

令和 2 年 5 月 5 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K10001

研究課題名(和文) 福山型先天性筋ジストロフィーに対するプロスタノイド合成阻害療法開発の基礎的研究

研究課題名(英文) Basic research aimed at developing a prostanoid synthetase inhibitor for patients with Fukuyama congenital muscular dystrophy

研究代表者

石垣 景子 (Ishigaki, Keiko)

東京女子医科大学・医学部・准教授

研究者番号：10366304

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：福山型先天性筋ジストロフィー(FCMD)患者のプロスタグランジン(PG)D2, E2尿中代謝物は、健常対照より有意に高値であり、典型・重症例で上昇がみられ、臨床病型との相関が認められた。FCMD患者剖検筋の免疫染色では、PGD, PGE合成酵素の発現が散在性に確認され、FCMDの病態において、Duchenne型と同様プロスタノイドの関連が示唆された。FCMD疾患モデルマウス尿中代謝産物の測定では、PGD2代謝物が有意差をもって高値だった。治療薬候補として、疾患モデルマウスにアスピリン投与した結果、PG尿中代謝物の低下が認められたが有意差には至らず、免疫染色も含めた筋病理で変化は得られなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

FCMDは、脳奇形合併を特徴とする重度の筋ジストロフィーであるが、治療法はまだない。DMDでは筋壊死にPGD2の関与が示唆され、治療薬として造血器型PGD合成酵素阻害薬が治験実施中であるが、FCMDではPGDの関与が低く対象外とされてきた。本研究では、FCMD患者において、臨床病型の重症度と一致して、PG尿中代謝物が有意に増加しており、かつ筋壊死線維にPG合成酵素の発現がみられたことから、FCMDの候補治療薬として、PGD合成酵素阻害薬などアラキドン酸カスケードを阻害する薬剤が候補となりうることを示された。疾患モデルマウスへのアスピリン投与を試みたが、今回は有効性の証明には至らなかった。

研究成果の概要(英文)：Fukuyama congenital muscular dystrophy (FCMD) patients show significantly elevated prostaglandin (PG) D2 and E2 metabolites in urine samples as compared with normal controls.

These PGD2 and PGE2 metabolites were increased in patients with typical and severe phenotypes, suggesting clear correlations with phenotype. Scattered expressions of hematopoietic PGD synthase and microsomal PGE synthase-1 were detected in some necrotic fibers from patients with FCMD. These observations suggested that prostanoid may have an important role in the pathogenesis of FCMD, as it does in Duchenne muscular dystrophy. FCMD model mice also had significantly elevated PGD2 metabolites. We gave FCMD model mice low and high doses of aspirin as a potential therapy. The urinary PGD2 and E2 metabolite levels tended to decrease but, even in the high-dose group, the differences did not reach statistical significance, and aspirin administration did not produce clear pathological changes in muscles.

研究分野：小児神経

キーワード：福山型先天性筋ジストロフィー プロスタノイド ドラッグリポジショニング アスピリン H-PGDS阻害薬 ステロイド アラキドン酸カスケード

## 1. 研究開始当初の背景

福山型先天性筋ジストロフィー (FCMD) は、神経細胞移動障害による脳奇形合併を特徴とする重度の筋ジストロフィーであり、日本人に特異的に多い。患者の多くは、生涯歩行不能であり、多くは呼吸不全、心筋症から 20 歳以前に死亡する難病であるが、現在治療法はまだない。

2002 年連携研究者らは、免疫組織染色を用い、DMD や筋炎など集団的な筋線維の壊死を特徴とする疾患において、ホスホリパーゼ A2 (cPLA2)、シクロオキシゲナーゼ-2 (Cox-2)、造血管型プロスタグランジン D 合成酵素 (H-PGDS) が筋壊死周辺で誘導されることから、筋壊死の拡大に H-PGDS により産生される PGD2 が関与する可能性を示唆した<sup>1)</sup>。2009 年に連携研究者らは、独自に開発した H-PGDS 阻害薬を、DMD のモデルマウスである mdx マウスに投与し、筋壊死体積の縮小と自発運動量の改善効果を示し、筋壊死が H-PGDS により産生される PGD2 を介して二次的に拡大することを証明した<sup>2)</sup>。H-PGDS 阻害薬は、その後 DMD 犬でも有効性と安全性が証明され、2015 年より DMD 患者を対象とした臨床試験第 I 相、II 相が行われた。FCMD においては、3 例の生検筋の免疫染色で、壊死筋における H-PGDS は陰性であったことから FCMD の筋壊死には PGD2 は関与していないと解釈され<sup>1)</sup>、H-PGDS 阻害薬の対象外とされていた。この結果が 3 例という少数例、かつ 1 歳未満の低年齢児から導き出された点から疑問を持ち、症例数を拡大して、LC-MS/MS を用いた尿中の PG 代謝産物 (PGDM, PGEM) の検討を行った。FCMD 20 例の検討を行い、対照と比較して、尿中 PGD2、PGE2 代謝産物ともに上昇し、特に PGE2 代謝産物の上昇が著しいことが判明した。以上の結果より、FCMD の病態にも、PGD2、PGE2 を初めとするプロスタノイドの関与が示唆された。

## 2. 研究の目的

本研究では、FCMD におけるプロスタノイドの関与を証明し、FCMD における新たな治療法として、シクロオキシゲナーゼ阻害薬 (非ステロイド性抗炎症薬 (アスピリン))、H-PGDS 阻害薬の可能性を臨床検体およびモデル動物系より検討する。

## 3. 研究の方法

### (1) FCMD 患者の尿中 PGD2、PGE2 代謝物上昇の確認およびその評価

東京女子医科大学に通院歴のある FCMD 患者だけでも 43 例より尿検体を採取し、LC-MS/MS を用いて尿中 PGD2、PGE2 代謝物である tetranor-PGDM (t-PGDM)、tetramer-PGEM (t-PGEM) を測定し、今までの研究から得ている対照コントロール 116 例との値と比較した。尿中 PGD2、PGE2 代謝物の年齢による変化、自然歴との比較、値に影響する他因子の評価を行った。二群間の統計解析は Mann-Whitney の U 検定を用い、有意水準は  $p < 0.05$  と設定した。

### (2) FCMD 患者筋検体における壊死筋の PGD、PGE 合成酵素 (H-PGDS、mPGES-1) 発現の評価

東京女子医科大学小児科に研究使用に同意を得て保存されていた FCMD 患者の剖検筋検体 (胎児、小児 2 例) を用いて、免疫組織染色により、壊死筋における PGD、PGE 合成酵素 (H-PGDS、L-PGDS、mPGES-1) 発現を評価した。比較として、先天性ミオパチー (2 歳)、DMD (6 歳) の生検筋を用いた。免疫染色は、薄切標本に、マウスをホストとして作成された、抗ヒト造血管型 PGD 合成酵素 (H-PGDS) 抗体、抗ヒトリポカリン型 PGD 合成酵素 (L-PGDS) 抗体、抗ヒト膜結合型 PGE 合成酵素-1 (mPGES-1) 抗体を用いて免疫染色を行い、壊死筋が強染色されるかを光学顕微鏡にて評価を行った。

### (3) FCMD モデルマウスの尿中 PGD2、PGE2 代謝物評価

神戸大学で飼育されている FCMD 疾患モデルマウスを使用した。モデルマウスはヒト 3kb 型挿入変異のノックインホモ型マウス (HpHp) とその正常対照マウス (HnHn) あるいは糖鎖欠損を呈するヒト 3kb 型挿入変異/fukutin KO 型複合ヘテロマウス (Hp/-) とその正常対照マウス (Hp/+) の 2 系統を使用した。これら 4 週齢及び 8 週齢の尿を採取し、尿中 PGD2、PGE2 代謝物を測定した。二群間の統計解析は Mann-Whitney の U 検定を用い、有意水準は  $p < 0.05$  と設定した。

### (4) FCMD モデルマウスにおける COX 阻害薬 (アスピリン) 投与 (低用量、高用量) の有効性の評価

モデルマウスを用いてアスピリンをマウスに投与した。アスピリンは飲水容器から経口摂取を行い、低用量 (100mg/kg/日) 及び高用量 (300mg/kg/日) にて連日投与した。投与前後で尿中 PGD2、PGE2 代謝物測定を行った。二群間の統計解析は Mann-Whitney の U 検定を用い、有意水準は  $p < 0.05$  と設定した。計 8 週間投与の後、モデルマウスを安楽死させ、筋病理にて、筋病理像および PGD、PGE 合成酵素 (H-PGDS、mPGES-1) 発現の変化を評価した。

## 4. 研究成果

### (1) FCMD 患者の尿中 PGD2、PGE2 代謝物上昇の確認およびその評価

FCMD 患者 43 例 (0-29 歳: 平均 9 歳) の t-PGEM、t-PGDM を測定した結果、健常対照 116 例 (t-PGDM  $3.3 \pm 0.2$  ng/mg creatinine, t-PGEM  $9.9 \pm 0.7$  ng/mg creatinine (mean  $\pm$  SE)) と比較して、FCMD 患者では t-PGDM  $5.4 \pm 0.6$  (約 1.7 倍)、( $p < 0.0001$ )、t-PGEM  $32.2 \pm 3.1$

(約 3.4 倍)( $p < 0.0001$ )と有意差をもって上昇を認め、特に t-PGEM では著しい高値を認めた(図 1). 3kb の挿入変異のホモ、ヘテロ接合型の遺伝子型、性別では有意差はなかったが、臨床型では重症・典型例に比較し、軽症例は有意に低値であり( $p < 0.05$ ), 臨床病型との相関を認めた(図 2). 年齢による変化では、t-PGDM では 10 歳未満と比較し、20 歳以上では有意に高値( $p < 0.05$ )であったが、t-PGEM では有意な差は認められなかった。t-PGDM においても、加齢に伴い増加していく傾向は明らかではなかった。

以上の結果より、DMD と同様に FCMD においても、プロスタノイドの産生が亢進していることが判明し、t-PGDM、t-PGEM とともに重症度が高いほど、高値であることが示された。これは、プロスタノイド産生亢進の重症度への影響を示す重要なデータであり、プロスタ

タノイド産生系が治療薬のターゲットとなりうる重要な根拠となる。年齢変化では、t-PGDM では 10 歳未満と比較し、20 歳以後に有意に上昇が認められた( $p = .$  DMD でも同様に 8 歳以後、t-PGDM が上昇し、進行度との関連性が報告されている<sup>3)</sup>。しかし、今回の検討では 20 歳以上の検体数が少なかったこと、原疾患の進行に伴い、筋量が減少したため、補正に用いた Cr 値が影響した可能性は否めない。研究開始当初は DMD における t-PGEM の動向に関する報告はほとんどなく、上昇は少ないとされ、DMD では PGD2 上昇が主体で、PGE2 は軽度の上昇、FCMD では PGD2 の上昇は軽度で、PGE2 の上昇が著しいと異なるパターンを示すと想定していた。後に H-PGDS 阻害薬を投与した DMD 患者の t-PGDM、t-PGEM の変化の検討がなされ、DMD も、FCMD 同様 t-PGEM 値が高値であり、歩行可能な患者では正常対照の 2 倍程度であるのに対し、歩行機能喪失後には約 4 倍と著明な高値であったとの報告があった<sup>4)</sup>。この報告で著者らは、進行に伴う筋量の低下により Cr が低下したこと、進行により一定筋量あたりの PGD2 と PGE2 発現が上昇していると推測した。本研究における FCMD では、t-PGDM の上昇は 1.7 倍であるが、t-PGEM の上昇は 3 倍以上と上昇のパターンを示し、DMD と同様、PGD2 と PGE2 の発現が上昇しているが、より歩行喪失後の DMD と同様のパターンが示され、FCMD では歩行機能獲得例がほとんどなく、筋量が DMD と比較し少ないことが影響したと考えられた。

## (2) FCMD 患者筋検体における壊死筋の PGD、PGE 合成酵素 (H-PGDS, mPGES-1) 発現の評価

DMD、FCMD とともに、筋の一部で mPGES-1 抗体の染色が確認された。DMD では散在する壊死筋が濃染したが軽度であった。FCMD では、胎児の筋線維が全体的に濃染され、小児例では DMD よりも多く、濃染する筋線維が散在していた。PGE は炎症が生じた際に発現し、DMD においては筋壊死の再生を促進すると想定されているため、DMD、FCMD の患者の生検筋において発現が認められたことは推定した結果と一致する。H-PGDS 抗体による染色では、DMD では報告程は染色性が明らかでなく、一部の壊死筋にみられたのみであった。既報告でも全例には認められず、一部の例に現局していたことから、今回の結果も一致する。FCMD では、既報告では染色性は認められないとのことであったが、胎児筋では一部、小児例では濃染する筋が散在しており、H-PGDS 染色陽性の筋は、DMD に限らず、FCMD でも認められることが判明した(図 3)。結論として、H-PGDS、mPGES-1 抗

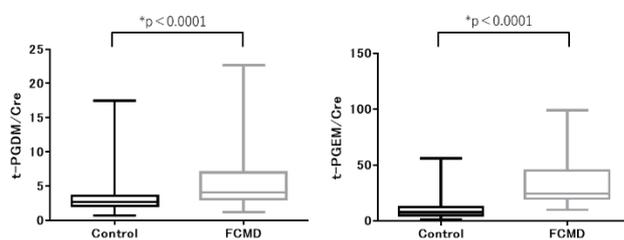


図1 t-PGDM, t-PGEM対照患者比較

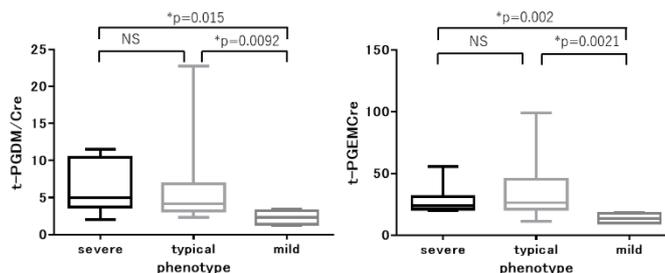


図2 t-PGDM, t-PGEM FCMD重症度比較

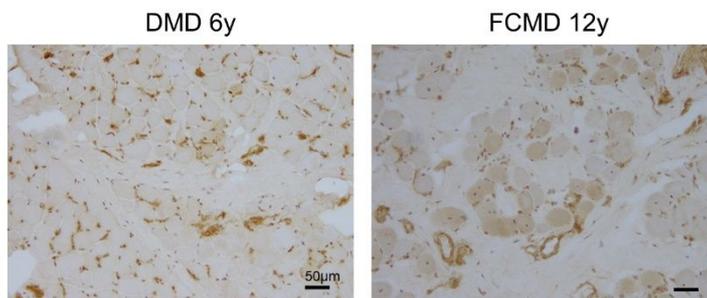


図3 H-PGDS抗体染色

体による免疫染色では、DMD、FCMD の小児例ともに染色性のある筋の散在が確認された。FCMD においては、胎児筋で mPGES-1 抗体が全体的に染色され、H-PGDS 抗体による染色は一部にとどまった。先天性ミオパチーでは、いずれも染色されなかった。

### (3) FCMD モデルマウスの尿中 PGD2, PGE2 代謝物評価

マウスに関しては、動物舎で原因不明の死亡が多く、当初は 2 系統のモデルマウスを使用する予定だったが、1 系統のみ、糖鎖欠損を呈するヒト 3kb 型挿入変異/fukutin KO 型複合ヘテロマウス(Hp/-)とその正常対照マウス(Hp/+)の検討のみを行い、それぞれ 4 週齢、8 週齢の t-PGDM, t-PGEM の測定を行った。疾患モデルマウスと対照マウスの比較では、8 週齢のマウスで t-PGDM が有意差をもって高値 (p=0.0047) であったが、4 週齢マウスの t-PGDM および、t-PGEM では 4 週、8 週ともに疾患マウスと対照に有意差は認められなかった。加齢に伴う変化として、t-PGDM は、疾患モデルマウスと対照マウスともに、4 週、8 週齢で差は認められなかった。一方、t-PGEM では対照マウスのみ、4 週齢と比較し、8 週齢が有意差をもって上昇が認められた (p=0.0025)。

糖鎖欠損を呈するヒト 3kb 型挿入変異/fukutin KO 型複合ヘテロマウス(Hp/-)は、疾患モデルマウスではあるが、筋病理の変化は明らかではなく、握力が対照より弱い程度である。疾患モデルマウスとして弱い病型ではあるが、対照と比較して、t-PGDM が有意に高値であることから、評価系として解析可能と判断した。また、加齢とともに、PG 尿中代謝産物が上昇する傾向があることから、下記のアスピリン投与実験には、20 週以後のマウスを用いることとした。

### (4) FCMD モデルマウスにおける COX 阻害薬 (アスピリン) 投与 (低用量, 高用量) の有効性の評価

20 週齢の糖鎖欠損を呈するヒト 3kb 型挿入変異/fukutin KO 型複合ヘテロマウス (Hp/-) とその正常対照マウス (Hp/+) に対し、低用量と高用量のアスピリン投与を行い、4 週後の尿中代謝物を測定した。対照マウスでは、低用量、高用量アスピリン投与群とともに、非投与群に比して、有意差をもって、t-PGDM, t-PGEM ともに低下が認められた。一方で、疾患モデルマウスにおいては、t-PGDM, t-PGEM ともに低用量、高用量にて低下は認められたものの、有意差には至らなかった (p=0.056)。また、20 週齢マウスは、予測と異なり、対照と疾患モデルマウスで t-PGDM, t-PGEM の有意差を認めなかった(図 4)。投与 8 週後の筋病理組織は、対照と疾患モデルマウスで変化なく、

免疫染色でも PGD, PGE 合成酵素の発現は両者ともに認められなかった。アスピリン投与の有無でも、病理像に変化は認められなかった。

既報告と同様、アスピリン投与により、対照マウスでは有意差をもって尿中 PG 代謝物が低下、疾患モデルマウスでも低下する傾向が認められた。疾患モデルマウスで予測と異なる結果が出た理由

として、一つには、本研究ではアスピリン非投与の疾患モデルマウスの検体数が 2 と非常に少なく、有意差を出すには至らなかったこと、もう一つは、20 週齢マウスでは、8 週齢で認められたように尿中 PG 代謝物に有意差が見られず、スタート時点から評価が困難であったことがあげられる。これには、動物舎での原因不明のマウス死亡の増加がかかわっており、研究期間内で結果をあげることができなかったが、今後継続して行っていく予定である。さらに、FCMD の疾患モデルマウスは、病型が強いものは生存期間も短く、体重、筋量も少ないため、採尿が困難であること、さらに尿中 PG 代謝物の測定値はクレアチニン補正を行うことから、筋量が少ない場合、影響が否定できない。今回選択した糖鎖欠損を呈する疾患モデルマウスは、臨床症状が非常に軽微で、採尿や投薬にも耐えうる生存期間を有するが、筋病理変化も糖鎖欠損のみで、壊死がほとんどなく、今回のプロスタノイドの病態への影響を検討するには、不向きであり、研究のリミテーションであった。

今回の研究を通し、FCMD の病態、重症度にも DMD と同様に、PGD2, PGE2 の関与が示唆され、H-PGDS 阻害薬、アスピリン、ステロイドなどアラキドン酸カスケードを阻害する薬剤の治療薬の候補の可能性が証明された。疾患モデルマウスでも尿中 PG 代謝物の増加が確認された。一方、アスピリン投与による尿中 PG 代謝物の低下は確認できたが、筋病理など実際の治療効果に繋がる結果は得られなかった。今後の研究においては、臨床病型、筋病理が病態と近い、FCMD モデル動物の開発が必要と考える。

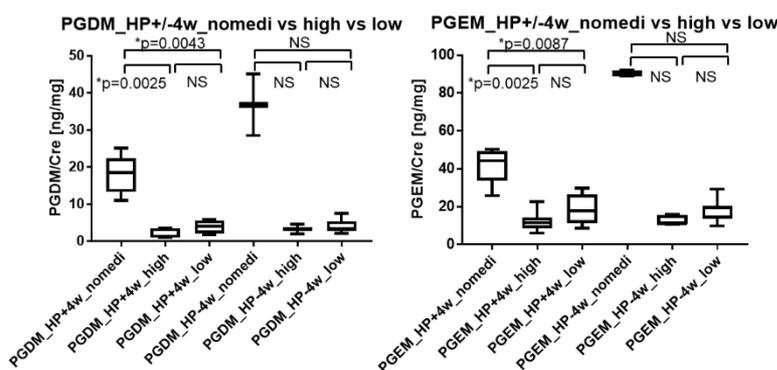


図4 t-PGDM, t-PGEM アスピリン投与比較

- 1) Okinaga T et al. Induction of hematopoietic prostaglandin D synthase in hyalinated necrotic muscle fibers: its implication in grouped necrosis. *Acta Neuropathol.* 2002;104:377-84.
- 2) Mohri I et al. Inhibition of prostaglandin D synthase suppresses muscular necrosis. *Am J Pathol.* 2009;174:1735-44.
- 3) Nakagawa T et al. 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) Takeshita E et al. Urinary prostaglandin metabolites as Duchenne muscular dystrophy progression markers. *Brain Dev.* 2018;40:918-925

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	池田 真理子(谷口)  (Taniguchi-Ikeda Mariko)  (00410738)	神戸大学・医学研究科・特命准教授    (14501)	
研究分担者	竹内 敦子  (Takeuchi Atsuko)  (80154970)	神戸薬科大学・薬学部・准教授    (34512)	
連携研究者	裏出 良博  (Urade Yoshihiro)  (10201360)	筑波大学・学内共同利用施設等・教授    (12102)	