

学位論文題名

Up-regulated expression of Fas antigen (CD95)
by peripheral naive and memory T cell subsets
in patients with systemic lupus erythematosus :
a possible mechanism for lymphopenia

(全身性エリテマトーデス患者末梢血ナイーブ及び
メモリーT細胞サブセットにおける Fas 抗原 (CD95)
の発現増強 —リンパ球減少との関連性について—)

学位論文内容の要旨

I 研究目的

Fas抗原(CD95)はリンパ球においてapoptosisを仲介する細胞膜表面抗原であり、TNFレセプター、低親和性NGFレセプター、CD40抗原等と同一のファミリーに属する分子と考えられている。Fas抗原はヒト末梢血ではCD4⁺T細胞およびCD8⁺T細胞において、CD45RO⁺細胞分画に優位に発現が認められ、T細胞トレランスの維持に重要な役割を果たすと推測されている。

ヒトの全身性エリテマトーデス(以下SLE)に類似した自己免疫病態を呈するlprマウスではFas抗原mRNAの著明な発現低下が存在し、この結果胸腺内でのT細胞のnegative selectionから逸脱した自己反応性T細胞が末梢に出現する機序が推測されているが、ヒトの自己免疫疾患におけるFas抗原の異常や病態との関連についてはまだ十分な検討はされていない。そこでSLE患者末梢血T細胞におけるFas抗原の発現を3-color法flow cytometryを用いて解析し、病態との関連を検討した。

II 対象及び研究方法

1. 対象症例：1982年アメリカリウマチ協会分類基準を4項目以上みたすSLE患者25名で、対照として性、年齢をマッチさせた健康人18名、および当科慢性関節リウマチ(RA)患者18名を用いた。
2. 細胞の調製と免疫蛍光染色：ヘパリン加末梢静脈血より比重遠心法により調製した末梢単核細胞に対して、モノクローナル抗Fas抗体(間接法PE標識)、抗CD45RO抗体(FITC標識)、抗CD4または抗CD8抗体(PerCP標識)による免疫蛍光染色を行なった。
3. フローサイトメトリー解析：FACScanフローサイトメーターにより、リンパ球ゲート中のPerCP強陽性細胞領域をCD4またはCD8⁺T細胞ゲートとしてデータを取り込み、Fas抗原(PE)とCD45RO抗原(FITC)の2-color解析に使用した。予備的検討で上記ゲート内の細胞は99%以上CD3陽性で、CD19、CD14、CD56の混入率は1%以下であった。毎回測定したPE陰性コントロールの平均蛍光強度(MFI)はほとんど変動しなかったため、Fas抗原の相対的発現量はMFIを指標として解析した。
4. セルソーティング：CD4⁺CD45RO⁺T細胞における2-color解析のため、末梢単核細胞をFITC標識抗CD45ROおよびPerCP標識抗CD4抗体により染色し、FACS Vantageを用いセルソーティングを行なった。回収したCD4⁺CD45RO⁺T細胞の純度は99%以上で、FITC蛍光陽性細胞を含まなかった。この細胞についてFITC標識抗Fas抗体とPE標識抗CD25、抗CD71、抗HLA-DR抗体との二重染色を行ない、FACScanを用いて解析した。
5. SLEの臨床活動性指標：採血と同時に測定した抗DNA抗体価、C3、C4、CH50、CRP、赤沈

値、白血球数、リンパ球数、ヘモグロビン値、血小板数、総蛋白量、IgG、 γ グロブリン値、BUN、Cr、一日尿蛋白量を解析に用いた。また採血時のステロイド服用量、罹患年数についても同様に検討した。

- 統計解析：SLE群と健常人またはRA患者群間のFas抗原MFI値の比較はWilcoxon-Mann-Whitney検定による。相関係数とその検定はSpearmanの順位相関係数検定法による。

Ⅲ 結 果

- SLE患者末梢血のCD4⁺T細胞、CD8⁺T細胞はともに健常人、RA患者に比較し有意なFas抗原の発現増強を示した。
- SLE患者のCD4⁺T細胞およびCD8⁺T細胞中のCD45RO⁺分画は健常人に比較し有意なFas抗原の増強を示したが、SLE患者では従来Fas抗原陰性とされるCD45RO⁻分画においてもFas抗原の発現増強が観察された。
- 他のT細胞活性化抗原との関連では、早期活性化マーカーであるCD25、CD71はSLE患者のnaive CD4⁺T細胞においてFas抗原とともに同時に発現されていたが、後期活性化マーカーであるHLA-DR抗原はnaive CD4⁺T細胞のうちFas抗原発現の増強した限られたサブセットにのみ発現されていた。
- 治療経過との関連では、疾患活動期SLE患者の末梢血CD4⁺、CD8⁺T細胞のFas抗原発現はステロイド大量投与後明らかに低下した。
- SLEの臨床検査指標とFas抗原発現との関連の検討では、CD4⁺T細胞、CD8⁺T細胞のFas抗原発現増強の程度は抗DNA抗体価、血清補体価などのSLEの疾患活動性指標、および罹病年数、ステロイドの内服量と関連しなかった。一方CD4⁺T細胞のCD45RO⁺およびCD45RO⁻各サブセットにおけるFas抗原のMFIは患者末梢血における当該サブセットの実数と有意な負の相関を示した。

Ⅳ 考 察

今回の検討からヒトSLEにおいてはlprマウス様のFas抗原の発現低下は存在しないことが示された。別に行なった塩基配列解析でもSLE患者でFas抗原の構造異常は認められず、ヒトSLEではlprマウス様のFas抗原発現低下に起因するapoptosis異常が一次的に病因に関与する可能性は否定的と考えられた。

SLE患者末梢血では逆に、CD4⁺T細胞、CD8⁺T細胞を通じてFas抗原の発現の有意な増強が認められた。SLE患者ではCD4⁺CD45RO⁻(naive)T細胞の減少が従来報告されている一方、Fas抗原は末梢血CD45RO⁺(memory)T細胞において構成的に陽性である。従ってCD4⁺T細胞、CD8⁺T細胞全体でのFas抗原のMFI値はCD45RO⁺T細胞の比率に影響されうるが、3カラー解析の結果からSLE患者末梢血T細胞のFas抗原の発現増強はこうした見かけ上の変化ではなく、naive、memory T細胞を通じて存在することが示された。また同様の傾向はRA患者では観察されず、自己免疫疾患全てに共通の現象ではないと考えられた。

さらにSLE患者ではnaive T細胞サブセットの段階でFas抗原の発現増強が特徴的であった。このSLE患者naive CD4⁺T細胞は健常人の場合と異なり、CD25、CD71、HLA-DR等の他の活性化分子を発現する傾向にあるため、in vivoですでに抗原刺激等のシグナルを受けて早期から中期の活性化状態に達していることが示唆された。

SLE患者において特にCD4⁺T細胞のサブセットにおけるFas抗原の発現は末梢血における該当サブセットの実数と有意な負の相関を示し、SLE患者におけるFas抗原発現増強とリンパ球減少との関連が示唆された。リンパ球減少はSLEにひろく認められる現象でその機序は現在も不明の点が多いが、今回の観察からT細胞表面で発現の増強したFas抗原を介したapoptosisが、SLE患者におけるリンパ球減少の一因となる可能性が推測された。ただし健常人およびSLE患者末梢血T細胞は抗Fas抗体単独の処理に対しては非感受性であり、従ってこれらの細胞がin vivoの環境でFasリガンドの作用でapoptosisに至るには、生体内でさらに何らかの付加的シグナルを受けるプロセスが介在すると予想された。

Ⅴ 結 語

ヒトSLEにおけるFas抗原の発現はlprマウスとは全く異なる異常を呈することが明らかとなった。またFas抗原の発現増強がSLE患者のリンパ球減少の機序となる可能性が示唆されるとともに、ヒト末梢血T細胞に発現されたFas抗原が抗原感作された活性化T細胞の除去の過程で機能的分子として働いている可能性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 池 隆 夫

副 査 教 授 吉 木 敬

副 査 教 授 上 出 利 光

学 位 論 文 題 名

Up-regulated expression of Fas antigen (CD95)
by peripheral naive and memory T cell subsets
in patients with systemic lupus erythematosus :
a possible mechanism for lymphopenia

(全身性エリテマトーデス患者末梢血ナイーブ及び
メモリーT細胞サブセットにおける Fas 抗原 (CD95)
の発現増強 リンパ球減少との関連性について)

本研究はSLE患者末梢血T細胞において、apoptosis関連分子である Fas抗原 (CD95)の発現に関し、自己免疫発症lprマウス様の発現異常の有無をflow cytometry法により解析するとともに、その臨床病態との関連、ならびにFas抗原の発現と他の活性化抗原の発現との関連を検討したものである。

I 研究対象及び方法

1)対象症例は1982年アメリカリウマチ協会分類基準を4項目以上みたすSLE患者25名で、対照として性、年齢をマッチさせた健常人18名、および慢性関節リウマチ(RA)患者18名を用いた。

2)患者及び対照の末梢血単核細胞を調製し、モノクローナル抗Fas抗体、抗CD45RO抗体、抗CD4または抗CD8抗体による3重免疫蛍光染色を行ない、FACSscan上でCD4⁺またはCD8⁺T細胞におけるFas抗原とCD45RO抗原の2-color解析を行なった。Fas抗原の相対的発現量はMFIを指標として評価した。

3)セルソーティングはCD4⁺CD45RO⁻T細胞の詳細な解析を目的とし、健常人及びSLE患者末梢単核細胞よりFACS Vantageを用いて同分画を

精製した。この細胞についてFas抗原とCD25、CD71、HLA-DRの2-color解析をFACSscan上で行なった。

4) SLEの臨床活動性指標として抗DNA抗体価、C3、C4、CH50、CRP、赤沈値、白血球数、リンパ球数等につきFas抗原の相対的発現量との相関を検討した。

II 結果

1) SLE患者末梢血のCD4⁺T細胞、CD8⁺T細胞はともに健常人、RA患者に比較し有意なFas抗原の発現増強を示した。

2) SLE患者のCD4⁺T細胞およびCD8⁺T細胞中のCD45RO⁺分画は健常人に比較し有意なFas抗原の増強を示したが、SLE患者では従来Fas抗原陰性とされるCD45RO⁻分画においてもFas抗原の発現増強が観察された。

3) SLE患者のnaive CD4⁺T細胞において早期活性化マーカーであるCD25、CD71はFas抗原とco-expressされていたが、後期活性化マーカーであるHLA-DR抗原はその中のFas抗原⁺の限られた分画にのみ発現されていた。

4) 治療経過との関連では、疾患活動期SLE患者の末梢血CD4⁺、CD8⁺T細胞のFas抗原発現はステロイド大量投与後明らかに低下した。

5) SLE患者におけるCD4⁺またはCD8⁺T細胞のFas抗原発現増強の程度は抗DNA抗体価、血清補体価などの疾患活動性指標やステロイドの内服量と相関しなかった。一方CD4⁺T細胞のCD45RO⁻およびCD45RO⁺各サブセットにおけるFas抗原のMFIは患者末梢血における当該サブセットの実数と有意な負の相関を示した。

III 考案

今回の検討に加え、SLE患者でFas抗原遺伝子の一次構造異常は認められず、ヒトSLEではlprマウス様のFas抗原発現低下に起因したapoptosis異常の病因への一次的関与は否定的と考えられた。SLE患者末梢血T細胞では逆にFas抗原の発現増強が認められ、3カラー解析の結果からこの現象がnaive、memoryサブセット比の変化による見かけ上の現象ではないことが示された。同様の傾向はRA患者では観察されず、自己免疫疾患全てに共通の現象ではないと考えられた。

SLE患者末梢血T細胞では、特にnaive T細胞サブセットの段階からのFas抗原の発現増強が特徴的であった。このサブセットは健常人と異なり各種の活性化抗原も陽性で中でもCD71の発現はFas抗原の発現発現と平行し、SLE患者CD4⁺CD45RO⁻T細胞のin vivoの刺激による活性化が明らかとなった。一方SLEの臨床病態との相関の統計解析では、

Fas抗原の発現増強が疾患活動性と必ずしも対応しない一方、SLE患者CD4⁺T細胞のサブセットにおけるFas抗原の発現量は末梢血における該当サブセット実数と有意に逆相関し、リンパ球で過剰発現したFas抗原を介するapoptosis亢進と、SLEで広く認められるリンパ球減少との関連が推測された。

これまでヒトSLEにおけるFas抗原の発現については、memory細胞比の増加により相対的な増強を呈するとされていたに留まっており、3-color解析によりnaive、memory両分画の直接的なFas抗原の発現増強の証明、及びその臨床的意義を詳細に評価した報告は今回のものが初めてと考えられた。

IV 審査の概要

口頭発表に際し、吉木教授よりin vitroでのT細胞のFas抗原発現の動態、ステロイド治療の影響、可溶性Fas抗原との関係等について、上出教授よりFas抗原発現量の意味づけ、CD45アイソフォーム変化との関係について、小林教授よりFas抗原発現亢進細胞がリンパ球減少例で検出される機序について、皆川教授よりヒトSLEの病因におけるFas抗原の意義付けについて、細川教授よりFas強陽性細胞と自己反応性細胞の関係、Fas ligand異常の可能性について、小野江教授よりFas抗原発現とリンパ球減少の相関の解釈についての質疑及び指摘があった。これらに対して、演者は概ね適当な返答を行なった。

本研究によりヒトSLEはlprマウスとは全く異なるFas抗原の発現異常を呈することが示された。さらに患者末梢血T細胞のin vivoにおける活性化状態に関する知見や、臨床的にはSLEにおけるリンパ球減少の機序解明の面からも意義があり、本研究は学位の授与に値すると考えられた。