



Increased expression of both Fas antigen and Bcl-2protein in T cells from patients with Sjögren's syndorome

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-30 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 唐橋, 太郎 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1203

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 350号	学位授与年月日	平成13年 3月27日
氏名	唐橋太郎		
論文題目	<p>Increased expression of both Fas antigen and Bcl-2 protein in T cells from patients with Sjögren's syndrome (シェーグレン症候群患者における T細胞の Fas 抗原と Bcl-2 蛋白の発現の検討)</p>		

博士(医学) 唐橋太郎

論文題目

Increased expression of both Fas antigen and Bcl-2 protein in T cells from patients with Sjögren's syndrome
(シェーグレン症候群患者におけるT細胞のFas抗原とBcl-2蛋白の発現の亢進)

論文の内容の要旨

シェーグレン症候群(以下SSと略す)は、唾液腺炎や涙腺炎などの臓器特異的な炎症と皮膚・造血器・肺・腎などの全身性自己免疫疾患の特徴を合わせ持った疾患である。近年末梢性アポトーシスを制御する機構としてFas-Fasリガンド系に注目が集まっている。動物実験系ではFas抗原やFasリガンドの欠損によりマウスが全身性エリテマトーデス(以下SLEと略す)やSS様の症状・所見を呈し、自己免疫疾患のモデルになりうると報告されているが、ヒトにおいては、SLE患者末梢血より得たT細胞、B細胞ともFas抗原の発現が亢進しており動物実験とは逆の結果であった。また、アポトーシス抑制遺伝子Bcl-2蛋白の発現は、SLE患者リンパ球で亢進しており、そのメッセンジャーRNAも増加していると報告されている。

そこで今回我々は、SS患者においてアポトーシス関連蛋白Fas抗原とBcl-2の発現を末梢血リンパ球にて検討し、培養系にてリンパ球を刺激してその発現の変化を観察することによってその病態を解析した。

[対象患者及び方法]

厚生省のSSの診断基準を満たした36名のSS患者と26名の健常者(男性1名、女性25名、平均年齢41.8±13.2)を対象患者とした。SS患者は原発性シェーグレン症候群(以下I°SSと略す)(男性2名、女性16名、平均年齢50.1±10.8)、二次性シェーグレン症候群(以下II°SSと略す)(女性18名、平均年齢49.3±13.3)でその内訳は、SLE7名、強皮症5名、混合性結合組織病3名と慢性関節リウマチ3名であった。

[フローサイトメトリー法]

健常者及びSS患者より早朝空腹時、ヘパリン加末梢血を採取し、単核球に分離した。二重染色解析は、FITC標識抗Fas抗体と、PE標識抗CD3、4、8、20抗体を同時使用した。三重染色解析は、FITC標識抗Fas抗体、PE標識抗CD45RO抗体とPerCP標識抗CD4抗体を使用した。細胞内抗原であるBcl-2の染色は、0.25%パラホルムアルデヒドと70%メタノールで処理後FITC標識抗Bcl-2抗体とPE標識抗CD3、CD4、CD8抗体にて行った。二重または、三重染色細胞の解析は、EPICS Profile IIまたは、EPICS Eliteによって行った。

[細胞培養]

細胞数が 1×10^6 /mlになるように培養液で調整し、37°C、5%CO₂浮卵器で培養した。細胞刺激には、PHA(最終濃度5.7µg/ml)、インターロイキン2(100U/ml)を使用した。それぞれ0、24、72時間で細胞を回収し、T細胞におけるFas抗原、Bcl-2蛋白の発現を検討した。

[結果]

(1) I°SS、II°SSのCD3、CD4陽性細胞のFas抗原の発現を健常者と比較検討したところ両SS群では健常者に比較して有意に発現の亢進がみられた。しかし、CD8、CD20陽性細胞では、両SS群と健常者群においてFas抗原の発現率に差はなかった。

- (2) さらに、CD4陽性細胞をナイーブ(CD4+CD45RO-)とメモリー(CD4+CD45RO+)T細胞にて検討した。I° SSではナイーブとメモリーCD4陽性T細胞のFas抗原の有意な発現の亢進がみられたが、II° SSでは差がみられなかった。
- (3) SS末梢血の%Fas陽性CD4陽性細胞は、SS患者のフォオカススコアと相関がみられた。
- (4) I° SSにおけるBcl-2の発現は、健常者に比しCD3陽性細胞で発現の有意な亢進がみられたが、CD4、8、20陽性細胞では、差はみられなかった。また、II° SSでは健常者に比し、Bcl-2の発現に差はみられなかった。
- (5) PHAもしくはインターロイキン2刺激後、CD3陽性細胞のFas抗原の発現は、健常者でもSS患者でも、経時的な亢進がみられた。Bcl-2の発現では、逆にPHAもしくはインターロイキン2刺激にもかかわらず、その発現はSS患者、健常者とも減少した。

[考察]

SS患者末梢血では、Fas抗原はCD4陽性T細胞に発現増強がみられ、CD8陽性T細胞やB細胞の発現は健常者と差がみられなかった。SS患者においては、SLE患者にみられるようなT細胞やB細胞に広くFas抗原の発現の増強があるのではなく、CD4陽性T細胞のみにみられた点の特徴である。また、SSの末梢血CD3、4陽性T細胞のFas抗原の発現は、SS患者の疾患重症度の指標である唾液腺組織におけるフォオカススコアと相関がみられ、末梢血でのFas抗原の発現が病態に関与しているものと考えられた。一方Bcl-2蛋白は、I° SSにおける末梢血CD3陽性T細胞で発現亢進がみられたが、患者リンパ球を培養系に移して非特異的に刺激してもその発現は減少する事より、Bcl-2発現増強は単なるリンパ球活性化に伴う随判現象とは考えにくく、SSの病態と関連し、アポトーシス抑制的な働きがあるものと推察された。

[結語]

SSの末梢血リンパ球でのFas抗原の発現の亢進はSSの唾液腺組織のフォオカススコアと相関があり、SSの病態への関与が考えられた。また、Fas抗原とBcl-2の発現の亢進がお互いに拮抗し、アポトーシスの制御にそのバランスの関与が示唆された。

論文審査の結果の要旨

シェーグレン症候群(SS)は、T細胞の機能傷害とB細胞の多クローン性免疫グロブリン産生により惹起されるヒトの自己免疫疾患の原型として知られ、全身性エリテマトーデス(SLE)とともに、臓器特異的な炎症と、全身性疾患をあわせもった代表的な疾患である。その病因についてはいまだ不明であるが、動物実験においては、末梢性アポトーシス制御機構の1つであるFas-Fasリガンド系の欠損が症状の促進することと相関することが知られている。ところが、ヒトにおいては、T細胞およびB細胞のFas抗原と、アポトーシス制御遺伝子Bcl-2蛋白が共に発現が亢進していることから、異なる機構が介在していることが考えられた。

そこで、申請者はSS患者の末梢血単核細胞において、アポトーシス関連蛋白であるFas抗原とBcl-2の発現性について検索した。ついで、培養系においてファイトヘモアグルチニン(PHA)あるいはインターロイキン-2(IL-2)を添加して末梢血単核細胞を刺激し、その際のFas抗原とBcl-2の発現性について同様に検索した。用いた材料および方法は本研究の目的に適していると、審査委員会では判定された。

さらに、得られた結果に対し、審査委員会では次のように評価された。

- (1) 原発性SSと二次性SSのCD3、CD4陽性細胞のFas抗原の発現は健常者と比較して有意に亢進していたが、CD4⁺CD45RO⁻ナイーブT細胞とCD4⁺CD45RO⁺メモリーT細胞は、原発性SSにおいてのみ有意に発現の亢進がみられた。このFas抗原陽性のCD4⁺細胞では、SS患者のfocus scoreとよく相関した。
- (2) Bcl-2発現は原発性SSにおいてのみ、CD3陽性細胞において健常者と比較し有意の亢進がみられたが、CD4、8、20陽性細胞には差がみられなかった。
- (3) PHAあるいはIL-2によりin vitroで刺激すると、CD3陽性細胞のFas抗原の発現は、健常者でもSS患者でもともに亢進していたが、Bcl-2発現はSS患者と、健常者でもともに減少した。

以上の所見から、SS患者の末梢血単核細胞、とくにCD4陽性T細胞のFas抗原の発現亢進がみられ、かつfocus scoreとも相関がみられたが、CD8陽性T細胞やB細胞では有意の変化がみられないことから、末梢血CD4細胞T細胞のFas抗原の発現性の変化が病態を反映している可能性が示された。また、Bcl-2蛋白の発現は、原発性SSにおいてCD3陽性T細胞が亢進していたが、二次性SSにおいては培養系でPHAなどで刺激しても減少していたことから、SS疾患の病態の進行はFas抗原の発現とBcl-2の亢進が相互に拮抗し、両者がアポトーシス制御に積極的に関与することが明らかにされた。

以上の主張に対し、審査委員会では、SS疾患の病態進行に関し末梢血単核細胞(とくにT細胞)のアポトーシス関連蛋白Fas抗原とBcl-2の発現が相互に拮抗することの重要性を明らかにしたことを高く評価した。

本論文の審査過程において、次のような質疑が行われた。

- 1) 用いた末梢血単核細胞の細胞組成は
- 2) 単球のFas抗原およびBcl-2発現性は
- 3) Fas抗原の発現性はSS発症の原因かあるいは結果か
- 4) SS患者の唾液腺や皮膚などの局所に、どのような細胞が浸潤するか
- 5) SS患者の末梢血B細胞の免疫グロブリン産生の特徴について
- 6) Focus scoreの臨床的意義について
- 7) Bcl-2蛋白がCD4⁺T細胞において亢進しない理由
- 8) Disease controlとして何を用いたか
- 9) SSの病態のstageと、Bcl-2およびFas抗原発現との間に相関がみられるか。

これらの質問に対する申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で判定した。

論文審査担当者 主査 山下 昭
副査 瀧川 雅浩 副査 馬場 聡