

201317084A

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25年度 総括研究報告書

研究代表者 裏出 良博

平成26（2014）年5月

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25年度 総括研究報告書

研究代表者 裏出 良博

平成26（2014）年5月

目 次

I. 総合研究報告

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 D₂代謝物の簡易測定法の開発研究

裏出 良博 11

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方法に関する研究

松尾 雅文 17

3. 筋ジストロフィー患者の尿中プロスタグランジン D₂代謝物の定量分析

竹内 敦子 19

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
(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)

岩田 裕子 23

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 27

IV. 研究成果の刊行物・別刷 32

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)D₂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（hematopoietic PGD synthase, H-PGDS）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PGD₂代謝物であるPGDM-tetranor（PGDM-t）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H-PGDS阻害薬を1月間、混餌投与すると、筋壊死体積と尿中PGDM-tが共に用量依存的に低下したので、尿中PGDM-tがDMDの病態進行の新たな指標として使用できることを確認した。δ-sarcoglycan欠損の拡張型心筋症モデルハムスターにH-PGDS阻害薬を3週間、皮下投与した場合も、尿中PGDM-tの抑制と心機能の回復を確認したので、尿中PGDM-t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。2～55歳のDMD、ベッカー型筋ジストロフィー（BMD）、γ-サルコグリカノパチー、ラミノパチー、先天性ミオパチー、B-ジストログリカン異常などの筋変性疾患患者1,003検体および2～14歳の健常者116検体、健常成人86名の早朝第一尿を収集して尿中PGDM-t量を測定した。その結果、DMD患者が最も高く、BMDがそれに続き、他の疾患でも高値を示す患者が見つかった。これらの疾患ではPGD₂を介した筋肉炎症が進行していると考えられるので、DMD患者を対象として抗炎症剤アスピリンを用いた臨床研究を開始した。PGDM-tに対するモノクローナル抗体を利用したELISA系を構築し、*mdx*マウスやDMD患者の尿中PGDM-t量測定に利用できることを確認した。さらに、尿検査紙による簡易測定法の開発に向けた改良を進めている。

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H-PGDS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PGD₂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PGD₂代謝物の測定技術を開発する。

B. 研究方法

(1) 尿中 PGD₂ 代謝物 (PGDM-t) の新規測定法の確立

PGDM-t に対する特異的抗体を作製するために、PGD₂ 産生能を失ったリ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 PGDM-t 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

PGDM-t と PGE₂ 代謝物 (PGEM-t)、PGF_{2α} 代謝物 (PGFM-t)、および、トロンボキサン (TX) A₂ 代謝物 (2,3-dinor-TXB₂) を比較対照として確認した。

続いて、ヒト尿を用いて EIA 法と LC-MS/MS 法による PGDM-t 測定を行い、相関性を比較した。更に、PGDM-t の脱水分解物である PGJM-t に対する交叉性も調べた。

(2) 筋ジストロフィーモデルマウスへの H-PGDS 阻害薬の投与による病態の軽減と尿中 PGD₂ 代謝物の抑制

mdx マウス (4 週齢、n=17) に、混餌 (0%、0.01%、0.1%) にて経口投与で有効な H-PGDS 選択的阻害薬 (TAS-205) を 1 か月間投与した。自発運動量並びに組織化学染色により病態を評価した。自発運動量は、解剖の 3 日前から赤外線センサー行動量測定装置を用いて測定した。

採尿は病理組織検索を目的とした解剖の前々日より解剖前日までの暗期約 12 時間、代謝ケージを用いて行った。

尿中 PGDM-t および PGEM-t は、液体クロマトグラフィー・タンデムマススペクトル (LC-M/MS) 法を用いて分析した。

病理組織 (横隔膜) は、摘出後に液体窒素で冷却したイソペンタン内で凍結することで凍結ブロックを作成し、クライオスタットで薄切 (7μm) した。切片は、ヘマトキシリン・エオジン染色 (HE 染色) 或いは抗マウス IgG 抗体で免疫染色した。抗 IgG 染色される壊死部は、顕微鏡画像を電子ファイル化した後、解析ソフト (BZ-9000、KEYENCE) を用いて切片の全体面積、および壊死面積を測定した。

(3) 心筋症モデル動物の尿中 PGD₂ 代

謝物の測定

δ -sarcoglycan 欠損の拡張型心筋症モデルハムスターと同週齢の野生型動物を用いた。10 週齢の心筋症ハムスターに H-PGDS 阻害薬(TFC-007, 30 mg/kg/day) または溶媒(PBS)を 3 週間、皮下投与し、組織の繊維化と心機能を指標に、薬効を評価した。繊維化はマッソントリクローム染色により確認した。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。

PGD₂ 産生量の変動を評価するため、代謝ケージを用いて暗期(12 時間)に採尿し、PGD₂ の尿中安定代謝物(PGDM-t)を液体クロマトグラフィー・タンデムマススペクトロメトリーを用いて測定した(LC: 資生堂、MS/MS: AB Sciex)。

(4) DMD 患者の尿中 PGD₂ 代謝物の測定

1) 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-t を HPLC・MS/MS を用いて測定した。

また、「プロスタグランジン産生抑制剤の Duchenne 型筋ジストロフィーに対する臨床試験」として、臨床研究を開始した。これまでに同意の得られた 3 例の DMD 患者にアスピリンを投与した。投与量は 30mg/kg/N3 を連日 28 日投与とした。

2) 神戸大学医学部附属病院小児科を受診している 2~55 歳の筋変性疾患患者 1,003 検体および 2~14 歳の健常者 116 検体、健常成人 86 検体を対象とした。各種筋疾患患者の内訳は、DMD、BMD、 γ -サルコグリカノパチー、ラミノパチー、

先天性ミオパチー、B-ジストログリカン異常などである。また、尿中 PGDM-t 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とから、早朝一番尿を採取した。

3) 尿中 PGD₂ 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(PGDM-t-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-t 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。

(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 PGD₂ 代謝物の測定実験および「プロスタグランジン産生抑制剤の Duchenne 型筋ジストロフィーに対する臨床試験」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。

研究対象者に対する人権擁護上の配慮を充分に行い、研究方法による研究対象者に対する不利益が存在しないことや危

険性の排除に関する説明を個別面談より行い、書面による同意の確認を得た上(インフォームド・コンセント)で研究を実施している。

C. 研究結果

(1) 抗 tPGDM-t モノクローナル抗体の作製

生体内で PGD₂ がほとんど産生されないリポカリン型および造血管型 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 KLH をキャリア蛋白質とし複合体抗原 (KLH-PGDM-t) を免疫したところ、PGDM-t に対する高い抗体価を示す血清を得ることができた。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 PGEM-t、PGFM-t、2,3-dinor-TXB₂ 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た。

続いて、5 つのクローンを用いて EIA 法による測定系を構築した。予め抗マウス IgG ウサギポリクローナル抗体を吸着させた 96 ウェルプレートに、一定量の競合試薬 (アセチルコリンエステラーゼ-PGDM-t 複合体) と一定量のマウスモノクローナル抗体および試料 (或いは PGDM-t 標準品) を加えて、約 12 時間反応させ、各ウェルを洗浄後、発色試薬 (Ellman 試薬) と反応させ、412nm の吸光度を測定することによって、試料中の PGDM-t を定量した。

LC-MS/MS 測定には、API3200 system (AB Sciex 製) を用いて予めプリカーサーイオンとプロダクトイオンのイオン化条件を決定し、PGDM-t と内部標準物質

(重水ラベル化 PGDM-t) とのピーク面積比から試料中の PGDM-t を定量した。尚、ヒト尿試料は、固相抽出カラム (Sep-Pak Vac) を用いて抽出、粗精製を行った。

5 つのクローンを用いて作製した EIA 法によるヒト尿中の PGDM-t 定量結果と LC-MS/MS 法による定量結果を比較したところ、相関係数 (R^2 値) 0.57-0.98 と良好な相関を示すことが判明した。一方、5 つのクローンは他の PG 代謝物に対してほとんど交叉性を示さないにも関わらず、EIA 法による測定値は、LC-MS/MS 法に比べて 8-150 倍の高い値を示し、尿中に構造類似体が含まれる可能性を示唆した。

続いて、これらの 5 つのクローンの PGDM-t とその脱水分解物の PGJM-t に対する反応性を化学合成して標準品を用いて比較した。いずれのクローンも PGDM-t と PGJM-t に対する反応性は同等であり、米国 Cayman 社から供与された PGDM-t 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。

(2) 筋ジストロフィーモデルマウスへの H-PGDS 阻害薬の投与による病態の軽減と尿中 PGD₂ 代謝物の抑制

mdx マウスに H-PGDS 特異的阻害薬 (TAS-205) を 1 か月間、混餌で持続的に投与し、尿中 PGDM-t の変動を調べた。健常 (C57BL/6) マウス (2.4 ± 0.2 ng / day、平均値 \pm 標準誤差) に比べて、阻害薬を与えなかった *mdx* マウスの尿中の PGDM-t は有意に高値を示した (4.0 ± 0.3 ng/day)。H-PGDS 阻害薬を混餌 (0.01% および 0.1% w/w) にて与えたマウスの尿中 PGDM-t は用量依存的にかつ有意に抑制された (2.5 ± 0.2 ng / day、 $1.7 \pm$

0.1 ng/day)。

阻害薬を与えなかった *mdx* マウスは、健常 (C57BL/6) マウスに比べて自発運動量の有意な低下が認められた。一方、H-PGDS 阻害薬を混餌にて与えたマウスは、用量依存的に自発運動量の改善が認められた。

更に、組織学的検索の結果、健常 (C57BL/6) マウスの壊死面積率はわずか ($2 \pm 1\%$ 、平均値 \pm 標準誤差) であり、阻害薬を与えなかった *mdx* マウスの壊死面積率は有意に高値 ($12 \pm 4\%$) を示した。H-PGDS 阻害薬を混餌 (0.01%および0.1% w/w) にて与えた *mdx* マウスの骨格筋壊死は用量依存的にかつ有意に抑制された ($6.6 \pm 1.4\%$ 、 $4.5 \pm 1\%$)。

(3) 心筋症モデル動物の尿中 PGD₂ 代謝物の測定

拡張型心筋症モデルハムスターでは、野生型動物に比べ、心臓組織での HPGDS 蛋白質の発現量が 2・5 倍程度増加していた。また、両者から単離した心筋細胞の比較においても HPGDS の発現増加が示された。心臓及び心筋細胞を用いた免疫染色の結果から、H-PGDS の介在板近傍への強い集積が認められた。これらの知見は、心筋症病態の進行に伴い、同週齢の野生型動物に比べ、尿中-PGDM-t 量が高値を示すことと一致する。

拡張型心筋症モデルハムスターへの H-PGDS 阻害薬の投与 (TFC-007, 30 mg/kg/day) により、尿中 PGDM-t が減少することを確認した。心臓組織の繊維化を定量したところ、溶媒投与群に比べて、H-PGDS 阻害薬の投与群では、繊維化の進行に抑制傾向が観察された。小動物用

超音波高解像度イメージングシステムにより、心機能を評価したところ、溶媒投与群に比べ、H-PGDS 阻害薬の投与群では、左室内径短縮率(%FS)の低下に抑制傾向が見られた。

(4) DMD 患者の尿中 PGD₂ 代謝物の測定

DMD 患者の早朝第 1 尿サンプルの収集を進め、100 検体以上の尿サンプルの尿中 PGDM-t を測定した結果、その濃度は DMD 患者では正常より有意に高く、驚くべきことに患者が 8 歳以上になるとさらに上昇することを見出した。これらの結果をまとめて論文発表した。

これらに加えて、PGD₂ の産生を抑制することが期待されるアスピリンを DMD の治療に応用する臨床研究を始めた。同意の得られた患者を対象として、アスピリンを投与し、その経過中に PGDM-t を測定した。その結果、投与前には高値であった尿中 PGDM-t が治療により、減少することが確認できた。

一方、アスピリン投与により DMD 患者の運動能の改善効果は現在のところ認められていない。今後、長期に亘る観察、あるいは、より精度の高い運動能の解析が必要である。

2~55 歳の筋変性疾患患者から採取した早朝一番尿 1,003 検体中の PGDM-t を測定したところ、健常者の尿に比べ、高かった。各種筋疾患患者のうち、DMD と BMD を比較したところ、尿中 PGDM-t は DMD の方が有意に高かった。

DMD、BMD、 γ -サルコグリカノパチー、ラミノパチー、先天性ミオパチー、B-ジストログリカン異常他の筋疾患の尿中 PGDM-t を測定したところ、疾患により

差が認められた。著しく高値を示す疾患があったが、検体数が少ないため今後の課題とし、検体数を増やして検討する必要がある。

D. 考察

生体内で PGD₂ を産生できない PGD 合成酵素欠損マウス (Balb/c 背景) に PGD₂ 代謝物との KLH をキャリアタンパク質とした複合体を免疫することにより、高い抗体価の免疫を獲得させることができた。他の PG 代謝物に比べて 100 倍以上高い特異性を示す 5 つのクローンを得、それらを用いた EIA 測定法と LC-MS/MS 法による尿試料測定を行ったところ、いずれのクローンも LC-MS/MS と良好な相関を示した。しかし、その測定値は大きな隔たりがあり、尿試料中に PGDM-t と類似した化学構造を有し、かつ同様の免疫交差性を示す未知の化合物の存在が示唆された。

DMD と同様にジストロフィン遺伝子の異常を示す *mdx* マウスに H-PGDS 特異的阻害薬を与えると、尿中 PGD₂ 代謝物の抑制と病態の軽減、壊死の抑制が認められたことから、尿中 PGD₂ 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。

拡張型心筋症モデルハムスターにおいて、尿中 PGDM-t 量が高値を示す症例が認められた。そこで、H-PGDS 阻害薬投与による薬効評価を行ったところ、心臓組織の繊維化進行、および心機能の低下を軽減させる傾向が示された。したがって、H-PGDS により産生された PGD₂ がハムスターの拡張型心筋症病態の進行に重要な役割を持つ可能性が示された。

拡張型心筋症のモデルマウスでも、尿中 PGDM-t 量が高値を示すことから、今後これらの動物モデルを用いて、心筋組織における PGD₂ 産生と病態進行の関連性を明らかにする必要がある。

拡張型心筋症は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。H-PGDS 阻害薬の投与実験を行うことで、新規治療法開発の可能性を検証できる。また、治療対象の決定や薬剤効果を評価できるマーカーが必要であるが、尿中の安定代謝物である PGDM-t がその候補として期待される。

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-t 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 PGD₂ が関与していることを示した。

また、他の筋疾患患者の尿中 PGDM-t を測定したところ、疾患により差が認められ、これらの疾患の治療効果の判定にも応用可能であると考えられた。

PGD₂ はアラキドン酸からサイクロヘキシナーゼ (COX) と H-PGDS による酵素反応により産生される。DMD で PGD₂ が高いことは、PGD₂ 依存性の炎症が DMD で生じていることを示し、この COX が治療標的の 1 つと考えられる。

COX の作用阻害の目的でアスピリンを DMD 患者に投与した結果、予想通り PGDM-t の産生が抑えられることを示す結果を得た。

PGD₂ 依存性の炎症が DMD の進行に大きな役割を果たしているのであれば、このアスピリン投与による DMD 治療効果は大きいと予想される。

E. 結論

PGDM-t と PGJM-t に特異性の高いモノクローナル抗体を作製した。

mdx マウスに H-PGDS 阻害薬を投与すると尿中 PGDM-t の抑制を伴った病態の軽減が観察された。

尿中 PGD₂ 代謝物は DMD の病態進行の新たな指標として使用できる。

DMD 患者に対して、尿中 PGDM 排出をアスピリン投与により下げる臨床研究を開始した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sarashina, H., Tsubosaka, Y., Omori, K., Aritake, K., Nakagawa, T., Hori, M., Hirai, H., Nakamura, M., Narumiya, S., Urade, Y., Ozaki, H., Murata, T., Opposing immunomodulatory roles of prostaglandin D2 during the progression of skin inflammation. ***J Immunol*** 2014, 192 (1), 459-65.
- 2) Murata, T., Aritake, K., Tsubosaka, Y., Maruyama, T., Nakagawa, T., Hori, M., Hirai, H., Nakamura, M., Narumiya, S., Urade, Y., Ozaki, H., Anti-inflammatory role of PGD₂ in acute lung inflammation and therapeutic application of its signal enhancement. ***Proc Natl Acad Sci U S A*** 2013, 110 (13), 5205-10.
- 3) Nakagawa, T., Takeuchi, A., Kakiuchi, R., Lee, T., Yagi, M., Awano, H., Iijima, K., Takeshima, Y., Urade, Y., Matsuo, M., A prostaglandin D2 metabolite is

elevated in the urine of Duchenne muscular dystrophy patients and increases further from 8 years old. ***Clin Chim Acta*** 2013, 423, 10-4.

- 4) Taketomi, Y., Ueno, N., Kojima, T., Sato, H., Murase, R., Yamamoto, K., Tanaka, S., Sakanaka, M., Nakamura, M., Nishito, Y., Kawana, M., Kambe, N., Ikeda, K., Taguchi, R., Nakamizo, S., Kabashima, K., Gelb, M. H., Arita, M., Yokomizo, T., Watanabe, K., Hirai, H., Okayama, Y., Ra, C., Aritake, K., Urade, Y., Morimoto, K., Sugimoto, Y., Shimizu, T., Narumiya, S., Hara, S., Murakami, M., Mast cell maturation is driven via a group III phospholipase A2-prostaglandin D2-DP1 receptor paracrine axis. ***Nat Immunol*** 2013, 14 (6), 554-63.
 - 5) Maekawa K, Hirayama A, Iwata Y, Tajima Y, Nishimaki-Mogami T, Sugawara S, Ueno N, Abe H, Ishikawa M, Murayama M, Matsuzawa Y, Nakanishi H, Ikeda K, Arita M, Taguchi R, Minamino N, Wakabayashi S, Soga T, Saito Y. Global metabolic analysis of heart tissue in a hamster model for dilated cardiomyopathy. ***J. Mol. Cell Cardiol.*** 2013, 59, 76-85.
 - 6) Iwata Y, Ohtake H, Suzuki O, Matsuda J, Komamura K, Wakabayashi S. Blockade of sarcolemmal TRPV2 accumulation inhibits progression of dilated cardiomyopathy. ***Cardiovas. Res.*** 2013, 99, 760-768.
- ### 2. 学会発表
- 1) Yoshihiro Urade

- “Use of protein crystal growth technology in space to discover and develop therapeutic candidates for Duchenne muscular dystrophy“ 2nd Annual ISS research and development conference (2013 July 17, Denver, USA).
- 2) Taku Nakagawa, Atsuko Takeuchi, Ryohei Kakiuchi, Tomoko Lee, Mariko Yagi, Hiroyuki Awano, Kazumoto Iijima, Yasuhiro Takeshima, Yoshihiro Urade, Masafumi Matsuo
 “A prostaglandin D2 metabolite is elevated in the urine samples of patients with Duchenne muscular dystrophy ” 18th International WMS Congress (2013. 10.1-5 Asilomar, California, USA).
- 3) Masafumi Matsuo
 “DMD treatment: overview” Japan-Vietnam joint research meeting on Duchenne muscular dystrophy (2014.2.26 Hanoi, Vietnam).
- 4) Atsuko Takeuchi
 “ LC-MS/MS quantification of a prostaglandin D2 metabolite in the urine of Duchenne muscular dystrophy patients ” Japan-Vietnam joint research meeting on Duchenne muscular dystrophy (2014.2.26 Hanoi, Vietnam).
- 5) Yoshihiro Urade
 “Development of drugs used for therapy of Duchenne muscular dystrophy : Inhibitors of hemato-
- poietic prostaglandin D synthase“ Japan-Vietnam joint research meeting on Duchenne muscular dystrophy (2014.2.26 Hanoi, Vietnam).
- 6) Masafumi Matsuo
 “Mutations in the dystrophin gene” Japan-Vietnam joint research meeting on Duchenne muscular dystrophy (2014.2.26 Hanoi, Vietnam).
- 7) 松尾雅文, 裏出良博, 竹内敦子
 「デュシェンヌ型筋ジストロフィーの尿中プロスタグランジン代謝産物解析」第40回BMSコンファレンス (2013.7.9 宮崎)
- 8) 竹内敦子, 裏出良博, 松尾雅文
 「LC-MS/MSによるDuchenne型筋ジストロフィー患者の尿中プロスタグランジンD2代謝物の定量」第40回BMSコンファレンス (2013.7.9 宮崎)
- 9) 柳下沙絢, 竹内敦子, 中川 卓, 竹島泰弘, 裏出良博, 松尾雅文
 「デュシェンヌ型筋ジストロフィー患者尿中プロスタグランジンD2代謝物濃度」第61回質量分析総合討論会 (2013.9.10 つくば)
- 10) 鎌内慎也, 岩田裕子, 若林繁夫
 「Prostaglandin D₂ metabolites are elevated in the urine of animal models of dilated cardiomyopathy」第 86 回日本生化学会大会 (2013 年 9 月 11-13 日、横浜)

- 11) 裏出良博、中川 卓、竹内敦子、垣内涼平、Tomoko Lee、八木麻里子、栗野宏之、飯島一誠、竹島泰弘、松尾雅文、有竹浩介
「デュシェンヌ型筋ジストロフィーの新規病態マーカーとしての尿中 PGD2 代謝物」 第 86 回日本生化学会大会、(2013 年 9 月 13 日、横浜)
- 12) 有竹浩介、田中克尚、鈴木比佐子、三好和久、林 勸生、佐々木英治、裏出良博
「Effect of a highly selective inhibitor for hematopoietic prostaglandin D synthase on an experimental model of Duchenne muscular dystrophy」 第 86 回日本生化学会大会、(2013 年 9 月 13 日、横浜)
- 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 D₂代謝物の簡易測定法の開発研究

研究分担者：裏出 良博

【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はジストロフィン蛋白質欠損により発症する事が明らかになったが、病態の進行が患者によって大きく異なる等、詳細な病態の進行機構は不明である。そのため、診断が容易であるが、有効な治療法は確立されておらず、病態の進行マーカーも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が欠損したモデル動物 (*mdx* マウス) を用いて、尿中 PGD₂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 PGD₂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、尿中 PGD₂代謝物の簡易測定系の確立を目指して、PGD₂代謝物に対する特異的抗体を作製した。更に、*mdx* マウスに選択的かつ強力な PGD 合成酵素阻害薬を投与して、尿中 PGD₂代謝物の抑制を伴う病態の軽減効果を確認した。

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、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、治療法に関しては、遺伝子治療や再生移植治療の研究が進められているが、いずれも研究段階である。

本研究では、DMD 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(PG) D₂代謝物の酵素免疫測定法(EIA 法)による簡易測定法確立を目的とした抗体作製と尿中 PGD₂代謝物と病態進行度の相関を DMD モデル(*mdx*)マウスを用いて証明することを目的とする。

B. 研究方法

(1) 尿中 PGD₂代謝物 (tetranor-PGDM) の新規測定法の確立

尿中 PGD₂代謝物 (Tetranor-PGDM) の簡易測定法の確立を目的とした特異的モノクローナル抗体の作製を行った。

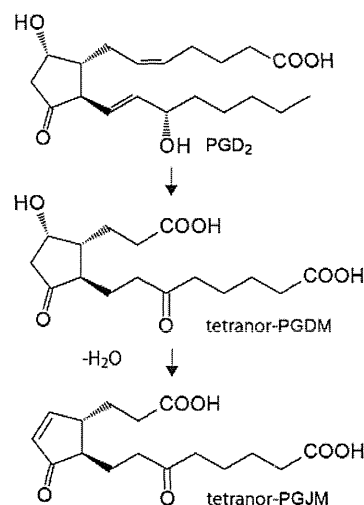


図1. PGD₂および尿中に排泄される代謝物 tetranor-PGDM とその分解物 tetranor-PGJM

低分子化合物の tetranor-PGDM ($C_{16}H_{24}O_7$, 分子量 328、図 1) に対する特異的抗体を作製するために、Keyhole Limpet hemocyanin (KLH) をキャリアタンパク質とした複合体 (KLH-tetranor-PGDM) を抗原として用いた。これを 2 種類の PGD 合成酵素 (造血管型 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各種プロスタグランジンの代謝物である PGE_2 代謝物 (tetranor-PGEM)、 $PGF_{2\alpha}$ 代謝物 (tetranor-PGFM) およびトロンボキサン (TX) A_2 代謝物 (2,3-dinor-TXB₂) 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、ヒト尿を用いて EIA 法を LC-MS/MS 法による tetranor-PGDM 測定を行い、相関性を比較した。

更に、tetranor-PGDM の分解物である tetranor-PGJM に対する交叉性も調べた。

(2) 筋ジストロフィーモデルマウスへの H-PGDS 阻害薬の投与による病態の軽減と尿中 PGD_2 代謝物の抑制

mdx マウス (4 週齢、 $n=17$) に、混餌 (0%、0.01%、0.1%) にて経口投与で有効な H-PGDS 選択的阻害薬 (TAS-205) を 1 か月間投与した。自発運動量並びに組織化学染色により病態を評価した。自発運動量は、解剖の 3 日前から赤外線センサー行動量測定装置を用いて測定した。

尿は病理組織検索を目的とした解剖の前々日より解剖前日までの暗期約 12 時間の尿を代謝ケージを用いて採取した。

尿中の tetranor-PGDM および tetranor-PGEM

は、液体クロマトグラフィー・タンデムマススペクトル (LC-M/MS) 法を用いて分析した。

病理組織 (横隔膜) は、摘出後に液体窒素で冷却したイソペンタン内で凍結することで凍結ブロックを作成し、クライオスタットで薄切 (7 μ m) した。切片は、ヘマトキシリン・エオジン染色 (HE 染色) 或いは抗マウス IgG 抗体で免疫染色した。抗 IgG 染色される壊死部は、顕微鏡画像を電子ファイル化した後、解析ソフト (BZ-9000、KEYENCE) を用いて切片の全体面積、および壊死面積を測定した。

(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 に特異的なモノクローナル抗体の作製

生体内で PGD_2 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 をキャリア蛋白質とし複合体抗原 (KLH-tetranor-PGDM) を免疫したところ、tetranor-PGDM に対する高い抗体価を示す血清を得ることができた。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、tetranor-PGFM、2,3-dinor-TXB₂ 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た。

続いて、5 つのクローンをを用いて EIA 法による測定系を構築した。予め抗マウス IgG ウサギポリクローナル抗体を吸着させた 96 ウェルプレートに、一定量の競合試薬 (アセ

チルコリンエステラーゼ-tetranor-PGDM 複合体) と一定量のマウスモノクローナル抗体および試料 (或いは tetranor-PGDM 標準品) を加えて、約 12 時間反応させ、各ウエルを洗浄後、発色試薬(Elman 試薬)と反応させ、412nm の吸光度を測定することによって、試料中の tetranor-PGDM を定量した。

LC-MS/MS 測定には、API3200 system (AB Sciex 製) を用いて予めプリカーサーイオンとプロダクトイオンのイオン化条件を決定し、tetranor-PGDM と内部標準物質(重水ラベル化 tetranor-PGDM)とのピーク面積比から試料中の tetranor-PGDM を定量した。尚、ヒト尿試料は、固相抽出カラム(Sep-Pak Vac) を用いて抽出、粗精製を行った。

EIA 法と LC-MS/MS 法による測定結果を比較した例を図 2 に示す。

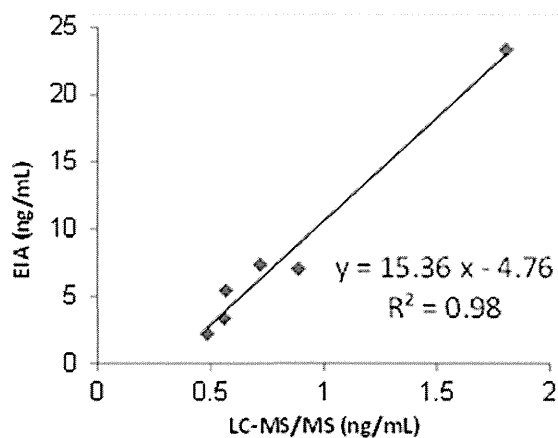


図 2 tetranor-PGDM 特異的抗体を用いた酵素抗体法と LC-MS/MS 法による定量比較

5つのクローンを用いて作製した EIA 法によるヒト尿中の tetranor-PGDM 定量結果と LC-MS/MS 法による定量結果を比較したところ、相関係数 (R^2 値) 0.57-0.98 と良好な相関を示すことが判明した。一方、5つのクローンは他の PG 代謝物に対してほとんど交叉性を示さないにも関わらず、EIA 法による測定値は、

LC-MS/MS 法に比べて 8-150 倍の高い値を示した。

続いて、これらの5つのクローンの tetranor-PGDM とその分解物の tetranor-PGJM に対する反応性を化学合成して標準品を用いて比較した。いずれのクローンも tetranor-PGDM と tetranor-PGJM に対する反応性は同等であった。

(2) 筋ジストロフィーモデルマウスへの H-PGDS 阻害薬の投与による病態の軽減と尿中 PGD₂ 代謝物の抑制

mdx マウスに H-PGDS 特異的阻害薬 (TAS-205) を1か月間、混餌で持続的に投与し、尿中 tetranor-PGDM の変動を調べた。健常 (C57BL/6) マウス (2.4 ± 0.2 ng/day、平均値±標準誤差) に比べて、阻害薬を与えなかった *mdx* マウスの尿中の tetranor-PGDM は有意に高値を示した (4.0 ± 0.3 ng/day)。H-PGDS 阻害薬を混餌 (0.01%および 0.1% w/w) にて与えたマウスの尿中 tetranor-PGDM は用量依存的にかつ有意に抑制された (2.5 ± 0.2 ng/day、 1.7 ± 0.1 ng/day)。

H-PGDS 病態の改善効果を調べた。阻害薬を与えなかったマウスは、阻害薬を与えなかった *mdx* マウスは、健常 (C57BL/6) マウスに比べて自発運動量の有意な低下が認められた。一方、H-PGDS 阻害薬を混餌にて与えたマウスは用量依存的に自発運動量の改善が認められた。

更に、組織学的検索の結果、健常 (C57BL/6) マウスの壊死面積率はわずか ($2 \pm 1\%$ 、平均値±標準誤差) であった。阻害薬を与えなかった *mdx* マウスの壊死面積率は、有意に高値 ($12 \pm 4\%$ 、平均値±標準誤差)を示した。H-PGDS 阻害薬を混餌 (0.01%および 0.1% w/w) にて与えたマウスの骨格筋の壊死は用量依存的にかつ有意に抑制され

た (6.6±1.4%、4.5±1%)。

D. 考察

生体内でプロスタグランジン (PG) D₂ が産生されない、PGD₂ 合成酵素欠損マウス (Balb/c 背景) に PGD₂ 代謝物との KLH をキャリアタンパク質とした複合体を免疫することにより高い抗体価を得ることができた。他の PG 代謝物に比べて 100 倍以上高い特異性を示す 5 つのクローンをを用いた EIA 測定法と LC-MS/MS 法による尿試料測定を行ったところ、いずれのクローンも LC-MS/MS と良好な相関を示したが、測定値は大きな隔たりがあった。この結果から、尿試料中に tetranor-PGD₂ と類似した化学構造を有し、かつ同様の体内動態を示す未知の化合物の存在が示唆された。

DMD と同様にジストロフィン遺伝子の異常を示す *mdx* マウスに H-PGDS 特異的阻害薬を与えると、尿中 PGD₂ 代謝物の抑制と病態の軽減、壊死の抑制が認められたことから、尿中 PGD₂ 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-PGD₂ と tetranor-PGJM 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 H-PGDS 阻害薬を投与すると尿中 tetranor-PGD₂ の抑制を伴った病態の軽減が観察された。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sarashina, H., Tsubosaka, Y., Omori, K., Aritake, K., Nakagawa, T., Hori, M., Hirai, H., Nakamura, M., Narumiya, S., Urade, Y., Ozaki, H., Murata, T., Opposing immunomodulatory roles of prostaglandin D₂ during the progression of skin inflammation. *J Immunol* 2014, 192 (1), 459-65.
- 2) Murata, T., Aritake, K., Tsubosaka, Y., Maruyama, T., Nakagawa, T., Hori, M., Hirai, H., Nakamura, M., Narumiya, S., Urade, Y., Ozaki, H., Anti-inflammatory role of PGD₂ in acute lung inflammation and therapeutic application of its signal enhancement. *Proc Natl Acad Sci U SA* 2013, 110 (13), 5205-10.
- 3) Nakagawa, T., Takeuchi, A., Kakiuchi, R., Lee, T., Yagi, M., Awano, H., Iijima, K., Takeshima, Y., Urade, Y., Matsuo, M., A prostaglandin D₂ metabolite is elevated in the urine of Duchenne muscular dystrophy patients and increases further from 8 years old. *Clin Chim Acta* 2013, 423, 10-4.
- 4) Taketomi, Y., Ueno, N., Kojima, T., Sato, H., Murase, R., Yamamoto, K., Tanaka, S., Sakanaka, M., Nakamura, M., Nishito, Y., Kawana, M., Kambe, N., Ikeda, K., Taguchi, R., Nakamizo, S., Kabashima, K., Gelb, M. H., Arita, M., Yokomizo, T., Watanabe, K., Hirai, H., Okayama, Y., Ra, C., Aritake, K., Urade, Y., Morimoto, K., Sugimoto, Y., Shimizu, T., Narumiya, S., Hara, S.,

Murakami, M., Mast cell maturation is driven via a group III phospholipase A2-prostaglandin D2-DP1 receptor paracrine axis. *Nat Immunol* 2013, 14 (6), 554-63.

- 5) Izumi Y, Aritake K, Urade Y, Fukusaki E. Practical evaluation of liquid chromatography/tandem mass spectrometry and enzyme immunoassay method for the accurate quantitative analysis of prostaglandins. *J Biosci Bioeng*. 2014, S1389-1723(13)00480-5.

2. 学会発表

1) Yoshihiro Urade

“Use of protein crystal growth technology in space to discover and develop therapeutic candidates for Duchenne muscular dystrophy“ 2nd Annual ISS research and development conference (2013 July 17, Denver, USA).

- 2) Taku Nakagawa, Atsuko Takeuchi, Ryohei Kakiuchi, Tomoko Lee, Mariko Yagi, Hiroyuki Awano, Kazumoto Iijima, Yasuhiro Takeshima, Yoshihiro Urade, Masafumi Matsuo

“A prostaglandin D2 metabolite is elevated in the urine samples of patients with Duchenne muscular dystrophy” 18th International WMS Congress (2013. 10.1-5 Asilomar, California, USA).

- 3) 松尾雅文, 裏出良博, 竹内敦子

「デュシェンヌ型筋ジストロフィーの尿中プロスタグランジン代謝産物解

析」第40回BMSコンファレンス (2013.7.9 宮崎)

- 4) 竹内敦子, 裏出良博, 松尾雅文

「LC-MS/MSによるDuchenne型筋ジストロフィー患者の尿中プロスタグランジンD2代謝物の定量」第40回BMSコンファレンス (2013.7.9 宮崎)

- 5) 柳下沙絢, 竹内敦子, 中川 卓, 竹島泰弘, 裏出良博, 松尾雅文

「デュシェンヌ型筋ジストロフィー患者尿中プロスタグランジンD2代謝物濃度」第61回質量分析総合討論会 (2013.9.10 つくば)

- 6) 裏出良博, 中川 卓, 竹内敦子, 垣内涼平, Tomoko Lee, 八木麻里子, 栗野宏之, 飯島一誠, 竹島泰弘, 松尾雅文, 有竹浩介

「デュシェンヌ型筋ジストロフィーの新規病態マーカーとしての尿中 PGD2 代謝物」第86回日本生化学会大会、(2013年9月13日、横浜)

- 7) 有竹浩介, 田中克尚, 鈴木比佐子, 三好和久, 林 勸生, 佐々木英治, 裏出良博

「Effect of a highly selective inhibitor for hematopoietic prostaglandin D synthase on an experimental model of Duchenne muscular dystrophy」第86回日本生化学会大会、(2013年9月13日、横浜)

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

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性筋疾患である。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、未だ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) D_2 が関与しているとの仮説のもと、DMD患者の早朝第一尿を採取して、尿中のPG D_2 代謝産物(PGDM)の解析をHPLC-MS/MSの手法で解析してきた。そして、DMDでは尿中PGDMが高値であることまた、年齢が進むとともにその値がさらに高値になることを明らかにした。そして、その結果を論文として報告した。

この尿中PGDM測定の結果は、DMDにおいてPG D_2 を介した炎症が進行していることを示した。そこで、この炎症を抑制する治療について臨床研究を開始した。現在その臨床研究が進行中である。

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。

プロスタグランジン(PG)には多くの種類がある。その中で、PG D_2 は炎症因子として知られている。DMDでは、骨格筋にPG D_2 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PG D_2 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、PGDMがDMD患者の早朝第一尿で高値であることを明らかにするとともに、このPGDMを指標としてPG D_2 産生を抑制するアスピリン投与によるDMD治療の臨床研究を開始した。そして、予備的な結果では、アスピリン投与により尿中PGDMの低下が示唆される結果を得つつある。

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。

また、「プロスタグランジン産生抑制剤のDuchenne型筋ジストロフィーに対する臨床試験」として、臨床研究を開始した。これまでに同意の得られた3例のDMD患者にアスピリンを投与した。投与量は30mg/kg/N3を連日28日投与とした。

(倫理面への配慮)

本研究の実施に当たっては、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。

C. 研究結果

DMD 患者の早朝第 1 尿サンプルの収集はなかった。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。これらの結果をまとめて、論文発表した。

これらに加えて、PGDM の産生を抑制することが期待されるアスピリンを DMD の治療に応用する臨床研究をはじめた。同意の得られた患者を対象として、アスピリンを投与し、その経過中に PGDM を測定した。その結果、投与前には高値であった尿中 PGDM が治療により、減少する傾向にあることが確認できた。さらに症例数を増やすことにより、この効果を明らかにする。

一方、アスピリン投与により DMD 患者の運動能の改善効果は現在のところ認められていない。今後、長期に亘る観察、あるいは、より精度の高い運動能の解析が必要である。

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 PGD₂ が関与していることを示した。

プロスタグランジン D₂ はアラキドン酸からサイクロヘキシナーゼ (COX) により、代謝されて産生される。DMD で PGD₂ が高いことは、PGD₂ 依存性の炎症が DMD で生じていることを示し、この COX が治療標的の 1 つと考えられる。

今回、この COX の作用阻害の目的でアスピリンを DMD 患者に投与した。その結果、予想

通り PGDM の産生が抑えられることを示す結果を得つつある。

もし、DMD で PGD₂ 依存性の炎症が DMD の進行に大きな役割を果たしているのであれば、このアスピリン投与による DMD 治療効果は大きいと予想される。

E. 結論

DMD で尿中 PGDM 排出が高値であることを明らかにし、それを下げる臨床研究を開始した。

F. 健康危険情報

特に報告することはない。

(分担研究報告書には記入せずに、総括研究報告書にまとめて記入)

G. 研究発表

1. 論文発表

Nakagawa,T., Takeuchi,A., Kakiuchi,R., Lee,T., Yagi,M., Awano,H., Iijima,K., Takeshima,Y., Urade,Y., Matsuo,M. 2013. A prostaglandin D₂ metabolite is elevated in the urine of Duchenne muscular dystrophy patients and increases further from 8years old. *Clin Chim Acta.* 423: 10-4

2. 学会発表

T.Nakagawa; A.Takeuchi; R.Kakiuchi; T.Lee; M.Yagi; H.Awano; K.Iijima; Y.Takeshima; Y.Urade; M.Mtsuo. A prostaglandin D₂ metabolite is elevated in the urine samples of patients with Duchenne muscular dystrophy, 10月3日 18回 世界筋学会

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし