膠原病における進歩と今後の展望

—— 全身性エリテマトーデス患者自己抗体産生細胞の アポトーシス回避機構の解析とその是正 ——

鈴木 登*

mini review

INFLAMMATION AND REGENERATION

The mechanism responsible for escape from immune surveillance of autoantibody secreting B cells in patients with SLE

Fas and Fas ligand (FasL) have been assigned a pivotal role for the development and maintenance of peripheral tolerance. Mice having defects in Fas and FasL develop lupus like symptoms. In this study, we have studied FasL expression of peripheral blood lymphocytes in patients with systemic lupus erythematosus (SLE). Expression of FasL was not or very weakly detected in the freshly isolated PBMC in normal individuals. In contrast, freshly SLE PBMC exhibits enhanced expression of FasL without *in vitro* stimulation. Not only purified T cells but also purified B cells expressed FasL on their cell surface spontaneously in patients with SLE. Anti-DNA antibody secreting B cells were purified by using biotin labeled DNA and streptavidin-bead, and the freshly isolated anti-DNA autoantibody secreting B cells express FasL spontaneously. Thus autoreactive B lymphocytes that aberrantly express FasL would kill Fas+immunoregulatory T lymphocytes. The aberrantly expressed FasL on B cells would, at least partly, facilitate escape of the autoreactive B cells from immune tolerance system, and may contribute sustained secretion of autoantibodies in patients with SLE.

Rec. 6/21/2001, Acc. 7/17/2001, pp 635~638

Noboru Suzuki*

key words : Fas, Fas ligand, systemic lupus erythematosus (SLE), anti-DNA antibody

全身性エリテマトーデス (SLE) は、全身性自己免疫病の原型的な疾患で、抗 DNA 抗体をはじめとして多彩な自己抗体の出現を特徴とする¹⁾。自己抗体とそれにより生じる免疫複合体の沈着は補体の活性化を引き起こし、腎臓をはじめとして多臓器に炎症性病変を惹起する。ヒト SLE では自己反応性リンパ球の存在が認められ、これに免疫調節性 T 細胞の機能低下が加わり、その結果として自己反応性リンパ球の過剰な活性化により自己抗体の産生が誘導される¹⁾。ヒト SLE では、この

自己反応性リンパ球の除去あるいは抑制のステップに基本となる異常が存在すると考えられる。

アポトーシスと Fas/Fas リガンド (FasL) 系

アポトーシスは、個体の発生や生体の恒常性の維持に重要な役割を果たしており、アポトーシスの誘導には Fas (Apo. 1/CD 95) をはじめさまざまな刺激が関わっている。Fas は、抗 Fas 抗体の対応抗原として、それを発現する細胞にアポトーシスを誘導する蛋白として発見された、膜貫通領域を一つ有する TNF/NGF 受容体スーパーファミリーに属する I 型膜貫通蛋白質である^{2,3)}。

* Department of Immunology and Medicine, St. Marianna University School of Medicine 聖マリアンナ医科大学免疫学・病態動物学教室

図1 Fas/Fas ligand を介したアポトーシス

Fas はアポトーシスの誘導に必須である死の領域 (death domain) をもつ。この death domain に FADD あるいは MORT 1 とよばれるアダプター蛋白が会合する。この FADD にカスパーゼ 8 (FLICE, MACH) が会合する。カスパーゼ 8 は下流に位置するカスパーゼをつぎつぎと活性化する。活性化されたカスパーゼがその基質である種々の蛋白質を分解することで、DNA の断片化、核の濃縮など、アポトーシスに特有の細胞の変化を引き起こす (図 1)。

Fas 抗原は胸腺での自己反応性リンパ球の除去の過程や末梢でのトレランスの維持に重要な働きをする。FasL は、TNF ファミリーと相似性をもった Fas の生理的リガンドで、Fas 陽性細胞を

傷害する細胞傷害性 T 細胞 (CTL) から FasL の mRNA が単離された⁴⁾。lpr (lymphoproliferation) マウスや gld (generalized lymphoproliferative disease) マウスでは、それぞれ Fas 抗原あるいは FasL の遺伝子に異常が存在し、そのため Fas/FasL システムを介したアポトーシスの誘導がおこらず、自己反応性リンパ球の生存を許し、結果として SLE 類似の病態を引き起こす⁴⁻⁶⁾。すなわち、アポトーシスの誘導に関わる Fas や FasL の異常が SLE の病因・病態と深く関わっていることが、モデル動物の成績から示唆されている。

そこで、ヒト SLE においても Fas 抗原あるいは FasL の異常がその病因、病態に関与しているのかは多くの臨床家の注目を集めている。しかし、ループスマウスと異なり、ヒトにおいてはごく一部の症例において Fas や FasL 遺伝子の異常が報告されているのみである⁸⁻¹⁰⁾。大部分の SLE 症例において Fas や FasL 遺伝子自体には異常はみられない。ここでは、SLE 患者リンパ球での FasL 発現を検討した筆者らの成績を中心に SLE の病因・病態形成におけるヒト FasL の役割を考察する。

SLE 患者リンパ球での FasL 発現の検討

Elkon らは、SLE 患者リンパ球での FasL 発現とその機能は正常者とくらべて大きな異常はないと報告した¹¹⁾。一方、Tsokos らは、SLE 患者 T リンパ球では FasL 発現が亢進し、SLE 患者リンパ球でのアポトーシス亢進に関わっていると報告している¹²⁾。筆者らは、RT-PCR 法によって SLE 患者リンパ球での FasL mRNA の発現を検討した。リンパ球分離直後の正常者リンパ球では FasL mRNA の発現がほとんど認められず、PHA 刺激により 3 時間後に FasL mRNA の発現が誘導され、この発現は 24 時間後も継続した。

一方、SLE 患者では正常者とは異なり、分離直後の非刺激状態のリンパ球において FasL mRNA の発現が明らかに亢進していた。このことは、抗ヒト FasL 抗体を用いたウエスタンブロットによ

図2 SLE患者B細胞をビオチン標識DNAと反応させたあと、ストレプトアビジン-ビーズを加え磁力を用いて精製した。RNAを回収後RT-PCR法でFasL mRNAの発現を評価した。

る蛋白レベルでの検討によっても認められた。すなわち、正常者リンパ球では分離直後にはFasLはほとんど発現しておらず、PHA刺激に反応して強いFasL蛋白の発現が誘導された。FasL蛋白の発現は3~6時間でほぼピークに達し、その後24時間でFasL発現は低下した。これに対して、SLE患者リンパ球では非刺激時でFasLが高いレベルで発現していた。この発現はPHA刺激を加えても増強されることはなく、むしろ逆に培養時間とともに減弱していった。これまでの検討から正常者では全例で分離直後ではFasL発現は認められず、PHA刺激後3時間ないし6時間においてFasL蛋白の発現が誘導されたのに対し、SLEでは全例で非刺激時にFasL蛋白の発現亢進を認めた。

この成績から正常者リンパ球では抗原刺激に対しFasLの発現が厳密に規定されているのに対し、SLE患者リンパ球ではFasLの発現調節に異常が存在することは明らかになった。

そこでSLE患者リンパ球サブセットでのFasL発現を検討した。SLE患者では、非刺激時の

図3 Fasリガンド過剰発現によるSLE患者B細胞の免疫調節からのエスケープ(immune privilege 類似の状態)

T細胞分画では弱いFasL発現を認めるのみだが、非刺激B細胞分画では強くFasLが発現されていた。SLE患者単球でも弱いFasL発現を認めた。つぎに、これらSLE患者リンパ球サブセットを24時間培養し、可溶性FasLを含む培養上清がFas抗原陽性細胞にアポトーシスを誘導するか検討した。SLE患者非刺激T細胞分画と単球分画では弱いアポトーシスの誘導を認めたただけだが、非刺激B細胞分画は強くアポトーシスを誘導した。SLE患者B細胞が*in vivo*でFasLを発現していることは、あるいは、SLE患者B細胞の培養上清がFas抗原陽性T細胞を積極的にアポトーシスに陥れたことは、SLE患者B細胞はT細胞による免疫調節機構から逃れることができることを示している。精巣や角膜のようにいわゆる免疫特権 (immune privilege) の状態にあると推定される。

さらにSLE患者B細胞を抗DNA抗体産生B細胞とそれ以外の特異性のB細胞とに分画し、それぞれのサブポピュレーションにおけるFasL発現をRT-PCR(図2)と免疫化学的に同定した。すると抗DNA抗体産生B細胞では、FasLを優先的に発現すること、抗DNA抗体以外を産生する

B細胞では、FasLの発現はむしろ低下していることが明らかになった。免疫調節に働くTリンパ球のほとんどは、Fasを発現すると考えられることから、自己抗体産生B細胞はFasLを発現・分泌することで免疫調節機構から優先的に逃れると考えられる(図3)。

臨床的にはしばしば、血中IgGは低値であるにもかかわらず抗DNA抗体高値が持続する場合が認められる。あるいは、この成績はSLE患者自己抗体産生Bリンパ球が優先的にアポトーシスから逃れ、自己抗体産生を持続するメカニズムの少なくとも一部を説明しているのかも知れない。

おわりに

Fas/FasLシステムが誘導するアポトーシスは、ヒトにおいて末梢の免疫寛容の維持に重要な役割を果たしている。しかし、SLE患者では自己抗体産生Bリンパ球はFasLを発現することで免疫特権(immune privilege)を獲得し、免疫調節細胞をアポトーシスに誘導することで免疫調節機構から逃れていることが示唆された。今後、このようなimmune privilegeな細胞にアポトーシスを誘導できる手法の開発が望まれる。現在、筆者らはアンチセンスDNAを用いてFasL発現を低下させ、それが抗DNA抗体産生の抑制に結びつくのかを検討している。

本研究は聖マリアンナ医科大学免疫学研究室の多くの先生方との共同研究である。

文 献

- 1) 坂根 剛, 鈴木 登: SLE発症の細胞免疫学的機序. Annual Review 免疫 1987. 菊池浩吉, 矢田純一, 奥村 康編. 中外医学社. 1987, p 291-311.
- 2) Nagata S: Fas and Fas ligand: a death factor and its receptor. Adv Immunol 57: 129-144, 1994.
- 3) Itoh N, Yonehara S, Ishii A, Yonehara M, Mizushima S, Sameshima M, Hase A, Seto Y, Nagata S: The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. Cell 66: 233-243, 1991.
- 4) Suda T, Takahashi T, Golstein P, Nagata S: Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. Cell 75: 1169-1178, 1993.
- 5) Nagata S, Suda T: Fas and Fas ligand: lpr and gld mutations. Immunol Today 16: 39-43, 1995.
- 6) Drappa J, Brot N, Elkon KB: The Fas protein is expressed at high levels on CD4+CD8+ thymocytes and activated mature lymphocytes in normal mice but not in the lupus-prone strain, MRL lpr/lpr. Proc Natl Acad Sci USA 90: 10340-10344, 1993.
- 7) Takahashi T, Tanaka M, Brannan CI, Jenkins NA, Copeland NG, Suda T, Nagata S: Generalized lymphoproliferative disease in mice, caused by a point mutation in the Fas ligand. Cell 76: 969-976, 1994.
- 8) Wu J, Wilson J, He J, Xiang L, Schur PH, Mountz JD: Fas ligand mutation in a patient with systemic lupus erythematosus and lymphoproliferative disease. J Clin Invest 98: 1107-1113, 1996.
- 9) Rose LM, Latchman DS, Isenberg DA: Apoptosis in peripheral lymphocytes in systemic lupus erythematosus: a review. Br J Rheumatol 36: 158-163, 1997.
- 10) Mysler E, Bini P, Drappa J, Ramos P, Friedman SM, Krammer PH, Elkon KB: The apoptosis-1/Fas protein in human systemic lupus erythematosus. J Clin Invest 93: 1029-1034, 1994.
- 11) McNally J, Yoo DH, Drappa J, Chu JL, Yagita H, Friedman SM, Elkon KB: Fas ligand expression and function in systemic lupus erythematosus. J Immunol 159: 4628-4636, 1997.
- 12) Kovacs B, Liossis SN, Dennis GJ, Tsokos GC: Increased expression of functional Fas-ligand in activated T cells from patients with systemic lupus erythematosus. Autoimmunity 25: 213-221, 1997.