of Hsp90 confers tumour selectivity on Hsp90 inhibitors. *Nature* **425** : 407—410, 2003.
 - 34) 宮田愛彦 : 分子シャペロン HSP90 をターゲットとする抗癌薬の開発と作用機序. *日本薬理誌* **121** : 33—42, 2003.
 - 35) Workman, P. and Maloney, A. : HSP90 as a new therapeutic target for cancer therapy : the story unfolds. *Expert. Opin. Biol. Ther.* **2** : 3—24, 2002.
 - 36) Neckers, L. : Hsp90 inhibitors as novel cancer chemotherapeutic agents. *Trends Mol. Med.* **8** : S 55—S 61, 2002.
 - 37) Stancato, L. F., Chow, Y. H., Owens-Grillo, J. K., Yem, A. W., Deibel, M. R., Jr., Jove, R. and Pratt, W. B. : The native v-Raf. Hsp90. p50 heterocomplex contains a novel immunophilin of the FK506 binding class. *J. Biol. Chem.* **269** : 22157—22161, 1994.
 - 38) Stepanova, L., Leng, X., Parker, S. B. and Harper, J. W. : Mammalian p50Cdc37 is a protein kinase-targeting subunit of Hsp90 that binds and stabilizes Cdk4. *Genes Dev.* **10** : 1491—1502, 1996.
 - 39) Sato, S., Fujita, N. and Tsuruo, T. : Modulation of Akt kinase activity by binding to Hsp90. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97** : 10832—10837, 2000.
 - 40) Chang, D. W., Ditsworth, D., Liu, H., Srinivasula, S. M., Alnemri, E. S. and Yang, X. : Oligomerization is a general mechanism for the activation of apoptosis initiator and inflammatory procaspases. *J. Biol. Chem.* **278** : 16466—16469, 2003.
 - 41) Berghe, T. V., Kalai, M., Loo, G. V., Declercq, W. and Vandenabeele, P. : Disruption of HSP90 function reverts tumor necrosis factor-induced necrosis to apoptosis. *J. Biol. Chem.* **278** : 5622—5629, 2002.
 - 42) Watanabe-Fukunaga, R., Brannan, C. I., Copeland, N. G., Jenkins, N. A. and Nagata, S. : Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature* **356** : 314—317, 1992.
 - 43) Suda, T. and Nagata, S. : Why do defects in the Fas-Fas ligand system cause autoimmunity?. *J. Allergy Clin. Immunol.* **100** : S 97—S 101, 1997.
 - 44) Shibata, Y., Hishikawa, Y., Izumi, S., Fujita, S., Yamaguchi, A. and Koji, T. : Involvement of Fas/Fas Ligand in the induction of apoptosis in chronic sialadenitis of minor salivary glands including Sjogren's syndrome. *Hum. Cell* **15** : 52—60, 2002.
 - 45) Grodzicky, T. and Elkon, K. B. : Apoptosis in rheumatic diseases. *Am. J. Med.* **108** : 73—82, 2000.
 - 46) Chang, D. W., Xing, Z., Pan, Y., Algeciras-Schimmich, A., Barnhart, B. C., Yaish-Ohad, S., Peter, M. E. and Yang, X. : cFLIP_L is a dual function regulator for caspase-8 activation and CD95-mediated

- apoptosis. *EMBO J.* **21** : 3704—3714, 2002.
- 47) Micheau, O., Thome, M., Schneider, P., Holler, N., Tschopp, J., Nicholson, D. W., Briand, C. and Grutter, M. G. : The long form of FLIP is an activator of Caspase-8 at the Fas death-inducing signaling complex. *J. Biol. Chem.* **277** : 45162—45171, 2002.
- 48) Kim, K.-H. and Seong, B. L. : Pro-apoptosis function of HBV X protein is mediated by interaction with c-FLIP and enhancement of death-inducing signal. *EMBO J.* **22** : 2104—2116, 2003.
- 49) Galea-Lauri, J., Richardson, A. J., Latchman, D. S. and Katz, D. R. : Increased heat shock protein 90 expression leads to increased apoptosis in the monoblastoid cell line U937 following induction with $\text{TNF}\alpha$ and cycloheximide. *J. Immunol.* **157** : 4109—4118, 1996.