

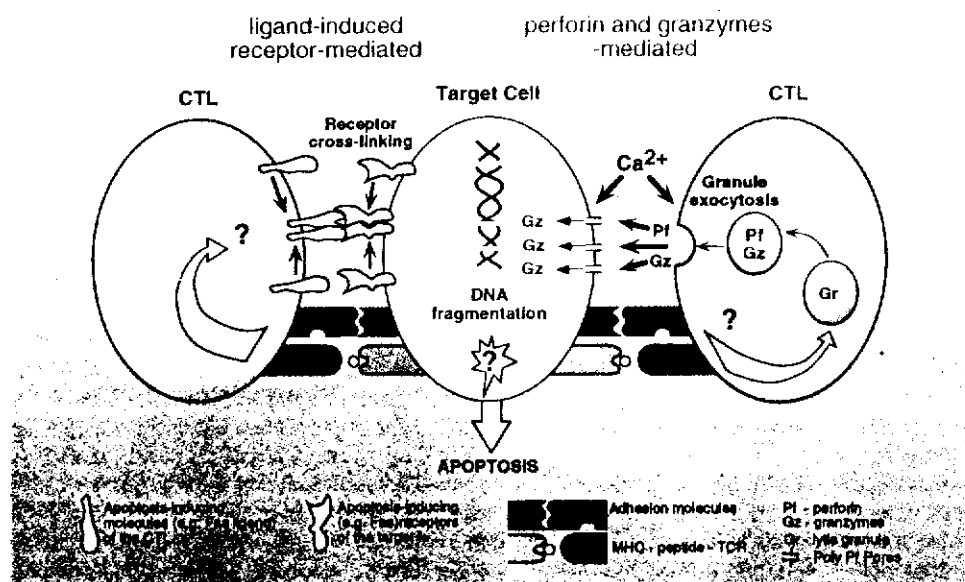
บทความทั่วไป

Fas และ Fas Ligand : อีกกลไกหนึ่งที่ cytotoxic T lymphocyte ใช้ทำลายเซลล์เป้าหมาย

นลินี เปรมประชา*

Cytotoxic T lymphocyte (CTL) เป็นเซลล์ที่มีบทบาทสำคัญในระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย คือ มีหน้าที่ทำลายเซลล์ที่มีการติดเชื้อไวรัส และ เซลล์มะเร็ง นอกจากนี้ยังมีบทบาทสำคัญในการไม่ยอมรับอวัยวะที่ถูกนำมาปลูกถ่าย การที่ CTL จะทำลายเซลล์เป้าหมายได้ จะต้องมีการจับกันระหว่าง CTL กับเซลล์เป้าหมายอย่างจำเพาะก่อน โดยใช้ T cell receptor (TCR) ที่อยู่บนผิว CTL จับกับ major histocompatibility complex (MHC) และ peptide ของ antigen ที่อยู่บนผิวเซลล์เป้าหมาย เมื่อ CTL จับกับเซลล์เป้าหมายแล้วจะมีกลไก 2 กลไกทำให้เซลล์เหล่านั้นตาย ดังแสดงในรูป

เซลล์ที่เป็นเป้าหมายของ CTL ถูกทำให้ตายแบบ apoptosis ลักษณะของเซลล์ที่เกิด apoptosis คือ เซลล์และนิวเคลียสจะหดตัวเล็กลง DNA ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ nuclease ทำให้ขาดเป็นท่อนๆ cytoplasm และ นิวเคลียส ถูกแยกเป็นส่วนๆ (segmentation) ถ้าเกิดขึ้นภายในสิ่งมีชีวิต เซลล์ที่เกิด apoptosis จะถูกกลืนกินไปอย่างรวดเร็วโดยเซลล์ข้างเคียง จึงมักไม่เหลือร่องรอยใดๆ ตัวอย่างการตายแบบ apoptosis ในระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ได้แก่ การตายของ thymocyte ในต่อมธัยมัส การตายของเซลล์ที่เป็นเป้าหมาย (target cell) ของ cytotoxic T cell และ natural killer cell เป็นต้น



ภาพแสดงกลไกที่ CTL ใช้ทำลายเซลล์เป้าหมาย ด้านซ้ายเกิดจาก Fas และ FasL ด้านขวาเกิดจาก perforin และ granzymes¹

* ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

CTL มีกลไกอย่างไรที่ทำให้เซลล์เป้าหมายตาย หลายปีที่ผ่านมานักวิทยาศาสตร์ทราบกันว่ากลไกหนึ่งที่ CTL ใช้ทำลายเซลล์เป้าหมาย คือการหลั่งสาร perforin และ granzymes ที่อยู่ใน granule ออกมา สาร perforin ทำให้เกิดรูบนผิวของเซลล์เป้าหมายคล้ายกับรูที่เกิดจาก complement ในตอนแรกนักวิทยาศาสตร์เข้าใจว่า perforin เพียงอย่างเดียวที่ทำให้เซลล์เป้าหมายแตกสลาย แต่เนื่องจาก perforin ทำให้เซลล์แตกเท่านั้นโดยที่ DNA ของเซลล์ไม่ได้ถูกย่อยซึ่งไม่ตรงกับลักษณะของเซลล์ที่ตายเนื่องจาก CTL ซึ่ง DNA จะถูกย่อยเป็นส่วนๆ ต่อมาจึงพบว่า ในการทำลายเซลล์เป้าหมายของ CTL ต้องอาศัยทั้ง perforin และ granzymes ร่วมกัน granzymes ประกอบด้วยเอนไซม์ serine protease ถูกหลั่งออกมาจาก granule พร้อมกับ perforin และเข้าไปในเซลล์เป้าหมายโดยผ่านรูบนผิวเซลล์ที่เกิดจาก perforin เชื่อกันว่า granzymes เกี่ยวข้องกับการย่อย DNA ให้ขาดเป็นท่อนๆ ทำให้เซลล์เป้าหมายตายแบบ apoptosis แต่กลไกโดยละเอียดขณะนี้ยังไม่มีผู้ใดทราบ

ปัจจุบันพบว่า perforin และ granzymes ไม่ใช่กลไกเพียงชนิดเดียวที่ CTL ใช้ทำลายเซลล์เป้าหมาย แต่ยังมี Fas และ Fas ligand (FasL) ซึ่งเป็นอีกกลไกหนึ่งที่ CTL ใช้ทำลายเซลล์เป้าหมาย บทความนี้จะกล่าวถึงประวัติความเป็นมาของการค้นพบ วิธีการศึกษา และบทสรุปในปัจจุบันของนักวิทยาศาสตร์ถึงกลไกทั้งหมดที่ CTL ใช้ทำลายเซลล์เป้าหมาย

Fas (APO-1, CD95) ถูกค้นพบเมื่อปี ค.ศ. 1989 โดยนักวิทยาศาสตร์ 2 กลุ่ม คือกลุ่มของ Yonehara และกลุ่มของ Trauth ทั้ง 2 กลุ่มต้องการผลิต monoclonal antibody (mAb) ต่อโปรตีนบนผิวเซลล์ โดย Yonehara ฉีด human diploid fibroblast cell line เข้าไปในหนู Balb/c และโดยอาศัยวิธีไฮบริโดมา ทำให้ได้ mAb ตัวหนึ่ง ซึ่งเมื่อทำปฏิกิริยากับ fibroblast cell line แล้ว ทำให้เซลล์นั้นตายแบบ apoptosis Yonehara ตั้งชื่อ mAb นั้นว่า

anti-Fas¹² ส่วน Trauth ต้องการศึกษาหาโมเลกุลบนผิวเซลล์ที่สามารถควบคุมการเจริญเติบโตของเซลล์ lymphocyte ที่เป็นมะเร็ง จึงผลิต mAb ต่อ human B lymphoblast cell line และพบ mAb ตัวหนึ่ง สามารถหยุดยั้งการเจริญของเซลล์ และทำให้เซลล์ตายแบบ apoptosis จึงตั้งชื่อว่า anti APO-1¹⁰

ต่อมาในปี ค.ศ. 1991 Itoh และคณะ ได้แยก cDNA ของ Fas ได้สำเร็จ ทำให้ทราบลักษณะโมเลกุลโดยละเอียดว่าเป็น glycoprotein ที่อยู่บนผิวเซลล์ มีน้ำหนักโมเลกุล 48 กิโลดาลตัน ประกอบด้วย amino acid 325 ตัว ส่วนที่ฝังอยู่ในผิวเซลล์ (membrane spanning region) อยู่กลางโมเลกุล จัดเป็น type I membrane protein เพราะมีปลายด้าน amino อยู่นอกผิวเซลล์ และถูกจัดอยู่ใน Tumor necrosis factor receptor (TNF-R) family โมเลกุลที่อยู่ใน family นี้มีส่วนที่อยู่นอกผิวเซลล์ (extracellular region) ประกอบด้วย cysteine domain 3-6 domain และค่อนข้าง conserved ส่วนที่อยู่ในเซลล์ (cytoplasmic domain) ไม่ค่อย conserved ยกเว้น Fas และ TNF-R1 มีบริเวณที่ conserved อยู่บริเวณหนึ่ง พบว่าเป็น domain ที่จำเป็นในการส่งสัญญาณให้เซลล์เกิด apoptosis จึงให้ชื่อว่า death domain Itoh และคณะได้ incubate anti-human Fas กับเซลล์มะเร็งหลายชนิด พบว่า ทำให้เซลล์มะเร็งเกิด apoptosis ได้เช่นกัน ต่อมา Ochm และคณะ ในปี ค.ศ. 1992 ได้ clone cDNA ของ APO-1 antigen และพบว่าเป็นโมเลกุลชนิดเดียวกับ Fas^{6,7}

โมเลกุลของ Fas พบได้ปริมาณน้อยๆ บนผนังเซลล์ปกติทั่วไป ยกเว้นในหนู mouse ที่สามารถพบโมเลกุลของ Fas มากที่สุดต่อมธัยมัส ตับ หัวใจ ปอด ไต รังไข่ นอกจากนี้พบ Fas มากบน mature lymphocyte ที่ถูกกระตุ้น (activated mature lymphocyte) และบนผิวของเซลล์มะเร็งบางชนิด โมเลกุลของ Fas จะมียากขึ้น ถ้ากระตุ้นด้วย interferon-gamma และ tumor necrosis factor-alpha^{6,7}

ในปี ค.ศ. 1993 Rouvier และคณะพบว่า CTL hybridoma สามารถทำลายเซลล์เป้าหมายได้ด้วยกลไกที่ปราศจาก Ca^{++} โดยทำลายได้เฉพาะเซลล์ที่มี Fas อยู่บนผิวเซลล์เท่านั้นและทำให้เซลล์เป้าหมายเกิด apoptosis เนื่องจากกลไกที่ CTL ใช้ทำลายเซลล์เป้าหมายที่ทราบขณะนั้น คือ การหลั่งสาร perforin และ granzymes มีผลให้เซลล์เป้าหมายเกิด apoptosis เช่นกัน แต่เป็นกลไกที่ต้องอาศัย Ca^{++} Rouvier จึงคิดว่าน่าจะมีอีกกลไกหนึ่งที่ CTL ใช้ทำลายเซลล์เป้าหมายโดยอาศัยโมเลกุลของ Fas ที่อยู่บนผิวเซลล์เป้าหมาย เมื่อพบว่ากลไกนี้ต้องมีโมเลกุลของ Fas อยู่บนผิวเซลล์เป้าหมาย จึงคิดว่า Fas น่าจะเป็น receptor ของโมเลกุลใดโมเลกุลหนึ่งที่อยู่บนผิวของ CTL หรือหลังจาก CTL เมื่อโมเลกุลนั้นจับกับ Fas จึงกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์ มีผลให้เซลล์เกิด apoptosis⁸ ต่อมาในปี ค.ศ. 1994 Suda และ Nagata ได้แสดงให้เห็นว่าบนผิว CTL มีโมเลกุลดังกล่าวจริง จึงเรียกว่า Fas ligand (FasL) การศึกษาของ Suda และ Nagata ทำโดยสังเคราะห์โมเลกุลของ Fas ในรูป soluble form ขึ้นมา และพบว่า soluble form ของ Fas ที่สังเคราะห์ขึ้นมานี้ สามารถยับยั้งไม่ให้ CTL ทำลายเซลล์เป้าหมายที่มี Fas บนผิวเซลล์ได้ แสดงว่าน่าจะมี FasL อยู่บนผิว CTL จริง และถูกจับด้วย soluble Fas จึงไม่เหลือ FasL ที่จะไปจับกับ Fas ที่อยู่บนผิวเซลล์เป้าหมาย ทำให้เซลล์เป้าหมายไม่ถูกทำลาย นอกจากนี้เมื่อย้อมเซลล์ CTL ด้วย soluble Fas และวิเคราะห์โดย flow cytometry พบว่าย้อมติดจางๆ แต่ต่างจากเซลล์ที่ย้อมไม่ติดอย่างชัดเจน และเพื่อยืนยันว่ามี FasL บนผิว CTL จริงๆ Suda และ Nagata ใช้เครื่อง Fluorescence activated cell sorter คัดเลือก (sorting) เซลล์ที่มี FasL ปริมาณสูงจาก CTL cell line ที่มีอยู่ แล้วนำเซลล์ที่ผ่านการคัดเลือกมาเลี้ยงเพิ่มจำนวนแล้วนำไปคัดเลือกใหม่ ทำแบบนี้ 18 รอบ ทำให้ได้ CTL subline ที่มีปริมาณ FasL สูงกว่าเซลล์เริ่มต้นถึง 120 เท่า พบว่า CTL

subline ที่ได้นี้มีความสามารถในการทำลายเซลล์เป้าหมายที่มี Fas ได้มากกว่าเดิมถึง 100 เท่าเช่นกัน จากนั้นจึงแยกโมเลกุลของ FasL จาก CTL subline ที่ได้และทำให้บริสุทธิ์โดยเทคนิคทางโครมาโตกราฟี พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุล 40 กิโลดาลตัน และ FasL ที่แยกได้นี้สามารถทำลายเซลล์เป้าหมายได้เช่นเดียวกับ CTL cell line โดยทำลายเฉพาะเซลล์ที่มี Fas บนผิวเซลล์เท่านั้น กลไกการฆ่าดังกล่าวนี้ไม่ใช่เกิดจาก perforin และ granzymes เพราะไม่ต้องอาศัย Ca^{++} และไม่ใช่เกิดจาก tumor necrosis factor (TNF) หรือ lymphotoxin (LT) เพราะน้ำหนักโมเลกุลของ FasL ต่างจากของ TNF และ LT⁹ ต่อมาหลังจาก clone cDNA ได้แล้ว พบว่า ลักษณะโมเลกุล ไม่มี signal sequence อยู่ที่ N-terminal มี hydrophobic amino acid อยู่กลางโมเลกุล จัดเป็น type II membrane protein เพราะมี carboxy terminal อยู่ด้านนอกเซลล์ และจัดอยู่ใน TNF family พบโมเลกุลของ FasL เฉพาะบน activated T cell เท่านั้น และไม่พบ mRNA ของ FasL ใน B cell macrophage หรือ fibroblast^{6,7}

จากข้อมูลข้างต้นทำให้ทราบว่า FasL เสมือนเป็น death factor และ Fas เป็น receptor ที่อยู่บนผิวของเซลล์เป้าหมาย การกระตุ้นให้เกิด apoptosis เข้าใจกันว่า เกิดจากการเชื่อมโยง (cross-link) โมเลกุลของ Fas เข้าด้วยกัน ซึ่งสามารถเชื่อมด้วย antibody ต่อ Fas หรือด้วย FasL ที่อยู่บนผิวเซลล์หรือแม้แต่ว่าด้วย FasL ที่ถูกสร้างและปล่อยออกมาในรูปสารละลาย (soluble FasL) การที่ soluble FasL ทำให้เกิด cross-linking ของ Fas ได้ เพราะ FasL ที่อยู่ในรูปสารละลายจะอยู่ร่วมกันเป็นสารประกอบของ 3 โมเลกุล (trimeric) เมื่อจับกับ Fas จึงสามารถทำให้เกิด cross linking ของ Fas ได้ หลังจากโมเลกุลของ Fas ถูกเชื่อมโยง จะมีโปรตีนหลายชนิดภายในเซลล์มาจับที่ death domain ของ Fas และมีการกระตุ้นเอนไซม์ protease ภายในเซลล์ มีผลให้เซลล์

เกิด apoptosis กลไกที่เกิดขึ้นระหว่างที่โปรตีนเหล่านี้จับกับ death domain ของ Fas และการกระตุ้นเอนไซม์ protease ภายในเซลล์ ยังต้องมีการศึกษารายละเอียดเพิ่มเติมอีก⁶

เมื่อมีรายงานการพบ FasL บนผิวของ CTL cell line หลายชนิด และคาดว่า Fas และ FasL อาจจะเกี่ยวข้องกับการทำลายเซลล์เป้าหมายของ CTL เพื่อตอบคำถามว่า Fas และ FasL เกี่ยวข้องกับการทำลายเซลล์เป้าหมายของ CTL จริงหรือไม่ นักวิทยาศาสตร์แบ่งการศึกษาเป็น 2 ขั้นตอน คือ ขั้นตอนแรกเพื่อที่จะศึกษาว่า perforin และ granzymes เป็นกลไกเพียงชนิดเดียวที่ CTL ใช้ทำลายเซลล์เป้าหมายหรือไม่ นักวิทยาศาสตร์ 2 กลุ่ม คือ กลุ่มของ Kagi และกลุ่มของ Lowin ใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมศาสตร์สร้างหนูที่ไม่มียีนที่กำหนดการสร้าง perforin (perforin knock-out mice) ขึ้นมา หนูดังกล่าวสามารถดำรงชีวิตอยู่และสืบพันธุ์ได้ มีจำนวน CTL ปกติ แต่ความสามารถในการกำจัดเชื้อไวรัสและเซลล์มะเร็งบกพร่อง ถ้า perforin และ granzymes เป็นกลไกเพียงชนิดเดียวที่ CTL ใช้ทำลายเซลล์เป้าหมาย CTL จากหนูพันธุ์ดังกล่าวจะต้องไม่สามารถทำลายเซลล์เป้าหมายได้เลย แต่จากผลการศึกษากลับพบว่า หนูที่ขาดยีนที่กำหนดการสร้าง perforin แม้ว่า cytotoxic activity ส่วนใหญ่จะหายไปแต่ยังมีบางส่วนหลงเหลืออยู่ จึงเชื่อกันว่า น่าจะมีกลไกอื่นอีกที่ CTL ใช้ทำลายเซลล์เป้าหมาย ขั้นตอนที่ 2 เพื่อศึกษาว่ากลไกอื่นนั้นจะเกี่ยวข้องกับ Fas หรือไม่ ทำโดยเปลี่ยนเซลล์เป้าหมายให้เป็นเซลล์ที่ไม่มี Fas (ได้จากหนูที่มี mutation ของยีนที่กำหนดการสร้าง Fas)¹¹ พบว่า cytotoxic activity ที่เหลืออยู่เล็กน้อยนั้นกลับหายไปทั้งหมด การที่ CTL จากหนูที่ไม่มียีนที่กำหนดการสร้าง perforin ไม่สามารถทำลายเซลล์เป้าหมายที่ไม่มี Fas ได้ แสดงว่ากลไกที่ CTL ใช้ทำลายเซลล์เป้าหมายน่าจะมีเพียง 2 กลไกเท่านั้น คือ perforin pathway และ Fas-FasL pathway และจากผลการศึกษาดังกล่าวเห็นได้ชัดว่า กลไกทั้งสองนี้ไม่เกี่ยวข้อง

กัน เพราะ CTL ที่ไม่มี perforin สามารถทำลายเซลล์เป้าหมายที่มี Fas ได้ ขณะเดียวกันเซลล์เป้าหมายที่ไม่มี Fas ก็ถูกทำลายได้โดย CTL จากหนูปกติได้³⁻⁵

เมื่อมี 2 กลไกที่เกี่ยวข้อง จึงเกิดคำถามว่ากลไกใดสำคัญกว่า ทำไมจึงต้องมีถึง 2 กลไกจากการศึกษาของ Lowin และคณะ สามารถประมาณได้ว่า 2 ใน 3 ของความสามารถในการทำลายเซลล์เป้าหมายของ CTL เป็นกลไกที่เกิดจาก perforin และ ประมาณ 1 ใน 3 เป็นกลไกที่เกิดจาก Fas อย่างไรก็ตาม จากการที่พบว่า โมเลกุลของ Fas บนเซลล์แต่ละชนิด มีปริมาณต่างกัน และภาวะการติดเชื้อแต่ละชนิดอาจมีผลต่อปริมาณของ Fas และ FasL ที่อยู่บนผิวเซลล์เป้าหมายและบนผิว CTL ดังนั้น นักวิทยาศาสตร์จึงคาดว่า การที่มี 2 กลไกอาจจะมีประโยชน์ต่อการที่ CTL ทำลายเซลล์เป้าหมายที่ต่างชนิดกันมากกว่า คือ เป้าหมายที่มีและไม่มี Fas⁵

นอกจากนี้ จากภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์วิดีโอ (Video-microscopy) ที่เห็นว่า CTL เซลล์เดียวสามารถทำลายเซลล์เป้าหมายได้หลายเซลล์โดยทำลายทีละเซลล์นั้น มีคำถามว่า CTL ทำได้อย่างไร โดยการปล่อย granule เพียงบางส่วนและเก็บบางส่วนไว้ทำลายเซลล์เป้าหมายอื่นๆ หรือโดยเปลี่ยนจากการทำลายด้วย perforin มาเป็น Fas system ในปี ค.ศ. 1995 Griffiths ได้ให้ข้อคิดเห็นในเรื่องนี้ว่า จากผลการทดลองที่ผ่านมา พบว่า ขณะที่ granzymes และ perforin ถูกใช้ไป เซลล์สามารถสร้างชิ้นใหม่ทดแทนได้ ทำนองเดียวกัน FasL ก็ถูกสร้างขึ้นใหม่ได้โดยการกระตุ้น CTL ผ่าน T cell receptor ดังนั้น จึงไม่จำเป็นที่ CTL จะต้องเปลี่ยนกลไกการทำลายเซลล์เป้าหมายจากกลไกหนึ่งมาเป็นอีกกลไกหนึ่ง เพราะไม่เหลือ granule ที่มี perforin และ granzymes หรือ ไม่เหลือ FasL บนผิวเซลล์ Griffiths จึงสรุปทำนองเดียวกันว่า การที่มี 2 กลไกน่าจะมีประโยชน์ในการทำลายเซลล์เป้าหมายที่ต่างชนิดกันคือ เป้าหมายที่มีและไม่มี Fas มากกว่าเพื่อที่จะ

ใช้สลับกันในการทำลายเซลล์เป้าหมายให้ได้หลายเซลล์²

สรุปว่า กลไกการทำลายเซลล์เป้าหมายของ CTL มีเพียง 2 กลไกเท่านั้น คือ กลไกที่ต้องอาศัย Ca^{++} โดย perforin และ granzymes และกลไกที่ไม่ต้องอาศัย Ca^{++} โดย Fas system กลไกทั้งสองเป็นอิสระต่อกัน แต่สามารถเกิดร่วมกันและส่งเสริมกันได้⁴ อย่างไรก็ตาม มีข้อสังเกตว่า การศึกษาการทำลายเซลล์เป้าหมายทั้งหมดที่กล่าวมานี้ เป็นการศึกษากลไกที่ดูผลในระยะสั้น คือ 4-5 ชั่วโมง ในร่างกายสิ่งมีชีวิตอาจมีกลไกอื่นที่สำคัญแต่ต้องใช้เวลานานกว่าเซลล์เป้าหมายจะถูกทำลาย เช่น โดย tumor necrosis factor- α ซึ่งพบบนผิว CTL ส่วนใหญ่¹ จากการศึกษาในหลอดทดลอง พบว่า ต้องใช้เวลา 24-48 ชั่วโมงจึงจะสามารถตรวจพบการทำลายเซลล์เป้าหมายโดย tumor necrosis factor ได้ นอกจากนี้ จะเห็นได้ว่า ยังคงมีคำถามอีกมากมายเกี่ยวกับกลไกการเกิด apoptosis ของเซลล์เป้าหมายของ CTL เช่น รายละเอียดเกี่ยวกับกลไกการทำงานร่วมกันของ perforin และ granzymes หรือกลไกภายในเซลล์เป้าหมายที่ถูกกระตุ้นให้เกิด apoptosis ว่าเกี่ยวข้องกับโปรตีนอะไรในเซลล์บ้างและทำไมเซลล์เป้าหมายจึงเกิด apoptosis ได้ เป็นต้น ความรู้ที่ได้นอกจากจะทำให้เข้าใจพื้นฐานของกลไกการทำงานของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันแล้ว ยังอาจจะเป็นประโยชน์ต่อการป้องกันและรักษาโรคติดเชื้อไวรัส โรคมะเร็ง และยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการปลูกถ่ายอวัยวะให้ได้ผลสำเร็จอีกด้วย

เอกสารอ้างอิง

1. Berke G. The CTL's kiss of death. *Cell* 1995; 81: 9-12.
2. Griffiths GM. The cell biology of CTL killing. *Curr Opin Immunol* 1995; 7: 343-8.
3. Kagi D, Ledermann B, Burki K. Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-deficient mice. *Nature* 1994; 369: 31-7.
4. Kagi D, Vignaux F, Ledermann B. *et al.* Fas and perforin pathways as major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity. *Science* 1994; 265: 528-30.
5. Lowin B, Hahne M, Mattmann C, Tschopp J. Cytolytic T-cell cytotoxicity is mediated through perforin and Fas lytic pathways. *Nature* 1994; 370: 650-2.
6. Nagata S, Goldstein P. The Fas death factor. *Science* 1995; 267: 1449-56.
7. Nagata S, Suda T. Fas and Fas ligand: lpr and gld mutations. *Immunology Today* 1995; 16: 39-43.
8. Rouvier E, Luciani MF, Golstein P. Fas involvement in Ca^{++} independent T cell-mediated cytotoxicity. *J Exp Med* 1993; 177: 195-200.
9. Suda T, Nagata S. Purification and characterization of the Fas-ligand that induces apoptosis. *J Exp Med* 1994; 179: 873-8.
10. Trauth BC, Klas C, Peter AMJ, *et al.* Monoclonal antibody-mediated tumor-regression by induction of apoptosis. *Science* 1989; 245: 301-5.
11. Watanabe-Fukunaga R, Brannan CI, Copeland NG, Jenkins NA, Nagata S. Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature* 1992; 356: 314-7.
12. Yonehara S, Ishii AI, Yonehara M. A cell-killing mAb (anti-Fas) to a cell surface antigen codown regulated with the TNF-receptor. *J Exp Med* 1989; 169: 1747-56.