

自己免疫疾患病変局所におけるアポトーシス関連分子発現

江口 勝美・川上 純・坪井 雅彦・飛田 あゆみ
 富永 雅博・中島 友紀・浦山 哲・右田 清志
 河部 庸次郎・折口 智樹*1・中島 宗敏*2

Jpn. J. Clin. Immun., 20 (6) : 502~505, 1997.

I. はじめに

アポトーシスは生体の恒常性を保つために、自己に不必要および不都合な細胞を取り除くための機構と考えられ、その遂行は種々の遺伝子産物の相互作用により制御されている。その中でもレセプター/リガンドの関係にある Fas/Fas ligand (FasL) システムは特に注目されており、実際、ヒト慢性炎症性疾患である慢性関節リウマチ (RA)、シェーグレン症候群および自己免疫性甲状腺疾患¹⁾等の発症・進展への関与が示唆されている。本稿では RA 関節病変の形成における Fas 依存性アポトーシスのデータも含めて概説する。

II. サイトカインによる滑膜細胞アポトーシスの制御

Nick end labeling 法を用いて、RA 滑膜組織においてアポトーシスの組織学的検討がなされている。それによると RA 滑膜組織では多くの細胞にアポトーシス陽性像が見られ、その陽性細胞は主に滑膜細胞や血管内皮細胞である。Fas は TNF/NGF レセプターファミリーに属する細胞表面分子で、細胞内へアポトーシスのシグナルを誘導するが、滑膜細胞上の Fas 発現も組織学的に同定されている。一方、RA 滑液中には種々のサイトカインが高濃度に存在しているので、私たちは培養滑膜細胞の Fas 依存性アポトーシスのサイトカインによる調節を検討した²⁻⁵⁾。

培養滑膜細胞は恒常的に Fas を発現しており、抗 Fas IgM 添加にてすみやかにアポトーシスに陥るこ

とにより、滑膜細胞上の Fas は機能的であることがわかる。次に、以前より間葉系細胞の増殖因子とされる TGF- β 1, IL-1 β および PDGF の滑膜細胞 Fas 依存性アポトーシスへの影響を検討した。TGF- β 1²⁾ および IL-1 β ³⁾ は Bcl-2 発現への効果には差異があるものの、ともに滑膜細胞の Fas 発現および抗 Fas IgM 添加による Fas 依存性アポトーシスを顕著に抑制した。一方、PDGF は Fas 発現には影響を及ぼさなかったが、Bcl-2 発現を増加させ、Fas 依存性アポトーシスを抑制した⁴⁾。これにより、TGF- β 1, IL-1 β および PDGF の滑膜細胞増殖活性の一部は Fas 依存性アポトーシス抑制効果であることが考えられた。

III. CD 4⁺ T 細胞による滑膜細胞アポトーシスの調節

RA 滑膜内には著明な活性化 CD 4⁺ T 細胞の浸潤が認められることから、滑膜細胞のアポトーシスが CD 4⁺ T 細胞との相互作用により惹起される可能性がある。私たちは滑膜細胞は抗原依存性に T 細胞を活性化することを確認していたので^{6,7)}、滑膜細胞と CD 4⁺ T 細胞の相互作用を *in vitro* で検討した。本実験においては抗原としては staphylococcal enterotoxin B (SEB) を、また CD 4⁺ T 細胞は健康人末梢血より分離して使用した。IFN- γ で刺激し、HLA-DR および HLA-DQ 抗原を強発現した滑膜細胞を標的細胞として用いると、SEB 存在下では顕著な細胞障害が誘導された。この細胞障害性は抗 HLA-DR および抗 HLA-DQ 抗体で阻害されることより、SEB 依存性であることがわかり、また、hFas-Fc 添加にても抑制されることより、CD 4⁺ T 細胞の effector molecule として FasL が考えられた。そこで、この混合培養系において CD 4⁺ T 細胞に FasL 発現が誘

長崎大学医学部第1内科

*1長崎大学医療技術短期大学部

*2国立嬉野病院

導されるか否かを検討した。ここでは FasL の細胞内領域を認識するペプチド抗体を用いて、CD 4 との二重染色をフローサイトメトリー法にて行った。末梢血より分離した静止期 CD 4⁺ T 細胞には FasL の発現は認められず、また、SEB 存在下で無刺激滑膜細胞と混合培養しても、その FasL 発現誘導はきわめて弱かった。一方、IFN- γ 刺激滑膜細胞との混合培養においては、SEB 依存性に CD 4⁺ T 細胞には強い FasL 発現が認められ、このことは hFas-Fc 添加による細胞障害性抑制効果とよく合致していた。これに加えて、滑膜細胞上に発現している CD 54, CD 58 および CD 106 に対する抗体添加によっても、SEB 依存性に誘導される CD 4⁺ T 細胞の FasL 発現および滑膜細胞障害性は著明に抑制された。このことは抗原依存性に FasL 陽性の活性化 CD 4⁺ T 細胞を誘導するには滑膜細胞上の costimulatory molecule (副刺激分子) も重要であることを意味する。

以前より、CD 4⁺ Th 1 clone の細胞障害性の大部分は FasL に起因することがいわれていた。RA 罹患関節局所においては滑膜細胞は HLA-DR や副刺激分子を発現していることが組織学的に証明されている⁸⁾。以上のデータから、滑膜細胞は抗原依存性に CD 4⁺ T 細胞を活性化するが、活性化 CD 4⁺ T 細胞により Fas/FasL システムによって、滑膜細胞自身はアポトーシスに陥ることがわかった。このことは、RA 滑膜組織の無秩序な増殖を制御しようとする生体内の counter system とも考えられる。

IV. アポトーシス誘導による滑膜細胞増殖の制御

アポトーシスを制御することにより、RA を治療しようという新しい試みがなされている。

私たちはラパマイシンの滑膜細胞のアポトーシスに対する影響について検討した⁹⁾。本剤は T 細胞増殖因子である IL-2 で誘導される T 細胞の Bcl-2 発現を抑制することが知られている。滑膜細胞にラパマイシンを添加し、48 時間培養し、細胞を溶解し、その細胞内蛋白を抗 Bcl-2 抗体を用いたウェスタンブロットで検討した。ラパマイシンは濃度依存性に滑膜細胞の Bcl-2 発現を有意に抑制した。一方、本剤は Fas 抗原の発現には全く影響を及ぼさなかった。ラパマイシンで前処置した滑膜細胞は抗 Fas IgM で誘導されるアポトーシスを増強することができた。また、PDGF 刺激での滑膜細胞の Bcl-2 増加もラパマイシン処理

で有意に抑制することができた⁹⁾。

V. RA における滑膜細胞の増殖とアポトーシス

RA 滑膜組織では滑膜細胞の増殖とアポトーシスが認められ、両者のバランスが重要と考えられる。すなわち、滑膜組織は増殖とアポトーシスの速度がバランスをとり恒常性を保っている。RA 滑膜組織に大量に検出される TGF- β , IL-1, PDGF は滑膜細胞自身の増殖を促進させ、同時に Fas 抗原の発現を抑制したりあるいは Bcl-2 発現を増加させたりして、Fas 依存性アポトーシスに対して抑制的に作用する。これにより、滑膜組織の増殖は亢進し、パンヌス形成に導く。反対に、ラパマイシンは滑膜細胞の P 70 S 6 キナーゼの活性化を阻止して増殖を抑制する⁹⁾と同時に、Bcl-2 発現を抑制し、アポトーシスを促進する。これらにより、増殖した滑膜組織を減少させパンヌス退縮に導く。今後、RA の滑膜増殖機構がより一層解明されるに従って、増殖抑制やアポトーシス促進を目的とした新しい治療薬の開発が期待される。

VI. 骨芽細胞のアポトーシス

RA においては滑膜組織増殖とともに、骨破壊および傍関節性骨粗鬆症は必発であり、臨床的にも重要な問題である。その機序としては従来より炎症性サイトカインによる破骨細胞活性化の重要性が指摘されているが、骨新生は骨芽細胞により誘導されるとの観点から骨芽細胞の Fas 依存性アポトーシスについて検討した¹⁰⁾。この実験にはヒト細胞株である MG 63 と骨生検由来の初代培養骨芽細胞を使用した。両細胞共に Fas を強く発現し、抗 Fas IgM 添加によりアポトーシスが誘導された。

次に、活性化単核球による骨芽細胞障害性を検討した。活性化単核球は膜型 FasL を強く発現し、骨芽細胞への障害性も強く認められた。この障害性は hFas-Fc 添加により抑制されるので、骨芽細胞は活性化単核球膜型 FasL で Fas 依存性アポトーシスを誘導されると考えられる。滑膜浸潤単核球には FasL 発現が確認されているので、RA 滑液中および滑膜浸潤単核球自体による骨芽細胞障害性ということは推定されるが、実際には RA 罹患関節の骨破壊部位に細胞浸潤が認められることは少ない。一方、膜型 FasL はマトリックシ・メタロプロテアーゼにより可溶性 FasL となる。そこで、液性因子として、可溶性 FasL による骨芽細胞障害性について検討した。活性化単核球培養

上清を骨芽細胞に添加すると骨芽細胞はアポトーシスに陥り、この上清中には骨芽細胞にアポトーシスを誘導する物質のあることが示唆される。ここに hFas-Fc を加えると、活性化単核球培養上清による骨芽細胞アポトーシス誘導能は著明に低下し、活性化単核球培養上清中の可溶性 FasL による骨芽細胞障害性の機序が示唆された。このことより、滑液および滑膜内の活性化単核球由来の可溶性 FasL により、RA 罹患関節の骨破壊部位には細胞浸潤がなくても骨芽細胞に Fas 依存性アポトーシスが惹起されうることが考えられる。

VII. 骨芽細胞 Fas 依存性アポトーシスの調節因子

骨芽細胞 Fas 依存性アポトーシスを調節する因子について検討した。TNF- α は骨吸収活性があることで知られている。そこで TNF- α を骨芽細胞に添加すると、骨芽細胞の増殖や spontaneous apoptosis には影響を与えなかったが、同細胞の Fas 発現および抗 Fas IgM による Fas 依存性アポトーシスは著明に増加した。IL-1 β も TNF- α と同様に骨吸収活性を有するが、IL-1 β もまた骨芽細胞の Fas 発現および抗 Fas IgM 添加によるアポトーシスを増強し、TNF- α と同時添加すると相加的に作用した。このことより、RA 滑液および滑膜内に存在する TNF- α や IL-1 β は骨芽細胞の Fas 依存性アポトーシスを増強し、骨破壊や傍関節性骨粗鬆症に寄与していることも考えられる。

次に、骨粗鬆症の治療薬として使用されるビタミン

K₂ の影響を検討した。ビタミン K₂ は既に破骨細胞のアポトーシスを促進することが報告されている。ヒト培養骨芽細胞にビタミン K₂ を加えても、同細胞の増殖や spontaneous apoptosis への影響はなかったが、ビタミン K₂ は濃度依存性に骨芽細胞の Fas 発現を抑制し、同時に抗 Fas IgM によるアポトーシスも抑制した。先述のように、TNF- α は骨芽細胞の Fas 依存性アポトーシスを促進するが、ビタミン K₂ を添加することにより、この TNF- α の骨芽細胞 Fas 依存性アポトーシスの増強効果も抑制された。このことは、ビタミン K₂ の作用機序としては破骨細胞のアポトーシス促進に加えて、骨芽細胞の Fas 依存性アポトーシスを抑制し、骨芽細胞数を維持することも考えられる。

VIII. おわりに

多細胞生物の組織のホメオスタシスは、種々に分化した細胞群の増殖とアポトーシスのバランスにより保たれている。滑膜細胞には Fas 依存性アポトーシスが誘導されうが、in vivo ではそれを上回る細胞増殖があり、結果的には滑膜増殖という形態をとることが考えられる。サイトカインがその機構を調節していることもありうる。それに加えて、骨芽細胞にも Fas 依存性アポトーシスが惹起され、これもまたサイトカインや治療薬により修飾されることが示された。今後、さらに RA 関節病変形成へのアポトーシスの関与に関する研究が進み、ひいては治療への応用が期待される。

文 献

- 1) Kawakami, A., Eguchi, K., Matsuoka, N., et al.: Thyroid-stimulating hormone inhibits Fas antigen-mediated apoptosis of human thyrocytes in vitro. *Endocrinology*, 137: 3163, 1996.
- 2) Kawakami, A., Eguchi, K., Matsuoka, N., et al.: Inhibition of Fas antigen-mediated apoptosis of rheumatoid synovial cells in vitro by transforming growth factor β 1. *Arthritis Rheum.*, 39: 1267, 1996.
- 3) Tsuboi, M., Eguchi, K., Kawakami, A., et al.: Fas antigen expression on synovial cells was down-regulated by interleukin 1 β . *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 218: 280, 1996.
- 4) Migita, K., Eguchi, K., Ichinose, Y., et al.: Effect of rapamycin on apoptosis of rheumatoid synovial cells. *Clin. Exp. Immunol.*, 108: 199, 1997.
- 5) Tsukada, T., Eguchi, K., Migita, K., et al.: Transforming growth factor β 1 induces apoptotic cell death in cultured human umbilical vein endothelial cells with down-regulated expression of bcl-2. *Biochem. Bio-*

- phys. Res. Commun., 210 : 1076, 1995.
- 6) Matsuoka, N., Eguchi, K., Kawakami, A., et al. : Inhibitory effect of clarithromycin on costimulatory molecule expression and cytokine production by synovial fibroblast-like cells. Clin. Exp. Immunol., 104 : 501, 1996.
 - 7) Kawakami, A., Eguchi, K., Matsuoka, N., et al. : Inhibitory effect of IL-10 on human synovial cells in vitro. Immunology, 91 : 252, 1997.
 - 8) Aoyagi, T., Eguchi, K., Nakashima, M., et al. : Immunolocalization of adhesion molecules in rheumatoid and osteoarthritic synovial tissues. Acta. Med. Nagasaki, 38 : 62, 1993.
 - 9) Migita, K., Eguchi, K., Aoyagi, T., et al. : The effects of the immunosuppressant rapamycin on the growth of rheumatoid arthritis (RA) synovial fibroblast. Clin. Exp. Immunol., 104 : 86, 1996.
 - 10) Kawakami, A., Eguchi, K., Matsuoka, N., et al. : Fas and Fas ligand interaction is necessary for human osteoblast apoptosis. J. Bone Miner. Res., 12 : 1637, 1997.
-