

学 位 論 文 題 名

Serum levels of soluble Fas/APO-1(CD95)and its molecular structure in patients with systemic lupus erythematosus(SLE)and other autoimmune diseases.

(全身性エリテマトーデス (SLE) およびその他の自己免疫疾患における
血清可溶性 Fas/ APO-1 (CD95) レベルとその構造的特徴)

学位論文内容の要旨

[目的]

Fas/APO-1(CD95)は、腫瘍壊死因子受容体や神経成長因子受容体など同一の受容体ファミリーに属する膜貫通型細胞膜抗原で、Fasリガンド(FasL)や抗Fas抗体と反応することにより細胞にアポトーシスを誘導しうる。近年、ヒト全身性エリテマトーデス(SLE)類似の自己免疫現象を呈するモデル動物である *lpr*(lymphoproliferation)マウスと *gld*(generalized lymphoproliferative disease)マウスが、各々FasとFasLの遺伝子変異体であることが明らかにされ、これらのマウスではFas-FasLを介するアポトーシス機構が障害されているため、異常リンパ球の増殖、多彩な自己抗体の出現、多発関節炎や糸球体腎炎などを呈することが明らかになった。このことより、Fasを介するアポトーシスは、免疫寛容の成立に重要な役割を果たしており、その異常がSLEをはじめとするヒト自己免疫疾患の発症や病態にも関与している可能性が示唆された。しかし、現在までのところ、SLEではFasやFasL遺伝子そのものに異常は認められていない。

一方、健常人やSLE患者末梢血単核細胞を用いたFas遺伝子のRT-PCR解析では、膜型Fasの他に、選択的スプライシングによって膜貫通領域の大部分を欠損した可溶性Fas(sFas)が認められ、蛋白レベルでもsFasの存在が明らかになった。in vitroの実験ではsFasはFas-FasLを介するアポトーシスに抑制活性を有することより、SLEではsFasの異常産生がFasを介するアポトーシス機構に変調をきたし、病態に関与していることも考えられる。このため、SLEを含む各種自己免疫疾患における血清中のsFasを測定し、その臨床的意義と、SLEで検出されるsFasの構造的特徴を解析した。

[対象と方法]

健常人40例と、SLE77例、慢性関節リウマチ(RA)60例、強皮症(SSc)19例、多発性筋炎および皮膚筋炎(PM/DM)13例、原発性シェーグレン症候群(SS)34例を対象とした。SLE患者においては、SLE disease activity index(SLEDAI)スコアにもとづいて、活動期SLE(SLEDAI $\geq$ 10) 28例と非活動期SLE(SLEDAI $\leq$ 9) 49例の2群に分けて検討を加えた。

血清sFasの測定は、2種の抗Fas抗体を用いたサンドイッチ酵素標識免疫定量法(ELISA)で行った。陽性コントロールには、リコンビナント・ヒト・sFasを用いた。

[結果]

まずはじめに、sFasの測定に用いる抗Fas抗体の組み合わせを検討した。detector抗体にビオチン化抗Fasモノクローナル抗体(DX2)を用いた場合、capture抗体には各種抗Fasモノクローナル抗体(CH11、UB2、ZB4、DX3)のうち、DX3を用いた場合にのみ、sFasは測定可能であった。また最近、可溶性FasL(sFasL)の存在が明らかにされ、実際に各種疾患の血清中にsFasLが検出されている。このため、DX3とDX2を用いたsFas測定法に与えるsFasLの影響を検討した。陽性コントロールに用いたりコンビナント・ヒト・sFasの希釈系列をあらかじめ、リコンビナント・ヒト・sFasLと十分反応させた場合と、sFasLを反応させなかった場合の測定値を比較したところ、両者のsFasレベルはほぼ一致したことより、われわれのsFas測定法はsFasLの影響を受けないことが明らかになった。以下に、本測定法を用いた健常人と各種自己免疫疾患患者の血清sFasレベルの解析結果を示す。

- 1) sFasレベルが健常人($0.22 \pm 0.25 \text{ ng/ml}$)より有意に高値だったのはSLE($0.87 \pm 1.54 \text{ ng/ml}$)($P < 0.001$)のみであった。
- 2) SLEのsFasレベルは、RA($0.38 \pm 0.81 \text{ ng/ml}$)($P < 0.001$)、SSc($0.24 \pm 0.27 \text{ ng/ml}$)($P = 0.006$)、SS($0.31 \pm 0.37 \text{ ng/ml}$)($P = 0.004$)より有意に高値だった。
- 3) 活動期SLE(SLEDAI ≥ 10) 28例と非活動期SLE(SLEDAI ≤ 9) 49例のsFasレベルを比較したところ、活動期SLEのsFasレベル($1.58 \pm 2.36 \text{ ng/ml}$)は、非活動期SLE($0.46 \pm 0.40 \text{ ng/ml}$)より有意に高値($P = 0.011$)だった。
- 4) 健常人のsFasレベルの平均+3SD(0.98 ng/ml)より高値を示した例をsFas陽性とする、活動期SLE患者のsFas陽性頻度(39.3%)は非活動期SLE(8.2%)($P = 0.002$)、RA(11.7%)($P = 0.005$)、SSc(0%)($P = 0.001$)、PM/DM(0%)($P = 0.008$)、SS(2.9%)($P < 0.001$)より有意に高かった。
- 5) sFas陰性SLEとsFas陽性SLEにおける各種臨床検査成績を比較したところ、sFas陽性SLEでは有意に、SLEDAI($P = 0.004$)、抗核抗体($P = 0.026$)、抗DNA抗体($P < 0.001$)が高値で、白血球数($P = 0.004$)、ヘモグロビン濃度($P = 0.004$)、C3($P = 0.011$)、C4($P = 0.042$)が低値を示した。
- 6) 活動期SLE患者の治療経過とsFasレベルの変動を検討したところ、SLE再燃時に高値を示していたsFasレベルが、ステロイド治療後、赤沈(ESR)、抗DNA抗体、CH50やSLEDAIなど、臨床所見の改善とともに低下した。

次に、SLEで検出されるsFasの構造的特徴を検討した。本測定法で用いたDX3とDX2は、ともにFasの細胞外領域の異なったエピトープを認識する抗Fasモノクローナル抗体であるが、各々のSLE患者において、このDX3とDX2の組み合わせによるELISAと、DX3と細胞内領域を認識する抗Fasポリクローナル抗体(aFasC)の組み合わせによるELISAを用いた場合のsFasの測定値を比較した。その結果、2種類の測定法によるsFasレベルには良好な相関関係が認められた。このことより、SLEで検出されるsFasの大部分が選択的スプライシングにより膜貫通領域を欠損し、細胞内領域を保持しているsFasであると考えられたが、DX3とDX2の組み合わせによるELISAでは高値を示したが、DX3とaFasCの組み合わせによるELISAではsFasが検出されない例も少数ながら認められた。この実験結果はSLEで検出されるsFasの一部に、aFasCが認識する細胞内領域部を欠損しているsFasの存在を示唆しており、SLEで認められるsFasが複数の機序により出現する可能性も考えられた。

考案

SLEでは、健常人や他の自己免疫疾患患者より有意に血清sFasレベルが高値を示し、特に、活動期SLEで高値だった。また、sFasレベルは、SLEの活動性を評価する上で重要な臨床検査成績と有意な相関を示したことより、sFasレベルの測定はSLEの活動性指標や治療効果判定に有用であると考えられた。また、SLEで検出されるsFasの大部分は、選択的スプライシングにより膜貫通領域を欠損した分泌型Fasと考えられたが、細胞内領域を欠損しているsFasの存在も示唆され、SLEで認められるsFasが複数の機序により出現する可能性も考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 吉 木 敬

副 査 教 授 小野江 和 則

副 査 教 授 小 池 隆 夫

学 位 論 文 題 名

Serum levels of soluble Fas/APO-1(CD95)and its molecular structure in patients with systemic lupus erythematosus(SLE)and other autoimmune diseases.

(全身性エリテマトーデス (SLE) およびその他の自己免疫疾患における血清可溶性 Fas/ APO-1 (CD95) レベルとその構造的特徴)

本学位論文は、SLE、特に活動期SLEにおいて、血清可溶性Fas(sFas)レベルが高く、臨床所見と良好な相関関係を認めたことより、血清sFasレベルがSLEの活動性指標や治療効果判定に有用である可能性を示すとともに、SLEで検出されるsFasの構造的特徴についても解析したものである。論文内容の発表後、主査、副査の各教授から以下の質問がなされた。

- (1)生体の免疫機構におけるsFasの生理的あるいは病因的意義。
- (2)SLEでみられる白血球減少におけるsFasの意義。
- (3)近年報告された、Fas遺伝子異常を有する、ヒト自己免疫性リンパ球増殖症候群の病態と、SLEにおけるFasを介するアポトーシス異常による病態の相違点。
- (4)SLE血清中で検出されるエクソン6欠損型Fasの産生機序。
- (5)SLEの末梢血単核細胞における膜型Fas mRNA発現とsFas mRNA発現との関係。
- (6)学位申請者の用いたsFas測定系において、血清中の可溶性Fasリガンド(sFasL)の存在がsFasレベルに影響を及ぼさない理由。
- (7)活動期SLE血清中で検出される高濃度のsFasは、SLEの病因として機能しているのか、あるいはSLE病態の結果、二次的に産生されるのか。
- (8)健常人におけるsFasの生理的機能。
- (9)SLE血清中において高濃度に検出されるsFasの産生臓器(細胞)。
- (10)血清以外の、関節液や髄液などの試料におけるsFasの測定結果。
- (11)sFasによる、Fasを介するアポトーシスに対する抑制機序。
- (12)最近報告された、sFas変異体について。

以上の各々の質問に対して、学位申請者は以下のように回答した。

- (1)sFasは、Fasを介するアポトーシス機構に対する抑制因子として機能し、その過剰産生は、自己反応性リンパ球のアポトーシス不全を引き起こして自己寛容を破綻させ、自

己免疫疾患の病因となり得ると考えられる。

(2)過剰産生されたsFasが、Fasを介する自己反応性リンパ球のアポトーシス不全を引き起こし、自己白血球に対する免疫応答を惹起し、白血球減少に関与している可能性が考えられる。

(3)自己免疫性リンパ球増殖症候群は、Fas遺伝子異常に基づく先天性疾患であり、異常リンパ球の非腫瘍性増殖や著明な全身リンパ節腫脹を呈する、*lpr*マウスに類似した病態を呈するのに対し、SLEはFas遺伝子そのものには異常を認めない後天性疾患であり、臨床像にも明らかに相違がみられる。

(4)エクソン6の選択的スプライシングによって、エクソン6のコードする膜貫通領域のみを欠損した蛋白として血清中に分泌される。

(5)健常人末梢血単核細胞では、膜型Fas mRNA発現とsFas mRNA発現にほぼ相関が見られ、何らかの調節機構が働いていることが示唆されるのに対し、SLE末梢血単核細胞ではそのような相関関係はみられず、sFas mRNAの発現が異常亢進している例が認められる。膜型Fas mRNAとsFas mRNA発現の調節機構に関しては現段階では全く解明されていない。

(6)sFasとsFasLが血中で結合し、複合体を形成しうる可能性が考えられるが、実際には明らかにされていない。本測定系では、sFasLの存在下においても、sFasと二種の抗Fas抗体との結合能が障害されなかったため、sFasレベルの測定に影響が生じなかったことが考えられる。

(7)sFasが*in vitro*実験で、Fasを介するアポトーシスに対し抑制活性を有すること、正常マウスにsFasを注射した際に、自己免疫現象がみられること、自己免疫性リンパ球増殖症候群患者に、sFasの認められる例のあることなどから、sFasがSLEの病因として機能していることが考えられる。ただし、今回の研究では、*in vivo*における解析は行っていないため、SLEにおいて、sFasが実際にどのような病因的意義を有しているかは明らかにはできなかった。

(8)sFasの生理的機能は明らかではない。ただし、大部分の健常人では、血清中に有意なsFasの上昇は認められなかった。

(9)Fasは、全身の臓器・細胞で発現している。しかし、sFas mRNAは末梢血単核細胞と肝臓で特に高発現している。このため肝臓もsFasの主要な産生臓器である可能性が考えられる。しかし、SLEにおいては末梢血単核細胞でのsFas mRNAの発現と血清sFasレベルにほぼ相関がみられることなどから、SLEの血清中に検出されるsFasの由来としては、末梢血単核細胞が第一に考えられる。

(10)慢性関節リウマチ患者関節液中のsFasレベルが、変形性関節症患者関節液より高値を示した。

(11)sFasがFasLと結合し、膜型FasとFasLとの結合を阻害する可能性と、sFasが膜型Fasの細胞外領域と結合し、細胞膜上での膜型Fasの三量体形成を阻害することにより、膜型FasとFasLの結合によるアポトーシス・シグナルの伝達を抑制する可能性の二つが考えられているが、不明な点が多い。

(12)sFasには、エクソン6欠損型Fasの他に、スプライシング異常により複数種の構造の異なる機能性の可溶性Fasが産生されることが明らかになってきている。われわれも最近、SLEの末梢血単核細胞からエクソン3,4,6欠損型Fasのクローニングを初めて行った。SLE病態にsFasが関与しているのであれば、このような可溶性Fas変異体の定量解析も必要と考えられる。

以上、いずれの質問に対しても、学位申請者は自らの実験結果や豊富な知識に基づいて明解に回答した。

最後に副査小野江和則教授から、SLEの肝臓におけるsFasの発現解析の必要性についての助言があった。

本学位論文は、SLEにおけるsFasの臨床的意義に関して、多数のSLE患者を用いた、はじめての詳細な解析結果を示し、SLE病態にsFasが関与している可能性を示唆したものである。審査員一同は、この研究成果を高く評価し、また学位申請者が研究者として誠実かつ熱心であり、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。