

異なる免疫学的遺伝背景を持つラットにおける視細胞間 レチノイド結合蛋白由来合成ペプチドによる 実験的自己免疫性網膜ぶどう膜炎と免疫反応

笹本 洋一

北海道大学医学部眼科学教室

要 約

視細胞間レチノイド結合蛋白由来の合成ペプチド R 16 を用いて、同一のペプチドが異なる主要組織適合抗原 class II 分子に結合し、異なる系統のラットに実験的自己免疫性網膜ぶどう膜炎 (EAU) やリンパ球増殖反応を惹起できるか検討した。R 16 を完全フロインドアジュバントとともに免疫したところ、EAU はラットの主要組織適合抗原 RT 1 が *l* の LEW で 100%、*K* の WKAH で 75%、*u* の SDJ で 0%、*j* の LEJ で 75%、*b* の BUF で 19% に発症した。リンパ球増殖反応では、purified protein derivative (PPD) に対しては全系統のラットで反応がみられたが、R 16 に対する反応は EAU を発症した LEW, WKAH, LEJ, BUF でみられ、SDJ ではみられなかった。さらに、ラットの抗 class II 抗体のう

ち、抗 RT 1-B 抗体の OX 6 と抗 RT 1-D 抗体の OX 17 を用いたところ、LEW と LEJ では主として OX 6 により増殖反応は抑制された。以上から、R 16 は異なる RT 1 を有するラットの系統に EAU を惹起でき、しかも同じ locus の異なる class II 分子に結合できることが明らかとなった。このことは、異なる系統においても、同一のペプチドが病気や免疫反応を誘導する可能性を示している。(日眼会誌 98: 357-361, 1994)

キーワード：実験的自己免疫性網膜ぶどう膜炎、視細胞間レチノイド結合蛋白、主要組織適合抗原、RT 1、クラス II 抗原

Uveitogenicity and Immunogenicity of Interphotoreceptor Retinoid-Binding Protein-Derived Peptide R16 in Different Strains of Rats

Yoichi Sasamoto

Department of Ophthalmology, Hokkaido University School of Medicine

Abstract

Interphotoreceptor retinoid-binding protein (IRBP) can induce experimental autoimmune uveoretinitis (EAU) in different rat strains. This is because IRBP has many epitopes, each of which binds to a specific class II molecule. However, there is the possibility that one epitope can bind to different class II molecules. In this study we attempted to examine this postulate, by checking uveitogenicity and immunogenicity of IRBP-derived peptide R16. We used rat strains LEW, WKAH, SDJ, LEJ, and BUF, which have RT1 haplotype *l*, *k*, *u*, *i*, and *b*, respectively. Immunization with R16 caused EAU in LEW (100%), WKAH (75%), SDJ (0%), LEJ (75%), and BUF (19%). We also examined the immunogenicity of R16 by lymphocyte proliferative assay in which lymph node cells from rats of

each strain immunized with R16 were stimulated with the immunogen peptide. R16 evoked substantial proliferative responses in LEW, WKAH, LEJ, and BUF, but not in SDJ. An inhibition test with anti-class II monoclonal antibodies showed that OX6 (anti-RT1-B) could inhibit the proliferation against R16, but OX17 (anti-RT1-D) could not. These experiments demonstrated that the same peptide induces the disease and immunity in different strains of rats. (J Jpn Ophthalmol Soc 98: 357-361, 1994)

Key words: Experimental autoimmune uveoretinitis (EAU), Interphotoreceptor retinoid-binding protein (IRBP), Major histocompatibility complex (MHC), RT1, Class II molecule

別刷請求先：060 北海道札幌市北区北 14 条西 7 丁目 北海道大学医学部眼科学教室 笹本 洋一
(平成 5 年 8 月 26 日受付, 平成 5 年 12 月 1 日改訂受理)

Reprint requests to: Yoichi Sasamoto, M.D. Department of Ophthalmology, Hokkaido University School of Medicine, Kita-14, Nishi-7, Kita-ku, Sapporo-shi, Hokkaido 060, Japan

(Received August 26, 1993 and accepted in revised form December 1, 1993)

I 緒 言

実験的自己免疫性網膜ぶどう膜炎 (experimental autoimmune uveoretinitis, EAU) は、ラット、モルモット、マウス、サルなどに S 抗原や視細胞間レチノイド結合蛋白 (interphotoreceptor retinoid-binding protein, IRBP) などの網膜特異抗原を免疫することにより、免疫部位とは離れた網膜、ぶどう膜に惹起される炎症で、ヒトの内因性ぶどう膜炎のモデルと考えられている^{1)~5)}。免疫された S 抗原や IRBP は、細胞外酵素などにより断片化され、マクロファージなど抗原提示細胞 (antigen presenting cell, APC) に取り込まれ、プロセッシングを受け、アミノ酸 11~15 個程度のペプチドとなる。これらは次に主要組織適合抗原 (major histocompatibility complex, MHC) の class II 分子と結合して、APC 上に発現し、CD4 陽性の helper T 細胞を活性化する⁶⁾⁷⁾。これらの活性化された T 細胞が分裂増殖して眼の網膜、ぶどう膜組織に移動して EAU を惹起すると考えられている。S 抗原や IRBP は、異なる class II 分子を有する種々の系統のラットに EAU を誘導できることが明らかとなっている^{8)~11)}。それは、これらの抗原がその内部に複数の抗原決定基を持ち、それぞれ異なる class II 分子と結合可能のため、すなわち、異なる class II 分子に異なるペプチドが結合して T 細胞を活性化するためと考えられてきた。しかし、同一のペプチドが異なる class II 分子に結合できることも考えられる。今回、この点を明らかにする目的で、IRBP 由来の合成ペプチドの中で抗原性が最も強いと考えられる¹²⁾¹³⁾ R 16 を用いて、すでに主要組織適合抗原 (RT 1) が明らかとなった¹⁴⁾、異なる系統のラットに対する EAU の惹起能と免疫反応について検討した。

II 実験方法

実験動物：北海道大学医学部動物実験施設から供給された、8~12 週齢の雄のラット 5 系統を用いた。各系統のラットの RT 1 を表 1 に示した¹⁴⁾。

抗原：抗原はウシ IRBP のアミノ酸配列 1177-1191 (ADGSSWEGVGVVPDV) の合成ペプチド R 16 を用いた。ペプチドの作製は、レジンでの固相法により自動ペプチド合成機 (430 A Applied Biosystem Inc, Foster City, CA) を用いて Ogasawara ら¹⁵⁾の方法により合成し、逆相高速液体クロマトグラフィー (Waters Japan, Tokyo, Japan) により精製し、アミノ酸分析機 835 (Hitachi Ltd, Tokyo, Japan) により確認した。

免疫方法：100 nmol の抗原を、*Mycobacterium tuberculosis* H 37 Ra を含む完全フロイドアジュバント (Difco Lab, Detroit, MI) に 1:1 に乳和し、ラットの左後足足蹠に免疫、*Bordetella pertussis* (和光純薬) の死菌 1×10^{10} 個を同時に静脈内投与した。

病変の評価：免疫後 16~18 日にラットを屠殺し、眼球を摘出、切片を作製、ヘマトキシリン-エオジン染色を行い、光学顕微鏡で EAU の発症の有無と重症度を Gery ら¹⁶⁾の報告に従って評価した。

リンパ球増殖反応：免疫後 16~18 日に所属リンパ節を摘出、これより単核細胞を得て³H-TdR 取り込みを既報のごとく行った¹⁰⁾。簡単には、 2×10^5 個の細胞を LEW の 1% 新鮮ラット血清を加えた培養液 0.2 ml に抗原とともに浮遊させて、72 時間培養後に³H-TdR (18.5 kBq/20 μ l/well, ICN Biomedicals Inc, Costa Mesa, CA) を加えて、さらに 16 時間培養した。³H-TdR 取り込みは液体シンチレーションカウンターで計測し、結果は SI (Stimulation Index, 抗原添加 cpm/対照 cpm) で示した。刺激抗原には R 16、または purified protein derivative (PPD, ビーシージー製造) を用いた。さらに、抗 class II 抗体による増殖反応の抑制効果を検討するため、培養液中の R 16 10 μ M に抗 RT 1-B 抗体の OX6 (Pharmin-gen, San Diego, CA)、または抗 RT 1-D 抗体の OX-17 (Pharmin-gen, San Diego, CA) を加え反応抑制率を測定した。

III 結 果

1. 各系統のラットの EAU 発症率

R 16 の免疫による 5 系統のラットの EAU 発症率を図 1 に示す。RT 1 が *l* の LEW は、20 眼中 20 眼のすべてに EAU を発症した。RT 1 が *k* の WKAH は 16 眼中 12 眼、75% に EAU を発症した。RT 1 が *u* の SDJ は、免疫したラット (12 眼) のいずれも EAU を発症しなかった。一方、RT 1 は *j* だが RT 1-H, B, D に *u/b*, *b*, *b* を持つ LEJ は (表 1)、12 眼中 9 眼の 75% に EAU を発症した。しかし、RT 1 が *b* で、H, B, D に *b*, *b*, *b* を持つ BUF は、16 眼中 3 眼の 19% しか EAU を発症しなかった。

2. EAU の重症度

R 16 により EAU を発症した眼のみについて、その重症度を図 2 にまとめた。LEW (20 眼) では、平均重症度が 2.35 と最も大きかった。WKAH (12 眼) は 1.67 であり、LEJ (9 眼) は 1.11、BUF (3 眼) は 0.83 であった。発症率の低い系統ほど EAU も軽症の傾向が見られた。

3. 各系統のラットの免疫反応

R 16 と完全フロイドアジュバントで免疫した、ラットの所属リンパ節から作製された浮遊リンパ球を PPD 25 μ g/ml を用いて刺激した反応では、すべてのラットの系統でリンパ球増殖反応が見られ、最も低かった SDJ でも SI で 8.0 以上を示した (図 3)。また、これらのラットにおける R 16 刺激によるリンパ球増殖反応は、図 1 で EAU を発症が認められたすべての系統、LEW (3 匹)、WKAH (3 匹)、LEJ (6 匹)、BUF (3 匹) でみられた (図 4)。しかも、EAU 発症率の低い BUF も LEW と同

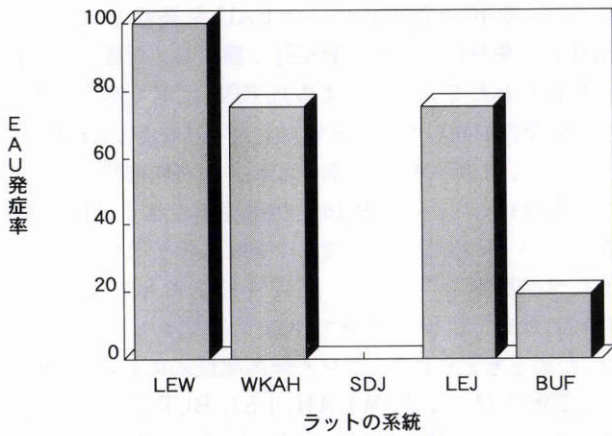


図 1 R16 免疫による各系統のラットの EAU 発症率.

表 1 各系統のラットの主要組織適合抗原 RT 1 のハプロタイプおよび class II 遺伝子座

ラット	RT 1	H	B	D
LEW	<i>l</i>	<i>l</i>	<i>l</i>	<i>l</i>
WKAH	<i>k</i>	<i>k</i>	<i>k</i>	<i>k</i>
SDJ	<i>u</i>	<i>u</i>	<i>u</i>	<i>u</i>
LEJ	<i>j</i>	<i>u/b</i>	<i>b</i>	<i>b</i>
BUF	<i>b</i>	<i>b</i>	<i>b</i>	<i>b</i>

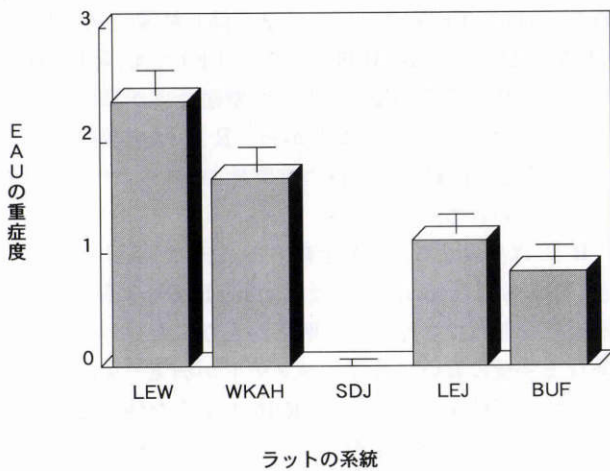


図 2 R16 免疫により発症した EAU の平均重症度 (平均値±標準誤差, n=LEW; 20 眼, WKAH; 12, SDJ; 0, LEJ; 9, BUF; 3).

程度の反応が見られた。また、これらの系統では、EAU を発症したラットばかりでなく、EAU を発症しないラットでもリンパ球増殖反応が認められた。一方、EAU を全く発症しなかった SDJ (3 匹) では、PPD に対してリンパ球増殖反応が見られたが、R16 に対しては全く増殖反応を示さなかった。

4. 抗 class II 抗体によりリンパ球増殖反応の抑制

抗 class II 抗体による *in vitro* での R16 に対するリンパ球増殖反応の抑制実験を LEW および LEJ で行い、その結果を図 5, 6 に示した。LEW (4 匹) におけるリンパ球増殖反応は、OX 6 によって濃度依存性に強く抑

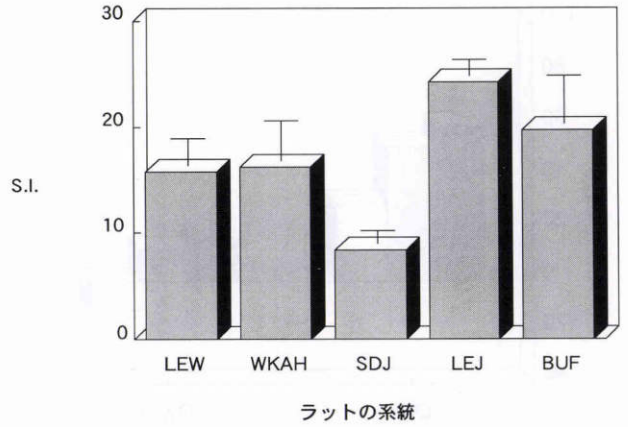


図 3 PPD 25 μg/ml 刺激による各系統のラットのリンパ球増殖反応 (平均値±標準誤差, n=LEW; 3 匹, WKAH; 3, SDJ; 3, LEJ; 6, BUF; 3).

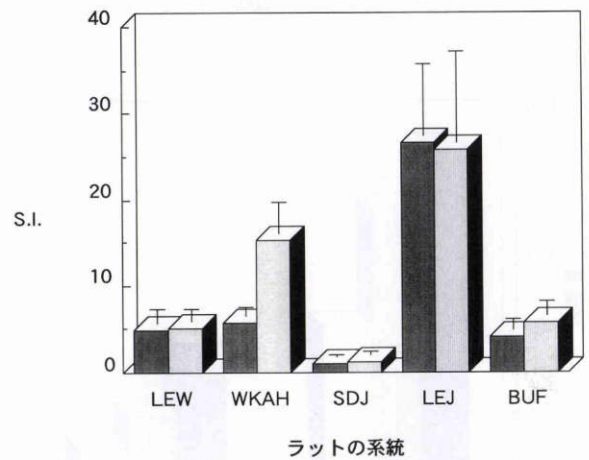


図 4 R16 (10 μM, 100 μM) 刺激による各系統のラットのリンパ球増殖反応 (平均値±標準誤差, n=LEW; 3 匹, WKAH; 3, SDJ; 3, LEJ; 6, BUF; 3).
刺激 R16 濃度 (μM)
濃い網部分: 10, 薄い網部分: 100

制されるが、OX 17 によっては、ほとんど抑制されないことが示された (図 5)。また、LEJ (5 匹) でも R16 によるリンパ球増殖反応は OX 17 よりも、主として OX 6 によって著明に抑制されることが示された (図 6)。したがって、R16 は少なくとも同じ locus の RT 1-B 領域に存在する異なる class II 分子、すなわち LEW の持つ *l* 分子と、LEJ の持つ *b* 分子に結合し、増殖反応を起こしていることが明らかとなった。

IV 考 按

これまで IRBP や S 抗原などの大きな蛋白質は多くの抗原決定基を持つため、異なる系統のラットにも EAU を惹起できることが知られていた^{8)~11)}。しかし、抗原決定基が恐らく 1 個しかない R16 のような小さなペプチドによって、遺伝的背景が異なるラットに EAU を惹起できるとする報告は認められなかった。今回、R16

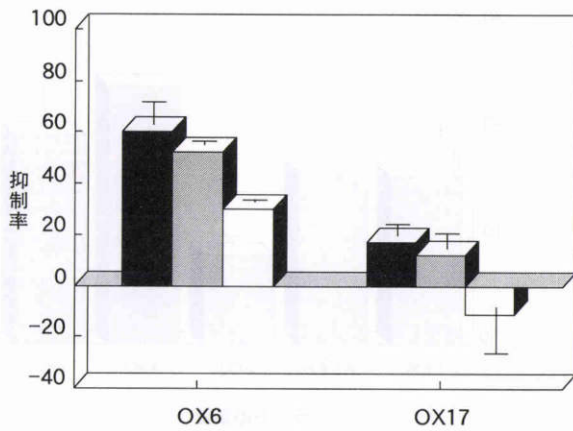


図5 抗 class II 抗体による LEW の R 16 刺激リンパ球増殖反応の抑制率 (平均値±標準誤差, n = 4 匹).

抗 class II 抗体濃度 (希釈倍率)

黒部分: 1:200, 網部分: 1:800, 白部分: 1:3,200

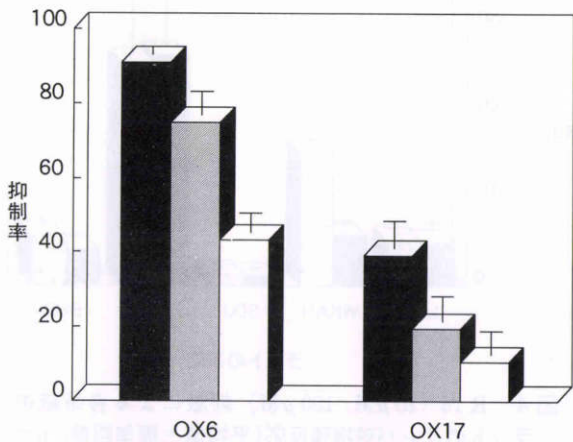


図6 抗 class II 抗体による LEJ の R 16 刺激リンパ球増殖反応の抑制率 (平均値±標準誤差, n = 5 匹).

抗 class II 抗体濃度 (希釈倍率)

黒部分: 1:200, 網部分: 1:800, 白部分: 1:3,200

を 100 nmol 免疫したが, これは大変強力な免疫であり, Sanuri¹²⁾は, LEW では R 16 を 0.02 nmol 免疫しても EAU が発症すると報告している. 我々は EAU 惹起能を明確にするため, 強力な免疫を行ったが, 20 nmol, 2 nmol 免疫した実験でも 100 nmol 免疫と同じ結果を得た (未発表データ).

この実験で用いた LEJ と BUF は, RT 1-B, D に同じハプロタイプ *b* を持ち, RT 1-H のみ *u/b* と *b* と異なる. 図 6 の結果から, R 16 は主として RT 1-B^b と結合することが明らかとなっているので, この点からは LEJ と BUF は同じ EAU 感受性を持つと考えられる. しかし, EAU の発症率が大きく異なるのは, EAU の発症に RT 1 などの MHC 領域だけでなく, non-MHC 領域も強くかかわっているためと考えられる. 同様のことは congenic strain を用いた実験でも報告されている¹⁰⁾¹⁷⁾.

今回, R 16 の免疫によって EAU を発症しなかった SDJ は, 免疫によって足蹠が強く腫脹し, 所属リンパ節から得られたリンパ球による抗 PPD 反応も高いことから, 免疫は成立していると考えられる. しかし, EAU のみでなく, R 16 の抗原刺激によるリンパ球増殖反応も全く示さないことから, R 16 を抗原提示できる APC が存在しない (R 16 が結合できる class II 分子を持たない), または抗原提示されても, R 16 を認識できる T 細胞が存在しない (R 16 を認識できる T 細胞レセプターがない) ためと考えられる. リンパ球増殖反応において, R 16 は LEW だけでなく, WKAH, LEJ, BUF のラットから得られたリンパ球に対しても強い増殖反応を誘導できたことは, EAU の誘発とともに R 16 がそれぞれの系統の class II 分子と結合して抗原提示され, helper T 細胞を活性化できることを示している. これまで, LEW においては class II 分子に対する抗体, 例えば, 抗 RT 1-B 抗体である OX 6 によって, R 16 免疫リンパ球に対する増殖反応が抑制されることが示されている¹⁸⁾. しかし, 同じ class II 分子抗体の抗 RT 1-D 抗体, OX 17 は抑制効果が極めて少ない. したがって, R 16 は APC 上の class II 分子のうち, RT 1-D 領域の分子よりも, 主として RT 1-B 領域の分子と結合し, 増殖反応を起こしていると考えられる. 今回も LEW については全く同じ結果であったが, LEW と異なる class II 分子を持つ LEJ でも, RT 1-B に対する抗体である OX 6 によって増殖反応が抑制されることが示された. このことから, R 16 は複数のラット class II 分子に親和性を持つ抗原性の強いペプチドであると考えられる.

R 16 は, 異なる RT 1 を有する系統に EAU を惹起でき, しかも同じ locus の異なる class II 分子に結合し, 増殖反応を惹起できることが明らかとなった. このことは, 異なる系統においても同一ペプチドが病気や免疫反応を起こす可能性を示している. R 16 のような強力な免疫力および EAU 惹起能を持つペプチドが, 多数の異なる class II 分子を持つ系統に EAU を惹起できることは, ヒトのように heterogenicity が高い動物においても, 特定のペプチドが病因となっている可能性を示す. さらに LEW において, R 16 の静脈内投与によって R 16 や IRBP による EAU の発症を抑制できることが報告されており¹⁹⁾, ヒトにおいてもこのようなペプチドが特定されれば, 病気の抑制や治療を可能とする道が開けると考えられる.

稿を終えるにあたり, 御校閲, 御指導下さいました眼科学教室松田英彦教授に深謝いたします. また, この研究に直接御指導をいただいた小竹 聡講師, ならびに免疫科学研究所病理部門小野江和則教授, 小笠原一誠助教授に心から感謝申し上げます. なお, 本研究は文部省科学研究費 (奨励研究 A 05771378 笹本洋一) の援助を受けた. 記して謝意を示します.

文 献

- 1) **Caspi RR, Roberge FG, Chan CC, Wiggert B, Chader GJ, Rozenszajn LA, 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.
- 2) **Wacker WB, Donoso LA, Kalsow CM, Yankeelov JA Jr, Organisciak DT**: Experimental allergic uveitis. Isolation, characterization, and localization of a soluble uveitopathogenic antigen from bovine retina. *J Immunol* 119: 1949—1958, 1977.
- 3) **Faure JP**: Autoimmunity and the retina. *Current Topics in Eye Research* 2: 215—302, 1980.
- 4) **Hirose S, Kuwabara T, Nussenblatt RB, Wiggert B, Redmond TM, Gery I**: Uveitis induced in primates by interphotoreceptor retinoid-binding protein. *Arch Ophthalmol* 104: 1698—1702, 1986.
- 5) **Kotake S, de Smet MD, Wiggert B, Redmond TM, Chader GJ, Gery I**: Analysis of the pivotal residues of the immunodominant and highly uveitogenic determinant of interphotoreceptor retinoid-binding protein. *J Immunol* 146: 2995—3001, 1991.
- 6) **Schwartz RH**: T-lymphocyte recognition of antigen in association with gene products of the major histocompatibility complex. *Annu Rev Immunol* 3: 237—261, 1985.
- 7) **Brown JH, Jardetzky TS, Gorga JC, Stern LJ, Urban RG, Strominger JL, et al**: Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature* 364: 33—39, 1993.
- 8) **Gery I, Mochizuki M, Nussenblatt RB**: Retinal specific antigens and immunopathogenic processes they provoke. In: Osborne NN, et al (Eds): *Progress in Retinal Research*, Vol 5. Pergamon Press, Oxford 75—109, 1986.
- 9) **Broekhuysse RM, Winkens HJ, Kuhlmann ED**: Induction of experimental autoimmune uveoretinitis and pinealitis by IRBP. Comparison to uveoretinitis induced by S-antigen and opsin. *Curr Eye Res* 5: 231—240, 1986.
- 10) **Hirose S, Ogasawara K, Natori T, Sasamoto Y, Ohno S, Matsuda H, et al**: Regulation of experimental autoimmune uveitis in rats. Separation of MHC and non-MHC gene effects. *Clin Exp Immunol* 86: 419—425, 1991.
- 11) **Mochizuki M, Kuwabara T, Chan CC, Nussenblatt RB, Metcalfe DD, Gery I**: An association between susceptibility to experimental autoimmune uveitis and choroidal mast cell numbers. *J Immunol* 133: 1699—1701, 1984.
- 12) **Sanui H, Redmond TM, Kotake S, Wiggert B, Hu LH, Margalit H, 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.
- 13) **Kotake S, Wiggert B, Redmond TM, Borst DE, Nickerson JM, Margalit H, 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.
- 14) **Fujii H, Kakinuma M, Yoshiki T, Natori T**: Mapping and transcriptional properties of RT1 class II region genes. *Transplantation* 52: 369—373, 1991.
- 15) **Ogasawara K, Wambua PP, Gotohda T, Onoé K**: Modification of the T cell responsiveness to synthetic peptides by substituting amino acids on agretopes. *Int Immunol* 2: 219—224, 1990.
- 16) **Gery I, Wiggert B, Redmond TM, Kuwabara T, Crawford MA, Vistica BP, et al**: Uveoretinitis and pinealitis induced by immunization with interphotoreceptor retinoid-binding protein. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 27: 1296—1300, 1986.
- 17) 吉川浩二, 広瀬茂人, 笹本洋一, 小竹 聡, 松田英彦: 実験的自己免疫性ぶどう膜炎の発症における non-major histocompatibility complex gene の役割. *日眼会誌* 97: 169—174, 1993.
- 18) **Lipham WJ, Redmond TM, Takahashi H, Berzofsky JA, Wiggert B, Chader GJ, et al**: Recognition of peptides that are immunopathogenic but cryptic. Mechanisms that allow lymphocytes sensitized against cryptic peptides to initiate pathogenic autoimmune processes. *J Immunol* 146: 3757—3762, 1991.
- 19) **Sasamoto Y, Kawano YI, Bouligny R, Wiggert B, Chader GJ, Gery I**: Immunomodulation of experimental autoimmune uveoretinitis by intravenous injection of uveitogenic peptides. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 33: 2641—2649, 1992.