

学位論文題名

全身性エリテマトーデスにおけるFasリガンドの発現異常に関する研究

学位論文内容の要旨

I. 緒言

全身性エリテマトーデス(SLE)は自己抗体産生と全身の臓器障害を特徴とする代表的な自己免疫疾患である。その発症には遺伝的素因、環境要因、ウイルス感染、免疫異常など複数因子の関与が考えられているが、その機序はまだ不明な点が多い。近年、SLEモデルマウスのlpr及びgldはそれぞれFasとFasリガンド(FasL)の遺伝子異常であることが明らかにされた。lprおよびgldマウスではFas依存性のアポトーシスが誘導されず、末梢リンパ組織に異常T細胞が蓄積する。ヒトSLEのT細胞では、lprマウスと異なり、細胞表面のFas密度はむしろ増加している。さらにCD4とCD8のナイーブおよびメモリーT細胞サブセットもそれぞれFasの陽性化やFas密度の亢進が報告されている。しかも、CD4ナイーブT細胞では、CD25やCD71のような活性化抗原も発現しており、SLEは活性化T細胞が容易に末梢血にて検出される異常な病態である。しかし、活性化T細胞の増加がFasLの異常に起因するFas依存性アポトーシスの機能異常か否かについては、まだ報告がない。本研究では、限られた臨床サンプルから高感度でかつ簡便に遺伝子発現を半定量する方法を確立すると共に、SLEの末梢血単核細胞(PBMC)におけるFasL遺伝子ならびに蛋白発現について解析したので報告する。

II. 対象と方法

1. 健常人16名, SLE38名と慢性関節リウマチ(RA) 20名の無作為抽出例を対象とした。
2. PBMCにおけるFasLの遺伝子発現を解析するために半定量的RT-PCR法を開発した。すなわち、ビオチン化プライマーを用いてFasLと同一のチューブ内で β -actinも増幅させ、両PCR産物を6%ポリアクリルアミドゲルにて泳動後、ナイロン膜にプロットした。化学発光法にて検出したX線フィルム上のPCR産物をデンシトメーターで定量し、対数的増幅を示すサイクルにおけるFasL/ β -actin比を求めた。
3. SLEのPBMCおよびT細胞サブセットにおけるFasLの蛋白発現はFACScanによるフローサトメトリ法にて検討した。

III. 結果

1. 遺伝子レベルにてFasL発現を解析したところ、以下の結果を得た。

1) 未治療群SLE (2.21 ± 1.09 , $n=16$)では健常人 (1.17 ± 0.26)とRA (1.25 ± 0.43)より有意にFasLの発現を増加していた ($P=0.0001$, $P=0.0078$)。しかも、SLE活動性指数 (SLEDAI) の高い症例ほどFasL遺伝子の発現が亢進していた ($r_s=0.547$, $P=0.0012$)。

2) プレドニゾン治療群SLE (0.78 ± 0.52 , $n=22$)では未治療群よりFasL遺伝子の発現が明らかに減少し ($P<0.0001$)、さらに興味あることに健常人よりも有意に減少した ($P=0.0078$)。また、FasL遺伝子の発現量とプレドニゾンの投与量の間には有意に逆相関を示した ($r_s=-0.703$, $P=0.0009$)。

3) プレドニゾン治療によるFasL遺伝子発現の抑制はRAでは観察されなかった。

2. 蛋白レベルにてFasLの発現をフローサイトメーターで解析したところ、未治療SLEと抗CD3抗体で刺激した健常人のT細胞サブセットではFasLが検出されたが、プレドニゾンにて治療したSLEと未刺激健常人のPBMCではFasLは検出されなかった。

3. 健常人PBMCをデキサメサゾンと共に培養すると、用量依存的にまた時間の経過と共に、FasL遺伝子の発現が抑制された。

IV. 考察

本研究では、SLEにおけるFasLの発現を遺伝子および蛋白レベルで解析し、それとSLE病態との関連性を検討した。

未治療SLEのPBMCでは、FasLの遺伝子および蛋白発現が有意に亢進していた。しかも、FasL遺伝子発現は補体価や抗DNA抗体価ならびにSLE活動性指数と有意に相関しており、SLE活動性を反映する一つのパラメーターと考えられた。in vitroの抗CD3抗体刺激による各T細胞サブセットのFasL発現は、SLEにおけるFasL発現亢進がT細胞活性化によることを示唆した。従って、発現亢進したFasLの機能的解析は残されているものの、少なくともSLEではFasL発現低下によるアポトーシス機能の低下はないと考えられた。

本研究において見出されたもう一つの事実は、SLEにおけるステロイドの1日服用量に依存しFasL遺伝子の発現抑制である。この機序一つとして、ステロイドによるPBMCへの直接的抑制作用が、in vitro 実験結果から推測された。しかし、ステロイドによるこのような免疫抑制作用は、活性化された自己反応性T細胞のFas依存性アポトーシスをも抑制して、SLE再燃を誘導するクローンを残存させる可能性も考えられる。

本研究が、SLE病態のさらなる解明や新しいステロイド療法導入への足がかりとなることを期待したい。

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

全身性エリテマトーデスにおけるFasリガンドの発現異常に関する研究

全身性エリテマトーデス(SLE)は自己抗体産生と全身の臓器障害を特徴とする代表的な自己免疫疾患である。その発症には遺伝的素因、環境要因、ウイルス感染、免疫異常など複数因子の関与が考えられているが、その機序はまだ不明な点が多い。近年、SLEモデルマウスのlpr及びgldはそれぞれFasとFasリガンド(FasL)の遺伝子異常であることが明らかにされた。lprおよびgldマウスではFas依存性のアポトーシスが誘導されず、末梢リンパ組織に異常T細胞が蓄積する。ヒトSLEのT細胞では、lprマウスと異なり、細胞表面のFas密度はむしろ増加している。さらにCD4とCD8のナイーブおよびメモリーT細胞サブセットもそれぞれFasの陽性化やFas密度の亢進が報告されている。しかも、CD4ナイーブT細胞では、CD25やCD71のような活性化抗原も発現しており、SLEは活性化T細胞が容易に末梢血にて検出される異常な病態である。しかし、活性化T細胞の増加がFasLの異常に起因するFas依存性アポトーシスの機能異常か否かについては、まだ報告がない。本研究では、限られた臨床サンプルから高感度でかつ簡便に遺伝子発現を半定量する方法を確立すると共に、SLEの末梢血単核細胞(PBMC)におけるFasL遺伝子ならびに蛋白発現について解析したので報告した。

本研究では健常人16名、SLE38名と慢性関節リウマチ(RA)20名の無作為抽出例を対象とした。方法として、PBMCにおけるFasLの遺伝子発現を解析するために半定量的RT-PCR法を開発した。すなわち、ビオチン化プライマーを用いてFasLと同一のチューブ内で β -actinも増幅させ、両PCR産物を6%ポリアクリルアミドゲルにて泳動後、ナイロン膜にプロットした。化学発光法にて検出したX線フィルム上のPCR産物をデンストメーターで定量し、対数的増幅を示すサイクルにおけるFasL/ β -actin比を求めた。SLEのPBMCおよびT細胞サブセットにおけるFasLの蛋白発現はFACSscanによるフローサトメトリ法にて検討した。

遺伝子レベルにてFasL発現を解析したところ、以下の結果を得た。未治療群SLE(2.21

±1.09, n=16)では健常人 (1.17±0.26)とRA (1.25±0.43)より有意にFasLの発現を増加していた (P=0.0001, P=0.0078)。しかも、SLE活動性指数 (SLEDAI) の高い症例ほどFasL遺伝子の発現が亢進していた ($r_s=0.547$, P=0.0012)。プレドニゾロン治療群SLE (0.78±0.52, n=22)では未治療群よりFasL遺伝子の発現が明らかに減少し (P<0.0001)、さらに興味あることに健常人よりも有意に減少した (P=0.0078)。また、FasL遺伝子の発現量とプレドニゾロンの投与量の間には有意に逆相関を示した ($r_s=-0.703$, P=0.0009)。蛋白レベルにてFasLの発現をフローサイトメーターで解析したところ、未治療SLEと抗CD3抗体で刺激した健常人のT細胞サブセットではFasLが検出されたが、プレドニゾロンにて治療したSLEと未刺激健常人のPBMCではFasLは検出されなかった。健常人PBMCをデキサメサゾンと共に培養すると、用量依存的にまた時間の経過と共に、FasL遺伝子の発現が抑制された。

本研究は、SLEにおけるFasLの発現を遺伝子および蛋白レベルで解析し、Fas依存性アポトーシスにFasLの発現異常が関与するかどうかを検索する目的で行った。未治療SLEのPBMCでは、FasLの遺伝子および蛋白発現が有意に亢進していた。一方、SLEのPBMCでは膜型Fasの発現が亢進していることが既に報告されている。これらの事実より、SLEではFas依存性アポトーシスの亢進が示唆される。しかも、FasL遺伝子発現は補体価や抗DNA抗体価ならびにSLE活動性指数と有意に相関しており、SLE活動性を反映する一つのパラメーターと考えられた。in vitroの抗CD3抗体刺激による各T細胞サブセットのFasL発現は、SLEにおけるFasL発現亢進がT細胞活性化によることを示唆した。本研究において見出されたもう一つの事実は、SLEにおけるステロイドの1日服用量に依存しFasL遺伝子の発現抑制である。これはステロイドの新しい免疫抑制機序として、SLEのリンパ球減少と症状を改善するメカニズムの一つとも考えられる。

本研究が、国内外ではSLEにおけるFasLの遺伝子および蛋白発現が有意に亢進していたこととステロイド治療によりFasL遺伝子発現の抑制のことを初めに見出した。SLE病態のさらなる解明や新しいステロイド療法導入への足がかりとなることを期待したい。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、また研究者として誠実かつ熱心であり申請者が博士 (医学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。