

## 合成ペプチド抗原を使用した ヒトサイログロブリンエピトープの研究

加藤亮二<sup>1)</sup>, 丸山正幸<sup>2)</sup>, 亀子文子<sup>1)</sup>, 高宮 脩<sup>1)</sup>  
菅谷 昭<sup>2)</sup>

### Studies of Antigenic Determinants on Human Thyroglobulin using Synthetic Peptides

The antigenic determinants of thyroglobulin (Tg) using the amount of antibodies produced in cultured human lymphocytes from peripheral blood by the stimulation of either native Tg or 8 kinds of the synthetic peptides from Tg were examined in this study.

The serums or lymphocytes from the peripheral blood were obtained from 2 patients with chronic thyroiditis, 2 patients with Graves' disease and 2 normal controls. The  $10^6$  of lymphocytes per each well in the microplate were cultured with  $1 \mu\text{g/ml}$  Tg or synthetic peptides for 3 to 6 days. Thereafter, the amount of antibodies in the supernatants were measured by enzyme-linked immunosorbent assay in the wells bound by either Tg or synthetic peptides prior.

In 1 case of chronic thyroiditis, significant titer of antibodies against Tg or 2 kinds of synthetic peptides were observed, whereas normal control and cultivation with medium alone never showed the productions of antibodies. The reactions between synthetic peptides and autoantibodies in the serum from patients with both chronic thyroiditis or Graves' disease were also observed.

Our results suggested that the 2 kinds of synthetic peptides might reflect the activating determinants related to producing the autoantibodies, and molecular mimicry of antigen might be associated with the mechanism of yielding the autoantibodies in this portion.

#### Key Words :

Synthetic Peptide (合成ペプチド), Lymphocyte from Peripheral Blood (末梢血リンパ球), Thyroglobulin (サイログロブリン), B Cell Response (B細胞応答), T Cell Response (T細胞応答)

1) 信州大学医療技術短期大学部衛生技術学科 ; KATO Ryoji, KAMEKO Fumiko, TAKAMIYA Osamu, Dept. of Medical Technology, School of Allied Medical Sciences, Shinshu Univ.

2) 信州大学医学部第二外科 ; MARUYAMA Masayuki, SUGENOYA Akira, Second Dept. of Surgery, Shinshu Univ. School of Medicine

## はじめに

慢性甲状腺炎やバセドウ病の自己免疫性甲状腺疾患患者血清中には甲状腺特異自己抗原（サイログロブリン；Tg, 甲状腺ペルオキシダーゼ；TPO および TSH レセプター；TSHr）に対する抗体が存在することが知られている。一方、マウスにこれらの抗原を投与すると実験的自己免疫性甲状腺疾患（EAT）が誘導できるとの報告がある<sup>1)</sup>。このうち Tg に対する免疫応答はマウスの系統により異なり<sup>2)</sup>、さらに、Native-Tg (N-Tg) とフラグメント化した Tg (F-Tg) の違いでもその応答は異なると言われている<sup>3)</sup>。Tg は分子量 660 kD の糖蛋白抗原であり、その分子表面に多数の抗原決定基を有している。自己免疫応答により認識されるエピトープは明らかにされていないが、自己抗体の認識部位は Tg の高次構造あるいはきわめて限られた領域であるとの推測がなされている<sup>4)</sup>。そこで、自己抗体の認識部位を明らかにするために Tg 合成ペプチドを作成し、これらを抗原としたヒトリンパ球の抗 Tg 抗体産生能実験を行ったので報告する。

## 材料および方法

### 1. 測定対象

測定対象は抗 Tg 抗体価 $20^2 \sim 320^2$ 、抗 TPO 抗体価 $20^2 \sim 320^2$ の自己抗体を有する慢性甲状腺炎 2 例、バセドウ病 2 例および健常者 2 例である。両抗体価は凝集法（富士レビオ社）にて測定され、 $10^2$ 以上が陽性とされた。

### 2. 自己抗原の作成

#### 1) Tg 抗原

手術時に得られたバセドウ病組織 100 g から Tg 抗原を精製した<sup>5)</sup>。組織を 100 mM のリン酸緩衝液（PBS：pH7.2, 150 mM NaCl）

でホモジナイズし遠心後、上清を 1.9 M 硫酸で塩析した。それを PBS で透析し、さらに ACA 34 (LKB) でゲルろ過し Tg を得た。蛋白量は UV 比色法 (280 nm) で求めた。

#### 2) Tg 合成ペプチド抗原

Tg のアミノ酸配列から予測抗原決定基を含む 8 ケ所を選択し対応するペプチド 8 種類を Multiple Antigen Peptide System (MAP 法) で合成した。ペプチドの内訳は表 1 の如く No. 1 ~ No. 8 とした。

表 1 サイログロブリン合成ペプチド

No	ペプチド No	アミノ酸部位
1.	2177	1-15
2.	2178	2561-2579
3.	2179	2735-2748
4.	2180	134-152
5.	2181	331-349
6.	2182	1000-1018
7.	2183	1474-1492
8.	2184	1824-1842

### 3. 抗 Tg 自己抗体測定法

Kato ら<sup>6)</sup>の高感度 ELISA 法で測定した。すなわち、精製 Tg 結合マイクロプレート固相にサンプル液 25  $\mu$ l, 1% 牛胎児血清加リン酸緩衝液（以下 FCS 緩衝液）50  $\mu$ l を入れ 30 分間反応させた。その後 4 回洗浄を行い、ペルオキシダーゼ標識プロテイン A 液（Dako 社）を 100  $\mu$ l 入れ、30 分間反応させた。さらに 4 回洗浄後テトラメチルペンチジン（TMB）を 100  $\mu$ l を入れ 30 分間反応後比色し抗 Tg 抗体価を求めた。なお判定は同時に測定した健常者血清の吸光度が平均 + 3SD を超えるものを陽性とした。

### 4. Tg 合成ペプチドと自己抗体の反応

Peptide Coating Kit (TAKARA) を使用して 8 種類の合成ペプチドを固相化した。専

用のマイクロプレートに  $2 \mu\text{g}/\text{Well}$  の Tg 合成ペプチドとリアクション液  $10 \mu\text{l}$  を入れ室温で2時間反応させた。その後蒸留水で洗浄し、使用まで低温乾燥状態で保存した。使用の際は直前に2時間ブロッキングを行った。測定方法はサンプル  $25 \mu\text{l}$  を合成ペプチド結合固相に入れ室温で30分間反応させ洗浄後、ペルオキシダーゼ結合抗ヒト IgG (HRP-AHIgG) を  $100 \mu\text{l}$  加え室温で30分間反応させた。以下抗 Tg 抗体と同様な方法で発色させ、吸光度を求めた。

### 5. ヒトリンパ球の採取

ヘパリン入りの真空採血管で患者当り末梢血  $10 \text{ ml}$  を採血し、これと等量の PBS を加え希釈した。別の試験管に  $3 \text{ ml}$  の Ficoll-Hypaque (比重  $1.077$ : ファルマシア社) を取り、これに希釈した血液  $5 \sim 6 \text{ ml}$  を静かに重層した。  $1500$  回転  $30$  分間遠心を行い、リンパ球層を回収した。リンパ球を3倍量の PBS と混和後  $700$  回転で  $10$  分間遠心し、沈渣の細胞を2回洗浄した。沈渣に PBS  $1 \text{ ml}$  を入れ細胞浮遊液を作成し、細胞数を算出した。

### 6. 抗原刺激によるリンパ球の抗体産生能試験

無菌的に  $10^6/\text{ml}$  に調整したリンパ球浮遊液  $100 \mu\text{l}$  に Tg 抗原  $100 \text{ ng} \sim 1 \mu\text{g}/\text{ml}$  または Tg 合成ペプチド  $100 \text{ ng}/\text{ml}$  をそれぞれ  $100 \mu\text{l}$  入れ  $3 \sim 6$  日間培養した方法と  $10^6/\text{ml}$  リンパ球浮遊液に Tg 抗原  $1 \mu\text{g}/\text{ml}$  を入れ  $30$  分間反応させた後、リンパ球を洗浄して Tg 抗原を除去した方法の2法で抗体産生能を比較した。抗体測定は毎日採取した培養液を用いて ELISA で行った。

## 結果

### 1. リンパ球数と Tg 抗原量の検討

リンパ球数  $10^4/\text{ml}$ ,  $10^5/\text{ml}$ ,  $10^6/\text{ml}$  に  $100 \text{ ng}/\text{ml}$  と  $1 \mu\text{g}/\text{ml}$  の Tg 抗原をそれぞれ添加して培養したところ、  $10^6/\text{ml}$  のリンパ球数において図1示すように、いずれの抗原濃度においても Tg 抗体の産生が認められた。抗原量  $100 \text{ ng}/\text{ml}$  に比べ  $1 \mu\text{g}/\text{ml}$  は抗体産生量が多い結果であった。リンパ球数  $10^4/\text{ml} \sim 10^5/\text{ml}$  では  $10^6/\text{ml}$  に比べ抗体産生量は低い傾向であった。

ng/ml と  $1 \mu\text{g}/\text{ml}$  の Tg 抗原をそれぞれ添加して培養したところ、  $10^6/\text{ml}$  のリンパ球数において図1示すように、いずれの抗原濃度においても Tg 抗体の産生が認められた。抗原量  $100 \text{ ng}/\text{ml}$  に比べ  $1 \mu\text{g}/\text{ml}$  は抗体産生量が多い結果であった。リンパ球数  $10^4/\text{ml} \sim 10^5/\text{ml}$  では  $10^6/\text{ml}$  に比べ抗体産生量は低い傾向であった。

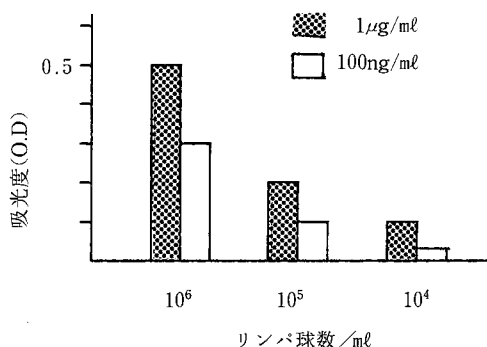
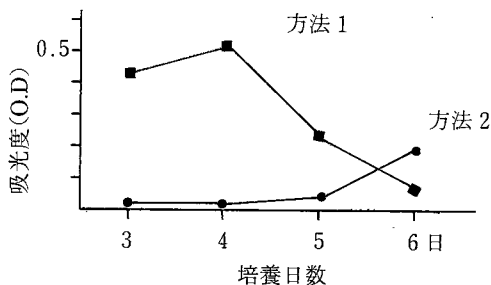


図1 リンパ球数と抗体産生量

### 2. 抗原刺激法の検討

抗原存在下で培養する方法と抗原刺激後抗原を除去して培養する2法で抗体産生能を検討したところ、両者の方法で抗 Tg 抗体は検出された。しかし、前者では抗原の存在が抗 Tg 抗体測定系に影響を及ぼすことが考えられることから以後は後者の方法で行った (図2)。



方法1: 抗原+リンパ球⇒培養

方法2: 抗原+リンパ球⇒洗浄⇒培養

図2 Tg 抗原刺激法の違いによる抗体産生

### 3. Tg 自己抗原刺激による抗体産生能

慢性甲状腺炎患者 2 例および健常者 2 例のリンパ球浮遊液に Tg 抗原を入れて抗 Tg 抗体産生能を調べた。図 3 に示すように、抗原刺激から 5 日目に慢性甲状腺炎患者 1 例から Tg 抗体が検出された。健常人 2 例は抗体の検出を認めなかった。また、リンパ球に緩衝液のみを入れた系でも抗体産生を認めなかった。

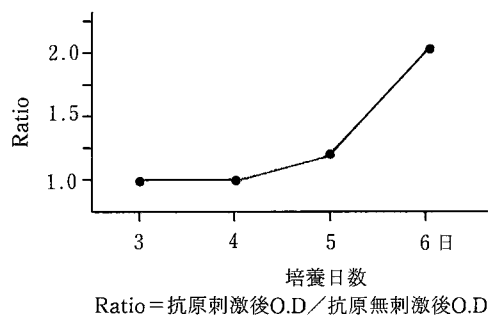


図 3 Tg 抗原刺激による抗体産生

### 4. Tg 合成ペプチド刺激による抗体産生能

前記 3 と同じ症例について 8 種類の合成ペ

プチドでリンパ球刺激試験を行ったところ、図 4 に示すように、No. 2, No. 3, No. 5 の合成ペプチドに対して抗 Tg 抗体を認めた。

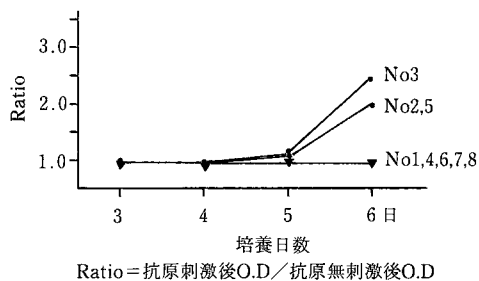


図 4 合成ペプチド抗原刺激による抗体産生

### 5. Tg 合成ペプチドと自己抗体の反応性

慢性甲状腺炎 2 例、バセドウ病 2 例および健常者 2 例の血清を使用して Tg 合成ペプチドとの反応性を調べたところ、表 2 に示すように No. 3, No. 5, No. 6, No. 8 の合成ペプチドと各自己抗体の間で反応を認めた。

表 2 Tg 合成ペプチドと自己抗体の反応

	No.	Tg 合成ペプチド							
		1	2	3	4	5	6	7	8
自己抗体陽性血清 A		—	—	2+	—	2+	2+	—	2+
〃 B		—	—	2+	—	2+	2+	—	2+
〃 C		—	—	—	—	±	—	—	—
〃 D		—	—	±	—	±	—	—	—
正常血清 A		—	—	—	—	—	—	—	—
〃 B		—	—	—	—	—	—	—	—
抗 Tg 免疫抗体		2+	±	±	3+	±	±	+	±

(結果) — : O. D. ~0.010  
 ± : O. D. 0.010~0.100  
 + : O. D. 0.100~0.300  
 2+ : O. D. 0.300~0.600  
 3+ : O. D. 0.600~

## 考察

Tg 自己抗原と Tg 合成ペプチドに対する自己免疫応答を明らかにする目的で慢性甲状腺患者から得られたリンパ球を用いて解析したところ、Tg および合成ペプチドと患者リンパ球は明らかな応答を認めた。Tg 抗原や合成ペプチドを添加しなかった対照リンパ球や健常者リンパ球は応答を認めなかったことからこの反応は特異反応と考えられた。

本来正常個体の免疫担当細胞は Tg とは免疫応答を示さない。Tg のように健常者血中に微量に存在する物質は T 細胞トレランスが関与していると考えられており、Burnet<sup>7)</sup>らにより T 細胞の Clonal deletion モデルとして提唱されている。しかし、Penhale<sup>8)</sup>らの実験で指摘されたように、胸腺を摘出し放射線を照射したラットに甲状腺炎が発症したことは自己抗原に反応する T 細胞が胸腺以外に存在していることを意味し、T 細胞トレランスは自己の T 細胞機能を制御する別の T 細胞の存在をも示唆している。

最近、ヒト Tg の cDNA<sup>9)</sup>が明らかにされ、全アミノ酸配列を手がかりにエピトープの解析が行われている。Tg は分子量が大きくエピトープ数が多いため、特異的な免疫応答を観察する手段はきわめて少ない。さらに抗 Tg 自己抗体は高次構造を認識しているともいわれ<sup>10)</sup>、一次構造を有するペプチドからのアプローチは困難であると考えられていた。しかし、今回の結果から患者末梢血リンパ球中の自己抗原認識クローンは Tg およびその合成ペプチド抗原に対して抗 Tg 抗体を産生した。また患者血清中の自己抗体と数種のペプチド抗原の間で反応が認められた。特に No. 3, No. 5 の合成ペプチドは患者リンパ球に対する刺激活性および自己抗体との反応の

両者に比較的高い抗原活性を持つことから、自己抗体の産生機序に関する仮説として従来から唱えられている<sup>11)</sup>ウイルス等の外来抗原との相同性および修飾された抗原との交差反応 (molecular mimicry) が関与していると考えられた。さらに、これらが残存する Tg 特異的認識 T 細胞と反応することが推測される。

いずれにしても Tg を認識する T 細胞クローンとペプチド抗原 (変異抗原とする) を認識する T 細胞クローンの量的な制御バランスも考えられ、お互いの増減が自己抗体産生に寄与していることも否定はできないと思われた。また、今後、リンパ球の刺激活性を持つ領域のペプチドを用いた実験的甲状腺炎の発症に関連した Tg 遺伝子の存在の有無の検索が期待される。

## 参考文献

- 1) Rose N R, Twarog F J and Growle A T: Murine thyroiditis: Importance of adjuvant and mouse strain for induction of thyroid lesions. *J Immunol*, 106: 698-704, 1971.
- 2) Beisel K W, et al.: Regulation of experimental autoimmune thyroiditis. *Immunogenetics*, 15: 427-430, 1982.
- 3) Kohno Y, et al.: Interspecies cross reactive determinants of thyroglobulin recognized by autoantibodies. *Clin exp Immunol*, 61: 44-48, 1985.
- 4) Salamero J R et al.: Experimental autoimmune thyroiditis induced by a 5-10kDa tryptic fragment from porcine thyroglobulin. *Eur J Immunol*, 17: 843-848, 1987.
- 5) Shulman S and Armenia J P: Studies on thyroid proteins. *J Biol Chem*, 238: 2723-2731, 1963.
- 6) Kato R, et al.: A sensitive EIA of anti-thyroglobulin autoantibody. 5th International

Congress of Immunology. p177. 1983.

7) Burnet F M : The clonal selectin theory of acquired immunity. Cambridge University Press, London. 1959.

8) Penhale W J, et al. : Spontaneous thyroiditis in thymectomized and irradiated Wistar rats. Clin exp Immunol, 15 : 225-236, 1973.

9) Malthier Y and Lissitzky S: Primary structure of human thyroglobulin deduced from the sequence of its 8448-base complementary DNA. Eur J Biochem, 491-498, 1987.

10) Shimojo N, et al. : Antigenic determinants on thyroglobulin : comparison of reactivities of different thyroglobulin preparations with serum antibodies and T cell of patients with chronic thyroiditis. Clin Endocrinol Metab, 66 : 689-69, 1988.

11) Oldstone MBA : Molecular mimicry and autoimmune disease. Cell, 50 : 819-820. 1987.

受付日 : 1995年10月16日

受理日 : 1995年11月21日