

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-PGD₂ 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。

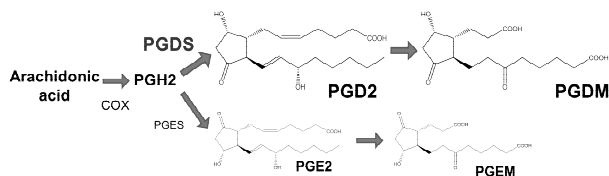


Fig.1 Synthesis and Metabolism of Prostaglandin D₂ and E₂

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

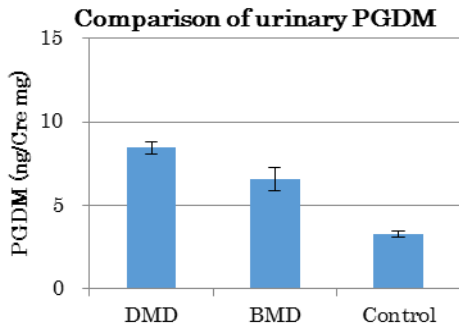
B:0-2min 10%,24min 30%, 24min 70%, 28min 100%

流速:250μl/min

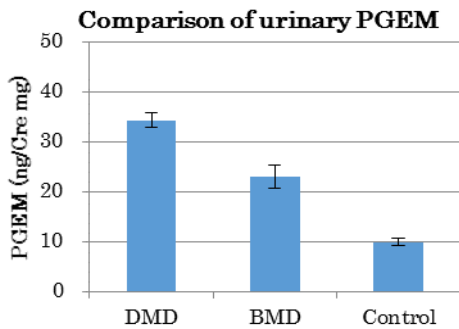
C . 研究結果

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 患者と健常者で比較したとき 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。



DMD vs BMD: $p < 0.05$
DMD vs Control, BMD vs Control: $p < 0.001$



DMD vs BMD: $p < 0.005$
DMD vs Control, BMD vs Control: $p < 0.001$

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 PGD₂ し

を介した炎症が起こり、PGDM の数値も上昇すると思われる。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、PGD₂ 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、PGE₂ 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、PGE₂ 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