

**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に関する研究**

平成24年度～26年度 総合研究報告書

研究代表者 裏出 良博

平成27(2015)年 5月

目 次

I . 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
II . 分担研究報告	
1 . 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に関する研究	
裏出良博	----- 8
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	----- 12
3 . 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	----- 14
4 . 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	
竹内 敦子	----- 18
III . 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 24
IV . 研究成果の刊行物・別刷	----- 30

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 クローンモノクローン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)。

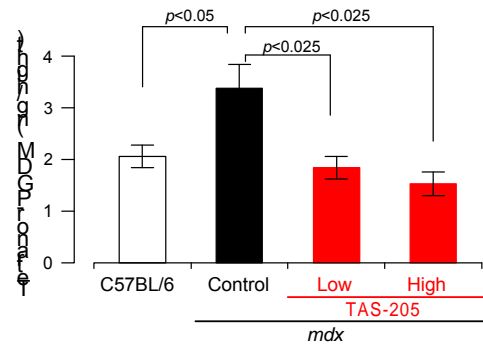
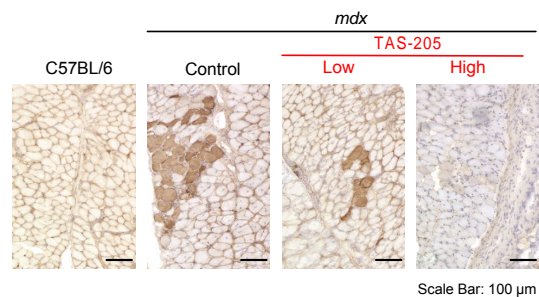


図1 H-PGDS 阻害薬の尿中 PGD₂ 代謝物に及ぼす効果

(a)



(b)

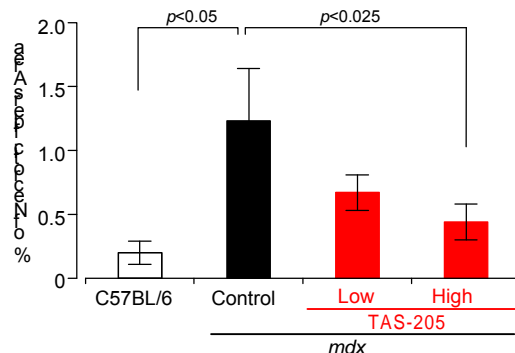


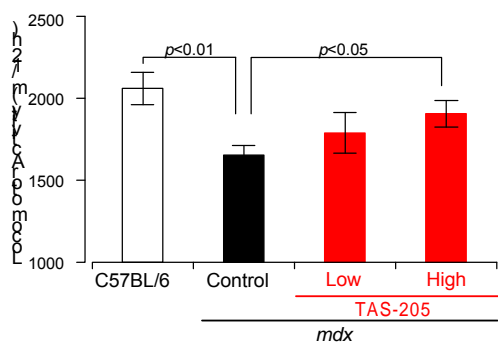
図2 H-PGDS 阻害薬による *mdx* マウスの筋壊死軽減

(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。



Mean ± S.E.M. (N = 16 - 17)

図3 H-PGDS阻害薬によるmdxマウスの自発運動量の改善

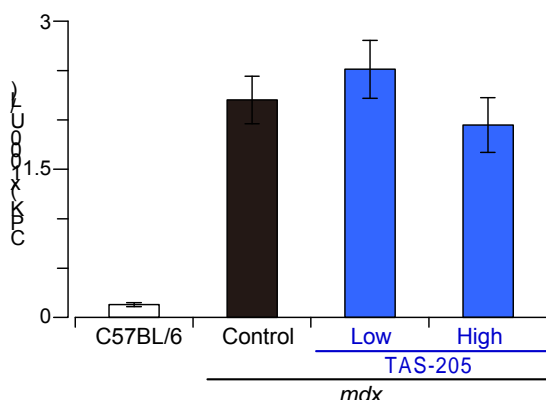


図4 H-PGDS阻害薬の尿中PGD₂代謝物および血中CPKに及ぼす効果

(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。

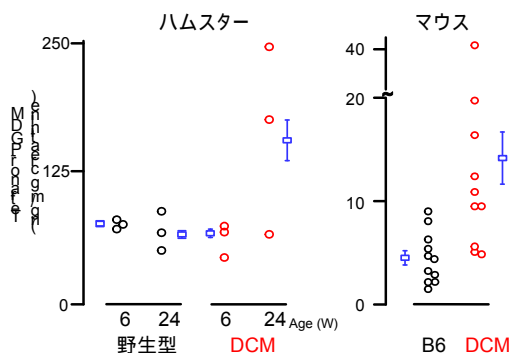


図5 拡張型心筋症(DCM)モデル動物でのPGD₂代謝物の変動

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)。

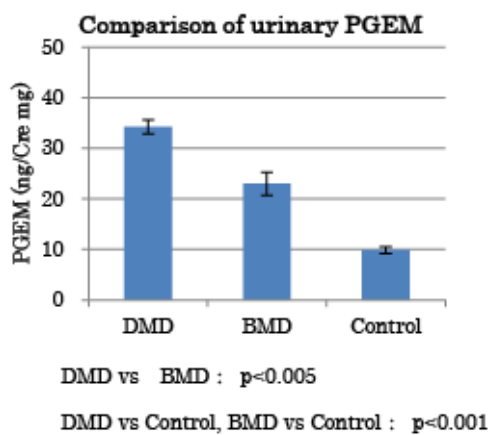
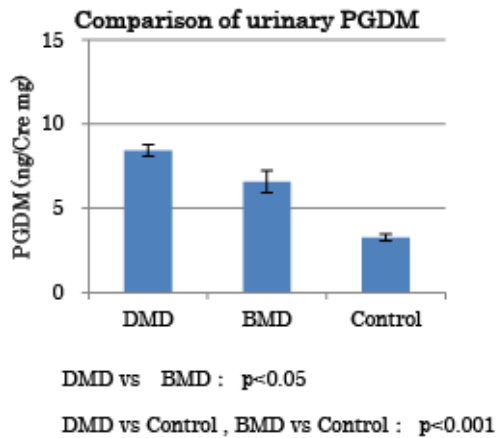


図6 健常男子、DMD患者およびBMD患者の尿中PGD₂、PGE₂代謝物の比較

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。

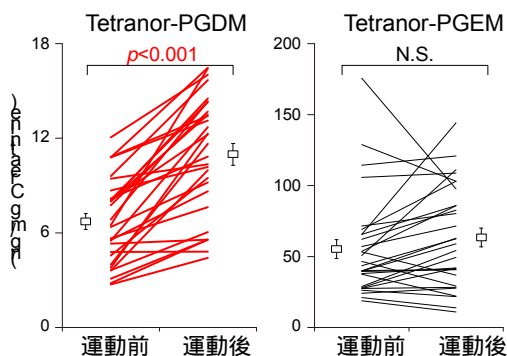


図7 BMD患者の運動前後の尿中PGD₂、PGE₂代謝物の比較

(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

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。

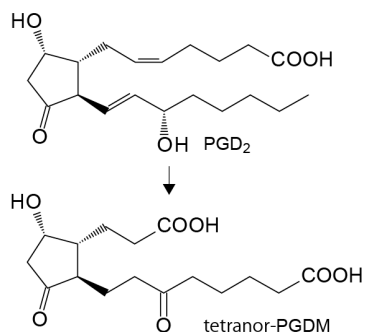


図1 PGD₂ および尿中に排泄される代謝物 tetranor-PGDM

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。

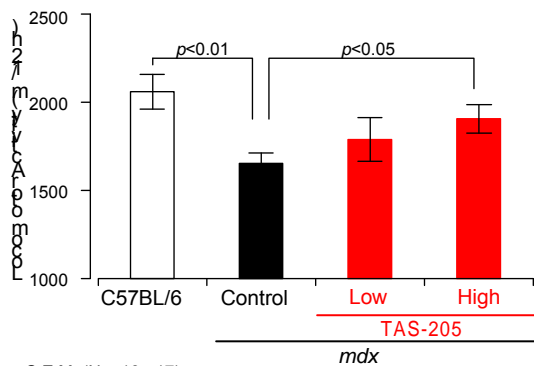
動物実験および遺伝子組み換え実験については、全て筑波大学の動物実験委員会、組換え DNA 実験安全委員会の審査を受けている。

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

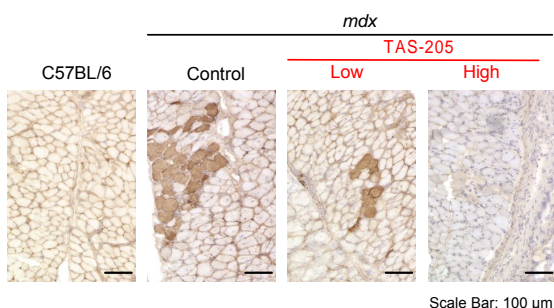


Mean ± S.E.M. (N = 16 - 17)

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)

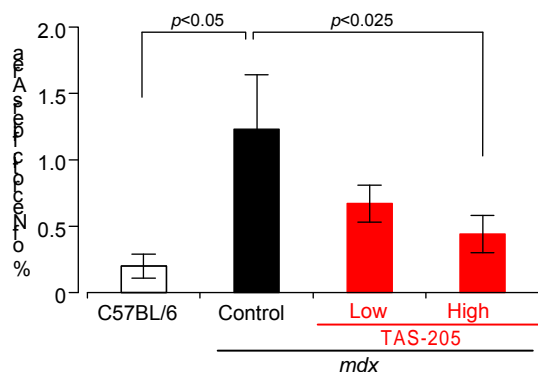


図3 H-PGDS 阻害薬による *mdx* マウスの筋壊死軽減

- (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%)。

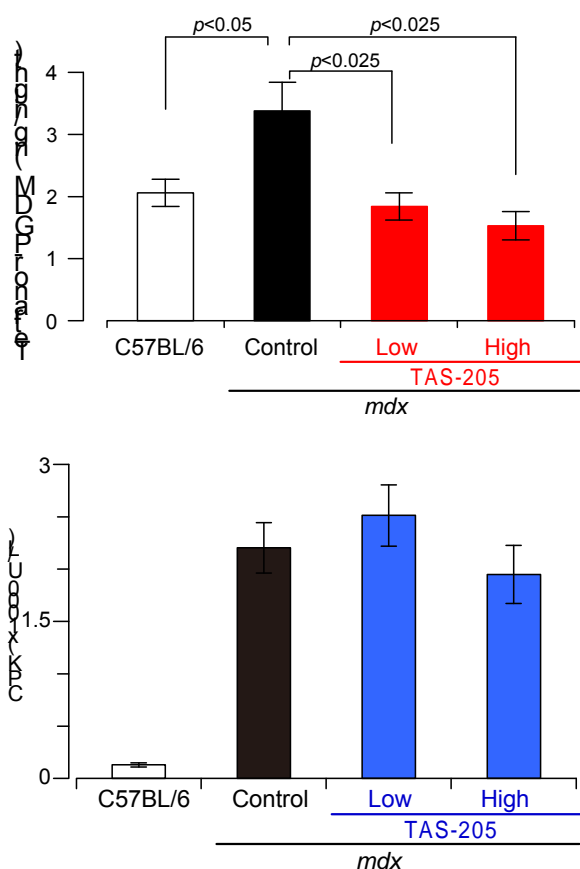


図4 H-PGDS 阻害薬の尿中 PGD₂ 代謝物および血中 CPK に及ぼす効果

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

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)₂が関与しているとの仮説のもと、DMD患者の尿中のPGD₂代謝産物(PGDM)を解析した。まず、尿中のPGDMのHPLC・MS/MS解析システムを用い、DMD患者の早期1尿のPGDMを定量した。その結果、DMDでは尿中PGDMが正常より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。これはPGD₂が、DMDの進行性の病態に関与していることを示唆した。また、PGDMの産生抑制がDMDの治療標的の1つであることを示した。

そこで、PGDMの産生を抑制するアスピリンを用いたDMDの治療の臨床研究を開始した。

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付くものと大きく期待されている。

プロスタグラジン(PG)には多くの種類がある。その中で、PGD₂は炎症因子として知られている。DMDでは、骨格筋にPGD₂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。

本研究では、DMD患者尿中のPGD₂の代謝産物であるPGDMを解析し、DMDでの尿中PGDMの増加を明らかにした。そして、このPGDMを指標としてPGD₂産生を抑制するDMD治療の臨床研究を実施した。

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。まず、日内変動を解析した。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。

さらに、ベッカー型筋ジストロフィー(Becker muscular dystrophy: BMD)の患者がロボットスーツHALを用いたリハビリテーションを実施している。その訓練による運動負荷がPGDMに及ぼす影響を明らかにするため、訓練の前後において尿を採取し、そのPGDMを測定した。

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。同意の得られた 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 患者の尿を各排尿時に採取し、その PGDM を測定した。PGDM の排泄量は ml 当りあるいは mg/creatinine 当りにしても、日内で大きく変化していることが判明した。また、運動との関連も調べたが、PGDM 排泄量と運動の間には明確な関連は見い出せなかった。日内の詳細な排泄量の変化の検討を行ったところ、PGDM はいずれの患者においても各日の第 1 尿が最低値をとることが判明した。そこで、DMD の PGDM 排泄量の検討については、早期第 1 尿を解析試料とすることにした。

DMD 患者の早期第 1 尿サンプルの収集をはかった。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、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。

BMD 患者で、ロボットスーツ着用による歩行訓練の前後で、尿を採取し、尿中 PGDM を解析した。合計 29 回の訓練で採尿と解析が行われた。そして、尿中 PGDM は訓練により約 1.6 倍に増加することが判明した。

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。DMD 患者が尿中に PGDM を多量に排泄していることを世界で初めて明らかにしてきた。これは、病態に PGD₂ が関与していることを示した。

プロスタグランディン D₂ 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 PGD₂ が高いことは、PGD₂ 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 患者に投与する臨床研究を計画した。計画通りにアスピリンの投与は実施され、投与は終了した。現在、この計画に従ったアスピリン投与の有効性について解析中である。

BMD 患者への運動負荷により尿中の PGDM が増加した。このことは、筋肉への負荷に何らかの機序が働いて PGD₂ の産生を亢進させることを示唆した。

E. 結論

DMD で尿中 PGDM 排出が高値であることが明らかとなった。これは PGDM の産生抑制が DMD の治療標的であることを示した。

F. 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

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)

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。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造血器型プロスタグランジン(PG)D合成酵素(H-PGDS)によるPGD₂産生が相関することが強く示唆されている。そこで、拡張型心筋症心筋組織においても同様に、筋壊死に伴う病態進行とPGD₂産生の亢進が関連している可能性を検証するため、心筋症及び心筋変性のモデル動物(ハムスター、マウス)を用いた解析を行った。拡張型心筋症ハムスターと心筋症マウスにおいて、心筋障害と関連した尿中PGD₂代謝物の増加を確認した。これは病態動物心筋組織、特に心筋組織間に存在する肥満細胞に多く局在が確認されたH-PGDSの増加と一致していた。また、心筋症等心筋変性モデル動物にH-PGDS 阻害薬を投与することにより、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(H-PGDS)によるプロスタグランジン(PG)D₂産生が相関することが強く示唆されている。そこで、心筋症心筋組織においても同様に、筋壊死に伴う病態進行とPGD₂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および糖鎖異常による拡張型心筋症マウス、収縮蛋白異常による拡張型心筋症マウス、心筋変性マウスモデルを用いた。対照として、同週齢の野生型動物を用いた。心筋変性マウスモデルは *mdx* マウスに甲状腺ホルモンの Triiodothyronin (T3) を 2 mg/kg/day 3 週間投与して作成した。H-PGDS 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、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。

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および糖鎖異常による拡張型心筋症マウス、収縮蛋白異常による拡張型心筋症マウス、心筋変性マウスモデルを用いた。対照として、同週齢の野生型動物を用いた。心筋変性マウスモデルは *mdx* マウスに甲状腺ホルモンの Triiodothyronin (T3) を 2 mg/kg/day 3 週間投与して作成した。H-PGDS 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。

PGD₂ 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、PGD₂ 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ー・タンデムマススペクトロメトリーを用いて測定した(LC: 資生堂、MS/MS: AB Sciex)。心筋組織における H-PGDS の含量は H-PGDS 抗体を用いたイムノプロットにより、局在は組織切片を心筋(cTnI 等)、肥満細胞(トリプターゼ等)、マクロファージ(CD11b 等)特異的蛋白等の各々抗体と H-PGDS 抗体との二重染色により同定及び解析を行なった。

(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において、心筋症病態の発症前後(4週齢及び16週齢)で比較すると、16週齢で尿中代謝物量が高くなる傾向が見られた。また、16週齢では野生型ハムスターとの比較でも高値を示した。さらに、2種類の心筋症モデルマウスにおいても検討し、野生型マウスと比べ高値を示す症例が認められた。

心筋症ハムスター及び拡張型心筋症マウス、T3 投与心筋変性マウスでは、野生型動物、T3 非投与マウスに比べ、心臓組織での H-PGDS 蛋白質の発現量の増加が観察された。心筋組織を用いた免疫染色の結果から、H-PGDS は病態心筋組織において心筋細胞というよりは壊れた細胞や炎症細胞の浸潤部位に局在すること、H-PGDS の集積箇所と肥満細胞のマーカーが一致したこ

とより H-PGDS は肥満細胞に多く存在していることが判明した。これらの知見は、心筋症病態の進行に伴い、尿中 tetranor-PGDM 量が高値を示したことと一致していた。また心筋症及び心筋変性モデル動物において H-PGDS 阻害薬を投与すると、心筋組織の H-PGDS 蛋白質含量の減少と尿中 tetranor-PGDM の減少に伴い、心機能の改善と心筋組織の繊維化の減少が観察された。

D. 考察

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。3年間で明らかになった心筋症・変性心筋の病態進行に伴う H-PGDS 増加、特に心筋間質に存在する肥満細胞への集積、H-PGDS 阻害薬の心筋病態改善効果などの結果より、H-PGDS を標的にした新規治療法開発の可能性が示唆された。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

変性心筋組織においても変性骨格筋同様に、筋壊死に伴う病態進行と PGD₂ 産生の亢進が関連していることが示され、H-PGDS 阻害薬が筋ジストロフィー等の筋変性疾患だけでなく心筋症、心筋変性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) Iwata Y, Suzuki O, Wakabayashi S. Decreased surface sialic acid content is a sensitive indicator for muscle damage. **Muscle & Nerve**,47:372-378, 2013
- 2) 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
- 3) 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9回日仏国際シンポジウム(2012年9月7-8

日、東京) 岩田 裕子 「Inhibition of Ca²⁺-permeable channel TRPV2 provides the beneficial effects on cardiomyopathy」

2) 第86回日本薬理学会年会(2013年3月21-23日、福岡) 岩田 裕子、若林繁夫「筋細胞膜の低下したシアール酸含量は筋変性疾患における傷害の高感度マーカーである」

3) 第86回日本薬理学会年会(2013年3月21-23日、福岡) 鎌内慎也、岩田裕子、若林繁夫「拡張型心筋症モデル動物におけるプロスタグランジン D2 尿中代謝物の増加」

4) 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 D₂ metabolites are elevated in the urine of animal models of dilated cardiomyopathy」

5) 第87回日本薬理学会年会(2014年3月20日、仙台国際センター) 鎌内慎也、岩田裕子、Cheng-Kun Du、Dong-Yun Zhan、森本幸生、白井幹康、若林繁夫：TRPV2 N 末ドメインの高発現は、トロポニン T 変異を持つ拡張型心筋症モデルマウスの症状を改善する

6) 第87回日本薬理学会年会(2014年3月21日、仙台国際センター) 岩田裕子、大武仁美、鎌内慎也、若林繁夫：Ca²⁺透過チャネル TRPV2 の細胞膜局在の阻害により拡張型心筋症モデル動物の病態進行が抑制された。

7) 第62回日本心臓病学会学術集会(2014年9月26日仙台市民会館) 駒村和雄、岩田裕子：拡張型心筋症の新規治療薬の開発：伸展感受性 Ca 透過型陽イオンチャネル TRPV2 の阻害薬の可能性

8) 第86回日本生化学会大会(2014年10月18

日 国立京都国際会館) 岩田裕子、大武仁美：
TRPV2 阻害剤によりマウス重症心筋症の進行が
抑制される。

9) AHA Scientific Sessions 2014 (2014 年 11 月
16 日 McCormick Place Chicago /USA) Iwata,
Y., Komamura, K.: Tranilast, Transient Receptor
Potential Vanilloid 2 Antagonist, Ameliorates
End-Stage Heart Failure of Mice With Dilated
Cardiomyopathy.

G. 知的財産権の出願・登録条件

1. 特許取得

1) 特許第 4997441 号 (登録日 平成 24 年 5 月
25 日) 筋傷害の簡便検査方法及び筋傷害検

査用キット 鈴木 治 岩田 裕子

2) 特許第 5644026 号 (登録日 平成 26 年 1
月 14 日) TRPV2 の部分ペプチド 岩田 裕
子 若林 繁夫

3) 特許第 5667223 号 (登録日 平成 26 年 12
月 19 日) TRPV2 阻害剤、疾患の予防又は治
療剤、薬剤探索用リード化合物、及び薬剤探
索方法 岩田 裕子 若林 繁夫

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

厚生労働科学研究費補助金（障害者対策総合研究事業）
（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。

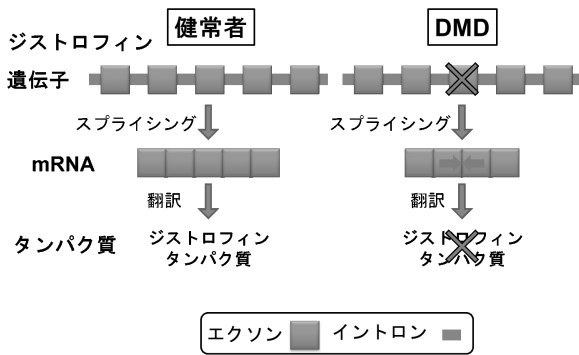


図1 ジストロフィンタンパク質の合成過程

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。

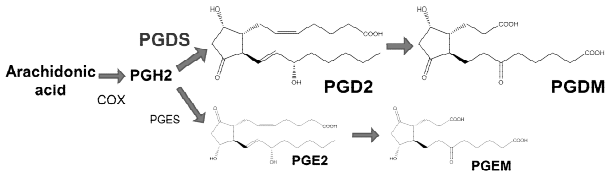


図2 PGD₂およびPGE₂の生合成・代謝経路

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)。

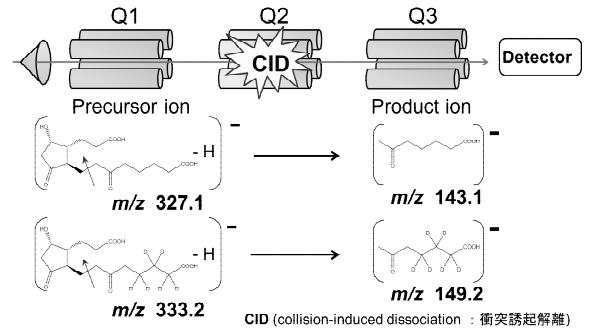


図3 PGDM の Selected reaction monitoring (SRM)法

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。

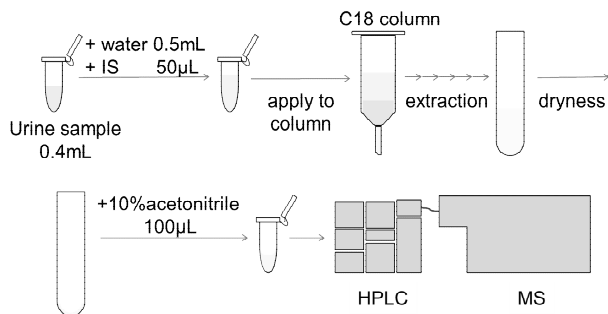


図4 PGDM測定用試料の定量法のフローチャート

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)。

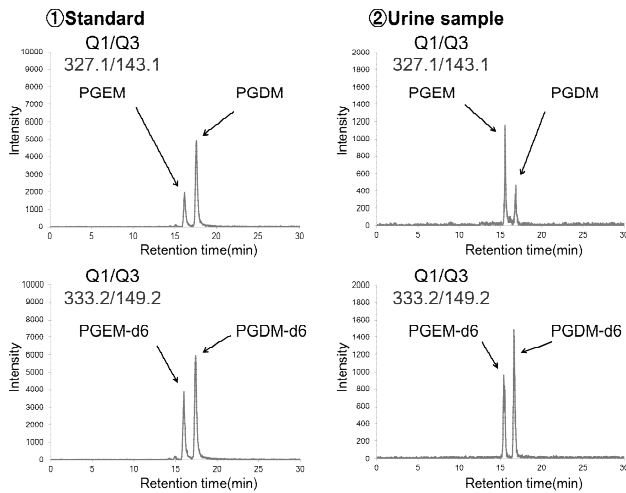


図6 LC-MS/MS クロマトグラム

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)。

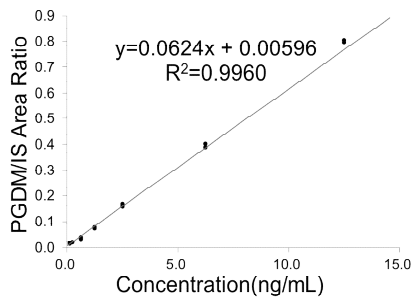


図7 検量線

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。

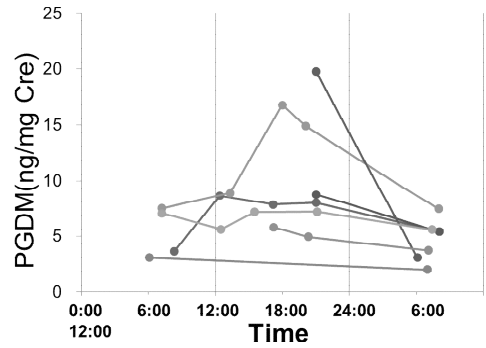


図8 尿中 PGDM 濃度の日内変動

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)。

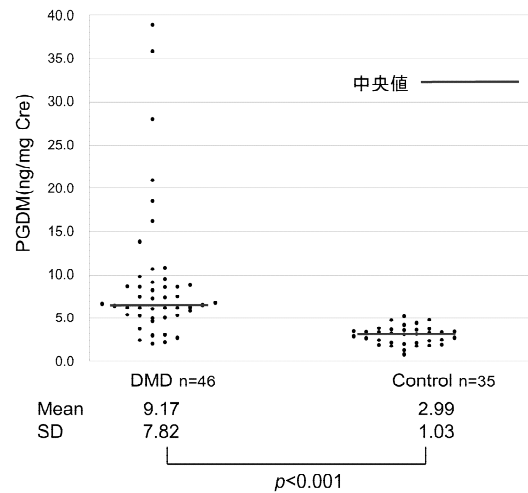


図9 健常群、DMD 群の尿中 PGDM 濃度の分布

[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。

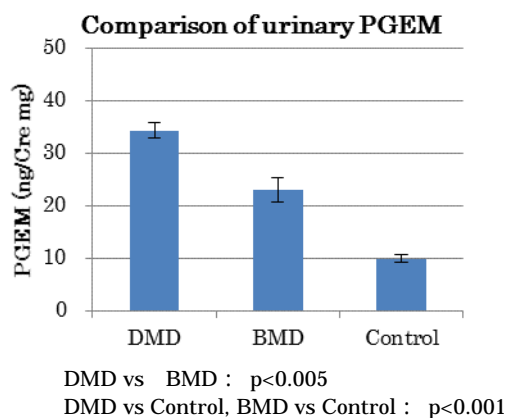
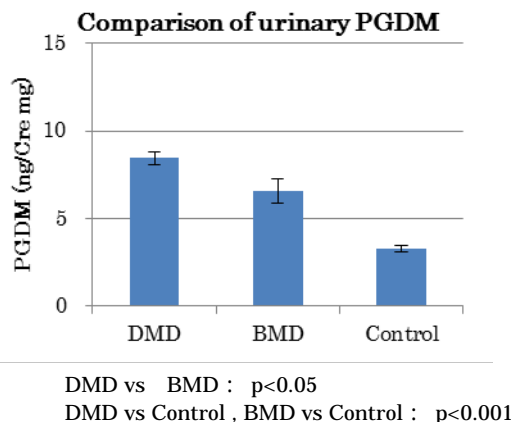


図 10 健常群、DMD 群、BMD 群の尿中 PGDM および PGEM 濃度の比較

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。

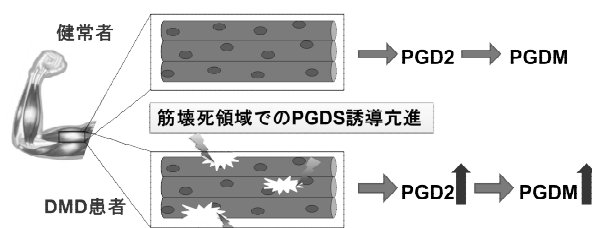


図 11 健常群、DMD 群における PGDM 生成

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 8 years 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

研究成果の刊行に関する一覧表

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
裏出良博	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の定量	松嶋正明、伊中浩治	進化をとげる構造生物学	株式会社化学同人	東京	2014	169-180

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
Trimarco A, Forese MG, Alfieri V, Lucente A, Brambilla P, Diana G, Pieragostino D, Sacchetti P, <u>Urade Y</u> , Boizet-Bonhoure B, Martinelli Boneschi F, Quatrini A, Tavecchia C	Prostaglandin D ₂ synthase/GPR44: a signaling axis in PNS myelination	Nat Neurosci	17(12)	1682-92	2014
Asai.T.,Ojima.I., Minami.S., Takeshima.Y., <u>Matsuo.M.</u> ,	Gait training for becker's muscular dystrophy using robot suit hybrid assistive limb	Physical Medicine and Rehabilitation-International	1	1-3	2014
Izumi Y, Aritake K, <u>Urade Y</u> , Fukusaki	Practical evaluation of liquid chromatography/tandem mass spectrometry and enzyme immunoassay method for the accurate quantitative analysis of prostaglandins	J Biosci Bioeng	118(1)	116-8	2014
Sarashina H, Tsubosaka, Y, Omori K, Aritake K, Nakagawa M, Hori M, Hirai H, Nakamura M, Narumiya S, <u>Urade Y</u> , Ozaki H, Murata T	Opposing immunomodulatory roles prostaglandin D ₂ during the progression of skin inflammation	J Immunol	192	459-465	2014
Maekawa K, Hirayama A, <u>Iwata Y</u> , 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

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
Nakagawa T, Takeuchi A, Kakiuchi R, Lee T, Yagi M, Awano H, Iijima K, Takeshima Y, Urade Y, Matsuo M	A prostaglandin D ₂ metabolite is elevated in the urine of Duchenne muscular dystrophy patients and increases further from 8years old	Clin. Chim. Acta	423(23)	10-14	2013
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, 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.	Mast cell maturation is driven via a group III Phospholipase A ₂ -Prostaglandin D ₂ -DPI receptor paracrine axis	Nat Immunol	14(6)	554-563	2013
Iwata Y, Suzuki O, Wakabayashi S	Decreased surface sialic acid content is a sensitive indicator for muscle damage	Muscle & Nerve	47	372-378	2013
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 ₂ in acute lung inflammation and therapeutic application of its signal enhancement	Proc Natl Acad Sci U S A	110 (13)	5205-10	2013

発表者氏名	演題名	学会名	年度
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、神戸	2015年3月
裏出 良博	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マーカー物質の測定法	障害者対策事業成果発表、東京	2015年2月
裏出 良博	筋ジストロフィー病態の進行軽減療法開発	筋ジストロフィー合同班会議、東京	2015年1月
Tanaka K, Aritake K, Tanaka M, Sasaki E, Utsugi T, A Sasaoka T, <u>URADE Y</u>	Novel inhibitor of hematopoietic prostaglandin D synthase improves the muscle disorder in an experimental model of Duchenne muscular dystrophy	International Congress of the world muscle Society (WMS2014), Germany	2014年10月
Tanaka K, Aritake K, Tanaka M, Shigeno K, Hayashi Y, Sasaki E, Utsugi T, Sasaoka T, <u>Urade Y</u>	Inhibition of hematopoietic prostaglandin D synthase improves symptoms of muscular dystrophy in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy	NEUROSCIENCE 2014, USA	2014年11月
駒村和雄, 岩田裕子	拡張型心筋症の新規治療薬の開発: 伸展感受性Ca透過型陽イオンチャンネルTRPV2の阻害薬の可能性	第62回日本心臓病学会学術集会、仙台	2014年9月
<u>Iwata, Y.</u> , Komamura, K	Transient Receptor Potential Vanilloid 2 Antagonist, Ameliorates End-Stage Heart Failure of Mice With Dilated Cardiomyopathy.	AHA Scientific Sessions 2014, USA	2014年11月
岩田裕子, 大武仁美	TRPV2阻害剤によりマウス重症心筋症の進行が抑制される。	第86回日本生化学会大会、京都	2014年10月
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、神戸	2014年6月
鎌内慎也, 岩田裕子, Cheng-Kun Du, Dong-Yun Zhan, 森本幸生, 白井幹康, 若林繁夫	TRPV2 N末ドメインの高発現は、トロポニンT変異を持つ拡張型心筋症モデルマウスの症状を改善する	第87回日本薬理学会年会、仙台	2014年3月

学会発表

岩田裕子、大武仁美、鎌内慎也、若林繁夫	Ca ²⁺ 透過チャネル TRPV2の細胞膜局在の阻害により拡張型心筋症モデル動物の病態進行が抑制された。	第 87 回日本薬理学会年会、仙台	2014 年 3 月
<u>Masafumi Matsuo</u>	DMD treatment: overview” Japan-Vietnam joint research meeting on Duchenne muscular dystrophy	Japan-Vietnam joint research meeting on Duchenne muscular dystrophy	2014年2月
<u>Masafumi Matsuo</u>	Mutations in the dystrophin gen	Japan-Vietnam joint research meeting on Duchenne muscular dystrophy	2014年2月
Yoshiro Urade	Development of drugs used for therapy of Duchenne muscular dystrophy : Inhibitors of hemato-poietic prostaglandin D ₂ synthase	Japan-Vietnam joint research meeting on Duchenne muscular dystrophy	2014年2月
Atsuko Takeuchi	LC-MS/MS quantification of a prostaglandin D ₂ metabolite in the urine of Duchenne muscular dystrophy patients	Japan-Vietnam joint research meeting on Duchenne muscular dystrophy	2014年2月
Taku Nakagawa, <u>Atsuko Takeuchi</u> , Ryohei Kakiuchi, Tomoko Lee, Mariko Yagi, Hiroyuki, Awano, Kazumoto Iijima, Yasuhiro Takeshima, Yoshihiro Urade, Masafumi Matsuo	A prostaglandin D ₂ metabolite is elevated in the urine samples of patients with Duchenne muscular dystrophy	18th International WMS Congress (2013. Asilomar, California, USA	2013年10月
岩田裕子、若林繁夫	Prostaglandin D ₂ metabolites are elevated in the urine of animal models of dilated cardiomyopathy	第 86 回日本生化学会大会、横浜	2013 年 9 月
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 ₂ 代謝物」	第 86 回日本生化学会大会、横浜	2013 年 9 月

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、横浜	2013 年 9 月
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年9月
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、横浜	2013 年 9 月
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, USA	2013年7月
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、宮崎	2013 年 7 月
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 D ₂ 代謝物の定量	第 40 回 BMS コンファレンス、宮崎	2013 年 7 月
岩田裕子、若林繁夫	拡張型心筋症モデル動物におけるプロスタグランジン D ₂ 尿中代謝物の増加	第 86 回日本薬理学会年会、福岡	2013 年 3 月
岩田 裕子、若林繁夫	筋細胞膜の低下したシアル酸含量は筋変性疾患における傷害の高感度マーカーである	第 86 回日本薬理学会年会、福岡	2013 年 3 月
岩田 裕子	Inhibition of Ca ²⁺ -permeable channel TRPV2 provides the beneficial effects on cardiomyopathy	第9回日仏国際シンポジウム、東京	2012年9月
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D ₂ 代謝物の定量	日本薬学会第132年会、札幌	2012年3月

特許権等の知的財産権の出願・登録状況

氏名	題名	番号	取得日
岩田 裕子、若林 繁夫	TRPV2阻害剤、疾患の予防又は治療剤、薬剤探索用リード化合物、及び薬剤探索方法	特許第5667223号	2014年12月19日
岩田 裕子、若林 繁夫	TRPV2の部分ペプチド	特許第5644026号	2014年11月14日
鈴木 治、岩田 裕子	筋傷害の簡便検査方法及び筋傷害検査用キット	特許第4997441号	2012年5月25日

その他

発表内容	題名	年度
ボーイング社ホームページ掲載	日本人科学者 裏出博士の筋ジストロフィー治療薬の開発	2014年3月
第 32 回全国筋ジストロフィー大阪大会 基調講演： 裏出 良博	デュシェンヌ型筋ジストロフィーの薬物療法	2014年10月
大鵬薬品工業(株)登録番号 (NCT02246478) 臨床試験開始 *米国 NIH 広報	H-PGDS阻害薬 (TAS-205) を用いたDMD患者を対象とした臨床試験	2014年9月