



Elevation of the serum Fas ligand in patients with hemophagocytic syndrome and Diamond-Blackfan anemia

長谷川, 大一郎

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2002-11-13

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙2648

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2002648>

※ 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。



【 1 4 3 】

氏 名 ・ (本 籍) 長谷川 大一郎 (兵庫県)

博士の専攻分野の名称 博士 (医学)

学 位 記 番 号 博ろ1850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11月13日

【 学位論文題目 】

Elevation of the serum Fas ligand in patients with
hemophagocytic syndrome and Diamond-Blackfan anemia.
(血球貪食症候群と Diamond-Blackfan 貧血患者における
血清 Fas ligand 濃度の上昇)

審 査 委 員

主 査 教 授 中 村 肇

教 授 松 尾 雅 文

教 授 西 尾 久 英

【緒言】

FasはTNF受容体／神経成長因子受容体ファミリーの一種でinterleukin-1 β -converting enzyme(ICE)-like cystine proteaseのカスケードを活性化することによってapoptosisのsignalを誘導する。Fasは胸腺や肝臓、心臓、腎臓などの様々な組織に発現しているばかりではなく、健康人の骨髓中のCD34陽性細胞上にも発現している。IFN- γ やTNF- α で骨髓中のCD34陽性細胞を処理するとFasの発現は上昇し、抗Fas抗体でapoptosisを誘導できるようになる。一方、FasLはII型の膜蛋白で活性化T細胞やNK細胞のような細胞障害活性を持った細胞上に発現しており、精巣や脳、眼球の前房のような免疫寛容状態にある細胞内にも発現している。Fas/FasL系はこれまでT細胞のclonal selectionに重要な役割を担っていると考えられてきたが、種々のウイルス感染や橋本病などの自己免疫疾患、肝炎、腫瘍免疫における病態にも関与していることが分かってきた。またFasLはmetalloproteinase様の酵素で細胞膜上から切り離され可溶性となる。可溶性FasLは膜型FasLと同様に標的細胞上でFasと結合し細胞死のシグナルを伝達する。それゆえcytotoxic cellは直接もしくは可溶性FasLと結合するかのいずれによっても標的細胞に細胞死を起こさせることができる。さらに血清可溶性FasL濃度は様々なヒトの疾患においてcytotoxic cellの活性の指標となり得る。本研究では、その病態において免疫学的な機序が示唆されている再生不良性貧血(AA)やhemophagocytic lymphohistiocytosis(HLH)、Diamond-Blackfan貧血(DBA)、伝染性単核球症(IM)などの血液疾患において血清中のFasL濃度を検討し、これら疾患におけるFas/FasL系の役割を明らかにすることを目的として行なわれた。

【対照と方法】

対象はAA 11例、DBA 6例、HLH 19例、IM 5例の41例、および健康対照 22例について検討した。HLHの診断は発熱と肝脾腫などの臨床徴候と検査所見、組織学的検査によった。可溶性FasLの測定はモノクローナル抗FasL抗体と組み替え型ヒトFasLを用いたEnzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)を用いた。IFN- γ の測定はDiaclone Research社性キットを用いた。検出感度は可溶性FasL、IFN- γ ともに5pg/mlであった。可溶性FasL、IFN- γ ともに検出感度以下の場合、検定上は5pg/mlとして扱った。またFowcytometric analysisにあたってはCoulter社製のEpics Flow Cytometry Systemを用いた。

【結果】

健康対照における可溶性FasL濃度は 0.16 ± 0.11 ng/mlであった。伝染性単核球症における可溶性FasL濃度は対照に比しわずかに高かったが、HLHにおいては19例のうち15例で有意な可溶性FasLの上昇が見られた(3.75 ± 3.82 ng/ml)。またDBAにおいては6例中5例で可溶性FasLが上昇しており、可溶性FasL濃度(2.75 ± 2.42 ng/ml)

と有意な上昇がみられたが、再生不良性貧血患者においては全例で正常範囲内であった。

in vivoのマウスの系においては抗Fas抗体の投与は肝障害をひき起こす。また、in vitroでは抗Fas抗体は造血細胞のコロニー形成を抑制し肝細胞や白血病細胞の細胞死(apoptosis)を誘導する。したがって流血中もしくは組織中のcytotoxic cellから可溶性FasLが過剰に産生されることによってHLHやDBAにおいては細胞障害がひき起こされている可能性がある。しかしながら実際にはDBAにおいてはHLH患者にみられるような肝機能異常や血球減少はみられない。一方、IFN- γ は標的細胞上のFasの発現をup-regulateさせ、Fasを介した細胞死を誘導しやすくすることが知られている。そこで我々はHLH、DBAにおいて血清中のIFN- γ 濃度の検討を行った。その結果、HLHにおいてはIFN- γ の血清中濃度は著しく上昇していたが、DBA患者においては全例感度以下であった。これらの結果からHLHにおいてはIFN- γ によって標的細胞上のFasの発現がup-regulateされ、その結果Fas/FasL系を介した細胞死が誘導されている可能性が示された。さらに典型的なHLHにおいて白血球減少の程度は可溶性FasL、IFN- γ の濃度と相関しており、可溶性FasLやIFN- γ の頂値はLDHの頂値に先行し、治療後可溶性FasL濃度、IFN- γ 濃度は速やかに低下していた。9例のHLH症例について急性期と寛解期で可溶性FasLの値を比較したところ、全症例において寛解期には可溶性FasLの値は低下していることが分かった。

一方、DBAの多くは可溶性FasLが著しい高値を示した。DBAにおいてはcytotoxic cellが赤芽球系の前駆細胞表面上の外来抗原や自己抗原を認識し、Fas/FasL系またはperforin/granzyme系を介して細胞死を誘導している可能性がある。そこで我々はDBA 2例から得た骨髓細胞における赤芽球系細胞(GPA+)上のFas抗原の発現を調べた。その結果、DBA患者から得た骨髓細胞ではGPA陽性細胞の63%、79%がFas陽性であったのに対し、健康人の骨髓細胞においてはGPA陽性細胞の87%、46%、54%、65%がFas陽性であった。

【考察】

HLHは著しい血球貪食を伴う全身の組織球増殖により特徴づけられる予後不良な疾患の総称で、常染色体劣勢遺伝形式をとるFELとウイルス関連血球貪食症候群(VAHS)を包括している。HLHは発熱、リンパ節の腫脹、肝脾腫を共通して呈し、しばしばEBVがその発症に関与する他、可溶性interleukin-2 receptor(IL-2R)やIFN- γ 、TNF- α 等のサイトカインが上昇することが知られている。本疾患は異常な活性化リンパ球やNK細胞を介する細胞障害が病態に関わっていると考えられてきたが、正確な機序は分かっていない。本研究において我々はHLH患者の多くで血清中可溶性FasLが上昇し、その程度が病態と密接に関わっていることを明らかにした。これらの結果はcytotoxic cellがHLHでは活性化されていることを示している。一方、過去の報告によるとマウスのT細胞株では可溶性FasLを1ng/ml投与することで15時間以内に90%の細胞に細胞死を誘導することができる。また、マウスの線維芽細胞株では3.2 ng/mlの可溶性FasLの投与を行うことによって7時間以内に40%の細胞に細胞死を

誘導することができる。今回の検討ではHLH患者の可溶性FasL濃度の平均は3.75 ng/mlで、且つ2例については可溶性FasL濃度は10 ng/mlを越す高値を示した。少なくともin vitroではこうした高濃度の可溶性FasLが存在すれば十分に細胞障害を起こさせ得るものと思われる。他方、可溶性FasLの単独投与ではマウスに対して致死的に作用しないが、Propionibacterium acnesを皮下投与した後、可溶性FasLを静脈投与すると24時間以内に肝不全を呈して死亡するとする報告もある。これはPropionibacterium acnesによってIFN- γ やTNF、IL-1等の様々なサイトカインが刺激産生され、可溶性FasLの感受性が増すことによるものと思われる。本研究ではHLH患者血清中で可溶性FasLとIFN- γ の両者が上昇していることを示したが、これら二つのサイトカインが互いに作用して肝細胞障害を引き起こしているのかもしれない。

一方、DBAは先天的に重篤な赤芽球系の造血不全を呈する疾患である。DBAは一部ではステロイドに良好な反応を示すことから、免疫学的な機序が関与している可能性がある。これまでDBAの赤芽球系の造血不全の原因は十分には明らかにされていなかったが、今回の研究において我々はDBA患者の多くで可溶性FasLが上昇しており、cytotoxic cellの活性化が起こっていることを示した。現時点ではDBAにおける可溶性FasLの由来は明らかでないが、DBAにおいてある種のリンパ球分画からFasLが過剰に産生している可能性がある。また本研究ではDBA患者骨髓中の赤芽球系細胞がFas抗原を発現していることが示された。DBAにおけるFas/FasL系の役割を明らかにするにはさらに症例を増やして検討することが必要だが、DBAにおいてcytotoxic cellが赤芽球系細胞をFas/FasL系を介して細胞死を誘導している可能性が示された。

【結論】

HLHやDBAの少なくとも一部の患者においては、Fas/FasL系を介した細胞死(apoptosis)の誘導がその病態に関与している

神戸大学大学院医学系研究科 (博士課程)

論文審査の結果の要旨			
受付番号	乙 第1854号	氏 名	長谷川 大一郎
論文題目	Elevation of the serum Fas ligand in patients with hemophagocytic syndrome and Diamond-Blackfan anemia. 血球貪食症候群と Diamond-Blackfan 貧血患者における血清 Fas ligand 濃度の上昇		
審査委員	主 査 中 村 隆 副 査 松 尾 雅 文 副 査 西 尾 久 英		
審査終了日	平成 14 年 11 月 / 日		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

長谷川 大一郎氏の学位論文審査結果

平成 14 年 10 月 18 日

Fas は TNF 受容体／神経成長因子受容体ファミリーの一種で interleukin-1 β -converting enzyme (ICE)-like cystine protease のカスケードを活性化することによって apoptosis の signal を誘導する。Fas は胸腺や肝臓、心臓、腎臓などの様々な組織に発現しているばかりではなく、健康人の骨髄中の CD34 陽性細胞上にも発現している。

申請者は、再生不良性貧血や hemophagocytic lymphohistiocytosis, Diamond-Blackfan 貧血、伝染性単核球症などの血液疾患において血清中の FasL 濃度を検討し、これら疾患における Fas/FasL 系の役割を明らかにすることを試みた。

研究対象は、再生不良性貧血 11 例, Diamond-Blackfan 貧血 6 例, hemophagocytic lymphohistiocytosis 19 例, 伝染性単核球症 5 例の 41 例、および健常対照 22 例について検討した。可溶性 FasL をモノクローナル抗 FasL 抗体と組み替え型ヒト FasL を用いた Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) を用いて、IFN- γ は Diaclone Research 社製キットを用いて測定している。また Flow cytometric analysis に当たっては、Coulter 社製の Epics Flow Cytometry System を用いた。

研究結果として、健常対照における可溶性 FasL 濃度は 0.16 ± 0.11 ng/ml であった。伝染性単核球症では健常対照に比しわずかに高かったが、hemophagocytic lymphohistiocytosis においては 19 例のうち 15 例で有意な可溶性 FasL の上昇を認めた (3.75 ± 3.82 ng/ml)。また Diamond-Blackfan 貧血においては 6 例中 5 例で可溶性 FasL が上昇しており、可溶性 FasL 濃度 (2.75 ± 2.42 ng/ml) と有意な上昇がみられたが、再生不良性貧血患者においては全例で正常範囲内であった。

hemophagocytic lymphohistiocytosis においては IFN- γ の血清中濃度は著しく上昇していたが、Diamond-Blackfan 貧血患者においては全例感度以下であった。これらの結果から hemophagocytic lymphohistiocytosis においては IFN- γ によって標的細胞上の Fas の発現が up-regulate され、その結果 Fas/FasL 系を介した細胞死が誘導されている可能性が示された。さらに、典型的な hemophagocytic lymphohistiocytosis において白血球減少の程度は可溶性 FasL、IFN- γ の濃度と相関

しており、可溶性 FasL や IFN- γ の頂値は LDH の頂値に先行し、治療後可溶性 FasL 濃度、IFN- γ 濃度は速やかに低下していた。9 例の hemophagocytic lymphohistiocytosis 症例について急性期と寛解期で可溶性 FasL の値を比較したところ、全症例において寛解期には可溶性 FasL の値は低下していた。

本研究は、再生不良性貧血や hemophagocytic lymphohistiocytosis, Diamond-Blackfan 貧血、伝染性単核球症などの血液疾患において血清中の FasL 濃度を検討し、これら疾患における Fas/FasL 系の役割について研究したものであり、hemophagocytic lymphohistiocytosis や Diamond-Blackfan 貧血の患者において Fas/FasL 系を介した細胞死 (apoptosis) の誘導がその病態に関与している可能性を示唆する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) の学位を得る資格があると認める。