

〔綜 説〕

# 合成ペプチドを用いた免疫療法の新しい戦略 —ペプチドスーパーアゴニスト同定法の開発—

熊本大学大学院医学研究科 脳・免疫統合科学系 免疫識別学講座

松下 祥

**Key words** : combinatorial peptide library — mass spectrometry — peptide superagonist

はじめに

ペプチドスーパーアゴニストの概念

抗原ペプチド上のアミノ酸を1残基置換したアナログで刺激することにより、T細胞の応答は量的あるいは質的に変化することが明らかにされてきた。実際、アナログペプチドのヒトへの有効な応用例がいくつか報告されている。基礎免疫学的な背景については拙著<sup>1)</sup>を参照されたい。最近我々は、このような従来型の1残基置換によるアナログではなく、コンビナトリアルペプチドライブラリーと質量分析機を利用することにより、多残基置換によるアナログを同定する方法を開発した<sup>2)</sup>。一方、このようなペプチドの作用機序はTCR特異的なものであるが、アレルギーにおいては単一抗原蛋白上に複数のT細胞エピトープが存在することが多く、これらに対する多クローン性応答を標的にできるような戦略の開発も望まれていた。これに関連して我々は、ペプチドの長さを調節することにより、抗原特異的かつTCR非特異的に多クローン性応答を標的にすることができることを明らかにした<sup>3)</sup>。本稿ではこれらの新しい戦略のうち、多残基置換によるアナログペプチドの同定、特にスーパーアゴニスト同定法について解説したい。

T細胞応答を抗原特異的に増強する試みは、おもに感染免疫や腫瘍免疫の領域でなされてきたが、自己免疫やアレルギーにおいても、Th1応答へのシフトやクローン特異的なアポトーシスの誘導と関連して注目され始めている。抗原構造の修飾に関しては、一残基置換アナログペプチドによる免疫応答の修飾が数多く報告されているが、HLAとの結合を増強するにしてもTCRとの結合を増強するにしても<sup>4)5)</sup>、logオーダーの増強はむずかしく、新たな戦略の開発が望まれていた。Hemmerらはcombinatorial peptide libraryを用いたT細胞エピトープのpositional scanningにより、野生型ペプチドよりもlogオーダーで強い抗原刺激活性を有するペプチド(peptide superagonists)を同定した。これは一残基を置換したペプチドではなく、多残基を置換したペプチドであった<sup>6)</sup>。その後、我々を含めて複数のグループが異なるT細胞クローンを用いて同様の戦略を試みたが、「ペプチド上のあるポジションにおいて免疫応答増強的に働くアミノ酸残基置換をすべてのポジションに有するペプチドは、必ずしもスーパーアゴニストではない」ことが明白になってきた<sup>7)~9)</sup>。これはペプチドの構造を考えれば自明であって、特定のアルファ炭素の周囲の回転角は数残基先のアルファ炭素の周囲の回転角にも影響を与えるからである<sup>10)11)</sup>。よって、ちょうどチェスのゲームにおいてコンピューターがとる思考過程のようにファジーな戦略を取らないと、「最強の」ペプチドを同定することはむずかしい(図1)。簡略化のために、AAAAAを野生型ペプチドとする。仮にAEAAAとAAQAがより強いT細胞応答を誘導したとしよう。しかしAEAQAはさらに強い抗原とはならない例のほうがむしろ多い。Aの代わりにすべてのアミノ酸を合成反

## NOVEL STRATEGIES FOR PEPTIDE-BASED IMMUNOTHERAPY : Identification of Peptide Superagonists Using Combinatorial Peptide Libraries and Mass Spectrometry

Sho Matsushita

Division of Immunogenetics, Kumamoto University  
Graduate School of Medical Sciences

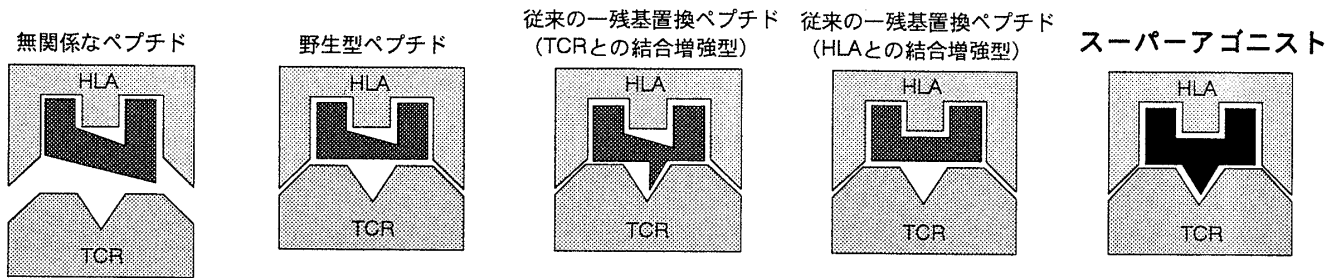


図1. HLA 結合ペプチドの分類 (概念図).

HLA と TCR の間に挟まれた構造物がペプチドを表している。「野生型ペプチド」とは、本稿の場合、K-ras ペプチドを意味する。二次元的にはスーパーアゴニストは二残基置換で達成させるかにみえるが、実際のペプチドの三次元構造はより複雑であり、時には野生型ペプチドとは一次構造上まったくホモロジーのないようなペプチドがスーパーアゴニストとなり得る。図中に使われている「結合」という言葉は、親和性, off-rate などの要素をすべて加味したものである。

Wild-type : E Y K L V V V G A G G V G K S A L T  
 Relative position # : 1 2 3 4 5 6 7 8 9  
 Library design : E Y K L V X X X X X X X X S A L T

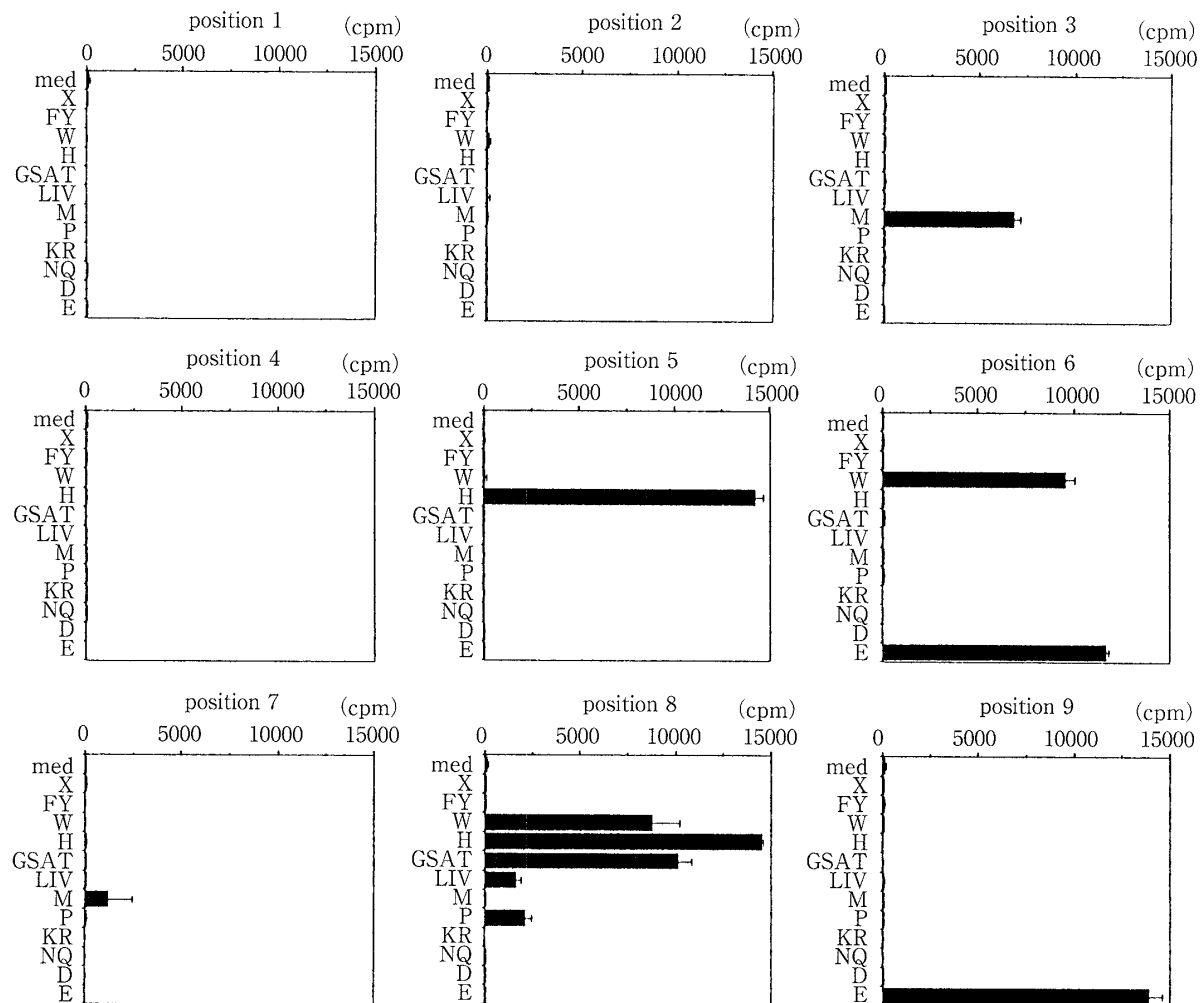


図2. X9 コンビナトリアルペプチドライブラリーの T 細胞刺激活性.

ライブラリーのデザインはトップに示されている。例えば position 3 のパネルで応答を誘導しているペプチドは EYKLVXXMXXXXXX-SALT の配列を有する。各ペプチドは 150  $\mu$ M で T 細胞クローン + APC と共培養された。

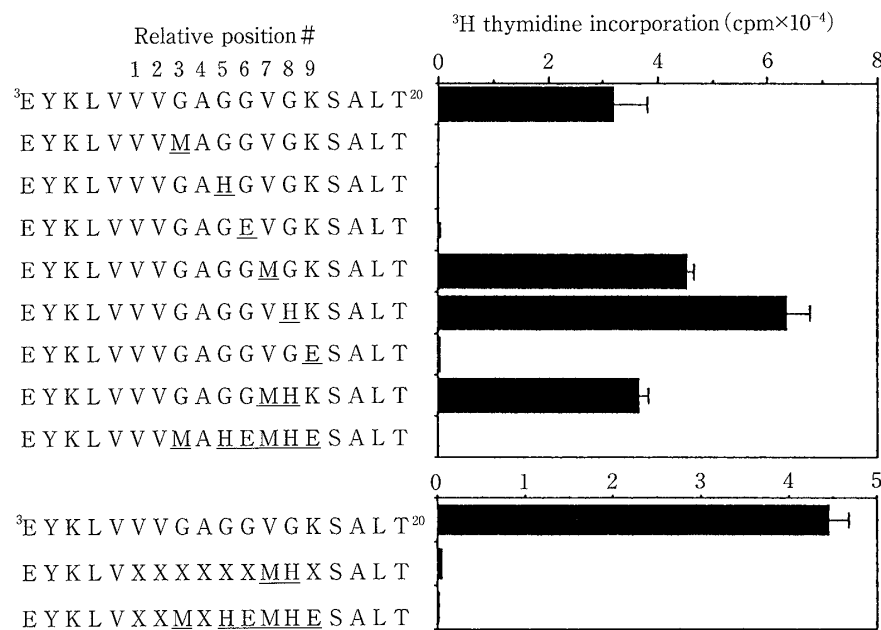


図3. 有利な置換の和がスーパーアゴニストを生むわけではない. 上部パネルは 0.1  $\mu\text{M}$ . 下部パネルは 100  $\mu\text{M}$  (野生型は 1  $\mu\text{M}$ ) で培養に加えられる.

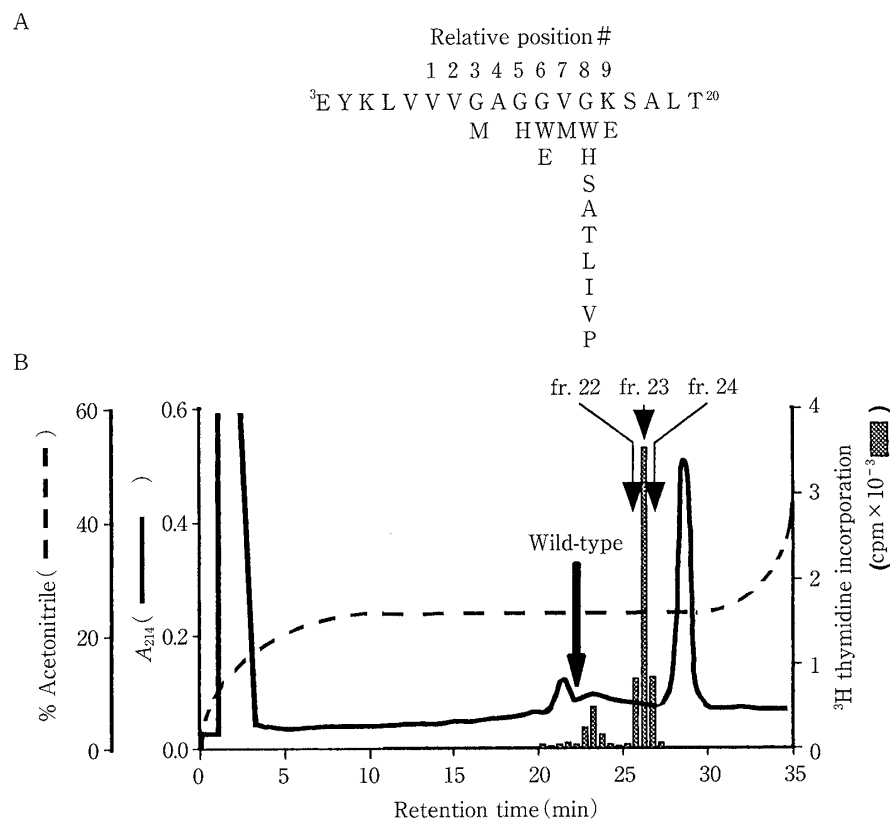
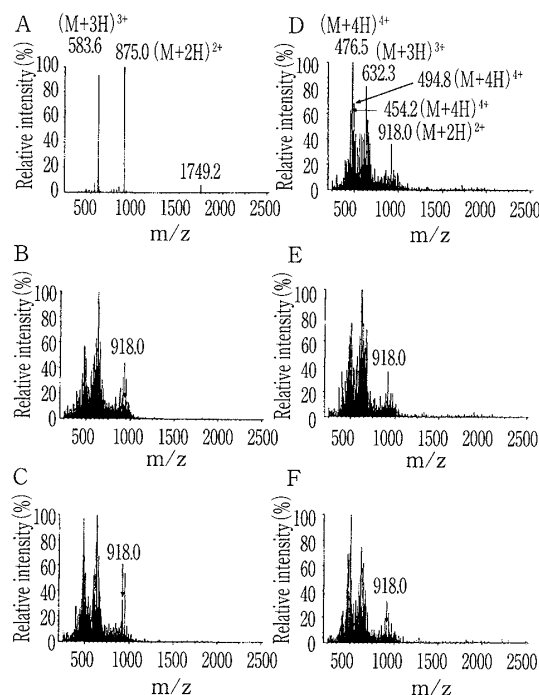


図4. HPLC 分画と抗原活性.  
太い矢印は野生型ペプチドの retention time を示す.



応に添加した XXXXX をベースとし、一つのポジションを特定のアミノ酸に固定した（例えば AXXXX）ペプチドの混合物を一つ一つ合成したものが combinatorial peptide library である。この例では 20 アミノ酸  $\times$  5 positions = 100 通りのライブラリーができ上がる（ファージなどは使っていない全く degenerate な合成物である）。これを用いると、前記のような矛盾はいくらか解決でき、それを応用したのが前記の Hemmer らの論文である<sup>6)</sup>。しかし、実際は, combinatorial peptide library を使った場合でも、たとえば XEXXX と XXXQX を組み合わせた XEXQX よりも XEXMX のほうがさらに強い活性を持っているにもかかわらず、

図 5. HPLC 画分の質量分析. A は野生型ペプチドの分析結果.

以下 fraction 21 (B), 22 (C), 23 (D), 24 (E), 25 (F).

表 1 ペプチド配列, 疎水性, ならびに抗原活性

| Observed peak m/z | Theoretical m.w. | m.w.    | Sequence            | Relative hydrophobicity score | ED <sub>50</sub> |
|-------------------|------------------|---------|---------------------|-------------------------------|------------------|
| 583.6/875.0       | 1748             | 1748.07 | EYKLVVVGAGGVGKSALT  | - 1.3                         | 0.11             |
| 918.0             | 1834             | 1834.15 | EYKLVVVGAGEVAKSALT  | - 2.1                         | $\infty$         |
|                   |                  | 1835.09 | EYKLVVVGAGEVAESALT  | - 1.6                         | $\infty$         |
|                   |                  | 1836.23 | EYKLVVVGAGGMLKSALT  | + 0.6                         | 0.0021           |
|                   |                  | 1836.23 | EYKLVVVGAGGMIKSALT  | + 1.2                         | 0.0018           |
|                   |                  | 1836.23 | EYKLVVVMAGGVAKSALT  | + 3.2                         | 0.050            |
| 476.5             | 1902             | 1900.22 | EYKLVVVGAGEVHKSALT  | - 7.1                         | NT               |
|                   |                  | 1900.22 | EYKLVVVGAEHVGKSALT  | - 7.1                         | NT               |
|                   |                  | 1900.28 | EYKLVVVGAEHGMPSALT  | - 7.5                         | NT               |
|                   |                  | 1901.16 | EYKLVVVGAGEVHESALT  | - 6.6                         | NT               |
|                   |                  | 1901.16 | EYKLVVVGAEHVGESALT  | - 6.6                         | NT               |
|                   |                  | 1901.22 | EYKLVVVGAEHGMPSALT  | - 7.0                         | NT               |
|                   |                  | 1902.30 | EYKLVVVGAEHGMVKSALT | - 1.8                         | $\infty$         |
|                   |                  | 1903.30 | EYKLVVVMAGGVHKSALT  | - 1.8                         | $\infty$         |
| 632.3             | 1984             | 1902.30 | EYKLVVVMAGHVGKSALT  | - 1.8                         | $\infty$         |
|                   |                  | 1892.19 | EYKLVVVGAGWVAESALT  | + 0.9                         | $\infty$         |
|                   |                  | 1892.25 | EYKLVVVGAGEMPESALT  | - 7.7                         | NT               |
|                   |                  | 1893.19 | EYKLVVVGAGEMPESALT  | - 7.2                         | NT               |
|                   |                  | 1894.27 | EYKLVVVGAGEMVKSALT  | - 2.0                         | $\infty$         |
|                   |                  | 1894.27 | EYKLVVVMAGEVGKSALT  | - 2.0                         | $\infty$         |
|                   |                  | 1894.33 | EYKLVVVMAGGMPESALT  | - 2.4                         | $\infty$         |
|                   |                  | 1895.21 | EYKLVVVGAGEMVESALT  | - 1.5                         | $\infty$         |
|                   |                  | 1895.21 | EYKLVVVMAGEVGESALT  | - 1.5                         | $\infty$         |
|                   |                  | 1895.27 | EYKLVVVMAGGMPESALT  | - 1.9                         | $\infty$         |

ED<sub>50</sub> は  $\mu$ M で表されており  $\infty$  は増殖誘導能がないことを示す。小さい数字ほど抗原活性が大きい。

1 行目の配列は野生型ペプチドであり, relative hydrophobicity score が -1.3 より大であれば, そのペプチドは野生型ペプチドよりも疎水性である。

XXXMX は弱い応答しか誘導できないなどという組み合わせが数多く存在する。我々は combinatorial peptide library に逆相 HPLC と質量分析を組み合わせることによりこの問題を解決した<sup>2)</sup>。

#### ペプチドスーパーアゴニスト同定法の開発

方法の流れは以下の通りである。

1) Self K-ras 由来のペプチド (<sup>3</sup>EYKLVVVGAGGVGKSALT<sup>20</sup>) に反応するヒト CD 4 T 細胞クローンが認識するコアペプチドを同定し、その部分を randomize した combinatorial peptide library (EYKLVXXX-XXXXXXSALT-based) を合成して T 細胞応答を観察した (図 2)。

2) 応答を増強する置換の和がさらに強い応答を誘導するわけではないことを確認した (図 3)。

3) 図 2 で応答を増強するアミノ酸残基をすべてのポジションに有するペプチドの混合物を合成した (図 4 A: 理論的には 480 種類のペプチドの混合物である)。これを逆相 HPLC で分画し、各画分の増殖誘導活性を定量したところ、fraction 23 に強い活性が認められた (図 4 B)。

4) Electrospray ionization 型の質量分析機で野生型ペプチドを分析すると、予想通り、多価イオンが観察された (図 5 A)。多価イオンの情報は合成過程で生じた出来損ないの短いペプチドを区別させてくれるので利用価値がある。そこで fraction 23 (図 5 D) および前後の画分 (図 5 B, C, E, F) を分析したところ、質量数 1834 に対応するシグナル (例えば (M+2H)<sup>2+</sup>=918.0) は図 4 B の増殖誘導活性の分画パターンとよく似たシグナル強度の変化をしめた。

5) 480 種類のペプチドのうち 1834±0.15% の範囲内に収まるペプチドを合成し、増殖活性を定量した (表 1)。他にも疑わしいシグナルが 4 種類存在したので、疎水性スコアが野生型ペプチドよりも高いもの (図 4 B の retention time より、めざす superagonist は野生型ペプチドよりも疎水性であると推測できる) を合成した (その一部を表 1 に示した)。予想通り、1836.23 の質量を持つペプチド 2 種類が 100 倍近い活性を持つスーパーアゴニストとして同定された (野生型のペプチドの ED<sub>50</sub> が 0.11 μM であるのに対して、スーパーアゴニストのそれは 0.0021 と 0.0018)。これらは<sup>14</sup>VG<sup>15</sup>を<sup>14</sup>MI<sup>15</sup>と<sup>14</sup>ML<sup>15</sup>に置換したものであった (図 6)。

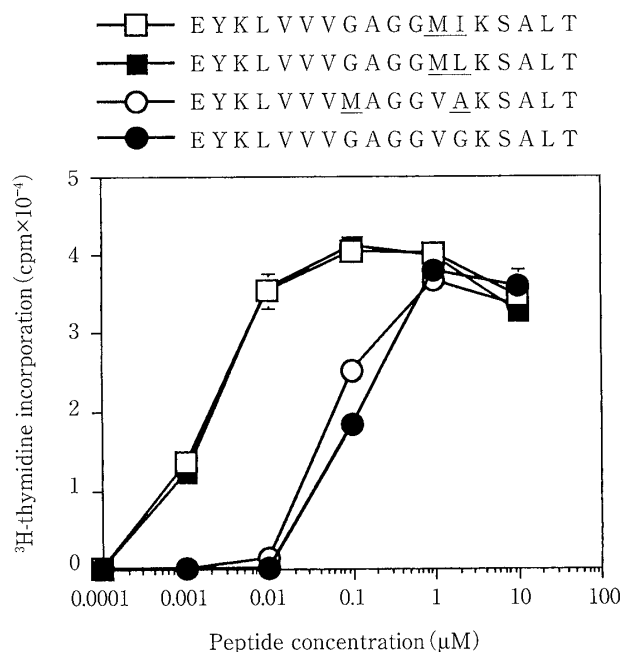


図 6. スーパーアゴニストと野生型ペプチドの dose response.

黒丸が野生型ペプチド、四角で示したのがスーパーアゴニストである。

このような方法は、特定の T 細胞応答の in vivo または ex vivo 刺激による増強や、自己免疫病における分子擬態 (molecular mimicry: 12) の解析、さらには特異性未知の T 細胞が認識するリガンドの同定などに威力を発揮するであろう。

#### おわりに

ここにご紹介した方法は特定の T 細胞クローンの応答を増強することを念頭においたものである。標的を抗原特異的多クローン性応答に設定する場合は全く異なる発想も必要であろう<sup>3)</sup>。本研究は本教室大学院の田中芳彦 (現 La Jolla Institute for Allergy and Immunology)、岡山大学歯学部・大山秀樹博士との共同研究である。

#### 文 献

- 1) 松下 祥: アレルギー治療の将来: 抗原特異的なアプローチ. アレルギー 47, 6-10, 1998.
- 2) Tanaka, Y., Ohyama, H., Ogawa, M., Nishimura, Y. and Matsushita, S.: Identification of peptide su-

- peragonists for a self-K-ras-reactive CD4<sup>+</sup> T cell clone using combinatorial peptide libraries and mass spectrometry. *J. Immunol.* **162**, 7155–7161, 1999.
- 3) Matsushita, S. and Matsuoka, T. : Peptide length-dependent TCR antagonism on class II HLA-restricted responses of PBMC and T-cell clones. *Eur. J. Immunol.* **29**, 431–436, 1999.
  - 4) Matsushita, S., Takahashi, K., Motoki, M., Komoriya, K., Ikagawa, S. and Nishimura, Y. : Allele specificity of structural requirement for peptides bound to HLA-DRB1\*0405 and -DRB1\*0406 complexes : Implication for the HLA-associated susceptibility to methimazole-induced insulin autoimmune syndrome. *J. Exp. Med.* **180**, 873–883, 1994.
  - 5) Yokomizo, H., Matsushita, S., Murakami, S., Fujita, H., Shirouzu, M., et al. : Augmentation of immune response by an analog of the antigenic peptide in a human T-cell clone recognizing mutated Ras-derived peptides. *Hum. Immunol.* **52**, 22–32, 1997.
  - 6) Hemmer, B., Fleckenstein, B.T., Vergelli, M., Jung, G., McFarland, H., et al. : Identification of high potency microbial and self ligands for a human autoreactive class II-restricted T cell clone. *J. Exp. Med.* **185**, 1651, 1997.
  - 7) Matsushita, S., Kohsaka, H. and Nishimura, Y. : Evidence for self- and non-self-peptide partial agonists that prolong clonal survival of mature T cells in vitro. *J. Immunol.* **158**, 5685–5691, 1997.
  - 8) Matsuoka, T., Kohrogi, H., Ando, M., Nishimura, Y. and Matsushita, S. : Altered TCR ligands affect antigen-presenting cell responses : Upregulation of IL-12 by an analogue peptide. *J. Immunol.* **157**, 4837–4843, 1996.
  - 9) Chen, Y-Z., Matsushita, S. and Nishimura, Y. : Response of a human T cell clone to a large panel of altered peptide ligands carrying single residue substitutions in an antigenic peptide : Characterization and frequencies of TCR agonism and TCR antagonism with or without partial activation. *J. Immunol.* **157**, 3783–3790, 1996.
  - 10) 松下 祥 : MHC・ペプチド複合体と抗原提示. “標準免疫学”(宮坂昌之, 谷口 克編), 医学書院, 東京, 145–161, 1997.
  - 11) Chen, Y-Z., Matsushita, S. and Nishimura, Y. : Single residue polymorphism at the DRβ 37 affects recognition of peptides by T cells. *Hum. Immunol.* **54**, 30–39, 1997.
  - 12) 松下 祥 : リウマチ発症の遺伝要因. カレントセラピー **17**, 24–30, 1999.