

ヒト骨肉腫におけるFasリガンド発現とその機能に関する研究 腫瘍内浸潤細胞傷害性Tリンパ球に対するアポトーシス誘導と免疫回避への関与

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/4514

ヒト骨肉腫における Fas リガンド発現とその機能に関する研究 ：腫瘍内浸潤細胞傷害性Tリンパ球に対するアポトーシス誘導と免疫回避への関与

金沢大学大学院医学系研究科がん医科学専攻機能再建学
(旧講座名：整形外科学)
(主任：富田勝郎教授)

北 野 慎 治

Fas リガンド (Fas ligand, FasL) は活性化した細胞傷害性Tリンパ球 (cytotoxic T-lymphocyte, CTL) とナチュラルキラー細胞に発現し、腫瘍免疫において重要な役割を演ずる。最近、様々な腫瘍細胞における FasL の発現が報告され、その発現が免疫回避に関与している可能性が推測されている。本研究では、ヒト骨肉腫組織と骨肉腫細胞株を用い、骨肉腫細胞における FasL の発現を検証すると共に、免疫回避との関連について検討した。生検時に採取した骨肉腫組織20例に対して、免疫組織化学およびTUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-digoxigenin nick end labeling) 法により、骨肉腫組織における FasL 発現強度、発現率および組織内の CD8 陽性細胞数・アポトーシス細胞数を調査し、これらの因子と臨床治療成績との関連について検討した。また、20症例のうち新鮮凍結保存が可能だった3例 (OS-1, OS-2, OS-3) とヒト骨肉腫細胞3株 (OST, HOS, Saos-2) に対し、ウエスタンブロット法で FasL 蛋白の発現を検討した。更にヒト骨肉腫細胞3株においては、逆転写-ポリメラーゼ連鎖反応 (reverse transcription-PCR, RT-PCR) を用いて FasL の mRNA 発現の解析を行った。ついで骨肉腫組織 (OS-1) の新鮮凍結切片上で Fas 感受性細胞のヒト白血病細胞である Jurkat 細胞を培養し、Jurkat 細胞に対するアポトーシス誘導の有無を検討する機能解析を行った。同様の機能解析をヒト骨肉腫細胞 (OST, HOS) に対しても施行した。その結果、骨肉腫細胞では 17/20例 (85%) に FasL の発現を観察した。骨肉腫細胞に発現される FasL 蛋白の分子量は正常であり、また mRNA には構造異常は認めなかった。機能解析において、骨肉腫組織およびヒト骨肉腫細胞のいずれも Fas 感受性 Jurkat 細胞のアポトーシスを増加させ、その効果は抗ヒト FasL 中和抗体により抑制された。CD8 陽性細胞数とアポトーシス細胞数には正の相関が認められ ($r=0.746$)、アポトーシス細胞数と FasL 発現率にも正の相関が認められた ($r=0.498$)。以上より、骨肉腫細胞の大多数は FasL を発現しており、骨肉腫組織に浸潤してきた Fas 陽性 CTL が骨肉腫細胞と直接接触した際に、腫瘍表面の FasL が Fas 陽性 CTL をアポトーシスに導く攻撃を行うことにより、腫瘍免疫監視機構から回避している可能性が示された。骨肉腫細胞における FasL の発現は、臨床治療成績とは相関しなかったが、FasL 発現形質の獲得は骨肉腫発生早期に生じる現象で、骨肉腫のごく初期の発生段階および転移形成において重要な役割を果たしていると考えられた。

Key words apoptosis, Fas ligand, immune evasion, osteosarcoma, tumor-infiltrating cytotoxic T lymphocyte

分子量40kDのII型膜貫通型蛋白である Fas リガンド (Fas ligand, FasL) は、Fas 受容体 (以下 Fas) に結合し細胞にアポトーシスシグナルを伝達する¹⁾²⁾。FasL は、抗原認識を契機に活性化された細胞傷害性T細胞 (cytotoxic T-lymphocyte, CTL) の細胞膜表面上に表出し、Fas-FasL 結合を介しウイルス感染細胞や癌細胞等の標的細胞をアポトーシスに誘導する際のエフェクター分子としての役割を担っている。一方、FasL は活性化Tリンパ球や自己反応性リンパ球をアポトーシスに誘導し、過剰な免疫反応を抑制し免疫系の恒常性を維持するという重要な役割も担っていることが明らかになってきた³⁾。元来、FasL は、T細胞系の細胞に発現すると考えられていた。しかし、最近では、免疫寛容部位と呼ばれる角膜や精巣等の免疫応答の起こりにく

い組織での恒常的な発現が明らかにされた⁴⁾⁵⁾。これらの組織は、FasL を発現することにより Fas 陽性リンパ球にアポトーシスを誘導し、リンパ球による攻撃から回避している可能性が推測されている⁴⁾⁵⁾。

FasL は、活性化CTLとナチュラルキラー細胞に発現し、腫瘍免疫において重要な役割を演ずる。しかし、腫瘍細胞の多くは、細胞膜表面上での Fas 蛋白の欠損、アポトーシス抑制分子である bcl-2 ファミリーの過剰発現⁶⁾、Fas の細胞内領域 death domain の変異⁷⁾⁸⁾、Fas のアポトーシスシグナルをブロックする FAP-1⁹⁾¹⁰⁾ や Decoy 受容体¹¹⁾¹²⁾ の過剰発現、Fas の細胞質内へのトラッピング¹³⁾ 等の“Fas 機能の喪失”により免疫攻撃から回避していることが報告されている。更に最近、ヒト肺癌¹⁴⁾ を

平成15年1月8日受付、平成15年2月24日受理

Abbreviations : CTL, cytotoxic T-lymphocyte; DAB, 3,3'-diaminobenzidine; FasL, Fas ligand; FBS, fetal bovine serum; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase; RT-PCR, reverse transcription-polymerase chain reaction; TUNEL, terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-digoxigenin nick end labeling

含めた幾つかの腫瘍あるいは腫瘍細胞^{15)~20)}では、腫瘍細胞が自ら FasL を発現し、腫瘍浸潤性 Fas 陽性 CTL をアポトーシスに誘導することにより積極的に免疫監視機構から回避している可能性が提唱されている。術前化学療法導入により、近年、骨肉腫の治療成績は飛躍的に向上した。しかし、転移のために不幸な結果となる症例も依然少なくなく、骨肉腫の転移機構の解明が整形外科腫瘍学における最重要課題の一つである²¹⁾。本研究では、外科的に切除されたヒト骨肉腫とヒト骨肉腫細胞株を用い、骨肉腫の転移機構に関する研究の一環として、ヒト骨肉腫における FasL の発現とその機能を明らかにすることを目的とした。

対象および方法

I. 対象症例

当教室において治療された骨肉腫 20 例の生検材料を対象とした。対象患者の平均年齢は 17.2 歳、性別は男性 12 例、女性 8 例、病期別 (Enneking の病期分類)²²⁾²³⁾では、stage IIB (初診時に遠隔転移を認めないもの) 16 例、stage IIIB (初診時に遠隔転移を認めるもの) 4 例であった。手術的に切除された骨肉腫組織を 4% パラフォルムアルデヒドで 4℃、16 時間固定した。エタノールによる脱水、パラフィン包埋後 4μm の連続切片を作成した。

20 症例のうち新鮮保存可能であった 3 例 (OS-1, OS-2, OS-3) については生検手術直後に腫瘍組織の一部を RNase フリーのサンプルチューブ内あるいは OCT compound (三共, 東京) 包埋し、速やかに液体窒素にて凍結し -80℃ に保存した。

II. 実験に用いた培養細胞株

ヒト骨肉腫細胞 OST, HOS, Saos2 の 3 株を検討に用いた。OST については当教室で継代培養したものを用い、HOS と Saos2 については米国標準培養株保存機関 (Rockville, USA) より入手した。各細胞株は、加熱失活処理した 10% 仔牛胎児血清 (fetal bovine serum, FBS) (大日本製薬, 大阪), 100 単位 (unit, U)/ml ペニシリン (萬有製薬, 東京), 100μg/ml ストレプトマイシン (明治製薬, 東京) を含んだダルベッコ変法イーグル培地 (Dulbecco's modified Eagle's medium) (日本製薬, 東京) を用いて、湿潤 37℃, 5%CO₂ の条件下で培養した。細胞浮遊液の調整にはトリプシン溶液を用いた。

Fas 感受性細胞としてヒト白血病細胞である Jurkat 細胞を用いた。Jurkat 細胞は東北大学加齢医学研究所 (仙台) から入手した。培地は, RPMI1640 (Gibco, Grand Island, USA) を使用し、骨肉腫細胞と同様に、加熱失活処理した 10%FBS (大日本製薬), 100U/ml ペニシリン (萬有製薬) 100μg/ml ストレプトマイシン (明治製薬) を加え、湿潤 37℃, 5%CO₂ の条件下で培養した。

III. 免疫組織化学

1. FasL

骨肉腫組織における FasL 蛋白の発現を、4% パラフォルムアルデヒド固定パラフィン包埋材料の切片を用い、ストレプトアビジン・ビオチン複合体 (streptavidin-biotin complex) 法にて解析した。脱パラフィン後、室温にて 0.3% 過酸化水素水を加えたメタノール液で 10 分間内因性ペロキシダーゼ活性を除去した後、0.01M クエン酸緩衝液 (pH6.0) 中でのオートクレーブ処理 (121℃, 10 分) により、抗原の賦活化を行った。10% 正常ウサギ血清 (ニチレイ, 東京) により非特異的反応を除去した後、抗ヒト FasL マウスモノクローナル抗体 (1μg/ml, Transduction

Laboratories, Lexington, USA) を用いて 4℃, 16 時間反応させた。二次抗体としてビオチン化抗マウス IgG+IgA+IgM ウサギ抗体 (ニチレイ) を使用し、発色には 3,3'-ジアミノベンチジン (3,3'-diaminobenzidine, DAB) を用いた。陰性対照としては、一次抗体の代わりに同様な濃度に希釈した非免疫マウス IgG あるいは PBS を反応させた。骨肉腫細胞における FasL の発現率は、対物×20 レンズで代表的数視野を観察し、骨肉腫細胞 200 個中の FasL 陽性細胞をカウントしてその百分率を求めた。また FasL の染色強度を強陽性 (++)、陽性 (+)、陰性 (-) の 3 段階に分けて評価した。これらの陽性細胞率・染色強度に関して、臨床病理学的因子 (性別, 組織型, 臨床病期, 遠隔転移, 化学療法の効果) に対する関連性の有無を検討した。

2. CD8

骨肉腫組織中に存在する CTL とナチュラルキラー細胞を検出するため、それらに特異的に発現される CD8 に対する免疫染色を行った。内因性ペロキシダーゼ処理後、標本賦活化用タンパク分解酵素緩衝液 (target retrieval solution) (ダコ・ジャパン, 京都) 中で 95℃, 30 分間の抗原賦活化を行った。一次抗体として抗 CD8 抗体 (20μg/ml, ダコ・ジャパン) を用いた。CD8 陽性細胞は対物×20 レンズにおける各々代表的 10 視野を写真撮影し、陽性細胞数を計測した。

IV. TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-digoxigenin nick-end labeling) 染色

CD8 に対する免疫染色の隣接切片で生体内局所 アポトーシス検出キット (Oncor, Gaithersburg, USA) を使用し TUNEL 法による DNA 3' 末端標識を行った。脱パラフィン組織切片をプロテインナーゼ K (20mg/ml, Boehringer-Mannheim, Mannheim, Germany) による蛋白消化後、末端デオキシスクレオチド転移酵素 (terminal deoxynucleotidyl transferase) を 37℃, 1 時間反応させた。反応停止後、ペロキシダーゼ標識抗ジゴキシゲニン抗体と反応させ DAB で発色した。陽性対照としてヒト扁桃を用いた。対物レンズ×20 を用い CD8 に対する免疫染色と同様に各々 10 視野を写真撮影し、TUNEL 標識リンパ球数を計測した。各症例における TUNEL 標識リンパ球数に対する CD8 陽性細胞数、臨床病理学的因子および FasL 染色強度・染色率との関連も各々検討した。

V. ウエスタンブロット法による FasL 蛋白発現の解析

凍結腫瘍組織および骨肉腫培養細胞から lysis 緩衝液 [50mM Tris-HCl (pH7.5), 10% グリセリン, 5mM 酢酸マグネシウム, 0.2mM EDTA, 1% SDS] で蛋白抽出を行った。抽出した蛋白をプロテインアッセイキット (Bio-Rad laboratories, Richmond, USA) にて定量後、10μg 相当を 15% ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動で展開し、ニトロセルロース膜へ転写した。転写膜を抗 FasL マウスモノクローナル抗体 (1μg/ml, Transduction Laboratories) と 37℃, 1 時間反応させた後、HRP (horse radish peroxidase) 標識抗マウス IgG 抗体 (ダコ・ジャパン) と反応させ、化学発光基質キット (Super Signal, Pierce, Rockford, USA) を用い感光フィルムへ露光し検出した。陽性対照として精製ヒト FasL (Transduction Laboratories) を用いた。

VI. 逆転写-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 法による FasL mRNA 発現の解析

骨肉腫培養細胞 1x10⁷ から RNA 抽出キット (Isogen, ニッポンジーン, 富山) を用い全 RNA を抽出し、DNase 処理後、逆転写酵素 (Promega, Madison, USA) により cDNA 合成を行った。

合成した cDNA にセンスおよびアンチセンスプライマー、TaqEx DNA ポリメラーゼ (Takara, 大津) および基質を加え DNA 増幅器 (MJ Research, Watertown, USA) を用い DNA を増幅した。ヒト FasL 遺伝子特異的プライマーとしてはセンスプライマー: 5'-GTTCTGGTTGCCTTGGTAGG-3', アンチセンスプライマー: 5'-TAAGATTGAACACTGCCCC-3' を用い, 94 °C 30 秒, 55 °C 30 秒, 72 °C 1 分 30 秒の条件で 40 サイクルの反応を行った。各々の PCR 産物は 1.5% アガロースゲルにて電気泳動し 臭化エチジウムで染色後, 紫外線照射下に観察し発現を解析した。RT-PCR の陽性コントロールとしてグリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素 (glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase, GAPDH) の遺伝子発現をセンスプライマー: 5'-CCACCCATGGCAAATTCATGGCA-3' およびアンチセンスプライマー: 5'-TCTAGACGGCAGGTCAGGTCCACC-3' を用いた PCR を行った。

アガロースゲルから PCR 産物を抽出し, pGEM-T-easy (Promega) にクローニングし, シークエンス解析によりヒト FasL mRNA の特異的発現であることを確認した。

Ⅶ. 骨肉腫組織に発現される FasL の機能解析

新鮮凍結組織切片上での Fas 感受性 Jurkat 細胞を用いた FasL の機能解析を Strand ら¹⁷⁾ の方法に従い施行した。先ず, 実験に用いた Jurkat 細胞が Fas 感受性であることを抗 Fas 抗体

(Pharmigen, San Diego, USA) を用いたアポトーシス誘導により確認した後, 以下の検討を行った。

1. 新鮮凍結骨肉腫組織切片上での Jurkat 細胞に対するアポトーシス誘導

5 μm, 約 10 × 10 mm 大の新鮮凍結組織切片 (OS-1 を使用) を清潔下に作製し, 直ちに 2 × 10⁴ 個の Jurkat 細胞を含む RPMI1640 200 μl を滴下し CO₂ インキュベーターで 37 °C, 6 時間培養した。その後培養液を回収し, 室温 1500 rpm, 5 分間遠沈後, ベレットをスライドガラス上に滴下, 風乾した。風乾固定後, DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole) (Sigma Chemical Co, St. Louis, USA) を用い室温にて 30 分間染色し, 蛍光顕微鏡で観察したのち対物レンズ x 20 で代表的視野数視野を写真撮影した。200 個の Jurkat 細胞を観察し, そのアポトーシス誘導率を計測した。各症例とも同条件で 3 回実験を行い, その平均値 ± 標準偏差を比較した。対照として新鮮凍結切片を塗布しないスライドのみによる検討も加えた。

2. ヒト骨肉腫細胞上での Jurkat 細胞に対するアポトーシス誘導

マイクロプレート上に骨肉腫細胞 (HOS を使用) がコンフルエントとなるまで培養した後, 凍結切片で行った方法と同様に骨肉腫細胞上で Jurkat 細胞を滴下・培養し, アポトーシス誘導率を計測した。また HOS の Fas 感受性を調べるため, HOS に

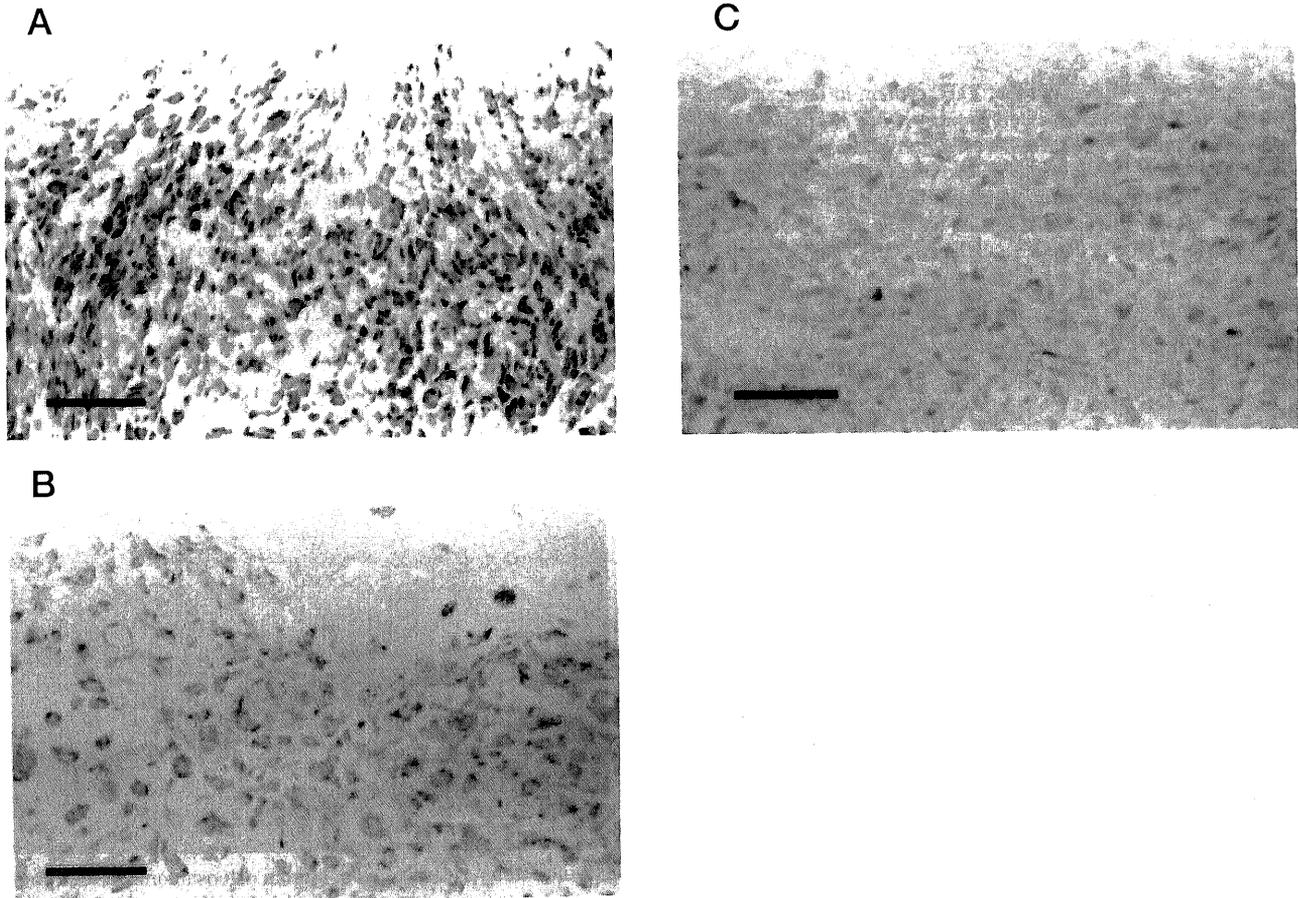


Fig. 1. Immunohistochemical staining of FasL in the human osteosarcoma tissue sections. (A) strongly positive expression (++) , (B) constantly positive expression (+) , (C) negative expression (-) . Scale bar: 200 μm.

抗Fas抗体を加えて培養し、そのアポトーシス誘導率を計測した。

3. 抗ヒトFasL中和抗体を用いたアポトーシス誘導の抑制

Jurkat細胞に誘導されるアポトーシスがFas/FasL系を介した反応であることを確認するため、抗ヒトFasL中和抗体であるNOK1 (4 μ g/ml, PharMingen) を培養液に加え抑制試験を行った。

Ⅷ. 統計学的解析

FasL染色強度と各臨床病理学的因子との関連はFisherの直接確率法を用いて分析した。また、各臨床病理学的因子とFasL陽性率との有意差およびJurkat細胞を使用したアポトーシス誘導の実験での2群間の有意差はMann-Whitney U検定を用いて判定し、測定値はすべて平均値 \pm 標準偏差 ($\bar{x} \pm SD$) で示した。相関の有意性の検定は、Pearsonの相関係数を求めて行った。いずれも危険率が5%未満の場合 ($p < 0.05$) を統計学的に有意差ありと判定した。

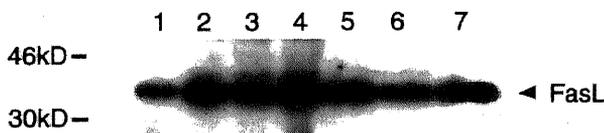
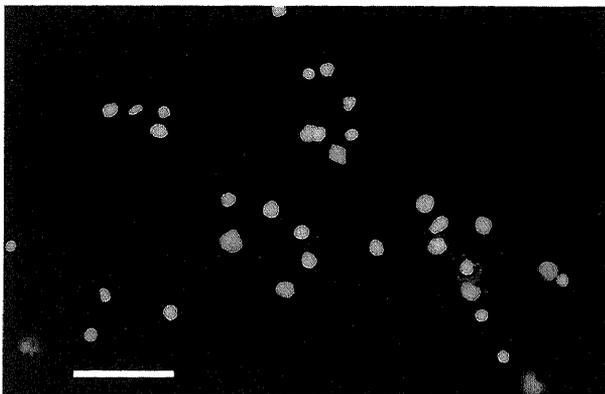


Fig. 2. Western blot analysis of FasL protein in osteosarcoma tissues and cell lines. Cell lysates were loaded on 15% polyacrylamide gel electrophoresis, thereafter protein bands were transferred onto nitrocellulose membrane, and detected by anti-FasL mouse monoclonal antibody. Lane 1, positive control sample (human endothelial lysate); lane 2, OS-1; lane 3, OS-2; lane 4, OS-3; lane 5, HOS; lane 6, OST; lane 7, Saos-2.

A



成 績

I. 骨肉腫組織におけるFasL蛋白の発現

1. FasLに対する免疫染色

抗FasL抗体を用いた免疫染色にて、骨肉腫組織の細胞膜あるいは細胞質に、様々な染色強度でFasLの発現を認めた [図1 (A: 強陽性, B: 陽性, C: 陰性)]. 陰性対照として用いた正常マウスIgGあるいはPBSでは有意な陽性所見は認めず、免疫染色の特異性が確認された。骨肉腫症例のFasL発現が強陽性(++)もしくは陽性(+)であったのは、20例中17例(85.0%)であり、そのうちの11例で、骨肉腫細胞のFasL発現率が50%以上であった。骨肉腫細胞におけるFasLの発現強度および発現率と、臨床病理学的因子との間には明らかな関連を見出されなかった。

2. ウェスタンブロット法

骨肉腫3検体とヒト骨肉腫細胞3株について検討した。骨肉

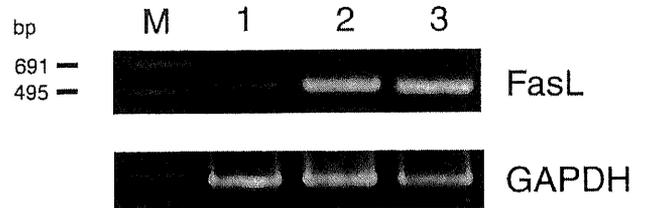


Fig. 3. Reverse transcription-PCR analysis of FasL mRNA in human osteosarcoma cells. Expression of glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase (GAPDH) was also studied as an internal control. cDNA fragments for FasL and GAPDH were amplified 40 cycles of PCR, and their products were resolved on 1.5% agarose gel and visualized by ethidium bromide staining. Lane M, maker; lane 1, Saos-2; lane 2, OST; lane 3, HOS.

B

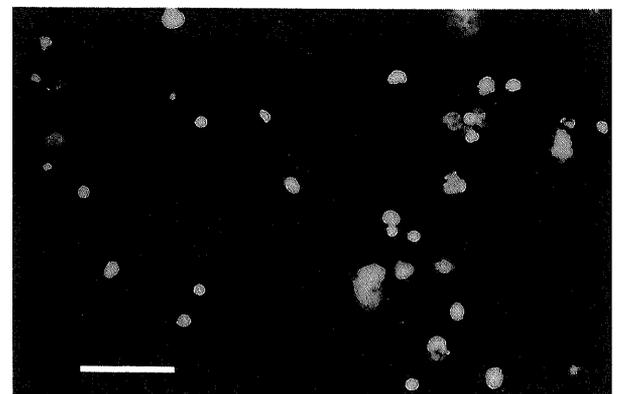


Fig. 4. Fluorescence micrographs of Jurkat lymphocytes: Jurkat cells were cultured on cryosections of human osteosarcoma tissues or on human osteosarcoma cell lines, and then were observed under fluorescent microscopy stained with DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole). (A) Culture on slide glass only; a small number of apoptotic lymphocytes were observed. (B) Culture on cryosections of human osteosarcoma tissue (OS-1); a large number of apoptotic cells showing nuclear bleb formation, condensation and fragmentation were observed. Scale bar: 200 μ m.

腫症例の3例中3例 (100%) に、分子量40kDの膜型 FasL の発現を検出した (図2)。ヒト骨肉腫細胞株でも同様に3株全例に膜型 FasL の発現を認めた。可溶性 FasL (26kD) は骨肉腫症例および細胞株のいずれにおいても検出されなかった。骨肉腫組織および細胞のいずれにも異常分子量の FasL 発現は認めなかった。

II. 骨肉腫細胞における FasL mRNA の発現

RT-PCR法

骨肉腫細胞について RT-PCR で FasL の mRNA の発現を検討

した。全検体で設定された511bpのPCR産物が検出された (図3)。発現量の多かったHOSのPCR産物についてDNA解析を施行したところ、ヒト FasL cDNA (Gene bank accession NO. U11821) と100%の相同性が確認された。

III. Fas 感受性 Jurkat 細胞を用いた FasL の機能解析

1. Jurkat 細胞に対する新鮮骨肉腫組織切片上でのアポトーシス誘導および骨肉腫培養細胞上でのアポトーシス誘導

免疫染色で FasL の発現が確認された骨肉腫組織新鮮凍結切片上でのインキュベーションにより Fas 陽性 Jurkat 細胞に核の

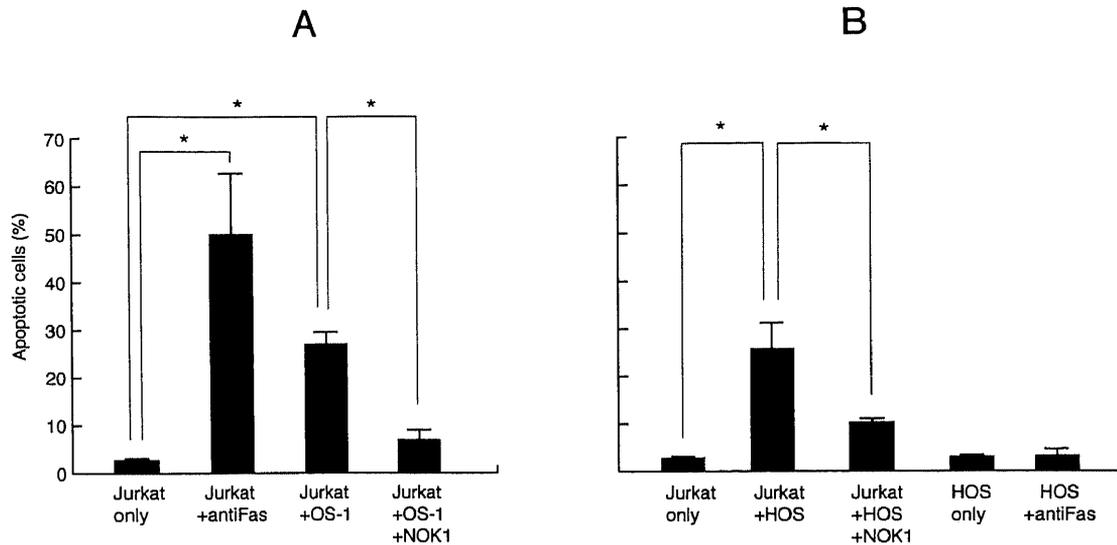


Fig. 5. (A) Jurkat lymphocytes, which are sensitive to anti-Fas-induced apoptosis, were cultured on cryosections of human osteosarcoma tissues (OS-1) or on slide glass only, and then frequency of apoptotic lymphocytes was estimated by counting 200 cells under fluorescent microscopy. Frequency of apoptotic cells cultured with OS-1 tissue was significantly higher than that cultured on slide glass only. NOK1, a neutralizing anti-human FasL monoclonal antibody inhibited the apoptosis of Jurkat cells. (B) Culture of Jurkat lymphocytes with human osteosarcoma cell line (HOS) was performed, and then frequency of apoptotic lymphocytes was estimated by counting 200 cells under fluorescent microscopy. Frequency of apoptotic cells cultured with HOS was significantly higher than that cultured on slide glass only, and NOK1 inhibited the apoptosis of Jurkat cells. HOS cells were resistant to anti-Fas-mediated apoptosis. Value are expressed as $\bar{x} \pm SD$.

*P<0.05 by Mann-Whitney's U test.

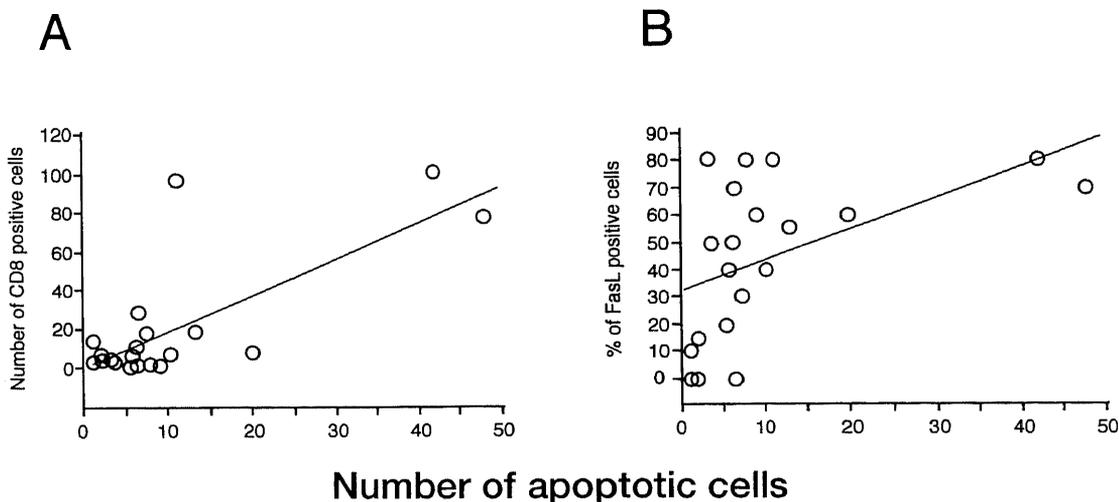


Fig. 6. (A) Relation between the number of apoptotic cells and the number of CD8 positive cells in osteosarcoma tissues ($r=0.746$, $p<0.0001$). (B) Relation between the number of apoptotic cells and percentage of FasL positive cells in osteosarcoma tissues ($r=0.498$, $p=0.0242$).

凝集と断片化などアポトーシス誘導が観察された(図4)。FasLを発現するOS-1組織はFas感受性Jurkat細胞に対し、27.7±4.4%と、ガラススライドのみのアポトーシス率4.2±0.6%と比較し有意に高いアポトーシス誘導能を示した($p<0.05$) (図5A)。

HOS細胞を用いて行った同様の実験においても、HOSはFas感受性Jurkat細胞に対し、25.9±6.5%と、ガラススライドのみのアポトーシス率2.9±1.2%と比較し有意に高いアポトーシス誘導能を示した($p<0.05$)。またHOSは抗Fas抗体を加えてもアポトーシスの有意な増加を認めず、Fas非感受性であった(図5B)。

2. 抗ヒトFasL中和抗体を用いたアポトーシス誘導の抑制

FasL発現骨肉腫組織新鮮凍結切片および骨肉腫培養細胞を用いたJurkat細胞のアポトーシス誘導は、抗FasL中和抗体によりそれぞれ6.7±2.0%、10.3±1.5%と有意に抑制された(ともに $p<0.05$) (図5A, B)。

IV. TUNEL法およびCD8に対する免疫染色

骨肉腫組織20例に対し、CD8に対する免疫染色とTUNEL法を行った。抗CD8抗体による免疫染色ではCTLの細胞膜に局限した陽性反応を、TUNEL法では凝集したあるいは断片化した細胞核に一致した陽性反応を認めた。腫瘍細胞および好中球の一部にもTUNEL法による標識を認めたが、それらは形態からもリンパ球におけるアポトーシスと容易に鑑別可能であった。TUNEL陽性細胞数とCD8陽性細胞数の間には正の相関が認められた(Pearsonの相関係数 $r=0.746$, $P<0.0001$)。またTUNEL標識細胞数と腫瘍細胞におけるFasL発現率との間には、弱い正の相関が認められた(Pearsonの相関係数 $r=0.498$, $P=0.0242$) (図6)。CD8陽性細胞数とFasL発現率との間には有意な相関関係はなかった。

考 察

骨肉腫は若年者の長管骨骨幹部部に好発し、原発性悪性骨腫瘍の中で最も頻度が高い。従来は、発見と同時に四肢の切断・離断術が行われていたが、肺転移を抑制することができず、5年生存率は20%以下と極めて不良であったが²⁴⁾、近年の化学療法の導入に伴い、治療成績は飛躍的に向上し、5年生存率は50~60%までになっている^{25)~28)}。当講座の土屋はカフェインを抗癌剤と併用することにより殺細胞効果が増強されることを示し²⁹⁾³⁰⁾、1990年から臨床応用を行い、初診時に遠隔転移のない骨肉腫症例では局所有効率100%、5年生存率は90%と良好な成績を得ている³¹⁾。しかしながら、初診時からすでに遠隔転移を伴った症例では局所有効率は相対的に低く、その治療成績は依然として不良である³²⁾。このように、骨肉腫症例の中には治療開始時から抗癌剤に抵抗性を示すものがあり、その克服のためには既存の抗癌剤の効果を増強する薬剤や新たな抗癌剤の開発・発見が切望されている。またそれらの抗癌剤開発とは別のアプローチとして、p53などに代表される遺伝子導入による治療³³⁾や血管形成阻害剤³⁴⁾などの転移巣形成を抑制する薬剤が模索されている。いずれにせよ骨肉腫に限らず、様々な悪性腫瘍において原発巣のコントロールのみならず、転移形成の抑制が予後の向上に非常に重要である。このためには何らかの分子標的を見つけることや、転移や抗癌剤耐性の新たな分子メカニズムを検討する必要がある。

癌細胞の転移は複数の異なるステップからなることが知られ

ている³⁵⁾。そのうち免疫監視機構からの回避は腫瘍細胞の発育および転移形成に必須の性質である。癌細胞に対する免疫監視機構では、CTLとナチュラルキラー細胞が重要な役割を演ずる。これらのエフェクター細胞は腫瘍抗原を認識すると同時に、腫瘍細胞膜表面に発現しているFas受容体をFasLを介し活性化し、腫瘍細胞にデスシグナルを発生させる³⁾。しかし、最近、免疫細胞だけでなく、肺癌や胃癌など各種の癌細胞におけるFasLの発現も観察され、癌細胞自らがこのFasLを介し腫瘍浸潤性リンパ球をカウンターアタックによりアポトーシスに誘導するという能動的な免疫回避機序の存在が提唱されている^{14)36)~38)}。この能動的な免疫回避が腫瘍形成や転移形成に非常に重要と考えられている。本研究では、骨肉腫症例20例ならびにヒト骨肉腫細胞3株を用い、骨肉腫細胞における高率なFasLの発現を蛋白およびメッセージレベルで確認した。この骨肉腫細胞に発現されるFasLのメッセージおよび蛋白構造に異常が無いこと、Fas陽性ヒトT細胞に対してアポトーシス誘導機能を有すること、更にin vivoにおいても骨肉腫組織に浸潤するCTLに対しアポトーシス誘導をもたらしていることを明らかにした。

Shirakiら³⁹⁾およびMitsiadesら⁴⁰⁾は、それぞれ大腸癌、Ewing肉腫の検討で転移性腫瘍におけるより高率なFasLの発現を観察し、FasL発現と転移形成との関係を示唆した。しかし、本研究ではBennettら⁴¹⁾の胃癌における成績と同様、FasLの発現亢進と化学療法の効果や転移形成の有無などの臨床病理学的予後因子との間に有意な関連は認めなかった。

FasL発現と化学療法効果との関連が無かったことについては、どのように考えられるだろうか。Hug⁴²⁾は化学療法などの薬剤によって、標的腫瘍細胞のFas受容体発現が亢進し、腫瘍表面のFasL発現が抑制され、これらによって腫瘍死が生じるとしている。当講座におけるカフェイン併用の動注化学療法は、その効果が非常に強力であり、骨肉腫細胞はほとんどの場合、アポトーシスではなく壊死となってしまうため、FasLのようなアポトーシスのエフェクター蛋白との関連が生じず、予後に対する差が出なかった可能性があると考えた。

今回の検討では、FasL発現と転移形成の有無についても統計学的に有意な関連は見出せなかった。逆にFasL発現のなかった3症例中2例で遠隔転移が起こっていた。Shimonishiら⁴²⁾は胆管腫瘍において、異形成でも腫瘍表面にFasL形成亢進があり、分化型肝内胆管癌ではさらにFasL形成が増強するが、未分化癌ではFasL形成が逆に低下してくると報告している。その一方で、腫瘍のグレードが高くなるにつれて、Fasレセプターの発現が減少してくるため、Fas-FasLシステムを介したアポトーシスが生じにくくなり、これが未分化癌における腫瘍免疫の耐性に関与しているのではないかと報告している。骨肉腫においても仮にFasLの発現が不良であったとしても、このようなFasレセプターの発現低下や無形成がおこることで、免疫監視から逃れている可能性がある。またFellenbergら⁴³⁾によれば、骨肉腫細胞株ではFasレセプターの発現は十分あるが、抗Fas抗体を介したアポトーシスに抵抗性で、これは骨肉腫細胞から分泌される可溶性Fasが腫瘍浸潤性CTL表面のFasLを中和することによって生じていると報告している。このように、骨肉腫細胞はFasLを発現して免疫担当細胞を直接攻撃する能動的な免疫回避とFasレセプターの異常による免疫回避の組み合わせで免疫監視から逃れ、腫瘍増生や転移形成を行っている

と考えられる。

肝内胆管癌の報告⁴³⁾と同様に、食道腫瘍でも異形成あるいは上皮内癌で既にFasLの発現亢進が報告されている⁴⁴⁾。これらの情報を総合すると、FasLの発現亢進は腫瘍発生はかなり早い時期に獲得されると考えられる。今回、臨床病理学的因子とFasLの発現とが関連しなかったが、これらの因子は腫瘍が形成されてかなり時間が経過してからの状態を表すものであり、早期に形質獲得されるFasLとは関連しなかったのかもしれない。FasLは、腫瘍発生や転移形成のごく初期に腫瘍発育に関連する必須の形質のひとつだと予想される。

骨肉腫細胞に発現されるFasLは、ウエスタンブロット法ならびにRT-PCR産物のシーケンス解析により、蛋白ならびにmRNAとも構造的に異常のないことが確認された。Kontnyら⁴⁵⁾は、Ewing肉腫細胞では、ウエスタンブロットおよびRT-PCR法でFasL発現を認めるが、非機能的である事を観察し、FasLに関しては発現だけでなく機能状態の解析が必要なることを強調している。これまで癌細胞を用いたFasLの機能解析の報告は多いが¹⁴⁾¹⁵⁾¹⁸⁾³⁹⁾⁴⁴⁾⁴⁶⁾⁴⁷⁾、ヒトの腫瘍組織に発現されたFasLの機能に関する情報は未だ乏しい¹⁷⁾¹⁸⁾³⁶⁾。Strandら¹⁷⁾はヒト肝癌組織の新鮮凍結切片上でJurkat細胞を培養することでFas陽性細胞に対するアポトーシス誘導能を示し、Walkerら³⁶⁾およびSaasら¹⁸⁾は酵素消化で得られたヒト神経腫細胞を用いFas陽性細胞に対するアポトーシス誘導能を証明した。本研究ではStrandら¹⁷⁾と同様の方法を用い、ヒト骨肉腫組織に発現されるFasリガンドが機能的であることを明らかにした。また今回の実験では、骨肉腫組織切片における組織内CD8陽性細胞数とアポトーシスを生じたリンパ球細胞数が相関しているということと、アポトーシス細胞数がFasL陽性細胞率とも相関していたということから、*in vivo*においても骨肉腫細胞が、腫瘍浸潤性CTLに対してカウンターアタックによる能動的な免疫回避を行っている可能性を示した。以上の結果から、ヒト骨肉腫組織において、骨肉腫細胞はFasL発現により腫瘍浸潤性CTLをアポトーシスに誘導し、免疫監視機構から回避していると考えた。

このFasL発現による免疫回避は、骨肉腫の腫瘍発生の初期や転移形成に重要な役割を担っていると考えられる。今後、骨肉腫におけるFasL発現を抑制し、またFasレセプターを正常に機能させる薬剤や遺伝子治療が開発されることによって、化学療法に耐性の骨肉腫症例の治療が可能となることを期待する。

結 論

ヒト骨肉腫組織とヒト骨肉腫細胞株を用いて、ヒト骨肉腫におけるFasLの発現を検証すると共に、骨肉腫組織に発現されるFasLの*in vivo*における機能解析をFas陽性Jurkat細胞を用いて行い、腫瘍内浸潤CTLにおけるアポトーシス誘導との関係を検討し、以下の結論を得た。

1. ヒト骨肉腫組織20症例中17例(85.0%)にFasLの発現を認めた。これらの発現強度および発現率と臨床病理学的因子との間には、明らかな関連を認めなかった。
2. 骨肉腫組織3例とヒト骨肉腫細胞3株をウエスタンブロット法によりFasL蛋白の発現について検討した。いずれの検体にも分子量40kDの膜型FasLの発現が認められた。
3. ヒト骨肉腫細胞3株においてRT-PCRにてFasLのmRNA発現が確認された。またこれらのPCR産物はヒトFasLcDNA

であることが確認された。

4. Jurkat細胞を用いたFasLの機能解析では、Jurkat細胞をFasL高発現骨肉腫組織上もしくは骨肉腫細胞上で培養することにより、Jurkat細胞のアポトーシスが有意に増加した。これらのアポトーシスは、FasLの中和抗体であるNOK1により有意に減少した。

5. 骨肉腫組織切片中のアポトーシス細胞数とCD8陽性細胞数には正の相関関係が認められた。また、同じくアポトーシス細胞数とFasL陽性細胞率との間にも弱いながらも正の相関が認められた。

以上の結果から、ヒト骨肉腫は機能的なFasLを高率に発現し、腫瘍浸潤性CTLをカウンターアタックすることにより、免疫監視機構から回避していると予想した。FasLの発現と臨床病理学的な因子とは関連が乏しかったが、骨肉腫におけるFasL発現は腫瘍発生や転移形成に関連していると考えた。

謝 辞

稿を終るにあたり、御指導、御校閲を賜りました恩師金沢大学医学部がん医科学専攻機能再建学研究分野(整形外科)富田勝郎教授に深甚なる謝意を表します。本研究に関し、終始直接懇切なる御指導御助言をいただきました同講座土屋弘行助教授に深謝いたします。また、本研究の遂行に際し、多大な御指導御助言と御協力いただきました金沢医科大学第二病理学教室上田善道教授に感謝いたします。なお、本論文の要旨は、第31回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会(1998年、千葉)、第14回日本整形外科学会基礎学術集会(1999年、奈良)、The 10th International Symposium of Limb Salvage(1999年、Cairns, Australia)、および18th UICC International Cancer Congress(2002年、Oslo, Norway)において発表された。

文 献

- 1) 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
- 2) Nagata S, Golstein P. The Fas death factor. *Science* 267: 1449-1456, 1995
- 3) Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell* 88: 355-365, 1997
- 4) Griffith TS, Brunner T, Fletcher SM, Green DR, Ferguson TA. Fas-ligand induced apoptosis as a mechanism of immune privilege. *Science* 270: 1158-1159, 1995
- 5) Bellgrau D, Gold D, Selawry H, Moore J, Franzusoff A, Duke RC. A role for CD95 ligand in preventing graft rejection. *Nature* 377: 630-632, 1995
- 6) Takahashi M, Saito H, Okuyama T, Miyashita T, Kosuga M, Sumisa F, Yamada M, Ebinuma H, Ishii H. Overexpression of Bcl-2 protects human hepatoma cells from Fas-antibody-mediated apoptosis. *J Hepatol* 31: 315-322, 1999
- 7) Owen-Schaub LB, Radinsky R, Kruzel E, Berry K, Yonehara S. Anti-Fas on nonhematopoietic tumors: levels of Fas/APO-1 and bcl-2 are not predictive of biological responsiveness. *Cancer Res* 54: 1580-1586, 1994
- 8) Takakuwa T, Dong Z, Takayama H, Matsuzuka F, Nagata S, Aozasa K. Frequent mutations of Fas gene in thyroid lymphoma. *Cancer Res* 61: 1382-1385, 2001
- 9) Ungefroren H, Voss M, Jansen M, Roeder C, Henne-Bruns D, Kremer B, Kalthoff H. Human pancreatic adenocarcinomas express Fas and Fas ligand yet are resistant to Fas-mediated

- apoptosis. *Cancer Res* 58: 1741-1749, 1998
- 10) Li Y, Kanki H, Hachiya T, Ohyama T, Irie S, Tang G, Mukai J, Sato T. Negative regulation of Fas-mediated apoptosis by FAP-1 in human cancer cells. *Int J Cancer* 87: 473-479, 2000
 - 11) Pitti RM, Marsters SA, Lawrence DA, Roy M, Kischkel FC, Dowd P, Huang A, Donahue CJ, Sherwood SW, Baldwin DT, Godowski PJ, Wood WI, Gurney AL, Hillan KJ, Cohen RL, Goddard AD, Botstein D, Ashkenazi A. Genomic amplification of a decoy receptor for Fas ligand in lung and colon cancer. *Nature* 396: 699-703, 1998
 - 12) Elnemr A, Ohta T, Yachie A, Kayahara M, Kitagawa H, Fujimura T, Ninomiya I, Fushida S, Nishimura GI, Shimizu K, Miwa K. Human pancreatic cancer cells disable function of Fas receptors at several levels in Fas signal transduction pathway. *Int J Oncol* 18: 311-316, 2001
 - 13) Nambu Y, Hughes SJ, Rehemtulla A, Hamstra D, Orringer MB, Beer DG. Lack of cell surface Fas/APO-1 expression in pulmonary adenocarcinomas. *J Clin Invest* 101: 1102-1110, 1998
 - 14) Niehans GA, Brunner T, Frizelle SP, Liston JC, Salerno CT, Knapp DJ, Green DR, Kratzke RA. Human lung carcinomas express Fas ligand. *Cancer Res* 57: 1007-1012, 1997
 - 15) O'Connell J, O'Sullivan GC, Collins JK, Shanahan F. The Fas counterattack: Fas-mediated T cell killing by colon cancer cells expressing Fas ligand. *J Exp Med* 184: 1075-1082, 1996
 - 16) Hahne M, Rimoldi D, Schroter M, Romero P, Schreier M, French LE, Schneider P, Bornand T, Fontana A, Lienard D, Cerottini J, Tschopp J. Melanoma cell expression of Fas (APO-1/CD95) ligand: Implications for tumor immune escape. *Science* 274: 1363-1366, 1996
 - 17) Strand S, Hofmann WJ, Hug H, Muller M, Otto G, Strand D, Mariani SM, Stremmel W, Krammer PH, Galle PR. Lymphocyte apoptosis induced by CD95 (APO-1/Fas) ligand-expressing tumor cells-A mechanism of immune evasion? *Nat Med* 2: 1361-1366, 1996
 - 18) Saas P, Walker PR, Hahne M, Quiquerez AL, Schnuriger V, Perrin G, French L, Van Meir EG, de Tribolet N, Tschopp J, Dietrich PY. Fas ligand expression by astrocytoma in vivo: maintaining immune privilege in the brain? *J Clin Invest* 99: 1173-1178, 1997
 - 19) Ito Y, Noguchi S, Takeda T, Matsuura N. Fas ligand expression in BRCA1-associated hereditary breast carcinoma clearly differs from that in sporadic breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat* 66: 95-100, 2001
 - 20) Zietz C, Rumpel U, Sturzl M, Lohrs U. Inverse relation of Fas-ligand and tumor-infiltrating lymphocytes in angiosarcoma: indications of apoptotic tumor counterattack. *Am J Pathol* 159: 963-970, 2001
 - 21) Tsuchiya H, Kanazawa Y, Abdel-Wanis ME, Asada N, Abe S, Isu K, Sugita T, Tomita K. Effect of timing of pulmonary metastases identification on prognosis of patients with osteosarcoma: the Japanese Musculoskeletal Oncology Group study. *J Clin Oncol* 20: 3470-3477, 2002
 - 22) Enneking WF, Spanier SS, Goodman MA. A system for the surgical staging of musculoskeletal sarcoma. *Clin Orthop* 153: 106-120, 1980
 - 23) Enneking WF, Spanier SS, Malawar MM. The effect of the anatomic setting on the results of surgical procedures for soft part sarcoma of the thigh. *Cancer* 47: 1005-1022, 1981
 - 24) Friedman MA, Carter SK. The therapy of osteogenic sarcoma: current status and thoughts for the future. *J Surg Oncol* 4: 482-510, 1972
 - 25) Jaffe N, Raymond AK, Ayala A, Carrasco CH, Wallace S, Robertson R, Griffiths M, Wang YM. Effect of cumulative courses of intraarterial cis-diamminedichloroplatin-II on the primary tumor in osteosarcoma. *Cancer* 63: 63-67, 1989
 - 26) Bacci G, Picci P, Avella M, Ferrari S, Casadei R, Ruggieri P, Brach del Prevert A, Tienghi A, Battistini A, Mancini A. Effect of intra-arterial versus intravenous cisplatin in addition to systemic adriamycin and high-dose methotrexate on histologic tumor response of osteosarcoma of the extremities. *J Chemother* 4: 189-195, 1992
 - 27) Tomita K, Tsuchiya H. Intermediate results and functional evaluation of limb-salvage surgery for osteosarcoma; An intergroup study in Japan. *J Surg Oncol* 41: 71-76, 1989
 - 28) Tsuchiya H, Tomita K. Prognosis of osteosarcoma treated by limb-salvage surgery: the ten-year intergroup study in Japan. *Jpn J Clin Oncol* 22: 347-353, 1992
 - 29) 土屋弘行, 富田勝郎. ヒト骨肉腫培養細胞におけるシスプラチンとカフェインの併用効果. *癌と化学療法* 14: 3125-3130, 1987
 - 30) 土屋弘行. カフェインによる制癌剤の効果増強に関する研究. *十全医会誌* 97: 543-556, 1988
 - 31) Tsuchiya H, Tomita K, Mori Y, Asada N, Kitano S, Morinaga T, Yamamoto N. Caffeine-assisted chemotherapy and minimized tumor excision for nonmetastatic osteosarcoma. *Anticancer Res* 18: 657-666, 1998
 - 32) Tsuchiya H, Tomita K, Mori Y, Asada N, Yamamoto N. Marginal excision for osteosarcoma with caffeine assisted chemotherapy. *Clin Orthop* 358: 27-35, 1999
 - 33) 毛利良彦. 野生型 p53 遺伝子導入とカフェイン併用によるヒト骨肉腫細胞の抗癌剤感受性の増強. *十全医会誌* 107: 493-503, 1998
 - 34) Morishita T, Miyauchi Y, Mii Y, Miura S, Honoki K, Aoki M, Kido A, Yoshimoto M, Tamai S, Tsutsumi M, Konishi Y. Delay in administration of CDDP until completion of AGM-1470 treatment enhances antimetastatic and antitumor effects. *Clin Exp Metastasis* 17: 15-18, 1999
 - 35) Woodhouse EC, Chuaqui RF, Liotta LA. General mechanisms of metastasis. *Cancer* 80: 1529-1537, 1997
 - 36) Walker PR, Saas P, Dietrich PY. Role of Fas ligand (CD95L) in immune escape the tumor cell strikes back. *J Immunol* 158: 4521-4524, 1997
 - 37) Hug H. Fas-mediated apoptosis in tumor formation and defence. *Biol Chem* 378: 1405-1412, 1997
 - 38) Okada K, Komuta K, Hashimoto S, Matsuzaki S, Kanematsu T, Koji T. Frequency of apoptosis of tumor-infiltrating lymphocytes induced by fas counterattack in human colorectal carcinoma and its correlation with prognosis. *Clin*

Cancer Res 6: 3560-3564, 2000

39) Shiraki K, Tsuji N, Shioda T, Isselbacher KJ, Takahashi H. Expression of Fas ligand in liver metastases of human colonic adenocarcinomas. Proc Natl Acad Sci USA 94: 6420-6425, 1997

40) Mitsiades N, Poulaki V, Kotoula V, Leone A, Tsokos M. Fas ligand is present in tumors of the Ewing's sarcoma family and is cleaved into a soluble form by a metalloproteinase. Am J Pathol 153: 1947-1956, 1998

41) Bennett MW, O'Connell J, O'sullivan GC, Roche D, Brady C, Kelly J, Collins JK, Shanahan F. Expression of Fas ligand by human gastric adenocarcinomas: a potential mechanism of immune escape in stomach cancer. Gut 44: 156-162, 1999

42) Shimonishi T, Isse K, Shibata F, Aburatani I, Tsuneyama K, Sabit H, Harada K, Miyazaki K, Nakanuma Y. Up-regulation of fas ligand at early stages and down-regulation of Fas at progressed stages of intrahepatic cholangiocarcinoma reflect evasion from immune surveillance. Hepatology 32: 761-769, 2000

43) Fellenberg J, Mau H, Scheuerpflug C, Ewerbeck V, Debatin

KM. Modulation of resistance to anti-APO-1-induced apoptosis in osteosarcoma cells by cytokines. Int J Cancer 72: 536-542, 1997

44) Gratas C, Tohma Y, Barnas C, Taniere P, Hainaut P, Ohgaki H. Up-regulation of Fas (APO-1/CD95) ligand and down-regulation of Fas expression in human esophageal cancer. Cancer Res 58: 2057-2062, 1998

45) Kontny HU, Lehrnbecher TM, Chanock SJ, Mackall CL. Simultaneous expression of Fas and non functional Fas ligand in Ewing's sarcoma. Cancer Res 58: 5842-5849, 1998

46) Gratas C, Tohma Y, Van Meir EG, Klein M, Tenan M, Ishii N, Tachibana O, Kleihues P, Ohgaki H. Fas ligand expression in glioblastoma cell lines and primary astrocytic brain tumors. Brain Pathol 7: 863-869, 1997

47) von Bernstorff W, Spanjaard RA, Chan AK, Lockhart DC, Sadanaga N, Wood I, Peiper M, Goedegebuure PS, Eberlein TJ. Pancreatic cancer cells can evade immune surveillance via non functional Fas (APO-1/CD95) receptors and aberrant expression of functional Fas ligand. Surgery 125: 73-84, 1999

Expression of Fas ligand in human osteosarcoma and its function: Fas ligand-induced apoptosis in Tumor-infiltrating cytotoxic T lymphocytes and immune evasion of tumor cells Shinji Kitano, Department of Restorative Medicine of Neuro-Musculoskeletal System, Graduate School of Medical Science, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 — J. Juzen Med Soc., 112, 41 — 49 (2003)

Key words apoptosis, Fas ligand, immune evasion, osteosarcoma, tumor-infiltrating cytotoxic T lymphocyte

Abstract

Fas receptor and Fas ligand (FasL) -mediated apoptosis is one of the main pathways for killing activated T-lymphocytes. Recent reports have demonstrated that FasL expression in tumor cells plays an important role in immune escape of the cancer cells in various cancer cell lines and several human cancer tissues. However, in human osteosarcomas, FasL expression and its function are still unclear. We examined the expression of FasL in 20 surgically excised human osteosarcoma tissue samples as well as in three human osteosarcoma cell lines (HOS, OST, Saos-2), and its correlation with the frequency of apoptosis in CD8-positive tumor infiltrating lymphocytes. Furthermore, the functional activities of FasL expressed in the tumor tissues to induce apoptosis were evaluated using Jurkat cells. FasL protein was expressed in 85.0% (17/20) of osteosarcoma tissues. Western blot analysis demonstrated predominantly membranous FasL (40kD) expression in the three human osteosarcoma cell lines. Expression of FasL mRNA in the tumor cell lines was confirmed by RT-PCR. A significant and positive correlation between the rate of FasL expression and the number of apoptotic lymphocytes infiltrating to tumor cell nests was shown. In vitro study showed that tumor tissue sections expressing FasL, not stroma, induced apoptosis in Jurkat cells through the Fas-FasL system. All this shows that osteosarcoma cells predominantly express a functionally active membranous FasL protein. These findings support the significance of FasL-mediated immune escape of osteosarcoma *in vivo* and indicate that tumor infiltrating cytotoxic T lymphocytes are induced to apoptosis when these cells directly interact with osteosarcoma cells that are expressing membrane anchored FasL protein. FasL expression could conceivably facilitate the initial establishment of tumors or tumor metastases.