咽頭粘膜上皮における interleukin-1 の局在とその産生について

和歌山県立医科大学耳鼻咽喉科学教室（主任：田端敏秀教授）

木村 貴昭, 岩橋 美穂子, 赤城 ゆかり, 国本 優
田村 真司, 垣内 弘, 田端 敏秀

THE LOCALIZATION AND PRODUCTION OF INTERLEUKIN-1 IN PHARYNGEAL EPITHELIUM

TAKA AKI KIMURA, M.D., MIHOKO IWAHASHI, M.D., YUKARI AKAGI, M.D.
MASURU KUNIMOTO, M.D., SHINJI TAMURA, M.D., HIROMU KAKIUCHI, M.D.
and TOSHIHIDE TABATA, M.D.

Department of Otolaryngology, Wakayama Medical College, Wakayama

Interleukin-1 (IL-1) has been thought to be one of the essential cytokines mainly produced by macrophage. The function of IL-1 are not only activates T-lymphocytes, but also regulates immune responses to several antigens and effects on local and systemic immune reactions. Recently, it is reported that epidermal keratinocytes produces IL-1, and attention has been paid to local immune reaction mediated with this cytokine. In this study, we performed immunohistochemistry and immunoblotting on the pharyngeal epithelial keratinocytes and we evaluated the production of IL-1 by these cells.

Pharyngeal mucous membrane of each region reacted strongly against anti-IL-1 alpha antibody, on the contrary, anti-IL-1 beta antibody comparatively only weakly. Strong reactivity was often observed on the basal layer, then it was seemed that some important relationship exists between the production of IL-1 and maturation of pharyngeal keratinocytes. Infiltration of T-lymphocytes was observed in proportion to the increase of epithelial reactivity against IL-1. There seemed to be no correlation between expression of HLA-DR antigen on keratinocytes and reactivity of IL-1. In immunoblotting study, the 31kD band, intracellular immature molecule, was identified besides 17 and 52kD. From this finding, it was suggested that IL-1 is derived from pharyngeal keratinocytes. In conclusion, the present study is helpful for well-understanding of local cellular immunity of pharyngeal mucous membrane.

Key words: 免疫組織化学, 咽頭粘膜, IL-1 immunoblotting
HLA-DR

A94—0963—50060

I はじめに

IL-1はTリンパ球に対し刺激を与えるばかりではなく、抗原に対する反応を制御することにより全身のおよび局所的な免疫応答に関与する重要なサイトカインの一つである。IL-1はマクロファージ以外にNK細胞・Bリンパ球・線維芽細胞・表皮細胞などにも産生

が見られることがわかっている¹⁾。

ところで咽頭粘膜には一般に比較的多数のTリンパ球が浸潤し、さらにHLA-DR抗原が陽性となって局所の免疫応答に何らかの役割をはたしている可能性があることを筆者ら²⁾は報告してきた。そこでこの粘膜上皮を構成する細胞にIL-1の産生が見られないか

表 1 各種抗体による免疫染色の結果

* 1 : 細胞浸潤の程度

* 2 : 筆者ら⁶⁾の分類による上皮細胞上への抗原の発現強度

		年齢	性	IL-1 α	IL-1 β	T リン パ 球*1	B リン パ 球*1	HLA-DR 抗 原*2
口蓋扁桃	1	6	女	++	±	++	+	IV
	2	20	男	++	+	++	+	III
	3	7	女	++	+	++	+	III
咽頭扁桃	1	39	男	++	+	++	++	IV
	2	7	女	++	±	++	++	IV
	3	9	男	++	+	++	—	III
中 咽 頭	1	6	男	+	±	++	—	III
	2	43	女	+	+	±	+	I
	3	41	女	+	±	++	—	IV
下 咽 頭	1	69	男	+	±	++	—	IV
	2	41	女	+	±	—	—	III
	3	72	男	+	±	++	±	III
皮 膚	1	32	男	+	±	+	—	II

を検索し、咽頭粘膜の局所免疫機構を知る一助とした
いと考えた。

II 対象および方法

1) 対象

対象となった患者は11名で、材料はすべて全身麻酔下に摘出した。口蓋扁桃3例・咽頭扁桃3例・中咽頭粘膜3例・下咽頭粘膜3例・足底皮膚1例の計13例(11名)で、口蓋扁桃と咽頭扁桃、中咽頭と下咽頭粘膜はそれぞれ1例ずつ同一患者より採取した(表1)。

2) 免疫組織学的検索

摘出組織は細切した後 -80°C のヘキサン内で凍結し、Tissue-Teck II Cryostat にて厚さ $5\mu\text{m}$ に薄切した。風乾後冷アセトンにて10分間固定、一次抗体にウサギ抗ヒト IL-1 α ・IL-1 β 抗体(Genzyme 社)を、二次抗体に biotin 標識ブタ抗ウサギ免疫グロブリン抗体(Dako 社)を使用し、diaminobenzidine を基質に使用した avidin-biotin peroxidase 法で染色を行った。

同時に抗 HLA-DR 抗体(Becton-Dickinson 社)抗 Leu3a 抗体(Becton-Dickinson 社)、抗 panB 抗体(Dako 社)による免疫染色も行い上皮細胞自体の HLA-DR 抗原の発現状況、および上皮内に浸潤する T ないし B リンパ球の状態を観察した。

判定は、IL-1 においては、陽性対照として行ったケラチンの免疫染色像と同等の強さの反応を示したもの

を++、わずかでも反応を示したものを±、その間を+とした。HLA-DR 抗原の陽性強度は一昨年³⁾の日本扁桃研究会で筆者ら³⁾が報告した通り、全体が陽性のものをVI、全く陰性のものをIとしその間をIIおよびIIIとした。T および B リンパ球については++から—までの5段階でその浸潤程度を評価した。

さらに、今回使用した一次抗体の免疫源である recombinant human IL-1 α および IL-1 β (Genzyme 社)と24時間反応させることによってそれぞれの抗体に対する吸収操作を行い、これを一時抗体に使う染色性の低下を確認した。

3) Immunoblotting 法による検索

サンプルの作成は当教室の林ら⁴⁾が行った方法にしたがい図1に示す方法で作成した。口蓋扁桃・咽頭扁桃・中咽頭粘膜・下咽頭粘膜それぞれ1例ずつについて作成したほか、対照として頭頸部腫瘍患者の頸部皮膚・胸鎖乳突筋についても同様のサンプルを作成した。採取した組織は -80°C のヘキサン内で凍結し Tissue-Teck II Cryostat にて厚さ $20\mu\text{m}$ に薄切した。切片を sample buffer に加えガラスホモジェナイザーにて homogenize した後、sonicate した。さらに 100°C にて2分間加熱した後 10000g で2分間遠沈しその上清をサンプルとした。

immunoblotting の手順を図2に示す。サンプルは12%ポリアクリルアミドゲルにて 40mA の定電流で90分間電気泳動を行い、ニトロセルロース膜に 70V の

図1 上皮サンプルの作成方法

図2 immunoblottingの方法

図4 口蓋扁桃 ABC染色 7歳 女性 (a, c: IL-1 α , b, d: IL-1 β , $\times 120$)
粘膜上皮は一部にc, dのごとく基底層が強く陽性を示すものが見られた。

定電圧で120分間転写を行った。ニトロセルロース膜はこの後、3%ゼラチン加TBS buffer でブロックを行い、抗 IL-1 α および IL-1 β 抗体と室温で一晩で反応させた。洗浄の後、peroxidase 標識抗ウサギ IgG 抗体 (Bio-Rad 社) と室温で120分間反応させ、さらに洗浄の後 4-chloro-1-naphtol を基質として発色させた。

III 結 果

1) 免疫組織学的検索

図3は下咽頭粘膜における IL-1 の免疫染色像である。上皮全層にわたって陽性をしめしたが IL-1 α に比較して IL-1 β は反応が弱かった。さらに詳細に観察すると IL-1 α では特に下咽頭粘膜で基底層から有棘層にかけて反応が強く、これと比較すると角層は反応が弱いように思われた。IL-1 β においては、基底層のみ陽性が特に強い部分が見られた。中咽頭粘膜においても同様の所見が得られた。

図4-a, b は口蓋扁桃の粘膜上皮の染色像を示し

たものである。これらのリンパ装置に接する粘膜上皮においても中咽頭・下咽頭粘膜と同様の傾向がみられた。しかし、その反応は他の部位の粘膜に比較して強い印象を受けた。また、これらの標本の中には IL-1 β に対しても比較的強い反応を示すものがあつた。さらに上皮の一部には図4-b, d に示すように基底層周辺に強い反応の見られる部位もみられた。この傾向は中咽頭・下咽頭粘膜上皮にも散見されている。咽頭扁桃でも同様の所見が得られているが、基底層一層のみ反応が強い部位は口蓋扁桃より少ない印象を受けた。口蓋扁桃陰窩の部分を図5に示すが、この部位においても上皮細胞に一致して網目上に陽性所見がえられた。さらに、陰窩周辺にはマクロファージなどと考えられる強く IL-1 陽性を示す細胞が散見された。なお IL-1 陽性細胞は、ほかに暗殺および濾胞と陰窩の間に集簇するのみで、胚中心や他の濾胞間領域にはほとんど確認されなかった。

T リンパ球との関係においては浸潤が強くなるに

図5 口蓋扁桃(陰窩) ABC 染色 7歳・女性 (a: IL-1 α , b: IL-1 β , $\times 120$)
陰窩粘膜上皮に一致して陽性像が観察される。上皮内およびその直下のリンパ組織内にも上皮細胞とは別の陽性細胞が観察される(矢印)。

図6 immunoblotting の結果 (IL-1 α)

- 1: pharyngeal tonsil-2
- 2: palatine tonsil-3
- 3: mesopharynx-2
- 4: hypopharynx-1
- 5: skin
- 6: muscle

図7 immunoblotting の結果 (IL-1 β)

- 1: pharyngeal tonsil-2
- 2: palatine tonsil-3
- 3: mesopharynx-2
- 4: hypopharynx-1
- 5: skin
- 6: muscle

従って IL-1 α は陽性強度が強くなる傾向が見られたが、IL-1 β に関しては明瞭な傾向が見られなかった。HLA-DR については12例の標本で陽性強度にかなりの違いが見られたが、IL-1 の染色性との間には今回の検索の限りでは明瞭な関係は認められなかった。以上の結果を表1にまとめて示す。

なお、吸収試験ではすべての標本において IL-1 α ・IL-1 β の染色性の低下を確認した。

2) Immunoblotting 法による検索

IL-1 α ・IL-1 β に対する各抗体を反応させた immunoblottingの結果を示す(図6, 7)。lane 1—4に示す各粘膜とも 50kD 付近に比較的強いバンドを検出するほか、31kD, 17kD にもバンドが見られた。また対照に行った皮膚 (lane 5) でも粘膜と同様の結果が得られたが、筋肉 (lane 6) では 50kD 付近にバンドが見られたものの 31kD, 17kD にはバンドは検出されず、より低分子量の部分に1本のバンドを認めた。

一方 IL-1 β では各部位の粘膜のサンプルは lane 2 以外は 50kD 付近にほとんどバンドを検出せず、31kD, 17kD に弱いバンドを認めるのみであった。また皮膚 (lane 5) では 17kD のバンドはほとんど検出されず、筋肉 (lane 6) では全くバンドが検出されなかった。

IV 考 察

正常人の皮膚ケラチノサイトには T リンパ球を活性化させる epidermal cell derived thymocyte activating factor (ETAF) と呼ばれる可溶性物質が存在することが以前より報告されていたが⁵⁾、分子量およびアミノ酸配列の詳細な検索によりこれが IL-1 とまったく同じ物質であることが判明し、現存ケラチノサイトが IL-1 を産生して局所の免疫応答に能動的に参加しているものと考えられている⁶⁾⁷⁾。本研究はこの成果をもとに咽頭粘膜における IL-1 産生とその局所免疫応答を検索することを目的としたものである。

IL-1 α はすべての症例で陽性を示したが、口蓋扁桃および咽頭扁桃などのリンパ装置に隣接する粘膜上皮は陽性強度が特に強い印象をうけた。また、IL-1 α は T リンパ球の粘膜内への浸潤が強いほどその反応が強い傾向を示した。一方 IL-1 β は全般に IL-1 α よりも反応が弱く、扁桃などの粘膜上皮では若干強く反応が見られたものの全体としては一定の傾向が見られなかった。しかしどちらも吸収試験で明らかにその染色性が低下したことより、ここに反応する物質は IL-1 であることが確認された。

Sauder ら⁸⁾ は blind well chamber を使った in vitro の実験系で、ケラチノサイトより放出された ETAF つまり IL-1 が T リンパ球を走化させることを報告しているが、今回の結果より少なくとも IL-1 α は T リンパ球の粘膜内への浸潤に何らかの役割をは

たしているものと考えられる。T 細胞を中心とした免疫応答の結果、上皮細胞自身の HLA-DR 抗原の発現も強くなるのではないかと当初われわれは推察したが、今回の検索では明瞭な関係は見いだせなかった。in vitro の実験でも Morhenn ら⁹⁾ は IL-1 はケラチノサイト上への HLA-DR 抗原の発現を誘導しなかったとしている。

Luger ら¹⁰⁾ はこの上皮由来の IL-1 は silica, endotoxin, phorbol myristate acetate, hydroxyurea, および機械的障害などのさまざまな細胞損傷因子に暴露することによって活性が上昇するとのべ、その作用は T リンパ球を活性化して IL-2 の産生を促進させるばかりではなく好中球の遊走を促進し、直接線維芽細胞にはたいて増殖を刺激するとして、彼はケラチノサイト由来のこのサイトカインは免疫系細胞を抑制するものではなく創傷の治癒に重要な役割をはたしていると推察している。さらに Granstein ら¹¹⁾ は IL-1 のマウスにおける実験で IL-1 の局所投与により好中球・単核球の浸潤がおり、炎症を惹起させることを報告している。つまり今回の免疫染色の結果は粘膜上皮細胞に何らかの stress が加わることにより、T リンパ球の浸潤が促されたと考えるのが妥当であろう。

IL-1 の免疫染色で、基底細胞層が強く反応した標本や、上皮全層が反応した標本でも基底層から有棘層にかけて特に陽性強度が強かったものが多かったことから、この上皮細胞の IL-1 産生能は細胞の分化・成熟と密接な関係があるものと考えられる。ただし Gahring ら¹²⁾ は角層からも多くの IL-1 を抽出するのに成功している。

基底層が特に強く染まる部位があったが、粘膜下にリンパ装置の見られる部分では特にこの傾向が強い印象を受けた。この染色の結果より咽頭粘膜のケラチノサイトによる IL-1 の産生は、分化・成熟以外にも産生量を制御するメカニズムがあるようである。Romero ら¹³⁾ は正常皮膚と乾癬の皮膚に免疫染色を行うことによって IL-1 の局在を調べている。彼らの結果でも IL-1 α が IL-1 β に比較して反応が強く見られているが、注目すべきはその局在が正常では細胞間に多かったのに対し、乾癬患者の皮膚では陽性所見が細胞質に多く見られたことである。このことより in vivo でも、少なくとも乾癬という病的状態の皮膚においては皮膚ケラチノサイトの IL-1 産生能が変化していることがうかがわれる。

さて、IL-1 は可溶性物質であるため免疫染色で粘膜

上皮細胞が反応しても、実際にこれらの細胞が IL-1 を産生しているのか、あるいは別の部位由来のものを上皮細胞が特異的に取り込んでいるのかを判定することはできない。そこで、われわれはそれを証明するために immunoblotting を行った。Didierjean ら⁹⁾ によれば、成熟した IL-1 は分子量が 17kD であるのに対し、未熟な細胞内 IL-1 は分子量 31kD である。また彼は皮膚ケラチノサイトにおける IL-1 の immunoblotting で 52kD 付近に反応するバンドを認め、これを上皮に特異的なものであるとしている。今回の検索でも、すべての粘膜上皮に皮膚同様抗 IL-1 α 抗体に反応する 17kD, 31kD, 52kD のバンドを認めた。しかし、対照とした筋肉組織にたいしても 52kD 付近のバンドが検出されており、抽出法等の違いによる可能性も否定できないと思われる。さらに、筋肉組織においては IL-1 の分子量として一般に認識されている 17kD, 31kD に反応するバンドは全く見られなかったが、より低分子の領域に 1 本のバンドを認めている。IL-1 α には 4kD という小さな分子が生体内に存在するが、今回の検索ではこのバンドが 4kD とは考えにくい。使用した一次抗体がモノクローナル抗体でないためこのようなバンドが出現したのかも知れないが、現在のところこのバンドの意義は不明である。

IL-1 β においては、全体に反応が弱いといえる。さらに、31kD のバンドはある程度確認されるが 17kD, 52kD のバンドは不明瞭となり、筋肉組織ではどのバンドもほとんど検出されていない。上皮組織より未熟な細胞内 IL-1 が検出されたことより、粘膜上皮細胞が IL-1 を直接産生しているものと考えられる。Ansel ら¹⁴⁾ はケラチノサイトにおける IL-1 の mRNA を証明することにより、細胞内での蛋白合成を証明している。今後、粘膜上皮においても同様の検索が必要なものとする。

粘膜局所の免疫応答はこれまで IgA を中心とした液性免疫の分野で論じられることが多かったが、粘膜上皮細胞がこのように多くの IL-1 を産生している事実より T リンパ球を介した細胞性免疫が皮膚と同様かなり重要な位置を占めていることが推察される。特にアフタ性口内炎、扁平苔癬、放射線障害などの病的状態において今後検討を重ねていきたい。

V 結 語

今回われわれは口蓋扁桃・咽頭扁桃 中咽頭・下咽頭粘膜上皮の IL-1 を調べ以下のような結果を得た。

図3 下咽頭粘膜 ABC染色 69歳・男性 (a: IL-1 α , b: IL-1 β , $\times 240$)

1) IL-1 α および IL-1 β はともに粘膜上皮に検出された。しかし、IL-1 α の方がより反応が強かった。

2) 反応は基底層に強い傾向があり、IL-1 の産生はケラチノサイトの分化・成熟と関係していると思われる。

3) immunoblotting 法により上皮組織より細胞内の未熟な分子量をもつ IL-1 を検出した。このことより、上皮細胞の IL-1 はこの部位で産生されていることが推察された。

参考文献

- 1) 山下優毅, 田中良哉: インターロイキン 1 は T 細胞増殖因子となりうるか。臨床免疫 22(1): 114-120, 1990.
- 2) 木村貴昭, 田端敏秀, 横田昌也, 藤原啓次, 田村真司 他: 咽頭粘膜の HLA-DR 抗原とリンパ球。口咽科 2: 155-160, 1990.
- 3) 木村貴昭, 藤原啓次, 九鬼清典, 林 泰弘, 田端敏秀: 扁桃上皮の抗原性について。日扁桃誌 28: 269-277, 1989.
- 4) 林 泰弘, 田端敏秀: 掌蹠膿疱症患者扁桃上皮および血清抗ケラチン抗体について。日扁桃誌 27: 104-109.
- 5) Luger TA, Stadler BM, Katz SI et al: Epidermal cell (keratinocyte)-derived thymocyte-activating factor (ETAF). J Immunol 127: 1493-1498, 1981.
- 6) Hauser C, Saurat J-h, Schmitt A et al: Interleukin 1 is present in normal human epidermis. J Immunol 136: 3317-3323, 1986.
- 7) Didierjean L, Salomon D, Merot Y et al: Localization and characterization of the interleukin 1 immunoreactive pool (IL-1 alpha and beta forms) in normal human epidermis. J Invest Dermatol 92: 809-816, 1989.
- 8) Sauder DN, Monick MM, Hunninghake GW: Epidermal cell-derived thymocyte activating factor (ETAF) is a potent T-cell chemoattractant. J Invest Dermatol 85: 431-433, 1985.
- 9) Morhenn VB, Wastek GJ, Cua AB et al: Effects of recombinant interleukin 1 and interleukin 2 on human keratinocytes. J Invest Dermatol 93: 121-126, 1989.
- 10) Luger TA, Szein JA, Schmidt JA et al: Properties of murine and human epidermal cell-derived thymocyteactivating factor. Federation Proc 42: 2772-2776, 1983.
- 11) Granstein RD, Margolis R, Mizel SB et al: In vivo inflammatory activity of epidermal cell-derived thymocyte activating factor and recombinant interleukin 1 in the mouse. J Clin Invest 77: 1020-1027, 1986.
- 12) Gahring LC, Buckley A, Daynes RA: Presence of epidermal-derived thymocyte activating factor/interleukin 1 in normal human stratum corneum. J Clin Invest 76: 1585-1591, 1985.
- 13) Romero LI, Ikejima T, Pincus SH: In situ localization of interleukin-1 in normal and psoriatic skin. J Invest Dermatol 93: 518-522, 1989.
- 14) Ansel J, Perry P, Brown J et al: Cytokine modulation of keratinocyte cytokines. J Invest Dermatol 94: 101s-107s, 1990.

(1990年12月7日受稿 1991年2月27日受理)

別刷請求先 〒640 和歌山市七番町27

和歌山県立医科大学耳鼻咽喉科学教室 木村貴昭