

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尿中プロスタグランジン D₂ 代謝物の定量分析

研究分担者 竹内 敦子 神戸薬科大学 准教授

【研究要旨】

Duchenne 型筋ジストロフィー（Duchenne muscular dystrophy :DMD）は進行性の筋萎縮を呈し、患者はほぼ 20 歳代に死亡する極めて重篤な遺伝性疾患である。本疾患は、原因遺伝子であるジストロフィン遺伝子の変異により、筋の細胞膜形成に關与するジストロフィンタンパク質が欠損し、筋細胞が壊れるため発症する。近年、DMD 患者の壊れかけた筋肉では炎症やアレルギーなどに関与するプロスタグランジン D₂（PGD₂）合成酵素の発現が亢進していることが明らかとなった。そこで、PGD₂ の尿中代謝物である tetranor-PGDM（PGDM）の濃度を DMD 患者および健常者について、API3000 LC/MS/MS system を用いる測定法を確立した。

DMD 患者、BMD 患者および健常者について尿中 PGDM 濃度を測定したところ、DMD の病状診断に有効であると考えられた。そこで、他の筋疾患患者の尿中 PGDM を測定したところ、疾患により差が認められた。次に、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ため、DMD 患者の尿中 PGDM と PGEM を測定し、DMD の診断に有効であるかを考察した。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た。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る。

A．研究目的

Duchenne 型筋ジストロフィー (Duchenne muscular dystrophy : DMD)は進行性の筋萎縮を呈し、極めて重篤な遺伝性疾患である。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、筋の細胞膜形成に關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（図 1）。

DMD 患者は 4～5 歳時に筋力低下を認め、年齢と共に筋萎縮が進行し、10～12 歳時には歩行能を失う。そして心筋あるいは呼吸筋の障害が出現し、心不全あるいは呼吸不全により、多くは 20 歳代で死に至る。

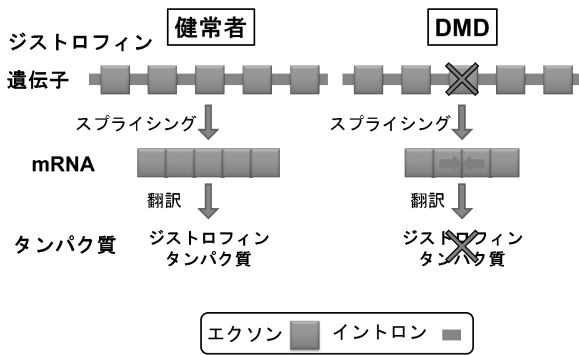


図1 ジストロフィンタンパク質の合成過程

近年、DMD 患者の壊れかけた筋肉では、炎症やアレルギーなどに関するプロスタグランジン D₂ 合成酵素 (PGD₂ synthase : PGDS) の発現が亢進していることが明らかとなった。したがって、DMD の病状診断に PGD₂ の尿中代謝物である tetranor-PGDM (PGDM) 濃度の定量が有効であるとの考えに至った。

図2にPGD₂およびPGE₂の生合成・代謝経路を示す。

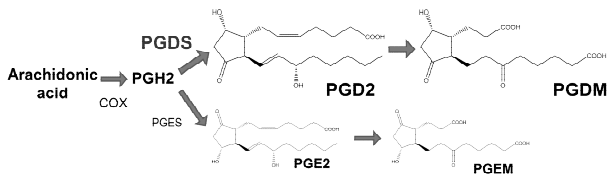


図2 PGD₂およびPGE₂の生合成・代謝経路

現在のところPGDMの測定には、液体クロマトグラフィーと接続した liquid chromatography(LC)-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) 法が最も適している。MS (mass spectrometry) は、まず化合物を適切な方法でイオン化し、生成したイオンを m/z で分離して、各々の m/z のイオン量を測定することで定性・定量分析を行う分析法である。本法は感度がよいことから、ng あるいはそれ以下程度の極微量試料に対して大いに威力を発揮する。本実験では、数ある質量分析法のイオン化、質量分析部の中から、イオン化法としてエレクトロスプレーイオン化 (electrospray ionization : ESI) を、質量分析部として四重極質量分析を用いた。ESI は、イオンを溶液から気相へ移すソフトなイオン化法であり、比較的大きな分子量をもち、PGDM のイオン化には適している。tandem mass spectrometry (MS/MS) は、第1段階 (MS1) において質量選択されたプリカーサーイオンが、活性化された中性種との衝突により衝突誘起解離 (CID) を起こし、生じたプロダクトイオンが第2段階 (MS2) で選択されることで観測する手法である。この測定モードが selected reaction monitoring (SRM) であり、LC-MS/MS は2段階のMS分析すなわちSRMを行うことで、高感度が

つ高い選択性で化合物の測定を行うことが可能となる。

また、PGDM は negative ion モードでのイオン化効率が高い。したがってPGDM (MW: 328) は、MS1 でプリカーサーイオン $[M-H]^-$ の m/z 327.1、MS2 でプロダクトイオンの m/z 143.1 によって定量することにした。内標準として、PGDM-d6 を用いたので、プリカーサーイオン $[M-H]^-$ は m/z 333.2、MS2 でプロダクトイオンは m/z 149.2 となる (図3)。

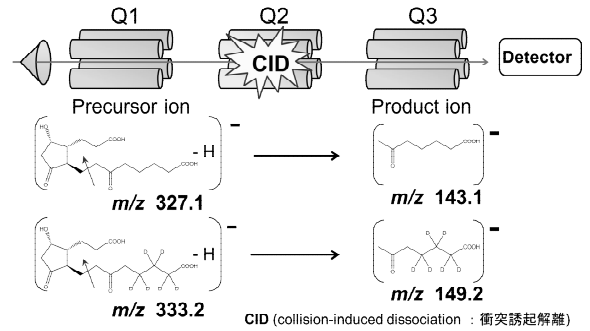


図3 PGDM の Selected reaction monitoring (SRM)法

24~25 年度は、本法を用いて DMD 患者および健常者について尿中 PGDM 濃度を測定し、DMD の病状診断に有効であるかどうかを検討した。

DMD は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の病態進行にPGD₂を介した炎症が関係していることが明らかになり、26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した。そこで DMD 患者の尿中の PGDM と PGEM を測定し、DMD の診断に有効であるかを検討した。

B. 研究方法

[24 年度]

1) 対象

4~23 歳の DMD 患者 46 名および健常者 35 名を対象とした。

2) 測定用試料の調製

DMD 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) を加えて混和したのち、1N HCl で pH3 程度に調整した。あらかじめエタノールと純水で洗浄した固相抽出カラム Sep-Pak Vac に全量をアプライした。5% アセトニトリル 6ml に続いてヘキサン 6ml で洗浄したのち、酢酸エチル 3ml で溶出した。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 100 μ l 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。

図4にPGDM測定用試料の定量法のフローチャートを示す。

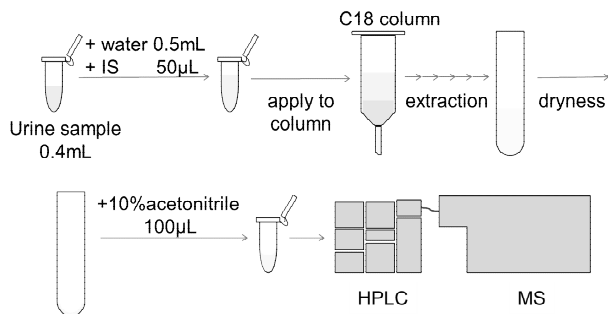


図4 PGDM測定用試料の定量法のフローチャート

3) LC-MS/MSによる測定

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。

図5にLC-MS/MS測定に用いたHPLC並びにMS条件を示す。

また、比色定量により尿中クレアチニンを定量し、その定量値を補正に用いた。

HPLC	Shimadzu LC-10ADvp [SHIMADZU CORPORATION]
Column	Inertsil ODS-3 (5µm, 2.1mm I.D. × 150mm)
Mobile phase	A:0.01% acetic acid, B:acetonitrile
Gradient (B.conc)	0-2min 10%, 24min 30%, 27min 70%, 28min 100%, 31min 100%
Flow rate	0.25mL/min
MS	API3000 LC/MS/MS System [Applied Biosystems]
Ionization	Electrospray ionization (ESI)
Polarity	Negative ion mode
Duration	40min
Injection volume	20µL

図5 LC-MS/MS条件

[25年度]

1) 対象

2～55歳の患者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。

各種筋疾患患者の内訳は、DMD、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である。

また、尿中PGDM濃度の日内変動を調べたところ、概して早朝に低く、日中に高い傾向が見られたことから、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)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。

[26年度]

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
[24 年度]

LC-MS/MS で高い選択性を有するプリカーサーおよびプロダクトイオンを用いることにより、PGDM は単一のピークとして認められ、微量定量が可能であった(図6)。

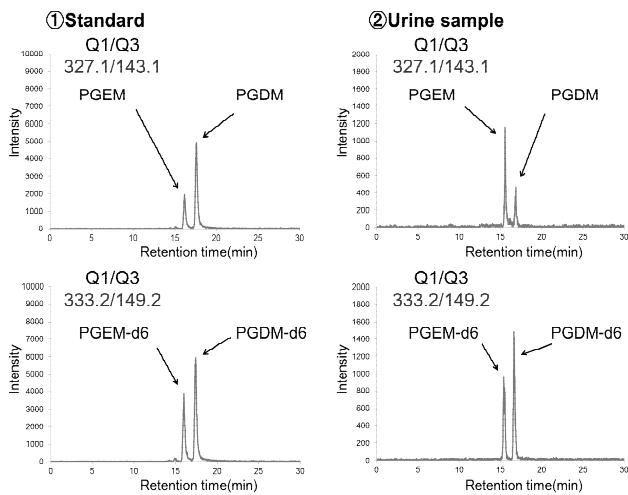


図6 LC-MS/MS クロマトグラム

検量線も良好な直線性を示し、信頼性の高い定量ができたと判断した(図7)。

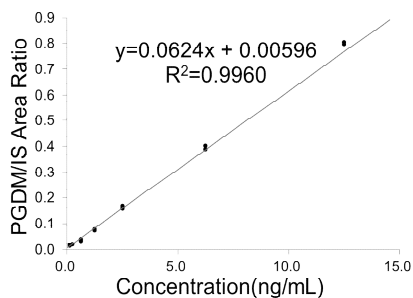


図7 検量線

尿中 PGDM 濃度の日内変動を調べたところ、概して早朝に低く、日中に高い傾向が見られた(図8)。この結果から、早朝尿を測定対象とすることにした。

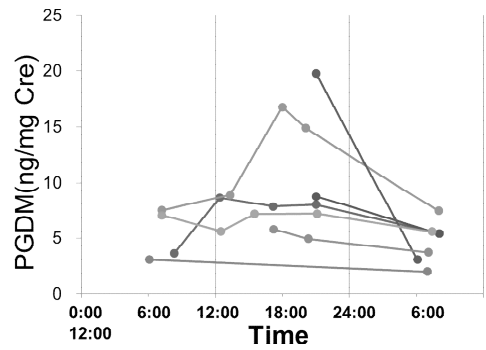


図8 尿中 PGDM 濃度の日内変動

クレアチニン濃度で補正した尿中 PGDM 濃度を DMD 患者と健常者と比較したところ、DMD 患者の方が高かった(図9)。

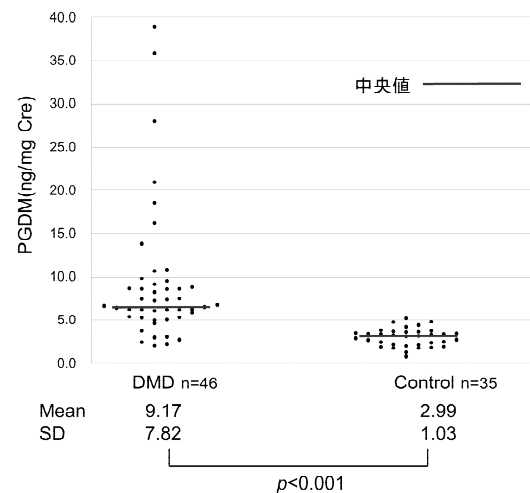


図9 健常群、DMD 群の尿中 PGDM 濃度の分布

[25 年度]

2 ~ 55 歳の患者から採取した早朝一番尿 1,003 検体中の PGDM を測定したところ、健常者の尿に比べ、高かった。

各種筋疾患患者のうち、DMD と BMD を比較したところ、尿中 PGDM は DMD の方が有意に高かった。

DMD、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他の筋疾患の尿中 PGDM を測定したところ、疾患により差が認められた。著しく高値を示す疾患があったが、検体数が少ないため今後の課題とし、検体数を増やして検討する必要がある。

[26 年度]

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。

図 10 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。

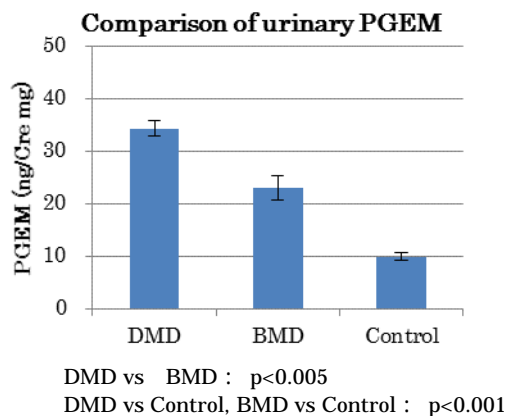
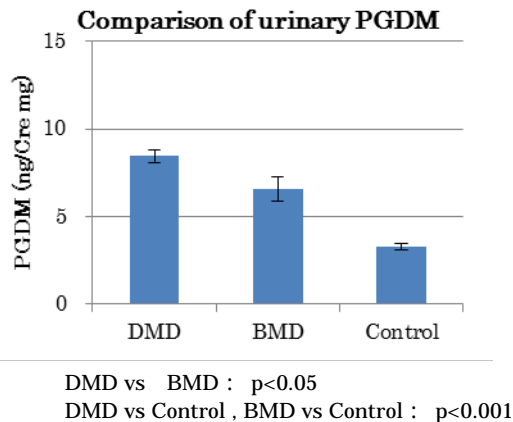


図 10 健常群、DMD 群、BMD 群の尿中 PGDM および PGEM 濃度の比較

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。

D. 考察

MS/MS による最適なプロダクトイオン、プリカーサーイオンを用いて SRM 法を行った結果、高い選択性により、PGDM は単一のピークとして認められた。また、IS とのピーク面積比を用いて算出した定量値も、検量線が良好な直線性を示したことから、信頼性の高い微量定量ができたと考えられた。

クレアチニン補正を行って算出した尿中 PGDM 濃度において、DMD 患者と健常者と比較したところ、DMD 患者の方が有意に高値であった。

PGDM 濃度は、早朝尿で評価すると随時尿よりも安定した結果が得られると考えられた。

DMD 患者および健常者について測定したところ、DMD の病状診断に有効である可能性が示唆された。また、他の筋疾患患者の尿中 PGDM を測定したところ、疾患により差が認められた。以上の結果より、治療効果の判定に応用可能であると考えられた。

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、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、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。

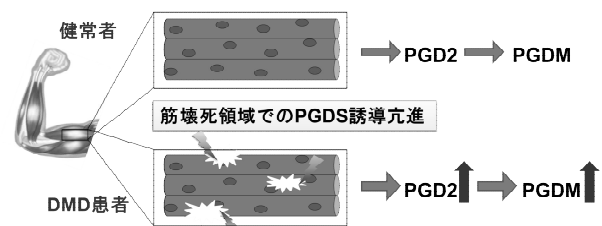


図 11 健常群、DMD 群における PGDM 生成

E. 結論

API3000 LC/MS/MS system を用いる PGD₂ の代謝物である尿中 PGDM 濃度の測定法を確立した。

尿中 PGDM 濃度は、健常者 < BMD 患者 < DMD 患者の順に高かったことから、DMD の病状診断に有効であることが明らかとなった。

尿中 PGDM は DMD 濃度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、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

Nakagawa T, Takeuchi A, Kakiuchi R, Lee T, Yagi M, Awano H, Iijima K, Takeshima Y, Urad e Y, Matsuo M.

“A prostaglandin D₂ metabolite is elevated in the urine of Duchenne muscular dystrophy patients and increases further from 8years old.”
Clin. Chim. Acta. **2013** 423(23) 10-14.

2. 学会発表

1) 垣内 涼平, 成田 哲也, 竹内 敦子, 裏出 良博, 鎌内 慎也, 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D₂代謝物の定量」

日本薬学会第132年会 (2012.03.30 札幌).

2) Taku Nakagawa, Atsuko Takeuchi, Ryohei

Kakiuchi, Tomoko Lee, Mariko Yagi, Hiroyuki Awano, Kazumoto Iijima, Yasuhiro Takeshima, Yoshihiro Urade, Masafumi Matsuo

“A prostaglandin D₂ metabolite is elevated in the urine samples of patients with Duchenne muscular dystrophy”

18th International WMS Congress (2013. 10.1-5 Asilomar, California, USA)

3) 松尾 雅文, 裏出 良博, 竹内 敦子
「デュシェンヌ型筋ジストロフィーの尿中プロスタグランジン代謝産物解析」
第40回BMSコンファレンス (2013.7.9 宮崎)

4) 竹内 敦子, 裏出 良博, 松尾 雅文
「LC-MS/MSによるDuchenne型筋ジストロフィー患者の尿中プロスタグランジンD₂代謝物の定量」
第40回BMSコンファレンス (2013.7.9 宮崎)

5) 柳下 沙絢, 竹内 敦子, 中川 卓, 竹島 泰弘, 裏出 良博, 松尾 雅文
「デュシェンヌ型筋ジストロフィー患者尿中プロスタグランジンD₂代謝物濃度」
第61回質量分析総合討論会 (2013.9.10 つくば)

5) Atsuko Takeuchi
“LC-MS/MS quantification of a prostaglandin D₂ metabolite in the urine of Duchenne muscular dystrophy patients”
Japan-Vietnam joint research meeting on Duchenne muscular dystrophy(2014.2.26 Hanoi, Vietnam)

6) 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)

7) 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
特になし