

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：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390182

研究課題名(和文)メタボロミクスを用いた食欲調節ペプチド自己抗体症候群の総合的解析

研究課題名(英文)Ghrelin and ghrelin autoabs in anorexia nervosa.

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) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：摂食障害における食欲調節ペプチド自己抗体の解析と精製を行った。神経性食欲不振症患者のグレリン自己抗体は減少し、グレリン抵抗性の一翼を担う可能性が考えられた。神経性食欲不振症患者の血中グレリン自己抗体をIgA、IgM、IgG型に分類・精製し、げっ歯類の脳内投与による食行動への影響を検討したが、グレリン作用を阻害する自己抗体を見出すことはできなかった。新規ペプチド受容体に関してはグレリン様ペプチドの新規受容体のクローニングに成功した(未発表)。メタボローム解析に関しては神経性食欲不振症のメタボロームプロファイリングを確定すべく解析を進め、病態特異的な低分子代謝物の同定に成功した(論文作製中)。

研究成果の概要(英文)：The autoantibodies (autoAbs) against feeding-regulatory peptides such as MSH are reported, with the serum levels being correlated with psychopathological traits in anorexia nervosa (AN) patients. We measured plasma levels of autoantibodies reactive with ghrelin and des-acyl ghrelin by enzyme-linked immunosorbent assay in patients with AN. We found the decrease of bioavailable ghrelin autoAbs may underlie the long-term elevation of plasma ghrelin levels and the relating phenomenon of ghrelin resistance in malnourished patients with AN. The purified ghrelin autoAbs, especially IgG type, failed to affect feeding behavior in rodents after intra-cerebroventricular injection with ghrelin. Although we could not identify the novel peptide, we successfully identified a new peptide receptor related to ghrelin that could be of importance in feeding and other behaviors. We also performed metabolome analysis in AN and identified several changes in low MW substances (in preparation).

研究分野：心身医学、心療内科学

キーワード：神経性食欲不振症 食欲調節ペプチド自己抗体 グレリン

1. 研究開始当初の背景

神経性食欲不振症、癩等の摂食障害・悪液質や肥満症において、食欲調節ペプチドは重要な役割を演じていると考えられる。しかし、従来の研究は、ペプチドそのものに終始し、ペプチドの作用を修飾する自己抗体の解析は不十分であった。神経性食欲不振症や悪液質は難治性の疾患であり、病態の理解や治療法の開発が急務である。我々は、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の概念を提唱しつつある。

2. 研究の目的

本研究の目的は、神経性食欲不振症などの患者血中の食欲調節ペプチド自己抗体を網羅的に解析し、食欲調節ペプチド自己抗体によるシグナリング異常と摂食・認知・情動異常の機序を解明する。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い、ペプチドライブラリーから自己抗体阻害ペプチドを同定し、ペプチド・抗体医薬応用による新しい治療方法の可能性を検討する。とりわけ、神経性食欲不振症では、最先端手法であるメタボローム解析を行い、自己抗体を含めた病態の網羅的解明を試みる。

3. 研究の方法

(1) 摂食障害における食欲調節ペプチド自己抗体の精製、解析と構造決定:

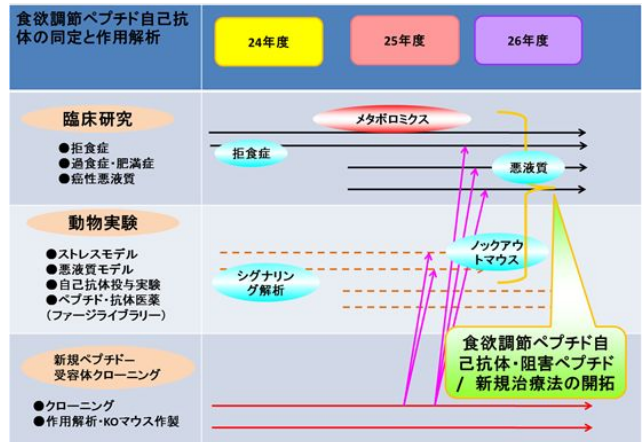
患者血中の食欲促進ペプチド(グレリン神経ペプチド Y (NPY) /アグーチ関連ペプチド (AgRP)) や食欲抑制ペプチド(メラノコルチン (POMC)、ペプチド YY (PYY)、コレシストキニン (CCK)、グルカゴン様ペプチド1 (GLP-1)) などの自己抗体を同定する。とりわけ、グレリンおよび MSHを中心に、食欲調節の根幹を担うペプチドを検討する。食欲調節ペプチド自己抗体はELISA法で同定し、IgA、IgG、IgM型に分別、精製する。食行動や情動・認知との関連を神経心理学的に検討し、あわせて血中ペプチドレベル、代謝産物や栄養療法など治療における変動、病型、合併症、予後等との関連を解析する。

(2) ストレス・悪液質モデル動物における食欲調節ペプチド自己抗体の解析

食欲調節ペプチドや精製食欲調節ペプチド自己抗体を、マウスに腹腔内投与し、食欲・体重調節やエネルギー代謝、不安等の情動、認知・学習に及ぼす影響を解析する。マーモセットを用いた解析も行う。



(図1) マーモセット



(図2) 食欲調節ペプチド自己抗体症候群 - 研究の概略とまとめ -

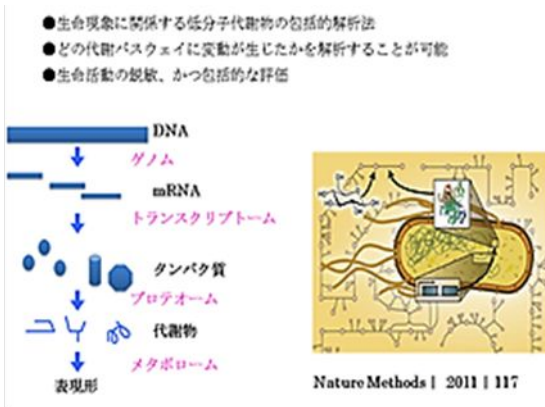
臨床研究は神経食欲不振症・過食症から悪液質までを対象とし、神経性食欲不振症の自己抗体の解析を進めたが、グレリンシグナルを減弱させるグレリン抵抗性に関わる自己抗体の同定は、げっ歯類を中心とした検討からは見出すことができなかった。神経性過食症・肥満症に関する研究は進展し、グレリンシグナルを正に調節する自己抗体を同定することに成功した。今後、自己抗体阻害ペプチドの同定を進めていく予定である。自己抗体を有する新規ペプチドは見出せなかったが、グレリン様物質の受容体のクローニングに成功した。研究の進捗は必ずしも順調ではなかったが、おおむね図のような流れの中で研究が進展した。

(3) 新規ペプチド 受容体のクローニングと解析

アフィニティーカラムにペプチド(グレリンなど)もしくは可溶性受容体を吸着させ、食欲調節に関わる新規ペプチド 受容体のクローニングを行う。

(4) メタボローム解析

摂食障害のメタボロームプロファイリングを確定し、自己抗体と低分子代謝物の関連を解析し、自己抗体関連および非関連の疾患バイオマーカーを同定する。この目的のために、測定データを処理し、どのような分子が、どのような疾患や進行状態によって変動するのかわかるとともに、疾患特異的な代謝物(メタボローム)変動パターンを決定する。疾患特異的でなく、食事等による変動が大きいものはデータから除去し多変量解析を実施、疾患により変動する代謝物のみを選び出し、グルーピングして疾患特異的メタボロームプロファイリングを構築する。



(図3)メタボロミクス(メタボローム解析)

4. 研究成果

食欲調節ペプチド自己抗体の解析と精製

患者血中の食欲促進ペプチド(グレリン神経ペプチド Y (NPY)/アグーチ関連ペプチド (AgRP)) や食欲抑制ペプチド(メラノコルチン (POMC)、ペプチド YY (PYY)、コレシストキニン (CCK)、グルカゴン様ペプチド1 (GLP-1)) などの内、グレリンファミリーペプチド、POMC などの自己抗体の存在を確認した。食欲調節ペプチド、とりわけグレリンと MSH 自己抗体を ELISA 法で同定し、IgA、IgG、IgM 型に分別、精製し、その一部に関しては構造決定を進めている。

神経性食欲不振症患者から精製したポリクローナルなグレリン自己抗体は、カイネテイクスの異常にもかかわらず、動物実験ではグレリン作用を修飾しえず、モノクローナル化を行うことができなかった。肥満症患者からのグレリン自己抗体は、グレリン作用を増強することを証明し (Takagi K, Nature Commun. 2013)、構造決定、単離のプロセスを進めている。

マームセットの食行動解析系を確立した。この系を用い、ペプチドリガントの作用を解析し、論文投稿準備中である。げっ歯類よりも、ヒトの食行動に近いパターンを示すことを確認している。ペプチド YY (PYY) および隣ポリペプチド (PP) に関しては心循環動態に及ぼす影響を解析し、糞便中の食物残渣解析から、消化・吸収をも比較検討しうる系を確立した。

新規ペプチド、新規受容体のクローニング

新規ペプチドの同定には至らなかったが、グレリン様ペプチドの未知なる受容体の同定に成功した。現在特許取得を進めているが、グレリンやグレリン化合物の臨床応用の可能性から、大きな成果と期待している。そのシグナリング機構や病態生理学的意義に関し、現在研究を進めている。

摂食障害患者のメタボローム解析

神経性食欲不振症患者を中心に、メタボローム解析を施行した。メタボローム解析は、ガスクロマトグラフィー質量分析計 (GC-MS)

により水溶性低分子代謝物を、また液体クロマトグラフィー質量分析計 (LC-MS) により脂質、極性水溶性代謝物の解析を行った。現在研究は終了し、論文作製中であり、世界的にも報告されていない貴重な成果が得られるものと期待している。その後、食欲調節ペプチド自己抗体や臨床病態とメタボロームプロファイリングを比較検討する予定である。

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, Tennoune 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

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

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(招待講演)

2013 年 6 月 26 日

国立京都国際会館(京都市)

(3) 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)

(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 17 回熊本精神科臨床治療懇話会

2012 年 11 月 13 日

ホテル日航熊本(熊本県)

〔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

浅川 明弘 (Asakawa Akihiro)
鹿児島大学
医歯(薬)学総合研究科
准教授
研究者番号: 10452947

研究分担者

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

(3)連携研究者

岸田 昭世 (Kishida Shosei)
鹿児島大学
医歯(薬)学総合研究科
教授
研究者番号: 50274064

連携研究者

宮田 篤郎 (Miyata Atsurou)
鹿児島大学
医歯(薬)学総合研究科
教授
研究者番号: 60183969

連携研究者

吉田 優 (Yoshida Masaru)
神戸大学
医学(系)研究科(研究院)
准教授
研究者番号: 00419475

連携研究者

加藤 郁夫 (Kato Ikuo)
北陸大学
薬学部
教授
研究者番号: 70509843