

## HLAペプチド予測による免疫標的探索法の開発

● 宇高 恵子

高知大学医学部

### 〈研究の目的と進め方〉

T細胞は、同じく遺伝子組み換えにより多様性を獲得してB細胞（リンパ球）の抗原認識分子として作られる抗体分子が、外来の異物分子に対し、広く反応性をもつ抗原レパートリーをもつのは対照的に、自己細胞の細胞膜分子であるMHC (Major Histocompatibility Complex) 分子に結合し、提示された抗原たんぱく質由来のペプチドしか抗原として認識できないという制約がある。このため、異物分子を無害な形にして注射することにより、比較的自由に抗体産生が誘導できる免疫法が早くから発達したことに比べ、抗原特異的なT細胞の誘導は今日も困難な課題として残されている。T細胞を誘導する免疫法として実用化されているのは、弱毒化ウイルスが樹立できた、ごく一部のウイルス感染症についてのみである。弱毒化ウイルスは、ホストの細胞に感染し、ホスト細胞の自然な抗原提示（抗原たんぱく質からペプチドが切り出され、MHC分子に結合して細胞表面に提示される過程）を経てT細胞に抗原を提示することができるため、効率よくT細胞を誘導することができる。

この抗原提示の過程をバイパスして、最終的にMHC分子に結合する理想的な長さのアミノ酸配列のペプチドを自由にデザインできれば、合成ペプチドを細胞外に投与することにより、細胞表面に残されたペプチドが結合していない空のMHC分子に合成ペプチドが結合し、あたかも、自然な抗原提示を経た抗原提示細胞のようにT細胞を誘導することが可能である。細胞傷害性T細胞 (CTL; cytotoxic T lymphocyte) に抗原を提示するMHCクラスI分子は、ランダムなアミノ酸配列の9アミノ長のペプチドの中で、100-150種に1種程度結合ペプチドが存在する程度の限られてはいるが、広い結合特性を持った分子である。がんや難治性ウイルス感染症に対するCTLを誘導したい場合には、MHCクラスI分子に結合する抗原ペプチドを正確に知る必要がある。このような、認識の特異性に甘さがあるような分子反応の解析は、樹立されていない。また、MHC分子には、個体ごとに異なる遺伝子型があり、型ごとに結合するペプチドのレパートリーが異なるため、ペプチドの同定は、それぞれの型のMHC分子ごとに行う必要がある。

我々は、ヒトのMHC分子であるHLA(human leukocyte antigen)クラスI分子のペプチド結合特性を解析するため、NEC日本電気株式会社の理論研究グループと情報技術の開発を進めてきた。隠れマルコフモデルを基盤とする質問学習法を用いて、限られた数のペプチドのMHC結合活性のデータベースを解析して得られる情報をもとに、ランダムに作成したアミノ酸配列のペプチドの中から最も結合活性を予測しにくいペプチドを拾い出し、それらについて、25-30ペプチド程度の結合実験を行った。この解析→予想困難なペプチドの結合実験→結合データをデータベースにフィードバック、というサイクルを6、7回繰り返すことにより、予想プログラムを実測の結合データで追加トレーニングをして、予想精度を上げる試行を行った(1)。

### 〈研究開始時の研究計画〉

1. HLA-A24、A2型（余裕があれば、他の分子についても）について、質問学習法を使った実験計画に基づき、実験候補にあげられたアミノ酸配列のペプチドを合成、精製し、結合実験をする。
2. 上記結合結果を隠れマルコフモデルを使って解析し、その結果完成したモデルを使って、未知のアミノ酸配列のペプチドについて結合活性を予想するプログラムを作製する。この解析は、H15年度に共同研究を行っている日本電気 (NEC) 理論グループが行う。
3. 隠れマルコフモデルの改良。  
以前のサイクリックモデルから平行モデルに換え、N末、C末のアミノ酸の独立性を確保する。
4. アミノ酸の物理化学的性質を置換アミノ酸の予想に付加し、予想精度を上げる。  
(京大化学研究所、N. Majeux氏、馬見塚 拓氏との共同研究)

### 〈研究期間の成果〉

- ① 質問学習法を使ってHLA-A\*0201、-A\*0206、-A\*2402分子について結合性ペプチドの特異性解析を完了した。結合値のデータベースを使って、任意のアミノ酸配列のペプチドについて予想プログラムを作製、予想能を10-fold cross validation etc.によって検定した。その結果、93% (HLA-A\*2402の解析結果) の予想的中率が得られるようになった。以上の型を網羅すれば、日本人の80%を超える患者が治療対象となる。
- ② 予想プログラムを使って、ヒトC型肝炎ウイルス (HCV) ゲノム全長および、腫瘍特異的抗原であるWT1、survivinについて、HLA-A\*0201と-A\*2402結合性ペプチドを予想。実験にて結合能を確認したのち、物質特許出願を行った (情報解析担当のNECとの共同出願)。現在、その他、数種の抗原ペプチドのリストも特許出願準備中である。
- ③ MHC class I分子、ペプチド、 $\beta$ 2-microglobulinの3者の会合の特異性がどのように制御されているかを調べるため、阪大蛋白質研究所の後藤祐児教授らと共同で、MHCの重鎖に接すると立体構造上予想されるアミノ酸を置換した複数の $\beta$ 2-microglobulin置換体を使って、ペプチド会合の特異性に対する影響を調べた。
- ④ C型肝炎、担がん患者の末梢血T細胞を用いて上記で見つけた抗原ペプチドを認識するT細胞があるかどうか、を調べた。重点研究終了後も、患者T細胞の誘導実験を進めたところ、コンピューター予測をしたHLA高結合性ペプチドの8割程度は、実際に、C型肝炎患者や、頻度は少ないが健康人にもペプチドT細胞を誘導できることがわかった。HCVは、遺伝子変異が頻繁に起こるため、抗原特異的T細胞がせっかく誘導されても、HLA分子に提示されにくい変異が入ることや、T細胞に不応答を誘導するアミ

ノ酸置換ペプチドが出現して慢性化→肝硬変→肝がんの経緯をたどる。抗原ペプチドのデザインが今回の研究で容易になったため、これを利用して、複数のペプチドを混合したカクテルワクチンを提唱した(論文投稿中6)。一方、これまでに、ウイルス側もHLA分子に提示されにくい、あるいは、T細胞に認識されにくい変異を獲得したウイルスが日本というHLA型について偏った分布を見せる集団では蔓延していることが危惧されたため、日本で単離されたHCVについて系統樹解析、同義置換、非同義置換比の解析を行ったところ、特に、日本人の6割が少なくともヘテロで有するHLA-A\*2402分子結合性ペプチドについて、危惧されるような免疫を回避する変化が蓄積している証拠はなく、我々の方法で同定されたペプチドを公衆のワクチンとして治療に用いることは十分意義があることであると判断された(論文投稿中6)。

また、HCV感染モデルマウスを使った実験ができないか探るため、マウスMHC class I分子に結合するHCVペプチドを同定し、免疫実験を行った。HCVトランスジェニックマウスの導入、T細胞の抗原認識に重要な役割を果たすヒトCD8トランスジェニックマウスの開発も行った。本年度からマウスを用いた免疫実験が自由にできるようになる。

- ⑤ 上記②③で同定したワクチン候補ペプチドについて、将来、医師主導型の臨床試験を行う必要がある。本学の付属病院にて、臨床医と研究者が協力して臨床試験を行う経験をするのは重要である。このため、我々が数年前に阪大杉山治夫教授らと同定し、阪大病院で臨床試験が進んでいるWT1ペプチドを用いたがんの免疫治療がH16年度より厚労省の研究班として拡大される機会を利用して、本学付属病院でもペプチド免疫治療を立ち上げた(2,3,4,5)。1年間に、約20症例の試験治療を行い、3症例で腫瘍の増大が抑制され、新たな転移が起きなくなった。現在の治療は細胞傷害性T細胞が認識する抗原ペプチドのみを投与する免疫賦活能の低い免疫方法であるので、現在、免疫賦活能を高める工夫を具体的に進めており、マウスでは、良好な治療成績が得られている。本年免疫賦活能の工夫についての特許出願の後、試験治療を開始する予定である。

#### 〈国内外での成果の位置づけ〉

世界で標準のHLA結合性ペプチド予想のアンカー法では、的中率が3割程度であり、また、結合能を実数値で予想することはできない。これに比べ、我々の自動予想プログラムは、精度、大量の情報の解析能(ゲノムワイドの探索)、実測値予想と、いずれも世界で他に追従を許さぬ位置にある。この技術を用いて、現在、世界的に問題となっている悪性腫瘍の腫瘍抗原、難治性ウイルス感染症の抗原ペプチド探索をゲノムワイドに行い、HLA結合性ペプチドを同定している。

特に、HCVのように変異が頻繁に起こる病原体の場合、単一の抗原ペプチドを用いた免疫では、早晚、T細胞の認識を逃れる変異体が出現する。このようなケースにおいて、標的ペプチドを多数、正確に同定できる技術が確立できたことは、今後の標的治療の開発にきわめて有利である。

#### 〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

- ① HLAの型によっては、予定していた酸解離法によ

るペプチド結合実験が可能ではなかった。このため、遺伝子クローニング、遺伝子発現細胞の樹立、結合実験の条件設定に、予想外の時間がかかった。

- ② ペプチドを使ったT細胞の誘導実験の際に、マウスのように遺伝背景が均一でないヒトのT細胞の活性をモニターすることが極めて困難であった。アロ(同種異個体)に対する免疫応答や、NKレセプターを介した抗原認識のバックグラウンドとペプチド依存性の細胞傷害活性を分離する工夫を重ねて、ようやく論文投稿にこぎつけた。今年度にヒトHLA分子やCD8分子を発現するトランスジェニックマウスが使えるようになるので、マウスを使った免疫実験でいくらかの問題は解決できると思われる。

#### 〈今後の課題〉

世界的にT細胞ワクチンの開発は急務であり、一日も早く、免疫賦活能の高い免疫方法を確立して、HLA結合性ペプチドを標的としたがんや難治性ウイルス感染症の治療ワクチンの開発にこぎつけたい。

医師主導型の臨床試験を後押しする法律改正や政策が始められているが、試験治療にかかる経済的支援体制は整備されていない。臨床医と基礎研究者の共同作業も容易ではないが、なんとか、ワクチンの実用化ができるまでがんばりたい。

HLA解析方法自体も、隠れマルコフモデルの他にいくつかの情報技術の導入がのぞまれ、現在NEC理論研究部と開発を進めている。また、ペプチド結合実験自体も、現在ではほとんどが手作業で効率が悪い。研究費を獲得して、せめてマルチプルペプチド合成機と、HPLCを購入したい。

この技術を活用すれば、アレルギーや自己免疫疾患の原因抗原ペプチドを自動探索することも可能である。今後、効率のよいHLAクラスII分子のペプチド結合解析方法を開拓して、これらの抗原に基づいた標的抗原に対する免疫応答のみを抑える技術を開発したい。

#### 〈研究期間の全成果公表リスト〉

##### 1) 論文

1. (0302102031) K. Udaka, Hiroshi Mamitsuka, Yukinobu Nakaseko and Naoki Abe. Empirical evaluation of a dynamic experiment design method for prediction of MHC class I-binding peptides. *J Immunol*, 169, 5744-5753, 2002.
2. Tsuboi A, Oka Y, Udaka K, et al., Enhanced induction of human WT1-specific cytotoxic T lymphocytes with a 9-mer WT1 peptide modified at HLA-A\*2402-binding residues. *Cancer Immunol Immunother.* 51(11-12):614-20, 2002.
3. Y. Oka, A. et al., Wilms Tumor Gene Peptide-Based Immunotherapy for Patients with Overt Leukemia from Myelodysplastic Syndrome (MDS) or MDS with Myelofibrosis. *Int J Hematology*, 78, 56-61, 2003.
4. (0502101600) A. Tsuboi, et al., WT1 peptide-based immunotherapy for patients with lung cancer: Report of two cases. *Microbiol Immunol* 48, 175-184, 2004.
5. (0502101551) Y. Oka, et al. Induction of WT1(Wilms tumor gene)-specific cytotoxic T lymphocytes by WT1 peptide vaccine and the resultant cancer regression. *Proc Natl Acad Sci USA* 21, 13885-13890, 2004.
6. Mashiba T., Udaka K., Hirach Y., Hiasa Y., Miyakawa T., Satta Y., Osada T., Kataoka S., Kohara M. and Onji M.

Identification of CTL epitopes in hepatitis C virus by a genome-wide computational scanning and a rational design of peptide vaccine. (submitted)

2) MHC結合性ペプチド予想プログラム (Lib score)

<http://hypernig.nig.ac.jp/cgi-bin/Lib-score/request.rb?lang=E>

3) 特許

(HLA結合性ペプチド、その前駆体、それをコードするDNA断片および組み換えベクター)

特願2005-50164 (特願2004-135652特願2004-272314)

上記、PCT国際も

特願2004-272385 (特願2005-046459) PCT国際も

特願2005-135652特願2005-050164 PCT国際も

特願2005-048660 特願2005-017140 PCT国際も

特願2005-259773