

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

【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 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、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 PGD<sub>2</sub> 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) D<sub>2</sub> 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 PGD<sub>2</sub> 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 PGD<sub>2</sub> 代謝物 (tetranor-PGD<sub>2</sub>) の新規測定法の確立

尿中 PGD<sub>2</sub> 代謝物 (Tetranor-PGD<sub>2</sub>) 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。

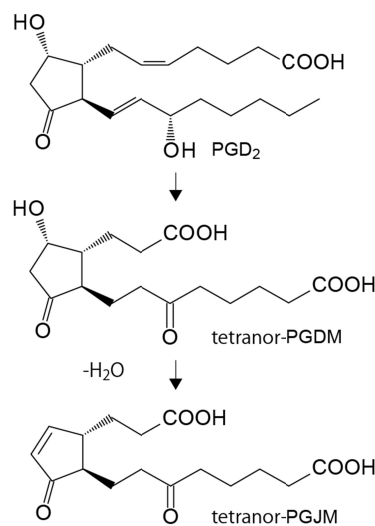


図 1. PGD<sub>2</sub> および尿中に排泄される代謝物 tetranor-PGD<sub>2</sub> とその分解物 tetranor-PGJM

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-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、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 $\mu$ 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-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 ウエルプレートに、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(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 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。

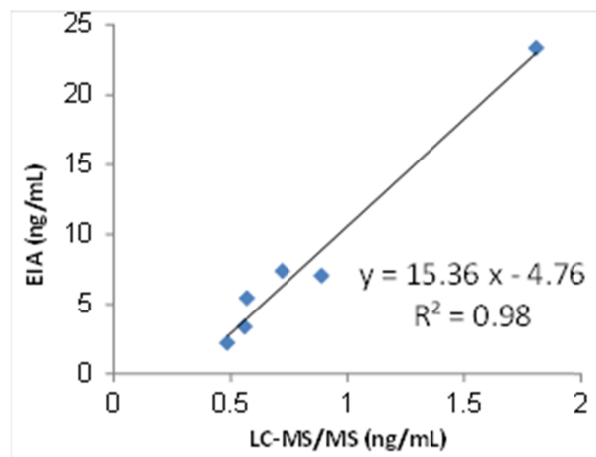


図 2 tetranor-PGDM 特異的抗体を用いた酵素抗体法と LC-MS/MS 法による定量比較

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 PGD<sub>2</sub> 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 ( $2.4 \pm 0.2$  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 tetranor-PGDM は有意に高値を示した ( $4.0 \pm 0.3$  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 ( $2.5 \pm 0.2$  ng/day、 $1.7 \pm 0.1$  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  $\pm$  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  $\pm$  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 ( $6.6 \pm 1.4\%$ 、 $4.5 \pm 1\%$ )。

#### D . 考察

生体内でプロスタグランジン (PG) D<sub>2</sub> が産生されない、PGD<sub>2</sub> 合成酵素欠損マウス (Balb/c 背景) に PGD<sub>2</sub> 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-PGDM 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 PGD<sub>2</sub> 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 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-PGDM 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-PGDM 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 D<sub>2</sub> 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 USA* 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 D<sub>2</sub> 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

なし

学会発表

発表者氏名	演題名	学会名	発行年

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ



雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Nakagawa,T., Takeuchi,A., Kakiuchi,R., Lee,T., Yagi,M., Awano,H., Iijima,K., Takeshima,Y., Urade,Y., <u>Matsuo,M.</u>	1.A prostaglandin D <sub>2</sub> metabolite is elevated in the urine of Duchenne muscular dystrophy patients and increases further from 8 years old.	Clin Chim Acta.			in press