

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

研究分担者 竹内 敦子 神戸薬科大学 准教授

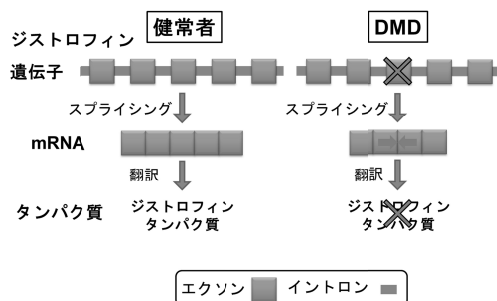
研究要旨

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、ほぼ 20 歳代に心不全または呼吸不全により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、筋の細胞膜形成に關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關与するプロスタグランジン D2（PGD2）合成酵素の発現が亢進していることが明らかとなった。これまでに、PGD2 の尿中代謝物である tetranor-PGDM（PGDM）の LC-MS/MS を用いる定量法を確立した。DMD 患者、BMD 患者および健常者について測定したところ、DMD の病状診断に有効である可能性が示唆された。そこで、他の筋疾患患者の尿中 PGDM を測定したところ、疾患により差が認められた。

A．研究目的

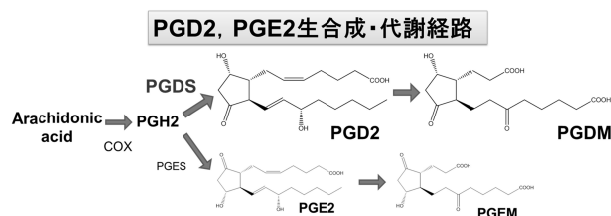
Duchenne 型筋ジストロフィー (Duchenne muscular dystrophy :DMD)は進行性の筋萎縮を呈し、極めて重篤な遺伝性疾患である。本疾患は、原因遺伝子であるジストロフィン遺伝子のエクソン欠失および重複等の変異により、筋の細胞膜形成に關与するジストロフィンタンパク質が欠損する遺伝性筋疾患である。人種に関係なく出生男子約 3500 人に 1 人の割合で発症する。

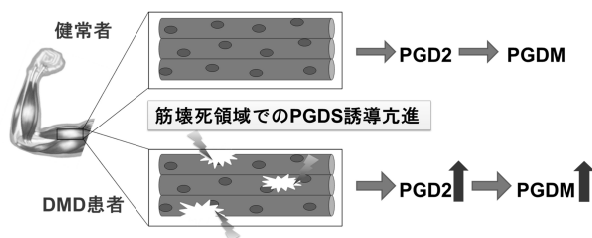
ジストロフィンタンパク質合成過程



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關与するプロスタグランジン D2 合成酵素（PGD2 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 PGD2 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。





B．研究方法

1) 対象

2～55歳の患者 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、 α -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 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。

2) 測定用試料の調製および LC-MS/MS による定量

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。次に固相抽出カラム Sep-Pak Vac を用いて抽出した。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 μ 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。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。

C．研究結果

2～55歳の患者から採取した早朝一番尿 1,003 検体中の PGDM 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 は DMD の方が有意に高かった。

DMD、BMD、 α -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 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

DMD 患者および健常者について測定したところ、DMD の病状診断に有効である可能性が示唆された。また、他の筋疾患患者の尿中 PGDM を測定したところ、疾患により差が認められた。以上の結果より、治療効果の判定に応用可能であるとが考えられた。

今後は、DMD 患者に薬による治療を行い、その効果の判定に応用していく予定である。

E．結論

尿中 PGDM は、健常者 < BMD 患者 < DMD 患者の順に高かったことから、DMD の病状診断に有効であることが明らかとなった。

F．研究発表

1．論文発表

なし

2．学会発表

- 1) 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)

- 2) 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)

- 3) 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)

- 4) 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)

- 5) 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)

G . 知的財産権の出願・登録状況
なし