

原 著

珪肺症例 T 細胞における膜 Fas 発現

大 槻 剛 巳¹⁾ 高 田 晶 子¹⁾ 植 木 絢 子²⁾
三 浦 由 恵¹⁾ 西 村 泰 光¹⁾ 草 加 勝 康³⁾
勝 山 博 信⁴⁾

1) 川崎医科大学衛生学

2) 川崎医療福祉大学医療福祉学部医療福祉環境デザイン学科

3) 草加病院内科

4) 川崎医科大学公衆衛生学

Expression of surface Fas receptor in CD4+T lymphocytes derived from patients with silicosis

Takemi Otsuki¹⁾ Akiko Takata¹⁾ Ayako Ueki²⁾
Yoshie Miura¹⁾ Yasumitsu Nishimura¹⁾
Masayasu Kusaka³⁾ Hironobu Katsuyama⁴⁾

1) Department of Hygiene, Kawasaki Medical School,

2) Department of Medical Welfare and Environmental Design, School of Medical Welfare, Kawasaki University of Medical Welfare,

3) Department of Internal Medicine, Kusaka Hospital,

4) Department of Public Health, Kawasaki Medical School

要約

珪肺症では自己免疫疾患の合併が知られており、我々は、リンパ球のアポトーシスに関連が深い Fas 受容体とその関連分子の異常について、これまで検討してきた。その結果、珪肺症の血清では可溶性 Fas が高値を示し、末梢血単核球での *fas* 遺伝子の発現は、可溶性 *fas* 発現が野生型 *fas* に比し有意に亢進していること、同様に Fas 分子と同様な機能を有する *decoy receptor 3 (dcr3)* 遺伝子の発現亢進、多くの選択的スプライシング異型の *fas transcripts* が検出され、自己抗体についても caspase-8 や Fas に対する自己抗体が認められた。今回は、健常人と珪肺症例のリンパ球膜表面 Fas 発現の解析データを再度洗い直した結果、陽性率としては差が無くても平均蛍光強度では珪肺症群で減弱していることが判明した。そこで、新たに珪肺症例の CD4+T細胞を、膜表面 Fas の比較的低発現群 (mFas^{LOW}) と比較的高発現群

受付：平成17年10月3日 採用：平成17年11月21日

別刷請求宛先：大槻剛巳

〒701-0192 倉敷市松島577 川崎医科大学衛生学

Received: October 3, 2005 Accepted: November 21, 2005

Reprint Requests to Takemi Otsuki, Department of Hygiene, Kawasaki Medical School, 577 Matsushima, Kurashiki, Okayama 701-0192 Japan

(mFas^{HIGH}) に分けてフローサイトメーターにて収集し、その細胞での可溶性 *fas* と野生型 *fas* の発現を SYBR-G を用いたリアルタイム PCR で検討した。その結果、mFas^{LOW} では、可溶性 Fas 発現が強く起こっていることが判明した。このことは、我々がこれまで考案していた珪肺症例の末梢血 T 細胞には 2 群存在し、膜 Fas 低発現、可溶性 *fas* 遺伝子高発現、抗 Fas 自己抗体抵抗性 (膜 Fas 低発現のため) であり、細胞外での Fas ligand と膜 Fas の結合が阻害されている群と、逆に膜 Fas 高発現、野生型 *fas* 遺伝子高発現、抗 Fas 自己抗体感受性であり、アポトーシスに陥っては、また、骨髄から動員されているような一群があるという想定を強く支持するものであった。前者には、自己認識クローンが含まれている可能性があり、今後、想定されている群の分子細胞学的特性の検討が必要であると思われる。

(臨床環境14 : 119~127, 2005)

Abstract

Since autoimmune diseases are often a complication in silicosis patients (SIL), we have been investigating Fas and Fas-related molecules, which are known to play important roles in the occurrence of autoimmune disorders. Our results revealed, elevated serum soluble Fas levels with dominantly expressed alternatively spliced variants of *fas* messages including soluble *fas* as compared with the wild-type *fas* message, and elevated levels of the *decoy receptor 3 (dcr3)* message, which functions similarly to soluble Fas. In addition, it has been assumed, based on factor analysis, that a small number of silicosis patients develop immunological diseases without presenting with respiratory disorders after exposure to silica compounds. In addition, many autoantibodies have been found in these patients, including anti-Fas and caspase-8 autoantibodies. In this study, we re-analyzed the data which we had previously collected to examine the membrane Fas expression on lymphocytes from healthy donors (HD) and SIL. Then, a higher mean fluorescent intensity in SIL than HD had been found, although there was no difference in the membrane Fas positive rate between HD and SIL. As for the elevated soluble *fas* gene expression in peripheral blood mononuclear cells from SIL, the lower expresser of membrane Fas (mFas^{LOW}) in lymphocytes from SIL may transcribe higher soluble *fas* than the higher expresser of membrane Fas (mFas^{HIGH}) after sorting mFas^{LOW} and mFas^{HIGH} cells from among CD4+ T cells from SIL with a FACSAria[®] flow-cytometer, soluble and wild-type *fas* expression was analyzed using a real-time RT-PCR with SYBR-G. The results showed the mFas^{HIGH} fraction to be the high expresser for wild-type *fas* and mFas^{LOW} to be that for soluble *fas*. Therefore, we assume that there are two groups of lymphocytes in SIL, one showing lower membrane Fas expression due to the higher transcription of soluble *fas*, resistance to the Fas-stimulating anti-Fas autoantibody and inhibition of contact between the Fas ligand and membrane Fas. These features may cause reduced apoptosis and long-term survival. The other group, on the other hand, exhibits higher membrane Fas expression with reduced expression of inhibitory molecules such as *surviving*, *sentrin*, *icad/df45* and *i-flice*, and is sensitive to the anti-Fas autoantibody, and enhancement of Fas-mediated apoptosis. The former may include self-recognizing clones and later may be recruited from bone marrow after apoptosis. Future study is required to clarify the cellular and molecular characteristics of these two hypothesized fractions.

(Jpn J Clin Ecol 14 : 119~127, 2005)

《Key words》 silicosis, Fas, alterenative splicing. autoimmunity

I. 緒言

珪肺症例では、呼吸器障害のみならず免疫系の異常、中でも、自己抗体の検出や自己免疫疾患の合併などの自己寛容の破綻が多く認められること

が知られている^{1~4)}。我々はこれまでに、耐火煉瓦工場の従業員のうち、塵肺症と診断された症例の中で、何等、特異的な自己免疫疾患の症状を呈していない症例の検体を用いて、トポイソメラー

ゼI、caspase 8、Fasなどに対する自己抗体の検出を報告してきた^{5~11)}。また、同様の症例の中では、自己認識T細胞のアポトーシスに強く関連するFas分子についての検討も進めてきており、珪肺症例血清中には、膜受容体型のFas分子とそのリガンドであるFas ligandの結合を細胞外で競合的に阻害する*fas*遺伝子の選択的splicing variantである可溶性Fas分子が高値を示す¹²⁾、末梢血単核球における遺伝子発現レベルにおいても、健常人と比較して珪肺症例では可溶性*fas*遺伝子発現が野生(膜)型(wild(membrane) type) *fas*発現に比し優位となっていること¹³⁾、可溶性Fas分子と同様の機能を有する*decoy receptor 3 (dcr 3)* 遺伝子発現も同様に珪肺症例で健常人に比し相対的に優位になっていること¹⁴⁾、あるいは、*fas*遺伝子は*fas* ligand遺伝子のアミノ酸置換を伴うような突然変異は生じていないけれども、可溶性*fas*同様のFas ligandとの結合部位は有しながら膜貫通領域を欠いている。即ち、タンパク質として形成された後には細胞外に出て、そこでFas ligandと膜Fasとの結合を阻害するであろうその他の選択的splicing variantsも多く検出されること¹⁵⁾などを報告してきた。また、これら免疫異常の進行は、呼吸障害とは別の病像を呈する症例も少なからず存在する可能性があり¹⁶⁾、これらには個人的素因、例えば、HLAなども関与する可能性を示唆してきた^{6, 7, 9, 10)}。

これまでの結果より、検討が進んでいなかった点として、珪肺症の末梢血リンパ球の膜表面Fas分子の陽性率は健常人と変わらないにもかかわらず、可溶性Fasの高値・高発現が認められたという結果の解釈が困難であった。そこで、健常人と珪肺症例の末梢血のリンパ球の膜表面Fas分子の結果を再検討し、膜表面Fas陽性細胞の平均蛍光強度を珪肺症と健常人で比較してみることとした。これは、もし細胞当たりの*fas*発現量がそれほど変わらないとすると、可溶性*fas*発現亢進のあるリンパ球では野生型遺伝子発現が減弱しており、結果として膜Fasは陽性であっても低発現になっている想定されるからである。即ち、膜Fas高発現細胞では遺伝子発現も野生型優位

であり、膜Fas低発現細胞では可溶性*fas*遺伝子発現優位となっているであろうという理解である。その証明のために、新たに症例のリンパ球より膜発現の高い細胞群と低い細胞群をフローサイトメーターにて収集して遺伝子発現を検討したので、報告する。

なお、自己免疫疾患における可溶性Fasの増加については、多くの報告がなされている^{17~20)}。しかし、末梢血リンパ球分画での膜Fas発現の度合いにより分画して野生型/膜型*fas*と可溶性*fas*の責任発現リンパ球としての意義付けをした報告は著者らの知る限り無く、本研究はこの点で、詳細な病態の解釈を導いてくれると考える。

II. 対象および方法

1. 対象

末梢血リンパ球における膜表面Fas発現についての解析は、1995年から1997年にかけて、岡山県備前市草加病院で経過観察中のじん肺健診にて塵肺症の診断が付いている耐火煉瓦工場従業員の症例(52名、男46名、女6名、平均年齢67.8歳)ならびに川崎医科大学にて健康診断を受けた健常人(30例、男16名、女14名、平均年齢64.7歳)の末梢血より採血し検討報告したデータ^{12, 30)}の再検討という形で行われた。また、今回新たに19例の珪肺症例ならびに一人の健常人のヘパリン加末梢血を採取した。すべての検体はインフォームドコンセントが得られた症例ならびに健常人より採取され、この研究は川崎医科大学倫理委員会の承認を得て行われた。

2. リンパ球膜Fas発現

末梢血リンパ球における膜表面Fas発現についての解析は、既報告の通りである^{12, 30)}。ヘパリン加末梢血よりFicoll-Hypaque法にて単核球を分離し、Fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識抗ヒトFas抗体(MBL Co. Ltd., Nagoya, Japan)にて室温、30分間染色、phosphate buffered saline (PBS)にて洗浄後、FACSCalibur™ (BD Bioscience, San Jose, CA)フローサイトメーターにて解析した。既報では非染色検体との比較によるリンパ球分画のFas陽性細胞率(%)

のみ提示したが^{12,30)}、今回、平均蛍光強度 (mean fluorescent intensity: MFI) の検討を行った。

3. CD4+Tリンパ球膜表面 Fas 発現の比較的低発現細胞 (mFas^{LOW}) と高発現細胞 (mFas^{HIGH}) の収集

mFas^{LOW} と mFas^{HIGH} の採集については、FACSAriaTM (BD Bioscience) フローサイトメーターを用いて行われた。今回、新たにヘパリン加採取された症例ならびに健常人の末梢血 5 ml より、末梢血単核球を分離、その後 FITC 標識抗ヒト Fas 抗体と phycoerythrin (PE) 標識抗ヒト CD4 抗体で室温30分間二重染色を行い、PBS 洗浄後に解析と収集に供与した。なお、収集後の純度は、再度フローサイトメーターで解析し、95% 以上であることを確認した。

4. mFas^{LOW} と mFas^{HIGH} における野生型ならびに可溶性 fas 遺伝子発現の解析

可溶性 fas は、野生型 fas の選択的翻訳異常により、膜貫通ドメインの63bp が欠失している型である。そのため、個々の (mFas^{LOW} と mFas^{HIGH}) における両 fas 発現の検討は、fluorescence thermocycler (Mx3000PR QPCR System, Stratagene Corporation, La Jolla, CA) を使用し、SYBR-G 染色によるリアルタイム RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction) 法にて行った。なお、PCR 産物の確認はエチジウムブロマイド染色も合わせて行い、解析可能な PCR であったかどうかの判断を行った。使用したプライマーの塩基配列は以下のとおりである；野生型 fas: forward: 5'-TGTGTGATGAAGGACATGGC-3', reverse: 5'-CCAAACAATTAGTGAATTG-3', 可溶性 fas: forward: 5'-GAA GGACATGGCTTAGAAGTGG-3', reverse: 5'-TCACTTCCTCTTTGCACTTGGTG-3'。

III. 結果

1. 膜 Fas 陽性率と MFI の比較

既報と同様、図1-Aに示すように健常人 (HD; healthy donors) と珪肺症例 (SIL; silicosis patients) との間に、リンパ球膜表面 Fas 発現陽性率の差は認められなかった。しかし、今回、新

たに MFI の検討を行ってみると、図1-Bに示すように、有意に珪肺症で低値であった。

2. リンパ球膜 Fas 発現と mFas^{LOW} と mFas^{HIGH} 分画

陽性率に差がないにも関わらず、MFI の違いが顕著であることの原因を検討する目的で、実際の解析画像を再検討した。図2には、左側に健常人、右側に珪肺症のそれぞれ2例の結果を示すが、健常人では、陽性の中でも蛍光強度が高い細胞が多く、反対に珪肺症では、低い細胞が多いことが判明した。

我々は、リンパ球膜表面の Fas 陽性率を検討した際に、症例の血清中の可溶性 Fas 分子が健常人に比し高値を示していること、また、症例末梢血単核球を用いた遺伝子発現の検討にて、野生

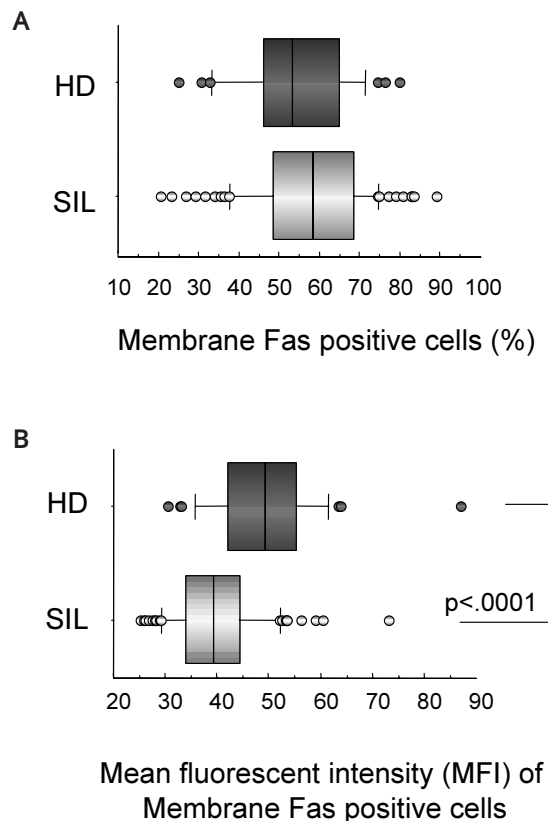


図1 珪肺症 (SIL) ならびに健常人 (HD) における [A] 膜表面 Fas 発現陽性率 (%) と [B] 陽性細胞における平均蛍光強度 (Mean fluorescent intensity: MFI) の比較

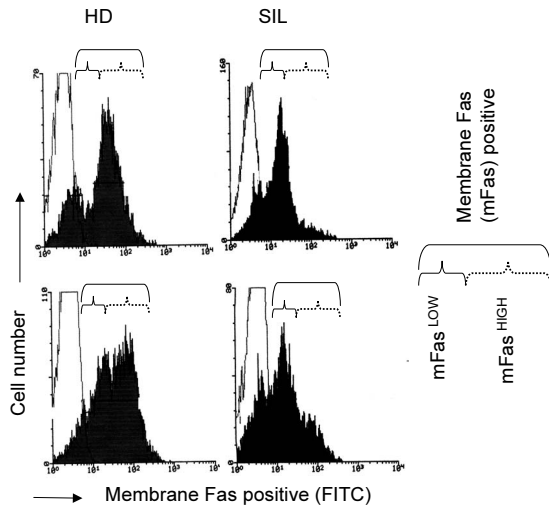


図2 膜 Fas のフローサイトメーター解析における実際の解析図

健康人 (HD) 2 例 (左列の上下) と珪肺症 (SIL) 2 例 (右列上下) の実際の解析図を示す。白抜きは細胞のみの対照。塗りつぶしが膜 Fas 陽性細胞の分布を示す。図 1-A の陽性率は図 2 右端に示すように全体の陽性細胞の率のみを示したが、詳細に検討すると、健康人では陽性度の高い細胞集団が多く、珪肺症では低いものが多い傾向にある。このことは、図 1-B で認められた MFI の差を生じていると考えられる。よって、膜 Fas 陽性細胞で、mFas^{LOW} と mFas^{HIGH} の 2 つの分画を規定した。

(膜) 型 *fas* に比し、可溶性 *fas* の発現亢進が生じていることを報告してきた^{12,13,30)}。これらの結果より、もし、珪肺症において個々のリンパ球当たりの *fas* 発現自体に大きな変化がもたらされてはいないとすると、可溶性 *fas* 発現が高い細胞では、相対的に野生 (膜) 型 *fas* 発現が減少していると想定され、それは、即ち、膜に結合している Fas 分子の量の減少、すなわち解析上は膜表面 Fas としては陽性であっても、蛍光強度の低下として表れると考えられる。

3. mFas^{LOW} と mFas^{HIGH} 分画における野生型ならびに可溶性 *fas* 発現の解析

この仮定を検証する目的で、今回、新たに19例の珪肺症例と1名の健康人の末梢血を検討に供した。対象と方法に記したように図2で示す mFas^{LOW} と mFas^{HIGH} のそれぞれの分画の細胞を収集し、遺伝子発現をリアルタイムRT-PCR法

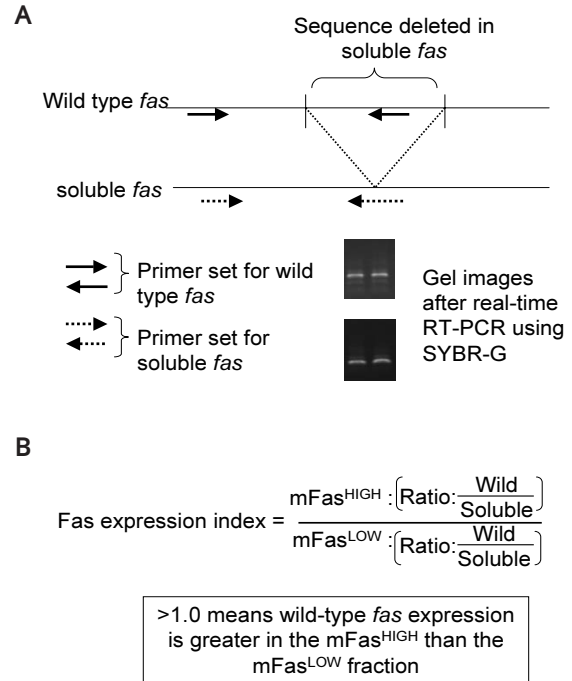


図3 リアルタイム RT-PCR 法を用いた mFas^{LOW} と mFas^{HIGH} の 2 つの分画における Fas expression index 計算

[A] には、プライマーの設定とそれぞれの RT-PCR にて単一産物として確認された増幅産物の一例を示す。[B] では、Fas expression index の計算式を示す。詳細は、本文中。

にて解析した。図 3-A で示すように、野生型 *fas* を増幅するプライマーは可溶性 *fas* で欠失している 63bp の中に reverse プライマーを設定、また、可溶性 *fas* 用のプライマーでは、欠失後に新たに再結合した塩基配列に reverse プライマーを設定した。図中にあるように、それぞれは単一増幅産物が得られるような設定であり有効に解析を行っていた。

もし上記の仮定が正しいとすると、mFas^{HIGH} 分画では野生型 *fas* 発現が可溶性 *fas* 発現に比し高発現となっており、mFas^{LOW} 分画では反対に可溶性 *fas* の高発現が見られると考えられる。収集した mFas^{LOW} と mFas^{HIGH} のそれぞれの分画の細胞よりの cDNA を用いて野生型ならびに可溶性 *fas* 発現を検討し、そのサイクル数の比 (図 3-B で示される [Ratio: Wild/soluble]) が、mFas^{LOW} よりも mFas^{HIGH} で高いとすると (前記の [Ratio:

Wild/soluble] を、再度 [mFas^{HIGH}/mFas^{LOW}] として比で表す (=Fas expression index) この仮定が合っていることになる。すなわち、Fas expression index が 1 以上であれば、その症例では、mFas^{HIGH} 分画で野生型 *fas* 発現優位、mFas^{LOW} 分画では反対に可溶性 *fas* 優位の発現となっていることになる。なお、この検討では、健常人であっても症例であっても Fas expression index は 1 を越えると想定される。

4. Fas expression index の結果

図 4 に示すように、Fas expression index は、2 例の珪肺症を除き、17 例の珪肺症例と 1 例の健常人において、1 以上を示し、10 以上の症例も 4 例認められた (2 回の解析の平均を示す)。このことは、mFas^{HIGH} 分画で野生型 *fas* 発現優位、mFas^{LOW} 分画では反対に可溶性 *fas* 優位の発現となっていることを証明し、珪肺症例で MFI が低値であったこと、mFas^{LOW} 分画が多かったこと、血清可溶性 Fas が高値であったことは、一連の変化の中で起こっており、長期間の珪酸曝露に伴って T 細胞での Fas 発現の変化がもたらされ、mFas^{HIGH} 分画よりも mFas^{LOW} 分画優位となっていること、しかし、劣勢な mFas^{HIGH} 分画も同時

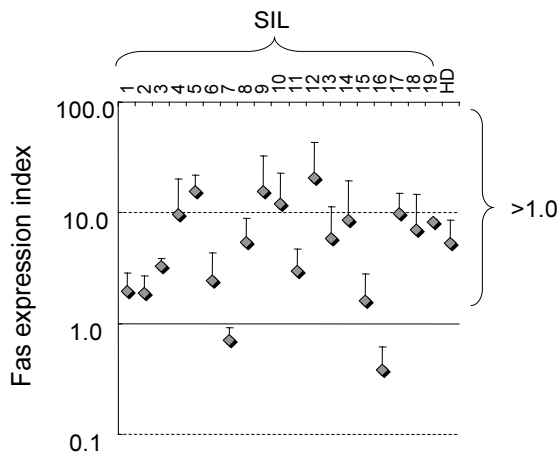


図 4 Fas expression index の結果

珪肺症例 19 例中 17 例と 1 例の健常人で Fas expression index は 1.0 以上であり、これは、これらのケースでは、mFas^{LOW} と細胞にて可溶性 *fas* 発現が優位に行われており、反対に mFas^{HIGH} 分画では、野生型 *fas* 発現となっていることを示す。

に存在していると想定されることを示している。

なお、健常人においても、mFas^{LOW} 分画が可溶性 *fas* 発現分画であったことは今回の推論では理解し得る結果であり、我々の既報でも健常人末梢血単核球に弱いながら可溶性 *fas* 発現が認められている。その上で、病態として問題になる点は、健常人であれば、mFas^{HIGH} 分画優位となっているにも関わらず、珪肺症例で mFas^{LOW} 分画優位である点と考えられる。但し、健常人検体の解析も引き続き行った上で、この確証を強固にしたいと考える。

IV. 考察

我々のこれまでの珪肺症例での免疫異常の結果を抜粋してみると、

- i. 血清可溶性 Fas の高値^{12,30)}
- ii. 末梢血単核球での可溶性 *fas* 発現の高値¹³⁾
- iii. 同様に可溶性 Fas と同じ機能の *dcr3* 遺伝子発現の高値¹⁴⁾
- iv. 珪肺症末梢血単核球では、可溶性 *fas* と機能の類似が想定される alternative splicing variants の高頻度の検出¹⁵⁾
- v. 末梢血単核球で細胞内 Fas 媒介アポトーシスに対して抑制的に働く *sentrin*, *i-flice*, *icad/df45* や *survivin* の遺伝子発現の減弱^{31,32)}
- vi. 約 1/4 の珪肺症例での血清中の抗 Fas 自己抗体の検出と抗 Fas 自己抗体の Fas 媒介アポトーシス誘導性^{33,34)}

などが、挙げられる。

これらのうち、i・ii・iii・iv は細胞外で膜表面 Fas に媒介されるアポトーシスを阻害する方向に働く結果と解釈される。一方、v・vi は、細胞内で Fas 媒介アポトーシスが進行している、あるいは、その進行を誘導するように働く因子があることを示唆している。即ち、これまでも著者らは、これらの結果より、珪肺症のリンパ球では、2 群の細胞群があり、一群では Fas 媒介アポトーシスが減弱させられており、他群では、逆に亢進しているのではないかと想定してきた^{31,35,36)}。

この想定に今回の結果、すなわち珪肺症の CD4+T 細胞において Fas 発現で区別すると

mFas^{LOW} と mFas^{HIGH} の二群の細胞集団があり、mFas^{LOW} が可溶性 Fas 産生細胞で構成されているということを照合してみると、図5に示すごとく、mFas^{LOW} が可溶性 fas や *der3* の過剰発現、あるいは他の選択的翻訳異型の産生に与り、また、膜 Fas の低発現により Fas 媒介アポトーシス誘導性の抗 Fas 自己抗体に対し抵抗性の強い群と想定される。反対に、mFas^{HIGH} では、抗 Fas 自己抗体によるアポトーシス誘導に感受性高く、Fas 媒介アポトーシスの亢進が起っており、その結果、抑制的分子の発現も相対的に減弱していると考えられる。

我々は、実験系で健康人末梢血 T 細胞における早期活性化指標である CD69 分子の誘導は、アスベストとの共培養では起こらないにも関わらず、珪酸との共培養で惹起されることを報告した³⁷⁾。これは、珪肺症例においては、長期慢性反復性の珪酸曝露あるいは体内繫留珪酸とのリンパ球の邂逅等により T 細胞は緩い活性化とその後の AICD (activation induced cell death)^{38~41)} を起こしている可能性を示唆するものである。

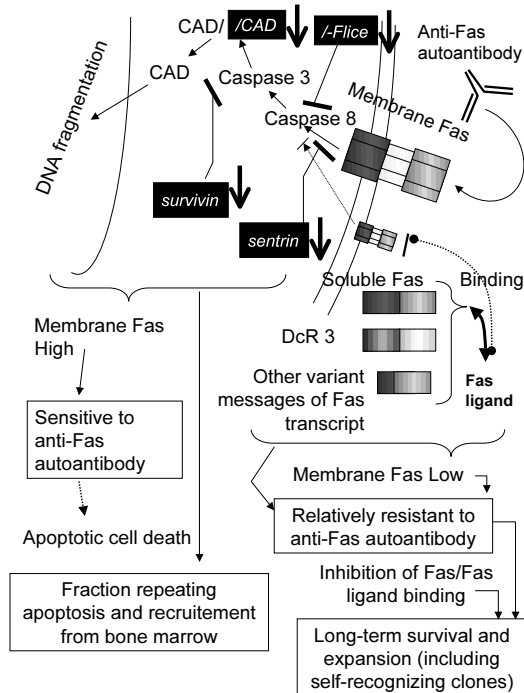


図5 珪肺症例の T 細胞での二群の想定

よって、上記の二群の細胞集団のうち、mFas^{LOW} は、長期生存群でありおそらく自己認識クローンなどが含まれていると考えられるし、反対に mFas^{HIGH} は、細胞死に陥り、また、骨髄より動員されるという状況を繰り返している一群と想定される。

今後、この両群の細胞の特徴付けを種々の分子生物学的な側面から検討し、珪肺症における自己免疫異常発症の原因の追究を行うとともに、自己免疫異常の病態の解明の一助、あるいは、珪酸曝露等への分子予防標的の解明に努力したい。

謝辞

川崎医科大学衛生学ならびに組織培養免疫センターの研究補助員であります坂口治子氏、幡山圭代氏および畑田聡美氏には研究において多大な技術的援助を受けました。また、川崎医科大学衛生学 兵藤文則博士には、貴重なご助言を頂きました。ここに深謝いたします。なお、本論分の一部は、川崎医科大学プロジェクト研究費 (16-401M、17-611O) ならびに日本学術振興会研究費補助金 (16390175) のサポートを得て遂行されました。

文献

- 1) Benedek TG: Rheumatoid pneumoconiosis. Documentation of onset and pathogenic considerations. *Am J Med* 55: 515-524, 1973
- 2) Uber CL, McReynolds RA: Immunotoxicology of silica. *Crit Rev Toxicol* 10: 303-319, 1982
- 3) Steenland K, Goldsmith DF: Silica exposure and autoimmune diseases. *Am J Ind Med* 28: 603-608, 1995
- 4) Shanklin DR, Smalley DL: The immunopathology of silicosis. History, clinical presentation, and relation to silicosis and the chemistry of silicon and silicone. *Immunol Res* 18: 125-173, 1998
- 5) Ueki H, Kohda M, et al: Antidesmoglein autoantibodies in silicosis patients with no bullous diseases. *Dermatology* 202: 16-21, 2001
- 6) Ueki A, Isozaki Y, et al: Autoantibodies

- detectable in the sera of silicosis patients. The relationship between the anti-topoisomerase I antibody response and HLA-DQB1*0402 allele in Japanese silicosis patients. *Sci Total Environ* 270: 141-148, 2001
- 7) Ueki A, Isozaki Y, et al: Different distribution of HLA class II alleles in anti-topoisomerase I autoantibody responders between silicosis and systemic sclerosis patients, with a common distinct amino acid sequence in the HLA-DQB1 domain. *Immunobiology* 204: 458-465, 2001
 - 8) Tomokuni A, Otsuki T, et al: Detection of Anti-topoisomerase I autoantibody in patients with silicosis. *Environ Health Prev Med* 7: 7-10, 2002
 - 9) Ueki A, Isozaki Y, et al: Intramolecular epitope spreading among anti-caspase-8 autoantibodies in patients with silicosis, systemic sclerosis and systemic lupus erythematosus, as well as in healthy individuals. *Clin Exp Immunol* 129: 556-561, 2002
 - 10) Ueki A, Isozaki Y, et al: Anti-caspase-8 autoantibody response in silicosis patients is associated with HLA-DRB1, DQB1 and DPB1 alleles. *J Occup Health* 47: 61-67, 2005
 - 11) Takata-Tomokuni A, Ueki A, et al: Detection, epitope-mapping and function of anti-Fas autoantibody in patients with silicosis. *Immunology* 116: 21-129, 2005
 - 12) Tomokuni A, Aikoh T, et al: Elevated soluble Fas/APO-1 (CD95) levels in silicosis patients without clinical symptoms of autoimmune diseases or malignant tumours. *Clin Exp Immunol* 110: 303-309, 1997
 - 13) Otsuki T, Sakaguchi H, et al: Soluble Fas mRNA is dominantly expressed in cases with silicosis. *Immunol* 94: 258-262, 1998
 - 14) Otsuki T, Tomokuni A, et al: Overexpression of decoy receptor 3 (DcR3) gene in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) derived from silicosis cases. *Clin Exp Immunol* 119: 323-327, 2000
 - 15) Otsuki T, Sakaguchi H, et al: Detection of alternatively spliced variant messages of Fas gene and mutational screening of Fas and Fas ligand coding regions in peripheral blood mononuclear cells derived from silicosis patients. *Immunol Lett* 72: 137-143, 2000
 - 16) Otsuki T, Ichihara K, et al: Evaluation of cases with silicosis using the parameters related to the Fas-mediated apoptosis. *Int J Mol Med* 4: 407-411, 1999
 - 17) Tokano Y, Miyake S, et al: Soluble Fas molecule in the serum of patients with systemic lupus erythematosus. *J Clin Immunol* 16: 261-265, 1996
 - 18) Jodo S, Kobayashi S, 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: 89-95, 1997
 - 19) Kovacs B, Szentendrei T, et al: Persistent expression of a soluble form of Fas/APO1 in continuously activated T cells from a patient with SLE. *Clin Exp Rheumatol* 15: 19-23, 1997
 - 20) Inoue A, Koh CS, et al: Detection of the soluble form of the Fas molecule in patients with multiple sclerosis and human T-lymphotropic virus type I-associated myelopathy. *J Neuroimmunol* 75: 141-146, 1997
 - 21) Nozawa K, Kayagaki N, et al: Soluble Fas (APO-1, CD95) and soluble Fas ligand in rheumatic diseases. *Arthritis Rheum*: 1126-11129, 1997

- 22) Zipp F, Weller M, et al: Increased serum levels of soluble CD95 (APO-1/Fas) in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Ann Neurol* 43: 116-120, 1998
- 23) Shimaoka Y, Hidaka Y, et al: Serum concentration of soluble Fas in patients with autoimmune thyroid diseases. *Thyroid* 8: 43-47, 1998
- 24) Hamzaoui K, Hamzaoui A et al: Levels of soluble Fas/APO-1 in patients with Behcet's disease. *Mediators Inflamm* 7: 111-114, 1998
- 25) Fujihara T, Takeuchi T, et al: Serum soluble Fas/APO-1 is increased in patients with primary Sjogren's syndrome. *Clin Rheumatol* 17: 496-499, 1998
- 26) Hiromatsu Y, Bednarczuk T, et al: Increased serum soluble Fas in patients with Graves' disease. *Thyroid* 9: 341-345, 1999
- 27) Al-Maini MH, Mountz JD, et al: Serum levels of soluble Fas correlate with indices of organ damage in systemic lupus erythematosus. *Lupus* 9: 132-139, 2000
- 28) Boylan MT, Crockard AD, et al: Serum and cerebrospinal fluid soluble Fas levels in clinical subgroups of multiple sclerosis. *Immunol Lett* 78: 183-187, 2001
- 29) Wang CY, Zhong WB, et al: Circulating soluble Fas ligand correlates with disease activity in Graves' hyperthyroidism. *Metabolism* 51: 769-773, 2002
- 30) Tomokuni A, Aikoh T, et al: Elevated soluble Fas levels in patients with silicosis. Chiyotani K, Hosoda Y et al (eds): *Advances in the Prevention of Occupational Respiratory Diseases (Excerpta Medica International Congress Series ICS 1153)*. Elsevier Science, Amsterdam, 1998, pp.931-936
- 31) Otsuki T, Tomokuni A, et al: Reduced expression of the inhibitory genes for Fas-mediated apoptosis in silicosis patients. *J Occup Health* 42: 163-168, 2000
- 32) Guo Z-Q, Otsuki T, et al: Reduced expression of survivin gene in PBMC from silicosis patients. *Kawasaki Med J* 27: 75-81, 2001
- 33) Takata-Tomokuni A, Ueki A, et al: Detection, epitope-mapping, and function of anti-Fas autoantibody in patients with silicosis. *Immunology* 116: 21-29, 2005
- 34) 高田-友国晶子、植木絢子、他: 珪肺症例で認められた抗 Fas 自己抗体の機能解析. *臨床環境* 13: 102-109, 2004
- 35) Otsuki T, Takata A, et al: Dysregulation of Fas-mediated apoptotic pathway in silicosis patients. *Rec Res Develop Immunol* 4: 703-713, 2002
- 36) Otsuki T, Takata A, et al: Review of regulation for the Fas-mediated apoptotic pathway in silicosis patients. *Kawasaki Med J* 29: 33-43, 2003
- 37) Wu P, Hyodoh F, et al: Induction of CD69 antigen expression in peripheral blood mononuclear cells on exposure to silica, but not by asbestos/chrysotile-A. *Immunol Lett* 98: 145-152, 2005
- 38) Ju ST, Matsui K, et al: Molecular and cellular mechanisms regulating T and B cell apoptosis through Fas/FasL interaction. *Int Rev Immunol* 18: 485-513, 1999
- 39) Janssen O, Sanzenbacher R, et al: Regulation of activation-induced cell death of mature T-lymphocyte populations. *Cell Tissue Res* 301: 85-99, 2000
- 40) Hamad AR, Schneck JP: Antigen-induced T cell death is regulated by CD4 expression. *Int Rev Immunol* 20: 535-546, 2001
- 41) Maher S, Toomey D, et al: Activation-induced cell death: the controversial role of Fas and Fas ligand in immune privilege and tumour counterattack. *Immunol Cell Biol* 80: 131-137, 2002