

# Endocytosis of soluble IgG immune complex and its transport to lysosomes in hepatic sinusoidal endothelial cells

メタデータ	言語: jpn 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-30 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 小杉, 伊三夫 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10271/1460">http://hdl.handle.net/10271/1460</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	医博論第 183号	学位授与年月日	平成 6年 7月22日
氏名	小杉伊三夫		
論文題目	Endocytosis of soluble IgG immune complex and its transport to lysosomes in hepatic sinusoidal endothelial cells (肝類洞内皮細胞における可溶性 IgG 型免疫複合体の摂取とライソゾームへの移送)		

博士(医学) 小杉伊三夫

論文題目

Endocytosis of soluble IgG immune complex and its transport to lysosomes in hepatic sinusoidal endothelial cells

(肝類洞内皮細胞における可溶性 IgG 型免疫複合体の摂取とライソゾームへの移送)

論文の内容の要旨

血液中の可溶性 IgG 型免疫複合体 (IgG immune complex : IgG-IC) の多くは肝で代謝される。肝での IgG-IC 処理には、Fc $\gamma$  レセプター (Fc $\gamma$  receptor : FcR) と補体レセプター (C3 receptor : CR 1) を持つ Kupffer 細胞のみが関与するとされていたが、肝類洞内皮細胞 (洞内皮細胞) も FcR を持ち IgG-IC を摂取することが明らかとなっている。さらに、洞内皮細胞は CR 1 を持たないことから、IgG-IC の中でも抗原過剰域で形成される補体反応性の低い IgG-IC の代謝に関与することが推測される。しかし、洞内皮細胞で摂取された IgG-IC が細胞内でどのような経路を辿るのかは明らかでない。一方、肝細胞も IgG-IC の代謝に関与しているとの報告もみられるが、FcR 及び CR 1 を持たないとされる肝細胞がどのようにして IgG-IC を摂取しているのかも不明である。本研究では、IgG-IC 代謝における洞内皮細胞の重要性を明確にするために、摂取された IgG-IC が洞内皮細胞内でライソゾーム (lysosome) に移送され分解されるか否かを光顕・電顕免疫組織化学的な観察によって検討した。同時に肝細胞の IgG-IC 代謝への関与についても検討した。

方法：等量点の 5 倍過剰量のウシ血清アルブミン (bovine serum albumin : BSA) と抗 BSA マウス IgG を用いて IgG-IC を作製し、ショ糖密度勾配遠心法により IgG-IC の 95% は沈降係数 20 S 以下の小形状のものであることを確認した。また、F(ab')<sub>2</sub> 型抗体からなる IC も作製した。これらの IC もしくは BSA のみを ICR マウスに静注し、1、5、15、30、120 分後の肝における摂取像をペルオキシダーゼ標識抗 BSA ウサギ Fab' を用いた酵素抗体直接法で観察した。光顕観察は新鮮凍結切片を、電顕観察は灌流固定組織を対象に行った。なお、一部のマウスでは、IgG-IC 投与 4 時間前に直径 810 nm のラテックス粒子を静注し、Kupffer 細胞をラテックス貪食細胞として同定した。lysosome の同定は酸性ホスファターゼ (acid phosphatase : AcP) 染色によった。さらに、IgG-IC と lysosome の局在を同時に観察するために、IgG-IC と AcP の二重染色を行った。

結果：1~120 分のいずれにおいても、IgG-IC は洞内皮細胞と Kupffer 細胞で摂取され、肝細胞での摂取像は認められなかった。また、F(ab')<sub>2</sub> 型抗体からなる IC および BSA は摂取されなかった。IgG-IC の染色濃度は 15 分で最も強く、30 分で低下し 120 分では著明に低下した。電顕では、洞内皮細胞の類洞側表面において IgG-IC は被覆小孔 (coated pit) を介して細胞内に取り込まれ、5 分以降ではエンドソーム (endosome) もしくは lysosome と考えられる管状構造物及び直径 300~800 nm の大きな空胞内に多く認められた。AcP 染色によって大きな空胞は AcP 陰性のもの (endosome) と陽性のもの (lysosome) とに識別できた。さらに、IgG-IC と AcP との二重染色で IgG-IC 陽性の大きな空胞の一部において IgG-IC と AcP の同時局在を認めた。また、いずれの時点においてもディッセ (Disse) 腔に面した洞内皮細胞表面ならびに肝細胞表面に IgG-IC は認められなかった。

結論：洞内皮細胞は FcR を持ち CR 1 を持たないことが既に報告されている。この事実に加え、本研究では IgG-IC のみが coated pit を介して取込まれ Fc 部分の無い IC は取込まれないことから、洞内

皮細胞での IgG-IC の摂取 (endocytosis) は FcR を介することが確認された。また、5～15分で IgG-IC は lysosome に移送されることが判った。さらに、IgG-IC 中の BSA の抗原性を指標としてみる限り、洞内皮細胞内において IgG-IC は少なくともその抗原性が無くなるまで分解され、免疫複合体の持つ特有の構造 (抗原抗体結合) と生物活性が消失するものと考えられた。以上から、洞内皮細胞は抗原過剰域で形成される補体反応性の低い小形状 IgG-IC の代謝に重要な役割を演じていることが明らかとなった。同時に、肝細胞の IgG-IC 代謝への関与は認められなかった。

### 論文審査の結果の要旨

B リンパ球、および形質細胞における免疫グロブリン分子 (Ig) の合成機序の詳細は、近年の研究により次第に明らかにされたが、Ig の生体内における代謝過程やその機序に関しては不明な点が多く、その解明が待たれているところである。

申請者は Ig の代謝部位として肝臓に着目し、肝内の各種細胞、とくに Fc $\gamma$  レセプター (FcR) を持つ洞内皮細胞と、FcR と補体レセプター (C3b receptor : CRI) のいずれも持たない肝細胞の可溶性 IgG 型免疫複合体 (IgG immune complex : IgG-IC) の摂取と分解の機序について形態学的、ならびに免疫組織化学的方法で解明しようとした。

申請者の口頭発表と論文内容に関し、審査委員会で評価された点は次のとおりである。

1. ウシ血清アルブミン (bovine serum albumin : BSA) と抗 BSA マウス IgG と F(ab')<sub>2</sub> 分画を準備した。ついで、IgG-IC を ICR マウスに静注し肝内の各種細胞における摂取能をペルオキシダーゼ標識抗 BSA ウサギ Fab' による酵素抗体直接法で検索し、さらに、光顕的、ならびに電顕的観察をおこなって細胞内小器官、とくに ; lysosome への移行像を酸性フォスファターゼ (acid phosphatase : AcP) 染色法で検索した。これらの研究法は、本研究目的を解明するために適切であり、また、手法、精度、再現性などの点で問題がないと評価された。

2. IgG-IC は静注後 1～120分で、洞内皮細胞と Kupffer 細胞によって摂取されたが、肝細胞では摂取像は認められなかった。洞内皮では F(ab')<sub>2</sub> 型抗体や BSA の摂取が認められなかったことから、IgG-IC の摂取は FcR を介すると推論した。

3. 電顕的観察により、投与後 5～15分で IgG-IC はまず洞内皮細胞膜の coated pit を介して細胞質内に取りこまれ、さらに、酸性フォスファターゼ陰性の endosome と陽性の lysosome 内に移送されることを明らかにした。

4. 本実験では、抗原過剰域で形成された補体反応性の低い小形状の IgG-IC を用い、FcR<sup>+</sup>、CRI<sup>-</sup> 洞内皮細胞での局在を見いだしたことから、洞内皮は FcR を介して小形状の IgG-IC を摂取し、その生体内代謝に関与すると推論した。

5. 洞内皮の IgG-IC の分解の程度に関しては、IgG-IC や BSA の抗原性の消失がみられることから、IC の立体構造と生物活性の両方が変化するか消失するに至るまで分解されていると推論した。

審査委員会では、本研究が Ig の代謝機構のうち、補体反応性の低い小形状 IgG-IC の代謝に肝の洞内皮が重要な役割を演じていることを明らかにした点が、独創的であると高い評価が与えられた。残された点として、内皮に摂取された IgG-IC の超微形態の詳細、定量的な解析、再現性、ならびにその経時的变化などを明らかにすることにより、今後さらに研究を進展されることが期待された。

審査の過程において、申請者に対し次のような質疑がなされた。

1. 用いた ICR マウスの飼育状況について

2. 洞内皮と Kupffer 細胞における IgG-IC の摂取能の違いについて
3. coated pit の vesicotubular 構造とは
4. IC と AcP の二重染色における各反応物の電顕像の相違
5. IC-AcP 反応物の立体構造を電顕レベルで観察できないか
6. 洞内皮の細胞質内における IC の定量化は可能か
7. 洞内皮の熱処理 IgG-IC 摂取能について

以上の質疑に対し、申請者はほぼ適切な解答をおこなったので、本論文が博士（医学）の学位授与に値する内容を備えているものと審査委員全員で判定した。

論文審査担当者 主査 教授 山下 昭  
副査 教授 寺 皮 進 副査 教授 吉 田 孝 人  
副査 助教授 梶 村 春 彦 副査 助教授 中 村 達