



## Fas/Fas ligand interactions play an essential role in the initiation of murine autoimmune diabetes

中山, 真紀

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2002-10-09

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙2645

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2002645>

※ 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。



【 140 】

氏名・(本籍) 中山真紀 (岐阜県)

博士の専攻分野の名称 博士(医学)

学位記番号 博ろ1847号

学位授与の要件 学位規則第4条第2項該当

学位授与の日付 平成14年10月9日

【 学位論文題目 】

Fas/Fas Ligand Interaction Play an Essential Role  
in the Initiation of Murine Autoimmune Diabetes  
(自己免疫性糖尿病におけるFas/Fas リガンド相互作用の役割)

審査委員

主査教授 春日雅人

教授 熊谷俊一

教授 南康博

## 自己免疫性糖尿病における Fas/Fas リガンド相互作用の役割

### [緒言]

自己免疫性糖尿病において、膵β細胞は主に自己反応性 T 細胞により破壊される。細胞傷害性 T 細胞は、主にパーフォリン/グランザイム B、あるいは Fas/Fas リガンド(FasL)を介するアポトーシス誘導により標的細胞を破壊する。後者においては、細胞傷害性 T 細胞上に表出した FasL が標的細胞上の Fas に結合することにより標的細胞はアポトーシスに陥るが、自己免疫性糖尿病のモデル動物である NOD マウスの糖尿病における Fas/FasL 相互作用による細胞傷害性の重要性についての見解は一致していない。本研究では、まず NOD マウス膵β細胞特異的 CD4 陽性と CD8 陽性 T 細胞における Fas/FasL 相互作用の役割を解析した。抗 FasL 抗体投与により CD4 陽性 T 細胞移入による糖尿病は部分的に抑制され、Fas/FasL 相互作用は CD4 陽性 T 細胞による細胞傷害性において重要ではあるが必須ではないことが示唆された。一方、CD8 陽性 T 細胞移入による糖尿病発症は抗 FasL 抗体投与により抑制されず、CD8 陽性 T 細胞による細胞傷害性に Fas/FasL 相互作用は重要ではないと考えられた。

一方、NOD マウス幼若期での抗 FasL 抗体(MFL1)投与により糖尿病発症、膵炎が完全に抑制されることから、Fas/FasL 相互作用が自己免疫性糖尿病の初期において必須であることが示唆された。

### [方法および結果]

#### [1] 膵ラ島特異的 T 細胞の FasL の発現の解析

膵ラ島特異的 CD4 陽性 T 細胞クローニング(CD4-YNK7.3)、膵ラ島由来 CD8 陽性 T 細胞(CD8-CTL)を抗 FasL 抗体(MFL1)で染色し、細胞表面上の FasL 発現をフローサイトメーターにて解析した。CD4-YNK7.3 は無刺激の状態では FasL の発現を認めなかつたが、PMA(phorbol 12-myristate 13-acetate)および ionomycin での刺激にて FasL 発現が検出された。CD8-CTL は、PMA と ionomycin の刺激の有無にかかわらず FasL の発現を認めた。

#### [2] In vitro における膵ラ島特異的 T 細胞の Fas/FasL 相互作用を介する細胞傷害性の検討

膵ラ島特異的 T 細胞が Fas/FasL 相互作用を介して直接標的細胞を破壊し得るかを評価するために、Fas 陽性細胞(Jurkat 細胞、Fas 導入 L1210 細胞)および NOD-scid 膵ラ島細胞を標的細胞とし、膵ラ島特異的 T 細胞(CD4-YNK7.3、CD8-CTL)の細胞傷害性を Cr-release assay にて測定した。

#### (1) Fas/FasL を介する細胞傷害性の検討

PMA と ionomycin により刺激された CD4-YNK7.3 は、Fas 陽性 Jurkat 細胞を破壊することができ(E/T 比=50; %specific cell lysis=28±3%)、抗 FasL 抗体(MFL1)添加により細胞傷害性は 0%に抑制された。また、刺激された CD4-YNK7.3 は Fas 陽性 L1210 細胞を破壊できるが(43±4%)、Fas 陰性 L1210 細胞は破壊できず、CD4-YNK7.3 は Fas/FasL を介して細胞傷害性を表すことが示された。一方、CD8-CTL は Fas 陽性 Jurkat 細胞に対して細胞傷害性を示し(59±2%)、MFL1 抗体により細胞傷害性は部分的に抑制された(40±3%)。同様に、CD8-CTL は Fas 陰性 L1210 細胞(24±0.5%)に比し、Fas 陽性 L1210 細胞(85±3%)に対しより強い細胞傷害性を示した。CD8-CTL は、Fas/FasL 相互作用および他の機構(おそらくパーフォリン/グランザイム B)を介して細胞傷害性を表すことが示唆された。

#### (2) Fas/FasL を介する膵β細胞傷害性の検討

NOD-scid マウス由来の膵ラ島細胞は、IL-1 $\alpha$ との 12 時間の培養により Fas の発現を認めた。CD4-YNK7.3 は IL-1 $\alpha$ 処理膵ラ島細胞に対して細胞傷害性を示すが(E/T 比=50; %specific cell lysis=22±8%)、MFL1 添加によっても抑制されず(24±4%)、また NOD-lpr/lpr マウス由来の Fas 陰性膵ラ島細胞に対して同程度の細胞傷害性を示した(19±5%)。同様に、CD8-CTL は、IL-1 $\alpha$ 処理膵ラ島細胞を破壊することができるが(56±4%)、MFL1 添加 IL-1 $\alpha$ 処理膵ラ島細胞(47±9%)、NOD-lpr/lpr 由来 Fas 陰性膵ラ島細胞(59±5%)に対しても同程度の細胞傷害性を示した。CD4-YNK7.3 および CD8-CTL は、vitro においては Fas/FasL を介さずに膵β細胞を破壊していることが判明した。

#### [3] 移入糖尿病での Fas/FasL の役割

In vivo において、Fas/FasL 相互作用が膵β細胞破壊に関与しているかを評価するため、養子移入実験を行った。

##### (1) 糖尿病性膵細胞移入糖尿病における Fas/FasL 相互作用の検討

NOD マウス由来糖尿病性膵細胞  $6 \times 10^7$  を 7 日齢 NOD マウスに養子移入すると、30 日以内に全例が糖尿病を発症する。抗 FasL 抗体(MFL1)の同時投与や、Fas の遺伝子変異を有する NOD-lpr/lpr マウスをレシピエントにすることにより、糖尿病発症はそれぞれ、67%、60%に抑制された。NOD マウスの移入糖尿病において、細胞傷害性 T 細胞は一部 Fas/FasL 相互作用により膵β細胞を破壊していることが示唆された。

##### (2) CD4 陽性 T 細胞移入糖尿病における Fas/FasL 相互作用の検討

CD4 陽性 T 細胞の膵β細胞傷害において in vivo での Fas/FasL 相互作用の関与を検討した。CD4-YNK7.3 を 7 日齢 NOD マウスに養子移入すると、60%が糖尿病を発症す

るのに対し(6/10)、MFL1 投与により糖尿病発症は約 18%(2/11)となり、脾う島炎も若干抑制された。レシピエントが NOD-lpr/lpr マウスの場合、糖尿病発症は認めず(0/8)、脾う島炎も強く抑制された。CD4 陽性 T 細胞の脾β細胞傷害に、Fas/FasL 相互作用が重要であることが示唆された。

### (3) CD8 陽性 T 細胞移入糖尿病における Fas/FasL 相互作用の検討

一方、CD8-CTL を 7 日齢 NOD マウス、あるいは NOD-lpr/lpr マウスに養子移入すると全例が 15 日以内に糖尿病を発症し(13/13, 9/9)、MFL1 を同時投与しても糖尿病発症は抑制されなかった(14/15)。CD8 陽性 T 細胞による脾β細胞傷害には、in vivo においても Fas/FasL 相互作用は重要ではないと考えられた。

### [4] 自然発症糖尿病への抗 FasL 抗体(MFL1)投与の効果

NOD マウスに対し、MFL1 を 2~30 週齢の間投与すると(1 回 200μg、週 2 回)、NOD-lpr/lpr マウスと同様に糖尿病、脾う島炎は完全に抑制される。自然発症糖尿病での脾β細胞傷害に対する Fas/FasL 相互作用の重要性を検討するために、脾う島に単核細胞浸潤が認められるようになる 5~15 週齢の間、MFL1 を投与した。4~5 週の糖尿病発症遅延を認めたが、糖尿病発症が完全に抑制されることはない。一方、自己免疫性糖尿病の病初期での Fas/FasL 相互作用を評価するために 2~4 週齢の間のみ MFL1 を投与した群では、糖尿病発症は強く抑制され、さらに 2 回を除く全ての糖尿病未発症マウスにおいては脾う島炎も完全に抑制されていた。これらの結果より、Fas/FasL 相互作用が自己免疫性糖尿病の病初期に極めて重要かつ必須の役割を担っていることが示唆された。

### [考察]

本研究では、活性化 CD4 陽性、CD8 陽性 T 細胞が FasL を発現し、Fas/FasL 相互作用による細胞傷害活性を有することを示した。5~15 週齢に抗 FasL 抗体を投与することによっても 4~5 週の糖尿病発症遅延のみであり、in vivo の脾β細胞破壊においては Fas/FasL は重要ではあるが必須ではないことが示唆された。

In vitro での本研究の結果では、CD8 陽性 T 細胞は Fas/FasL 相互作用および他の機構(おそらくパーフォリン/グランザイム B)により細胞傷害性を発揮するが、脾β細胞に対しては Fas/FasL 相互作用は主ではなかった。CD8 陽性 T 細胞の養子移入実験で Fas/FasL 相互作用の阻害によっても糖尿病発症が抑制されることなく、CD8 陽性 T 細胞による脾β細胞破壊に Fas/FasL 相互作用はそれほど重要ではないことが示唆された。これまでに、CD8 陽性 T 細胞クローニングを用いた養子移入実験で Fas/FasL 相互作用が重要であるという報告がある。彼らのクローニングが幼若な時期の T 細胞を起源

とし特殊な環境で活性化されているのに対し、本研究では脾β細胞破壊がすでに進行している時期の T 細胞を直接用いており、結果の相違となったのかもしれない。これらの結果をあわせると、エフェクター細胞のひとつである CD8 陽性 T 細胞を介する細胞傷害性に Fas/FasL 相互作用は必須ではないと考えられた。

一方、CD4 陽性 T 細胞により移入される糖尿病は抑制され、CD4 陽性 T 細胞による細胞傷害性に Fas/FasL 相互作用は重要な役割を担っていることが示唆された。しかし糖尿病抑制は不完全であり必須ではないと考えられる。CD4 陽性 T 細胞は Fas/FasL 相互作用により直接的な細胞傷害性を有するものの、脾β細胞に対しては Fas/FasL 相互作用以外の機構(サイトカイン産生、NO の効果など)により細胞傷害性を発揮するという本研究における vitro の結果や、Fas 欠損 CD4 陽性 T 細胞クローニングの糖尿病移入効果は減弱するもののわずかに残存しているというこれまでの報告などを考えあわせると、CD4 陽性 T 細胞は Fas/FasL 相互作用や他の機構により細胞傷害性を発揮しており、CD4 陽性 T 細胞を介する脾β細胞破壊に Fas/FasL 相互作用は重要であるが必ずしも必要ではないと考えられた。

以上のように細胞傷害性 T 細胞の脾β細胞傷害機構に Fas/FasL 相互作用は必須でないにも関わらず、Fas あるいは FasL 変異 NOD マウスの糖尿病は完全に抑制されることが報告されている。本研究は幼若期での Fas/FasL 相互作用の阻害により糖尿病発症、脾う島炎が完全に抑制されることを示した。Fas/FasL 相互作用はむしろ自己免疫性糖尿病の病初期において重要かつ必須の役割を担っていることを示唆された。Fas/FasL 相互作用の自己寛容誘導への関与が示唆され、今後さらなる研究による解明が必要である。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	乙 第 1849 号	氏名	中山 真紀
論文題目	<p>Fas/Fas Ligand Interaction Play an Essential Role in the Initiation of Murine Autoimmune Diabetes</p> <p>自己免疫性糖尿病における Fas/Fas リガンド相互作用の役割</p>		
審査委員	主査	春日 雅人	
	副査	熊谷 俊一	
	副査	南 康博	
審査終了日	平成 14 年 8 月 19 日		

(要旨は 1,000 字～2,000 字程度)

1A 型糖尿病は、膵  $\beta$  細胞に対する臓器特異的自己免疫疾患であり、自己反応性 T 細胞による膵  $\beta$  細胞傷害の結果、内因性インスリンの絶対的欠乏に陥り発症する。一般に細胞傷害性 T 細胞は主にパーフォリン/グランザイム B、Fas/FasL 分子を介して標的細胞にアポトーシスを誘導するが、後者では、細胞傷害性 T 細胞に発現した FasL が標的細胞上の Fas に結合することにより、標的細胞に“死のシグナル”が伝達しアポトーシスに陥る。自己反応性 T 細胞による膵  $\beta$  細胞傷害において Fas/FasL 分子の果たす役割については一定の見解が得られていない。本研究では、自己免疫性糖尿病のモデル動物である NOD マウスを用いて、自己免疫性糖尿病発症過程における Fas/FasL 分子の役割について検討した。

本研究ではまず、膵  $\beta$  細胞傷害性 CD4、CD8 陽性 T 細胞それぞれの Fas/FasL 分子を介する細胞傷害性の解析を行った。NOD マウスの膵  $\beta$  細胞由来の CD4 陽性 T 細胞クローニング、CD8 陽性 T 細胞群は活性化状態において FasL を発現し、さらに  $^{51}\text{Cr}$ -release assay により Fas を表出している標的細胞を Fas/FasL 依存性に傷害しており、膵  $\beta$  細胞特異的 CD4、CD8 陽性 T 細胞は Fas/FasL 分子を介する細胞傷害活性を有していることを示した。次に、これらの膵  $\beta$  細胞傷害性 T 細胞の膵  $\beta$  細胞に対する傷害性を検討した。CD8 陽性 T 細胞は IL-1 $\alpha$  により Fas を発現させた NOD 膵  $\beta$  細胞に対して Fas/FasL 分子を介する細胞傷害活性を示さず、in vivo においても膵  $\beta$  細胞特異的 CD8 陽性 T 細胞により移入される糖尿病は抗 FasL 抗体投与や recipient の Fas の欠損によっても抑制されなかった。これらの結果より、CD8 陽性 T 細胞による膵  $\beta$  細胞傷害において Fas/FasL 分子は必須ではないことが示唆された。一方、CD4 陽性 T 細胞クローニングにより移入される糖尿病発症は Fas/FasL 阻害により一部抑制された。この糖尿病抑制効果は不完全であり、 $^{51}\text{Cr}$ -release assay において CD4 陽性 T 細胞による膵  $\beta$  細胞破壊は Fas/FasL 阻害により抑制されなかったことから、CD4 陽性 T 細胞による膵  $\beta$  細胞傷害において Fas/FasL 分子は重要であるが必須ではないことが示唆された。上記のように、膵  $\beta$  細胞を破壊するエフェクタ一機構においては Fas/FasL 分子を介するアポトーシスは必ずしも必要ではないが、

本研究では、自然発症糖尿病を示す NOD マウス系に抗 FasL 抗体を投与することにより、自己免疫性糖尿病の発症過程における Fas/FasL 相互作用の重要性を明らかにした。すなわち、幼若期に抗 FasL 抗体を投与することにより、NOD マウスの脾ラ島炎と糖尿病発症は完全に抑制され、Fas/FasL 相互作用はむしろ自己免疫性糖尿病の病初期において重要かつ必須の役割を担っていることが示唆された。

本研究は、CD4、CD8 陽性 T 細胞各々による脾β細胞傷害における Fas/FasL 分子を介するアボトーシスの役割を明らかにし、さらに自己免疫性糖尿病の病初期での Fas/FasL 相互作用の重要性を初めて報告したものである。自己免疫性糖尿病の進展と発症における Fas/FasL 分子の役割について重要な知見を得たものとして価値ある業績であると認める。よって、本研究者は博士(医学)の学位を取る資格があると認める。