

2014/9082A

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 26 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 裏出 良博

平成 27 (2015) 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	-----	6
裏出良博		
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	-----	9
3. 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)に関する研究		
岩田 裕子	-----	11
4. 筋ジストロフィー患者の尿中プロスタグランジン代謝物 (tetranor-PGDMおよびtetranor-PGEM)の定量分析		
竹内 敦子	-----	14
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	17
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	20

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 国立大学法人筑波大学
国際統合睡眠医化学研究機構 教授

【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（TAS-205）を1月間、混餌（0.01%及び0.1%）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、動物の行動量が増加したので、尿中PGDM-tがDMDの病態進行の新たな指標として使用でき、H-PGDS阻害薬（TAS-205）が病態進行の抑制と運動機能の保持に有効であることを確認した。

δ-sarcoglycan欠損の拡張型心筋症モデルハムスターやT3糖鎖異常心筋症マウスにおいても尿中PGDM-tの増加が確認され、H-PGDS阻害薬（TFC-007）の投与は心臓の繊維化の抑制と心機能の回復をもたらした。従って、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、H-PGDS阻害薬は心機能の保護にも有効である。

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、尿中PGDM-t量は、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。

さらに、BMD患者のロボットスーツを使用したリハビリテーション前後での尿中PGDM-t量を測定した結果、ほぼ全ての患者で増加が観察され平均で1.6倍に増加した。一方、PGE₂の尿中代謝物であるPGEM-t量は、統計学的に有意な増加は観察されな

かった。この尿中PGDM-t量の増加はリハビリテーションに伴う筋肉炎症を反映していると考えられる。

PGD₂を作れないリポカリン型PGD合成酵素と造血器型PGD合成酵素の二重遺伝子欠損マウス (Balb/c系統) を、PGDM-tのKLHタンパク質複合体を用いて免疫して、PGDM-tに対するモノクローナル抗体5クローンを作成した。これらの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

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

竹内敦子 神戸薬科大学 薬学部
准教授

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) H-PGDS 阻害剤 (TAS-205) の混餌飼料 (0.01% & 0.1% w/w) の長期投与による *mdx* マウスの運動量、筋壊死体積と尿中PGD₂代謝物の変動の測定

mdx マウスに、H-PGDS 阻害剤 (TAS-205) を 0.01%w/w (低用量群) と 0.1% w/w (高用量群) 含む混餌飼料と普通の飼料を5-9週齢にかけて与えた。その後、尿中のPGD₂代謝物(PGDM-tetranor, PGDM-t) を、液体クロマトグラフィー・タンデムマスマスペクトル (LC-MS/MS) 法を用いて分析した。

さらに、マウス横隔膜での壊死筋の体積を、組織切片での抗 IgG 染色により組織化学的に定量し、マウスの活動期である暗期 12 時間の行動量を、赤外線センサーを用いて定量した。

(2) 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、*mdx* マウスに甲状腺ホルモン T3 (2 mg/kg/day) を 2-3 週間、皮下投与して作成した心筋症モデルを用いた。

これらの動物の尿中 PGDM-t を LC-MS/MS 法を用いて定量した。これらの動物に 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。

(3) DMD と BMD 患者の尿中 PGD₂ 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 と BMD 患者で同意の得られた例から尿を収集した。さらに、BMD 患者でロボットスーツを用いたりハビリテーションを行なっている患者を対象として、リハビリテーション前後の早朝第一尿の提供を受け、尿中の PGDM-t と PGE₂ 代謝物である PGEM-tetranor (PGEM-t) を、LC-MS/MS 法を用いて測定した。

2) 尿中 PGD₂ 代謝物の測定：尿 0.4ml に内部標準として重水素置換した標準物質 (PGDM-t-d₆, PGEM-t-d₆) を加え、固相抽出カラムを用いて PGDM-t 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、比色定量により尿中クレアチンを定量し、補正した。

(4) 抗 PGDM-t モノクローナル抗体の作製と結合特異性の検証

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、独立 5 クローンモノクローナル抗体

産生株を単離した。得られたハイブリドーマの特異性は、抗原である PGDM-t と PGEM-t、PGF_{2α} の代謝物である PGFM-tetranor (PGFM-t)、および、Thromboxane (TX) A₂ の代謝物である 2,3-dinor-TXB₂ を比較対照として使用した。

(倫理面への配慮)

本研究の動物実験については、筑波大学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。研究計画は両機関の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なうため、実験参加者に対する説明会を開催して、研究方法による研究対象者に対する不利益が無いこと、自由に研究への協力を中止できること、危険性の排除方法を判りやすく説明し、書面による同意 (インフォームド・コンセント) 書を得た上で、研究を開始した。

C. 研究結果

(1) H-PGDS 阻害剤 (TAS-205) の混餌飼料 (0.01% & 0.1% w/w) の長期投与による *mdx* マウスの運動量、筋壊死体積と尿中 PGD₂ 代謝物の変動の測定

5週齢の *mdx* マウスに、普通の飼料と TAS-205 を 0.01%w/w (低用量群) と 0.1% w/w (高用量群) を含む混餌飼料を4週齢与えた結果、尿中 PGDM-t 量は、普通食を与えた *mdx* マウス (4.0 ± 0.3 ng/day) から、両群とも野生型マウス (2.4 ± 0.2 ng/day) 以下にまで低下した。逆に、横隔膜の壊死筋繊維の容積が減少し、夜間 12 時間の行動量が用量依存的に増加した。一方、逸脱酵素である血中 CPK の値は、TAS-205 の投与で変化しなかった。

以上の結果は、尿中 PGDM-t 量は DMD の病態進行の新たな指標として有効であり、H-PGDS 阻害剤 (TAS-205) が DMD の病態進行軽減薬として有効であることを示している。

(2) 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と糖鎖異常心筋症マウスでは、心臓組織での H-PGDS 蛋白質の発現量が 2・5 倍程度増加していた。そして、同週齢の野生型動物に比べ、尿中 PGDM-t 量が 2・5 倍程度高値を示した。

両方の心筋症モデル動物への H-PGDS 阻害薬 (TFC-007, 30 mg/kg/day) の投与により、尿中 PGDM-t が減少し、心臓組織の繊維化が抑制され、小動物用超音波高解像度イメージングシステムにより評価した心機能も改善した。

従って、尿中 PGDM-t 量は心筋変性の病態進行の指標としても有効であり、H-PGDS 阻害剤が心筋症の病態進行軽減薬としても有効であると考えられる。

(3) DMD 患者の尿中 PGD₂代謝物の測定

DMD 患者 532 例、BMD 患者 80 例、健常者 116 例の早朝第一尿の尿中 PGDM-t 量は、DMD 患者が健常者の約 3 倍、BMD 患者が約 2 倍高い値を示した。そして、尿中 PGEM-t 量は、いずれも PGDM-t 量の 3 倍程度高い値を示し、DMD 患者が健常者の約 3.5 倍、BMD 患者が約 2.3 倍高い値を示した。

ロボットスーツを用いたリハビリテーションを行なっている BMD 患者の尿中 PGDM-t 量は、リハビリテーション後に 1.4 倍に増加した ($p < 0.001$)。しかし、尿中 PGEM-t 量に変化は見られなかった。

従って、尿中 PGDM-t 量はリハビリテーションに伴う筋変性の指標としても有効であり、H-PGDS 阻害剤はリハビリテーションに伴う筋変性の軽減薬としても有効であると考えられる。

(4) 抗 PGDM-t モノクローナル抗体の作製

作製した 5 クローンの抗 PGDM-t モノクローナル抗体の特異性を検討した結果、いずれの抗体も、PGEM-t、PGFM-t、2,3-dinor-TXB₂ に対して PGDM-t と比べて 100 倍以下の免疫交差性しか示さなかった。従って十分に高い特異性を持つモノクローナル抗体であることが判明した。さらに、いずれの抗体も米国 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。

D. 考察

尿中 PGDM-t 量は DMD の病態進行の新たな指標として使用でき、H-PGDS 阻害薬は DMD の病態進行軽減薬として有効であると考えられる。拡張型心筋症モデル動物においても、尿中 PGDM-t 量が高値を示し、H-PGDS 阻害薬投与が心臓の繊維化と心機能の低下を軽減させた。従って、H-PGDS 阻害薬は DMD 患者の末期の心不全に対しても効果を示すことが期待できる。

DMD や BMD を含む様々な筋ジス患者の尿中で PGEM-t が PGDM-t の 3 倍以上も高い値を示し、全身での PGE₂ の産生が PGD₂ 同様に亢進していることが明らかになった。しかし、BMD 患者のロボットスーツを用いたリハビリテーション前後で、尿中 PGDM-t は増加したが、尿中 PGEM-t 量は変化せず、PGE₂ が PGD₂ とは異なった病態に関与することが示唆された。

PGE₂ と PGD₂ の産生を抑制できるアスピリンを用いて、3 人の DMD 患者への投与実験を行なった。現在、尿中 PGEM-t と PGDM-t の分析を進めている。呼び検査の結果では、アスピリン投薬中には両代謝物の排泄量の抑制が観察されている。今後、患者の運動量の測定や問診による診断結果を合わせた解析を進め、病態との関連性の解析を進める予定である。

さらに、H-PGDS 阻害剤 TAS-205 を用いた DMD 患者でのフェーズ 1 安全性試験が、昨年 9 月より、国立精神・神経医療研究センターで開始され、患者の尿中 PGDM-t 量の測定が開始された。本研究の終了時点でも、何ら有害事象の報告は無く、順調に治験研究は継続されている。本治験研究は本年 5 月末に終了予定である。今後の治験研究においても、H-PGDS の抑制効果の確認のための Proof of concept (POC) の指標として尿中 PGDM-t 量の測定が行なわれ、DMD の病態進行の新たな指標として使用される予定である。

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を用いれば、尿中 PGDM-tetranor の簡易測定法が開発できる。

E. 結論

尿中 PGDM-t 量は DMD の病態進行の新たな指標として使用でき、H-PGDS 阻害薬は DMD の病態進行軽減薬として有効である

F. 健康危険情報
なし

G. 研究発表

1. 論文発表
別紙

2. 学会発表
別紙

H. 知的財産権の出願・登録状況
別紙

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
マーカー物質の開発研究

研究分担者 裏出 良博 筑波大学 国際統合睡眠医科学研究機構 教授

【研究要旨】

現在のところ筋ジストロフィーの病態進行の生化学的指標としてクレアチニンキナーゼが知られているが、病態との相関は必ずしも良好でない。筋ジストロフィーの薬物治療や遺伝子治療の効果の検証あるいは筋力低下の防止を目的としたリハビリテーションにおける運動負荷量の選定のためには病態進行に良好な相関を示す指標の確立が強く求められている。我々は、病態モデルマウスを用いた検討の結果、尿中プロスタグランジン(PG)_{D2}代謝物がデュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD)の病態進行度を予測する非侵襲性マーカーになりうることを見出した。そこで、ヒト尿中PGD₂代謝物と病態の相関を調べたところ、尿中PGD₂代謝物はDMD病態が急激に進行する小学校低学年で急激に上昇し、ベッカー型筋ジストロフィー患者では過度なリハビリテーションにより増加し、病態と良好な相関を示す。尿中PGD₂代謝物の簡易測定系の構築を目的として、特異的モノクローナル抗体の作製を行った。体内でPGD₂および代謝物がほとんど作られないPGD合成酵素欠損マウスを用いて抗原の免疫を行うと、野生型に比べて高い抗体価を示す血清が得られ、他のPG代謝物に比べて高い選択性を示すモノクローナル抗体を作製することができた。

A. 研究目的

筋ジストロフィーの治療法として、遺伝子治療法や再生移植治療法による根本治療法の確立が進められているが、いずれも研究段階であり、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。リハビリテーションも、筋力維持のために必要な運動負荷が大きすぎると逆に筋傷害を進行させる危険を伴う。従って、現状では運動負荷量の選定は試行錯誤で行うしかなく、病態進行指標の確立が強く求められている。

我々は、尿中プロスタグランジン(PG)_{D2}代謝物がデュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD)の病態進行度を予測する非侵襲性マーカーになりうることを示した(Am J Pathol. 2009、特願2009-55057)。本研究では、尿中PGD₂代謝物を指標としたリハビリ運動メニューのマニュアル化と、尿中PGD₂代謝物簡易測定法の実用化を目指す。本手法の確立は、治療薬候補物質の評価法

としての意義も大きく、治療法の開発にも大きく貢献する。

本研究では、以下の知見や評価手法を駆使し、モノクローナル抗体を用いた安価かつ簡便な尿中PGD₂代謝物の測定法の開発と、動物実験および臨床試験による種々のデータの蓄積および統計学的処理による尿中PGD₂代謝物の病態進行評価指標としての有効性を検証する。

B. 研究方法

1) 造血器型PGD合成酵素阻害薬による筋ジストロフィー病態軽減と尿中PGD₂代謝物抑制の相関

神戸大学医学部附属病院小児科を受診し、同意の得られたDMD患者およびその家族から尿を収集した。尿中のPGD₂代謝物(tetranor-PGD₂)を高速液体クロマトグラフィー・タンデム型質量分析(LC・MS/MS)法を用いて測定した。

その他の筋ジストロフィーについて、病態と尿中PGD₂代謝物の相関を明らかにするために、ベッ

カー型筋ジストロフィー (Becker muscular dystrophy: BMD) の患者に対するロボットスーツを用いたリハビリ訓練による運動負荷が訓練の前後において尿を採取し、その PGDM を測定した。

2) 尿中PGD₂代謝物簡易測定法の開発
酵素免疫測定 (enzyme immunoassay, EIA法) の開発を目的として、尿中のPGD₂代謝物 (tetranor-PGDM) に対する特異的モノクローナル抗体の作製を行った。抗体作製には、体内で PGD₂およびその代謝物が作られない、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)の2重遺伝子欠損マウス (Balb/c 背景) を用いた。

(倫理面への配慮)

本研究では「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守し、神戸大学の倫理委員会において承認を受けた上で研究を行った。また提供者への説明とインフォームド・コンセント個人情報の厳重な管理 (匿名) を徹底した。

動物実験および遺伝子組み換え実験については、全て筑波大学の動物実験委員会、組換え DNA 実験安全委員会の審査を受けている。

C. 研究結果

尿中 Tetranor-PGDM 濃度は、DMD 患者の筋委縮が急激に進行する小学校低学年で急激に上昇し、他の筋疾患でも高値を示す場合が散見された。ベッカー型筋ジストロフィーでは DMD に比べて低値を示すが、多くの患者でリハビリテーションにより増加した。

PGD 合成酵素を欠損するマウス (Balb/c系統) に Keyhole Lympe Hemocyanin (KLH) をキャリア蛋白質として抗原の Tetranor-PGDM を腹腔内に免疫すると、野生型マウスに同様の抗原を免疫した場合の血清に比べて高い抗体価を示した。その脾臓細胞と骨髄腫細胞との融合細胞を作製した。Tetranor-PGDMに対するモノクローナル抗体産生クローンは、尿中に排泄される他の主要なPG代謝物 (tetranor-PGEM、tetranor-PGFM、2,3-dinor-TXB₂ 等) を陰性対象

として、Tetranor-PGDM に対して比較的高い特異性と親和性 (KD=3-10 nM) を示すモノクローナル抗体を5クローン単離した。選出した5クローンのサブクラスはいずれも IgG1 であった。尿中に排泄される主要な PG 代謝物を対象とした特異性検査の結果、その交差性は何れも 100 倍以上も弱かった。以上の結果は、尿中 Tetranor-PGDM 濃度は筋疾患患者の筋肉炎症の病態マーカーとして有望であり、得られたモノクローナル抗体は尿中 Tetranor-PGDM の簡便な免疫測定法の開発に有効であることを示している。

D. 考察

筋傷害の進行が活発な小学校低学年のDMD患者ばかりでなく、筋肉に過度な負荷がかかったと考えられるリハビリテーション直後のベッカー型筋ジストロフィー患者でも尿中 tetranor-PGDMが比較的高値を示したということは、tetranor-PGDM は従来の筋炎症の生化学マーカーとされた CPK に比べてより、病態を反映するマーカーと考えられた。生体内でほとんどPGD₂が作られないと考えられるPGD合成酵素欠損マウスを用いて抗原を免疫すると野生型マウスを用いた場合に比べて、高い抗体価が得られた。また、得られた抗体は比較的選択性の高いものであった。低分子の生理活性脂質であるプロスタグランジン類およびその代謝物の抗体の作製は、その化学構造の類似性から困難であったが、今回の結果から各プロスタグランジン合成酵素欠損マウスが特異的抗体作製に有効であることが強く示唆された。

E. 結論

Tetranor-PGDM濃度は筋疾患患者の筋肉炎症の病態マーカーとして有効である。Tetranor-PGDMの簡便な免疫測定系の開発に有効なモノクローナル抗体を作製した。

F. 健康危険情報

特に報告することはない。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Practical evaluation of liquid chromatography/tandem mass spectrometry and enzyme immunoassay method for the accurate quantitative analysis of prostaglandins. Izumi Y, Aritake K, Urade Y, Fukusaki E *J Biosci Bioeng.* 118(1):116-8. 2014
- 2) Prostaglandin D₂ synthase/GPR44: a signaling axis in PNS myelination. Trimarco A, Forese MG, Alfieri V, Lucente A, Brambilla P, Dina G, Pieragostino D, Sacchetta P, Urade Y, Boizet-Bonhoure B, Martinelli Boneschi F, Quattrini A, Taveggia C. *Nat Neurosci.* 17(12):1682-92. 2014

2. 学会発表

1. Neuroscience 2014 (北米神経科学会、2014年11月15-19日、ワシントンDC) Tanaka K, Aritake K, Tayama M, Shigeno K, Hayashi Y, Sasaki E, Utsugi T, Sasaoka T, Urade Y. Inhibition of hematopoietic prostaglandin D synthase improves symptoms of muscular dystrophy in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy

2. International Congress of the world muscle Society (WMS 2014) (第19回 世界筋肉学会、2014年10月7-11日、ベルリン) Tanaka K, Aritake K, Tayama M, Sasaki E, Utsugi T, Sasaoka T, Urade Y. Novel inhibitor of hematopoietic prostaglandin D synthase improves the muscle disorder in an experimental model of Duchenne muscular dystrophy

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

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)D₂が関与しているとの仮説のもと、DMD患者の尿中のPGD₂代謝産物(PGDM)を解析してきた。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報告してきた。

そこで、PGDMの産生を抑制するアスピリンをDMD患者に投与する臨床研究を開始し、投与は終了した。現在その結果について解析中である。一方、ベッカー型筋ジストロフィーでは、運動負荷によりPGDMが増加した。

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、PGD₂は炎症因子として知ら

れている。DMDでは、骨格筋にPGD₂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。

先に私達はDMD患者尿中のPGDMが高値であること、また年齢が進むとともにさらに高値になることを見出し報告した。¹⁾

本研究では、DMD患者の尿中PGDM測定を継続するとともに、このPGDMを指標としてPGD₂産生を抑制するDMD治療の臨床研究のアスピリン投与を終了した。さらに、Becker型筋ジストロフィー患者で運動負荷による尿中PGDMの変化を分析した。

¹⁾ Nakagawa,T., et al 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

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取

集した。尿中の PGDM を HPLC・MS/MS を用いて測定した。さらに、ベッカー型筋ジストロフィー (Becker muscular dystrophy: BMD) の患者がロボットスーツ HAL を用いたリハビリテーションを実施している。その訓練による運動負荷が PGDM に及ぼす影響を明らかにするため、訓練の前後において尿を採取し、その PGDM を測定した。

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。同意の得られた 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 患者の尿中 PGDM 解析を引き続き行い、尿中 PGDM は正常より有意に高いことを確認した。

BMD 患者で、ロボットスーツ着用による歩行訓練の前後で、尿を採取し、尿中 PGDM を解析した。合計 29 回の訓練で採尿と解析が行われた。そして、尿中 PGDM は訓練により約 1.6 倍に増加することが判明した。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。現在、投与の計画は終了し、アスピリン投与による PGDM の変化を解析中である。

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。DMD 患者が尿中に PGDM を多量に排泄していることを世界で初めて明らかにしてきた。引き続き、DMD では、尿中 PGDM が高値である結果を得ている。これは、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

らサイクロオキシナーゼ (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 患者に投与する臨床研究を計画した。計画通りにアスピリンの投与は実施され、投与は終了した。現在、この計画に従ったアスピリン投与の有効性について解析中である。BMD 患者への運動負荷により尿中の PGDM が増加した。このことは、筋肉への負荷に何らかの機序が働いて PGD₂ の産生を亢進させることを示唆した。

E. 結論

DMD で尿中 PGDM 排出が高値であることからそれを下げる臨床研究を実施中である。運動により尿中 PGDM が上昇することを明らかにした。

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

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

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。これまでに、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造血器型プロスタグランジン (PG) D合成酵素 (H-PGDS) によるPGD₂ 産生が相関することが強く示唆されている。そこで、拡張型心筋症心筋組織においても同様に、筋壊死に伴う病態進行とPGD₂ 産生の亢進が関連している可能性を検証するため、心筋症及び心筋変性のモデル動物(ハムスター、マウス)を用いた解析を行ってきた。心筋症等心筋変性モデル動物にH-PGDS 阻害薬を投与することにより、心筋症病態の進行が抑制される可能性が示された。

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 (H-PGDS) によるプロスタグランジン (PG) D₂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、心筋症心筋組織においても同様に、筋壊死に伴う病態進行とPGD₂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

8- sarcoglycanを欠損した拡張型心筋症モデルハ

ムスターおよび糖鎖異常による拡張型心筋症マウスを用いた。対照として、同週齢の野生型動物を用いた。心筋変性マウスモデルは*mdx*マウスに甲状腺ホルモンTriiodothyronin (T3) を2 mg/kg/day 3週間投与して作成した。HPGDS阻害薬(30mg/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11,15-Dioxo-9-hydroxy-2, 3, 4, 5-tetranorprostan-1, 20-dioic acid

(tetranor-PGDM)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)。心筋組織におけるH-PGDSの含量はH-PGDS抗体を用いたイムノブロットにより、局在は組織切片を心筋(cTnI等)、肥満細胞(トリプターゼ等)、マクロファージ(CD11b等)特異的蛋白等の各々抗体とH-PGDS抗体との二重染色により同定及び解析を行なった。(倫理面への配慮)

実験動物を用いる研究については、国立循環器病研究センター動物実験指針に準拠して実施した。本研究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

心筋症ハムスター及び糖鎖異常心筋症マウス、T3 投与心筋変性マウスでは、野生型動物、T3 非投与マウスに比べ、心臓組織での H-PGDS 蛋白質の発現量の増加が観察された。心筋組織を用いた免疫染色の結果から、H-PGDS は病態心筋組織において心筋細胞というよりは壊れた細胞や炎症細胞の浸潤部位に局在すること、H-PGDS の集積箇所と肥満細胞のマーカーが一致したことより H-PGDS は肥満細胞に多く存在していることが判明した。これらの知見は、心筋症病態の進行に伴い、尿中 tetranor-PGDM 量が高値を示すことと一致していた。また心筋症及び心筋変性モデル動物において H-PGDS 阻害薬を投与すると、心筋組織の H-PGDS 蛋白質含量の減少と尿中 tetranor-PGDM の減少に伴い、心機能の改善と心筋組織の繊維化の減少が観察された。

D. 考察

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。今回明らかになった心筋症・変性心筋の病態進行に伴う H-PGDS 増加、特に心筋間質に存在する肥満細胞への集積、H-PGDS 阻害薬の心筋病態改善効果などの結果より、H-PGDS を標的にした新規治療法開発の可能性が示唆された。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 tetranor-PGDM がその候補として期待される。

E. 結論

H-PGDS 阻害薬が拡張型心筋症の病態進行を抑制できる可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
 - 1) 第 87 回日本薬理学会年会 (2014 年 3 月 20 日、仙台国際センター) 鎌内慎也、岩田裕子、Cheng-Kun Du、Dong-Yun Zhan、森本幸生、白井幹康、若林繁夫: TRPV2 N 末ドメインの高発現は、トロポニン T 変異を持つ拡張型心筋症モデルマウスの症状を改善する
 - 2) 第 87 回日本薬理学会年会 (2014 年 3 月 21 日、仙台国際センター) 岩田裕子、大武仁美、鎌内慎也、若林繁夫: Ca²⁺透過チャネル TRPV2 の細胞膜局在の阻害により拡張型心筋症モデル動物の病態進行が抑制された。
 - 3) 第 62 回日本心臓病学会学術集会 (2014 年 9 月 26 日 仙台市民会館) 駒村和雄、岩田裕子: 拡張型心筋症の新規治療薬の開発: 伸展感受性 Ca 透過型陽イオンチャネル

TRPV2 の阻害薬の可能性

- 4) 第 86 回日本生化学会大会 (2014 年 10 月
- 5) 症の進行が抑制される。
- 6) AHA Scientific Sessions 2014 (2014 年 11 月 16 日 McCormick Place Chicago /USA) Iwata, Y., Komamura, K.: Tranilast, Transient Receptor Potential Vanilloid 2 Antagonist, Ameliorates End-Stage Heart Failure of Mice With Dilated Cardiomyopathy.

18 日 国立京都国際会館) 岩田裕子、大武仁美: TRPV2 阻害剤によりマウス重症心筋

G. 知的財産権の出願・登録条件

1. 特許取得

- 1) 特許第 5 6 4 4 0 2 6 号 (登録日 平成 26 年 1 1 月 1 4 日)

TRPV2 の部分ペプチド 岩田 裕子 若林 繁夫

- 2) 特許第 5 6 6 7 2 2 3 号 (登録日 平成 26 年 1 2 月 1 9 日)

TRPV2 阻害剤、疾患の予防又は治療剤、薬剤探索用リード化合物、及び薬剤探索方法
岩田 裕子 若林 繁夫

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代謝物（tetranor-PGDM および tetranor-PGEM）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】

デュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD)は遺伝子変異によるジストロフィンタンパク質の欠乏によって起こる進行性の遺伝性筋疾患の中で大部分を占めている。筋繊維の壊死が特徴として挙げられ、10代からは歩行が困難になり、20代には心不全や呼吸困難で死亡するとされている。このDMDがプロスタグランジンD₂(PGD₂)を介した炎症が関係していることが明らかになっており、代表的な炎症マーカーのプロスタグランジンE₂(PGE₂)もDMDに関与しているかを検討する。DMD患者の尿中のPGD₂代謝産物のtetranor PGDMとPGE₂代謝産物のtetranor PGEMを測定し、DMDの診断に有効であるかを考察した。API3000 LC/MS/MS systemで尿中PGDMとPGEMを測定したところ、DMD患者と健常者ではDMD患者の方がともに数値が高かった。このことからDMD患者では、筋繊維の壊死に伴ってPGD₂を介した炎症が起こり、数値も上昇すると考えられた。尿中PGDM濃度は症状との関係が認められたが、尿中PGEM濃度に関係が認められなかった。これらの結果からPGD₂の代謝産物であるPGDMの測定はDMDの診断に有効であると判断される。しかしながら、PGE₂の代謝産物であるPGEMは結果からはDMDの診断に必ずしも有効であるとは言えないと考えられた。

A. 研究目的

デュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD)は遺伝子変異によるジストロフィンタンパク質の欠乏によって起こる進行性の遺伝性筋疾患の中で大部分を占めている。筋繊維の壊死が特徴として挙げられ、10代からは歩行が困難になり、20代には心不全や呼吸困難で死亡するとされている。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、筋の細胞膜形成に関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。まだ治療法が確立していない難病で現在は病気の進行を遅らせる様々な試みがされている。このDMDがプロスタグランジンD₂(PGD₂)を介した炎症が関係していることが明らかになり、今年度は代表的な炎症マーカーのプロスタグランジンE₂(PGE₂)もDMDに関与しているかを考察する。そこでDMD患者の尿中のPGD₂代謝産物のtetranor PGDM (PGDM)とPGE₂代謝産物のtetranor PGEM (PGEM)を測定し、DMDの診断に有効であるかを検討した。

Fig.1にPGD₂とPGE₂の生合成・代謝経路を示した。

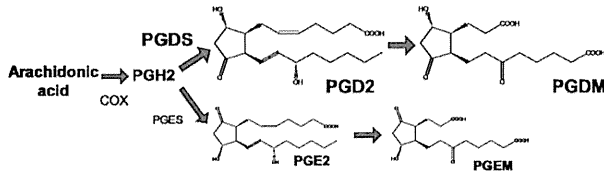


Fig.1 Synthesis and Metabolism of Prostaglandin D₂ and E₂

B. 研究方法

1) 対象

前年度の尿中 PGDM 濃度の測定使用した 2～55 歳の患者 (DMD および BMD) 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。

尿中 PGDM 濃度の場合、早朝に低く、日中に高い傾向が見られたことから、尿中 PGEM 濃度の測定の場合も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 0.5ml を加え、さらに内標準物質(tetranor-PGDM-d6 および tetranor-PGEM-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 100μl 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。

《HPLC 測定条件》

装置:Shimadzu 10ADvp[Shimadzu]

カラム:Inertsil ODS-3 column

(150×2.1 mm i.d.) [GL Sciences]

移動相:

A:0.01%(v/v) acetic acid, B:acetonitrile

B:0-2min 10%,24min 30%, 24min 70%, 28min 100%

流速:250μl/min

C. 研究結果

2～55 歳の患者から採取した早朝一番尿 1,003 検体中の尿中 PGDM および PGEM を測定したところ、それぞれのピークは分離し、単一ピークとして検出され、分離定量が可能であった。

Fig.2 に示すように、尿中 PGDM 濃度および尿中 PGEM 濃度を DMD 患者と健常者と比較したとき DMD 患者の方がともに数値が高かった。DMD と BMD を比較したところ、尿中 PGDM 濃度および尿中 PGEM 濃度は DMD の方が有意に高かった。

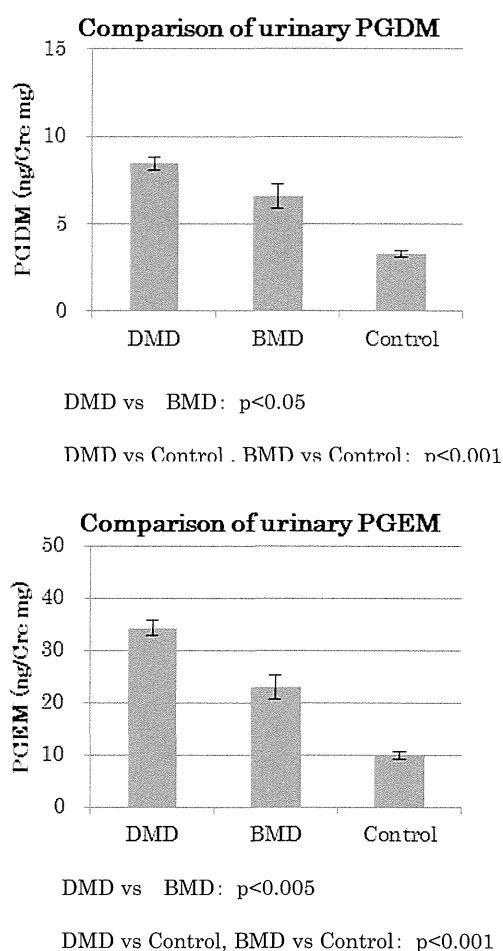


Fig.2 Comparison of Urinary Prostaglandin D2 and E2 metabolites

症状から分類した年齢群に分けて尿中 PGDM 濃度と尿中 PGEM 濃度の関係と検討したところ、いずれの年齢群においても相関が認められた。

年齢別に検討したところ、尿中 PGDM 濃度は症状との相関が認められたが、尿中 PGEM 濃度に相関が認められなかった。

D. 考察

DMD 患者では、筋繊維の壊死に伴って PGD_2 を介した炎症が起こり、PGDM の数値も上昇すると考えられる。これまで行ってきた DMD 患者および健常者中の尿中 PGDM 濃度測定の結果から、 PGD_2 の代謝産物である尿中 PGDM 濃度は DMD

の病状診断に有効であると判断された。

また、 PGE_2 の代謝産物である PGEM 濃度は結果からは、必ずしも DMD の診断に有効であるとは言えず、今後も検討していく必要があると考えられた。

E. 結論

尿中 PGDM は DMD の病状診断に有効であるが、 PGE_2 の代謝産物である PGEM 濃度は結果からは、必ずしも DMD の診断に有効であるとは言えない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) 竹内 敦子

「疾患の診断・治療をめざす質量分析の応用研究」第 67 回日本臨床化学会近畿支部例会 (2014.6.14 神戸)

2) 藤井 菜摘, 竹内 敦子, 裏出 良博, 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代謝物 (tetranor-PGDM および tetranor-PGEM) の定量」日本薬学会第 135 年会 (2015.3.26 神戸)

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト

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
裏出良博	筋ジストロフィー患者の尿中プロスタグランジン代謝物の定量	松嶋正明、伊中浩治	進化をとげる構造生物学	株式会社化学同人	東京	2014	169-180

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
Trimarco A, Forese MG, Alfieri V, Lucente A, Brambilla P, Dina G, Pieragostino D, Sacchetta P, <u>Urade Y</u> , Boizet-Bonhoure B, Martinelli Boneschi F, Quattrini A, Taveggia C	Prostaglandin D2 synthase/GPR44: a signaling axis in PNS myelination	Nat Neurosci	17(12)	1682-92	2014
Asai.T., Ojima.I., Minami.S., Takeshima.Y., <u>Matsuo.M.</u>	Gait training for becker's muscular dystrophy using robot suit hybrid assistive limb	Physical Medicine and Rehabilitation-International	1	1-3	2014
Izumi Y, Aritake K, <u>Urade Y</u> , Fukusaki	Practical evaluation of liquid chromatography/tandem mass spectrometry and enzyme immunoassay method for the accurate quantitative analysis of prostaglandins	J Biosci Bioeng	118(1)	116-8	2014

学会発表

発表者氏名	演題名	学会名	年度
藤井 菜摘, 竹内 敦子, 裏出 良博, 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代謝物 (tetranor-PGDM および tetranor-PGEM) の定量	日本薬学会第 135 年会、神戸	2015 年 3 月
裏出 良博	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マーカー物質の測定法	障害者対策事業成果発表、東京	2015年2月
裏出 良博	筋ジストロフィー病態の進行軽減療法開発	筋ジストロフィー合同班会議、東京	2015年1月
Iwata, Y, Komamura, K	Transient Receptor Potential Vanilloid 2 Antagonist, Ameliorates End-Stage Heart Failure of Mice With Dilated Cardiomyopathy.	AHA Scientific Sessions 2014, USA	2014年11月
Tanaka K, Aritake K, Tayama M, Sasaki E, Utsugi T, A Sasaki T, URADE Y	Novel inhibitor of hematopoietic prostaglandin D synthase improves the muscle disorder in an experimental model of Duchenne muscular dystrophy	International Congress of the world muscle Society (WMS2014), Germany	2014年10月
Tanaka K, Aritake K, Tayama M, Shigeno K, Hayashi Y, Sasaki E, Utsugi T, Sasaki T, Urade Y	Inhibition of hematopoietic prostaglandin D synthase improves symptoms of muscular dystrophy in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy	NEUROSCIENCE 2014, USA	2014年10月
岩田裕子、大武仁美	TRPV2阻害剤によりマウス重症心筋症の進行が抑制される。	第86回日本生化学会大会、京都	2014年10月
駒村和雄、岩田裕子	拡張型心筋症の新規治療薬の開発：伸展感受性Ca透過型陽イオンチャネルTRPV2の阻害薬の可能性	第62回日本心臓病学会学術集会、仙台	2014年9月
Masafumi Matsuo	Mutations in the dystrophin gene	日本・ベトナム Duchenne 型筋ジストロフィーに関する共同研究会議	2014.8 月
竹内敦子	疾患の診断・治療をめざす質量分析の応用研究	第67回日本臨床化学会近畿支部例会、神戸	2014年6月
鎌内慎也、岩田裕子、Cheng-Kun Du, Dong-Yun Zhan, 森本幸生、白井幹康、若林繁夫	TRPV2 N末ドメインの高発現は、トロポニンT変異を持つ拡張型心筋症モデルマウスの症状を改善する	第87回日本薬理学会年会、仙台	2014年3月
岩田裕子、大武仁美、鎌内慎也、若林繁夫	Ca ²⁺ 透過チャネルTRPV2の細胞膜局在の阻害により拡張型心筋症モデル動物の病態進行が抑制された。	第87回日本薬理学会年会、仙台	2014年3月