

**厚生労働科学研究費補助金**

**障害者対策総合研究事業**

**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**

**平成25年度 総括研究報告書**

**研究代表者 裏出 良博**

**平成26(2014)年5月**

# 目 次

． 総合研究報告		
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		
裏出 良博	-----	1
． 分担研究報告		
1． 筋ジストロフィーの病態進行の生化学マーカーとなる尿中プロスタグラン ジン D <sub>2</sub> 代謝物の簡易測定法の開発研究		
裏出 良博	-----	11
2． 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方法に関する研究		
松尾 雅文	-----	17
3． 筋ジストロフィー患者の尿中プロスタグランジン D <sub>2</sub> 代謝物の定量分析		
竹内 敦子	-----	19
4． 動物モデルを用いた筋壊死と尿中代謝物の相関の実証 (心筋症モデルでの心筋壊死と薬物投与効果および尿中代謝物の関係)		
岩田 裕子	-----	23
III． 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	27
IV． 研究成果の刊行物・別刷	-----	32

厚生労働科学研究費補助金（障害者対策総合研究事業）  
総括研究報告書

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（公財）大阪バイオサイエンス研究所  
分子行動生物学部門 研究部長

【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) $D_2$ 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PGD $_2$ 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む。

*mdx*マウスにH-PGDS阻害薬を1月間、混餌投与すると、筋壊死体積と尿中PGDM-tが共に用量依存的に低下したので、尿中PGDM-tがDMDの病態進行の新たな指標として使用できることを確認した。 $\delta$ -sarcoglycan欠損の拡張型心筋症モデルハムスターにH-PGDS阻害薬を3週間、皮下投与した場合も、尿中PGDM-tの抑制と心機能の回復を確認したので、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る。2～55歳のDMD、ベッカー型筋ジストロフィー（BMD）、 $\alpha$ -サルコグリカンノパチー、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、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。これらの疾患ではPGD $_2$ を介した筋肉炎症が進行していると考えられるので、DMD患者を対象として抗炎症剤アスピリンを用いた臨床研究を開始した。PGDM-tに対するモノクローナル抗体を利用したELISA系を構築し、*mdx*マウスやDMD患者の尿中PGDM-t量測定に利用できることを確認した。さらに、尿検査紙による簡易測定法の開発に向けた改良を進めている。

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

竹内敦子 神戸薬科大学 薬学部  
准教授

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

## 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PGD<sub>2</sub>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PGD<sub>2</sub>代謝物の測定技術を開発する。

## B . 研究方法

### ( 1 ) *mdx* マウスでの運動負荷による筋壊死体積と尿中 PGD<sub>2</sub> 代謝物の変動の測定

*mdx* マウス (9-10 週齢) を実験動物用強制運動測定器 (トレッドミル) を用いて、7-8 m/min の速度で 1 時間、運動負荷を与えた。

運動負荷前 12 時間および運動負荷後 12 時間の尿を回収し、尿中の PGD<sub>2</sub> 代謝物 (tetranor-PGDM) および PGE<sub>2</sub> 代謝物 (tetranor-PGEM) 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。

マウスの壊死筋の非侵襲的な検出と定量には、小動物用 X 線 CT 撮影装置を用いた。予め投与した非イオン性 X 線造影剤の壊死筋への漏出を指標として、運動負荷前後の壊死体積を定量した。

### ( 2 ) 心筋症モデル動物の尿中 PGD<sub>2</sub> 代謝物の測定

- sarcoglycan 欠損の拡張型心筋症モデルハムスターと同週齢の野生型動物を用いた。10 週齢の心筋症ハムスターに 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。

PGD<sub>2</sub> 産生量の変動を評価するため、代謝ケージを用いて暗期 (12 時間) に採尿し、PGD<sub>2</sub> の尿中安定代謝物 (PGDM-t) を液体クロマトグラフィー・タンデムマススペクトロメトリ を用いて測定した (LC: 資生堂、MS/MS: AB Sciex)。

### ( 3 ) DMD 患者の尿中 PGD<sub>2</sub> 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 患者で同意の得られた例から尿を収集した。尿中の PGDM 測定は後述の HPLC・MS/MS 法を用いてした。まず、日内変動を解析して、尿中 PGDM が早期第 1 尿で低値であることから、早期第 1 尿の収集をはかった。

2) 尿中 PGD<sub>2</sub> 代謝物の測定: DMD 患

者および健常者の尿 0.4ml に内標準物質 (tetranor-PGDM-d6) を加え、固相抽出カラムを用いて PGDM 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、比色定量によりクレアチニンを定量し、補正した。

#### ( 4 ) 抗 tetranor-PGDM モノクローナル抗体の作製

Tetranor-PGDM に対する特異的抗体を作製するために、PGD<sub>2</sub> 産生能を失ったりポカリン型および造血器型 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 tetranor-PGDM 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、得られたハイブリドーマの特異性は、抗原である tetranor-PGDM と tetranor-PGEM および 2,3-dinor-TXB<sub>2</sub> を比較対照として確認した。

#### ( 倫理面への配慮 )

本研究の動物実験については、公益財団法人大阪バイオサイエンス研究所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 PGD<sub>2</sub> 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、研究方法による研究対象者に対する不利益、危険性の排除や説明と同意 ( インフォームド・コンセント ) に関わる状況、

## C . 研究結果

### ( 1 ) mdx マウスでの運動負荷による筋壊死体積と尿中 PGD<sub>2</sub> 代謝物の変動

mdx マウスにトレッドミルを用いた運動負荷を行い、その前後での腓腹筋での筋壊死体積の変化を X 線 CT 造影により測定し、尿中 PGD<sub>2</sub> 代謝物の濃度変化を液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析装置 ( LC-MS/MS ) により測定した結果、運動負荷は mdx マウスの筋壊死体積を増加させ、尿中 PGD<sub>2</sub> 代謝物も増加させた。この結果は、DMD の病態進行の新たな指標として尿中 PGD<sub>2</sub> 代謝物が使用できることを示す。

### ( 2 ) 心筋症モデル動物の尿中 PGD<sub>2</sub> 代謝物の測定

拡張型心筋症モデルハムスターでは、野生型動物に比べ、心臓組織での HPGDS 蛋白質の発現量が 2 - 5 倍程度増加していた。また、両者から単離した心筋細胞の比較においても HPGDS の発現増加が示された。心臓及び心筋細胞を用いた免疫染色の結果から、H-PGDS の介在板近傍への強い集積が認められた。こ

これらの知見は、心筋症病態の進行に伴い、同週齢の野生型動物に比べ、尿中-PGDM-t量が高値を示すことと一致する。

拡張型心筋症モデルハムスターへのH-PGDS阻害薬の投与(TFC-007, 30 mg/kg/day)により、尿中PGDM-tが減少することを確認した。心臓組織の繊維化を定量したところ、溶媒投与群に比べて、H-PGDS阻害薬の投与群では、繊維化の進行に抑制傾向が観察された。小動物用超音波高解像度イメージングシステムにより、心機能を評価したところ、溶媒投与群に比べ、H-PGDS阻害薬の投与群では、左室内径短縮率(%FS)の低下に抑制傾向が見られた。

### (3) DMD患者の尿中PGD<sub>2</sub>代謝物の測定

DMD患者団体の協力を得て、4歳から15歳までの117名の患者の早朝第一尿191点と、同年齢の健常児童71名の早朝第一尿79点を収集して、彼らの尿中PGD<sub>2</sub>代謝物量と尿中クレアチニンを測定した。その結果、筋ジス患者の尿中PGD<sub>2</sub>代謝物濃度(6.90 ± 0.35 ng/mgクレアチニン)は、健常児(3.08 ± 0.15)に比べ、2.2倍も高い値を示した。さらに、その濃度は病状の安定した7歳までの患者(4.75 ± 0.32)では健常児(3.55 ± 0.30)に比べ1.3倍ほど高いだけだが、筋委縮が進み運動機能が急激に低下する8歳以上の患者(7.69 ± 0.44)では健常者(2.90 ± 0.17)の2.7倍も高い値を示し、病態の進行につれて尿中PGD<sub>2</sub>代謝物が増加することが明らかになった。

### (4) 抗 tetranor-PGDM モノクローナル

### 抗体の作製

尿中PGD<sub>2</sub>代謝物の簡易測定法を開発するために、PGDM-tetranorをKeyhole Limpet Hemocyanin 蛋白質に結合させた複合体を、PGD<sub>2</sub>産生能を失ったりポカリン型PGD合成酵素と造血器型PGD合成酵素のダブル・ノックアウトマウス(Balb/c系)に免疫して、常法による免疫動物の脾細胞を用いたモノクローナル抗体の作製を行なった。

PGE<sub>2</sub>代謝物(PGEM-tetranor)とトロンボキサンA<sub>2</sub>代謝物(2,3-dinor TXB<sub>2</sub>)を比較対照としたスクリーニングを行い、PGDM-tetranorに対して100倍以上の特異性を持つモノクローナル抗体を産生する独立したハイブリドーマを5クローン得た。

いずれの抗体も米国Cayman社から供与されたPGDM-tetranor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

mdxマウスにトレッドミルを用いた運動負荷を行うと、筋壊死体積と尿中PGD<sub>2</sub>代謝物が共に増加したため、尿中PGD<sub>2</sub>代謝物がDMDの病態進行の新たな指標として使用できると考えられる。

拡張型心筋症モデルハムスターにおいて、尿中PGDM-t量が高値を示す症例が認められた。そこで、H-PGDS阻害薬投与による薬効評価を行ったところ、心臓組織の繊維化進行、および心機能の低下を軽減させる傾向が示された。したがって、H-PGDSにより産生されたPGD<sub>2</sub>がハムスターの拡張型心筋症病態の進行に重要な役割を持つ可能性が示された。

拡張型心筋症のモデルマウスでも、尿

中PGDM-t量が高値を示すことから、今後これらの動物モデルを用いて、心筋組織におけるPGD<sub>2</sub>産生と病態進行の関連性を明らかにする必要がある。

拡張型心筋症は発症機序が不明であり予後も不良であることから、新たな治療法の確立が求められている。H-PGDS阻害薬の投与実験を行うことで、新規治療法開発の可能性を検証できる。また、治療対象の決定や薬剤効果を評価できるマーカーが必要であるが、尿中の安定代謝物であるPGDM-tがその候補として期待される。

DMD患者の尿中PGD<sub>2</sub>代謝物量は健常児童に比べて2.2倍も高く、病態の進行につれて上昇することが証明されたので、DMDの病態進行の新たな指標として尿中PGD<sub>2</sub>代謝物量が使用できると考えられる。

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PGD<sub>2</sub>代謝物の簡易測定法が開発できる。

## E . 結論

尿中PGD<sub>2</sub>代謝物はDMDの病態進行の新たな指標として使用できる。

F . 健康危険情報  
なし

## G . 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Sarashina, H., Tsubosaka, Y., Omori, K., Aritake, K., Nakagawa,

T., Hori, M., Hirai, H., Nakamura, M., Narumiya, S., Urade, Y., Ozaki, H., Murata, T., Opposing immunomodulatory roles of prostaglandin D2 during the progression of skin inflammation. **J Immunol** 2014, 192 (1), 459-65.

- 2) Murata, T., Aritake, K., Tsubosaka, Y., Maruyama, T., Nakagawa, T., Hori, M., Hirai, H., Nakamura, M., Narumiya, S., Urade, Y., Ozaki, H., Anti-inflammatory role of PGD<sub>2</sub> in acute lung inflammation and therapeutic application of its signal enhancement. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2013, 110 (13), 5205-10.

- 3) Nakagawa, T., Takeuchi, A., Kakiuchi, R., Lee, T., Yagi, M., Awano, H., Iijima, K., Takeshima, Y., Urade, Y., Matsuo, M., A prostaglandin D2 metabolite is elevated in the urine of Duchenne muscular dystrophy patients and increases further from 8 years old. **Clin Chim Acta** 2013, 423, 10-4.

- 4) Taketomi, Y., Ueno, N., Kojima, T., Sato, H., Murase, R., Yamamoto, K., Tanaka, S., Sakanaka, M., Nakamura, M., Nishito, Y., Kawana, M., Kambe, N., Ikeda, K., Taguchi, R., Nakamizo, S., Kabashima, K., Gelb, M. H., Arita, M., Yokomizo, T., Watanabe, K., Hirai, H., Okayama, Y., Ra, C., Aritake, K., Urade, Y., Morimoto, K., Sugimoto, Y., Shimizu, T., Narumiya, S., Hara, S., Murakami, M., Mast cell maturation is driven via a group III phospholipase A2-prostaglandin D2-DP1 receptor paracrine axis. **Nat Immunol** 2013, 14 (6), 554-63.

5) Maekawa K, Hirayama A, Iwata Y, Tajima Y, Nishimaki-Mogami T, Sugawara S, Ueno N, Abe H, Ishikawa M, Murayama M, Matsuzawa Y, Nakanishi H, Ikeda K, Arita M, Taguchi R, Minamino N, Wakabayashi S, Soga T, Saito Y. Global metabolic analysis of heart tissue in a hamster model for dilated cardiomyopathy. **J. Mol. Cell Cardiol.** 2013, 59, 76-85.

6) Iwata Y, Ohtake H, Suzuki O, Matsuda J, Komamura K, Wakabayashi S.  
Blockade of sarcolemmal TRPV2 accumulation inhibits progression of dilated cardiomyopathy. **Cardiovas. Res.** 2013, 99, 760-768.

## 2. 学会発表

### 1) Yoshihiro Urade

“Use of protein crystal growth technology in space to discover and develop therapeutic candidates for Duchenne muscular dystrophy“ 2nd Annual ISS research and development conference (2013 July 17, Denver, USA).

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) Masafumi Matsuo  
“DMD treatment: overview”  
Japan-Vietnam joint research meeting on Duchenne muscular dystrophy (2014.2.26 Hanoi, Vietnam).

4) 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).

5) Yoshihiro Urade  
“Development of drugs used for therapy of Duchenne muscular dystrophy : Inhibitors of hematopoietic prostaglandin D synthase“  
Japan-Vietnam joint research meeting on Duchenne muscular dystrophy (2014.2.26 Hanoi, Vietnam).

6) Masafumi Matsuo  
“Mutations in the dystrophin gene”  
Japan-Vietnam joint research meeting on Duchenne muscular dystrophy (2014.2.26 Hanoi, Vietnam).

7) 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)

8) 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)

9) 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)

10) 鎌内慎也, 岩田裕子, 若林繁夫

「Prostaglandin D<sub>2</sub> metabolites are elevated in the urine of animal models of dilated cardiomyopathy」第86回日本生化学会大会(2013年9月11-13日、横浜)

11) 裏出良博, 中川 卓, 竹内敦子, 垣内涼平, Tomoko Lee, 八木麻里子, 栗野宏之, 飯島一誠, 竹島泰弘,

松尾雅文, 有竹浩介

「デュシェンヌ型筋ジストロフィーの新規病態マーカーとしての尿中PGD<sub>2</sub>代謝物」第86回日本生化学会大会、(2013年9月13日、横浜)

12) 有竹浩介, 田中克尚, 鈴木比佐子, 三好和久, 林 勸生, 佐々木英治, 裏出良博

「Effect of a highly selective inhibitor for hematopoietic prostaglandin D synthase on an experimental model of Duchenne muscular dystrophy」第86回日本生化学会大会、(2013年9月13日、横浜)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

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

筋ジストロフィーの病態進行の生化学マーカーとなる尿中プロスタグランジン D<sub>2</sub> 代謝物の簡易測定法の開発研究

研究分担者：裏出 良博

【研究要旨】

デュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD)は進行性の筋萎縮症を示し、20歳台に心不全あるいは呼吸不全により死亡する極めて重篤な遺伝子筋疾患である。DMDはジストロフィン蛋白質欠損により発症する事が明らかになったが、病態の進行が患者によって大きく異なる等、詳細な病態の進行機構は不明である。そのため、診断が容易であるが、有効な治療法は確立されておらず、病態の進行マーカーも未だに確立されていない。

我々は、筋ジスの治療法や病態評価指標の研究を続け、DMDと同様にジストロフィン遺伝子が欠損したモデル動物 (*mdx* マウス) を用いて、尿中 PGD<sub>2</sub> 代謝物が病態進行度を予測する非侵襲性マーカーになることを示し、患者団体の協力を得て、尿中 PGD<sub>2</sub> 代謝物量が筋断裂に伴う逸脱酵素としての血中 CPK 値とは異なる筋繊維の二次炎症傷害の指標となることや、ベッカー型筋ジス患者のリハビリに伴い増加することを見出した。

本年度は、尿中 PGD<sub>2</sub> 代謝物の簡易測定系の確立を目指して、PGD<sub>2</sub> 代謝物に対する特異的抗体を作製した。更に、*mdx* マウスに選択的かつ強力な PGD 合成酵素阻害薬を投与して、尿中 PGD<sub>2</sub> 代謝物の抑制を伴う病態の軽減効果を確認した。

A. 研究目的

デュシェンヌ型筋ジストロフィー (Duchenne Muscular dystrophy : DMD) は、細胞の裏打ちタンパク質をコードし、X染色体上に存在するジストロフィンの遺伝子異常によって発症する、進行性の筋疾患である。人種や地域に関係なく出生男子約3500人に1人の割合で発症する。診断法は確立しているが、治療法に関しては、遺伝子治療や再生移植治療の研究が進められているが、いずれも研究段階である。

本研究では、DMD 病態進行の生化学マーカーとなる尿中プロスタグランジン(PG) D<sub>2</sub> 代謝物の酵素免疫測定法(EIA 法)による簡易測定法確立を目的とした抗体作製と尿中 PGD<sub>2</sub> 代謝物と病態進行度の相関を DMD モデル(*mdx*)マウスを用いて証明することを目的とする。

B. 研究方法

(1) 尿中 PGD<sub>2</sub> 代謝物 (tetranor-PGD<sub>2</sub>) の新規測定法の確立

尿中 PGD<sub>2</sub> 代謝物 (Tetranor-PGD<sub>2</sub>) の簡易測定法の確立を目的とした特異的モノクローナル抗体の作製を行った。

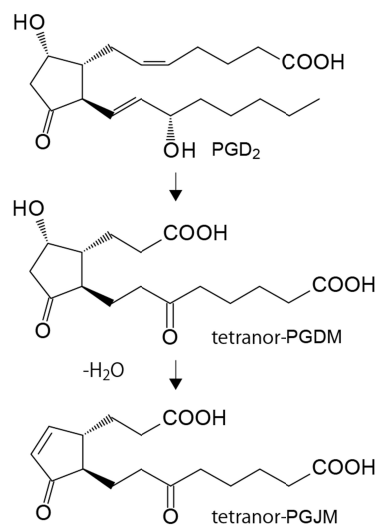


図 1. PGD<sub>2</sub> および尿中に排泄される代謝物 tetranor-PGD<sub>2</sub> とその分解物 tetranor-PGJM

低分子化合物の tetranor-PGDM ( $C_{16}H_{24}O_7$ , 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  $PGE_2$  代謝物 (tetranor-PGEM)、 $PGF_{2\alpha}$  代謝物 (tetranor-PGFM) およびトロンボキササン (TX)  $A_2$  代謝物 (2,3-dinor-TXB<sub>2</sub>) 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。

更に、tetranor-PGDM の分解物である tetranor-PGJM に対する交叉性も調べた。

## (2) 筋ジストロフィーモデルマウスへの H-PGDS 阻害薬の投与による病態の軽減と尿中 $PGD_2$ 代謝物の抑制

*mdx* マウス (4 週齢、 $n=17$ ) に、混餌 (0%、0.01%、0.1%) にて経口投与で有効な H-PGDS 選択的阻害薬 (TAS-205) を 1 か月間投与した。自発運動量並びに組織化学染色により病態を評価した。自発運動量は、解剖の 3 日前から赤外線センサー行動量測定装置を用いて測定した。

尿は病理組織検索を目的とした解剖の前々日より解剖前日までの暗期約 12 時間の尿を代謝ケージを用いて採取した。

尿中の tetranor-PGDM および tetranor-PGEM は、液体クロマトグラフィー・タンデムマススペクトル (LC-M/MS) 法を用いて分析した。

病理組織 (横隔膜) は、摘出後に液体窒素で冷却したイソペンタン内で凍結することで凍結ブロックを作成し、クライオスタットで薄切 (7 $\mu$ m) した。切片は、ヘマトキシリン・エオジン染色 (HE 染色) 或いは抗マウス IgG 抗体で免疫染色した。抗 IgG 染色される壊死部は、顕微鏡画像を電子ファイル化した後、解析ソフト (BZ-9000、KEYENCE) を用いて切片の全体面積、および壊死面積を測定した。

## (倫理面への配慮)

実験動物を用いる研究については、公益財団法人大阪バイオサイエンス研究所動物実験委員会の動物実験指針に準拠して実施した。実験計画は動物実験委員会の承認を得ている。また、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。

## C. 研究結果

### (1) Tetranor-PGDM に特異的なモノクローナル抗体の作製

生体内で  $PGD_2$  がほとんど産生されない PGD 合成酵素遺伝子欠損マウスに KLH をキャリア蛋白質とし複合体抗原 (KLH-tetranor-PGDM) を免疫したところ、tetranor-PGDM に対する高い抗体価を示す血清を得ることができた。追加免疫後に得られた脾細胞を用いて、細胞融合を行い、得られたハイブリドーマをスクリーニングしたところ、対照とした tetranor-PGEM、tetranor-PGFM、2,3-dinor-TXB<sub>2</sub> に対する交叉性が 1/100 以下の特異性の高い 5 つの単クローンを得た。

続いて、5 つのクローンを用いて EIA 法による測定系を構築した。予め抗マウス IgG ウ

サギポリクローナル抗体を吸着させた 96 ウエルプレートに、一定量の競合試薬 (アセチルコリンエステラーゼ-tetranor-PGDM 複合体) と一定量のマウスモノクローナル抗体および試料 (或いは tetranor-PGDM 標準品) を加えて、約 12 時間反応させ、各ウエルを洗浄後、発色試薬(Ellman 試薬)と反応させ、412nm の吸光度を測定することによって、試料中の tetranor-PGDM を定量した。

LC-MS/MS 測定には、API3200 system (AB Sciex 製) を用いて予めプリカーサーイオンとプロダクトイオンのイオン化条件を決定し、tetranor-PGDM と内部標準物質(重水ラベル化 tetranor-PGDM)とのピーク面積比から試料中の tetranor-PGDM を定量した。尚、ヒト尿試料は、固相抽出カラム(Sep-Pak Vac) を用いて抽出、粗精製を行った。

EIA 法と LC-MS/MS 法による測定結果を比較した例を図 2 に示す。

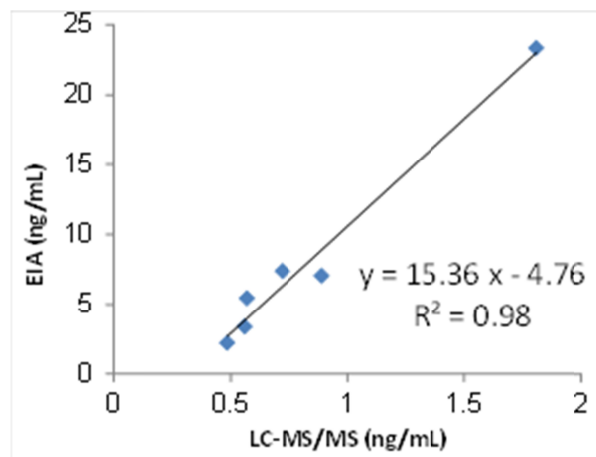


図 2 tetranor-PGDM 特異的抗体を用いた酵素抗体法と LC-MS/MS 法による定量比較

5 つのクローンを用いて作製した EIA 法によるヒト尿中の tetranor-PGDM 定量結果と LC-MS/MS 法による定量結果を比較したところ、相関係数 ( $R^2$  値) 0.57-0.98 と良好な相関を示すことが判明した。一方、5 つのクローンは

他の PG 代謝物に対してほとんど交叉性を示さないにも関わらず、EIA 法による測定値は、LC-MS/MS 法に比べて 8-150 倍の高い値を示した。

続いて、これらの 5 つのクローンの tetranor-PGDM とその分解物の tetranor-PGJM に対する反応性を化学合成して標準品を用いて比較した。いずれのクローンも tetranor-PGDM と tetranor-PGJM に対する反応性は同等であった。

(2) 筋ジストロフィーモデルマウスへの H-PGDS 阻害薬の投与による病態の軽減と尿中 PGD<sub>2</sub> 代謝物の抑制

*mdx* マウスに H-PGDS 特異的阻害薬 (TAS-205) を 1 か月間、混餌で持続的に投与し、尿中 tetranor-PGDM の変動を調べた。健常 (C57BL/6) マウス ( $2.4 \pm 0.2$  ng/day、平均値  $\pm$  標準誤差) に比べて、阻害薬を与えなかった *mdx* マウスの尿中の tetranor-PGDM は有意に高値を示した ( $4.0 \pm 0.3$  ng/day)。H-PGDS 阻害薬を混餌 (0.01%および 0.1% w/w) にて与えたマウスの尿中 tetranor-PGDM は用量依存的にかつ有意に抑制された ( $2.5 \pm 0.2$  ng/day、 $1.7 \pm 0.1$  ng/day)。

H-PGDS 病態の改善効果を調べた。阻害薬を与えなかったマウスは、阻害薬を与えなかった *mdx* マウスは、健常 (C57BL/6) マウスに比べて自発運動量の有意な低下が認められた。一方、H-PGDS 阻害薬を混餌にて与えたマウスは用量依存的に自発運動量の改善が認められた。

更に、組織学的検索の結果、健常 (C57BL/6) マウスの壊死面積率はわずか ( $2 \pm 1\%$ 、平均値  $\pm$  標準誤差) であった。阻害薬を与えなかった *mdx* マウスの壊死面積率は、有意に高値 ( $12 \pm 4\%$ 、平均値  $\pm$  標準誤差) を示した。H-PGDS 阻害薬を混餌 (0.01%および

0.1% w/w) にて与えたマウスの骨格筋の壊死は用量依存的にかつ有意に抑制された (6.6 ± 1.4%、4.5 ± 1%)。

#### D . 考察

生体内でプロスタグランジン (PG) D<sub>2</sub> が産生されない、PGD<sub>2</sub> 合成酵素欠損マウス (Balb/c 背景) に PGD<sub>2</sub> 代謝物との KLH をキャリアタンパク質とした複合体を免疫することにより高い抗体価を得ることができた。他の PG 代謝物に比べて 100 倍以上高い特異性を示す 5 つのクローンを用いた EIA 測定法と LC-MS/MS 法による尿試料測定を行ったところ、いずれのクローンも LC-MS/MS と良好な相関を示したが、測定値は大きな隔たりがあった。この結果から、尿試料中に tetranor-PGDM と類似した化学構造を有し、かつ同様の体内動態を示す未知の化合物の存在が示唆された。

DMD と同様にジストロフィン遺伝子の異常を示す *mdx* マウスに H-PGDS 特異的阻害薬を与えると、尿中 PGD<sub>2</sub> 代謝物の抑制と病態の軽減、壊死の抑制が認められたことから、尿中 PGD<sub>2</sub> 代謝物は筋壊死の新たな進行マーカーになりうると思われる。

#### E . 結論

(1) Tetranor-PGDM と tetranor-PGJM に特異性の高いモノクローナル抗体を作製した。

(2) *mdx* マウスに H-PGDS 阻害薬を投与すると尿中 tetranor-PGDM の抑制を伴った病態の軽減が観察された。

#### F . 健康危険情報

#### G . 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Sarashina, H., Tsubosaka, Y., Omori, K., Aritake, K., Nakagawa, T., Hori, M., Hirai, H., Nakamura, M., Narumiya, S., Urade, Y., Ozaki, H., Murata, T., **Opposing immunomodulatory roles of prostaglandin D<sub>2</sub> during the progression of skin inflammation.** *J Immunol* 2014, 192 (1), 459-65.
- 2) Murata, T., Aritake, K., Tsubosaka, Y., Maruyama, T., Nakagawa, T., Hori, M., Hirai, H., Nakamura, M., Narumiya, S., Urade, Y., Ozaki, H., **Anti-inflammatory role of PGD<sub>2</sub> in acute lung inflammation and therapeutic application of its signal enhancement.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2013, 110 (13), 5205-10.
- 3) Nakagawa, T., Takeuchi, A., Kakiuchi, R., Lee, T., Yagi, M., Awano, H., Iijima, K., Takeshima, Y., Urade, Y., Matsuo, M., **A prostaglandin D<sub>2</sub> metabolite is elevated in the urine of Duchenne muscular dystrophy patients and increases further from 8 years old.** *Clin Chim Acta* 2013, 423, 10-4.
- 4) Taketomi, Y., Ueno, N., Kojima, T., Sato, H., Murase, R., Yamamoto, K., Tanaka, S., Sakanaka, M., Nakamura, M., Nishito, Y., Kawana, M., Kambe, N., Ikeda, K., Taguchi, R., Nakamizo, S., Kabashima, K., Gelb, M. H., Arita, M., Yokomizo, T., Watanabe, K., Hirai, H., Okayama, Y., Ra, C., Aritake, K., Urade, Y., Morimoto,

K., Sugimoto, Y., Shimizu, T., Narumiya, S., Hara, S., Murakami, M., Mast cell maturation is driven via a group III phospholipase A2-prostaglandin D2-DP1 receptor paracrine axis. *Nat Immunol* 2013, 14 (6), 554-63.

- 5) Izumi Y, Aritake K, Urade Y, Fukusaki E. Practical evaluation of liquid chromatography/tandem mass spectrometry and enzyme immunoassay method for the accurate quantitative analysis of prostaglandins. *J Biosci Bioeng*. 2014, S1389-1723(13)00480-5.

## 2. 学会発表

### 1) Yoshihiro Urade

“Use of protein crystal growth technology in space to discover and develop therapeutic candidates for Duchenne muscular dystrophy” 2nd Annual ISS research and development conference (2013 July 17, Denver, USA).

- 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)

- 6) 裏出良博, 中川 卓, 竹内敦子, 垣内涼平, Tomoko Lee, 八木麻里子, 栗野宏之, 飯島一誠, 竹島泰弘, 松尾雅文, 有竹浩介

「デュシェンヌ型筋ジストロフィーの新規病態マーカーとしての尿中 PGD2 代謝物」第86回日本生化学会大会、(2013年9月13日、横浜)

- 7) 有竹浩介, 田中克尚, 鈴木比佐子, 三好和久, 林 勸生, 佐々木英治, 裏出良博

「Effect of a highly selective inhibitor for hematopoietic prostaglandin D synthase on an experimental model of Duchenne muscular dystrophy」第86回日本生化学会大会、(2013年9月13日、横浜)

H . 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

学会発表

発表者氏名	演題名	学会名	発行年



書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Nakagawa,T., Takeuchi,A., Kakiuchi,R., Lee,T., Yagi,M., Awano,H., Iijima,K., Takeshima,Y., Urade,Y., <u>Matsuo,M.</u>	1.A prostaglandin D <sub>2</sub> metabolite is elevated in the urine of Duchenne muscular dystrophy patients and increases further from 8 years old.	Clin Chim Acta.			in press

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  
の測定方法に関する研究

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）

【研究要旨】

デュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD)は進行性の筋萎縮を示し、20歳台に心不全あるいは呼吸不全により死亡する極めて重篤な遺伝性筋疾患である。DMDはジストロフィン欠損により発症する事が明らかになったが、未だ詳細な病態は不明である。そのため、未だ有効な治療法は確立されていない。

本研究では、DMDの病態にプロスタグランジン(PG)<sub>2</sub>が関与しているとの仮説のもと、DMD患者の早朝第一尿を採取して、尿中のPGD<sub>2</sub>代謝産物(PGDM)の解析をHPLC-MS/MSの手法で解析してきた。そして、DMDでは尿中PGDMが高値であることまた、年齢が進むとともにその値がさらに高値になることを明らかにした。そして、その結果を論文として報告した。

この尿中PGDM測定の結果は、DMDにおいてPGD<sub>2</sub>を介した炎症が進行していることを示した。そこで、この炎症を抑制する治療について臨床研究を開始した。現在その臨床研究が進行中である。

A．研究目的

デュシェンヌ型筋ジストロフィー(Duchenne Muscular dystrophy : DMD)は進行性の筋萎縮を示し、20歳台に心不全あるいは呼吸不全で死亡する極めて重篤な遺伝性筋疾患である。DMDではジストロフィン遺伝子の異常によるジストロフィン欠損により発症する。ジストロフィンは筋細胞膜の裏打ちタンパクで、このジストロフィンの欠損により細胞内へのカルシウムの流入などの異常が生じ、タンパク分解酵素が活性化されることが考えられている。しかし、DMDはジストロフィン欠損が明確となったが、それによって生じる病態の詳細は不明である。そのため、DMDの治療法としてはジストロフィンの発現を目指したものが主流となっている。一方、DMDの詳細な病態の解明はその病態を修飾する治療法の開発に結びつくものと大きく期待されている。

プロスタグランジン(PG)には多くの種類がある。その中で、PGD<sub>2</sub>は炎症因子として知られている。DMDでは、骨格筋にPGD<sub>2</sub>合成酵素の発現が骨格筋で増加していることが報告さ

れている。しかし、DMDにおけるPGD<sub>2</sub>の病態との関連について詳細な検討はされておらず、その病態的意義は不明である。

本研究では、PGDMがDMD患者の早朝第一尿で高値であることを明らかにするとともに、このPGDMを指標としてPGD<sub>2</sub>産生を抑制するアスピリン投与によるDMD治療の臨床研究を開始した。そして、予備的な結果では、アスピリン投与により尿中PGDMの低下が示唆される結果を得つつある。

B．研究方法

神戸大学医学部附属病院小児科を受診しているDMD患者で同意の得られた例から尿を収集した。尿中のPGDMをHPLC・MS/MSを用いて測定した。

また、「プロスタグランジン産生抑制剤のDuchenne型筋ジストロフィーに対する臨床試験」として、臨床研究を開始した。これまでに同意の得られた3例のDMD患者にアスピリンを投与した。投与量は30mg/kg/N3を連日28日投与とした。

### (倫理面への配慮)

本研究の実施に当たっては、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。

### C. 研究結果

DMD患者の早朝第1尿サンプルの収集を始めた。DMDの100以上の尿サンプルが集積され、それらの尿中PGDMを測定した。その結果、DMD患者の尿中PGDMは正常より有意に高いことが判明した。驚くべきことに、この尿中PGDMは患者が8歳以上になるとさらに上昇した。これらの結果をまとめて、論文発表した。

これらに加えて、PGDMの産生を抑制することが期待されるアスピリンをDMDの治療に応用する臨床研究をはじめた。同意の得られた患者を対象として、アスピリンを投与し、その経過中にPGDMを測定した。その結果、投与前には高値であった尿中PGDMが治療により、減少する傾向にあることが確認できた。さらに症例数を増やすことにより、この効果を明らかにする。

一方、アスピリン投与によりDMD患者の運動能の改善効果は現在のところ認められていない。今後、長期に亘る観察、あるいは、より精度の高い運動能の解析が必要である。

### D. 考察

DMDの病態の基本は骨格筋におけるジストロフィン欠損である。本研究ではDMD患者が尿中にPGDMを多量に排泄していることを明らかにした。これは、DMDの病態にPGD<sub>2</sub>が関与していることを示した。

プロスタグランジン D<sub>2</sub> はアラキドン酸からサイクロヘキシナーゼ (COX) により、代謝されて産生される。DMDでPGD<sub>2</sub>が高いことは、PGD<sub>2</sub>依存性の炎症がDMDで生じていることを示し、このCOXが治療標的の1つと考えられる。

今回、このCOXの作用阻害の目的でアスピリンをDMD患者に投与した。その結果、予想

通りPGDMの産生が抑えられることを示す結果を得つつある。

もし、DMDでPGD<sub>2</sub>依存性の炎症がDMDの進行に大きな役割を果たしているのであれば、このアスピリン投与によるDMD治療効果は大きいと予想される。

### E. 結論

DMDで尿中PGDM排出が高値であることを明らかにし、それを下げる臨床研究を開始した。

### F. 健康危険情報

特に報告することはない。  
(分担研究報告書には記入せずに、総括研究報告書にまとめて記入)

### G. 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., Urade, Y., Matsuo, M. 2013. A prostaglandin D<sub>2</sub> metabolite is elevated in the urine of Duchenne muscular dystrophy patients and increases further from 8 years old. *Clin Chim Acta*. 423: 10-4

#### 2. 学会発表

T.Nakagawa; A.Takeuchi; R.Kakiuchi; T.Lee; M.Yagi; H.Awano; K.Iijima; Y.Takeshima; Y.Urade; M.Mtsuo. A prostaglandin D<sub>2</sub> metabolite is elevated in the urine samples of patients with Duchenne muscular dystrophy, 10月3日 18回 世界筋学会

### 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

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

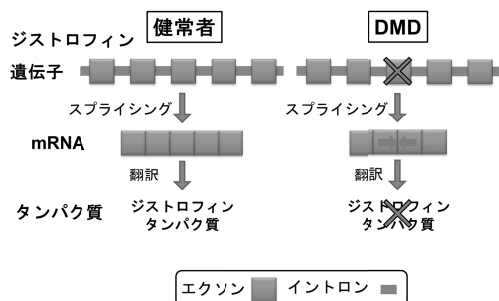
研究要旨

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、ほぼ 20 歳代に心不全または呼吸不全により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關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。これまでに、PGD2 の尿中代謝物である tetranor-PGDM（PGDM）の LC-MS/MS を用いる定量法を確立した。DMD 患者、BMD 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。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。

A . 研究目的

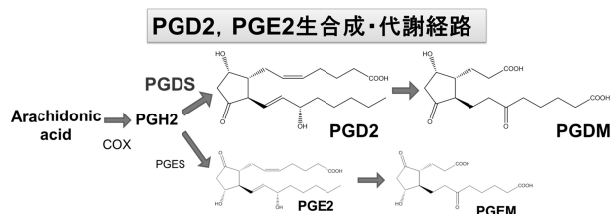
Duchenne 型筋ジストロフィー (Duchenne muscular dystrophy : DMD)は進行性の筋萎縮を呈し、極めて重篤な遺伝性疾患である。本疾患は、原因遺伝子であるジストロフィン遺伝子のエクソン欠失および重複等の変異により、筋の細胞膜形成に關与するジストロフィンタンパク質が欠損する遺伝性筋疾患である。人種に関係なく出生男子約 3500 人に 1 人の割合で発症する。

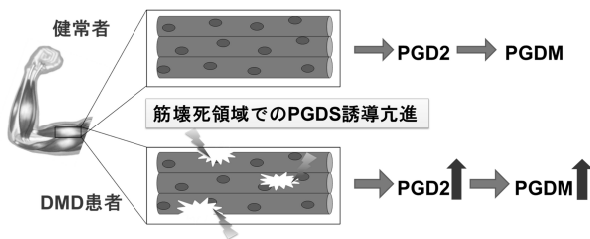
ジストロフィンタンパク質合成過程



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。

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關与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。





## B. 研究方法

### 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、 $\alpha$ -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B0.5ml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 100 $\mu$ 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。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。

## 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、 $\alpha$ -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。

## D. 考察

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。

今後は、DMD患者に薬による治療を行い、その効果の判定に応用していく予定である。

## E. 結論

尿中PGDM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。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

- 1) 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)

- 2) 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)

3) 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)

4) 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)

G . 知的財産権の出願・登録状況  
なし

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

動物モデルを用いた筋壊死と尿中代謝物の関連の実証  
（心筋症モデルでの心筋壊死と薬物投与効果および尿中代謝物の関係）

分担研究者：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

【研究要旨】

拡張型心筋症は、その発症機序が不明であり予後も不良であることから、新たな治療法の確立が求められている。分担研究者は、Duchenne 型筋ジストロフィーにおいて骨格筋における病態進行とプロスタグランジンD<sub>2</sub> 産生が相関するとの知見に基づき、心筋組織においても同様に、筋壊死に伴う病態進行とPGD<sub>2</sub> 産生の亢進が関連している可能性を検証した。また、拡張型心筋症モデルハムスターにHPGDS 阻害薬を投与することにより、拡張型心筋症病態の進行が抑制される可能性が示された。

A. 研究目的

拡張型心筋症は、その発症機序が不明であり予後も不良であることから、新たな治療法の確立が求められている。これまでに、Duchenne型筋ジストロフィーの病態進行と造血器型PGD合成酵素（HPGDS）によるプロスタグランジン（PG）D<sub>2</sub>産生が相関することが強く示唆されている。そこで研究分担者は、心筋組織においても同様に、筋壊死に伴う病態進行とPGD<sub>2</sub>産生の亢進が関連している可能性を検証するため、拡張型心筋症のモデル動物（ハムスター、マウス）を用いた解析を行った。

B. 研究方法

δ- sarcoglycan を欠損した拡張型心筋症モデルハムスターを用いた。対照として、同週齢の野生型動物を用いた。10週齢の心筋症ハムスターにHPGDS阻害薬(30mg/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。

PGD<sub>2</sub> 産生量の変動を評価するため、



代謝ケージを用いて暗期（12時間）に採尿し、PGD<sub>2</sub>の尿中安定代謝物 11,15-Dioxo-9-hydroxy-2, 3, 4, 5-tetranorprostan-1, 20-dioic acid (tetranor-PGDM)を液体クロマトグラフィ・タンデムマススペクトロメトリを用いて測定した（LC: 資生堂、MS/MS: AB Sciex）。

（倫理面への配慮）

実験動物を用いる研究については、国立循環器病研究センター動物実験指針に準拠して実施した。本研究計画は動物実験委員会の承認を得ている。また、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。

### C. 研究結果

拡張型心筋症モデルハムスターでは、野生型動物に比べ、心臓組織でのHPGDS蛋白質の発現量が2 - 5倍程度増加していた。また、両者から単離した心筋細胞の比較においてもHPGDSの発現増加が示された。心臓及び心筋細胞を用いた免疫染色の結果から、HPGDSの介在板近傍への強い集積が認められた。これらの知見は、心筋症病態の進行に伴い、同週齢の野生型動物に比べ、尿中tetranor-PGDM量が高値を示すことと一致する。

拡張型心筋症モデルハムスターへのHPGDS阻害薬の投与（30mg/kg/day）により、尿中tetranor-PGDMが減少することを確認した。心臓組織の繊維化を定量したところ、溶媒投与群に比べて、HPGDS阻害薬の投与群では、繊維化の進行に抑制傾向が観察された。小動物用超音波高解像度イメージングシステムにより、心機能を評価したところ、溶媒投与群に比べ、HPGDS阻害薬の投与群では、左室内径短縮率(%FS)の低下に抑制傾向が見られた。

### D. 考察

拡張型心筋症モデルハムスターにおいて、尿中tetranor-PGDM量が高値を示す症例が認められた。そこで、HPGDS阻害薬投与による薬効評価を行ったところ、心臓組織の繊維化進行、および心機能の低下を軽減させる傾向が示された。したがって、HPGDSにより産生されたPGD<sub>2</sub>がハムスターの拡張型心筋症病態の進行に重要な役割を持つ可能性が示された。

拡張型心筋症のモデルマウスでも、尿中tetranor-PGDM量が高値を示すことから、今後これらの動物モデルを用いて、心筋組織におけるPGD<sub>2</sub>産生と病態進行の関連性を明らかにする必要がある。

拡張型心筋症は、その発症機序が不

明であり予後も不良であることから、新たな治療法の確立が求められている。HPGDS 阻害薬の投与実験を行うことで、新規治療法開発の可能性を検証できる。また、治療対象の決定や薬剤効果を評価できるマーカーが必要であるが、尿中の安定代謝物である tetranor-PGDMがその候補として期待される。

#### E. 結論

HPGDS 阻害薬が拡張型心筋症の病態進行を抑制できる可能性が示唆された。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Maekawa K, Hirayama A, Iwata Y, Tajima Y, Nishimaki-Mogami T, Sugawara S, Ueno N, Abe H, Ishikawa M, Murayama M, Matsuzawa Y, Nakanishi H, Ikeda K, Arita M, Taguchi R, Minamino N, Wakabayashi S, Soga T, Saito Y. Global metabolic analysis of heart tissue in a hamster model for dilated cardiomyopathy. **J. Mol. Cell Cardiol.**, 59: 76-85,2013
- 2) Iwata Y, Ohtake H, Suzuki O, Matsuda J, Komamura K, Wakabayashi S. Blockade of sarcolemmal TRPV2 accumulation inhibits progression

of dilated cardiomyopathy.

**Cardiovas. Res.**, 99: 760-768, 2013

#### 2. 学会発表

- 1) 第 86 回日本生化学会大会  
(2013 年 9 月 11-13 日、横浜)  
鎌内慎也、岩田裕子、若林繁夫  
「Prostaglandin D<sub>2</sub> metabolites are elevated in the urine of animal models of dilated cardiomyopathy」

#### G. 知的財産権の出願・登録条件

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

学会発表

発表者氏名	演題名	学会名	発行年
Yoshiro Urade	Use of protein crystal growth technology in space to discover and develop therapeutic candidates for Duchenne muscular dystrophy	2nd Annual ISS research and development conference	2013
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	Hanoi, Vietnam	2013
Yoshihiro Urade	Development of drugs used for therapy of Duchenne muscular dystrophy: Inhibitors of hemato-poietic prostaglandin D synthase“ Japan-Vietnam joint research meeting on Duchenne muscular dystrophy	Hanoi, Vietnam	2013
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	第40回BMSコンファレンス(宮崎)	2013
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	第40回BMSコンファレンス(宮崎)	2013

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(つくば)	2013
裏出良博, 中川 卓, 竹内敦子, 垣内涼平, Tomoko Lee, 八木麻里子, 粟野宏之, 飯島一誠, 竹島泰弘, 松尾雅文, 有竹浩介	デュシェンヌ型筋ジストロフィーの新規病態マーカーとしての尿中 PGD2 代謝物	第 86 回日本生化学会大会	2013
有竹浩介, 田中克尚, 鈴木比佐子, 三好和久, 林 勸生, 佐々木英治, 裏出良博	Effect of a highly selective inhibitor for hematopoietic prostaglandin D synthase on an experimental model of Duchenne muscular dystrophy	第 86 回日本生化学会大会	2013
T.Nakagawa; A.Takeuchi; R.Kakiuchi; T.Lee; M.Yagi; H.Awano; K.Iijima; Y.Takeshima; Y.Urade; M.Mtsuo.	A prostaglandin D2 metabolite is elevated in the urine samples of patients with Duchenne muscular dystrophy	18 <sup>th</sup> International WMS Congress (CA, USA)	2013.10.3
Masafumi Matsuo	Mutations in the dystrophin gene	日本-ベトナム Duchenne 型筋ジストロフィーに関する共同研究会議	2014.8.26
Masafumi Matsuo	DMD treatment : overview	日本-ベトナム Duchenne 型筋ジストロフィーに関する共同研究会議	2014.2.26

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Nakagawa T, Takeuchi A, Kakiuchi R, Lee T, Yagi M, Awano H, Iijima K, Takeshima Y, Urade Y, Matsuo M	A prostaglandin D <sub>2</sub> metabolite is elevated in the urine of Duchenne muscular dystrophy patients and increases further from 8years old.	<b><i>Clin. Chim. Acta.</i></b>	423	10-14	2013
Maekawa K, Hirayama A, Iwata Y, Tajima Y, Nishimaki-Mogami T, Sugawara S, Ueno N, Abe H, Ishikawa M, Murayama M, Matsuzawa Y, Nakanishi H, Ikesa K, Arita M, Taguchi R, Minamino N, Wakabayashi S, Soga T, Saito Y	Global metabolomic analysis of heart tissue in a hamster model for dilated cardiomyopathy.	<b><i>J Mol Cell Cardiol</i></b>	59	76-85	2013
Iwata Y, Ohtake H, Suzuki O, Matsuda J, Komamura K, Wakabayashi S	Blockade of sarcolemmal TRPV2 accumulation inhibits progression of dilated cardiomyopathy.	<b><i>Cardiovasc Res</i></b>	99(4)	760-768	2013
Sarashina H, Tsubosaka, Y, Omori K, Aritake K, Nakagawa M, Hori M, Hirai H, Nakamura M, Narumiya S, Urade Y, Ozaki H, Murata T	Opposing immunomodulatory roles prostaglandin D <sub>2</sub> during the progression of skin inflammation	<b><i>J Immunol</i></b>	192	459-465	2014

<p>Taketomi Y, Ueno N, Kojima T, Sato H, Murase R, Yamamoto K, Tanaka S, Sakanaka M, Nakamura M, Nishito Y, Kawana M, Kambe N, Ikeda K, Taguchi R, Nakamizo S, Kabashima K, Gelb MH, Arita M, Yokomizo T, Nakamura M, Watanabe K, Hirai H, Nakamura M, Okayama Y, Ra C, Aritake K, Urade Y, Morimoto K, Sugimoto Y, Shimizu T, Narumiya S, Hara S, Murakami M.</p>	<p>Mast cell maturation is driven via a group III Phospholipase A<sub>2</sub>-Prostaglandin D<sub>2</sub>-DPI receptor paracrine axis</p>	<p><b>Nat Immunol</b></p>	<p>14(6)</p>	<p>554-563</p>	<p>2013</p>
<p>Murata, T., Aritake, K., Tsubosaka, Y., Maruyama, T., Nakagawa, T., Hori, M., Hirai, H., Nakamura, M. Narumiya, S., Urade, Y., Ozaki, H.</p>	<p>Anti-inflammatory role of PGD<sub>2</sub> in acute lung inflammation and therapeutic application of its signal enhancement</p>	<p><b>Proc Natl Acad Sci U S A</b></p>	<p>110 (13)</p>	<p>5205-10</p>	<p>2013</p>
<p>Liu YY, Yin D, Chen L, Qu WM, Chen CR, Laudon M, Cheng NN, <b>Urade Y</b>, Huang ZL.</p>	<p>Piromelatine exerts antinociceptive effect via melatonin, opioid, and 5HT1A receptors and hypnotic effect via melatonin receptors in a mouse model of neuropathic pain</p>	<p><b>J Biosci Bioeng</b></p>		<p>In press</p>	<p>2014</p>

