

令和 6 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：2020～2023

課題番号：20K08250

研究課題名(和文)有機銅錯体-循環型キレート剤混合ミセルを用いたMenkes病治療薬の展開

研究課題名(英文) Dissolved Disulfiram rescues mice model of Menkes disease

研究代表者

宗形 光敏 (Mitsutoshi, Munakata)

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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：Menkes病は銅トランスポーターATP7Aの遺伝子異常があり、必須元素の銅を脳へ送達できない。我々はこの疾患の病態マウスに銅錯体を経口投与しその有効性を確認したが、下痢が生じ易かった。Disulfiram(DSF)は臨床では嫌酒薬として使用される。DSFは食餌中や体内の銅と錯体を形成する。DSFをMenkes病モデルマウスに投与したところ、粉末では効果は不安定だが、溶液の形では病態マウス全例が生存し、脳内の銅濃度の上昇も確認できた。一方銅に依存するノルアドレナリンの生成は不十分であり、また過量投与では脳重量を抑制した。臨床導出のためには銅製剤の併用と血中濃度測定等慎重な計画が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Menkes病は銅の吸収不全を来す重篤な遺伝性疾患であり、未治療では致死性である。治療には銅製剤の注射の継続が必要であり、患者、保護者の負担は大きく、効果も限定的である。この疾患におけるDisulfiramの応用は本疾患の経口薬による治療を可能とし、患者の負担を軽減する。また銅の過剰部位から脳へ消化管の負担なく銅を移送するため、治療効果の進展も期待できる。

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. Disulfiram (DSF), a drug used for alcohol addiction treatment, forms a complex with free copper in diet and in body tissue and delivers copper to the brain. In the present study, oral administration of oil-dissolved DSF stably rescued Menkes' disease model mice, accompanied by increased brain weight and copper concentration in the brain. Increased DSF dose, however, reduced brain weight gain. Careful monitoring of DSF concentration might be required for the future clinical use.

研究分野：小児科

キーワード：Menkes disease Macular mouse Copper

## 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 *atp7a* の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ており、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銅輸送機能が残存する。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。また長期にわたる銅製剤の皮下投与は患者の負担が大きい。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。

これまで我々は銅を配位した有機銅錯体 (Cu-GTSM、図1左) をこの疾患の治療に利用できないか、メンケス病の致死性マウスモデル(マクラマウス)を用いて検討してきた。マクラマウスは *atp7a* 遺伝子上にミスセンス変異を有し (T4219C) Menkes 病に似た病態を呈し、生後2週齢頃全例が死亡する。Cu-GTSM は高い脂溶性を有しており、生後早期より Cu-GTSM を経口投与することによりマクラマウスを生存させることに成功した。経口投与は注射に比べ負担が少ない。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)。

しかし、Cu-GTSM の経口投与ではしばしば下痢がみられた。これは消化管上皮細胞に銅が過剰に蓄積しており、銅製剤の投与によりさらに銅の負荷が増したため考えられる。経口投与によりこの疾患を治療するために銅の消化管負荷を軽減する必要が生じた。

この課題を解決するため臨床では広く嫌酒薬として用いられている Disulfiram (DSF) の利用を検討することにした。この化合物は体内で2分子の DEDTC に乖離し、生体内で遊離している銅と錯体を形成する。この錯体は脂溶性が高く細胞膜を容易に透過し脳組織にも移行し Menkes 病への治療可能性が見玉らによって示されている (Fujisawa et al., Mol Genet Metab Rep [Review], 2022)。この DSF を単独または Cu-GTSM と併用することで消化管上皮の過剰な銅をキレートしその負荷を減少させることが可能ではないかと着想した。

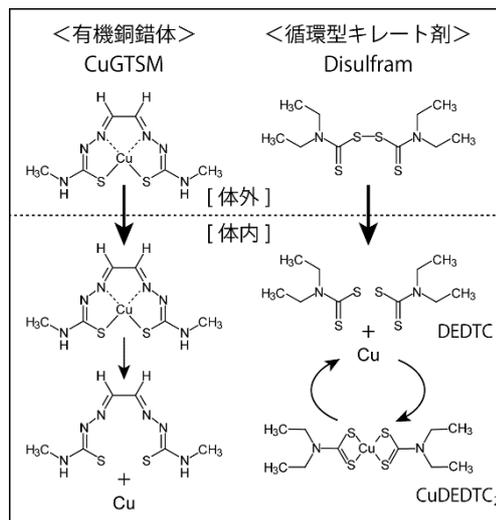


図 1

## 2. 研究の目的

本研究では DSF に効果を高めるための製剤上の工夫を行い、そのうえでマクラマウスに DSF を単独で経口投与した場合にどのような生存、生育上の効果が得られるか、また下痢の発生はどうかを検討する。

## 3. 研究の方法

### (1) DSF の調製と投与

原末を懸濁したものと溶液化したものを用事調製する。

懸濁液は DSF 原末を標準懸濁液 (standard suspension vehicle; SSV) に入れバイオマッシャーで1分間ミリングして DSF 懸濁液とする。一方溶液化は DSF が水にきわめて難溶であるので食用できる油脂に溶解し DSF 溶液とした。今回は DSF 剤型自体の効果を比較するため塩化銅の投与は行わないこととした。

マクラマウスは未治療であれば全例が2週齢付近で死亡する。銅の供給も生後7日齢までに供給を開始しないと生存は難しい。一方、この期間に必要な銅を供給できればその後は銅を投与しなくとも生存を続ける。今回は日齢5、8、11に DSF を経口投与した。

### (2) 体重変化並びに脳重量の計測

マクラマウスの脳重量は少なく、治療に鋭敏に反応する。一方、DSF から生成する DEDTC は過量に投与すると脳重量を減少させるとの報告がある。そこで DSF を用量を変えて投与後、日齢14に脳重量を測定する。また、同様に DSF (0.3 mg/g 体重) を投与後、3か月にわたり体重を追跡した。

### (3) 脳内銅濃度、カテコラミン濃度の測定

DSF を投与後、日齢 14 日で脳組織を取りだし、一部は高純度濃硝酸で分解・乾固し、2%硝酸中で ICP-MS により銅濃度を測定した。また、他の一部はバッファー液中でホモジェナイズし、遠心、上清を用いてノルアドレナリン、ドパミン濃度をカテコラミン自動分析装置にて測定し、ノルアドレナリン/ドパミン濃度比を算出した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 剤型による効果の比較

DSF を 1 回用量 0.3 mg/g 体重とし日齢 5, 8, 11 に投与後、生存を観察した。DSF 懸濁液を使用した場合、死亡例が多くみられたが、DSF 脂質溶液を使用した場合、投与を終えた後も体重は安定して増加し、全例が生じた(図 2)。Cu-GTSM で見られたような下痢は生じなかった。そこで以後の実験は DSF 脂質溶液を用いて行った。

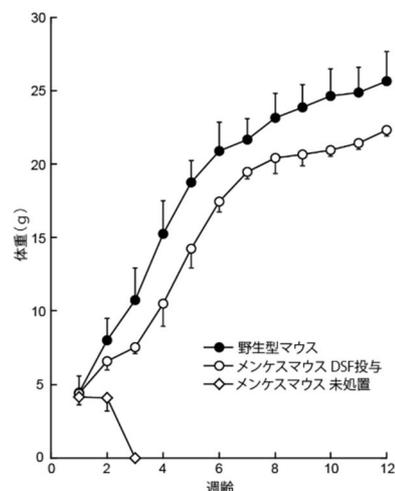


図 2

##### (2) 脳重量に対する DSF 脂質溶液の効果

DSF 脂質溶液一回用量を 0.2, 0.3, 0.4 mg/g 体重として日齢 5, 8, 11 に投与後、日齢 14 で脳重量を測定した(図 3)。マクラマウスでは 0.2 mg/g 体重の投与量では未治療群と変わらないが、0.3 mg/g 体重では有意に脳重量が上昇した。0.4 mg/g 体重では野生型、マクラマウスともに有意に脳重量は減少した。投与期間中下痢は見られなかった。

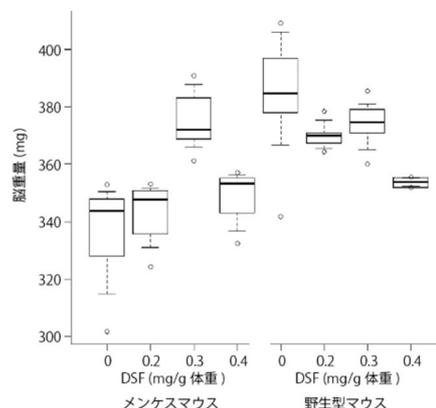


図 3

##### (3) 脳組織中銅濃度に対する効果

野生型、マクラマウスともに銅濃度は上昇し、特にマクラマウスでは有意(51%)の上昇がみられた(図 4、\*:マクラマウス対象に対する有意差、†:野生型対照に対する有意差、 $p < 0.05$ )。

##### (4) 脳内カテコラミン生成に対する効果

日齢 5, 8, 11 に DSF 0.3 mg/g 体重を投与後、日齢 14 で脳組織中のカテコラミンを測定し、ノルアドレナリン/ドパミン比を算出した(図 5)。マクラマウスでは脳内銅濃度の上昇に反し、ノルアドレナリン生成の改善がみられなかった(図 5)。

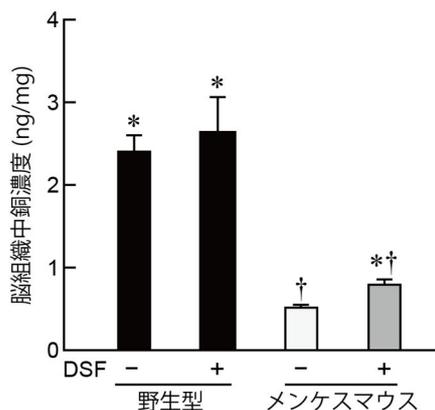


図 4

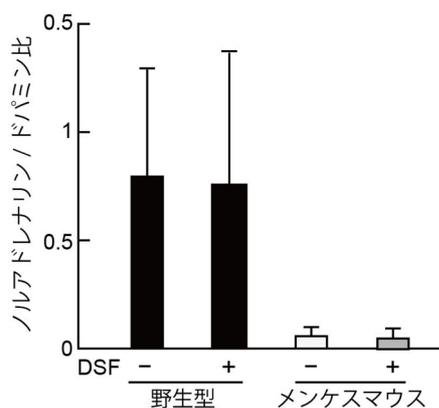


図 5

##### (5) 考察とまとめ

DSF 粉末懸濁液単独では安定したマクラマウスの生存は困難だったが、脂質に溶解することで銅製剤の併用がなくとも安定してマクラマウスを生存させることができた。これは DSF によって脳に送られた銅は DSF から離れ、脳の銅が関与する代謝に実際に組み込まれたことを意味する。一方、銅依存性酵素であるドパミン-水酸化酵素によるノルアドレナリンの生成は上昇しなかった。ドパミン-水酸化酵素の活性中心の銅は遊離しやすいため、DSF のキレート作用により活性中心から銅が奪われた可能性がある。また DSF 0.3mg/g 体重でマクラマウスの脳重量は増加したが、0.4 mg/g 体重では逆に脳重量を抑制した。これは高濃度の DEDTC が幼弱脳のミエ

リン形成を可逆的に抑制するとの報告があり、DSF の場合も関与している可能性がある。

以上、DSF は溶液とすることで顕著に薬効が増加し、Menkes 病治療への有効性が高まると考えられる。発達期の脳では一定の治療濃度域が想定され、DSF の血中濃度測定による慎重な用量管理が必要である。また、ドパミン -水酸化酵素の活性を維持するため、Cu-GTSM 等の銅製剤の投与を付加し DSF のキレート作用を飽和する必要がある。あるいはカテコラミン製剤の併用も考えられる。引き続き DSF の Menkes 病治療への安全な導出を目指し検討を重ねたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yamagishi Yoshiaki, Kudo Toshiyuki, Oyumi Masafumi, Sakamoto Yusuke, Takahashi Kazuki, Akashi Taiki, Kobayashi Shohei, Kawakami Takeaki, Goda Hitomi, Sato Yasuhiro, Mimaki Masakazu, Kodama Hiroko, Munakata Mitsutoshi, Makino Kosho, Takahashi Hideyo, Fukami Toshiro, Ito Kiyomi	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 Pharmaceutical Research	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 -

1. 著者名 Haginoya Kazuhiro, Sekiguchi Futoshi, Munakata Mitsutoshi, Yokoyama Hiroyuki, Hino-Fukuyo Naomi, Uematsu Mitsugu, Jin Kazutaka, Nagamatsu Kenichi, Ando Tadashi, Miyake Noriko, Matsumoto Naomichi, Kure Shigeo	4. 巻 15
2. 論文標題 A patient with a 6q22.1 deletion and a phenotype of non-progressive early-onset generalized epilepsy with tremor	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Epilepsy & Behavior Reports	6. 最初と最後の頁 100405 ~ 100405
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ebr.2020.100405	査読の有無 無
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0件

〔図書〕 計0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	佐藤 恭弘 (Satho Yasuhiro) (00750241)	帝京大学・医学部・助教  (32643)	
研究分担者	鈴木 亮 (Suzuki Ryo) (90384784)	帝京大学・薬学部・教授  (32643)	

6. 研究組織（つづき）

	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	児玉 浩子  (Kodama Hiroko)  (00093386)	帝京平成大学・未登録・特任教授    (32511)	

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