血管内皮細胞の免疫機能

—炎症性腸疾患を場として—

大谷 明夫, 名倉 宏

東北大学医学部第二病理

The Immunologic function of vascular endothelial cells in inflammatory bowel disease

Haruo Ohtani, Hiroshi Nagura

Department of Pathology, Tohoku University School of Medicine

To evaluate immunologic function of vascular endothelial cells, we have set up an immunohistochemical study on the adhesion molecules in inflammatory bowel disease (IBD). In IBD, vascular endothelial cells became morphologically active; i.e., they became swollen and had well developed cell organelles. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) was expressed in plasma cells, lymphocytes, macrophages and vascular endothelial cells. Its counter-receptor, lymphocyte function associated antigen (LFA-1) was localized in lymphocytes. The expression of these molecules increased remarkably in IBD than in the normal intestinal or colonic mucosa. MHC class II antigen was also expressed abundantly in IBD. Vascular endothelial cells of venules expressed endothelial leukocyte adhesion molecule-1 (ELAM-1) in active inflammatory phase. Its expression was sporadic in the resolving phase of inflammation and the normal mucosa. Our study suggests that vascular endothelial cells regulate the permeation of inflammatory cells into the tissue from the blood by expressing the adhesion molecules. The common expression of ICAM-1 and HLA-DR antigens with macrophages indicates the presence of a unit of endothelial cells and macrophages in eliciting and/or maintaining the inflammation.

Key words: Adhesion molecules, Inflammatory bowel disease, Immunohistochemistry, Venules

はじめに

血管内皮細胞は血液を通す管である血管の内面を被覆し、血液と組織を境界している。しかし、近年この内皮細胞が単に異なったふたつの環境を境するのみならず、以下に述べる種々の機能を営んでいる

ことが明らかにされつつある。すなわち、血漿成分透過；結合組織成分合成；凝固調節；血管トーン調節；代謝調節；炎症・免疫反応の調節である。この際、内皮細胞はサイトカイン・増殖因子などの生理活性物質の合成・分泌に深く関与している¹⁾。

炎症・免疫への関わりでは、内皮細胞は細胞外基

質あるいは血中からの抗原刺激を受け、自己・非自己の認識をおこない、免疫担当細胞への情報伝達を営んでいるとされている。それに関与するのは内皮細胞に表出されている、MHC Class II 抗原や IL-1 といった、免疫機能分子である¹⁾。さらにこれについては近年、接着分子の観点からのアプローチが盛んである。接着分子は cell-cell contact をつかさどる物質である。免疫現象に関わるものとしては三つに大別されている²⁾。a) 免疫グロブリン (Ig) スーパーファミリー, b) インテグリンファミリー(α , β 鎖よりなる), c) LECAM ファミリー(レクチン様, EGF 様, 補体結合様のドメインを有する)。これらは、白血球, 内皮細胞, 抗原提示細胞, 一部上皮細胞などに発現される²⁾。われわれは、今回 Ig superfamily に属する ICAM-1³⁾ (intercellular adhesion molecule), integrin family に属する LFA-1⁴⁾ (lymphocyte function-associated antigen) (CD11a/CD18), そして LECAM family に属する ELAM-1⁵⁾ (endothelial leukocyte adhesion molecule) をとりあげた。ICAM-1 と LFA-1 は receptor-counter receptor の関係にある。また, ELAM-1 は好中球の糖鎖 sialyl Le^x をリガンドとしている^{6,7)}。本稿では、炎症性腸疾患をモデルとしてとりあげ、血管内皮細胞の炎症・免疫反応への関わりについて著者らの観察を中心に、内外の報告をあわせ紹介し、その重要性を論じたい。

材料と方法

1. 免疫組織化学用

潰瘍性大腸炎10例(男7, 女3例, 平均年齢31歳)およびクローン病10例(男5, 女5例, 平均年齢34歳)の手術切除材料を用いた。標本は病変部より採取し、直ちに periodate-lysine-paraformaldehyde (PLP) 固定液にいれ、6~10時間固定した。ショ糖加 PBS で洗浄の後、OCT compound に包埋し、凍結した。厚さ6 μ の凍結切片上で酵素抗体間接法を用いた。使用した抗体は表1に示した。二次抗体は F(ab')₂ フラグメントに HRP を標識したものをを用いた (Amersham)。

酵素抗体二重染色は biotin-streptavidin 法 (ヒストファインキット, ニチレイ) を用い、第一回目は AEC (Vector), 第二回目は 4-chloro-1-naphtol で発色した。両免疫反応のあいだでは、切片をグリシン緩衝液で30分洗浄し、さらに、内因性ビオチンブロックキット (Vector) をもちいて、第一回目の二

表1 使用した抗体

anti-ICAM-1 (Immunotech)
anti-LFA-1 (CD11a) (Nichirei)
OKM5 (CD36) (Ortho)
anti-ELAM-1 (British-Biotechnology)
M718 (CD68) (DAKO)
anti-S100 protein (DAKO)

次抗体のビオチンをブロックした。免疫電顕用には酵素抗体間接法で同様におこなった。

通常電顕用には潰瘍性大腸炎5例を用いた。生検材料をおもに用いた。2.5% glutaraldehyde 2% paraformaldehyde で2時間固定し、1% osmium tetroxide で後固定し、常法にてエポン包埋した。1 μ 切片で観察部位のオリエンテーションをして、超薄切片をウラン鉛で重染し、電顕観察した。

結 果

1. 内皮細胞の活性化現象—炎症に伴う血管構造変化

正常大腸粘膜の血管は毛細血管が主体を占めていた。その毛細血管では内皮細胞が薄くその小器官は乏しかった (Fig. 1)。これに対し、炎症の強い部分では血管増殖が引き起こされ、内腔の狭い毛細血管の増加とともに、内腔の広い小静脈が増殖していた。内皮細胞は一般に大型化していた (Fig. 2)。

2. ICAM-1 と LFA-1 の免疫組織化学

正常大腸粘膜固有層では、ICAM-1 は血管内皮細胞にのみ発現していた (Fig. 3a)。LFA-1 は散在性に存在するリンパ球にのみ認められた (Fig. 4a)。

潰瘍性大腸炎もクローン病ともそれらの粘膜組織において、炎症の程度にはほぼ比例して、ICAM-1, LFA-1 陽性細胞の出現・増加を認めた (Figs. 3b, 4b)。ICAM-1 は血管内皮細胞(ことに小静脈について)と形質細胞・マクロファージを含む炎症性細胞に表出されていた。なお一次リンパ濾胞のリンパ球は陰性だった。一部、腺上皮にも ICAM-1 陽性像が観察された。LFA-1 はおもに単核球系細胞に発現していた。炎症緩解期ではこれらの発現は少なかった。免疫電顕では ICAM-1 は血管内皮内腔面(一部内皮細胞核周囲腔)および、リンパ球, 形質細胞, マクロファージ様細胞の細胞膜に陽性であった。MHC class II 抗原の表出もこれらと同様であった (Figs.

Fig. 1 正常大腸粘膜固有層の毛細血管
内皮細胞の小器官は発達せず、核のない部分の細胞質は薄く、血液を通す“くた”として合理的な形状を呈している。

Fig. 2 潰瘍性大腸炎肉芽組織での小血管(venule)
形態的活性化が明らかである。内腔に顆粒を有するリンパ球の付着を認め(LY), 矢印は内皮細胞と pericyte の間の顆粒球(の一部)を示す。

5a, 5b)。

3. マクロファージ系細胞との関連

免疫重染色では、CD68⁺マクロファージは正常大腸粘膜では ICAM-1 (-) であるのに対し、炎症巣では

ICAM-1 (+) であった。S-100⁺樹枝状細胞も ICAM-1 (+) であった。また、正常粘膜に比較し炎症性腸疾患では CD68⁺マクロファージは有意に増加し (約2.4倍)、S-100⁺樹枝状細胞は正常粘膜ではほとんど存

Fig. 3 ICAM-1の免疫組織化学

a 正常粘膜。おもに、血管が陽性。 ×110

b 潰瘍性大腸炎活動期の粘膜。浸潤細胞多数と血管が陽性。 ×220

在しなく、炎症巣での出現増加が明らかであった(以上のデータは Nakamura et al., manuscript in preparation)。

4. ELAM-1の免疫組織化学

炎症の強い部位においてのみ、小静脈を中心とする血管に陽性となった (Fig. 6)。また、多くの好中球がこれらの血管内腔とその周囲に観察された。炎症緩解巣ではELAM-1の陽性血管は小数であった。正常血管はほとんど陰性であった。

免疫電顕的にはELAM-1は内皮細胞の内腔面に陽性であった (Fig. 7)。また内皮細胞の発達した粗面小胞体、円形顆粒も陽性であった。血管内腔への開口分泌像も認めた。

5. リンパ組織での結果

リンパ節とパイエル板では、ICAM-1は胚中心のリンパ球と樹状細胞および血管内皮細胞に陽性だった。LFA-1はおもにTリンパ球に陽性だった。ELAM-1はT-zoneのhigh endothelial venule

Fig. 4 LFA-1の免疫組織化学

a 正常大腸粘膜。リンパ球が散在性に陽性。×110

b 潰瘍性大腸炎活動期。多数のリンパ球が陽性。×220

(HEV)の一部に局在した。

考 察

炎症反応は、白血球間、白血球—血管内皮細胞間、白血球—抗原提示細胞間の複雑な相互作用により司られており、接着分子はこれらの細胞間相互作用を調節している。今回とりあげた LFA-1 ははじめ細胞傷害性リンパ球の細胞傷害活性を阻害する抗体として報告された⁴⁾。これはインテグリンファミリー

属する糖蛋白で、ほとんどの白血球に分布している。また ICAM-1 は LFA-1 の counter receptor として同定された³⁾。これは Ig superfamily に属する糖蛋白で、血管内皮細胞、線維芽細胞、上皮細胞に発現しており、末梢白血球ではほとんど発現されていない。炎症性サイトカイン (IL-1, TNF, INF- γ) によりこれら細胞にも ICAM-1 が誘導される⁸⁾。血管内皮細胞での ICAM-1 の発現は正常でもみられるが、炎症性サイトカインの刺激を受けると、その

Fig. 5 HLA-DR 免疫染色

a 正常大腸粘膜。リンパ球，マクロファージ，血管が陽性。

b 潰瘍性大腸炎活動期。多数の浸潤細胞と血管，および上皮細胞が陽性。 ×220

発現が増加することが知られている。このことは、LFA-1 陽性白血球の炎症巣での血管外移動に重要な働きをしていることが示唆される。今回の結果でも炎症性腸疾患において炎症の程度に応じて、ICAM-1 陽性炎症性細胞増加が観察された。このことは、炎症性サイトカインが働いていることを示唆している。筆者らの観察結果は他のヒト炎症性疾患での報告と一致する^{9)~11)}。また、その結果としての

LFA-1 陽性白血球の増加は予想されるとおりである。

抗原提示細胞としてのマクロファージと樹状細胞が炎症性疾患で増加し、しかもマクロファージに ICAM-1 の発現が付与されていることは、リンパ球との接着を ICAM-1 と LFA-1 が促進していることを示唆している（つまり、抗原/MHC-TCR/CD3 の接着を抗原非依存性に補助していると考えられ

Fig. 6 ELAM-1 免疫染色
潰瘍性大腸炎の潰瘍部肉芽組織。小静脈が陽性。

Fig. 7 ELAM-1 の免疫電顕
クローン病での炎症部粘膜。小静脈内皮細胞の内腔面に陽性。
内腔には炎症性細胞を認める。なお、血管内皮細胞での ICAM-1 と HLA-DR の表出も内腔面に沿っておこなわれ、この所見と似ている。このほか、ELAM-1 は内皮細胞の粗面小胞体や顆粒にも陽性である。

Fig. 8 血管内皮細胞 (En) と抗原提示細胞 (APC) における炎症性細胞に対する接着分子の表出のまとめ
太線が接着分子の表出部位。炎症性細胞が血管透過の時点と APC との接着において、接着分子が働くことを示している。本稿では太線は ICAM-1 (あるいは HLA-DR) に相当する。counter-receptor は LFA-1 (あるいは CD4) である。内皮細胞とマクロファージとはこのような機能的共通性を有しており、炎症巣形成における一つの単位としてとらえることが可能である。

る¹²⁾¹³⁾。

ELAM-1 は炎症性サイトカインにより急速に誘導される内皮細胞上の接着分子である⁵⁾。レクチン様ドメインを有し、好中球の糖鎖である sialyl Le^x と結合する (なお興味あることに sialyl Le^x は各種腺癌の腫瘍マーカーとして以前より知られていた¹⁴⁾)。すでに急性炎症巣での小静脈で発現することが知られている¹⁵⁾。今回の結論はこれと一致する。炎症性腸疾患での好中球浸潤において、血管内皮と好中球の接着に関与していると考えられる。

ま と め

炎症巣の成立・維持において、白血球の局所への浸潤を司っているのは接着分子と考えられつつある。また、抗原提示細胞と白血球との接着にも深く関与している。ICAM-1 がこの両者 (内皮細胞と抗原提示細胞) に発現していることは、この両者が機能分子的に共通の役割をになっていることを示している。内皮細胞はこのように白血球浸出に関与シマ

クロファージ、樹状細胞と一つの群をなして免疫・炎症反応にかかわっていると考えている (Fig. 8)。これが、血管内皮の免疫機能としての重要な一側面である。

今 後 の 展 開

血管新生 (angiogenesis) が起こる代表は炎症と固形癌である。今回炎症における血管内皮の役割を考察した。本研究の示すように血管新生が単なる血管の増加を意味しているのではないことは明らかである。では、癌ではどうであろうか？ 単に癌の栄養補給という面でのみ考察してはおそらく不十分であろう。癌間質でも血管内皮細胞が形態的にも機能面でも変化していることはわれわれがすでに報告してきた¹⁶⁾¹⁷⁾。今後この面からの検討が望まれる。

謝辞：大阪市立大学医学部第三内科 中村志郎先生の協力に深く感謝します。

文 献

- 1) Beilke MA: Vascular endothelium in immunology and infectious disease. *Rev Infect Dis* 11: 273-283 1989
- 2) 宮坂昌之: 血管内皮細胞へのリンパ球接着-Adhesion molecules. *病理と臨床* 9: 22-25 1991
- 3) Marlin SD, Springer TA: Purified intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is a ligand for lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1). *Cell* 51: 813-819 1987
- 4) Krensky AM, Danchez-Madred F et al.: The functional significance, distribution and structure of LFA-1, LFA-2, and LFA-3: cell surface antigens associated with CTL-target interactions. *J Immunol* 131: 611-616 1983
- 5) Bevilacqua MP, Stengelin S, Gimbrone MA, Seed B: Endothelial leukocyte adhesion molecule I: an inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins. *Science* 243: 1160-1165 1989
- 6) Lowe JB, Stoolman LM, Nair RP, et al.: ELAM-1 dependent cell adhesion to vascular endothelium determined by a transfected human fucosyltransferase cDNA. *Cell* 63: 475-484 1990
- 7) Phillips ML, Nudelman E, Gaeta FCA et al.: ELAM-1 mediates cell adhesion by recognition of a carbohydrate ligand, sialyl-Lex. *Science* 250: 1130-1132 1990
- 8) Dustin ML, Springer TA, et al.: Induction by IL-1 and IFN- γ : tissue distribution, biochemistry and function of a natural adherence molecule (ICAM-1). *J Immunol* 137: 245-254 1986
- 9) Griffiths CEM, Nickoloff BJ: Keratinocyte intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression precedes dermal T lymphocyte infiltration in allergic contact dermatitis (Rhus dermatitis). *Am J Pathol* 135: 1045-1053 1989
- 10) Volpes R, Desmet VJ et al.: Immunohistochemical study of adhesion molecules in liver inflammation. *Hepatology* 12: 59-65 1990
- 11) Sobel RA, Fondren G et al.: Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in cellular immune reactions in the human central nervous system. *Am J Pathol* 136: 1309-1316 1990
- 12) Dustin ML, Springer TA: Lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1) interaction with intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is one of at least three mechanisms for lymphocyte adhesion to cultured endothelial cells. *J Cell Biol* 107: 321-331 1988
- 13) Malizia G, Calabrese A, et al.: Expression of leukocyte adhesion molecules by mucosal mononuclear phagocytes in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 100: 150-159 1991
- 14) Fukushi Y, Nudelman E et al.: Novel fucolipids accumulating in human adenocarcinoma. III a hybridoma antibody (FH6) defining a human cancer-associated difucoganglioside. *J Biol Chem* 259: 10511 1984
- 15) Cotran RS, Gimbrone MA et al.: Induction and detection of a human endothelial activation antigen in vivo. *J Exp Med* 164: 661-666 1986
- 16) Ohtani H, Sasano N: Characterization of microvasculature in the stroma of human colorectal carcinoma: an immunoelectron microscopic study on factor VIII/von Willebrand factor. *J Electron Microsc* 36: 204-212 1987
- 17) Ohtani H, Nagura H: Differing microvasculature in the two major types of gastric carcinoma: a conventional, ultrastructural and ultrastructural immunolocalization study of von Willebrand factor. *Virchows Arch [A]* 417: 29-35 1990