The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Fas and Fas Ligand Gene Mutations in Hashimoto's Thyroiditis
Author(s)	董, 稚明
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43963
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

氏　　名　董（トウ）　稚（チ）明（メイ）

博士の専攻分野の名称　博　士（医　学）

学位記番号　第　17624　号

学位授与年月日　平成15年3月25日

学位授与の要件　学位規則第4条第1項該当

医学系研究科分子病態医学専攻

学位論文名　Fas and *Fas Ligand* Gene Mutations in Hashimoto's Thyroiditis
（橋本甲状腺炎におけるFasとFasL遺伝子変異の解析）

論文審査委員　（主査）
教　授　青笹　克之

（副査）
教　授　北村　幸寄　　教　授　網野　信行

論文内容の要旨

【目的】

アポトーシスは、生体の恒常性を維持するうえで重要な役割を果たしており、その生理的及び病理的過程における分子機構も徐々に明らかにされてきている。アポトーシスシグナルと生存シグナルが巧妙なバランスを取ることによって、細胞の生死が決定される。このバランスが崩れることにより様々な異常が起こる。Fas/Fas ligand (Fas/FasL) 系はFas発現細胞にアポトーシスを誘導するうえで重要である。Fas/FasL系の異常によって引き起こされるアポトーシスの欠陥により、自己反応性リンパ球が蓄積することにより、自己免疫疾患が発生するという報告がなされている。

橋本甲状腺炎（橋本病）は甲状腺にリンパ濾胞形成を伴う多数のリンパ球浸潤が見られる臓器特異的自己免疫疾患である。FasとFasLは正常甲状腺濾胞上皮では弱く発現しているが、橋本病の濾胞上皮細胞では強く発現することが知られている。これまで、濾胞細胞同士がFas/FasL経路を介してアポトーシスを誘導するという報告や、浸潤するT細胞がFas/FasL系を介して濾胞細胞のアポトーシスを誘導しているという報告などがなされている。一方、疫学調査によって、甲状腺リンパ腫は、橋本病に浸潤する活性化されたリンパ球の腫瘍化であるということが強く示唆されている。甲状腺リンパ腫の65.4%の症例にFas遺伝子変異がみられたとの報告を最近行ったが、本研究ではFas/FasLの変異が橋本病の発生に関係しているか否かを明確するために、21例の橋本病につきFas/FasL遺伝子の変異を検討した。

【方法及び成績】

神戸隈病院に1995年から2001年の間に受診した橋本病21例を対象とした。男性2例、女性19例、年齢45－70（中間値　66）歳であった。橋本病の診断は、臨床的には甲状腺の腫大、甲状腺刺激ホルモン上昇、^{123}I摂取量低下、血清中抗ミクロソーム抗体と抗サイログロブリン抗体価の上昇を指標とし、組織学的には甲状腺に胚中心を伴うリンパ濾胞形成、多数の単核球のびまん性浸潤、甲状腺組織の線維化、濾胞萎縮により診断した。

Fas/FasL遺伝子変異の検出方法は以下のとおりである、新鮮な橋本病組織標本から全RNAを抽出して、逆転写反応によりfirst strand cDNAを合成した。Fas/FasL遺伝子全長のプライマーを用いて、Fas/FasLの全長を増幅した。そのPCR産物を精製した後、クローニングし、シークエンスを行った。変異の判定としては、2つの異なるPCR反

応に由来したPCR産物、各々12-16クローンを選んでシークエンスを行った。共通の変異が2つのPCRで見つかった場合を変異ありと判定した。21例の橋本病中8例（38%）にFas遺伝子変異がみられた。1例のサイレント変異を除いて7例は全部細胞内のデスドメインに影響するフレームシフト変異であった。Fas cDNAの正常シークエンスではnucleotide 1088-1094にpoly A tractがあるが、症例5、6、7、8ではnucleotide 1095にAが1塩基挿入する変異が見られ、アポトーシス信号伝達に影響する機能喪失変異であった。症例3、4、5はnucleotide 846-870に25塩基の欠失が認められた。その結果フレームシフトが生じ、デスドメイン領域が欠失をすることになる。FasL遺伝子変異は、21例中、1例（症例9）に見られた。変異はexon 2に一致する46塩基の欠失を生じるフレームシフト変異であり、翻訳されるタンパク質は細胞内領域の一部のみで機能的でないと考えられる。

橋本病の組織に浸潤するリンパ球のうち、リンパ濾胞を形成する胚中心とその周囲のマントル層、濾胞間のリンパ球のいずれの部位にFas遺伝子変異が見られるか、laser capture microdissection法を用いて検討した。同時に甲状腺濾胞上皮についても検討した。1095 ins Aの変異を持つ症例5、6、7、8を用い、ゲノムDNAを抽出し、同領域をPCRで増幅し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動でinsertionによる長さの変化を解析した。その結果、症例5、6はマントル層のみにFas遺伝子変異をもつ細胞が見られ、症例7、8は胚中心細胞とマントル層のリンパ球に変異が検出された。

【総括】

橋本病の約4割にFas遺伝子の変異が検出され、1例を除いて、機能喪失性変異と考えられた。FasL遺伝子変異は1例しか検出されなかった。Microdisssection法によりFas遺伝子変異を持ったリンパ球はマントル層と胚中心に分布していることが認められた。Fas遺伝子変異を持ったリンパ球はアポトーシスに抵抗性のため、組織で残存し蓄積することが考えられた。以上の結果により、橋本病のリンパ濾胞内のFas変異を有するリンパ球は、アポトーシス抵抗性のため蓄積し、橋本病の病態に関与する可能性が考えられた。

論文審査の結果の要旨

Fas と FasL はアポトーシスを媒介することで、正常及び自己免疫疾患などの免疫制御機構に深く関与する。Fas/FasL 系の異常によって引き起こされるアポトーシスの欠陥により、自己反応性リンパ球が浸潤、増殖、蓄積することにより、自己免疫疾患が発生するという考えが提唱されている。橋本病は臓器特異的な自己免疫疾患であるが、その発生の病態は未だ解明されていない。本研究では新鮮な橋本病組織標本から総 RNA を抽出して、RT-PCR で cDNA を合成した。Fas/FasL の全長をクローニングし、シークエンスを行い、Fas/FasL の変異を調べた。橋本病の約4割に Fas 遺伝子の変異が認められた。マイクロダイセクション法を用いた検討により Fas 遺伝子変異を備えたリンパ球はマントル層と胚中心に分布していることが分かった。Fas 遺伝子変異を持ったリンパ球はアポトーシスに抵抗して、組織で蓄積することが橋本病の病因の1つである可能性が示唆された。以上の結果は橋本病の解明に資するものであり、学位の授与に値するものと認める。