

# 視細胞間レチノイド結合蛋白に由来するぶどう膜炎 惹起ペプチドの免疫学的解析

小竹 聡<sup>1)</sup>, 讚井 浩喜<sup>2)</sup>, Igal Gery<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup>北海道大学医学部眼科学教室, <sup>2)</sup>九州大学医学部眼科学教室, <sup>3)</sup>米国国立眼研究所

## 要 約

視細胞間レチノイド結合蛋白 (IRBP) 由来のペプチド R 14 (牛 IRBP アミノ酸配列番号 1169~1191) はルイスラットにぶどう膜炎惹起能がきわめて強く, 免疫原性も強いことが知られている. この R 14 の短縮ペプチドである 1184~1191 (8 mer), 1183~1191 (9 mer), 1182~1191 (10 mer), 1181~1191 (11 mer) の免疫学的性質を検討した. その結果, 8 mer と 9 mer の間および 10 mer と 11 mer の間には免疫学的交差反応性が認められたが, 8 mer, 9 mer と 10 mer, 11 mer の間には交差反応性が認められなかった. 10 mer, 11 mer は IRBP とも交差反応性を持つ主要決定基と考えられ, ぶどう膜炎惹起能を持っていた. さらに, 1182 位のトリプトファンの置換ペプチドの免疫学的検討では, フェニルアラニンへの置換ペプチドのみが病原性, 免疫原性を保っていた. 以上より, R 14 は 2 つのまったく異なる抗原決定基を内在するユニークなペプチドで, 1182 位が抗原性, 病原性を決める重要部位であることが明らかになった. (日眼会誌 96: 600-605, 1992)

キーワード: 免疫反応, 抗原決定基, ペプチド, 視細胞間レチノイド結合蛋白, 実験的自己免疫性網膜ぶどう膜炎

## Unique Immunological Properties of Short Forms of the Interphotoreceptor Retinoid-Binding Protein Derived Uveitogenic Peptide

Satoshi Kotake<sup>1)</sup>, Hiroki Sanui<sup>2)</sup> and Igal Gery<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup>Department of Ophthalmology, Hokkaido University School of Medicine

<sup>2)</sup>Department of Ophthalmology, Faculty of Medicine, Kyushu University

<sup>3)</sup>National Eye Institute, NIH

## Abstract

Interphotoreceptor retinoid-binding protein (IRBP) induces experimental autoimmune uveoretinitis in a variety of animals. We have previously shown that sequence 1169~1191 of bovine IRBP has strong uveitogenicity and immunogenicity in Lewis rats. In this study, two completely distinct antigenic sites were detected within a short form of this peptide. One site is localized in sequence 1182~1191. The second site localizes within sequence 1183~1191 and becomes detectable only when tryptophan at 1182 is deleted. Lymphocytes sensitized against the first determinant recognized a longer peptide as well as whole IRBP. Lymphocytes sensitized against the second determinant

別刷請求先: 060 札幌市北区北15条西7丁目 北海道大学医学部眼科学教室 小竹 聡

(平成3年9月20日受付, 平成3年11月1日改訂受理)

Reprint requests to: Satoshi Kotake, M.D. Department of Ophthalmology, Hokkaido University School of Medicine, Kita 15, Nishi 7, Kita-ku, Sapporo 060, Japan

(Received September 20, 1991 and accepted in revised form November 1, 1991)

recognized only two peptides 1184~1191 and 1183~1191. No cross reactivity was detected between these two determinants. Amino acid substitution of tryptophan with alanine or glutamic acid at 1182 in peptide 1182~1191 caused complete loss of uveitogenicity and immunogenicity, while substitution with phenylalanine did not change any immunological activities of the original peptide. The unique immunological properties of IRBP-derived peptides were discussed. (*Acta Soc Ophthalmol Jpn* 96 : 600-605, 1992)

**Key words :** Immunological response, Antigenic determinant, Peptide, Interphotoreceptor retinoid-binding protein, Experimental autoimmune uveoretinitis

## I 緒 言

視細胞間レチノイド結合蛋白 (interphotoreceptor retinoid-binding protein, IRBP) は網膜および松果体に特異的に存在する分子量約 14 万の糖蛋白であり、各種動物に免疫することにより、実験的自己免疫性網膜ぶどう膜炎 (experimental autoimmune uveoretinitis, EAU) を引き起こすことが知られている<sup>1)~3)</sup>。IRBP で起こる EAU は抗原特異的リンパ球により誘導される<sup>4)</sup>。すなわち抗原提示細胞 (antigen presenting cells, APC) により処理され、主要組織適合抗原系 (major histocompatibility complex, MHC) のクラス II 分子に結合した形の IRBP の部分的ペプチドを認識するヘルパー T リンパ球が病気を引き起こしていると考えられる。一般に、T リンパ球のペプチドへの反応はきわめて抗原特異性が高く、ペプチドのたとえ 1 個のアミノ酸の切断、追加、置換でもしばしば反応性が大きく変わる<sup>5)~7)</sup>。我々は、牛 IRBP 由来の合成ペプチドを用いて、ラットおよび猿に EAU を引き起こすことができることを報告した<sup>8)~12)</sup>。特に牛 IRBP のアミノ酸配列番号 1169~1191 (R 14) はリスラットに対してきわめてぶどう膜炎惹起能にとみ、免疫原性も強いペプチドであることがわかっている<sup>8)9)</sup>。しかも R 14 の 23 個のアミノ酸のうち 1182~1190 の 9 個のアミノ酸からなるペプチドが最短の病原ペプチドであることまで研究されている<sup>13)</sup>。今回は病原ペプチド R 14 の N 端短縮ペプチドを用いて免疫学的性質を検討し、この短縮ペプチドが T リンパ球に認識されるうえで、きわめてユニークな性質を持っていることが明らかになったのでここに報告する。

## II 実験方法

### 1. 抗原

IRBP は牛の網膜より分離抽出した。IRBP 由来ペプチドは Borst ら<sup>14)</sup>の牛 IRBP のアミノ酸配列の報告に基づき、Applied Biosystems 社 (Foster City, CA) にて合成したものをを用いた。本研究で使用された合成ペプチドのアミノ酸配列は表 1 に示す通りである。以下、ペプチド 1184~1191, 1183~1191, 1182~1191, 1181~1191 をそれぞれ 8 mer, 9 mer, 10 mer, 11 mer と呼び、10 mer の 1182 位置換ペプチドを 1182 位のアミノ酸をもとに (F) 10 mer, (A) 10 mer, (E) 10 mer と呼ぶ。

### 2. 動物

生後 8~12 週の雄の純系リスラットを用いた。

### 3. 免疫方法

各合成ペプチドあるいは 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、ラットの左後足足跡に 0.1 ml (抗原量はペプチドは 100 nmol, IRBP は 10  $\mu$ g) を皮下注射した。

### 4. 病変の評価

ぶどう膜炎の発症は動物を毎日観察し評価した。さらに免疫後 21 日目には動物より眼球を摘出し、組織学的にも検討した。病変の強さはその程度に応じて、0 から 4 までの数字で示した<sup>1)</sup>。

### 5. リンパ球増殖反応

ラットを免疫後 12 日目に所属リンパ節 (膝窩および単径リンパ節) を採取し、リンパ球を分離した。3  $\times$  10<sup>5</sup> の細胞に刺激抗原として IRBP あるいは合成ペプチドを加え、4 日間培養した。細胞回収 16 時間前に <sup>3</sup>H-thymidine を培養液に加え、細胞への取込を測定した。結果は stimulation index (S.I.)、すなわち抗原添加群と非添加群の比で示した。

## 6. 抗体によるリンパ球増殖反応の抑制

リンパ球増殖反応の測定の際、抗ラット MHC モノクローナル抗体 (Accurate Chemical and Scientific Corp. Westbury, NY) を加えて培養し、抗体を加えたことによる抑制を検討した。使用したモノクローナル抗体は OX 3 (抗ラット MHC クラス II 抗体), OX 6 (抗ラット I-A 抗体), OX 17 (抗ラット I-E 抗体) である。

## III 結 果

### 1. R 14 の短縮ペプチドの病原性

今回用いた R 14 の短縮ペプチド 8, 9, 10, 11 mer のぶどう膜炎惹起能は表 2 に示すごとくである。10 mer および 11 mer には EAU 惹起能があり、病原性が認められるのに対し、8 mer および 9 mer には病原性は認められなかった。すなわち 1182 位のトリプトファンが存在がペプチドの病原性を保つのに重要であることが確認された。

表 1 本研究で用いられたペプチドのアミノ酸配列

本報での呼び名	アミノ酸配列	IRBP 内の位置
8 mer	G V G V V P D V	1184—1191
9 mer	E G V G V V P D V	1183—1191
10 mer	W E G V G V V P D V	1182—1191
11 mer	S W E G V G V V P D V	1181—1191
	W E G V G V V P D	1182—1190
	W E G V G V V P	1182—1189
	E G V G V V P D	1183—1190
	G V G V V P D	1184—1190
(F)10 mer	F E G V G V V P D V	
(A)10 mer	A E G V G V V P D V	
(E)10 mer	E E G V G V V P D V	

アルファベットはそれぞれ以下のアミノ酸を示す。

A: アラニン, D: アスパラギン酸, E: グルタミン酸,

F: フェニルアラニン, G: グリシン, P: プロリン,

S: セリン, V: バリン, W: トリプトファン

表 2 8, 9, 10, 11 mer の EAU 惹起能

ペプチド*	EAU		
	発症率	発症日 (平均)	炎症の強さ (平均)
8 mer	0/4	—	—
9 mer	0/4	—	—
10 mer	4/4	11.0	1.0
11 mer	4/4	9.5	1.5

\*ラット 1 匹あたり 100 nmol のペプチドを完全フロイントアジュバントとともに免疫した。

### 2. R 14 の短縮ペプチドの免疫原性

次に R 14 の短縮ペプチドの免疫原性を検討した。8, 9, 10, 11 mer のすべてに免疫原性が認められた。また、ここには示さないが、1185~1191 の 7 mer には免疫原性は認められなかった。8, 9, 10, 11 mer (表 1) で免疫されたラットから得たリンパ節細胞のそれぞれのペプチドあるいは IRBP に対する *in vitro* での反応を表 3 に示す。10 あるいは 11 mer に感作されたリンパ球はこの 2 つのペプチド、さらに IRBP にもよく反応する。しかし、9 mer より短いペプチドには反応しなかった。逆に、8 あるいは 9 mer に感作されたリンパ球はこれらペプチドにのみ反応し、これより長いペプチドや IRBP には反応しなかった。すなわち、2 つの

表 3 IRBP あるいはペプチドで免疫されたラットのリンパ球増殖反応

免疫抗原	刺激抗原*				
	8 mer	9 mer	10 mer	11 mer	IRBP
8 mer	9.9**	4.4	1.1	1.2	1.0
9 mer	8.4	3.6	1.4	1.3	0.9
10 mer	1.2	0.9	6.3	10.8	5.4
11 mer	1.2	0.9	5.3	7.2	4.3
IRBP	1.0	1.0	3.3	5.3	11.2

\*刺激抗原の *in vitro* での濃度はペプチドは 10  $\mu$ M, IRBP は 10  $\mu$ g/ml

\*\*S.I.: stimulation index

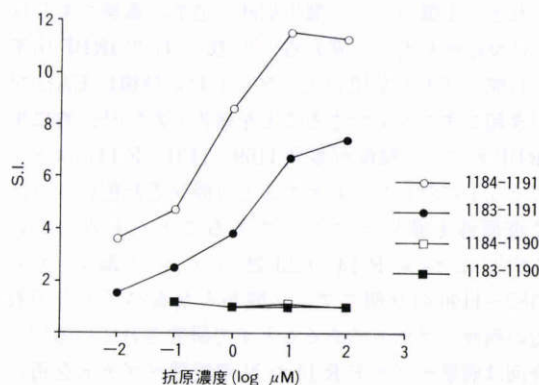


図 1 8 mer (1184~1191) で免疫されたラットからリンパ節を採取し、リンパ球を分離後、刺激抗原とともに *in vitro* で培養した。横軸は刺激抗原の対数濃度 ( $\log \mu$ M), 縦軸は stimulation index (S.I.) を示している。8 mer で感作されたリンパ球は 9 mer (1183~1191) を認識するが、1191 位の取り除かれた 1184~1190 あるいは 1183~1190 を認識することはできなかった。

特異性をもつ反応パターンが認められた。さらに、IRBPで感作されたリンパ球は10mer, 11merは認識したが、8mer, 9merは認識できなかった。

反応特異性の詳細を検討するため、8merあるいは10merで免疫されたラットより得たリンパ節細胞の反応をさらに検討した。図1に示す通り、8mer(1184~1191)に感作されたリンパ球は9mer(1183~1191)は認識できるが、1184~1190あるいは1183~1190は認識できなかった。すなわち、この抗原特異性には1183位のグルタミン酸は必須ではないが、1191位のバリンは必須である。また、10mer

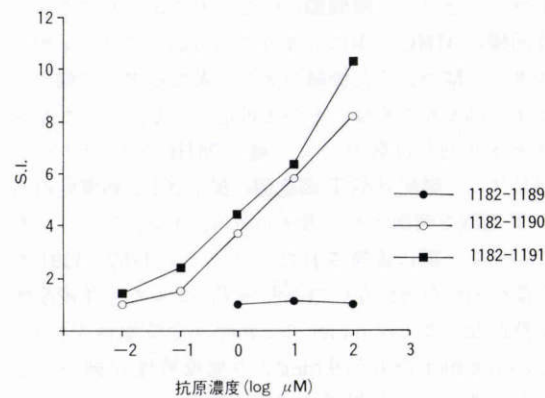


図2 10mer(1182~1191)で免疫されたラットからリンパ節を採取し、リンパ球を分離後、刺激抗原とともにin vitroで培養した。横軸は刺激抗原の対数濃度(log μM)、縦軸はstimulation index(S.I.)を示している。10merで感作されたリンパ球は1191を取り除いた1182~1190は認識できたが、1190位を除いた1182~1189は認識できなかった。

表4 8merおよび11merのMHC拘束

抗体	8mer	11mer
なし	23,970±1,084*	10,095±393
OX 3	6,031±273	3,233±159
OX 6	6,926±475	2,806±444
OX 17	25,413±282	10,009±1,367

\*CPM(平均±SE)

8merあるいは11merで免疫したラットより採取したリンパ節細胞をin vitroで免疫抗原とともに培養した(8merは1μM, 11merは0.1μM)。この培養系に抗ラットMHC抗体を加えたときの増殖反応の変化をみた。

抗ラットMHC抗体は1:3,200に希釈して用いた。抗原なしのときのカウント(バックグラウンド)は8mer:5,098±338, 11mer:2,011±350。

(1182~1191)に感作されたリンパ球は図2に示す通り、1182~1190は認識するが、1182~1189は認識できなかった。すなわち、この抗原特異性には1182位のトリプトファンと1190位のアスパラギン酸が必須であることがわかった。

3. 2つの抗原性部位に対するMHC拘束

さきに述べた2つの抗原部位の反応が異なったMHCに支配されている可能性を検討するために、ラットMHCに対するモノクローナル抗体を用いて、これら抗原に対するリンパ球の反応をin vitroで抑制した。表4に示すように8mer, あるいは11merペプチドに対する反応は両者とも抗ラットI-A(OX-6)抗体, および抗I-AかつI-E抗体(OX-3)で抑制された。しかし、両者とも抗ラットI-E抗体(OX-17)では抑制されなかった。

4. 1182位置換ペプチドの病原性および抗原性

病原性, 抗原性においてきわめて重要な1182位のトリプトワンのフェニルアラニン, アラニン, グルタミン酸への置換ペプチドの病原性(表5), 抗原性(表6)を示す。置換ペプチドのうちではフェニルアラニン置換ペプチドのみがぶどう膜炎惹起能を持っていた。さらに、フェニルアラニン置換ペプチドのみが抗

表5 1182位のトリプトファンを置換したペプチドのEAU惹起能

免疫抗原*	EAU		
	発症率	発症日(平均)	炎症の強さ(平均)
10mer	4/4	10.8	1.0
(F)10mer	4/4	11.0	1.0
(A)10mer	0/4	—	—
(E)10mer	0/4	—	—

\*ラット1匹あたり100nmolのペプチドを完全フロイントアジュバントとともに免疫した。

表6 1182位置換ペプチドで免疫されたラットのリンパ球増殖反応

免疫抗原	刺激抗原*			
	10mer	(F)10mer	(A)10mer	(E)10mer
10mer	6.3**	3.6	1.1	1.3
(F)10mer	7.0	8.8	0.9	0.9
(A)10mer	1.1	0.9	0.9	1.2
(E)10mer	1.0	0.9	0.9	1.0

\*刺激抗原のin vitroでの濃度は10μM

\*\*S.I.: stimulation index

原性をもち、このペプチドと 1182~1191 には交差反応性が認められた。アラニン、グルタミン酸置換ペプチドは病原性も抗原性も認められなかった。

#### IV 考 按

IRBP 由来の多数のペプチドのぶどう膜炎惹起能が検討されており、そのうち R 14 についてはルイスラットにおいてきわめて病原性も免疫原性も優れていることが知られている<sup>8)9)13)</sup>。我々は本研究で、この R 14 の短縮ペプチドに 2 つのまったく異なる、交差反応性を持たない抗原決定基が内在することを示した。しかもこの 2 つの抗原性はわずかひとつ (1182 位のトリプトファン) のアミノ酸を含むか、含まないかで決まることが明らかとなった。本実験で 10 mer (1182~1191) あるいは 11 mer (1181~1191) で示された長い方のペプチドは病原性、あるいは免疫原性においてもペプチド R 14 の主体となっている決定基である。これは IRBP で免疫されたルイスラットから採取したリンパ節細胞が 10 mer より長いペプチドは認識するがそれより短いペプチドは認識できないという 10 mer より長いペプチドの immunodominance<sup>15)</sup>にも示されている。

これに対して、短いほうの 8 mer, 9 mer は異なった性質を持っていた。まず、抗原特異性はこれらふたつのペプチドだけにみられ、これより長いペプチドとも短いペプチドとも交差反応性は認められない。また、8 mer はそれより長い 9 mer よりも抗原性が強く、9 mer で免疫されたラットより採取したリンパ節細胞も 9 mer 自身よりも 8 mer によく反応した(表 1)。逆に 11 mer は 10 mer よりも刺激抗原としての抗原性に富んだ(表 1)。

このようにわずか 10 個のアミノ酸からなるペプチド 1182~1191 の中にふたつの抗原決定基が含まれることはきわめてめずらしい現象であり、このメカニズムを説明するのは難しい。まず考えられるのはそれぞれの抗原決定基が異なった MHC に拘束されていることであるが、この考えは今回の我々の実験で否定された。すなわち両決定基とも表 4 に示すごとく I-A に拘束されている。次に考えられることは 8 mer, 9 mer が抗原提示細胞上の MHC 分子に長いペプチドと異なった様式で結合しているということである。結果として 2 種類の異なった抗原、MHC 複合体が形成され、異なった T 細胞クローンを誘導することとなる。ペプチドが MHC に空間的に異なった形で結合するとい

う報告<sup>16)17)</sup>もあり、我々の仮説を支持している。この仮説が正しいとすると、1192 位のトリプトファンを取り除くことにより、8 mer, 9 mer が MHC に長いペプチドと異なった形で結合するのを可能にしていることとなる。

病原性、抗原性に大きく関与していると考えられる 1182 位のトリプトファンを他のアミノ酸に置換した実験ではフェニルアラニンへの置換ペプチドは病原性も保たれ、免疫原性においても 1182~1191 と交差反応を持つが、アラニン、グルタミン酸への置換では病原性も免疫原性も失われた。1182 位のトリプトファンは MHC との結合に重要と考えられている<sup>13)</sup>が、トリプトファンとアミノ酸側鎖の似ているフェニルアラニンは同様に MHC の中にはまりこめるが、アラニンやグルタミン酸のような側鎖の大きく異なるアミノ酸ではうまくはまりこめないものと推定される。いったんペプチドが同じ位置のアミノ酸で MHC と結合すると同じアミノ酸配列が T 細胞側に提示され、病原性のある T 細胞を刺激すると考えられる。また、アラニンやグルタミン酸に置換されたペプチドが 1182~1191 と交差反応性を持たないのみならず、まったく免疫原性を持たないことは 8 mer や 9 mer が免疫原性を持ち、しかも 8 mer の方が 9 mer より免疫原性が強いことも考えあわせると N 端がのびることは 8 mer の免疫原性には不利で、すなわち 8 mer はかなり空間的にひねられた状態で MHC に結合していることが想像される。

欄筆にあたり、御指導、御校閲を賜った北海道大学松田英彦教授に深謝いたします。

#### 文 献

- 1) Gery I, Wiggert B, Redmond TM, et al: Uveitis and pinealitis induced by immunization with interphotoreceptor retinoid-binding protein. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 27: 1296-1300, 1986.
- 2) Hirose S, Kuwabara T, Nussenblatt RB, et al: Uveitis induced in primates by interphotoreceptor retinoid-binding protein. *Arch Ophthalmol* 104: 1698-1702, 1986.
- 3) Caspi RR, Roberge FG, Chan C-C, 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) McAllister CG, Wiggert B, Chader GJ, et al: Uveitogenic potential of lymphocytes sensitized

- to interphotoreceptor retinoid-binding protein. *J Immunol* 138: 1416-1420.
- 5) **Allen PM, Matsueda GR, Haber E, et al:** Specificity of the T cell receptor: Two different determinants are generated by the same peptide and the I-A\* molecule. *J Immunol* 135: 368-373, 1985.
  - 6) **Vacchio MS, Berzofsky JA, Krzych U, et al:** Sequences outside a minimal immunodominant site exert negative effects on recognition by staphylococcal nuclease-specific T cell clones. *J Immunol* 143: 2814-2819, 1989.
  - 7) **Wraith DC, Smilek DE, Mitchell DJ, et al:** Antigen recognition in autoimmune encephalomyelitis and the potential for peptide-mediated immunotherapy. *Cell* 59: 247-255, 1990.
  - 8) **讃井浩喜, Gery I:** 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. *日眼会誌* 95: 147-151, 1991.
  - 9) **Sanui H, Redmond TM, Kotake S, et al:** Identification of an immunodominant and highly immunopathogenic determinant in the retinal interphotoreceptor retinoid-binding protein (IRBP). *J Exp Med* 169: 1947-1960, 1989.
  - 10) **Sanui H, Redmond TM, Kotake S, et al:** Uveitis and immune responses in primates immunized with IRBP-derived synthetic peptides. *Curr Eye Res* 9: 193-199, 1990.
  - 11) **Kotake S, Wiggert B, Redmond TM, et al:** Repeated determinants within the retinal interphotoreceptor retinoid-binding protein (IRBP). Immunological properties of the repeats of an immunodominant determinant. *Cell Immunol* 126: 331-342, 1990.
  - 12) **Kotake S, Redmond TM, Wiggert B, et al:** Unusual immunological properties of the uveitogenic IRBP-derived peptide R23. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 32: 2058-2064, 1991.
  - 13) **Kotake S, de Smet MD, Wiggert B, et al:** Analysis of the pivotal residues of the immunodominant and highly uveitogenic determinant of interphotoreceptor retinoid-binding protein (IRBP). *J Immunol* 146: 2995-3001, 1991.
  - 14) **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.
  - 15) **Berzofsky JA:** Immunodominance in T lymphocyte recognition. *Immunol Lett* 18: 83-95, 1988.
  - 16) **Bhayani H, Paterson Y:** Analysis of peptide binding patterns in different major histocompatibility complex/T cell receptor complexes using pigeon cytochrome c-specific T cell hybridomas. Evidence that a single peptide binds major histocompatibility complex in different conformation. *J Exp Med* 170: 1609-1625, 1989.
  - 17) **Kurata A, Berzofsky JA:** Analysis of peptide residues interacting with MHC molecule or T cell receptor. Can a peptide bind in more than one way to the same MHC molecule? *J Immunol* 144: 4526-4535, 1990.