

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IPGD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-PGDM）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り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 患者の筋萎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 Limpet 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。その脾臓細胞と骨髓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选择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, Ura

de 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