

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：82611

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590908

研究課題名(和文) 摂食障害のプロテインアクティブアレイを用いた網羅的自己抗体スクリーニング

研究課題名(英文) A genome-wide screenig of autoantibody for eating disorders using the protein active array

研究代表者

安藤 哲也(Ando, Tetsuya)

独立行政法人国立精神・神経医療研究センター・精神保健研究所・心身医学研究部・室長

研究者番号：50311428

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：摂食障害および肥満患者血清中の自己抗体を、約2万種の蛋白を搭載したプロテインアレイを用いてスクリーニングし、355個の陽性スポットを検出した。このうち強い陽性シグナルを示した180の抗原蛋白について独立の血清サンプルで確認を行った。47の抗原は神経性食欲不振症患者サンプルで陽性で、かつ健常者で陰性であり、陽性率の上位には細胞内輸送、G蛋白質シグナル伝達の調節、食欲の調節、神経内分泌系のストレス反応に関する蛋白が含まれていた。Gene Set 解析で、陽性抗原はホルモン活性のGene Setに有意に多く含まれていた。さらに新たな独立サンプルで再現性の確認を行い特異的な抗原を絞り込む必要がある。

研究成果の概要(英文)：Serum autoantibodies specific for eating disorders were screened using a protein array loaded with approximately 20,000 proteins, and 355 positive spots were detected. Of those, 180 antigens showing the strong signal were subjected to further confirmation in independent samples of eating disorder, obesity and healthy control. Forty seven antigens showed the positive signal in the anorexia nervosa sample, while negative in the control sample. The antigens with high positive rates included proteins which play a role in intracellular trafficking, regulation of G protein signaling, gastrointestinal functions and food intake, and neuroendocrine stress responses. A gene set analysis indicated that the positive antigens were included significantly more often in the gene set of Hormone_Activity.

研究分野：内科系臨床医学

科研費の分科・細目：内科学一般(含心身医学)

キーワード：摂食障害 神経性無食欲症 神経性大食症 肥満 プロテインアレイ 自己抗体 蛋白質 抗原

1. 研究開始当初の背景

摂食障害 (Eating Disorders, ED) は食行動の重篤な障害を特徴とし主として神経性食欲不振症 (anorexia nervosa, AN) と神経性過食症 (bulimia nervosa, BN) に分類される。AN の特徴は食事制限、絶食、過剰な運動、排出行動 (自己誘発性嘔吐、下剤等の濫用) により正常体重の最低限の維持を拒否することである。BN はむちゃ喰いと体重増加を防ぐための代償行動 (絶食、過剰な運動、排出行動) を繰り返し著しい低体重は示さない。思春期・青年期の女性に多く発症する。ED に特異的な生物学的なマーカーは見つかっていない。そのため生物学的な発症や病態のメカニズムの解明が困難である。近年、精神・神経疾患に関連する可能性のある自己抗体の存在が相次いで報告されている。ED においても AN および BN 患者において、血清中に alpha-MSH、ACTH、LHRH に対する自己抗体が健常者に比較して高頻度にみられること (Fetissov SO et al. Proc Natl Acad Sci USA 99:17155, 2002) alpha-MSH や ACTH、oxytocin、vasopressin に対する自己抗体のレベルが健常者の ED に関連する心理行動特性と相関すること (Fetissov SO et al. Proc Natl Acad Sci USA 102: 14865, 2005) が報告された。

2. 研究の目的

本研究ではプロテインアレイを使用した網羅的自己抗体スクリーニング法によって ED 患者に特異的な自己抗体を探索することを目的とする。自己抗体より同定された抗原蛋白の機能を解析することにより、ED の病態メカニズムを解明するのに役立つ。また、ED に特異的な自己抗体は、ED の発症前や早期の診断への応用、治療法の開発に役立つことが期待される。

3. 研究の方法

1) 対象者

摂食障害 (ED) および肥満患者、健常対照者の血清試料と身体計測値、臨床データ、生化学検査値などの臨床パラメータ、表現型を収集した。

2) プレスクリーニング

ヒト蛋白質発現リソース (HUPEX) (Goshima N et al. Nature Methods 5(12): 1011-1017 2008) からコムギ無細胞蛋白質合成系により合成された蛋白約 2 万種を搭載したプレスクリーニング用のプロテインアレイ (C-PAA) を作成した。C-PAA の 1 スポットにはそれぞれ 10 種の蛋白質が搭載された。次に 3 人分の血清サンプルのプール血清を 10 グループ作成した。その内訳は AN—制限型 2 グループ、AN—むちゃ喰い/排出型 2 グループ、BN 2 グループ、肥満 2 グループ、健常者 2 グループである。C-PAA による抗原検出は、希釈プール血清をアレイに添加・反応、洗浄

後、二次抗体を添加・反応、洗浄後、基質を加え化学発光、イメージアナライザーによる画像検出、スポットの数値化の手順で実施した。各グループ 15~20 の閾値以上の反応を示すポジティブスポットが検出された。

3) 抗原同定

陽性スポット上の混合蛋白質を展開した各グループ 150~200 の抗原と、それに加えて蛋白の機能から摂食障害と関連する可能性のある候補抗原 185 (Pinheiro AP et al. Am J Med Genet 153B: 1070-1080) を搭載した抗原同定用のプロテインアレイ (E-PAA) を作成した。作成した E-PAA に各プレスクリーニングに用いたグループのプール血清を反応させたところ 355 個の陽性スポットが検出された。

4) 独立サンプルでの抗原確認

E-PAA で同定された抗原のうち自己抗体と強く反応する 180 種類の抗原蛋白を選択し、これらが搭載された確認用のアレイ F-PAA を作成した。この F-PAA を用いて、スクリーニングに用いた 10 グループを構成する 30 サンプルおよび独立の ED49 例 [AN44 例 (うち 9 例は AN と BN の両方の既往あり)、BN5 例]、肥満患者 11 例および健常者 12 例の血清サンプルについて搭載された抗原に対する自己抗体が存在するか確認を行った。

4. 研究成果

1) 独立血清サンプルでの自己抗体の確認

AN の独立サンプルで陽性であった健常者で陰性であった抗原数は 47 であり、それぞれの抗原の陽性率は 32%~2% であった。陽性率上位の抗原蛋白には細胞内輸送、G 蛋白質シグナル伝達調節、消化管機能や食欲の調節、神経内分泌系のストレス反応に関与する蛋白やペプチドが含まれていた。

2) Gene Set 解析

どのような機能カテゴリーに含まれる遺伝子が、F-PAA でポジティブな抗原遺伝子として検出される傾向にあるかを調べるため、AN 患者に陽性で健常者に陰性であった 47 抗原の中で遺伝子のアノテーション情報が Entrez に登録されている遺伝子名と一致した 44 遺伝子を用いて Gene Set 解析を実施した。解析対象 Gene Set は MsigDB (Molecular Signatures Database) に登録されている C2、C5 カテゴリーの ORGANISM が "Homo sapiens" である Gene Set (全遺伝子数: 20710) を用いた。FPAA 搭載遺伝子数に対するポジティブ遺伝子の数が有意に高い Gene Set が存在しているかを調べるため、超幾何分布を用いた解析を行った。Gene Set 解析の結果、AN 患者の独立サンプルでポジティブであった抗原遺伝子は 1) Hormone_Activity、2) ReactomePeptide_Ligand_Binding_Receptors、3) Cell_Fraction、4) Receptor_Binding、5)

Reactome_GPCR_Ligand_Binding (以上 $P < 0.05$)、6) Soluble_Fraction ($P < 0.1$) の Gene Set に有意に多く含まれていた。

今後、新たな独立サンプルで再現性の確認を行い、特異的な抗原を絞り込むことが必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 10 件)

- 1) Ando T, Ishikawa T, Hotta M, Naruo T, Okabe K, Nakahara T, Takii M, Kawai K, Mera T, Nakamoto C, Takei M, Yamaguchi C, Nagata T, Okamoto Y, Ookuma K, Koide M, Yamanaka T, Murata S, Tamura N, Kiriike N, Ichimaru Y, Komaki G and the Japanese Genetic Research Group For Eating Disorders. No association of brain-derived neurotrophic factor Val66Met polymorphism with anorexia nervosa in Japanese. *Am J Med Genet Part B*. 159B: 48-52, 2012. 査読有. DOI: 10.1002/ajmg.b.32000.
- 2) Kobayashi M, Matsumoto T, Ryuge S, Yanagita K, Nagashio R, Kawakami Y, Goshima N, Jiang S-X, Saegusa M, Iyoda A, Satoh Y, Masuda N, and Sato Y. CAXII Is a Sero-Diagnostic Marker for Lung Cancer. *PLoS ONE* 7 (3) e33952, 2012. 査読有. DOI: 10.1371/journal.pone.0033952.
- 3) Okabayashi K, Fujita T, Miyazaki J, Okada T, Iwata T, Hirao N, Noji S, Tsukamoto N, Goshima N, Hasegawa H, Takeuchi H, Ueda M, Kitagawa Y, Kawakami Y. Cancer-testis antigen BORIS is a novel prognostic marker for patients with esophageal cancer. *Cancer Sci* 103(9):1617-1624, 2012. 査読有. DOI: 10.1111/j.1349-7006.2012.02355.x.
- 4) Ando T, Tamura N, Mera T, Morita C, Takei M, Nakamoto C, Koide M, Hotta M, Naruo T, Kawai K, Nakahara T, Yamaguchi C, Nagata T, Ookuma K, Okamoto Y, Yamanaka T, Kiriike N, Ichimaru Y, Ishikawa T, Komaki G, The Japanese Genetic Research Group For Eating Disorders. Association of the c.385C>A (p.Pro129Thr) polymorphism of the fatty acid amide hydrolase gene with anorexia nervosa in the Japanese population.. *Molecular Genetics & Genomic Medicine*. Article first published online 24 FEB 2014. 2014. 査読有. DOI: 10.1002/mgg3.69
- 5) 安藤哲也: 摂食障害と遺伝子. *臨床精神医学* 42(5):609-620, 2013. 査読無.
- 6) Boroska V, Franklin CS, Floyd JAB, Thornton LM, Huckins LM, Southam L, Ando T (173 人中 42 番目). A genome-wide association study of anorexia nervosa. *Mol Psychiatry Advance online publication FEB 11 2014* 査読有. DOI:10.1038/mp.2013.187
- 7) 安藤哲也. 摂食障害研究の最近の動向. *心身医学* 54(2): 146-153, 2014 査読無.
- 8) Minami S, Nagashio R, Ueda J, Matsumo K, Goshima N, Hattori M, Hachimura K, Iwamura M, and Sato Y. Detection of tumor-associated antigens in culture supernatants using autoantibodies in sera from patients with bladder cancer. *Biomedical Research (Tokyo)* 53(1): 25-35, 2014. 査読有.
- 9) Yugawa T, Nishino K, Ohno S, Nakahara T, Fujita M, Goshima N, Umezawa A and Kiyono T. Non-canonical NOTCH signaling limits self-renewal of human epithelial and iPS cells through ROCK activation.. *Mol Cell Biol*. 33(22): 4434-4447, 2013. 査読有. DOI: 10.1128/MCB.00577-13
- 10) Yamamoto T, Nakayama K, Hirano H, Tomonaga T, Ishihama Y, Yamada T, Kondo T, Kodera Y, Sato Y, Araki N, Mamitsuka H, and Goshima N. Integrated View of the Human Chromosome X - centric Proteome Project. *J. Proteome Res.* 12: 58-61, 2013. 査読有. DOI: 10.1021/pr300844p

〔学会発表〕(計 7 件)

- 1) 安藤哲也, 石川俊男, 鈴木(堀田)真理, 成尾鉄朗, 岡部憲二郎, 中原敏博, 瀧井正人, 河合啓介, 米良貴嗣, 中本智恵美, 武井美智子, 山口力, 永田利彦, 岡本百合, 大隈和喜, 小出将則, 山中隆夫, 田村奈穂, 切池信夫, 小牧元, 摂食障害遺伝子解析研究協力者会議 脳由来神経栄養因子遺伝子の多型と神経性食欲不振症との関連の検討. 第52回日本心身医学会総会ならびに学術講演会 2011.6.9-10. パシフィコ横浜, 横浜.
- 2) 安藤哲也, 田村奈穂, 山本浩史, 倉尚樹, 小西恵, 富田吉敏, 田中孝幸, 知場奈津子, 庭瀬亜香, 濱田孝, 朽久保修, 石川俊男, 小牧元: 神経性食欲不振症における血漿アミノ酸濃度プロファイルの検討. 第16回日本心療内科学会総会・学術大会. 2011.11.26-27. 東京国際交流館・プラザ平成, 東京.
- 3) 安藤哲也, 田村奈穂, 倉尚樹, 東風谷祐子, 小西恵, 富田吉敏, 知場奈津子, 庭瀬亜香, 濱田孝, 朽久保修, 市丸雄平,

石川俊男, 小牧元. 神経性食欲不振症の血漿アミノ酸濃度の解析. 第16回日本摂食障害学会学術集会. 政策医療大学院大学, 港区, 東京, 2012.10.6-7. 東京

- 4) 五島直樹. In vitro proteome analysis by using genome-wide human proteome expression resources (HUPEX) 第35回日本分子生物学会年会 ワークショップ 福岡国際会議場, 福岡, 2012.12.12.
- 5) 安藤哲也, 田村奈穂, 米良貴嗣, 河合啓介, 武井美智子, 中本智恵美, 鈴木(堀田)真理, 成尾鉄朗, 石川俊男, 小牧元: 脂肪酸アミド加水分解酵素 (FAAH) 遺伝子 385C/A 多型と神経性食欲不振症との関連. 第17回日本摂食障害学会・学術集会. 神戸市産業振興センター, 神戸, 2013.11.2-3.
- 6) 安藤哲也, 田村奈穂, 倉尚樹, 小西恵, 富田吉敏, 知場奈津子, 本間洋州, 濱田孝, 石川俊男, 小牧元: 神経性食欲不振症の血漿アミノ酸プロファイルの解析. 第54回日本心身医学会学術講演会, パシフィコ横浜, 横浜, 2013.6.26-27.
- 7) Ando T, Tamura N, Ichimaru Y, Kura N, Konishi M, Tomita Y, Chiba N, Ishikawa T and Komaki G. Plasma amino acid profile in anorexia nervosa and its relation to current food intake. International Conference on Eating Disorders 2014, 3.27-29, 2014.

〔図書〕(計 2 件)

- 1) Ando T. Ghrelin Gene Variants and Eating Disorders. In: Anorexia, Litwack, G Ed. Vitamins and Hormones, Vol 92. Academic Press. pp.107-123, 2013.
- 2) 五島直樹. 新機能抗体開発ハンドブック 第1章5節 アレイを用いた自己抗体解析. (株)エヌ・ティー・エス. 2012.

6. 研究組織

(1)研究代表者

安藤 哲也 (Ando Tetsuya)

独立行政法人国立精神・神経医療研究センター精神保健研究所心身医学研究部・室長
研究者番号: 5 0 3 1 1 4 2 8

(2)研究分担者

五島 直樹 (Goshima Naoki)

独立行政法人産業技術総合研究所創薬分子プロファイリング研究センター細胞システム制御解析チーム
研究者番号: 7 0 2 1 5 4 8 2