

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（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PGD $_2$ 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。 $\delta$ -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）、 $\alpha$ -サルコグリカンノパチー、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PGD $_2$ 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ー・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

- 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。

PGD<sub>2</sub> 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、PGD<sub>2</sub> 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 を用いて測定した (LC: 資生堂、MS/MS: AB Sciex)。

### ( 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 法を用いてした。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。

研究対象者に対する人権擁護上の配慮、研究方法による研究対象者に対する不利益、危険性の排除や説明と同意 ( インフォームド・コンセント ) に関わる状況、

## 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

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

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。

### (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 ± 0.35 ng/mgクレアチニン)は、健常児(3.08 ± 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 ± 0.32)では健常児(3.55 ± 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 ± 0.44)では健常者(2.90 ± 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>産生能を失ったりポカリン型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)とトロンボキサン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ため、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PGD<sub>2</sub>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PGD<sub>2</sub>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  
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 PGD<sub>2</sub> 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 D<sub>2</sub> 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PGD<sub>2</sub>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