

自己免疫性リンパ球増殖症候群2家系3症例における Fasレセプター異常の解析

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: 和田, 泰三 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/9252

自己免疫性リンパ球増殖症候群 2 家系 3 症例における Fas レセプター異常の解析

金沢大学医学部医学科小児科学講座 (主任: 小泉晶一教授)

和田 泰 三

Fas レセプター/Fas リガンドシステムは Fas 陽性細胞に生理的細胞死 (アポトーシス, apoptosis) を誘導することにより免疫反応の調節, 特に自己反応性クローンの除去に重要な役割を果たしている. Fas レセプター異常に起因する *lpr* マウスは CD4⁺CD8⁻T 細胞 (ダブルネガティブT細胞) の増殖を伴い自己免疫異常を呈するが, 最近これに類似したヒトの症例で Fas レセプター遺伝子変異が同定され, 本疾患は自己免疫性リンパ球増殖症候群 (autoimmune lymphoproliferative syndrome, ALPS) と命名された. 本研究では, 幼少期よりリンパ節腫大, 肝脾腫, 血小板減少, 高 γ -グロブリン血症, ダブルネガティブT細胞の増加を認めるリンパ球増殖症候群の 2 家系 3 症例およびその家族において, Fas レセプターの異常を免疫学的, 分子生物学的に解析し, 病態との関係を検討した. 症例 1, 2 (兄妹例) では母由来の変異対立遺伝子においてイントロン 7 の 5' スプライシング部位に T から C への点突然変異があり, このため変異対立遺伝子由来の mRNA ではスプライシング異常が生じ, エキソン 7 と 8 の間に GCAG という 4 塩基の挿入が認められ, フレームシフトによりエキソン 7 が以降異常なコドンが 9 個続いた後終止コドンとなっていた. 変異由来の Fas レセプターは細胞外部分の発現は正常であるが, デスドメインを含む細胞内部分がなく, 異常な 3 量体を形成するため, ドミナントネガティブ効果により細胞死に至るシグナルが伝達されないと考えられた. しかしこの母親は同じ遺伝子異常をもち, 細胞レベルでは Fas 誘導性アポトーシスに対し抵抗性を示したが, 臨床的に全く無症状であり, ALPS 発症にはさらに別の因子が関与している可能性が考えられた. 症例 3 ではイントロン 3 の 3' スプライシング部位に A から G への点突然変異があるためエキソン 4 のスキップが認められ, エキソン 3 と 5 が直接繋がっていた. この結果フレームシフトが生じエキソン 3 が以降異常なコドンが 38 個続いた後終止コドンとなっていた. 症例 3 では両親がいとこ婚で変異対立遺伝子のホモ接合体となっていたため Fas レセプターそのものの発現が全く欠如し細胞死に至るシグナルが伝達されず, また症例 1, 2 よりも重症であると考えられた. これらの症例は本邦初であり, 確認された遺伝子異常は従来の報告にはみられず全く新しいものであった. 患児では活性化T細胞の Fas 誘導性アポトーシスが全く欠如しているほか活性化誘導型細胞死 (activation-induced cell death, AICD) も減弱しているため, 自己反応性T細胞が排除されず, 自己寛容が破綻し様々な自己免疫状態が生じているものと考えられた. さらに培養B細胞の Fas 誘導性アポトーシスが減弱していることから, 高 γ -グロブリン血症や自己抗体の産生が, 自己反応性B細胞そのもののアポトーシス低下にも起因している可能性が示唆された.

Key words Fas (APO-1, CD95), apoptosis, autoimmune lymphoproliferative syndrome, double-negative T cell

Fas レセプター (APO-1, CD95) は生理的細胞死 (アポトーシス, apoptosis) のシグナルを誘導する分子の一つとして同定され^{1,2)}, 1991年にその遺伝子がクローニングされた^{3,4)}. Fas レセプターは, 腫瘍壊死因子 (tumor necrosis factor, TNF) 受容体ファミリーに属し, その細胞外領域にシステインを豊富に含む特徴的な繰り返し構造を 3 ケ所もつ分子量約 45kDa の I 型膜貫通型糖蛋白として細胞膜に発現している. Fas リガンド^{5,6)}による架橋化により Fas レセプターは三量体を形成し, 同時に細胞質内でデスドメイン (death domain) が三量体化されることによって細胞死に至るシグナルが伝達される⁷⁾.

lpr および *gld* マウスは, 自己抗体産生など全身性エリテマトーデス (systemic lupus erythematosus, SLE) 様病態に加え,

CD2⁺CD3^{low}CD4⁻CD8⁻T細胞レセプター (T cell receptor, TCR) $\alpha\beta^{low}$ B220⁺ などの表現型をもつ異常T細胞の非腫瘍性増加からくるリンパ節腫脹, 脾腫を示し, 自己免疫疾患のモデル実験動物として知られていた⁸⁾. 最近, *lpr* マウスでは Fas 遺伝子イントロン内へのトランスポゾンの挿入により機能的な mRNA の発現が低下し Fas レセプターの発現が抑制されていること^{9,10)}, また *gld* マウスでは Fas リガンド細胞外C末端部位の点突然変異からくるアミノ酸置換が生じていることが報告され¹¹⁾, *lpr* および *gld* マウスはそれぞれ Fas レセプター, Fas リガンドの異常に起因することが判明した¹²⁾. Fas レセプター/Fas リガンド系を介したアポトーシスは, 末梢における自己反応性リンパ球や過剰に産生され不要になった成熟リンパ球の

平成 8 年 11 月 22 日 受付, 平成 8 年 12 月 16 日 受理

Abbreviations: AICD, activation-induced cell death; ALPS, autoimmune lymphoproliferative syndrome; bp, base pairs; dNTP, deoxyribonucleotide triphosphate; EBV, Epstein-Barr virus; FITC, fluorescein isothiocyanate; *gld*, generalized lymphoproliferative disease; LCL, lymphoblastoid cell line; *lpr*, lymphoproliferation; PBS, phosphate-

排除に重要な役割を果たすことが示唆され、免疫系の恒常性維持や自己寛容の成立に不可欠と考えられている¹⁹⁻¹⁷⁾。

ヒトでもダブルネガティブT細胞が増加し、*lpr* マウスに類似する病態が存在することが報告されていた¹⁸⁾¹⁹⁾が、1995年6月に2つのグループより別々に、*lpr* マウス類似のヒトのリンパ球増殖症候群において Fas レセプターの遺伝子変異が報告された²⁰⁻²²⁾。Fisher ら²⁰⁾はこの一群の疾患を自己免疫性リンパ球増殖症候群 (autoimmune lymphoproliferative syndrome, ALPS) と名付けている。

今回、幼少期よりリンパ節腫大、肝脾腫、血小板減少、高 γ -グロブリン血症、ダブルネガティブT細胞の増加を認める ALPS 類似のリンパ球増殖症候群の2家系3症例において、Fas レセプターの異常を免疫学的、分子生物学的に解析し病態との関係を検討した。

対象および方法

1. 対象

対象は、2家系3症例のリンパ球増殖症候群の患児とその家族である。家系1は、父、母、妹(症例1)、兄(症例2)を、家系2は、母方祖母、父、母、兄、症例3を解析した。各家系の患児以外の家族はいずれも健康で、リンパ球増殖症候群に罹患していない。症例1～症例3の臨床経過は以下のとおりである。

1) 家系1-症例1

出血斑、肝脾腫のため紹介入院した8ヶ月女児で、全身に癒合傾向のある紅斑、出血斑が散在し、肝5cm、脾7cmと著明な肝脾腫、両頸部リンパ節腫大を認めた。また著明な溶血性貧血(赤血球 $272 \times 10^4/\mu\text{l}$ 、血色素6.3g/dl)、血小板減少($0.6 \times 10^4/\mu\text{l}$)、好中球減少に加え高 γ -グロブリン血症(IgG 3124 mg/dl)を認めた。骨髄に血球貪食細胞が増加し、生検された頸部リンパ節からPCR法によりEBウイルス(Epstein-Barr virus, EBV)ゲノムが証明され、発症1年後においてEBV抗体価の上昇を認めたことより、臨床的にEBV関連血球貪食症候群と考えられていた。ステロイドあるいは γ -グロブリン投与により臨床症状の改善が認められたが、肝脾腫、リンパ節腫大は軽快増悪を繰り返し、また血小板減少、溶血性貧血も断続的に認められた。しかし経過と共にその頻度は減少し、9歳の現在は無治療にて経過観察中である。

2) 家系1-症例2

2歳9ヶ月の男児で症例1の兄であり、妹が入院した2ヶ月後に出血斑が出現し、中等度の肝脾腫、軽度のリンパ節腫大が認められた。貧血は認めなかったが妹同様、著明な血小板減少、好中球減少、高 γ -グロブリン血症を呈した。骨髄における血球貪食細胞は認めなかったが、妹同様、断続的に血小板減少を認め、ステロイドあるいは γ -グロブリン治療にて改善が認められていた。

3) 家系2-症例3

1歳の女児で両親がいとこ婚。妊娠中より胎児水腫を認め、在胎33週4日体重2534g、軽度の仮死状態(アプガースコア6点)にて出生した。全身浮腫、腹水、肝脾腫を認め、血色素7.0g/dl、血小板 $6.8 \times 10^4/\mu\text{l}$ 、血清総蛋白3.6 g/dlだった。呼

吸管理や輸血により胎児水腫は改善、また γ -グロブリン投与により一時的に血小板は増加したが、週1～2回の赤血球輸血、血小板減少($10 \times 10^4/\mu\text{l}$ 以下)が続くため生後2カ月時に紹介医に入院した。紹介医入院時には、肝3cm脾7cmで傍大動脈リンパ節腫脹の他、好中球減少、血小板減少、高 γ -グロブリン血症(IgG 4,943mg/dl)を認めた。その後易感染性があり2～4週間に1度は高熱、CRP強陽性のエピソードを反復している。脾機能亢進症に関しては、特発性として6ヶ月時に部分脾動脈塞栓術が施行され、血色素10g/dl・血小板 $20 \times 10^4/\mu\text{l}$ 前後に維持されていた。しかし1歳過ぎより肝脾腫が増大し、再び輸血依存状態となり、重症感染症に罹患し入院中である。

II. 方法

1. 材料

患児、その家族、健康人よりヘパリン加末梢静脈血を同意のうえ採取した。末梢静脈血よりフィコール-ハイパーク(Ficoll-Hypaque)比重遠心法にて単核球を分離し、 $10 \mu\text{g/ml}$ のフィトヘマグルチニン(phytohemagglutinin, PHA) (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA)により刺激し、10%非動化ウシ胎児血清(fetal calf serum, FCS)、25mM HEPES、 $2 \times 10^{-5}\text{M}$ 2-メルカプトエタノール、0.3mg/ml グルタミン、200U/ml ペニシリンG、10mg/ml ゲンタマイシンを含むRPMI1640培養液(Gibco Laboratories, Grand Island, USA)に50IU/mlのインターロイキン2(interleukin-2, IL-2)(シオノギ、大阪)を添加し、 $1 \times 10^6/\text{ml}$ の細胞濃度で5%CO₂、37℃の条件下で14～21日間培養し活性化T細胞を得た。また単核球から2-アミノエチルイソチオウロニウムブロマイド(2-aminoethylisothiouonium bromide, Sigma Chemical Co.)処理ヒツジ赤血球を用いたロゼット法とフィコール-ハイパーク比重遠心法を用い分離したE-ロゼット非形成細胞を100IU/mlのIL-2と0.005%のホルマリン固定黄色ブドウ球菌Cowan I株(formaldehyde-fixed *Staphylococcus aureus* Cowan I, SAC) (Calbiochem-Behring, San Diego, USA)の存在下で7～10日間培養し培養B細胞を得た。EBV形質転換B細胞株(lymphoblastoid cell line, LCL)は、E-ロゼット非形成細胞にB95-8細胞株の培養上清を加え培養し樹立した。

2. フローサイトメトリーによる表面抗原の解析

ヘパリン加静脈血を0.1Mリン酸緩衝生理食塩水(phosphate-buffered saline, PBS, pH7.2)で2回洗浄し、フィコエリスリン(phycoerythrin, PE)あるいはフルオレッセン・イソチオシアニン酸(fluorescein isothiocyanate, FITC)で標識された抗CD3抗体、抗CD4抗体、抗CD8抗体、抗CD16抗体、抗CD20抗体、抗TCR- $\alpha\beta$ 抗体、抗TCR- $\gamma\delta$ 抗体(いずれもBecton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, USA)を添加し、4℃で20分間染色した。0.83%塩化アンモニウム溶液で溶血後、細胞をPBSに再浮遊しフローサイトメーターCytoron Absolute (Ortho Diagnostic System, 東京)を用いて解析し、ダブルネガティブT細胞、T細胞、B細胞、NK細胞の比率を検討した。

また患児、その家族、健康人の活性化T細胞におけるFasレセプターの発現を、抗Fas抗体(CH11, IgM) (MBL, 名古屋)を一次抗体に、FITC標識ヤギ抗マウスIgM抗体を二次抗体に用いて同様にフローサイトメーターにて解析した²³⁾。

3. 抗 Fas 抗体, 抗 CD3 抗体によるアポトーシスの誘導

患児, その家族, 健康人の活性化 T 細胞, 培養 B 細胞, LCL を 1×10^6 /ml の濃度に調整後, それぞれの細胞に $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ の抗 Fas 抗体を添加, あるいは $4 \mu\text{g}/\text{ml}$ の抗 CD3 抗体 (OKT3, Ortho Diagnostic Systems) をあらかじめ 96 穴平底マイクロタイタープレート (Corning Glass Works, Corning, USA) に固相化しておき, 1 穴に $200 \mu\text{l}$ ずつを分注し 12 時間培養した. そのうち 5×10^4 個の細胞を細胞遠心沈殿装置 (Cytospin 2) (Shandon Southern Products, Cheshire, UK) を用いスライドガラス上に遠沈し, 塗抹標本を作製した. それぞれメイグリュンワルドギムザ染色後検鏡し, アポトーシスに陥った細胞の比率を算出した²⁰.

4. 逆転写 PCR 法 (reverse transcriptase-PCR, RT-PCR)

総 RNA の抽出は, Chomczynski ら²⁰の酸・グアニジニウムチオシアネート/フェノール/クロロホルム法 (AGPC 法) に準じ

を行った. D 液 (4M グアニジンチオシアネート, 25mM クエン酸ナトリウム pH7.0, 0.1M 2-メルカプトエタノール, 0.5% N-ラウロイルサルコシン酸ナトリウム) 1 容量に, 10 分の 1 容量の 2M 酢酸ナトリウムと, 1 容量の二炭酸ジエチル (diethylpyrocarbonate, DEPC) 処理水にて飽和したフェノールを混合し X 液を作成し, $LCL 5 \times 10^6$ 個に対し 1ml を加えよく混合した. 0.2ml のクロロホルムを加え懸濁し, 5 分間静置後, 15,000rpm, 20 分間遠心分離した. 上層に等量のイソプロパノールを加え混和し, 5 分間静置後再び 15,000rpm, 20 分間遠心した. 沈殿した RNA を 75% エタノール 1ml に再浮遊させ洗浄後, 乾燥させ, Tris-EDTA (TE) 緩衝液 (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH6.8) に溶解した. RNA の濃度は 260nm の吸光度から求めた.

1 本鎖 cDNA は, 上記により得た RNA からランダムプライマー法にて合成した. すなわち総 RNA $2 \mu\text{g}$ に $1.5 \mu\text{l}$ の $80 \mu\text{M}$ ランダムヘキサヌクレオチドプライマー (宝酒造, 東京) を加

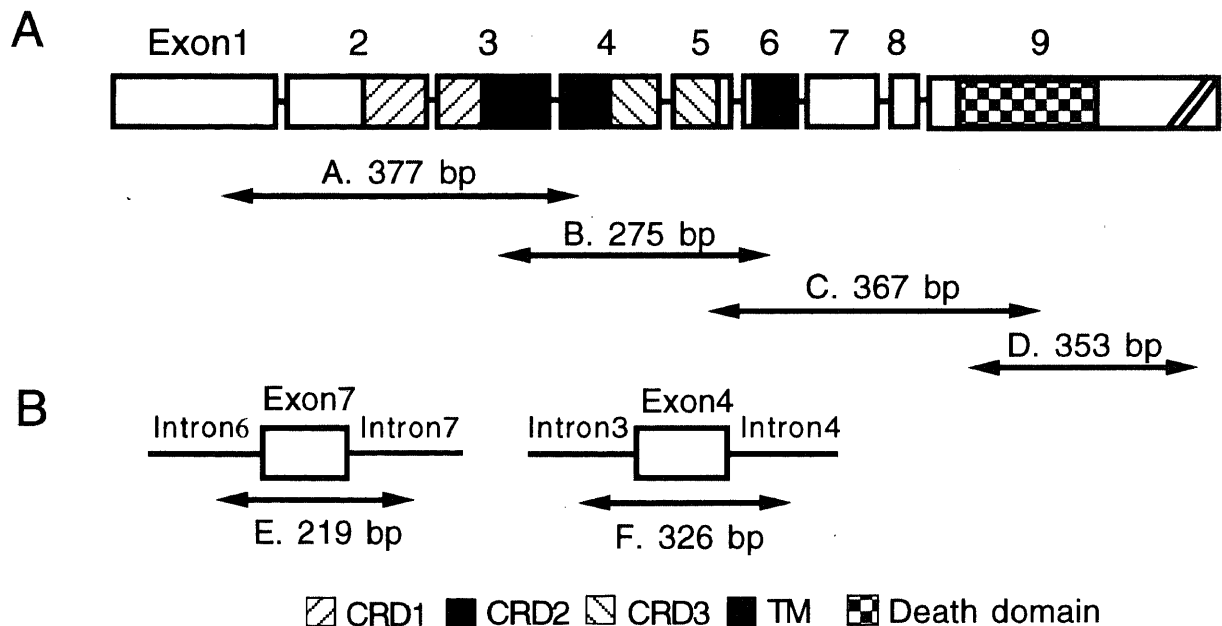


Fig. 1. The scheme of the human Fas mRNA structure and the location of the fragments amplified by the PCR primer pairs (Table 1). (A) Fas mRNA is composed of 9 exons and all the coding regions were examined. (B) E and F regions included the 5' splice site of intron 7, and the 3' splice site of intron 3, respectively. CRD, cystein-rich domain; TM, transmembrane domain.

Table 1. Primers used for RT-PCR and PCR analysis of the Fas sequence

Region	Primer	Nucleotide sequence (5'-3')	Coordinates	Product (bp)
A	A5	GTTGGGGAAGCTCTTTCAC	154	377
	A3	GCCATGTCCTTCATCACAC	-530	
B	B5	GGAGTACACAGACAAAGCC	461	275
	B3	GAAGAAGACAAAGCCACCC	-735	
C	C5	TCATCAAGGAATGCACATC	652	367
	C3	ACTTCTGTTCTGCTGTGTC	-1018	
D	D5	AGAATGGTGTCAATGAAGCC	946	353
	D3	CCCAGTAAAAACCAAGCAG	-1298	
E	E5	TGTTCTCACATGCATTCTAC		219
	E3	AGTAACAAAAAGCCAAATCAC		
F	F5	CTGTACTACTGGTGTCAATGC		326
	F3	TCAGTCAGTGTACTCCCT		

The cDNA nucleotide numbers correspond to Ito et al³ and are available from GenBank (accession numbers X81334-X81342).

え, TE 緩衝液 (pH6.8) で全量 $25\mu\text{l}$ とし, GeneAmp™ PCR system 9600-R (Perkin-Elmer Applied Biosystems Division, Norwalk, USA) (以下 9600-R) を用い 65°C で10分間加熱後, 20分かけて 25°C まで冷却し, RNA の変性とプライマーのアニールリングを行なった. 引き続き $25\mu\text{l}$ の反応液 [100mM Tris-HCl (pH8.3), 200mM 塩化カリウム (KCl), 20mM 塩化マグネシウム (MgCl₂), 20mM ジチオスレイトール, 各 2mM デオキシリ

ボヌクレオチド三リン酸 (deoxyribonucleotide triphosphate, dNTP), 逆転写酵素 RAV-2 (宝酒造) 10単位] を加え, 42°C で60分間反応させ cDNA を合成させた. 反応後, TE 緩衝液 (pH7.0) $50\mu\text{l}$ を加え全量 $100\mu\text{l}$ とし, 1回の PCR 反応に $5\mu\text{l}$ を鋳型として用いた. RT-PCR プライマーは, 図 1A のごとく Fas cDNA^{26/27} の翻訳部分を全て含むように, 互いに重なるように分割した 4ヶ所の領域 A, B, C, D を増幅する様に設定した

Table 2. Lymphocyte phenotypic profiles in ALPS patients and families

Subject	Percentage of lymphocyte subpopulations							
	CD3	CD4	CD8	CD16	CD20	TCR $\gamma\delta$	TCR $\alpha\beta^+CD4^-CD8^-$	
Family 1	Patient 1	81.4	40.6	24.8	3.1	10.4	7.3	8.1
	Patient 2	75.3	32.0	32.2	9.8	9.7	5.1	5.6
	Father	64.0	31.4	25.9	8.8	28.4	5.9	0.7
	Mother	66.7	33.2	23.4	14.2	14.4	1.7	15.4
Family 2	Patient 3	46.2	35.1	9.8	4.7	31.7	0.1	6.4
	GM	55.3	40.2	18.1	7.4	11.6	3.3	0.6
	Father	69.7	46.0	22.0	8.3	12.3	2.0	0.7
	Mother	73.3	38.9	25.6	9.6	10.4	3.2	0.8
	Brother	76.1	54.5	13.9	4.7	18.1	2.9	0.7
Control (n=10)	69.5 ± 4.6^a	43.1 ± 6.0	22.0 ± 5.4	8.0 ± 4.4	11.2 ± 3.5	4.4 ± 2.4	0.6 ± 0.1	

Peripheral lymphocytes from ALPS patients and families were stained with FITC-or PE-conjugated anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD16, anti-CD20, anti-TCR $\alpha\beta$ and anti-TCR $\gamma\delta$ mAb. The percentage of lymphocyte subpopulations was evaluated by flowcytometry. GM, maternal grandmother. a) $\bar{x}\pm\text{SD}$.

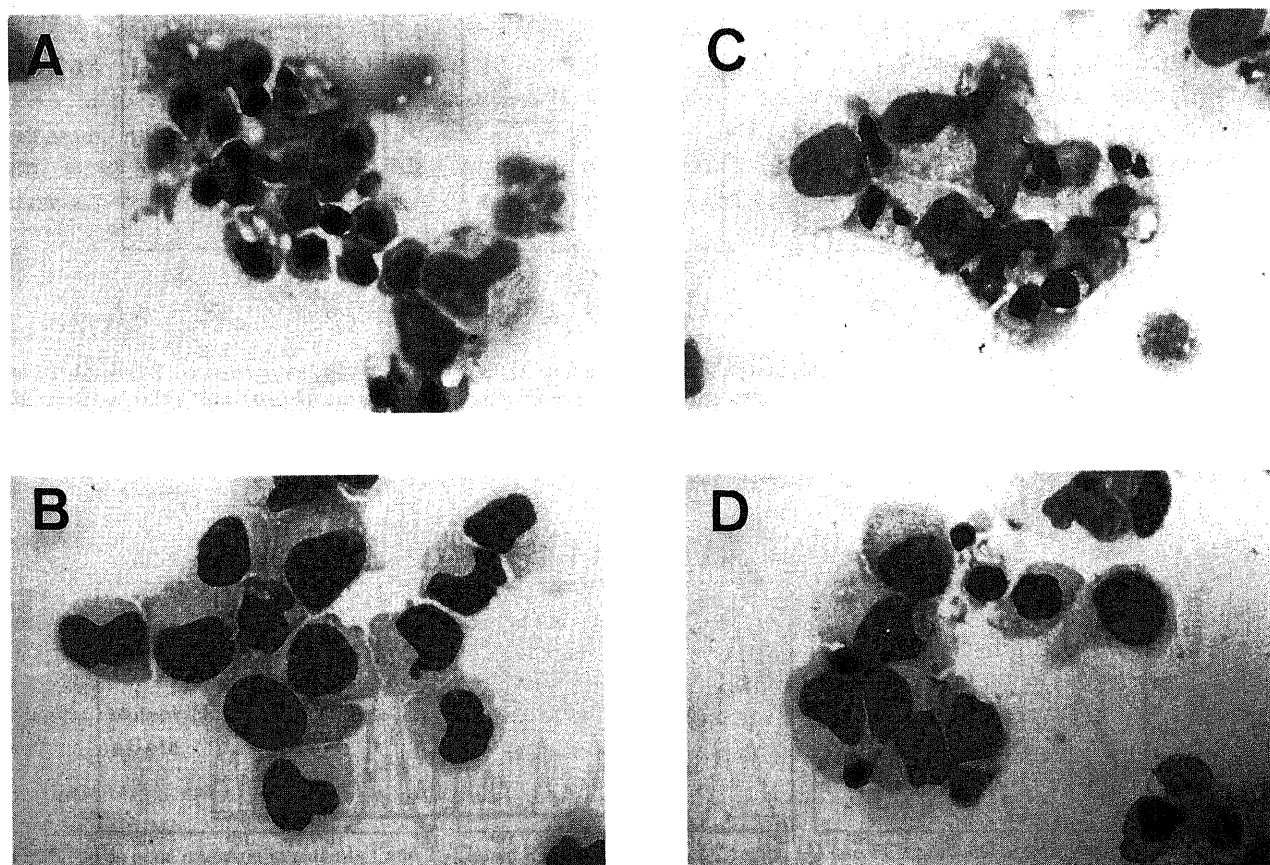


Fig. 2. Morphological features of Fas- or CD3-induced T cell apoptosis. PHA-activated T cells ($1\times 10^6/\text{ml}$) from normal control (A, C) or patient 1 (B, D) were treated with $1\mu\text{g}/\text{ml}$ of anti-Fas mAb (A, B) or immobilized anti-CD3 mAb (C, D) for 12 hours. Morphology of cells after treatment is shown by May-Grünwald-Giemsa-stained preparations photographed at a magnification $\times 1,000$.

(表1). 合成はフナコシ株式会社(東京)に委託した. RT-PCRは, 上記のcDNAに, 最終 $0.2\mu\text{M}$ の各プライマー, 各 $200\mu\text{M}$ のdNTP, PCR反応緩衝液(10mM Tris-HCl, $\text{pH}8.3$, 50mM KCl, 1.5mM MgCl_2), 1.25 単位のTaq DNAポリメラーゼ(Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, USA)を加え全量 $50\mu\text{l}$ で行なった. PCR反応は 94°C 5分の初期変性の後, 変性 95°C 30秒, アニール 54°C 30秒, 伸長反応 72°C 30秒のプログラムで35~40サイクル行なった. 反応後10分の1容量の泳動緩衝液(0.25% プロモフェノールブルー, 0.25% キシレンシアノール, 15% フィコール400)を加え, $10\mu\text{l}$ を 3% アガロースゲル(H14-TAKARA, 宝酒造)で電気泳動しエチジウムブロマイド染色後, 紫外線照射装置(トランスイルミネーター, フナコシ)上で観察した.

5. 塩基配列の解析

1) PCRダイレクトシーケンス法

RT-PCRにて増幅したDNA断片を直接鋳型とし, 蛍光色素を用いたダイターミネーター法²⁰⁾により塩基配列を決定した. PCR産物は 1.5% アガロースゲルから電気溶出法にて回収し, フェノール/クロロホルム抽出, エタノール沈殿にて精製した.

これを鋳型としてDNA cycle sequencing kit (Perkin-Elmer Applied Biosystems Division)を用いてシーケンス反応を行ない, DNAシーケンサー371A (Perkin-Elmer Applied Biosystems Division)にて解析した. シーケンスプライマーには各PCRプライマーをそのまま使用した. 反応は9600-Rを使用し, 変性 96°C 15秒, アニール 50°C 1秒, 伸長反応 70°C 4分のプログラムで25サイクル行なった. 反応後, フェノール/クロロホルム抽出にて過剰なプライマー, 蛍光色素を除去しエタノール沈殿にて反応産物を回収した. シーケンスゲルはLong Ranger (AT Biochem, 東洋紡績, 東京)を用いトリスホウ酸EDTA (Tris-Borate-EDTA, TBE) 緩衝液(45mM Tris-Borate, 1mM EDTA, $\text{pH}8.0$)にて40W定電力で泳動した.

2) TAクローニング

ダイレクトシーケンスでA, T, C, Gの各ピークが二重となり, ダブルピークを示した領域に関しては, 精製したPCR産物をpT7Blue T-Vector Kit (Novagen, 宝酒造, 東京)を用いてプラスミドベクターにクローニングし, *E. coli* JM109コンピテントセル(宝酒造)に形質転換した. 複数個の単一コロニーをLuria-Bertani培地で培養しアルカリ-SDS法にてプラスミ

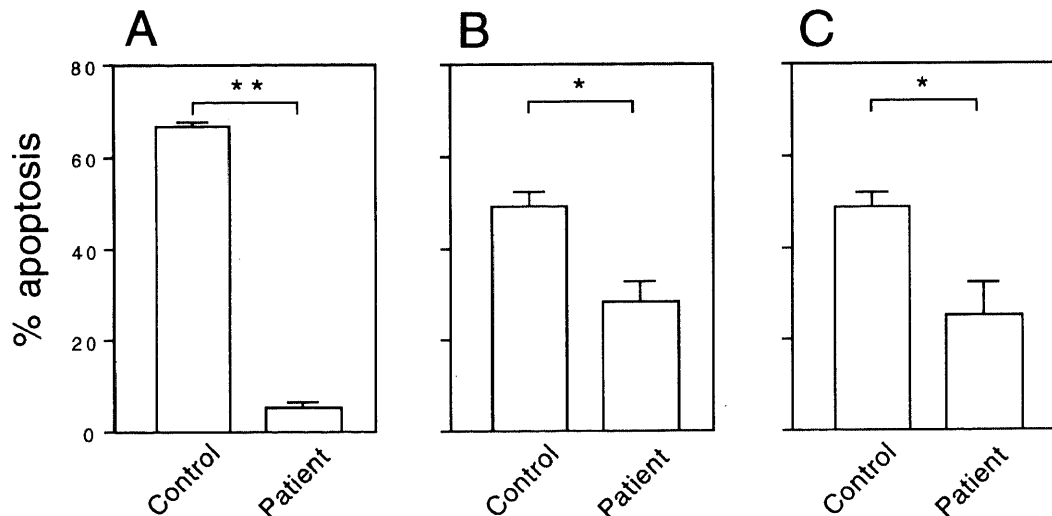


Fig. 3. Defective Fas-mediated apoptosis and activation-induced cell death in ALPS patients. $1 \times 10^6/\text{ml}$ of cultured T cells (A, B) or cultured B cells (C) from control and patient were treated with $1\mu\text{g}/\text{ml}$ of anti-Fas mAb (A, C) or immobilized anti-CD3 mAb (B) for 12 hours. The percentages of apoptotic cells after culture were estimated by microscopic counting on May-Grünwald-Giemsa-stained preparations. Each data represents the mean of three patients and three normal controls. Vertical bars showed SD. *, $p < 0.01$, **, $p < 0.001$ versus normal controls.

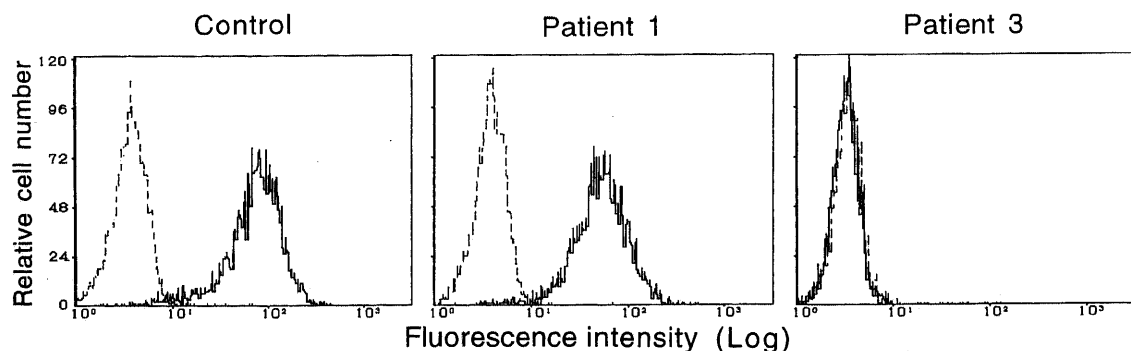


Fig. 4. A flowcytometric analysis of surface Fas expression on activated T cells. Activated T cells from a normal control, patient 1 and 3 were treated with anti-Fas mAb and stained further with FITC-conjugated goat anti-mouse IgM antibody. The fluorescence intensity was analyzed by a flowcytometer.

ド DNA を精製し、これを鋳型として同様にシーケンスした。

6. スプライシング部位の解析

症例 1, 2 および症例 3 の予想されるスプライシング部位の変異部位を含むようにゲノム DNA 上に、図 1B のようにプライマーを設定し(それぞれ E, F 領域), 患児, その家族, 健康人から抽出した DNA 0.5 μ g を鋳型に PCR を行ない, シークエンスあるいは制限酵素による解析を行った。ゲノム DNA は, 活性化 T 細胞 1×10^7 個に, 100 μ l の 10mg/ml プロテナーゼ K (和光純薬工業, 大阪) を添加し, DNA/RNA/プラスミド抽出システムモデル 341 (Perkin-Elmer Applied Biosystems Division) を用いて抽出した。

成 績

I. リンパ球サブセット

lpr マウスや ALPS では末梢リンパ組織におけるダブルネガティブ T 細胞の著明な増加が特徴的であるが, 全症例とも表 2 に示すように 5.6~8.1% と有意にダブルネガティブ T 細胞が増加していた。症例 1, 2 の母親は 15.4% とむしろ患者よりもダブルネガティブ T 細胞の増加が認められた。T 細胞, B 細胞, NK 細胞の比率は症例 1~3, その家族とも大きな異常を認めなかった。

II. 抗 Fas 抗体, 抗 CD3 抗体によるアポトーシスの誘導

活性化 T 細胞に抗 Fas 抗体を添加すると, 健康人では図 2A のようにほとんどの細胞において核クロマチンの凝縮化, 核および細胞質の濃染・断片化が認められ, アポトーシスに陥ったが, 症例 1 では抗 Fas 抗体を添加してもアポトーシスは全く認められなかった(図 2B)。また抗 CD3 抗体にて誘導されるアポトーシス, いわゆる活性化誘導型細胞死 (activation-induced cell death, AICD) (図 2C) も, 症例 1 では減弱していた(図 2D)。症例 2, 3 でも同様に抗 Fas 抗体誘導性のアポトーシスは認められず, 抗 CD3 抗体誘導性のアポトーシスは減弱して

いた(図 3A, B)。つまりこれらの結果から, Fas レセプターを介して細胞死を誘導するシグナル伝達機構に異常がある可能性が示唆された。

さらに全症例の培養 B 細胞, LCL における抗 Fas 抗体にて誘導されるアポトーシスは, 健康人に比べ減弱していた(図 3C)。

III. Fas レセプターの発現

症例 1, 2 においては Fas レセプターの発現は, 正常コントロールとの違いは認められず, 少なくとも膜表面の Fas レセプターの発現には異常を認めなかった。症例 3 では Fas レセプターの発現が全く欠如していた(図 4)。症例 1~3 の家族ではいずれも Fas レセプターの発現の欠如は認められなかった。

IV. 症例 1, 2 (家系 1) における Fas 遺伝子異常

症例 1, 2 では A, B, C, D 領域のいずれも, 正常コントロールと比べ PCR 産物の大きさに違いはみられなかった。ダイレクトシーケンス決定では, A, B, D 領域は異常なかったが, C 領域のエキソン 7 と 8 の移行部よりダブルピークが出現した。そこで C 領域の PCR 産物を T ベクターにクローニングし複数個をシーケンスしたところ, エキソン 7 と 8 の間に GCAG という 4 塩基の挿入が生じているものと正常のものがほぼ同じ比率で認められた。異常が想定されるイントロン 7 の 5' スプライシング部位をはさむ E 領域のシーケンスより, 変異対立遺伝子では 5' スプライシング部位の +2 部位に T から C への点突然変異が認められ, このため変異対立遺伝子由来 mRNA ではスプライシング異常が起こり GCAG という 4 塩基の挿入が生じていた(図 5)。症例 1, 2 においては突然変異により新たに制限酵素 PstI の認識部位ができることを利用し, E 領域の PCR 産物を PstI で処理し, 家族における Fas 遺伝子異常を解析した。症例 1, 2 では変異対立遺伝子由来の PCR 産物により消化され 144 と 75 塩基対 (base pairs, bp) の 2 つのバンドが新たに生じたが, 父親では全く消化されなかった。母親は症例 1, 2 と同一パターンを示し, 変異対立遺伝子は母親由来と考えられた(図 6A)。

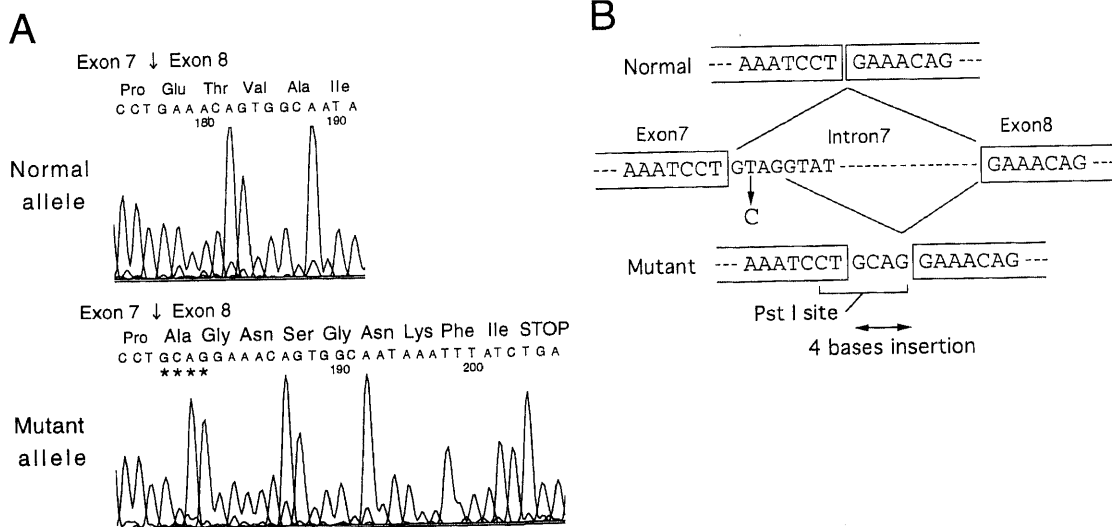


Fig. 5. Fas gene mutation in patients 1 and 2. Cloned RT-PCR products of C region (A) and PCR products of E region (B) from patients 1 and 2 were analyzed by automated dye-terminator sequencing using primers C5 and E5, respectively. (A) In C region, 4 bases insertion (GCAG) was observed between the exons 7 and 8 in the mutant allele. The mutant mRNA was predicted to cause a frameshift and a premature termination after 9 missense codons. (B) The genomic sequence of the mutant allele (E region) showed a T to C point mutation in the 5' splice site of the intron 7.

症例 1, 2 の母親は ALPS の症状は全くみられないが, 活性化 T 細胞における抗 Fas 抗体にて誘導されるアポトーシスは患児と同様欠如していた (図 6B).

V. 症例 3 (家系 2) における Fas 遺伝子異常

症例 3 では A, C, D 領域の PCR 産物の大きさは正常コントロールと同じであったが, B 領域では正常よりも短い PCR 産物が検出された. そこで症例 3 の家族の B 領域を RT-PCR により

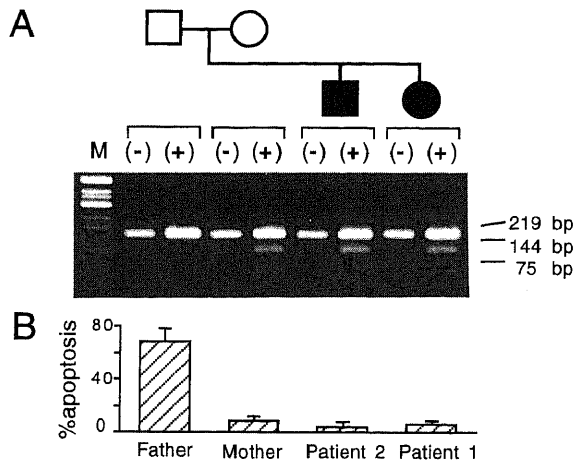


Fig. 6. PCR and restriction enzyme analysis of E region and Fas-induced apoptosis in family 1. (A) Genomic DNA was extracted from cultured T cells of family 1, and E region of Fas DNA was amplified using primers E5 and E3. The products after treatment with PstI were analyzed on a 3.0% agarose gel and visualized with ethidium bromide. In the mutant allele, T to C point mutation in the intron 7 make a PstI expected to cleave the 219 bp PCR product into 144 bp and 75 bp fragments. (-), no PstI added; (+), PstI added; M, molecular marker. (B) PHA-activated T cells (1×10^6 /ml) from family 1 were treated with $1 \mu\text{g/ml}$ of anti-Fas mAb for 12 hours. The percentages of apoptotic cells were estimated by the microscopic counting on May-Grünwald-Giemsa-stained preparations. The data represent $\bar{x} \pm \text{SD}$ of three independent experiments.

増幅したところ, 家族では正常の長さの PCR 産物と症例 3 と同じ短い PCR 産物の 2 本が認められた (図 7). 症例 3 のダイレクトシーケンス決定では, A, C, D 領域は異常なかったが, RT-PCR の段階で PCR 産物の長さが短く, 変異の存在が予想されていた B 領域において, エキソン 4 の完全な欠失が認められた. 異常が想定されるイントロン 3 の 3' スプライシング部位をばさむ F 領域のシーケンス決定により, 3' スプライシング部位の -2 部位に A から G への点突然変異があるためスプライシング異常が起こりエキソン 4 のスキップが生じていることが明らかとなった (図 8). B 領域の RT-PCR のパターンから, 症例 3 の両親は正常と変異対立遺伝子のヘテロ接合体であり, 症例 3 は変異対立遺伝子のホモ接合体となっていると考えられた. 症例 3 では突然変異により制限酵素 MaeI の認識部位がなくなることを利用し, F 領域の PCR 産物を MaeI で処理し, 家族における Fas 遺伝子異常を解析した. F 領域の PCR 産物を MaeI で処理すると正常ではイントロン 3 の 3' スプライシング部位とプライマー F3 側に MaeI の認識部位があるため, 134, 173, 19bp の断片に消化され, ゲル泳動上は $134+173\text{bp}$ の 1 本のバ

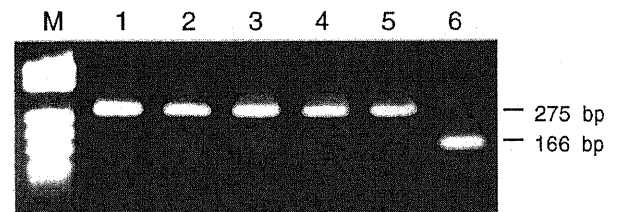


Fig. 7. RT-PCR analysis of B region in family 2. Single-strand cDNA was synthesized using total RNA from lymphoblastoid cell lines of family 2, and B region of the Fas cDNA was amplified with primers B5 and B3. The products from normal control (lane 1), maternal grandmother (lane 2), father (lane 3), mother (lane 4), brother (lane 5) and patient 3 (lane 6) were analyzed on a 3.0% agarose gel and visualized with ethidium bromide. Patient 3 had shorter products and the families had two bands, normally amplified 275 bp products and the shorter ones. M, molecular marker.

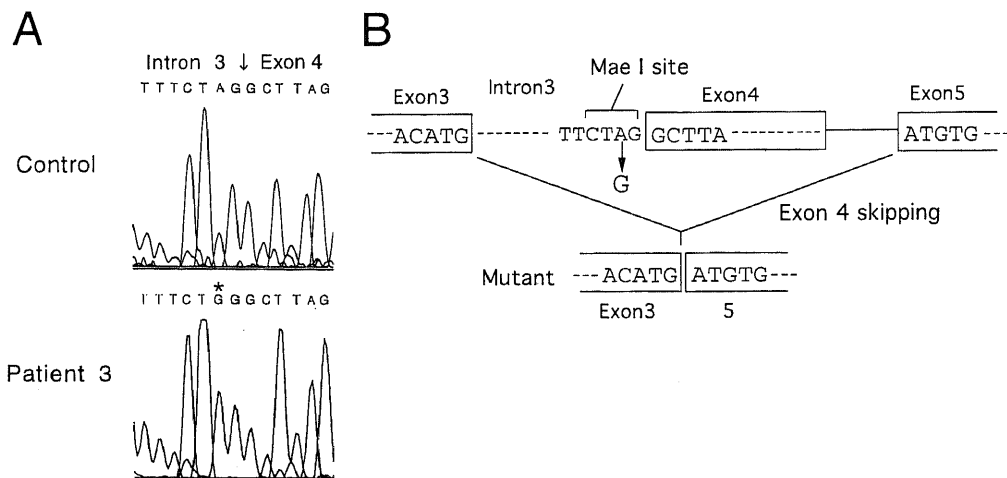


Fig. 8. Fas gene mutation in patient 3. PCR products of F region (A) and RT-PCR products of B region (B) from patient 3 were analyzed by automated dye-terminator sequencing using primers F5 and B5, respectively. (A) The genomic direct sequence of the mutant allele (homozygote) showed an A to G point mutation in the 3' splice site of intron 3. (B) The mRNA lacking exon 4 was predicted to have a frameshift and a premature termination.

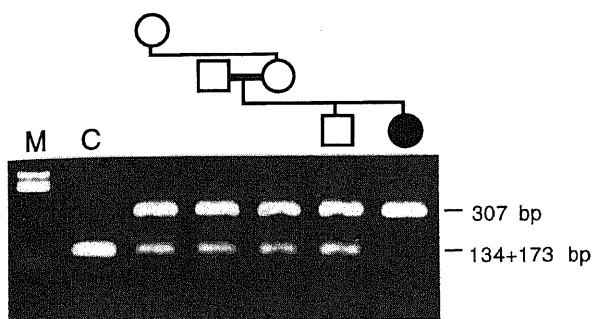


Fig. 9. PCR and restriction enzyme analysis of F region in family 2. Genomic DNA was extracted from the cultured T cells of family 2, and F region of Fas DNA was amplified using primers F5 and F3. The products after treatment with *MaeI* were analyzed on a 3.0% agarose gel and visualized with ethidium bromide. A *MaeI* normally cuts 326 bp PCR product into a shorter fragment (134+173 bp) and invisible 19 bp fragment. A to G point mutation in intron 3 abolished a *MaeI* site, and the PCR product from patient 3 having the homozygous mutation were cut into 307 bp fragment and invisible 19 bp fragment. The digests after treatment with *MaeI* of family 2 showed two fragments, 307 bp and 134+173 bp. M, molecular marker; C, control.

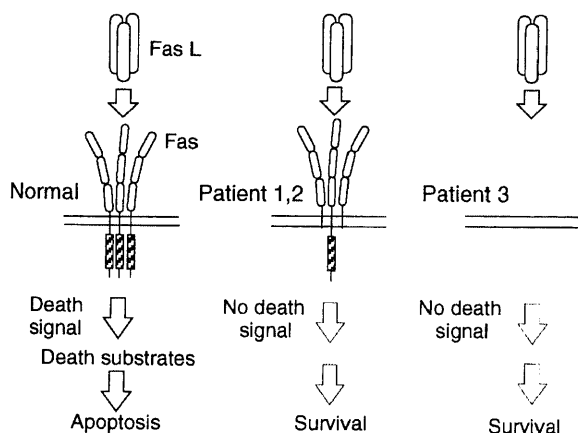


Fig. 10. A suggestive mechanism of defective Fas-mediated apoptosis in the ALPS patients. The binding of the trimeric Fas-ligand or agonistic anti-Fas mAb induces trimer formation of the Fas receptor, leading to successful transduction of the apoptotic death signal. In patients 1 and 2, by dominant negative effect of the mutant Fas proteins lacking their intracytoplasmic death domain, apoptotic death signal is not transmitted. In patient 3, absence of Fas expression precludes any Fas-mediated signal.

ンドとして検出された。症例3ではイントロン3の3' スプライシング部位に変異がホモで存在するためプライマー F3 側の *MaeI* 認識部位のみで消化され、307bp と 19bp の断片が生じ、ゲル泳動上は 307bp のみのバンドとして検出された。症例3のすべての家族では一方の対立遺伝子の変異があるため、307bp のバンドと 134bp+173bp の2つのバンドが認められた(図9)。

考 察

Fas レセプター/Fas リガンド系は免疫系の恒常性維持や自己寛容に重要な働きを果たし、またアポトーシスの異常が自己免

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報告されており Fas レセプター/Fas リガンド系やアポトーシスに関する研究は近年非常に増えている¹⁹⁾。

lpr マウスに類似するヒトのリンパ球増殖症候群である ALPS は、これまでに7家系8症例が報告されている。その遺伝形式は常染色体優性で、Fas レセプターの遺伝子座は10q23に位置する。発症年齢は2ヶ月から12歳にわたり、リンパ節腫脹、肝脾腫、自己免疫性の血管炎による蕁麻疹様皮疹、溶血性貧血、血小板減少症、好中球減少、糸球体腎炎、自己抗体産生、高 γ -グロブリン血症を呈し、いずれの症例も末梢血で CD3⁺ CD4⁻ CD8⁻ TCR $\alpha\beta$ ⁺ のダブルネガティブT細胞が15~60%と増加すると報告されている²⁰⁻²²⁾。今回解析した3症例は、いずれも幼少期の発症で、報告された ALPS とリンパ節腫脹、肝脾腫、紅斑、血小板減少、好中球減少などの臨床所見が極めて類似し、正常では末梢血において1%以下とほとんど検出されないダブルネガティブT細胞も、既報告例と比較すると少ないが、5.6~8.1%と有意に増加していた。

Fas 遺伝子の解析では症例1、2では母由来の変異対立遺伝子においてイントロン7の5' スプライシング部位にTからCへの点突然変異があるため、スプライシング異常が生じエキソン7と8の間に GCAG という4塩基が挿入されていた。この結果フレームシフトが生じエキソン7以降異常なコドンが9個続いた後終止コドンとなっていた。症例3は両親がいとこ婚で変異対立遺伝子のホモ接合体となっていたが、イントロン3の3' スプライシング部位にAからGへの点突然変異があるためエキソン4のスキップが認められ、エキソン3と5が直接繋がっていた。

前述のように劣性遺伝である *lpr* マウスと異なり、ALPS のほとんどは基本的に一つの対立遺伝子の変異により発症する優性遺伝形式をとる。Fas レセプターを介した細胞死の過程では、細胞内部分のデスドメインが3量体を形成することが必須であることが最近示唆されている²³⁾が、症例1、2のように、変異対立遺伝子と正常対立遺伝子のヘテロ接合体である場合、正常対立遺伝子由来の Fas レセプターだけで正常な3量体が形成される確率は、変異対立遺伝子と正常対立遺伝子由来の Fas レセプターの発現量が同じで、しかも正常と変異の Fas レセプターの会合がランダムであると仮定すると、理論的には $(1/2)^3 = 0.125$ となり、90%近くが変異 Fas を含んだ異常な3量体となる。このためドミナントネガティブ効果が生じ、Fas レセプターを介した細胞死に至るシグナル伝達が正常に行なわれないものと考えられる²⁴⁾(図10)。実際、症例1、2では Fas cDNA のC領域のダイレクトシーケンス決定でダブルピークを示していること、同部位の TA クローニングで正常と変異のクローンがほぼ同数得られたことより、正常対立遺伝子と変異対立遺伝子はほぼ同等に発現していると推測される。

しかし症例1、2の兄妹例では症状の程度にかなりの差が認められ、しかも症例1、2の母親はダブルネガティブT細胞が増加し、同じ遺伝子異常をもちながら ALPS を発症していない。また報告例でも明らかな家族での発症は記載されていない。つまり細胞レベルでの表現型が異常であっても、個体レベルでは疾患として発症するとは限らない。一般に優性遺伝の疾患には表現度の差異がみられることがあるが、Fas 異常のみで ALPS 発症は決定されず、ウイルス感染症などの環境因子や、免疫機構を調節する Fas 以外の未知の遺伝子異常、TNF・TNF レセ

プターなど Fas 以外の生理的細胞死に関わる系などが関与している可能性が考えられる。

症例 3 はエクソン 4 を欠如する変異をホモにもち、正常の Fas レセプター発現が欠如しているため、細胞死に至るシグナルが伝達されないと考えられる (図 10) が、この症例は胎児水腫を認め、新生児期早期より発症しており、症例 1, 2 と比べ臨床像もより重症である。症例 3 の家族は、正常対立遺伝子と異常対立遺伝子をもっているが、RT-PCR でみると正常なバンドに比べ、エクソン 4 を欠如する短い mRNA 由来のバンドは薄い。この RT-PCR は、正常対立遺伝子と変異対立遺伝子との競合 RT-PCR となっており変異 mRNA の発現が、正常の mRNA より少ないことが示唆される。これは、おそらく変異 mRNA の安定性が悪いことに起因すると考えられる。しかも変異由来の Fas レセプターは細胞膜貫通領域がなく膜上に発現できないため、症例 3 の家族では正常の Fas レセプターだけの発現となっていると考えられる。したがって、Fas レセプターを介するアポトーシスは正常に行なわれる。

Fas mRNA は 9 つのエクソンより構成されるが^{26,27)}、既に報告された 7 家系 8 症例の ALPS ではエクソン 3 からエクソン 9 にかけて変異が認められ、いわゆるホットスポットという部位は見当たらない。今回解析した 2 家系 3 症例では、既報告例とは全く異なる新しい部位に Fas 遺伝子異常が認められた。Fiucci ら³¹⁾は、100 検体について変異を検索した結果、正常人では Fas 遺伝子の変異はみつからなかったとしており、Fas 遺伝子変異は ALPS に特異的と考えられる。

一般にダブルネガティブ T 細胞は、胸腺における未熟な分化段階でみられるが、*lpr* マウスや ALPS の末梢リンパ組織や血液中に増加するダブルネガティブ T 細胞の由来は不明である^{32,33)}。生体内では増加がみられるものの生体外でのレクチンや抗 CD3 抗体、抗 CD2 抗体に対する増殖反応は低下していることが報告されている¹⁹⁾。このダブルネガティブ T 細胞はフローサイトメトリーにより簡便に測定できるため ALPS の診断において重要と考えられた。また T 細胞レセプター (TCR) $V\beta$ のレパトアの検索からこの T 細胞亜群はオリゴクローナルとされるが、腫瘍性増殖はきたさない³²⁾。

自己寛容の破綻において重要な役割を果たすと考えられる自己反応性 T 細胞は、通常胸腺における負の選択により大部分がアポトーシスを起こして除かれ、また末梢にもれてたものもやはりアポトーシスに陥り排除されると考えられている³⁴⁾。Fas レセプターの発現は、末梢の活性化成熟リンパ球の他に、マウスでは未熟な $CD4^+ CD8^+$ ダブルポジティブ胸腺細胞で発現するため、当初、Fas/Fas リガンド系が異常である *lpr* マウスでは、胸腺内での自己反応性 T 細胞の除去が低下して、自己寛容の破綻が起こると考えられていた。しかし、*lpr* や *gld* マウスでは胸腺での負の選択はほぼ正常に起こっていることが報告されている³⁵⁻³⁷⁾。

一方ヒトにおいては、Fas レセプターは最も未熟な $CD4^- CD8^-$ ダブルネガティブ T 細胞から $CD4^+ CD8^+$ ダブルポジティブ T 細胞にかけて弱く発現し、 $CD4^+ CD8^+$ ダブルポジティブ T 細胞から $CD4^- CD8^+$ あるいは $CD4^+ CD8^-$ のシングルポジティブ T 細胞に成熟する過渡期、つまり最も強く選択を受けている T 細胞に強く発現している^{38,39)}。このことから *lpr* マウスと異なり、ALPS では胸腺内での自己反応性 T 細胞の除去が低下している可能性がある。また *lpr* マウスや ALPS では AICD が起

きにくいことが報告されている^{21,40,41)}が、今回の解析でも患児の抗 CD3 抗体による AICD は誘導されにくく、末梢における自己反応性 T 細胞も排除されない可能性を示唆している。以上の機構により ALPS では自己寛容が破綻し、様々な自己免疫状態が生じると考えられる。

さらに T 細胞のみならず B 細胞におけるアポトーシスにも Fas レセプター/Fas リガンド系が関与していることが最近示されている⁴²⁻⁴⁴⁾が、実際患児の培養 B 細胞や EBV 形質転換 B 細胞株においても Fas 誘導性のアポトーシスは減弱していた。このことは ALPS における高 γ -グロブリン血症、自己抗体の産生が、自己反応性 T 細胞による B 細胞の活性化だけでなく、自己反応性 B 細胞そのもののアポトーシス低下にも起因している可能性を示唆しており興味深いと思われた。

最近、リンパ球増殖症候群を伴った SLE に Fas リガンドの遺伝子変異が初めて報告された⁴⁵⁾。Fas レセプターや Fas リガンドの異常によって引き起こされるこのような症例の解析により、Fas レセプター/Fas リガンドシステムの免疫系における役割がさらに解明され、また自己免疫疾患の発症の機構、病態の解明につながることを期待される。

結 論

自己免疫性リンパ球増殖症候群の 2 家系 3 症例およびその家族に対し Fas レセプター異常の解析を行い以下の結果を得た。

1. 家系 1-症例 1, 2 では母由来の変異対立遺伝子においてイントロン 7 の 5' スプライシング部位に T から C への点突然変異があり、このため変異対立遺伝子由来の mRNA ではスプライシング異常が生じ、エクソン 7 と 8 の間に GCAG の 4 塩基の挿入が認められ、フレームシフトによりエクソン 7 以降異常なコドンが 9 個続いた後終止コドンとなっていた。変異由来の Fas レセプターは細胞外部分の発現は正常であるが、デストメインを含む細胞内部分がなく異常な 3 量体を形成するため、ドミナントネガティブ効果により細胞死に至るシグナルが伝達されないと考えられた。

2. 家系 2-症例 3 ではイントロン 3 の 3' スプライシング部位 (アクセプター) に A から G への点突然変異があるためエクソン 4 のスキップが認められ、エクソン 3 と 5 が直接繋がっていた。この結果フレームシフトが生じエクソン 3 以降異常なコドンが 38 個続いた後終止コドンとなっていた。症例 3 では両親がいとこ婚で変異対立遺伝子のホモ接合体となっていたため Fas レセプターそのものの発現が全く欠如し細胞死に至るシグナルが伝達されず、また症例 1, 2 よりも重症であると考えられた。

3. これらの症例は本邦初であり、確認された遺伝子異常は従来の報告にはみられず全く新しいものであった。

4. 症例 1, 2 の母親は同じ遺伝子異常をもち、細胞レベルでは Fas 誘導性アポトーシスに対し抵抗性を示したが、臨床的には全く無症状であり ALPS 発症にはさらに別の因子が関与している可能性が考えられた。

5. 患児では T 細胞の Fas 誘導性アポトーシスが欠如しているほか AICD も減弱しているため、自己反応性 T 細胞が排除されず、自己寛容が破綻し様々な自己免疫状態が生じているものと考えられた。さらに培養 B 細胞の Fas 誘導性アポトーシスが減弱していることから、高 γ -グロブリン血症、自己抗体の産生が自己反応性 B 細胞そのもののアポトーシス低下にも起因し

ている可能性が示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導と御校閲を賜りました金沢大学医学部小児科学教室谷口 昂名誉教授ならびに小泉晶一教授に深甚なる謝意を表します。さらに御支援と御協力を頂きました金沢大学医学部小児科学教室の皆様、現富山医科薬科大学小児科学教室宮脇利男教授に深謝致します。また貴重な症例(症例3)を御紹介頂いた愛媛大学小児科石田也寸志先生に感謝いたします。なお本研究の一部は厚生省特定疾患原発性免疫不全症候群調査研究班より助成を受けたことを付記し謝意を表します。本論文の一部は第26回日本免疫学会総会・学術集会(横浜1996)において発表した。

文 献

- 1) Yonehara S, Ishii A, Yonehara M. A cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor. *J Exp Med* 169: 1747-1756, 1989
- 2) Trauth BC, Klas C, Peter AMJ, Matzku S, Möler P, Falk W, Debatin KM, Krammer PH. Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. *Science* 245: 301-305, 1989
- 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) Oehm A, Behrmann I, Falk W, Pawlita M, Maier G, Klas C, Li-Weber M, Richards S, Dhein J, Trauth BC, Pongstingl H, Krammer PH. Purification and molecular cloning of the APO-1 cell surface antigen, a member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor superfamily. *J Biol Chem* 267: 10709-10715, 1992
- 5) 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
- 6) Suda T, Nagata S. Purification and characterization of the Fas-ligand that induces apoptosis. *J Exp Med* 179: 873-879, 1994
- 7) Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH, Peter ME. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins from a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J* 14: 5579-5588, 1995
- 8) Cohen PL, Eisenberg RA. *Lpr* and *gld*: Single gene models of systemic autoimmunity and lymphoproliferative disease. *Ann Rev Immunol* 9: 243-269, 1991
- 9) Watanabe-Fukunaga R, Brannan CI, Copeland NG, Jenkins NA, Nagata S. Lymphoproliferative disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature* 356: 314-317, 1992
- 10) Adachi M, Watanabe-Fukunaga R, Nagata S. Aberrant transcription caused by the insertion of an early transposable element in an intron of the Fas antigen gene of *lpr* mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 1756-1760, 1993
- 11) 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
- 12) Nagata S, Suda T. Fas and Fas ligand: *lpr* and *gld* mutations. *Immunol Today* 16: 39-43, 1995
- 13) Lynch DH, Ramsdell F, Alderson MR. Fas and FasL in the homeostatic regulation of immune responses. *Immunol Today* 16: 569-574, 1995
- 14) Dhein J, Walczak H, Bämmler C, Debatin KM, Krammer PH. Autocrine T-cell suicide mediated by APO-1 / (Fas/CD95). *Nature* 373: 438-441, 1995
- 15) Nagata S, Golstein P. The Fas death factor. *Science* 267: 1449-1456, 1995
- 16) Ju ST, Panka DJ, Cui H, Ettinger R, El-Khatib M, Sherr DH, Stanger BZ, Marshak-Rothstein A. Fas(CD95)/FasL interactions required for programmed cell death after T-cell activation. *Nature* 373: 444-448, 1995
- 17) Lenardo MJ. Fas and the art of lymphocyte maintenance. *J Exp Med* 183: 721-724, 1996
- 18) Illum N, Ralfkiaer E, Pallesen G, Geisler C. Phenotypical and functional characterization of double-negative (CD4⁻ CD8⁻) $\alpha\beta$ T-cell receptor positive cells from an immunodeficient patient. *Scand J Immunol* 34: 635-645, 1991
- 19) Sneller MC, Straus SE, Jaffe ES, Jaffe JS, Fleisher TA, Stetler-Stevenson M, Strober W. A novel lymphoproliferative/autoimmune syndrome resembling murine *lpr* / *gld* disease. *J Clin Invest* 90: 334-341, 1992
- 20) Rieux-Laucat F, Le Deist F, Hivroz C, Roberts IAG, Debatin KM, Fischer A, de Vilartay JP. Mutations in Fas associated with human lymphoproliferative syndrome and autoimmunity. *Science* 268: 1347-1349, 1995
- 21) Fisher GH, Rosenberg FJ, Straus SE, Dale JK, Middleton LA, Lin AY, Strober W, Lenardo MJ, Puck JM. Dominant interfering Fas gene mutations impair apoptosis in a human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Cell* 81: 935-946, 1995
- 22) Le Deist F, Emile JF, Rieux-Laucat F, Benkerrou M, Roberts I, Brousse N, Fischer A. Clinical, immunological, and pathological consequences of Fas-deficient conditions. *Lancet* 348: 719-723, 1996
- 23) Miyawaki T, Uehara T, Nibu R, Tsuji T, Yachie A, Yonehara S, Taniguchi N. Differential expression of apoptosis-related Fas antigen on lymphocyte subpopulations in human peripheral blood. *J Immunol* 149: 3753-3758, 1992
- 24) Iwai K, Miyawaki T, Takizawa T, Konno A, Ohta K, Yachie A, Seki H, Taniguchi N. Differential expression of bcl-2 and susceptibility to anti-Fas-mediated cell death in peripheral blood lymphocytes, monocytes, and neutrophils. *Blood* 84: 1201-1208, 1994
- 25) Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156-159, 1987
- 26) Behrmann I, Walczak H, Krammer PH. Structure of the human APO-1 gene. *Eur J Immunol* 24: 3057-3062, 1994
- 27) Cheng J, Liu C, Koopman WJ, Mountz JD. Characterization of human Fas gene. *J Immunol* 154: 1239-1245, 1995
- 28) Kelley JM. Automated dye-terminator DNA sequencing. *In*

- MD Adams, C Fields, C Venter (eds), Automated DNA Sequencing and Analysis, 1st ed, p175-181, Academic Press, London, 1994
- 29) Itoh N, Nagata S. A novel protein domain required for apoptosis. *J Biol Chem* 268: 10932-10937, 1993
- 30) Cascino I, Papoff G, De Maria R, Testi R, Ruberti G. Fas / Apo-1 (CD95) receptor lacking the intracytoplasmic signaling domain protects tumor cells from Fas-mediated apoptosis. *J Immunol* 156: 13-17, 1996
- 31) Fiucci G, Ruberti G. Detection of polymorphisms within the Fas cDNA gene sequence by GC-clamp denaturing gradient gel electrophoresis. *Immunogenetics* 39: 437-439, 1994
- 32) Zhou T, Bluethmann H, Eldridge J, Berry K, Mountz JD. Origin of CD4⁻ CD8⁻ B220⁺ T cells in MRL-*lpr/lpr* mice. *J Immunol* 150: 3651-3667, 1993
- 33) Budd RC, Mixter P F. The origin of CD4⁻ CD8⁻ TCR $\alpha\beta$ ⁺ thymocytes : a model based on T-cell receptor avidity. *Immunol Today* 16: 428-431, 1995
- 34) Singer GG, Abbas AK. The fas antigen is involved in peripheral but not thymic deletion of T lymphocytes in T cell receptor transgenic mice. *Immunity* 1: 365-371, 1994
- 35) Herron LR, Eisenberg RA, Roper E, Kakkanaiah VN, Cohen PL, Kotzin BL. Selection of the T cell receptor repertoire in *lpr* mice. *J Immunol* 151: 3450-3459, 1993
- 36) Ogasawara J, Suda T, Nagata S. Selective apoptosis of CD4⁺ CD8⁺ thymocytes by the anti-Fas antibody. *J Exp Med* 181: 485-491, 1995
- 37) Adachi M, Suematsu S, Suda T, Watanabe D, Fukuyama H, Ogasawara J, Tanaka T, Yoshida N, Nagata S. Enhanced and accelerated lymphoproliferation in Fas-null mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 2131-2136, 1996
- 38) Yonehara S, Nishimura Y, Kishi S, Yonehara M, Takazawa K, Tamatani T, Ishii A. Involvement of apoptosis antigen Fas in clonal deletion of human thymocytes. *Int Immunol* 6: 1849-1856, 1994
- 39) Debatin KM., Stüss D, Krammer PH. Differential expression of APO-1 on human thymocytes: implications for negative selection ? *Eur J Immunol* 24: 753-758, 1994
- 40) Russell JH, Rush B, Weaver C, Wang R. Mature T cells of autoimmune *lpr/lpr* mice have a defect in antigen-stimulated suicide. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 4409-4413, 1993
- 41) Gillette-Ferguson I, Sidman CL. A specific intercellular pathway of apoptotic cell death is defective in the mature peripheral T cells of autoimmune *lpr* and *gld* mice. *Eur J Immunol* 24: 1181-1185, 1994
- 42) Rathmell JC, Cooke MP, Ho WY, Grein J, Townsend SE, Davis MM, Goodnow CC. CD95 (Fas)-dependent elimination of self-reactive B cells upon interaction with CD4⁺ T cells. *Nature* 376: 181-184, 1995
- 43) Garrone P, Neidhardt EM, Garcia E, Galibert L, van Kooten C, Banchereau J. Fas ligation induces apoptosis of CD40-activated human B lymphocytes. *J Exp Med* 182: 1265-1273, 1995
- 44) Watanabe D, Suda T, Nagata S. Expression of Fas in B cells of the mouse germinal center and Fas-dependent killing of activated B cells. *Int Immunol* 7: 1949-1956, 1995
- 45) 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

Functional and Mutational Analysis of Fas Receptor (CD95) in Three Patients with Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome Taizo Wada, Department of Pediatrics, School of Medicine, Faculty of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. *Juzen Med Soc.*, 105, 776—787 (1996)

Key words Fas (APO-1, CD95), apoptosis, autoimmune lymphoproliferative syndrome, double-negative T cell

Abstract

The Fas receptor/Fas ligand system induces apoptosis of Fas-bearing cells and plays an important role in the immune regulations, especially in the deletion of self-reactive clones. It is known that *lpr* mouse caused by the Fas deficiency, exhibits autoimmunity with abnormal proliferation of CD4⁻CD8⁻ (double-negative) T cells. Autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS) was recently identified as a human counterpart of the *lpr* mouse. In this study, 3 cases of ALPS from two independent families were evaluated for immunological and genetic abnormalities of the Fas receptor. They all exhibited lymphadenopathy, hepatosplenomegaly, thrombocytopenia, hypergammaglobulinemia and the increased number of double-negative T cells from early childhood. In patient 1 and 2 (family 1) who were heterozygous in the Fas receptor gene, the genomic sequence of the mutant allele inherited from their mother showed a T to C point mutation in the 5' splice site of intron 7, resulting in aberrant splicing. In the mutant mRNA, 4 bases insertion (GCAG) between exon 7 and 8 was predicted to cause a frameshift and premature termination after 9 missense codons. The surface Fas expression on activated T cells from these patients was comparable to that on normal T cells, but the truncated mutant proteins lacking the death domain probably induced a dominant negative effect, leading to the formation of abnormal trimers unable to transduce the intracytoplasmic death signal. Although their mother had an identical mutation of the Fas receptor and exhibited a similar resistance to Fas-mediated apoptosis at the cellular level, she remained asymptomatic. These facts suggested that there exists an additional factor responsible for the manifestation of typical ALPS. Patient 3 (family 2) was born to parents who were cousins, and the

genomic sequence of the homozygous mutant alleles showed an A to G point mutation in the 3' splice site of the intron 3. The mRNA lacking exon 4 was predicted to have a frameshift and premature termination after 38 missense codons. Absence of the Fas expression may preclude any Fas-mediated signals and result in much severer clinical features in this case. In all cases, activation-induced cell death of T cells was markedly diminished and Fas-induced apoptosis was defective. It was strongly suggested that these abnormalities of the T cell function led to the failure in the exclusion of self-reactive T cell clones, resulting in the development of various autoimmune disorders. Moreover, decreased Fas-mediated apoptosis of cultured B cells from these patients suggested that defective killing of the self-reactive B cells was directly related to the hypergammaglobulinemia and the autoantibody production.