

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：12611

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24592489

研究課題名(和文)胎盤関門における胎盤特異的 I I b 型 F c 受容体を含む新規小胞の I g G 輸送機構の解明

研究課題名(英文) IgG transport mechanism of Fc gamma RIIB-containing compartments across the placental barrier

研究代表者

石川 朋子 (ISHIKAWA, Tomoko)

お茶の水女子大学・プロジェクト教育研究院・特任准教授

研究者番号：70212850

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：胎盤血管内皮細胞モデルとして、遺伝子導入によって I I b 型 Fc 受容体(以下 Fc RIIB)を発現させた内皮細胞を用い、これを含む小胞が IgG 輸送に関連すること、この小胞の形成に Rab3D が関与することを明らかにした。また内皮細胞に発現する Fc RIIB 機能解明のため、他器官の内皮細胞における発現動態を探索したところ、肝類洞内皮細胞において、食事誘導性肝疾患の発症と進行に伴う発現変動が確認された。

研究成果の概要(英文)：We performed in vitro bio-imaging analysis of IgG trafficking by Fc RIIB-containing compartments and elucidated that Fc RIIB participates in maternal IgG trafficking of placental endothelial cells and RAB3D plays a role in regulating intracellular dynamics of the Fc RIIB-containing compartments. Furthermore, we attempted to develop animal model and confirmed Fc RIIB expression level in hepatic sinusoidal endothelial cells during the diet-induced hepatic disorders.

研究分野：機能形態学・栄養化学

キーワード：細胞・組織 小胞輸送 免疫 栄養

1. 研究開始当初の背景

胎盤は母体から胎児への栄養供給を司ると共に、母体免疫グロブリン G (IgG) を胎児へ受け渡す器官として、新生児の受動免疫に重要な役割を果たしています。母体血中の IgG が胎児に移行するためには、両血液間に存在する胎盤関門を通過しなければなりません (Vaccine 21: 3365, 2003)。第一の関門である栄養膜においては、栄養膜細胞に発現する胎児型 Fc 受容体 (FcRn) が母体 IgG の輸送を担いますが (J Exp Med 180: 2377, 1994)、第二の関門である胎児血管内皮細胞を通過するための輸送機序は未だ明らかにされていません。連携研究者・研究代表者らは、平成 16-18 年度基盤研究 B 「胎盤における IgG 輸送の鍵となる II 型 Fc 受容体を含む新しい細胞内小器官の解析」の助成を受け、胎児血管内皮細胞にある FcRIIb を含む細胞内小器官 (FcRIIb-小胞) に IgG が含まれることを見出し (J Immunol 175: 2331, 2005)、また単離した FcRIIb-小胞のタンパク質を網羅的に解析することで、いくつかの FcRIIb-小胞関連因子を同定しました。FcRIIb は、主に白血球細胞表面に発現していて、細胞内ドメインに抑制性モチーフ (ITIM) をもった免疫抑制的にはたらく受容体として知られており、末梢性免疫寛容、自己免疫疾患、免疫グロブリン療法における重要性が注目されていました (Nar Rev Immunol 2: 580, 2002; J Clin Immunol 25: 1, 2005)。胎盤胎児血管内皮細胞の FcRIIb は、その細胞内局在から、白血球細胞膜表面の FcRIIb とは機能が異なることが予測されます。FcRIIb の新規機能を解明することは、細胞生物学、免疫学、周産期医療分野への貢献だけでなく、胎盤を介した胎児栄養や薬物治療法へとつながる可能性を秘めています。

2. 研究の目的

本研究は、未だ不明な点が多い、胎盤胎児血管内皮細胞に発現する FcRIIb の IgG 輸送における役割を明らかにすることを目的として計画されました。さらに研究代表者の研究環境の変化に伴い、当初の計画を一部変更し、血管内皮細胞に発現する FcRIIb の白血球膜表面とは異なる新たな機能解明のための *in vivo* 実験モデル確立を目指して、血管内皮細胞における FcRIIb 発現動態を検討することにしました。

3. 研究の方法

(1) 胎盤胎児血管内皮細胞モデルを用いた IgG 輸送のバイオイメージング解析

ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) に遺伝子導入によって FcRIIb-EGPF 融合タンパク質を発現させ、バイオイメージング解析により胎盤胎児血管内皮細胞モデルと成り得るかを検証しました。

FcRIIb-EGPF 融合タンパク質を発現させた HUVEC を用いて、FcRIIb-小胞の IgG 細胞内取

込を検証しました。蛍光標識した IgG および F(ab')₂ フラグメントを培地に添加し、IgG の細胞内取込、IgG と FcRIIb の細胞内局在に着目し、バイオイメージング解析を行いました。

(2) FcRIIb-小胞関連因子の探索

ヒト胎盤組織から単離した FcRIIb-小胞のプロテオミクス解析によりすでに同定されていた関連因子の候補分子のなかから、数種類の RAB GTPase 遺伝子を short interfering RNA (siRNA) によりノックダウンし、FcRIIb-小胞の発現および IgG 細胞内輸送動態の変化をバイオイメージング解析しました。

(3) 内皮細胞に発現する FcRIIb 機能解析のための *in vivo* 実験モデルの探索

げっ歯類の受動免疫に関する報告がある各種組織における FcRIIb 発現の検証を行いました。胎仔、新生仔、成獣ラットを用い、卵黄嚢、胎盤、小腸、肝臓の各組織について、FcRIIb および胎児型 Fc 受容体 (FcRn) の発現を、mRNA 発現は qRT-PCR により、タンパク質発現は免疫組織化学法により解析しました。

血管内皮細胞における FcRIIb の新規機能の解明のため、栄養素代謝の要である肝臓の類洞内皮細胞に着目し、食事により誘導される肝障害との関連を検証しました。

4. 研究成果

(1) 胎盤胎児血管内皮細胞モデルを用いた IgG 輸送のバイオイメージング解析

HUVEC の遺伝子導入効率は決して高くありませんが、共焦点レーザー顕微鏡解析により、強制発現させた FcRIIb-EGPF 融合タンパク質は、細胞膜表面および細胞質に顆粒状に検出されました。一方、対照として EGFP のみを強制発現させた場合は、EGFP シグナルは細胞質に散在性に検出され、顆粒状の局在はみられませんでした。これらのことから、強制発現させた FcRIIb は、ヒト胎盤胎児血管内皮細胞における FcRIIb-小胞を *in vitro* 実験系で再現していると考えられました。

蛍光標識したヒト IgG を培養液に添加し、FcRIIb-EGPF 発現細胞における取込みと細胞内局在を解析しました。共焦点レーザー顕微鏡観察および形態計測により、FcRIIb-EGPF 発現細胞において、有意な IgG 取込みが確認されました。取り込まれた IgG は、FcRIIb-EGPF と共局在を示し、タイムラプス観察により挙動を共にする様子が捉えられました。対照として EGFP 発現細胞を用いた場合、IgG 取込みは有意に低くなりました。また IgG の F(ab')₂ フラグメントのみを培養液に添加した場合は、細胞内への取り込みはほとんど認められませんでした。よって細胞内への IgG 取込みは Fc フラグメントに依存することが明らかになりました。これらのことから、胎盤胎児血管内皮細胞に発現する FcRIIb は、細胞内への IgG 取込みと細胞内輸

送に關与することが示唆されました。

(2) FcRIIb-小胞關連因子の探索

網羅的解析によって同定した FcRIIb-小胞關連因子候補の中から、Rab GTPase の Rab 1 A, Rab1B, Rab3A, Rab3C, Rab3D について、各々2~3種の siRNA を設計し、ノックダウン効率やオフターゲット効果を、qRT-PCR 法および Western blotting 法により検証しました。各々の遺伝子発現を適切な siRNA を用いてノックダウンし、FcRIIb-EGPF 融合タンパク質発現とその細胞内局在、IgG 取込み能を解析しました。その結果、Rab3D の発現を抑制すると、細胞質に顆粒状に局在する FcRIIb が減少すること、細胞内への IgG 取込みが減少することが確認されました。これらのことから、FcRIIb-小胞形成の制御因子のひとつとして、Rab3D の關与が示唆されました。

(3) 内皮細胞に発現する FcRIIb 機能解析のための *in vivo* 実験モデルの探索

げっ歯類の母仔間 IgG 受渡しは、主に卵黄嚢を介して、また母乳から新生仔の小腸吸収上皮細胞を介して行われ、そこに発現する胎児性 Fc 受容体 (FcRn) が IgG 輸送に關与するとの報告があります。妊娠後期の Wistar ラットを用いた解析では、胎盤、卵黄嚢、新生仔小腸における FcRIIb mRNA 発現は極めて低く、免疫組織化学法においても局在を明確に解析することはできませんでした。一方肝臓では、胎仔期から FcRIIb の発現が認められ、ヒト胎盤と同様に毛細血管内皮細胞 (肝類洞内皮細胞) に局在していました。さらに FcRIIb mRNA レベルは、出生を境に著しく増加することがわかりました。このことから、肝類洞内皮細胞に発現する FcRIIb が担う役割は、授乳や食事といった腸管を介した栄養素等の摂取と深く關連していることが予測されました。

肝類洞内皮細胞に発現する FcRIIb に着目し、栄養障害や肝障害を誘導することが知られている食事摂取との關連を検証しました。

タンパク質栄養状態との關連は、リシンを制限アミノ酸とするグルテン食の影響について検証しました。グルテン食 1 週間摂餌群では対照の通常食群に比べ、血漿 ALT, AST が有意に増加して肝障害の徴候が認められましたが、肝臓の炎症性サイトカインと線維化マーカーの mRNA 発現は有意に減少していました。この時 FcRIIb mRNA 発現は有意に増加しており、FcRIIb の免疫抑制機能が肝内の炎症や線維化を抑制している可能性が示唆されました。

脂質代謝障害との關連は、非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) 誘導食の影響について検証しました。はじめに、ラットに高脂肪食と果糖水を自由摂取させた実験群で検討を行いました。通常食群に比べ肝臓の FcRIIb 発現は増加傾向、炎症性サイトカインと線維化マーカーは減少傾向を示しましたが、どの発

現も有意差はありませんでした。この実験食は、長期給餌により非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) を発症しますが、肝線維化には至らないとの報告もあり、実験期間だけでなく、実験食の検討も必要と考えられました。

引き続き、平成 27-29 年度基盤研究 C 「肝類洞内皮細胞に発現する抑制性 Fc 受容体の食餌誘導性肝障害発症における役割」の助成を受け、検討を行っています。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

T. Ishikawa, T. Takizawa, J. Iwaki, T. Mishima, K. Ui-Tei, T. Takeshita, S. Matsubara, T. Takizawa. Fc gamma receptor IIb participates in maternal IgG trafficking of human placental endothelial cells. *Int. J. Mol. Med.* 35 (2015) 1273-1289 (査読有)

DOI: 10.3892/ijmm.2015.2141.

J. R. Walton, H. A. Frey, D. D. Vandre, J. J. Kwiek, T. Ishikawa, T. Takizawa, J. M. Robinson, W. E. Ackerman IV.

Expression of flotillins in the human placenta: potential implications for placental transcytosis. *Histochem. Cell Biol.* 139 (2013) 487-50 (査読有)

DOI: 10.1007/s00418-012-1040-2

[学会発表](計 7 件)

石川朋子, 柴田彩霞, 池上寛子, 藤原葉子. 食事誘導性肝障害の発症過程における抑制型 Fc γ 受容体の発現変動. 第 70 回日本栄養・食糧学会大会. 2016 年 5 月 14 日. 武庫川女子大学 (兵庫・西宮)

石川朋子, 柴田彩霞, 藤原葉子. グルテン食摂取ラットにおける抑制性 Fc γ 受容体の発現動態の解析. 第 62 回日本栄養改善学会学術総会 2015 年 9 月 25 日 福岡国際会議場 (福岡・福岡)

Haruka Sato, Yuki Kawamura, Shiho Tomino, Mariko Sonoda, Ikuyo Ichi, Yasuko Sone, Tomoko Ishikawa, Yoko Fujiwara. Tocotorienol improves the glucose tolerance in obese mice induced by high fat feeding. 12th Asian Congress of Nutrition. May 16, 2015. Pacifico Yokohama (Kanagawa・Yokohama)

石川朋子, 川村悠貴, 富野志穂, 園田麻里子, 市育代, 曾根保子, 藤原葉子. 高脂肪食誘導性肥満マウスにおいて食餌性 トコトリエノールが膵内分泌細胞に及ぼす影響. 第 55 回日本組織細胞化学会総会・学術集会. 2014 年 9 月 27 日. 松本市中央公民館 (長野・松本)

T. Ishikawa, Y. Sone, M. Sonoda, K. Yamashita, Y. Fujiwara.

Three-dimensional analysis of the onset of regional heterogeneity of hepatocytes and microvascular architecture in shrew hepatic lobules. 20th International Congress of Nutrition. Sep. 16, 2013. Granada (SPAIN)

瀧澤俊広、岩城隼、吉武洋、石川朋子、瀧澤敬美、三嶋拓也、程久美子、竹下俊行、松原茂樹。胎盤血管内皮細胞においてRAB3はIgG輸送体であるIIb型Fc受容体を含む小胞の輸送能を調節している。第27回日本生殖免疫学会学術集会。2012年12月9日。大阪医科大学(大阪・高槻)

To. Takizawa, T. Ishikawa, Ta. Takizawa, T. Mishima, K. Ui-Tei, T. Takeshita, S. Matsubara 27. Fc Gamma Receptor IIb (FCGR2B2) Plays An Important Role In IgG Trafficking Of Human Placental Endothelial Cells. 14th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry. Aug. 28, 2012. Kyoto International Conference Center (Kyoto・Sakyo-ku)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
(該当なし)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石川 朋子 (ISHIKAWA, Tomoko)
お茶の水女子大学・プロジェクト教育研究
院・特任准教授
研究者番号：70212850

(2) 研究分担者

藤原 葉子 (FUJIWARA, Yoko)
お茶の水女子大学・基幹研究院・教授
研究者番号：50293105

(3) 連携研究者

瀧澤 俊広 (TAKIZAWA, Toshihiro)
日本医科大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：90271220

菊池 邦生 (KIKUCHI, Kunio)
日本医科大学・医学部・講師
研究者番号：70374676