



Title	可溶型Fas測定における血清検体の非働化効果について
Author(s)	多羅尾, 史明; 森本, 美恵; 馮, 奕斌 他
Citation	北海道大学医療技術短期大学部紀要, 12, 1-8
Issue Date	1999-12
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/37647
Type	departmental bulletin paper
File Information	12_1-8.pdf



原 著

可溶型Fas測定における血清検体の 非働化効果について

多羅尾史明・森本 美恵・馮 奕斌・小林 清一

Effect of heat inactivation of serum samples on soluble Fas measurement

Fumiaki Tarao, Mie Morimoto, Yibin Feng and Seiichi Kobayashi

Abstract

Soluble Fas (APO-1/CD95) is a secretory form of the apoptosis-inducing Fas receptor. In this study, we analyzed the effect of heat inactivation of serum samples on soluble Fas measurement and obtained the following new findings: all serum samples from healthy controls and most of those from active SLE patients exhibited increased soluble Fas levels after heat inactivation of serum samples. Mixture experiments of recombinant soluble Fas with untreated or heat-inactivated serum from healthy controls and SLE patients showed that untreated serum from both groups had an inhibitory effect on the soluble Fas levels and that heat inactivation of serum before mixture abolished the inhibition. In our sandwich ELISA untreated, but not heat-inactivated, serum inhibited binding of the anti-Fas detector antibody (DX2) to recombinant soluble Fas in a dose-dependent manner. These results suggest that an unidentified heat-labile protein in human serum affects soluble Fas measurement and indicate a new functional role of soluble Fas.

要 旨

可溶型Fas (APO-1/CD95) は、アポトーシス誘導性Fasレセプターの可溶型分子である。本研究においてわれわれは、可溶型Fas測定に

対する血清検体の非働化効果を解析し、以下の新知見を得た。すなわち健常人血清の全て、および全身性エリテマトーデス (SLE) 患者血清の多くに、非働化処理により可溶型Fasレベルの上昇を認めた。リコンビナント可溶型Fasと

北海道大学医療技術短期大学部衛生技術学科

Department of Laboratory Technology, College of Medical Technology,

Hokkaido University

健常人ならびにSLE血清との混合実験から、未処理血清に可溶型Fasレベルの抑制作用を見出すと共に、阻害実験によって可溶型Fas分子に会合すると考えられる易熱性蛋白の存在が示唆された。これらの結果は、可溶型Fas測定系の標準化に貢献すると共に、Fas分子の新たな機能的役割を示唆しているものと考えられる。

キーワード：可溶型Fas・サンドイッチELISA・血清非働化・易熱性阻害蛋白・全身性エリテマトーデス

緒 言

可溶型Fas(APO-1/CD95)は、アポトーシス誘導性Fasレセプターの可溶型分子である。その生成機序はFasの膜貫通領域をコードするエクソン6が選択的スプライシングにより欠失し、分泌型となったものである^{1,2)}。しかし、健常人の活性化リンパ球³⁾や全身性エリテマトーデス(SLE)患者の末梢血単核細胞⁴⁾においてFas遺伝子発現をRT-PCR解析すると、エクソン6を欠失した主要な可溶型Fas遺伝子以外にもエクソン3, 4やエクソン3, 4, 6を欠失したFas遺伝子変異体が検出される。これら可溶型Fas遺伝子に共通なエクソン2は、Fas-Fasリガンド(FasL)相互作用を抑制するための機能的最小単位をコードすると考えられている^{3,4)}。

血中可溶型Fasは自己免疫疾患患者や担癌患者において有意に増加することが多くのグループより報告されており⁵⁻⁹⁾、疾患活動性の指標や腫瘍補助マーカーとしてその臨床的有用性が提唱されている。しかし一方では、同一の疾患でありながら相反する報告もあり^{10,11)}、その意義については研究者間で必ずしも一定しているわけではない。その原因としては、可溶型Fas測定系に用いる抗Fas抗体のエピトープ特異性や親和性、スタンダードの不統一性、検体

保存や前処理の違いなどの可能性が考えられるが、これらを追求した解析は今までのところ皆無である。

今回われわれは、可溶型Fas測定法標準化を検討した過程において、血清検体の非働化が可溶型Fas測定値に大きな影響を及ぼすことを見出すと共に、混合ならびに阻害実験の結果からヒト血清中に可溶型FasLとは異なる易熱性阻害物質の存在を示唆する所見が得られたのでここに報告する。

対象と方法

1. 患者および血清

全身性エリテマトーデス(SLE)分類基準(1982)¹²⁾を満たす未治療SLE患者より採血後血清を分離し、使用時まで-70℃に分注保存した。対照として年齢および性別をほぼマッチさせた健常人血清を使用した。血清の非働化は56℃, 30分で行った。

2. 可溶型Fas濃度の測定

血清可溶型Fas濃度は既報のサンドイッチELISA法⁷⁾を若干変更して測定した。すなわち、50 μ lの抗Fas捕獲抗体(5 μ g/ml)(DX3; Oncogene Research Products, Cambridge, MA)を37℃, 3時間にてイムノプレート(Nunc MaxiSorp; Nalge Nunc International, Roskilde, Denmark)に結合させたのち、100 μ lのBlock Ace(大日本製薬)にて37℃, 2時間ブロッキング操作を行った。2倍希釈の血清検体(50 μ l)をduplicatesにて37℃, 2時間反応させたのち、50 μ lのビオチン標識抗Fas検出抗体(5倍希釈)(DX2; PharMingen, San Diego, CA), 続いて50 μ lのストレプトアビジン標識アルカリホスファターゼ(Zymed Labs, Inc., South San Francisco, CA)をそれぞれ37℃, 1時間反応させた。最後に100 μ lの基質溶液(1mg/mlのニトロフェニル磷酸含有ジエタノールアミンバッファー, pH9.8)を加え、30

分後に吸光度（主波長405nm, 副波長600nm）を測定した。各ステップ間の洗浄は0.05% Tween-20-PBS, pH7.4にて5回行った。全ての測定には、下記のリコンビナント可溶性Fasを含む培養上清をスタンダードとして用いた。

3. リコンビナント可溶性Fasの作製

SLE患者末梢血単核細胞からRT-PCR法にて可溶性Fas遺伝子をTAベクター (Invitrogen, San Diego, CA) にサブクローニングした。そのPCR産物がFas遺伝子のエクソン6を欠失した可溶性Fas遺伝子であることを確認した後、EcoRI断片をpcDL-SR α 296発現ベクター¹³⁾ のEcoRIサイトに挿入して可溶性Fasの発現ベクター (pSR α -FasDEL6) を構築した。pSR α -FasDEL6をDEAE-dextran法によりCOS-7細胞に遺伝子導入し、10%牛胎児血清 (FBS) 添加RPMI1640培養液にて3日間培養後に上清を回収した。既知濃度の可溶性Fas（順天堂大医学部榎垣伸彦先生より恵与）により培養上清中の可溶性Fas濃度を測定し、分注して使用時まで-70℃に保存した。

4. 可溶性FasLの測定

血清可溶性FasLは、MBL社製測定キットを用い、添付説明書に従って測定した。

5. 統計解析

データはマッキントッシュコンピュータにて統計処理ソフトウェア StatView 4.02 (Abacus Concepts, Inc., Berkeley, CA) を利用して解析した。グループ間の有意差検定はMann-WhitneyのU検定およびWilcoxonの符号付順位検定を、また、2変数の相関関係はSpearmanの順位相関係数を用いた。P<0.05を統計学的に有意とした。

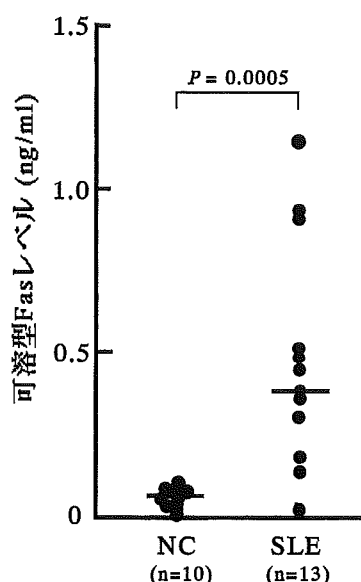


図1 血清可溶性Fasレベル
健康人 (NC) および全身性エリテマトーデス (SLE) 患者血清における可溶性FasレベルをサンドイッチELISA法にて測定した。各群の横線は中央値を示す。Mann-WhitneyのU検定を行った。

結 果

1. 未治療SLE患者および健康人における血清可溶性Fasレベル

未治療の活動期SLE患者 (n=13) と健康人 (n=10) 血清について可溶性FasレベルをサンドイッチELISA法にて測定した (図1)。SLE患者および健康人の可溶性Fasレベルはそれぞれの中央値が0.386ng/ml (範囲; 0.020~1.151 ng/ml), 0.059ng/ml (範囲; 0~0.098ng/ml) で、既報のごとくSLE患者の方が健康人よりも統計学的に有意に血清可溶性Fasレベルが上昇していた (P=0.0005)。

2. 血清非働化による可溶性Fasレベルの変化

血清非働化は補体不活化のために臨床検査では最も多用される方法である。そこで、SLE患者および健康人血清を56℃, 30分加温して未処

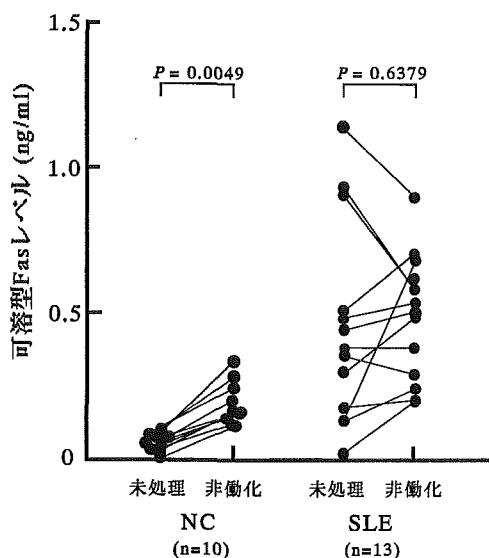


図2 血清非働化による可溶性Fasレベルの変動

図1と同一の血清を56℃、30分の非働化処理した後、可溶性Fasレベルを測定し、未処理血清での可溶性Fasレベルと比較した。Wilcoxonの符号付順位検定を行った。

理の同一血清と同時に可溶性Fasレベルを測定すると（図2）、健常人血清すべてにおいて非働化処理にて可溶性Fasレベルが有意に上昇した（ $P=0.0049$ ）。一方、SLE患者血清では非働化処理により13例中8例において可溶性Fasレベルの上昇を認めたが、4例では反対に可溶性Fasレベルの低下が認められた。このうち3例は未処理血清にて可溶性Fasレベルが高値の症例であった。

3. 血清による可溶性Fas測定の抑制作用と非働化による抑制解除効果

次に、非働化処理によりなぜ可溶性Fas値が変動するのかを調べるために、可溶性Fasと血清との混合実験を行った。すなわち、スタンダードに用いるリコンビナント可溶性Fasを最終濃度2 ng/ml、健常人またはSLE血清が最終濃度2倍希釈となるように混合した。混合後非働化処理を行い、未処理混合血清と共に可溶性Fasレベルを測定した（図3）。リコンビナント可

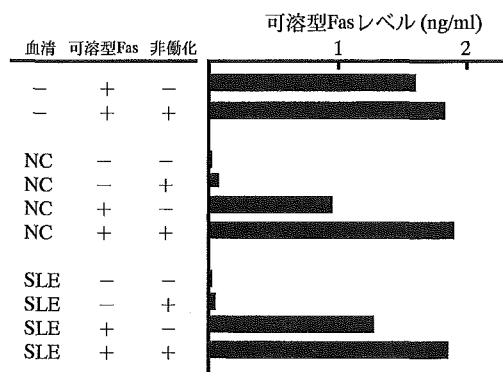


図3 可溶性Fasとヒト血清との混合実験(1)

健常人(NC)または全身性エリテマトーデス(SLE)患者血清（図2での非働化後上昇例）にリコンビナント可溶性Fas（最終濃度2 ng/ml）を混合し、未処理または非働化処理後に可溶性Fasレベルを測定した。

溶性Fasレベルは、本実験に供した健常人またはSLE血清存在下にそれぞれ41%、21%抑制されたが、非働化処理により血清による抑制効果は完全に解除された。このような結果は複数の健常人において同様に認められたが、SLE血清では非働化処理による可溶性Fas下降例において抑制効果が認められない場合があった（data not shown）。

ヒト血清が非存在下のリコンビナント可溶性Fasでは非働化による有意な可溶性Fas値の増加がないことから（図3）、混合血清における非働化効果は可溶性Fas自体の熱変化ではないと考えられる。このことを確認するために、予め非働化した血清にリコンビナント可溶性Fasを添加して可溶性Fas値への影響を検討した（図4）。健常人血清による24%（NC-1）および39%（NC-2）の可溶性Fasレベルの抑制効果は血清の非働化前処理により完全に消失したことから、ヒト血清による可溶性Fasレベルの抑制作用は血清のみに起因すると考えられた。

4. ヒト血清の可溶性Fas測定系への影響

次に、サンドイッチELISA系に及ぼすヒト血清の影響を検討した（図5）。リコンビナント

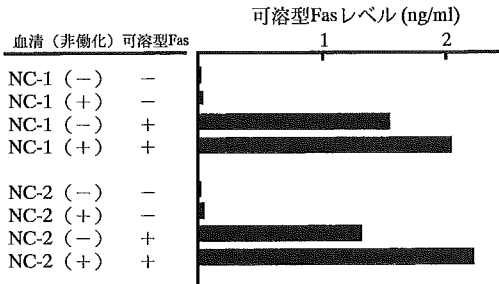


図4 可溶性Fasとヒト血清との混合実験(2)

未処理または非働化前処理した健常人 (NC-1, NC-2) 血清とリコンビナント可溶性Fas (最終濃度2ng/ml) を混合し、可溶性Fasレベルを測定した。

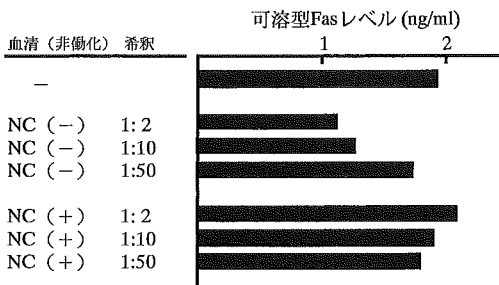


図5 ヒト血清による可溶性Fas測定の阻害実験

サンドイッチELISA法において、リコンビナント可溶性Fas(2ng/ml)とビオチン化抗Fas検出抗体(DX2)のステップ間に、段階希釈した未処理(NC(-))または非働化健常人血清(NC(+))を37℃ 1時間反応させた。

ト可溶性Fas(2 ng/ml)をサンプルとしてアプライした後、各段階に希釈した未処理または非働化健常人血清を反応させてからビオチン化抗Fas抗体(DX2)を反応させた。血清を反応させない時には、1.92ng/mlとほぼ期待値通りの結果が得られたが、2倍希釈未処理血清との反応により1.16ng/mlと可溶性Fasレベルが40%阻害された。しかも、この阻害効果は10倍希釈未処理血清では35%、50倍希釈未処理血清では10%と用量依存性に認められた。また、混合実験と同様に血清の非働化処理により可溶性Fasレベルの阻害作用は完全に消失した。

5. 可溶性FasLレベルと可溶性Fas阻害作用との相関

可溶性Fasの動態に可溶性FasLが影響する可能性を考え、非働化により増加した可溶性Fasレベルと可溶性FasLレベルの相関を検討した。しかし、両者には統計学上有意な相関関係は認められなかった(P=0.109) (data not shown)。

考 察

本研究により得られた新知見は、DX3-DX2系サンドイッチELISA法による血清可溶性Fasレベルが、血清非働化により大部分の検体において増加したことと、リコンビナント可溶性Fasと健常人およびSLE血清との混合実験ならびに阻害実験により、血清中に可溶性Fas測定を阻害する易熱性物質の存在が示唆されたことである。

一般的に、血清検体においては過度の溶血や黄疸、乳糜血清、有形成分の存在などは測定値に影響を及ぼすことがあるとされている。また、長期の凍結保存や頻回の凍結融解も避けるべきものとして認識されている。今回われわれは、対象疾患が同一でありながら血清可溶性Fasレベルの相反する報告があることから、可溶性Fas測定系の標準化を目的として種々の検討を試みた。その過程において、血清非働化による可溶性Fasレベルの変動を見出した。われわれのグループも含めて従来の可溶性Fas測定においては未処理血清が検体として使用され、非働化操作は熱変性等の影響を考慮して施行されていなかった。しかし、今回敢えて非働化処理を行ったもう一つの理由は、抗体検査等で非働化処理済の貴重な血清検体を可溶性Fas測定系にも利用可能かということであった。その結果、意外にも非働化後に可溶性Fasレベルの増加が認められた。その原因としては種々の確認実験から、血清中の易熱性成分による可溶性Fasの測定阻害が非働化によって解除されることが推定された。

リコンビナント可溶性Fasと血清との混合実験では、捕獲抗体であるDX3との競合物質や可溶性Fasへの結合物質が考えられた。しかし、前者の存在は比較的大量のリコンビナント可溶性FasをDX3と反応させたあとでも、未処理血清に阻害作用が認められた事実を説明できない。ただ、DX3との親和性が可溶性Fasよりも強い場合にはあり得るかもしれないが、DX3がFas以外の抗原特異性を有するとの報告はない。

次に可溶性Fasへの結合物質についてはまず第一にマトリックスメタロプロテナーゼにより細胞膜から切断され、遊離した可溶性FasL¹⁴⁾が候補として挙げられる。実際に、SLE血清では可溶性FasLレベルの上昇が報告され¹⁵⁾、両者が液相において結合しうることも明らかとなっている¹⁶⁾。従って、可溶性Fas-可溶性FasL複合体が非働化によって易熱性（かどうかは不明であるが）の可溶性FasLが遊離し、隠されていた可溶性FasのDX2エпитープが露出されることが考えられる。もし、これが本当ならば、非働化によって見かけ上増加する可溶性Fasレベルと可溶性FasLレベルは正の相関を示すはずである。しかし、実際に両者には有意な相関は認められなかった。更に、われわれはすでに、DX3-DX2可溶性Fas測定系におけるリコンビナント可溶性Fasの標準曲線は、可溶性FasLの添加にても変化がないことを報告している⁷⁾、可溶性FasLが可溶性FasとDX2抗Fas抗体との反応を阻害する可能性は低いと考えられる。

阻害実験からは、DX3に結合した可溶性Fasにまだ未知の、あるいは結合作用が認識されていない易熱性蛋白が結合することによって、DX2エпитープが塞がれる可能性が十分に考えられる。非働化における易熱性蛋白としては、本来の目的である補体系分子C1, C2, C5, C8, C9, B因子が最も普通に考えられる。しかし、C1qが一部の免疫グロブリンと、また、C5aが

そのレセプターであるCD88に結合することは知られているが、補体分子のFas分子への結合性についての報告は皆無である。未知あるいは既知の血清蛋白であっても、血清分画法による阻害物質の絞り込みは可能であり、現在そのプロジェクトが進行中である。

さて、今回の新知見において最も説明し難い事実は、SLE血清において未処理血清で可溶性Fasが高値を示した症例では、むしろ非働化により可溶性Fasレベルが低下したことである。元来、Fas分子は細胞膜上でも液相でもホモトリマーなどの重合体を形成しやすい分子であり、この性質こそが細胞内にある死ドメインのシグナル伝達に重要とされている。高濃度の可溶性Fasが存在する場合には、非働化による重合化の促進により抗体エпитープの見かけ上の減少が想像できるが、このような症例では前述した可溶性Fasへの易熱性結合物質が低下している可能性もある。実際に、一部の混合実験ではリコンビナント可溶性Fasの抑制効果を示さないSLE血清があり、SLE症例間にはFas結合性易熱性蛋白量に差があると考えられた。

あるいは、非働化によって可溶性Fasレベルが減少したSLE血清では、スタンダードに用いているリコンビナント可溶性Fasとは分子構造が異なるのかもしれない。事実、SLE血清の中には、DX3-DX2系では検出されるが、DX3-FasC（細胞内C端ペプチドに対する抗体）系では検出されない可溶性Fasも存在しており、われわれはすでに可溶性Fas分子のヘテロジェネイティを明らかにしている⁷⁾。可溶性Fasの分子構造の差が非働化による変化を反映しているという説も魅力的であるが、そのためには症例毎に可溶性Fas分子種の解析が必要であらう。

いずれにしても、DX3-DX2系の可溶性Fas測定においては、血清非働化の有無に関わらずSLEにおいて可溶性Fasレベルが健常人より有意に上昇しているという事実は確認された。

従って、既報における相反する結果は血清非働化の有無ではなく、使用する抗Fas抗体クローンの違いやスタンダードの優劣、血清検体の偏りなどが主因となっていると考えられる。これを克服するためには、世界的に統一された測定系の確立が急務であり、本研究もその一端を担うものと強く信じたい。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり貴重な血清検体をご供与していただいた北海道大学医学部内科学第二講座小池隆夫教授ならびにリコンビナント可溶性Fasの精製にご助力をいただいた医学部附属病院第二内科浄土 智助手に深甚なる謝意を表します。また、本研究の一部は平成10年度北海道大学医療技術短期大学部研究助成金により行われたことを付記し、関係各位の皆様により感謝申し上げます。

引用文献

- 1) Cheng J., Zhou T., Liu C. et al.: Protection from Fas-mediated apoptosis by a soluble form of the Fas molecule. *Science* 263: 1759-1762, 1994.
- 2) 小林清一: 分泌型CD95 (Fas/APO-1抗原) cDNAのクローニングと蛋白発現. 厚生省特定疾患免疫異常の発症機序調査研究班平成5年度研究報告書, p31-34, 1994.
- 3) Cascino I., Fiucci G., Papoff G. et al.: Three functional soluble forms of the human apoptosis-inducing Fas molecule are produced by alternative splicing. *J. Immunol.* 154: 2706-13, 1995.
- 4) Jodo S., Kobayashi S., Kasahara H. et al.: The mechanisms of apoptosis inhibition by soluble Fas. *Arthritis Rheum.* 41: S75, 1998.
- 5) Mountz J.D., Pierson M.C., Zhou T. et al.: sFas expression in patients with autoimmune disease. *Arthritis Rheum.* 38: S174, 1995.
- 6) Tokano Y., Miyake S., Kayagaki N. et al.: Soluble Fas molecule in the serum of patients with systemic lupus erythematosus. *J. Clin. Immunol.* 16: 261-265, 1996.
- 7) Jodo S., Kobayashi S., Kayagaki N. et al.: Serum levels of soluble Fas/APO-1 (CD95) and its molecular structure in patients with systemic lupus erythematosus (SLE) and other autoimmune diseases. *Clin. Exp. Immunol.* 107: 89-98, 1997.
- 8) Midis G.P., Shen Y., Owen-Schaub L.B. et al.: Elevated soluble Fas (sFas) levels in nonhematopoietic human malignancy. *Cancer Res.* 56: 3870-3874, 1996.
- 9) Jodo S., Kobayashi S., Nakajima Y. et al.: Elevated serum levels of soluble Fas/APO-1 (CD95) in patients with hepatocellular carcinoma. *Clin. Exp. Immunol.* 112: 166-171, 1998.
- 10) Knipping E., Krammer P.H., Onel K. B. et al.: Levels of soluble Fas/APO-1/CD95 in systemic lupus erythematosus and juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 38: 1735-1737, 1995.
- 11) Goel N., Ulrich D.T., St Clair E.W. et al.: Lack of correlation between serum soluble Fas/APO-1 levels and autoimmune disease. *Arthritis Rheum* 38: 1738-1743, 1995.
- 12) Tan E.M., Cohen A.S., Fries J.F. et al.: The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 25: 1271-

- 1277, 1982.
- 13) Takabe Y., Seiki M., Fujisawa J. et al.: SR α promoter: an efficient and versatile mammalian cDNA expression system composed of the simian virus 40 early promoter and the R-U5 segment of human T-cell leukemia virus type 1 long terminal repeat. *Mol. Cell. Biol.* 8: 466-472, 1988.
- 14) Kayagaki N., Kawasaki A., Ebata T. et al.: Metalloproteinase-mediated release of human Fas ligand. *J. Exp. Med.* 182: 1777-1783, 1995.
- 15) Nozawa K., Kayagaki N., Tokano Y. et al.: Soluble Fas (APO-1, CD95) and soluble Fas ligand in rheumatic diseases. *Arthritis Rheum.* 40: 1126-1129, 1997.
- 16) Tanaka M., Suda T., Takahashi T. et al.: Expression of the functional soluble form of human fas ligand in activated lymphocytes. *EMBO J.* 14: 1129-1135, 1995.