胸腺ペプチドの合成と免疫活性

藤野 政彦*・脇 舂 光 広*

Synthesis of Thymus Peptides and Their Immunologic Activities.

Masahiko FUJINO* and Mitsuhiro WAKIMASU*

Recent advances in the field of the chemistry and biology of thymic factors are reviewed, in which the following items are described. 1) Chemical structure and some biological properties of ubiquitin. 2) Structure, synthesis and biological properties of thymopoietin. 3) Chemical nature, syntheses and immunologic activities of serum thymic factor (FTS). 4) Chemical structure and syntheses of thymosin α_1 .

1. はじめに

胸腺にホルモン様の物質が存在し、免疫機能の調節に深いかかわりを持っているらしいことは、Miller の古い研究—動物の新生児から胸腺を摘出すると、高度の免疫不全が出現するが、これに胸腺を移植すると回復する—から広く生物学者の間では、認識されてきたことである。また、胸腺を摘出した動物では、数ヶ月後に老化が進んだ状態、すなわち wasting disease に陥ることが知られており、老化と胸腺とが密接な関係を持つことも、想像されていた。最近の研究成果は、これらの事実を、分子レベルで考察できる日が近いことを物語っているが、ここでは物質という面から最近の胸腺ペプチドに関する研究と知見を紹介する。

2. 胸腺の作用

免疫機能に対する胸腺 (thymus) の働きを簡単に説

明すると図 1 に示すようなものであろう。

骨髄 (Bone marrow) から産生される precursor T-cell (thymus derived cell) が胸腺を経て、T-cell に誘導され、この T-cell が細胞性免疫をつかさどる。また一方、B-cell (bone marrow derived cell) に対しても、helper action や suppressor action を及ぼしていると考えられている。

さて、この胸腺の働きがホルモン様の物質によって行われているのかどうかは、「ホルモン」なる言葉の意味をも含めていろいろと議論されてきた。そして、その存在を化学物質としてのレベルで証明しようとする研究が、数多く行われてきた。現在まで、十数種類にも及ぶ thymus factor と呼ばれるホルモン様因子が提唱されてきている。それらの数多くの因子と呼ばれるものには、お互に、同一の物質や混合物などを誤認している場合も多いであろう。現時点で、化学的本質が明らかになった因子を、表 1 に示した。

Fig. 1 A scheme of cellular and humoral immunity.

* 武田薬品(株)中央研究所 ()

* Chemical Research Laboratories, Central Research Division, Takeda Chemical Ind., Ltd. ()

これらの内、1~4については、それぞれ、化学構造が推定され、一部化学合成も完了しているが、thymic humoral factor (THF)¹⁾に関しては、不明の点が多く、FTSと同一視する研究者もあるが、一応 31 残基のアミ

Fig. 5 Synthetic route to thymopoietin II.

した。

Thymopoietin II は、アミノ酸残基数 49 と、比較的長鎖のペプチドであり、しかも塩基性や酸性のアミノ酸が多く、合成途上の保護ペプチド類が溶媒に難溶であることが予想されたので、N 端側 27 残基の fragment と C 端側 22 残基の fragment をまず合成し、これを最後に縮合するという方式で合成を行った。この方式では、幸い溶解性の問題は回避され、しかも 27 位のアミノ酸がプロリ

ンであるため、ラセミ化の問題も回避される。

このようにして合成した thymopoietin II は、合成の fragment 29-41 の 10 倍以上の活性 (*in vitro*, T-cell 分化作用) を示した。従って thymopoietin II の sequence は、多分正確なものであろうと推定される。Thymopoietin II に関しては、最近、テキサス大学の Folkers¹³⁾ の研究室で、固相法による合成が完了したとのことであるが、thymopoietin I の合成は、まだ報告がない。

最近, 安孫子ら¹⁴⁾は, 尿毒症患者の血清が E-rosette 形成を阻害する性質を示すことを Assay に利用して, fragment 32-41 には, 阻害を回復する活性があるが, fragment 33-41 には, その作用がないことを報告しているが, 一方, G. Goldstein ら^{15, 16)}は, さらに短い fragment である H-Arg-Lys-Asp-Val-Tyr-OH (32-36) に, thymopoietin II と同じく, *in vitro*, *in vivo* いずれでも T-cell 分化作用を示すことを認めている。49 残基中のわずか 5 残基に, その生理活性が, 局在している事実は, 非常に興味深いことである。F. Aiuti ら¹⁷⁾は, さらに進んで, この合成 pentapeptide を臨床的にも使用して, ある程度の効果を認めたと報告している。すなわち, Di George syndrome 患者は, 生後 1 ヶ月で, 呼吸困難, チアノーゼ, ケイレン, 発熱等に, みまわれるが, 胸腺, T-cell が欠損しており, E-rosette-forming cell (ERFC) も 5~8% に減少している。この患者のリンパ球に, pentapeptide 0.1 μ g~1 μ g を加えると ERFC は 12~48% にまで増加する (*in vitro*)。また, *in vivo* では, 初日 0.1 mg/kg, 2 日目 0.5 mg/kg, 3 日目 1 mg/kg, 4 日目以降 1 mg/kg を, 週 2 回, 4 週間投与すると, ERFC の割合も, T-cell 数も増加し, また,

ケイレン, 発熱, 下痢等の症状も改善するという。

Thymopoietin は, bioassay や immunofluorescence 法によって胸腺のみに認められ, また胸腺摘出動物では, 血中に認められなくなることから, 胸腺ホルモンであることは確実であろう。今後, 感度のよい RIA 法の開発によって, 免疫病やガンとの関係などが, 詳細に調べられるものと期待される。

3.3. Serum thymic factor (FTS) FTS は, Bach らによって, ブタの血清から単離されたペプチドであるが, 研究当初, フランス語で "Facteur Thymique Serique" と呼ばれたため, FTS の略号が定着している。その化学構造は^{18, 19, 20)}最初, 図 6 に示した a) の構造が推定されたが, ついで, メルク社の研究陣の協力を得て合成的なアプローチが進められ, 最終的には図 6 の b) の化学構造に落ち付いた。b) 式の合成品は, 生理活性も含めて, 全ての点で, 天然品と一致するとのことである。

a) H-Glx-Ala-Lys-Ser-Glx-Gly-Gly-Ser-Asn-OH

b) pGlu-Ala-Lys-Ser-Gln-Gly-Gly-Ser-Asn-OH

Fig. 6 Amino acid sequence of FTS.

Glx=Glu or Gln.

Table 2 Biological activity of FTS analogs.

Analog	Biological activity	Reference
1 2 3 4 5 6 7 8 9 pGlu-Ala-Lys-Ser-Gln-Gly-Gly-Ser-Asn-OH	+ a)	(24)
H-Gln ¹	+ a)	(24)
H-Ala ²	+ a) + b)	(24, 25)
H-Lys ³	+ a) + b)	(24, 25)
H-Ser ⁴	- a) - b)	(24, 25)
Z-Gln ¹	+ a)	(24)
D-Ala ¹	+ b)	(26)
Arg ³	+ c)	(26)
H-Lys ³ Gly-OH ⁷	+ c)	(27)
Ser-OH ⁸	- a)	(24)
Asp-OH ⁹	- a)	(24)
Ala ⁸ OH	- a)	(24)
Gln-OH ⁹	- a)	(24)
β -Ala-NH ₂ ⁹	- a)	(24)
H-Val-Lys-Arg-Gln	+ d)	(13, 29)

a) Rosette assay (*in vitro*).

b) Inhibition of sheep erythrocyte rosette formation by Uremic toxin.

c) Cytotoxic assay (*in vitro*).

d) Reactions of the impaired immune competence in aged mice (*in vivo*).

FTSは免疫に関係があるとされている種々の bio-assay で positive であるが、最近、G. Goldstein ら²¹⁾は、T-cell の分化のみではなく B-cell の分化にも作用を示すと、報告している。しかし、Bach らによると、胸腺摘出動物では血中から消失するとされており、胸腺を origin としていることは確からしく、やはり、胸腺ホルモンの一種であろう。

FTSは比較的小分子のペプチドであり、しかも、thymopoietin より生理活性が強力であることから、今後 analog 合成が、さらに盛んに行われるものと予想される。Blanot ら²²⁻²⁴⁾は、種々の analog を合成し、その一部について生物活性も報告している (表2) が、それによれば、FTS 活性を示す最小のペプチドは、fragment 3-9 であり、特に C 末端のアスパラギンは、essential のようである。

また、表2に示した以外の analog としては、[D-Asn⁹] FTS, [Asn-NH₂⁹] FTS, [D-Ala²] FTS, (des-pGlu¹) [D-Ala²] FTS 等が合成されている。安孫子ら^{25, 26)}は、E-rosette assay 系を利用して構造活性相関について検討し、FTS 活性を示す最小ペプチドは、やはり fragment 3-9 であること、[Arg³] FTS, [D-Ala¹] FTS は、共に、FTS と同程度の活性を示すことを報告している。また、最近、寺田ら²⁷⁾は、cytotoxic assay を用いて、fragment 3-7 に、FTS 活性があることを報告した。

われわれの研究室でも、FTS およびその analog 類を多数合成しているが、図7には、液相法による FTS の合成例を、また図8に、固相を併用した合成例²⁸⁾を示した。

Fig. 7 Synthetic route to FTS (solution method).

Fig. 8 Synthetic route to FTS (solid phase method).
Bzl = benzyl. Pms = *p*-tolylmethylsulfonyl.

FTSは、アミノ酸9残基と、比較的短鎖のペプチドであり、合成は、比較的簡単であるが、C端がアスパラギンのペプチド合成では、一般の固相法による合成は、アスパラギンの副反応を伴い問題がある。そこで、われわれは、まず、FTSを通常の液相法によって合成し、また、固相法の変法、すなわち、固相法と液相法を併用した合成法を検討したが、両者ともに全く同一の最終産物を得ている。

最近、Folkers ら^{13, 29)}は、固相法で FTS を合成すると同時に FTS の N 端に thymopoietin II の C 端 tripeptide を付加した H-Val-Lys-Arg-Gln-Ala-Lys-Ser-Gln-Gly-Gly-Ser-Asn-OH を合成して、このものに生理作用があることを報告しているが、このことから、さらに FTS の前駆体として、thymopoietin II の C 端に FTS が結合した 58 残基からなるペプチドを仮定している。一般にホルモンの前駆体からホルモンが遊離される機構は、塩基性アミノ酸2残基が並んだ箇所での酵素分解による“プロセッシング”であることから考えると面白い発想ではあるが、証拠はない。

FTS については、病気との関連や加齢との関係が調べられているが、rosette assay によるものがほとんどであり、より正確にこれらの関連を考察するためには、RIA 法の確立が重要であろう。

3.4. Thymosin 胸腺ホルモンの中で最も生物学的に研究されているのが thymosin であるが、その中でも特に、thymosin fraction V と呼ばれる fraction は、臨床的にも使用されつつある。しかし最近まで、その実体については不明の点が多く、fraction V と呼ばれるものも、ポリアクリルアミドゲル電気泳動や、isoelectric fo-

Fig. 11 Synthetic route to thymosin α_1 (C. Birr et al.).

Ddz = 3,5-dimethoxy- α , α -dimethyl-benzyloxycarbonyl.

Mbh = 4,4'-dimethoxybenzhydryl. TFEtOH = trifluoroethanol.

deficiency Disease) 50 例, (2) ガン患者 150 例, (3) 自己免疫疾患 (Autoimmune Disease) 6 例等である。一次性免疫不全症においては, *in vitro* で, E-rosette assay において, thymosin に反応した例の 80 % に回復が認められ, 40 % 以上に T-cell の著しい増加が認められた。特に, Thymic hypoplasias, DiGeorge Syndrome, Wiskott-Aldrich Syndrome では, 臨床症状も改善されるらしい。またガン患者の治療においては, 最高 4 年間投与し, 平均生存日数が, 240 日から 450 日に延長し, 自己免疫疾患 (Systemic lupus erythematosus 5 例, Rheumatoid arthritis 1 例) の患者においては, immunologic parameter の明確な改善がなされたという。

4. 胸腺ホルモンと老化

胸腺摘出した若い動物は, 老化が進んだ状態になることは述べたが, 実際に胸腺ホルモンと加齢との関係は, どうなっているのであろうか。

最近 C & E News³⁷⁾ に thymosin の血中濃度と加齢の関係がニュースとして報じられているが, 加齢と共に, 胸腺が縮小し, それに伴って, 明らかに thymosin の血中濃度が下降している。胸腺由来の免疫能は, 一般に 20 才を境に急激に低下するとされている。

また, FTS においても, Bach ら³⁸⁾ の報告によると, 血中濃度と加齢は明確な関連を示し, やはり 20 才前後

で, 血中 FTS 濃度は下降し, 60 才以上では, 血中から消失している。

このことから, ガン, 細菌感染を含めて, 多くの老人病が, 胸腺ホルモンと深いかわりあいを持つことが, 容易に予想される。実際に, Bach ら³⁹⁾ は, 胸腺摘出マウスで, FTS が, ある種の tumor の growth を阻害することを確めており, 同様のことが, thymosin^{40, 41)} についても報告されている。

胸腺に関するホルモン類は, 最近やっと, その本体の一部が明らかになり, これらが, 胸腺の生理的役割の一部を代行しうることが確認されてきたが, 合成品の入手が可能となった現在, 純度の高い合成品が多くの生物学者, 医学研究者の手に渡り, ここ 2, 3 年で, 生物学的, 生理学的意義や臨床の応用の可能性等について, 重大な進歩がもたらされることが予想されるが, 一方では, fraction V の物質構成の複雑さからもわかるように, 胸腺中には, まだまだ不明のホルモン様因子が, 数多く存在する。これらがすっきりした筋道で免疫とのかかわり合いが記載される日は, まだ遠いことのように思われる。

(昭和 55 年 7 月 24 日受理)

文 献

- 1) N. Trainin, A. I. Kook, T. Umiel, M. Albala, *Ann. NY Acad. Sci.*, **249**, 349 (1975)
- 2) D. H. Schlesinger, G. Goldstein, H. D. Niall,

- Biochemistry*, **14**, 2214 (1975)
- 3) L. T. Hunt, M. O. Dayhoff, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **74**, 650 (1977)
- 4) M. O. J. Olson, I. L. Goldknopf, K. A. Guetzow, G. T. James, T. C. Hawkins, C. J. Mays-Rothberg, H. Busch, *J. Biol. Chem.*, **251**, 5901 (1976)
- 5) T. L. K. Low, G. B. Thurman, M. McAdoo, J. J. McClure, J. L. Rossio, P. H. Naylor, A. L. Goldstein, *ibid.*, **254**, 981 (1979)
- 6) T. L. K. Low, A. L. Goldstein, *ibid.*, **254**, 987 (1979)
- 7) G. Goldstein, *Lancet*, **1968**, **ii**, 119
- 8) G. Goldstein, *Nature*, **247**, 11 (1974)
- 9) D. H. Schlesinger, G. Goldstein, *Cell*, **5**, 361 (1975)
- 10) G. Goldstein, "Progress in Immunology III", p 390 (1977)
- 11) D. A. Schlesinger, G. Goldstein, M. P. Scheid, E. A. Boyse, *Cell*, **5**, 367 (1975)
- 12) M. Fujino, S. Shinagawa, T. Fukuda, M. Takoki, H. Kawaji, Y. Sugino, *Chem. Pharm. Bull.*, **25**, 1468 (1977)
- 13) E. Biznakov, Y. P. Wan, D. Chang, K. Folkers, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **80**, 631 (1978)
- 14) T. Aviko, M. Kumikawa, H. Sekino, *Chem. Pharm. Bull.*, **27**, 2233 (1979)
- 15) G. Goldstein, M. P. Scheid, E. A. Boyse, D. Schlesinger, J. V. Wauwe, *Science*, **204**, 1309 (1979)
- 16) J. P. Tischio, J. E. Patrick, H. S. Weintraub, M. Chasin, G. Goldstein, *Int. J. Peptide Protein Res.*, **14**, 479 (1979)
- 17) F. Aiuti, L. Businco, P. Rossi, I. Quinti, *Lancet*, **1980**, 91
- 18) J. -F. Bach, M. Dardenne, J. -M. Pleau, J. Rosa, *C. R. Acad. Sci.*, **283**, 1605 (1976)
- 19) J. -F. Bach, M. Dardenne, J. -M. Pleau, J. Rosa, *Nature*, **266**, 55 (1977)
- 20) J. -M. Pleau, M. Dardenne, Y. Blouquit, J. -F. Bach, *J. Biol. Chem.*, **252**, 8045 (1977)
- 21) A. Brand, D. G. Gilmour, G. Goldstein, *Nature*, **269**, 597 (1977)
- 22) D. Blanot, J. Martinez, G. Auger, E. Bricas, *Int. J. Peptide Protein Res.*, **14**, 41 (1979)
- 23) E. Bricas, J. Martinez, D. Blanot, G. Auger, M. Dardenne, J. -M. Pleau, *7th Intern. Peptide Symposium*, La Jolla. Calif. June, 1977
- 24) J. -F. Bach, M. -A. Bach, D. Blanot, E. Bricas, J. Charreire, M. Dardenne, C. Fournier, J. -M. Pleau, *Bull. Inst. Pasteur*, **76**, 325 (1979)
- 25) T. Abiko, I. Onodera, H. Sekino, H. Higuchi, *Chem. Pharm. Bull.*, **28**, 667 (1980)
- 26) T. Abiko, M. Kumikawa, S. Dazai, H. Sekino, H. Higuchi, *ibid.*, **27**, 2207 (1979)
- 27) 寺田成之, 矢野勝喜, 今泉 晃, 高田章子, 木本英治, *生化学*, **51**, 926 (1979)
- 28) T. Fukuda, C. Kitada, M. Fujino, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1978**, 220
- 29) Y. P. Wan, K. Folkers, *Bioorganic Chemistry*, **8**, 35 (1979)
- 30) A. L. Goldstein, T. L. K. Low, M. McAdoo, J. McClure, C. B. Thurman, J. Rossio, C. Y. Lai, D. Chang, S. S. Wang, C. Harvey, A. H. Ramel, J. Meienhofer, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **74**, 725 (1977)
- 31) S. S. Wang, I. D. Kuleska, D. P. Winter, *J. Am. Chem. Soc.*, **101**, 253 (1979)
- 32) C. Birr, U. Stollenwerk, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **18**, 394 (1979)
- 33) C. Birr, U. Stollenwerk, *Angew. Chem.*, **91**, 422 (1979)
- 34) S. S. Wang, R. Makofske, A. Bach, R. B. Merrifield, *Int. J. Peptide Protein Res.*, **15**, 1 (1980)
- 35) T. Abiko, I. Onodera, H. Sekino, *Chem. Pharm. Bull.*, **27**, 3171 (1980)
- 36) T. L. K. Low, G. B. Thurman, C. Chincarini, J. E. McClure, G. D. Marshall, S. -K. Hu, A. L. Goldstein, *Ann. NY Acad. Sci.*, **332**, 33 (1979)
- 37) C & EN, **55**, Dec 19, 16 (1977)
- 38) J. -F. Bach, M. Dardenne, J. -M. Pleau, M. -A. Bach, *Ann. NY Acad. Sci.*, **249**, 186 (1975)
- 39) J. -F. Bach, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **17**, 281 (1977)
- 40) M. A. Hardy, M. Zisblatt, N. Levine, A. L. Goldstein, F. Lilly, A. White, *Transpl. Proc.*, **3**, 926 (1971)
- 41) M. A. Zisblatt, A. L. Goldstein, F. Lilly, A. White, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **66**, 1170 (1970)