

ぶどう膜炎を惹起する光受容体間レチノイド結合蛋白 (IRBP) 由来ペプチドの免疫反応の解析

讃井 浩喜*, Igal Gery**

*九州大学医学部眼科学教室, **米国国立眼研究所

要 約

光受容体間レチノイド結合蛋白 (IRBP) のぶどう膜炎惹起部位の解析から IRBP 由来の人工合成ペプチドである R4 と R14 はぶどう膜炎を惹起する。さらに R4 は弱い炎症を R14 は網膜剥離を伴う強い炎症を起こすことが知られている。今回はこの R4 と R14 の二つのペプチドを用い、ぶどう膜炎惹起能、免疫反応および感作細胞によるぶどう膜炎の移入の三点について R4 と R14 を比較検討した。その結果、R14 は R4 に比べて約1,000 倍ぶどう膜炎惹起能が高かった。またリンパ球若幼化反応および感作細胞によるぶどう膜炎の移入において、R14 と IRBP の間には抗原交叉があったが、R4 との間にはなかった。抗体産生においては、R4、R14 とともに IRBP との間に抗原交叉はなかった。これらの結果から、R14 は IRBP における免疫優位部位であるといえる。IRBP を免疫した時に見られるぶどう膜炎や免疫反応において、炎症反応の主体となるのは、IRBP 分子全体の中で R14 に相当する部位であると考えられる。(日眼会誌 95: 147-151, 1991)

キーワード: 免疫反応, 免疫優位部位, ペプチド, ぶどう膜炎, 光受容体間レチノイド結合蛋白

Analysis of Immune Responses of Uveitogenic Synthetic Peptides Derived From IRBP

Hiroki Sanui*, Igal Gery**

*Department of Ophthalmology, Faculty of Medicine, Kyushu University

**National Eye Institute, NIH

Abstract

We reported that R4 and R14 are uveitogenic synthetic peptides derived from bovine IRBP (interphotoreceptor retinoid-binding protein) in rats. R4 induced mild uveitis, while R14 induced severe uveitis with retinal detachment. In this experiment, a comparison of uveitogenicity, immune responses and capacity of uveitis transfer was made between R4 and R14. R14 was found to be approximately 1,000 times more uveitogenic than R4. R14 showed cross-reactivity with IRBP, original antigen, but R4 did not in lymphocytic proliferation assay and adoptive transfer experiment. Neither R4 nor R14 exhibited cross-reactivity with IRBP in antibody production in sera. Therefore, R14 is found to be an immunodominant site in the whole sequence of IRBP. It is conceivable that R14 plays an important role in uveitis induction and immune responses in rat immunized with IRBP. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 95: 147-151, 1991)

Key words: Immune response, Immunodominance, Peptide, Uveitis, IRBP

別刷請求先: 812 福岡市東区馬出3-1-1 九州大学医学部眼科学教室 讃井 浩喜

(平成2年4月25日受付, 平成2年7月9日改訂受理)

Reprint requests to: Hiroki Sanui, M.D. Department of Ophthalmology, Faculty of Medicine, Kyushu University.

3-1-1 Maidashi Higashi-ku, Fukuoka 812, Japan

(Received April 25, 1990 and accepted in revised form July 9, 1990)

I 緒 言

光受容体間レチノイド結合蛋白 (Interphotoreceptor retinoid-binding protein, IRBP) は、眼と松果体に存在し、光受容体間の主な構成成分である。眼では IRBP は視細胞外節と網膜色素上皮の間でレチノイドの移動に関係していると考えられている¹⁾。IRBP を完全フロイントアジュバントに混ぜて、免疫すると、ラット²⁾、マウス³⁾、ウサギ⁴⁾およびサル⁵⁾において眼に直接触れずに網膜ぶどう膜炎が惹起される。さきに我々は、IRBP のどの部位がぶどう膜炎を惹起するかを検討した。ウシの IRBP の全アミノ酸配列が決定されているので⁶⁾、それをもとにして、人工的に14個のペプチドを作成し、R1からR14と名付けた。それらをラットに免疫したところ、R4, R9, R13およびR14がぶどう膜炎を惹起することを見出した⁷⁾。R4, R9およびR13によって惹起されたぶどう膜炎は弱く、R14によるそれは網膜剥離を伴う強い炎症であった。

今回我々は、ともに23個のアミノ酸よりなるR14とR4を取り上げ、この二つのペプチドにより惹起されたぶどう膜炎の組織学的所見の違いが、二つのペプチド間のいかなる違いによるかを検討した。さらにペプチドとIRBPの免疫反応における関係を調べ、それぞれのペプチドがIRBP全体の中でいかなる役割を果たしているかを考察した。

II 実験方法

動物

8ないし12週齢の雄の純系ルイスラットを用いた。

抗原

IRBP は牛の網膜より精製した⁸⁾。R4のR14の二つのペプチドは、Applied Biosystems 社 (Foster City, CA) にて合成した。それらのペプチドのアミノ酸配列は表1に示す通りである。

免疫

R4, R14あるいはIRBP をリン酸緩衝液(phosphate buffered saline, PBS) に溶かし、等量の完全フロイントアジュバントに混ぜ、懸濁液を作り、ラットの右足蹠に0.1ml 接種した。免疫は、種々の濃度で行った。抗原接種時に百日咳死菌 (10^{11} /ml) を0.1ml 静注した。免疫後毎日細隙燈顕微鏡にて眼を観察した。

組織学的検索

免疫後種々の時期に眼球を摘出し、グルタルアルデヒドで固定し、グリコールメタクリレートに包埋し、

表1 R4とR14のアミノ酸配列

R4	HVDDTDLYLTIPARSVGAADGS
R14	PTARSVGAADGSSWEGVGVPVD

アルファベットはそれぞれ以下のアミノ酸を表す。

A: アラニン, D: アスパラギン酸, E: グルタミン酸,
G: グリシン, H: ヒスチジン, I: イソロイシン,
L: ロイシン, P: プロリン, R: アルギニン,
S: セリン, T: スレオニン, V: バリン,
W: トリプトファン, Y: チロジン

ヘマトキシリン・エオジンで染色して観察した。

リンパ球幼若化反応

ラットに免疫後2～3週間目に所属リンパ節(膝窩および鼠径リンパ節)を取り、リンパ節をつぶして細胞浮遊液を得た。3×10⁶の細胞にR4, R14あるいはIRBPを10ないし1μg/mlの濃度で入れ4日間培養した。細胞回収16時間前に³H-thymidineを入れ、細胞回収後³H-thymidineの取り込みを測定した。結果はStimulation indexつまり抗原添加群と非添加群の比で表した。

血清中の抗体産生

ラットに免疫後2～3週間目に血清を取り、ELISA法で調べた。1穴当たり0.3μgの抗原をコーティングしたプレートに血清を入れ、反応させたのち、ペルオキシダーゼをラベルした抗体を反応させ、分光光度計で測定した。結果は410nmの吸光度で表した。

感作細胞によるぶどう膜炎の移入

ラットを免疫し2～3週間後に所属リンパ節を取り、R4, R14あるいはIRBPを入れ、リンパ球を3日間培養した。回収したリンパ球を正常ラットの腹腔内に50～100×10⁶個注射して、毎日眼を観察した。

III 結 果

ぶどう膜炎惹起能

R4とR14のぶどう膜炎惹起能を調べるために、種々の濃度のペプチドを免疫した。結果を表2に示す。R4のぶどう膜炎惹起最小濃度はラット一匹当たり67μgで、R14のそれは60ngであった。したがって、R14の方がR4に比べると約1,000倍ぶどう膜炎惹起能が高いことになる。またR14で惹起した時の方がぶどう膜炎発症日も早く、炎症の強さも低濃度でR4による炎症と同程度のものではあった。

ペプチドに対するリンパ球幼若化反応

R4あるいはR14で免疫したラットの所属リンパ節

表 2 種々の免疫量のペプチドによる網膜
ぶどう膜炎惹起能

免疫抗原	免疫量 ($\mu\text{g}/\text{rat}$)	網膜ぶどう膜炎		
		発症率	発症日 (平均)	炎症の強さ (平均)
R 4	200	7/7	13.2	1.5
	67	2/6	12.5	1.5
	22	0/6	—	0
R14	1.6	7/7	10.3	1.6
	0.3	7/7	11.1	1.6
	0.06	1/5	15.0	1.0
	0.012	0/5	—	0

R 4 あるいは R14 を完全フロイントアジュバントに混ぜ足
趾皮下に免疫した。同時に百日咳菌を静脈内に投与した。
R14 は、R 4 に比べ低濃度で網膜ぶどう膜炎を惹起する。

表 3 ペプチドおよび IRBP に対するリンパ球
幼若化反応

免疫抗原	刺激物質($\mu\text{g}/\text{ml}$)					
	R 4		R14		IRBP	
	10	1	10	1	10	1
R4	4.2*	3.2	0.5	0.9	1.0	1.1
R14	1.6	0.9	6.8	8.0	4.8	1.3
IRBP	1.1	0.6	11.3	6.6	5.0	7.2

*; Stimulation index.
R14 と IRBP との間に抗原交叉が見られるが、R 4 との間
には見られない。

表 4 ペプチドおよび IRBP に対する抗体産生

免疫抗原	測定抗原	血清希釈	
		1 : 10	1 : 40
R4	R4	0.32*	0.13
	IRBP	0.35	0.19
R14	R14	1.20	0.91
	IRBP	0.25	0.12
IRBP	R4	0.17	0.11
	R14	0.20	0.14
	IRBP	1.11	0.90

*; ELISA 法による 410nm における吸光度
R 4 および R14 とともに IRBP との間に抗原交叉が見
られない。

表 5 細胞移入実験による網膜ぶどう膜炎の誘導

免疫抗原	培養中抗原	網膜ぶどう膜炎		
		発症率	発症日 (平均)	炎症の強さ (平均)
R4	R4	9/9	4.3	1.3
	IRBP	0/3	—	0
R14	R14	7/9	5.1	1.5
	IRBP	6/7	4.0	1.2
IRBP	R4	0/4	—	0
	R14	5/5	4.6	1.8
	IRBP	8/8	3.9	2.0

細胞は正常ラットの腹腔内に注射した。
R14 と IRBP との間に抗原交叉が見られるが、R 4 との間
には見られない。

のリンパ球によるリンパ球幼若化反応の結果を表 3 に
示す。R4 で発作されたリンパ球は免疫抗原である R4
とは反応するが、IRBP とは反応しなかった。R14 で感
作されたリンパ球は、R14 のみならず IRBP とも反応
した。一方、IRBP で感作されたリンパ球は、IRBP だ
けでなく R14 と反応したが、R4 とは反応しなかった。
R4 および R14 を免疫した場合、それぞれのラットから
取られたリンパ球は免疫抗原に反応した。このことは
ラットにおいて R4、R14 とともに免疫原性を持っている
ことを意味する。さらに R14 は IRBP との間に抗原交
叉があったが、R4 にはなかった。

ペプチドに対する抗体産生

それぞれの抗原で免疫した血清の抗体価は、表 4 に
示す通りである。R4 で免疫したラットにより取った血
清は、R4 および IRBP に対して、低い抗体価しか見ら
れなかった。R14 で免疫したラットより取った血清は、
免疫抗原である R14 に対しては、高抗体価を示したが、

IRBP に対しては示さなかった。一方、IRBP で免疫し
たラットより取った血清は、IRBP に対して高い抗体
価を示したが、R14 および R4 に対しては、低抗体価で
あった。以上の結果から、R4 および R14 は、IRBP と
の間に抗体産生において抗原交叉を認めないことがわ
かった。

細胞によるぶどう膜炎の移入

ぶどう膜炎の移入実験の結果を表 5 にまとめた。R4
で感作し、R4 で in vitro で刺激されたリンパ球は、ぶ
どう膜炎を惹起したが、IRBP で刺激してもぶどう膜
炎は惹起できなかった。R14 で感作し、R14 あるいは
IRBP で刺激すると、いずれもぶどう膜炎を移入でき
た。一方、IRBP で感作したリンパ球は、R14 で刺激す
るとぶどう膜炎は移入できたが、R4 の刺激では移入で
きなかった。移入実験において、R14 と IRBP はリンパ
球幼若化反応に見られたように抗原交叉が見られた。
リンパ球を移入されたラットに見られたぶどう膜炎の

発症日および炎症の程度は、R4とR14の間には差はなかった。

IV 考 按

蛋白を構成するペプチド鎖の多くは、元の蛋白で免疫された動物において、免疫反応を引き起こさないが、限られた一部のペプチド鎖は反応を引き起こし、そのペプチド鎖に一致する抗原決定部位を免疫優位部位という⁹⁾。今回の実験で、R14は元の抗原であるIRBPで感作されたリンパ球に対して、免疫反応を引き起こすので、免疫優位部位にあたり、R4は非優位部位にあたる。免疫優位部位であるR14は非優位部位であるR4に比べて、約1,000倍高いぶどう膜炎惹起能があることが証明された。その理由として、R14は抗原提示細胞表面における組織適合性抗原との結合が強く、反応が効率よく起こる可能性があることが考えられる。またR14は単一ではなく複数のT細胞群を誘導することも考えられる。

ぶどう膜炎を惹起するもう一つの抗原として、S抗原が知られており、S抗原でもぶどう膜炎惹起部位が決定されている¹⁰⁾。ぶどう膜炎を惹起するS抗原由来のペプチドMおよびNはともにR14と異なり、ぶどう膜炎を惹起するのに比較的高濃度を免疫する必要がある¹⁰⁾¹¹⁾。すなわち、S抗原では免疫優位性については述べられていないが¹¹⁾、ペプチドMおよびNは、非免疫優位部位と考えられる。実験的自己免疫性脳脊髄膜炎の実験では、モルモット髄鞘塩基性蛋白由来のペプチド68~88が、免疫優位部位であることが報告されている¹²⁾。蛋白を接種し免疫反応を惹起できた場合、免疫優位部位を持つ蛋白と持たない蛋白の2種類があるのか否かについては、今後いくつかの蛋白の解析から明らかにされると思われる。

R14のぶどう膜炎惹起最低濃度は、一匹当たり約20 pmolでIRBPのそれは約2pmolであるので¹³⁾、R14はIRBPと比べると約1/10のぶどう膜炎惹起能である。一方、R4と比べると約1,000倍ぶどう膜炎惹起能が高い。その理由として、IRBP全体にR14と同様の優位なぶどう膜炎惹起部位がほかにいくつか存在することが考えられる。またぶどう膜炎惹起部位以外の部位に反応を強めるアジュバント効果を示す部位があることが考えられる。

R14は低濃度でぶどう膜炎を惹起するが、ぶどう膜炎移入実験に見られるように、いったんR14あるいはR4で感作されたリンパ球のぶどう膜炎惹起能の間に

差は見られない。このことからR14とR4の差は、免疫反応の導入期(Induction phase)にあることがわかる。

免疫反応ではリンパ球幼若化反応においてR14とIRBPには抗原交叉が見られたが、抗体産生においては、交叉が見られなかった。このことは、リンパ球幼若化反応と抗体産生に関するIRBPにおける抗原決定部位が異なることを意味する。細胞移入の実験からぶどう膜炎発症には、細胞性免疫が主体をなしていることが知られている¹⁴⁾。R14はIRBPとリンパ球幼若化反応において抗原交叉を示すことから、R14はIRBPが惹起するような強い炎症を引き起こすと考えられる。

R14により惹起されたぶどう膜炎は、IRBPによるそれに似ており、またR14はIRBPと抗原交叉が見られるので、IRBPにより惹起されたぶどう膜炎および免疫反応において、R14に相当する部位は重要な働きをしていることが考えられる。一方、R4に相当する部位は、そのみでもぶどう膜炎を惹起できるが、IRBPとの間に抗原交叉がない。したがって、IRBPで惹起された炎症の際には、R4に相当する部位は、炎症に関与していないと考えられる。しかし、軽い炎症の際には、R4が働いている可能性も考えられる。

猪俣 孟教授のご校閲に深謝致します。

References

- 1) Chader GJ: Interphotoreceptor retinoid-binding protein (IRBP): A model protein for molecular biological and clinically relevant studies. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 30: 7-22, 1989.
- 2) Gery I, Wiggert B, Redmond TM, et al: Uveoretinitis and pinealitis induced by immunization with interphotoreceptor retinoid-binding protein. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 27: 1296-1300, 1986.
- 3) Caspi RR, Roberge FG, Chan CC, et al: A new model of autoimmune disease: Experimental autoimmune uveoretinitis induced in mice with two different retinal antigens. *J Immunol* 140: 1490-1495, 1988.
- 4) Eisenfeld AJ, Bunt-Milam AH, Saari JC: Uveoretinitis in rabbits following immunization with interphotoreceptor retinoid-binding protein. *Exp Eye Res* 44: 425-438, 1987.
- 5) Hirose S, Kuwabara T, Nussenblatt RB, et al: Uveitis induced in primates by interphotoreceptor retinoid-binding protein. *Arch Ophthalmol* 104: 1698-1702, 1986.

- 6) **Borst DE, Redmond TM, Elser JE, et al:** Interphotoreceptor retinoid-binding protein (IRBP): Gene characterization, protein repeat structure and its evolution. *J Biol Chem* 264: 1115—1123, 1989.
 - 7) **Sanui H, Redmond TM, Hu LH, et al:** Synthetic peptides derived from IRBP induce EAU and EAP in Lewis rats. *Curr Eye Res* 7: 727—735, 1988.
 - 8) **Redmond TM, Wiggert B, Robey FA, et al:** Isolation and characterization of monkey interphotoreceptor retinoid-binding protein, a unique extracellular matrix component of the retina. *Biochemistry* 24: 787—793, 1985.
 - 9) **Berzofsky JA:** Immunodominance in T lymphocyte recognition. *Immunol Lett* 18: 83—95, 1988.
 - 10) **Donoso LA, Merryman CF, Shinohara T, et al:** S-antigen. Experimental autoimmune uveitis following immunization with a small synthetic peptide. *Arch Ophthalmol* 105: 838—840, 1987.
 - 11) **Singh VK, Nussenblatt RB, Donoso LA, et al:** Identification of a uveitopathogenic and lymphocyte proliferation site in bovine S-antigen. *Cell Immunol* 115: 413—419, 1988.
 - 12) **Vandenbark AA, Offner H, Reshef T, et al:** Specificity of T-lymphocyte lines for peptides of myelin basic protein. *J Immunol* 135: 229—233, 1985.
 - 13) **Fox GM, Kuwabara T, Wiggert B, et al:** Experimental autoimmune uveoretinitis (EAU) induced by retinal interphotoreceptor retinoid-binding protein (IRBP): Differences between EAU induced by IRBP and by S-antigen. *Clin Immunol Immunopathol* 43: 256—264, 1987.
 - 14) **Mochizuki M, Kuwabara T, McAllister C, et al:** Adoptive transfer of experimental autoimmune uveoretinitis in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 26: 1—9, 1985.
-