

## 論 文 要 旨

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

肥満者及び肥満マウスにおいて、  
抗グレリンイムノグロブリンはグレリン安定性と  
その摂食促進作用を調節する

高木 恭仁子

## 【序論および目的】

肥満者では主要な食欲促進ペプチドであるグレリンの血漿レベルが正常値であるのにも関わらず食欲が増す。これは、肥満者ではグレリンのシグナルがより強力に中枢神経性食欲調節機構に伝わっていることを示唆している。グレリンは主に胃より分泌され、GHS レセプターに活性を持つアシルグレリンと非活性型のデスアシルグレリンが存在する。近年、グレリン反応性イムノグロブリンG(IgG)、すなわちグレリン自己抗体が健常者及び神経性摂食不振症者(AN)で同定されている。そこで、この抗グレリン IgG の親和性の変化が、肥満でのグレリンの摂食促進を増強している可能性があることを検証した。

## 【材料および方法】

**被験者** 肥満者(n=14, BMI  $31.1 \pm 1.6$  kg/m<sup>2</sup>, 年齢  $23.1 \pm 1.1$  歳)、AN (n=12, BMI  $13.3 \pm 0.4$  kg/m<sup>2</sup>,  $21.4 \pm 2.0$  歳)及び健常者(n=14, BMI  $20.9 \pm 0.5$  kg/m<sup>2</sup>,  $18.9 \pm 1.1$  歳)はすべて女性であり、鹿児島大学倫理委員会により承認されている。静脈血は一晚絶食の後、午前 8 時にエチレンジアミン四酢酸(1 mg/ml)及びアプロチニン(500 U/ml)入りの採血管で採血した。血漿は 4°C で遠心分離し、一部には 1/10 量の 1N 塩酸を加え、使用まで -80°C で保存した。

**グレリン及び抗グレリンIgGの測定** グレリン及びデスアシルグレリン濃度測定はELISA kitsを用いた。自己抗体IgGの血漿レベルはELISA法を用い、総IgGは免疫ネフェロメトリーにより測定した。総IgGは血漿酸性化後、C-18SEPカラムによるペプチド抽出後、Melon Gel Kitを用いて精製し、凍結乾燥後、-80°C で保存した。表面プラズモン共鳴(SPR)センサー装置による測定ではサンプルをHBS-EP bufferで溶解した。

**IgG の反応速度論的解析** SPR センサー装置 BIAcore 1000 を用い、グレリンもしくはデスアシルグレリンをアミンカップリング法でセンサーチップ CM5 に固定し、各 IgG 0.5 mg/ml を用いた。アフィニティカイネティクス分析はマルチサイクル法によって行い、IgG (0.5, 0.25, 0.125, 0.625, 0.003125 mg/ml) の溶液を用いた。解析は BiaEvaluation 4.1.1 (Langmuir's 1:1) を使用した。

**ラットにおける急性摂食実験** 2 ヶ月齢雄性 Sprague-Dawley ラットを用い、摂食実験は AM11 時に満腹条件下で腹腔内投与(0.3 ml)後 30 分、1、2、4 及び 12 時間の飼料重量を測定した。実験 1) ヒト及びラットグレリン、1 または 3 nmol を投与した。実験 2) 各血漿から精製した IgG 150 µg、対照群には PBS を投与した。実験 3) IgG 及び 1 nmol ヒトグレリンを併投与した。全実験を通じて、各ラットに

は毎回同じ IgG を投与し、対照群は PBS もしくはグレリンのみを投与した。(各群 n=6)

**In vitro グレリン分解試験** IgG 抽出後の血漿溶出液にヒトグレリン(最終添加濃度 30 fmol/ml (PBS)) を加え、次に同じ血漿より抽出した IgG(1 nmol)を添加し、2 時間 37°Cで攪拌しながらインキュベートした。対照群には IgG を添加しないものを用いた。その後、グレリン濃度を前出の方法で測定した。

**肥満 *ob/ob* 及び正常マウス IgG の解析** 2 ヶ月齢雄性 *ob/ob* 及び C57BL6 マウスは非絶食下で断頭後、採血を前出の方法で行った。総 IgG は前出の方法で抽出し以下の実験に用いた。1 ヶ月齢 C57BL6 マウスを BioDAQ ケージにて、1)PBS、2)グレリン単独、3)グレリン+C57BL6 マウス IgG、4)グレリン+*ob/ob* マウス IgG の 4 群(各 n=8)に分け、AM10 時及び PM6 時 45 分の 1 日 2 回 14 日間腹腔内連続投与した。グレリンは 4 日目まで 0.1 nmol、その後 1 nmol を投与した。また、6 つの低 KD 値の *ob/ob* マウス IgG あるいは 6 つの高 KD 値の C57BL6 マウスの IgG プールから IgG 1 nmol をグレリンと併投与し、摂食行動を評価した。

## 【結 果】

**患者及び健常者のグレリン濃度** フリーの血漿グレリン、デスアシルグレリン濃度は肥満者と健常者では差がなかったが、抗体結合型グレリンを加えた積算グレリン濃度は肥満者で上昇していた。AN ではフリーの血漿グレリン及びデスアシルグレリン濃度の上昇が認められた。

**患者及び健常者の抗グレリン IgG** 抗グレリン IgG の血漿レベルは各群で差はなかった。肥満者の抗グレリン IgG は早い結合速度による高親和性を示した。抗デスアシルグレリン IgG に関しては、血漿中レベル、反応速度論的解析ともに群間で有意な差はなかった。

**肥満者 IgG はグレリンによる摂食促進作用を増強する** AN 及び健常者 IgG とグレリンの併投与では認められなかったが、肥満者 IgG とグレリンの併投与では著明な摂食促進が認められた。

**IgG はグレリンを分解から保護する** IgG 添加血漿溶出液ではグレリンの分解の抑制が確認されたが、患者及び健常者群で差は認められなかった。しかし、肥満者 IgG のグレリンの保護効率は他の群に比べて高かった。

***ob/ob* マウスまたは正常マウスのグレリン及び抗グレリン IgG** 血漿グレリン、デスアシルグレリン及び抗グレリン IgG レベルは *ob/ob* マウスで正常マウスよりも低かった。*ob/ob* マウスの抗グレリン IgG は遅い解離速度による高い親和性を示した。

**肥満マウス IgG はグレリンによる摂食促進作用を増強する** *ob/ob* マウス IgG とグレリンの 14 日間慢性併投与によって、一回の食餌量に変化はなかったが食頻度が増えたことにより摂食量が上昇した。

## 【結論及び考察】

今回の実験から、血液中でグレリンは IgG 結合型と非結合型の両者で存在し、グレリンは IgG と結合することによりその分解から保護されていることが明らかとなった。さらに、肥満者及び肥満マウスの IgG はグレリンに対して親和性が高く、それによってグレリンの食欲促進作用が肥満では増強されていることが明らかとなった。