

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293051

研究課題名(和文) プロスタグランジンD2情報伝達制御による筋ジストロフィーの進行抑制法の確立

研究課題名(英文) Chronic Treatment of Hematopoietic PGD Synthase Inhibitor Improves Skeletal Muscle Function and Cardiac Function in DMD

研究代表者

有竹 浩介 (ARITAKE, Kosuke)

筑波大学・国際統合睡眠医科学研究機構・准教授

研究者番号：70390804

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：難病のデュシェンヌ型筋ジストロフィー-モデルマウス (mdx) の傷害骨格筋周囲に浸潤した肥満細胞やマクロファージで造血器型PGD合成酵素(HPGD)の発現が亢進し、PGD2の産生が増加していることを尿中代謝物を指標とした分析によって証明した。HPGDS阻害薬をmdxマウスに投与すると、自発運動量の改善、筋炎症、特に集団的な筋壊死や細胞浸潤が抑制されること、摘出骨格筋を用いた評価から、筋張力の低下を抑制することが判明した。更に、心筋炎症の改善効果も認められた。これらの成果から、HPGDSが産生するPGD2は、DMD病態の進展に関与し、HPGDS阻害薬はDMD病態進行抑制の治療薬となる。

研究成果の概要(英文)：We found that the hematopoietic PGD synthase (HPGDS) catalyzed PGD2 production, estimated by its urinary metabolite (tetranor-PGDM), was significantly enhanced in mdx mice, a model for DMD. We also found that HPGDS expressed on the accumulated mast cells or macrophages around the damaged muscle cells in mdx mice. Chronic treatment with an inhibitor for hematopoietic PGD synthase efficiently decreased inflammatory cell migration in muscles and grouped-necrosis of skeletal muscle, and improved the decrement of locomotor activities, and also ameliorated the isolated skeletal muscle contraction of mdx. HPGDS inhibitor treated mdx hearts were less fibrotic, reductions in left ventricular mass and ejection fraction and fractional shortening were also observed. These results demonstrate that over production of PGD2 catalyzed by HPGDS accelerate the DMD pathology and the pharmacological inhibition of hematopoietic PGD synthase might provide functional benefit to DMD patients.

研究分野：薬理学

キーワード：プロスタグランジンD2 プロスタグランジンD合成酵素 デュシェンヌ型筋ジストロフィー 生理活性脂質 肥満細胞 プロスタグランジンD合成酵素阻害薬

1. 研究開始当初の背景

デュシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD) は、X 染色体に座位するジストロフィン遺伝子の変異によって発症する進行性筋疾患である。その発症頻度は男児の約 3,500 人に 1 人と高頻度な遺伝子疾患であり、多くの患者は 30 歳前に横隔膜骨格筋変性による呼吸器障害或いは心不全により死亡する。DMD に対して、遺伝子治療や再生移植治療が試みられているが実用には至っておらず根本的な治療法や治療薬は現在のところ無い。一方、病因遺伝子が特定されているにも関わらず、病態の進行度や重篤度が、患者によって大きく異なることから、病態の進行には他の要因が大きく関わると考えられる。

プロスタグランジン (PG) D₂ は、アレルギーや炎症反応のメディエーターとして肥満細胞や Th2 リンパ球で活発に産生され、2 種類の PGD₂ 受容体 (DP1 と DP2) を介して局所への炎症細胞の遊走や平滑筋収縮あるいは血管透過性亢進など様々な生理作用を示す生理活性脂質である。

我々は、遺伝子改変マウスや、酵素発現細胞、リコンビナント酵素タンパク質の X 線結晶構造解析技術、或いは共同研究を通じて決定した PGD₂ 合成酵素の立体構造を用いて酵素反応触媒機構や PGD₂ の病態生理作用について精査してきた。その研究過程で、デュシェンヌ型筋ジストロフィー患者やそのモデル動物において、1) 傷害筋とその周囲の筋肉組織に HPGDS の発現が誘導され、HPGDS 阻害薬の投与は筋壊死の進行を軽減できることを発見した。これらの結果は、壊死筋やその周囲で HPGDS の発現が亢進し、その触媒作用で PGD₂ が積極的に産生され、PGD₂ 受容体を介して DMD 病態の進行に大きく関わっていることを示すものである。

2. 研究の目的

これまでに、DMD の損傷筋肉組織において、生理活性脂質プロスタグランジン (PG) D₂ の合成酵素 (HPGDS) や PGD₂ 受容体の発現が亢進し、HPGDS のプロトタイプ阻害薬を DMD モデル動物に投与すると、PGD₂ 産生抑制を伴って、病態の進行を抑制できることが示唆された。そこで、DMD の進展に関与する PGD₂ とその合成酵素や受容体の機能を詳細に調べ、PGD₂ による骨格筋炎症病態進行メカニズムと HPGDS 発現制御機構を解明する。

また、DMD 患者の死因は、呼吸不全や心不全に寄る。近年、人工呼吸療法などの進歩により呼吸不全による生命予後が改善する一方、心不全の死因に占める割合が増加している。従って、DMD 患者の心機能の低下を減速することは重要である。そこで、DMD 病態進行に伴った、心機能低下における HPGDS 或いは PGD₂ の関与についても調べ、HPGDS 阻害薬による心機能の改善効果を検

討する。

以上のように、PGD₂ と DMD 病態進行に及ぼす機能を精査し、PGD₂ 情報伝達の制御による画期的な DMD 進行抑制法を開発することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) PGD₂ 情報伝達制御による筋ジストロフィー病態軽減効果の証明

HPGDS 蛋白質とプロトタイプ阻害薬の複合体 X 線結晶構造解析による 3 次元構造座標に基づいて、分子設計と化学合成された選択的かつ強力な阻害薬を DMD モデルマウス (*mdx*) マウスに 1 か月間連日投与して、マウスの自発運動量、骨格筋炎症、組織化学染色、血中筋壊死マーカー等を指標として、薬理的に病態進行抑制効果を調べた。更に、摘出筋を用いて、電気刺激による筋張力に及ぼす効果も調べた。

(2) PGD₂ 情報伝達制御による筋ジストロフィー病態軽減効果の証明

PGD₂ 受容体拮抗薬を *mdx* マウスに 1 か月間連日投与して、マウスの自発運動量、骨格筋炎症、組織化学染色、血中筋壊死マーカー等を指標として、薬理的に病態進行抑制効果を調べた。

(3) PGD₂ 情報伝達制御による筋ジストロフィー病態軽減効果の証明

mdx マウスに甲状腺ホルモンのトリイオドサイロニン (T₃) を 2 週間以上投与すると心筋の線維化を伴った拡張型心筋症を発症させることができる。*mdx* マウスに T₃ を 2 mg/kg の用量で 1 日 1 回、2 週間、皮下投与し、T₃ 投与開始と同時に HPGDS 阻害薬を投与して、心機能の低下に及ぼす作用を調べる。

(4) PGD₂ 安定代謝物の微量定量と病態との相関、治療効果の証明

PGD₂ は筋壊死損傷組織の局所で発現が亢進する HPGDS の触媒作用で産生されて近傍の組織や浸潤細胞に発現する DP 受容体に結合して作用すると考えられる。PGD₂ は化学的かつ生理的に不安定な物質であり、生体内で産生された PGD₂ そのものを直接定量することは困難である。そこで、DMD 病態の進行に伴って局所で産生される PGD₂ を捕捉する為に安定代謝物 (tetranor-PGD₂) を高速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) 法を用いて定量する。

更に、代謝物の簡易測定系の構築を目的として、代謝物 (tetranor-PGD₂) に特異的なマウスモノクローナル抗体の作製を行う。

4. 研究成果

(1) HPGDS 阻害薬による筋ジストロフィー病態軽減

mdx マウスに経口投与で有効な選択的 HPGDS 阻害薬を 5 週齢から 1 ヶ月間、持続的に経口投与して、病態進行に及ぼす作用を調べた。評価には、行動量、血液生化学、骨格筋への色素漏出量 (筋肉炎症)、尿中代謝

物、組織学を指標とした。

同週齢の健常マウスに比べて、溶媒を投与した *mdx* マウスは暗期の自発運動量（行動量）が有意に減少した。*mdx* マウスに 5 週齢から 1 ヶ月間 HPGDS 阻害薬を投与すると、溶媒投与に比べて用量依存的な暗期行動量の改善が認められた。筋炎症生化学マーカー (CPK) は、健常マウスに比べて溶媒投与した *mdx* マウスは有意な高値を示し、HPGDS 阻害薬を投与すると抑制傾向を示した。筋組織への色素取り込み量、或いは組織化学的解析を行ったところ、健常マウスに比べて *mdx* マウスは、有意な色素漏出量の増加と IgG 染色陽性の筋繊維（集団的筋壊死）を特徴とする顕著な筋炎症が認められた。HPGDS 阻害薬を投与すると色素漏出量は減少し、また IgG 染色陽性の筋繊維が減少した。

HPGDS 阻害薬を 1 か月間投与したマウスの長指伸筋を用いて、筋張力に及ぼす効果を調べた。健常の C57BL/6 マウスに比べて、溶媒を投与した *mdx* マウスの摘出長指伸筋は、電気刺激を繰り返すと、有意に張力が低下するが、阻害薬を 1 か月間投与した *mdx* マウスの摘出長指伸筋は電気刺激による張力の低下の程度が C57BL/6 マウスのそれと同程度であった。

(2) DPI 受容体拮抗薬による筋ジストロフィー病態軽減

mdx マウスに経口投与で有効な選択的 PGD₂ 受容体サブタイプ 1 (DPI 受容体) 拮抗薬を 5 週齢から 1 ヶ月間、持続的に経口投与して、病態進行に及ぼす作用を調べた。CPK、筋組織への色素取り込み量、或いは組織化学的解析を行ったところ、溶媒を投与した *mdx* マウスに比べて改善する傾向がみられたが、いずれも統計的有意性は認められなかった。

(3) HPGDS 阻害薬による拡張型心筋症病態進行改善効果

mdx マウスに甲状腺ホルモンのトリヨードサイロニン (T3) を 2 週間以上投与すると心筋の線維化を伴った拡張型心筋症を発症させた。ここに HPGDS 阻害薬を 2 週間以上投与して、心筋症に及ぼす効果を調べた。評価には、血液生化学、超音波エコーによる心機能検査、組織学的な評価により行った。

mdx マウスに T3 を 2 mg/kg の用量で 1 日 1 回、2 週間、皮下投与すると、対照として生理食塩水を投与した *mdx* マウスに比べて、心重量の増加、血中心筋炎症マーカー (Cardiac Troponin I) の増加、心機能 (左室内径短縮率; FS, と左室駆出率; EF) の低下、心臓の線維化が認められた。この時、心臓の HPGDS、シクロオキシゲナーゼ、PGD₂ 受容体 (DPI と DP2) それぞれの mRNA の発現量が対照に比べて有意に増加していた。さらに、免疫組織化学的解析の結果、HPGDS は主として、心組織中に浸潤した肥満細胞に発現していることが判明した。この T3 の投与で、PGD₂ 産生に関わる遺伝子の発現増加を伴っ

て発症する心筋症モデルマウスに HPGDS 阻害薬を T3 投与開始から 2 週間持続的に投与すると、血中 Cardiac Troponin I の低下、心機能低下 (FS と EF 値の低下)、心筋の線維化をいずれも有意に抑制することが判明した。更に、*mdx* マウスに 3 週間以上 T3 投与を継続すると、死亡率が上昇するが、HPGDS 阻害薬は死亡率も有意に低下した。

(4) PGD₂ 安定代謝物の微量定量と病態との相関、治療効果の証明

HPGDS 阻害薬或いは溶媒を 5 週齢から 1 か月間投与した *mdx* マウス、または健常の C57BL/6 マウスの尿中 PGD₂ 代謝物 (tetranor-PGDM) を LC-MS/MS 法を用いて分析した。健常マウスに比べて *mdx* マウスでは尿中 tetranor-PGDM 量が有意に増加した。HPGDS 阻害薬を投与した *mdx* マウスの尿中 tetranor-PGDM は、溶媒投与に比べて有意な減少が認められた。

以上の結果から、尿中代謝物は DMD の新たな病態進行マーカーとなりうる事が期待された。

そこで、簡易測定系の構築を目的として、tetranor-PGDM に対する抗体の作製を行った。体内で PGD₂ (および tetranor-PGDM) がほとんど作ることができない PGD 合成酵素遺伝子欠損マウス (Balb/c 系) 或いは Balb/c マウスに tetranor-PGDM をキャリア蛋白質 (keyhole limpet hemocyanin, KLH) と共に免疫したところ、PGD 合成酵素遺伝子欠損マウスでは特異的な抗体産生が認められた。

今後、この抗体を用いて酵素免疫法による測定系を作製する予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線) (1-6)

〔雑誌論文〕(計 6 件) すべて査読あり

1. Iwanaga, K., Nakamura, T., Maeda, S., Aritake, K., Hori, M., Urade, Y., Ozaki, H., and Murata, T. (2014) Mast cell-derived prostaglandin D2 inhibits colitis and colitis-associated colon cancer in mice. *Cancer Res* **74**, 3011-3019
10.1158/0008-5472.CAN-13-2792
2. Kaushik, M. K., Aritake, K., Kamauchi, S., Hayaishi, O., Huang, Z. L., Lazarus, M., and Urade, Y. (2014) Prostaglandin D(2) is crucial for seizure suppression and postictal sleep. *Exp Neurol* **253**, 82-90
10.1016/j.expneurol.2013.12.002
3. Moniot, B., Ujjan, S., Champagne, J., Hirai, H., Aritake, K., Nagata, K., Dubois, E., Nidelet, S., Nakamura, M., Urade, Y., Poulat, F., and Boizet-Bonhoure, B. (2014)

Prostaglandin D₂ acts through the Dp2 receptor to influence male germ cell differentiation in the foetal mouse testis. *Development* **141**, 3561-3571
10.1242/dev.103408

4. **Nagata, N.**, Iwanari, H., Kumagai, H., Kusano-Arai, O., Ikeda, Y., **Aritake, K.**, Hamakubo, T., and **Urade, Y.** (2017) Generation and characterization of an antagonistic monoclonal antibody against an extracellular domain of mouse DP2 (CRTH2/GPR44) receptors for prostaglandin D₂. *PLoS One* **12**, e0175452
10.1371/journal.pone.0175452
5. Nakamura, T., Fujiwara, Y., Yamada, R., Fujii, W., Hamabata, T., Lee, M. Y., Maeda, S., **Aritake, K.**, Roers, A., Sessa, W. C., Nakamura, M., **Urade, Y.**, and Murata, T. (2017) Mast cell-derived prostaglandin D₂ attenuates anaphylactic reactions in mice. *J Allergy Clin Immunol*
10.1016/j.jaci.2017.02.030
6. Nakamura, T., Maeda, S., Horiguchi, K., Maehara, T., **Aritake, K.**, Choi, B. I., Iwakura, Y., **Urade, Y.**, and Murata, T. (2015) PGD₂ deficiency exacerbates food antigen-induced mast cell hyperplasia. *Nat Commun* **6**, 7514
10.1038/ncomms8514

[学会発表](計 4 件)

1. Tanaka K, **Aritake K** et al. Inhibition of hematopoietic prostaglandin D synthase improves symptoms of muscular dystrophy in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy. SFN (北米神経学会), 2014Nov.15 ワシントン DC (米国)
2. Tanaka K, **Aritake K** et al. Novel inhibitor of hematopoietic prostaglandin D synthase improves the muscle disorder in an experimental model of Duchenne muscular dystrophy. World Muscle Society (国際筋肉学会), 2014Oct10 ベルリン (ドイツ)
3. 中村達朗、山田涼太、前田真吾、**有竹浩介**、裏出良博、村田幸久. 肥満細胞由来の PGD₂ はアナフィラキシーを抑制する。獣医学会, 2015年9月8日、北里大学、青森県十和田市
4. **Aritake K**, Shimamoto S, **Urade Y**, Lipocalin-type prostaglandin D synthase: a transporter of prostaglandin D₂ and scavenger of prostaglandin D₂-degraded products.

Lipid Mediator & PLA₂. 2016May20、サンディエゴ (米国).

[図書](計 1 件)

裏出良博、**有竹浩介**、造血器型プロスタグランジン D 合成酵素阻害薬による Duchenne 型筋ジストロフィーに対する信仰軽減療法、医学のあゆみ、Vol. 259 No.1

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

有竹 浩介 (ARITAKE, Kosuke)
筑波大学・国際統合睡眠医科学研究機構・
准教授
研究者番号：70390804

(2) 研究分担者

永田 奈々恵 (NAGATA, Nanae)
筑波大学・国際統合睡眠医科学研究機構・
研究員
研究者番号：80390805

(3) 連携研究者

裏出 良博 (URADE, Yoshihiro)
筑波大学・国際統合睡眠医科学研究機構・
教授
研究者番号：10201360