

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 26 日現在

機関番号：84425

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591290

研究課題名(和文)デュシェヌ型筋ジストロフィーのバイオマーカーと新規治療方法の開発

研究課題名(英文)Development of biomarker and the new therapeutic method for Duchenne muscular dystrophy

研究代表者

齊藤 利雄(齊藤利雄)(Saito, Toshio)

独立行政法人国立病院機構刀根山病院(臨床研究部)・その他部局等・研究員

研究者番号：60538776

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：Duchenne型筋ジストロフィー(DMD)の病態には、血管平滑筋機能異常による筋微小循環障害が影響し、血流障害を反映する末梢血循環CD34陽性細胞数は、低年齢層DMDで高値傾向を示す。しかしながら、DMDの筋血流改善による病状改善を目的とした、Phosphodiesterase 5A阻害剤投与での末梢血CD34陽性細胞数変動は一定せず、治療マーカーとしての有用性評価には検討が必要と考えられた。

研究成果の概要(英文)：In Duchenne muscular dystrophy (DMD), microcirculation abnormalities due to the vascular smooth muscle dysfunction influence the pathomechanism of the disease. The number of the peripheral blood circulation CD34-positive cell counts, which reflects microcirculation abnormalities, shows a higher tendency in low age group of DMD. However, the changes of number of peripheral blood CD34-positive cell counts showed no significant change in the phosphodiesterase 5A inhibitor administration for the purpose of improvement of DMD condition by affecting the microcirculation improvement. It is necessary to evaluate the number of peripheral blood CD34-positive cell counts whether it is useful as the DMD treatment marker.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学 神経内科学

キーワード：Duchenne型筋ジストロフィー 微小循環障害 末梢血血管内皮前駆細胞 ホスホジエステラーゼ5阻害剤

1. 研究開始当初の背景

- (1) その原因が異なっても、神経筋疾患では、低酸素血症や組織血流異常は病状や病態に影響を及ぼす。Duchenne 型筋ジストロフィー (Duchenne muscular dystrophy; DMD) の筋崩壊は、ジストロフィン欠損でひき起こされる筋線維脆弱性が主要因と考えられているが、血管平滑筋機能異常に起因する筋血流の異常は、筋線維の壊死・崩壊を増悪させる。一方、末梢血 CD34 陽性細胞は、脳血管障害などで血流障害の病態を反映する血管障害・新生マーカーであることが知られている。この末梢血 CD34 陽性細胞は、DMD の病態マーカーとなりうる可能性がある。
- (2) Phosphodiesterase 5A 阻害剤 (PDE5 阻害剤) は、肺動脈平滑筋、陰茎海綿体血管抵抗を低下させることが知られているが、同薬剤は、筋血管平滑筋にも作用し、筋ジストロフィーモデルマウスでの筋血流・臨床症状改善効果や、心筋症に対する効果が報告されている。

1. 研究の目的

- (1) 神経筋疾患患者の血液中血管新生関連マーカーを測定し、病態との関連を検討する。
- (2) DMD 患者に対する PDE5 阻害剤投与の安全性、DMD 病状・検査所見改善に対する有効性を検討する。

3. 研究の方法

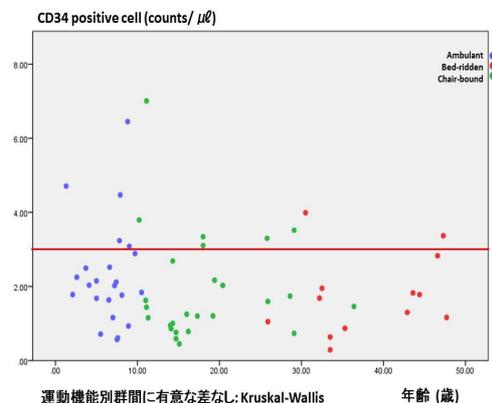
- (1) 対象疾患: DMD, 筋強直性ジストロフィー (Myotonic dystrophy; DM), 脊髄性筋萎縮症 (Spinal muscular atrophy; SMA) .
方法: DMD 延べ 62 例, 1.3~47.7 歳 (平均 13.0 歳), 全例男性, 自発呼吸/NPPV/気管切開: 35/17/10, 独歩/車椅子/臥床: 23/26/13 .
DM 延べ 19 例, 1.7~67.7 歳 (18.3), 男/女: 8/11, 自発呼吸/NPPV/気管切開: 10/7/2, 独歩/車椅子/臥床: 10/5/4 .
SMA 延べ 35 例, 3.0~58.3 歳 (14.4), 男/女: 13/22, 自発呼吸/NPPV/気管切開: 8/24/3, 車椅子/臥床: 31/4 .
健康対象 (healthy control; HC) 延べ 15 例, 6.9~48.7 歳 (15.1), 男/女: 9/6 .
全対象の血清クレアチンキナーゼ (CK), 末梢血中 CD34 陽性細胞数 (CD34), また、DMD 延べ 46 例, DM 17 例, SMA 15 例, HC 延べ 13 例の血清 angiogenin, MMP9 を測定し、各パラメータ間の相関、病状との関連を検討した。
- (2) 対象は DMD 5 例。症例 1: 10 歳, 症例 2: 17 歳, 症例 3: 7 歳, 症例 4: 11 歳, 症例 5: 9 歳で、いずれもジストロフィン遺伝子変異の存在あるいは生検筋でのジストロフ

イン発現のないことが確認されている。症例 3, 5 は独歩可能で、他例は車椅子使用の状態。全例自発呼吸は保たれる。症例 2 は脊柱固定術を施行している。症例 1, 3, 4 はステロイド使用中, 症例 2 は ACE 阻害剤, 遮断剤を使用中である。PDE5 阻害剤のシルデナフィルを 0.25mg/kg から 1.0mg/kg まで漸増の後、投与終了前に半減し、14 日間投与した。投与前 (pre), 投与終了前 (post), 投与終了 2 週~2 月 (after) で以下の項目を評価した。自覚的・他覚的病状変化。血圧。徒手筋力テスト, MFM-32, 呼吸機能検査 (VC, CPF, MIC), 心機能検査 (心エコー, 12 誘導心電図, ホルター心電図), 胸部レントゲン撮影, 血清 CK, BNP など一般血液検査, 末梢血 CD34 陽性細胞数, 活動量計による運動量測定, Near-infrared Spectroscopy (NIRS) による筋血流評価。また、症例 3, 5 では 6 分間歩行距離も評価した。

4. 研究成果

- (1) 血清 CK は、DMD で 49~33374 IU/l (平均 \pm SE; 5800 \pm 970 IU/l), DM で 14~937 IU/l (222.3 ± 55.8), SMA で 11~138 IU/l (47.0 ± 5.7), HC で 71~223 IU/l (141.0 ± 12.1) であった。CD34 は、DMD で 0.29~7.01 counts/ μ l (2.03 ± 0.17 counts/ μ l), DM で 0.18~2.11 counts/ μ l (0.89 ± 0.11), SMA で 0.26~5.53 counts/ μ l (1.61 ± 0.18), HC で 0.62~6.31 counts/ μ l (1.84 ± 0.39) であった。DMD での血清 CK と CD34 の相関は明らかではなかった。CD34 は若年齢で高値の傾向を示したが、運動機能別群で群間に有意な差はなかった (図 1)。SMA では、CD34 が高値傾向であったのは、NPPV コンプライアンス不良例、自発呼吸不安定が疑われる例であった。DMD では筋崩壊が、SMA では呼吸不全が、CD34 に関連する可能性があると考えられた。低酸素状態にあると考えられる DM で、CD34 が低値傾向であり、今後検討すべき課題と考えられた。

図 1



Angiogenin は, DMD で 484.1 ~ 2943.3 pg/ml (1451.9 ± 74.0 pg/ml), DM で 1013.1 ~ 4363.7 pg/ml (2065.4 ± 227.1), SMA で 1114.4 ~ 5289.3 pg/ml (2130.9 ± 282.6), HC で 1388.3 ~ 2443.5 pg/ml (1885.8 ± 90.3), MMP9 は, DMD で 0.98 ~ 16.00 ng/ml (4.24 ± 0.36 ng/ml), DM で 0.71 ~ 5.00 ng/ml (1.96 ± 0.27), SMA で 0.34 ~ 8.46 ng/ml (3.00 ± 0.61), HC で 1.24 ~ 4.91 ng/ml (2.90 ± 0.35)であった。歩行可能な DMD の angiogenin は, 臥床状態の DMD よりも有意に低値であったが, HC と比しても有意に低値であり, DMD の血管障害マーカーとしては不適当と考えられた。DMD の MMP9 は年齢とともに上昇傾向を示したが, 運動機能別の群間差はなかった。

- (2) 症例 1~5 いずれも投与を完遂した。最高投与量は症例 1:40mg/日, 症例 2:30mg/日, 症例 3:25mg/日, 症例 4:30mg/日, 症例 5:20mg/日であった。症例 4 で投与開始後の顔面火照りを訴えたが, その後再びの訴えはなかった。臨床的に問題となる程度の血圧変動はなかった。徒手筋力テストに大きな変化なく, MFM-32, 呼吸機能, 心エコーでの駆出率, ホルター心電図での平均心拍数にも大きな変化はなかった。胸部レントゲン, 12 誘導心電図所見の変化はなかった。血清 CK (IU/l) の変動は, 症例 1:pre, 4928; post, 5575; after, 4446, 症例 2:1635; 1851; 2022, 症例 3:11404; 24638; 12434, 症例 4:3836; 7581; 4989, 症例 5:5809; 12810; 5854 と一定しなかったが, BNP はほぼ正常範囲内の変動にとどまった。CD34 陽性細胞数 (counts/ μ l) の変動は, 症例 1:pre, 3.8; post, 10.96; after, 5.04, 症例 2:1.2; 1.5; 1.32, 症例 3:2.12; 2.95; 2.53, 症例 4:7.01; 5.3; 3.34, 症例 5:3.2; 2.8; 2.4 と, 症例 1 では投与後に大きく変動し, 病状との関連は明らかではなかった。活動量測定は日ごとの変動が大きかったが, 歩行可能な症例 3, 5 の活動量は, 投与期間中増加傾向であった。NIRS による筋血流測定は測定ごとの変動が大きく, 評価困難であった。症例 3 の 6 分間歩行距離は, pre, 388m; post, 347m; after, 369m, 症例 5 は 60; 60; 45 であった。14 日間の短期間投与では, 各評価項目の明らかな改善は認めず, 血清 CK と CD34 陽性細胞数の変動の関係も明らかでなかった。しかしながら, 臨床的に問題となる副作用も認めず, 短期間投与での安全性は確認されたと考えられた。
- (3) DMD の治療マーカーとしての可能性を考え, 末梢血中 CD34 陽性細胞数を測定したが, 当初の仮説通り, 末梢血中 CD34 陽性細胞は DMD の病態に関連すると考えられたものの, 現時点では治療判定に有用なマーカーとはいえなかった。

また, DMD 成人例の剖検心筋を用いた血管内皮細胞を中心とする CD34 陽性細胞の局在検討も行ったが, 心筋間での血管内皮細胞は減少しており, 心筋が相対的に虚血, 低酸素の状態に置かれていることが推定された。正確な病態把握には, 本検体と, 小児例での心筋, 骨格筋との比較検討, 小児例心筋, 骨格筋と末梢血中 CD34 陽性細胞との関連の検討を行う必要がある。

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)

[雑誌論文](計 1 件)

Saito T, Kikuchi-Taura A, Tada S, Iyama A, Kimura N, Matsumura T, Fujimura H, Sakoda S. Molecular biomarker of angiogenesis in neuromuscular disorders. *Neuromuscul Disord* 2013; 23: 809.
<http://dx.doi:10.1016/j.nmd.2013.06.595>

[学会発表](計 6 件)

Saito T, Kikuchi-Taura A, Iwata Y, Muneshige E, Yamamoto H, Nishizono H, Matsumura T, Fujimura H, Sakoda S. A Trial of Sildenafil treatment for patient with Duchenne muscular dystrophy. *ICNMD 2014 - 13th International Congress on Neuromuscular Diseases*. July 5-10, 2014. Nice, France.

齊藤利雄, 田浦映恵, 岩田裕美子, 井下兼一郎, 宗重絵美, 川村佳祐, 松村 剛, 藤村晴俊, 佐古田三郎. Duchenne 型筋ジストロフィーに対するシルデナフィル投与の試み. 第 56 回日本小児神経学会学術集会. 2014 年 5 月 29-31 日, 浜松.

Saito T, Kikuchi-Taura A, Tada S, Iyama A, Kimura N, Matsumura T, Fujimura H, Sakoda S. Molecular biomarker of angiogenesis in neuromuscular disorders. *18th World Muscle Society*. October 1-5, 2013, Asilomar conference grounds, California, USA.
齊藤利雄, 松村 剛. 神経筋疾患の血管新生マーカー. 第 55 回日本小児神経学会学術集会. 2013 年 5 月 29 日 6 月 1 日, 大分.

Saito T, Kikuchi-Taura A, Soma T, Iyama A, Kimura N, Matsumura T, Fujimura H, Sakoda S. Circulating CD34-positive cells in muscular dystrophy. *The 11th Annual Asian and Oceanian Myology Center (AOMC) Scientific Meeting*. June 7-8, 2012, Kyoto.

齊藤利雄, 田浦映恵, 相馬俊裕, 松村 剛,

猪山昭徳，木村紀久，藤村晴俊，佐古田三郎．神経筋疾患の血管新生マーカー．第53回日本神経学会学術大会．2012年5月25日，東京．

〔図書〕(計 1 件)

Saito T. Coagulation and fibrinolysis abnormalities in patients with muscular dystrophy. Fibrinolysis and Thrombolysis. Intech, 2014.

〔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

齊藤 利雄 (SAITO, Toshio)
国立病院機構刀根山病院 神経内科・医長
研究者番号：60538776

(2) 研究分担者

大平 充宣 (OHIRA, Yoshinobu)
大阪大学医学(系)研究科(研究院)・教授
研究者番号：50185378

藤村 晴俊 (FUJIMURA, Harutoshi)
国立病院機構刀根山病院 臨床研究部長
研究者番号：20263246

松村 剛 (MATSUMURA, Tsuyoshi)
国立病院機構刀根山病院 神経内科・部長
研究者番号：30549366

佐古田 三郎 (SAKODA, Saburo)
国立病院機構刀根山病院 院長

研究者番号：00178625

(3) 連携研究者

相馬 俊裕 (SOMA, Toshihiro)
兵庫医科大学 血液内科学・准教授
研究者番号：40273619

田浦 映恵 (KIKUCHI-TAURA, Akie)
大阪南医療センター臨床研究部・研究員
研究者番号：80644533

多田 智 (TADA, Satoru)
大阪大学 微生物病研究所
分子免疫制御分野
研究者番号：70626530

山寺みさき (YAMADERA, Misaki)
国立病院機構刀根山病院 神経内科・医員
研究者番号：90649906