



# Fas Ligand Exists on Intervertebral Disc Cells : a Potential Molecular Mechanism for Immune Privilege of the Disc

高田, 徹

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2004-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲2935

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1002935>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



【 86 】

氏 名・(本 籍) 高田 徹 (兵庫県)

博士の専攻分野の名称 博士(医学)

学 位 記 番 号 博い第1546号

学位授与の 要 件 学位規則第4条第1項該当

学位授与の 日 付 平成16年3月31日

【 学位論文題目 】

FAS LIGAND EXISTS ON INTERVERTEBRAL DISC  
CELLS: A POTENTIAL MOLECULAR MECHANISM FOR  
IMMUNE PRIVILEGE OF THE DISC  
(椎間板の免疫学的特権とその分子生物学的メカニズム  
—Fas-ligand の存在とその役割—)

審 査 委 員

主 査 教 授 尾原 秀史

教 授 中村 俊一

教 授 熊谷 俊一

椎間板は人体最大の無血管組織であり、高度に分化した細胞とそれを取り巻く豊富な細胞外基質より構成され、解剖学的にも生理学的にも特有の組織である。髄核は高密度の線維性組織である線維輪と椎体終板によって囲まれ、宿主の免疫機構から隔絶されている。髄核が椎間板から脱出すると、宿主免疫に暴露されることによって自己免疫反応と引き続く炎症反応が惹起され、これが神経損傷、ひいては根性疼痛の原因となる可能性が報告されている。これらの事実は髄核の免疫学的特権を示す間接的な証拠と考えられてきた。

さらに近年、type5 アデノウイルスベクターを使用した椎間板変性に対する遺伝子治療の基礎的研究において、椎間板の特殊性が指摘されている。通常他の組織においてはアデノウイルスのもつ抗原性のために宿主の免疫反応が生じ、短期間の導入遺伝子発現しか望めない。それに対し、椎間板への遺伝子導入では長期に渡る導入遺伝子の発現が確認された。さらに宿主を前もってアデノウイルスに対して免疫しておいても、椎間板内の導入遺伝子の発現には

ほとんど影響しないことが示され、これらのことは椎間板の免疫学的特権を示す直接的な証拠と考えられている。

免疫学的特権を持つその他の体内の組織には精巣や眼の前房が知られている。これらの組織の免疫学的特権は TNF family に属する 2 型細胞膜表面蛋白である Fas-ligand (FasL) の発現に起因するものであるとされている。FasL 陽性細胞は、侵入してくる Fas 陽性の活性型 T 細胞や N-K 細胞 (Natural-killer Cell) をアポトーシスに至らしめる能力がある(図 1)。精巣や眼の前房といった組織は、このシステムにより宿主の免疫から守られており、免疫学的特権を維持している。Park らは椎間板ヘルニア組織に FasL 陽性細胞とアポトーシス細胞が存在することを報告している。しかし、脱出椎間板組織はすでに宿主免疫系に暴露されており、健常椎間板とは生理的にも全く異なった状態であると考えられる。従って、本研究の目的は、健常椎間板の免疫学的特権の維持機構として椎間板に FasL が存在することを証明することである。

## 方法

### 1. ラット

生後 11 週 SD ラット(雄)5 匹をネンブータルにて屠殺後、尾椎から椎間板を摘出した。

### 2. ヒト椎間板

ヒト側彎症患者 6 人から摘出した椎間板細胞(男性 1 人、女性 5 人、14~18 才:平均年齢 15.7 才、特発性側彎症 2 例、神経・筋原性側彎症 4 例)を使用した。

### 3. FasL に対する免疫組織化学的検索

組織は直ちに 4% パラホルムアルデヒドにて固定後、パラフィン包埋切片を作成し、水平断に 5  $\mu$ m の厚さに薄切した。非特異性結合を 10% 正常ヤギ血清でブロックし、内因性ペルオキシダーゼを 3%  $H_2O_2$  を使用して 10 分間で処理して不活化した。これにヤギポリクローナル抗ヒト・ラット FasL 抗体、(和光純薬工業)を用いて、ストレプトアビジン・ビオチン法により免疫染色を行った。negative control として筋肉を、positive control として精巣を使用した。

発色にはニューフクシン、対比染色にはヘマトキシリンを使用した。これらの検体を 400 倍に拡大し検鏡した。

### 4. RT-PCR

生後 11 週 SD ラット 5 匹の尾椎椎間板を摘出後、直ちに液体窒素を使用して-80℃に凍結し、これを粉碎し、RNeasy Mini (QIAGEN)を使用して total RNA を抽出し、これらをもとに Gene Amp (PERKIN ELMER)を使用して cDNA を合成し、ついでラット FasL プライマー(sense:5'GGAATGGAGAGACACATATGGAAC TGC3', antisense:5'CATATCTGGCCAGTAGTG CAGTAATTC3'), を使用して PCR を行った。GAPDH を RNA 量のコントロールとして使用した。得られた PCR 産物は 2% アガロースゲル上で電気泳動し、Fluorimager 585 (Molecular Dynamics)を使用してそのサイズを求めた。得られた PCR 産物を精製し、その DNA シーケンスを解析し、FasL の cDNA 塩基配列と一致しているかどうかを確認した。

## 結果

### 1. ラット椎間板の免疫組織化学的検索

外側線維輪、脊索様部位に FasL の発現はほとんど見られなかったが、内側線維輪、髄核細胞には FasL 陽性染色が見られた。FasL は特に髄核細胞で強く発現していた。

### 2. ヒト椎間板の免疫組織化学的検索

またヒト側彎患者 6 人より術中に採取した椎間板組織の全てにおいて FasL 陽性染色を髄核細胞に認めた。

### 3. RT-PCR

椎間板および positive control の精巣において FasL に相当するバンドを得た。negative control である筋肉では得られなかった。また得られたバンドより PCR 産物を精製し、DNA シーケンスを解析すると、今回使用した primer 対によって増幅されるべきラット FasL cDNA の塩基配列に一致していた (544th to 780th mer (237bp))

## 考察

臨床的に、椎間板が免疫学的特権を有することは古くから知られている。例えば、椎間板ヘルニアに対して自己免疫反応が惹起されることや、また椎間板が人体最大の無血管組織であることなどの解剖学的特徴がその理由である。最近の報告によると、ある組織や器官の免疫学的特権はそういった解剖学的なもののみならず、もっと能動的な分子生物学的メカニズムの関与が指摘されている。この分子生物学的メカニズムにおいて、主要な役割をはたす蛋白として FasL が注目されている。

FasL は先にも述べたように TNF family に属する 2 型細胞膜表面蛋白で、人体でも免疫学的特権をもつ組織など限られた細胞のみ有することが報告されている。これに対して、Fas は人体の細胞に広く存在している。Fas は FasL と同様に TNF ファミリーの一員で、1 型膜表面蛋白であり、FasL と結合することにより Fas を発現している細胞にアポトーシスを誘導する。免疫学的特権を有する組織において、FasL は侵入してくる Fas 陽性の活性型 T 細胞やナチュラル

ルキラー細胞をアポトーシスに至らしめることによりこれらの組織を宿主免疫から保護していると考えられている。現在までに、免疫学的特権を有する組織あるいはそれに準ずる状態でこの Fas-FasL システムの存在が報告されているのは、眼の前房、精巣、脳、胎盤等である。

今回我々は、まず免疫染色によりラットの正常椎間板における FasL の発現を評価し、さらに種の違いを調べる目的で比較的正常に近いヒト椎間板にも同様の染色を行った。FasL の mRNA レベルでの発現はラット椎間板組織に対し RT-PCR を施行し評価した。免疫染色の結果、特に髄核において強い FasL の発現を認め、内側繊維輪には弱い発現が見られた。RT-PCR の結果、mRNA レベルでの FasL の発現も確認された。以上の結果から、髄核細胞を中心に FasL が発現していることが初めて証明された。従って、椎間板の内側、特に髄核には解剖学的特徴といった受動的なメカニズムのみならず、他の免疫学的特権を有する精巣や眼の前房といった組織と同様に、能動的にその免疫学的特権を維持する分

子生物学的メカニズムが存在することが強く示唆された。

また椎間板ヘルニアの脱出形態によって、随伴する炎症の強さや、ヘルニアの再吸収されやすさが異なることが近年報告されている。後縦靱帯を穿破し、宿主免疫に暴露されているタイプの椎間板ヘルニア (transligamentous-extrusion type と sequestered type) では、後縦靱帯を穿破せずに宿主免疫に暴露されていないタイプのヘルニア (protrusion type と subligamentous-extrusion type) に比較して強い炎症を惹起しやすく、また吸収もされやすい。これらの事実は髄核の免疫特権と宿主の髄核に対する免疫反応が臨床的に重要であることを強く示唆している。さらに Olmarker 等の報告に代表される様に髄核は強い炎症惹起物質として知られ、そこには髄核が免疫特権を有しているということだけでなく、FasL の直接的な関与が推測される。つまり椎間板ヘルニア組織において、マトリックスメタロプロテアーゼ (MMPs) の発現が上昇していることが報告されており、

一方、一般的に細胞表面上に発現された FasL はこの MMP によりプロセッシングされ、可溶性 FasL となることも既に示されている。この可溶性 FasL は炎症性サイトカインとしても直接的に作用し、直接 IL-1 $\beta$  等の炎症性サイトカイン産生を刺激することができる。従って FasL は椎間板ヘルニアに伴う強い炎症反応に深く関与しているだけでなく、根性痛にも大きく関与している可能性が強く、今後の研究が期待される。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲第 1548 号	氏名	高田 徹
論文題目	FAS LIGAND EXISTS ON INTERVERTEBRAL DISC CELLS: A POTENTIAL MOLECULAR MECHANISM FOR IMMUNE PRIVILEGE OF THE DISC  椎間板の免疫学的特権とその分子生物学的メカニズム —Fas-ligandの存在とその役割—		
審査委員	主 査 尾原 市史 副 査 中村 俊一 副 査 熊谷 俊一		
審査終了日	平成 16 年 2 月 2 日		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

はじめに

椎間板は人体最大の無血管組織であり、高度に分化した細胞とそれを取り巻く豊富な細胞外基質より構成され、解剖学的にも生理学的にも特有の組織である。髄核は高密度の線維性組織である線維輪と椎体終板によって囲まれ、宿主の免疫機構から隔絶されている。髄核が椎間板から脱出すると、宿主免疫に暴露されることによって自己免疫反応と引き続く炎症反応が惹起され、これが神経損傷、ひいては根性疼痛の原因となるとされている。近年、アデノウイルスベクターを使用した椎間板変性に対する遺伝子治療の基礎的研究において、椎間板への遺伝子導入では長期に渡る導入遺伝子の発現が確認された。さらに宿主を前もってアデノウイルスに対して免疫しておいても、椎間板内の導入遺伝子の発現にはほとんど影響しないことが示され、これらのことは椎間板の免疫学的特権を示す証拠と考えられている。

免疫学的特権を持つその他の体内の組織には精巣や眼の前房が知られている。これらの組織のその免疫学的特権はTNF familyに属する2型細胞膜表面蛋白であるFasLigand (FasL) の発現に起因するものであるとされている。FasL陽性細胞は、侵入してくるFas陽性の活性型T細胞やN-K細胞(Natural-killer Cell)をアポトーシスに至らしめる能力がある。精巣や眼の前房といった組織は、このシステムにより宿主の免疫から守られており、免疫学的特権を維持している。本研究の目的は、健常椎間板の免疫学的特権の維持機構として椎間板にFasLが存在することを証明することである。

#### 方法

1. ラット：生後11週SDラット(雄)5匹をネンブタールにて屠殺後、尾椎から椎間板を摘出した。
2. ヒト椎間板：ヒト側彎症患者6人から摘出した椎間板細胞(男性1人、女性5人、14～18才：平均年齢15.7才、特発性側彎症2例、神経・筋原性側彎症4例)を使用した。
3. FasLに対する免疫組織化学的検索：組織は直ちに4%パラホルムアルデヒドにて固定後、パラフィン包埋切片を作成し、水平断に薄切した。これにヤギポリクローナル抗ヒト・ラットFasL抗体を用いて、ストレプトアビジン・ビオチン法により免疫染色を行った。negative controlとして筋肉を、positive controlとして精巣を使用した。これらの検体を400倍に拡大し検鏡した。
4. RT-PCR：生後11週SDラット5匹の尾椎椎間板を摘出し、total RNAを抽出し、これらをもとにcDNAを合成し、ついでラットFasLプライマーを使用してPCRを行った。GAPDHをRNA量のコントロールとして使用した。得られたPCR産物はアガロースゲル上で電気泳動し、そのサイズを求めた。

また、得られたPCR産物を精製し、そのDNAシーケンスを解析した。

#### 結果

1. ラット椎間板の免疫組織化学的検索：外側線維輪、脊索様部位にFasLの発現はほとんど見られなかったが、内側線維輪、髄核細胞にはFasL陽性染色が見られた。FasLは特に髄核細胞で強く発現していた。
2. ヒト椎間板の免疫組織化学的検索：またヒト側彎症患者6人より術中に採取した椎間板組織の全てにおいてFasL陽性染色を髄核細胞に認めた。
3. RT-PCR：椎間板およびpositive controlの精巣においてFasLに相当するバンドを得た。negative controlである筋肉では得られなかった。また得られたバンドよりPCR産物を精製し、DNAシーケンスを解析すると、今回使用したprimer対によって増幅されるべきラットFasL cDNAの塩基配列に一致していた。

#### 考察

今回我々は、まず免疫染色によりラットの正常椎間板におけるFasLの発現を評価し、さらに種の違いを調べる目的で比較的正常に近いヒト椎間板にも同様の染色を行った。FasLのmRNAレベルでの発現はラット椎間板組織に対しRT-PCRを施行し評価した。免疫染色の結果、特に髄核において強いFasLの発現を認め、内側線維輪には弱い発現が見られた。RT-PCRの結果、mRNAレベルでのFasLの発現も確認された。以上の結果から、髄核細胞を中心にFasLが発現していることが初めて証明された。従って、椎間板の内側、特に髄核には解剖学的特徴といった受動的なメカニズムのみならず、他の免疫学的特権を有する精巣や眼の前房といった組織と同様に、能動的にその免疫学的特権を維持する分子生物学的メカニズムが存在することが強く示唆された。

本研究は従来ほとんど知られていなかった脊椎の椎間板の免疫学的特権の維持機構を明らかにしたユニークな研究である。免疫染色およびまたmRNAレベルでの検索で、椎間板の髄核細胞にFasLが発現していることが初めて証明された。椎間板に能動的に免疫特権を維持する分子メカニズムが存在することを証明したことは、今後椎間板への遺伝子導入治療の基礎研究を行うにあたって重要な知見を得たものとして価値ある集積であると思われる。よって、本研究者は、博士(医学)の学位を得る資格があると認める。