

平成 19 年度日本眼科学会学術奨励賞 受賞論文総説

Vogt-小柳-原田病発症機構
—メラノサイト自己抗原に対する T リンパ球反応

杉田 直

東京医科歯科大学眼科学教室

要 約

Vogt-小柳-原田病(以下, 原田病)は眼, 髄膜, 耳, 皮膚, 毛髪などのメラノサイトに炎症を起こす全身性疾患である。その病因は未だ不明な点が多いが, 臨床的, 実験的エビデンスからメラノサイトに対する自己免疫疾患と考えられている。本研究では, 原田病の発症機構を明らかにすることを目的とし, メラノサイト自己抗原に対する眼局所由来 T 細胞の反応およびその自己抗原と外来性抗原の構造類似性による原田病発症の可能性について検討した。その結果, HLA-DR 4 陽性の原田病患者から樹立した CD 4 陽性 T 細胞は DR 4 拘束性に tyrosinase や gp100 抗原を認識していた。さらに, CD 8 陽性 T 細胞は HLA-class I 拘束性に MART-1 を認識していたが, その活性は CD 4 陽性 T 細胞にはなかった。データベースを用いたホモロジー検索の結果, これらの抗原の中では tyrosinase がサイトメガロウイルス (CMV) 糖蛋白質 (CMV-egH) と高い構造類似性を示して

いた。また, 原田病患者から得られた tyrosinase ペプチド抗原特異的 T 細胞は CMV-egH ペプチドも認識し, さらに CMV ペプチド抗原特異的 T 細胞は tyrosinase ペプチドも認識する交叉反応 (cross-reaction) を示していた。原田病患者の CMV の血清抗体価はほとんどが陽性であったが (=CMV 既感染), 患者検体の定量 polymerase chain reaction (PCR) 結果では CMV-DNA は全例が陰性であった。以上の結果より, 原田病患者では CMV という一般的なウイルスを認識するメモリー T 細胞が全身に存在し, この T 細胞がメラノサイト抗原と構造類似性のための交叉反応起こし, この自己免疫炎症が発症していると考えられた。(日眼会誌 112: 953-964, 2008)

キーワード: Vogt-小柳-原田病, ぶどう膜炎, メラノサイト, HLA, 自己免疫疾患

A Review

Ocular Infiltrating CD 4⁺ T Cells from Patients with Vogt-Koyanagi-Harada Disease Recognize Human Melanocyte Antigens

Sunao Sugita

Department of Ophthalmology & Visual Science, Tokyo Medical and Dental University Graduate School of Medicine

Abstract

Vogt-Koyanagi-Harada (VKH) disease is a systemic disorder affecting systemic melanocytes including those in the eyes, meninges, ears, skin, and hair. Although the pathogenic mechanisms of the disease are still controversial, there is clinical and experimental evidence that the disease is an autoimmune disease involving melanocytes. In this study, we investigated whether patients with VKH disease have immune responses specific to melanocyte antigens, and

whether T lymphocytes of these patients cross-react with peptides of melanocytes and with exogenous antigens. Cells infiltrating the eyes in HLA-DR 4⁺ patients with VKH contained a population of CD 4⁺ T lymphocytes that recognized tyrosinase and gp 100 peptides and produced cytokines in response to these two peptides. The CD 8⁺ T cells recognized the MART-1 melanocyte peptide, but not the CD 4⁺ T cells. When a search was made for molecular mimicry

別刷請求先: 113-8519 東京都文京区湯島 1-5-45 東京医科歯科大学眼科学教室 杉田 直

(平成 20 年 3 月 6 日受付, 平成 20 年 7 月 16 日改訂受理) E-mail: sunaoph@tmd.ac.jp

Reprint requests to: Sunao Sugita, M. D., Ph. D. Department of Ophthalmology & Visual Science, Tokyo Medical and Dental University Graduate School of Medicine, 1-5-45 Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8519, Japan

(Received March 6, 2008 and accepted in revised form July 16, 2008)

between melanocyte antigens and exogenous antigens by database screening, cytomegalovirus envelope glycoprotein H (CMV-egH) had high amino acid homology with the tyrosinase peptide. Some of the T cells taken from VKH patients recognized melanocyte peptides including the tyrosinase peptide as well as the CMV-egH₂₉₀₋₃₀₂ peptide, which had a high amino acid homology to the tyrosinase peptide. CMV peptide-specific T cells showed significant proliferation in response not only to CMV-egH₂₉₀₋₃₀₂, but also to tyrosinase₄₅₀₋₄₆₂. The seroprevalence of CMV was significantly higher in VKH patients. In addition, all

tested samples of VKH patients were negative for CMV-DNA. These results indicate that CMV infection may stimulate the production of T cells that cross-react with tyrosinase by molecular mimicry. These events may be responsible for the onset of VKH disease.

Nippon Ganka Gakkai Zasshi (J Jpn Ophthalmol Soc 112 : 953-964, 2008)

Key words : Vogt-Koyanagi Harada disease, Uveitis, Melanocyte, HLA, Autoimmune disease.

I はじめに

Vogt-小柳-原田病(以下, 原田病)は原因不明の全身性疾患であり, メラノサイト特異的自己免疫疾患と考えられている。原田病がメラノサイトに対する自己免疫疾患であることを示唆するものとして, 本疾患は日本人を含む有色人種に多いこと, 炎症の標的組織はメラノサイトを豊富にもつ組織(眼, 皮膚, 内耳, 髄膜など)であること, 炎症の急性期にはこれらの組織のメラノサイトを中心に多数のリンパ球が浸潤して炎症を起こすこと, 急性期から数か月後の回復期にはメラノサイトの多くが消失していること, などの臨床的, 病理学的な所見が従来から知られている¹⁾²⁾。原田病の患者背景としてはHLA-DR 4陽性であることも知られている¹⁾²⁾。

近年, 癌研究において明らかになった組織特異抗原 tyrosinase, gp100, MART-1(melanoma antigen recognized by T cell-1/Melan-A)などはメラノーマのみならず正常のメラノサイトや網膜, ぶどう膜にも発現していることが報告されている^{3)~5)}。本稿では, このメラノサイト自己抗原を原田病患者の眼局所リンパ球が認識し反応するのか, その分子をHLA拘束性に認識しメラノサイト細胞傷害活性を示すのか, もしそうならばなぜ自己のリンパ球が自己抗原を認識するようになるのかなどその自己免疫疾患の発症機構について解説する。

II Vogt-小柳-原田病について

原田病は1906年Vogtが脱毛, 白髪, 白斑を伴う両眼性の虹彩炎を初めて報告した。原田病の眼所見は両眼の肉芽腫性虹彩毛様体炎, 後極部を中心に網膜剥離があり, 最も特徴的な所見として, 脈絡膜の色素細胞(メラノサイト)の崩壊による夕焼け状眼底が認められる。原田病患者の約1/3に感冒様症状, 頭痛, 耳鳴, 場合によってはめまい, 吐き気, 頸部痛などの髄膜刺激症状を訴える前駆症状が認められる。こうした前駆症状はほぼ1週間以内であり, これに次いで眼症状が発症する。その他, 全身症状として皮膚の白斑, 毛髪の白変, 脱毛,

難聴, 耳鳴などを訴え, 発症後3か月以内に髄液細胞増多が高率に認められる。これらの色素脱失所見から, 以前より原田病は, 自己のメラノサイトを抗原とした免疫異常と考えられている。その重要な根拠として原田病発症のほとんどの患者はHLA-DR 4(HLA-DRB1*0405)を有する⁶⁾。原田病は軽度の頭痛や感冒様症状などの前駆症状の数日後に突発性に両眼性ぶどう膜炎を発症する。このような発症様式は, 原田病が何らかの感染症を契機として発病するのではないかと, という考えをもたせるものである。このような仮説に対して多くの研究がなされたが, 原田病がウイルスをはじめとする何らかの微生物感染が直接の原因となって生じるという確かな証拠は報告されていなかった。しかし, その後の研究で, 原田病患者の末梢血や髄液細胞, あるいは眼内浸潤細胞の免疫学的解析がなされ, 最近では, メラノサイト抗原と原田病の発症機構との関連性が注目されている。我々は, 患者リンパ球(T細胞)が自己メラノサイト抗原を認識し細胞傷害を示すこと⁷⁾⁸⁾, そのT細胞がその自己抗原と構造類似性のある外来性抗原との交叉反応を示すこと⁹⁾を報告した。その詳細な内容については次項に記述する。古くはメラノサイト抗原が患者末梢血リンパ球や局所浸潤リンパ球に拘束性に認識され, 患者リンパ球を活性化させることが報告されている¹⁰⁾。また, メラノサイト抗原の一つ tyrosinase ファミリー蛋白質による実験モデルも報告されている¹¹⁾。これらの知見は, 原田病がメラノサイト, メラノサイト抗原ペプチドに対する自己免疫疾患であることを示唆するものといえる。

III メラノサイト抗原

近年, 細胞傷害性T細胞(cytotoxic T lymphocyte : CTL)により認識されるいくつかのHLA-class I拘束性メラノーマ抗原が同定された。これらのうち, MART-1, gp 100(pMel-17), tyrosinaseらはメラノーマのみならず正常のメラノサイトにも発現している^{3)~5)}。また, MART-1は網膜/ぶどう膜にも発現していることが報告されている³⁾。癌患者ではその自己の免疫システムの異

表 1 ヒトメラノサイト抗原ペプチドのアミノ酸配列と HLA 拘束性

ペプチド	アミノ酸配列	HLA 拘束性	参考文献
MART-1	AAGIGILTV	HLA-A 2	3
tyrosinase	YMNGTMSQV	HLA-A 2	4
	SYLQDSDPDSFQD	HLA-DR 4	13
gp 100 (pMel-17)	YLEPGPVTA	HLA-A 2	5
	WNRQLYPEWTAQRLD	HLA-DR 4	14

今回の研究に使用した代表的なメラノサイト抗原ペプチドについてまとめた。
MART-1 : melanoma antigen recognized by T cell-1/Melan-A.

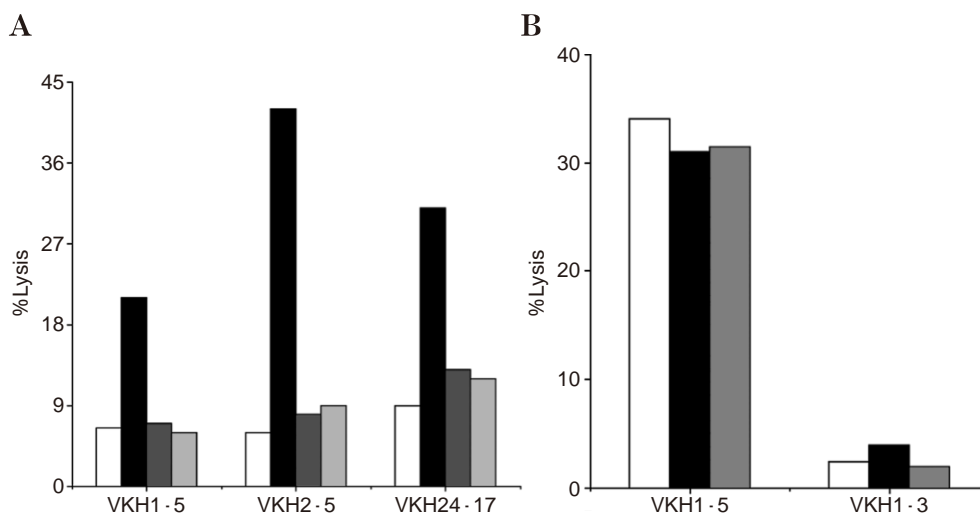


図 1 Vogt-小柳-原田病(原田病)患者眼局所由来 CD 8 陽性 T 細胞の細胞傷害活性。

A : 3 名のぶどう膜炎を有する原田病患者眼局所から得られた CD 8 陽性 T 細胞(細胞傷害性 T 細胞クローン, VKH 1-5, VKH 2-5, VKH 24-17)をエフェクター細胞として使用した. ターゲット細胞には HLA-A 2 陽性の T 2 細胞, 抗原に関してはメラノサイト抗原ペプチドに HLA-class I (HLA-A 2)拘束性の MART-1, gp100, tyrosinase ペプチドを使用した. 細胞傷害活性の評価は ^{51}Cr release assay にて行った. □ : ペプチド(-), ■ : MART-1, ■ : tyrosinase, ■ : gp100. B : 原田病 CD 8 陽性 T 細胞クローン (VKH 1-5) と CD 4 陽性 T 細胞クローン (VKH 1-3) を用いてメラノサイト細胞株 (NHEM 2488, HLA-A 2 陽性) とメラノーマ細胞株 (Malme-3 M と SK-MEL-5, ともに HLA-A 2 陽性) の ^{51}Cr release assay を行った. □ : NHEM 2488, ■ : Malme-3 M, ■ : SK-MEL-5.

常により正常組織抗原までもが認識され, その結果として正常自己組織の破壊=自己免疫疾患が引き起こされる場合もある. 実際, メラノーマ患者免疫療法後に白斑などのメラノサイト破壊炎症所見が認められた患者の報告例がある¹²⁾. また, 近年, 上記したメラノーマ/メラノサイト抗原の HLA-DR 4-binding site が同定され報告された¹³⁾¹⁴⁾. 以上より, これらの抗原の中で原田病の発症あるいは炎症の原因となる抗原の候補が含まれている可能性が示唆された. 表 1 にこれらの抗原ペプチドのアミノ酸配列と HLA 拘束性についてまとめた.

IV 原田病 T 細胞クローンの樹立および MART-1 特異的細胞傷害活性

原田病の免疫病理機構解析を目的とし, 原田病 T 細胞がこれらのメラノサイト抗原を認識できるかどうかを検討した. 最初のメラノサイト抗原として HLA-class I

拘束性の抗原ペプチドを使用した. まず, 数名の活動性の眼内炎症をもつ HLA-A 2 陽性の原田病ぶどう膜炎患者の眼局所(前房水), 末梢血単核球(peripheral blood mononuclear cells : PBMC), および脳脊髄液より interleukin (IL)-2 存在下で限界希釈法を用いて T 細胞クローンを樹立した. また, 同様の方法で交感性眼炎, Behçet 病, HTLV-1 ぶどう膜炎の前房水および健康人の PBMC より T 細胞クローンを樹立し, 対照細胞として用いた. これらの細胞を用いて, MART-1 特異的細胞傷害活性を示すかどうかを HLA-A 2 陽性の T 2 細胞株(ターゲット細胞)を用いて ^{51}Cr release assay にてスクリーニングを行った. この MART-1 ペプチドは 9-mer で(AAGIGILTV, 表 1)HLA-A 2 拘束性を示す³⁾. 患者の眼局所から得られた CD 8 陽性 T 細胞(細胞傷害性 T 細胞, CTL)と CD 4 陽性 T 細胞をエフェクター細胞として使用した. 原田病患者のいくつかの CD 8 陽性 T 細胞

表 2 原田病患者眼局所および末梢血単核球由来 T 細胞クローンにおけるサイトカイン/ケモカイン産生能

疾患	検体	TCC の数	サイトカイン (pg/ml)							ケモカイン (pg/ml)				
			IL-1 α	IL-2	IL-4	IL-6	IL-10	TNF- α	IFN- γ	GM-CSF	IL-8	MIP-1 α	MIP-1 β	RANTES
原田病	前房水	n=7	0	4	0	46*	16	37	64*	24	1,031**	370	278*	581*
	PBMC	n=7	0	5	0	13	7	45	90*	13	135	62	92	176
健常人	PBMC	n=7	0	3	0	6	4	12	0	3	355	222	78	57

ELISAにて測定したサイトカインとケモカインの数値は平均値で表示した。*: p<0.05, **: p<0.005, 健常人 PBMC(末梢血単核球)と比較。

TCC : T 細胞クローン. IL : interleukin. TNF- α : tumor necrosis factor- α . IFN : interferon. GM-CSF : 顆粒球マクロファージコロニー刺激因子. MIP : macrophage inflammatory protein.

胞クローンは、HLA-A 2 拘束性に MART-1 ペプチドを認識したが、gp100 や tyrosinase ペプチドに関してはその反応は示さなかった(図 1 A)。同様に、1 名の交感性眼炎患者から樹立した CD 8 陽性 T 細胞クローンは、HLA-A 2 拘束性に MART-1 を認識していた⁷⁾。これに対して、これらの原田病および交感性眼炎患者のいくつかの CD 4 陽性 T 細胞クローンや Behçet 病, HTLV-1 ぶどう膜炎および健常人 PBMC 由来 T 細胞クローン (CD 4 と CD 8) では、MART-1 特異的 CTL 活性は示さなかった⁷⁾。次に、これらの MART-1 特異的 T 細胞クローンはメラノーマ細胞株およびメラノサイト細胞株に対して細胞傷害活性を示すかどうかの検討を行った。原田病眼局所由来 CD 8 陽性 T 細胞クローンは A 2 陽性メラノサイト細胞株に対して高い細胞傷害活性を示したが(図 1 B), A 2 陰性メラノサイト細胞株に対しては示さなかった。同様に、メラノーマ細胞株に対しても、HLA-A 2 拘束性に高い細胞傷害活性を示した(図 1 B)。次に HLA-A 2 陽性原田病患者と A 2 陽性健常人 PBMC を MART-1 存在下で, *in vitro* で刺激することで MART-1 特異的 CTL を得ることを試みた。結果的に原田病患者、健常人 1 名ずつに MART-1 に対して高い細胞傷害活性をもつ CTL を得ることができた⁷⁾。これらのことは患者のみならず健常人でも MART-1 を認識できる precursor CTL が末梢血中に存在して血液中を循環していることが示唆された。

V 原田病と MART-1 メラノサイト抗原の関連性について

過去の報告で示したように⁷⁾、原田病や交感性眼炎の眼局所および末梢血には MART-1 に特異的な CTL が存在していて、これらの細胞が直接的にメラノサイトを認識し傷害している可能性が高いということが判明した。さらに、健常人にもこのような CTL が存在しているにもかかわらず原田病が発症しないのは、さまざまな誘因あるいは遺伝的背景などが関与していることが考えられる。何かを契機にこのような人の CTL は血液・網膜関門の破綻とともに眼内に侵入し、ぶどう膜炎を惹起するのではと推測される。しかし、最も重要な点は、

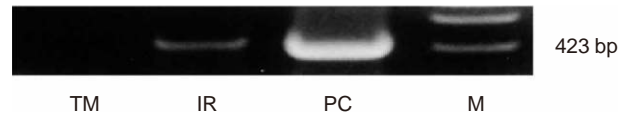


図 2 原田病患者から得られた虹彩組織の tyrosinase mRNA 発現。

原田病ぶどう膜炎の続発性緑内障患者から得られた虹彩組織から RNA を抽出、cDNA 合成後に tyrosinase mRNA 発現について reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) にて検討した。M : 100 bp マーカー, PC : 陽性対照, IR : 虹彩, TM : 線維柱帯(同患者由来)。

(文献 8 より許可を得て転載, 一部改変)

HLA-A 2 に拘束される MART-1 分子が、原田病発症の直接的原因分子かどうかという点にある。それは前述したように、原田病の疾患感受性遺伝子は HLA-DR 4 という点からもいえる。近年、メラノーマ遺伝子の中で DR 4 拘束性の binding site が報告された¹³⁾¹⁴⁾。今回、MART-1 特異的 CTL はいずれの患者も再発を繰り返し治療に抵抗性を示した活動性ぶどう膜炎から得られたが、初発の患者からはこのような CTL は得られなかった。T 細胞の眼内メラノサイトに対する作用機序を推測すると、ある一定の遺伝的素因(HLA)をもった人では、何かを契機に炎症細胞が血液・網膜関門を通過し眼内メラノサイトを認識する。これは例えばウイルスなどの感染症の病原体とメラノサイト抗原とに構造類似性(molecular mimicry)があるために交叉反応(cross reaction)を生じる。眼内メラノサイト抗原を認識した T 細胞は、サイトカインなどのさまざまな伝達物質により CTL を含んだ他の炎症細胞を炎症の場に誘導する。これらのメラノサイト特異的 T 細胞は血液の中を循環し全身のメラノサイトの存在する場所(目, 耳, 皮膚など)で炎症を引き起こすと考えられる。再発を繰り返す患者の眼の前房水中に多くの MART-1 特異的 CTL が出現しているような傾向がみられたが、これは何度も MART-1 に対し抗原刺激を受け感作されたためではないかと考えられる。メラノサイト抗原は膜抗原で多様性があると考えられ、HLA-A 2 拘束性の MART-1 は CD 8 陽性細胞傷害性 T 細胞により認識される抗原の一つ

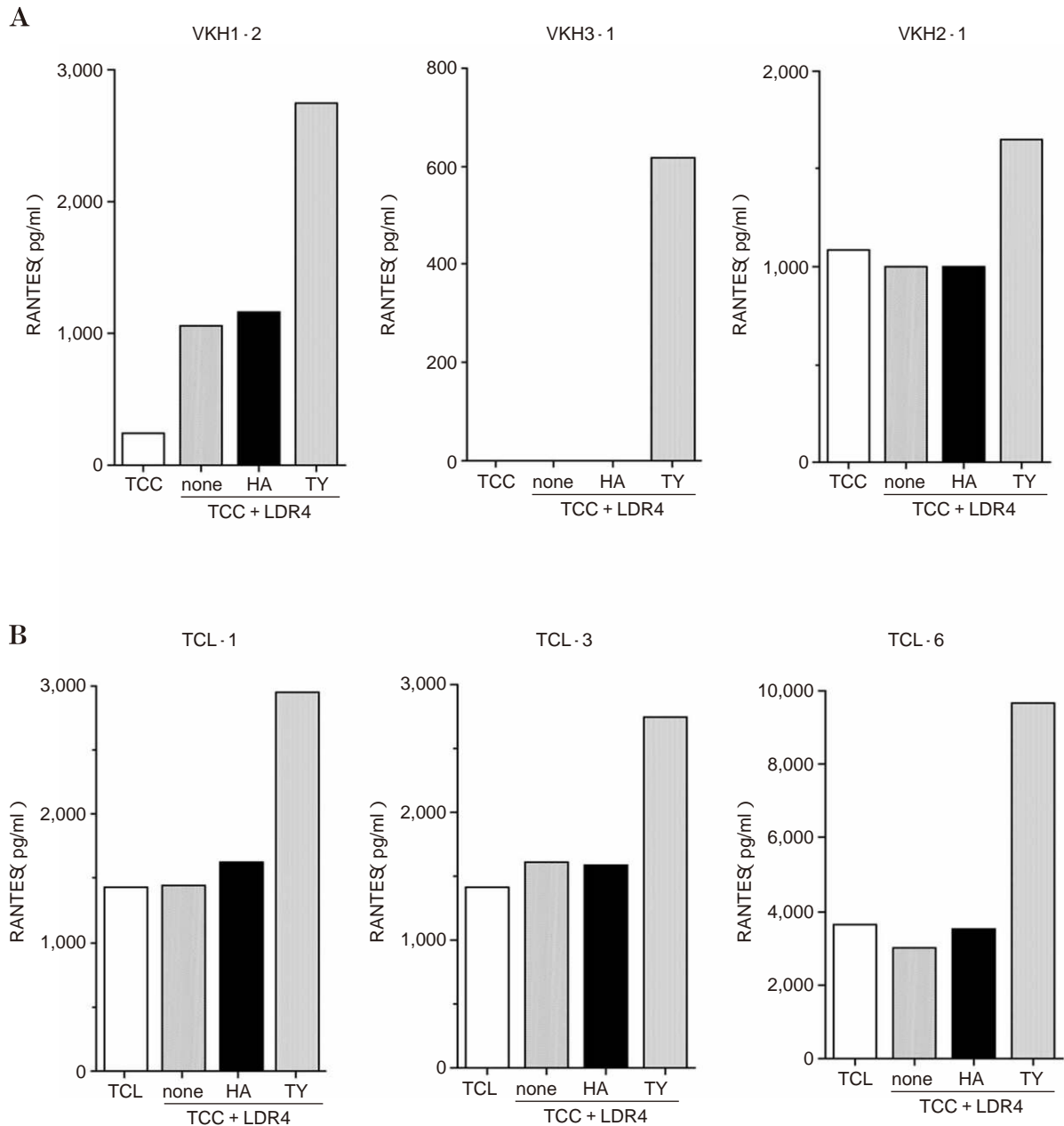


図 3 原田病患者眼局所由来 T 細胞の HLA-DR 4-binding tyrosinase ペプチド認識。

A : 3 名のぶどう膜炎を有する原田病患者眼局所から得られた CD 4 陽性 T 細胞 (VKH 1-2, VKH 3-1, VKH 2-1) をエフェクター細胞として使用し, ターゲット細胞には LDR 4 (HLA-DRB 1*0405 陽性) を用いた。HLA-DR 4 拘束性 tyrosinase ペプチド (TY) と対照ペプチド (HA : インフルエンザウイルス抗原, HA 307-319) を抗原として使用した。細胞活性の評価は T 細胞の産生する RANTES で検討した。B : 3 名のぶどう膜炎を有する原田病患者 PBMC から T 細胞株 (T cell line : TCL) を樹立し, tyrosinase ペプチド (TY) と対照ペプチド (HA) に対する反応性の評価を RANTES 産生能で検討した。none : ペプチドなし, T 細胞 + ターゲット細胞のみ。(文献 8 より許可を得て転載, 一部改変)

と推測される。

過去 20 年間の報告によると, 癌細胞上には MHC class I 拘束性の癌抗原が発現されていて, これを認識する CTL が局所に存在することがいわれている。隔絶された正常組織に発現している分化抗原 (例えば MART-1 など) は癌抗原と同様に癌抗原特異的 CTL に認識される可能性をもっており, 認識されれば自己組織

の破壊を引き起こす。局所の CTL の存在は癌の消失および正常自己組織の破壊を意味するが, 存在しなければ癌の増殖を意味するのでそのバランスは重要である。

VI 原田病 CD 4 陽性 T 細胞の解析

次に, 我々は活動性眼内炎症のある原田病ぶどう膜炎患者の HLA genotyping について調べてみた。原田病ぶ

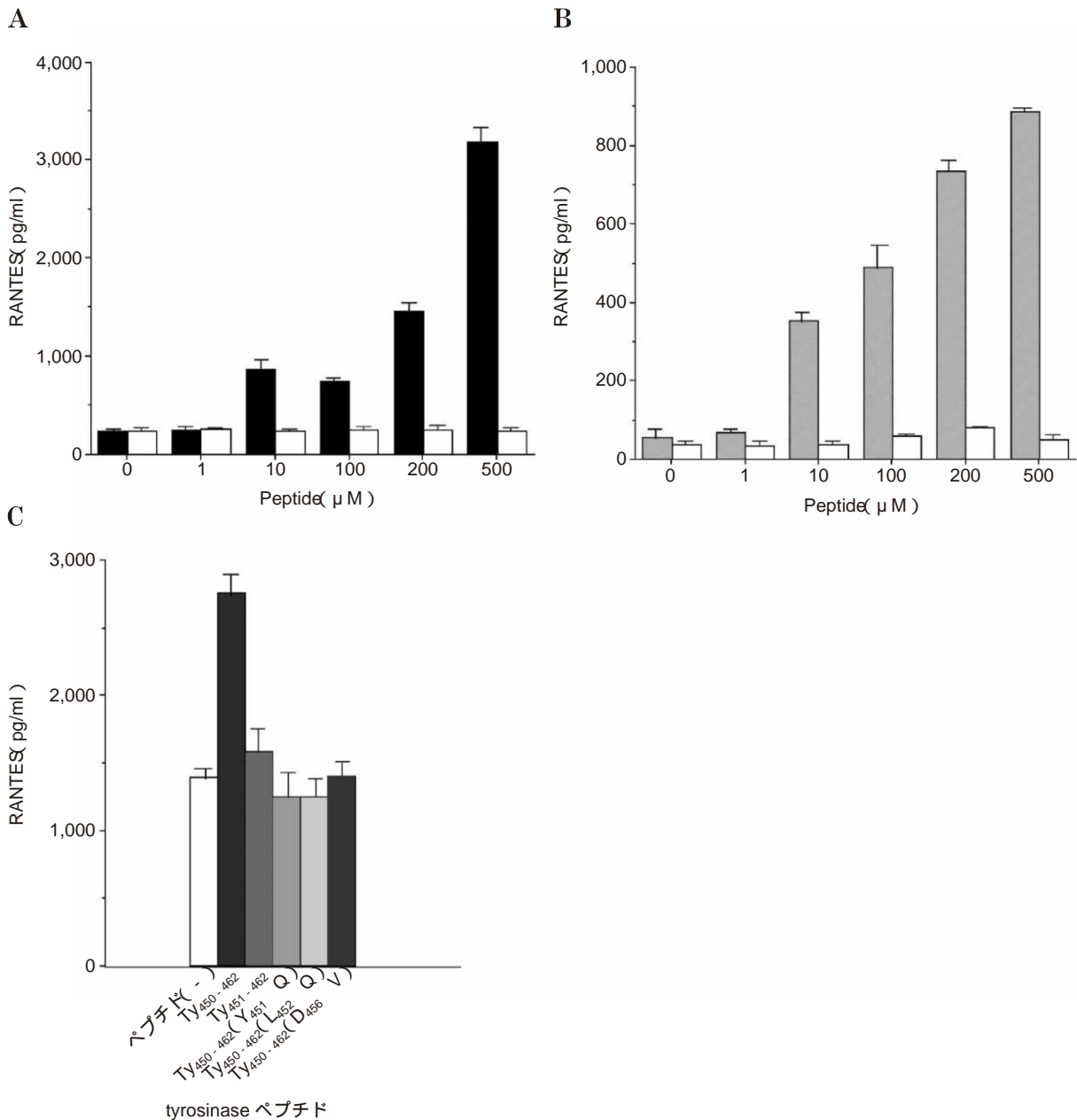


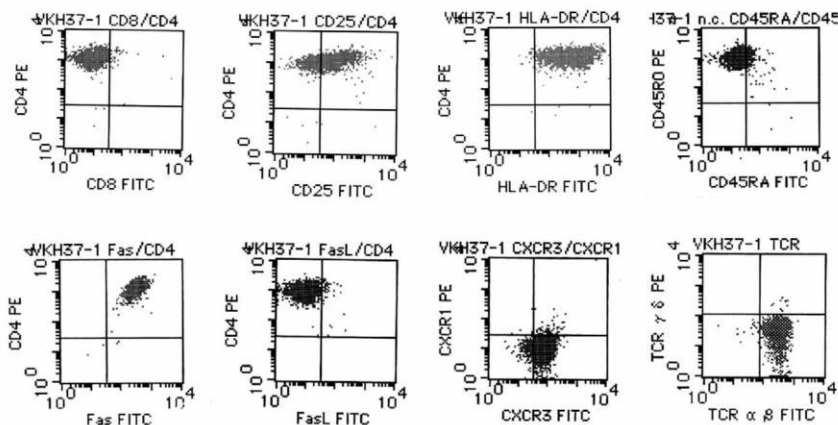
図 4 原田病患者眼局所由来 CD 4 陽性 T 細胞のメラノサイト抗原ペプチド濃度および変異ペプチドアッセイ。

眼局所由来 CD 4 陽性 T 細胞クローン(VKH 3-1)が HLA-DR 4 拘束性に tyrosinase(A)と gp 100(B)および対照ペプチド(HA)に対して濃度依存的に反応するかどうか RANTES 産生能にて検討した。各種それぞれの濃度 1, 10, 100, 200, 500 μM のペプチドを使用した。■ : tyrosinase₄₅₀₋₄₆₂, ■ : gp100₄₄₋₅₉, □ : HA₃₀₇₋₃₁₉。C : tyrosinase ペプチド(Ty₄₅₀₋₄₆₂)の HLA-DRB 1*0405 のアンカーポジションと思われるアミノ酸を意図的に欠如あるいは変異置換したペプチドを 50 μM ずつを使用した。その評価は T 細胞の産生する RANTES 産生能にて検討した。(文献 8 より許可を得て転載, 一部改変)

どう膜炎患者 14 名いずれも HLA-DR 4 陽性で、その中で 13 名が HLA-DRB 1*0405 が陽性、1 名が DRB 1*0410 が陽性を示した。この後者の 1 名も典型的な原田病所見を示していた。この結果あるいは過去の報告からも原田病の疾患感受性遺伝子は HLA-DR 4 で、その MHC class II 上の抗原を認識できるのは基本的に CD 8 陽性 T 細胞ではなく、CD 4 陽性 T 細胞と考えられる。そこで、次のステップとして原田病由来の CD 4 陽性 T

細胞が眼局所でどのようなサイトカイン/ケモカインを産生し、HLA-DR 4 拘束性にメラノサイト自己抗原を認識できるかどうかを検討した。活動性眼内炎症をもつ DR 4 陽性の原田病どう膜炎患者の眼局所、PBMC より IL-2 存在下で限界希釈法を用いて T 細胞クローンを樹立した。これらの T 細胞を用いて、サイトカイン産生能についてスクリーニングした。検討した炎症性サイトカインの中で、健常人 PBMC 由来 T 細胞クローン

A



B

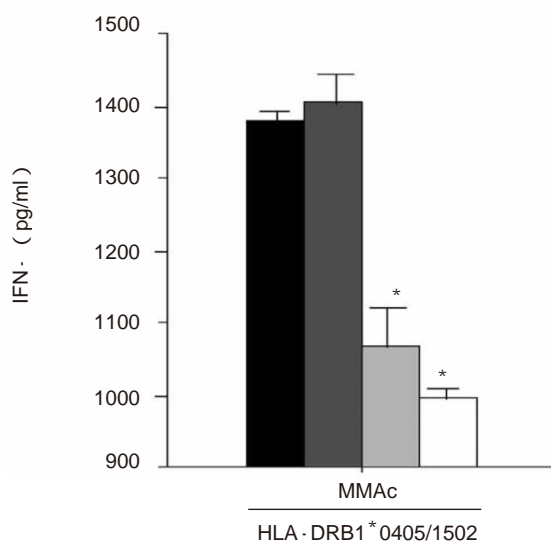


図 5 Tyrosinase 抗原を認識していた眼局所由来 CD 4 陽性 T 細胞の phenotype 解析.

A : 眼局所由来 CD 4 陽性 T 細胞クローン (VKH 3-1) の flow cytometry を用いた細胞表面抗原解析を行った. 使用した抗体 : CD 4, CD 8, CD 25, HLA-DR, CD 45 RA/RO, Fas (CD 95), FasL (CD 95 L), CXCR 1, CXCR 3, TCR α/β , TCR γ/δ . B : この T 細胞クローン (VKH 3-1) の HLA-class II 拘束性についてメラノマ細胞株 (MMac, HLA-DRB1*0405/1502) を用いて確認した. *In vitro* assay で用いた抗体は anti-HLA-class I (A, B, C) abs, anti-HLA-DR abs, anti-CD 4 abs で, その評価は T 細胞の産生する Th 1 サイトカインの IFN- γ 産生能で検討した. * $p < 0.05$ (t 検定). ■ : abs(-), ▒ : anti-class I, ▓ : anti-DR, □ : anti-CD 4. (文献 8 より許可を得て転載)

(対照 T 細胞) に比べて, 原田病眼局所由来 T 細胞と PBMC 由来 T 細胞が有意に高い値を示したのは IL-6, interferon (IFN)- γ , IL-8, macrophage inflammatory protein (MIP)-1 β , RANTES であった (表 2). この中で自己免疫疾患の病態形成に重要なヘルパー CD 4 陽性 T 細胞, 特に Th 1 細胞が産生する IFN- γ と RANTES に注目して以下の実験を進めた.

HLA-DR 4 拘束性メラノサイト抗原には tyrosinase と gp100 が過去に同定され報告されている¹³⁾¹⁴⁾. Tyrosinase と gp100 ペプチドともに DRBI*0405 および DRBI*0401 に拘束されるモチーフである. これらは両ペプチドを認識する抗原決定基 (エピトープ) が HLA-

DR 4 分子上に別々 (別のアミノ酸領域) に存在することを示唆する. そこで, まずこのメラノサイト抗原の発現がヒトの眼内ぶどう膜組織に確認できるかどうか検討した. 原田病ぶどう膜炎の続発性緑内障患者から得られた虹彩組織から RNA を抽出し, cDNA 合成後, reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) を用いて tyrosinase mRNA 発現について検討した. β -actin 陽性のこの虹彩組織は tyrosinase の mRNA レベルでの発現が認められた (図 2). 同じ HLA-DR 4 拘束性を示す gp100 mRNA も同患者虹彩組織から同定された⁸⁾.

次に, 原田病眼局所由来 T 細胞が tyrosinase に特異的な炎症反応を示すかどうかを HLA-DR 4 陽性の LDR 4

細胞株 (HLA-DRB1*0405 陽性) を用いて T 細胞の RANTES 産生能にてスクリーニングを行った. その結果, 原田病患者のいくつかの CD4 陽性 T 細胞クローンは HLA-DR4 拘束性に tyrosinase ペプチドを特異的に認識したが, 対照ペプチドに関しては示さなかった(図 3). これに対して, これらの原田病患者の CD8 陽性 T 細胞クローンや HLA-DR4 陽性の Behçet 病, サルコイドーシスおよび健常人 PBMC 由来 CD4 陽性 T 細胞では, tyrosinase ペプチドに無反応で RANTES 産生能に変化はみられなかった⁸⁾. 同様の所見は gp100 (HLA-DR4) の抗原ペプチドにも認められたが, 1 つの T 細胞クローンから同時に tyrosinase ペプチドと gp100 ペプチドの両方に反応する T 細胞クローンはなかった⁸⁾.

次に, メラノサイト抗原を認識する眼局所 T 細胞が末梢血中にも存在するのを確認するために, PBMC より IL-2 存在下で樹立した原田病患者 T 細胞株 (T cell lines) を用いて同様の反応について検討した. 図 3 に示したように, 原田病患者 T 細胞株は HLA-DR4 拘束性に tyrosinase ペプチドを特異的に認識し, RANTES 産生能が増強していた. さらに, この T 細胞株は tyrosinase だけではなく gp100 にも HLA-DR4 拘束性に反応

していた⁸⁾. 上記した実験にてこの 2 つのメラノサイト抗原はヒトの虹彩組織に mRNA レベルでの発現が確認されていることから, ぶどう膜組織に豊富に存在する眼内メラノサイトにはこれらの抗原の発現があると思われる. 原田病ぶどう膜炎発症時にはこの眼内自己抗原がターゲットになっている可能性があると思われた.

我々は次に, 眼局所 T 細胞が tyrosinase や gp100 ペプチドの濃度を変えて加えてみた場合どのような変化を示すか, また HLA-DR4 のアンカーの位置を変えたいくつかのペプチドを認識できるかを検討してみた. 図 4 に示したように, 眼局所由来 T 細胞は tyrosinase と gp100 ペプチドに対して濃度依存的に反応し, RANTES を産生していた. また, tyrosinase ペプチドの DRB1*0405 のアンカーポジションと思われるアミノ酸を意図的に欠如させたり変換したりするとそのペプチドに対する T 細胞の反応が消失していた(図 4).

次に, この tyrosinase ペプチドに反応していた原田病 T 細胞の phenotype について検討した. Flow cytometry 解析でこの眼局所由来の CD4 陽性 T 細胞は CD25, HLA-DR, Fas (CD95), CXCR3, CD45RO, TCR α/β が陽性で, CD8, FasL (CD95L), CXCR1, CD45RA, TCR γ/δ が陰性であった(図 5). さらに, この tyrosinase ペプチドに反応していた眼局所 CD4 陽性 T 細胞がメラノーマ細胞株を HLA-DR 拘束性に認識するかどうかを検討した. ターゲットに tyrosinase 抗原の発現が確認できているメラノーマ細胞株 MMac (HLA-DRB1*0405/1502) を用いた. この原田病 T 細胞は, HLA-DR 拘束性に認識し, Th1 サイトカインの IFN- γ を産生していた(図 5). 以上の細胞表面抗原解析と *in vitro* assay にて, この自己抗原特異的 CD4 陽性 T 細胞の phenotype は活性化メモリー Th1 細胞である

表 3 Tyrosinase と CMV-egH ペプチドのアミノ酸配列のホモロジー

ペプチド	アミノ酸配列	HLA-DRB1*0405 拘束性
tyrosinase ₄₅₀₋₄₆₂	SYLQDSDPDSFQD	(+)
CMV-egH ₂₉₀₋₃₀₂	SYLKDSDFLDAAL	(+)

データベース・スクリーニングの結果, cytomegalovirus envelope glycoprotein H (CMV-egH₂₉₀₋₃₀₂) と tyrosinase₄₅₀₋₄₆₂ がアンカーポジションを 4 か所を含む 6 アミノ酸で構造類似性を示した.

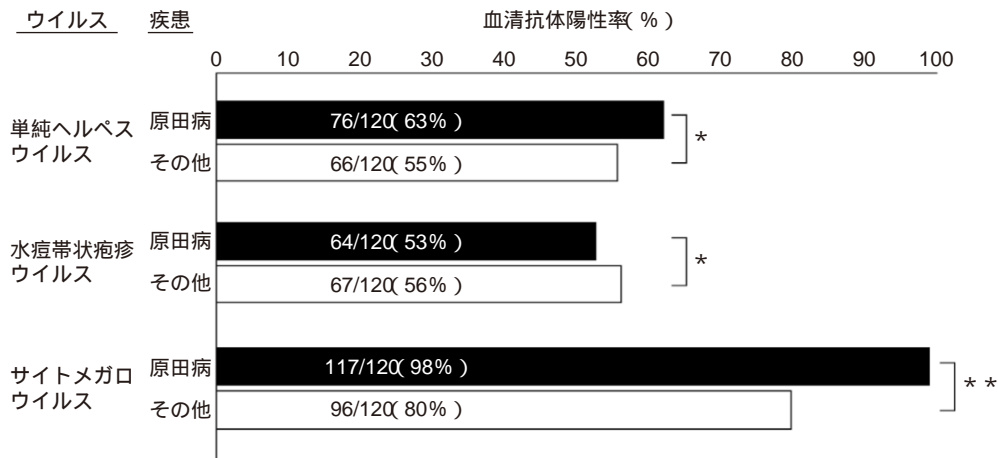


図 6 原田病患者におけるヘルペスウイルス血清抗体価測定.

活動性ぶどう膜炎を有する原田病患者 (黒棒グラフ, n=120, 平均年齢 42 歳) と原田病以外の他のぶどう膜炎患者 (白棒グラフ, n=120, 平均年齢 44 歳) のヘルペスウイルス属血清抗体価を比較検討した. 単純ヘルペスウイルス (HSV), 水痘帯状疱疹ウイルス (VZV), サイトメガロウイルス (CMV) の二群間の血清抗体陽性率を比較, 検討した (χ^2 有意差検定, *: 有意差なし, **: $p < 0.0005$).

ことが示された。

VII 自己免疫疾患と構造類似性 (molecular mimicry)

過去の報告で, Fujinami らは, B 型肝炎ウイルスポリメラーゼのアミノ酸配列 6 個が実験的自己免疫性脳炎の惹起抗原である myelin basic protein (MBP) のそれと同一であること, その合成ペプチドを動物に免疫すると, 免疫された実験動物は肝炎ウイルスと MBP の両者に対して細胞性免疫反応を示し実験的自己免疫性脳炎と同じ病変が起こることを初めて報告した¹⁵⁾. 眼科領域では, Shinohara らのグループが実験的自己免疫性ぶどう膜炎の原因抗原の一つである S 抗原の M ペプチドはパン酵母菌, 大腸菌, B 型肝炎ウイルス, マウス白血球ウイルスなどの構造蛋白質と相同性を持ち, これらの微生物構造蛋白質の合成ペプチドを免疫すると実験的自己免疫性ぶどう膜炎と同じ眼内炎が起こることを報告している¹⁶⁾. これらのことは, 自己抗原と高い相同性をもつ微生物の感染や摂取により, 宿主の免疫システムが微生物抗原により感作され, 感作リンパ球が自己抗原を認識して炎症性免疫反応を起こす可能性を提言したものであり, 自己免疫疾患の発症機構に新しい視点を与えるものとして注目され, “molecular mimicry” 説として知られる。

VIII Tyrosinase と微生物抗原との相同性

我々はメラノサイト抗原の tyrosinase や gp100 が HLA-DR 4 拘束性に CD 4 陽性 T 細胞に認識されるという今回の研究結果から, 原田病の原因抗原として可能性の高いと思われるこれらのメラノサイト抗原に対して, そのアミノ酸配列と相同性のある微生物抗原 (外来性抗原) をデータベース・スクリーニング法で検索した. その結果, サイトメガロウイルス・エンベロープの糖蛋白質 H (CMV-egH₂₉₀₋₃₀₂) が tyrosinase ペプチド (tyrosinase₄₅₀₋₄₆₂) と高い相同性を有していた. 興味深いことに, この CMV-egH は HLA-DRB 1*0405 拘束性のペプチドであった (表 3). このように HLA-DR 4 拘束性 tyrosinase ペプチドが CMV-egH と構造類似性 “molecular mimicry” を示す可能性が示唆された. 過去の報告で, Baglivo らは原田病患者の尿から CMV 抗原 (early CMV antigen) を, さらにぶどう膜炎を起こしていた同患者の前房水から CMV 特異抗体 (Q 値, 4.47) を証明した¹⁷⁾. この典型的な原田病患者から CMV 抗原や抗体が同定されていたことから, 我々は次に原田病患者の CMV 感染について検討した.

IX CMV 感染の可能性

まず, 原田病ぶどう膜炎患者より前房水, 血清, 髄液をインフォームド・コンセントのもと採取した. これら

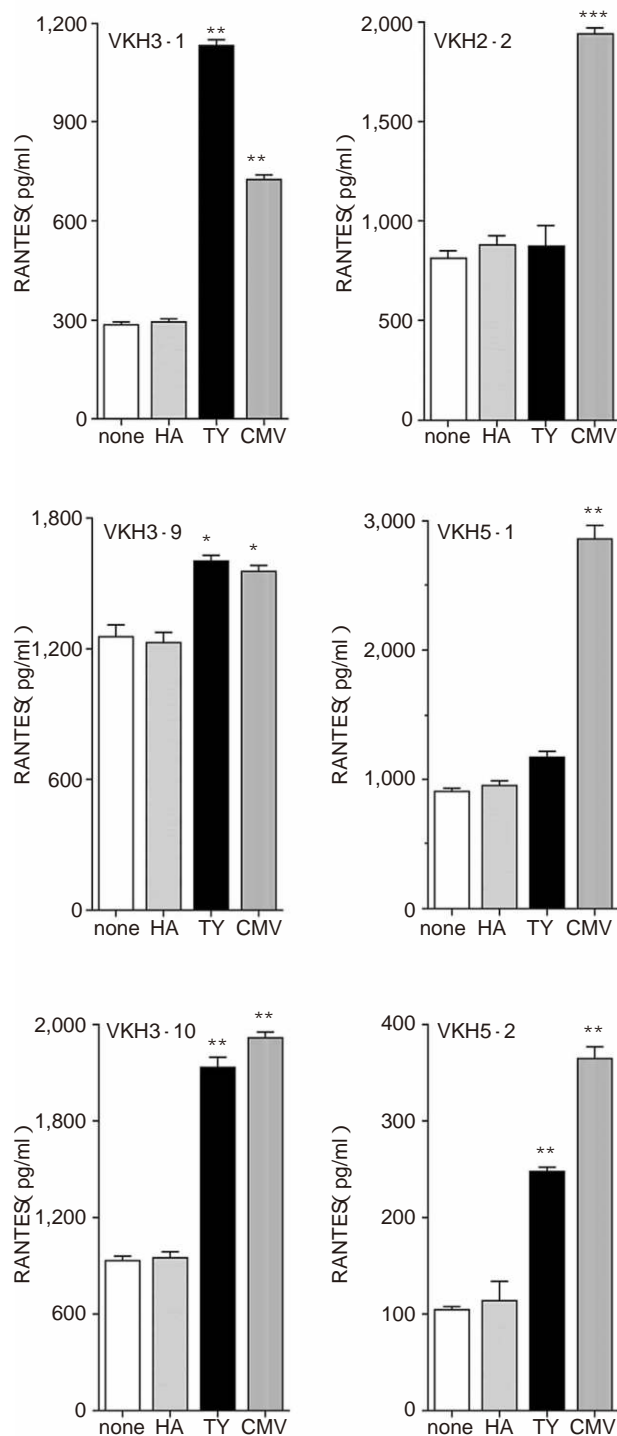


図 7 原田病 T 細胞のメラノサイト抗原とサイトメガロウイルス抗原認識.

3 名の患者由来の 6 つの眼局所由来 CD 4 陽性 T 細胞 (VKH 3-1, VKH 3-9, VKH 3-10, VKH 2-2, VKH 5-1, VKH 5-2) が HLA-DR 4 拘束性に tyrosinase メラノサイト抗原と同時にその tyrosinase 抗原と構造類似性のあるサイトメガロウイルス抗原 CMV-egH も認識するかどうかを RANTES 産生能にて検討した. tyrosinase ペプチド (TY), CMV ペプチド (CMV), 対照ペプチド (HA) を 50 μ M ずつ使用した. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.005$, ***: $p < 0.0005$ (t 検定).

(文献 8 より許可を得て転載)

表 4 Tyrosinase または CMV-egH ペプチドで誘導した原田病患者抗原特異的 T 細胞株の交叉反応試験

抗原特異的 T 細胞株	細胞増殖試験：Thymidine-uptake (cpm)			
	peptide (-)	HA ₃₀₇₋₃₁₉	tyrosinase ₄₅₀₋₄₆₂	CMV-egH ₂₉₀₋₃₀₂
CMV-egH 感作 TCL (PBMC 由来)	1,214	2,063 (SI=1.7)	8,255 (SI=6.8)	10,562 (SI=8.7)
tyrosinase 感作 TCL (PBMC 由来)	566	962 (SI=1.7)	5,320 (SI=9.4)	2,207 (SI=3.9)
CMV-egH 感作 TCL (前房水由来)	441	529 (SI=1.2)	1,014 (SI=2.3)	1,676 (SI=3.8)
tyrosinase 感作 TCL (前房水由来)	417	417 (SI=1.0)	1,751 (SI=4.2)	1,710 (SI=4.1)

事前に抗原ペプチドで数回刺激・誘導した4種類の抗原特異的 T 細胞株を使用した。

SI: stimulation index, リンパ球増殖能を示す。

の検体を用いて CMV-DNA が同定されるかを定量 PCR 法にて検討した。定量リアルタイム PCR の結果はいずれの検体 (n=35) も測定限界以下で、CMV-DNA は局所を含めて患者検体からは証明できなかった⁹⁾。次に、CMV 感染の既往があるかどうかを抗体価にて測定した (図 6)。原田病以外の他のぶどう膜炎患者 (n=120) と比較して、原田病患者 (n=120) は有意に CMV 血清抗体価が陽性を示していた (98% 陽性, $p < 0.0005$)。他のヘルペスウイルスの単純ヘルペスウイルス, 水痘帯状疱疹ウイルスに関してはその 2 群間に有意な差は認めなかった (図 6)。これらの結果より、原田病では炎症の病態そのものに CMV 感染は関与していないが、発症の契機 (trigger) に CMV 感染が関与している可能性が示唆された。日本人の成人の約 80% が CMV 既感染であるとされ、原田病は基本的に成人以降に発症し、原田病に小児が少ないのは CMV 感染がこの疾患の発症の trigger であることを示すものである。

X 原田病 CD 4 陽性 T 細胞の CMV-egH 抗原認識

原田病由来の CD 4 陽性 T 細胞が HLA-DR 4 拘束性に tyrosinase メラノサイト自己抗原を認識することを示したが、同じ T 細胞がその tyrosinase 抗原と構造類似性のある CMV-egH も認識するかどうかを検討した。眼局所から樹立した T 細胞クローンの一部は、tyrosinase ペプチドと CMV-egH ペプチド両方に HLA-DR 4 拘束性に反応し、サイトカインを産生していた (図 7)。対照の別の HLA-DR 4 陽性ぶどう膜炎由来の T 細胞ではこのような反応はみられなかった⁸⁾。次に、原田病患者 PBMC を両ペプチドでそれぞれ事前に刺激・培養し、抗原特異的 T 細胞株を樹立した。その方法は、リコンビナント IL-2 や X 線照射した feeder 細胞存在下で tyrosinase ペプチド, CMV-egH ペプチド, あるいは HA 対照ペプチドで数回刺激し、抗原ペプチド特異的な T 細胞株を *in vitro* で誘導した。tyrosinase 抗原で誘導した tyrosinase 抗原特異的 T 細胞株は tyrosinase ペプチドだけでなく、CMV-egH ペプチドも HLA-DR 4 拘束性

に反応し、細胞増殖活性を示していた (表 4)。同様に、CMV 抗原で誘導した CMV 抗原特異的 T 細胞株は CMV-egH ペプチドだけでなく、tyrosinase ペプチドも HLA-DR 4 拘束性に認識していた (表 4)。眼内浸潤細胞から樹立した抗原特異的 T 細胞でも同様の結果が得られた (表 4)。このように原田病患者由来の CMV-egH 感作リンパ球は CMV-egH に対しては無論のこと tyrosinase ペプチドに対してもリンパ球増殖反応を起こすこと、同様に tyrosinase 感作リンパ球は tyrosinase に対しても CMV-egH に対しても増殖反応を起こすことを示した。これらの知見は、サイトメガロウイルスの抗原蛋白質が tyrosinase ペプチドと構造類似性を有して免疫学的交叉反応 (cross-reaction) を起こすことを示すものであり、この molecular mimicry が原田病の発症機構に深くかかわっていることを示唆するものである。

XI おわりに

以上の結果より、原田病の発症機構についてまとめた模式図を図 8 に示した。全身のある細胞/組織に潜伏している CMV が何かを契機に血液中に遊離され、抗原提示細胞に取り込まれ提示される。HLA-DR 4 陽性の人には CMV-egH が抗原提示細胞上の DR 4 上に提示され、CD 4 陽性 T 細胞が認識する。通常自己抗原を認識する T 細胞は胸腺で除去されるのだが、CMV は外来性抗原なので生き残り CMV 抗原を認識するメモリー T 細胞となる。CMV 抗原とメラノサイト自己抗原 (tyrosinase) とに構造類似性があるため、そのメモリー T 細胞はメラノサイト上に DR 4 拘束性に提示されている自己抗原を誤認してしまう。これが発症の trigger となると推測される。しかし、CMV という成人の大半が感染し以後は潜伏感染しているごくありふれたウイルスが、どのような仕組みで特定の患者における発症に関与するのか、などまだ解明すべき課題は多い。実際、日本人の約 4 割が HLA-DR 4 陽性ともいわれており、この多くの DR 4 陽性者でも原田病の発症は通常みられないし、CMV 感染も既に受けているものと思われる。

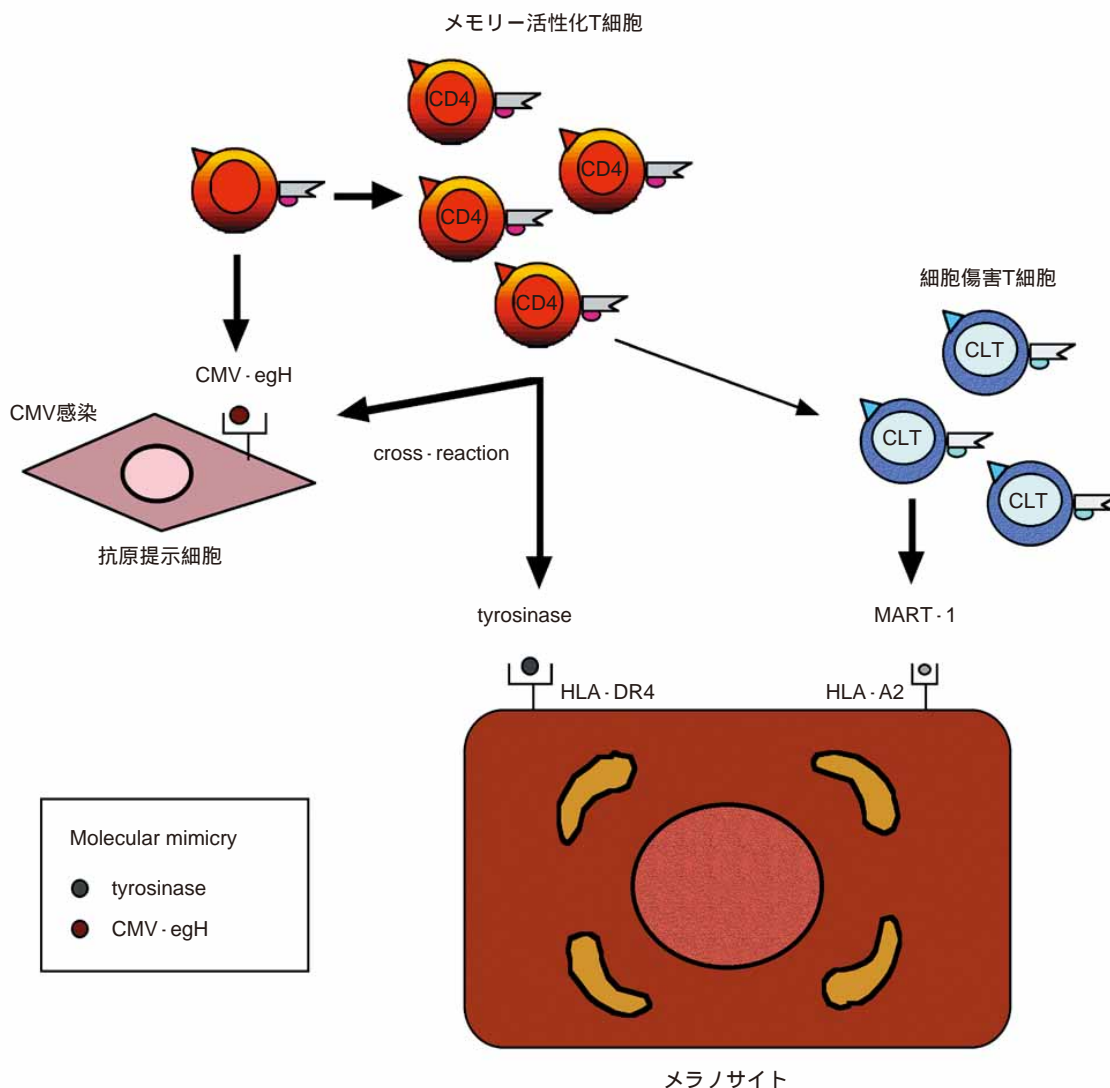


図 8 原田病 T 細胞の眼内メラノサイトに対する作用機序の推測模式図。

細胞/組織に潜伏している CMV(おそらく線維芽細胞や血管内皮細胞などに潜伏)が何かを契機に血液中に遊離され、抗原提示細胞に取り込まれ提示される。HLA-DR4 陽性の人には CMV-egH が抗原提示細胞上の DR 4 上に提示され、CD 4 陽性 T 細胞が認識する。その後、全身で増殖し CMV 抗原を認識するメモリー T 細胞が全身を循環する。CMV 抗原と tyrosinase は構造類似性(molecular mimicry)があるため、そのメモリー T 細胞はメラノサイト上に DR 4 拘束性に提示されている自己抗原を誤認、つまり交叉反応(cross-reaction)を示す。CD 4 陽性 T 細胞は炎症性サイトカイン/ケモカインなどを分泌し、細胞傷害性 T 細胞(CTL)を局所に遊走させ HLA-class I 上に提示されているメラノサイト抗原(例えば MART-1 など)を認識し、直接メラノサイトを破壊する。原田病の場合、メラノサイトが存在する場所(眼、内耳、皮膚、髄膜)のすべてで炎症が起こるメラノサイトに対する自己免疫疾患である。

稿を終えるにあたり、研究をご指導いただきました東京医科歯科大学眼科学教室の望月 學教授および研究をお手伝いいただきました高瀬 博先生をはじめとする教室の先生方に深く感謝いたします。また、共同研究にご協力いただきました久留米大学眼科の田口千香子先生、久留米大学臨床検査部の佐川公矯教授および久留米大学免疫学教室の伊東恭吾教授に心より御礼申し上げます。

文 献

1) Lubin J, Ni C, Albert D : Clinicopathological study

of the Vogt-Koyanagi-Harada syndrome. Int Ophthalmol Clin 22 : 141—156, 1988.

2) Read RW, Holland GN, Rao NA, Tabbara KF, Ohno S, Arellanes-Garcia L, et al : Revised diagnostic criteria for Vogt-Koyanagi-Harada disease : report of an international committee on nomenclature. Am J Ophthalmol 131 : 647—652, 2001.

3) Kawakami Y, Eliyahu S, Sakaguchi K, Robbins PF, Rivoltini L, Yannelli JR, et al : Identification of the immunodominant peptides of the MART-1

- human melanoma antigen recognized by the majority of HLA-A 2-restricted tumor infiltrating lymphocytes. *J Exp Med* 180 : 347—352, 1994.
- 4) **Wolfel T, Van Pel A, Brichard V, Schneidr J, Seliger B, zum Muschenfelde K, et al** : Two tyrosinase nonapeptides recognized on HLA-A 2 melanomas by autologous cytolytic T lymphocytes. *Eur J Immunol* 24 : 759—764, 1994.
 - 5) **Kawakami Y, Eliyahu S, Jennings C, Sakaguchi K, Kang X, Southwood S, et al** : Recognition of multiple epitopes in the human melanoma antigen gp100 by tumor-infiltrating T lymphocytes associated with *in vivo* tumor regression. *J Immunol* 154 : 3961—3968, 1995.
 - 6) **Shindo Y, Inoko H, Yamamoto T, Ohno S** : HLA-DRB 1 typing of Vogt-Koyanagi-Harada's disease by PCR-RFLP and the strong association with DRB 1*0405 and DRB 1*0410. *Br J Ophthalmol* 78 : 223—226, 1994.
 - 7) **Sugita S, Sagawa K, Mochizuki M, Shichijo S, Itoh K** : Melanocyte lysis by cytotoxic T lymphocytes recognizing the MART-1 melanoma antigen in HLA-A 2 patients with Vogt-Koyanagi-Harada disease. *Inter Immunol* 8 : 799—803, 1996.
 - 8) **Sugita S, Takase H, Taguchi C, Imai Y, Kamoi K, Kawaguchi T, et al** : Ocular infiltrating CD 4⁺ T cells from patients with Vogt-Koyanagi-Harada disease recognize human melanocyte antigens. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47 : 2547—2554, 2006.
 - 9) **Sugita S, Takase H, Kawaguchi T, Taguchi C, Mochizuki M** : Cross-reaction between tyrosinase peptides and cytomegalovirus antigen by T cells from patients with Vogt-Koyanagi-Harada disease. *Inter Ophthalmol* 27 : 87—95, 2007.
 - 10) **Maewaza N, Yano A, Taniguchi M, Kojima S** : The role of cytotoxic T lymphocytes in the pathogenesis of Vogt-Koyanagi-Harada disease. *Ophthalmologica* 185 : 179—186, 1982.
 - 11) **Yamaki K, Gocho K, Hayakawa K, Kondo I, Sakuragi S** : Tyrosinase family proteins are antigens specific to Vogt-Koyanagi-Harada disease. *J Immunol* 165 : 7323—7329, 2000.
 - 12) **Kawakami Y, Rosenberg SA** : Immunobiology of human melanoma antigens MART-1 and gp100 and their use for immuno-gene therapy. *Int Rev Immunol* 14 : 173—192, 1997.
 - 13) **Topalian SL, Gonzales MI, Parkhurst M, Li YF, Southwood S, Sette A, et al** : Melanoma-specific CD 4⁺ T cells recognize nonmutated HLA-DR-restricted tyrosinase epitopes. *J Exp Med* 183 : 1965—1971, 1996.
 - 14) **Touloukian CE, Leitner WW, Topalian SL, Li YF, Robbins PF, Rosenberg SA, et al** : Identification of a MHC class II-restricted human gp100 epitope using DR-4 IE transgenic mice. *J Immunol* 164 : 3535—3542, 2000.
 - 15) **Fujinami RS, Oldstone MBA** : Amino acid homology and immune response between the encephalitogenic site of myelin basic protein and virus : a mechanism for autoimmunity. *Science* 230 : 1043—1045, 1985.
 - 16) **Shinohara T, Singh VK, Yamaki K, Abe T, Tsuda M, Suzuki S** : S-antigen : molecular mimicry may play a role in autoimmune uveitis. *Prog Clin Biol Res* 362 : 163—190, 1991.
 - 17) **Baglivo E, Rossillion B, De Gottrau P** : Detection of anticytomegalovirus antibody synthesis in the anterior chamber in Vogt-Koyanagi-Harada syndrome. *Br J Ophthalmol* 82 : 1216—1217, 1998.
-