

人眼角膜上皮細胞によるインターロイキン6および インターロイキン1 α の産生

坂本 真栄***, 稲田 捷也**, 千葉可芽里***, 吉田 昌男**, 田澤 豊*

*岩手医科大学眼科学教室, **岩手医科大学細菌学教室

要 約

培養人眼角膜上皮細胞のインターロイキン6 (IL-6) 産生について, その培養上清中の活性を Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) キットで測定することによって検討した。その結果, 無刺激でも培養上清中に IL-6活性が認められ, 人眼角膜上皮が IL-6を恒常的に産生することが明らかになった。我々は, 培養したヒト角膜上皮細胞が IL-1をやはり恒常的に産生することを報告しており, 人眼角膜上皮細胞の IL-6産生は IL-1と同様に恒常的産生であることが判明した。さらに, IL-6および IL-1 α の産生を増強する目的で lipopolysaccharide (LPS) による産生刺激を行ったが, いずれも有意な増加は認められなかった。しかしながら, 角膜上皮の産生する IL-6および IL-1は ocular surface での免疫機構に重要な役割を演じていることが推測された。(日眼会誌 95: 728-732, 1991)

キーワード: インターロイキン6, インターロイキン1 α , 人眼角膜上皮細胞, 培養, リポ多糖

Production of IL-6 and IL-1 α by Human Corneal Epithelial Cells

Shin-ei Sakamoto***, Katsuya Inada**, Kagari Chiba***

Masao Yoshida** and Yutaka Tazawa*

*Department of Ophthalmology, School of Medicine, Iwate Medical University

**Department of Bacteriology, School of Medicine, Iwate Medical University

Abstract

By using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), it was demonstrated that cultured human corneal epithelial cells produced interleukin-6 (IL-6) without any stimulation. As lipopolysaccharide (LPS)-stimulation did not induce further production of IL-6 and IL-1 α , it was suggested that IL-6 was produced naturally as in the case of IL-1 α production which has been previously reported by the author. Production of IL-1 α and IL-6 in the human corneal epithelial cells may play a role in amplifying immune responses on the ocular surface. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 95: 728-732, 1991)

Key words: Interleukin-6, Interleukin-1 α , Human corneal epithelial cells, Culture, LPS (lipopolysaccharide)

別刷請求先: 020 盛岡市内丸19-1 岩手医科大学眼科学教室 坂本 真栄

(平成2年9月21日受付, 平成2年12月12日改訂受理)

Reprint requests to: Shin-ei Sakamoto, M.D. Department of Ophthalmology, School of Medicine, Iwate Medical University.

19-1 Uchimaru, Morioka 020, Japan

(Received September 21, 1990 and accepted in revised form December 12, 1990)

I 緒 言

角膜上皮は眼組織のなかでも外界と接し、感染防御に重要である。しかし、正常の角膜には血管系もリンパ系も存在せず、一般的な免疫あるいは感染防御機構は起こり難い。角膜上皮の感染防御機構としては、上皮細胞の物理的防御や涙液によるものの他に、種々の細胞が産生するサイトカインの一つであるインターフェロンがあげられている¹⁾。

我々はこれまで、人眼角膜上皮がサイトカインの一つであるインターロイキン1 (IL-1)を恒常的に産生すること、また、産生されるIL-1は主にIL-1 α であることを明らかにした²⁾。IL-1は、本来、マクロファージ(M ϕ)系の細胞によって産生され、その生物活性は多彩で、線維芽細胞や脳星状グリア細胞あるいは腎メサンギウム細胞の増殖因子として作用するほか、滑膜細胞や血管内皮細胞からプロスタグランジンE₂産生やコラゲナーゼ産生の誘導、グラム陰性細胞の感染防御効果を発揮するなど、炎症や免疫反応に深く関与している³⁾。従って、角膜上皮細胞が産生するIL-1は、角膜の感染防御にも重要であると考えられる。

近年、免疫、炎症学の分野においては、IL-1と同様に多機能性のサイトカインであるIL-6の存在が知られるようになった。IL-6もまた細胞分化の誘導、ある種の遺伝子発現の誘導、細胞増殖の誘導あるいは抑制などその機能は多彩である⁴⁾。一般的に、感染症においても、血中のIL-6濃度が上昇すると言われており、我々も、敗血症患者の血清中のIL-6の濃度の増加を認めている⁵⁾。この様にIL-6は、IL-1と同様に炎症反応や細胞の分化に関与している。そこで今回IL-6に着目し、ヒト角膜上皮がIL-6を産生するか否かを検討した。さらに、IL-6あるいはIL-1 α の産生を誘導する幾つかの物質が知られており、今回、その中の一つであるグラム陰性菌の菌体成分であるlipopolysaccharide(LPS)によるIL-6およびIL-1 α の産生刺激を試みたので合わせて報告する。

II 実験方法

1. 人眼角膜上皮細胞の培養および培養上清の採取

ドナーA(34歳)から得た2個の人眼を、実体顕微鏡下で角膜を輪部で強膜から切除し、デスメ膜と角膜内皮細胞を剝離、除去した。この角膜片の実質の中層に切開を入れて上皮を含んだ実質片を作製し、これをさらに15個の約3mm角の小片にし、上皮側を上にして

培養皿(Nunc 134673, ϕ 15mm)に1個ずつ静置、固着させた。これに培養液としてTC-199培地(ニッスイ)に1-グルタミン(10mg/ml)、ペニシリンG(100 μ g/ml)、ストレプトマイシン(100 μ g/ml)、およびウシ胎児血清(GIBCO)(10%)を添加したものを1ml加え、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂、湿度95%以上のインキュベーターで培養した。

すべての角膜片から2日後には上皮細胞の増殖が認められ、約1週間後にconfluentな状態になった。この時点で角膜片を除去し、その部位が上皮細胞によって覆われるまで、さらに数日培養を続けた。再びconfluentになった時点で培養液を交換し、1週間培養後、その培養上清を採取し、3,000rpm、20分遠心して、その上清を無刺激の被検検体とし、-80 $^{\circ}$ Cで保存した(n=3)。

また、他のドナーB(84歳)から得た角膜を上記と同様の方法で培養した。この場合、角膜上皮細胞は培養皿に接着せず、培養液中に浮いた状態で増殖した。この浮遊した上皮細胞を集め、リン酸緩衝食塩水で洗浄した後、細胞数を10⁶/mlに調整し、4穴の培養皿(Nunc 134673, ϕ 15mm)に10⁶/wellの細胞数で培養した。培養液およびインキュベーターは上記と同じ条件とした。1週間培養後にその培養上清を採取し、3,000rpm、20分遠心して、その上清を浮遊した細胞の無刺激の被検検体とし、-80 $^{\circ}$ Cで保存した(n=2)。

2. lipopolysaccharide (LPS) 刺激

IL-6およびIL-1 α の産生を誘導する目的で、グラム陰性細菌内毒素であるlipopolysaccharide(LPS)(*E. coli* 0111:B4, Difco)で刺激した。刺激方法は、ドナーAでは、角膜片を除去して角膜上皮細胞がconfluentになった状態で培養液を交換し、各穴にLPSがそれぞれ1, 10, 100 μ g/mlの濃度になるように加えた(各n=3)。コントロールとしてリン酸緩衝食塩水を100 μ l加え、1週間培養後にその培養上清を採取し、3,000rpm、20分遠心し、LPS刺激検体およびコントロールとして-80 $^{\circ}$ Cで保存した。また、ドナーBでは、培養液中に浮遊したヒト角膜上皮細胞を洗浄し、細胞数を10⁶/mlに調整したのち、LPSをそれぞれ1, 10, 100 μ g/mlの濃度になるように加えた(各n=2)。コントロールとしてリン酸緩衝食塩水を100 μ l加え、1週間培養後、その培養上清を採取し、3,000rpm、20分遠心し、浮遊した細胞のLPS刺激検体およびコントロールとして-80 $^{\circ}$ Cで保存した。

3. IL-6, IL-1 α の定量

IL-6の定量には、enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) を応用した Intertest-6 (Genzyme 社) を、IL-1 α の定量には、やはり ELISA を用いたヒトインターロイキン1 α 測定キット(大塚製薬(株))を使用した。本測定法は、IL-6またはIL-1 α に対するマウスモノクローナル抗体を用いたサンドウィッチ法で、特異性と感度が高いとされているものである。以下、マニュアルにしたがって定量した、即ち、このモノクローナル抗体を96穴プレートに固相化し、前述の被検検体を希釈せず原液のまま加えて反応させた。また、別に標準曲線を作成するための標準ヒト recombinant IL-6またはIL-1 α を培養液でそれぞれ10~0.156 ng/mlまで2倍6段階、250~7.8 pg/mlまで2倍5段階に希釈したものを加えて反応させた。さらに抗IL-6ビオチン化家兎抗血清あるいは抗IL-1 α 家兎抗血清を加えて、マウスモノクローナル抗体に結合したIL-6、IL-1 α に反応させた。次に、IL-6ではアビジン化ペルオキシダーゼ標識抗家兎IgG、IL-1 α ではペルオキシダーゼ標識抗家兎IgG抗体を加えて抗IL-6、抗IL-1 α 家兎抗血清に反応させた。この後、ペルオキシダーゼの基質である0-フェニレンジアミンを反応させ、各穴のペルオキシダーゼ酵素活性を波長492 nmのマイクロプレート用光度計(EAR 340, SLT)で計測し、標準IL-6、IL-1 α の吸光度より標準曲線を作成した。被検検体の吸光度を標準曲線に当てはめて被検検体中のIL-6およびIL-1 α の量を求めた。尚、陰性対照として10%ウシ胎児血清を加えたTC-199培地中のIL-6およびIL-1 α 量を求めた。

III 結 果

1. 培養細胞の状態

ドナーAから得た角膜上皮は培養皿に接着して増殖したが、ドナーBから得た角膜上皮は培養皿に接着せず、培養液中に浮遊して増殖した。浮遊した細胞を集め、さらに培養した場合には、細胞の増殖はほとんど認められなかった。また、LPSを添加した場合の接着した細胞、浮遊した細胞ともに、トリパンブルーによる細胞障害試験での細胞障害は認められなかった。

2. 無刺激の培養上清中のIL-6の量

ドナーAの接着した角膜上皮細胞およびドナーBの浮遊した角膜上皮細胞を、無刺激で培養した培養上清は、表1に示すように、ドナーAではそれぞれ230, 210, 210 pg/ml、平均217 $\pm$ 11 pg/ml、ドナーBでは310, 320 pg/ml、平均315 pg/mlのIL-6が検出された。

表1 無刺激培養上清中のIL-6活性

	培養上清中のIL-6活性	平均 $\pm$ 標準偏差 (pg/ml)
ドナーA	230, 210, 210	217 $\pm$ 11
ドナーB	310, 320	315

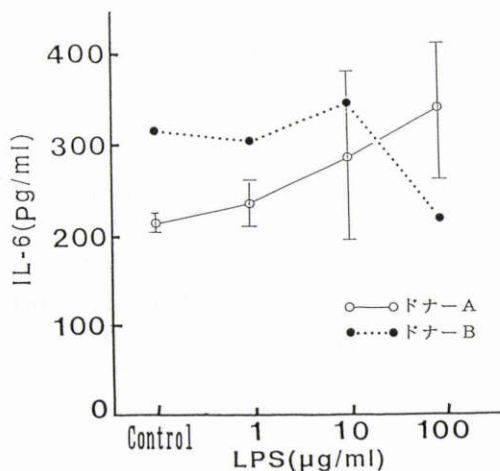


図1 LPS刺激による角膜上皮培養上清中のIL-6活性

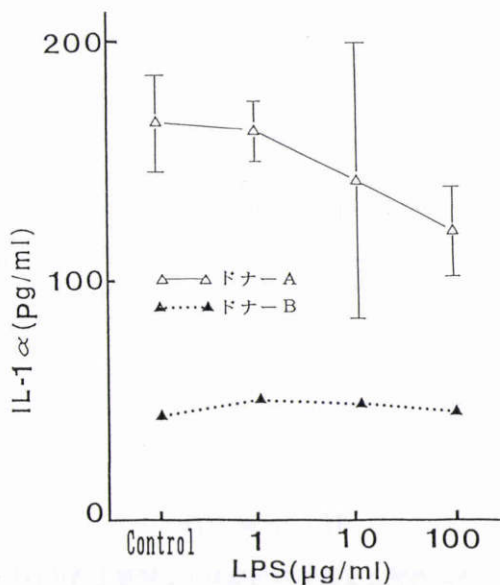


図2 LPS刺激による角膜上皮培養上清中のIL-1 α 活性

3. LPS刺激

LPSを添加して培養した培養上清中のIL-6活性は、

図1に示したように、ドナーAではコントロールで 215 ± 10 pg/ml, LPS を1, 10, $100 \mu\text{g/ml}$ の濃度で添加したものはそれぞれ 235 ± 25 , 285 ± 95 , 340 ± 70 pg/ml であり、有意な差はなかった。ドナーBでも、コントロールで 310 pg/ml, LPS を添加したものではそれぞれ 300 , 345 , 220 pg/ml であり産生の増強は認められなかった。また、図2にはドナーAおよびドナーBのIL-6を測定した同じ培養上清中のIL-1 α の量を示した。ドナーAではコントロールで 168 ± 20 pg/ml, LPS を1, 10, $100 \mu\text{g/ml}$ の濃度で添加したものはそれぞれ 164 ± 12 , 143 ± 58 , 122 ± 18 pg/ml であり有意な差はなかった。ドナーBでも、コントロールで平均 44 pg/ml, LPS を添加したものではそれぞれ平均 51 , 48 , 45 pg/ml であり、IL-6の場合と同様にLPSの添加によってもIL-1 α の産生の増強は認められなかった。尚、陰性対照として用いた10%ウシ胎児血清を加えたTC-199培地のみでは、IL-6, IL-1 α とも測定限界以下であった。

IV 考 按

我々はこれまでに、培養した人眼角膜上皮細胞がIL-1を恒常的に産生することを報告した²⁾。また、IL-1は分子構造の違いによりIL-1 α , IL-1 β の2つのタイプ³⁾が知られており、人眼角膜上皮細胞が産生するのは主にIL-1 α で、産生されるIL-1 α の量はIL-1 β の約20倍であることも報告²⁾した。今回、IL-1と同様に多機能性のサイトカインであるIL-6の産生を検討した。その結果、培養上清中にIL-6活性を認め、培養したヒト角膜上皮細胞がIL-6を産生することが明らかになった。

人間のIL-6は212残基のアミノ酸から構成される分泌蛋白であり、これまでにB cell stimulatory factor 2 (BSF-2), hepatocyte stimulating factor (HSF), interferon β_2 (INF β_2) などと呼ばれていた物質がすべて同じものであることが明らかになり、近年、IL-6と呼称されるようになったものである。また、IL-6の産生もT細胞、B細胞、マクロファージなど免疫系の細胞のみならず、線維芽細胞、血管内皮細胞、脳星状グリア細胞、腎メサンギウム細胞などの非免疫系の細胞からも産生される⁴⁾ことが知られるようになった。上皮系の細胞では、皮膚の角質細胞がやはりIL-6を産生する^{6,7)}ことが報告されている。

IL-6の産生には、刺激をしなくても産生される恒常的な産生と刺激によって産生される誘導的な産生とが

ある。今回の結果から、人眼角膜上皮細胞ではIL-6は恒常的に産生されることが判明した。また、すでに報告²⁾したようにIL-1 α の産生もやはり恒常的な産生であり、IL-6の結果と同一である。これまでの報告⁴⁾では、T細胞、B細胞、線維芽細胞などの細胞からのIL-6の産生は誘導的な産生であるが、皮膚の角質細胞からのIL-6, IL-1の産生は恒常的な産生である^{6)~8)}とされている。このIL-6あるいはIL-1 α の細胞の種類による産生様式の違いは、皮膚、角膜組織が何れも体表層に位置していることを考えると、刺激を必要としない恒常的な産生が、体表層における一次防御の特長であるのかも知れない。

IL-6やIL-1などのサイトカインの産生を増強する物質はこれまでに幾つか知られているが、今回、その一つで、グラム陰性菌の菌体成分であるlipopolysaccharide (LPS)によるIL-6, IL-1 α 産生の増強を試みた。その結果、両者ともその産生は増加しなかった。LPSの添加によっても細胞のトリパンブルー試験が陰性であったことから、産生の増強がなかったことがLPSの細胞障害によるものとは考え難い。また、培養条件によって結果が異なる可能性はあるが、少なくとも今回の培養条件では、LPSはこれらのサイトカイン産生を誘導しなかった。皮膚の角質細胞のIL-6産生は、LPS刺激により増強する⁷⁾ことが知られている。皮膚、角膜とも体表層に位置する組織であるが、LPSに対する反応が異なり、角膜では、IL-1 α およびIL-6産生が増強されないシステムになっている可能性も考えられる。

一方、IL-6産生を誘導する物質としてはLPSの他に、IL-1, tumor necrosis factor (TNF), 血小板由来増殖因子などのサイトカイン、タンパク質合成阻害剤、細胞内cAMPを増加させるものなど様々である⁴⁾。また、産生を刺激する物質は細胞の種類によって異なっており、例えば、IL-1やTNFは線維芽細胞のIL-6産生を誘導するが、T細胞のIL-6産生は誘導しない⁴⁾。従って、人眼角膜上皮細胞からのIL-1, IL-6産生を誘導する物質の存在の有無や、あるとすればその同定が今後の検討課題である。

今回はドナーAの接着して増強した角膜上皮細胞の他に、ドナーBの接着しない角膜上皮細胞も実験に用いた。接着しなかった原因として、ドナーBの年齢が高いことが考えられる。しかし、どちらの場合でもIL-6は恒常的に産生された。このことから、人眼角膜上皮細胞では、IL-6が細胞が接着しない状態でも産生さ

れることが明らかになった。

皮膚の角質細胞が産生する IL-1は、皮膚組織での IL-2の産生、IL-2レセプターの発現など T細胞の増殖に重要であり⁹⁾、さらに、恒常的に産生されることから、抗原抗体反応に即応できる状態を作っているものと考えられる。また、IL-6の生物学的機能として、T細胞における IL-2産生および IL-2レセプター発現の誘導があり⁴⁾、恒常的に産生される IL-6も皮膚での免疫応答に重要であると思われる。

角膜組織においても、一旦、免疫応答が起こった場合には角膜上皮細胞の産生する IL-1あるいは IL-6は免疫応答にとって重要な因子になると考えられる。また、眼瞼および球結膜組織は、血管系、リンパ系の良く発達した組織であり、免疫応答の起こりやすい部位である。角膜輪部、結膜には抗原提示細胞¹⁰⁾と考えられるランゲルハンス細胞の存在が知られており、角膜上皮細胞が産生した IL-1、IL-6は涙液中に拡散し、結膜組織での免疫応答に関与している可能性もある。この様に、角膜上皮細胞が産生した IL-1および IL-6は、ocular surfaceでの免疫応答に重要な役割を演じているものと推測される。

本論文の要旨は第94回日本眼科学会総会（1990年5月24日、岡山）にて発表した。

文 献

- 1) 嶋田孝吉：眼における免疫の特殊性。松田英彦編，眼科 Mook 24，眼疾患の免疫，東京，金原出版，84—92，1985。
- 2) 坂本真栄，清野雅子，田澤 豊，他：ヒト角膜培養上清中の IL-1 活性—モノクローナル抗体を用いた ELISA による検出—，眼紀 41：505—510，1990。
- 3) 笠原 忠，八木沢仁：インターロイキン 1(IL-1)，日本生化学会編，新生化学実験講座 12，分子免疫学 I，免疫細胞，サイトカイン，東京，東京科学同人，272—280，1989。
- 4) 松田 正，平野俊夫：インターロイキン 6(IL-6)，日本生化学会編，新生化学実験講座 12，分子免疫学 I，免疫細胞，サイトカイン，東京，東京科学同人，317—326，1989。
- 5) 遠藤重厚，稲田捷也，井上義博，他：Interleukin 1 β と interleukin 6 の関与した敗血症性ショック，日救急医誌 2，1991（印刷中）。
- 6) Kupper ST, Min K, Sehgal P, et al: Production of IL-6 by keratinocytes. Ann NY Acad Sci 557: 454—464, 1989。
- 7) Luger TA, Schwarz T, Krutmann J, et al: Interleukin-6 is produced by epidermal cells and plays an important role in the activation of human T-lymphocytes and natural killer cells. Ann NY Acad Sci 557: 405—414, 1989。
- 8) 小林芳郎：マクロファージと IL-1, BIO Medica 4: 774—776, 1989。
- 9) Edelson RL, Fink JM: The immunologic function of skin. Sci Am 252: 34—41, 1985。
- 10) 田川義継，竹内 勉，松田英彦：角膜上皮層におけるランゲルハンス細胞の分布とその免疫学的検討，日眼会誌 85: 1053—1059, 1981。