

平成 28 年 5 月 24 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24591523

研究課題名(和文) マイクロペットを用いたメンケス病のキレート剤による治療効果に関する研究

研究課題名(英文) Study on the therapeutic effect of the chelating agent in Menkes disease by using microPET

研究代表者

新宅 治夫 (SHINTAKU, HARUO)

大阪市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：00206319

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：メンケス病は先天性銅代謝異常症であり、銅輸送障害による中枢神経での銅欠乏、腎での銅蓄積を来す疾患である。マクラマウスはメンケス病のモデルマウスであり、これに銅と脂溶性銅キレート剤ジスルフィラム(以下D)と水溶性銅キレート剤であるペニシラミン(以下P)を用いて、脳への銅集積と腎での銅排泄能に関して検討し、D及びP併用投与により、脳への銅移行が増加すると共に、腎での銅排泄が増加すると考えられる。この為、メンケス病の神経学的予後を改善でき、さらには、腎機能の長期予後を改善できる可能性を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Menkes disease is a congenital copper metabolic disorder, leading to both copper deficiency in brain and copper accumulation in the kidney due to copper transport disorder. Macula mice is used as Menkes disease model. Pretreatment with the lipophilic chelator disulfiram markedly increased copper uptake to the brain of macular mice. Pretreatment with the water-soluble chelator penicillamine enhanced urinary excretion and reduced copper accumulation in the kidney. Concomitant treatment with disulfiram and penicillamine retained the same effects. Combined use of disulfiram and penicillamine may improve clinical outcomes of Menkes disease. Therefore, it is possible to improve the neurologic outcome of Menkes disease, further revealed the possibility of improving the long-term prognosis of renal function.

研究分野：先天代謝異常症

キーワード：メンケス病 銅 ATP7A ジスルフィラム ペニシラミン マイクロペット キレート剤 発達遅滞

### 1. 研究開始当初の背景

(1) メンケス病はX染色体劣性遺伝形式で男児約8万人に1人の希な先天性銅代謝異常症である。本症は銅の転送酵素(ATP7)をコードする遺伝子の先天的な異常により、消化管における銅の吸収障害と、吸収された銅の各臓器への移行障害に由来する銅欠乏状態を引き起こす。重篤な銅欠乏により、特徴的な縮れた毛髪、色白で金髪、けいれん、精神運動発達遅滞、脳血管の蛇行などの臨床症状を呈する。神経症状は銅を補酵素とするドーパミンβ水酸化酵素の障害による神経伝達物質の低下により重篤な神経障害を呈する。また縮れた毛髪はケラチン異常に起因するもので、銅を含む酵素の活性化が阻害され、更にエラスチンやコラーゲンの障害から血管壁に異常をきたす。治療は銅の補充療法であるが、経口投与では上昇しないのでヒスチジン銅の皮下注射が一般的である。皮下注射では投与後速やかに血中の銅濃度は上昇し血中セロプラスミン濃度も上昇するため、一定の期間治療を継続すると皮膚や毛髪などで改善が認められるが、中枢神経症状の改善はほとんど認められない。これは銅が脳血液関門を通過しないため脳の銅欠乏状態は銅の皮下注射だけでは改善しないと考えられ、銅の脳への移行を助ける新しい治療法が望まれていた。2005年に児玉らはメンケス病のモデルマウスであるマクラマウスを用いて銅と銅のキレート剤であるジエチルジチオカルバメイトの併用療法で脳の銅濃度の上昇を認めることを報告(文献①)していた。

(2) また、メンケス病は腎からの銅排泄が障害されているため腎での銅蓄積を来たす疾患であり銅の補充療法は長期的には腎障害をきたす恐れがあり、銅補充療法の問題となっていた。

### 2. 研究の目的

(1) 我々はジエチルジチオカルバメイトの2量体であるノックピン(ジスルフィラム)がすでに臨床で嫌酒剤と使用されていることに着目し、銅の皮下注射に加えてこのジスルフィラムの併用療法をメンケス病の新しい治療法としての有効性を検討した。

(2) 銅の脳への移行だけでなく、銅の腎排泄について水溶性の銅キレート剤であるペニシラミンを用いてその効果を検討した。

### 3. 研究の方法

(1) 脂溶性キレート剤であるジスルフィラムの併用が銅の脳への移行に有効であることを証明するために、銅の核種である $^{64}\text{Cu}$ のマイクロPETを用いて画像解析を行った。コントロールマウス:4週齢の雄のマウス(C3H/He slc)に銅の核種 $^{64}\text{Cu}$ [52 MBq  $^{64}\text{CuCl}_2$  (Vehicle; saline)(pH7.5, volume 0.1ml)]を静脈内投与し4時間microPETで撮影した。脂溶性銅キレート

剤のジスルフィラムを投与し、コントロールのマウスでの銅の各臓器の取り込みがどのように変化するか検討するために、投与量を0, 1, 10, 100mg/kgの4群に分け、ジスルフィラムを腹腔内投与し、40分後に銅の核種 $^{64}\text{Cu}$ [52 MBq  $^{64}\text{CuCl}_2$  (Vehicle; saline)(pH7.5, volume 0.1ml)]を静脈内投与し4時間microPETで撮影した。次にメンケス病モデルマウス:4週齢の雄のマクラマウスにおいて同様の検討を行い治療効果について解析した。

(2) コントロールマウスにおいてジスルフィラムとペニシラミンの併用による銅の組織移行の効果を見るために投与量を0, 1, 10, 100mg/kgの4群に分け、ペニシラミンを経口投与し、40分後に銅の核種 $^{64}\text{Cu}$ [52 MBq  $^{64}\text{CuCl}_2$  (Vehicle; saline)(pH7.5, volume 0.1ml)]を静脈内投与し4時間microPETで撮影した。マクラマウスでも同様の検討を行った。

### 4. 研究成果

(1) マクラマウス(MD model)ではコントロールマウス(Wild type)に比べて銅の分布は腎に蓄積し脳への移行は少なかった。(図1)

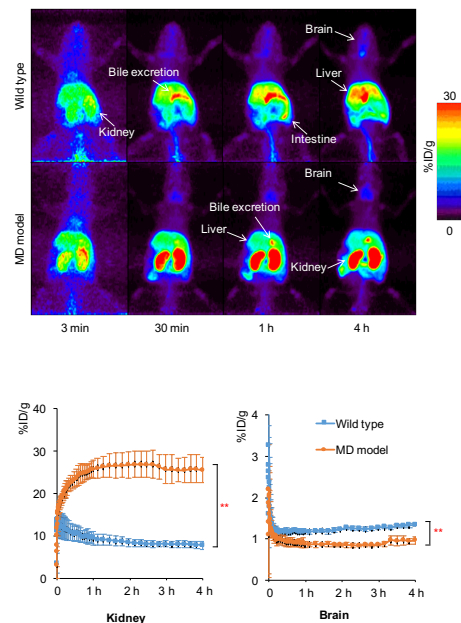


図1. 野生型およびメンケス病モデル(MD)における $^{64}\text{CuCl}_2$ の脳と腎への取り込み

(2) メンケス病モデルマウスでは、脂溶性キレート剤ジスルフィラムの投与により、銅の腎への蓄積は低下し、水溶性キレート剤ペニシラミン投与では、銅の腎からの排泄が増加し膀胱に著名な銅の蓄積が認められた。(図2)一方、銅の脳への移行では、脂溶性キレート剤ジスルフィラム投与で、脳への移行が著名に改善したが、水溶性キレート剤のペニシラミンでは脳への移行は全く認められなかった。(図2, 3)

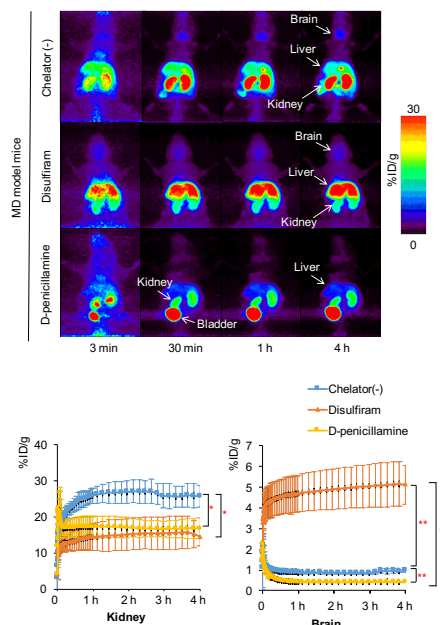


図2. メンケス病モデル(MD)マウスにおけるジスルフィラムとDペニシラミン投与時の $^{64}\text{CuCl}_2$ の脳と腎への取り込み

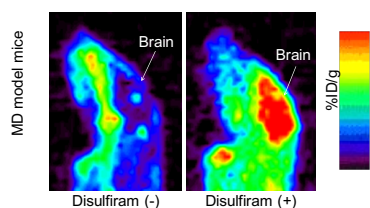


図3. メンケス病モデルマウスにおける脂溶性キレート剤ジスルフィラム投与による銅の脳への移行

(3) 以上の結果より、メンケス病に対する銅の皮下注射は、単独では脳への移行は無く治療効果は期待できないと考えられ、脂溶性キレート剤のジスルフィラム併用療法が進められる。一方銅の単独皮下注射では銅の腎への蓄積が長期的に腎障害をきたす恐れがあるが、ジスルフィラム併用により銅の腎への蓄積も改善することが示された。また水溶性キレート剤のペニシラミンの併用では腎からの銅排泄が著名に改善され、またジスルフィラムの脳への銅移行を阻害しないため、脂溶性と水溶性の両キレート剤の併用療法も可能であることを明らかにした。

#### <引用文献>

- ① Kodama H, Sato E, Gu YH, Shiga K, Fujisawa C, Kozuma T. J Inherit Metab Dis. 28(6) 2005, 971-8.

#### 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 1 件)

- ① Nomura S, Nozaki S, Hamazaki T, Takeda T, Ninomiya E, Kudo S, Hayashinaka E, Wada Y, Hiroki T, Fujisawa C, Kodama H, Shintaku H, Watanabe Y. PET imaging analysis with  $^{64}\text{Cu}$  in disulfiram treatment for aberrant copper biodistribution in Menkes disease mouse model. J Nucl Med. 2014; 55(5):845-51.

[学会発表] (計 5 件)

- ① Hoshina T, Nozaki S, Kudo S, Hamazaki T, Nakatani Y, Yamazaki A, Hayashinaka E, Wada Y, Kodama H, Watanabe Y. Shintaku H: Per-oral copper administration with disulfiram: potential treatment for Menkes disease. International Society for Trace Element Research in Humans (ISTERH) 2015 (Dubrovnik) Oct. 18-22, 2015.
- ② Shintaku H, Nomura S, Nozaki S, Takeda T, Hamazaki T, Fujioka H, Kodama H, Watanabe Y: Effects copper chelators on copper biodistribution in menkes disease model mice by using microPET. World congress on neurotherapeutics: dilemmas, debates & discussions (DDD). DDDN 2014 (Basel) Sep. 4-7, 2014.
- ③ Shintaku H, Nomura S, Nozaki S, Takeda T, Ninomiya E, Kudo S, Hamazaki T, Fujioka H, Hayashinaka E, Wada Y, Fujisawa C, Kodama H, Watanabe Y: Effects of two types of copper chelators on copper biodistribution in the kidney of menkes disease model mice by using microPET. The 3rd Global Congress for Consensus in Pediatrics & Child Health (CIP) 2014, (Bangkok) Feb. 13-16, 2014.
- ④ Nomura S, Nozaki S, Takeda T, Ninomiya E, Kudo S, Hamazaki T, Fujioka H, Hayashinaka E, Wada Y, Fujisawa C, Kodama H, Watanabe Y, Shintaku H: MicroPET imaging is useful to evaluate the effect of disulfiram on copper biodistribution in the kidney of Menkes disease model mice. Society of Nuclear Medicine and Molecular Imaging (SNMMI) 2013, Vancouver, BC, Canada, June 8-12, 2013.
- ⑤ 野村 志保, 野崎 聡, 濱崎 考史, 二宮 英一, 林中 恵美, 和田 康弘, 渡辺 恭良, 新宅 治夫: 小動物用PETイメージングによるメンケス病モデルマウスを用いた新規治療法の開発と評価 第49回日本周産期新生児医学会、パシフィコ横浜、神奈川県(2013.7.14-16)

[図書] (計 1 件)

- ① 新宅治夫: メンケス病、大関武彦、他編、今日の小児治療指針、第15版、医学書院、

東京、pp. 216、2012年

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0件）

○取得状況（計 0件）

〔その他〕

ホームページ等

無し

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

新宅治夫 (SHINTAKU, Haruo)

大阪市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：00206319

### (2) 研究分担者

塩見 進 (SHIOMI, Susumu)

大阪市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：30170848

濱崎孝史 (HAMAZAKI, Takashi)

大阪市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：40619798

藤岡弘季 (FUJIOKA, Hiroki)

大阪市立大学・大学院医学研究科・客員研究員

研究者番号：70382083

### (3) 連携研究者

無し

### (4) 研究協力者

無し