

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 1 日現在

機関番号：34509

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2011

課題番号：23659521

研究課題名（和文） Duchenne 型筋ジストロフィーはプロスタグランディンの関与する炎症か？

研究課題名（英文） Dose prostaglandin -mediated inflammation commit to pathology of Duchenne muscular dystrophy?

研究代表者

松尾 雅文(MATSUO MASAFUMI)

神戸学院大学・総合リハビリテーション学部・教授

研究者番号：10157266

研究成果の概要（和文）：Duchenne型筋ジストロフィー（DMD）の病態にプロスタグランディンを介した炎症が関与していることを明らかにするため、患者尿中のプロスタグランジンD<sub>2</sub>（PGD<sub>2</sub>）代謝産物の解析と患者筋肉中のプロスタグランジン合成酵素の発現解析を行った。その結果、尿中のPGD<sub>2</sub>の代謝産物である tetranorPGDMをDMD患者の早朝第1尿で測定したところ、正常より高いことが判明した。また、その尿中へ排出量の年齢変化をみると8歳からさらに急上昇することかが明らかになった。これはこの時期のDMD患者の歩行喪失時期と一致しており、病態的意義は深いものと考えられた。そして、この結果は、PGD<sub>2</sub>合成酵素阻害剤によるDMDの治療の可能性を示唆する結果であった。

研究成果の概要（英文）：Prostaglandin-mediated inflammation was examined in Duchenne muscular dystrophy by examing urinary prostaglandin D<sub>2</sub> metabolite and expression of prostaglandin D<sub>2</sub> synthesis in muscles. It was found that urinary excretion of tetranor PGDM was elevated in Duchenne muscular dystrophy.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医療薬学

科研費の分科・細目：内科系・臨床医学・小児科学

キーワード：筋ジス ジストロフィン PGD<sub>2</sub> 炎症

## 1. 研究開始当初の背景

Duchenne 型筋ジストロフィー（DMD）は進行性の筋萎縮症で、骨格筋の細胞膜裏打ちタンパクであるジストロフィンを欠損を特徴とする。そのため、過去数十年に亘り膜の構造異常が DMD の基本病態であると考えられてきた。申請者はこれまで数百名の DMD 患者の分子病態の解析を進めてきた。そして、全く同じ遺伝子の異常によるジストロフィン欠損を有する兄弟でも臨床症状に大きな差がある等、ジストロフィン欠損のみでは説明出来ない事実に遭遇してきた。こうしたことから、申請者は DMD の鍵病態は「ジストロフィン欠損に続発する炎症、特にプロスタグランジン（PG）をメディエーターとする炎症」であるとの仮説を立てるに至った。そして、DMD

患者の PG D<sub>2</sub>（PGD<sub>2</sub>）代謝に着目し、この仮説を検討した。着想通りに DMD 患者が PGD<sub>2</sub> の代謝産物を大量に尿中に排泄していることを示唆する結果を得つつある。そこで、本研究ではさらに多くの DMD 症例を対象としてこの仮説を証明するものである。その成果は、世界で初めて PGD<sub>2</sub> が DMD の臨床症状発現の鍵の病態と深く関わっていることを明らかにするものである。

## 2. 研究の目的

本研究は、百名以上の DMD 患者を対象として尿中 PGD<sub>2</sub> 代謝産物を解析し、その排泄亢進を明らかにする。さらに、PGD<sub>2</sub> 合成酵素遺伝子の発現亢進を DMD 患者筋細胞において明らかにするものである。PGD<sub>2</sub> が DMD の病態の鍵であることを明らかにす

る世界で最先端の研究である。そのため、尿中のPGD<sub>2</sub>代謝産物の解析をLC-MS/MSを用いて行い、DMDの病態とPGD<sub>2</sub>排泄量との関連を明らかにする。さらに、DMD患者骨格筋のPGD<sub>2</sub>合成酵素の遺伝子発現量を解析し、その発現亢進を明らかにすると共に、尿中PGD<sub>2</sub>代謝産物との関連を明らかにする。

### 3. 研究の方法

本研究は、百名以上のDMD患者のを対象として、従来の分子病態の解析に加え、尿中PG代謝産物の解析・遺伝子発現解析を実施した。

#### 1) DMD患者のプロスタグランジンD<sub>2</sub>代謝産物の質量分析解析

プロスタグランジンD<sub>2</sub>(PGD<sub>2</sub>)の尿中代謝産物(tetranor PGDM:+PGDM)を分析することによりDMD患者でのPGD<sub>2</sub>産生亢進を解析した。

DMD患者と正常者の尿中PGD<sub>2</sub>の代謝産物を解析

液体クロマトグラフィータンデム質量分析計(LC-MS/MS)を応用したPGD<sub>2</sub>の代謝産物の解析システムを用いて、尿中のtPGDMを微量サンプルで正確に定量した。ここでは、さらに多くのDMD患者で解析するのみならず、正常者・他の型の筋ジストロフィー等、筋の炎症が疑われる患者から尿を採取し、尿中のtPGDMを測定した。

DMD患者のtPGDMの病態意義の解析

これまでのtPGDMの検討では、尿中への排泄の変化は日内変動を含めて、多くの因子が関与していることが明らかにされつつある。そこで、尿中tPGDMの病態的意義を明らかにするために、各種病態とtPGDMとの関連を患者年齢との関係などを考慮に入れつつ解析した。

そして、バイオマーカーとしてのtPGDMの意義を確立した。さらに、血清クレアチンキナーゼとの比較検討、ジストロフィン遺伝子の異常との関連についても検討した。

#### 2) DMD患者におけるPGD<sub>2</sub>合成酵素の発現解析

PGD<sub>2</sub>合成酵素のDMD患者での特異的な発現亢進を明らかにするために、リアルタイムPCRを用いてPGD<sub>2</sub>合成酵素mRNAの発現量を定量的に解析した。この定量解析量とDMD患者の臨床パラメーターとの比較検討を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) DMD患者の尿中代謝産物解析

尿中のPGD<sub>2</sub>の代謝産物であるtPGDMを50名近くのDMD患者の随時尿を用いて測定した(図1)。tPGDM値は一日の中で変動が大きいことが判明した。

特に運動との間で関連があることが示唆された。その中で、早朝第1尿がどの症例においても最低値を示した。そこで、早朝第1尿を用いて、尿中tPGDMを比較することとした。

早朝第1尿で正常29例と比較したところDMD207例では尿中tPGDM値がDMDで有意に高いことが判明した。また、DMD患者でtPGDMの尿中へ排出量の年齢変化をみると8歳からさらに急上昇することが明らかになった。これはこの時期のDMD患者の歩行喪失時期と一致しており、病態的意義は深いものと考えられた。

この尿中tPGDMと血清クレアチンキナーゼとの関連について比較した。その結果、血清クレアチンキナーゼの低下とともに、尿中tPGDMの上昇がみられた。このことも尿中tPGDMと筋萎縮の進行との関連も示唆した。しかし、尿中tPGDMとジストロフィン

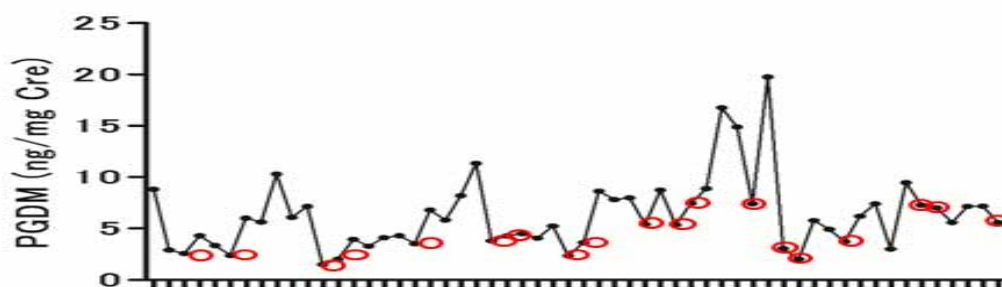


図1 DMD患者の随時尿におけるtPGDM

ある例での随時尿のtPGDM値を示す。縦軸がtPGDM値で、横軸が日である。

印で示した点は早朝第1尿の値を示す。印以外の点は日中に得られた尿での値で、大きく変動することが判る。

遺伝子の異常の型との間には関連はみられなかった。  
 一方、尿中tPGDMを他の筋疾患患者尿で測定したところ、DMD患者のレベルほどではないが、正常よりも高いことが判明した。すなわち、DMD以外の筋ジストロフィーでも明らかな上昇がみられた。一方、ミオパチーの患者では高い傾向が認められた。

### (2) PGD<sub>2</sub> 発現解析

リアルタイム PCR を用いた PGD<sub>2</sub> 合成酵素 mRNA の解析システムの確立に成功した。PGD<sub>2</sub> 合成酵素にはアイソフォームがあり、それぞれが異なった mRNA 構造となっている。2 種のアイソフォームについてそれぞれを特異的に検出する系を確立した。そして、本法を用いて DMD 患者筋での PGD<sub>2</sub> 合成酵素 mRNA の発現量を定量解析した。しかしながら、PGD<sub>2</sub> 合成酵素 mRNA の発現量と年齢との関連あるいは筋病理像との関連について検討したが、有意な結果は得られなかった。

### (3) 考察

本研究では、PGD<sub>2</sub> の代謝産物である tPGDM の尿中排泄量を解析した。PGD<sub>2</sub> は PGD<sub>2</sub> 合成酵素の作用を受け、PGH<sub>2</sub> より産生される (図 2)。

## アラキドン酸カスケード

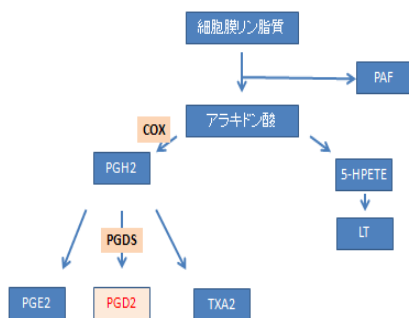


図 2 アラキドン酸カスケード

アラキドン酸からの代謝を示す。  
 PGH<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, TXA<sub>2</sub> と LT が合成されることを示す。

このアラキドン酸カスケードによれば PGH<sub>2</sub> は COX (サイクロオキシゲナーゼ) の作用によりアラキドン酸より産生される。さらに、このアラキドン酸はリン脂質より産生される。一方、アラキドン酸からはプロ

スタグランディンのみならずトロンボキサンなどの生理活性物質が産生される。このようなアラキドン酸カスケードの最下法に位置する tPGDM は、このカスケードの動態を鋭く反映するバイオマーカーと考えられる。

本研究では、PGD<sub>2</sub> の産生に関与する PGD<sub>2</sub> 合成酵素の mRNA 量を DMD 患者筋生検組織で定量測定した。しかし、PGDS mRNA にはあまり有意な変動はとらえられなかった。これは mRNA 発現量よりも酵素タンパクが十分に存在しているためとも考えられ、今後は酵素活性の解析も必要なことが示唆された。アラキドン酸カスケードの中で重要な働きをしているのが COX である。COX 阻害は鎮痛解熱剤のアスピリンの作用点としてよく知られている。この COX の阻害は下流の PGD<sub>2</sub> の産生を抑制することが大きく期待される。

Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) ではジストロフィン欠損による膜の異常に加えプロスタグランディンを介した炎症が関与していることを明らかにした。本成果は、DMD が膜の異常であるとする古典的な概念を打破する画期的なものである。その成果は PGD<sub>2</sub> 合成酵素阻害剤により DMD の治療を可能にするものである。

しかしながら、DMD 患者筋における PGD<sub>2</sub> 合成酵素の発現については、より多数の患者での発現解析を必要とする。

## 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 4 件)  
 投稿論文審査中

〔学会発表〕(計 1 件)  
 日本薬学会第 132 年会, 2012.3.29-31, 札幌

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

垣内涼平, 成田哲也, 竹内敦子, 鎌内慎也, 裏出良博, 松尾雅文,

〔その他〕  
 ホームページ等  
[http://www.kobegakuin.ac.jp/general-information/soran/08\\_rehabilitation/matsuo.html](http://www.kobegakuin.ac.jp/general-information/soran/08_rehabilitation/matsuo.html)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

松尾 雅文 ( MATSUOMASAFUMI )

神戸学院大学総合リハビリテーション学

部・教授

研究者番号 : 10157266