

Title	Membrane Fas ligand kills human peripheral blood T lymphocytes, and soluble Fas ligand blocks the killing
Author(s)	Hashimoto, Hideo
Citation	
Issue Date	
Text Version	ETD
URL	https://doi.org/10.11501/3143884
DOI	10.11501/3143884
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

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 lymphocytes, 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、可溶性 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性 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 の膜型および可溶性 FasL に対する感受性を検討した。

【方法】

健康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、また可溶性 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 γ , 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、膜型及び可溶性 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 μ 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 γ 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 γ 、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思われる。