

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 12 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461534

研究課題名(和文) 機能的有機銅錯体を用いたMenkes病に対する新しい治療法の開発

研究課題名(英文) New therapeutic approach using functional copper complexes to treat Menkes disease.

研究代表者

宗形 光敏 (Munakata, Mitsutoshi)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：Menkes病は銅トランスポーターATP7Aの遺伝子異常による希少疾患である。銅の吸収・体内送達ができず銅依存性酵素群の致死的機能不全を来す。治療にはヒスチジン銅が用いられるが、十分な効果が得られず、また、皮下注射を継続する負担も大きい。そこで、Menkes病モデルマウスであるmacularマウスを用いて脂溶性銅錯体Cu-gtsmの経口投与の効果を検討した。Cu-gtsmの経口投与により罹患マウスの生存例が得られ、脳組織の銅濃度の上昇、脳内の銅依存性酵素群の活性の上昇、血清中セルロプラスミン活性の上昇が認められたが、一方、運動能には拙劣さが残存した。さらに、投与時期・量の検討を行う必要がある。

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. We investigated the oral copper supplementation with Cu-gtsm, a lipophilic copper complex, in male hemizygous macular mice, an animal model of Menkes disease. Orally administered Cu-gtsm rescued affected mice with an increase of cerebral copper concentration and activities of cerebral Cu-dependent enzymes including cytochrome oxidase and dopamine-β-hydroxylase. Serum ceruloplasmin activities were also recovered. However, rotarod test performance was still impaired. This study indicates that Cu-gtsm potentially have clinical utility as an oral medication in the treatment of Menkes disease.

研究分野：小児神経学

キーワード：Menkes病 macular mouse

1. 研究開始当初の背景

Menkes 病は銅トランスポーターATP7A の遺伝子変異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、細胞質側から細胞外やオルガネラ（ゴルジ体）内への銅輸送を担う。この機能が完全に失われる変異は胎生致死となるが、Menkes 病の変異ではわずかに機能が残存する。結果、出生に至るが、やがて銅欠乏による機能不全が顕在化する。Menkes 病では食餌中の銅は吸収されず、1980 年代より現在まで、治療としてヒスチジン銅の皮下注射が行われている。しかし、その効果は限定的で(Munakata et al. Brain Dev, 2005)、皮下注射を継続する負担も大きい。新たな治療法が切望されている。現在の Menkes 病治療の課題は次のようにまとめられる。

(1) 血液脳関門の通過の障害 血液脳関門を担う脳血管内皮とグリア細胞に銅が滞留し、神経細胞に到達できない。そのため、中枢神経障害（てんかん、発達障害等）が改善されない。

(2) ゴルジ体への送達障害 ゴルジ体で合成される銅依存性酵素 lysyl oxidase が作られず、コラーゲンやエラスチンが架橋されないため、全身の結合組織がきわめて脆弱となる。

(3) 腎尿細管からの排出障害 腎尿細管に銅が蓄積し、尿細管障害がおこる。

(4) 皮下注射であること 長期頻回の皮下注射は患児、家族の負担が大きい。

これまで我々は、致死的な Menkes 病モデルマウスである macular mouse を用いて様々な有機銅錯体を検討し、Cu-pyruvaldehyde-bis(N⁴ methylthiosemicarbazone) (以下 Cu-ptsm) の皮下注射によって病態マウスの生存例が見られた。銅の脳への移行も塩化銅よりも優れ、かつ腎臓への蓄積が軽減されることを見出した(Munakata et al. Pediatr Res, 2012)。しかし、Cu-ptsm は著しく脂溶性が高く、少なくとも原末のままでは経口投与には向かない。そこで、体内への移行性を保ちつつ溶解性を付与した化合物を見出すことができれば経口投与を実現できる可能性がある。

2. 研究の目的

本申請研究の目的は、メンケス病モデルマウスを用い、細胞膜透過性と溶解性を兼ね備えた有機銅錯体を見出し、注射より負担の少ない経口投与による効率的な銅の供給法を見出すことにある。

3. 研究の方法

本申請研究では新規合成した各種の有機銅錯体をメンケス病モデルマウスに経口投与し、その死亡をレスキューできるか、また、主要臓器の銅および銅と関連する亜鉛の濃

度、銅依存性酵素活性とその年齢依存性、運動学習能力に対する効果を検討する。

実験に用いた macular mouse は X 染色体上 ATP7A 遺伝子座(Mottled; Mo)に変異を有し、そのヘミ接合体雄(Mo^{ml/y})は Menkes 病の病態をよく反映する。すなわち、白色の体毛と縮れたヒゲを有し、未治療であれば 2 週間程度で全例死亡する。このマウスを Menkes 病のモデルとして用い、同胞正常雄（黒色体毛）を対照とした。

化合物は Cu-(bis(thiosemicarbazone)) 錯体を基本とし、これに様々な修飾を試みた。合成した銅錯体は、standard suspension vehicle(SSV)に懸濁して経口投与を行った。投与は日齢 5, 8, 11, 17, 23 および 32 に行い、以後は投与せず、生死を追跡した。

生後 15 日(この場合に限り錯体の投与は日齢 5, 8, 11 のみ) 3ヶ月、8ヶ月の時点で、主要臓器片を秤量し、湿式灰化の後、銅、亜鉛の濃度を誘導結合プラズマ質量分析にて求めた。

また、銅依存性酵素である cytochrome oxidase の脳内活性を検討するため、凍結脳組織から作成した脳薄切片にチトクロームオキシダーゼ組織化学染色を行い、前頭葉大脳皮質においてその発色濃度を計測した。さらに、dopamine hydroxylase (DBH) 活性を評価するため、脳組織中のノルアドレナリン、ドパミン濃度をカテコールアミン分析計にて測定し、その比を DBH 活性の指標とした。

血清中の ceruloplasmin (CP) 活性は、Ceruloplasmin colorimetric activity kit (Kamiya biomedical)により計測した。

生後 3 ヶ月に達したマウスに対して rotarod 試験を行った。病態、正常マウスに 3 日間毎日馴化トレーニングを行い、4 日目にテストを行った。

4. 研究成果

様々な銅錯体の経口投与を試み、いくつかの化合物が罹患マウスの生存期間を延長した。その中でまず copper-glyoxal-bis(4-methyl-3-thiosemicarbazone) (以下 Cu-gtsm) についてその効果を詳細に検討することにした。

(1) Macular mouse について

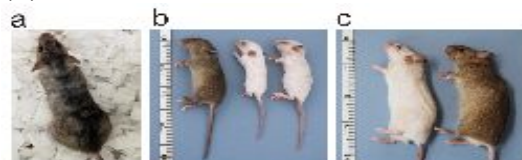


図 1

図 1 a に macular mouse のヘテロ接合体雌 (Mo^{ml/x}) を示す。まだら模様(macular)の体毛を有する。 b には日齢 15 の正常雄(左端)、Menkes 病の病態を呈するヘテロ接合体雄 (Mo^{ml/y}; 以下罹患マウス)の未治療例(中央)並びに Cu-gtsm 投与例(左端)を示す。この

時期に未治療の個体は顕著な体重減少を呈している。一方、Cu-gtsm 投与例では体毛はわずかにグレーとなり、体重減少も軽減している。c は3ヶ月齢の治療後罹患マウスと正常対照を示す。生後1ヶ月を過ぎて生存すれば後は投薬しなくともほぼ安定して生存するが、3ヶ月齢に至っても体毛は白く、体重は対照より有意に少ない。

(2) 生存曲線、体重増加曲線の検討：

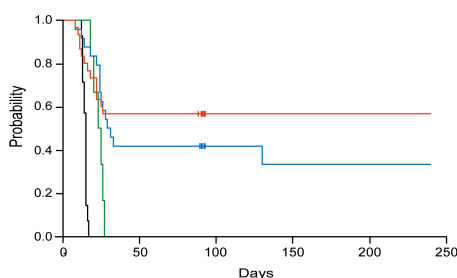


図2

図2に罹患マウスの生存曲線をしめす。黒線は未治療例、緑、青、赤の線はそれぞれ、体重あたり3, 5, 10 µgのCu-gtsmを投与した場合を示している。用量3 µgでは生存期間の延長の傾向はあったが全例死亡した。用量5, 10 µgでは生存例が出現した。生後1ヶ月を過ぎればあとは投与を受けなくともほぼ安定して観察のエンドポイントである8ヶ月齢まで生存した。用量5, 10 µgの生存曲線は生後早期、対照との間にわずかな交差が見られた。すなわち、罹患マウスの生存にとってCu-gtsmは有効であるが、生後早期にはCu-gtsmにより用量依存性にハザードが増した可能性がある。10 µg Cu-gtsmと同量の銅を含む塩化銅水溶液を同じ日齢に投与したが生存例は得られなかった。

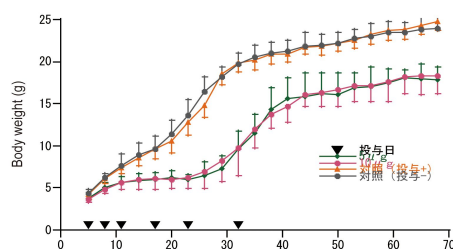


図3

図3に生存した罹患マウスとその対照の成長に伴う体重変化を示している。横軸のは投薬のタイミングを表す。正常対照では(黒線)生後より1ヶ月齢頃まで一定して体重が増加しているが、罹患マウスでは1ヶ月齢までは体重は横ばいで、その後急に体重の増加が始まる。罹患マウスの体重変化は用量によらず同一の変化を示した。

投与期間中は一過性の下痢がしばしば見られ、発生頻度は用量に依存した。投薬により1ヶ月齢に達した罹患マウスにふたたび高頻度に投与しても下痢は出現しなかった。一方、正常マウスに投与しても下痢は見られず、体重の変化にも影響を与えなかった(橙線)。

(3) 主要臓器の銅分布、加齢変化

日齢15の脳(前頭葉)では、罹患マウスは正常対照に比し銅濃度は著しく低値であったが、Cu-gtsm 10 µg 投与群は未治療群に比べ有意に高値となった。限定的ではあるがCu-gtsmにより脳に銅が送達されたことを示唆する。3, 8ヶ月齢では(この時点では未治療罹患マウスは全例死亡している)脳組織中の銅濃度は対照より低値であるが、Cu-gtsmの投与は終了しているにもかかわらず、加齢とともに上昇した。

肝臓では、15日齢において、正常マウスでは脳組織の20倍近くの非常に高い濃度で生理的に銅が蓄積されていた。一方罹患マウスでは蓄積はなく、Cu-gtsm 投与群でも有意な上昇は認められなかった。

腎臓では、15日齢において、罹患マウスでは正常例の5倍程度の銅の過剰な蓄積が認められた。一方、Cu-gtsm 投与群でも同程度の銅の蓄積が認められたが未治療群と有意差はなく、投薬によって腎臓への蓄積の憎悪は認められなかった。

消化管の亜鉛の吸収は銅の吸収と拮抗するが、今回、未治療群、治療群、正常対照の主要臓器の亜鉛濃度に有意差はなかった。

(4) 血清セルロプラスミン活性への効果

血清中セルロプラスミン値は対照に比し未治療罹患マウスでは有意に低かったが、投薬群では正常レベルまで速やかに回復していた。血清セルロプラスミンは肝臓で生成される。経口投与されたCu-gtsmは門脈から肝臓に至るとその一部から銅が分離し、セルロプラスミンに組み込まれて体循環に移行したと推定される。よってCu-gtsmの銅が肝臓において生理的な銅送達系に組み込まれたことが示唆されたが、一方、血液-脳関門、血液-脳脊髄液関門を超えて銅を送達するには、一定量のCu-gtsmが分解されずに肝臓を超えて体循環に移行する必要がある。Cu-gtsmが肝臓でどの程度代謝されるのか(初回通過効果)今後検討を要する。

(5) 脳内銅依存性酵素群への効果

脳組織のcytochromeoxidase活性は、日齢15において、未治療の罹患マウスでは正常より低かったが、Cu-gtsm 投与群では有意に高値となった。活性はCu-gtsm投与終了後も加齢とともに上昇し、生後8ヶ月には対照と有意差がなくなった。

dopamine hydroxylase 活性の指標として脳組織中のノルアドレナリン/ドパミン比を求めた。日齢15において、この比率はCu-gtsm 投与群で有意に上昇した。cytochromeoxidase 活性同様、3~8ヶ月齢にかけて上昇が見られたが、いずれも対照よりも下回った。

脳内の両酵素活性がCu-gtsm 投与群で高まったことから、Cu-gtsmによって脳内へ銅が

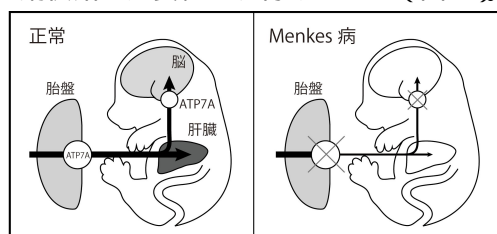
送達されかつ生理的に利用されたことが示唆された。

(6) 運動能への効果

rotarod 試験は協調運動能を表すとされる。4 rpm、120 s の馴化訓練を3日間行った。正常対照の多くは初日から120秒間ロッド上にとどまったが、罹患マウスでは120秒を待たずに落下した。しかし3日目になると全例120秒間ロッド上にとどまれるようになり、運動能が拙劣ではあるものの、学習能を有することを示した。本試験では、しかし、正常対照に比べ有意に成績がわるかった。また、5 µg 投与群と10 µg 投与群間で有意は差無く、治療効果に用量依存性が見られなかった。

(7) 成果のまとめ

主要臓器の銅分布の測定から、正常例では肝臓に大量の銅を蓄積しているが、罹患マウスは胎盤のATP7Aの機能不全のため、生下時より銅の蓄積が枯渇しており生後早期からの銅供給の必要性が裏付けられた(図4)。



妊娠後期の銅の動き

図4

Cu-gtsm の経口投与で、メンケス病病態マウスが生存しうることが示唆された。注射より負担の少ない経口投与の可能性が示唆されたことは意義ある。

投薬は生後早期に行えば、以後は投薬をしなくとも生存を続けた。生後早期の投薬が重要であることが確認されたが、一方でこの時期に特異的に下痢等の副作用が出現した。今後、徐放化等製剤上の工夫や錯体分子の修飾によって体内への吸収を制御し、副作用の出現を克服する必要がある。

生存した個体でも運動能力の拙劣さが残存し、これはCu-gtsmの用量に依存しなかった。投与時期をさらに早めることで改善できないか、検討を加える予定である。

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)

[雑誌論文](計3件)

- 1 星 佑次郎, 谷 紀彦, 田畑 英嗣, 若松 真太朗, 宗形 光敏, 丸山 一雄, 児玉 浩子, 忍足 鉄太, 夏苺 英昭, 高橋 秀依, Menkes 病治療薬の開発をめざしたジスルフィラム-銅錯体の可溶化、YAKUGAKU ZASSHI, 査読有, 135, 2015, 493-499

DOI: 10.1248/yakushi.14-00188

- 2 Sun G, Ota C, Kitaoka S, Chiba Y, Takayanagi M, Kitamura T, Yamamoto K, Fujie H, Mikami H, Uematsu M, Hino-Fukuyo N, Munakata M, Kure S, Haginoya K, Elevated serum levels of neutrophil elastase in patients with influenza virus-associated encephalopathy, J Neurol Sci, 査読有, 349, 2015, 190-195
DOI:10.1016/j.jns.2015.01.017

- 3 Munakata M, et al., Reduction in glutamine/glutamate levels in the cerebral cortex after adrenocorticotrophic hormone therapy in patients with west syndrome, Tohoku J Exp Med, 査読有, 232, 2014, 277-283
URL:https://www.jstage.jst.go.jp/article/tjem/232/4/232_277/_article

[学会発表](計4件)

- 1 星祐次郎, ペク・スンア, 谷 紀彦, 田畑英嗣, 関むつみ, 鈴木 亮, 丸山一雄, 宗形光敏, 廣木伴子, 児玉浩子, 夏苺英昭, 高橋秀依, 銅-ジスルフィラム錯体の可溶化、日本薬学会第134年会(2014/3/27) ホテル日航熊本、熊本
- 2 Takahashi H, Soong-a P, Hoshi Y, Tani N, Natsugari H, Seki M, Suzuki R, Maruyama K, Munakata M, et al., Studies on Cu complexes as therapeutic drugs for Menkes disease, 10th International Society for Trace Element Research in Humans (2013/11/18-22) 京王プラザホテル、東京
- 3 星祐次郎, ペク・スンア, 谷 紀彦, 田畑英嗣, 関むつみ, 鈴木 亮, 丸山一雄, 宗形光敏, 廣木伴子, 児玉浩子, 夏苺英昭, 高橋秀依, Menkes 病治療薬の開発を目的とした銅錯体の可溶化、第57回日本薬学会関東支部大会(2013/10/26) 帝京大学、東京
- 4 ペク・スンア, 星祐次郎, 谷 紀彦, 田畑英嗣, 関むつみ, 鈴木 亮, 丸山一雄, 宗形光敏, 廣木伴子, 児玉浩子, 夏苺英昭, 高橋秀依, Menkes 病治療薬としての銅錯体の創出、第57回日本薬学会関東支部大会(2013/10/26) 帝京大学、東京

[図書](計0件)

[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

宗形 光敏 (MUNAKATA, Mitsutoshi)
東北大学・大学院医学系研究科・非常勤講師
研究者番号：30312573

(2) 研究分担者

児玉 浩子 (KODAMA, Hiroko)
帝京大学・医学部・非常勤講師
研究者番号：00093386