

サイログロブリンおよびその合成ペプチド抗原に 対するバセドウ病患者 T 細胞の反応性

加藤亮二¹⁾, 奥山英理子²⁾, 亀子文子¹⁾
春日好雄²⁾, 吉沢 要³⁾, 降旗謙一⁴⁾

Reactivity of the T-Cells in Graves' disease to human thyroglobulin and synthetic peptides

Graves' disease is a common organ specific disorder characterized by immune response toward a number of thyroid proteins including thyroglobulin (Tg), thyroid peroxidase (TPO), and TSH receptor.

Although considerable progress has been made in understanding and mapping the response of autoantibodies to Tg, much less is known about recognition of Tg by pathogenic T-cell in human diseases.

To identify such reactions, we analyzed the proliferative responses of T-cells in the peripheral blood (PBMC) to Tg and to synthetic peptides.

Nineteen patients with Graves' disease, 2 patients with chronic thyroiditis, and 5 normal subjects were studied.

PBMC from 4 of the patients with Graves' disease reacted to Tg. Their reactivities to synthetic peptides were less than that to Tg.

This may lead to a design of more accurate and specific diagnostic assays for the cellular immunity to the thyroid antigens in autoimmune thyroid disorders as well as to the development of specific immunotherapy for the disorders.

Key Words :

T-cell (T 細胞), Proliferation (増殖), Thyroglobulin (サイログロブリン), Synthetic pep-

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

2) 信州大学医学部第二外科; OKUYAMA Eriko, KASUGA Yoshio, Dept. of Surgery, Shinshu Univ, School of Medicine.

3) 信州大学医学部第二内科; YOSHIZAWA Kaname, Dept. of Internal Medicine, Shinshu Univ, School of Medicine.

4) 信州大学医学部臨床検査医学; FURIHATA Kenichi, Dept. of Laboratory Medicine, Shinshu Univ, School of Medicine.

tides (合成ペプチド)

はじめに

バセドウ病の患者血清中には、甲状腺自己抗原に対する自己抗体が存在する。また、マウスなどの実験動物に自己抗原を投与すると実験自己免疫疾患 (EAT) が誘導できることが知られている¹⁾。マウスの EAT の発症には自己抗原、特にサイログロブリン (Tg) の特定のエピトープに対する T 細胞の免疫応答が関与すると言われている²⁾。この自己免疫応答により認識される Tg 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場所であるとの報告がある^{3,4)}。そこで、T 細胞が認識する Tg のエピトープを解析するために、Tg およびその合成ペプチドを用いて検討した。

材料および方法

1. 測定対象

測定対象には抗サイログロブリン自己抗体 (抗 Tg 自己抗体) 陽性のバセドウ病 19 例と健常者 5 例を用い、この症例からリンパ球を採取した。さらに、抗 Tg 自己抗体陽性血清のバセドウ病 2 例および橋本病 2 例と健常者 1 例をウエスタンブロットに使用した。

2. ヒトリンパ球の採取法

ヘパリン処理真空採血管で患者あたり 10 ml 採血し、これと等量のリン酸緩衝液 (PBS) を加えて希釈した。別の試験管に 3 ml の Ficoll-Hypaque (比重 1.077: ファルマシア社) を取り、これに希釈血液 5~6 ml を静かに重層して、700×g 30 分間遠心を行った。白い帯状のリンパ球層を回収して、およそ 3 倍程度の PBS と混和後、700×g 10

分間遠心して細胞を洗浄した。この操作を 2 回繰り返した後に沈渣を PBS で希釈後、細胞数を算出した。なお、以上の操作は無菌的に行った。

3. リンパ球の ³H-Thymidine 摂取率

リンパ球浮遊液 100μl (2×10⁵/well) を 96well マイクロプレートの各 well に入れ、これに ①バセドウ組織粗抗原 10² 希釈液/well ②Tg 10ng/well ③Tg 合成ペプチド 10ng/well, 対照 (培養液) をそれぞれ 100μl 加えて培養した。培養 6 日目に ³H-Thymidine を 0.5μCi/well になるように各 well に添加して、さらに 16 時間培養した。その後リンパ球をハーベスタで捕獲し、液体シンチレーションカウンター (パッカード社) で計測して ³H-Thymidine 摂取率を求めた。なお、抗 Tg 抗体測定用としてペプチドと Tg 抗原を添加した well から、培養 6 日目に上清 100μl を採取した。

4. バセドウ病組織粗抗原と Tg の精製

実験に使用した抗原の精製は手術後、速やかに得られた新鮮バセドウ病甲状腺組織 5g 程度を 0.05M/l のリン酸緩衝液 (pH7.2) と共にガラスホモジナイザーでホモジナイズして 12,000×g 20 分間遠心した。上清をミリポアフィルター (0.22μ) でろ過後、培養液 (RPMI1640+10%FCS) で 10²~10⁶ まで希釈したものを組織抗原として使用した。精製 Tg はホモジネートの遠心上清を 1.9M 硫酸で塩析し、PBS で透析後、ACA34 (LKB) によるゲルろ過法で作成した。蛋白質量は紫外部 (280nm) による比色法で求め、抗原は使用時までそれぞれ凍結保存した。

5. Tg 合成ペプチドの作成

Tg のアミノ酸配列から予測抗原決定基を

表1 Tg 成ペプチドの種類とアミノ酸配列

Peptide No	Residue Range	Amino Acid Sequence
No 1	1 - 15	NIFEYQVDAQPLRPC
No 2	2561 - 2579	ENATRDYFIICPIIDMASAC
No 3	2735 - 2748	CLLSLQEPGSKTYSK
No 4	134 - 152	QLGRPKRCPRSCCEIRNRRLC
No 5	331 - 349	RQQGEPPSCAEGQSCASERC
No 6	1000 - 1018	LLRSGPYMPQCDAFGSWEC
No 7	1474 - 1492	PVGRTTISAGAFSQTHCVTC
No 8	1824 - 1842	ASPTEAGLTTELFSPVDLNC

含む8種類のペプチドをMAP法にて合成した。表1に8種のペプチドのアミノ酸配列を示した。

6. 培養液中の抗Tg自己抗体測定法

katoら⁵⁾の高感度抗Tg自己抗体測定法を用いた。Tg結合固相に培養上清25 μ l, 1%牛胎児血清加リン酸緩衝液(以下FCS緩衝液)50 μ lを入れ, 30分反応させた。洗浄後ペルオキシダーゼ標識抗ヒトIgG(HRP-AHIgG:Dako社)を100 μ l加え, 30分間反応させた。洗浄後テトラメチルベンチジン(TMB)を100 μ l加え30分間反応させた後比色し, 抗Tg抗体価を求めた。なお陽性の判定は同時に測定した健常者血清の平均吸光度+3SDを超えるものとした。

7. 酵素分解によるTgフラグメントの作成

Tg(1mg/ml)500 μ lに対してV8プロテアーゼ(1mg/ml:Sigma社)を50 μ l加え, 室温で1時間分解後, プロテアーゼ反応を停止, これを小分けして-80 $^{\circ}$ Cで保存した。

8. TgおよびTgフラグメントのウエスタンブロッティング

TgおよびTgフラグメントと抗Tg自己

抗体の反応性を検索するためにTgとそのフラグメントをSDS-PAGE後, ウエスタンブロッティングを行い, それぞれの自己抗体と反応させた。

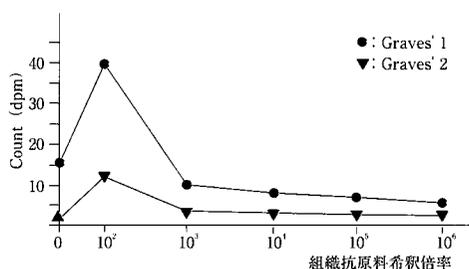


図1 組織抗原量における³H-Thymidine 摂取率試験

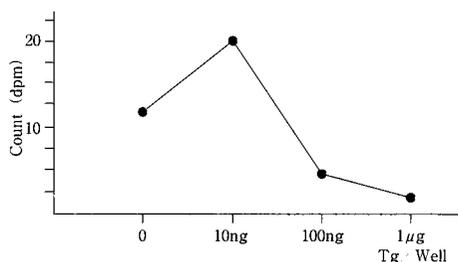


図2 Tg 抗原濃度における³H-Tymidine 摂取率試験

結果

1. ³H-Thymidine 摂取率における最適リンパ球数の検討

細胞数を決定するために、リンパ球数を 1×10^5 /well から 1×10^6 /well までの5濃度を作成して調べたところ、³H-Thymidine 摂取率は 3×10^5 /well をピークに前後で減少した。実験には正常コントロールの³H崩壊カウントが1000~3000dpm程度が望ましいことから、以下の実験では 2×10^5 /well の数を使用した。

2. ³H-Thymidine の摂取率における抗原量の検討

a. 組織粗抗原量の検討

使用する抗原量を決定するためにバセドウ

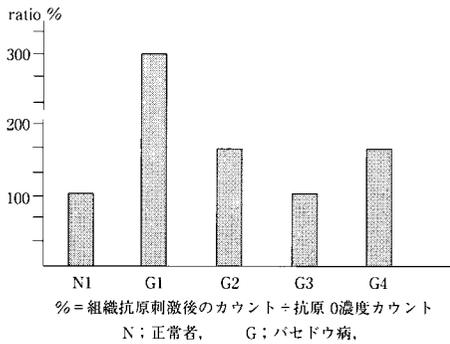


図3 組織抗原刺激における³H-Thymidine 摂取率試験

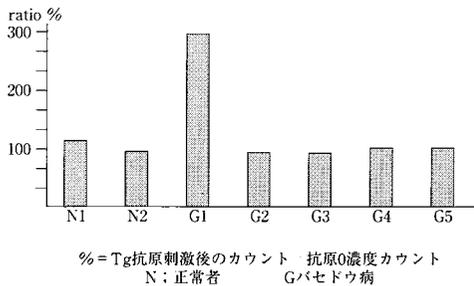


図4 Tg 抗原刺激における³H-Thymidine 摂取率試験

甲状腺組織ホモジネート（蛋白量1.2mg/ml）を $10^2 \sim 10^6$ 倍に希釈して調べたところ、図1に示すように³H-Thymidine 摂取率は0濃度に比べ 10^3 倍にピークを認めたので以下の実験にはこの抗原を使用した。

b. Tg 抗原量の検討

至適 Tg 抗原量を決定するために Tg 0 ~ 1 μg/well までの4種類の濃度で調べたところ、図2に示すように³H-Thymidine 摂取率は Tg 抗原10ng/well にピークを認めたが、それ以上の Tg 抗原量の増加では³H-Thymidine の取り込み量は減少した。以上の結果から10ng/well の Tg 抗原を使用した。

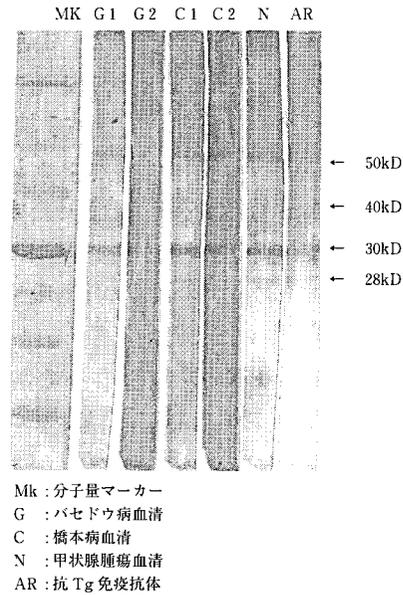


図5 Tg ラグメントと自己抗体のウエスタンブロット

3. 組織粗抗原刺激による³H-Thymidineの摂取率

正常1例, バセドウ病4例のリンパ球を使用して組織粗抗原刺激(10²倍希釈)による³H-Thymidineの摂取率を検討した. 図3に示すように組織抗原で刺激後, 得られたカウント数を刺激なしのカウント数との比(%)で表した. バセドウ病4例中2例では200%以上の高い摂取率が得られ, 他の2例は167%と100%であった.

4. Tg抗原刺激による³H-Thymidineの摂取率

正常2例, バセドウ病5例のリンパ球でTg抗原(10ng/well)刺激による³H-Thymidineの摂取率を求めた. 図4に示すようにTg抗原で刺激後得られたカウントと刺激なしのカウントとの比(%)を求めたところ, バセドウ病5例中1例に292%の摂取率の増加が認められた. 他の4例は正常者と同等の結果であった.

5. ペプチド抗原刺激による³H-Thymidineの摂取率

正常2例, バセドウ病10例のリンパ球を8種類のペプチド抗原(10ng/well)で刺激して³H-Thymidineの摂取率を求めた. 表2に示すようにペプチド抗原で刺激後, 得られた%はバセドウ病10例中1例でペプチドN02, No7およびNo8の刺激で高い摂取率が得られた. 結果には示していないが, この症例の培養上清中の抗Tg抗体量を調べたところNo2のペプチド刺激で抗体量の増加が認められた.

6. ウェスタンブロット

V8プロテアーゼで分解したTgフラグメントをSDS-PAGE後にニトロセルロース膜に転写して40倍希釈した自己抗体陽性血清(バセドウ病2例, 橋本病2例, 良性腫瘍1例)と免疫抗Tg抗体を反応させた結果を図

5に示した. 対照の化学染色されたサンプルでは15~16本の多数バンドが確認されたのに対して自己抗体を使用した免疫染色では50, 40, 30, 28kDaに強いバンドがそれぞれ認められた.

表2 8種類のペプチド抗原刺激による³H-Thymidine 摂取率試験

	1	2	3	4	5	6	7	8
N1	207	118	84	88	77	86	65	99
N2	42	41	60	44	41	84	63	80
G1	125	34	49	46	40	38	49	60
G2	182	99	111	62	62	71	74	68
G3	68	80	91	71	85	60	95	104
G4	130	104	70	55	58	64	83	84
G5	51	49	42	44	53	41	71	67
G6	52	56	28	58	55	38	98	89
G7	151	306*	147	193*	223*	141	270*	379*
G8	107	70	61	61	61	32	54	60
G9	128	100	86	101	74	101	89	83
G10	166	62	76	88	75	40	65	90

単位=%

%=ペプチド抗原刺激後のカウント/抗原0濃度カウント

N; 正常者

G; セドウ病

*: 有意差あり

考察

Tgのように健常者血中に微量に存在する物質はもともと正常個体の免疫担当細胞と免疫応答を示さない. それはT細胞トレランスによるものと考えられており, Burnetら⁶⁾によりT細胞のClonal deletionモデルとして提唱されている. 一方, Penhale⁷⁾らの実験の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細胞の存在を意味し, 自己のT細胞機能を制御する別のT細胞の存在を示唆している. T細胞の分化はT細胞レセプターへの抗原提示時に強い反応性を持つタイプ(ネガティブセクション)と弱く反応するタイプ(ポジティブセクション)およ

びほとんど反応しないタイプに分類され、ポジティブセレクションされたT細胞のみ生存することが知られている。ポジティブ/ネガティブセレクションには抗原提示時の濃度と親和性が関係あるとされ、抗原の低濃度と弱親和性の場合にポジティブセレクションは起こり易いとされる。

最近、Tgの全アミノ酸の配列からエピトープに関する研究がなされているが⁹⁻¹¹⁾、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。そこで、Tgの合成ペプチドを作成してT細胞の自己免疫応答を解析した。まず、バセドウ病組織のホモジネートを抗原としてバセドウ病患者リンパ球への³H-Thymidine 摂取率を指標とした実験を行ったところ、50%以上の症例で高い摂取率を得た。このことは甲状腺組織内にリンパ球を刺激・増殖分化させる物質の存在が示唆され、ホモジネート中に存在する甲状腺自己抗原のTg、TPO、TSHレセプターやサイトカイン等との反応が推測された。同様に抗原を既製の精製TgとTg合成ペプチドを使用して実験を行った結果、Tgや合成ペプチドに対して高い摂取率を示す例が認められた。また、ウエスタンブロット法でTgを分解して得られたTgフラグメントと自己抗体の間で特定なバンドを認めたことや合成ペプチド(No 2)のような小さなフラグメントに対して抗Tg抗体の産生とリンパ球にレスポンスを認めたことは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¹²⁾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)が関与しているとも考えられた。しかし、Tgとその合成ペプチド刺激に対するproliferationが一致しなかったのはTgのエピトープを認識

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細胞クローンとの量的な制御バランスの結果とも考えられ、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。

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) Kato R, et al. : A sensitive EIA of anti-thyroglobulin autoantibody. 5th International Congress of Immunology. p177. 1983.
- 6) Burnet FM : The clonal selection theory of acquired immunity. Cambridge University Press, London. 1959.
- 7) Penhale W J, et al. : Spontaneous thyroiditis in thymectomized and in radiated Wistar rats. *Clin exp Immunol*, 15 : 225-236, 1973.
- 8) Malthiery Y and Lissitzky S : Primary structure of human thyroglobulin deduced from the sequence of its 8448-base complementary DNA. *Eur J Biochem*, 165 : 491-498, 1987.
- 9) Shimojo N, et al. : Antigenic determinants

thyroglobulin : comparison of reactivities of different thyroglobulin preparations with serum antibodies and T cell of patients with chronic thyroiditis. *J Clin Endocrinol Metab*, 66 : 689-69, 1988.

10) Soliman M, et al. : T-Cell Reactivity to Recombinant Human Thyrotropin Receptor Extracellular Domain and Thyroglobulin in Patients with Autoimmune and Non autoimmune Thyroid Disease. *J Clin Endocri Metabo*. 80 : 206-213. 1995.

11) Soliman M, et al. : T-Cells Recognize Multiple Epitopes in the Human Thyrotropin Receptor Extracellular domain. *Jounal Clinical Endocri Metabo*. 80 : 905-914. 1995.

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

受付日 : 1996年10月15日

受理日 : 1996年11月27日