

学 位 論 文 題 名

Identification of a peptide inducing experimental
autoimmune uveoretinitis(EAU)in H-2A^k-carrying mice

(H-2 A^kを持つマウスにおける実験的自己免疫性網膜ぶどう膜炎惹起ペプチドの同定)

学位論文内容の要旨

実験的自己免疫性網膜ぶどう膜炎 (EAU) はベーチェット病などの内因性ぶどう膜炎の実験モデルとされており、我々はこれまでにラットの系でEAUの研究を行ってきた。しかし現在、各種研究分野においてマウスを使った研究が盛んに行われており、各種抗体、遺伝子導入マウス、欠損マウスなどの実験材料が豊富であることから、ますますマウスでの研究は盛んになってきている。EAUの分野でも最近になってマウスの系での研究が散見されるが、その成果は他の自己免疫疾患の動物モデルの研究に比べてまだまだ遅れている。その原因のひとつとして、マウスでのEAU惹起抗原であるウシ視細胞間レチノイド結合蛋白(IRBP)上の抗原決定基が、マウスのEAUでは同定されていないことがあげられる。そこで我々はマウスにEAUを惹起するIRBPの抗原ペプチドの同定を試みることにした。

以前に決定されたマウスMHC class IIであるH-2A^k分子結合モチーフ(Dxxxxxxxx[A, R, T])を参考にして、ウシIRBP蛋白のアミノ酸配列より6種のペプチド (K1, K2, K3, K4, K5, K6) を選択した。ペプチドは自動ペプチド合成機 (Shimazu PSSM-8) にて合成した。

まず、合成したそれぞれのペプチドに対するT細胞増殖反応について検討した。H-2A^kを有するB10.BR マウス (6~8週齢、雌) を合成したペプチド(50nmol)とCFAとのemulsionで皮下に免疫した。免疫から10日後にリンパ節を摘出し、ナイロンウールカラムに通してT細胞を得た。96穴プレートに、T細胞(4×10^5 /well)、抗原提示細胞として3000radのX線照射した脾細胞(1×10^5 /well)、ペプチド(100 μ Mより10倍希釈)を加え、72時間培養した。³H]-TdRをパルスし、さらに24時間培養後³H]-TdRの取り込みをMatrix96にてカウントした。

I-A^k結合性を基に選択した6種のペプチドは、すべてペプチド抗原特異的T細胞増殖反応を誘導した。

次にこれらのペプチドによりEAUが惹起されるかどうかを検討した。B10.BRマウスをペプチド(50nmol)とCFAのemulsionで皮下に免疫し、さらに同時に百日咳死菌懸濁液 10^{10} を腹腔内に注射した。免疫から28日後に眼球を摘出し、固定後HE染色をして組織学的に診断し、EAUの組織学的診断スコアに従い評価した。

その結果6種のペプチドのうち、1種のペプチド 'K2' で免疫されたマウスの10眼

中 8 眼にEAUの発症が見られ、その平均重症度は2.8であった。他の 5 種のペプチド K1, K3, K4, K5, K6で免疫されたマウスではEAUの発症は見られなかった。

次に他のH-2A^kを持つ系統のマウスにおいてペプチドK2によりEAUの発症が見られるかどうかを検討した。B10.Aマウスは、classII分子はB10.BRマウスと同じであるが、ClassI分子の一部が違う系統であり、B10.A(4R)マウスは、classII分子のH-2Aはkタイプであるが、H-2E分子を持たない系統である。これらのマウスを先ほどと同様の方法でK2を免疫することによりEAUの誘導を行った。B10.BRでは発症率が6/10、平均重症度は1.7であるのに対し、B10.Aではそれぞれ8/10、2.3、B10.A(4R)ではそれぞれ6/10、1.2で、その間に有意差は認められなかった。このことからペプチドK2はClassII分子のH-2A^kに結合してEAUを誘導していることが示唆された。

次にペプチドK2とIRBPとの交叉反応性について検討した。K2 20nmol、IRBP 100 μ gでB10.BRマウスをそれぞれ免疫し、T細胞増殖反応を調べた。K2を免疫して得たT細胞は高濃度のIRBPに対して反応し、また、IRBPを免疫して得たT細胞は高濃度のK2に対して反応した。このように両者は交叉反応性を示したが、このことはIRBPで免疫すると、IRBPが抗原提示細胞内で処理されてペプチドK2が産生され、K2がH-2A^kに結合して抗原提示されていることを示唆している。

ペプチドK2 (IRBP201-216) のアミノ酸配列を見るとH-2A^kに結合するモチーフとなりうる部分が2カ所存在する。一つは202-210(DKDVVLTSS)がモチーフとなる場合、もう一つは204-212(DVVLTSSR)がモチーフとなる場合である。そこで実際にどちらがモチーフとしてH-2A^kに結合しているのかを検討した。202残基のアスパラギン酸(D)をリジン(K)に置換したアナログペプチドK2(202K)と204残基のDをKに置換したアナログペプチドK2(204K)を作成し、B10.BRマウスを免疫してT細胞増殖反応を見た。K2が抗原特異的にT細胞増殖反応を誘導したのに対し、K2(202K)はT細胞増殖反応を誘導しなかった。このことは、202残基のDがMHCとの結合に非常に重要なアミノ酸であったことを意味している。また、K2(204K)はT細胞増殖反応を誘導し、しかもそれはK2と交叉しない抗原特異的なものであった。このことは204のDがMHCとの結合というよりはむしろT細胞との結合に重要なアミノ酸であることを意味している。以上より、K2のアミノ酸配列の中でも202-210がモチーフとしての役割を果たしているものと推察される。

この研究で我々はH-2A^kを持つマウスにおけるウシIRBP由来のEAU惹起ペプチドを同定することができた。これまでは、EAU惹起抗原として使われるIRBP蛋白を精製するには大量のウシの眼球が必要で、その精製も容易ではなく実験の遂行そのものが困難であった。また、抗原が蛋白であるため、MHC分子との結合様式などの詳細な解析には限界があり、さらにその後の発症抑制実験をデザインすることが困難であった。今回IRBP中のEAU惹起ペプチドを同定できたことにより以上の問題が解決され、EAUの研究が促進されると考えられる。今後はこのペプチドを使った発症のメカニズムの解析、また、発症抑制研究を行い、最終的にはヒトの内因性ぶどう膜炎を含む自己免疫疾患の治療に結びつけたい。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 吉 木 敬

副 査 教 授 松 田 英 彦

副 査 教 授 小野江 和 則

学 位 論 文 題 名

Identification of a peptide inducing experimental autoimmune uveoretinitis(EAU)in H-2A^k-carrying mice

(H-2 A^kを持つマウスにおける実験的自己免疫性網膜ぶどう膜炎惹起ペプチドの同定)

実験的自己免疫性網膜ぶどう膜炎 (EAU) は内因性ぶどう膜炎の実験モデルであるが、マウスの系での研究は他の自己免疫疾患の動物モデルの研究に比べてまだまだ遅れている。その原因のひとつとして、マウスでのEAU惹起抗原であるウシ視細胞間レチノイド結合蛋白(IRBP)上の抗原決定基が同定されていないことがあげられる。そこで申請者はマウスにEAUを惹起するIRBPの抗原ペプチドの同定を試みた。マウスMHC class IIであるH-2A^k分子結合モチーフ(Dxxxxxxxx[A, R, T])を参考にして、ウシIRBP蛋白のアミノ酸配列より6種のペプチド (K1, K2, K3, K4, K5, K6) を選択し、合成した。合成したそれぞれのペプチドに対するT細胞増殖反応について検討したところ、すべて抗原特異的T細胞増殖反応をしめた。次にこれらのペプチドによりEAUが惹起されるかどうかを検討したところ、6種のペプチドのうち、1種のペプチド 'K2' で免疫されたマウスにEAUの発症が見られた。他の5種のペプチド K1, K3, K4, K5, K6で免疫されたマウスではEAUの発症は見られなかった。以上よりH-2A^kを持つマウスにおけるウシIRBP由来のEAU惹起ペプチド 'K2' が同定された。次に他のH-2A^kを持つ系統のマウスにおいてペプチドK2によりEAUの発症が見られるかどうかを検討した。B10.Aマウスは、class II分子はB10.BRマウスと同じであるが、Class I分子の一部が違う系統であり、B10.A(4R)マウスは、class II分子のH-2Aはkタイプであるが、H-2E分子を持たない系統である。これらのマウスを先ほどと同様の方法でK2を免疫することによりEAUの誘導を行った。B10.BRでは発症率が6/10、平均重症度は1.7であるのに対し、B10.Aではそれぞれ8/10、2.3、B10.A(4R)ではそれぞれ6/10、1.2で、その間に有意差は認められなかった。このことからペプチドK2はClass II分子のH-2A^kに結合してEAUを誘導していることが示唆された。次にペプチドK2とIRBPとの交叉反応性についての検討をT細胞増殖反応にて調べた。K2を免疫して得たT細胞は高濃度のIRBPに対して反応し、また、IRBPを免疫して得たT細胞は高濃度のK2に対して反応した。このように両者は交叉反応性を示したが、このことはIRBPで免疫すると、IRBPが抗原提示細胞内で処理されてペプチドK2が産生さ

れ、K2がH-2A^kに結合して抗原提示されていることを示唆している。K2にはH-2A^kに結合するモチーフとなりうる部分が2カ所存在するため、どちらがモチーフとしてH-2A^kに結合しているのかを検討した。202残基、204残基のアスパラギン酸(D)をリジン(K)に置換したアナログペプチドK2(202K)、K2(204K)を作成し、B10.BRマウスを免疫してT細胞増殖反応を見た。K2(202K)ではT細胞増殖反応が誘導されず、K2(204K)ではT細胞増殖反応が誘導された。このことは202残基のDがMHCとの結合に非常に重要なアミノ酸であり、204残基のDがMHCとの結合というよりはむしろT細胞との結合に重要なアミノ酸であることを意味している。以上より、K2のアミノ酸配列の中でも202-210がモチーフとしての役割を果たしているものと推察される。口頭発表にあたり、副査免疫科学研究所病理部門小野江教授より、K2以外のペプチドでは病原性がみられなかった事に対して、病原性にかかわる因子についての質問があり、申請者は病原性については免疫原性の強さ以外に血液網膜間柵、マウス網膜との交叉反応性など複雑な因子が関与している可能性を述べた。その後、副査眼科松田教授より、ラットの系に加えて今回のマウスの系で実験をすることの意義についての質問と、ヒトへの応用への考えについての質問があった。申請者は前者については種を越えて同じ結果を得ることはヒトへの応用への可能性が高まるとの回答をし、後者についてはヒトのブドウ膜炎の抗原蛋白が発見された際にはその中の抗原ペプチドを決定することにより治療の巾が広がる可能性があるとの回答をした。次いで、主査第1病理吉木教授より、MHC class II E分子のEAU発症への関与の可能性についての質問があった。申請者は、今回の結果からはH-2A^kの関与は明らかであるがH-2E^kの関与については完全に否定できない旨の回答をした。

この論文は、これまでのマウスでのEAUでは抗原が蛋白であるため、MHC分子との結合様式などの詳細な解析には限界があり、さらにその後の発症抑制実験をデザインすることが困難であったが、今回IRBP中のEAU惹起ペプチドを同定できたことにより以上の問題が解決されるという点で評価される。今後はこのペプチドを使った発症のメカニズムの解析、また、発症抑制研究がおこなわれ、最終的にはヒトの内因性ぶどう膜炎を含む自己免疫疾患の治療に生かされることが期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位等も併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。