

厚生労働科学研究費補助金（障害者対策総合研究事業）
総合研究報告書

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)₂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んだ。

*mdx*マウスにH-PGDS阻害薬（TFC-007、TAS-205）を生後5週齢から9週齢まで4週間投与すると、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。一方、筋繊維の断裂に伴う逸脱酵素であるCPKの血中濃度に変化は無かった。従って、尿中PGDM-tは、逸脱酵素であるCPKとは異なる、DMDの病態進行の新たな指標として使用でき、H-PGDS阻害薬がDMDの病態進行の抑制と運動機能の保持に有効であることが明らかとなった。

δ-sarcoglycan欠損の拡張型心筋症モデルハムスターやマウスの心筋変性においても尿中PGDM-tの増加が確認され、拡張型心筋症モデルハムスターやT3ホルモン投与*mdx*マウスへの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DMD患者の心機能の保護にも有効だと考えられる。

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ので、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。さらに、PGE₂の尿中代謝物であるPGEM-t量は、尿中PGDM-t量の2倍以上も含まれ、

PGE₂の全身での産生が亢進していることも明らかになった。そこで、DMD患者を対象として、

PGD₂とPGE₂の産生を同時に阻害できる抗炎症剤アスピリンを用いた臨床研究を開始した。その結果、アスピリン投薬中の尿中のPGDM-t量とPGEM-t量の抑制が確認され、血小板凝集抑制作用や運動量の変化との相関性の可能性の検証を進めている。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、尿中PGEM-t量は、リハビリテーション前後で統計学的に有意な増加は観察されなかった。従って、尿中PGDM-t量はリハビリテーションに伴う筋肉炎症の有効な指標であると考えられる。

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、既存のポリクローナル抗体と同様の感度と特異性を持つことが確認できた。今後、DMD患者の尿中PGDM-t量測定に利用できる尿検査紙などの簡易測定法の開発に向けた改良を進める予定である。

本研究と並行して進められてきたヒトH-PGDS阻害剤TAS-205を用いたDMD患者に対する安全性試験が昨年9月に国立精神・神経医療研究センターで開始された。この臨床試験においても、TAS-205の有効性の確認のため、尿中PGDM-tの測定が行なわれている。本治験研究は現在まで何ら有害事象の報告は無く、本年5月末の終了を予定して順調に進行中である。

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を、組織切片での抗 IgG 染色により組織化学的に検出、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マウス、*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 0.4 ml 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 やその他の PGs 代謝物を抽出し、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、比色定量により定量したクレアチニン値を用いて代謝物濃度を補正した。

(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管型 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 クローンの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 と尿中に排泄される PGE₂ 代謝物である 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(図 1)。

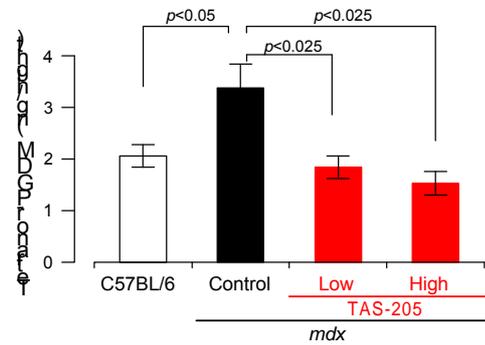
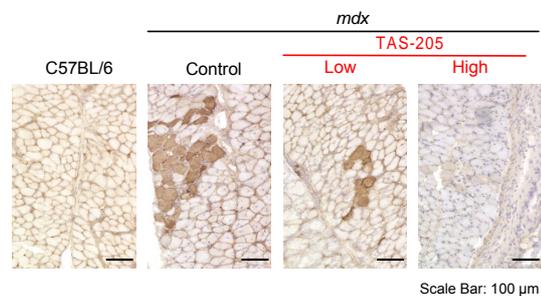


図1 H-PGDS 阻害薬の尿中 PGD₂ 代謝物に及ぼす効果

(a)



(b)

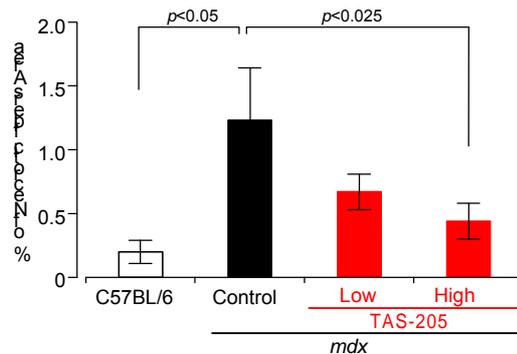


図2 H-PGDS 阻害薬による *mdx* マウスの筋壊死軽減

(a) 抗 IgG 抗体染色による壊死領域の可視化
(b) HPGDS 阻害薬による用量依存的な壊死の縮小。

一方、横隔膜の壊死筋繊維の容積は、普通試料を与えた *mdx* マウスに比べて有意に減少し、夜間 12 時間の行動量が用量依存的に増加した(図 2, 3)。一方、逸脱酵素であり、筋炎症の生化学マーカーとされた血中 CPK の値は、TAS-205

の投与で変化しなかった(図4)。

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。

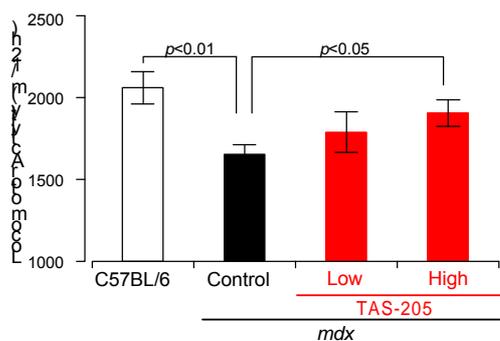


図3 H-PGDS阻害薬によるmdxマウスの自発運動量の改善

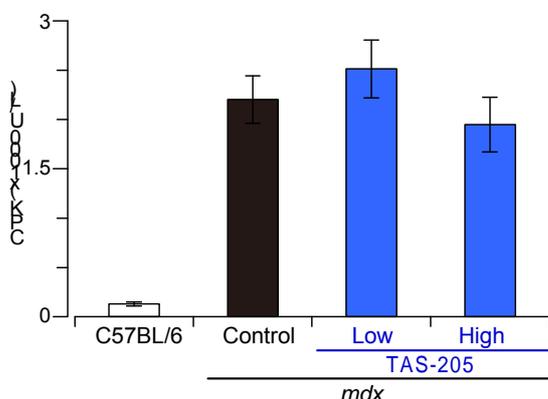


図4 H-PGDS阻害薬の尿中PGD₂代謝物および血中CPKに及ぼす効果

(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マウス、及び、T3投与mdx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、拡張型心筋症モデルハムスターとマウスでは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(図5)。

これら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。

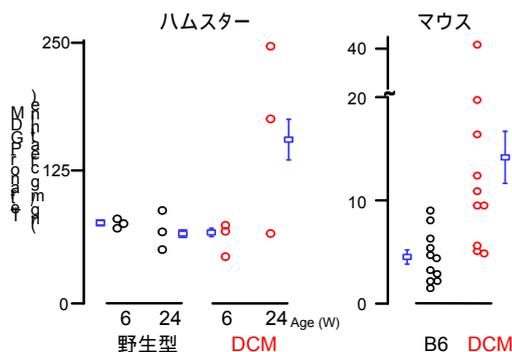


図5 拡張型心筋症(DCM)モデル動物でのPGD₂代謝物の変動

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(図6)。

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(図7)。

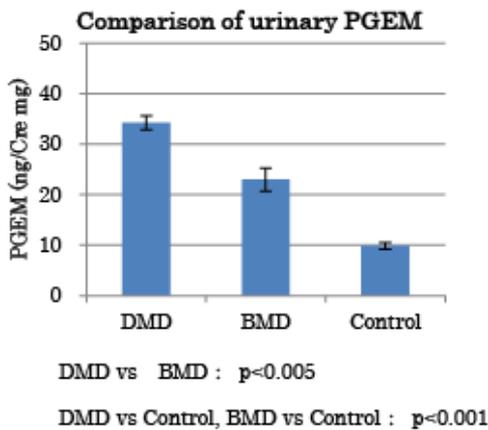
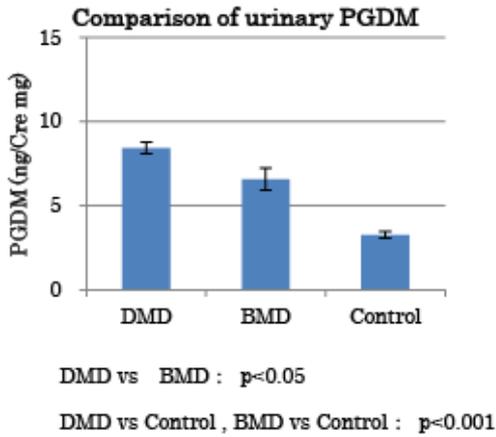


図6 健常男子、DMD患者およびBMD患者の尿中PGD₂、PGE₂代謝物の比較

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。

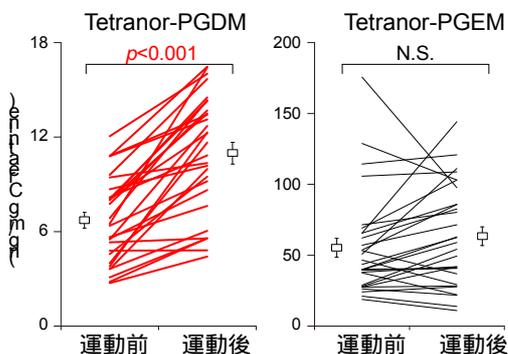


図7 BMD患者の運動前後の尿中PGD₂、PGE₂代謝物の比較

(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、何ら有蓋事象の報告は無く、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は米国Cayman社から供与された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ので、これらの抗体を利用したELISAや尿検査紙を作製することで、尿中PGD₂代謝物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

別紙

H.知的財産権の出願・登録状況

別添