

# Fc Receptors in Liver Sinusoidal Endothelial Cells in NZB/W F1 Lupus Mice : A Histological Analysis Using Soluble Immunoglobulin G-Immune Complexes and a Monoclonal Antibody (2.4G 2)

メタデータ	言語: jpn 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-11-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: SYED, SALAHUDDIN AHMED メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10271/1047">http://hdl.handle.net/10271/1047</a>

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 194号	学位授与年月日	平成 8年 3月26日
氏名	SYED SALAHUDDIN AHMED		
論文題目	<p>Fc Receptors in Liver Sinusoidal Endothelial Cells in NZB/W F1 Lupus Mice:A Histological Analysis Using Soluble Immunoglobulin G-Immune Complexes and a Monoclonal Antibody (2.4G2)  (NZB/W F1 マウスにおける肝類洞壁内皮細胞の Fc レセプター：可溶性 immunoglobulin G-immune complex と単クローン抗体 2.4G 2 を用いた解析)</p>		

博士(医学) SYED SALAHUDDIN AHMED

論文題目

Fc Receptors in Liver Sinusoidal Endothelial Cells in NZB/W F1 Lupus Mice: A Histological Analysis Using Soluble Immunoglobulin G-Immune Complexes and a Monoclonal Antibody (2.4G2)

(NZB/W F1 マウスにおける肝類洞内皮細胞の Fc レセプター：可溶性 immunoglobulin G-immune complex と単クローン抗体 2.4G2 を用いた解析)

論文の内容の要旨

代表的な自己免疫疾患の一つである紅斑性狼瘡 (SLE) では、免疫複合体 (IC) が、血中に現れるとともに組織に沈着し、腎炎などを起こす。このため SLE における血中 IC とくに IgG 型 IC (IgG-IC) の代謝について、種々検討されてきた。その結果、SLE では、マクロファージの Fc $\gamma$  レセプター (FcR) が減少し、赤血球抗赤血球 IgG-IC の血液クリアランスが低下していることが明らかにされている。しかし、組織障害性の強い可溶性 IgG-IC のクリアランスは、正常ないし亢進状態にあると言われている。

一方、血中投与された赤血球抗赤血球 IgG-IC が主に脾のマクロファージによって処理されるのに対して、可溶性 IgG-IC は肝で代謝される。この肝の働きが、マクロファージの FcR を抗原として作られた抗 FcR 抗体 2.4G2 によって阻害されることから、血中可溶性 IgG-IC は、FcR を介して Kupffer 細胞によって代謝されると考えられてきた。しかし、最近、肝類洞内皮細胞 (洞内皮) も FcR を持ち、可溶性 IgG-IC を摂取し分解することが証明され、19S 以下の IgG-IC の場合、洞内皮が Kupffer 細胞を凌ぐ量を処理することも判ってきた。これら IgG-IC 代謝についての知見を総合した場合、SLE では、洞内皮の IgG-IC 処理能が保たれている可能性が示唆される。しかし、SLE における洞内皮の機能について検討した研究は見あたらない。そこで本研究では、洞内皮による IgG-IC 処理と SLE の関係を解析することを目的として、まず、肝による IgG-IC 代謝を阻害する抗 FcR 抗体 2.4G2 が、洞内皮 FcR と反応するか否かを検討し、次いで、SLE 自然発症マウス NZB/W F1 における洞内皮 FcR の発現と ligand 結合能を組織学的に分析した。

〔研究材料と方法〕

動物：5週-9ヵ月齢の雌性 NZB/W F1 マウスを研究対象とし、対照動物として同齢の雌性 NZW マウスを使った。また、Kupffer 細胞と洞内皮を識別するため、一部の動物には、屠殺前に墨汁を尾静脈投与した。なお、本研究で使用した動物のうち、9ヵ月齢の NZB/W F1 の全てに進行したループス腎炎を認めた。

FcR の組織学的検出：新鮮凍結切片に、抗低親和性 FcR 単クローン抗体 (MAb) 2.4G2 を使った西洋ワサビ・パーオキシダーゼ (HRP) 標識酵素抗体間接法によって FcR 抗原を染色した。また、HRP 抗 HRPIgG 複合体 (PAPIgG) を ligand として反応させ、FcR と結合した PAPIgG をベンチジン反応で検出する方法も用いた。なお、洞内皮 FcR を選択的に検出するために、抗マクロファージ MAb F4/80 を用いたアルカリ・フォスファターゼ標識酵素抗体間接法で Kupffer 細胞を染めた後に、FcR を染めることも行った。

FcR 活性の抑制実験：予め MAb 2.4G2 で処理した組織に、PAPIgG を反応させ FcR 活性への MAb 2.4G2 と抗 Clq 抗体の影響をみた。また、熱変性 IgG を PAPIgG 液に加え、競合試験も行った。

Kupffer 細胞数の算出: Kupffer 細胞を上記の方法で染め、単位面積当りの Kupffer 細胞数をマイクロメーターを用いて求めた。

〔結果〕

FcR 抗原の肝内分布: 検索した全てのマウスにおいて、肝類洞壁に沿って連続的に FcR 抗原が認められた。また、墨汁投与動物の組織に、FcR 抗原とマクロファージ特異抗原 F 4 / 80 の二重染色を施した標本では、炭粉を少量摂取した F 4 / 80 抗原陰性の洞内皮に、FcR 抗原が明瞭に認められた。

FcR 活性の肝内分布: FcR 活性すなわち FcR の ligand として用いた PAPIgG の結合が、FcR 抗原同様に類洞壁に認められ、洞内皮に陽性であった。

MAb 2, 4G 2 と熱変性 IgG による FcR 活性の抑制: NZB/W F1 マウスと NZW マウスにおいて、洞内皮と PAPIgG の結合は、20.0  $\mu$ g/ml の MAb 2, 4G 2 では完全に抑制された。また、PAPIgG 液に熱変性 IgG を 0.07 から 0.62 mg/ml 加えた場合、類洞壁細胞と PAPIgG の結合が不完全に抑制され、1.25 mg/ml では完全に抑制された。

Kupffer 細胞数: 5 週齢から 5 ヶ月齢まで、NZB/W F1 と NZW とともに、Kupffer 細胞数は漸増したが、2 群間に有意差はなかった。しかし、9 ヶ月齢では、NZB/W F1 の Kupffer 細胞数が著しく増え、NZW の 2 倍に達した。

PAPIgG 染色強度の加齢による変化: Kupffer 細胞を含む全類洞壁細胞における PAPIgG 染色強度は、NZB/W F1 と NZW とともに、5 ヶ月齢を頂点として変化し、NZB/W F1 は、5 週齢と 2 ヶ月齢で、NZW より有意に強い染色性を示した。しかし、9 ヶ月齢では、Kupffer 細胞の過形成にもかかわらず著しく減弱し、NZW より有意に低値を示した。また、MAb F 4 / 80 との重染色によって洞内皮 FcR を選択的に染めた標本も、類洞壁全体の場合と同様の变化を示した。

MAb 2, 4G 2 染色強度の加齢による変化: MAb 2, 4G 2 による洞内皮の染色強度は、NZB/W F1 と NZW とともに、PAPIgG 染色強度と同様に加齢ともなって変動した。

〔結論〕

本研究によって、マウスの洞内皮 FcR が、MAb 2, 4G 2 と反応する低親和性 FcR であることが明らかになり、この FcR が可溶性 IgG-IC の代謝に重要な役割を担うことの再確認ができた。また、NZB/W F1 マウスの洞内皮 FcR が、SLE 発症前の 1 - 5 ヶ月齢に、非自己免疫マウス NZW と同等か、それ以上の ligand 結合活性を示したことは、NZB/W F1 マウス (3 - 6 ヶ月齢) の可溶性 IgG-IC 血液クリアランスが、正常ないし亢進状態にあると言われていることと密接な関係があると考えられる。しかし、9 ヶ月齢において、Kupffer 細胞とともに洞内皮が、FcR 活性と抗原発現の著しい低下を示したことから、SLE 末期には、肝による可溶性 IgG-IC 処理が障害されている可能性が強く示唆される。

## 論文審査の結果の要旨

代表的な自己免疫疾患である全身紅斑性狼瘡 (SLE) では、免疫複合体 (IC) が病態を形成する主要原因とされ沢山の研究が積み重ねられてきた。SLE の IgG 型 IC (IgG-IC) は血中に現れ、組織に沈着し、腎炎などをおこす。実験的に赤血球抗赤血球 IgG-IC が主に脾のマクロファージによって処理されるのに対し、可溶性 IgG-IC は肝で代謝される。この肝の働きが、マクロファージの Fc レセプター (FcR) に特異的な抗 FcR 抗体 2, 4G 2 で阻止されることから、血中可溶性 IgG-IC は Kupffer 細胞の FcR を介して取り込まれ代謝されると考えられてきた。肝類洞内皮細胞 (洞内皮) も FcR を

持ち、同様に分解し、Kupffer細胞を凌ぐ量処理することが最近判ってきた。

申請者はSLEにおける洞内皮の機能について検討した研究が見あたらないことから、洞内皮によるIgG-IC処理とSLEの関係を解析することを目的とした。SLEモデルマウスNZB/W F1を用いて洞内皮FcRの発現、FcRの反応性について加齢と病態との関係について検索した。

申請者の論文内容、口頭発表を審査した結果、次の新しい内容が評価された。

1. 肝内の洞内皮にFcR抗原が存在することを、まず明らかにした。FcRのリガンドであるPA-PIgG (HRP抗HRPIgG複合体)が反応している洞内皮の存在を免疫組織化学的に検索することによって、活性FcRの存在を明確にした。
2. PAPIgG反応は低親和性抗FcR単クローン抗体、MAb 2.4G2、および熱変性IgGで抑制されることから、洞内皮のFcRの存在をより明確にした。
3. 洞内皮のFcRは3～6ヵ月齢NZB/W F1マウスで可溶性IgG-IC血液クリアランスが亢進状態にあるが、9ヵ月齢になるとKupffer細胞とともにFcR活性とFcR抗原量の著しい低下を示すことを明らかにした。

以上を総合して申請者は、肝における可溶性IgG-IC処理がSLE末期に障害されることが、抗原・抗体複合体による病態形成と深く関係していると主張した。

論文審査の過程で申請者に対し、次のような質疑がなされた。

- 1) 抗原・抗体複合体、IgG-ICのIgGサブクラス、およびその分子量について
- 2) 洞内皮にはC3bレセプターが表現しているか
- 3) 高親和性免疫グロブリン、および異常免疫グロブリンについて
- 4) NZB/W F1マウスの腎炎発症と、洞内皮、Kupffer細胞のFcR活性レベルとの関係について
- 5) Kupffer細胞と洞内皮の炭粉摂取の様式の違いについて
- 6) Kupffer細胞には低親和性FcRがあるか
- 7) 肝臓より抗原・抗体複合体を抽出してみたか
- 8) 血清エストロゲン値を測定したか
- 9) SLEの末期にFcR活性の低下が見られるか
- 10) 自己免疫病でFcR活性低下がおきるか

以上の質疑に対し申請者の解答はおおむね適切であり、問題点も十分理解しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で判定した。

論文審査担当者 主査 教授 吉田 孝人

副査 教授 瀧川 雅浩 副査 教授 山下 昭

副査 助教授 小出 幸夫 副査 講師 大橋 弘幸