



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	<a href="https://doi.org/10.11501/3143884">https://doi.org/10.11501/3143884</a>
rights	
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

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。

今まで、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はば全長を持つ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】

今まで, 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 細胞の產生する 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。