The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Transgenic Expression of Fas in T cells Blocks Lymphoproliferation But Not Autoimmune Disease in MRL-lpr Mice
Author(s)	福山, 英啓
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43124
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【32】

氏　　名	福山英啓（ふくやまひでひろ）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学位記番号	第　16445　号
学位授与年月日	平成13年6月5日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文名	Transgenic Expression of Fas in T cells Blocks Lymphoproliferation But Not Autoimmune Disease in MRL-*lpr* Mice （FasをT細胞でのみ発現する *lpr* トランスジェニックマウスではリンパ球異常増殖は抑制されるが、自己免疫疾患は抑制されない）
論文審査委員	（主査） 教授　長田　重一 （副査） 教授　平野　俊文　　教授　宮坂　昌之

論文内容の要旨

【目的】

プログラムされた細胞死（アポトーシス）は、個体にとって不必要になった細胞、および有害になった細胞の除去に大きな役割を果たしている。

Fasリガンド（FasL）はTNF群に属するサイトカインであり、“a death factor”として、その受容体Fasに結合すると、caspaseと呼ばれる一群のプロテアーゼファミリーの活性化を引き起こし、アポトーシスを誘導する。FasはT細胞、B細胞、肝臓、心臓といった様々な組織で恒常的に発現しているが、Fasリガンド（FasL）は活性化されたT細胞およびNK細胞で強く発現している。*lpr*マウスは、Fasに変異を持つマウスであり、大量の非腫瘍性の異常T細胞を蓄積し、リンパ節腫や脾臓肥大をひき起こす。また、自己に対する抗体である抗DNA抗体を産生し、免疫複合体型の糸球体腎炎を誘発し、全身性エリテマトーデス（SLE）様の自己免疫疾患にかかり死亡する。この*lpr*マウスの研究から、Fas/FasLシステムは末梢における自己反応性T細胞の選択的なクローン除去に関与していると考えられる。すなわち、様々な刺激によってT細胞は活性化され増殖し、役目を終えると収束に向かう。この際の活性化T細胞のdown-regulationにFas/FasLシステムが作用している。それでは、*lpr*マウスで見られる、自己抗体の増加、自己免疫疾患はどのような機構で起こるのであろうか。T細胞に関するFasの関与に比べ、B細胞におけるFas/FasLシステムの生体内での役割は明らかにされていない。そこで本研究は、B細胞でのFas/FasLシステムの役割を個体レベルで解明することを目的とした。

【方法ならびに成績】

Fasを*lpr*マウスのT細胞で特異的に発現させ、組織特異的にFasの欠損を機能回復させたトランスジェニックマウス（Tg）を作製し、免疫学的手法を用いて解析した。すなわち、T細胞でのみ発現する*lck*プロモーターの下流にFas遺伝子を結合したハイブリッド遺伝子を*lpr*マウスの卵に導入し、FasをT細胞でのみ発現するマウスを作製した。Northern Blot法、フローサイトメトリー法の解析により、このマウスではTリンパ球でのみFasを発現しており、Bリンパ球、肝臓、心臓ではFasの発現は認められなかった。また、マウスの脾臓より得たリンパ球をLipopolysaccharide（LPS）存在下で52時間、37℃で培養し、その後、IgM^+B細胞におけるFasの発現を検討した。その結果、野生型では、Fasの発現は活性化により上昇したが、*lpr*およびTgではFasの発現は認められなかった。また、野生型マウスから調製したT細胞も、活性型B細胞もFasLの添加により死滅したが、Tgマウスからの細胞

では、T細胞のみが死滅し、B細胞は完全に抵抗性を示した。以上より、このマウスは、T細胞でのみ機能的Fasを発現していることが確認された。

つぎに、このマウスの血清およびリンパ球を用いて、その病理学的な検討を行った。17週齢のTgマウスで、*lpr*マウスで見られたリンパ節腫、および脾臓肥大は完全に治癒していた。またこれらの原因と考えられる異常T細胞の蓄積は見られなかった。このことは、*lpr*マウスにおける異常T細胞の蓄積は、FasがT細胞で機能しないことによることを示している。しかし、このTgマウスでは、リンパ節、脾臓において、B細胞の割合が増えていた。すなわち、B細胞の数は、脾臓で3倍に、リンパ節では約40倍に増えていた。そこで、5－7カ月齢のマウスの血清中のimmunoglobulin量および抗DNA抗体量をラジアルイムノデイフュージョンアッセイおよびELISA法を用いて検討した。その結果、B細胞が末梢で増えているTgマウスおよび*lpr*マウスで、IgG1およびIgG2aでは野生型の2－3倍に、また抗DNA抗体においては5－6倍の値を認めた。さらに抗マウスIgsを用いた免疫組織化学法により、これらのマウスの糸球体では免疫複合体が沈着していることが認められ、Hematoxylin-Eosin (H-E) 染色にて、このマウスの糸球体は腎炎を起こしていることも示された。このことより、*lpr*マウスにみられる自己抗体の産生、糸球体腎炎はB細胞でのFasの欠損によると結論された。

【総括】

Fas/FasLシステムによるアポトーシスは活性化T細胞の除去ばかりでなく、自己反応性B細胞、活性化B細胞の除去にも関与している。

論文審査の結果の要旨

福山英啓氏の本論文は、B細胞のアポトーシスにおけるFas/Fasリガンドシステムの役割について検討したものである。Fas遺伝子のloss-of-function変異をもつ、突然変異マウスMRL-lprは、lymphadenopathyやsplenomegaryを引き起こし、自己免疫疾患を発症する。このマウスにT細胞特異的に働くことで知られているproximal lck promoterの下流にマウスFas cDNAを連結し、MRL-lpr胚に注入し、トランスジェニックマウスを作成した。このマウスでは、T細胞でのみ機能的なFasを発現し、B細胞では活性化しても発現は見られなかった。これらのマウスでは、lymphadenopathyが見られなくなったことから、lymphadenopathyはT細胞におけるFasの欠損が原因であることが明らかとなった。また末梢においてB細胞数が増え、自己抗体を産生し、糸球体腎炎を引き起こすことから、MRL-lprの自己免疫疾患はB細胞でのFasの欠損が原因であることが示唆された。さらに、T細胞、B細胞の両方でFasが発現するMRL-lprトランスジェニックマウスを作成し、解析した結果、B細胞の蓄積は見られず、自己免疫疾患は緩慢になったことから、B細胞におけるホメオスタシスにFas/Fasリガンドシステムが重要な働きを担っていることが、明らかとなった。

本研究は、以前から考えられていた、MRL-lprマウスの自己免疫疾患の原因が異常T細胞の蓄積による2次的な要因ではなく、B細胞でのFas/Fasリガンドシステムの機能不全により、自己反応性B細胞のアポトーシスによる除去が行われなくなったことが原因であることを証明したことになる。このことから福山英啓氏はFas/FasリガンドシステムがB細胞における自己寛容に重要な役割を担っていることを明らかにし、自己免疫疾患の病因を理解する上で重要な研究であり、学位論文に値する。