

令和元年6月9日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09959

研究課題名(和文) 銅の体内動態の発達変化に基づいたMenkes病治療薬の開発

研究課題名(英文) Copper supplement therapy based on a developmental change in copper metabolism in Menkes disease.

研究代表者

宗形 光敏 (Munakata, Mitsutoshi)

東北大学・医学系研究科・非常勤講師

研究者番号：30312573

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)：Menkes病は体内銅の欠乏により銅依存性酵素群の致命的機能不全を来す。治療のヒスチジン銅の皮下注射は継続の負担が大きい。銅錯体glyoxal-bis(N(4)-methylthiosemicarbazonato)-copper(II)(Cu-GTSM)の経口投与はMenkes病モデルマウス(マクラマウス)を生存させたが、生後2週齢頃下痢が生じた。この時期、空腸の銅濃度は著しく高値となり、また空腸絨毛の形成不全が観察された。銅キレーター前駆体disulfiramの経口投与は下痢を緩和した。また母体マウスへのCu-GTSMの投与は仔のマクラマウスの生存期間を延長した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来のMenkes病の治療法であるヒスチジン銅の皮下注射は中枢機能の回復が十分でなく、また長期にわたる皮下注射は患者側の負担が大きい。我々は脂溶性有機銅錯体による薬物治療のアプローチを行なっている。これらの化合物の特性を生かせば、経口・経胎盤など投与方法の低侵襲かつ多彩な展開が期待できる。また、出生前診断法の発達も著しい。そこで、銅の体内動態の発達変化を踏まえ、胎児期を含めた治療を検討することは十分に意義がある。Menkes病は希少な疾患であり、大規模な治療薬開発のターゲットになりにくい。臨床の場からの創薬のチャレンジは社会的意義がある。

研究成果の概要(英文)：Menkes disease is a severe X-chromosome-linked disorder caused by mutations in a copper transporter, ATP7A. Parenteral administration of copper-histidine for treatment of the disease has been burden of prolonged injections. Oral copper supplementation via glyoxal-bis(N(4)-methylthiosemicarbazonato)-copper(II)(Cu-GTSM), a lipophilic copper rescued male hemizygous macular mice (MoM1/y), a mouse model of Menkes disease. However, in suckling macular mice, the Cu-GTSM treatment transiently induced diarrhea, accompanied by extreme copper accumulation and altered villus morphology in the ileum. Combined oral administration of disulfiram (DSF), a precursor of diethyldithiocarbamate, a copper chelator, enable reducing a dose of Cu-GTSM and ameliorated Cu-GTSM-induced diarrhea. The combined use of Cu-GTSM and DSF may decrease the chance of adverse enteral effects in oral administration of Cu-GTSM.

研究分野：小児科

キーワード：Menkes病 macular mouse Cu-GTSM

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

メンケス病は銅トランスポーターATP7Aの遺伝子異常による伴性劣性遺伝病である。ATP7Aはほぼ全ての臓器で発現し、細胞質からオルガネラ(ゴルジ体)や細胞外への銅輸送を担う。この機能が完全に失われる変異は胎生致死となるが、メンケス病の変異ではわずかに機能が残存する。その結果出生には至るが、間もなく銅欠乏による機能不全が顕在化する。治療としては、1980年代より現在までヒスチジン銅の皮下注射が行われているが、生後からの投与では血液脳関門に阻まれ脳に対する効果は乏しく、重度の発達遅滞、てんかんを惹起する。そこで、脳へ適切な時期に、的確に銅を送達する新たな治療法が切望されている。

もし、銅を内包して細胞膜を通過し、かつ、目的地に達すると銅を遊離する機能性分子が存在すれば、本疾患のより有効な治療の可能性が開かれる。そこで我々は、核医学用分子プローブとして開発された有機銅錯体に着目した。中でも、Cu-GTSM、Cu-PTSM、Cu-ATSM という一群の化合物は(図1)「高い脂溶性により速やかに脂質膜を通過、細胞内で還元されると銅を遊離する」というユニークな性質を有する(Taniuchi et al., Biol Pharm Bull, 1995)。

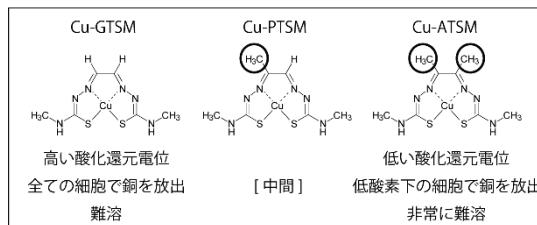


図1 候補となる有機銅錯体

さらに、分子内のメチル基により(図中丸で囲む)錯体内の銅の酸化還元電位が変わる結果、Cu-GTSMはすべての細胞内で還元され銅を放出するのに対し、Cu-PTSM、Cu-ATSMは正常細胞では還元されず、低酸素下もしくは代謝機能不全の細胞に達して初めて銅を放出するという特性差を有する。我々はこれらの化合物を、トランスポーターに依存せずに細胞膜を通過し、目的地(細胞質、オルガネラ内)で銅を遊離する「分子装置」と捉え、メンケス病治療への応用の可能性を検討し、以下の成果を得た。

まず、生後早期よりCu-PTSMの皮下投与を行い、致死的なメンケス病モデルマウス(マクラマウス)を生存させることに成功した。その際、脳においては、銅依存性酵素であるdopamine hydroxylase活性、cytochrome oxidase活性が回復し、Cu-PTSMが血液脳関門を越えて脳内へ銅を送達することが示唆された(Munakata et al., Ped Res, 2012)。

次に、Cu-GTSMが若干の水溶性を有し、胃酸に対しても安定であることから、この錯体の経口投与を試み、マクラマウスが生存することを確認した。ここでも、脳内の銅依存性酵素活性の回復が確認され、Cu-GTSMに由来する銅が実際に脳内で利用されることが示された。

このような経口投与は患者の負担が少なく、その実現は保護者からの強いニーズがある。しかしCu-GTSMの経口投与初期には下痢は見られないが、生後2週齢に一過性の下痢が高頻度に見られた。対照の野生型マウスではこのような下痢は生じない。また生後1ヶ月を過ぎたマクラマウスにCu-GTSMを投与しても下痢は起こらなかった。これはマクラマウスの銅の代謝・動態は成長と共に変化し、その過程で銅の経口投与に対し消化管が脆弱となる時期があると考えられた。安全な銅錯体の経口投与の実現のためには下痢が生じる原因を明らかにし、これを回避する方策を見出す必要がある。

さらに胎盤の胎児側組織にもATP7Aが発現し、積極的に胎児に銅が送られ、胎児肝臓に大量に貯蔵される。しかしメンケス病では肝臓に銅の蓄積は見られず、脳組織の銅濃度も低かった(図2)。胎児期の銅欠乏は永続的な協調運動障害を惹起するため、この時期からの銅補充が治療効果を上げる可能性がある。さらに、胎児の血液脳関門は未熟であるため良好な脳内への銅の移行が期待できる。

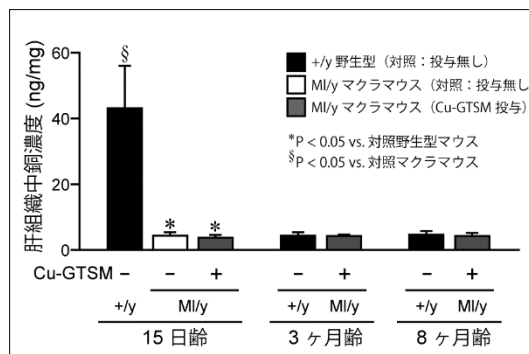


図2 肝組織中銅濃度の成長に伴う変化

## 2. 研究の目的

高い脂溶性によって細胞膜を通過し、銅を細胞内へ送達する有機銅錯体が本疾患の治療に有望である。さらに有機銅錯体 Cu-GTSM は経口投与によっても体内に移行しマクラマウスを生存させた。しかし、Cu-GTSMの経口投与は2週齢のマクラマウスに特異的に下痢を引き起こし、これが経口投与の障害となっている。本研究ではこの下痢の原因を明らかにし、これを回避する方策を見出すことにある。また、出生前から母胎に銅錯体を投与することにより、胎仔消化管を介さずに胎盤経路でマクラマウスに銅を供給し、出生後の成長を補助出来ないか検討する。

## 3. 研究の方法

Cu-GTSMの調製と投与: Cu-GTSMは文献(Gingras et al., Can J Chem, 1962)に従って合成し、乳鉢で細粒化、standard suspension vehicle (SSV)と混合、ソニケーターとボルテックスミキサーを用いて懸濁液とし経口投与する。15日齢の評価では日齢5, 8, 11, 3ヶ月齢の評価では日齢5, 8, 11, 17, 23, 32日にCu-GTSM(10 µg/g b.w.)を経口投与する。

(1) 小腸組織の銅濃度の成長に伴う変化

野生型(+/*y*)およびマクラマウス (MI/*y*)において Cu-GTSM 投与群、非投与群(vehicle のみ)を作成し 15 日齢、3 ヶ月齢において小腸各部位の銅濃度を比較した。各組織片は超純水を用いて作成した生理食塩水で十分に内容物を洗浄した後、高純度濃硝酸中でマイクロウェーブにより分解、誘導結合プラズマ質量分析計(ICP-MS)をもちいて銅濃度を測定した。

#### (2) 小腸病理像の比較検討

15 日齢の小腸組織の各部位は同様に洗浄後、10%中性緩衝ホルマリン液にて固定、H E 染色標本を作製した。染色した標本はバーチャルスライドスキャナにてデジタル化し、空腸絨毛の長さ、径を計測して比較した。

#### (3) Cu-GTSM と銅キレーターの同時経口投与による下痢の緩和の検討

銅の消化管上皮への過剰な蓄積を緩和するため、銅のキレーターの経口投与を併用する。キレーターには予備的検討の結果 disulfiram(DSF)を用いた。(図3) DSFは細胞内で2分子の DEDTC に解離し銅分子をキレートする。この Cu-DEDTC<sub>2</sub> は電荷を持たず脂溶性が高いため細胞膜を越えて拡散する。結果として銅過剰部位から周囲へ移動し、特に脳へ移行しやすいことが知られている。

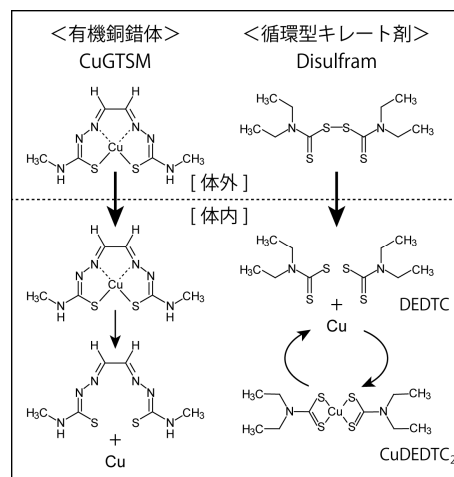


図3 Cu-GTSM と Disulfiram の体内変化

#### (4) 母体への Cu-GTSM の投与の効果

在胎 17 日に妊娠マウスに胃ゾンデを用いて Cu-GTSM (10 μg/g b.w.) を投与する。その後、出産後のマクラマウスの生存日数を観察し Cu-GTSM 非投与の妊娠マウスから生まれたマクラマウスの生存日数と生存期間解析により比較する。

### 4. 研究成果

#### (1) 小腸組織の銅濃度の成長に伴う変化

小腸各部位の銅濃度を 15 日齢、3 ヶ月齢で測定し、比較した(3 群以上の比較では Kruskal-Wallis test、2 群間の比較では Mann-Whitney test を用いた)。結果を図4に示す。

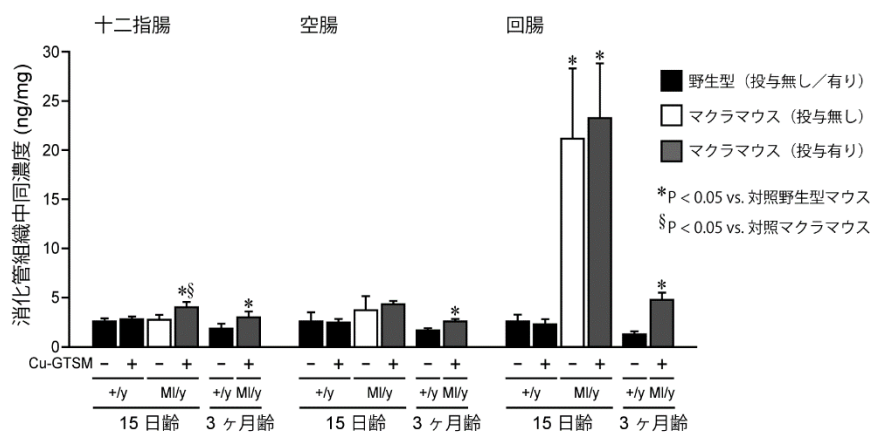


図4 消化管組織中銅濃度の部位別発達変化

野生型(+/*y*)では Cu-GTSM 投与群/非投与群の消化管各部位において銅濃度に差はなかったことから、正常マウスでは消化管から吸収された Cu-GTSM は消化管に蓄積することなく体循環に移行し、また、消化管腔内の Cu-GTSM は十分除かれている。15 日齢のマクラマウスでは回腸の著しい銅の蓄積を認めた。これはこの週齢のマウスでは回腸の銅の吸収が著しく亢進している一方でマクラマウスでは回腸上皮細胞内から門脈側に銅を送る ATP7A の機能不全があることから回腸上皮に異常な銅の蓄積が生じたと考えられる。Cu-GTSM を投与したマクラマウスの回腸ではさらに銅の蓄積は増加したが有意ではなかった。理由としては小腸粘膜上皮のターンオーバーが挙げられる。

(2) 病理組織の観察ではマクラマウスの回腸の絨毛の形成が悪く、絨毛は短く細かった(図5)。Cu-GTSM 投与群ではさらに絨毛長は短くなったが、むしろ太さは増した(図6)。このような絨毛の形態変化は産業動物に銅製剤を投与した場合の報告に類似しており、2 週齢の回腸の過剰な銅負荷が週齢に特異的な Cu-GTSM 投与時の下痢の原因と推察された。

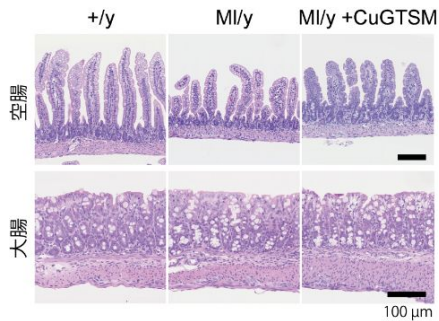


図5 空腸組織像の比較

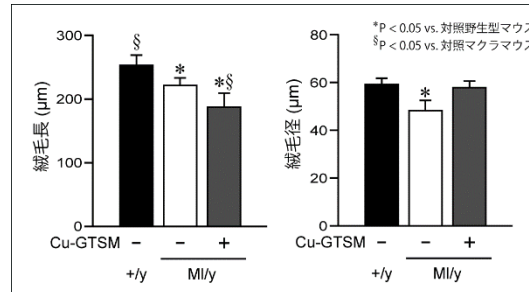


図6 絨毛形態の計測

### (3) Cu-GTSM と銅キレーターの同時経口投与による下痢の緩和の検討

D S F (0.3 mg/g b.w.)を併用することにより、Cu-GTSM の減量(3 μg/g b.w.)が可能となり、また下痢の緩和が見られた。

### (4) 母体への Cu-GTSM の投与の効果

妊娠 17 日で Cu-GTSM (10 μg/g b.w.)を経口投与した母体から生まれたマクラマウスは体毛がかすかに灰色を帯び、生存期間の延長が観察されたが、今回の投与方法では 1 ヶ月齢を越えての生存例は見られなかった。

## まとめ

メンケス病では長期にわたり銅投与を必要とするため、患者の負担を減らす銅製剤の経口投与の確立は臨床的に重要である。しかし、メンケス病の発達病態では生後間もなく一過性に回腸に銅の著しい蓄積が起こり、これが銅製剤 Cu-GTSM の経口投与による銅負荷に脆弱となり下痢を生じる。この問題を解決する手立てとしてキレーター前駆体 D S F の経口投与の併用は有効であると考えられた。また、Cu-GTSM の母体への投与でも、胎仔への銅が移行し、生後の生存に寄与すると示唆された。しかし、母体投与単独では長期生存には至らず、出生後も切れ目無く銅を供給する必要がある。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Munakata M, Kodama H, Tani N, Kimura K, Takahashi H, Maruyama K, Sakamoto Y, Kure S, Menkes disease: Oral administration of glyoxal-bis(N(4)-methylthiosemicarbazonato)-copper(II) rescues the macular mouse, Pediatric Research, 査読有, 84 巻, 2018, 770-777 DOI: 10.1038/s41390-018-0116-7

〔学会発表〕(計 3 件)

小林 昌平、川上 武昭、阪本 優介、宗形 光敏、児玉 浩子、高橋 秀依、中村 悠輔、山岸 喜彰、工藤 敏之、伊藤 清美、メンケス病モデル動物マクラマウスにおける CuGTSM の体内動態の検討、日本薬学会第 139 年会、2019 年 3 月 20-23 日、千葉

宗形 光敏、児玉 浩子、谷 紀彦、木村 和彦、高橋 英依、坂本 吉正、呉 繁夫、Menkes 病モデルマウス(Macular mouse)に対する有機銅錯体の経口投与の効果について、第 22 回日本ウイルソン病研究会、2018 年 5 月 12 日、東京

宗形 光敏、児玉 浩子、谷 紀彦、木村 和彦、高橋 英依、丸山 一雄、呉 繁夫、Menkes 病モデルマウスに対する有機銅錯体経口投与による治療効果の検討、第 58 回日本先天代謝異常学会、2016 年 10 月 27-29 日、東京

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称：  
 発明者：  
 権利者：  
 種類：  
 番号：  
 出願年：  
 国内外の別：

取得状況（計 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：児玉 浩子

ローマ字氏名：**Kodama Hiroko**

所属研究機関名：帝京大学

部局名：医学部

職名：非常勤講師

研究者番号（8桁）：**00093386**

研究分担者氏名：高橋 英依

ローマ字氏名：**Takahashi Hideyo**

所属研究機関名：帝京大学

部局名：薬学部

職名：教授

研究者番号（8桁）：**10266348**

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。