

穂、奥村秀雄、能勢真人：DBA/1 マウスコラーゲン誘導関節炎における疾患感受性遺伝子座の同定と MRL 系マウス関節炎関連遺伝子群の役割。第 29 回日本免疫学会、京都、1999.12.3.

11. 曲衛敏、宮崎龍彦、路靈敏、西原美由紀、山田明弘、寺田美穂、森士朗、中鶴修一、中村祐輔、能勢真人：ループモデルマウス

MRL/lpr における新たな血管炎感受性遺伝子座。第 29 回日本免疫学会、京都、1999.12.1.

13. 鴨川淳二、寺田美穂、水木伸一、大石久志、西原美由紀、森士朗、奥村秀雄、中鶴修一、中村祐輔、能勢真人：関節炎好発系マウス MRL/lpr と MSM 野生マウスとの交配による新たな関節病変の発現。第 29 回日本免疫学会、京都、1999.12.2.

β1 インテグリンシグナル伝達分子 Cas-L の機能及び慢性関節リウマチの病態における意義の研究

分担研究者 : 森本 幾夫
東京大学医科学研究所・教授

研究要旨

インテグリンファミリーに属するβ1インテグリン(CD29/VLA)分子は細胞外マトリックス或いは細胞間相互作用を媒介する接着分子である。慢性関節リウマチ(RA)の罹患関節に浸潤する T 細胞はβ1インテグリン分子を強発現しており、これら T 細胞の炎症局所への遊走におけるβ1インテグリンの重要性が示唆されている。さらにβ1インテグリンはシグナル伝達分子としても重要であることが、最近報告されている。我々は CD29/VLA 刺激によってチロシンリン酸化される主要な分子 pp105 が cDNA クローニングの結果、Cas 類縁の新しいシグナル分子であることを明らかにし、リンパ球細胞に選択的に発現されることから、Cas-L と命名した。今回我々はβ1インテグリンのシグナル伝達分子の Cas-L が T 細胞の遊走や活性化にいかなる役割を果たし、さらに慢性関節リウマチの炎症にいかに関わっているかを明らかにすることを目的とした。

Jurkat T 細胞株は CD29/VLA の抗体やそのリガンドと抗 CD3 抗体と組合わせても、IL-2 は産生しない。しかし CD3 と CD28 抗体の組合わせでは IL-2 を産生した。この Jurkat T 細胞株は FAK は発現しているものの、Cas-L は殆ど発現していなかった。Cas-L の Jurkat トランスフェクタントを樹立して固相化した抗 CD3 抗体及びα4β1インテグリンのリガンドである CS-1 で刺激して IL-2 産生を検討したところ、ベクターコントロールと比較して CS-1 の濃度依存性に IL-2 を産生した。さらにこの IL-2 産生はトランスフェクタントを抗 CD49d 抗体及び抗 CD29 抗体で処理することにより抑制された。FAK の Cas-L への結合部位の SH3 ドメインを欠いた変異体の Jurkat トランスフェクタントでは CD29/VLA と CD3/TCR の架橋化でも IL-2 は産生せず、また Cas-L 分子は CD29/VLA 刺激によりチロシンリン酸化されなかった。さらにトランスウェルに抗 CD3 抗体及び FN を coat した場合、親株 Jurkat は遊走しないが、Cas-L Jurkat トランスフェクタントは強い遊走能を獲得した。さらに RA のモデル動物である tax トランスジェニックマウスにおいて Cas-L のチロシンリン酸化及び細胞遊走能が亢進していた。

我々が cDNA クローニングを行い確立した Cas-L 分子はβ1インテグリン由来の T 細胞共刺激や細胞遊走に鍵となる分子であることが明らかになり、さらに RA の滑膜炎にも Cas-L が重要な役割を果たしていることが示唆された。

A. 研究目的

慢性関節リウマチ患者(RA)では炎症の場である滑膜、滑液においてβ1 インテグリン分子(CD29/VLA)を強発現する T 細胞が集積する一方、炎症局所の血管内皮細胞、滑膜細胞、マクロファージなどには VCAM-1 を始めとするβ1 インテグリンのリガンド分子の発現亢進が認められる。これらの分子間の相互作用は関節炎の発症、進展及び慢性化に重要な役割を果たしている。

1996 年、我々は CD29/VLA 刺激によってチロシンリン酸化される主要な分子 pp105 が Cas 類縁の新しいシグナル伝達分子であるこ

とを遺伝子クローニングによって明らかにし、pp105 がリンパ系細胞に選択的に発現されることから Cas-L (Cas lymphocyte type)と命名した。さらに、CD29/VLA 刺激の結果活性化された FAK により Cas-L がリン酸化され、その機序として Cas-L の SH3 ドメインに FAK が結合して Cas-L の YDYVHL 配列を直接リン酸化し、Src 型チロシンキナーゼの結合部位を構成し、結合した Src 型キナーゼがさらに Cas-L の YXXP 基質ドメインをリン酸化することを明らかにした。本研究は慢性関節リウマチの炎症部位への T 細胞の遊走及びサイトカイン産生などのエフェクター T 細胞機能発

現に重要な役割を果たしている $\beta 1$ インテグリンのシグナル分子 Cas-L の生物学的機能及びその慢性関節リウマチの病態における役割を検討することを目的とした。

B. 研究方法

1. 細胞及び抗体など：

T 細胞は健常人からの末梢血を Ficoll 上で遠心分離し、末梢血リンパ球を得た後、E-ロゼット法にて分離し、さらにプラスチックディッシュ上で培養して、単球を除いた。

Jurkat T 細胞はアメリカ組織培養コレクション (ATCC) から得て、10% FCS RPMI 1640 (10% FCS-RPMI) にて培養した。抗 CD3 (OKT3), 抗 CD28 (4B10), 抗 CD29 (4B4), 抗 CD49d (3G6), 及び抗 CD49e (2H6) 抗体は我々の研究室にて確立し、精製抗体を用いた。抗リン酸化チロシン抗体 (4G10) 及び c-myc tag への抗体は Upstate Biotechnology 社から購入した。Focal adhesion kinase (FAK) への単クローン抗体及びラビット抗 Cas-L ポリクロナル抗体は我々の研究室で確立した。

2. GST-CS1 陽性蛋白、cDNA 及びプラスミド：
 $\alpha 4\beta 1$ インテグリン分子のリガンドの一つの CS-1 は GST 融合蛋白として作製した。Cas-L c-DNA は我々の研究室で単離した。野生型 Cas-L c-DNA, SH3 ドメイン欠損変異体 (Cas-L Δ SH3)、基質結合ドメイン欠損変異体 (Cas-L Δ SD) 或いは C 末端部 YDYVHL の FDFVHL 変異体は c-myc タグを付けて pBCMG-Hygro ベクターに挿入した。発現ベクターはエレクトロポレーション法にて Jurkat 株にトランスフェクトされ、トランスフェクタントはハイグロマイシン含有メディアで培養した。

3. IL-2 産生の検出：

Jurkat トランスフェクタントは固相化抗 CD3 抗体、抗 CD28 抗体や CD29/VLA のリガンドで 24 時間刺激され、培養上清の IL-2 は CTLL-2 assay にて検出した。

4. トランスエンドテルマイグレーション：

細胞遊走は直径 6.5mm のトランスウェル (3 μ m 穴、ポリカーボネート；コスター社) を用いて CD3 抗体及びフィブロネクチン (FN) を coat し、 1×10^6 /ml に調節した細胞を CO_2 培養器中で

4 時間培養し、下層に遊走した細胞は 30 秒間フローサイトメトリー或いは顕微鏡にて数えた。

5. 免疫沈降及び免疫ブロット：

c-myc タグ蛋白は 9E10 抗体及びプロテイン A-セファロースにて免疫沈降した。チロシンリン酸化は ^{125}I -ラベル抗リン酸化チロシン抗体 (4G10) 或いは抗マウス IgG-HRP-結合抗体を用いた ECL システムにて検出した。

6. tax トランスジェニックマウス：

HTLV-1 の LTR-env-pX-LTR 領域マウス (14 週齢) は東京大学医科学研究所岩倉教授から供与された。

C. 研究結果

Jurkat T 細胞株は IL-2 を産生する数少ないヒト T 細胞株の一つであるが、インテグリンの抗体あるいはそのリガンドと抗 CD3 抗体を組み合わせても IL-2 を産生しない。しかし、抗 CD3 と抗 CD28 抗体では IL-2 を産生する。FAK 及び Cas-L の発現を調べたところ、FAK は発現しているものの Cas-L は殆ど発現していなかった。このことから、Jurkat T 細胞株でインテグリン刺激により IL-2 産生が誘導されないのは、Cas-L の発現が欠損している可能性が示唆された。この点を解明のために、幾つかの Cas-L Jurkat トランスフェクタントを樹立した。その中から無差別に CD3, CD29, CD49d, CD28 の発現はほぼ同じであるトランスフェクタント及びベクターコントロールを選択して、固相化した抗 CD3 抗体及び CD49d のリガンドである CS-1 蛋白で刺激して、IL-2 産生を検討した。Cas-L トランスフェクタントはベクターコントロールと比較して CS-1 の濃度依存性に IL-2 を産生した。10 μ g/ml の CS-1 蛋白では、Cas-L トランスフェクタントは抗 CD3 抗体のみの場合と比較して、約 5 倍の IL-2 産生が認められた。一方、Cas-L トランスフェクタント及びベクターコントロールとも CD28 由来共刺激では両者ともほぼ同レベルの IL-2 を産生した。さらに、これらの結果がクローナルバリエーションから得られたという可能性を否定するため、Cas-L トランスフェクタント及びベクターコントロール細胞株を 5 つづつ選択して、固相化した抗 CD3 抗体及び CS-1 で刺激して IL-2 産生を検討

した。Cas-L トランスフェクタントの平均 IL-2 産生はベクターコントロールと比較して約 15 倍も多く産生した (35.4 ± 5.2 U/ml vs 2.4 ± 1.3 U/ml)。さらに Cas-L のインテグリン由来共刺激に重要なドメインを検討するため Cas-L の FAK の結合するドメインの SH3 欠損ドメイン(Cas-L Δ SH3)の Jurkat トランスフェクタントを樹立して、CD3 及び CS-1 で刺激したところ、Cas-L Δ SH3 トランスフェクタントは IL-2 を殆ど産生しなかったが、野生型 Cas-L トランスフェクタントでは有意に IL-2 を産生した。また Cas-L の CD29/VLA 刺激によるリン酸化を検討したところ Cas-L Δ SH3 トランスフェクタントはリン酸化しなかったが、野生型 Cas-L はリン酸化した。この結果から、Cas-L の SH3 ドメインがインテグリン共刺激に重要であり、Cas-L はインテグリンによる T 細胞共刺激に鍵となる分子であることが明らかになった。次にインテグリンは細胞遊走にも重要な役割を果たしているので、Cas-L の FN 由来 CD3 刺激 T 細胞遊走機能に及ぼす影響を検討した。この為にポイデンチャンバー アッセイを用いた。T 細胞は FN 及び抗 CD3 抗体を coat したフィルター上に乗せ、その遊走能を解析した。ヒト末梢血 T 細胞はこのシステムで、有意に遊走を示したが、Jurkat T 細胞株は殆ど遊走しなかった。Cas-L の T 細胞遊走能における役割を検討するために、Cas-L のトランスフェクタントを樹立した。このトランスフェクタントは CD3, CD49d, CD49e, CD29, CD28 は親株 Jurkat と比較して同レベルに発現していた。野生型トランスフェクタントはこのシステムで有意に細胞遊走能が亢進したが、ベクターコントロールでは殆ど遊走しなかった。CD3 抗体及び FN のみを coat した場合は Cas-L トランスフェクタントは殆ど遊走しなかった。また CD3 と CD28 抗体を coat した場合、Jurkat 株は IL-2 を産生するが、この場合もトランスフェクタント及び親株 Jurkat とも遊走しなかった。次に細胞遊走における Cas-L の機能ドメインを決定するために、SH3 ドメイン欠陥 Cas-L(Cas-L Δ SH3)、基質ドメイン欠陥 Cas-L(Cas-L Δ SD) 及び C 末端部の YDYVHL を FDFVHL に置換した Cas-L 変異体(Cas-L-F)を、Jurkat T 細胞にトランスフェクトして細胞遊走能を検

討した。Cas-L Δ SD トランスフェクタントは殆ど細胞遊走を示さなかったが、他のトランスフェクタントは野生型 Cas-L トランスフェクタント同様に細胞遊走を示した。さらに FN 及び CD3 抗体刺激による Cas-L 分子のチロシンリン酸化を検討したところ、Cas-L Δ SD トランスフェクタントは CD3+FN 刺激では殆どチロシンリン酸化されなかったが、Cas-L Δ SH3 及び Cas-L-F トランスフェクタントは野生型トランスフェクタント同様にチロシンリン酸化された。このことから Cas-L 分子はインテグリン由来細胞遊走にも鍵となる分子で、Cas-L の基質ドメインが重要であることが明らかとなった。

次に Cas-L の慢性関節リウマチの病態への役割を検討するために RA のモデルマウスといわれる tax-トランスジェニックマウスを用いて検討した。14 週齢の tax-トランスジェニックマウスは RA 様関節炎を発症しているが、このマウスの脾細胞はコントロールマウスと比較してトランスウェルでの遊走能は有意に亢進していた。さらに 14 週齢マウスではコントロールマウスと比較して Cas-L 分子のチロシンリン酸化が亢進しているという結果が得られた。

D. 考察

本研究は T 細胞の増殖、遊走に Cas-L が鍵となる分子であることを明らかにした。すなわち、Jurkat T 細胞はヒト T 細胞株では IL-2 を産生する数少ない細胞株の一つで、CD3, CD29, CD49d, CD28 を強く発現しているが CD29/VLA インテグリンと CD3/TCR との架橋化により IL-2 産生をしない。しかし CD28 刺激である抗 CD3 と抗 CD28 抗体では IL-2 を産生する。この様に Jurkat T 細胞株は CD29/VLA を正常に発現しているにも関わらず、末梢血 T 細胞と異なり CD29/VLA 刺激による共刺激シグナルが誘導できない。CD29/VLA シグナル伝達では FAK 及び Cas-L が重要と思われることから、この発現を調べたところ FAK は発現しているものの Cas-L は殆ど発現していなかった。そこで Cas-L を Jurkat T 細胞株に発現させたところ、CD3 と CD29/VLA 分子の架橋化によって IL-2 産生が誘導された。しかし CD28 刺激においては Cas-L 及びベクターコントロール Jurkat とも

に同レベルの IL-2 産生が認められることから Cas-L は CD29/VLA 刺激による IL-2 産生に鍵となる分子であることが示唆された。また Cas-L を発現させた Jurkat T 細胞は FN と抗 CD3 抗体を同時に coat すると強い細胞遊走能を起すことも観察した。さらに、これらの機能発現のためには Cas-L のチロシンリン酸化が重要であることが明らかとなった。インテグリン由来共刺激では FAK の Cas-L への結合部位である SH3 ドメインが重要で、また Cas-L の基質ドメインは細胞遊走に重要であることも明らかになった。この Cas-L の共刺激及び細胞遊走に関わる下流シグナル分子がいかなるものか、今後検討に値するものと思われる。この様に Cas-L は $\beta 1$ インテグリン刺激による T 細胞活性化や細胞遊走に重要な役割を果たし、またその機能発現にはチロシンリン酸化が必要なことが明らかになった。RA のモデル動物である tax トランスジェニックマウスにおいても細胞遊走能は亢進し、Cas-L がチロシンリン酸化されていることが明らかになった。RA では炎症部位や滑膜で $\beta 1$ インテグリン強陽性 T 細胞が集積している一方、VCAM-1 を始めとする $\beta 1$ インテグリンのリガンド発現亢進も血管内皮細胞や滑膜等で認められる。今回の結果から、これらの環境下では慢性関節リウマチの滑膜浸潤 T 細胞は $\beta 1$ インテグリン刺激カスケードが活性化を受け、様々な炎症性サイトカインを産生して炎症の誘導、維持を行っていると考えられる。

E. 結論

我々が cDNA クローニングを行い、確立した Cas-L 分子が $\beta 1$ インテグリン分子由来の T 細胞共刺激や遊走に鍵となる分子であることを明らかにし、また RA モデルマウスの検討結果から、RA の滑膜での炎症にも Cas-L が重要な役割を果たしていることが推測された。

F. 発表

1. Iwata S, Yamaguchi N, Munakata Y, Ikushima H, Lee JF, Hosono O, Schlossman SF, and Morimoto C. CD26/DPPIV differentially regulates the chemotaxis of T cells and monocytes toward RANTES. *Int. Immunol.* 1999, 11:417-426.
2. Munakata Y, Umezawa Y, Iwata S, Dong R-P, Yoshida S, Ishii T and Morimoto C.

Specific inhibition of Th2 type cytokine production from human peripheral T cells by terfenadine in vitro. *Clin. Exp. Allergy* 1999, 29:1281-1286.

3. Hosono O, Homma T, Kobayashi H, Munakata Y, Nojima Y, Iwamoto A, and Morimoto C. Decreased dipeptidyl peptidase IV enzyme activity of plasma soluble CD26 and its inverse correlation with HIV-1 RNA in HIV-1 infected individuals. *Clin. Immunol.* 1999, 91:283-95.
4. Mukasa R, Homma T, Ohtsuki T, Hosono O, Souta A, Kitamura T, Fukuda M, Watanabe S, and Morimoto C. Core 2-containing O-glycans on CD43 are preferentially expressed in the memory subset of human CD4 T cells. *Int. Immunol.* 1999; 11: 259-268.
5. Sato K, Kawasaki H, Nagayama H, Serizawa R, Ikeda J, Morimoto C, Yasunaga K, Yamaji N, Tadokoro K, Juji T, and Takahashi T. CC chemokine receptors, CCR-1 and CCR-3, are potentially involved in antigen-presenting cell function of human peripheral blood monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 1999, 93:34-42.
6. Mukasa R, Homma T, Hosono O, Yoshino S, Nishioka K, Fukuda M, Morimoto C. Human T lymphocyte populations which bind to P- or E-selection are enriched with cells expressing core 2 O-glycans. *Immunol. Lett.* 1999,67:117-124.
7. Kamiguchi K, Tachibana K, Ohashi Y, Fujita H, Iwata S, and Morimoto C. Cas-L is required for $\beta 1$ integrin-mediated costimulation in T cells. *J. Immunol.* 1999, 163: 563-568.
8. Ohashi Y, Iwata S, Kamiguchi K, Morimoto C : Tyrosine Phosphorylation of Cas-L is a Critical Element for T Cell Receptor- and $\beta 1$ Integrin-induced T Lymphocyte Migration. *J. Immunol.* 163:3727-3734.
9. Iwata S, and Morimoto C. CD26/Dipeptidyl peptidase IV in context: The different roles of a multifunctional ectoenzyme in malignant transformation. *J. Exp. Med.* 1999, 190: 301-305.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

課題名：TNF受容体ファミリー分子を介したシグナル伝達に関する研究

分担研究者 八木田 秀雄

所属機関 順天堂大学医学部免疫学助教授

TRAF5 欠損マウスを作製し、CD27 や CD40 を介したリンパ球の活性化に異常を認めたが、NF- κ B や JNK の活性化は正常であり、NF- κ B や JNK に非依存性の TRAF5 を介したリンパ球活性化経路の存在が明らかとなった。さらに、TRAF2 欠損マウスとの交配により、TRAF5 及び TRAF2 が TNF 受容体を介した NF- κ B の活性化とアポトーシス抵抗性の誘導に重要であることを示した。また、マウス及びラット OX40L, マウス4-1BBL, ヒト及びマウス TRAIL に対する mAb を作製し、これらの分子の発現と機能を解析した。

A. 研究目的

I型あるいはII型TNF受容体, lymphotoxin (LT)- β 受容体, Fas, CD40, CD30, CD27, OX40といったTNF受容体ファミリー分子とそのリガンドは、アポトーシスや炎症反応の惹起に関与し、RAの病態形成においても重要であることが示唆されている。本研究においては、これらのTNF受容体ファミリー分子の機能とシグナル伝達機構を解明し、RAにおける炎症反応とアポトーシスの新たな制御法を開発することを目的とする。

B. 方法と結果

1. N末端側を欠いたdominant negative TRAF5によって293細胞でのTNFによるNF- κ B活性化が抑制されることから、TRAF2だけではなく、TRAF5もTNF受容体を介したNF- κ Bの活性化に関わることが示唆された。

2. gene targetingによりTRAF5欠損 (T5KO)マウスを作製した。T5KOマウスの発育及び白血球の分化・成熟には明らかな異常は認められなかったが、T細胞においてCD27を介した活性化の低下、及び、B細胞においてCD40を介した活性化の低下を認めた。しかしながら、これらのTNFファミリー分子を介したNF- κ B及びJNKの活性化には変化が認められず、他のTRAF分子の補足的な関与が示唆されるとともに、NF- κ BやJNKに非依存性のTRAF5を介したリンパ球活性化経路の存在が明らかとなった。

3. T5KOマウスとTRAF2欠損 (T2KO)マウスを交配したT5/T2KOマウス由来の胎仔線維芽 (EF) 細胞においては、TNFによるNF- κ B活性化が遅延・減弱し、アポトーシス誘導が著明に亢進することから、TRAF5及びTRAF2がTNF受容体を介したNF- κ Bの活性化、及び、アポトーシス抵抗性の誘導に重要であることが示された。

4. マウスOX40リガンド (OX40L) に対するmAbを作製し、活性化B細胞や樹状細胞 (DC) での発現とT細胞活性化への関与を明らかにした。また、DBA/1マウスでのコラーゲン誘発性関節炎 (CIA) に対する抑制効果を認めた。

5. ラットOX40Lに対するmAbを作製し、HTLV-1感染T細胞株での異常発現を認めた。さらに、ラットCIA及びアジュバント関節炎 (AA) への効果を検討している。

6. マウス4-1BBリガンド (4-1BBL) に対するmAbを作製し、活性化B細胞やDCでの発現とT細胞活性化への関与を明らかにしている。

7. ヒト及びマウスのTNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) に対するmAbを作製し、その活性化T細胞やNK細胞での発現を明らかにするとともに、これらの細胞による細胞傷害活性へのTRAILの関与を示した。

8. RA患者関節中の単球に高頻度に感染が認められるパルボウイルスの非構造蛋白NS1は、NIK \rightarrow IKKを介してNF- κ Bを活性化すること、及び、TNF受容体を介したNF- κ B活性化を相乗的に増強することを明らかにした。

C. 考察と結論

TNF受容体ファミリー分子を介したNF- κ B活性化は、IL-6やIL-8といった炎症性サイトカインの産生やICAM-1やE-セレクトインといった接着分子の発現を誘導することにより炎症反応を惹起、増強する他、I型TNF受容体やDR4やDR5といったTRAIL受容体を介したアポトーシスに対して抑制的に働くことが示唆されている。これまでの解析によりTRAF \rightarrow NIK \rightarrow IKKというNF- κ B活性化の主たる経路が明らかとなり、NIKやIKKを標的とした抗炎症剤の開発が期待される。さらに、これらのTNF受容

体ファミリー分子のRAの病態形成への関与については、RA患者での発現の検討とともに、そのリガンドに対する中和抗体のCIAやAAに対する効果から明らかにしていく予定である。

D. 発表

1. Kayagaki, N., Yamaguchi, N., Nakayama, M., Kawasaki, A., Akiba, H., Okumura, K., and Yagita, H. Involvement of TNF-related apoptosis-inducing ligand in human CD4⁺ T cell-mediated cytotoxicity. *J. Immunol.*, 162: 2639-2647, 1999.
2. Shimozato, O., Takeda, K., Yagita, H., and Okumura, K. Expression of CD30 ligand (CD153) on murine activated T cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 256: 519-526, 1999.
3. Hiromatsu, Y., Hoshino, T., Yagita, H., Koga, M., Sakisaka, S., Honda, J., Yang, N.D., Kayagaki, N., Okumura, K., and Nonaka, K. Functional Fas ligand expression in thyrocytes from patients with Graves' disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 84: 2896-2902, 1999.
4. Kim, Y-H., Kim, S., Kim, K-A., Yagita, H., Kayagaki, N., Kim, K-W., and Lee, M-S. Apoptosis of pancreatic β -cells detected in accelerated diabetes of NOD mice: no role of Fas-Fas ligand interaction in autoimmune diabetes. *Eur. J. Immunol.*, 29: 455-465, 1999.
5. Kawamura, T., Azuma, M., Kayagaki, N., Shimada, S., Yagita, H., and Okumura, K. Fas/Fas ligand-mediated elimination of antigen-bearing Langerhans cells in draining lymph nodes. *Brit. J. Dermatol.*, 141: 201-205, 1999.
6. Kayagaki, N., Yamaguchi, N., Nakayama, M., Etoh, H., Okumura, K., and Yagita, H. Type I interferons (IFNs) regulate TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) expression on human T cells: a novel mechanism for anti-tumor effect of type I IFNs. *J. Exp. Med.*, 189: 1451-1460, 1999.
7. Matsue, H., Edelbaum, D., Hartmann, A.C., Morita, A., Bergstresser, P.R., Yagita, H., Okumura, K., and Takashima, A. Dendritic cells undergo rapid apoptosis in vitro during antigen-specific interaction with CD4⁺ T cells. *J. Immunol.*, 162: 5287-5298, 1999.
8. Suzuki, N., Nakajima, A., Yoshino, S., Matsushima, K., Yagita, H., and Okumura, K. Selective accumulation of CCR5⁺ T lymphocytes into inflamed joints of rheumatoid arthritis. *Int. Immunol.*, 11: 553-559, 1999.
9. Akiba, H., Oshima, H., Takeda, K., Atsuta, M., Nakano, H., Nakajima, A., Nohara, C., Yagita, H., and Okumura, K. CD28-independent costimulation of T cells by OX40 ligand and CD70 on activated B cells. *J. Immunol.*, 162: 7058-7066, 1999.
10. Shimizu, M., Fontana, A., Takeda, Y., Yagita, H., Yoshimoto, T., and Matsuzawa, A. Induction of antitumor immunity with Fas/APO-1 ligand (CD95L)-transfected neuroblastoma Neuro-2a cells. *J. Immunol.*, 162: 7350-7357, 1999.
11. Matsue, H., Matsue, K., Walters, M., Okumura, K., Yagita, H., and Takashima, A. Induction of antigen-specific immunosuppression by CD95L cDNA-transfected 'killer' dendritic cells. *Nature Med.*, 5: 930-937, 1999.
12. Imaizumi, K., Kawabe, T., Ichiyama, S., Kikutani, H., Yagita, H., Shimokata, K., and Hasegawa, Y. Enhancement of tumoricidal activity of alveolar macrophages via CD40-CD40 ligand interaction. *Am. J. Physiol.*, 277: L49-L57, 1999.
13. Seko, Y., Takahashi, N., Oshima, H., Shimozato, O., Akiba, H., Kobata, T., Yagita, H., Okumura, K., Azuma, M., and Yazaki, Y. Expression of tumor necrosis factor (TNF) receptor/ligand superfamily co-stimulatory molecules CD40, CD30L, CD27L, and OX40L in murine hearts with chronic ongoing myocarditis caused by coxsackie virus B3. *J. Pathol.*, 188: 423-430, 1999.
14. Nakano, H., Sakon, S., Koseki, H., Takemori, T., Tada, K., Matsumoto, M., Munechika, E., Sakai, T., Shirasawa, T., Akiba, H., Kobata, T., Santee, S.M., Ware, C.F., Rennert P.D., Taniguchi, M., Yagita, H., and Okumura, K. Targeted disruption of Traf5 gene causes defects in CD40- and CD27-mediated lymphocyte activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96: 9803-9808, 1999.
15. Kayagaki, N., Yamaguchi, N., Nakayama, M., Takeda, K., Akiba, H., Tsutsui, H., Okumura, H., Nakanishi, K., Okumura, K., and Yagita, H. Expression and function of TNF-related apoptosis-inducing ligand on murine activated NK cells. *J. Immunol.*, 163: 1906-1913, 1999.
16. Tsutsui, H., Kayagaki, N., Kuida, K., Nakano, H.,

- Hayashi, N., Takeda, K., Matsui, K., Kashiwamura, S., Hada, T., Akira, S., Yagita, H., Okumura, H., and Nakanishi, K. Caspase-1-independent, Fas/Fas ligand-mediated IL-18 secretion from macrophages causes acute liver injury in mice. *Immunity*, 11: 359-367, 1999.
17. Shirakata, Y., Ishii, K., Yagita, H., Okumura, K., Taniguchi, M., and Takemori, T. Distinct subcellular localization and substrate specificity of extracellular signal-regulated kinase in B cells upon stimulation with IgM and CD40. *J. Immunol.*, 163: 6589-6597, 1999.
18. Kawamura, T., Azuma, M., Kayagaki, N., Shimada, S., Yagita, H., and Okumura, K. Fas/Fas ligand-mediated apoptosis of murine langerhans cells. *J. Dermatol. Sci.*, 22: 96-101, 2000.
19. Akiba, H., Miyahira, Y., Atsuta, M., Takeda, K., Nohara, C., Futagawa, T., Matsuda, H., Aoki, T., Yagita, H., and Okumura, K. Critical contribution of OX40 ligand to T helper cell type 2 differentiation in experimental leishmaniasis. *J. Exp. Med.*, 191: 375-380, 2000.
20. Takeda, K., Oshima, H., Hayakawa, Y., Akiba, H., Atsuta, M., Kobata, T., Kobayashi, K., Ito, M., Yagita, H., and Okumura, K. CD27-mediated activation of murine NK cells. *J. Immunol.*, 164: 1741-1745, 2000.

自己免疫疾患におけるレトロウイルスの病因論的関与に関する研究

分担研究者 吉 木 敬 北海道大学医学部教授

研究要旨

当該分担研究者らはヒトT細胞白血病ウイルスI型（HTLV-I）のenv-pX遺伝子をラットに導入し、ヒト自己免疫疾患のプロトタイプ・モデルを樹立した。本ラットの末梢リンパ球は発症前から活性化されやすい状態にあり、この発症前末梢リンパ球を移入することで正常ラットに一部の疾患が再現された。しかしながら骨髄細胞では移入できない疾患や、血球系細胞の移入では誘導できない疾患もあり、疾患により異なる発症機序が存在する。一方、炎症局所ではオリゴクローナルなT細胞の浸潤が観察されるが、標的となる単一の抗原は存在しない。またenv-pXラットと正常ラットでは脾臓におけるCD4CD25陽性細胞の動態に違いが認められ、免疫制御の異常が発症に関与している可能性も考えられた。この他、内在性レトロウイルス（ERV）の病原性を解析するうえで有用な新しい動物モデルとしてHERV-Rトランスジェニックラットを樹立した。

A. 研究目的

関節炎などいくつかの自己免疫疾患類似の病態への関与が指摘されているHTLV-Iについて、病原性の主体と考えられるenv-pX遺伝子を導入したトランスジェニックラット（env-pXラット）を作製し、リウマチ因子など自己抗体の産生を伴う慢性関節リウマチ類似の関節炎をはじめ壊死性血管炎、血栓症、涙腺・唾液腺炎、心筋炎、筋炎、皮膚炎などの自己免疫疾患発症モデルを樹立した。当該研究では本ラットの疾患発症機構を解析し、レトロウイルスの自己免疫疾患における病因論的発症機構解析モデルとする。また、ERVの疾患への関与の可能性についても検討する。

B. 研究方法

env-pXラット：炎症局所への浸潤T細胞のクロナリティーはRT-PCR-SSCP法で検討し、一部はTCRVβCD3領域の塩基配列を決定した。正常WKAHラットとの間で骨髄や脾細胞移入実験を行い、疾患の発症を検討した。FACSにてリンパ組織のCD4CD25陽性細胞の検討を行った。

ERV：1コピー型ヒトERVであるHERV-Rについて、臍帯静脈内皮細胞、血管平滑筋細胞をモデルにサイトカインによるmRNAの発現量を競合RT-PCRにより検討した。HERV-R遺伝子全長をクローニングし、ラットに遺伝子導入した。

C. 研究結果

env-pXラット：本ラットの末梢T細胞は疾患の有無にかかわらず副シグナル分子の発現増強やin vitroでの高反応性を示す。関節炎や皮膚炎局所にオリゴクローナルなT細胞の集積を認めたが、いずれの個体にも共通するクローンやCDR3領域のアミノ酸配列に一定のモチーフは見出せなかった。致死量の放射線を照射した正常ラットに、env-pXラットの骨髄や脾細胞を移入し、移入された正常ラットにそれぞれ皮膚炎あるいは皮膚炎および血管炎を誘導した。env-pXラットに正常ラットの骨髄あるいは脾細胞を移入すると、骨髄細胞では皮膚炎のみしか抑制できなかったが、脾細胞ではほとんどの疾患を抑制した。また、正常ラット脾細胞は放射線未照射のenv-pXラットにもほとんどの疾患の発症を抑制したほか、その前投与でenv-pXラットのタイプIIコラーゲン投与による関節炎をも抑制した。免疫制御に関わると考えられているCD4CD25陽性細胞のリンパ組織での動態を検討すると、正常ラットの脾臓で観察される生後2週をピークとする一過性の増加がenv-pXラットでは観察されなかった。

ERV：HERV-Rの血管内皮細胞での発現はTNF-α、IL-1α、IL-1βにより増強し、IFN-γで抑制された。血管平滑筋細胞ではTNF-αやIL-6で発現増強傾向を示した。またHERV-R遺伝子全長を導入したトランスジェニックラットを樹立した。本ラットでは涙腺、唾液腺を中心にHERV-Rの組織特異的な発現が観察された。

D. 考察

env-pXラット：関節炎局所では導入遺伝子産物など単一の抗原がT細胞の標的である可能性は低く、導入遺伝子に修飾されたいくつかの自己抗原が標的となり、病態を形成していると考えられた。細胞移入により、皮膚炎は導入遺伝子を発現したリンパ球が主因と考えられたが、関節炎などは標的臓器や胸腺での導入遺伝子発現も深く関わっていると思われた。血管炎の発症にはリンパ球の成熟に重要な胸腺などでの導入遺伝子が病因となっている可能性が示唆された。さらに、env-pXラットの脾臓では免疫制御に関わる細胞に異常をきたしている可能性が想定された。その細胞の候補としてCD4CD25陽性細胞の可能性が考えられた。

ERV：HERV-Rはサイトカインの発現を介して血管炎の病態に関与する可能性が示された。樹立したHERV-RトランスジェニックラットはERVの病原性を解析するのに有用な動物モデルになると考えられた。

E. 結論

レトロウイルスは単に免疫の標的抗原としてふるまうのみならず、免疫系との相互作用を介して関節炎をはじめとする自己免疫疾患の発症やその病態に関与している可能性が示唆され、今後も内在性レトロウイルスを含めたレトロウイルスによる自己免疫疾患発症への関与に関する研究を一層進めていく必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

Ohashi, T., Hanabuchi, S., Kato, H., Koya, Y., Takemura, F., Hirokawa, K., Yoshiki, T., Tanaka, Y., Fujii, M., Kannagi, M. : Induction of adult T-cell leukemia-like lymphoproliferative disease and its inhibition by adoptive immunotherapy in T-cell-deficient nude rats inoculated with syngeneic human T-cell leukemia virus type 1-immortalized cells. *J. Virol.* 73: 6031-6040, 1999.

Katsumata, K., Ikeda, H., Sato, M., Ishizu, A., Kawarada, Y., Kato, H., Wakisaka, A., Koike, T., Yoshiki, T. : Cytokine regulation of env gene expression of human endogenous retrovirus-R in human vascular endothelial cells. *Clin. Immunol.* 93: 75-80, 1999.

Hanabuchi, S., Ohashi, T., Koya, Y., Kato, H., Takemura, F., Hirokawa, K., Yoshiki, T., Yagita, H., Okumura, K., Kannagi, M. : Development of human T-cell leukemia virus type 1-transformed tumors in rats following suppression of T-cell immunity by CD80 and CD86 blockade. *J. Virol.* 74: 428-435, 2000.

2. 学会発表

Yoshiki, T. : Chronic progressive myeloneuropathy in WKAH rats induced by HTLV-I infection. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.* 20: A14, 1999.

Kannagi, M., Ohashi, T., Hanabuchi, S., Koya, Y., Kato, H., Takemura, F., Hirokawa, K., Yoshiki, T. : T cell-control of tumor cells in vivo in a rat model system of ATL. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.* 20: A12, 1999.

Ohashi, T., Hanabuchi, S., Kato, H., Koya, Y., Hirokawa, K., Yoshiki, T., Tanaka, Y., Fujii, M., Kannagi, M. : Induction of ATL-like lymphoproliferative disease and its prevention by adoptive immunotherapy in T-cell deficient nude rats inoculated with syngeneic HTLV-I-immortalized cells. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.* 20: A13, 1999.

Kikuchi, K., Ikeda, H., Fugo, K., Tsuchikawa, T., Sugaya, T., Yoshiki, T. : Development of thymomas in transgenic rats carrying HTLV-I pX gene under control of a lymphoid tissue specific promoter. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.* 20: A15, 1999.

Hanabuchi, S., Ohashi, T., Koya, Y., Kato, H., Takemura, F., Hirokawa, K., Yoshiki, T., Yagita, H., Okumura, K., Kannagi, M. : Induction of HTLV-I tumor development in vivo by suppressing HTLV-I-specific T cell immunity. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.* 20: A16, 1999.

Jiang, X., Ikeda, H., Morita, K., Tomaru, U., Ohya, O., Yoshiki, T. : Pathogenesis of HTLV-I infection in central nervous system of a rat model for HAM/TSP. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.* 20: A42, 1999.

Fugo, K., Ikeda, H., Sugaya, T., Tanaka, S., Higuchi, M., Lai, Y., Tsuchikawa, T., Shimata, M., Yoshiki, T. : Analysis of the pathogenesis of autoimmune diseases in transgenic rats carrying the env-pX gene of HTLV-I. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.* 20: A42, 1999.

Ikeda, H., Katsumata, K., Sato, M., Ishizu, A., Yamamoto, Y., Yoshiki, T. : Cytokine regulation of the env gene expression of human endogenous retrovirus-R in human vascular endothelial cells. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.* 20: A83, 1999.

柴田雅彦, 池田 仁, 勝俣一晃, 佐藤昌幸, 吉木 敬 : 内在性レトロウイルスと自己免疫疾患. *リウマチ* 39: 194, 1999.

石倉 浩, 池田 仁, 柴田雅彦, 吉木 敬 : 壊死性血管炎の発症要因. *リウマチ* 39: 202, 1999.

池田 仁, 菅谷壽晃, 富居一範, 樋口正人, 柴田雅彦, 吉木 敬 : 種々の自己免疫疾患を発症する疾患モデル動物 -HTLV-I LTR-env-pXトランスジェニックラット-. *リウマチ* 39: 255, 1999.

富居一範, 池田 仁, 菅谷壽晃, 樋口正人, 田中 敏, 頼 玉熔, 土川貴裕, 柴田雅彦, 吉木 敬 : HTLV-I LTR-env-pXトランスジェニックラットにおける自己免疫疾患発症に関する検討. *リウマチ* 39: 425, 1999.

菊地和徳, 池田 仁, 土川貴裕, 田中 敏, 菅谷壽晃, 富居一範, 吉木 敬 : lckプロモーターによりHTLV-I pX遺伝子を発現するトランスジェニックラットに発生する胸腺腫の解析. *日本病理学会会誌* 88: 313, 1999.

菅谷壽晃, 池田 仁, 富居一範, 樋口正人, 田中 敏, 頼 玉熔, 土川貴裕, 柴田雅彦, 吉木 敬 : 自己免疫疾患を発症するHTLV-I遺伝子導入ラットの末梢血および関節炎局所浸潤リンパ球の解析. *日本病理学会会誌* 88: 325, 1999.

姜 綉雲, 池田 仁, 森田啓介, 外丸詩野, 大矢 宰, 笠井武史, 吉木 敬 : HAM/TSPモデルラットを用いた中枢神経系でのHTLV-Iの病原性の解析. *日本病理学会会誌* 88: 334, 1999.

田中 敏, 池田 仁, 山本友希代, 吉木 敬 : ヒト内在性レトロウイルスERV3遺伝子導入ラットの作製と解析. 第79回北海道医学大会病理分科会プログラム 19, 1999.

土川貴裕, 池田 仁, 菊地和徳, 柴田雅彦, 田中 敏, 富居一範, 吉木 敬 : HTLV-I pXトランスジェニックラットに発生する胸腺腫の解析. 第79回北海道医学大会病理分科会プログラム 19, 1999.

土川貴裕, 池田 仁, 菊地和徳, 柴田雅彦, 田中 敏, 富居一範, 吉木 敬 : lck-pXトランスジェニックラットに発生する胸腺腫細胞の由来に関する検討. *日本免疫学会総会・学術集会記録* 29: 69, 1999.

姜 綉雲, 池田 仁, 森田啓介, 外丸詩野, 大矢 宰, 吉木 敬 : HAM/TSPモデルラットを用いた脊髄症発症機序の解析-HTLV-I感染によるオリゴデンドロサイト細胞死のin vitro解析-. *日本免疫学会総会・学術集会記録* 29: 121, 1999.

花淵志野, 大橋 貴, 小屋美博, 竹村富美代, 広川勝いく, 吉木 敬, 八木田秀雄, 奥村 康, 神奈木真理 : 抗CD80/86抗体を用いたラットATL様疾患誘導. *日本免疫学会総会・学術集会記録* 29: 121, 1999.

樋口正人, 池田 仁, 富居一範, 菅谷壽晃, 田中 敏, 柴田雅彦, 吉木 敬 : HTLV-I LTR-env-pXトランスジェニックラットの胸腺, リンパ節, 脾臓におけるCD25+CD4+T細胞分画の比較検討. *日本免疫学会総会・学術集会記録* 29: 189, 1999.

辻 宗啓, 池田 仁, 富居一範, 樋口正人, 鈴木 昭, 石津明洋, 柴田雅彦, 吉木 敬 : HTLV-I LTR-env-pXトランスジェニックラットにおける自己免疫疾患発症の抑制に関する検討. 第25回北海道リウマチ研究会プログラム・抄録 5, 2000.

G. 知的所得権の取得状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

慢性関節リュウマチの発症に関わる Fas を介するアポトーシス誘導システムの研究

分担研究者 米原 伸 京都大学ウイルス研究所・教授

研究要旨

Fas は活性化した末梢の T 細胞や B 細胞の除去に関与することによって、自己反応性免疫担当細胞の除去を行う分子である。また Fas は、慢性関節リュウマチ発症時に炎症にともなって増殖する滑膜細胞の除去にも関わっているが、正常の滑膜細胞にはアポトーシスを誘導できない。これらの事実は、Fas システムの機能が慢性関節リュウマチの発症を阻止しており、その働きの抑制が慢性関節リュウマチの発症と増悪に関与することを示している。したがって、Fas を介するアポトーシス誘導の細胞内シグナル伝達系や Fas を介するアポトーシス誘導の感受性決定の分子機構を明らかにすることは、慢性関節リュウマチの発症機構を分子レベルで解明し、新たな治療法の開発につながるものと考えられる。昨年度、我々は Fas のシグナル伝達機構に深く関わる新規分子 FLASH の cDNA クローニングをなすとげ、FLASH が Fas の下流で caspase8 の活性化に必須の分子であることを示した。今年度は、FLASH に対する特異的モノクローナル抗体を調製して解析を行うと共に、FLASH が Fas を介するアポトーシスを負に制御する分子機構にも関与することを明らかにした。すなわち、Bcl-2 ファミリーに属するアデノウイルス E1B19K タンパク質が FLASH に作用することにより Fas を介するアポトーシスの誘導を阻害することが示唆された。また、線維芽細胞（3T3 細胞）を用いて、Ras/MAPK 経路の活性化が Fas を介するアポトーシス誘導シグナルを抑制することを示し、この活性が Fas の発現には影響を与えず、細胞内での caspase の活性化を抑制することによることを明らかにした。また、Ras/MAPK を活性化させる bFGF の処理によっても Fas 刺激に対する耐性が誘導されることを示した。これらの Fas を介するアポトーシスを阻害する機構が慢性関節リュウマチの発症機所に関わることを予想され、興味深い。

A. 研究目的

Fas は自己反応性免疫担当細胞が末梢で除去される時に機能する分子である。また、Fas は慢性関節リュウマチにおいて炎症にともなって増殖する滑膜細胞の除去にも関わっている。そして、Fas の機能不全は全身性の自己免疫疾患を発症することが知られている。これらの事実は、Fas システムが慢性関節リュウマチの発症を阻止しており、その働きの抑制が慢性関節リュウマチの発症と増悪に関与することを示している。従って、Fas を介するアポトーシス誘導の細胞内シグナル伝達経路や、Fas を介するアポトーシス誘導の感受性決定機構を明らかにすることが、慢性関節リュウマチの発症機構を分子レベルで解明し、新たな治療法の開発にもつながると考えられる。一方、Fas を介するアポトーシス誘導の

分子機構では、以下の点が明らかになっている。即ち、Fas が Fas リガンドやアゴニスティックな抗 Fas モノクローナル抗体で刺激されると、Fas の細胞内領域に FADD というアダプター分子が会合し、この複合体にさらに caspase8 が会合する。そして、caspase8 が活性化することにより、種々の caspase が活性化して、アポトーシスが実行される。我々は、Fas を介する刺激の感受性が決定される分子機構を解析する中で、caspase8 の活性化に関わる未知の分子が存在すると考え、caspase8 に結合する新たな分子（FLASH と命名）の cDNA クローニングを行った。そして FLASH を介して、Fas 誘導アポトーシスを阻害するタンパク質の作用機作を明らかにすることを目的とした。また、線維芽細胞を用いて、Fas を介するアポトーシスを抑制する分子を探索す

る中で、Ras/MAPK が強い抑制活性を有することを見いだしていた。今年度は、この機構の作用機作を解析すると共に、生理的的刺激で Ras/MAPK を活性化させることにより、Fas を介するアポトーシスが阻害できるかを解析した。これらの研究によって、自己反応性免疫担当細胞や滑膜細胞がアポトーシスを回避し、慢性関節リウマチが発症する分子機構を明らかにする新しい視点を提供することができた。

B & C. 研究方法と研究結果

FLASH に対するモノクローナル抗体を調製した。大腸菌でヒト FLASH のアミノ酸配列で 1242 番目から 1557 番目のペプチドを生産し、これを精製してモノクローナル抗体を作成する抗原とした。その結果、ヒト FLASH にもマウス FLASH にも特異的に反応するモノクローナル抗体を複数調製できた。これらのモノクローナル抗体を用いて、Fas を刺激した直後に形成される Death-Inducing Signaling Complex (DISC: Fas, FADD, caspase8 から構成されることが示されている)に FLASH が入っているか否かを解析した結果、DISC には分子量 220kDa の抗 FLASH モノクローナル抗体が認識できるタンパク質の存在することが明らかとなった。新たに作成した抗 FLASH モノクローナル抗体によっても、FLASH が caspase8 と共に DISC に入ることが示された。

アデノウイルス E1B19K タンパク質は Bel-2 ファミリーに属するとされているが、他の Bel-2 ファミリータンパク質と比較して Fas を介するアポトーシスを強く抑制することが報告されている。E1B19K は Fas・FADD や caspase-8 とは会合しないことが示されていたが、FLASH との会合を解析した結果、共免疫沈降解析と免疫組織染色の両方でその会合を示すことができた。また、E1B19K によって Fas を介するアポトーシスが抑制されている細胞に FLASH を強制発現させると、Fas に対する感受性が復活することも示すことができた。さらに、免疫染色実験によって、E1B19K は FLASH や caspase-8 をミトコンドリア外膜にトラップすることも示唆された。

我々は、これまで、Ras や MAPK の変異体を細胞

に一過性に導入発現させると Fas を介するアポトーシスが線維芽細胞で抑制されることを見いだしてきた。このような人為的な系(一過性の過剰発現系)を用いてきたが、より生理的な条件下で Ras を活性化させることを目的に、様々な増殖因子(EGF, IGF, basic FGF/bFGF)で線維芽細胞を刺激したところ、bFGF のみが Fas を介するアポトーシスの誘導を阻害することが明らかとなった。この bFGF の効果は、ドミナントネガティブの Ras や MAPK の活性を抑制する MKP-1 の発現によって阻害された。bFGF は、Ras/MAPK を活性化させることにより Fas を介するアポトーシス誘導を阻害することが示された。一方、この抑制活性を示さない EGF や IGF も Ras/MAPK を活性化するが、なぜ Fas を介するアポトーシス誘導を阻害しないかが問題である。そこで、MAPK (ERK1/2) の活性化(リン酸化)を各増殖因子で刺激した後に、時間を追って測定した。興味深いことに、EGF と IGF は MAPK の活性化が一過性であったのにも関わらず、bFGF は継続的に MAPK を活性化させることが分かった。これらの結果は、継続的な MAPK (ERK) の活性化によって、Fas 誘導アポトーシスが抑制されることを示唆するものである。

さらに、Ras/MAPK の活性化によって Fas を介するアポトーシスが抑制される分子機構についての解析を行った。最近、Ras/Akt 経路の活性化が Fas の発現を抑制することが報告された。このようなことが我々の系でも引き起こされているかを調べた結果、Ras/MAPK の活性化や Rasa/Akt の活性化では Fas の発現レベルは影響を受けないことが明らかとなった。我々の見いだした、Ras/MAPK の活性化による Fas 誘導アポトーシスの抑制は、Fas を介するアポトーシス誘導の細胞内シグナル伝達系を抑制するものであることを示すことができた。次に、既に知られている分子であり、細胞内で Fas 刺激による caspase-8 の活性化を抑制するという c-FLIP の発現レベルを解析した。我々の用いた細胞では、Ras の活性化の有無に関わらず、c-FLIP の発現は Western blotting 法と Northern blotting 法によっては検出できなかった。一方、これらの方法で FADD や caspase-8 は有意に検出された。FLIP の作用機作

は、FADD と caspase-8 の会合を拮抗的に阻害するものであり、このような発現レベルの c-FLIP では Fas を介するアポトーシスを抑制できないと考えられた。

D. 考察

FLASH が DISC の構成分子であることをモノクローナル抗体を用いて示すことができた。今後は、FLASH の N 末端領域（既知のタンパク質との相同性が認められない）の機能・FLASH と caspase-8 の複合体が Fas が刺激されると Fas の存在する細胞膜直下に移動する分子機構・免疫担当細胞のアポトーシス感受性決定機構と FLASH との関係・滑膜細胞の Fas を介するアポトーシス感受性決定機構と FLASH との関係等の問題を明らかにすることが重要な研究課題となると考えられる。

Ras/MAPK の活性化が Fas を介するアポトーシスを抑制した。正常滑膜細胞は Fas 刺激に非感受性であるが、関節リウマチにおける滑膜細胞が Fas 誘導アポトーシスに感受性であることが示されているが、このような感受性との関連が次の問題である。この MAPK の活性化による Fas 誘導アポトーシス抑制の分子機構をさらに明らかにすることが次の課題である。MAPK の活性化は、Fas の発現レベルに影響を与えず、また c-FLIP を介さずに Fas 誘導アポトーシスを抑制すると考えられる。したがって、この抑制の分子メカニズムは未知のメカニズムと考えられ、大変興味深い。

E. 結論

① Fas を介するアポトーシス誘導と caspase8 の活性化に必須の新規シグナル伝達分子 FLASH を発見し、クローニングにも成功した。また、FLASH に対する特異的モノクローナル抗体を作成して解析に用いた結果、FLASH が DISC の構成成分であることを示した。さらに、アデノウイルス E1B19K タンパク質が FLASH と caspase8 の複合体をミトコンドリアの外膜にトラップし、Fas 刺激時に Fas の細胞質領域と会合するための細胞内移動を阻止することを示した。Fas 刺激に非感受性となる新しい分

子機構を示した。

② Ras/MAPK の活性化が線維芽細胞で Fas を介するアポトーシス誘導シグナルを抑制することを明らかにした。また、bFGF によって Ras/MAPK を活性化しても Fas 誘導シグナルを阻害した。これらの事実は、Ras/MAPK 系が慢性関節リウマチにおける免疫担当細胞や滑膜細胞の Fas 誘導アポトーシスに対する感受性の変化を支配、あるいはこれに影響を与えていることを示唆していると予想され、興味深い。

F. 研究発表

1. 論文発表

Yuzuru Imai, Takaharu Kimura, Akira Murakami, Nobuyuki Yajima, Kazuhiro Sakamaki and Shin Yonehara. The CED-4-homologous protein FLASH is involved in Fas-mediated activation of caspase-8 during apoptosis. *Nature*, 398: 777-785, 1999.

Hirota Kazama and Shin Yonehara. Oncogenic K-Ras and basic FGF prevent Fas-mediated apoptosis in fibroblasts through activation of MAP kinase. *J. Cell Biol.*, 148: 557-566, 2000.

Shin Yonehara. Effects of anti-Fas antibodies on lymphocytes and other organs: Preparation of original and new monoclonal antibodies and amelioration of systemic autoimmune disease. *Intern. Rev. Immunol.*, 18: 329-345, 1999.

Yuko Inazawa and Shin Yonehara. Fas-induced *in vivo* apoptosis in bone marrow: Anti-Fas mAb-induced elimination and successive proliferation of Fas-expressing cells especially those of myeloid lineage. *Cell Struct. Funct.*, 24: 151-159, 1999.

Shin-ichi Tsukumo and Shin Yonehara. Requirement of cooperative functions of two repeated death effector domains in caspase-8 and in MC159 for induction and inhibition of apoptosis, respectively. *Genes Cells*, 4: 541-549, 1999.