

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 29 日現在

機関番号：17701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2015

課題番号：15K15277

研究課題名(和文) 食欲調節ペプチド自己抗体のクローニングとその意義の解明 - グレリンを中心に -

研究課題名(英文) Cloning of peptide auto antibodies

研究代表者

乾 明夫 (Inui, Akio)

鹿児島大学・医歯学域医学系・教授

研究者番号：80168418

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：肥満症患者を対象とし、血漿中の食欲調節ペプチドに対する抗体価の測定を行い、アシルグレリンやデスアシルグレリンに対する抗体価が高値であることを確認した。また、肥満症患者の血液から抗体遺伝子の可変領域をつないだ一本鎖抗体(scFv)を作製した。ファージディスプレイ法やバイオパンニング法を用いて、アシルグレリンやデスアシルグレリンに特異的に結合する抗体ファージを精製した。精製した抗体ファージのアシルグレリン、デスアシルグレリン各々に対する特異性や他の抗原に対する反応はELISA法を用いて測定し、グレリンに対する特異性を確認した。

研究成果の概要(英文)：We intended for obesity patients and measured the plasma antibody titer for appetite adjustment peptide and confirmed that antibody titer for acyl ghrelin and the death acyl ghrelin was a high price. In addition, we made single-chain Fv fragment (scFv), which we tied the variable region of the antibody gene from the blood of the adiposity patient. Using the phage display method and the biopanning method, we purified the antibody bacteriophage which specifically bind to acyl ghrelin and des-acyl ghrelin. The reaction of refined antibody bacteriophages to acyl ghrelin, des-acyl ghrelin and other antigens measured them using the ELISA method. We confirmed it's specificity for ghrelin.

研究分野：心身内科学

キーワード：摂食関連ペプチド グレリン自己抗体 食行動異常

1. 研究開始当初の背景

摂食はエネルギー摂取のための最も基本的な生命活動であり、その障害は恒常性維持のための生理機能の調節のみならず、情動調節、認知・行動調節など様々な影響を及ぼす。近年、肥満症や悪液質、摂食障害患者は年々増加しており、高齢化や年齢層の拡大(摂食障害)と共に問題はより深刻化している。特に死亡率の高い摂食障害は、神経性食欲不振症、神経性過食症に区分されているが、厚生労働省の難治性疾患に指定されており、その病態の解明や治療法の進歩が強く求められている。

我々を始め日本人研究者により、神経性食欲不振症においては胃から分泌される空腹ホルモングレリンの放出が不十分であることが明らかにされ、グレリンの投与が世界に先駆けて開始された。しかしながら、摂食障害や悪液質においては、グレリン抵抗性が存在し、飢えに対するグレリンの応答を阻害している可能性が明らかとなった。我々は神経性食欲不振症患者において、グレリン自己抗体の存在を証明し、再栄養療法により改善することを明らかにした(Terashi M, Nutrition 2011)。また、肥満者および肥満マウスのグレリン自己抗体は、グレリンに結合して保護的に作用し、グレリンの食欲促進作用を増強することを明らかにした(Takagi K, Nature Commun.2013)。これらのことは、グレリン自己抗体がグレリン抵抗性や感受性に関わり、ホルモン作用の修飾因子として、病態生理学的意義を有するものと考えられる(図1)。

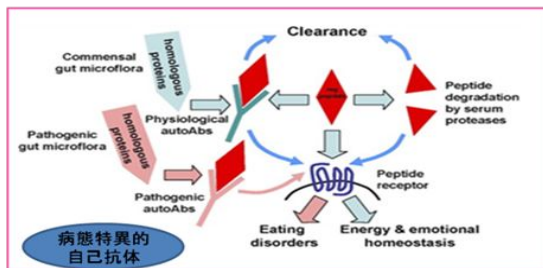


図 1. 食欲調節ペプチド自己抗体群の提唱 -Fetissov and Inui-

2. 研究の目的

本研究は、グレリンを中心とした食欲調節ペプチドに焦点を当て、これらに対する病態特異的な自己抗体をクローニングし、肥満症や中枢性摂食異常症、悪液質などの食欲関連疾患治療に効果的な抗体医薬品の開発・臨床応用に資する研究である。ファージディスプレイ法やバイオパンニング法を用いて、患者血中より病態特異的な食欲調節ペプチド自己抗体ライブラリの作製と構造決定を行い、それを基にペプチドライブラリから自己抗体阻害ペプチドを同定し、ペプチド・抗体医薬品による新しい治療法を創出する。ストレス・悪液質の動物モデルや霊長類マーモセットを用いて、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・情動異常を解明する。食欲関連疾患における自己抗体の病態生理学的意義、新たな摂食メカニズムの解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) 患者血漿を用いたグレリンを中心とした食欲調節ペプチドに対する抗体価の測定

患者血中より血漿を分離し、ELISA法を使用して、アシルグレリンやデスアシルグレリンなどを中心とした食欲調節ペプチドに対する抗体価を測定する。

(2) 患者血中より食欲調節ペプチド自己抗体の精製、解析と構造決定

摂食異常症の患者血中の食欲促進ペプチド関連ペプチド(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))などのうち、グレリン次いで MSH の自己抗体を同定する。共に、食欲調節の根幹を担うペプチドである。食欲調節ペプチド自己抗体の精製にはファージディスプレイ法を用いて行う。抗体は可変領域の遺伝子再配列により抗原に対する多様性を獲得する。その可変領域である VH 領域と VL 領域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するのがファージディスプレイ法である。食欲関連疾患患者の末梢血よりリンパ球を分離し cDNA を合成する。合成した cDNA を基に PCR 法で抗体遺伝子の可変領域の部分を増幅する。増幅

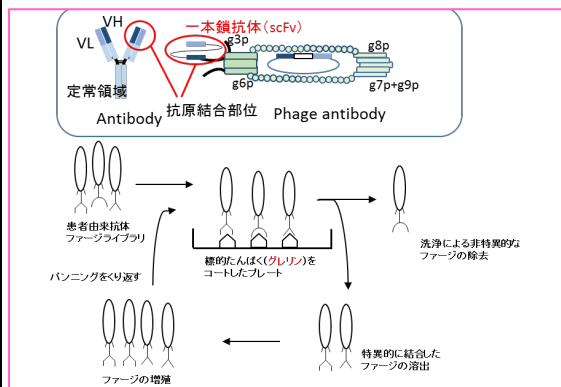


図 2. 抗体と抗体ファージの構造(上)、ファージのバイオパンニング(下)

した VH 領域と VL 領域をリンカーDNA を用いて一本鎖抗体(scFv)にする。作成した一本鎖抗体の配列を解析し、変異がないことを確認し、ファージディスプレイ法にて食欲関連疾患患者由来のファージディスプレイヒト抗体ライブラリを作製する。その後、バイオパンニング法を用いて、構築した抗体ファージライブラリより食欲調節ペプチドに対して特異的に結合するファージを選別、患者由来食欲調節ペプチド自己抗体を精製する(図2)。

我々は、ファージディスプレイ技術を用いて、無数のレパートリーを有するヒト抗体ライブラリと巨大なペプチドライブラリを構築

してきた。この技術を応用し、病態特異的自己抗体の同定、構造決定を行い、このライブラリを創薬シーズとして用いる。

### (3) 食欲調節ペプチド自己抗体阻害ペプチドの同定

精製した患者由来抗体ファージライブラリを用いて、我々の有する巨大ペプチドライブラリより、グレリンを中心とした食欲調節ペプチド自己抗体に特異的に働く阻害ペプチドを同定する。

### (4) 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機能解析

精製食欲調節ペプチド自己抗体、また自己抗体阻害ペプチドを、肥満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(Asakawa and Inui, *Gastroenterology*, 1999, 1999, 2001, 2003)。我々は *Nat Commun.* 紙にて、肥満者及び肥満マウスの IgG はグレリンに対して高親和性で分解されにくく、それによってグレリンの食欲促進作用が増強されていることを明らかにしている (Takagi K, *Nature Commun.* 2013)。本研究にて、よりグレリンに対して特異的な作用を持つ自己抗体を単離することができれば、さらに活性化された食欲促進作用が期待できる。不安・抑うつ評価系としては、高架式十字迷路、オープンフィールドテストや強制水泳モデルを用い、認知・学習は受動回避試験でスクリーニングの後、空間認知を反映する Morris 水迷路を用いる。動物の行動解析をより鋭敏に行うために、摂食・飲水量経時記録装置 (K2-CABIN) を用いる。長期にわたり摂食・飲水量を記録することで、より詳細な解析が可能になるためである。不安やストレスモデル (電気ショック、水浸拘束、ソーシャルストレスなど) や悪液質モデルなど我々の研究室で使用しているモデル動物を用いて、その作用を検討する。ペプチド性食欲調節因子の検討からは、過食症は拒食症と鏡面関係にある自己抗体プロファイルを示すと予想されるが、検討成績は我々のグループを除き、皆無に等しい。また、癌などの悪液質病態においても同様な病態が形成されている可能性が高く、精製した食欲調節ペプチド自己抗体・阻害ペプチドの作用をこれらの動物モデルで検討することにより、様々な病態における自己抗体の意義の解明、治療法への応用を目指す。

### (5) 食欲調節ペプチド自己抗体・阻害ペプチドの最適化

動物モデルを用いて得られた自己抗体・阻害ペプチドの効果や問題点を確実にフィードバックし、より有効な抗体医薬品へと応用する。ファージディスプレイ法を用いた抗体精製では、分子量が小さく組織への浸透率の高い一本鎖抗体から、生体内での安定性・結

合親和力の高い完全抗体への変換も可能であり、これらを比較・検討することにより機能性の高い構造を持つ自己抗体・阻害ペプチドの精製を行う。また、最適化を行った食欲調節ペプチド自己抗体・阻害抗体の生体内での作用を検討する。生体内機能の解析を充分に行うことにより、摂食メカニズムの新たな知見を得ることも期待できる。

## 4. 研究成果

### (1) 患者血漿を用いたグレリンを中心とした食欲調節ペプチドに対する抗体価の測定

研究代表者らはすでに、グレリン作用を増強するグレリン自己抗体の存在を明らかにしている。本研究においても食欲関連疾患患者の血液より血漿を分離し、ELISA 法にて食欲調節ペプチド (アシルグレリン、デスアシルグレリン、レプチン、 $\alpha$ -MSH) に対する抗体価を抗体クラス別 (IgG<sub>1</sub> ~ IgE) に評価した。食欲関連疾患患者では食欲調節ペプチドに対する抗体価が高く、特にアシルグレリン、デスアシルグレリンに対して、IgG<sub>1</sub> の抗体価が非常に高いことを確認した。

### (2) 患者血中より食欲調節ペプチド自己抗体の精製・解析と構造決定

食欲関連疾患患者の末梢血よりリンパ球を分離し、RNA から cDNA を合成した。合成した cDNA を基に抗体の可変領域 (VH 領域と VL 領域) を PCR 法にて増幅し、リンカー DNA を用いて一本鎖抗体 (scFv) を作製した。作製した scFv の遺伝子配列を解析し、変異が含まれていないことを確認、食欲関連疾患患者の抗体ライブラリを構築した。その後、scFv の情報をファージの表面へ掲示できるファージディスプレイ法を用いて、食欲関連疾患患者由来のファージディスプレイヒット抗体ライブラリを作製した。作製した抗体ライブラリは食欲関連疾患患者の抗体情報を網羅していると考えられる十分なライブラリサイズであった。作製した患者由来ファージディスプレイヒット抗体ライブラリを用いて、バイオパニング法を行った。バイオパニング法は、操作を繰り返すことにより特異性の高いファージを精製するものである。本研究においても 6 回の操作を繰り返すことによりアシルグレリンやデスアシルグレリンに対して特異的に結合すると考えられる食欲関連疾患患者由来抗体ファージを精製した。精製した抗体ファージの中から特にアシルグレリン、デスアシルグレリン各々に対して特異的と推定される抗体ファージを用いて、その特異性を評価した。また、アシルグレリン、デスアシルグレリン特異的な患者由来抗体ファージの他の抗原に対する反応を ELISA 法を用いて評価を行い、他の抗原に対する結合が低いことを確認している。

本研究においては、バイオパニング法においてグレリン等の食欲調節ペプチドと抗体ファージライブラリの結合・濃縮に時間を要

することや困難な場合が考えられた。しかし、バイオパニングによるファージの精製が可能となったことにより、急速に抗体ファージの特異性等の評価が進んでおり、今後も順調に研究が進行すると考えている。

今後は、グレリン特異的な患者由来抗体ファージの遺伝子配列の解析や作製した抗体ファージを基にした食欲調節ペプチド自己抗体阻害ペプチドを同定する。また、動物モデルを使用して患者由来食欲調節ペプチド特異的抗体ファージや自己抗体阻害ペプチドの生体内での作用を解析し、食欲関連疾患における自己抗体の病態生理学的意義、新たな摂食メカニズムの解明を目指す。

## 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 2 件)

1. Fujitsuka N, Asakawa A, Morinaga A, Amitani MS, Amitani H, Katsuura G, Sawada Y, Sudo Y, Uezono Y, Mochiki E, Sakata I, Sakai T, Hanazaki K, Yada T, Yakabi K, Sakuma E, Ueki T, Niijima A, Nakagawa K, Okubo N, Takeda H, Asaka M, Inui A. Increased ghrelin signaling prolongs survival in mouse models of human aging through activation of sirtuin1. Mol Psychiatry. 2016 [Epub ahead of print]査読有
2. 乾明夫「グレリンの臨床応用」『日本潰瘍学会誌 潰瘍』43 巻(2016)印刷中  
査読無

[学会発表](計 1 件)

乾明夫「グレリンの臨床応用」第 43 回日本潰瘍学会.2015 年 6 月 20 日沖縄科学技術大学院大学(沖縄県恩納村)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

乾 明夫 (INUI, Akio)

鹿児島大学・医歯学域医学系・教授

研究者番号：80168418

### (2)研究分担者

なし

### (3)連携研究者

勝浦 五郎 (KATSUURA, Goro)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・特任講師

研究者番号：20401226