

氏名	首藤光洋
生年月日	
本籍	東京都
学位の種類	博士(理学)
学位記番号	博甲第438号
学位授与の日付	平成13年9月28日
学位授与の要件	課程博士(学位規則第4条第1項)
学位授与の題目	Fasリガンドによる炎症誘導機構に関する研究
論文審査委員(主査)	辻 彰(薬学部・教授)
論文審査委員(副査)	宮本 謙一(医病院・教授) 横井 毅(医研究科・教授) 中西 義信(医研究科・教授) 須田 貴司(がん研・教授)

## 学位論文要旨

### Abstract

Fas Ligand(FasL) is a cytokine that induces apoptosis when it engages its cell surface receptor Fas. FasL expressing in immune-privileged organs might induce apoptosis in infiltrated inflammatory cells to protect those organs from detrimental effect of inflammation. Recent study showed that FasL induces not only apoptosis but also conversion of pro-IL-1 $\beta$  into its active form and causes inflammation. FasL is a membrane-bound protein and the soluble form is released from the membrane form by a proteolytic mechanism. However the role of the membrane-bound and soluble form of FasL in inflammation has not been well understood. Although IL-1 is a mediator to induce neutrophil infiltration, the mechanism of neutrophil infiltration in FasL induced inflammation is not fully understood because the infiltration is still observed in IL-1KO mice. Therefore, in this study, 1) comparison *in vivo* inflammation activity of the membrane and soluble form of FasL, and 2) investigation of the factors that may concern with neutrophil infiltration were performed.

1) Tumor cell lines that express membrane-bound and/or soluble form of FasL were established from mouse leukemia cell line FBL-3. Those tumor cells were injected into the peritoneal cavity of syngeneic mice. 18hr after the injection, peritoneal exudate cells were analyzed by flow cytometry. Tumor cells expressing the membrane-bound form of FasL induced neutrophil infiltration, whereas the soluble form of FasL did not. Furthermore intraperitoneal injection of purified soluble FasL(0.1-10000ng) did not induce the neutrophil infiltration. Tumor cells expressing FasL were transplanted into the skin of syngeneic mice. Tumor expressing membrane-bound but not soluble FasL were rejected earlier than control tumors. These results indicate that the membrane-bound but not soluble form of FasL plays a critical role in the induction of neutrophil infiltration and the

acceleration of tumor rejection by FasL *in vivo*

2) Tumor cell lines that express FasL were injected into the peritoneal cavity, then cytokines in the peritoneal cavity were measured by ELISA. Quantity of IL-1 $\beta$ , IL-6, KC and IL-17 were increased by FasL. Thioglycollate-induced PEC cultured with FasL also released those cytokines. Although it has been reported that IL-17 was released mostly from T cells, thioglycollate-induced PEC from SCID mice also release IL-17 upon FasL stimulation. This result suggests the possibility that not only T cells but also other cells in PEC release IL-17. Consequently, IL-17, IL-6, KC might be additional factors that concern with the neutrophil infiltration.

Fasリガンド(FasL)はTNFファミリーの一員で、40kDaの2型の膜貫通蛋白質であり、細胞表面受容体Fasに働き、細胞にアポトーシスを誘導するサイトカインである。FasLは活性化T細胞やナチュラルキラー細胞に発現し、ウィルス感染細胞や癌細胞を駆逐することや、自己反応性のリンパ球や役割を終えた活性化リンパ球などの排除に関与し、免疫系の恒常性を維持している。また、FasLの発現は、眼球や精巣等の様々な免疫特権組織にも発現し、浸出した免疫系細胞にアポトーシスを誘導することにより、過剰な炎症反応を抑制していると考えられている。メラノーマ、胃癌、肺癌などの悪性腫瘍もFasLを発現させ、腫瘍細胞を駆除するために来た免疫担当細胞にアポトーシスを誘導し、免疫系からの攻撃を免れているとも考えられている。しかし、臓器移植を目的とした研究で、免疫系からの攻撃を免れるため膵臓細胞にFasLを発現させた細胞を移植したところ、逆に好中球の浸出を伴う炎症が生じ、移植細胞の拒絶が早まったという報告がされている。だが、どのようなメカニズムで炎症が起こるのかはまだ詳しくは検討されていないのが現状である。

FasLは膜蛋白質として生産されるが、膜貫通領域近郊の細胞外領域でメタロプロテアーゼによる切断を受け、可溶型として細胞外へも放出される。FasLは膜型は強いアポトーシス誘導活性をもっている。一方、可溶型はアポトーシス誘導活性が弱く、また、アポトーシスを誘導できる対象の細胞に種間で差がみられる。しかし、*in vitro*で可溶型FasLは好中球に対し遊走活性をもつことが示され、FasLによる炎症誘導は可溶型FasLが担っていると示唆されていた。本研究では、*in vivo*におけるFasLによる炎症誘導作用が膜型と可溶型のいずれによって担われているかを明らかにすることを目的とした。

また、FasLによる好中球浸出の機構については、FasLは炎症細胞にアポトーシスを引き起こすが、同時に炎症性サイトカインであるInterleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )を不活性型から活性型へ変化させ放出によるとの報告がなされている。しかし、IL-1 $\alpha/\beta$ ノックアウト(IL-1KO)マウスを用いた研究では、好中球の浸出は野生型(WT)と比べ抑制はされるが、完全に抑制されているわけではない。このことは、IL-1の放出のみで好中球浸出誘導を担っていると説明するには過分で、好中球の浸出を誘導させるIL-1を介さない他の系があると示唆されていた。そこで、IL-1以外の好中球浸出に関わる因子を同定することを更なる目的とした。

#### 1. 膜型および可溶型Fasリガンドによる炎症誘導作用の解析

FasLによる炎症誘導作用が膜型あるいは可溶型のいずれによって担われているかを検討するため、遺伝子組換え法により改変FasLを作成した。FasLは細胞内領域がプロリ

ンリッチなため発現量が増えないため、細胞領域を大きく欠失させ発現量が増加するFasLを作成した。このFasLは膜型として産生され、切断を受け可溶型も放出する。また、膜型のみを発現するFasLは、メタロプロテアーゼによる切断部位を含むエクソン2を欠失させることでその切断をうけないような構造にして作成した。メタロプロテアーゼによる切断で放出される可溶型FasLのほぼ全長を、Fasシグナルシーケンスを融合させたものを、可溶型FasLとして作成した。これらの改変FasLをマウス白血病細胞FBL-3に遺伝子導入し、膜型と可溶型の片方あるいは双方のFasLを発現する細胞株を樹立した。

膜型と可溶型FasLが好中球を浸出させるか検討するため、樹立した細胞株( $4 \times 10^6$ 細胞/匹)を同系マウスの腹腔内へ投与した。18時間後に腹腔内の細胞(PEC)を回収し、抗Gr-1抗体で染色し、フローサイトメトリー法により組成を解析した。その結果、膜型FasLを発現する細胞株を投与したときは、好中球の腹腔内浸出を誘導したが、可溶型のみのFasLを発現する細胞株を投与しても好中球の浸出は認められなかった。また、好中球の浸出に関与するIL-1 $\beta$ の腹腔中の量をELISA法で測定したところ、膜型FasLを発現する細胞株を投与したときはIL-1 $\beta$ 量は上昇したが、可溶型のみのFasLを発現する細胞株ではこの上昇は認められなかった。可溶型FasLの好中球に対する走化性作用は0.1-10mMの濃度範囲内で有効であると言われている。そのため、抗FasL抗体カラムを用いて可溶型FasLを精製し、精製可溶型FasLを0.1-10000ngと広範囲でマウス腹腔内へ投与し、好中球が浸出するか検討してみた。しかし投与後4-18時間に回収したPEC中に好中球の浸出は認められなかった。

FasLが腫瘍の拒絶を誘導するという報告があることから、膜型あるいは可溶型のいずれが腫瘍の拒絶を誘導するか検討した。樹立したFasL発現細胞株( $2.5 \times 10^6$ 細胞)を同系のWTとlprのマウス背部の皮内に移植し、そこに生じる腫瘍塊の大きさを3日毎に測定した。FasLを発現していない対照細胞株は一旦成長するが、その後拒絶を受け退縮し、およそ3週間で消滅する。これはWTとlprとでは差がない。膜型FasLを発現する細胞株をlprに移植したときは、Fasを介したシグナルが伝わらないため3週間程度で消滅するのに対し、膜型FasLをWTに移植すると1週間程度で消滅し、拒絶が促進された。だが、可溶型FasLのみを発現する細胞株は、WTとlprのいずれにおいても、対照群と同程度の速度の3週間で拒絶を受けた。

以上より、*in vivo*におけるFasLによる好中球の浸出や腫瘍の拒絶といった炎症反応は、可溶型FasLではなく、膜型FasLに担われていることが明らかになった。

## 2. Fasリガンドによる炎症誘導における、好中球浸出に関わる因子の検討

FasLによる炎症における好中球浸出に関わる因子の解析のため、マウス腹腔内にFasL発現細胞株を腹腔内へ投与し、腹腔浸出液を回収し、ELISA法により好中球の浸出や炎症反応に関与しそうなサイトカイン等の変動を測定した。その結果、FasLの投与によりKC(CXCケモカインであり、ヒトIL-8の機能的ホモログ)と、IL-6、IL-17が上昇するのが認められた。これらはIL-1KOマウスにおいても変動がみられた。しかし、IFN、TGF、TNF、NOには変化が認められなかった。IL-17は上皮系細胞に働きかけIL-6やIL-8の産生を誘導すると報告があるほか、好中球に対し直接的な走化作用は認められてはいないが、動物に投与すると好中球の浸出を誘導する作用があると報告されている。

*in vitro*のこれらのサイトカインの産生を検討した。チオグリコレート誘導PECとFasLを共培養し、18時間後に培養上清中に放出されたのサイトカインの量を測定した結果、FasLがPECからのIL-17、IL-6、KCの産生を誘導することが明らかになった。また、

IL-17は主にT細胞によって産生されると報告がある。FasLによりIL-17がT細胞で産生されるのか確かめるため、抗原受容体の遺伝子が再構成ができないことによりT細胞とB細胞を欠如するSCIDマウスからチオグリコレート誘導PECを用意し、同様の実験を試みた。その結果、SCIDマウス由来のチオグリコレート誘導PECは野生型由来のと同程度のIL-17の産生を誘導し、FasLはT細胞以外の細胞にもIL-17の産生を誘導し得ることが示された。

これらのことから、FasLによる炎症誘導における好中球の浸出誘導のメカニズムにはIL-1 $\beta$ のみならずT細胞やB細胞以外の細胞が産生するIL-17も関与する可能性があると示唆された。

はじめに述べたようにFasLには炎症を促進する場合と抑制する場合がある。FasLの炎症抑制作用を利用して、移植片の拒絶を抑制できたという報告がある一方、FasLを人工的に組織に発現させると、強い炎症が起きて、組織が破壊されたという報告もある。また、FasLを発現した癌細胞は免疫系の攻撃を回避するという考え方が示されているが、本研究でも示しているようにFasLを発現させた腫瘍細胞は拒絶されやすい事実もある。この研究から明らかになったFasLの炎症誘導作用の分子機構に基づき、今後、FasLの炎症誘導作用と炎症抑制作用の分子機構をさらに詳細に解明し、これら二つの作用を完全に人為的に制御することが可能になれば、移植免疫を抑制したり、逆に癌の拒絶を促進することに利用しうる、新しい技術の開発につながると考えられる。

## 学位論文審査結果の要旨

Fas リガンド (FasL) はアポトーシスを誘導するサイトカインで、様々な炎症性疾患への関与が示唆されている。最近 FasL には炎症誘導作用があり、FasL を発現させた癌細胞は炎症により拒絶が促進されることが示された。この作用の分子機構に関し、FasL は炎症細胞にアポトーシスを誘導するが、このとき炎症性サイトカインである IL-1 $\beta$  が活性化されるために炎症が促進されるとする報告と、可溶性 FasL が好中球に対する走化性因子として働くとする報告がなされている。本研究は FasL の炎症誘導作用の分子機構を明らかにする目的で、膜型と可溶性 FasL のどちらに炎症誘導作用があるのか、IL-1 以外に FasL の炎症誘導作用を媒介する因子が存在するかについて検討した。その結果 FasL の好中球浸潤誘導作用、IL-1 $\beta$  活性化誘導作用、腫瘍拒絶促進作用とも膜型が担うことが示された。また、FasL 発現細胞を腹腔投与したマウス腹腔滲出液中に IL-1 の他に IL-17, KC, IL-6 が検出される一方、TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , TGF $\beta$  などは検出されなかった。炎症性腹腔浸出細胞を FasL で刺激すると IL-17 の分泌が誘導された。KC は好中球に対するケモカインであり、IL-1 や IL-17 は種々の細胞に KC の産生を誘導する。従って、FasL は炎症細胞に IL-1 や IL-17 の分泌を促し、KC が産生されて好中球浸潤を誘導する可能性が示唆された。本論文は FasL の炎症誘導機構の一端を明らかにし、炎症性疾患や癌に対する新しい治療法の開発に寄与しうるものであり、博士 (理学) に値すると評価された。