

201128247A

厚生労働科学研究費補助金  
難治性疾患克服研究事業

# Menkes 病・occipital horn 症候群の実態調査、 早期診断基準確立、治療法開発に関する研究

平成23年度 総括・分担研究報告書

平成24(2012)年3月31日

研究代表者 児玉浩子

## 目 次

I. 総括研究報告	
Menkes病・occipital horn症候群の実態調査、早期診断基準確立、治療法開発に関する研究	1
児玉浩子（帝京大学医学部小児科）	
II. 分担研究報告及び研究成果発表	
1. ヒスチジン銅の治療を受けているMenkes病患者の発育状況に関する疫学研究	5
顧艶紅（国立成育医療研究センター研究所）	
（資料） 実態調査2次アンケート調査用紙	9
2. Effect of copper and disulfiram combination therapy on the macular mouse, a model of Menkes disease	13
Wattanaporn Bhadhprasit（Department of Pediatrics, Teikyo University School of Medicine）	
3. Effects of disulfiram treatment in patients with Menkes disease and occipital horn syndrome	23
Eishin Ogawa（Department of Pediatrics, Teikyo University School of Medicine）	
4. Inherited Copper Transport Disorders: Biochemical Mechanisms, Diagnosis, and Treatment	30
Hiroko Kodama（Department of Pediatrics, Teikyo University School of Medicine）	
III. 平成23年度活動報告	
1. International Society for Trace Element Research in Humans（ISTERH） Conference 2011	44
2. 第53回日本先天性代謝異常学会総会	70
（併催 第10回アジア先天代謝異常症シンポジウム）	
3. 平成23年度「厚生労働省科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業」 3班合同公開シンポジウム 「難病・希少疾患を理解し克服する」	
【テーマ】 難病・希少疾患の理解と克服	73
IV. 研究成果の刊行に関する一覧表	113

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

総括研究報告書

**Menkes 病・occipital horn 症候群の実態調査、早期診断基準確立、  
治療法開発に関する研究**

児玉 浩子 帝京大学医学部小児科

研究要旨

Menkes 病および occipital horn 症候群は ATP7A 遺伝子異常症であるが、発症頻度は不明で、有効な治療法がない難治性疾患である。私達は、平成 22 年度の研究で Menkes 病の発症頻度は男子出生 100 万人に約 8 人、Occipital horn 症候群の発症頻度は男子出生約 68 万人に 1 人であることを推定した(本研究、平成 22 年度総括・分担研究報告書)。また、銅の皮下注射とジスルフィラム（ノックビン<sup>®</sup>）経口投与の新規併用治療法の検討では、モデルマウスを用いて銅の代謝動態への効果を明らかにした。さらに、女兒 1 例を含む 7 例の Menkes 病患者、1 例の occipital horn 症候群でヒスチジン銅皮下注射とジスルフィラム（ノックビン<sup>®</sup>）経口投与の新規併用療法を開始した。また、本研究が日本小児神経学会の支援共同研究として承認されたことより（申請番号 10-07）、本研究成果により得られた早期診断基準および治療ガイドラインを発表する体制を整えることが出来た。両疾患のホームページを立ち上げ、これらの成果を社会に発信している。さらに、患者家族会と定期的に交流し、患者家族の不安や悩みに対して支援している。

研究分担者：小川 英伸 帝京大学医学部小児科 准教授

研究分担者：藤澤 千恵 帝京大学医学部小児科 Research Fellow

研究分担者：新宅 治夫 大阪市立大学大学院医学研究科小児科 教授

研究分担者：清水 教一 東邦大学小児科 准教授

研究分担者：黒澤 健司 地方独立行政法人神奈川県立病院機構・神奈川県立こども医療センター 遺伝科 部長

研究分担者：顧 艶紅 独立行政法人・国立成育医療研究センター研究所 上級研究員

A. 研究目的

平成 23 年度の研究目的は以下である。

①平成 22 年度の調査で得られた 64 例の Menkes 病患者、7 例の occipital horn 症候群の病歴を詳細に検討し、早期診断基準を確立する。

②遺伝子型と表現型の関係を解析する。

③Menkes 病モデルマウスであるマクラマウスで、併用療法の長期治療効果を判定する。

④患者皮膚培養皮膚線維芽細胞でのジスルフィラ

ム（ノックビン®）の効果を明らかにする。

⑤両患者での新規治療の治療効果と副作用を明らかにする

⑥公開講座やホームページで、両疾患の理解および本研究の成果を世間に周知させる。

## B. 研究方法

### 1. 早期診断のための病歴調査、広告活動

全国アンケート調査の2次調査で、出生時の体重、身長、頭囲を正常児と比較した。また、小奇形の有無を調査した。

得られた知見について随時メンケス病・オクチピタルホーン症候群のホームページ等で公表した。

(<http://www.pediatric-world.com/menkes/index.html>)

### 2. 遺伝子型と表現型の関連の解析

遺伝子解析を希望する当該疾患患者で、文書での同意を得た後に、ATP7A 遺伝子のゲノム解析を行い、遺伝子型と表現型の関連を解析した。

### 3. 新規治療法（ジスルフィラム経口投与とヒスチジン銅皮下注射の併用療法）の効果の検討

①Macular マウスを用いての新时期治療の効果の解析

モデルマウスを用いたノックビン経口投与と銅注射の併用療法を1～2か月間行った研究では、Menkes 病の神経・結合織異常に有効で、副作用がないことを我々はすでに報告している。本研究では、さらに長期併用療法を行い、個体としての活動性・体重増加などの評価、各臓器の銅濃度、銅酵素活性などを検討し、長期的効果を明らかにした。銅濃度および銅酵素活性測定はすでに習熟している。同時に各臓器の組織学的検討、肝機能や腎機能を解析し、副作用の有無を明らかにする。

②患者への新規治療の実施

ノックビンはアルコール中毒の治療薬として保険診療で認可されている薬剤である。さらに抗がん剤であるシスプラチンの副作用軽減剤、コカイン

中毒の解毒薬としても用いられている。Menkes 病および occipital horn 症候群の病態および併用療法の作用機序から考えて occipital horn 症候群に対しても唯一の治療法になると考えられる。文書で同意が得られた7例の Menkes 病患者および1例の occipital horn 症候群患者で、治療効果と副作用の有無を経時的に検討した。すでに確立している治療効果評価法（骨密度、尿 VMA/HVA、尿デオキシピリジノリン値、血液・尿カテコラミン分画、頭部 MRS など）および全身状態や神経学的所見で治療効果を明らかにするとともに副作用の有無を詳細に検討した。ノックビンおよびヒスチジン銅の投与量や投与間隔などを検討し、最適な治療法を確立する（担当：児玉浩子、小川英伸、新宅治夫、清水教一）。

### （倫理面への配慮）

モデルマウスを用いた Menkes 病治療法開発の研究は、帝京大学動物実験倫理委員会の承認をすでに得ている（番号；帝医動07-035）。また、実験を担当する藤澤千恵は獣医で獣医博士を取得しており、実験動物に対する動物愛護に関しても十分に配慮できる。Menkes 病および occipital horn 症候群患者の遺伝子解析および生化学的診断も、帝京大学医学部倫理委員会の承認をすでに得ている（2006年、帝京医倫認証済み）。Menkes 病患者でノックビン経口投与と銅皮下注射の併用療法に関しても、帝京大学医学部倫理委員会の承認をすでに得ている（帝京医倫08-114）。遺伝子解析および治療を希望する患者家族には上記倫理委員会承認内容に準じて対応する。また、遺伝カウンセリング有資格者である共同研究者（黒沢健司医師）が必要に応じて遺伝カウンセリングを行った。

## C. 研究結果

### 1 早期診断のための方策

在胎週数に対する出生時の体重、身長、頭囲は対象児と差がなかったが、64例の Menkes 病患者の26.6%は小奇形を合併しており、これは全国の先

天奇形の発症率である 1.9%より有意に高かった。主な小奇形は、高口蓋、小頭症、脳または肺のう胞、房室ブロック、眼裂狭小、停留睾丸であった。これら奇形を合併する児では本症を疑う必要があると考えられた（顧艶紅、p75-82）。

広報活動：公開シンポジウムを平成24年2月19日に帝京大学で開催した。約50名の関係者が全国から参加した。Menkes病患者家族会代表の方にも講演していただき、患者家族の抱えている問題点や医療関係者への要望を聞くことが出来た。さらに患者家族と話し合う場を設け、お互いの情報交換を行った（p111-112）。

## 2. 遺伝子型—表現型の関連の解明

今までの解析も含めて57例のMenkes病患者および2例のoccipital horn症候群患者の遺伝子解析を行った。occipital horn症候群はsplice-site変異とmissense変異であることを明らかにした。Splice-site変異はリアルタイムRT-PCRで残存活性が存在することが確認された。遺伝子解析結果は遺伝カウンセリングを行い、患者家族に報告した（担当：黒沢、藤澤）。

## 3. 新規治療法（ノックビン経口投与とヒスチジン銅皮下注射）の確立

①モデルマウスを用いた新規治療の短期的および長期的効果および副作用の解明  
体重増加は併用療法群で対象群に比べて有意に増加していた（平均体重増加：併用療法群 $20.33 \pm 0.34g$ ；対照群 $18.64 \pm 0.49g$ ）。小脳および血清の銅濃度、小脳チトクロームCオキシダーゼ活性は併用療法群で対象群に比べて有意に改善を示した（p13-22）。短期併用療法群の血算、肝機能、腎機能および血液一般生化学検査に異常は認められなかったが、長期併用療法群の一部で肝機能異常が認められた。今後の課題と考えられた。

②モデルマウスでの新規治療での銅の脳への取り込みと保時の研究

マク라마ウスでの $^{64}Cu$ を用いたmicroPETの実験では、ノックビン投与マク라마ウスでは、Cuの脳への取り込みが、ノックビンを投与していないコントロールマク라마ウスに比べて、有意に多かった。さらにCuが長時間脳に保持された。すなわち、ノックビン併用で、銅の脳への移行を保持が、画像検査においても証明することが出来た（p94-102）。

③Menkes 病患者の培養皮膚線維芽細胞を用いた新規治療効果のin vitroの検討

本症患者の線維芽細胞では、銅が細胞外に分泌されず、細胞内に蓄積する。培養液にDEDTCを添加し、48時間培養し、その培養液中のlysyl oxidase (LOX)活性と細胞内銅濃度を検討した。DEDTC添加群のLOX活性は、DEDTCを添加していないMenkes病患者線維芽細胞群(コントロールMD細胞群)に比べて、有意に高値を示し、正常対照線維芽細胞群と同等の活性を示した。DEDTCが銅と結合してサイトゾルからゴルジ体への銅の輸送を改善し、分泌銅酵素LOX活性を改善することが示唆された（p103-110）。

④患者への新規治療の実施

7名のMenkes病患者でヒスチジン銅皮下注射とノックビン経口投与の併用療法を開始した。年齢は3歳～15歳で、6例は男児、1例は女児であった。7例ともヒスチジン銅の皮下注射をすでに行っている患者であった。ヒスチジン銅は原則今までの投与量で行った。ノックビンは30mg/日から開始し、徐々に増量し、約10mg/kg/日で現在経過を観察している。これらの成果は、平成23年10月の国際学会(ISTERH)でシンポジウムとして取り上げられ、諸外国の研究者に強い関心を持たれた。さらに英文論文として受理

されている (p44-58)。

#### D. 考察

本研究は平成22年度の2次募集の事業で、採択日は平成22年8月26日である。採択後にアンケート調査、動物実験、患者への治療を開始したものであるため、研究期間はまだ短い。しかし、現在も研究は着実に進行中である。今までの結果では、大まかに算定して Menkes 病は男子出生の約13万人に1人の発症、occipital horn 症候群は男子出生の約68万人に1人と考えられる。今後、登録患者を詳細に検討することにより、より正確な発症頻度が明らかになる。また、現在2次調査を継続して実施しており、それにより発症前の詳細な症状が明らかになり、早期診断法の確立が可能となる。

モデルマウスおよび患者での研究成果では、併用療法時の血清銅およびセルロプラスミン値は、銅注射のみの場合に比べて、明らかに上昇した。これは腸管での銅の吸収が改善していることを示唆している。さらに、モデルマウスでは、脳内の銅濃度およびチトクロームCオキシダーゼ値が改善した。これらの結果は、銅が脳血液関門を通過して神経細胞に輸送され、銅酵素であるチトクロームCオキシダーゼに利用されていることを示唆している。すなわち、当初に期待した効果が見られていると言える。また、明らかな副作用は認めない。患者家族も患者が元気になったことを実感しており、本併用療法が治療法として有効であ

ることを示唆している。今後、モデルマウスおよび患者での長期的効果を検証し、確立した治療法を提唱する予定である。

#### E. 結論

Menkes 病および occipital horn 症候群は希少疾患で、現在有効な治療法がない。全国アンケート調査の2次調査で、発症前の症状・所見を明らかにした。これらの結果を踏まえて早期診断法が提唱できると考えられる。

新規治療法に関しては、現在治療中の患者で副作用は見られておらず、数例で臨床症状の改善や血清銅・セルロプラスミン、骨密度等の改善が認められている。より詳細に経過を評価して、来年度中に治療指針を提唱する予定である。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

研究成果の刊行に関する一覧表、p113-115

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働省科学研究補助金（難治性疾患克服研究事業）  
Menkes 病・occipital horn 症候群の実態調査、早期診断基準確立、  
治療法開発に関する研究 分担報告書

研究課題：「ヒスチジン銅の治療を受けている Menkes 病患者の発育状況に関する疫学研究」

分担研究者

顧 艶紅（国立成育医療研究センター研究所 上級研究員）

研究要旨

平成 22 年度の 10-11 月に行った全国関連機関に対する 1 次と 2 次調査で得た Menkes 病に関するデータを入力し、ダブルチェックした。合計 1982-2009 年に生まれた 36 人の Menkes 病男児の出生時体重、出生時身長、出生時頭囲、ヒスチジン銅の治療中の身長や体重等のデータを用いて、疫学解析を行った。Menkes 病男児の平均在胎週数±標準偏差は 36.9 ± 1.3 週 (N=36、範囲 33-39 週)、平均出生体重は±標準偏差は 2621.8 ± 338.0g (N=35、範囲 1650-3314g) であった。しかし、在胎週数別の出生時体重、出生時身長と出生時頭囲は平成 22 年の厚生労働省の病院調査の一般男児データと比べ、統計上の有意差はみられなかった。生後 2 か月以降にヒスチジン銅治療を開始した Menkes 病男児はヒスチジン銅治療を行っているにも関わらず、体重と身長が一般男児より徐々に遅れてきて、延命期間が長くなるにつれて、体重と身長の遅れが顕著であった。ヒスチジン銅治療開始が生後 2 か月以降になれば、神経障害には効果がないと言われている。今回の結果で、ヒスチジン銅治療開始が 2 か月以降である場合は、発育障害も進行することが明らかになった。

A. 研究目的

Menkes 病に対する現行の治療法はヒスチジン銅の非経口投与である。非経口的ヒスチジン銅治療開始が生後 2 か月以降になると、神経障害の改善が見られない。その理由は、脳血液関門での銅蓄積と神経細胞への銅の輸送障害が原因であるとされている。一方、発育に関するヒスチジン銅の治療効果は検討されていない。今後の治療法の改良や開発のために、現行の治療法での発育に及ぼす影響を明らかにすることが必要である。そのために、今回、ヒスチジン銅の治療を受けている Menkes 病男児の体重と身長の変化について、検討した。

B. 研究方法

研究データは 2010 年の質問紙調査で得たもので、具体的な方法は 2010 年度の藤澤千恵らの研究報告書に記載した。対象者は 1982-2009 年間に生まれた 36 例の男児の患者であった。また、経時的に体重と身長が記載されたのは検討した 36 例中 12 例であった。研究データは匿名で、PASW で統計処理を行った。また、一般男児データと比較するために以下の参考データを利用した。1. 「平成 22 年乳幼児身体発育調査の概況について」 (<http://www.mhlw.go.jp>)、2. インターネットで公表された成長曲線自動作成プログラム

<http://www.pediatric-world.com/teikyoku/seicho.html>



調査時に 36 人の患者の栄養摂取の方法は次の通りであった。経口摂取のみは 10 人、経腸栄養のみは 16 人、経口摂取と経腸栄養は 3 人、中心静脈栄養と経腸栄養は 6 人、不明は 1 人であった。

### C. 研究結果

1. 表 1 に示したように Menkes 病男児における在胎週数別の出生時体重、出生時身長と出生時頭囲は平成 22 年の厚生労働省の病院調査の一般男児のデータと比べ、統計上の有意差がみられなかった。2. Menkes 病患者で、ヒスチジン銅の皮下注射を受けている患者の体重、身長経過を表 2、3 に示す。全例においてヒスチジン銅皮下注射の開始月齢は、3 か月以降の神経症状が発症してからであった。表 2 と 3 に示すようにヒスチジン銅の皮下注射を受けているにもかかわらず、体重と身長-SD 値は大きくなった。すなわち栄養状態は年齢が経るにつれて悪くなっていた。表 2 で示すように同じ月齢で体重が標準偏差は小さい方が長く生存できる傾向がみられた。

### D. 考察

今回の検討結果で、Menkes 病患者はやや早産で出生するが、出生時体重・身長は対照児と有意差がなかったことより、胎内では発育不全は見られないと考えられた。しかし、神経症状が発症した生後 3 か月以降にヒスチジン銅皮下注射の治療を開始した場合は、ヒ

スチジン銅投与を続けているにもかかわらず、体重・身長の増加は不良で、発育障害が徐々に進行し、患者の予後にかかわることが明らかになった。体重・身長の伸びの障害は、栄養不良が重要な要因と考えられるが、本症の患者は寝たきりであり、筋力低下、筋緊張低下であるため、筋などの発達が悪いことも原因であると考えられる。本症患者では骨粗鬆症を併発し、骨折も合併する。さらに、本症患者では、高頻度に難治性の下痢が続く。本症に下痢が伴うことの機序は不明であり、その解明は、本症患者の栄養状態を改善させるためにも今後の課題である。

### E. 結論

Menkes 病男児における在胎週数別の出生時体重、出生時身長と出生時頭囲は一般男児のデータより、統計上の有意差がみられなかったが、ヒスチジン銅治療開始が 3 か月以降の場合、体重と身長の増加が不良で、成長障害は徐々に進行し、患者の予後にかかわる傾向がみられた。

### F. 健康危険情報

なし。

### G. 研究発表

なし。

### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。



表 1. Menkes 病男児の出生時体重、出生時身長と出生時頭囲、および一般男児データとの比較

	在胎週数	Menkes 病患者 (男子)			男子 (平成 22 年乳幼児身体 発育調査データ*)	P 値**
		実数	平均値	標準偏差	平均値	
出生時体 重 (kg)	35	3	2.22	0.35	2.35	0.576
	36	8	2.52	0.31	2.53	0.944
	37	12	2.69	0.20	2.72	0.659
	38	8	2.83	0.26	2.94	0.255
	39	3	2.79	0.17	3.10	0.085
出生時身 長 (cm)	35	3	43.6	1.2	45.7	0.096
	36	2	48.3	2.5	46.5	-
	37	7	47.9	1.1	47.5	0.389
	38	2	48.3	2.4	48.5	-
	39	1	47.0	-	49.2	-
出生時頭 囲 (cm)	35	3	31.2	3.33	32.2	0.645
	36	2	32.0	-	32.6	-
	37	5	32.0	1.34	33.1	0.410
	38	1	33.0	-	33.4	-
	39	1	32.5	-	33.5	-

\* <http://www.mhlw.go.jp/stf/houdou/2r9852000001t3so.html> 「平成 22 年乳幼児身体発育調査の概況について」

\*\* 1 サンプルの t 検定

- : 不明

表 2. ヒスチジン銅皮下注射の治療を受けている Menkes 病男児の体重の経時変化

患者 ID	発症月齢	治療月齢	調査時転帰 平成 23 年 1 月末現在	患者月齢 1	患者体重 1 (kg)		患者月齢 2	患者体重 2 (kg)	
					値	SD*		値	SD*
1	3.0	4.0	生存、109 か月	3.0	6.0	-0.5	109.0	17.2	-2.0
2	3.0	4.0	死亡、39 か月時肺炎で	3.0	5.4	-1.2	38.0	7.4	-3.9
3	2.0	4.0	死亡、19 か月時原因不明 の心肺停止で	4.0	6.0	-1.2	-	-	-
4	1.0	5.5	死亡、56 か月時原因不明	5.0	6.8	-1.1	56.0	10.4	-3.0
5	1.5	6.0	死亡、43 か月時敗血症で	5.0	6.8	-1.1	-	-	-
6	4.0	8.0	生存、115.5 か月	5.0	7.9	-0.3	-	-	-
7	0.0	6.5	生存、95 か月	5.0	8.0	0.4	95.0	13.6	-2.5
8	-	-	死亡、30 か月時 腹部動脈瘤破裂で	6.0	6.5	-1.7	-	-	-
9	-	-	死亡、53 か月時感染契機 呼吸不全で	6.0	6.6	-1.6	52.0	9.5	-3.2
10	2.0	7.0	死亡、74 か月時原因不明	7.0	6.8	-1.6	-	-	-
11	4.0	6.5	死亡、76 か月時原因不明	7.0	6.9	-1.4	-	-	-
12	-	-	生存、26 か月	7.0	8.5	0.3	25.0	9.8	-1.7
範囲	1.0-4.0	4.0-8.0		3.0-7.0	5.4-8.5	+ 0.4 から -1.7	25.0-109.0	7.4-17.2	-1.7 から -3.9

\*参考データ：成長曲線自動作成プログラム <http://www.pediatric-world.com/sd/nose/seicho.html>。 - : 不明

表 3. ヒスチジン銅皮下注射の治療を受けている Menkes 病男児の身長の時経変化

患者 ID	発症月齢	治療月齢	患者月齢 1	調査時転帰 平成 23 年 1 月末現在	患者身長 1 (cm)		患者月齢 2	患者身長 2 (cm)	
					値	SD*		値	SD*
1	3.0	4.0	3.0	生存、109 か月	59.0	-0.7	109.0	96.0	-6.3
3	2.0	4.0	4.0	死亡、19 か月時原因不明の 心肺停止で	60.4	-2.3	-	-	-
4	1.0	5.5	5.0	死亡、56 か月時原因不明	-	-	56.0	88.0	-4.0
5	1.5	6.0	5.0	死亡、43 か月時敗血症で	66.0	-0.2	-	-	-
7	0.0	6.5	5.0	生存、95 か月	-	-	95.0	109.0	-3.0
9	-	-	6.0	死亡、53 か月時 感染契機呼吸不全で	62.6	-2.1	52.0	89.0	-3.2
10	2.0	7.0	7.0	死亡、74 か月時原因不明	60.5	-3.5	-	-	-
11	4.0	6.5	7.0	死亡、76 か月時原因不明	58.2	-4.5	25.0	79.0	-2.3
12	-	-	7.0	生存、26 か月	66.1	-1.2	-	-	-
範囲			3.0-7.0		58.2- 66.1	-0.2 から -4.5	25.0-109.0	88.0- 109.0	-2.3 から -6.3

\*参考データ：成長曲線自動作成プログラム <http://www.pediatric-world.com/teikyou/seicho.html>

平成 23 年 2 月 4 日

帝京大学医学部小児科  
児玉 浩子

Menkes 病・occipital horn 症候群 2 次調査のお願い

拝啓

余寒の候、先生におかれましてはますます御健勝のこととお慶び申し上げます。

昨年度は厚生労働省の研究である「Menkes 病・occipital horn 症候群の実態調査、早期診断基準確立、治療法開発」のアンケートにご回答いただき、誠にありがとうございました。多くの先生方、施設にご協力いただき無事 1 次調査を終えることができました。

今回、2 次調査としてより詳しい情報をまとめる事となりました。2 次調査を行うことにより Menkes 病・occipital horn 症候群について早期診断法の確立および予後などを明らかにしたいと思っております。

ご多忙のおり、大変恐縮でございますが、本調査にご協力いただけますようお願い申し上げます。同封した調査票にご記入いただき、同封されている封筒にて、3 月 31 日までに帝京大学小児科遺伝代謝研究室までご返送いただければ幸いです。

御回答いただきました調査結果は、本研究班の基礎資料として使わせていただきます。また、学会やホームページなどでの発表させていただきたいと思っております。調査結果の公表に際しましては、謝辞にお名前を載せさせていただきます。また、調査結果はご協力いただきました先生方にフィードバックさせていただく予定です。

何かご不明な点などございましたら、下記の連絡先までお問い合わせいただけますようお願いいたします。

敬具

厚生労働省科学研究費補助金難治性疾患克服事業 (H22-難治-一般-216)

研究代表者 児玉浩子 (帝京大学医学部小児科)

研究分担者 小川英伸 (帝京大学医学部小児科)

藤澤千恵 (帝京大学医学部小児科)

新宅治夫 (大阪市立大学大学院医学研究科小児科)

清水教一 (東邦大学医学部小児科)

黒澤健司 (地方独立行政法人神奈川県立病院機構神奈川県立こども医療センター)

顧艶紅 (独立行政法人国立成育医療研究センター研究所)

連絡先

〒173-8605 東京都板橋区加賀 2-11-1

帝京大学医学部小児科 遺伝代謝研究室

児玉浩子、藤澤千恵

TEL:03-3964-1211 内線:1494 FAX:03-3579-8212

E-mail: nanchi22@med.teikyo-u.ac.jp

患者様イニシャル：

患者様ID(カルテ番号)：

出生年月日： 年 月 日 性別： 男 女

- 1 遺伝子解析 施行していない  
施行した(変異: )
- 2 現在の状況 生存  
死亡 死亡年月日あるいは年齢( )  
死亡原因( )
- 3 (ご両親)血縁婚 いいえ  
はい(具体的に: )
- 4 家族歴 親族にMenkes病患者がいますか  
いない  
いる(患者との関係: )
- 4 出生時状況 在胎週数( ) 出生時体重( )  
出生時身長( ) 出生時頭囲( )  
黄疸 普通 不明  
強い(光線療法 あり 交換輸血 あり)
- 5 奇形 なし  
あり(どのような奇形でしょうか )
- 6 発達歴 追視 なし あり( カ月) 不明  
頸定 なし あり( カ月) 不明  
寝返り なし あり( カ月) 不明  
お座り なし あり( カ月) 不明  
退行性変化 なし あり(具体的に: )  
)
- 7 初診時年齢または年月日 年齢( 才 カ月 )あるいは年月日( 年 月 日 )
- 8 初診時の主訴 ( )

9 現病歴について

- ① 頭髪異常                      なし                      不明  
 あり(生後              カ月)から 注:さかのぼって頭髪異常が認められたとき
- ② 低体温エピソード              なし                      不明  
 あり 回数 (              回)( 生後              カ月、              カ月、              カ月)
- ③ 痙攣                              なし                      不明  
 あり (                      カ月)から  
 痙攣のタイプ(                              )
- ④その他(                              )

- 10 診断時年齢または年月日              年齢(              才              カ月 )あるいは年月日 (              年              月              日 )
- 診断時の体重                      (                      kg)
- 診断時の身長                      (                      cm)
- 最近(              年              月              日 )の体重                      (                      kg)
- 最近(              年              月              日)の身長                      (                      cm)

11 確定診断法——該当する項目前に○をつけてください。

- (              )銅負荷試験                      (              )遺伝子診断  
 (              )培養皮膚線維芽細胞内の銅の蓄積              (              )その他(検査名:                      )

- 12 脳血管の異常              なし              不明              あり              最初の検査日あるいは年齢 (                      )  
 所見 (                      )
- 13 頭蓋内出血              なし              不明              あり              最初の検査日あるいは年齢 (                      )  
 所見 (                      )
- 14 脳萎縮                      なし              不明              あり              最初の検査日あるいは年齢 (                      )  
 所見 (                      )
- 15 他の脳MRI所見              なし              不明              あり              最初の検査日あるいは年齢 (                      )  
 所見 (                      )
- 16 膀胱憩室                      なし              不明              あり              発症に気付いた年齢 (                      )

17 骨折	なし	不明	あり	発症年齢 ( )
18 骨粗鬆症	なし	不明	あり	発症年齢 ( ) 最初の検査日あるいは年齢 ( )
19 ヒスチジン銅の治療	なし	不明	あり	治療開始年齢あるいは年月日 ( )
ヒスチジン銅治療有りの方				
1 ノックピンの併用	なし		あり	併用開始年齢あるいは年月日 ( ) 併用期間 :
2 ヒスチジン銅治療後の変化	なし		あり	(具体的に:
20 現在の食事の取り方				
経口摂取	可能		不可能;	いつから ( 才 カ月)
中心静脈栄養法	なし		あり;	いつから ( 才 カ月)
経腸栄養	なし		あり;	いつから ( 才 カ月)
21 人工呼吸器を使ったことがありますか				
気管挿管	なし		あり;	いつから ( 才 カ月)
気管切開	なし		あり;	いつから ( 才 カ月)
22 生存している方のみ				
1 現在の状況について				
痙攣	なし		あり	
抗痙攣薬使用	なし		あり	(薬剤名: )
抗痙攣薬効果	なし		多少あり	著明にあり
2 現在の状態				
	①追視	可能	不可能	②笑い あり なし
	③頸定	あり	なし	④寝返り 可能 不可能
	⑤お座り	可能	不可能	

# Effect of Copper and Disulfiram Combination Therapy on the Macular Mouse, a Model of Menkes Disease

Wattanaporn Bhadhprasit<sup>a</sup>, Hiroko Kodama<sup>a,b\*</sup>, Chie Fujisawa<sup>a</sup>, Tomoko Hiroki<sup>a</sup>, Eishin Ogawa<sup>a</sup>

<sup>a</sup> *Department of Pediatrics, Teikyo University School of Medicine, Tokyo*

<sup>b</sup> *Department of Health and Dietetics, Faculty of Health and Medical Sciences, Teikyo Heisei University, Tokyo*

Short title: Therapy with copper and disulfiram on macular mice

## ABSTRACT

Menkes disease (MD) is a genetic neurodegenerative disorder characterized by copper deficiency due to a defect in ATP7A. Standard treatment involves parenteral copper-histidine administration. However, the treatment is ineffective if initiated after two months of age, because the administered copper accumulates in the blood-brain barrier and is not transported to neurons. To resolve this issue, we investigated the effects of a combination therapy comprising copper and disulfiram, a lipophilic chelator, in the macular mouse, an animal model of MD. Seven-day-old macular mice treated subcutaneously with 50 µg of CuCl<sub>2</sub> on postnatal day 4 were used. The mice were given a subcutaneous injection of CuCl<sub>2</sub> (10 µg) with oral administration of disulfiram (0.3 mg/g body weight) twice a week until eight weeks of age, and then sacrificed. Copper concentrations in the cerebellum, liver, and serum of treated macular mice were significantly higher than those of control macular mice, which received only copper. Mice treated with the combination therapy exhibited higher cytochrome c oxidase activity in the brain. The ratios of noradrenaline and adrenaline to dopamine in the brain were also increased by the treatment, suggesting that dopamine β-hydroxylase activity was improved by the combination therapy. Liver and renal functions were



almost normal, although renal copper concentration was higher in treated macular mice than in controls. These results suggest that disulfiram facilitates the passage of copper across the blood-brain barrier and that copper-disulfiram combination therapy may be an effective treatment for MD patients.

**Key words:** Menkes disease, copper, disulfiram, cytochrome c oxidase, blood-brain barrier

## **Introduction**

Menkes disease (MD) is an X-linked recessive disorder caused by a defect in copper-transporting ATPase (ATP7A). In humans, ATP7A is expressed in almost all cell types except hepatocytes. In normal cells, ATP7A is localized in the trans-Golgi network and transports copper from the cytosol into the Golgi apparatus, where copper is incorporated into secretory copper enzymes [1]. In MD-affected cells, however, copper accumulates in the cytosol and cannot be excreted. Copper accumulation in the intestines results in copper absorption failure, leading to overall copper deficiency in the body, except in the kidney. Copper also accumulates in the cells of the blood-brain barrier. Thus, copper cannot be delivered from the bloodstream to neurons after barrier maturation [2–4]. Copper concentrations in the serum, liver, and brain of MD patients are significantly lower, resulting in reduced activities of copper-dependent enzymes, such as cytochrome c oxidase, dopamine  $\beta$ -hydroxylase, and lysyl oxidase. Currently, parenteral administration of copper-histidine is the standard treatment for MD [1,5]. However, the treatment is ineffective if initiated after two months of age, because the administered copper accumulates in the blood-brain barrier and is not transported to neurons. Therefore, copper delivery to neurons is the most important objective in the treatment of MD-associated neurological degeneration [6].

We previously reported that a combination therapy comprising copper and diethyldithiocarbamate (DEDTC) improved copper concentrations, cytochrome c oxidase activity, and catecholamine metabolism in the brain of macular mice [7]. A dimer of DEDTC, disulfiram, has

been used for the treatment of alcoholism and cocaine addiction and as a modulator of cisplatin-induced toxicity [8–10]; thus, oral disulfiram is easily applicable in the clinical setting. Here, we report the effects of a combination therapy comprising copper injection and oral disulfiram on the macular mouse, an animal model of MD [11].

## **Materials and methods**

### *Animals*

Male hemizygous macular mice and normal littermate controls were treated with a single subcutaneous injection of cupric chloride solution (50 µg of CuCl<sub>2</sub>) on postnatal day 4, because macular mice die without this treatment. All mice were maintained under standard conditions. Macular mice were separated into control and treated groups. The latter group was treated with a subcutaneous injection of CuCl<sub>2</sub> (10 µg) and oral administration of disulfiram (0.3 mg/g body weight) twice a week from the age of 7 days to 8 weeks, and then sacrificed. Control mice were given a subcutaneous injection of CuCl<sub>2</sub> (10 µg) as above, but disulfiram was replaced with double distilled water. Normal littermates were used as normal controls. Body weights were measured twice a week during the treatment period. The cerebrum, cerebellum, kidney, liver, and intestines were dissected. Sera and tissues were stored at –80°C until analysis. This study was approved by Teikyo University School of Medicine Animal Ethics Committee (07-035).

### *Measurement of copper concentration*

Tissue samples were dried at 120°C for 12 h and wet-digested with concentrated HNO<sub>3</sub> by heating at 120°C, and the resultant residues were dissolved in 2 mol/L HNO<sub>3</sub>. Serum samples were wet-digested with concentrated HNO<sub>3</sub> by heating at 120°C. Copper concentration was analyzed with a Hitachi Z-8100 atomic absorption spectrophotometer (Hitachi Industries, Japan). All glassware was washed with nitric acid to avoid metal contamination.

### *Assay for Cytochrome c oxidase activity*

Mitochondria were isolated from tissue samples immediately after sacrifice using the Mitochondria Isolation Kit for Tissue (Pierce, Rockford, IL). Cytochrome c oxidase activity in the mitochondrial solution was determined using the Cytochrome c Oxidase Assay Kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Protein concentration was determined using the Pierce BCA Protein Assay Kit (Pierce, Rockford, IL).

### *Measurement of catecholamine and enzyme concentrations*

Cerebrum and cerebellum were homogenized in 0.4 N perchloric acid and centrifuged at 4°C (12,000 g, 5 min). Catecholamines, including dopamine, noradrenaline, and adrenaline, in the supernatant were analyzed using a catecholamine autoanalyzer (HLC-8030; Toso Ind., Tokyo, Japan). Serum levels of aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), blood urea nitrogen (BUN), and creatinine were analyzed by Oriental Yeast Co., Ltd (Shiga, Japan).

### *Statistical analysis*

Data are presented as mean±standard error (SE). The SE is computed from known sample statistics, and it provides an unbiased estimate of the standard deviation of the statistic, thus we used SE. Difference in body weight changes between two groups was analyzed using two-way repeated measure ANOVA. Differences in copper concentration, CCO activity and catecholamine between two groups were analyzed using one-way repeated measure ANOVA (Tukey post hoc test);  $p < 0.05$  was considered significant.

## **Results and discussion**

As shown in Fig. 1, weight gain in treated macular mice was significantly higher than that of control macular mice after week 7. Fig. 2 shows the copper concentration in tissues and serum. Consistent with a previous report [12], control macular mice exhibited low copper concentrations in

serum, liver, and brain, and high copper concentrations in the intestine and kidney. Copper concentrations in the cerebellum, liver, and serum of treated macular mice were significantly higher than those of control macular mice, suggesting that disulfiram improved intestinal copper absorption. The activity of cytochrome c oxidase, a copper-dependent enzyme, is reduced in the brain of macular mice [12]. Combination therapy improved cytochrome c oxidase activity (Fig. 3).

Dopamine  $\beta$ -hydroxylase is also a copper-dependent enzyme. Copper is incorporated into dopamine  $\beta$ -hydroxylase in the Golgi apparatus in normal cells. Dopamine  $\beta$ -hydroxylase activity is decreased in the brain of the brindled mouse, an animal model of MD [13]. Furthermore, even in patients with MD, the activity of this enzyme is reduced and cannot be improved by parenteral copper administration [14]. These findings indicate that copper cannot be incorporated into dopamine  $\beta$ -hydroxylase in MD-affected cells due to ATP7A defects. Given that dopamine  $\beta$ -hydroxylase converts dopamine to noradrenaline, which is subsequently metabolized to adrenaline, the ratios of noradrenaline and adrenaline to dopamine serve as indicators of dopamine  $\beta$ -hydroxylase activity. As shown in Fig. 4, the ratios of noradrenaline and adrenaline to dopamine were higher in treated macular mice, suggesting that dopamine  $\beta$ -hydroxylase activity was improved by the therapy. The results of our study suggest that disulfiram facilitates copper transport into the Golgi apparatus of affected cells, including cells in the intestines and blood-brain barrier, thereby making it available to copper-dependent enzymes.

MD patients and macular mice exhibit high renal copper concentrations [1]. Indeed, control macular mice exhibited a high concentration of copper in the kidney. The renal copper concentration of treated macular mice was higher than that of control macular mice. Serum creatinine levels were normal (normal, 0.08–0.24 mg/dL) in 23 treated mice; one treated mouse exhibited a slightly higher serum creatinine level (0.3 mg/dL). Serum BUN, AST, and ALT levels were normal in all treated macular mice. To apply the combination therapy to patients with MD, the effects of long-term combination treatment must be investigated in mouse models of MD.

## **Conclusions**

A combination therapy comprising copper injection and oral disulfiram improved copper concentrations in serum, liver, and brain, and enhanced cytochrome c oxidase activity and catecholamine metabolism in the brain of the macular mouse, a model of MD. These results suggest that the lipophilic copper-disulfiram complex can penetrate cellular membranes, including the blood-brain barrier and Golgi membranes, in MD-affected cells, thereby making copper available to copper-dependent enzymes. Connective tissue disorders, including arterial abnormalities, bladder diverticula, and osteoporosis, are also serious problems in patients with MD. These disorders are caused by reduced activity of lysyl oxidase, a secretory copper-dependent enzyme. Thus, the copper-disulfiram combination therapy may also be effective in treating connective tissue disorders associated with MD.

## **Acknowledgement**

This work was in part by a Grant of Research on Intractable Diseases from Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan (23-326) and a memorial fund for Naoki, a former patient with Menkes disease.

## **References**

- [1] Kodama H, Fujisawa C. Copper metabolism and inherited copper transport disorders: molecular mechanisms, screening, and treatment. *Metallomics* 2009; 1:42-52.
- [2] Kodama H, Meguro Y, Abe T, Rayner MH, Suzuki KT, Kobayashi S, Nishimura M. Genetic expression of Menkes disease in cultured astrocytes of the macular mouse. *J Inherited Metab Dis* 1991; 14:896-901.
- [3] Kodama H. Recent developments in Menkes disease. *J Inherited Metab Dis* 1993; 16:791-9.
- [4] Qian Y, Tiffany-Castiglioni E, Welsh J, Harris ED. Copper efflux from murine microvascular cells requires expression of the Menkes disease Cu-ATPase. *J Nutr* 1998; 128:1276-82.