

Title	Membrane Fas ligand kills human peripheral blood T lymphocytes, and soluble Fas ligand blocks the killing
Author(s)	Hashimoto, Hideo
Citation	大阪大学, 1998, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3143884
rights	
Note	

# The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

[97]

氏 名 橋 本 英 雄

博士の専攻分野の名称 博士(医学)

学位記番号第 13770 号

学位授与年月日 平成10年3月25日

学 位 授 与 の 要 件 学位規則第4条第1項該当

医学研究科外科系専攻

学 位 論 文 名 Membrane Fas ligand kills human peripheral blood T lympho-

cytes, and soluble Fas ligand blocks the killing

(膜型 Fasリガンドはヒト末梢T細胞を傷害し、可溶型 Fasリガンド

はその傷害を制止する)

論 文 審 査 委 員 (主査)

教 授 越智 隆弘

(副査)

教 授 長田 重一 教 授 松澤 佑次

# 論文内容の要旨

# 【目的】

Fas リガンド(FasL)は、その受容体である Fas に結合し、アポトーシスを誘導するサイトカインである。分子量約 40kD のⅡ型膜型貫通蛋白として産生されるが、Tumor Necrosis Factor(TNF)と相同性を示す c 末端側の細胞外領域は、TNF と同様に matrix metalloproteinase 様の蛋白分解酵素により可溶型 Fas リガンド(sFasL)に転換される。

現在まで、Fas を発現する細胞のアポトーシス感受性は、おもに抗 Fas 抗体を用いて調べられてきた。例えば、マウスの脾臓由来のナイーブ T細胞上の Fas は抗 Fas 抗体に非感受性であるため、その機能は抑制されていると考えられてきた。しかし細胞外領域のほぼ全長を持つ recombinant mouse sFasL(WX1) はこれらのナイーブ T細胞にアポトーシス誘導能を持つことから、Fas/FasLシステムの機能を評価する際には、Fasを発現する細胞の状態とともに、FasL の構造が重要であることが示唆された。

そこで、本論文では、ヒト末梢T細胞(PBT)に対する FasL の作用を明らかにするため、様々な成熟、活性化段階にある PBT の膜型および可溶型 FasL に対する感受性を検討した。

# 【方法】

健常成人の末梢血から比重遠心法でリンパ球分画(PBT)を分離した。それを ConA と IL-2で48時間培養した後、さらに IL-2のみで 5 日間培養し ConA blast とした。 膜型 FasL として細胞内領域の一部を欠失するヒト FasL を発現させた細胞株,1A12を用い,また可溶型 FasL として1A12の培養上清より抗体カラムを用いて精製したヒト sFasL である AL-1とマウス recombinant mouse sFasL である WX1を用いた。これらの構造の異なる FasL と PBT および ConA blast を共培養し14時間後のアポトーシス誘導能を propidium iodide 染色後にフローサイトメトリーで解析した。

次に、ヒトの臍帯血から得られたナイーブT細胞(CBT)に IL-12、IFN  $\gamma$ 、抗 CD28抗体の刺激を各々20時間加え Fas の発現を誘導した後に、膜型及び可溶型 FasL のアポトーシス誘導能を同様に評価した。

# 【成績】

分離直後の PBT は抗 Fas 抗体(CH11)に対しては非感受性であったが、WX1 には感受性であった。一方、活性化T細胞である ConA blast はCH11 および WX1に対してともに感受性であった。また WX1は Fas 陽性細胞を選択的に傷害していた。

膜型 FasL である1A12は単独では PBT に対して弱い傷害活性しか持たなかったが、 MMP 阻害剤である BB2116 を $10\,\mu$  M添加しタンパク分解による可溶型への転換を阻害すると、その活性は著しく亢進し、 Fas陽性の PBT が選択的に傷害された。

そこでヒト sFasLである AL-1 の PBT に対する活性を評価したところ ConA blast には活性を示したが、分離直後の PBT には全く活性を持たなかった。さらに 1A12 が PBT に細胞死を誘導する系に、AL1 を添加すると、用量依存性に 1A12の活性は抑制された。

IFN  $\gamma$  や抗 CD28 抗体とIL-2の組み合わせにより Fas を短時間で誘導された CBT は PBTと同様に WX1と膜型 FasL である 1A12 に対してのみ感受性を示した。

## 【総括】

現在まで、ヒト末梢のT細胞に発現する Fas は機能しないものと考えられてきたが、膜型 FasL が結合すれば細胞にアポトーシスを誘導できることが、今回初めて示された。この結果の生理的な意義を考察すると、外来抗原が存在する炎症局所には抗原提示を受けた活性化T細胞以外にも、抗原提示を受けていない bystander なT細胞も存在すると思われる。T細胞受容体を介した刺激を受けた活性化T細胞は FasL を発現するとともに自ら FasL に非感受性となるが、その周囲の bystander T細胞は活性化T細胞の産生する IFN  $\gamma$ 、IL-2のサイトカインや抗原提示細胞からの CD28を介する刺激により Fas の発現がまず誘導され、さらに活性化T細胞上の膜型 FasL によってアポトーシスが誘導され除去される。この様にして炎症局所での抗原特異的なT細胞の免疫応答を維持していると考えられる。

また、FasL は膜型と可溶型で、その機能が異なることが示された。すなわち可溶型 FasL のアポトーシス誘導能は膜型と比べ制限されており、膜型から可溶型への転換は FasL 活性の抑制機序の一つと考えられた。現在、慢性関節リウマチなどの自己免疫疾患で、その病態に Fas/FasL システムの異常が関与しているとの報告がなされているが、今後、治療への応用等を考える際には生体内での FasL の構造が重要な要素になると思われる。

#### 論文審査の結果の要旨

Fas/Fasリガンドを介したアポトーシスは生体内の恒常性維持に不可欠であり、その破綻は様々な自己免疫疾患の原因の一つと考えられ、現在、臨床研究でも応用が期待され脚光を浴びている。今まで Fas リガンドは膜型と可溶型の異なる構造を持つことが知られていたが、その機能については不明であった。本論文は、初めて Fas リガンドの機能を膜型と可溶型との対比で評価し、その生理的な意義を示唆したものである。Fasリガンドが関与する病態や治療への応用を今後考慮する際に重要な内容であり、学位の授与に値すると考えられる。