

## アポトーシス誘導シグナルを伝達する 細胞表層 Fas 抗原の機能解析

### A study of molecular mechanism and physiological role of cell surface Fas antigen-mediated apoptosis

研究代表者 京都大学ウイルス研究所教授 米原 伸  
Professor, Institute for Virus Research, Kyoto University  
Shin Yonehara

Fas antigen (Fas/CD95) is a cell surface receptor protein that mediates apoptosis-inducing signals. To analyze the function of Fas *in vivo*, we examined the effects of agonistic anti-Fas antibodies in mice. The intraperitoneal administration of the hamster anti-mouse Fas mAb, RK-8 which induced apoptosis both *in vivo* and *in vitro*, did not kill adult mice, whereas those given the another hamster anti-mouse Fas mAb, Jo2, rapidly die of fulminant hepatitis with hemorrhage. Histological analyses of mice given RK-8 indicated severe damage of the thymus and moderate damage of the spleen and liver. At day 7 after administration, the thymus was atrophied. These *in vivo* effects of RK-8 were transient; the thymus was regenerated, and the liver and spleen were apparently normal one month after injection. Since Fas plays an important role in the elimination of activated and/or autoreactive peripheral T and B cells, we wondered what would be the impact of antibody-mediated elimination of Fas-bearing cells on the course of a systemic autoimmune disease. After receiving a single administration of the anti-mouse Fas mAb RK-8, MRL-*gld/gld* mice thoroughly recovered and/or prevented from glomerulonephritis, arthritis, sialadenitis, vasculitis, and lymphadenopathy. The serum level of autoantibodies were decreased after the administration. All the therapeutic effects of RK-8 persisted for over 6 months. These findings suggest that the systemic administration of agonistic anti-Fas mAb without fulminant hepatitis-inducing activity is a useful therapeutic strategy for treating systemic autoimmune disease.

In the ovary, apoptosis is thought to cause follicular atresia and luteolysis. We have investigated the involvement of Fas in these ovarian physiological events. Fas protein is expressed on granulosa and luteal cells but not on oocytes in the ovary. The injection of anti-Fas antibody RK-8 into adult mice enhanced follicular atresia and luteolysis. In consequence of the injection, decreased number of ovulated ova and decreased amounts of luteal cell-produced progesterone were observed. Further, mature ovaries from mouse mutants *lpr* (mutant of Fas) and *gld* (mutant of Fas ligand) showed histological abnormality in follicular development and luteolysis, respectively, as a result of a non-functional Fas/Fas ligand system. These results suggest that Fas plays an important role in follicular atresia and luteolysis in ovarian physiology of adult mice.

The Fas system has been extensively investigated as a model of apoptosis and caspase cascade was shown to be characteristic mechanism of signaling of apoptosis. We have identified and purified a kinase that was activated after the stimulation of Fas on human thymoma-derived HPB-ALL cells. Partial amino acid sequences of the purified kinase revealed this kinase as MST/Krs, yeast STE20 family of protein kinases. MST/Krs was activated by proteolytic cleavage and proteolytic activation was blocked by caspase inhibitor, Z-VAD-FK. A mutant MST with Asp → Asn replacement at a putative caspase cleavage site was resistant to either the proteolytic cleavage or the activation of kinase activity. These findings suggest that proteolytic activation is one activation mechanism of MST and may play some roles in apoptosis.

#### 研究目的

プログラム細胞死は、環境が悪くもないのに特定の細胞が生体内で死んでいくときに認められる細胞死であり、生体のホメオスタシスの維持には必要不可欠である。そして、プログラ

ム細胞死はアポトーシスという形態学的に定義された細胞死と一致することが多い。アポトーシス（プログラム細胞死）は発生・分化の過程ばかりでなく、癌からの生体防御・自己反応性免疫細胞の除去・臓器を構築する細胞の turnover

などにおいて重要な役割を担っている。またアポトーシスの異常が関与する疾患として、自己免疫疾患・痛・AIDS・免疫不全症・神経変性疾患・貧血・劇症肝炎等をあげることができる。このように生体のホメオスタシスの維持にはアポトーシスが重要であるにも関わらず、細胞死の分子レベルでの研究は行われてこなかった。その理由としては、アポトーシスを解析する系が確立されていなかったことがあげられる。私が発見し、研究してきたアポトーシスを媒介する細胞表面 Fas 抗原 (Fas) は、アポトーシスを研究する系を確立した点で重要であるばかりでなく、免疫系をはじめとして生体内で重要な機能を担っていることが示唆されている。そこで、(1)細胞表面レセプター分子 Fas の生理的役割と機能を明かにし、(2)Fas を介するアポトーシス誘導のメカニズムを分子レベルで明かにすることを目的とする。さらには、アポトーシスの異常が関与する上記疾患の病因解明と治療方法開発の基礎を築くことを目的とする。

## 研究経過

細胞死 (アポトーシス) の解析は従来あまり行われていなかったが、最近では広く行われるようになった。そして、その研究対象は細胞増殖のシグナルがアポトーシスを誘導する系と、アポトーシスを特異的に誘導する系に分類できる。前者は増殖シグナル制御の破綻がアポトーシスを誘導すると解釈できる。後者はその存在は明らかとなった状況である。後者の代表は我々が発見した Fas 抗原である。Fas はアポトーシス特異的誘導シグナルを伝達する細胞表面レセプター分子であり、Fas 遺伝子の異常が全身性の自己免疫疾患の原因となることが明らかとなった。我々は Fas のシステムのバイオニアとしてその解析を展開し、Fas のシステムがアポトーシス特異的誘導シグナルを伝達する系であり、医学生物学的に重要な意味を有することが明らかとなった。そして、現在では世界中の多くの研究者が Fas のシステムをその研究対象とするようになっていく。

## 研究成果

### 1. Fas の生理的役割と機能の解析

#### a. 抗 Fas mAb の *in vivo* 投与による機能的 Fas 発現細胞の解析

マウスにアポトーシス誘導能を有する抗 Fas mAb である Jo-2 を投与すると、マウスは劇症肝炎が発症し死亡するという報告がある。我々もマウスの Fas に対する mAb を多数調製したところ、Jo-2 のようにマウスを殺す活性を持たないものを調製できた。我々の調製したアポトーシス誘導能を有する抗 Fas mAb RK-8 をマウスに投与すると、adult マウスは死亡しない。投与マウスで、1日後には胸腺で多くの T 細胞にアポトーシスの引き起こされていることが認められ、投与後 1 週間では胸腺は痕跡を残すのみで退縮したが、1ヶ月後には胸腺は元通りに回復した。脾臓では、投与 1 日後から CD4 陽性 T 細胞が特異的に減少した。肝臓では、投与 1 日後で肝実質細胞の一部にアポトーシスが誘導されたが、1ヶ月後には回復した。一方、新生児マウスではほぼ全ての肝実質細胞が障害を受け、マウスも投与後 5 日で死亡した。新生児と adult マウスの肝実質細胞には Fas を介するアポトーシスに対する感受性に差のあることが明らかとなった。

#### b. 卵巣における Fas の発現と機能の解析

抗 Fas モノクローナル抗体 RK-8 投与雌マウスにおいて、卵巣の黄体細胞と卵胞の顆粒層細胞にアポトーシスが誘導された。その結果、抗体投与マウスでは黄体が消失した。この時、既に存在していた黄体の消失だけでなく、新たな黄体の形成も抑制された。そして黄体から生産される黄体ホルモンの血中濃度も低下していた。また顆粒層細胞にアポトーシスが誘導された結果、排卵される卵の数が激減した。そればかりでなく排卵された卵は周りに卵丘細胞 (顆粒層細胞に由来する) が付着していない異常な卵であった。我々は多数の抗マウス Fas モノクローナル抗体を調製したが、その中で RMF-9 と命名したモノクローナル抗体がパラホルムアルデヒドで固定した組織標本の免疫染色に使用で

きることを見いだした。そして、免疫組織学的検討を加えた結果、と黄体細胞卵胞と顆粒層細胞に Fas の発現が認められた。また、卵そのものには Fas の発現はなかった。

Fas の機能不全マウスである *lpr* マウスでは、妊娠や出産における異常は報告されていない。実際、約 10 週齢までのマウスは妊娠・出産が可能である。組織学的に解析しても 12 週齢までの *lpr* マウスの卵巣には異常が認められなかった。従って、12 週齢以下のマウス卵巣では、機能的 Fas の発現はあるが、その機能は本質的ではない。ところが、20 週齢を過ぎた *lpr* マウスの卵巣には異常が認められた。即ち、発育途中の二次卵胞の数が増加しているが、それ以後の発育卵胞の数は減少していた。加齢マウスでは、二次卵胞の卵胞閉鎖に Fas が本質的な関与をしている可能性が示された。

### c. 抗 Fas mAb 投与による自己免疫疾患の治療

Fas のシステムを用いて自己反応性の免疫担当細胞が処理されていると考えられている。そこで、自己免疫疾患のモデルマウスに抗 Fas mAb RK-8 を投与して自己反応性免疫細胞を除去すると、自己免疫疾患に対する治療効果が認められることを期待して実験を行った。用いたマウスは Fas リガンドの loss of function ミュータントである *gld* マウスで、MRL のバックグラウンドを有するものである。*gld* マウスでは特殊なリンパ細胞が異常増殖し、前癌状態ともいえる lympho-denopathy を発症する。また、MRL バックグラウンドに *gld* のミューテーションが合わさると、重症の全身性自己免疫疾患（糸球体腎炎、リウマチ様関節炎、唾液腺炎、血管炎等）を発症する。このマウスに抗 Fas mAb RK-8 を一回投与し、その効果を解析した。lympho-adenopathy や全身性の自己免疫疾患の発症が確認された 13 週齢のマウスに RK-8 を一回だけ投与し、投与 8 週間後の 21 週齢で解析を行った。コントロールの RK-8 非投与マウスでは lympho-adenopathy だけでなく、糸球体腎炎・唾液腺炎・関節における滑膜炎・動脈炎（腎臓・

肺など）などの自己免疫疾患が認められた。一方、RK-8 投与マウスでは、lympho-adenopathy によるリンパ節の腫脹はほとんど無くなっていた。そればかりでなく、全ての自己免疫疾患の症状が著しく改善されていることが明らかとなった。自己免疫疾患の症状を著しく改善したのは、抗 Fas mAb が自己に反応する慢性的に活性化している T 細胞（B 細胞も）にアポトーシスを引き起こしたためと考えられる。一回の投与で自己免疫疾患の著しい改善が認められたのは驚くべき効果である。また、この効果が投与半年後も保たれた。この事実は自己反応性の T 細胞が駆除されたことを示唆しており、興味深い。また、関節の滑膜炎に最も顕著な治癒効果があったが、これは活性化 T 細胞の除去だけでなく、異常に増殖する滑膜細胞にもアポトーシスを引き起こしたためと考えられる。

### 2. Fas を介するアポトーシス誘導シグナルの解析

Fas を介するアポトーシス誘導シグナルでは、Caspase と呼ばれる一群のプロテアーゼが重要な働きをすることが明らかとなっている。そして、どのようにして Fas を刺激すると Caspase が活性化されるのか、Caspase が活性化された後にどのようなタンパク質が切断されてアポトーシスが実行されるのかが重要な問題となっている。そこで、Caspase の活性化機構と Caspase の基質の同定を試みてきている。ここでは、紙面の余裕もないので、我々が最近明らかにした、Caspase によって活性化されるプロテインキナーゼ Mst について報告する。

ヒト胸腺腫由来細胞株 HPB-ALL を用いて、Fas を刺激後活性化されるプロテインキナーゼを、時間を追って、色々な基質タンパク質を用いたゲル内リン酸化法で解析した。その結果、ヒストンと MBP を共通の基質とする分子量 34kd のキナーゼが、刺激 60 分後から検出でき、刺激後 120 分で最大に活性化された。このキナーゼ活性は Jurkat、や KB 等のヒト細胞株やマウス 3T3 細胞においてもアポトーシスを誘導した

ときに認められた。このキナーゼの活性化は Caspase の阻害剤である ZVAD-FK や DEVD-CIHO によって抑制されたので、このキナーゼは caspase カスケードの下流で活性化されると考えられた。

つぎにこのキナーゼの精製を行った。そして、得られた精製タンパク質の部分アミノ酸配列からこのキナーゼが Mst という名前で報告されている Ste20 ファミリーのキナーゼであることが明らかとなった。Mst は 487 個のアミノ酸からなるタンパク質であるが、我々が見だし精製したキナーゼは分子量 34kd であり、分子量が異なっていた。さらに構造を検討した結果、Mst の C 末端側に Caspase によって切断可能な DEMD↓S という配列が存在していた。次に、FLAG タグで標識した全長の DARK cDNA を発現させた細胞の Fas を刺激してアポトーシスを誘導した。その結果、アポトーシス誘導時のみにタグの抗体で認識される分子量 34kd のキナーゼが認められた。また、上記の DEMDS というアミノ酸配列を DEMNS と変化させたミュータント分子を発現させたところ、34kd のキナーゼ活性は出現しなかった。このキナーゼ活性が、アポトーシスの実行にどのように関わるかを現在解析中である。

#### 今後の課題と発展

抗マウス Fas mAb をマウスに投与することによって、生体内で機能的 Fas を発現する細胞を同定し、あらたに卵巣における Fas 機能を明らかにした。今後は、個体発生の課程などにおいて、機能的 Fas を発現する細胞等について解析を加えたい。また、抗 Fas mAb の投与によって、全身性の自己免疫疾患が治癒することを明らかにした。今後の応用に結びつく重要な発見であると考えられる。しかし、肝毒性のない抗ヒト Fas mAb を調製して、用いることが今後の重要な課題である。マウスの Fas にもヒトの Fas にも反応する抗 Fas mAb で、肝毒性が検出されずに T 細胞にアポトーシスを誘導するものを調製することを試み、興味深いものを得ているので、

今後の発展に期待したい。

Mst というプロテインキナーゼがアポトーシスの実行時に活性化することを見いだした。このキナーゼ活性がアポトーシスの実行にどのように関わるかを明らかにすることが急務であると考えている。最近、Mst と同じ Ste20 ファミリーのキナーゼである Pak-2 が Caspase の下流で機能することを示唆する報告がなされた。Mst や Pak-2 までの Caspase の下流で活性化される分子は、アポトーシスとは直接関係しない本来の機能を有することも予想されるので、これらの本来の機能やアポトーシス実行時における機能を明らかにし、細胞の生と死の調節機構を明らかにしていくことは重要な課題であると考えている。

#### 発表論文リスト

1. Yoshiko Nishimura, Ai Ishii, Yuko Kobayashi, Yoshiki Yamasaki, and Shin Yonehara. Expression and function of mouse Fas antigen on immature and mature T cells. *J. Immunol.* 154: 4395-4403, 1995.
2. Yoshiko Nishimura, Ai Ishii, and Shin Yonehara. Expression and function of apoptosis antigen Fas on T lymphocytes in periphery and thymus. *Leucocyte Typing V: White Cell Differentiation Antigens*. S.F. Schlossman, L. Boumsell, W. Gilks *et al.*, ed. pp1144-1148, Oxford University Press, Oxford, 1995.
3. Yoshiko Nishimura, Yoko Hirabayashi, Yumi Matsuzaki, Philippe Musette, Ai Ishii, Hiromitsu Nakauchi, Tohru Inoue, and Shin Yonehara. *In vivo* analysis of Fas antigen-mediated apoptosis: effects of agonistic anti-mouse Fas mAb on thymus, spleen and liver. *Int. Immunol.*, 9: 307-316, 1997.
4. Kazuhiro Sakamaki, Hisahiro Yoshida, Yoshiko Nishimura, Shin-ichi Nishikawa, Noboru Manabe, and Shin Yonehara. Involvement of Fas antigen in ovarian follicular atresia and luteolysis. *Mol. Rep. Dev.*, 47: 11-18, 1997.
5. Shuji Kishi, Shinobu Saijo, Masaaki Arai, Shigeru Karasawa, Susumu Ueda, Mari Kannagi, Yoichiro Iwakura, Masahiro Fujii, and Shin Yonehara. Resistance to Fas-mediated apoptosis of peripheral T-cells in HTLV-1 transgenic mice with autoimmune arthropathy. *J. Exp. Med.*, 186: 57-64, 1997.
6. Yoshiko Nishimura-Morita, Masata Nose, Tohru Inoue, and Shin Yonehara. Amelioration of systemic autoimmune disease by the stimulation of apoptosis-promoting receptor Fas with anti-Fas monoclonal antibody. *Int. Immunol.* in press.