

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）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或いは遺伝子治療の効果の検証や筋力低下の防止を目的としたリハビリテーションを目的とした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)₂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、DMD病態が急激に進行する小学校低学年で尿中PGD₂代謝物が急激に上昇し、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、病態と尿中PGD₂代謝物量に良好な相関が認められた。DMDの傷害筋或いはその周囲で発現が亢進し、PGD₂の産生を触媒する造血器型PGD合成酵素阻害薬をDMDモデルマウス(*mdx*)に投与すると、用量依存的に病態の軽減され、この時尿中PGD₂代謝物も用量依存的に抑制されたが、血中CPKには影響しなかった。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し、他のPG代謝物に比べて高い選択性を示す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)₂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)。本申請では、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ユアル化と、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。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) 造血管型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)を高速度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。

ヒトDMDと同様にジストロフィン遺伝子に異常を示し、モデル動物のmdxマウス (C57BL/6背景) に選択的かつ経口投与で有効な造血管型PGD合成酵素 (H-PGDS) 阻害薬 (TAS-205) の投与と実験を行った。生後4週齢から1か月間、混餌 (0.01% および0.1% w/wの2用量およびControl) にて H-PGDS 阻害薬を投与し、DMD病態および尿中 PGD₂ 代謝物に対する影響を調べた。

2) 尿中 PGD₂ 代謝物簡易測定法の開発

尿中 PGD₂ 代謝物 (Tetranor-PGDM) の簡易測定法の確立を目的とした酵素免疫測定法 (enzyme immunoassay, EIA法) の 開発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。

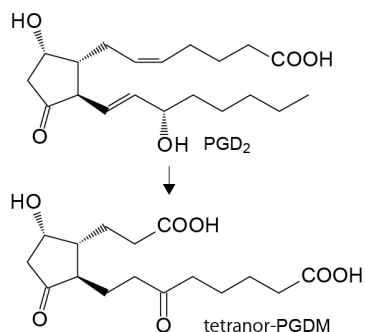


図1 PGD₂ および尿中に排泄される代謝物 tetranor-PGDM

低分子化合物の tetranor-PGDM (C₁₆H₂₄O₇, 分子量 328、図 1) に対する特異的抗体を作製するために、Keyhole Limpet hemocyanin (KLH) をキャリアタンパク質とした複合体 (KLH-tetranor-PGDM) を抗原として用いた。これを 2 種類の PGD 合成酵素 (造血管型 PGD 合成酵素およびリポカリン型 PGD 合成酵素) 遺伝子を欠損させた雌性マウス (Balb/c 背景) に免疫した。

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、得られたハイブリドーマの特異性は、抗原である tetranor-PGDM と尿中に排泄される各種プロスタグランジンの代謝物である PGE₂ 代謝物 (tetranor-PGEM)、PGF_{2α} 代謝物 (tetranor-PGFM) およびトロンボキサン (TX) A₂ 代謝物 (2,3-dinor-TXB₂) を比較対照として用いてスクリーニングを行った。続いて、ヒト尿を用いて EIA 法を LC-MS/MS 法による tetranor-PGDM 測定を行い、相関性を比較した。

(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。

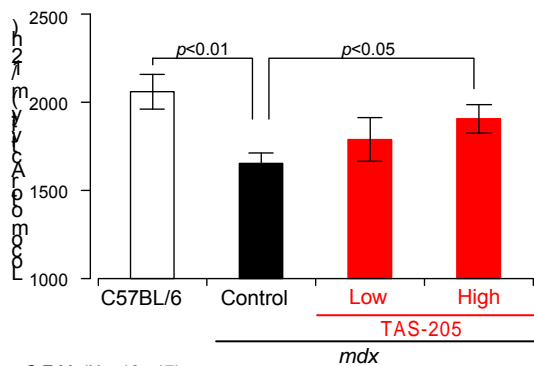
動物実験および遺伝子組み換え実験については、全て筑波大学の動物実験委員会、組換え DNA 実験安全委員会の審査を受けている。

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 tetranor-PGDM の絶対量は低値を示すが、多くの患者でリハビリテーションの運動負荷により統計的に有意に増加した。一方、尿中PGE₂代謝物 (tetranor-PGEM) はリハビリテーション前後でほとんど変動しなかった。

選択的H-PGDS阻害薬 (TAS-205) を1か月間

混餌にて投与し、マウスの自発運動量に及ぼ

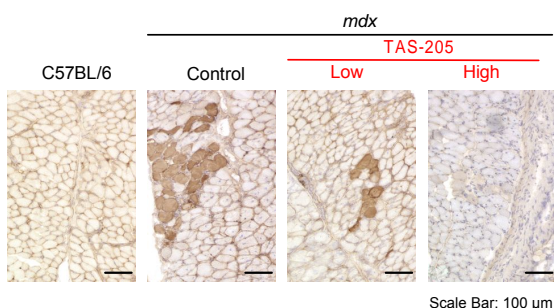


Mean ± S.E.M. (N = 16 - 17)

図2 H-PGDS 阻害薬による *mdx* マウスの自発運動量の改善

す効果をC57BL/6 マウスと比較した。阻害薬を与えなかった*mdx*マウスは、健常C57BL/6マウスに比べて有意に自発運動量が減少した。

(a)



(b)

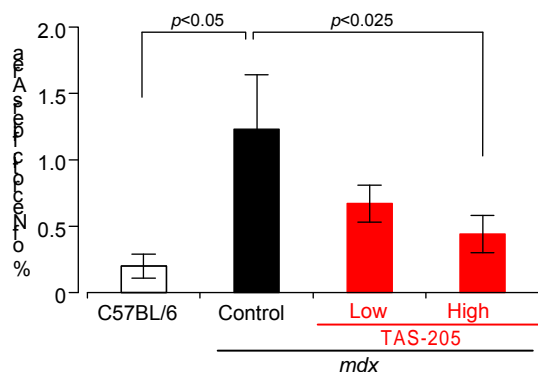


図3 H-PGDS 阻害薬による *mdx* マウスの筋壊死軽減

- (a) 抗 IgG 抗体染色による壊死領域の可視化
- (b) HPGDS 阻害薬は、用量依存的に壊死を小さくさせた。

*mdx*マウスにH-PGDS特異的阻害薬の TAS-205 を投与すると、用量依存的に自発運動量

が回復し、高用量 (0.1% w/w) を1か月間与えた *mdx*マウスの行動量は、健常C57BL/6と同等までに回復した (図2)。

続いて、組織学的検索を行ったところ、健常C57BL/6 マウスの骨格筋 (横隔膜) ではDMDに特有の集団的な筋壊死 (grouped necrosis) 領域がほとんど検出されなかったが (2±1%、平均値±標準誤差、図3)、阻害薬を与えなかった*mdx*マウスでは、grouped necrosisの領域が有意に増加していた (12±4%、平均値±標準誤差)。H-PGDS阻害薬を投与すると、用量依存的に集団的筋壊死領域が縮小された (6.6±1.4%、4.5±1%)。

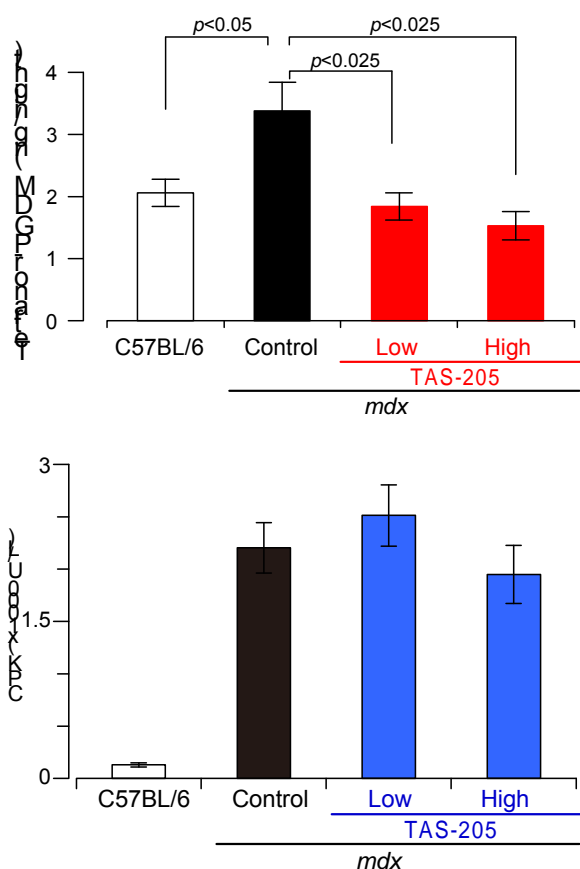


図4 H-PGDS 阻害薬の尿中 PGD₂ 代謝物および血中 CPK に及ぼす効果

尿中PGD₂ 代謝物 (tetranor-PGDM) 量を定量したところ、健常C57BL/6 マウスに比べて、*mdx* マウスでは有意に尿中tetranor-PGDM量が増加した。H-PGDS阻害薬を投与すると、用量依存的に尿中tetranor-PGDMが抑制された (図4)。

一方、血中CPKを調べたところ、健常マウスに比べて*mdx*マウスでは有意に高値を示したが、H-PGDS阻害薬の投与はCPKに影響しなかった。

以上の結果から、H-PGDS阻害薬をmdxに4週齢から1か月間、混餌での連続投与は、DMD病態を軽減し、尿中tetranor-PGDM量を抑制すること、血中CPKは病態と相関しないことが判明した。

PGD 合成酵素を欠損するマウス (Balb/c系統) に Keyhole Lymphet 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、その交差性はどれも 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。

造血器型PGD合成酵素阻害薬のmdxマウスへ

の投与は病態を軽減し、この時、尿中PGD₂代謝物 (tetranor-PGDM) も抑制されていたが、血中CPKには影響しなかった。従って、tetranor-PGDSは薬効の指標としても有効であるが、CPKはDMD病態の薬理学的効果の指標とならないことが示された。

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。

. 研究発表

1 論文発表

別紙

2. 学会発表

別紙

G. 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