

実験的自己免疫性網膜ぶどう膜炎発症における MHC と non-MHC gene の免疫遺伝学的役割

古館 直樹¹⁾, 笹本 洋一¹⁾, 小竹 聡¹⁾, 小笠原一誠²⁾, 小野江和則²⁾, 松田 英彦¹⁾

¹⁾北海道大学医学部眼科学教室, ²⁾北海道大学免疫科学研究所病理部門

要 約

実験的自己免疫性網膜ぶどう膜炎 (EAU) 発症における主要組織適合抗原 (MHC) と non-MHC gene の役割を明確にするために, 視細胞間レチノイド結合蛋白 (IRBP)由来の合成ペプチド R 16 を免疫抗原として, コンジェニックラットを用いて EAU の発症率と炎症の程度, およびリンパ球増殖反応について検討した. EAU 高感受性で RT 1^d (ラット MHC) を持つ LEW, EAU 低感受性と考えられる RT 1^k の WKAH, LEW と同じ RT 1^d で WKAH の non-MHC を持つ WKAH.1 L を, それぞれ 2 nmol の R 16 で免疫した. EAU の発症率は

LEW で 100%, WKAH.1 L で 92.9%, WKAH で 18.8%であった. EAU を発症したラットの EAU 平均重症度は, LEW で 2.06, WKAH.1 L で 1.23, WKAH で 0.38 であった. リンパ球増殖反応では, 3 系統とも有意の反応を認めた. 以上から, EAU の発症において, MHC と non-MHC gene がそれぞれ関与していることが示唆された. (日眼会誌 99: 537-540, 1995)

キーワード: EAU, MHC, non-MHC, IRBP, RT 1

MHC and non-MHC Gene Effects on the Development of Experimental Autoimmune Uveoretinitis

Naoki Furudate¹⁾, Yoichi Sasamoto¹⁾, Satoshi Kotake¹⁾,
Kazumasa Ogasawara²⁾, Kazunori Ono²⁾ and Hidehiko Matsuda¹⁾

¹⁾Department of Ophthalmology, Hokkaido University School of Medicine

²⁾Institute of Immunological Science, Hokkaido University and Department of Pathology

Abstract

Experimental autoimmune uveoretinitis (EAU) can be induced in rats by interphotoreceptor retinoid-binding protein (IRBP), and served as a model for human uveitis. Using IRBP-derived peptide R16, we investigated the MHC and non-MHC genes' effect on the regulation and susceptibility to EAU. EAU-high susceptible LEW (RT1^d), EAU-low susceptible WKAH (RT1^k), and WKAH.1L rats which carry RT1^d and WKAH background were immunized with 2 nmol of R16. One hundred percent of LEW rats developed EAU and 92.9% of WKAH.1L rats. Only, 18.8% of WKAH rats developed EAU. Among these strains tested, the severity of EAU

was 2.06 in LEW, 1.23 in WKAH.1L, and 0.38 in WKAH. R16 evoked substantial proliferative responses in all these strains. The present data suggest that both MHC and non-MHC genes play distinct roles in development of EAU. (J Jpn Ophthalmol Soc 99: 537-540, 1995)

Key words: Experimental autoimmune uveoretinitis, Major histocompatibility complex, Non-major histocompatibility complex, Interphotoreceptor retinoid-binding protein, RT1

別刷請求先: 060 北海道札幌市北区北 15 条西 7 丁目 北海道大学医学部眼科学教室 古館 直樹
(平成 6 年 10 月 24 日受付, 平成 6 年 12 月 10 日改訂受理)

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

(Received October 24, 1994 and accepted in revised form December 10, 1994)

I 緒 言

実験的自己免疫性網膜ぶどう膜炎 (experimental autoimmune uveoretinitis, EAU) は、網膜可溶性抗原 (soluble retinal antigen, S-Ag)^{1)~3)}や視細胞間レチノイド結合蛋白 (interphotoreceptor retinoid-binding protein, IRBP)^{3)~5)}などの網膜特異抗原をラットなどの動物に免疫することにより惹起される。このEAUは、ヒトとラットとの血液網膜柵の機能や、その炎症過程における病理組織学的な類似性から、Vogt-小柳-原田病、交感性眼炎、Birdshot retinochoroidopathyなどの内因性ぶどう膜炎のモデルとも考えられている^{1)~5)}。一方、内因性ぶどう膜炎のうち、ベーチェット病やVogt-小柳-原田病、強直性脊椎炎などはmajor histocompatibility comple (MHC) の特定のハプロタイプと相関^{6)~9)}することがよく知られており、特に原田病は特定のclass IIハプロタイプを持つヒトに発症すると考えられている⁹⁾。ラットのEAUの発症においても、S-AgやIRBPの免疫に対して、EAU感受性と抵抗性を示す系統があり¹⁰⁾、このような違いに対してMHCまたはnon-MHC geneがどのように関与しているかを明らかにできれば、内因性ぶどう膜炎発症機序の解明に役立つと考えられる。すでに、S-Agの免疫に対するEAUの発症については、MHC class II geneとnon-MHC geneがともに関与していることが報告¹¹⁾されている。しかし、S-Agは48 kDa、IRBPは145 kDaと大きな蛋白質で、その内部に複数の抗原決定基を持つ可能性があり、異なる抗原決定基がMHC class II分子と結合することによって、EAUの発症に差を生じていることも考えられる。そこで今回、抗原決定基を1個しか持たないと考えられるIRBP由来の小さなペプチドR 16¹²⁾を免疫抗原として、EAU発症におけるMHCとnon-MHC geneの役割を明確にするための検討を行った。

II 実験方法

1. 実験動物

北海道大学医学部附属動物実験施設で維持されている生後8~12週齢の雄のラット3系統 (LEW, WKAH, WKAH.1L) を用いた。LEWはR 16に対してEAU高感受性ラットで、WKAHはLEWに比べて低感受性ラット¹³⁾、WKAH.1LはMHCがLEWと同一で、non-MHC geneはWKAHと同じというコンジェニック

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	Background	RT 1	H	B	D
LEW	LEW	<i>l</i>	<i>l</i>	<i>l</i>	<i>l</i>
WKAH.1L	WKAH	<i>l</i>	<i>l</i>	<i>l</i>	<i>l</i>
WKAH	WKAH	<i>k</i>	<i>k</i>	<i>k</i>	<i>k</i>

ラットである。各系統のラットのMHCであるRT 1とclass II亜領域のRT 1-H, B, Dを表1に示した¹⁴⁾。

2. 抗原

抗原はウシIRBPのアミノ酸1177-1191 (ADGS-SWEGVGVVDPV) (R 16)を合成して用いた。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。

3. 免疫方法

2 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、ラットの左後肢足蹠に免疫、*Bordetella pertussis* (BP, 和光純薬)の死菌 1×10^{10} 個を同時に腹腔内投与した。

4. 病変の評価

免疫後14~21日にラットを屠殺し、眼球を摘出した。これから切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色を行い、光学顕微鏡でGeryら⁵⁾の報告に従ってEAUの発症の有無と重症度 (0~4) を評価した。

5. リンパ球増殖反応

免疫後14~21日に所属リンパ節を摘出し、これから単核細胞を得た。次に、 2×10^5 のリンパ節細胞を抗原とともにLEWの1%新鮮ラット血清を加えた培養液0.2 mlに浮遊させ、72時間培養後、³H-TdR (18.5 kBq/20 μ l/well, ICN Biomedicals Inc, Costa Mesa, CA)を加えて16時間培養した。³H-TdR uptake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/対象cpm)で示した¹¹⁾。

III 結 果

1. 各系統のラットのEAU発症率

各系統のラットのEAU発症率を図1に示した。LEWラットは16眼中16眼 (100%) にEAUを発症し、

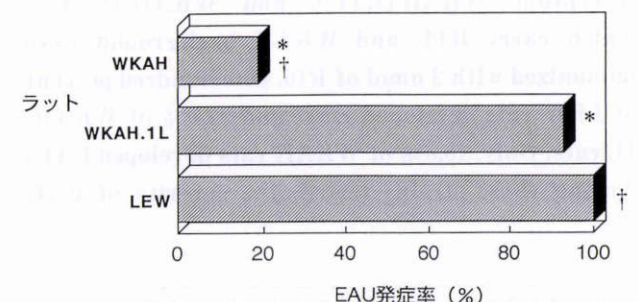


図1 R 16免疫による各系統のラットの実験的自己免疫性網膜ぶどう膜炎 (experimental autoimmune uveoretinitis, EAU) 発症率。

*†: $p < 0.01$ (Fisher 正確確率検定, 両側検定)

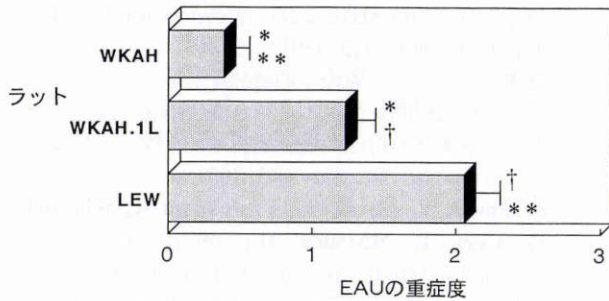


図2 R 16免疫により発症したEAUの平均重症度 (平均値±標準誤差, n=LEW; 16眼, WKAH.1L; 13眼, WKAH; 3眼).
*†: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ (student's t 検定)

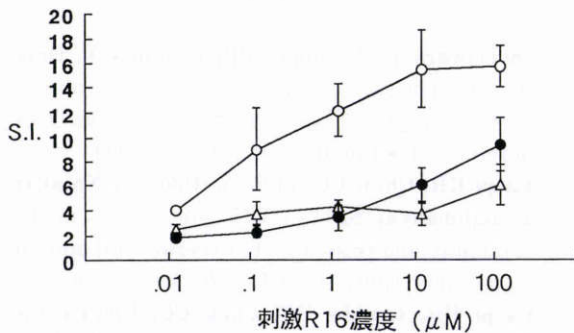


図3 R 16免疫によるリンパ球増殖反応 (平均値±標準誤差, n=LEW; 8匹, WKAH.1L; 7匹, WKAH; 8匹).
白丸: LEW, 三角: WKAH.1L, 黒丸: WKAH

WKAH.1Lラットは14眼中13眼(92.9%), WKAHラットは16眼中3眼(18.8%)の発症率であった。WKAHの発症率は、LEW, WKAH.1Lと比べて有意差を持って低かった。

2. EAUの重症度

EAUを発症した眼のみについて、その重症度を調べた結果、図2に示すように、LEWの平均重症度は2.06, WKAH.1Lは1.23, WKAHは0.38で、各系統間に有意差を認めた。

3. 各系統のラットの免疫反応

R 16で免疫したラットから得られたリンパ球の増殖反応の結果を図3に示す。3系統ともR 16の刺激により、SIで2.0以上のリンパ球増殖反応を認めた。3系統の中では、LEWの増殖反応が最も強かった。

IV 考 按

今回用いたWKAH.1Lラットは、R 16に対してEAU高感受性であるLEWラットのMHCを持ち、EAU低感受性であるWKAHラットのnon-MHC geneを持つコンジュニククラットである。したがって、R 16の免疫に対するEAUの発症にMHCだけが関与しているのであれば、同一のMHCを持つLEWとWKAH.1Lに同程度のEAU発症率および重症度がみられるはず

である。また、non-MHC geneだけが関与しているのであれば、同一のnon-MHC geneを持つWKAHとWKAH.1Lに同程度のEAU発症率および重症度となるはずである。

結果は、発症率においてはLEWとWKAH.1Lが同程度で、WKAHに比べて有意差を持って高かった。また、重症度においてはWKAH.1LはLEWとWKAHのほぼ中間値で、各系統間に有意差がみられた。すなわち、EAUの発症において、MHCとnon-MHC geneはともに関与しており、特にMHCはその発症率に大きく関与していると考えられる。

同様の結果は、S-Agを用いたHiroseら¹¹⁾の実験や、マウスを使ったCaspiら¹⁶⁾¹⁷⁾の実験でも示されており、今回の実験はこれらの報告を支持するものである。

ところでHappら¹⁸⁾は、EAUと似たメカニズムが想定されている、ラットの実験的アレルギー性脳脊髄炎(experimental allergic encephalomyelitis, EAE)の実験で、EAE発症におけるMHCとnon-MHC geneの役割について報告している。この中で、脳、脊髄特異抗原に対するリンパ球の増殖反応はMHCによって規定され、最終的にEAEを発症するかどうかはnon-MHC geneによって決定されるとしている。今回の実験で、リンパ球増殖反応については、3系統いずれもSIで2.0以上の反応があり、MHCによって規定されるというHappらの報告とは異なる結果となった。これには、EAUとEAEの違いの他に、R 16の強いEAU惹起能と免疫原性¹²⁾¹⁹⁾が関与していると考えられる。すなわち、Sanuiら¹⁹⁾は、LEWではR 16を0.02 nmol免疫しただけでもEAUが発症したと報告しており、今回用いた2 nmolという免疫はかなり強力であったと思われる。

また、R 16は、15個のアミノ酸から成る小さなペプチドであるにも関わらず、異なるRT 1を有する多くの系統にEAUを惹起できる¹²⁾。もし、同じlocusの異なるclass II分子に結合して増殖反応を惹起できるとすれば、この小さなペプチド抗原に複数の抗原決定基があると考えられるよりは、一つの決定基が異なるclass II分子に結合できるという可能性が強いと考えられる²⁰⁾。これを確かめるためには、さらにR 16ペプチドアナログを用いて実験をすすめる必要があると考えられる。

EAUの発症においてMHCが果たす免疫学的機序については、これまで多くの研究がなされているが、non-MHC geneについての報告は少ない。その一つに、Caspiら¹⁶⁾によって、サイトカインやホルモン、特定のT細胞レポーターなどの関与の可能性を指摘した報告がある。また、吉川ら²¹⁾によって、LEWのEAU発症に関与するnon-MHC geneは、常染色体上に存在する単一の遺伝子領域である可能性が強いとの報告もある。しかし、non-MHC geneが関与する免疫遺伝学的メカニズムについてはまだ十分解明されておらず、今後の研究が期待

される。

稿を終えるにあたり、実験動物を御提供いただきましたPALM 研究所名取 孝先生に深謝いたします。

文 献

- 1) **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.
- 2) **Faure JP**: Autoimmunity and the retina. *Current Topics Eye Research* 2: 215—302, 1980.
- 3) **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.
- 4) **Nussenblatt RB, Palestine AG**: Uveitis. Fundamentals and clinical practice. Medical Publishers Inc, Chicago, 1—447, 1988.
- 5) **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.
- 6) **Ohno S, Ohguchi M, Hirose S, Matsuda H, Wakisaka A, Aizawa M**: Close association of HLA-Bw51 with Behçet's disease. *Arch Ophthalmol* 100: 1455—1458, 1982.
- 7) **Yamamoto M, Yano A**: Requirement of Ia positive accessory cells in the MLR response against class II antigen on human B cell tumor line. *J Immunol* 135: 3887—3896, 1985.
- 8) **Wakefield D, Abi-Hanna D**: HLA antigens and their significance in the pathogenesis of anterior uveitis. *Curr Eye Res* 5: 465—471, 1986.
- 9) **水木信久, 大野重昭**: HLA 抗原遺伝子の構成と眼疾患との関連. *日眼会誌* 96: 417—431, 1992.
- 10) **Gery I, Robinson WG Jr, Shichi H, El-Saied M, Mochizuki M, Nussenblatt RB, et al**: Differences in susceptibility to experimental autoimmune uveitis among rats of various strains. In: O'Connor GR, et al (Eds): *Advances in Immunology and Immunopathology of the Eye*. Masson Publishing, New York, 242—245, 1985.
- 11) **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.
- 12) **笹本洋一**: 異なる免疫学的遺伝背景をも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. *日眼会誌* 98: 357—361, 1994.
- 13) **Sasamoto Y, Kotake S, Yoshikawa K, Wiggert B, Gery I, Matsuda H**: Interphotoreceptor retinoid-binding protein derived peptide can induce experimental autoimmune uveoretinitis in various rat strains. *Curr Eye Res* 13: 845—849, 1994.
- 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) **Caspi RR, Chan CC, Fujio Y, Oddo S, Najafian F, Bahmanyar S, et al**: Genetic factors in susceptibility and resistance to experimental autoimmune uveoretinitis. *Curr Eye Res* 11: 81—86, 1992.
- 17) **Caspi RR, Grubbs BG, Chan CC, Chader GJ, Wiggert B**: Genetic control of susceptibility to experimental autoimmune uveoretinitis in the mouse model. *J Immunol* 148: 2384—2389, 1992.
- 18) **Happ MP, Wettstein P, Dietzschold B, Heber-Katz E**: Genetic control of the development of experimental allergic encephalomyelitis in rats. *J Immunol* 141: 1489—1494, 1988.
- 19) **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.
- 20) **Itoh R, Ogasawara K, Takami K, Gotohda T, Naruse H, Good RA, et al**: Determination of amino acids on agretopes of pigeon cytochrome C related peptides specifically bound to I-A allelic products. *Eur J Immunol* 24: 76—83, 1994.
- 21) **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.