

学位論文題名

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

学位論文内容の要旨

I. 緒 言

実験的自己免疫性網膜ぶどう膜炎 (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 (IRBP) などの網膜特異抗原を免疫することにより惹起される炎症で、ヒトの内因性ぶどう膜炎のモデルと考えられている。免疫された抗原は、アミノ酸11から15個程度のペプチドとして、抗原提示細胞上の主要組織適合抗原 (MHC) のclass II分子と結合して、CD4陽性のhelper T細胞を活性化し、EAUを惹起すると考えられている。一方、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。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、異なるclass II分子に、それぞれ対応する抗原決定基が結合して、T細胞を活性化するためと考えられてきた。しかし、同一の抗原決定基が異なる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うち、抗原性が最も強く、アミノ酸配列がわかっているR16を用い、主要組織適合抗原 (RT1) のclass II領域 (H, B, D) が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：8-12週齢の雄のラット5系統，LEW (RT1. H^kB^kD^k'), WKAH (RT1. H^kB^kD^k), SDJ (RT1. H^dB^dD^d), LEJ (RT1. H^uB^bD^b), BUF (RT1. H^bB^bD^b)を用いた.

抗原と免疫方法：ウシIRBPのアミノ酸配列1177-1191 (ADGSSWEGVGVVPDV) の合成ペプチドR16を用いた. R16 (100 nmol) を, *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra を含む完全フロインドアジュバントとともに免疫し, *Bordetella pertussis* 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，切片を作製し，光学顕微鏡でEAUの発症の有無と重症度 (0-4) を評価した.

リンパ球増殖反応：所属リンパ節を摘出し，これより単核細胞を得て，³H-TdR 取り込みを測定した. 刺激抗原にはpurified protein derivative (PPD; 25 µg/ml), または, R16 (10 µM) 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，培養液中に抗RT1. B抗体のOX6, または，抗RT1. D抗体のOX17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発症率と重症度

R16免疫によるEAU発症率は，LEWで100 % (20/20眼)，WKAHで75 % (12/16眼)，SDJは0 % (0/12眼) だった. 一方，RT1. H^uB^bD^bを持つLEJは75 % (9/12眼)，RT1. H^bB^bD^bを持つBUFは19 % (3/12眼) しかEAUを発症しなかった. EAUを発症した眼の平均重症度は，LEWで2.35と最も大きく，WKAHは1.67，LEJは1.11，BUF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.

2. 各系統のラットの免疫反応

次に，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で

刺激したところ、全てのラットの系統でstimulation index(S. I.) 8.4以上のリンパ球増殖反応がみられた。また、R16の刺激によるリンパ球増殖反応は、EAUの発症を認めた全ての系統でみられ、10 μ Mで刺激したところ、S. I.はLEWで4.9, WKAHで5.7, LEJで26.7, BUFで4.1であった。EAU発症率の低いBUFも、LEWと同程度のリンパ球増殖反応がみられた。一方、EAUを発症しなかったSDJでは、全く反応を示さなかった。

3. 抗class II抗体によるリンパ球増殖反応の抑制

抑制実験は、LEWおよびLEJで、抗RT1. B, D抗体のOX6, OX17を、1:200, 1:800, 1:3200に希釈して行った。RT1. B^d D^dを持つLEWの抑制率は、OX6により濃度依存性に65~30 %であり、OX17では17~0 %であった。RT1. B^b D^bを持つLEJの抑制率は、OX6で91 %~43 %, OX17は39~10 %で、OX17よりもOX6によって強く抑制された。このことから、R16はRT1. Bに存在する異なるclass II分子、すなわちLEWのIと、LEJのb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EAUを惹起できると考えられていた。しかし、抗原決定基が1個と推定されるR16のように小さなペプチドが、遺伝的背景の異なるラットにEAUを惹起できるとする報告はない。

この実験では、RT1. B, Dに同じハプロタイプbを持つLEJとBUFで、EAUの発症率が大きく異なっていた。しかし、抗class II抗体による抑制実験で、R16はRT1. B^bと結合することが明らかとなった。このことは、EAUの発症にMHC領域だけでなく、non-MHC領域もかかわっていることを推測させる。

R16は、LEWだけでなくWKAH, LEJ, BUFに対しても強いリンパ球増殖反応を誘導できた。これは、EAUの誘発とともに、R16がそれぞれの系統のclass II分子と結合して、T細胞を活性化できることを示している。これまで、LEWではR16感作リンパ球の増殖反応が、OX6によって抑制

されることが報告されていた。今回も、LEWについては同じ結果であり、LEJもOX6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、R16は複数のRT1 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た。

R16は、異なるRT1を有するラットに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。すなわち、異なる系統において、同一ペプチドが眼の炎症や免疫反応を起こす可能性を示した。このことは、ヒトのようにheterogenicityが高い場合でも、特定のペプチドが眼の炎症を誘発することを示唆するものである。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 松 田 英 彦

副 査 教 授 小 野 江 和 則

副 査 教 授 皆 川 知 紀

学 位 論 文 題 名

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

実験的自己免疫性網膜ぶどう膜炎 (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 (IRBP) などの網膜特異抗原を免疫することにより惹起される炎症で、ヒトの内因性ぶどう膜炎のモデルと考えられている。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。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、異なるclass II分子に、それぞれ対応する抗原決定基が結合して、T細胞を活性化するためと考えられてきた。しかし、同一の抗原決定基が異なるclass II分子に結合できることも考えられる。本研究は、この点を明らかにする目的で、IRBP由来の合成ペプチドのうち、抗原性が最も強く、アミノ酸配列がわかっているR16を用い、主要組織適合抗原 (RT1) のclass II領域 (H, B, D)が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。

実験動物は、8-12週齢の雄のラット5系統、LEW (RT1. $H^l B^l D^l$), WKAH (RT1. $H^k B^k D^k$), SDJ (RT1. $H^d B^d D^d$), LEJ (RT1. $H^{ub} B^b D^b$), BUF (RT1. $H^b B^b D^b$)を用い、IRBPのアミノ酸1177-1191の合成ペプチドR16 (100 nmol) を、完全フロインドアジュバントとともに免疫した。免疫後16-18日に眼球を摘出、EAUの発症の有無と重症度 (0-4) を評価した。さらに、所属リンパ節より単核細胞を得て、purified protein derivative (PPD; 25

μg/ml), または, R16 (10 μM) で刺激し, ³H-TdR 取り込みを測定し, stimulation index(S. I.) で示した. また, 抗class II抗体による増殖反応の抑制効果を検討するため, 培養液中に抗RT1. B抗体のOX6, または, 抗RT1. D抗体のOX17を加え反応抑制率を測定した.

その結果, R16免疫によるEAU発症率は, LEWで100 % (20/20眼), WKAHで75 % (12/16眼), SDJは0 % (0/12眼) だった. 一方, LEJは75 % (9/12眼), BUFは19 % (3/12眼) しかEAUを発症しなかった. EAUを発症した眼の平均重症度は, LEWで2.35と最も大きく, WKAHは1.67, LEJは1.11, BUF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. 次に, PPDで刺激したリンパ球増殖反応は, 全てのラットの系統で, S. I.で8.4以上みられた. また, R16の刺激によるリンパ球増殖反応は, EAUの発症を認めた全ての系統でみられ, S. I.はLEWで4.9, WKAHで5.7, LEJで26.7, BUFで4.1であった. EAU発症率の低いBUFも, LEWと同程度のリンパ球増殖反応がみられた. 一方, EAUを発症しなかったSDJでは, 全く反応を示さなかった. LEWおよびLEJで, 抗RT1. B, D抗体のOX6, OX17を, 1:200, 1:800, 1:3200に希釈して抑制実験を行った. LEWの抑制率は, OX6により濃度依存性に65~30 %であり, OX17では17~0 %であった. LEJの抑制率は, OX6で91~43 %, OX17は39~10 %で, OX17よりもOX6によって強く抑制された. このことから, R16はRT1. Bに存在するclass II分子, すなわちLEWの*I*と, LEJの*b*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.

これまで, 抗原決定基が1個と推定されるR16のような小さなペプチドが, 遺伝的背景の異なるラットにEAUを惹起できるとする報告はない. また, R16は, LEWだけでなくWKAH, LEJ, BUFに対しても強いリンパ球増殖反応を誘導できた. これは, EAUの誘発とともに, R16が, それぞれの系統のclass II分子と結合して, T細胞を活性化できることを示している. さらに, 抑制実験の結果から, R16は同じ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.

以上, 本研究により, 異なる系統において, 同一ペプチドが眼の炎症や免疫反応を起こす可能性を示した. このことは, ヒトのようにheterogenicityが高い場合でも, 特定のペプチドが眼の炎症を誘発する可能性を示すものであり, 学術上極めて価値のあるものであり, 博士 (医学) の学位に値するものである.