

SLE におけるリンパ球減少とアポトーシス

石井 俊 徳

Lymphopenia and apoptosis of lymphocytes in systemic lupus erythematosus

Toshinori Ishii

Abstract To elucidate the mechanism responsible for lymphopenia in systemic lupus erythematosus, I measured apoptosis rate, positive rate of Fas antigen and amount of Bcl-2 antigen of peripheral blood lymphocytes directly after separation or after in vitro culture by flow cytometry method. Fas positive rate and Bcl-2 amount, but not apoptosis rate of non-cultured lymphocytes from SLE patients increased significantly more than those from healthy persons. After one day culture without serum, apoptosis rates of lymphocytes from both groups were enhanced. In addition apoptosis rate of SLE lymphocytes was significantly higher level than one of lymphocytes from healthy persons. Apoptosis rate of cultured lymphocytes correlated negatively with both Bcl-2 amount and lymphocyte counts. SLE sera added to the culture plates inhibited aggravation in apoptosis of lymphocytes from healthy persons, but not of SLE lymphocytes. Sera from healthy persons could not suppress the increment of apoptosis of both lymphocytes from SLE patients and healthy persons. These results suggest that execution of apoptosis in lymphocytes depends on amount of Bcl-2 even if apoptosis triggering stimuli has been already given to lymphocytes, and that some proportion of SLE lymphocytes might fall into apoptosis by poor response to serum factors which trigger Bcl-2 expression.

Key Words : Systemic Lupus Erythematosus (SLE), Lymphopenia, Apoptosis, Bcl-2, Fas

I. はじめに

全身性エリテマトーデス (SLE) は自己免疫疾患の中でもプロトタイプといわれる代表的な疾患であり, 自己免疫機序による全身臓器の障害により多彩な症状を呈する¹⁾。その臓器障害の機序としては, 自己抗原と抗体から構成される免疫複合体により刺激された好中球や単球から遊離される活性酸素・水解酵素・サイトカインが, 同じく免疫複合体により活性化された補体とともに血管内皮細胞を障害するいわゆるⅢ型アレルギーが主役を演じていると考えられている。またリンパ球減少や血小板減少には自己抗体によるⅡ型アレルギーも関与している。このように臓器障害の主役

をなす自己抗体の産生は, SLEにおいては自己反応B細胞のポリクローナルな活性化とT細胞の機能異常によってもたらされる。

健康人であればこのような自己反応性リンパ球は成熟の過程で大部分が排除される(クローン除去)が, 一部は生き残る。しかし残存した自己反応性リンパ球も自己抗原の長期間にわたる刺激の結果クローン除去される²⁾。これらクローン除去の機構は Fas 抗原が関与するアポトーシスと考えられている²⁾。SLEでは Fas 抗原の発現低下により, 自己反応性リンパ球のクローン除去が生じない可能性がある³⁾⁴⁾。また Fas 抗原の過剰発現⁵⁾や, 抗アポトーシス作用をもつ proto-oncogene として知られる *bcl-2* の異常⁶⁾がリンパ球減少の一

因である可能性も考えられる。

本稿では SLE のリンパ球について、アポトーシス発現率およびそれに関係する Fas 抗原量, Bcl-2 抗原量を測定し, その異常の有無およびリンパ球数との関連性について検討した。

II. 検体

SLE 患者 9 名 (すべて女性, 年齢 42.0 ± 10.4 才) と健常人 7 名 (すべて女性, 年齢 23.4 ± 7.5 才) より 3.8% クエン酸ナトリウム 0.5 ml 入り真空採血管に静脈血 4.5 ml を採血した。

III. 方法

1. リンパ球分離

血液を RPMI 1640 培地で 2 倍に希釈後, 同量の Lymphocyte Separation Medium (LSM, 比重 1.077, Organon 社) に重層し, 室温で $2,000 \text{ rpm}$ 30 分遠沈した。そして血漿と LSM の中間層の単核球分画を採取し, リン酸緩衝食塩液 (PBS, pH 7.4, CosmoBio 社) で 3 回洗浄後 PBS に浮遊させリンパ球分画とした。次に trypan blue による dye exclusion 法で生細胞を計数し, $2 \times 10^6 / \text{ml}$ の濃度に調整した。

2. リンパ球の培養

リンパ球を RPMI 1640 培地に $2 \times 10^6 / \text{ml}$ の濃度に浮遊させ, $100 \mu \text{ l}$ をそのままあるいは血漿 $100 \mu \text{ l}$ を加えて 5% CO_2 ガスインキュベーター内 37°C で 1 日培養した。

3. リンパ球細胞膜のジギトニン処理

細胞内抗原を抗体により検出するためには, 抗体が細胞膜を通過する必要があるため, ジギトニン (和光純薬社) による細胞膜処理を行った。ジギトニンは細胞形態を変化させフローサイトメーター (FCM) によるリンパ球選別に支障をきたすので, まず 0.25% paraformaldehyde (PFA) PBS 溶液をリンパ球浮遊液に対して 10 倍量加え, on ice で 2 分固定処理した。PBS で洗浄後ジギトニン溶液 ($100 \mu \text{g/ml}$ PBS) を等量加え on ice 20

分間置き膜処理した。

4. Fas 抗原測定

Phycoerythrin (PE) 標識抗ヒト Fas (CD 95) 抗体 (Pharmingen 社) $10 \mu \text{ l}$ をリンパ球 $100 \mu \text{ l}$ に加え, on ice で 30 分反応させた後, PBS で洗浄し PBS 1 ml に再浮遊させた。次に FCM でリンパ球と単球をサイトグラム上で選別し, リンパ球の Fas 陽性率と平均蛍光強度 (MFI) を測定した。

5. Bcl-2 測定

濾胞性 B リンパ腫の染色体転座切断点の解析より同定された proto-oncogene である *bcl-2* 遺伝子⁷⁾は, 現在抗アポトーシス遺伝子としての働きが注目されている。

Bcl-2 蛋白は殆どすべての正常リンパ球のミトコンドリア, 小胞体や核膜に発現している^{8), 9)}。そこで Bcl-2 蛋白量を Bcl-2 に対する蛍光標識抗体の MFI として測定した。まずリンパ球を PFA 固定, ジギトニン処理を行った。次に FITC 標識抗 Bcl-2 抗体 (DAKO 社) を on ice で 30 分反応させた後, FCM で Bcl-2 の MFI を測定した。リンパ球の Bcl-2 陽性率は SLE 96.8 ± 4.4 , 健常人 98.3 ± 0.6 であった。

6. アポトーシス測定 (Apo 2.7 抗原測定)

Apo 2.7 抗原はアポトーシスを起こした細胞のミトコンドリア膜に初期段階から発現する 38 kD の蛋白 (7 A 6 抗原) である¹⁰⁾。したがって Apo 2.7 抗原に対する抗体を用いた蛍光抗体法では, 初期の段階から感度よく簡便にアポトーシスに陥った細胞を測定できる。そこで PFA およびジギトニン処理したリンパ球と PE 標識抗 Apo 2.7 抗体 (Immunotech 社) を on ice で 30 分反応させた後, FCM で Apo 2.7 抗原の陽性率を測定した。

7. 白血球数およびリンパ球数の測定

白血球数およびリンパ球数は, EDTA 加静脈血を用いて自動血球計数機 (Coulter Counter S-PLUSSTKR, コールター社) で測定した。

表 1 末梢血リンパ球のアポトーシス、Bcl-2、Fas

測定	SLE	健常人	t-test
アポトーシス (%)	3.7±2.3	2.1±0.4	ns
Bcl-2 (MFI)	114.3±5.3	108.3±3.5	p<0.05
Fas (%)	52.2±11.9	31.0±7.0	p<0.01
Fas (MFI)	73.4±3.9	68.3±2.5	p<0.01
リンパ球数(／μl)	954±601	2,281±496	p<0.01

IV. 結果

1. リンパ球のアポトーシス、Bcl-2、Fas

末梢血リンパ球のアポトーシスならびにそれに関係する Bcl-2、Fas とリンパ球数を同時に測定した(表1)。アポトーシスは SLE 3.7%、健常人 2.1% で SLE がわずかに高いものの有意差はみられなかった。Bcl-2 は SLE の方が有意に高かった。Fas も陽性率、発現量ともに SLE が有意に高かった。リンパ球数は SLE で著しい減少がみられた。次に各測定値間の相関性を調べてみると、Bcl-2 と Fas の間には $r=0.60$ ($p<0.05$) の正の相関がみられた。また Fas 陽性率はリンパ球数との間に $r=-0.69$ ($p<0.01$) の負の相関があった。しかしアポトーシスとリンパ球数との間には相関はなかった。この結果は Fas 発現が高くなればリンパ球が減少すること、健常人リンパ球は Fas が低くアポトーシスの誘因がないので、Bcl-2 が低くてもアポトーシスは起こしにくいこと、SLE リンパ球では Fas が高いのでアポトーシスが生じてリンパ球は減少すること、SLE リンパ球でも Bcl-2 が高いリンパ球はアポトーシスが生じにくいことを示唆している。したがってアポトーシスを生じるか否かを左右するのは Bcl-2 であり、Bcl-2 の多いリンパ球は生き残ると考えられる。しかしこれを証明するためには、アポトーシスに陥った細胞の Bcl-2、Fas を測定する必要があるが、採取したリンパ球をそのままではアポトーシス率が低く正確な測定が出来ない。

2. 無血清培養によるアポトーシスの変化

アポトーシスを誘導する最も簡便な方法としてサイトカイン除去法を用いた。末梢血リンパ球を

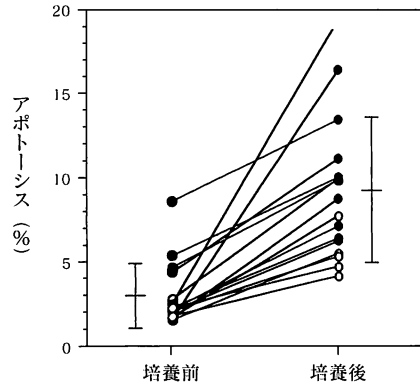


図 1 無血清培養によるリンパ球のアポトーシスの変化

● SLE、○ 健常人

無血清培地で 1 日培養するとアポトーシスを起しているリンパ球は $9.1\pm4.2\%$ となり、培養前の $3.0\pm1.9\%$ に比べて有意 ($p<0.01$) に増加した(図1)。さらに SLE と健常人に分けてみると、培養後のアポトーシスは SLE では $11.3\pm4.3\%$ 、健常人では $6.2\pm2.0\%$ となり、培養前の $3.7\pm2.3\%$ と $2.1\pm0.4\%$ に比べていずれも有意 ($p<0.01$) の増加がみられた。また培養後の SLE と健常人の間でも、培養前と異なり有意差があった。この結果は血漿中にはアポトーシスを抑制する因子が存在していることを示唆している。また培養前にはみられなかったリンパ球数との相関も培養後のアポトーシスでは有意の負の相関 ($r=-0.77$, $p<0.01$) がみられた。

培養による Bcl-2 と Fas の変化を SLE 3 名健常人 1 名について測定してみると、Bcl-2 は培養後に全例低下しており、平均 8.4 の低下となった。Fas は平均 8.5% の低下がみられた。さらにアポトーシスと Bcl-2 との関係性を培養前後の変化について調べてみると、有意の負の相関がみられた(図2)。したがって Bcl-2 の低下がアポトーシスの発現に重要な要因であることは明らかである。

3. Fas 抗原発現とアポトーシス

生体内におけるリンパ球のアポトーシスでは、Fas リガンド (FasL) による Fas 抗原を介する Fas

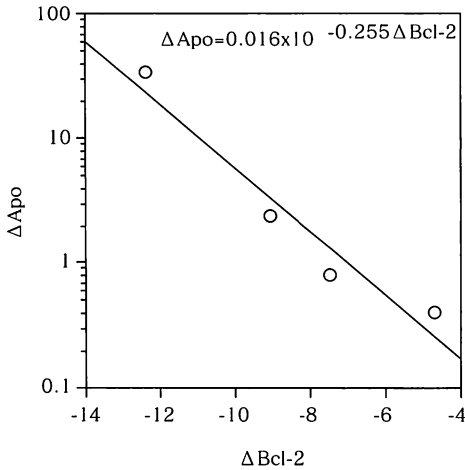


図2 培養後のアポトーシス増加と Bcl-2 減少の相関

$\Delta apo = [\text{培養前のアポトーシス}] - [\text{培養後のアポトーシス}]$ 、 $\Delta Bcl-2 = [\text{培養前の Bcl-2}] - [\text{培養後の Bcl-2}]$

依存性アポトーシスが主体とされている。無血清培養によるアポトーシス誘導に Fas が関与しているか否かを明らかにするために、リンパ球を1日培養後 Fas 陽性分画と陰性分画に分け、両分画のアポトーシス率を4名(健常人3名, SLE 1名)について測定してみた。その結果, Fas 陽性分画のアポトーシス率は $4.0 \pm 2.6\%$ に対して, Fas 陰性分画は $4.7 \pm 3.9\%$ となり, 両分画のアポトーシス率に有意差はみられなかった。したがって Fas 陽性分画のリンパ球のみがアポトーシスをおこしているのではないので, 無血清培養によるアポトーシスの誘導は Fas 依存性ではないことは明らかであり, Fas 抗原以外の要因を考える必要がある。

4. アポトーシスリンパ球の Bcl-2

アポトーシスリンパ球の Bcl-2を測定するために, リンパ球を1日培養後膜処理し PE 標識抗 Apo 2.7抗体と FITC 標識抗 Bcl-2で染色した。FCM 上で Bcl-2の抗原量によりリンパ球を4つに分画し, 各分画のアポトーシス率を SLE と健常人各1名について測定した(図3)。その結果 Bcl-2抗原量が少ないほどアポトーシス率が高く

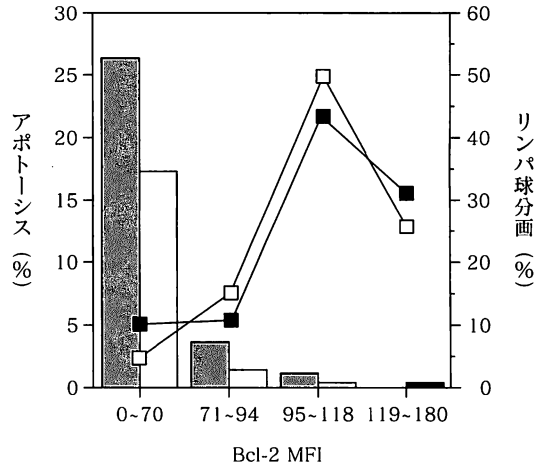


図3 Bcl-2により分画したリンパ球のアポトーシス

アポトーシス: ■ SLE、□ 健常人
リンパ球分画: —■— SLE、-□- 健常人

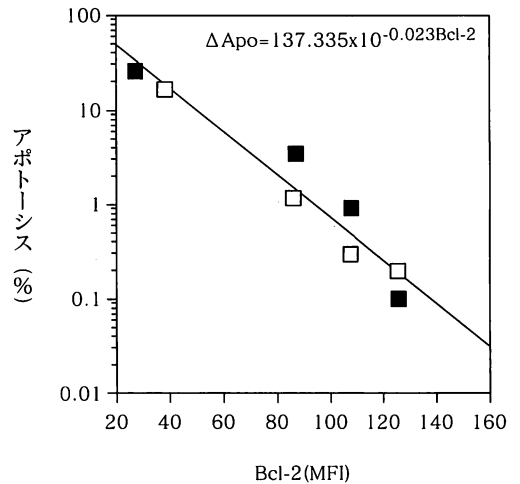


図4 アポトーシスと Bcl-2 の相関

■ SLE、□ 健常人

特に70以下になると急に増加することがわかった。しかし Bcl-2が71以上の分画を SLE で90%弱, 健常人で95%弱占めており, 全体としてはアポトーシスは高くない。ただし SLE は70以下の分画が多い分アポトーシスも高くなっている。各分画の平均 Bcl-2とアポトーシス率との相関性をみると(図4), 図2と同様に SLE 健常人に関わらずアポトーシス率の対数と Bcl-2 抗原量の間

表2 血漿添加培養による健常人リンパ球のアポトーシス、Bcl-2、Fasの変化

培養前に対する Student-test :

* $p < 0.05$ 、** $p > 0.01$

測定	培養前	SLE 血漿	健常人血漿
アポトーシス (%)	2.4±0.1	3.0±0.4	7.1±0.5**
Bcl-2 (MFI)	128.1±2.2	126.5±0.9	120.3±0.9**
Fas (%)	48.6±0.7	50.2±1.0	46.0±1.0*
Fas (MFI)	67.4±0.3	67.3±0.3	67.4±0.3

$r = -0.97$ ($p < 0.01$) の強い負の相関がみられた。つまりアポトーシスの誘導を規定するのは Bcl-2 であり、そのことは SLE も健常人も違いがないことを意味している。

5. 血漿添加培養によるリンパ球アポトーシス、Bcl-2、Fas の変化

無血清培地による培養でアポトーシスが誘導される場合、Bcl-2 抗原量の減少が大きく影響している。したがって血漿中には Bcl-2 抗原量を維持し減少を防止する因子が存在することが推測される。そこで健常人リンパ球に同じ血液型の SLE 血漿または健常人血漿を同量加え 1 日培養してみた (表 2)。培養前と比較すると、SLE 血漿では Bcl-2 は減少せずアポトーシスも増加しなかったが、健常人血漿では Bcl-2 の減少とアポトーシスの増加が見られた。Fas は健常人血漿で有意の低下がみられた。SLE 血漿と健常人血漿間では、全ての測定項目で有意差がみられた。この結果は SLE 血漿には Bcl-2 抗原量を維持する因子が存在

表3 血漿添加培養による SLE リンパ球のアポトーシス、Bcl-2、Fas の変化

培養前に対する Student-test :

* $p < 0.05$ 、** $p > 0.01$

測定	培養前	SLE 血漿	健常人血漿
アポトーシス (%)	6.0±1.8	16.7±1.2**	15.0±4.3*
Bcl-2 (MFI)	129.5±1.1	121.4±2.1**	120.9±1.3**
Fas (%)	22.3±0.3	34.8±0.9**	32.4±2.1*
Fas (MFI)	105.9±0.2	108.6±1.2*	108.0±0.2**

するが、健常人血漿にはこの因子はないことを示している。

次に健常人リンパ球の代わりに SLE リンパ球を用いて表 2 と同じ測定をしてみると (表 3)、SLE 血漿を加えた場合、健常人血漿を加えた場合ともに Bcl-2 の減少とアポトーシスの増加、Fas 陽性率と抗原の増加がみられた。SLE 血漿を加えた場合と健常人血漿を加えた場合を比較すると、どの測定項目にも有意差はなかった。この結果は SLE リンパ球自体が Bcl-2 の減少によるアポトーシスを起こしやすいことを示しており、SLE 血漿中の抑制因子で防止しようとしても効果がない。

V. 考察

Fas 抗原は TNF 受容体ファミリーに属する、哺乳類細胞のアポトーシスシグナル伝達に重要な細胞表面受容体分子である。リンパ系においては抗原に感作された T 細胞および B 細胞に Fas の発現が認められる³⁾。ヒト SLE 様自己免疫疾患モデルマウスである *lpr* では Fas の遺伝子機能異常により¹¹⁾、また *gld* マウスでは Fas リガンド (FasL) の遺伝子機能異常により¹²⁾、末梢血での自己反応性 T 細胞の除去が出来ず、種々の自己抗体産生を伴う免疫異常が惹起される。またヒト autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS) は Fas および FasL 遺伝子異常により惹起される^{13), 14)}。しかし SLE においてはこれらの遺伝子異常が検出されるのは稀とされている¹⁵⁾。SLE 患者では抗原刺激による活性化末梢血リンパ球に機能性の Fas 発現の亢進があり、Fas 依存性アポトーシスの亢進によりリンパ球が減少すると報告¹⁶⁾されている。本研究の結果も Fas は陽性率、発現量ともに健常人より高いこと、Fas 陽性率とリンパ球数との間に負の相関関係があることから、リンパ球減少の原因は Fas を介したアポトーシスであるという考えを支持している。

では残存しているリンパ球も Fas は高いのに、なぜアポトーシスを免れることができたのかとい

う疑問が生じる。その疑問に対してはアポトーシス抑制機構の存在を考える必要がある。アポトーシスの経路は誘導過程、決定過程、実行過程の3段階に分けて考えられる。誘導過程と決定過程には多様性があるが、決定過程の最終過程はカスパーゼ特にカスパーゼ3の活性化であり、実行過程はカスパーゼによる特定蛋白質の限定分解カスケードとDNAの断片化を中心とする共通のプロセスである¹⁷⁾。

アポトーシス抑制機構は決定過程に関与する機構であり、その実行分子としてはXIAP, cIAP 1, cIAP 2などのIAPファミリー蛋白とBcl-2, Bcl-xLなどのBcl-2ファミリー蛋白があげられる^{18), 19)}。IAPファミリー蛋白はカスパーゼの活性化を直接抑制することにより、またBcl-2ファミリー蛋白はミトコンドリア依存性のカスパーゼ活性化を抑制することにより抗アポトーシス作用を表す。SLEリンパ球のBcl-2が健常人より高いことは本研究だけでなくAringerらも報告²⁰⁾しているが、そのためFasが高くてもアポトーシスを起こさなかったものと考えられる。それならばBcl-2を下げればアポトーシスを誘導できることになる。そこで次にSLE末梢血リンパ球にアポトーシスを誘導してBcl-2との関係について調べてみた。アポトーシスはFasL²¹⁾, TNF²²⁾, グルココルチコイド²³⁾, ウィルス²⁴⁾, 放射線²⁵⁾, 熱²⁶⁾, 抗癌剤²⁷⁾などの作用の他、種々のサイトカイン、増殖因子、栄養因子の除去²⁸⁾によっても誘導されるので、本研究ではアポトーシスの誘導に簡便な無血清培地を使用したサイトカイン除去法を用いた。その結果アポトーシスリンパ球は増加し、その増加とBcl-2の低下との間に相関性が見られることがわかった。さらにApo 2.7とBcl-2を二重染色することによって、Bcl-2の減少したリンパ球がアポトーシスに陥りやすいことを直接明確に示すことができた。Bcl-2の低下によるアポトーシスの増加については、SLE以外にも伝染性単核球症における活性化CD 45 RO + T細胞²⁹⁾やAIDSのCD 4 + T細胞³⁰⁾などで報告されている。

他方Bcl-2の発現亢進でアポトーシスは回避されるので、SLEでは自己抗体産生細胞がBcl-2発現量を多くしてアポトーシスを免れている可能性がある。事実**bcl-2**のトランスジェニックマウスにおいては、自己抗体産生がみられ、SLE様の病態を呈する³¹⁾。図4においてBcl-2量が最も高い分画のリンパ球比率はSLEの方が高いことは、自己反応性リンパ球の存在を反映した結果かもしれない。今後高Bcl-2分画SLEリンパ球の自己抗体産生、FasおよびCD 40の発見について検討する必要がある。

Fasによるアポトーシス誘導の過程においては、カスパーゼ8を介してカスパーゼ3の活性化がおこるが、カスパーゼ8がミトコンドリアを介さずに直接カスパーゼ3を活性化する細胞(Type I細胞)と、カスパーゼ8がミトコンドリアからのシトクロムCの放出を誘導してカスパーゼ9を活性化し、その結果カスパーゼ3がカスパーゼ9依存性に活性化される細胞(Type II細胞)とに大別されることが報告^{32), 33)}されている。したがってType I細胞であればBcl-2量に関係なくアポトーシスに陥ることになるので、このType I細胞のアポトーシスがSLEのリンパ球減少の原因の可能性も考えられる。

無血清培養による健常人リンパ球のアポトーシス誘導はFasを介していないので、アポトーシスは当然ながらFas発現の有無に関係なく生じている。この場合のアポトーシスはBcl-2量の低下によるものであり、SLE血清添加によりBcl-2量の低下を阻止できることからSLE血清中にはBcl-2発現低下の阻止因子が存在していることは明らかである。Bcl-2の発現を促進する因子としてはIL-2³⁴⁾, IL-4³⁵⁾, CD 40抗体³⁶⁾, 抗Ig³⁷⁾, 抗原刺激³⁸⁾などが知られている。SLE血清中のIL-2, IL-4は共に健常人より高値であり³⁹⁾, 可溶性CD 40リガンド(sCD 40 L, sCD 154)も増加している⁴⁰⁾ので、IL-2, IL-4, sCD 40 LのいずれもがBcl-2量低下の阻止因子として働いている可能性がある。しかしIL-4レセプター(IL-4 R)は成熟T細胞, 成熟B細胞ともに発現しているのに対し、

IL-2レセプター (IL-2R) は活性化T細胞およびB細胞のみの発現であり、CD40もB細胞のみにしか発現していないので、IL-4が阻止因子として最も強く作用しているのではないかと推測される。しかしSLEリンパ球の場合、SLE血漿、健常人血漿に関わらずBcl-2の低下がみられるので、リンパ球側のIL-4Rの減少あるいは機能異常といった問題の可能性がある。今後抗CD124 (IL-4R α) 抗体によるレセプター密度や機能の解析が必要と思われる。Fasの発現は抗原刺激やIL-2により増強するので、SLEリンパ球のFas発現の増加はIL-2R発現の増加しているSLEリンパ球⁴¹⁾が血漿中のIL-2により刺激されたためと考えた方が自然である。

VI. おわりに

リンパ球全体を対象としたアポトーシスやBcl-2, Fasについての測定では、SLEにおける異常の大きな評価は可能であるが、詳細な分析をするためにはサブセットに分けた測定が必要である。またアポトーシスの誘導のみならず実行過程に活性酸素が関与している疑いもあり、活性酸素とBcl-2やFasの関連を検討する必要もある。しかし実際にサブセット別にこれらを測定分析しようとする、多重染色による測定が可能なFCMであっても技術的に解決しなければならない点も多く、今後の検討が必要である。

VII. 要旨

SLEにおけるリンパ球減少の機序を解明するために、分離直後および培養後のリンパ球のアポトーシス、Fas抗原、Bcl-2抗原を測定した。SLEリンパ球のFas、Bcl-2発現は健常人と比較して亢進していたが、アポトーシスには差がなかった。無血清培養によりSLEリンパ球のアポトーシスは増加し、健常人リンパ球との間に有意差がみられた。またアポトーシスとBcl-2量との間およびリンパ球数との間に負の相関がみられた。

SLE血清添加培養により健常人リンパ球のアポトーシス亢進は阻止されたが、SLEリンパ球のアポトーシス亢進は阻止されなかった。健常人血清はSLEリンパ球、健常人リンパ球のいずれのアポトーシス亢進も阻止できなかった。この結果は、アポトーシスの誘導刺激が与えられたとしてもアポトーシスの実行決定はBcl-2量に依存していること、SLEでは血清中の刺激因子によりリンパ球のFas発現、Bcl-2発現は亢進しているが、一部のリンパ球はBcl-2発現を亢進させる刺激に対する反応の異常によりBcl-2の低下を招き、このためアポトーシスが生じ、結果としてリンパ球減少にいたることを示している。

文献

- 1) Lahita, R.G.: Systemic lupus erythematosus, p 369 - 387. Churchill Livingstone, New York, 1992.
- 2) 米原伸: アポトーシスとFas抗原, 炎症と免疫 3: 6-13, 1994
- 3) Miyawaki, T., et al.: Differential expression of apoptosis-related Fas antigen antigen on lymphocyte subpopulations in human peripheral blood. J. Immunol. 149: 3753-3758, 1992.
- 4) Russell, J.H. et al.: Mature T cells of autoimmune *lpr/lpr* mice have a defect in antigen-stimulated suicide. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 4409-4413, 1993.
- 5) Amasaki, Y., et al.: Up-regulated expression of Fas antigen (CD95) by peripheral naive and memory T cell subsets in patients with systemic lupus erythematosus (SLE): a possible mechanism for lymphopenia. Clin. exp. Immunol. 99: 245-250, 1995.
- 6) Itoh, N., et al.: Effect of bcl-2 on Fas antigen-mediated cell death. J. Immunol. 151: 621-627, 1993.
- 7) Tsujimoto, Y., et al.: Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. Science

- 228 : 1440—1443, 1985.
- 8) Hockenberry, D., et al. : Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* 348 : 334—336, 1990.
 - 9) Monaghan, P., et al. : Ultrastructural localization of bcl-2 protein. *J. Histochem. Cytochem.* 40 : 1819—1825, 1992.
 - 10) Zhang, C., et al. : A mitochondrial membrane protein defined by a novel monoclonal antibody is preferentially detected in apoptotic cells. *J. Immunol.* 157 : 3980—3987, 1996.
 - 11) Watanabe-Fukunaga, R., et al. : Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature* 356 : 314—317, 1992.
 - 12) Takahashi, T., et al. : Generalized lymphoproliferative disease in mice, caused by a point mutation in the Fas ligand. *Cell* 76 : 969—976, 1994.
 - 13) Fisher, G.H., et al. : Dominant interfering Fas gene mutation impair apoptosis in a human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Cell* 81 : 935—946, 1995.
 - 14) Rieux-Laucat, F. et al. : Mutations in Fas associated with human lymphoproliferative syndrome and autoimmunity. *Science* 268 : 1347—1349, 1995.
 - 15) Wu, J., et al. : Fas ligand mutation in a patient with systemic lupus erythematosus and lymphoproliferative disease. *J. Clin. Invest.* 98 : 1107—1113, 1996.
 - 16) Mysler, E., et al. : The apoptosis-1 / Fas protein in human systemic lupus erythematosus. *J. Clin. Invest.* 93 : 1029—1034, 1994.
 - 17) Thornberry, N.A., et al. : A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis. *J. Biol. Chem.* 272 : 17907—17911, 1997.
 - 18) Deveraux, Q.L., et al. : IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. *EMBO J.* 17 : 2215—2223, 1998.
 - 19) Adams, J.M., et al. : The Bcl-2 protein family : arbiters of cell survival. *Science* 281 : 1322—1326, 1998.
 - 20) Aringer, M., et al. : High levels of bcl-2 protein in circulating T lymphocytes, but not B lymphocytes, of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 37 : 1423—1430, 1994.
 - 21) Suda, T., et al. : Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell* 75 : 1169—1178, 1993.
 - 22) Rubin, B.Y., et al. : Correlation between the anticellular and DNA fragmenting activity of tumor necrosis factor. *Cancer Res.* 48 : 6006—6010, 1988.
 - 23) Evans-Storrs, R.B., et al. : Regulation of apoptosis by steroid hormones. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 53 : 1—8, 1995.
 - 24) Vaux, D.L., et al. : An evolutionary perspective on apoptosis. *Cell* 76 : 777—779, 1994.
 - 25) Yamada, T., et al. : Radiation-induced interphase death of rat thymocytes is internally programmed (apoptosis). *Int. J. Rad. Biol. Phys. Chem. Med.* 53 : 65—75, 1988.
 - 26) Ohyama, H., et al. : Reduction of rat thymocyte interphase death by hyperthermia. *Radiation Research.* 82 : 342—351, 1980.
 - 27) Kaufmann, S.H. : Induction of endonucleolytic DNA cleavage in human acute myelogenous leukemia cells by etoposide, camptothecin, and other cytotoxic anticancer drugs : a cautionary note. *Cancer Research* 49 : 5870—5878, 1989.
 - 28) Duke, R.C., et al. : IL-2 addiction : withdrawal of growth factor activates a suicide program in dependent T cells. *Lymphokine Research* 5 :

- 289—299, 1986.
- 29) Tamaru, Y. et al.: Absence of bcl-2 expression by activated CD 45 RO+ T lymphocytes in infectious mononucleosis supporting their susceptibility to programmed cell death. *Blood* 82 : 521—528, 1993.
- 30) Hashimoto, F., et al.: Modulation of Bcl-2 protein by CD 4 cross-linking : a possible mechanism for lymphocyte apoptosis in human immunodeficiency virus infection and for rescue of apoptosis by interleukin- 2. *Blood* 90 : 745—753, 1997.
- 31) Strasser, A., et al.: Enforced bcl-2 expression in B-lymphoid cells prolongs antibody responses and autoimmune disease. *Proc. Natl.Acad.Sci. USA* 88 : 8661—8665, 1991.
- 32) Green, D.R.,: Apoptotic pathways : the road to ruin. *Cell* 94 : 695—698, 1998.
- 33) Scaffidi, C., et al.: Differential modulation of apoptosis sensitivity in CD 95 Type I and Type II cells. *J.Biol.Chem.* 274 : 22532—22538, 1999.
- 34) Demir, G., et al.: Immunomodulating therapy with rIL- 2 and interferon alpha-induces in vivo expression of Bcl- 2, Fas (APO- 1/ CD 95), and Fas ligand on peripheral lymphocytes (a pilot study). *Anticancer Research* 19 : 3517 — 3520, 1999.
- 35) Buske, C., et al.: Stimulation of B-chronic lymphocytic leukemia cells by murine fibroblasts, IL- 4, anti-CD 40 antibodies, and the soluble CD 40 ligand *Exp.Hematol.* 25 : 329 — 337, 1997.
- 36) Craxton, A., et al.: The CD 40 -inducible Bcl -2 family member A1 protects B cells from antigen receptor-mediated apoptosis. *Cell.Immunol.* 200 : 56—62, 2000.
- 37) Bras, A., et al.: B cell receptor cross-linking prevents Fas-induced cell death by inactivating the IL- 1 beta-converting enzyme protease and regulating Bcl- 2/ Bcl-x expression. *J.Immunol.* 159 : 3168—3177, 1997.
- 38) Liu, Y., et al.: Mechanism of antigen-driven selection in germinal centres. *Nature* 342 : 929—931, 1989.
- 39) Cuadrado, M.J., et al.: Relationship of IL- 2, IL- 2 R (CD 25+), soluble IL- 2 R and IL- 4 with disease activity in SLE patients. *Lupus* 2 : 257—260, 1993.
- 40) Kato, K., et al.: The soluble CD 40 ligand sCD 154 in systemic lupus erythematosus. *J.Clin. Invest.* 104 : 947—955, 1999.
- 41) Wigfall, D.R., et al.: Interleukin- 2 receptor expression in peripheral blood lymphocytes from systemic lupus erythematosus patients : relationship to clinical activity. *Clin.Immunol.Immunopathol.* 47 : 354—362, 1988.