



# Fas-ligand expression on nucleus pulposus begins in developing embryo

乾, 義弘

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2005-03-08

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙2812

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2002812>

※ 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 5 】

氏 名・(本 籍)	乾 義弘	(兵庫県)
博士の専攻分野の名称	博士(医学)	
学 位 記 番 号	博ろ第1937号	
学位授与の 要 件	学位規則第5条第2項該当	
学位授与の 日 付	平成17年3月8日	

【 学位論文題目 】

Fas-Ligand Expression on Nucleus Pulposus Begins  
in Developing embryo

(Fasリガンドは椎間板の形成過程のごく初期から発生  
している)

審 査 委 員

主 査	教 授	松尾 雅文
	教 授	寺島 俊雄
	教 授	堀田 博

【目的】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により構成され、解剖学的に生理学的にも特有の組織である。髄核は高度の線維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離されており、いわゆる免疫学的特権を有する組織の1つである。免疫学的特権をもつその他の体内の組織には精巣や、目の前房がある。これらの組織には TNF family に属する 2 型細胞膜表面蛋白である Fas-Ligand (FasL) が発現していることが報告されている。FasL 陽性細胞は、侵入してくる Fas 陽性の活性型 T 細胞や、NK 細胞をアポトーシスに至らしめることができ、免疫学的特権を有する上記の組織はこのシステムにより宿主免疫から自身を保護しているとされる。以前、我々はラット及びヒト正常椎間板において髄核を中心に FasL が強く発現していることをはじめて証明し、先の組織と同様の免疫学的特権を維持するメカニズムが存在することを示唆した。

今回我々は、FasL が椎間板の形成過程においてどの時期から発現しているのかを検討するために、ラットの胎児を経時的に免疫組織化学的に評価した。

【方法】生後約 20 週のメス SD ラットをオスと交尾させ、妊娠が成立したものを妊娠 14.5、16.5、18.5 日目にペントバルビタールにて屠殺後、胎児を摘出した。摘出した胎児を直ちに 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、矢状断に 5  $\mu$ m の厚さに薄切し、脊索を含む切片を選択した。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<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を使用して不活化した。これにヤギポリクローナル抗ヒト・ラット FasL 抗体 (和光純薬工業社製) 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施行した。対比染色にはヘマトキシリンを使用した。これを光学顕微鏡下に観察し、形態学的あるいは FasL の発現について検討した。

【結果】胎生 14.5 日目の切片では脊索は桿状に存在しその周囲に椎板を形成する細胞が集簇していた。椎板は細胞が密な部分と疎な部分に別れていた。この時点では脊索細胞において FasL の明らかな発現はな

かった。胎生 16.5 日目では脊索細胞が椎板の密な部分に集まりつつある像がみられ、脊索の分節化が始まっていた。この時期より、集まりつつある脊索細胞において FasL 陽性細胞が認められるようになった。胎生 18.5 日目では将来の椎体レベルと椎間板レベルがより明確になり、特に椎体レベルの細胞は細胞間質が広がり、かつ核が大きくなり軟骨細胞に分化しつつあった。16.5、18.5 日と経過するにつれて脊索細胞は将来の椎間板の高さに集中していき髄核を形成しつつあった。同時期には脊索細胞中の強い FasL の発現がみられた。

【考察】椎間板の形成過程は、まず中胚葉由来の一本の長い脊索が存在し、その周囲に椎板と呼ばれる疎性組織が取り囲むように存在している。次に、椎板により脊索が分断され最終的に髄核となる。また線維輪は、椎体と同様椎板由来で発生学的に髄核とは異なっている。このように椎間板の形成は特異な過程をたどるが、その機序について不明な点が多い。

FasL は先に述べたように 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組織にのみ有することが報告されている。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 NK 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。免疫学的特権を有する組織でこの 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、胎盤などである。2002 年、我々はラット及びヒト正常椎間板において髄核を中心に FasL が強く発現していることをはじめて証明し、先の組織と同様の免疫学的特権を維持するメカニズムが存在することを示唆した。

また French らは成熟および胎児マウスの Fas、FasL の発現を観察した結果、胎生 16.5 日の時点では脳、脊髄、唾液腺の組織において FasL の発現を確認しているが、この時点での FasL はアポトーシスに関与していず、脳においては危険な免疫反応から守る働きがあると推測している。

今回の研究において、胎生期の髄核が形成される時期に FasL の発現が始まることが確認された。これは FasL の発現が椎間板のごく基本的な生理状態に必要であることを意味しており、同時に、既にこの時期から、FasL を介する免疫学的特権機構が働いている可能性が示唆された。桿状の脊索から、分節化された髄核に移行する時期に一致して FasL が発現することは、FasL が脊索から髄核へと変化する際に何らかの重要な作用をおよぼしている可能性も考えられ、今後の調査が必要と思われた。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	乙 第 1940 号	氏 名	乾 義弘
論文題目	Fas-Ligand Expression on Nucleus Pulposus Begins in Developing embryo Fasリガンドは椎間板の形成過程のごく初期から発生している		
審査委員	主 査 松 尾 雅 文 副 査 寺 島 俊 雄 副 査 堀 田 博		
審査終了日	平成 17 年 2 月 16 日		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

椎間板、特に髄核は宿主免疫から隔離されており、いわゆる免疫学的特権を有する組織の1つである。免疫学的特権をもつその他の体内の組織には精巣や、目の前房がある。これらの組織にはTNF family に属する2型細胞膜表面蛋白であるFas-Ligand (FasL) が発現していることが報告されている。FasL陽性細胞は、侵入してくるFas陽性の活性型T細胞や、NK細胞をアポトーシスに至らしめることができ、免疫学的特権を有する上記の組織はこのシステムにより宿主免疫から自身を保護しているとされる。2002年、正常椎間板において髄核を中心にFasLが強く発現していることをはじめて証明し、先の組織と同様の免疫学的特権を維持するメカニズムが存在することを示唆した。今回、FasLが椎間板の形成過程においてどの時期から発現しているのかを検討するために、ラットの胎児を経時的に免疫組織化学的に評価した。

生後約20週のメスSDラットをオスと交尾させ、妊娠が成立したものを妊娠14.5、16.5、18.5日目に屠殺後、胎児を摘出した。摘出した胎児を直ちに固定、包埋し、矢状断に5 $\mu$ mの厚さに薄切し、脊索を含む切片を作製した。これに抗ヒト・ラットFasL抗体を用いて、免疫染色を施行、光学顕微鏡下に観察し、形態学的あるいはFasLの発現について検討した。

胎生14.5日目において脊索は桿状に存在しその周囲に椎板を形成する細胞が集簇していた。この時点では脊索細胞においてFasLの明らかな発現はなかった。胎生16.5日目では脊索細胞が椎板の密な部分に集まりつつある像がみられ、脊索の分節化が始まっていた。この時期より、集まりつつある脊索細胞においてFasL陽性細胞が認められるようになった。胎生18.5日目では将来の椎体レベルと椎間板レベルがより明確になり、特に椎体レベルの細胞は細胞間質が広がり、かつ核が大きくなり軟骨細胞に分化しつつあった。16.5、18.5日と経過するにつれて脊索細胞は将来の椎間板の高さに集中していき髄核を形成しつつあった。同時期には脊索細胞中の強いFasLの発現がみられた。

椎間板の形成過程は、まず中胚葉由来の一本の長い脊索が存在し、その周囲に椎板と呼ばれる疎性組織が取り囲むように存在している。次に、椎板により

脊索が分断され最終的に髄核となる。また線維輪は、椎体と同様椎板由来で発生学的に髄核とは異なっている。このように椎間板の形成は特異な過程をたどるが、その機序について不明な点が多い。今回の研究において、胎生期の髄核が形成される時期にFasLの発現が始まることが確認された。これはFasLの発現が椎間板のごく基本的な生理状態に必要であることを意味しており、同時に、既にこの時期から、FasLを介する免疫学的特権機構が働いている可能性が示唆された。桿状の脊索から、分節化された髄核に移行する時期に一致してFasLが発現することは、FasLが脊索から髄核へと変化する際に何らかの重要な作用をおよぼしている可能性も考えられ、今後の調査が必要と思われた。

本研究は、胎生期の椎間板、特に髄核でのFasLの発現について胎生期マウスを用いて研究したものであるが、従来詳細が不明であった椎間板発生初期においてFasLが発現し、この時期からFasLによる免疫学的特権機構が働いている可能性について重要な知見を得た価値ある集積であると認める。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。