

201224/18A

厚生労働科学研究費補助金

障害者対策総合研究事業

筋ジストロフィー患者のリハビリテーションに用い  
る尿中病態マーカー物質の測定法

平成24年度 総括研究報告書

研究代表者 裏出 良博

平成25（2013）年 5月

# 目 次

I. 総括研究報告	
筋ジストロフィー患者のリハビリテーションに用いる 尿中病態マーカー物質の測定法 裏出良博	----- 1
II. 分担研究報告	
1. 筋ジストロフィーの病態進行の生化学マーカーとなる 尿中プロスタグランジン D <sub>2</sub> 代謝物の簡易測定法の開発研究 裏出 良博	----- 6
2. 筋ジストロフィー患者のリハビリテーションに用いる 尿中病態マーカー物質の測定法に関する研究 松尾 雅文	----- 11
3. 筋ジストロフィー患者の尿中プロスタグランジン D <sub>2</sub> 代謝物の定量分析 竹内 敦子	----- 14
4. 動物モデルを用いた筋壊死と尿中代謝物の相関の実証 岩田 裕子	----- 19
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 22
IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 23

厚生労働科学研究費補助金（障害者対策総合研究事業）  
総括研究報告書

筋ジストロフィー患者のリハビリテーションに用いる  
尿中病態マーカー物質の測定法

研究代表者：裏出 良博（公財）大阪バイオサイエンス研究所  
分子行動生物学部門 研究部長

【研究要旨】

申請者らはデュシェンヌ型筋ジストロフィー（DMD）患者の筋壊死領域では炎症物質であるプロスタグランジン(PG) $D_2$ の産生が亢進することを見出し、その産生を司る造血器型PGD合成酵素に対する阻害剤を投与するとDMDモデル動物（*mdx*マウスとDMDビーグル犬）の筋壊死が抑制されることを証明した。本研究では、尿中PGD $_2$ 代謝物（PGDM-tetranor）がDMDの病態進行度を予測する非侵襲性マーカーになる可能性を検証し、その簡易測定法の開発に取り組む。

*mdx*マウスにトレッドミルを用いた運動負荷を行うと、筋壊死体積と尿中PGD $_2$ 代謝物が共に増加したので、尿中PGD $_2$ 代謝物がDMDの病態進行の新たな指標として使用できることが示唆された。拡張型心筋症モデルハムスターと2種類の心筋症モデルマウスでも尿中PGD $_2$ 代謝物の増加を確認したので、尿中PGD $_2$ 代謝物は心筋での筋壊死の病態進行の指標としても使用できる可能性がある。4歳から15歳までの117名のDMD患者と同年齢の健常児童71名の早朝第一尿を収集して尿中PGD $_2$ 代謝物量を測定した。その結果、DMD患者の尿中PGD $_2$ 代謝物濃度（ $6.90 \pm 0.35$  ng/mgクレアチニン）は健常児童（ $3.08 \pm 0.15$ ）に比べて2.2倍も高く、病状の安定した7歳までの患者（ $4.75 \pm 0.32$ ）よりも運動機能が急激に低下する8歳以上の患者（ $7.69 \pm 0.44$ ）ではより高い値を示し、病態の進行につれて尿中PGD $_2$ 代謝物が増加することが証明された。PGD $_2$ 産生能を失ったPGD合成酵素ノックアウトマウスにPGDM-tetranor・KLH蛋白質複合体を免疫して、PGDM-tetranorに対するモノクローナル抗体5種類を得た。これらの抗体を利用したELISAや尿検査紙を作製することで、尿中PGD $_2$ 代謝物の簡易測定法が開発できる。

研究分担者

松尾雅文 神戸学院大学  
総合リハビリテーション学部  
教授

竹内敦子 神戸薬科大学 薬学部  
准教授

岩田裕子 国立循環器病研究センター  
研究所 分子生理部  
室長



## A. 研究目的

DMDはジストロフィン蛋白質の遺伝的欠損症であり、筋肉の壊死と再生を繰り返すことで筋幹細胞が枯渇し、歩行困難から死に至る疾患である。その治療法は、本申請組織の松尾らによるエキソン・スキップによる遺伝子治療、裏出らによる造血器型PGD合成酵素阻害剤、あるいは、iPS細胞を利用した幹細胞治療などがあるが、いずれも研究段階や治験段階であり実用に至っていない。従って、現在、患者に適応可能なものは筋力低下の防止を目的としたリハビリテーションのみである。しかし、リハビリテーションも運動の過負荷は逆に筋傷害を進行させる危険を伴う。従って、運動負荷量の選定に有効な病態マーカーが求められている。

本研究では、動物実験および臨床試験により、尿中PGD<sub>2</sub>代謝物の病態進行評価指標としての有効性を統計学的処理により検証し、モノクローナル抗体を用いた安価かつ簡便な尿中PGD<sub>2</sub>代謝物の測定技術を開発する。

## B. 研究方法

(1) *mdx* マウスでの運動負荷による筋壊死体積と尿中 PGD<sub>2</sub> 代謝物の変動の測定

*mdx* マウス (9-10 週齢) を実験動物用強制運動測定器 (トレッドミル) を用いて、7-8 m/min の速度で 1 時間、運動負荷を与えた。

運動負荷前 12 時間および運動負荷後 12 時間の尿を回収し、尿中の PGD<sub>2</sub> 代謝物 (tetranor-PGDM) および PGE<sub>2</sub> 代謝物 (tetranor-PGEM) を、液体クロマトグラフィ・タンデムマススペクトル (LC-MS/MS)

法を用いて分析した。

マウスの壊死筋の非侵襲的な検出と定量には、小動物用 X 線 CT 撮影装置を用いた。予め投与した非イオン性 X 線造影剤の壊死筋への漏出を指標として、運動負荷前後の壊死体積を定量した。

(2) 心筋症モデル動物の尿中 PGD<sub>2</sub> 代謝物の測定

$\delta$ -sarcoglycan を欠損した拡張型心筋症モデルハムスターについて、心筋症病態の発症前後 (4 週齢及び 16 週齢) の動物を用いた。対照として、同週齢の野生型動物を用いた。また、心筋症モデルマウスについても検討した。採尿は、代謝ケージを用いて暗期 (12 時間) に行った。

尿中 tetranor-PGDM 量は、LC-MS/MS 法 (LC: 資生堂、MS/MS: AB Sciex) によって測定した。各週齢における心機能は、小動物用超音波高解像度イメージングシステム (VISUALSONICS) を用いて、麻酔下で非侵襲的に評価した。

(3) DMD 患者の尿中 PGD<sub>2</sub> 代謝物の測定

1) 尿試料の収集: 神戸大学医学部附属病院小児科を受診している DMD 患者で同意の得られた例から尿を収集した。尿中の PGDM 測定は後述の HPLC・MS/MS 法を用いた。まず、日内変動を解析して、尿中 PGDM が早期第 1 尿で低値であることから、早期第 1 尿の収集をはかった。

2) 尿中 PGD<sub>2</sub> 代謝物の測定: DMD 患者および健常者の尿 0.4ml に内標準物質 (tetranor-PGDM-d6) を加え、固相抽出カラムを用いて PGDM を抽出し、抽出液を濃縮乾固・再溶解して測定用試料と

した。検量線作成のために内標準物質を加えた各濃度の標準試料も作成した。標準試料・測定用試料を API3000 LC-MS/MS system に適用し、最適条件におけるプリカーサーおよびプロダクトイオンを検討した後、SRM (Selected Reaction Monitoring) 法で測定した。PGDM と内標準物質とのピーク面積比を用いて定量値を算出した。また、比色定量によりクレアチニンを定量し、補正した。

#### (4) 抗 tetranor-PGDM モノクローナル抗体の作製

Tetranor-PGDM に対する特異的抗体を作製するために、PGD<sub>2</sub> 産生能を失ったりポカリン型および造血器型 PGD 合成酵素を欠損したダブルノックアウトマウス (Balb/c 系統) に、Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH) をキャリアタンパク質とした tetranor-PGDM 複合体抗原を免疫した。

経時的な採血による抗体価の確認と追加免疫を行い、最終的に脾細胞を採取した。続いて、細胞融合を行い、得られたハイブリドーマの特異性は、抗原である tetranor-PGDM と tetranor-PGEM および 2,3-dinor-TXB<sub>2</sub> を比較対照として確認した。

#### (倫理面への配慮)

本研究の動物実験については、公益財団法人大阪バイオサイエンス研究所及び国立循環器病研究センターの動物実験指針に準拠して実施した。研究計画は動物実験委員会の承認を得て、麻酔使用等により動物愛護上の倫理的配慮を行い、適切な環境のもとで飼育管理を行った。

DMD 患者の尿中 PGD<sub>2</sub> 代謝物の測定

実験に当たっては、神戸学院大学倫理委員会および神戸大学医学部倫理委員会の承認のもとに実施した。

本研究においては、文部科学省、厚生労働省、経済産業省告示第1号の「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守した研究計画書を作成し、研究施設での倫理委員会において承認を受けた上で研究を行った。試料提供者への説明とインフォームド・コンセント、個人情報への厳重な管理 (匿名化) などを徹底している。遺伝子組換え生物の使用にあたっては、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」、「研究開発等に係る第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置を定める省令 (二種省令)」、「二種省令に基づく告示」、および所属機関の定める規程に従い、また設置されている遺伝子組換え実験安全委員会の審査を経たのち、指定された場所・方法により細心の注意をもって行っている。

動物を用いた実験を行う場合には、所属機関の「動物実験等に関する規則」を遵守し、動物実験実施者及び飼養者に対する教育訓練を受講し、動物愛護上の適切な配慮を行う。「遺伝子組換え生物等の使用」・「動物実験」に関しては、該当研究機関において研究計画が承認されている。

なお、全ての研究実施において、厚生労働省の定める指針等について遵守している。

#### C. 研究結果

(1) *mdx* マウスでの運動負荷による筋壊死体積と尿中 PGD<sub>2</sub> 代謝物の変動

*mdx* マウスにトレッドミルを用いた

運動負荷を行い、その前後での腓腹筋での筋壊死体積の変化を X 線 CT 造影により測定し、尿中 PGD<sub>2</sub> 代謝物の濃度変化を液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析装置 (LC-MS/MS) により測定した結果、運動負荷は *mdx* マウスの筋壊死体積を増加させ、尿中 PGD<sub>2</sub> 代謝物も増加させた。この結果は、DMD の病態進行の新たな指標として尿中 PGD<sub>2</sub> 代謝物が使用できることを示す。

### (2) 心筋症モデル動物の尿中 PGD<sub>2</sub> 代謝物の測定

DMD 骨格筋の病態進行と PGD<sub>2</sub> の産生亢進に関連して、拡張型心筋症モデルハムスターと 2 種類の心筋症モデルマウスを用いて心筋での筋壊死との関連性を検討した。その結果、いずれの心筋症モデルでも尿中 PGD<sub>2</sub> 代謝物の増加を確認した。従って、尿中 PGD<sub>2</sub> 代謝物は心筋での筋壊死の病態進行の指標としても使用できる可能性がある。

### (3) DMD 患者の尿中 PGD<sub>2</sub> 代謝物の測定

DMD 患者団体の協力を得て、4 歳から 15 歳までの 117 名の患者の早朝第一尿 191 点と、同年齢の健常児童 71 名の早朝第一尿 79 点を収集して、彼らの尿中 PGD<sub>2</sub> 代謝物量と尿中クレアチニンを測定した。その結果、筋ジス患者の尿中 PGD<sub>2</sub> 代謝物濃度 ( $6.90 \pm 0.35$  ng/mg クレアチニン) は、健常児 ( $3.08 \pm 0.15$ ) に比べ、2.2 倍も高い値を示した。さらに、その濃度は病状の安定した 7 歳までの患者 ( $4.75 \pm 0.32$ ) では健常児 ( $3.55 \pm 0.30$ ) に比べ 1.3 倍ほど高いだけだが、筋委縮が進み運動機能が急激に低下する 8 歳以上の患者 ( $7.$

$69 \pm 0.44$ ) では健常者 ( $2.90 \pm 0.17$ ) の 2.7 倍も高い値を示し、病態の進行につれて尿中 PGD<sub>2</sub> 代謝物が増加することが明らかになった。

### (4) 抗 tetranor-PGDM モノクローナル抗体の作製

尿中 PGD<sub>2</sub> 代謝物の簡易測定法を開発するために、PGDM-tetranor を Keyhole Limpet Hemocyanin 蛋白質に結合させた複合体を、PGD<sub>2</sub> 産生能を失ったリポカリン型 PGD 合成酵素と造血器型 PGD 合成酵素のダブル・ノックアウトマウス (Balb/c 系) に免疫して、常法による免疫動物の脾細胞を用いたモノクローナル抗体の作製を行なった。

PGE<sub>2</sub> 代謝物 (PGEM-tetranor) と тромбоキサン A<sub>2</sub> 代謝物 (2,3-dinor TXB<sub>2</sub>) を比較対照としたスクリーニングを行い、PGDM-tetranor に対して 100 倍以上の特異性を持つモノクローナル抗体を産生する独立したハイブリドーマを 5 クローン得た。

いずれの抗体も米国 Cayman 社から供与された PGDM-tetranor に対するポリクローナル抗体と同程度の結合親和性と特異性を示した。

## D. 考察

*mdx* マウスにトレッドミルを用いた運動負荷を行うと、筋壊死体積と尿中 PGD<sub>2</sub> 代謝物が共に増加したので、尿中 PGD<sub>2</sub> 代謝物が DMD の病態進行の新たな指標として使用できると考えられる。

拡張型心筋症モデルハムスターと 2 種類の心筋症モデルマウスでも尿中 PGD<sub>2</sub> 代謝物の増加を確認したので、尿中 PGD<sub>2</sub> 代謝物は心筋での筋壊死の病態進行の指

標としても使用できる可能性がある。

DMD患者の尿中PGD<sub>2</sub>代謝物量は健常児童に比べて2.2倍も高く、病態の進行につれて上昇することが証明されたので、DMDの病態進行の新たな指標として尿中PGD<sub>2</sub>代謝物量が使用できると考えられる。

得られた5クローンのPGDM-tetranorに対するモノクローナル抗体は米国Cayman社から供与されたポリクローナル抗体と同程度の結合親和性と特異性を示したので、これらの抗体を利用したELISAや尿検査紙を作製することで、尿中PGD<sub>2</sub>代謝物の簡易測定法が開発できる。

#### E. 結論

尿中PGD<sub>2</sub>代謝物はDMDの病態進行の新たな指標として使用できる。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Nakagawa T, Takeuchi A, Kakiuchi R, Lee T, Yagi M, Awano H, Iijima K, Takeshima Y, Urade Y, Matsuo M., A prostaglandin D<sub>2</sub> metabolite is elevated in the urine of Duchenne muscular dystrophy patients and increases further from 8years old., *Clin. Chim. Acta.* 423, 10-14, 2013

##### 2. 学会発表

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

厚生労働科学研究費補助金（障害者対策総合研究事業）  
分担研究報告書

筋ジストロフィーの病態進行の生化学マーカーとなる尿中プロスタグランジン D<sub>2</sub>代謝物の簡易測定法の開発研究

研究分担者：裏出 良博（公財）大阪バイオサイエンス研究所  
分子行動生物学部門 研究部長

【研究要旨】

デュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD)は進行性の筋萎縮症を示し、20歳台に心不全あるいは呼吸不全により死亡する極めて重篤な遺伝子筋疾患である。DMDはジストロフィン欠損により発症する事が明らかになったが、詳細な病態は不明である。そのため、未だ有効な治療法は確立されていない。つまり、診断が容易であるが病態の進行マーカーは未だに確立されていない。

我々は、筋ジスの治療法や病態評価指標の研究を続け、DMDと同様にジストロフィン遺伝子を欠損したモデル動物 (*mdx* マウス) を用いて尿中 PGD<sub>2</sub>代謝物が病態進行度を予測する非侵襲性マーカーになることを示し、患者団体の協力を得て、尿中 PGD<sub>2</sub>代謝物量が筋断裂に伴う逸脱酵素としての血中 CPK 値とは異なる筋繊維の二次炎症傷害の指標となることや、ベッカー型筋ジス患者のリハビリに伴い増加することを見出した。

本年度は、*mdx* マウスへの運動負荷による筋壊死の進行に伴う尿中プロスタグランジン代謝物の変動を調べ、運動負荷によって尿中 PGD<sub>2</sub>代謝物が有意に増加することを確認した。さらに、尿中 PGD<sub>2</sub>代謝物の簡易測定系の確立を目指して、PGD<sub>2</sub>代謝物に対する特異的抗体の作製を開始した。

研究協力者

有竹浩介（公財）大阪バイオサイエンス研究所  
分子行動生物学部門 研究員

A. 研究目的

デュシェンヌ型筋ジストロフィー (Duchenne Muscular dystrophy : DMD)は、細胞の裏打ちタンパク質をコードし、X染色体上に存在するジストロフィンの遺伝子異常によって発症する、進行性の筋疾患である。人種や地域に関係なく出生男子約3500人に1人の割合で発症する。診断法は確立しているが、治療法は確立されていない。

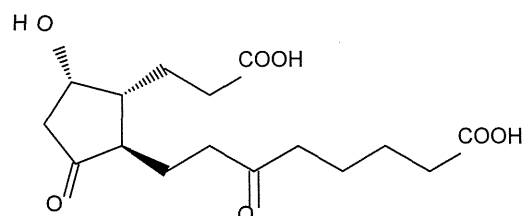


図 1. 尿中に排泄される PGD<sub>2</sub>代謝物の tetranor-PGDM



## B. 研究方法

### (1) 尿中 PGD<sub>2</sub> 代謝物

#### (tetranor-PGDM) の新規測定法の確立

Tetranor-PGDM の酵素免疫測定法 (enzyme immunoassay, EIA) の確立を目的として、特異的抗体作製を開始した。低分子化合物の tetranor-PGDM (C<sub>16</sub>H<sub>24</sub>O<sub>7</sub>, 分子量 328、図 1) に対する特異的抗体を作製するために、牛血清アルブミン(BSA) 或いは Keyhole Limpet hemocyanin (KLH) をキャリアタンパク質とした複合体抗原 (BSA-tetranor-PGDM、KLH-tetranor-PGDM) を用いた。これを雌性 Balb/c マウス或いは PGD 合成酵素 (造血器型 PGD 合成酵素およびリポカリン型 PGD 合成酵素) 遺伝子を欠損させた雌性マウス (Balb/c 背景) に免疫した。

経時的な採血による抗体価の確認と追加免疫を行い、最終的に脾細胞を採取した。続いて、細胞融合を行い、得られたハイブリドーマの特異性は、抗原である tetranor-PGDM と尿中に排泄される PGE<sub>2</sub> 代謝物 (tetranor-PGEM) およびトロンボキサン (TX) A<sub>2</sub> 代謝物 (2,3-dinor-TXB<sub>2</sub>) を比較対照として用いてスクリーニングを行った。続いて、特異性の高い抗体を用いて、EIA 測定を行い、LC-MS/MS による測定結果と比較した。

### (2) 筋ジストロフィーモデルマウスへの運動負荷による筋壊死と尿中 PGD<sub>2</sub> 代謝物の変動

*mdx* マウス (9-10 週齢、n=8) を実験動物用強制運動測定器 (シナノ製作所) を用いて、7-8 m/min の速度で 1 時間、運動負荷を与えた。運動負荷前 12 時間および運動負

荷後 12 時間の尿は、代謝ケージを用いて回収した。尿中の tetranor-PGDM および tetranor-PGEM は、液体クロマトグラフィー・タンデムマスマスペクトル法を用いて分析した。マウスの壊死筋の検出と定量には、小動物用 X 線 CT 撮影装置 (日立アロカ) を用いた。マウスに非イオン性 X 線造影剤 (イオパミロン 300) を 1.2 mL/hr の流速で持続的に注入し、造影剤の漏出を指標に下肢の壊死筋領域を検出した。

#### (倫理面への配慮)

実験動物を用いる研究については、公益財団法人大阪バイオサイエンス研究所動物実験委員会の動物実験指針に準拠して実施した。実験計画は動物実験委員会の承認を得ている。また、麻酔使用等により動物愛護上の倫理的配慮を行い、適切な環境のもとで飼育管理を行った。

## C. 研究結果

### (1) Tetranor-PGDM 特異的モノクローナル抗体作製

Balb/c マウスに BSA-tetranor-PGDM 或いは、KLH-tetranor-PGDM を免疫したところ、ほとんど抗体価が上がらなかった。一方、生体内で PGD<sub>2</sub> がほとんど産生されない PGD 合成酵素遺伝子欠損マウスに KLH-tetranor-PGDM を免疫したところ、tetranor-PGDM に対する高い抗体価を示した。追加免疫後に得られた脾細胞を用いて、細胞融合を行い、得られたハイブリドーマをスクリーニングしたところ、対照とした tetranor-PGEM、2,3-dinor-TXB<sub>2</sub> に対する交叉性が 1/100 以下の特異性の高い 5 つの単クローンを得ることができた (図 2)。Cayman 社で合成された tetranor-PGDM 標準品を用いて感

度を調べたところ、0.1 ng/mL まで検出することが出来た。

続いて、これらの5つのクローンを用いてヒト尿中 tetranor-PGDM の測定を行い LC-MS/MS 法を用いた分析結果と比較した。

いずれのクローンを用いた EIA 法に結果も LC-MS/MS 法による分析結果に比べて、高い tetranor-PGDM 値を示したが、相関係数は、0.6-0.9 と良好な相関を示すことが明らかとなった。

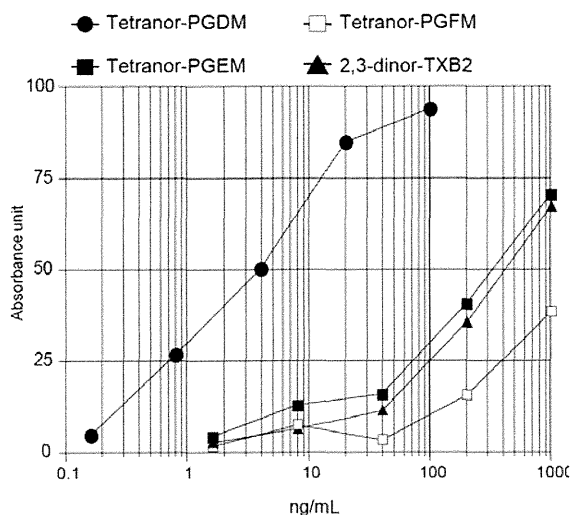


図2 Tetranor-PGDM に対する選択性尿中に排泄される他の PG 代謝物に比べて 100 倍以上の高い選択性を示す抗体を得た。

今後、特異性の詳細な検討を実施し、最適なクローンを選択する。

## (2) 運動負荷による尿中 tetranor-PGDM の変動

*mdx* マウスにトレッドミルを用いて運動負荷を与えた。運動負荷前後の後肢壊死体積を X 線 CT を用いて検出・定量したところ、実験に用いた全例で、運動負荷前 ( $35 \pm 1.8 \text{ mm}^3$ , 平均値  $\pm$  標準誤差) に比べて壊死領域が拡大し ( $48 \pm 2.4 \text{ mm}^3$ )、

その作用は統計学的有意であった (図3)。

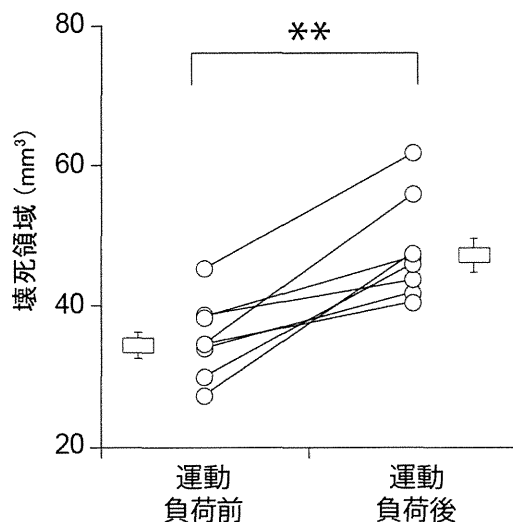


図3 *mdx* マウスのトレッドミルによる運動負荷後の筋壊死の拡大

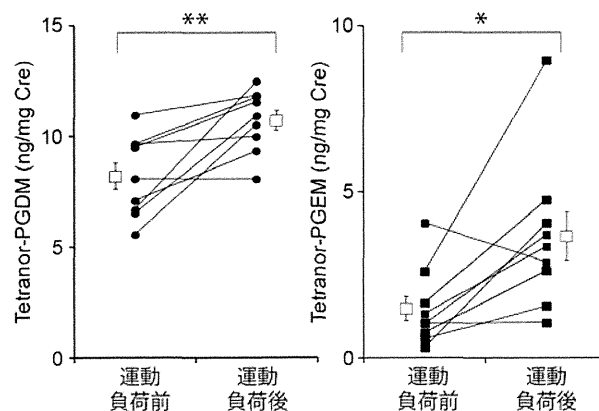


図4 *mdx* マウスのトレッドミルによる運動負荷後の尿中 PGD<sub>2</sub> 及び PGE<sub>2</sub> 代謝物の変動

この時の尿中の PG 代謝物の変動を調べるところ、運動負荷で壊死が拡大したマウスの全ての個体で尿中 tetranor-PGDM が増加し(運動負荷前  $8.2 \pm 0.5 \text{ ng/mg Cre}$  → 運動負荷後  $10.7 \pm 0.4 \text{ ng/mg Cre}$ )、その作用は統計学的有意な作用であった。一方、尿中 tetranor-PGEM も運動負荷で有意に増加 (運動負荷前  $1.5 \pm 0.4 \text{ ng/mg Cre}$  → 運

動負荷後  $3.7 \pm 0.7$  ng/mg Cre)したが、8例中1例は低下した(図4)。

#### D. 考察

低分子の生理活性脂質のプロスタグランジンに対する特異的抗体の作製は、一般的に困難である。今回、生体内でプロスタグランジン (PG)  $D_2$  が産生されない、PGD 合成酵素欠損マウスに PGD<sub>2</sub> 代謝物とキャリアタンパク質の複合体を免疫して、抗体作製を試みたところ、野生型マウスに比べて、高い抗体価を示したことは、遺伝子欠損マウスが、PGD<sub>2</sub> や PGD 合成酵素の生理に機能の解析ばかりでなく、抗体作製にも有用な動物であることが判明した。

DMD と同様にジストロフィン遺伝子の異常を示す *mdx* マウスへ運動負荷を与えると、尿中 PGD<sub>2</sub> 代謝物の増加と壊死体積の増加が認められたことから、尿中 PGD<sub>2</sub> 代謝物は筋壊死の新たな進行マーカーになりうると思われる。

#### E. 結論

- (1) Tetranor-PGD<sub>M</sub> に特異性の高いモノクローナル抗体を作製した。
- (2) *mdx* マウスに運動負荷すると筋壊死が進行し、尿中 tetranor-PGD<sub>M</sub> が増加する。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Nakagawa T, Takeuchi A, Kakiuchi R, Lee T, Yagi M, Awano H, Iijima K, Takeshima Y, Urade Y, Matsuo M., A prostaglandin  $D_2$  metabolite is elevated in the urine of Duchenne muscular dystrophy patients and increases further from 8years old., *Clin. Chim. Acta.* 423, 10-14, 2013

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（障害者対策総合研究事業）  
分担研究報告書

筋ジストロフィー患者のリハビリテーションに用いる尿中病態マーカー物質  
の測定方法に関する研究

研究分担者：松尾 雅文 神戸学院大学総合リハビリテーション学部 教授

【研究要旨】

デュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD)は進行性の筋萎縮症を示し、20歳台に心不全あるいは呼吸不全により死亡する極めて重篤な遺伝子筋疾患である。DMDはジストロフィン欠損により発症する事が明らかになったが、未だ詳細な病態は不明である。そのため、有効な治療法は確立されていない。

本研究では、DMDの病態にプロスタグランジン(PG)<sub>2</sub>が関与しているとの仮説のもと、DMD患者尿中のPGD<sub>2</sub>代謝産物(PGDM)の解析を行った。まず、PGD<sub>2</sub>の尿中代謝産物の変化についてDMD患者で測定した。その結果、日内変動が大きいことが判明した。しかし、早朝第1尿が日内で最も低値であることを明らかにした。そして、DMD患者の早朝第1尿を収集し、そのPGDMを測定した。その結果、DMDでは尿中PGDMが高値であることを明らかにした。また、年齢が進行するとともに尿中PGDMがさらに高値になることが判明した。以上からDMDの病態にPGD<sub>2</sub>関与していることが強く示された。

A. 研究目的

デュシェンヌ型筋ジストロフィー(Duchenne Muscular dystrophy : DMD)は進行性の筋萎縮を示し、20歳台に心不全あるいは呼吸不全で死亡する極めて重篤な遺伝性筋疾患である。DMDではジストロフィン遺伝子の異常によるジストロフィン欠損により発症する。ジストロフィンは筋細胞膜の裏打ちタンパクで、このジストロフィンの欠損により細胞内へのカルシウムの流入などの異常が生じ、タンパク分解酵素が活性化されることが考えられている。しかし、DMDはジストロフィン欠損が明確となったが、それによって生じる病態の詳細は不明である。そのため、DMDの治療法としてはジストロフィンの発現を目指したものが主流となっている。一方、DMDの詳細な

病態の解明はその病態を修飾する治療法の開発に結びつくものと大きく期待されている。

プロスタグラジン(PG)には多くの種類がある。その中で、PGD<sub>2</sub>は炎症因子として知られている。DMDでは、骨格筋にPGD<sub>2</sub>合成酵素の発現が骨格筋で増加していることが報告されている。しかし、DMDにおけるPGD<sub>2</sub>の病態との関連について詳細な検討はされておらず、その病態的意義は不明である。

本研究では、DMD患者尿中のPGD<sub>2</sub>の代謝産物であるPGDMを解析し、その意義を明らかにするものである。

B. 研究方法

神戸大学医学部附属病院小児科を受診しているDMD患者で同意の得られた

例から尿を収集した。尿中の PGDM を HPLC・MS/MS を用いて測定した。まず、日内変動を解析した。尿中 PGDM が早期第 1 尿で低値であることから、早期第 1 尿の収集をはかった。

(倫理面への配慮)

本研究の実施に当たっては、神戸学院学倫理委員会および神戸大学医学部倫理委員会の承認のもとに実施した。

### C. 研究結果

DMD 患者の尿を各排尿時に採取し、その PGDM を測定した。PGDM の排泄量は ml 当たりあるいは mg/creatinine 当りにしても、日内で大きく変化していることが判明した。また、運動との関連も調べたが、PGDM 排泄量と運動との間には明確な関連は見い出せなかった。日内の詳細な排泄量の変化の検討を行ったところ、PGDM はいずれの患者においても各日の第 1 尿が最低値をとることが判明した。そこで、DMD の PGDM 排泄量の検討については、早期第 1 尿を解析試料とすることにした。

DMD 患者の早期第 1 尿サンプルの収集をはかった。DMD の 100 以上の尿サンプルが集積され、それらの尿中 PGDM を測定した。その結果、DMD 患者の尿中 PGDM は正常より有意に高いことが判明した。驚くべきことに、この尿中 PGDM は患者が 8 歳以上になるとさらに上昇した。

また、尿中 PGDM の運動による変化を明らかにするため、ロボットスーツ (HAL) を用いて運動訓練を実施している患者尿中 PGDM を解析した。この HAL を用いた運動訓練の実施前後で尿を採取した。そして尿中 PGDM 値を測定すると、運動訓練により尿中 PGDM が上昇することが明らかとなった。

これらに加えて、PGDM の産生を抑制することが期待される市販薬を DMD の

治療に応用する治験の準備をはじめた。そして、倫理委員会での承認が得られたので、神戸大学において医師主導の治験を行う予定である。

### D. 考察

DMD の病態の基本は骨格筋におけるジストロフィン欠損である。本研究では DMD 患者が尿中に PGDM を多量に排泄していることを明らかにした。これは、DMD の病態に PGD<sub>2</sub> が関与していることを示した。

今後は、DMD と PGD<sub>2</sub> についてさらに検討する必要がある。

### E. 結論

DMD で尿中 PGDM 排出が高値であることを明らかにすることに成功した。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

1) Nakagawa T, Takeuchi A, Kakiuchi R, Lee T, Yagi M, Awano H, Iijima K, Takeshima Y, Urade Y, Matsuo M., A prostaglandin D<sub>2</sub> metabolite is elevated in the urine of Duchenne muscular dystrophy patients and increases further from 8years old., *Clin. Chim. Acta.* 423, 10-14, 2013

2) 中川卓, 李知子, 栗野宏之, 八木麻理子, 松尾雅文, 竹島泰弘, Duchenne 型筋ジストロフィーにおける尿プロスタグランディン D<sub>2</sub> 代謝産物の排泄の増加 脳と発達 44 (suppl) :211-211, 2012

#### 2. 学会発表

1) Duchenne 型筋ジストロフィーにおける尿プロスタグランディン D<sub>2</sub>



代謝産物の排泄の増加 第54回日  
本小児神経学会総会 札幌  
2012.5.17-19

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（障害者対策総合研究事業）  
分担研究報告書

筋ジストロフィー患者の尿中プロスタグランジン D<sub>2</sub> 代謝物の定量分析

研究分担者：竹内 敦子 神戸薬科大学 准教授

【研究要旨】

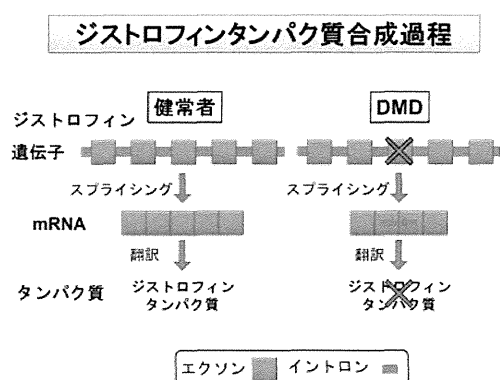
Duchenne 型筋ジストロフィー (Duchenne muscular dystrophy :DMD) は進行性の筋萎縮を呈し、患者はほぼ 20 歳代に死亡する極めて重篤な遺伝性疾患である。本疾患は、原因遺伝子であるジストロフィン遺伝子の変異により、筋の細胞膜形成に関与するジストロフィンタンパク質が欠損し、筋細胞が壊れるため発症する。近年、DMD 患者の壊れかけた筋肉では炎症やアレルギーなどに関与するプロスタグランジン D<sub>2</sub> (PGD<sub>2</sub>) 合成酵素の発現が亢進していることが明らかとなった。そこで、PGD<sub>2</sub> の尿中代謝物である tetranor-PGDM (PGDM) の濃度を DMD 患者および健常者について測定し、DMD の病状診断に有効であるかどうかを検討した。

DMD 患者および健常者の尿 0.4ml に内標準物質(tetranor-PGDM-d6)を加え、固相抽出カラムを用いて PGDM を抽出し、抽出液を濃縮乾固・再溶解して測定用試料とした。検量線作成のために内標準物質を加えた各濃度の標準試料も作成した。標準試料・測定用試料を API3000 LC-MS/MS system に適用し、最適条件におけるプリカーサーおよびプロダクトイオンを検討した後、SRM (Selected Reaction Monitoring) 法で測定した。PGDM と内標準物質とのピーク面積比を用いて定量値を算出した。また、比色定量によりクレアチンを定量し、補正した。

LC-MS/MS で高い選択性を有するプリカーサーおよびプロダクトイオンを用いることにより、PGDM は単一のピークとして認められ、微量定量が可能であった。検量線も良好な直線性を示し、信頼性の高い定量ができたと考えられた。クレアチン濃度で補正した尿中 PGDM 濃度を DMD 患者と健常者で比較したところ、DMD 患者の方が高かった。この結果から、PGD<sub>2</sub> の代謝物である PGDM の尿中濃度の測定は DMD の診断に有効であることが示唆された。

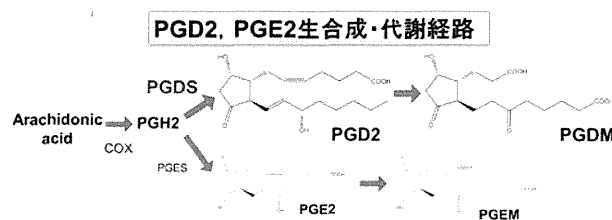
## A. 研究目的

Duchenne 型筋ジストロフィー (Duchenne muscular dystrophy : DMD) は進行性の筋萎縮を呈し、極めて重篤な遺伝性疾患である。本疾患は、原因遺伝子であるジストロフィン遺伝子のエクソン欠失および重複等の変異により、筋の細胞膜形成に参与するジストロフィンタンパク質が欠損する遺伝性筋疾患である。人種に関係なく出生男子約 3500 人に 1 人の割合で発症する。



DMD 患者は 4~5 歳時に筋力低下を認め、年齢と共に筋萎縮が進行し、10~12 歳時には歩行能を失う。そして心筋あるいは呼吸筋の障害が出現し、心不全あるいは呼吸不全により、多くは 20 歳代で死に至る。

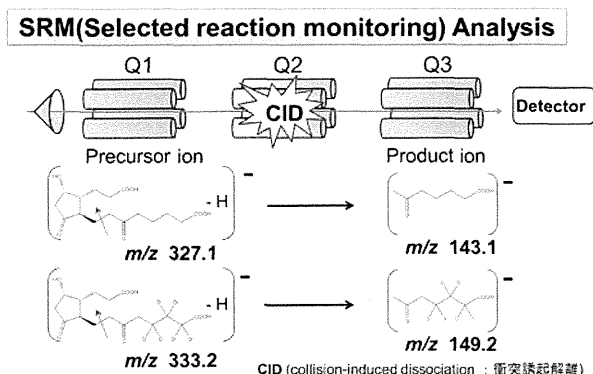
近年、DMD 患者の壊れかけた筋肉では、炎症やアレルギーなどに関与するプロスタグランジン D<sub>2</sub> 合成酵素 (PGD<sub>2</sub> synthase : PGDS) の発現が亢進していることが明らかとなった。したがって、DMD の病状診断に PGD<sub>2</sub> の尿中代謝物である tetranor-PGDM (PGDM) 濃度の定量が有効であるとの考えに至った。



現在のところ PGDM の測定には、液体クロマトグラフィーと接続した liquid chromatography(LC) -tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) 法が最も適している。MS (mass spectrometry) は、まず化合物を適切な方法でイオン化し、生成したイオンを m/z で分離して、各々の m/z のイオン量を測定することで定性・定量分析を行う分析法である。本法は感度がよいことから、ng あるいはそれ以下程度の極微量試料に対して大いに威力を発揮する。本実験では、数ある質量分析法のイオン化、質量分析部の中から、イオン化法としてエレクトロスプレーイオン化 (electrospray ionization : ESI) を、質量分析部として四重極質量分析を用いた。ESI は、イオンを溶液から気相へ移すソフトなイオン化法であり、比較的大きな分子量をもち、PGDM のイオン化には適している。tandem mass spectrometry (MS/MS) は、第 1 段階 (MS1) において質量選択されたプリカーサーイオンが、活性化された中性種との衝突により衝突誘起解離 (CID) を起こし、生じたプロダクトイオンが第 2 段階 (MS2) で選択されることで観測する手法である。この測定モードが selected reaction monitoring (SRM) であり、LC-MS/MS は 2 段階の MS 分析すなわち SRM を行うことで、高感度かつ高い選択性で化合物の測定を行うことが可能となる。

また、PGDM は negative ion モードでのイオン化効率が高い。したがって PGDM (MW: 328) は、MS1 でプリカーサーイオ

ン  $[M-H]^-$  の  $m/z$  327.1、MS2 でプロダクトイオンの  $m/z$  143.1 によって定量することにした。内標準として、PGDM-d6 を用いたので、プリカーサーイオン  $[M-H]^-$  は  $m/z$  333.2、MS2 でプロダクトイオンは  $m/z$  149.2 となる。



本法を用いて DMD 患者および健常者について尿中 PGDM 濃度を測定し、DMD の病状診断に有効であるかどうかを検討した。

## B. 研究方法

### 1) 対象

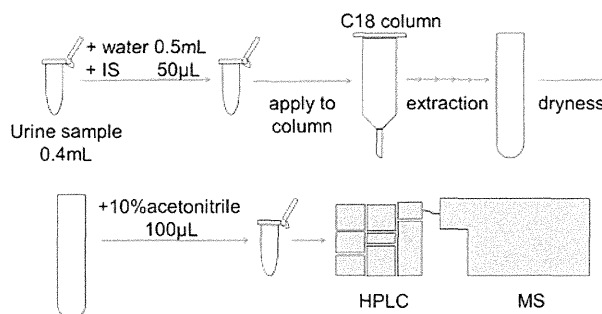
4~23 歳の DMD 患者 46 名および健常者 35 名を対象とした。

### 2) 測定用試料の調製

DMD 患者および健常者の尿 0.4ml に純水 B 0.5ml を加え、さらに内標準物質 (tetranor-PGDM-d6) を加えて混和したのち、1N HCl で pH3 程度に調整した。あらかじめエタノールと純水で洗浄した固相抽出カラム Sep-Pak Vac に全量をアプライする。5%アセトニトリル 6ml に続いてヘキサン 6ml で洗浄したのち、酢酸エチル 3ml で溶出した。この抽出液を窒素ガスで濃縮乾固したのち、10%アセトニトリル 100 $\mu$ l

で再溶解して測定用試料とした。検量線作成のために内標準物質を加えた各濃度の標準試料についても同様に作成した。

### PGDM測定用試料の調製



### 3) LC-MS/MS による測定

標準試料・測定用試料を API3000 LC-MS/MS system に適用し、最適条件におけるプリカーサーおよびプロダクトイオンを検討した後、SRM (Selected Reaction Monitoring) 法で測定した。PGDM と内標準物質とのピーク面積比を用いて定量値を算出した。

また、比色定量によりクレアチニンを定量し、補正した。

### LC-MS/MS条件

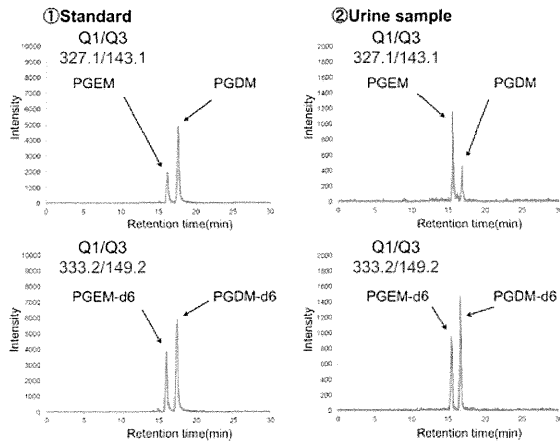
HPLC	Shimadzu LC-10ADvp [SHIMADZU CORPORATION]
Column	Inertsil ODS-3 (5 $\mu$ m, 2.1mm I.D. × 150mm)
Mobile phase	A:0.01% acetic acid, B:acetonitrile
Gradient (B.conc)	0-2min 10%, 24min 30%, 27min 70%, 28min 100%, 31min 100%
Flow rate	0.25mL/min

MS	API3000 LC/MS/MS System [Applied Biosystems]
Ionization	Electrospray ionization (ESI)
Polarity	Negative ion mode
Duration	40min
Injection volume	20 $\mu$ L

### C. 研究結果

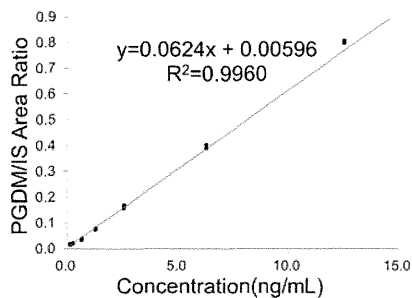
LC-MS/MS で高い選択性を有するプリカーサーおよびプロダクトイオンを用いることにより、PGDM は単一のピークとして認められ、微量定量が可能であった。

LC-MS/MSクロマトグラム



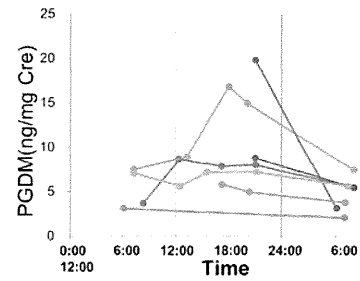
検量線も良好な直線性を示し、信頼性の高い定量ができたと判断した。

検量線



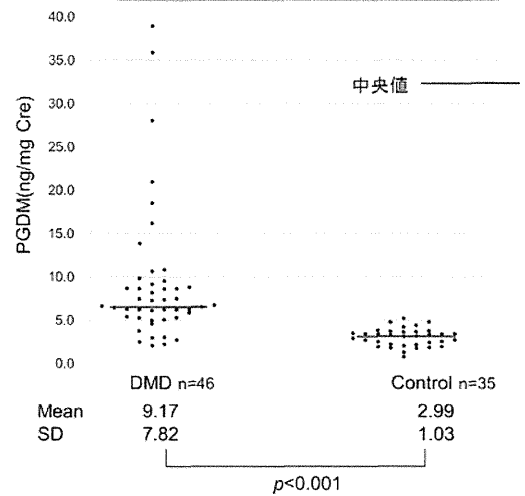
尿中PGDM濃度の日内変動を調べたところ、概して早朝に低く、日中に高い傾向が見られた。この結果から、早朝尿を測定対象とすることにした

PGDM日内変動



クレアチニン濃度で補正した尿中PGDM濃度をDMD患者と健常者と比較したところ、DMD患者の方が高かった。

健常群、DMD群のPGDMの分布



### D. 考察

①MS/MSによる最適なプロダクトイオン、プリカーサーイオンを用いてSRM法を行った結果、高い選択性により、PGDMは単一のピークとして認められた。また、ISとのピーク面積比を用いて算出した定量値も、検量線が良好な直線性を示したことから、信頼性の高い微量定量ができたと考えられた。

②クレアチニン補正を行って算出した尿中PGDM濃度において、DMD患者と健常者と比較したところ、DMD患者の方が有意



に高値であった。この結果から、PGD<sub>2</sub>の代謝物である PGDM の尿中濃度の測定は DMD の病状診断に有用であると考えられた。

③PGDM 濃度は、早朝尿で評価すると随時尿よりも安定した結果が得られると考えられた。

## E. 結論

以上の結果から、PGD<sub>2</sub>の代謝物である尿中 PGDM 濃度の測定は DMD の診断に有効であることが示唆された。

薬学会第132年会 (2012.03.30 札幌).

## G. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

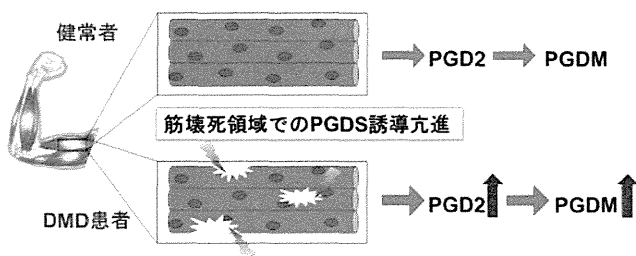
なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし



## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Nakagawa T, Takeuchi A, Kakiuchi R, Lee T, Yagi M, Awano H, Iijima K, Takeshima Y, Urade Y, Matsuo M., A prostaglandin D<sub>2</sub> metabolite is elevated in the urine of Duchenne muscular dystrophy patients and increases further from 8years old., *Clin. Chim. Acta.* 423, 10-14, 2013.

### 2. 学会発表

- 1) 垣内 涼平, 成田 哲也, 竹内 敦子, 裏出 良博, 鎌内 慎也, 松尾 雅文  
「筋ジストロフィー患者の尿中プロスタグランジンD<sub>2</sub>代謝物の定量」日本

動物モデルを用いた筋壊死と尿中代謝物の相関の実証  
(心筋症モデルでの心筋壊死と薬物投与効果および尿中代謝物の関係)

分担研究者：岩田裕子 国立循環器病研究センター研究所分子生理部 室長

【研究要旨】

拡張型心筋症は、その発症機序が不明であり予後も不良であることから、新たな治療法の確立が求められている。分担研究者は、Duchenne型筋ジストロフィーにおいて骨格筋における病態進行とプロスタグランジンD<sub>2</sub>産生が相関するとの知見に基づき、心筋組織においても同様に、筋壊死に伴う病態進行とPGD<sub>2</sub>産生の亢進が関連している可能性を検証した。拡張型心筋症モデルハムスターと2種類の心筋症モデルマウスにおいて、心筋障害と相関した尿中PGD<sub>2</sub>代謝物の増加を確認した。

A. 研究目的

拡張型心筋症は、その発症機序が不明であり予後も不良であることから、新たな治療法の確立が求められている。これまでに、Duchenne型筋ジストロフィーの病態進行と造血器型PGD合成酵素（HPGDS）によるプロスタグランジン（PG）D<sub>2</sub>産生が相関することが強く示唆されている。そこで研究分担者は、心筋組織においても同様に、筋壊死に伴う病態進行とPGD<sub>2</sub>産生の亢進が関連している可能性を検証するため、拡張型心筋症のモデル動物（ハムスター、マウス）を用いた解析を行った。

B. 研究方法

δ-sarcoglycan を欠損した拡張型心筋症モデルハムスターについて、心筋症病態の発症前後（4週齢及び16週齢）の動物を用いた。対照として、同週齢の野生型動物を用いた。また、心筋症モデルマウスについても検討した。採尿は、代謝ケージを用いて暗期（12時間）に行った。PGD<sub>2</sub>の半減期がきわめて短いため、その産生量は尿中に排泄されたPGD<sub>2</sub>の安定代謝物11,15-Dioxo-9-hydroxy-2,3,4,5-tetraorprostan-1,20-dioic acid