

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：17701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670355

研究課題名(和文)肥満症における病態特異的グレリン自己抗体の同定

研究課題名(英文)Anti-ghrelin immunoglobulins modulate ghrelin stability and its orexigenic effect in obese mice and humans.

研究代表者

乾 明夫(Inui, Akio)

鹿児島大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：80168418

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文):肥満症におけるグレリン自己抗体の精製、解析とモデル動物におけるグレリン自己抗体の食行動を含む作用解析を行った。グレリンペプチド自己抗体はELISA法で同定し、IgA、IgG、IgM型に分別、精製した。遊離型および結合型の自己抗体を解析し、その親和性やグレリンシグナリングに及ぼす影響を、表面プラズモン共鳴原理を用いたバイオセンサーを用いて解析した。精製グレリン自己抗体は、動物モデルでグレリンの食欲増進作用を増強し、肥満症の一部はこのグレリン自己抗体による可能性が考えられた。現在、グレリン自己抗体のクローニングを試みているが、リガンド分子の大きさ等の問題点を克服する必要がある。

研究成果の概要(英文):Obese individuals often have increased appetite despite normal plasma levels of the main orexigenic hormone ghrelin. Here we show that ghrelin degradation in the plasma is inhibited by ghrelin-reactive IgG immunoglobulins, which display increased binding affinity to ghrelin in obese patients and mice. Co-administration of ghrelin together with IgG from obese individuals, but not with IgG from anorectic or control patients, increases food intake in rats. Similarly, chronic injections of ghrelin together with IgG from ob/ob mice increase food intake, meal frequency and total lean body mass of mice. These data reveal that in both obese humans and mice, IgG with increased affinity for ghrelin enhances ghrelin's orexigenic effect, which may contribute to increased appetite and overeating. We are now performing the isolation of each ghrelin-reactive immunoglobulins with difficulty because of the small MW of ghrelin.

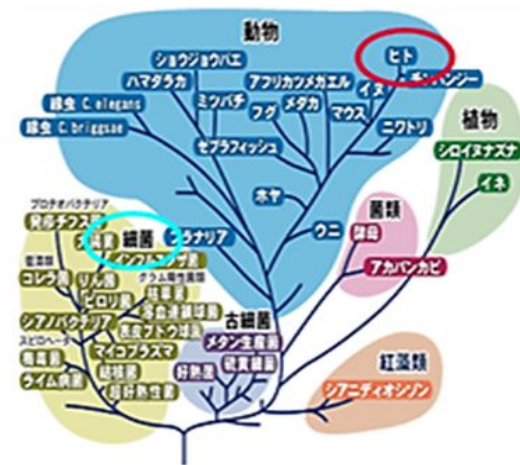
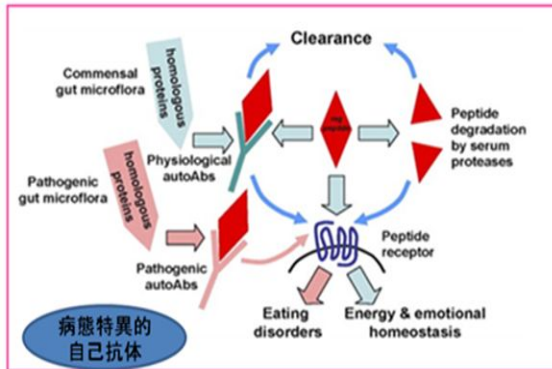
研究分野：心身医学、心療内科学

キーワード：肥満症 グレリン 自己抗体

1. 研究開始当初の背景

食欲や情動・認知には、脳腸ペプチドが重要な役割を演じている。ペプチド自己抗体の存在は、インスリンやグルカゴンなど、ごく一部のペプチドで知られ、高血糖・低血糖の反復など、重要な病態生理学的意義を有することが証明されたが、その後の進歩は認められていなかった。我々は、ペプチド自己抗体が、食欲体重等の脳機能調節に深く関わることを見出してきた。

食欲調節ペプチド自己抗体は腸内細菌蛋白との交差反応によると考えられるが、いまだ明らかではない。



腸内細菌叢の重要性:  
細菌とヒトペプチドの  
構造的類似性

(図1) 食欲調節ペプチド自己抗体症候群の提唱 -Fetissov and Inui-

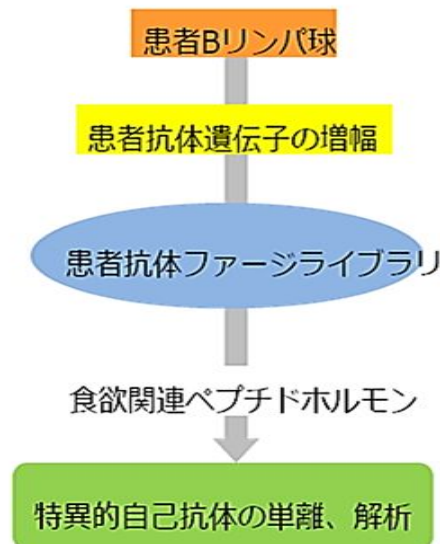
2. 研究の目的

本研究の目的は、肥満症・メタボリックシンドロームにおいて、病態特異的食欲調節ペプチド自己抗体を同定し、食欲調節ペプチド自己抗体症候群として病態を解明することにある。とりわけ、胃から放出される空腹ホルモンであるグレリンに注目し、肥満の生成に重要と考えられるグレリンシグナルを強化する自己抗体を、肥満症・メタボリックシンドローム患者から同定する。患者血中のグレリン自己抗体を精製し、構造解析を行うと

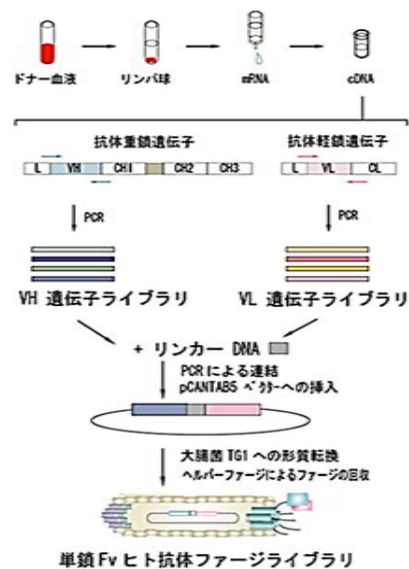
同時に、動物における作用を解析し、グレリン自己抗体によるシグナリング異常と摂食行動、代謝異常を解明する。

3. 研究の方法

動物モデルおよび患者血中の食欲促進ペプチドグレリンと、アシル基の無いデスアシルグレリンを区別して、それぞれの自己抗体を同定した。グレリンペプチド自己抗体は、各々の ELISA 法で同定し、IgA、IgG、IgM 型に分別、精製した。遊離型および結合型の自己抗体を解析し、その親和性やグレリンシグナリングに及ぼす影響を、表面プラズモン共鳴 (SPR) 原理を用いたバイオセンサーを主に用いて解析した。また、我々が有する巨大バクテリオファージライブラリーを用いて、患者個人の食欲調節ペプチド自己抗体ライブラリーの作製と構造決定を行う。



\*疾患の原因となる特異的自己抗体の同定



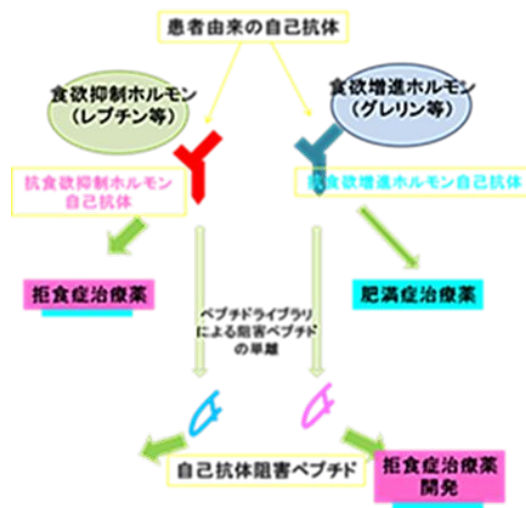
(図2) 肥満症における自己抗体の出現  
～ファージ抗体ライブラリによる自己抗体  
の同定と応用～

#### 4. 研究成果

バクテリオファージライブラリーを用いて、肥満患者個人の抗体ライブラリーを作製し、グレリンペプチド自己抗体のクローニングを行った。ファージディスプレイ法を用いて患者血液由来の抗体ファージライブラリーを構築し、バイオパンニング法により食欲調節ペプチド自己抗体の単離を行った。抽出・精製した自己抗体は、グレリンの作用を増強し(動物モデル)、グレリンシグナリングを増強する病態生理学的意義を有することを証明した(Takagi K, Nature Commun. 2013)。

患者個人の自己抗体の選別に成功し、現在グレリン結合自己抗体のクローニングを行っている。抗体の変領域であるVHとVLをリンカーでつないだ一本鎖抗体(scFv)やFabの形でファージ表面へ提示(ファージディスプレイ法)し、構造決定も終了した。今行っているのは、グレリンペプチドとの親和性の確認・単離であり、ペプチド一般の分子量の少なさから、このプロセスに時間を要している。更なる実験手技の工夫もしくは変更が必要であると考えている。この点に関しては、鹿児島大学理工学研究科 伊東教授のご指導を受け、種々のクローニング法を試みている。

また動物モデルとして、精製した自己抗体の食行動や情動・認知に及ぼす影響を、マーマセットとげっ歯類と比較検討したいと考えている。マーマセットは、食餌性肥満モデルとストレプトゾトシンを用いた糖尿病・認知モデルを用い、今その実験系の構築を行っている。食欲調節ペプチド、例えばグレリンやペプチド YY (PYY) に応答する感度のよい形であることを確認した。霊長類とげっ歯類では食欲・体重調節機構、とりわけ情動や報酬に関わる神経内分泌機構が異なると考えられ、鋭意とその解析を進めている(論文準備中)。



(図3) . 摂食異常症に対するペプチド・抗体医薬の開発と臨床応用

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

(1)Takagi K, Legrand R, Asakawa A, Amitani H, François M, Tenuoune N, Coëffier M, Claeysens S, do Rego JC, Déchelotte P, Inui A, Fetissov SO.

Anti-ghrelin immunoglobulins modulate ghrelin stability and its orexigenic effect in obese mice and humans.

Nature communications.

査読有 4 巻 2013 年 2685 頁

10.1038/ncomms3685

〔学会発表〕(計 4 件)

(1)乾 明夫

がん悪液質の病態と治療の進歩

第 24 回日本病態生理学ランチョンセミナー

2014 年 8 月 9 日

北九州国際会議場(北九州市)

(2)乾 明夫

肥満症診療のトピックス 食欲調節ペプチドを中心に-

第 95 回土曜会

2013 年 12 月 14 日

三宮研修センター(兵庫県神戸市)

(3)乾 明夫

Ghrelin and its autoantibodies in anorexia nervosa

第 11 回世界生物学的精神医学会国際会議

2013 年 6 月 26 日

国立京都国際会館(京都府京都市左京区)

(4)乾 明夫

食欲調節ペプチドから見た摂食障害の病態と治療

第 9 回九州 GIMD クラブ(招待講演)

2013 年 4 月 24 日

ホテルマリターレ創世(久留米市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

乾 明夫 ( Inui Akio )

鹿児島大学  
医歯（薬）学総合研究科  
教授  
研究者番号：80168418

(2)研究分担者

(3)連携研究者

上園 保仁 ( Uezono Yasuhito )  
独立行政法人国立がん研究センター  
がん患者病態生理研究分野  
分野長  
研究者番号：20213340

連携研究者

伊東 祐二 ( Ito Yuji )  
鹿児島大学  
理工学部  
教授  
研究者番号：60223195