

N-acetylcysteine による活性化末梢 T 細胞の アポトーシスの抑制と TNF 産生の増強

山本 英 順

札幌医科大学整形外科 (主任 石井清一 教授)

高橋 秀 史

札幌医科大学病理学第一講座 (主任 佐藤昇志 教授)

Inhibition of Apoptosis and Increase in TNF Production by N-Acetylcysteine

Hidenori YAMAMOTO

Department of Orthopaedics, Sapporo Medical University School of Medicine

(Chief : Prof. S. ISHII)

Shuji TAKAHASHI

Department of Pathology (Section 1), Sapporo Medical University School of Medicine

(Chief : Prof. N. SATO)

ABSTRACT Fas antigen is a member of the tumor necrosis factor receptor family and transduces a lethal signal in Fas-sensitive cells. We previously demonstrated that the sensitivity of Fas-mediated apoptosis was modulated by changing the intracellular glutathione (GSH) level in human T lymphocytes. When the Fas-sensitive cells were incubated with N-acetylcysteine (NAC), intracellular GSH was increased and Fas-mediated apoptosis was blocked. In this report, we examined whether lymphokine-activated-killer (LAK) activity is increased by NAC treatment via inhibition of Fas-mediated activation-induced cell death (AICD).

We previously established the Fas-resistant variant cell line JKT2D1R from the parental Fas-sensitive cell line Jurkat. AICD in JKT2D1R was markedly reduced. Induction of Fas antigen on the cell surface was confirmed after incubation of normal PBL with PHA and IL-2 for 7 days. After incubation with NAC, the intracellular GSH level was increased. In this context, surface expression of Fas, CD3 and HLA class I and intracellular expression of TIA-1 remained unchanged. However, production of TNF was markedly increased by NAC treatment. Therefore, the results suggest that LAK activity may be increased in terms of TNF production, most likely due to the inhibition of AICD. These results suggest that the increase of intracellular GSH induced by the administration of NAC may increase LAK activity and have clinical significance in tumor immunology.

(Received August 31, 1998 and accepted October 8, 1998)

Key words: Apoptosis, Fas, Glutathione, Lymphokine-activated-killer cell,
Tumor necrosis factor

1 緒 言

Fas/APO-1 (CD95) は 43 kDa の細胞表面抗原で、tumor necrosis factor receptor (TNFR)/nerve growth factor family に属する I 型膜貫通蛋白質であ

る。この分子は抗体や Fas ligand (FasL) と結合することによってアポトーシスを惹起する¹⁾。Fas 抗原は細胞内に 55 kD TNFR とホモロジーを持つ約 60 個のアミノ酸から成る death domain と呼ばれる相同領域がある²⁾。ウイルスに感染した細胞や腫瘍の排除にとって、

Fas を介するアポトーシスが適切に誘導されることが重要であるといわれている。Fas 抗原の発現が低下した *lpr* (lymphoproliferation) 変異マウスや、Fas 抗原の細胞内 domain に点変異があるためシグナル伝達が失われている *lpr^{CG}* 変異マウスでは、T 細胞のアポトーシスが起こらず、異常な T 細胞の蓄積が起こる^{3,4)}。FasL の発現が低下した *gld* マウスでは Fas を介するアポトーシスが誘導されず、同様に、異常な T 細胞の蓄積が起こる⁵⁾。このように、マウスやヒトの系において、Fas や FasL の遺伝子変異によって、リンパ節の腫大や自己免疫疾患、腫瘍化を起こすことが明らかとなった。

一方、マイトジェン刺激などにより活性化した末梢 T 細胞の細胞表面には、活性化抗原として Fas 抗原が表出される。つまり、活性化された T 細胞はネガティブフィードバックを受けているが、活性化の初期の段階ではアポトーシスを起こしにくい⁶⁾。また、Fas 抗原とリガンドがあっても、必ずしもアポトーシスを起こさない細胞も存在することが報告されている^{5,6,7)}。Fas を介するアポトーシスが起こるためには、細胞内のシグナル伝達が重要である。このシグナル伝達の制御因子としてグルタチオン (GSH) が重要な役割を果たしていることを我々は明らかにした⁸⁾。グルタチオンは、glutamate, cysteine, glycine の 3 個のアミノ酸からなる tripeptide であり、細胞内レドックス (酸化還元状態) を調節することにより、細胞の活性化、シグナル伝達、分化、細胞死 (アポトーシス) に関与している⁹⁾。また、TNFR 刺激が細胞内グルタチオンを調節して tyrosine phosphorylation を誘導し、さらに、Fas 刺激により tyrosine phosphorylation が促進されるという報告があった¹⁰⁾。このように、Fas を介するアポトーシスは、細胞内の酸化還元状態により調節が可能であることが示唆される。その 1 例として、ヒト T 細胞白血病株において、N-acetylcysteine (NAC) を用いた細胞内グルタチオンの濃度の増加が、T 細胞の Fas を介するアポトーシスを抑制することを我々は報告した¹¹⁾。NAC は細胞外の cystine を cysteine に還元し、cysteine は細胞内に取り込まれ、細胞内グルタチオンの合成が増加することが知られている¹²⁾。

一方、末梢 T 細胞では TCR/CD3 やマイトジェンによる刺激が増殖反応を起こすが、活性化 T 細胞や T 細胞白血病株では増殖抑制を起こすことが知られている。この現象は activation-induced cell death (AICD) と言われている¹³⁾。AICD の機序の一つとして、Fas を発現している活性化 T 細胞が、さらなる抗原刺激を受けることにより FasL も発現し、自律的なアポトーシス

が誘導される事実が知られている^{14,15,16)}。従って、キラー T 細胞を NAC で処理をして細胞内のグルタチオンの濃度を上げることによって、Fas の感受性は低下して AICD が抑制され、キラー T 細胞の細胞傷害性が増加することが予測される。

今回、我々は、正常ヒト末梢血から Lymphokine-activated-killer cell (LAK 細胞) を作製した。LAK 細胞の細胞内グルタチオンの増加により LAK 細胞の AICD が抑制されるかどうかを確かめた。また、LAK 細胞による細胞傷害活性の機序として、TIA-1 を含む perforin dependent killing mechanism, Fas-ligand/Fas, Tumor necrosis factor (TNF) がある^{17,18)}。今回、AICD が抑制されることにより LAK 活性が増強するかどうかについて、TNF を指標として検討したので報告する。

2 実験材料と方法

2.1 使用細胞

ヒト末梢血単核細胞 (PBL) を使用した。健康成人よりヘパリン加静脈血を採取し、Ficoll-Conray 液 (比重 1.082) に重層し、比重遠心法により単核細胞を分離回収した。分離された単核細胞は 100 U/ml の recombinant (r)IL-2 (Takeda Chemical, Tokyo) 及び 1 μ g/ml の PHA (Sigma, St. Louis, MO) 存在下で、AIM-V 培養液 (Gibco, Grand Island, New York, U. S. A) に浮遊し、炭酸ガス培養器 (37°C, 5%CO₂) にて 1 週間培養して、LAK 細胞とした。

Fas 感受性細胞株としてヒト白血病性 T 細胞株 Jurkat と、当教室において Jurkat から分離樹立した Fas 耐性株 JKT2D1R を用いた¹⁹⁾。また、TNF assay の際、TNF α 高感受性細胞株 WEHI-164 clone 13 細胞を用いた²⁰⁾。これらの細胞は、5% 非働化ウシ胎児血清 (fetal calf serum) (Summit, U. S. A), 100 units/ml ペニシリン G, 100 μ g/ml ストレプトマイシン、及び 2 mL-グルタミン (以上 Gibco, Grand Island, New York, U. S. A) を含む RPMI1640 (Sigma, St. Louis, MO) 培養液 CM に浮遊して、炭酸ガス培養器 (37°C, 5%CO₂) にて培養した。

2.2 使用抗体、薬品

抗 Fas モノクローナル抗体は、我々が以前に樹立した 2D1 抗体を用いた¹⁹⁾。また、FasL に対する抗体として、抗 FasL 抗体 (Nok-1, 順天堂大免疫学, 八木田先生から供与された。)を用いた。NAC 処理後の LAK 細胞表面抗原の発現の変化を見るために、抗 CD3 抗体; EF6²¹⁾, 抗 MHC class I 抗体; W6/32 (IgG2a)

(American Type Culture Collection, Rockville, MD, U. S. A.)を用いた。さらに、細胞質内のTIA-1に対する抗体としてモノクローナル抗体である抗TIA-1抗体(Coulter Immunology, U. S. A.)を用いた^{22,23}。LAK細胞のflow cytometryには、FITC-conjugated goat anti-mouse Ig (G+M) (Jackson Immunoresearch West Grove, PA)を用いた。細胞内グルタチオンを増加させるためには、N-acetylcysteine (NAC) (Sigma)を用いた。また、細胞膜を融解させるためにSaponin (Sigma)を使用した。

2・3 細胞内グルタチオン濃度の測定

細胞内グルタチオン濃度をTietze's法変法にて生化学的に定量した²⁴。まず最初に、 1×10^7 個の細胞を燐酸緩衝液(Phosphate Buffered Saline, PBS)で3回洗浄後、200 μ lのTCA solution (5% Trichloroacetic acid, 0.1 N HCL, 10 mM EDTA)を加え1分間攪拌し、2分間遠心(10000 rpm)を行った。その上清50 μ lを96 well底のマイクロプレート(Falcon No. 3072, Becton Dickinson, Mountain View, CA)に加えた。次に、stock buffer (125 mM sodium phosphate, 6.3 mM EDTA adjusted to pH 7.5)で希釈した0.3 mM NADPH (Sigma) 130 μ lと90 μ lのGSH reductase (Sigma, 1 U/ml in stock buffer)を各wellに加えた。さらに、このassayを開始する直前にstock bufferで希釈した6 mM 5, 5'-dithio-bis (2-nitrobenzoic acid) (DNTB, Sigma)を20 μ l加えた。NovaPath microplate reader (Japan BioRad Laboratories, Tokyo, Japan)を使用して、各wellの吸光度を測定した。測定波長は405 nm, referenceは490 nmとした。グルタチオンの濃度はGSH (Sigma)を使用したtitration curveから計算した。

2・4 生存細胞の測定

MTT [3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium promide] (Sigma)を用いた生細胞測定は既報に準じて行った²¹。NACで処理をした細胞を2回洗浄後、AIM-V培養液(rIL-2存在下)にて24時間オーバーナイト培養した。次に、 1×10^4 個の細胞を96 well底のマイクロプレートにまき、数種類の濃度の2D1抗体を加えた。24時間培養した後、MTT溶液5 mg/mlを10 μ l/wellになるように調整して加えた。4時間インキュベーター内に置くと、生細胞内ではミトコンドリアの酵素作用によりformazanの結晶が形成される。この結晶を塩酸化イソプロパノールを加えることにより溶解した。各wellの吸光度をmultiple scanning photometer (MicroELISA MR600, Dynatech

Laboratories, Inc., Alexandria, VA)を用いて測定した。測定波長は570 nm, referenceは630 nmとした。生存率は以下の計算式にて算出した。

$$\% \text{生存率} = (1 - \text{抗体存在下の吸光度} / \text{培養液のみでの吸光度}) \times 100$$

2・5 FACSscanによる解析

LAK細胞をNACで処理をしていないcontrol群と、NACの50 μ Mと100 μ Mで処理をした群に分けた。それぞれの群の 5×10^5 個の細胞に10 μ g/mlの1次抗体(2D1抗体, 抗CD3抗体, 抗MHC class I抗体)を加えて4°C, 30分間反応させた。PBSで洗浄後、2次抗体としてFITC-conjugated goat anti-mouse Ig (G+M)を加えて4°Cで、30分間反応させた。これをPBSで2回洗浄後、1.0%ホルマリンPBSで固定し、FACS analyzer (Becton Dickinson)にて解析を行った。

また、NAC未処理群と、NAC処理群の細胞質内のTIA-1を検討した。それぞれの群のLAK細胞 1×10^7 個をAIM-Vにて2回洗浄後、0.1% Saponin溶液1 ccを加えて、4°Cで5分間反応させた。次に、PBSにて洗浄後、抗TIA-1 mAbを10 μ g/ml加えて4°Cで、30分間反応させた。更にPBSで洗浄後、2次抗体としてFITC-conjugated goat anti-mouse Ig (G+M)を加え、4°Cで30分間反応させた。これをPBSで2回洗浄後、1.0%ホルマリンPBSで固定して、FACS analyzer (Becton Dickinson)にて解析した。

2・6 TNF assayによる解析

NACで処理をした 1×10^7 個のLAK細胞をAIM-Vで2回洗浄後、12時間培養した。96-well (flat)にTNFを含む培養上清を50 μ lずつ分注した。次に、WEHI-164 clone 13細胞を 5×10^4 /100 μ lとなるように、LiCl 20 mMを加えて、その100 μ lずつを分注した。また、検量線を作るために、recombinant TNF (大日本製薬)の希釈系列を50 μ lずつ加えた。インキュベーターにて24時間培養をした後、MTT試薬を各wellに10 μ l加えて、4時間インキュベートするとMTT formazanの結晶が形成された。この結晶に塩酸化イソプロパノールを各wellに150 μ l加えることにより溶解させ、microplate readerにて吸光度を測定した。測定波長は570 nm, referenceは630 nmとした。吸光度とTNF検量線からサンプルのTNF濃度を計算した。

3 結果

3・1 抗CD3抗体を用いたAICDの感受性の分析

Fas感受性株であるJurkat, 及び、その非感受性株であるJKT2D1Rを固相化した抗CD3抗体で刺激した。

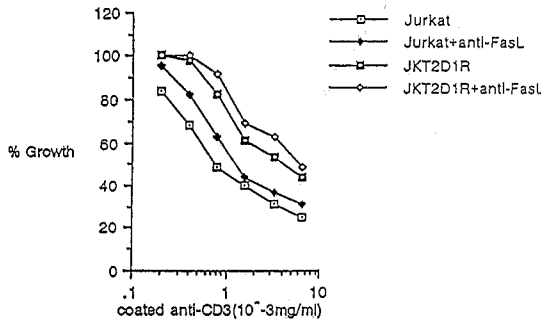


Fig. 1 AICD of Jurkat cells. T cell receptor (TCR) of the Fas-sensitive cell line Jurkat and the Fas-resistant variant cell line JKT2D1R was stimulated by anti-CD3 antibody. AICD in Jurkat was stronger than in JKT2D1R, and AICD was reduced in the presence of anti-FasL antibody. This result suggests that AICD of Jurkat cells is mostly dependent on Fas-mediated apoptosis.

その結果, Jurkat は JKT2D1R よりも明らかに高い AICD 感受性を示した。さらに, これらの細胞の AICD は抗 FasL 抗体 (NOK-1) を加えることにより部分的に抑制された。これらの結果は, Jurkat の AICD は, 少なくとも部分的には Fas 依存性であることを示していた。

3・2 正常ヒト活性化 PBL(LAK 細胞)における NAC 処理後の抗 Fas 抗体刺激によるアポトーシスの抑制

正常ヒト末梢血を採取し, リンパ球を分離した。その後, 2 日間にわたって 1 μ g/ml の PHA と 100 U/ml の (r) IL-2 で刺激した後に, 100 U/ml の (r) IL-2 入り AIM-V で 5 日間培養し実験に用いた。

NAC で処理をしていない LAK 細胞に, 抗 Fas 抗体 (2D1) 2 μ g/ml を加えた場合の生存率は, 52.3%であった。一方, NAC 50 μ M で処理をした場合の生存率は 79.3%, 100 μ M での処理では 85.8%であった (Fig. 2A)。同様の検索を, 個体の異なる正常人の末梢血リンパ球を用いて行った。NAC で処理をしていないコントロール群での生存率は 46.8%であったのに対して, NAC 50 μ M での処理では 78.3%, 100 μ M では 84.6%であった (Fig. 2B)。この結果は, NAC 処理によって, LAK 細胞の Fas を介するアポトーシスが抑制されたことを示している。

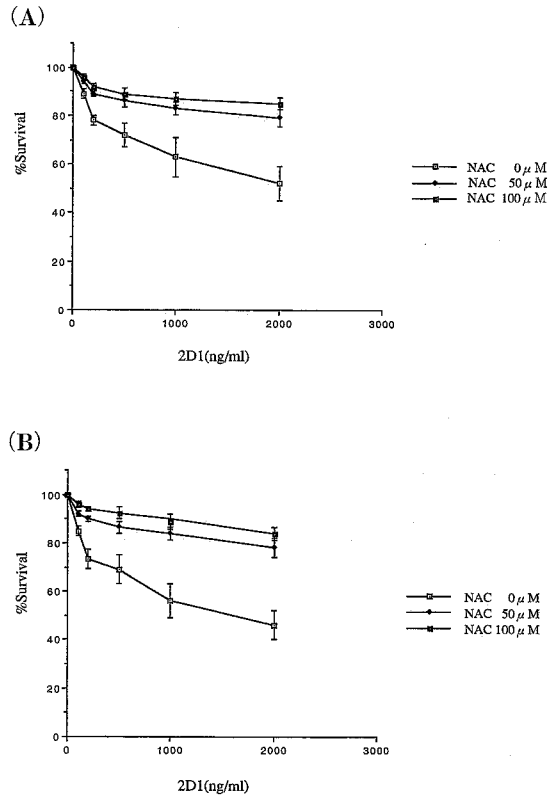


Fig. 2 The effect of NAC on intracellular GSH and Fas sensitivity in activated PBL. PBL obtained from a normal volunteer were cultured in AIM-V medium with PHA and IL-2 for 7 days. The LAK cells were further incubated with NAC for 4 h and intracellular GSH was analyzed. Pretreatment with NAC increased the intracellular GSH level of the LAK cells. Fas sensitivity of LAK cells treated with NAC was analyzed by MTT assay. In the presence of 50 μ M or 100 μ M NAC, induction of apoptosis by antiFas mAb (2D1) was significantly decreased compared to the control LAK cells.

3・3 NAC 処理による LAK 細胞の細胞動態の解析

3・3・1 NAC 処理による LAK 細胞の表面抗原の発現の変化

LAK 細胞を NAC で処理をした後, Fas, CD3, HLA class I の発現の変化を FCM で検討した (Fig. 3A)。これらの抗原は, NAC 処理前後では, その発現には変化は認めなかった。すなわち, NAC での処理では Fas を含めた細胞表面抗原の発現には影響を与えていなかった。NAC 処理が Fas を介する細胞内のアポトーシスのシグナル伝達を変化させることによって, AICD を抑制することが示唆された。

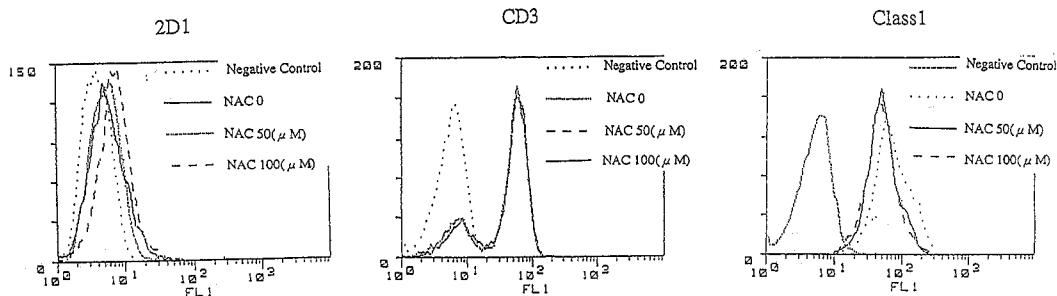


Fig. 3(A) FCM analysis of cell-surface expression of Fas, CD3 and HLA class I after treatment with or without NAC. After incubation with or without NAC, the LAK cells were stained with 2D1, anti-CD3 and anti-Class1 mAb, and analyzed by FCM. Pretreatment of LAK cells with NAC did not alter the surface expression of Fas, CD3 or HLA class I.

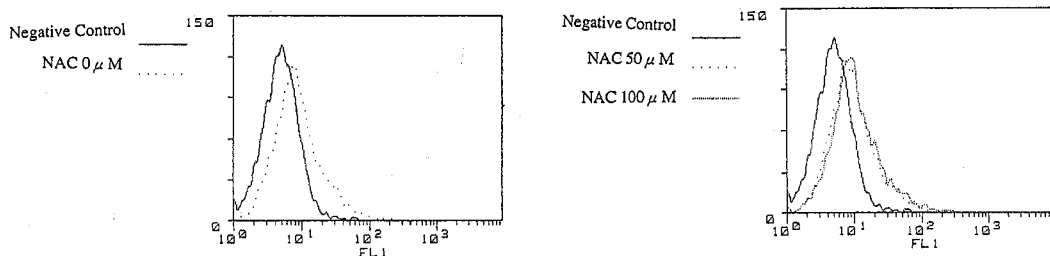


Fig. 3(B) FCM analysis of intracellular expression of TIA-1 after treatment with or without NAC. After incubation with or without NAC, the LAK cells were permeabilized with saponin, stained with TIA-1 monoclonal antibody and analyzed by FCM. Pretreatment of LAK cells with NAC did not alter the intracellular expression of TIA-1.

3・3・2 NAC処理をした後のLAK細胞の細胞内TIA-1の変化

LAK細胞をNACで処理をした後、0.1%のSaponin溶液を加えて、抗TIA-1抗体の反応性をFCMで検討した(Fig. 3B)。コントロール群とNACで処理をした群の間で、細胞質内TIA-1抗原量に変化は認められなかった。このことは、LAK細胞のTIA-1によるperforin dependent killing mechanismは、NAC処理によって影響を受けていないことを示唆していた。

3・4 NAC処理後のLAK細胞の細胞内グルタチオンの増加とTumor necrosis factor (TNF)産生の増加

NACで未処理のLAK細胞のグルタチオンの濃度は1.37 nmol/10⁶ cellsであった。一方、NAC 50 μM、及び100 μMでの処理を行うことによって、グルタチオンの濃度はそれぞれ1.91 nmol/10⁶ cellsと2.59 nmol/10⁶ cellsに上昇した(Fig. 4A)。また、LAK細胞のTNF

の濃度は、コントロール群で69.43 pg/mlであった。一方、50 μM、及び100 μMのNAC処理後には、それぞれ107.15 pg/m、128.82 pg/mlと増加していた(Fig. 4B)。同様の検索を、個体の異なる正常人の末梢血リンパ球を用いて行った。グルタチオン濃度(Fig. 4C)、TNFの濃度(Fig. 4D)の結果は同じであった。

この結果より、LAK細胞の細胞内グルタチオン濃度の増加がFas依存性AICDを抑制し、LAK細胞のTNF産生増加をもたらしたと考えられた。

4 考 察

Fas抗原はアポトーシスを選択的に誘導する細胞表面抗原である²⁵⁾。その際、生体内にリガンドが存在すると、Fas抗原と結合することでアポトーシスが誘導される²⁶⁾。AICDに関してもFas依存性に起こることが示されているが、一方ではFas耐性T細胞白血病株でもAICDが誘導される可能性があり、Fas非依存性の機序も存在することが示されている。今回、抗CD3抗体を用いた

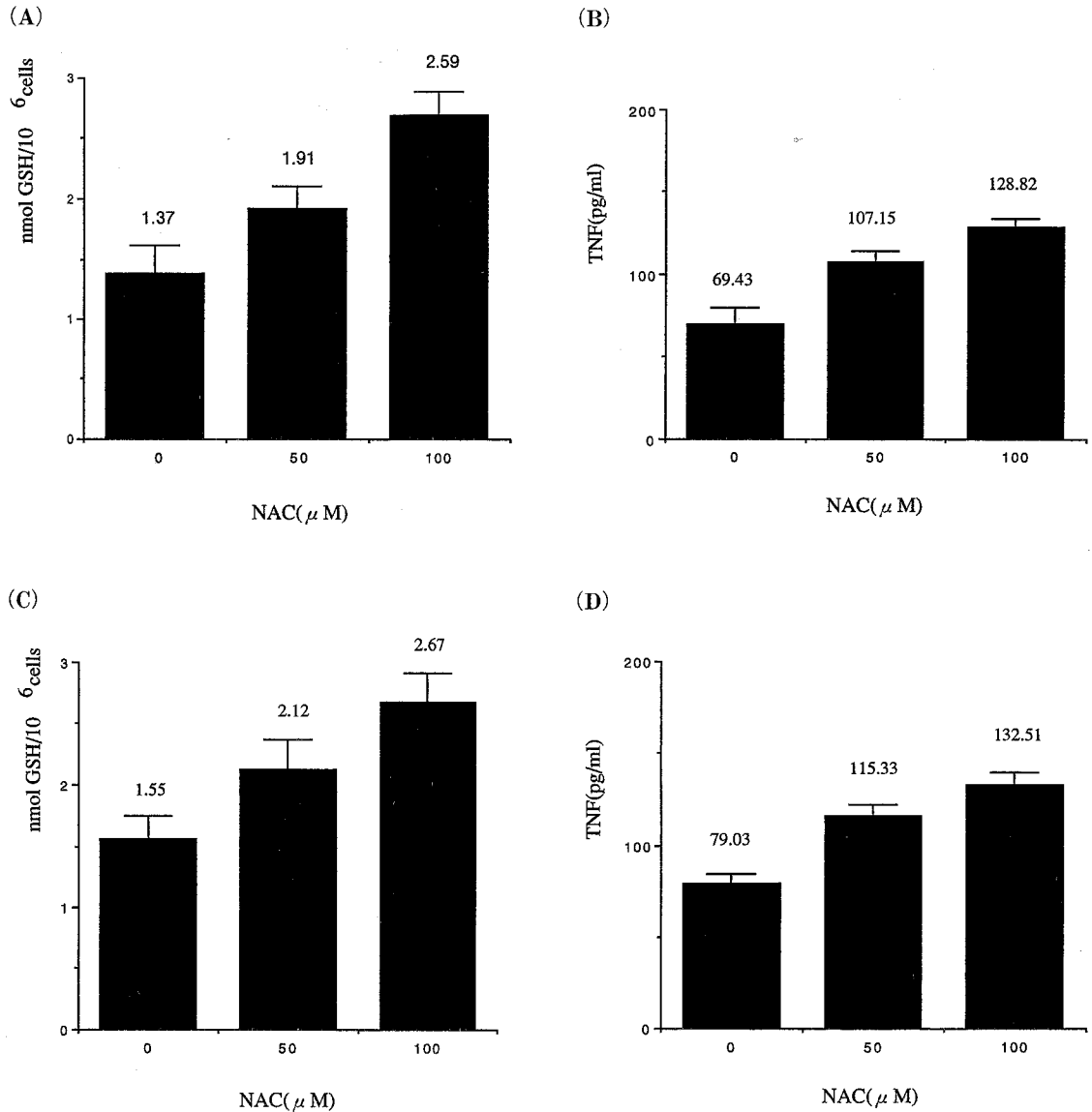


Fig. 4 The effect of NAC on intracellular GSH and TNF production in LAK cells. Pretreatment of LAK cells with NAC increased the intracellular GSH level, and increased TNF production of LAK cells.

AICDの感受性の分析から、Fas感受性細胞(Jurkat)とFas非感受性株(JKT2D1R)との比較を行ったが、JurkatのAICDの感受性が高く、さらにこれらの細胞に抗FasL抗体を加えるとAICDが抑制されることを確認した。この事実は、JurkatにおけるAICDは、少なくとも部分的にはFas依存性であり、グルタチオンの制御を受けることが示唆された。

一方、末梢T細胞においてもFas依存性のAICDが示されている^{14,15,16}。そこで、LAK細胞の細胞内でグ

ルタチオン濃度を増加させてAICDを抑制すれば、LAK細胞による細胞傷害活性が上がる可能性がある。一方、著者らは、LAK細胞をNACで処理することにより、細胞内のグルタチオンの濃度が上昇し、Fasを介するアポトーシスが抑制されることを明らかにした。その際、NAC処理によりFasを含めた細胞表面抗原に変化は見られなかった。このことは、細胞内のグルタチオンの濃度の増加が細胞内のアポトーシスのシグナル伝達を変化させることによってAICDを抑制することを示唆

していた。さらに、NAC処理によりLAK細胞の細胞内グルタチオンの濃度が上昇すると、LAK細胞のTNF産生量も増加していた。このTNF産生量の増加は、グルタチオンによるFas依存性のAICDの減少による効果と考えられた。マウスの腫瘍モデルにおいて、NACの投与により腫瘍の増殖が抑制されたという報告がある²⁷⁾。AICDが抑制されたことでLAK細胞の延命が起こり、このことが抗腫瘍効果の増強の一因となったものと思われる。

細胞傷害性T細胞の多くはパーフォリンを分泌して細胞傷害活性を発揮しているが、ターゲットの細胞に対するFas-ligand/Fasも細胞傷害性T細胞の細胞傷害活性機構の一つであると考えられている²⁸⁾。我々は、Fas感受性株と非感受性株を使ってLAK細胞による細胞傷害性を調べたところ、両細胞間に差は認められなかった¹¹⁾。このことは、LAK細胞はFas-ligand/Fasによって標的細胞に細胞傷害を起こしているのではなく、主としてperforin dependent killing mechanismによって細胞傷害を起こしていることを示していた。パーフォリンは標的細胞に孔を開けるが、それだけではアポトーシスを起こさない。granzyme B (Fragmentation 2, RNKP-1, CPP1) やTIA-1などと呼ばれる一群の酵素がその小孔から標的細胞に送られ、アポトーシスなどの細胞傷害活性をおこすと考えられている²⁹⁾。今回は、その酵素の1つであるTIA-1について検討したが、NAC処理後の細胞内にはTIA-1の抗原量に変化が認められなかった。このことは、NAC処理によって、細胞内グルタチオンの濃度を増加させた場合でも、TIA-1によるperforin dependent killing mechanismには影響を与えないことを示していた。

以上の結果より、NAC処理によって、LAK細胞はターゲットの細胞に対してperforin dependent killingを保ったまま、細胞内グルタチオン濃度の増加によりFasを介するアポトーシスが抑制されることになる。このFas依存性AICDの抑制により、TNFの産生量が増加することが考えられる。このことは、LAK細胞を利用した腫瘍の免疫治療において、NAC投与によってLAK細胞の延命を計ることは、より大きな抗腫瘍効果を期待できる可能性を示している。

5 結 語

正常ヒト活性化PBL (LAK細胞) を用いて、NACで処理をした後のAICDの抑制とキラー活性の増強について検討した。

1) LAK細胞は、NAC処理により細胞内グルタチ

オンが増加し、Fas抗原の発現には影響を与えず、Fasを介するアポトーシスを抑制することを明らかにした。

2) NAC処理によりLAK細胞のFas依存性AICDは抑制され、TNFの産生は亢進を示した。

3) NAC処理によってもLAK細胞内のTIA-1発現量は変化せず、perforin dependent killing mechanismには影響を与えないことを示唆していた。

4) 以上より、NAC処理によるLAK細胞のAICDの抑制がLAK活性を増強させることが示唆され、LAK細胞の延命を計ることは、腫瘍の免疫治療において、有効な手段になり得る可能性を示唆していた。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導と御校閲をいただいた本学病理学第一講座 菊地浩吉名誉教授、ならびに佐藤昇志教授に深謝致します。また、本研究に際し、御教示、御助言を賜った本学整形外科学講座 石井清一教授に厚く御礼申し上げます。

参 考 文 献

1. Nagata S, Golstein P. The Fas death factor. *Science* 1995, 267: 1449-1456.
2. Itoh N, Nagata S. A novel protein domain required for apoptosis. *J Biol Chem* 1993, 268: 10932-10937.
3. Watanabe FR, Brannan CI, Copeland NG, Jenkins NA, Nagata S. Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature* 1992, 356: 314-317.
4. Fisher GH, Rosenberg FJ, Straus SE, Dale JK, Middleton LA, Lin AY, Strober W, Leonardo MJ, Puck JM. Dominant interfering Fas gene mutations impair apoptosis in a human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Cell* 1995, 81: 935-946.
5. Owen-Schaub LB, Yonehara S, Crump III WL, Grimm EA. DNA fragmentation and cell death is selectively triggered in activated human lymphocytes by Fas antigen engagement. *Cell Immunol* 1992, 140: 197-205.
6. Miyawaki T, Uehara T, Nibu R, Tsuji T, Yachie A, Yonehara S, Taniguchi N. Differential expression of apoptosis-related Fas antigen on Lymphocyte subpopulations in human peripheral blood. *J Immunol* 1992, 149: 3753-3758.
7. Shima Y, Nishimoto N, Ogata A, Fujii Y,

- Yoshizaki K, Kishimoto T. Myeloma cells express Fas antigen/Apo-1 (CD95) but only some are sensitive to anti-Fas antibody resulting in apoptosis. *Blood* 1995, 85: 757-764.
8. Takahashi S, Chiba T, Kikuchi K. Intracellular glutathione in cellular immunology. *Tumor Res* 1994, 29: 1-10.
 9. Staal FJT, Anderson MT, Staal GEJ, Herzenberg LA, Gitler C, Herzenberg LA. Redox regulation of signal transduction: Tyrosine phosphorylation and calcium influx. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994, 91: 3619-3622.
 10. Eischen CM, Dick CJ, Leibson PJ. Tyrosine kinase activation provides an early and requisite signal for Fas-induced apoptosis. *J Immunol* 1994, 153: 1947-1953.
 11. Chiba T, Takahashi S, Sato N, Ishii S, Kikuchi K. Fas-mediated apoptosis is modulated by intracellular glutathione in human T cells. *Eur J Immunol* 1996, 26: 1164-1169.
 12. Clipstone NA, Crabtree GR. Identification of calcineurin as a key signaling enzyme in T-lymphocyte activation. *Nature* 1992, 357: 695-697.
 13. Deneke SM, Fanburg BL. Regulation of cellular glutathione. *Am J Physiol* 1989, 257: L163-L173.
 14. Kull FC Jr. The TNF receptor in TNF-mediated cytotoxicity. *Natural Immunity & Cell Growth Regulation*, 1988: 7(5-6) 254-265.
 15. Klostergaard J. Role of tumor necrosis factor in monocyte/macrophage tumor cytotoxicity in vitro. *Natural Immunity & Cell Growth Regulation*, 1987: 6(4) 161-166.
 16. Brunner T, Mogil RJ, LaFace D, Yoo NJ, Mahboubi A, Echeverri F, Martin SJ, Force WR, Lynch DH, Ware CF, Green DR. Cell-autonomous Fas (CD95)/Fas-ligand interaction mediates activation-induced apoptosis in T-cell hybridomas. *Nature* 1995, 373: 441-444.
 17. Dhein J, Walczak H, Baumler C, Debatin KN, Krammer PH. Autocrine T-cell suicide mediated by APO-1/(Fas/CD95). *Nature* 1995, 373: 438-441.
 18. Ju ST, Panka DJ, Cui H, Ettinger R, el-Khatib M, Sherr DH, Stanger BZ, Marshak-Rothstein A. Fas (CD95)/FasL interactions required for programmed cell death after T-cell activation. *Nature* 1995, 373: 444-448.
 19. Takahashi S, Sato N, Takayama S, Ichimiya S, Sato M, Hyakumachi N, Kikuchi K. Establishment of apoptosis-inducing monoclonal antibody 2D1 and 2D1-resistant variants of human T cell lines. *Eur J Immunol* 1993, 2: 1935-1941.
 20. Espevik T, Nissen-Meyer J. A highly sensitive cell line, WEHI 164 clone 13, for measuring cytotoxic factor/tumor necrosis factor from human monocytes. *J Immunol Methods* 1986, 95: 99-105.
 21. Takahashi S, Maecker MT, Levy R. DNA fragmentation and cell death mediated by T cell antigen receptor/CD3 complex on a leukemia T cell line. *Eur J Immunol* 1989, 19: 1911-1919.
 22. Anderson P, Blue ML, O'Brien C, Schlossman SF. Monoclonal antibodies reactive with the T cell receptor zeta chain: Production and characterization using a new method. *J Immunol* 1989, 143: 1899-1904.
 23. Anderson P, Nagler-Anderson C, O'Brien C, Levine H, Watkins S, Slayter HS, Blue ML, Schlossman SF. A monoclonal antibody reactive with a 15 kd cytoplasmic granule associated protein defines a subpopulation of CD8⁺ T lymphocytes. *J Immunol* 1990, 144: 574-582.
 24. Schick MR, Nguyen VQ, Levy S. Anti-TAPA-1 induce protein tyrosine phosphorylation that is prevented by increasing intracellular thiol levels. *J Immunol* 1993, 151: 1918-1925.
 25. Itoh N, Yonehara S, Ishii A, Yonehara M, Mizushima S, Sameshima M, Hase A, Seto Y, Nagata S. The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell* 1991, 6: 233-243.
 26. Suda T, Takahashi T, Golstein P, Nagata S. Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a noble member of the tumor necrosis factor family. *Cell* 1993, 75: 1169-1178.
 27. Yim CY, Hibbs JJB, Mcgregor JR, Galinsky RE, Samlowski WE. Use of N-acetyl cysteine to increase intracellular glutathione during the induction of antitumor responses by IL2. *Immunol* 1994, 152: 5796-5805.
 28. Kagi D, Vignaux F, Ledermann B, Burki K, Depraetere V, Nagata S, Hengartner H, Golstein P. Fas and perforin pathways as major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity. *Science* 1994, 265: 528-530.
 29. Berke G. The binding and lysis of target cells by cytotoxic lymphocytes; Molecular and cellular aspects. *Annu Rev Immunol* 1994, 11: 735-773.

別刷請求先:

(〒060-8543) 札幌市中央区南1条西16丁目

札幌医科大学医学部整形外科学講座 山本英順