内皮細胞障害による臓器病変

—内皮細胞膜上における抗原・抗体反応を中心として—

松尾清一・深津敦司*

Organ injury due to anti-endothelial antibodies—Interaction of antibodies with membrane antigens of the endothelial cells—

It has recently been reported that anti-endothelial cell antibody is present in several diseased conditions, but their roles in the pathogenesis of the disease are largely unknown. The aim of the present review is to summarize the events following the interaction of antibodies with plasma membrane antigens of the endothelial cells *in vivo* with special reference to the mechanisms of the immune deposit formation.

A series of studies using antibodies to rabbit angiotensin converting enzyme (ACE) revealed that; (1) the interaction of anti-ACE antibodies with cell surface ACE induced a rapid redistribution of ACE, and the formed immune complexes were shed from the plasma membrane, (2) the fate of immune complexes was different according to the structure and the function of each organ, i.e., deposition of immune complexes in the adjacent basement membrane in the glomerulus, vs, disappearance of ACE and its antibodies from the lung, (3) these processes were better observed in the mature oocytes *in vivo*.

The results obtained in these studies might have the relevance to the events occurring in human diseases in which organ injury is caused by antibody-mediated endothelial damage.

*Seiichi Matsuo・Atsushi Fukatsu**

key words: endothelial cell, immune complex, plasma membrane antigen, patching and shedding, anti-endothelial antibody

近年内皮細胞に関する知見が飛躍的に増加し、種々の病的状態における内皮細胞の重要性が認識されつつある。内皮細胞はその古典的な理解(すなわち基底膜と血流をわける隔壁であって凝固機転から血管を守り、炎症的にあっては受身的な存在であるとする理解)から、いまでは凝固・炎症・免疫・血管新生など広い範囲にわたって病態に積極的に関与していることが明らかにされている。これらについてはすでにすぐれた総説¹⁻³⁾が出されているので、本稿では内皮細胞膜上における抗

原・抗体反応によって惹起される組織病変を主として、反応の際形成される免疫複合体との関連で論ずることとしたい。

antibody-induced redistribution of plasma membrane antigens

細胞膜上に存在する抗原が抗体と反応した場合に、細胞膜上で抗原が抗体により小粒状に凝集され (clustering), 次いでエネルギー依存性にさらに大きな塊状に集まり (patching), 最後は大粒の cap 形成 (capping) をし、以後細胞内へ取り込まれる (internalization) か細胞外へ放出される (shedding) かして細胞膜から一時的に抗原が消失してしまう現象は、1967年、Boyce ら⁴⁾ が “antigenic modulation” というこぼで報告して以来、多くの細胞膜抗原について研究されてきた。

これらの変化を引き起こすためには、抗体(またはそれに類するレクチンのようなリガンド)は2価以上の多価であることが必要で、抗原物質は細胞膜の内外を貫く形のいわゆる trans membrane antigen であることが必要である⁵⁾。これらの抗原の中でも有名なものは Unanue 一派によるBリンパ球の表面免疫グロブリンに関するもの^{6,7)} であるが、この様子をシェーマにして図1に示した。

この現象が免疫グロブリン(抗体)の細胞膜抗原に対する作用を考えるうえで大変重要であることは、種々の病態(たとえばある種のウイルス感染症や重症筋無力症)で示唆されている。筆者らは、これまでの一連の研究からこの同じ現象が組織における免疫複合体沈着機序として重要であることを明らかにしてきた。

以下、それらの実験結果をもとに、*in vivo* における内皮細胞膜上における抗原・抗体反応を中心に、その結果惹起される病変について述べる。本稿では、膜抗原として主として全身の血管内皮細胞膜表面に存在するアンギオテンシン変換酵素

* The Third Department of Internal Medicine, Nagoya University School of Medicine 名古屋大学医学部第三内科学教室

(an-giotensin converting enzyme, 以下 ACE)を選び、抗 ACE 抗体を投与したときの肺・腎・卵巣における臓器障害を免疫病理学的な面から概説する。

ウサギ ACE を抗原とした実験系

(1) ヤギ抗ウサギ ACE 抗体

ウサギ肺から精製した ACE⁹⁾ をヤギに免疫して得た 抗血清⁹⁾ を コロンビア大学 内科 Caldwell 博士より 供与していただき 実験に 使用した。なお、この血清は肺の crude extract と反応させ、monospecific であることが 確認されている。また、この抗体はウサギの血管内皮、特に肺泡毛細血管内皮細胞に強く反応し、一部内皮以外に腎近位尿細管細胞刷子縁、脳脈絡叢刷子縁、さらに成熟卵細胞膜にも反応することがわかっている。

抗 ACE 抗血清をわずか 0.1 ml 静注するだけで、多くのウサギは肺出血/肺浮腫にて数時間のうちに死亡する¹⁰⁾。筆者らは、このような急性死を避けるため長時間かけて抗体を少量ずつ投与する方法で、各臓器の病変を経時的に観察した。

(2) 肺における病変

ACE は肺泡毛細血管内皮細胞の lumen 側の細胞膜に存在しているが、抗体静注とほぼ同時に(すなわち抗体が内皮細胞膜上の ACE と反応するとただちに)顆粒状の免疫複合物を形成する。すなわち、内皮細胞膜上で最初に述べたような抗原の redistribution(patching)を起こす。

さらに、抗体を少量ずつ投与すると 4 日目には肺から ACE・抗体 IgG とともに消失してしまい、ACE の酵素活性も肺から消失してしまうので、ACE は肺から完全に消失してしまったと考えられる。すなわち抗体と反応した ACE は最初に述べた shedding により流血中に放出され、内皮細胞膜から消失したと考えられる。この時点でウサギは抗 ACE 抗体に対してトレランスを獲得し、もはや大量に抗体を静注しても死亡しない。この現象を immunological enzymectomy と呼ぶ¹⁰⁾。抗体投与を中止すると、24 時間以内に ACE は再び肺にあらわれ、2 週間位で抗体投与前のレベルにもどる。

以上の様子を図 2 にまとめて示した。

(3) 腎(糸球体)における病変

糸球体に存在する ACE はごく微量であり、通常の間接蛍光抗体法では検出しがたい。しかし、

図 1 Antibody-induced redistribution of cell membrane antigen

アイソトープをラベルした抗 ACE 抗体を用いて腎灌流を行い抗体の結合量を定量してみると、糸球体 1 万個当たり約 5 μg の抗体が結合し ACE が存在していることがわかる。さらにウサギに ACE 阻害剤であるカプトプリルを投与しておくことと結合量は糸球体 1 万個当たり約 11 μg に増加し、ACE の拮抗的阻害剤により糸球体の ACE の発現が増すことがわかった¹¹⁾。

また抗 ACE 抗体を用いて腎灌流を行うと、蛍光抗体法で輸入細動脈および糸球体係蹄に添って抗体の結合が確認できること、さらにはヒト培養糸球体内皮細胞でも ACE の酵素活性が確認できることなどから、ACE は確かに糸球体に存在するといえる。

そこでまず、抗 ACE 抗体にペルオキシダーゼを標識して、ウサギの腎灌流を行い、抗体の結合様式を観察すると、抗体は内皮細胞膜に添い微細顆粒状に観察され、最初に述べた patching が起こっていることが確認された。

in vivo で抗体を 4 日間静注すると、1 日目には糸球体内皮細胞膜に添い、抗体は微細顆粒状に結合していることがわかった。このとき糸球体には多数の多核白血球の浸潤がみられ、内皮細胞は膨化/絨毛形成をきたして形態学的変化がいちじるしかった。抗体投与 4 日目—すなわち肺では ACE および抗体がすべて消失する時期—には、糸球体

図2
Mechanisms of antigen removal from the plasma membrane of the lung endothelium

図3
Mechanisms of immune deposition in glomerulus

では基底膜(GBM)上皮側に免疫沈着物が観察された。抗体投与を中止すると、時間の経過とともにこの沈着物は糸球体上皮細胞足突起間膜(slit membrane)のところへ凝集される。

蛍光抗体法・免疫電顕法でも顆粒状の抗体が観察され、いわゆる膜性腎症様の免疫沈着物の局在を呈する(図3)。このように腎糸球体においては肺と異なり、内皮細胞膜上での抗原・抗体反応とそれに引き続く抗原の re-distribution (patching/shedding) の後も糸球体に免疫複合物が存在し、

糸球体腎炎の特徴とされる GBM への免疫複合物の沈着をきたす。

肺と腎におけるこのような免疫複合物沈着に関する最終像の差は、これらの臓器の解剖学的ならびに循環生理学的な差異によるところが大きいと考えられる。すなわち、肺胞毛細血管内皮細胞は肺胞基底膜を一様に覆い、血液が直接基底膜に access できない構造となっている。したがって、内皮細胞管腔側細胞膜上で形成された免疫複合物は血流で運び去られ、基底膜側へは到達できない

図 4
Mechanisms of immune
deposition in ovary

ため、結果として肺組織から消失すると考えられる。

一方、糸球体ではその内皮細胞には fenestrae とよばれる小孔が無数に存在し、そこには glyco-calix の network があるものの、基本的には血流と GBM が直接的に接することができる。しかも、糸球体毛細血管は、管腔からボウマン腔に向かって強い濾過圧がかかっており、内皮細胞膜上で形成された免疫複合物は、内皮細胞から GMB 内皮下腔(subendothelial space)、さらに上皮下腔(subepithelial space)へと移動してゆくものと推察される。これら免疫複合物は、糸球体内皮細胞膜上で ACE と抗体との反応による *in situ* で形成されたもののほか、肺などの内皮細胞膜上で形成され、流血中に放出されたものが糸球体に捕捉されたものも含まれると考えられる。

また、肺や腎糸球体において抗体投与後、短時間で多核白血球を中心とした細胞浸潤がみられるが、そのメカニズムは本実験系では不明である。

最近、内皮細胞膜上に形成された iC3b と好中球膜の 3 型 補体レセプター(CR 3) による接着が *in vitro* のヒト培養内皮細胞で報告されており¹²⁾、ウサギではまだこれら補体レセプターの存在は必ずしも明確ではないが、筆者らの実験系で抗体投与直後から C₃ の沈着がみられることから白血球浸潤との関連が推察される。肺や糸球体における

内皮細胞障害には、これら浸潤細胞も深く関与していると思われる。

(4) 卵細胞

以上のような細胞膜上の抗原抗体反応による免疫複合物の生成および沈着過程を *in vivo* で詳細に観察するために、成熟卵細胞はもっとも適切な組織である。すなわち、成熟卵細胞はその周囲を zona pellucida とよばれる基底膜様の厚い細胞外基質で囲まれており、細胞膜上で形成された免疫複合物が細胞外へ放出された後の動態の観察に適している。

筆者らは、ACE が家兎の成熟卵細胞膜に存在することを見出した^{13,14)}。このことを利用して抗 ACE 抗体を少量ずつ 4 日間静注して卵細胞膜上の免疫複合物の動きを免疫組織学的に観察した。正常のウサギでは、ACE は成熟卵細胞膜上にびまん性(diffuse)に存在している。抗体投与 4 日目では卵細胞膜上に顆粒状に ACE と抗体 IgG が存在しており、抗体によって patching が起こっていることがわかる。4 日間で抗体投与を中止すると、卵細胞膜上で形成された顆粒状の免疫複合物は、しだいにその大きさを増しながら卵細胞膜表面から zona pellucida の外側へと徐々に移動してゆく。このとき卵細胞膜上には再び diffuse に ACE が発現されている¹⁴⁾。

zona pellucida の少なくとも一部は、卵細胞に

よって産生されているという報告があり、zona pellucida は卵細胞で形成されて順次外側、すなわち follicular space に向って移動すると考えられるので、免疫複合物の動きもこの流れにそったものと考えることができる(図4)。

細胞膜上における抗原抗体反応と免疫複合物の形成

ACE-anti ACE の実験系でみてきたように、ある種の細胞膜抗原と抗体との反応により抗原の局在の急速な変化(patching/capping)をきたし、さらに細胞膜から免疫複合物が放出(shedding)されるが、その際細胞に隣接して基底膜様の構造物が存在した場合に、免疫沈着物として観察が可能である。特に、腎糸球体の場合は、独特の内皮細胞の構造と濾過圧の存在により GBM への免疫複合物の沈着が起こりやすいと考えられる。このことは、糸球体内皮細胞抗原に限らず、血中の免疫複合物や内皮細胞膜に implant された外来性抗原(たとえばレクチン)^{15,16)}についても同様のことがいえる。

一方、肺では、逆にその構造的特性から免疫複合物の沈着が起こりにくいと考えられる。肺胞基底膜に流血中の抗体が到達しにくい事例として、抗基底膜抗体を投与したときにみられる現象があげられる。すなわち、ウサギあるいはマウス肺胞基底膜を免疫して作成した異種抗基底膜抗体をもとの動物に投与すると、糸球体基底膜には速かに抗体の結合がみられるが、肺胞基底膜には結合はまったくみられない。しかし、予め動物に100%酸素やガソリンを吸入させて肺胞内皮細胞の透過性を亢進させておくと、抗基底膜抗体は肺胞基底膜に結合するようになり、重篤な肺障害をきたす^{17,18)}。

また最近インターロイキン2とインターフェロン α を投与したマウスでも、同様に抗基底膜抗体による肺障害を起こすことが報告され、これらサイトカインによる血管内皮細胞の modulation とグッドパスチャー症候群の発症機転との関連が注目されている¹⁹⁾。

以上みてきたように、内皮細胞膜上における抗原抗体反応により惹起される基本的な生物学的現象(patching/shedding)は同じであるにもかかわらず、その最終像としての免疫複合物沈着の有無に

関してまったく異なる結果が得られるのは、各臓器の解剖学的、あるいは循環生理学的の差異に基づいていると考えられる²⁰⁾。ヒトの疾患においても肺疾患では、比較的免疫沈着物を認めることが少なく、一方、糸球体疾患では逆にそれが高率にみられるという事実も、これまでに述べてきたような観点から考えると理解しやすいのではないかとと思われる。

終わりに

最近、臓器移植はもちろんのこと、他の種々の疾患において抗内皮細胞抗体の存在が報告されているが、現在のところそれらの病態への関与は不明である。さらに、それら抗体の *in vivo* における動態はほとんどわかっていないが、今後の研究により正当な評価を得ることになると考えられる。

本稿では実験的な内皮細胞障害を抗体により惹起し、その結果引き起こされる臓器障害を免疫複合物沈着との関連で考えてみた。今後、同様の研究がヒト内皮細胞障害との関連で発展して行くことを望みたい。

稿を終えるに当たって、なが年にわたりご指導いただいたハーバード医学校 G. アンドレス教授ならびに ニューヨーク州立大学バッファロー校 J. ブレンチェン教授に感謝の念を捧げます。

文 献

- 1) Cotran, R.S.: Am. J. Pathol. 129: 407, 1987.
- 2) Pober, J.S.: Am. J. Pathol. 133: 426, 1988.
- 3) Vane, J.R., Auggard, E.E., Botting, R.M.: N. Eng. J. Med. 323: 27, 1990.
- 4) Boyce, E.A., Stockert, E., Old, L.J.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 58: 954, 1967.
- 5) Chatenaud, L., Bach, J-F.: Immunol. Today 5: 20-25, 1984.
- 6) Schreiner, G.F., Unanue, E.R.: Adv. Immunol. 24: 37, 1976.
- 7) Unanue, E.R., Karnovsky, M.J., Engers, H.D.: J. Exp. Med. 137: 675, 1973.
- 8) Soffer, R.L., Reza, R., Caldwell, P.R.B.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71: 1720, 1974.
- 9) Caldwell, P.R.B., Wigger, J.H., Fernandez, L.T., D'Alisa, R.M., Tse-Eng, D., Butler, V.P., Gigli, I.: Am. J. Pathol. 105: 54, 1981.
- 10) Barba, L.M., Caldwell, P.R.B., Downie, G.H., Camussi, G., Brentjens, J.R., Andres, G.: J. Exp. Med., 158: 2141, 1983.

- 11) Matsuo, S., Fukatsu, A., Taub, M.L., Caldwell, P.R.B., Brentjens, J.R., Andres, G.: J. Clin. Invest. 79: 1978, 1987.
- 12) Marks, R.M., Todd, III R.F., Ward, P.A.: Nature 339: 314, 1989.
- 13) Brentjens, J.R., Matsuo, S., Andres, G., Caldwell, P.R.B., Zamboni, L.: Experientia 42: 399, 1986.
- 14) Matsuo, S., Caldwell, P.R.B., Brentjens, J.R., Andres, G.: J. Clin. Invest. 75: 1369, 1985.
- 15) Matsuo, S., Yoshida, F., Yuzawa, Y., Hara, S., Fukatsu, A., Watanabe, Y., Sakamoto, N.: Kidney Int. 36: 1011, 1989.
- 16) Yoshida, F., Matsuo, S., Fukatsu, A.: Kidney Int. 35: 367(abstr.), 1989.
- 17) Jennings, L., Roholt, O.A., Pressman, D., Blau, M., Andres, G., Brentjens, J.R.: J. Immunol. 127: 129, 1981.
- 18) Yamamoto, T., Wilson, C.B.: Am. J. Pathol. 126: 497, 1987.
- 19) Queluz, T.H., Pawlowski, I., Brunda, M.J., Brentjens, J.R., Vladutiu, A.O., Andres, G.: J. Clin. Invest. 85: 1507, 1990.
- 20) Adnres, G., Brentjens, J.R., Caldwell, P.R.B., Camussi, G., Matsuo, S.: Lab. Invest. 55: 510, 1986.