

機関番号：32643

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21791011

研究課題名（和文） Disulfiramによる Menkes 病の新規治療法確立

研究課題名（英文） Establishment of new treatment with Menkes disease by disulfiram

研究代表者

藤澤 千恵 (FUJISAWA CHIE)

帝京大学・医学部・リサーチフェロー

研究者番号：10393000

研究成果の概要（和文）：先天性銅代謝異常症である Menkes 病は銅輸送蛋白 ATP7A 遺伝子異常により生体内へ銅が吸収されず著明な銅欠乏症状を呈する。本症に対する有効な治療法はいまだ確立していない。本研究では銅と脂溶性キレート剤 disulfiram の併用投与を Menkes 病モデルマウスに行いその効果を検討した。この併用投与により銅の吸収が増加し、銅酵素活性が上昇したと考えられた。また、銅が血液脳関門を通過するとともにカテコラミン代謝を促進したと考えられた。本研究結果から銅と disulfiram 併用投与による Menke 病への新規治療法は有用であると考えられた。

研究成果の概要（英文）：Menkes disease (MD) is an X-linked recessive copper deficiency disorder with progressive neurological degeneration of copper metabolism caused by mutations in the ATP7A gene. It is not useful treatment for connective tissue and neurological degeneration. In this study, examined the effect of administration of combination with disulfiram and copper for macular mouse is a model for Menkes disease. It is suggested that combination with copper and disulfiram was useful methods for Menkes disease.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：Menkes 病、disulfiram、銅代謝、macular マウス、治療、銅酵素活性

1. 研究開始当初の背景

Menkes 病 (Menkes kinky hair disease, trichopolydystrophy) は X 染色体劣性遺伝形式をとる先天性銅代謝異常症で、男児 18 万人に 1 人の頻度で発症する (Gu YH, Kodama H et al. Am J Med Genet. 99; 217-22 2001)。1993 年に責任遺伝子は銅輸送 ATPase (ATP7A) 遺伝子であることが同定された (Vulpe et al. Nature Genet. 3; 7-13 1993)。ATP7A は正常細胞では細胞のゴルジ体膜に存

在し、サイトソルからゴルジ体内への銅輸送を司っている。ゴルジ体へ輸送された銅は銅酵素と結合して、細胞外へ分泌される。ATP7A 機能が欠損している本症患者細胞では、銅がサイトソルに蓄積し、細胞外へ分泌されない。本症患者では腸粘膜での ATP7A 欠損により、食事の銅は体内へ吸収されず、体内は著明な銅欠乏になり、銅酵素活性が低下する。分泌銅酵素でありコラーゲン架橋を司る lysyl oxidase (LOX) 活性の低下は著明で、重篤な

結合織異常が生じる。また、ATP7A は血液脳関門においても存在することから、本症患者では銅は血液脳関門に蓄積し、神経細胞に輸送されず、神経細胞は著明な銅欠乏になる。このことより患者は生後3か月頃より神経症状が現れ始め成長とともに重度の神経障害を伴う。

現在、Menkes 病の治療としてヒスチジン銅の非経口的投与がなされている。この治療により、毛髪異常、血清銅・血清セロプラスミン値は改善する。しかし、銅を非経口的に投与しても、本症患者細胞および血液脳関門での ATP7A 機能欠損のために、投与した銅はゴルジ体内や神経細胞に移行せず、神経障害や結合織異常はまったく改善しない。銅欠乏による障害は重篤で、難治性痙攣や血管異常などにより、患児は重症心身障害児になり、多くは幼児期に死亡する。このように現在、本症に対する有効な治療法はない (Kodama H et al. *Pediatric Internal*. 41; 423-9 1999)。

2. 研究の目的

Menkes 病患者において必要なことは銅をゴルジ体膜や血液脳関門を通過させることである。一般に脂溶性物質は生体膜を通過しやすい。同様に血液脳関門も脂溶性物質は通過しやすい。そのような特性に注目し、銅と脂溶性キレート薬を併用投与することにより、脂溶性キレート薬と結合した銅はゴルジ体膜や血液脳関門を通過し、銅欠乏が改善されるとの仮説を立てた。本研究の目的は Menkes 病の治療法を開発し、有効な治療法を確立することである。DEDTC のダイマーであり、すでに医薬品として認可されている disulfiram を使用して臨床での応用を念頭に、disulfiram と銅の併用療法を検討することである。同時に併用療法における lysyl oxidase への影響を Menkes 病患者細胞で検討を行う。

3. 研究の方法

(1) disulfiram 投与

実験には Menkes 病モデルマウスであるマクラマウスと正常コントロールとして正常雄マウスを使用した。マクラマウスは生後早期に銅投与を行わなければ死亡するため予め生後3日に CuCl_2 を銅換算で $50 \mu\text{g}$ となるように皮下投与した。生後7日目から週1回 macular マウスに銅 $10 \mu\text{g}$ の皮下注射とジスルフィラム 0.3 mg/g body weight を経口投与した (治療群)。対照群としてマクラマウスに銅 $10 \mu\text{g}$ 皮下注射と DDW の経口投与を行った。正常雄マウスには何も投与を行わなかった。投与期間は短期投与として8週間、長期投与として24週間投与を行った。投与とともに体重の測定を行った。

(2) 検体の回収

マウスを解剖後、血清は採血後遠心、使用まで -80°C にて保存した。各臓器は、銅濃度測定用、cytochrome c oxidase 活性測定、カテコラミン分析、血清 AST, ALT, BUN, クレアチニンの測定を行った。

(3) 銅濃度測定

各種臓器の銅濃度測定を行った。臓器は 20 mg 前後計量採取し、 120°C で乾燥した後再度計量し dry weight を算出した。乾燥したサンプルに濃硝酸 $400 \mu\text{l}$ を添加し、 120°C で濃縮乾固した後、2N 硝酸 1 ml で希釈、原子吸光度計にて銅濃度を測定した。

(4) cytochrome c oxidase 活性測定

マウスの各臓器からミトコンドリアを Mitochondria isolation kit for tissue (Thermo Scientific) を用いて抽出したのち Cytochrome c oxidase Assay kit (Sigma-Aldrich) を用いて測定を行った。

(5) カテコラミン分析前処理

0.4N 過塩素酸を用いてホモジナイズしたのち上清を回収しカテコラミンを SRL にて測定した。

(6) 統計処理

測定値を外れ値検定を行った後、2群間の比較には t 検定を行い、3群間の比較には ANOVA を行った後に Tukey 法にて有意差を求めた。

4. 研究成果

(1) 体重の変化

治療群及びそのコントロールである対照群における体重の経時的変化を計測した (Figure 1, 2)。短期投与群では生後7週目より disulfiram 投与群で DDW 群よりも有意に体重の増加が認められた。

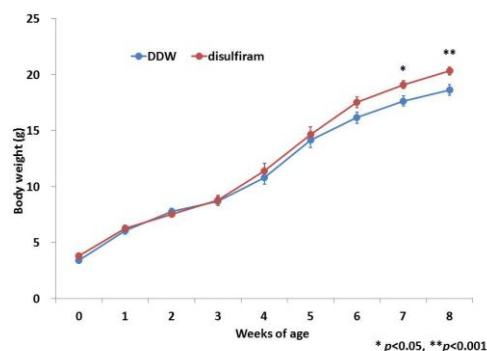


Figure 1. 短期間投与における体重変化

長期投与群においては体重の差が認められなかった。マクラマウスは生後早期に銅を注射することにより生存可能となる。その後の成長は生後半年では正常マウスと違いが認められないことから長期間投与では最終的な体重に差が認められなかったと考えられる。

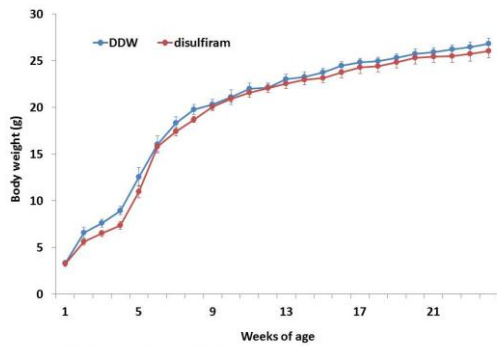


Figure 2. 長期間投与における体重変化

(2) 各臓器における銅濃度

短期投与群における大脳、小脳の銅濃度は正常マウスに比べマクラウスでは優位にその濃度が低かった。しかしながら治療群は対照群に比べ肝臓、血清で銅濃度が有意に高値を示した (Figure 3)。

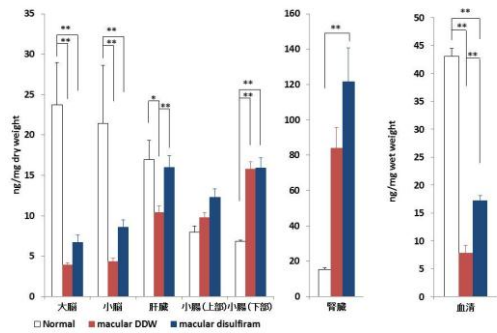


Figure 3. 短期投与後の各臓器内銅濃度
Normal: 正常マウス (n=4-8), macular DDW: macular マウス (n=16-19), CuCl2+DDW, macular disulfiram: macular マウス (n=20-24), CuCl2+disulfiram

また、大脳、小脳における銅濃度で治療群と対照群で有意差はなかったが、治療群は対照群に比べ高い傾向を示した。長期投与では大脳、小脳で対照群に比べ治療群が高い傾向を示したが有意差は認められなかった (Figure 4)。

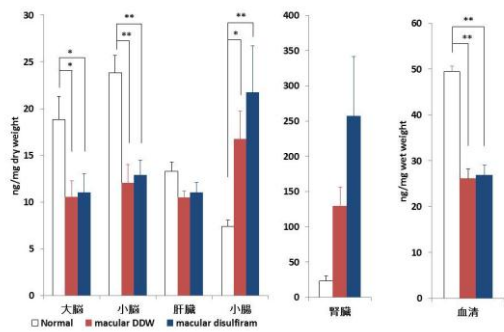


Figure 4. 長期間投与後の各臓器内銅濃度
Normal: 正常マウス (n=6-7), macular DDW: macular マウス (n=8-9), CuCl2+DDW, macular disulfiram: macular マウス (n=9-10), CuCl2+disulfiram

これらのことからマクラウス治療群では短期間投与により血清中に銅が輸送されている可能性が考えられた。また、大脳、小脳は個体差が大きく、脳内についてはさらなる

検討が必要である。腎臓、小腸における銅濃度結果はマクラウスが正常マウスに比べ銅濃度が高値を示した。これは腎臓、小腸では ATP7A の機能不全により排出されない銅が蓄積していると考えられる。マクラウス治療群での腎臓、小腸の銅濃度はマクラウス対照群に比べて、さらに高くなった。

(3) 脳内 cytochrome c oxidase 活性

短期間投与及び長期間投与における脳内 cytochrome c oxidase 活性の測定を行った。短期間、長期間ともに大脳、小脳において

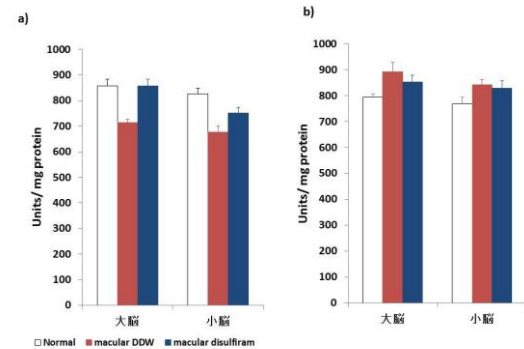


Figure 5. 脳内 cytochrome c oxidase 活性
a) 短期間 b) 長期間 Normal: 正常マウス (n=6, 6), macular DDW: macular マウス (n=5-6, 8-9), CuCl2+DDW, macular disulfiram: macular マウス (n=6, 8), CuCl2+disulfiram

cytochrome c oxidase 活性に有意な差は認められなかった。 (Figure 5)。

しかしながら、短期間投与においてマクラウス対照群に比べマクラウス治療群はその酵素活性が高い傾向が認められた。このことは disulfiram 投与により脳内の cytochrome c oxidase 活性が改善される可能性が考えられた。今後はさらなる検討が必要であると考えられる。また、マクラウスは銅治療により延命した際、生後 6 か月以降は正常マウスと脳内の CCO 活性に違いが認められなくなることが報告されている。今回の研究においても同様に長期間投与における CCO 活性に違いが認められなかった。

(4) 小脳内カテコラミン測定

銅酵素のドーパミンβヒドロキシラーゼはドーパミンからノルアドレナリンへの代謝を行っている。Menkes 病では銅の減少によりドーパミンβヒドロキシラーゼ活性が低下し、ドーパミンからノルアドレナリンへの代謝が障害され、ノルアドレナリン/ドーパミン比が低下することが知られている。また、ノルアドレナリンから作られるアドレナリン/ドーパミン比も同様に低下する。今回、ノルアドレナリン/ドーパミン比、アドレナリン/ドーパミン比を検出した。短期間では小脳のみでノルアドレナリン/ドーパミン比で有意差が認められた (Figure 6)。

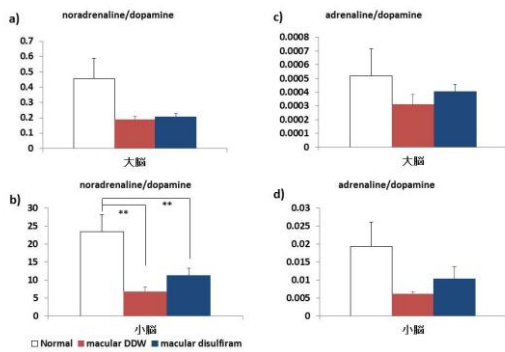


Figure 6. 短期間投与における脳内カテコラミン比
 a), b); noradrenaline/dopamine, c), d); Adrenaline/dopamine Normal: 正常マウス (n=5-7), macular DDW; macular マウス CuCl₂+DDW (n=6-7), macular disulfiram; macular マウス CuCl₂+disulfiram (n=6-7)

マクラマウスの治療群と対照群で有意差は認められなかったが、治療群でノルアドレナリン/ドーパミン比、アドレナリン/ドーパミン比ともに対照群に比べ高い傾向が認められた。長期間投与では大脳で正常マウス群とマクラマウス対照群、マクラマウス治療群の間でノルアドレナリン/ドーパミン比、アドレナリン/ドーパミン比の有意差が認められた (Figure 7)。小脳においてはそのような差は認められなかった。

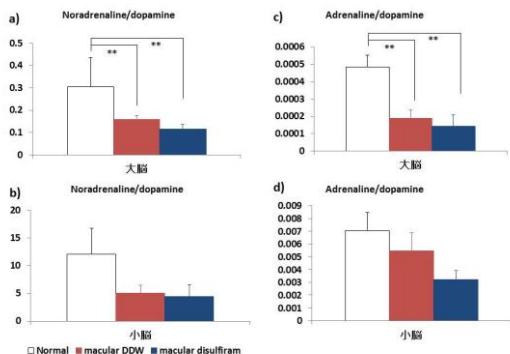


Figure 7. 長期間投与における脳内カテコラミン比
 a), b); Noradrenaline/dopamine, c), d); Adrenaline/dopamine Normal: 正常マウス (n=7), macular DDW; macular マウス CuCl₂+DDW (n=9), macular disulfiram; macular マウス CuCl₂+disulfiram (n=8-9)

長期間投与の大脳においてノルアドレナリン/ドーパミン比は個体差が大きく、大脳への銅の輸送には個体差があると考えられた。この結果から短期間の投与ではドーパミンβヒドロキシラーゼ活性が改善しドーパミン代謝が促進されている可能性が考えられた。しかしながら長期間ではそのような違いが認められなかったのはCCO活性同様に長期ではマクラマウスが正常マウスに近づくためであるとも考えられたが、更なる検討が必要と思われた。

(5) 肝機能、腎機能検査

肝機能、腎機能を調べるために AST、ALT、BUN、CRE をオリエンタル酵母に依頼して測定を行った。短期間における肝機能、腎機能は正常であると考えられた (Figure8)。長期間

の治療群において正常マウス、対照群に比べ ALT が高い値を示した。このことから治療群において肝機能が低下している可能性が考えられた。しかしながら組織像においては特に異常は認められなかったことから更なる検討が必要であると考えられる。腎機能に関しては治療群、対照群ともに異常は認められなかった。今回の結果は ALT、AST ともにばらつきが認められた。これらは銅に対する臓器の耐性、薬剤に対する反応性などが関与していると考えられる。

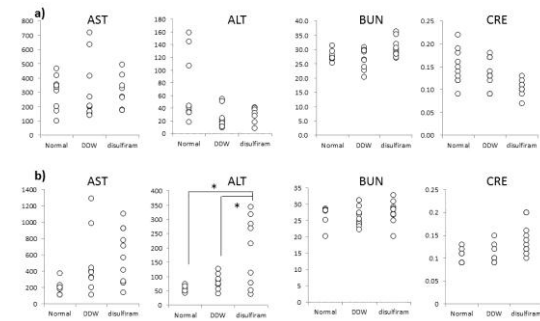


Figure 8. 肝機能、腎機能検査
 a); 短期間投与群 b); 長期間投与群 Normal: 正常マウス (短期 AST, ALT, BUN n=5, CRE n=10, 長期 AST, BUN, CRE n=7, ALT n=8), DDW; マクラマウス CuCl₂+DDW (短期 AST, ALT, BUN, CRE n=10, 長期 AST, BUN n=9, ALT n=8, CRE n=7), disulfiram; マクラマウス CuCl₂+disulfiram (短期 AST n=9, ALT n=7, BUN n=10, CRE n=8, 長期 AST, BUN, CRE n=10, ALT n=9)

(6) 総括

Menkes 病モデルマウスであるマクラウスに銅とキレート剤である disulfiram を併用投与することにより血清中銅濃度が上昇した。脳内銅濃度に関しては上昇する傾向が認められた。このことは disulfiram により銅が生体内に吸収されたと考えられる。更に disulfiram 投与群では体重の増加、cytochrome c oxidase 活性上昇傾向、カテコラミン代謝促進傾向が認められたことから生体内に吸収された銅は銅酵素として機能した可能性が示唆された。このような銅酵素活性の上昇は銅が disulfiram により血液脳関門を通過したためと考えられた。

長期間投与については肝機能の低下が考えられ今後容量の検討、さらなる副作用の検討が必要である。

本研究では disulfiram が Menkes 病治療として有用である可能性が示唆されたが、個体による差が大きく更に検体数を増やして検討を行う必要があると考えられた。

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 0 件)

[学会発表] (計 2 件)

1. ワッタナボン ペットパラシット、吉野美香、藤澤千恵、小川 英伸、児玉浩

子. Effect of copper and Disulfiram combination therapy on the macular mouse, an animal model of Menkes disease. 第52回日本先天代謝異常学会総会・第9回アジア先天代謝異常症シンポジウム、2010年10月21日-23日、大阪国際会議場

2. ワッタナボン ペットパラシット、吉野美香、藤澤 千恵、小川 英伸、児玉浩子. Effect of copper and Disulfiram combination therapy on the macular mouse, an animal model of Menkes disease. 第2回メタロミクス研究フォーラム、2010年11月2日-3日、京都薬科大学.

[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

藤澤 千恵 (FUJISAWA CHIE)

帝京大学・医学部・リサーチフェロー

研究者番号：10393000

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

ワッタナボン ペットパラシット

(BHADHAPRASIT WATTANAPPORN)

帝京大学・医学部・リサーチフェロー

研究者番号：90583253