

# ウルソデオキシコール酸の T cell-mediated target apoptosis に及ぼす影響

奈良県立医科大学第3内科学教室

川本 博

## EFFECTS OF URSODEOXYCHOLIC ACID ON T CELL-MEDIATED TARGET APOPTOSIS

HIROSHI KAWAMOTO

*Third Department of Internal Medicine, Nara Medical University*

Received October 14, 1998

*Abstract*: The effectiveness of UDCA has been proven in the treatment of not only primary biliary cirrhosis but also chronic viral hepatitis, in which the apoptotic death of hepatocytes induced by cytotoxic T lymphocytes (CTLs) is suggested to be involved. To elucidate immunologically why UDCA is effective, we investigated the effects of UDCA on T cell-mediated apoptosis of target cells using a Fas-expressing murine B lymphoma line as targets/antigen presenting cells (APCs) and a murine CD 4<sup>+</sup>-T cell hybridoma line with a defined antigen specificity as effector T cells. The B lymphoma cell line, A 20-HL, expresses MHC class II antigen and is capable of acting as antigen presenting cells (APCs), and the T hybridoma line, 3 DO 54.8, is known to exhibit strong cytotoxicity against APCs after specific antigen stimulation with chicken ovalbumin (OVA). We used a synthetic OVA-oligopeptide, identical to the antigenic determinant for the OVA-specific T cells, as an antigen instead of the native OVA protein to exclude the influence of UDCA on APC function. The T cell-mediated cytotoxicity against APCs was investigated by conventional <sup>51</sup>Cr release assay and DNA fragmentation assay. DNA fragmentation of APCs/target cells was observed after a 1-2 h incubation period prior to the specific <sup>51</sup>Cr release. FasL-mRNA in the effector cells was detected as early as 30 min after cocultivation with APCs in the presence of OVA-peptide. UDCA suppressed the <sup>51</sup>Cr release from target cells and also inhibited DNA fragmentation of target cells in a UDCA-dose dependent manner. In addition, mRNA synthesis of FasL in the effector T cells was suppressed by UDCA, although MHC class II or Fas expression was not. Our study demonstrates that UDCA suppresses antigen-specific CD 4<sup>+</sup>-T cell-mediated target apoptosis by inhibiting the induction of FasL. (奈医誌. J. Nara Med. Ass. 49, 442~452, 1998)

**Key words**: ursodeoxycholic acid, apoptosis, T cell-mediated cytotoxicity, Fas, Fas-legand

### はじめに

ジハイドロキシ胆汁酸であるウルソデオキシコール酸

(UDCA)が原発性胆汁性肝硬変(PBC)に有効であることが近年注目を浴び、現在ではその有用性は二重盲検試験によりほぼ確立されてきている<sup>1-5)</sup>。さらに、自己免疫

性肝炎やC型慢性肝炎に対しても UDCA の臨床的有用性が報告されている<sup>6-12)</sup>。最近、これらの疾患では、炎症性細胞浸潤の強い肝組織部位に一致してアポトーシス誘導関連抗原である Fas 抗原の発現が免疫組織化学的に証明され<sup>13,14)</sup>、また、C型慢性肝炎患者の肝浸潤リンパ球に Fas リガンド(FasL)の mRNA 発現が認められた<sup>15)</sup> ことから、これら肝疾患の肝障害機序として細胞障害性 T 細胞(CTL)による肝細胞のアポトーシス誘導が注目されている。

教室の吉川らは、UDCA がこれらの肝疾患に有効である機序のひとつに免疫調節作用があることを提唱し、これまでに、UDCA が免疫グロブリン産生やインターロイキン(IL)-2, IL-4, IFN- $\gamma$  などのサイトカイン産生抑制作用を有すること<sup>16-18)</sup>、さらに、モノクローナルな細胞群による抗原提示アッセイを用いて UDCA の抗原提示に及ぼす影響を追求する中で、UDCA は抗原提示細胞(APC)の抗原捕獲やそのプロセッシングなどの APC 機能に影響するのではなく、T細胞の活性化そのものを抑制する可能性が高いこと<sup>19)</sup>を報告してきた。この抗原提示アッセイに使用した CD 4 陽性 T 細胞株が APC と特異抗原存在下に培養すると IL-2 を産生すること、また APC に対して細胞障害活性を有することも確認している。

今回、著者は、本アッセイに APC として使用した B リンパ細胞腫株が constitutive に Fas 抗原を発現していることを見出し、また一般に、CD 4 陽性 CTL の主たる細胞障害機序は標的細胞に対するアポトーシス誘導である<sup>20-22)</sup> ことから、本アッセイ系を用いて、抗原特異的 T 細胞の APC に対するアポトーシス誘導に及ぼす UDCA の影響について検討した。

## 実験方法

### 1. UDCA

UDCA としては、UDCA-Na(東京田辺製薬社製)を用い、最終濃度を 0, 0.01, 0.05, 0.1 mmol/L(mM)に調整して使用した。使用した UDCA は、ガスクロマトグラフィにて純度 99%以上であることが確認されている。

### 2. 細胞および抗原

抗原提示細胞兼標的細胞(APC/target)として Fas 抗原陽性の BALB/c マウス由来 B リンパ腫細胞株 A 20-HL<sup>23)</sup>、T細胞として鶏卵白アルブミン(OVA)に特異的で細胞障害活性を有する Th 1 型 CD 4 陽性マウス T 細胞株 3 DO 54.8(I-A<sup>d</sup> 拘束性)<sup>23,24)</sup> を使用した。抗原としては、T細胞に認識される OVA 分子の 323 番から 339 番の 17 個のアミノ酸を人工合成して、OVA ペプチドと

し、最終濃度 2  $\mu$ g/ml で使用した。この OVA ペプチドが、APC による抗原の取り込みやプロセッシングを受けずに 3 DO 54.8 細胞を活性化し IL-2 産生や細胞障害活性を誘導し得ることはすでに知られている<sup>24,25)</sup>。なお、紫外域波長 274 nm の吸光度測定によるペプチドの検出を容易にするため、OVA ペプチドの C 末端に Tyr を付加した。この際、Tyr の付加によりペプチドの抗原性が影響を受けないことは既に確認されている<sup>26)</sup>。

### 3. T細胞の細胞障害活性の評価

A 20-HL に対する 3 DO 54.8 の細胞障害活性は、<sup>51</sup>Cr release 法および断片化 DNA 検出により検討した。

#### (1) <sup>51</sup>Cr release 法

A 20-HL を 100 kBq の Na<sub>2</sub>CrO<sub>4</sub>(1 MBp/ml, Amersham)で 37°C 1 時間標識し、RPMI 1640 培養液にて 3 回洗浄の後使用した。丸底 96 穴マイクロプレート上で、10%牛胎児血清(FCS)含有 RPMI 1640 培養液 200  $\mu$ l に混和した、<sup>51</sup>Cr 標識 A 20-HL 1 $\times$ 10<sup>5</sup> 個を OVA 抗原および T 細胞 5 $\times$ 10<sup>4</sup> 個と共に、UDCA の存在下あるいは非存在下で 16 時間培養した後、培養上清 100  $\mu$ l を採取し  $\gamma$ -シンチレーションカウンターで上清中の放射活性を測定した。% cytotoxicity は、次式により計算した。

$$\% \text{ cytotoxicity} = \{(a-b)/(c-b)\} \times 100$$

ただし a : 実験群遊離放射活性

b : 自然遊離放射活性

c : 最大遊離放射活性

なお、自然遊離活性は <sup>51</sup>Cr 標識細胞浮遊液 100  $\mu$ l に 100  $\mu$ l の培養液を加えて、また最大遊離放射活性は <sup>51</sup>Cr 標識細胞浮遊液 100  $\mu$ l に 1% Triton X-100 を 100  $\mu$ l 加えて測定した。

#### (2) 断片化 DNA 検出

24 穴培養プレート 1 穴あたり、A 20-HL 細胞 1 $\times$ 10<sup>6</sup> 個および T 細胞 5 $\times$ 10<sup>5</sup> 個を、OVA ペプチド(2  $\mu$ g/ml)とともに、10% FCS 含有 RPMI 1640 培養液 2 ml に混和し、UDCA の存在下または非存在下にて培養した。培養 0, 1, 2, 4, 8 時間後に細胞を回収し、冷 phosphate buffered saline(PBS)にて 2 回洗浄した後、細胞ペレットに、0.1 M Tris-HCl(pH 7.5), 10 mM EDTA, 0.2% Triton X-100 から成る冷 lysing buffer 600  $\mu$ l を加え、氷上にて 10 分静置した。4°C で 10 分間 15000 xg の遠心を加えた後、上清を回収し、フェノール処理、フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール処理し、水相約 400  $\mu$ l に 4 M NaCl 20  $\mu$ l, 3 M Na-acetate 40  $\mu$ l, ethanol 800  $\mu$ l を加え、-20°C にて 8 時間静置した。遠心の後、pellet を 70% ethanol にて洗浄し、乾燥させた

後, 20  $\mu$ l の TE 液(10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA)に溶解した. 20  $\mu$ g の RNAase を加え, 37°C にて 30 分処理の後, 40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA(pH 8.0)溶液にて 2% アガロースを用い, 電気泳動した. 泳動後, 0.5  $\mu$ g/ml ethidium bromide 液にて処理し, UV 光下にて観察した.

#### 4. フローサイトメトリー解析

A 20-HL 細胞が細胞表面に Fas 抗原を表出していることを確認するためラット抗マウス Fas 抗体(RMF 2, 医学生物学研究所, 名古屋)を用いて, フローサイトメトリー解析を行った. すなわち, A 20-HL 細胞  $1 \times 10^5$  個に RMF 2 抗体 20  $\mu$ l を加え, よく攪拌し, 氷上にて 15 分間静置した. 冷 PBS にて 3 回洗浄後, FITC 標識ヤギ抗ラット IgG(Cedarlane Lab. Ltd., Canada)にて処理し試料とした.

また, MHC class II (I-A<sup>d</sup>) 抗原のフローサイトメトリー解析には, ビオチン結合抗 I-A<sup>d</sup> 抗体 MKD-6<sup>22</sup> および fluorescein 結合アビジンを用いた.

#### 5. Fas および FasL の RNA メッセージの確認

##### (1) RNA 採取

24 穴培養プレート 1 穴あたり, A 20-HL  $1 \times 10^5$  個および T 細胞  $5 \times 10^5$  個を, OVA 抗原ペプチド(2  $\mu$ g/ml)とともに 10% FCS を含む RPMI 1640 培養液 2 ml 中にて UDCA の存在または非存在下にて培養し, 培養 0 分, 30 分, 45 分, 1 時間, 2 時間, 4 時間, 8 時間後に細胞を回収した. TRIzol(ライフテックオリエンタル社, 東京)1 ml を加え, 室温にて 5 分間静置の後, 0.2 ml のクロロホルムを加え攪拌し, さらに室温 3 分間静置の後, 4°C にて 12000 xg で 5 分遠心した. 水相約 600  $\mu$ l を回収し, イソプロパノール 500  $\mu$ l を混合, 室温 10 分間静置の後, 4°C 12000 xg で 5 分遠心して RNA pellet を得た. 70% ethanol にて洗浄し, 自然乾燥の後, RNAase を含まない H<sub>2</sub>O 10  $\mu$ l に溶解した.

##### (2) cDNA 作成

RNA 試料 3  $\mu$ l, RNase 1  $\mu$ l, 75 pmol ランダムプライマー 2  $\mu$ l, Moloney マウス白血病ウイルス由来 reverse

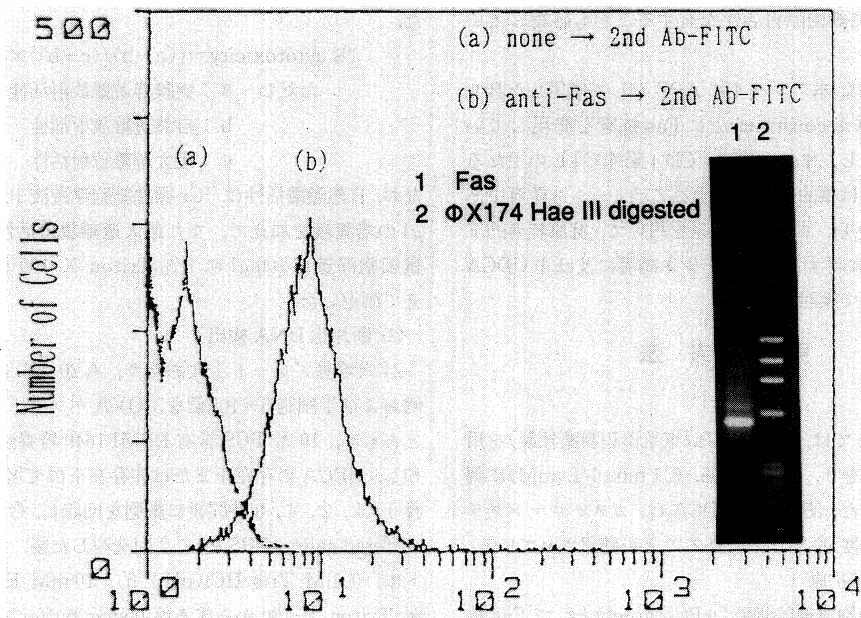


Fig. 1. Fas expression of A20-HL cells.

Fas expression on the surface of A20-HL cells was detected by flow microfluorimetric analysis. The cells were incubated with fluorescein-conjugated goat anti-rat IgG directly or after the treatment with rat anti-mouse Fas antibody, MRF2. Fas-mRNA was confirmed using RT-PCR technique and a primer set specific for murine Fas.

transcriptase(Toyobo Co., Ltd.)2  $\mu$ l, 5 $\times$ buffer 液 6  $\mu$ l, 2 mMdNTP 液 4  $\mu$ l, H<sub>2</sub>O 12  $\mu$ l を 37 $^{\circ}$ C で 30 分反応させ cDNA を作成した。

(3) PCR

マウス Fas および FasL 特異的プライマーセットを最近の報告<sup>27,28)</sup> の如くそれぞれ作成した。すなわち、マウス Fas プライマーセットは、5'ATCCGAGCTCT-GAGGAGGCGGGTTCATGAAAC と 5'GGAGGTTCTAGATTCAGGGTCATCCTG, マウス FasL プライマーセットは、5'GAGAAGGAAACCCTTTCCTG と 5'ATATTCCTGGTGGCCATGAT である。cDNA を鋳型とし、リコンビナント Taq DNA polymerase (Toyobo Co., Ltd.)を使用し、Fas および FasL いずれも、94 $^{\circ}$ C 1分, 60 $^{\circ}$ C 2分, 72 $^{\circ}$ C 2分を 1 サイクルとし、40 サイクルの PCR 増幅を行った。Fas および FasL の特異的プライマーセットを用いた際の期待される PCR 産物のサイズは、それぞれ 533 bp, 596 bp である。マウス  $\beta$  アクチンプライマーセットとしては、5'ATGGATGACGATATCGCT および 5'ATGAGGTAGTCTGT-CAGGT を使用した。PCR 条件は上述に同じである。

(4) Dot blot analysis

RNA 5  $\mu$ g をナイロン膜(Hybond-N<sup>+</sup>, Amersham Life Science)に紫外線にて固定した。ECL probe-amp kit(Amersham Life science RPN 3020)を用いて、fluorescein-11-dUTP を取り込ませた fluorescein ラベルした PCR 産物をプローブとして作成し、ペルオキシダーゼを結合した抗 fluorescein 抗体およびルミノール基質を用いて解析した。

成 績

1. Fas 発現

A 20-HL 細胞表面の Fas 抗原表出はフローサイトメトリーにて、Fas-mRNA 発現は RT-PCR にて確認した(図 1)。A 20-HL 細胞をラット抗マウス Fas 抗体 RF 2 で処理し、さらに FITC 標識ヤギ抗ラット IgG 抗体で処理した後、フローサイトメトリーを行うと図 1(b)のごとく分布曲線が右方にシフトし、Fas 表出が認められた。また、マウス Fas 特異的プライマーを用いた RT-PCR にて、期待されるサイズ 533 bp の PCR 増幅産物が確認され Fas-mRNA の発現が確認された。

2. FasL 発現

次に、OVA ペプチド存在下に 3DO 54.8 細胞と A 20-HL 細胞を共培養して、FasL の mRNA 発現を RT-PCR にて検討したところ(図 2)、期待されるサイズ 596 bp の PCR 増幅産物は共培養開始時には認められなかつ

たが、培養開始 30 分以後には検出可能となった。なお、図には示さないが、OVA ペプチド抗原非存在下に T 細胞と APC を培養しても、あるいは APC 非存在下に T 細胞と抗原を培養しても FasL-mRNA の発現はみとめなかった。

3. 3DO 54.8 細胞の A 20-HL 細胞に対する細胞障害に

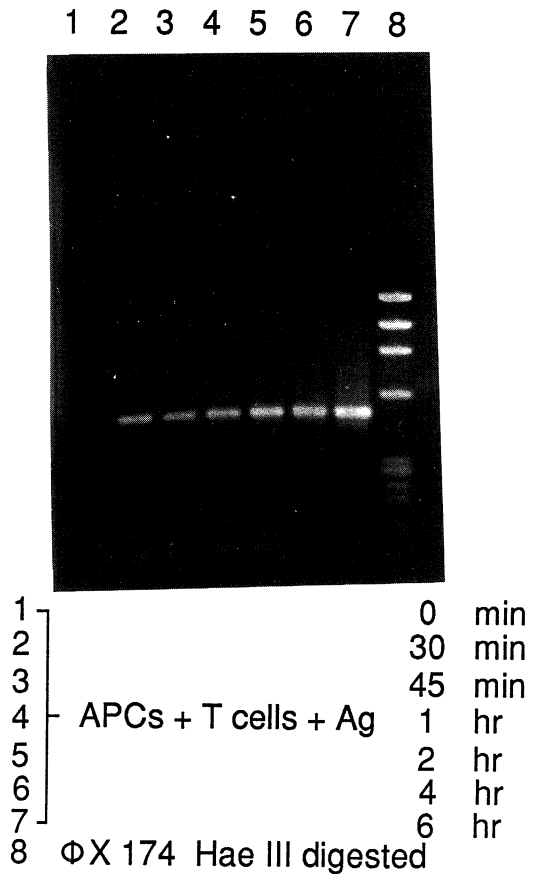


Fig. 2. Expression of FasL-mRNA.

A20-HL cells ( $1 \times 10^6$ ) and 3DO54.8 cells ( $5 \times 10^5$ ) were incubated in 2.0 ml of RPMI1640 medium in a 24-well culture plate for the indicated periods (0, 30, 45 min, 1, 2, 4, 6hr) in the presence of OVA-peptide. After RNA extraction and reverse transcription, Fas-L mRNA was detected by PCR using a primer set specific for murine FasL.

## 及ぼす UDCA の影響

$^{51}\text{Cr}$  標識した A 20-HL 及び 3 DO 54.8 細胞を UDCA の存在下あるいは非存在下に OVA ペプチド抗原とともに共培養し経時的に  $^{51}\text{Cr}$  遊出を観察したところ(図 3), 培養 8 時間目以降に有意な遊出が認められた。この際, この  $^{51}\text{Cr}$  遊出に対し, UDCA は 0.01 mM の濃度では影響を与えなかったが, 0.05 および 0.1 mM では濃度依存性の抑制効果を示した。

FasL-mRNA 発現は, 3 DO 54.8 T 細胞と A 20-HL 細胞の共培養早期より認めたことから, 有意な  $^{51}\text{Cr}$  遊出を認めなかった培養早期, すなわち, 培養開始 1, 2, 4 時間後の細胞より DNA を抽出し電気泳動を行ったところ(図 4 左), 培養 2 時間後に既に DNA 断片化が観察され, 4 時間後には鮮明となった。そこで, UDCA を最終濃度 0.05 mM および 0.1 mM になるように添加して

共培養 8 時間後に DNA を抽出し電気泳動を行うと(図 4 右), UDCA 非添加時に比して DNA 断片化の抑制が認められた。

## 4. UDCA の A 20-HL 細胞の MHC class II 抗原および Fas 抗原発現に及ぼす影響

A 20-HL 細胞を 0.1 mM の UDCA 存在下に 24 時間培養し MHC class II 抗原の表出量をフローサイトメトリーにて検討したところ, I-A<sup>d</sup> 表出量は UDCA 処置にて影響を受けなかった(図 5 左)。一方, Fas 表出量は 8 時間処理では, その表出量に変化を認めなかったが, 24 時間処理後にはわずかに減少した(図 5 右)。

## 5. UDCA の FasL-mRNA 発現に及ぼす影響

A 20-HL  $1 \times 10^6$  個および T 細胞  $5 \times 10^5$  個を OVA ペプチドとともに UDCA の存在下または非存在下に培養し, 培養 0, 1, 2, 4 時間後に細胞を回収し RNA を

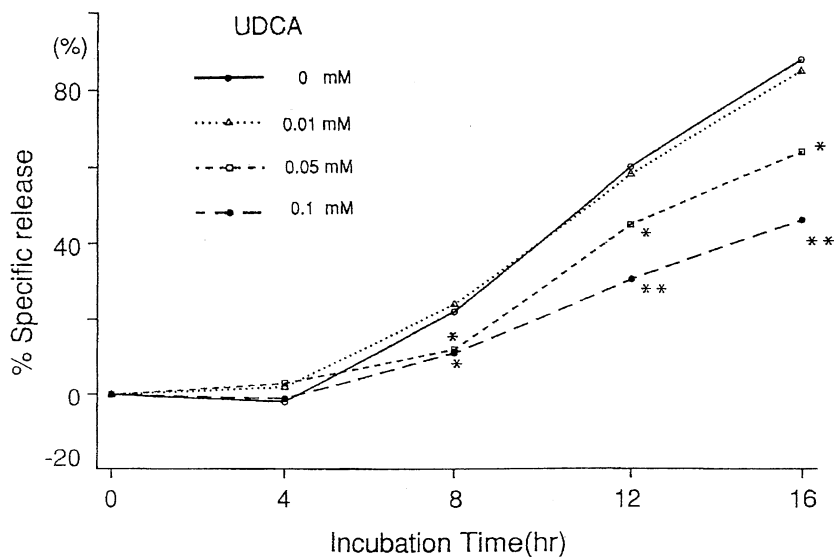


Fig. 3. Effects of UDCA on kinetics of T cell-mediated cytotoxicity.

3DO54.8 cells and  $^{51}\text{Cr}$ -labeled A20-HL cells were cocultured for the indicated periods with OVA-peptide in the presence of UDCA at concentrations of 0 mM (—○—), 0.01 mM (···△···), 0.05 mM (---□---) and 0.1 mM (—●—). Spontaneous  $^{51}\text{Cr}$  release was less than 40.9%. All determinations were made in triplicate and each point represents the mean. SD of each point was less than 10.8%. Specific  $^{51}\text{Cr}$  release of cultures containing UDCA was compared with that of cultures without UDCA at individual incubation times.

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$

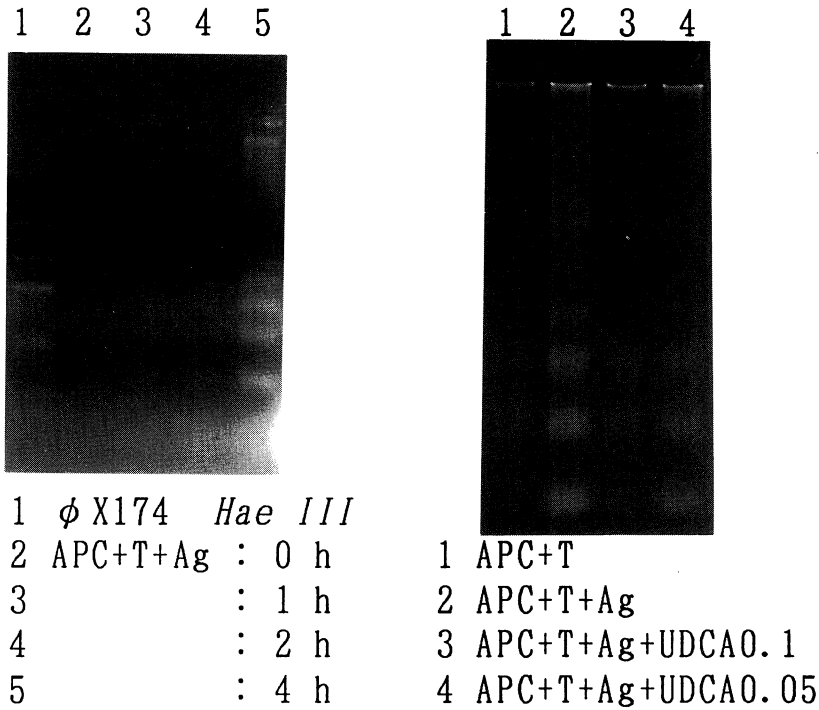


Fig. 4. DNA fragmentation by T cells and its suppression by UDCA.

Left : A20-HL cells and 3DO54.8 cells were cocultured with OVA-peptide in the absence of UDCA. Cells in the cultures were collected after 0h (lane 2), 1h (lane 3), 2h (lane 4) and 4h (lane 5) incubation periods and used for the detection of fragmented DNA. Hae III digested  $\phi$ ×174 DNA fragments were used as molecular markers (lane 1).

Right : A20-HL cells and 3DO54.8 cells were cocultured alone (lane 1) or with OVA-peptide in the presence of UDCA at concentrations of 0 mM (lane 2), 0.1 mM (lane 3) and 0.05 mM (lane 4) for 8hr. Cells in the cultures were used as samples for examining DNA fragmentation.

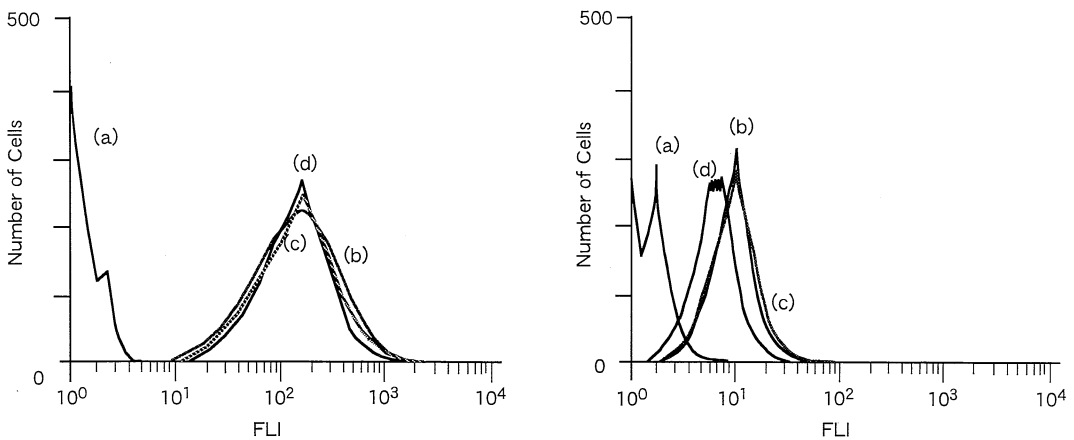


Fig. 5. Flow microfluorimetric analysis of MHC classII (I-A<sup>d</sup>) antigen and Fas antigen.

A20-HL cells were cultured in the presence of 0.1 mM of UDCA. After 8h- or 24h-incubation, I-A<sup>d</sup> and Fas expression was examined by flow microfluorimetry. a : unstained, b, c, d : stained at 0, 8 and 24h incubation time, respectively.

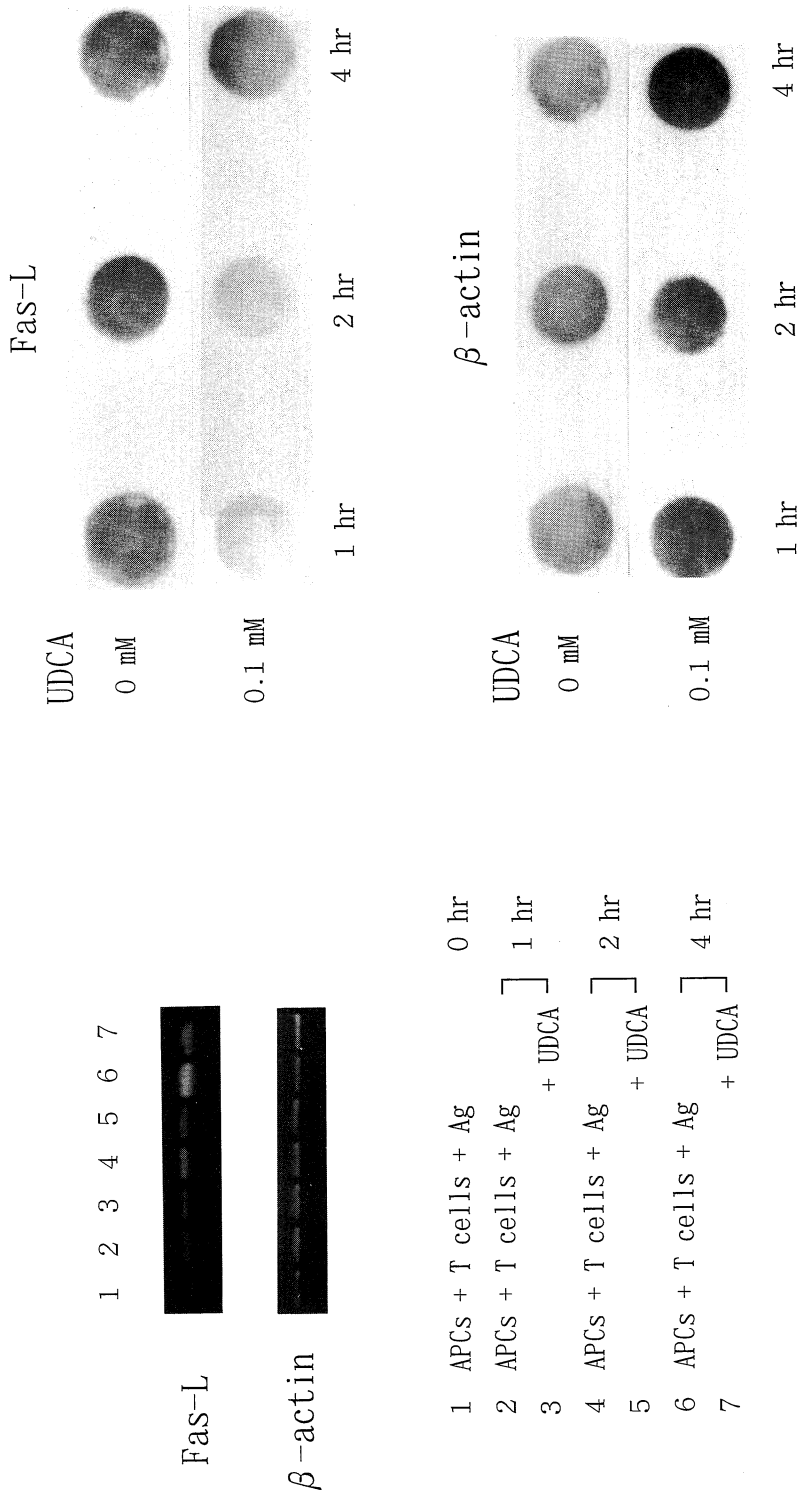


Fig. 6. Effect of UDCA on FasL-mRNA expression.

Left: A20-HL cells ( $1 \times 10^6$ ) and 3DO54.8 cells ( $5 \times 10^5$ ) were incubated with OVA-peptide in 2.0 ml of RPMI medium in a 24-well culture plate for the indicated periods (0, 1, 2, 4hr) in the presence or absence of UDCA. After RNA extraction and reverse transcription, Fas-L mRNA was detected using PCR and a primer set specific for murine FasL.

Right: RNA (5  $\mu$ g) were extracted from the cultured cells and fixed on a nylon membrane. The probes specific for murine FasL and  $\beta$ -actin were generated using PCR and were labelled with fluorescein by incorporating fluorescein-dUTP. Following hybridization, the membrane was treated by anti-fluorescein antibody conjugated with horseradish peroxidase. Signal of the blot was detected by enhanced chemiluminescence. The same membrane was used for signal detection of FasL and  $\beta$ -actin.

抽出し、マウス FasL 特異的プライマーセットを用い RT-PCR を施行した(図 6 左)。培養開始直後には、FasL-mRNA 発現は RT-PCR 法にても検出されず、培養 1 時間後では PCR 産物量に明らかな差は認めなかった。しかし、培養 2, 4 時間後では、UDCA 添加にて FasL-PCR 産物量の減少が観察された。

次に、培養 1, 2, 4 時間後の RNA を抽出し Fluorescein 標識プローブを用いて dot blot 解析した(図 6 右)。β-actin メッセージは幾分 UDCA 添加群に強かったが、FasL メッセージは明らかに UDCA 添加により抑制されていた。

## 考 察

UDCA が PBC の治療薬として有用であることはよく知られ、ここ数年間に報告されたいくつかの二重盲検臨床試験の成績からも明らかとなっている<sup>1-5)</sup>。一方、ウイルス慢性肝炎に対する UDCA の有効性についても、古くは 1976 年の山中らにより報告<sup>7)</sup>があり、その後一時研究が途絶えていたが、C 型慢性肝炎に対する IFN 療法の限界が明らかになった今日、その有用性が再び見直されている<sup>8-12)</sup>。これらの肝疾患では、その肝障害機序として細胞障害性 T 細胞(CTL)による肝細胞障害が考えられてきた。すなわち肝細胞、樹状細胞、マクロファージなどの抗原提示細胞(APC)の情報をもとに、活性化した CTL が target である肝細胞を傷害するという機序が考えられてきた。

ところで、リンパ球の細胞障害様式にはふたつの機構のあることがパーフォリン欠損マウスの研究などから明らかとなっている。すなわち、パーフォリン依存性機構および Fas 依存性機構である<sup>20,21)</sup>。CD 8 陽性 CTL はこの両機構により、NK 細胞はパーフォリン依存性機構により、また CD 4 陽性 CTL は主に Fas(-FasL)依存性機構により細胞障害活性を発揮すると考えられている。自己免疫性肝疾患や慢性ウイルス性肝炎患者の肝組織に Fas 抗原の発現が証明され<sup>13,14)</sup>、さらに、C 型慢性肝炎患者の肝浸潤リンパ球に FasL 発現が認められたこと<sup>15)</sup>は、これら肝疾患の肝障害機序の少なくとも一部に Fas-FasL 依存性のアポトーシス機構が関与していることを示唆している。

肝細胞の MHC 分子は、MHC クラス I は表出しているがクラス II は発現しておらず、慢性ウイルス性肝炎患者や自己免疫性肝疾患における肝細胞障害性 T 細胞は主に CD 8 陽性 T 細胞である。したがって、これら肝疾患の肝細胞障害の機序を検討するには、CD 8 陽性 T 細胞を effector とし、MHC クラス I 分子表出細胞を target に用

いる必要があると考えられる。しかし、本研究では、T 細胞による Fas 陽性 target のアポトーシスに及ぼす UDCA の影響を目的としている。

そこで、本研究では、Fas 抗原陽性細胞株を APC/target とし、effector としては、APC および特異抗原刺激により細胞障害活性を獲得する CD 4 陽性 T 細胞株を用い、アポトーシス誘導に対する UDCA の影響を検討した。このアッセイの schema を図 7 下段に、上段には Fas-Fas リガンドを介するアポトーシスの schema を示す。すなわち、T 細胞 3 DO 54.8 は、TCR を介して、APC (A 20-HL)の MHC クラス II I-A<sup>d</sup> 分子に結合した OVA ペプチド抗原を認識して活性化され、FasL 発現が導かれ、FasL-Fas interaction により、APC に death signal が伝えられる。

まず、本アッセイで観察される細胞障害が Fas-FasL 依存性アポトーシスであるかという点であるが、programmed cell death のひとつの特徴的所見である DNA 断片化が観察されたこと、APC には Fas 表出、さらに、特異抗原存在下で APC との共培養にて T 細胞に FasL mRNA の検出を認めたことから、この系の細胞障害は Fas-FasL 依存性アポトーシスであると考えられる。Fas-FasL 依存性の確認には、厳密には、Fas-Ig などの可溶性 Fas によるブロック実験や FasL 表出の確認が必要であろうが、我々は、3 DO 54.8 が、APC および特異抗原存在下において C 3 H/HeJ マウスの Con A 刺激脾細胞に対しては強い細胞障害性を示すが、Fas 欠損マウス C 3 H. MRL/1 pr マウスの Con A 刺激脾細胞に対してはその細胞障害性は極度に低下する事実を確認しており、3 DO 54.8 の細胞障害の主機構は Fas(-FasL) 依存性アポトーシスと考えている。

今回の実験において、T 細胞の Fas 陽性 APC に対する細胞障害活性は DNA 断片化検出および <sup>51</sup>Cr 遊出にて確認でき、この際、DNA 断片化は 2 時間後より検出され、<sup>51</sup>Cr 遊出は 8 時間後より認められた。この系に UDCA を添加すると、<sup>51</sup>Cr 遊出および DNA 断片化は抑制され、UDCA が CD 4 陽性 T 細胞の Fas 陽性標的細胞に対するアポトーシス誘導を抑制することが判明した。

以上のように UDCA が T 細胞の細胞障害活性を抑制することが明らかとなったが、その作用機序についてはいくつかの可能性が考えられた。われわれは以前に、UDCA は抗原提示細胞(APC)の抗原捕獲やそのプロセスに影響する可能性は低いことを報告<sup>19)</sup>したが、本研究では APC の抗原処理機能への影響を完全に除外するため、native な抗原蛋白にかえてペプチド抗原を使用した。この実験条件では、UDCA の作用機転として



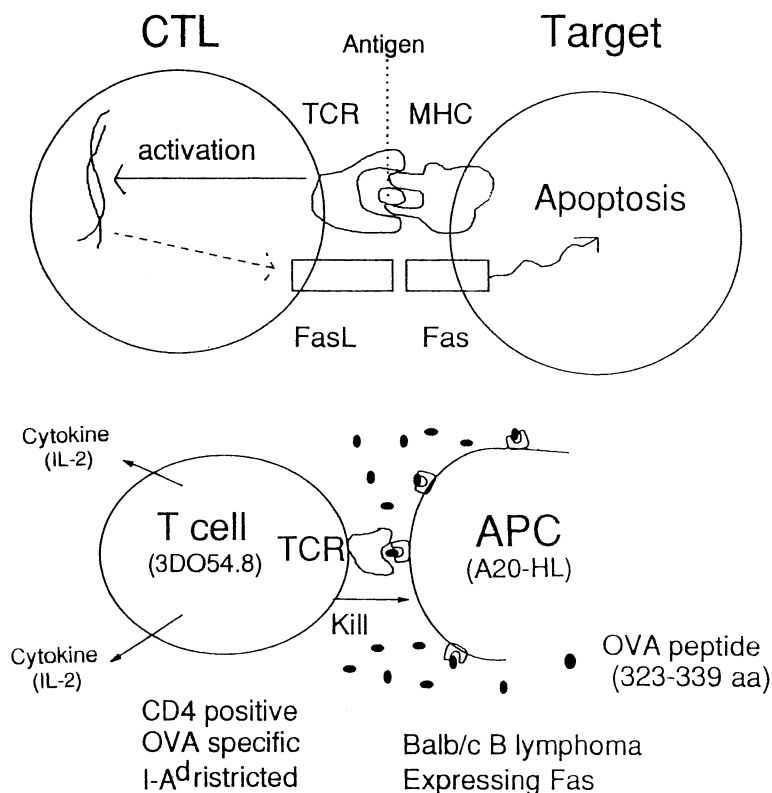


Fig. 7. A schema of Fas- and FasL-mediated Apoptosis (upper) and the model used in the present study (lower).

は、① APC のクラス 2 抗原表出量、② APC の Fas 表出量、③ T 細胞の FasL 表出量の 3 つの抑制の可能性が考えられる。そこで、これらの可能性について順次検討した。まず、UDCA は、A 20-HL のクラス 2 抗原 I-A<sup>d</sup> 表出に影響を与えなかった。また、A 20-HL 細胞の Fas 表出は UDCA 長時間処理にてわずかに減少したものの数時間処理では影響を受けなかった。これに対し、3 DO 54.8 細胞の FasL-mRNA 発現は UDCA 処理数時間にて明らかに抑制された。T 細胞による標的細胞のアポトーシス誘導に対する UDCA の抑制効果は UDCA 添加 8 時間後には、<sup>51</sup>Cr release 法および DNA 断片化検出法のいずれにおいても観察されたことから、本アッセイ系における UDCA のアポトーシス抑制は、APC のクラス 2 抗原や Fas 抗原の発現抑制によるのではなく、UDCA による T 細胞の FasL 発現抑制によると考えられた。

## 結 語

抗原特異的に活性化される CD 4 陽性 T 細胞株による Fas 陽性 APC/target に対するアポトーシス誘導に及ぼす UDCA の影響を検討し、以下の結果を得た。

1. CD 4 陽性 T 細胞株は特異抗原存在下で APC により活性化され、培養早期より FasL-mRNA 発現が観察され、この T 細胞株による Fas 陽性 APC/target に対するアポトーシス誘導は Fas-FasL 依存性と考えられた。
2. UDCA は、この CD 4 陽性 T 細胞株による <sup>51</sup>Cr 標識 Fas 陽性 APC/target からの <sup>51</sup>Cr 遊出および DNA の断片化を抑え、T 細胞による標的細胞に対するアポトーシス誘導を抑制すると考えられた。
3. UDCA は、constitutively に発現していた APC/target の Fas 表出にはほとんど影響を与えなかったが、CD 4 陽性 T 細胞の FasL 発現を抑制した。

稿を終えるにあたり、終始御懇篤なる御指導、御校閲を賜った福井 博教授に深甚なる謝意を表しますとともに、御助言、御校閲を賜った病態検査学教室中野 博教授、寄生虫学教室石坂重昭教授に深く感謝いたします。また、研究遂行にあたり御助言いただきました、寄生虫学教室吉川正英博士、および第三内科学教室諸兄に感謝いたします。

本研究の一部は、第 86 回 Falk シンポジウム(1995 年 10 月, Basel, Switzerland), 第 10 回アジア太平洋消化器病学会(1996 年 9 月, 横浜), 第 33 回日本肝臓学会総会(1997 年 4 月, 名古屋)において発表した。

## 文 献

- 1) Poupon, R. E., Poupon, R., Balkau, B. and the UDCA-PBC Study Group : Ursodiol for the long-term treatment of primary biliary cirrhosis. *N. Engl. J. Med.* **330** : 1342-1347, 1994.
- 2) Heathcote, E. J., Cauch-Dudek, K., Walker, V., Bailey, R. J., Blendis, L. M., Ghent, C. N., Michieletti, P., Minuk, G. Y., Pappas, S. C., Scully, I. J., Steinbrecher, U. P., Sutherland, L. R., Williams, C. N., Witt-Sullivan, H., Worobetz, L. J., Milner, R. A. and Wanless, I. R. : The Canadian multicenter double-blind randomized controlled trial of ursodeoxycholic acid in primary biliary cirrhosis. *Hepatology* **19** : 1149-1156, 1994.
- 3) Lindor, K. D., Dickson, E. R., Baldus, W. P., Jorgensen, R. A., Ludwig, J., Murtaugh, P. A., Harrison, J. M., Wiesner, R. H., Anderson, M. L., Lange, S. M., Lesage, G., Rossi, S. S. and Hofmann, A. F. : Ursodeoxycholic acid in the treatment of primary biliary cirrhosis. *Gastroenterology* **106** : 1284-1290, 1994.
- 4) Lindor, K. D., Therneau, T. M., Jorgensen, R. A., Malinchoc, M. and Dickson, E. R. : Effect of ursodeoxycholic acid on survival in patients with primary biliary cirrhosis. *Gastroenterology* **110** : 1515-1518, 1996.
- 5) Combes, B., Carithers, R. L., Maddrey, W. C., Lin, D., McDonald, M. F., Wheeler, D. E., Eigenbrodt, E., Munoz, S. J., Rubin, R., Garcia-Tsao, G., Bonner, G. F., West, A. B., Boyer, J. L., Luketic, V. A., Shiffman, M. L., Mills, A. S., Peters, M. G., White, H. M., Zetterman, R. K., Rossi, S. S., Hofmann, A. F. and Markin, R. S. : A randomized double-blind, placebo-controlled trial of ursodeoxycholic acid in primary biliary cirrhosis. *Hepatology* **22** : 759-766, 1995.
- 6) Mima, S., Sekiya, C., Kanagawa, H. and Uchida, T. : Ursodeoxycholic acid therapy for autoimmune hepatitis. *Int. Hepatol. Commun.* **2** : 207-212, 1994.
- 7) 山中正巳, 大藤正雄, 小幡 裕, 清水盈行, 菅田文夫, 八田善夫, 土肥 豊, 宮原英夫 : 二重盲検法によるウルソデオキシコール酸の慢性肝炎に対する治療効果の検討. *診断と治療* **64** : 2150-2157, 1976.
- 8) Pouti, C., Pannullo, A., Annovazzi, G., Fillipi, T. and Magrini, A. : Ursodeoxycholic acid and chronic hepatitis C infection. *Lancet* **341** : 1413-1414, 1993.
- 9) Crosignani, A., Battezzati, P. M., Setchell, K., Camisasca, M., Bertolini, E., Roda, A., Zuin, M. and Podda, M. : Effects of ursodeoxycholic acid on serum liver enzymes and bile acid metabolism in chronic active hepatitis: A dose-response study. *Hepatology* **13** : 339-344, 1991.
- 10) Bellentani, S., Podda, M., Tiribelli, C., Callea, F., Marazzi, M., Sodde, M., Merlini, R., Batezzati, P. M., Crosignani, A., Zuin, M. and Manenti, F. : Ursodiol in the long-term treatment of chronic hepatitis: a double-blind multicenter clinical trial. *J. Hepatol.* **19** : 459-464, 1993.
- 11) Attili, A. F., Rusticali, A., Varriale, M., Carli, L., Repice, A. M. and Callea, F. : The effect of ursodeoxycholic acid on serum enzymes and liver histology in patients with chronic active hepatitis: A 12-month double-blind, placebo-controlled trial. *J. Hepatol.* **20** : 315-320, 1994.
- 12) Takano, S., Ito, Y., Yokosuka, O., Ohto, M., Uchiumi, K., Hirota, K. and Omata, O. : A multicenter randomized controlled dose study of ursodeoxycholic acid for chronic hepatitis C. *Hepatology* **20** : 558-564, 1994.
- 13) Hiramatsu, N., Hayashi, N., Katayama, K., Mochizuki, K., Kawanishi, Y., Kasahara, A., Fusamoto, H. and Kamada, T. : Immunohisto-

- chemical detection of Fas antigen in liver tissue of patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* **19**: 1354-1359, 1994.
- 14) **Okazaki, M., Hino, K., Fujii, K., Hanada, H., Nakanishi, Y., Kanazawa, S., Kobayashi, N. and Okita, K.** : Immunohistochemical study of Fas antigen in liver of patients with chronic hepatitis and autoimmune liver disease. *Int. Hepatol. Commun.* **3**: 285-289, 1995.
- 15) **Mita, E., Hayashi, N., Iio, S., Takehara, T., Hijioka, T., Kasahara, A., Fusamoto, H. and Kamada, T.** : Role of Fas legend in apoptosis induced by hepatitis C virus infection. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **204**: 468-474, 1994.
- 16) **Yoshikawa, M., Tsujii, T., Matsumura, K., Yamao, J., Matsumura, Y., Kubo, R., Fukui, H. and Ishizaka, S.** : Immunomodulatory effects of ursodeoxycholic acid on immune responses. *Hepatology* **16**: 358-364, 1992.
- 17) **Yoshikawa, M., Matsui, Y., Umemoto, N., Yamao, J., Kawamoto, H., Ishizaka, S., Fukui, H., Hozumi, N. and Tsujii, T.** : Effects of ursodeoxycholic acid on immunoglobulin and cytokine production and antigen presentation. In "Bile acid and Immunology" PA Berg, U Leuschner eds, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp140-160, 1996.
- 18) 辻井 正, 吉川正英, 石坂重昭, 松村圭祐, 松為裕二 : 平成6年度文部省科研報告書, pp1-17, 1995.
- 19) **Yoshikawa, M., Matsumura, K., Matsumura, Y., Yamao, J., Kuriyama, S., Ishizaka, S., Fukui, H., Hozumi, N. and Tsujii, T.** : Effects of ursodeoxycholic acid on antigen presentation. *Int. Hepatol. Commun.* **1**: 243-249, 1994.
- 20) **Kagi, D., Ledermann, B., Burki, K., Zinkernagel, R. M. and Hengartner, H.** : Molecular mechanisms of lymphocytemediated cytotoxicity and their role in immunological protection and pathogenesis in vivo. *Annu. Rev. Immunol.* **14**: 207-232, 1996.
- 21) **Takayama, H., Kojima, H. and Shinohara, N.** : Cytotoxic T lymphocytes: The newly identified Fas(CD 95)-mediated killing mechanism and a novel aspect of their biological functions. *Adv. Immunol.* **60**: 289-321, 1995.
- 22) **Stalder, T., Hahn, S. and Erb, P.** : Fas antigen is the major target molecule for CD4<sup>+</sup> T cell-mediated cytotoxicity. *J. Immunol.* **152**: 1127-1133, 1994.
- 23) **Watanabe, M., Wegman, D. R., Ochi, A. and Hozumi, N.** : Antigen presentation by a B-cell line transfected with cloned immunoglobulin heavy- and light-chain gene specific for a defined hapten. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 5247, 1986.
- 24) **Watanabe, M., Yoshikawa, M. and Hozumi, N.** : Cytotoxic function of a clone helper T cell line. *Immunol. Lett.* **15**: 133-138, 1987.
- 25) **Yoshikawa, M., Watanabe, M. and Hozumi, N.** : Analysis of proteolytic processing during antigen presentation. *Cell. Immunol.* **110**: 431-435, 1987.
- 26) **Watts, T. H., Garipey, J., Schoolnik, G. and McConell, H. M.** : T-cell activation by peptide antigen: effect of peptide sequence and method of antigen presentation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**: 5480-5484, 1985.
- 27) **Watanabe-Fukunaga, R., Brannan, C. I., Itoh, N., Yonehara, S., Copeland, N. G., Jenkins, N. A. and Nagata, S.** : The cDNA structure, expression and chromosomal assignment of the mouse Fas antigen. *J. Immunol.* **148**: 1247-1279, 1992.
- 28) **Ju, S. T., Panka, D. J., Cui, H., Ettinger, R., El-Khatib, M., Sherr, D. H., Stanger, B. Z. and Marshak - Rothstein, A.** : Fas(CD 95)/ FasL interctions required for programmed cell death after T-cell activation. *Nature* **373**: 444-448, 1996.