

Fas・Fasリガンド遺伝子異常の分子生物学的解析と 遺伝子治療の基礎的検討

著者	笠原 善仁
著者別表示	Kasahara Yoshihito
雑誌名	平成11(1999)年度 科学研究費補助金 基盤研究(C) 研究成果報告書
巻	1998-1999
ページ	13p.
発行年	2000-03
URL	http://doi.org/10.24517/00054992



Fas・Fas リガンド遺伝子異常の分子生物学的
解析と遺伝子治療の基礎的検討

課題番号 10670710

平成10年度-平成11年度科学研究費補助金(基盤研究C(2))
研究成果報告書

平成12年3月

研究代表者 笠原善仁
(金沢大学医学部助教授)

金沢大学附属図書館



8000-89044-5

はしがき

生理的細胞死はアポトーシス(apoptosis)と呼ばれ、細胞の核分解酵素の活性化に伴い形態学的に核クロマチンの濃縮、DNAの断片化を呈し、病的細胞死である壊死(necrosis)とは区別される。アポトーシスは生理的な生体の恒常性の維持に重要であると共に、免疫系においても免疫担当細胞の分化、発達に加え、免疫応答反応の制御、特に末梢での活性化され不用となった細胞の除去(clonal deletion)に強く関わっていると考えられる。免疫担当細胞のアポトーシスの低下や亢進は自己免疫疾患や後天性免疫不全症候群などの病態への関与が示唆され、また種々の生理的因子や化学物質が異なる系統の細胞のアポトーシスに関与している。Fas/APO-1 (CD95) レセプターはアポトーシス誘導性抗体(Fas, APO-1)により認識され、遺伝子クローニングの結果、TNF レセプターファミリーに属する約 45kDa の I 型膜貫通型糖蛋白であり、さらにその細胞質内部分に TNF レセプターの細胞質内部分と相同性を有する細胞死に至るシグナルを伝達するいわゆる death domain が存在する。またその ligand (Fas ligand: FasL)も遺伝子解析より TNF ファミリーに属する可溶性アポトーシス誘導性分子であり、TCR $\alpha\beta$ +CD4-CD8-T 細胞の非腫瘍性増殖による自己免疫疾患モデルの *lpr*, *gld* マウスはそれぞれ Fas intron への *ETn* の挿入による Fas レセプターの発現抑制、FasL 蛋白のアミノ酸置換による機能的欠失に起因することが判明している。Fas・Fas リガンドシステムによるアポトーシス細胞死誘導は末梢リンパ組織における活性化された過剰な免疫担当細胞の排除、炎症反応の終演に重要であると考えられる。Fas/APO-1 (CD95)抗原は、免疫担当細胞では顆粒球、単球、活性化 T 細胞、活性化 B 細胞に発現し、抗 Fas, APO-1 抗体による架橋化や可溶性アポトーシス誘導性分子である FasL によりこれら Fas 陽性細胞はアポトーシス細胞死に誘導される。生体内での Fas・Fas L システムによるアポトーシス誘導の重要性は *lpr*, *gld* 自己疾患モデルマウスがそれぞれ Fas, FasL 遺伝子異常に起因することから顕かである。*lpr/gld* マウス類似の症状、すなわち肝脾腫、リンパ節腫大、好中球および血小板減少、溶血性貧血、高 γ グロブリン血症等の臨床像を呈するヒトリンパ球増殖症候群においては Fas・Fas リガンドシステムによるアポトーシス細胞死誘導が異常である可能性が示唆される。これらの症例において Fas レセプター、FasL の発現および抗 Fas 抗体あるいは FasL にて誘導されるアポトーシスを顆粒球、活性化 T、B 細胞を用い、正常人と比較検討すると、抗 Fas 抗体に対しアポトーシス抵抗性を示す 4 家系 5 症例を見出した。これらの症例より樹立した T、B 細胞株を用い、Fas 遺伝子異常を PCR 法を用い mRNA レベルでの異常を確認後、異常塩基配列を決定したところ、異なる heterozygous mutation (4 家系) と homozygous mutation (1 家系) を同定した。ヒトにおける Fas 遺伝子異常に起因するリンパ球増殖症候群の分子生物学的解析はヒトにおけるアポトーシスシステムの生体内における生理的意義を明らかにする意味では重要な意義を持つと考えられる。

研 究 組 織

研究代表者 笠原善仁 (金沢大学医学部 助教授)
研究分担者 な し

研 究 経 費

平成10年度 2,300 千円
平成11年度 900 千円
計 3,200 千円

研 究 発 表

1) 学会誌等

1. Y. Kasahara, T. Wada, Y. Niida, K. Ohta, H. Seki, T. Hashimoto, T. Miyawaki, S. Koizumi, N. Taniguchi. Novel Fas(CD95/APO-1) mutations in infants with lymphoproliferative disorders. Int. Immunol. 10: 195- 202, 1998.
2. T. Wada, H. Seki, A. Konno, K. Ohta, K. Nunogami, H. Kaneda, Y. Kasahara, A. Yachie,, S. Koizumi, N. Taniguchi, T. Miyawaki. Developmental changes and functional properties of human memory T cell subpopulations defined by CD60 expression. . Cell. Immunol. 187, 117-123, 1998.
3. A. Takami, S. Nakao, A. Yachie, Y. Kasahara, H. Okumura, N. Sugimori, W. Zeng, H. Wang, T. Kotani, S. Shiobara, and T. Masuda. Successful treatment of Epstein-Barr virus-associated natural killer cell large granular lymphocytic leukemia using allogenic peripheral blood stem cell transplantation. Bone Marrow. Transplantation. 21: 1279-1282, 1998.
4. A.Yachie, Y. Niida, T. Wada, N. Igarashi, H. Kaneda, T. Toma, Y. Kasahara, and S. Koizumi. Oxidative stress causes enhanced vascular endothelial cell injury in human heme oxygenase-1 deficiency; J. Clin. Invest. 103: 129-135, 1999
5. H. Seki, Y. Kasahara, K. Ohta, K. Ohta , Y. Saikawa, R. Sumita, A. Yachie, S. Fujita, and S. Koizumi.

- Increasing prevalence of ampicillin-resistant, non-beta-lactamase producing strains of *Haemophilus influenzae* in children in Japan.
Chemotherapy, 45; 15-21, 1999.
6. H. Ohminami, M. Yasukawa, S. Kaneko, Y. Yakushijin, Y. Abe, Y. Kasahara, Y. Ishida, and S. Fujita.
 Fas-independent and nonapoptotic cytotoxicity mediated by a human CD4+T-cell clone directed against an acute myelogenous leukemia-associated DEK-CAN fusion peptide.
Blood, 83(3):925-935, 1999.
 7. H. Seki, Y. Kasahara, K. Ohta, K. Ohta, Y. Saikawa, R. Sumita, A. Yachie, S. Fujita, and S. Koizumi.
 Antimicrobial activities of cefditoren against respiratory pathogen isolated from children in Japan.
J. Infect. Chemother. 5:16-20,1999
 8. T. Wada, T. Toma, S. Shimura, M. Kudo, Y. Kasahara, and S. Koizumi C. Ra, H. Seki, A.Yachie.
 Age-dependent increase of gE-binding and FcεRI expression on circulating basophils in children.
Pediatr. Res., 46(5); 603-607, 1999.
 9. T. Wada, K.Takei, M.Kudo, S.Shimura, Y.Kasahara S Koizumi, K Kawa Ha Y Ishida, S Imashuku, H Seki, A Yachie.
 Characterization of immune function and analysis of RAG gene mutations in Omenn syndrome and related disorders.
Clin. Exp. Immunol. in press
 10. K. Ohta, A. Yachie, K. Fujimoto, H. Kaneda, T, Wada, T. Toma, A. Seno, Y. Kasahara, H. Yokoyama, H. Seki, S. Koizumi.
 Tubular injury is a cardinal pathological feature in human heme oxygenase-1 deficiency.
Am. J. Kid Disease. 35:1-9, 2000.
 11. 笠原善仁. リンパ球増殖症候群.
 症候群事典（診断と治療，増刊号），診断と治療社，86, suupl, 229, 1998.
 - 12 関秀俊，金田尚，布上孝志，太田和秀，犀川太，笠原善仁，山上正彦，谷口昂，谷内江昭宏，藤田真一，小林泰，奥田則彦，長沖武，清酒外文，舟橋隆，本家一也，上野良樹，岩井和之，太田邦雄，和田英男，小泉晶一
 小児呼吸器感染症におけるペニシリン耐性肺炎球菌の検出と Cefditoren pivooxil（メイアクト）の有効性.

- 小児科臨床, 51(8): 475-483, 1998
13. 太田邦雄, 関秀俊, 市原強, 犀川太, 谷口昌史, 住田亮, 太田和秀, 笠原善仁, 山上正彦, 谷口昂, 谷内江昭宏, 藤田真一, 小林泰, 奥田則彦, 長沖武, 清酒外文, 舟橋隆, 本家一也, 上野良樹, 岩井和之, 和田英男, 小泉晶一.
小児呼吸器感染症由来のベータラクタマーゼ非産生 ABPC 耐性インフルエンザ菌の検討.
小児科診療, 61(8): 1515-1521, 1998.
 14. 笠原善仁, 小泉晶一.
原発性免疫不全症に合併する悪性腫瘍.
臨床検査. 43 (4) ; 452-454, 1999.
 15. 関秀俊, 笠原善仁.
インフルエンザ菌の薬剤耐性.
小児科, 40 (11); 1455-1461, 1999
 16. 笠原善仁, 谷内江昭宏.
自己免疫性リンパ増殖症候群における caspase-3 変異.
臨床免疫, in press.

2) 口演発表等

1. 笠原善仁, 久藤美保, 布上孝志, 小泉晶一, 関 秀俊, 谷内江昭宏.
EB ウイルス関連疾患における可溶性 Fas リガンド.
第 2 回血液疾患とサイトカイン研究会. (1998, 1, 31)
2. 金兼弘和, 宮脇利男, 丸箸圭子, 五十嵐 登, 笠原善仁.
EB ウイルス関連疾患におけるインターロイキン 10.
第 2 回血液疾患とサイトカイン研究会. (1998, 1, 31)
3. 笠原善仁, 谷内江昭宏, 関 秀俊, 小泉晶一.
Hemophagocytic Syndrome, 慢性 EB ウイルス感染症における EB ウイルスのリンパ球分画への感染様式の解析.
第 60 回日本血液学会. (1998, 3, 26)
4. 大南英樹, 安川正貴, 金子新, 薬師寺芳洋, 笠原善仁, 石田也寸志, 藤田繁.
DEK-CAN 融合ペプチド特異的 CD4 陽性 T 細胞クローンによる新たな抗原特異的細胞障害機構,
第 60 回日本血液学会. (1998, 3, 26)
5. 久藤美保, 和田泰三, 市村昇悦, 笠原善仁, 小泉晶一, 谷内江昭宏.
蚊過敏症における NK 細胞異常増殖と EBV の関与.
第 10 回日本アレルギー学会春季臨床大会. (1998, 4, 24)
6. 金田 尚, 布上孝志, 武井健吉, 住田 亮, 太田和秀, 笠原善仁, 小泉晶一,

- 谷内江昭宏, 関 秀俊, 絹谷清剛, 五十嵐 登.
凝固, 線溶系の異常と持続的血球破壊を伴い, ハプトグロビン, ヘモグロ
ビン複合体代謝異常が示唆された溶血性貧血の男児例
第 101 回日本小児科学会学術集. (1998, 5, 16)
7. 越田理恵, 藤本佳代子, 橋本浩之, 奥田則彦, 布上孝志, 太田邦雄, 新井田
要, 笠原善仁, 小泉晶一, 谷内江昭宏, 関 秀俊.
種々の自己抗体陽性の自己免疫疾患を合併している p47phox 欠損型慢性
肉芽腫症の女児例.
第 101 回日本小児科学会学術集. (1998, 5, 16)
8. 金兼弘和, 二谷 武, 脇口宏, 倉繁隆信, 新井田要, 笠原善仁, 宮脇利男.
慢性活動性 EB ウイルス感染症感染症として長期間フォローされていた
Fas 遺伝子異常の一例. 日本小児科学会
第 101 回日本小児科学会学術集. (1998, 5, 16)
9. 久藤美保, 布上孝志, 金田 尚, 笠原善仁, 小泉晶一, 関 秀俊, 谷内江昭宏,
金兼弘和.
慢性活動性 EBV 感染症 3 例における持続的感染細胞の同定— ISH-
flowcytometry 法による検討—.
第 8 回 EB ウイルス感染症研究会. (1998, 5, 30)
10. 笠原善仁, 久藤美保, 布上孝志, 金田 尚, 小泉晶一, 関 秀俊, 谷内江昭宏,
丸箸圭子, 五十嵐 登, 畑崎善芳, 寺尾 岳, 岩井和之.
Hemophagocytic Lymphohistiocytosis (HLH) 2 例におけるリンパ球分画への
EBV 感染様式の解析.
第 8 回 EB ウイルス感染症研究会. (1998, 5, 30)
11. 浅井 暁, 藤田修平, 和田泰三, 市村昇悦, 金田 尚, 笠原善仁, 市原 強, 小
泉晶一, 関 秀俊, 谷内江昭宏.
化学療法に伴い, 全身性の紅斑と表皮内水疱と発症した慢性活動性 EBV
感染症/リンパ球増殖症の一女児例.
第 8 回北陸ヘルペス感染症学会. (1998, 9, 5)
12. 東馬智子, 笠原善仁, 小泉晶一, 谷内江昭宏.
Hemin 誘導性細胞障害のヘムオキシナーゼ(HO)による抑制機構の解析.
第 19 回日本炎症学会. (1998, 9, 3)
12. 谷内江昭宏, 東馬智子, 笠原善仁, 太田和秀, 和田泰三, 小泉晶一.
ヘムオキシナーゼ 1 欠損症における全身性血管内皮障害.
第 19 回日本炎症学会. (1998, 9, 3)
13. 小泉晶一, 金田 尚, 太田和秀, 笠原善仁, 谷内江昭宏.
Heme Oxygene 1 欠損症の発見.

- 第 40 回日本小児血液学会総会。(1998, 9, 19)
14. 笠原善仁, 市村昇悦, 久藤美保, 和田泰三, 小泉晶一, 関 秀俊, 谷内江昭宏.
小児感染症リンパ球における Fas リガンド発現.
第 30 回日本小児感染症学会。(1998, 11, 6)
 15. 関 秀俊, 谷内江昭宏, 太田邦雄, 太田和秀, 金田 尚, 市村昇悦, 笠原善仁, 小泉晶一.
小児呼吸器感染症由来のベータラクタマーゼ非産生 ABPC 耐性インフルエンザ菌の検討.
第 30 回日本小児感染症学会。(1998, 11, 6)
 16. 笠原善仁, 市村昇悦, 久藤美保, 和田泰三, 小泉晶一, 関 秀俊, 谷内江昭宏.
EB ウイルス関連血液疾患における Fas リガンド発現.
第 40 回日本臨床血液学会。(1998, 11, 12)
 17. 谷内江昭宏, 市村昇悦, 金田 尚, 住田 亮, 太田和秀, 笠原善仁, 小泉晶一.
全身性血管内皮傷害による持続性溶血性貧血ならびに凝固・線溶系異常：
ヘオキシゲナーゼ 1 欠損症（世界第一例目）の報告.
第 40 回日本臨床血液学会。(1998, 11, 12)
 18. 中条達也, 中尾真二, 近藤恭夫, 松田 保, 塩原信太郎, 笠原善仁, 谷内江昭宏.
T 細胞と B 細胞の両者に EBV が検出された非血縁者間骨髄移植後の PTLD
(post transplantation lymphoproliferative disorders) .
第 40 回日本臨床血液学会。(1998, 11, 12)
 19. 太田和秀, 藤本佳代子, 瀬野晶子, 笠原善仁, 谷内江昭宏, 小泉晶一.
ヒト Heme oxygenase-1 欠損症における腎病変について.
第 17 回糸球体傷害研究会。(1998, 11, 20)
 20. 和田泰三, 武井健吉, 笠原善仁, 小泉晶一, 川島篤弘, 関 秀俊, 谷内江昭宏.
Omenn 症候群における RAG-1 遺伝子異常.
第 26 回日本臨床免疫学会。(1998, 12, 2)
 21. 笠原善仁, 東馬智子, 和田泰三, 久藤美保, 市村昇悦, 太田和秀, 谷内江昭宏, 関 秀俊, 小泉晶一.
Fas 誘導性アポトーシスにおける酸化ストレスの意義.
第 29 回日本免疫学会。(1998, 12, 4)
 22. 岡島道子, 住田亮, 笠原善仁, 谷内江昭宏, 小泉晶一.
ステロイド局注が効果的であった CGD に伴う食道狭窄の一例.

- 第 6 回食細胞機能異常症研究会. (1998, 12, 11)
23. 西田巳香, 浅井 暁, 住田 亮, 笠原善仁, 小泉晶一.
皮下インスリン分解症候群を呈した IDDM 女児例.
第 266 回日本小児科学会北陸地方会. (1999, 3, 14)
24. 前馬秀昭. 片山啓大. 加藤英治. 藤本 巖, 笠原善仁, 谷内江昭宏.
VP-16 が著効した EB ウイルス関連血球貪食症候群の 1 男児例.
第 266 回日本小児科学会北陸地方会. (1999, 3, 14)
25. 津田英夫, 岩井和之, 寺尾 岳, 野坂和彦, 青木伸一, 笠原善仁, 谷内江昭宏.
慢性活動性肝炎の病態を示す、慢性肉芽症の男児例.
第 266 回日本小児科学会北陸地方会. (1999, 3, 14)
27. 小泉晶一, 金田 尚, 東馬智子, 笠原善仁, 谷内江昭宏.
Heme oxygenase 1 欠損症の遺伝子解析と遺伝子治療の基礎的検討.
第 61 回日本血液学会総合. (1999, 4, 19)
28. 笠原善仁, 小泉晶一, 谷内江昭宏, 関 秀俊, 安川正貴.
Herpesvirus-saimiri 形質転換 NK 細胞株における CD 9 5 誘導性アポトーシス抵抗性.
第 61 回日本血液学会総合. (1999, 4, 19)
29. 末永孝生, 崔 永林, 朝倉昇司, 竹内正美, 笠原善仁.
自家 PBSCT 後に Double Negative T Cell の増加を示した末梢型 T 細胞リンパ腫の一例.
第 61 回日本血液学会総合. (1999, 4, 19)
30. 金田 尚, 新井田要, 和田泰三, 東馬智子, 太田和秀, 笠原善仁, 小泉晶一, 関 秀俊, 谷内江昭宏.
ヘムオキシゲナーゼ 1 欠損症における分子遺伝学的解析.
第 102 回日本小児科学会学術集会. (1999, 4, 24)
31. 和田泰三, 武井健吉, 市村昇悦, 太田和秀, 笠原善仁, 小泉晶一, 関 秀俊, 谷内江昭宏, 河 敬世, 石田也寸志, 今宿晋作, 崎山幸雄.
Omenn 症候群における RAG1/RAG2 遺伝子異常の解析.
第 102 回日本小児科学会学術集会. (1999, 4, 24)
32. 東馬智子. 和田泰三. 金田 尚. 笠原善仁. 小泉晶一. 関 秀俊. 谷内江昭宏.
ヘムオキシゲナーゼ 1 欠損細胞株における hemin 誘導細胞障害機構の解析.
第 102 回日本小児科学会学術集会. (1999, 4, 24)
33. 榊原方枝, 西村一志, 笠原善仁, 関 秀俊, 小泉晶一.

- 肢体不自由児およびてんかん児における予防接種の接種状況と効果.
第 41 回日本小児神経学会総会. (1999, 5, 14)
34. 浅井 暁, 久藤美保, 和田泰三, 市村昇悦, 金田 尚, 笠原善仁, 小泉晶一, 谷内江昭宏, 関 秀俊.
化学療法試行に伴い、全身性の紅斑と表皮内水疱を発症した慢性活動性 EBV 感染症／リンパ球異常増殖症の 1 女児例.
第 9 回 EB ウイルス感染症研究会. (1999, 5, 29)
35. 太田和秀, 藤本佳代子, 金田 尚, 瀬野晶子, 笠原善仁, 小泉晶一, 谷内江昭宏, 関 秀俊.
尿細管細胞における Heme Oxygenase- 1 (HO- 1) 機能の重要性の検討：ヒト HO- 1 欠損症例における腎臓変の推移から.
第 34 回日本小児腎臓病学会学術集会. (1999, 5, 27)
36. 笠原善仁, 和田泰三, 小泉晶一
ヒトリンパ球増殖症候群と Fas レセプター変異..
第 11 回北陸腸内細菌研究会. (1999, 7, 10)
37. 犀川 太, 金田 尚, 新井田 要, 和田泰三, 笠原善仁, 小泉晶一, 谷内江昭宏.
Heme Oxykgenase 1 欠損症例の遺伝子解析: Alu - based genomic deletion による exon skipping.
第 17 回日本血液学会北陸地方会. (1999, 7, 17)
38. 市村昇悦, 後藤義則, 太田和秀, 笠原善仁, 小泉晶一, 住田 亮, 谷内江昭宏, 関 秀俊,
若年性関節リウマチ (JRA) に対する超大量 γ グロブリン療法の試み.
第 35 回中部日本小児科学会. (1999, 8 29)
39. 清水正樹, 片山啓太, 加藤英治, 安田勲次, 笠原善仁, 谷内江昭宏.
EB ウイルスが関与した右頸部リンパ節原発のホジキン病の一例.
第 35 回中部日本小児科学会. (1999, 8 29)
39. 笠原善仁.
蚊過敏症を伴う慢性活動性 EBV 感染症と蚊特異的 IgE 抗体.
第 7 回北陸ヘルペス感染症研究会. (1999, 9, 4)
40. 山本雅樹, 脇口 宏, 三崎泰志, 倉繁隆信, 笠原善仁.
回帰性 ITP を呈した ALPS の一例.
第 41 回日本小児血液学会. (1999, 9, 10)
41. 犀川 太, 金田 尚, 新井田 要, 和田泰三, 笠原善仁, 小泉晶一, 谷内江昭宏.
Heme Oxygenase 1 欠損症例の遺伝子解析: Alu - based genomic deletion に

よる exon skipping

第 41 回日本小児血液学会. (1999, 9, 10)

42. 上原貴博, 後藤義則, 武井健吉, 市村昇悦, 久藤美保, 市原 強, 笠原善仁, 小泉晶一, 谷内江昭宏, 関 秀俊.

慢性活動性EBV感染症に続発したT細胞リンパ腫に対する非血縁者間同種骨髄移植療法.

第 31 回日本小児感染症学会. (1999, 10, 29)

43. 金兼千春, 笠原善仁, 市村昇悦, 久藤美保, 武井健吉, 小泉晶一, 関 秀俊, 岡田かなえ, 谷内江昭宏, 金兼弘和, 崎山幸雄.

EBV 関連血球貪食症候群におけるリンパ球分画へのEBV 感染様式の解析.

第 31 回日本小児感染症学会. (1999, 10, 29)

44. 住田 亮, 淵澤竜也, 嶋大二郎, 市村昇悦, 太田和秀, 笠原善仁, 小泉晶一, 谷内江昭宏.

若年性関節リウマチ (JRA) に対する超大量 γ -グロブリン療法の試み.

第 9 回日本小児リウマチ研究会. (1999, 10, 23)

45. 笠原善仁, 和田泰三, 武井健吉, 市村昇悦, 小泉晶一, 谷内江昭宏.

自己免疫性リンパ増殖症候群の3家系4症例におけるFas(CD95)遺伝子変異.

第 9 回日本小児リウマチ研究会. (1999, 10, 23)

46. 笠原善仁, 武井健吉, 和田泰三, 東馬智子, 久藤美保, 市村昇悦, 上原貴博, 太田和秀, 谷内江昭宏, 関 秀俊, 小泉晶一.

Herpesvirus saimiri 誘導性ヒトNK細胞株の機能的解析.

第 29 回日本免疫学会総会. (1999, 12, 2)

47. 谷内江昭宏, 上原貴博, 市村昇悦, 武井健吉, 久藤美保, 東馬智子, 笠原善仁, 関 秀俊, 小泉晶一.

末梢血T細胞受容体TCRV β レパートリーの分布異常を示した自己免疫性貧血の男児例.

第 32 回北陸臨床免疫症例検討/研究会. (1999, 11, 20)

48. 市村昇悦, 東馬智子, 太田和秀, 笠原善仁, 小泉晶一, 関 秀俊, 谷内江昭宏.

リンパ球ならびに網内系細胞におけるHO-1産生.

第 29 回日本免疫学会総会. (1999, 12, 2)

49. 東馬智子, 市村昇悦, 和田泰三, 笠原善仁, 小泉晶一, 谷内江昭宏, 関 秀俊.

血球系細胞株によるHO-1産生とヘミン誘導細胞傷害におけるアポトーシス抑制蛋白、Bcl-2の関与.

- 第 29 回日本免疫学会総会. (1999, 12, 2)
50. 笠原善仁, 市村昇悦, 小泉晶一, 谷内江昭宏, 津田英夫.
CMV 感染後長期に渡り肝傷害を呈した CGD の 1 例.
第 7 回食細胞機能異常症研究会. (1999, 12, 10)
51. 上原貴博, 後藤善則, 武井健吉, 市村昇悦, 久藤美保, 市原 強, 笠原善仁,
小泉晶一, 谷内江昭宏, 関 秀俊.
慢性活動性 EBV 感染症に続発した T 細胞リンパ腫に対する非血縁者間
同種骨髄移植療法.
第 4 回血液疾患とサイトカイン研究会. (2000, 1, 9)
52. 谷内江昭宏, 笠原善仁, 東馬智子, 武井健吉, 和田泰三, 小泉晶一.
Omenn 症候群および RAG1/RAG2 遺伝子異常と TCR V β repertoire、サイ
トカイン産生の解析.
平成 11 年度原発性免疫不全症候群調査研究班 班会議総会. (2000, 1, 20)

研究成果

学会雑誌等の 1, 11, 16 の別冊をもって代える。その概要は以下のごとくである。

Fas 抗原は血液細胞の生理的アポトーシス細胞死を誘導するシグナルを伝達する分子として同定されたが, *lpr* および *gld* マウスにおける自己免疫様リンパ球増殖症候群が Fas, Fas リガンド(FasL)遺伝子異常に起因することが判明したことより, 末梢における自己反応性リンパ球や過剰に産生され不用になった成熟リンパ球の排除における Fas 抗原/Fas リガンドシステムによるアポトーシスの重要性が示唆されている。肝脾腫, リンパ節腫大, 自己免疫性汎血球減少, 高 γ グロブリン血症, TCR $\alpha\beta$ 陽性 CD4 陰性 CD8 陰性 T 細胞の増加等 *lpr*, *gld* マウス類似の臨床症状を示す自己免疫リンパ球増殖症候群の 4 家系 5 症例において Fas 誘導性アポトーシス異常と Fas 遺伝子変異を解析し, 遺伝子治療の基礎的検討を加えた。

患児, 両親, 健康成人より得た末梢血より単核球及び顆粒球を分離し, PHA にて刺激し IL-2 添加培養液にて 14-21 日維持した活性化 T 細胞, および EB virus 形質転換 B 細胞, 顆粒球における抗 Fas 抗体にて誘導されるアポトーシスを比較検討した。さらに上記の方法にて得られた EB virus 形質転換 B 細胞より抽出した RNA を RT-PCR にて Fas cDNA を 4 分画するように設定したプライマーを用い増幅し, T-vector にてその PCR 産物を transform しクローンより得られたプラスミド DNA を用い Terminator Cycle Sequence kit を用い塩基配列を検索した。さらに genomic PCR にて family study も含め解析を加えた。

抗 Fas 抗体を用いた患者由来の活性化 T 細胞, EB transformed B 細胞, 顆粒球における Fas 抗原の発現は正常コントロールと違いは兄妹例では認められなかったが, 他の 1 例において全く欠如していた。抗 Fas 抗体により誘導されるアポトーシスは 3 例とも全く欠如し, 患児由来活性化 T 細胞において抗 CD3 抗体にて誘導される細胞死も減弱していた。Fas 抗原異常を解析する目的で患児 EB transformed B 細胞株を用いて解析したところ, 症例 1,2(兄妹症例)では intron 7 の splicing donor の点突然変異による exon 7-8 間に 4 bp の挿入が認められ, 正常 Fas 分子に加え分子量の小さい異常 Fas 分子が western blot 法にて確認された。症例 1, 2 における Fas 抵抗性は death domain を欠く異常 Fas 抗原による dominant effect と考えられた。症例 3 の遺伝子異常は exon 4 欠失のホモ接合体で, 完全 Fas 欠損型と考えられた。家族の解析により異常遺伝子は症例 1, 2 では母親由来, 症例 3 ではいとこ同士の両親由来であることが判明した。症例 4, 5 においては Fas 抗原細胞質内 death domain を code する exon 9 における missense 変異が同定された。これらの患児の T 細胞分画を解析するとすべての症例にて TCR $\alpha\beta$ 陽性 CD4 陰性 CD8 陰性のリンパ球の絶対的増加が認められた。さらに血清中の可溶性 FasL を ELISA にて測定すると完全欠損型で著明な増加が, 他の症例にて中等度の増加が認められた。正常 Fas 遺伝子を単離し患児由来細胞株に transfection し, Fas 誘導性アポトーシスを比較

検討したところ、アポトーシス誘導の増強が認められた。

生理的細胞死であるアポトーシスは生体内における恒常性の維持に重要であり、その異常は癌、自己免疫疾患、ウイルス感染症など種々の病態に関与することが示唆されている。Fas(APO-1, CD95) receptor は TNF レセプター/NGF レセプターファミリーに属する 48 kDa の膜貫通型分子であり、ligand あるいは抗体による架橋化によりアポトーシスが誘導される。TCR $\alpha\beta$ +CD4/CD8-T 細胞の非悪性増加を示す *lpr*, *gld* マウスが Fas 分子あるいは Fas ligand の異常に由来することから Fas・Fas L システムの生体内における反応性免疫担当細胞の除去に重要であることが改めて浮き彫りにされている。検討症例 1、2、4、5 における Fas を介するアポトーシス抵抗性は、細胞外部分を有するものの death domain を欠如する mutant Fas 分子による dominant negative 効果によると考えられる。Fas receptor では Fas ligand あるいは抗 Fas 抗体による架橋化により三量体を形成し始めて細胞死に至るシグナルが伝達されるため、三量体のうち 1 分子でも異常であれば細胞死に至るシグナルが伝達されないと考えられる。また、完全欠損型である症例 3 での臨床症状は最も重症であり、今回示された結果より末梢における自己反応性 T 細胞や活性化され不用となった反応性リンパ球の除去に Fas・Fas L システムが重要であることが一層明らかとなった。