

令和 4 年 8 月 24 日現在

機関番号：32680

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K06762

研究課題名(和文) 経口メンケス病治療薬創出を目的とした銅錯体の薬物動態学および製剤学的検討

研究課題名(英文) Pharmacokinetics and pharmaceuticals investigation on copper complex to development an oral therapeutic agent for Menkes disease.

研究代表者

工藤 敏之(Kudo, Toshiyuki)

武蔵野大学・薬学部・講師

研究者番号：10584815

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：メンケス病は、銅輸送タンパク質ATP7Aの遺伝子異常により銅の吸収および組織移行が低下し、多くが幼児期に死亡する希少疾患である。本研究では、経口投与可能なメンケス病治療薬の創出の一環として、メンケス病モデル動物マクラマウスにおける銅錯体CuGTSMの体内動態を検討した。経口投与したCuGTSMは吸収され、体内で銅とリガンドに解離すること、CuGTSMをナノ粒子化することで吸収が増大することを明らかにした。また、マクラマウスの体内においては、CuGTSMの銅とリガンドへの解離の程度が大きいことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、有機化学、製剤学、薬物動態学の専門家が連携して行ったことで市販されていない銅錯体について体内動態の評価および製剤的工夫ができた。メンケス病患者においては銅とリガンドへの解離が亢進している可能性が示唆されたこと、また、製剤的工夫により銅錯体の吸収性を高めることができたことを活用し、今後も有用なメンケス病治療薬創製を目指していきたい。

研究成果の概要(英文)：Menkes disease is a rare hereditary disease in which systemic deficiency of copper due to mutation of ATP7A result in decreased copper absorption and tissue distribution, and most patients die in early childhood. In this study, we investigated the pharmacokinetics of the copper complex CuGTSM in macular mice, a murine model of Menkes disease, as part of development of a therapeutic agent for Menkes disease which can be orally administered. Absorption and dissociation of orally administered CuGTSM has been confirmed in macular mice, and absorption was improved by nanoparticulation. In addition, it was suggested that CuGTSM is easily dissociated into copper and ligand in macular mice.

研究分野：薬物動態学

キーワード：銅錯体 メンケス病 ナノ粒子化

1. 研究開始当初の背景

メンケス病は日本において厚生労働省により定められている指定難病 330 種のうちのひとつであり、10~25 万人にひとりの割合で発症する¹⁾。メンケス病は銅輸送タンパク質 ATP7A の遺伝子異常が原因であり、その症状は全身の銅欠乏による重度の中樞神経障害、低体温、血管異常・膀胱憩室・骨粗鬆症などの結合織異常による硬膜下出血、骨折、尿路感染症など非常に重篤であり、多くは幼児期に死亡する²⁾。

通常、食物から摂取した銅は消化管上皮細胞に存在する copper transporter 1 (CTR1) により取り込まれ、ATP7A によりゴルジ体に輸送された後、血中に放出されて全身を循環する^{2,3)}。メンケス病では ATP7A が欠損しているために食物由来の銅が全身循環に移行せず、銅が欠乏し、種々の銅依存性酵素の活性が低下し上記の症状が現れる。母体由来の銅が枯渇する生後 2 ヶ月以前にヒスチジン銅を皮下注射することで銅欠乏に基づく神経障害の予防・軽減ができるものの、その効果は完全ではなく、さらに血液脳関門が成熟すると脳へ銅が輸送できなくなるため、中樞神経障害の発症を免れない²⁾。したがって、血液脳関門が成熟して以降も有効なメンケス病治療法の確立が必須である。

2. 研究の目的

最終的な目標をメンケス病治療法の開発とし、長期間に亘る薬物療法の負担を少しでも減らすべく経口投与可能な治療薬の創出を試みた。本研究では、マウスに静脈内投与した後に脳内へ移行することが示唆され^{4,5)}、細胞内で還元されて銅を解離すること⁶⁾が報告されている glyoxal-bis(N(4)-methylthiosemicarbazonato)-copper(II) (CuGTSM) (図 1) を治療薬候補として考え、その体内動態を正常マウスおよびメンケス病モデル動物 macular マウスを用いて検討した。また、CuGTSM は非常に難溶性であることが明らかになっており、そのままでは経口投与してもほとんど吸収されないことが予想されたことから、薬物の粒子径を極力小さくする「ナノ粒子化」による吸収性の改善についても評価した。

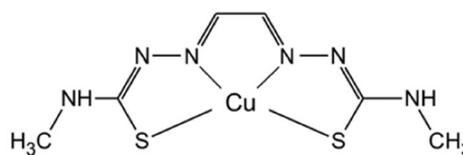


図 1 CuGTSM の構造

3. 研究の方法

(1) ナノ粒子化 CuGTSM (nCuGTSM) の調製

CuGTSM、CuGTSM から銅が解離したリガンド GTSM および LC-MS/MS による CuGTSM および GTSM 定量の際に内部標準物質として用いた diacetyl-bis(N(4)-methylthiosemicarbazone) (ATSM) は既報の方法に従って調製した^{7,8)}。nCuGTSM の調製は、添加剤には POVACOAT®などを用い、自転公転式粉碎機による wet grinding および凍結乾燥による crystallization の 2 つの方法で行った。動的光散乱測定器による粒子径およびゼータ電位の測定によりナノ粒子化の成否を判断した。

(2) ddY マウスに CuGTSM あるいは nCuGTSM を経口投与した際の CuGTSM および GTSM の体内動態

10 週齢の雄性 ddY マウスに CuGTSM あるいは nCuGTSM の懸濁液 (いずれも 10 mg/kg) を経口投与した後、尾静脈より経時的に採血した。得られた血液から血漿を分離し、血漿中 CuGTSM および GTSM 濃度を LC-MS/MS により測定した。

(3) マクラマウスに CuGTSM を経口投与した際の CuGTSM および GTSM の体内動態

24 - 25 週齢の雄性 C3H/HeNcrI マウス (対照動物) あるいは macular マウスに CuGTSM の懸濁液 (10 mg/kg) を経口投与した後、尾静脈より経時的に採血した。得られた血液から血漿を分離し、血漿中 CuGTSM および GTSM 濃度を LC-MS/MS により測定した。

(4) マクラマウスにおける nCuGTSM を経口投与した際の CuGTSM および GTSM の体内動態

8 週齢の雄性 C3H/HeNcrI マウスあるいは macular マウスに nCuGTSM の懸濁液 (10 mg/kg) を経口投与した後、尾静脈より経時的に採血した。得られた血液から血漿を分離し、血漿中 CuGTSM および GTSM 濃度を LC-MS/MS により測定した。

4. 研究成果

(1) nCuGTSM の調製

Wet grinding により調製した nCuGTSM の平均粒子径およびゼータ電位はそれぞれ 161.7 nm お

よび-17.3 mV、crystallization により調製した nCuGTSM の平均粒子径およびゼータ電位はそれぞれ 140.4 nm および-22.6 mV であった。また、nCuGTSM の粒子径の分布にも両方法間に顕著な差は認められなかった (図 2)。

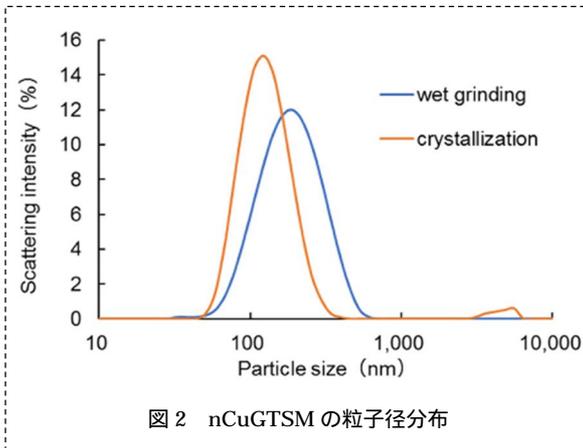


図 2 nCuGTSM の粒子径分布

(2) ddY マウスに CuGTSM あるいは nCuGTSM を経口投与した際の CuGTSM および GTSM の体内動態

CuGTSM、nCuGTSM 経口投与時のいずれも血漿中に CuGTSM および GTSM の両者が認められたことから、ddY マウスの体内で CuGTSM から Cu が解離したと考えられた。nCuGTSM 投与時の方が、CuGTSM および GTSM 両者の最高血漿中濃度および血漿中濃度時間曲線下面積 (AUC) が有意に高値を示したことから、ナノ粒子化によって CuGTSM の吸収が増大したと考えられた (図 3)。

(3) マクラマウスに CuGTSM を経口投与した際の CuGTSM および GTSM の体内動態

C3H/HeNcrI マウスおよび macular マウスのいずれにおいても CuGTSM 経口投与後の血漿中に CuGTSM および GTSM の両者が認められたことから、両マウスの体内で CuGTSM から Cu が解離したと考えられた (図 4)。C3H/HeNcrI マウスにおける血漿中 CuGTSM および GTSM 濃度はいずれも ddY マウスに同投与量の CuGTSM を投与したときより若干高値だったが、AUC 比 (GTSM/CuGTSM) は両マウスで同程度だった。一方で、macular マウスにおける AUC 比 (GTSM/CuGTSM) は C3H/HeNcrI マウスの約 8 倍であり、macular マウスの体内は CuGTSM が還元されやすい環境であると考えられた。

(4) マクラマウスに nCuGTSM を経口投与した際の CuGTSM および GTSM の体内動態

C3H/HeNcrI マウスおよび macular マウスのいずれにおいても、CuGTSM 経口投与時と比較して nCuGTSM 投与時の方が CuGTSM および GTSM の血漿中濃度は高値を示したことから、C3H/HeNcrI マウスおよび macular マウスにおいてもナノ粒子化による CuGTSM の吸収の増大が確認された (図 5)。また、CuGTSM 投与時と同様に、AUC 比 (GTSM/CuGTSM) は macular マウスの方が高値を示した。

以上の検討により、いずれのマウスにおいてもナノ粒子化による CuGTSM の吸収の増大は認められたものの、macular マウスにおいては銅錯体の解離が亢進していることが明らかになった。このメカニズムは不明だが、メンケス病においては ATP7A の活性が低いいため、脳へ銅が送達さ

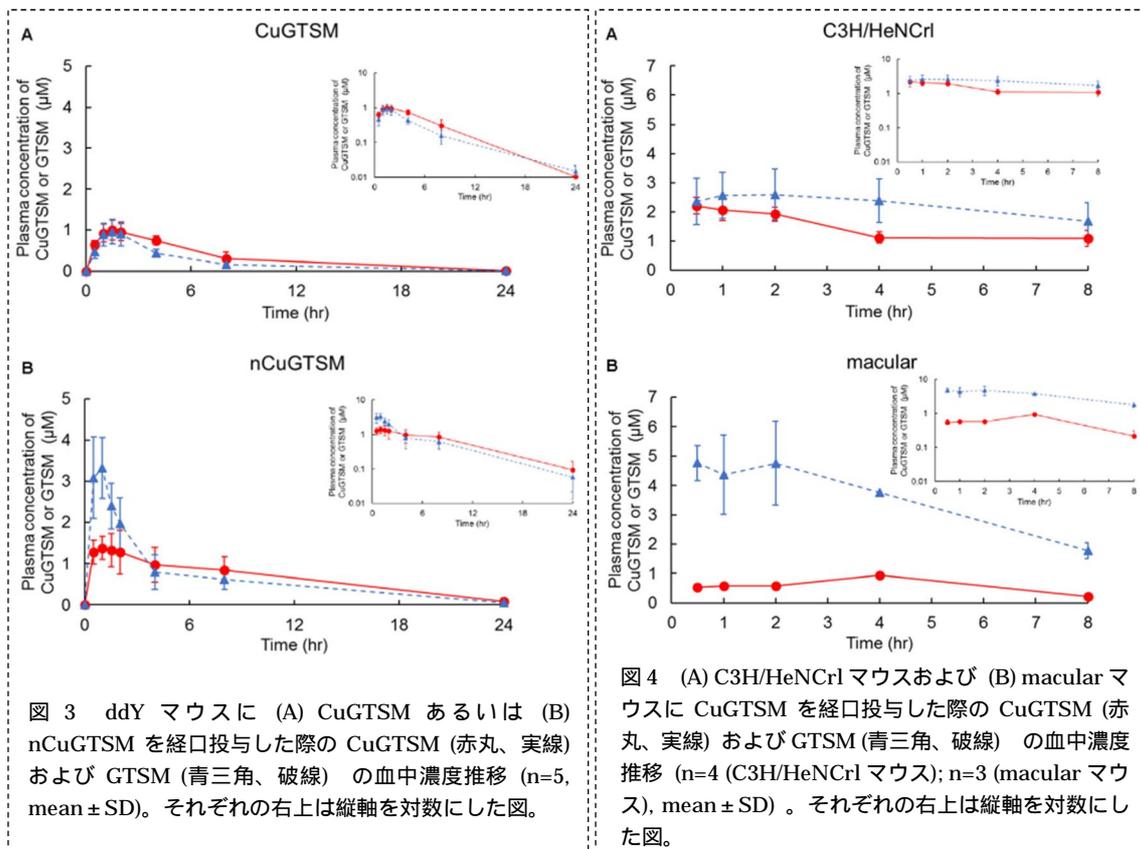


図 3 ddY マウスに (A) CuGTSM あるいは (B) nCuGTSM を経口投与した際の CuGTSM (赤丸、実線) および GTSM (青三角、破線) の血中濃度推移 (n=5, mean ± SD)。それぞれの右上は縦軸を対数にした図。

図 4 (A) C3H/HeNcrI マウスおよび (B) macular マウスに CuGTSM を経口投与した際の CuGTSM (赤丸、実線) および GTSM (青三角、破線) の血中濃度推移 (n=4 (C3H/HeNcrI マウス); n=3 (macular マウス), mean ± SD)。それぞれの右上は縦軸を対数にした図。

れる前に銅錯体が解離してしまうと脳への十分な銅輸送が期待できなくなると考えられる。宗形らの報告⁹⁾において、macular マウスに生後5日目からCuGTSMを反復経口投与することにより生存期間が延長したこと、脳内銅依存性酵素の活性が上昇したこと、運動能力が改善したことが報告された。CuGTSM投与により銅不足に起因する症状が緩和されたが、いずれも正常レベルまでの回復は認められず、その効果は十分ではなかった。さらに、腎臓および消化管への銅の蓄積が認められ、副作用の発現が懸念されたことから、CuGTSMより良いメンケス病治療薬候補となる銅錯体を見出す必要があると考えられた。

そこで、macular マウスに対して有効性を示したCuGTSMと構造が類似しており、既に低酸素部位の診断等の目的で臨床でも使用されているCuATSMに着目し、CuGTSMと同様にナノ粒子化製剤の調製およびC3H/HeNcr1 マウスおよびmacular マウスに経口投与時した際の体内動態の検討を行った。その結果、いずれのマウスにおいてもナノ粒子化によるCuATSMの吸収性の増大は認められたものの、macular マウスの方がAUC比(ATSM/CuATSM)が高く、CuGTSMと同様のmacular マウスにおける解離の促進も示唆された。

また、経口投与以外で長期間に亘る薬物療法の

負担を減らす手段の候補として、持続的な放出を目的としたCuATSMのマイクロスフェア製剤を調製し、C3H/HeNcr1 マウスおよびmacular マウスに皮下投与した際の体内動態を評価した。いずれのマウスにおいても血漿中にCuATSMおよびATSMが検出されたことから、皮下投与したマイクロスフェア製剤からCuATSMが放出されたことが示唆された。マイクロスフェア皮下投与の場合でも、経口投与時と同様にmacular マウスの方がAUC比(ATSM/CuATSM)が高く、macular マウスにおける銅錯体の解離の促進は投与経路に依らないことが示唆された。

本研究の結果から、macular マウスの体内は銅錯体が解離しやすい環境であることが示唆された。投与した銅錯体から銅が解離せずに錯体のまま排泄されてしまうと組織に銅を供給することができないので、体内である程度は銅とリガンドへの解離が起きる必要がある。一方で、解離の程度が大きすぎてもメンケス病においては、銅を血中から組織へ送達することができないことから、適度に解離をする銅錯体の開発が必要と考えられる。今後は、酸化還元電位を考慮して候補化合物を選出し、選出された化合物のメンケス病に対する有効性を評価する。有効性が認められた化合物については、さらなる有効性の向上および薬物療法の負担軽減を目指した製剤の工夫を施すことで、有用なメンケス病治療薬の開発を目指したい。

引用文献

- 1) Adv Pediatr. 1994; 41: 263-304.
- 2) Curr Drug Metab. 2012; 13: 237-50.
- 3) Prog Neurobiol. 2014; 116: 33-57.
- 4) J Alzheimers Dis. 2010; 20: 49-55.
- 5) J Nucl Med. 2016; 57: 109-114.
- 6) Inorg Chem. 2008; 47: 4338-4347.
- 7) Can J Chem. 1962; 40: 1053-1059.
- 8) Angew Chem Int Ed Engl. 2008; 47: 8416-8419.
- 9) Pediatr Res. 2012; 72: 270-276.

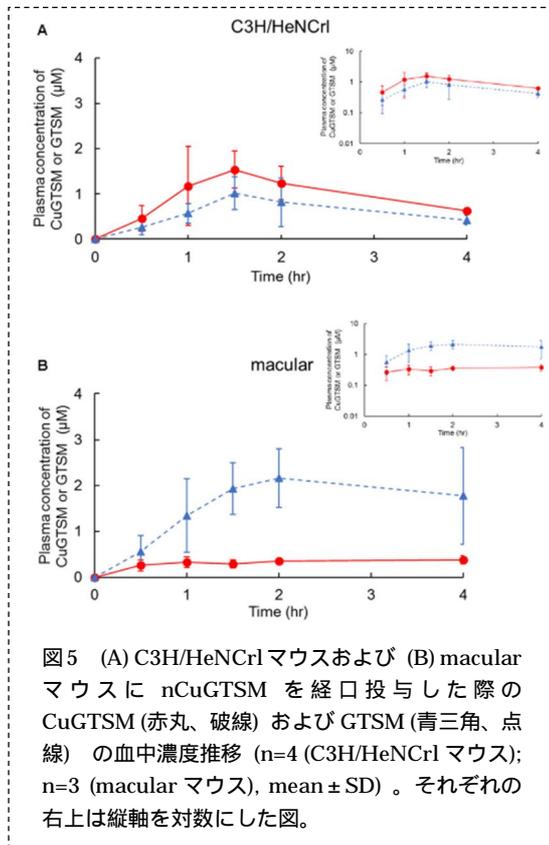


図5 (A) C3H/HeNcr1 マウスおよび (B) macular マウスに nCuGTSM を経口投与した際の CuGTSM (赤丸、破線) および GTSM (青三角、点線) の血中濃度推移 (n=4 (C3H/HeNcr1 マウス); n=3 (macular マウス), mean ± SD)。それぞれの右上は縦軸を対数にした図。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yamagishi Y, Kudo T, Oyumi M, Sakamoto Y, Takahashi K, Akashi T, Kobayashi S, Kawakami T, Goda H, Sato Y, Mimaki M, Kodama H, Munakata M, Makino K, Takahashi H, Fukami T, Ito K.	4. 巻 38
2. 論文標題 Pharmacokinetics of CuGTSM, a Novel Drug Candidate, in a Mouse Model of Menkes Disease.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pharm Res.	6. 最初と最後の頁 1335-1344
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11095-021-03090-0.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計19件（うち招待講演 1件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 藤村麻衣、大池なゆた、北澤遥佳、菅野有香、明石大希、伊藤清美、高橋秀依、深水啓朗
2. 発表標題 持続的放出を目的としたCu-ATSM封入マイクロスフェアの調製と評価
3. 学会等名 日本薬剤学会 第36年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中島 慶香、齋藤 恭兵、明石 大希、藤村 麻衣、大池 なゆた、深水 啓朗、高橋 秀依、佐藤 恭弘、児玉 浩子、山岸 喜彰、工藤 敏之、伊藤 清美
2. 発表標題 マイクロスフェアに封入されたCuATSM のマウスにおける体内動態の検討
3. 学会等名 日本医療薬学会 第4回 フレッシュヤーズ・カンファランス
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 浅香早希、藤村麻衣、北澤遥佳、伊藤清美、高橋秀依、深水啓朗
2. 発表標題 メンケス病に対するCu-ATSM封入徐放性マイクロスフェアの調製
3. 学会等名 第65回 日本薬学会 関東支部大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Nayuta Oike, Mai Fujimura, Kiyomi Ito, Hideyo Takahashi, Toshiro Fukami
2. 発表標題 Formulation of sustained release microsphere containing Cu-ATSM nanoparticles for the treatment of Menkes disease
3. 学会等名 第15回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 北澤遥佳、菅野有香、明石大希、伊藤清美、高橋秀依、深水啓朗
2. 発表標題 長期持続性を目的とした銅錯体封入マイクロスフェアの調製
3. 学会等名 日本薬剤学会第35年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大池なゆた、明石大希、伊藤清美、高橋秀依、深水啓朗
2. 発表標題 2 軸回転制御の遊星式攪拌装置による Cu-ATSM のナノ粒子化
3. 学会等名 第64回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤村麻衣、北澤遥佳、菅野有香、明石大希、中館和彦、伊藤清美、高橋秀依、深水啓朗
2. 発表標題 Cu-ATSM封入徐放性マイクロスフェア製剤の調製
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 明石大希、菅野有香、高橋一希、永瀬知子、伊藤清美、高橋秀依、深水啓朗
2. 発表標題 ナノ結晶化による難水溶性銅錯体Cu-GTSMの経口吸収性の改善
3. 学会等名 日本薬学会第34年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 菅野有香、明石大希、北澤遥佳、伊藤清美、高橋秀依、深水啓朗
2. 発表標題 メンケス病の治療に用いる銅キレート化合物を含有した持続性注射剤の開発
3. 学会等名 第44回製剤・創剤セミナー
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 齋藤恭兵、川上武昭、小林昌平、中村悠輔、井上貴文、高橋秀依、深水啓朗、山岸喜彰、工藤敏之、伊藤清美
2. 発表標題 銅錯体CuGTSM及びCuATSMのマウスにおける体内動態の検討
3. 学会等名 第63回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 北澤遥佳、菅野有香、明石大希、伊藤清美、高橋秀依、深水啓朗
2. 発表標題 メンケス病の治療に用いる銅錯体Cu-ATSMマイクロスフェア製剤の調製
3. 学会等名 第63回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中村 悠輔、井上 貴文、川上 武昭、小林 昌平、齋藤 恭兵、合田 ひとみ、児玉 浩子、宗形 光敏、高橋 秀依、深水 啓朗、山岸 喜彰、 工藤 敏之、伊藤 清美
2. 発表標題 メンケス病モデルマウスにおけるCuATSMの体内動態についての検討
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 北澤遙佳、菅野有香、明石大希、伊藤清美、高橋秀依、深水啓朗
2. 発表標題 メンケス病の治療に用いるCu-ATSM含有PLGAマイクロスフェアの調製と評価
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 菅野有香、明石大希、高橋一希、大西優、井上元基、伊藤清美、高橋秀依、深水啓朗
2. 発表標題 Cu-GTSM を含有する徐放性マイクロスフェア製剤の調製
3. 学会等名 第62回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 明石大希、菅野有香、高橋一希、永瀬知子、大西優、井上元基、伊藤清美、高橋秀依、深水啓朗
2. 発表標題 ナノ粒子化による Cu-GTSM のバイオアベイラビリティの改善
3. 学会等名 第62回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高橋秀依
2. 発表標題 Menkes病治療薬の開発に向けて
3. 学会等名 日本薬学会 第139年会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 明石大希、菅野有香、高橋一希、永瀬知子、伊藤清美、高橋秀依、深水啓朗
2. 発表標題 経口バイオアベイラビリティの改善を志向したCu-GTSMナノ結晶製剤の開発
3. 学会等名 日本薬学会 第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 菅野有香、明石大希、高橋一希、伊藤清美、高橋秀依、深水啓朗
2. 発表標題 メンケス病の補充療法に用いる銅キレート含有PLGAマイクロスフェアの調製
3. 学会等名 日本薬学会 第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 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
2. 発表標題 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
3. 学会等名 日本薬学会 第139年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	深水 啓朗 (Fikami Toshiro) (20366628)	明治薬科大学・薬学部・教授 (32684)	
研究分担者	高橋 秀依 (Takahashi Hideyo) (10266348)	東京理科大学・薬学部薬学科・教授 (32660)	
研究分担者	児玉 浩子 (Kodama Hiroko) (00093386)	帝京大学・医学部・講師 (32643)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	伊藤 清美 (Ito Kiyomi) (60232435)	武蔵野大学・薬学部・教授 (32680)	
研究協力者	山岸 喜彰 (Yamagishi Yoshiaki) (30805255)	武蔵野大学・薬学部・助教 (32680)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------