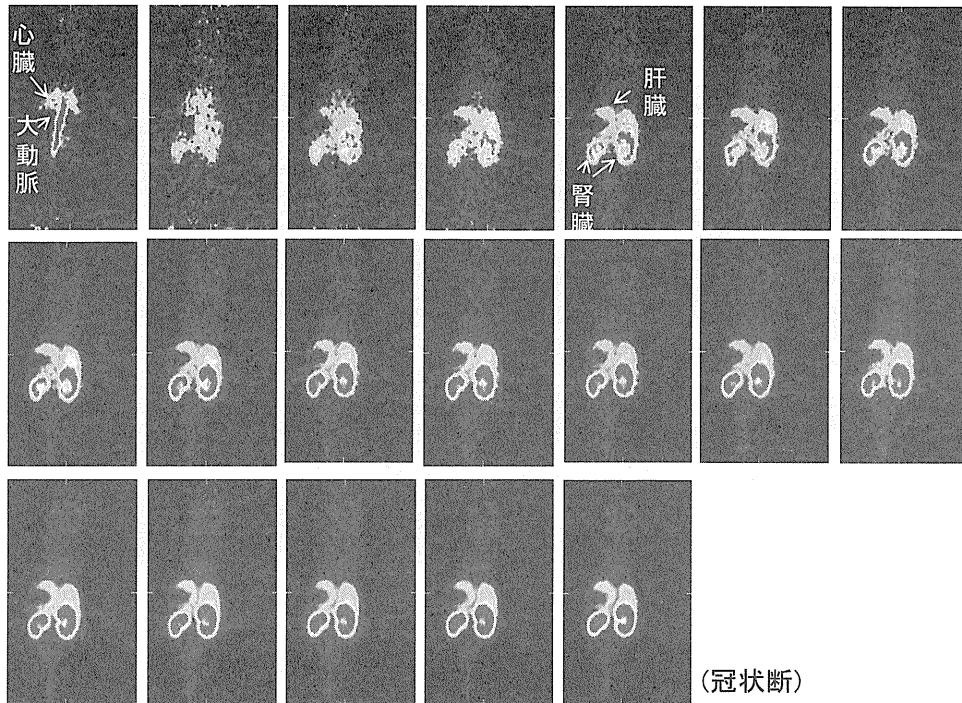


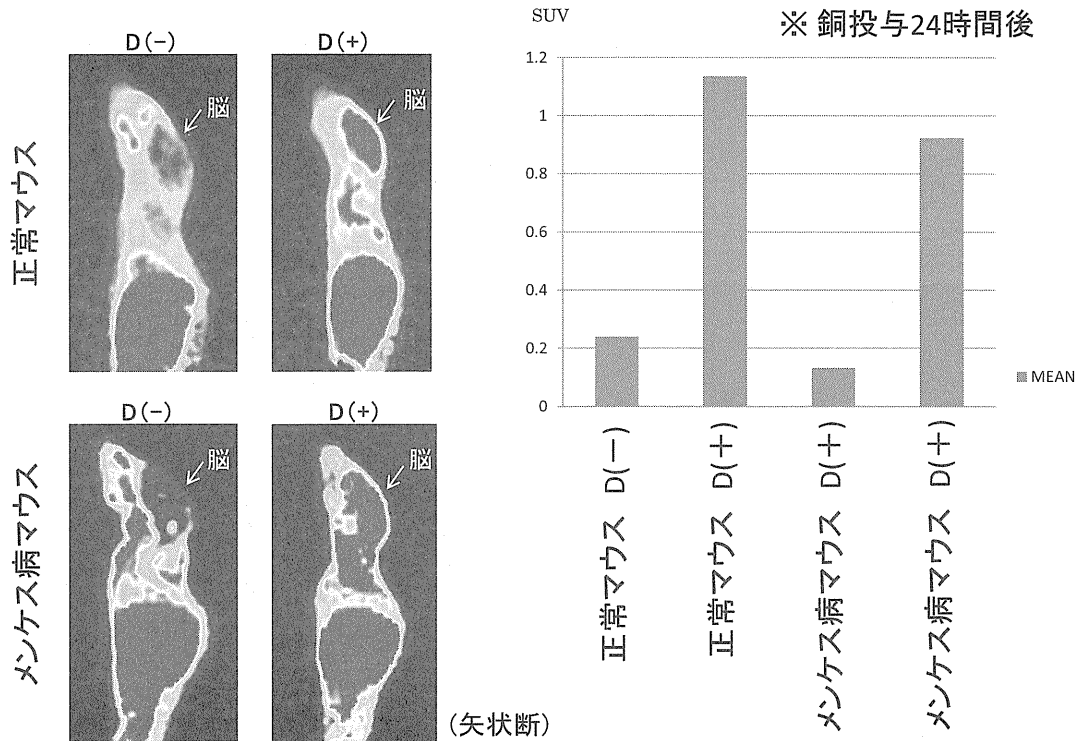
メンケス病マウスでは、腎臓への顕著な銅集積が認められた。

0分→



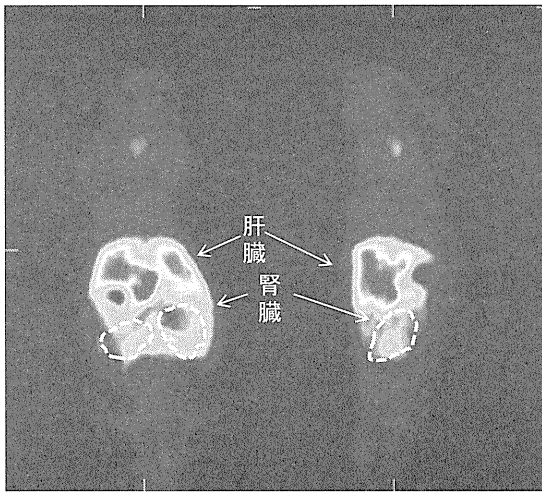
← 240分

脂溶性銅キレート剤ジスルフィラム(D)により、メンケス病マウスにおいて、脳への銅集積が増加した。



正常マウスでは多くの銅が肝臓に集積し、メンケス病マウスでは腎臓への銅集積が増加した。

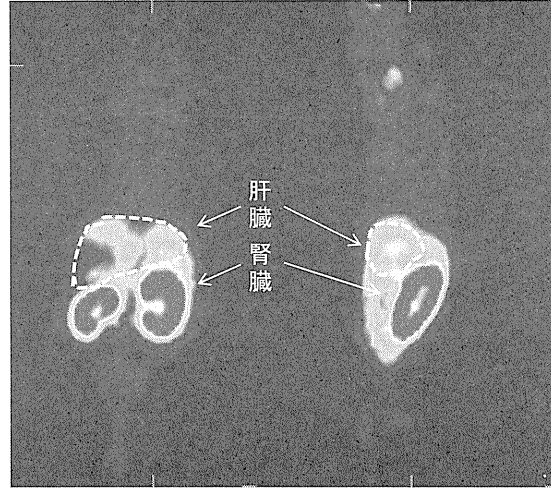
※ 銅投与4時間後



(冠状断)

(矢状断)

正常マウス



(冠状断)

(矢状断)

メンケス病マウス

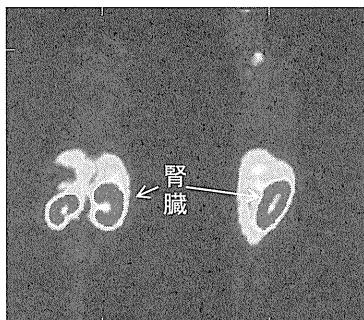
水溶性銅キレート剤ペニシラミン(PEN)により、メンケス病マウスにおいて、腎臓での銅集積が低下し、尿中への銅排泄が増加した。

※ 銅投与4時間後

PEN(-)

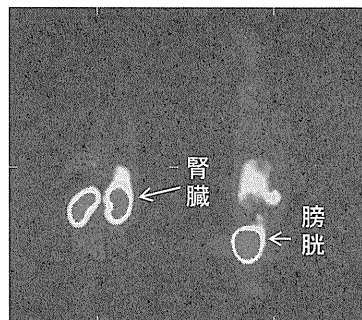
PEN(+)
100mg/kg

PEN(+)
200mg/kg



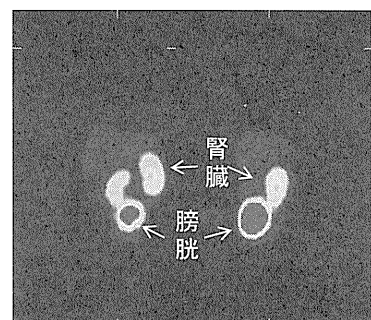
(冠状断)

(矢状断)



(冠状断)

(矢状断)



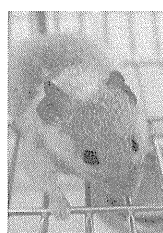
(冠状断)

(矢状断)

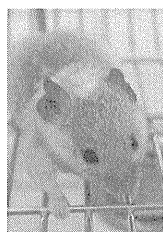
結果のまとめ (メンケス病マウスにおける銅の体内動態)

	脳	肝臓	腎臓	尿
銅投与のみ	—	+	++	±
ジスルフィラム併用投与	+	++	+	±
ペニシラミン併用投与	—	±	+	++

今後の展望について



→ 脳への銅増加
ジスルフィラム(脂溶性銅キレート剤)



→ 腎臓での銅低下
尿中銅排泄増加
ペニシラミン(水溶性銅キレート剤)



→ 脳への銅増加？
腎臓での銅低下？
尿中銅排泄増加？
ジスルフィラムとペニシラミンの併用

考察

- ✓ メンケス病では、ATP7A異常により、全身臓器での銅分布異常が存在すると考えられ、ヒスチジン銅の注射のみでは分布異常の改善は乏しい。
- ✓ 脂溶性および水溶性銅キレート剤を用いることで、脳や腎臓をはじめ、各臓器における銅分布異常を改善できる可能性が考えられた。
- ✓ microPETを用いた分子イメージング技術は、メンケス病における銅の体内動態の解明や、銅キレート剤の効果を評価する上で、有用であった。

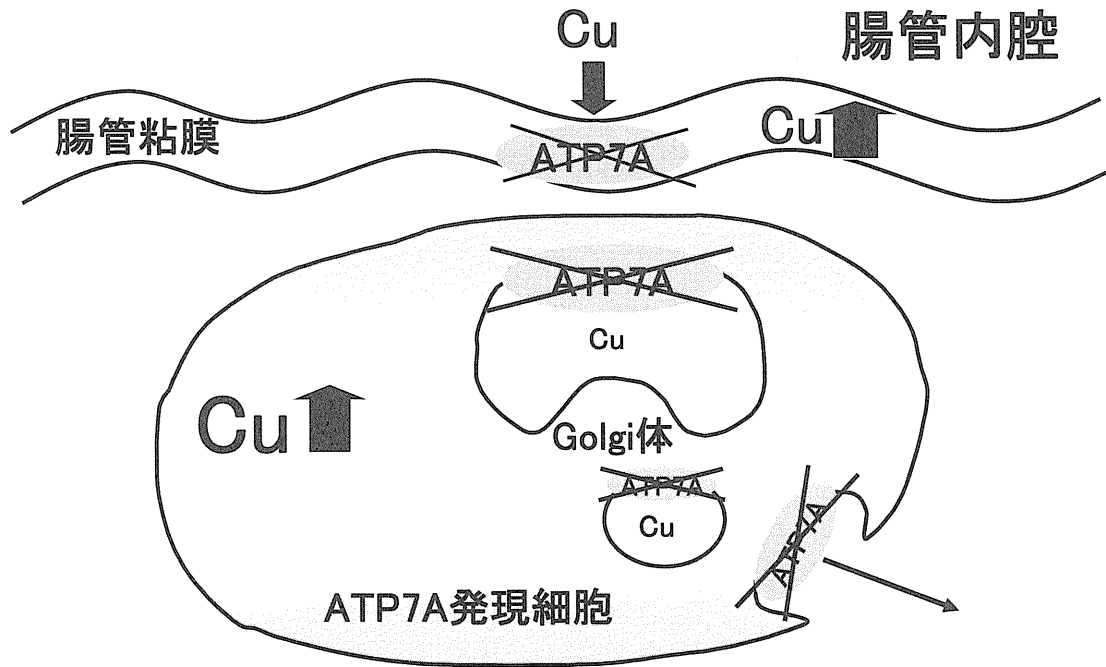
Menkes病患者皮膚線維芽細胞を用いた銅分泌酵素 Lysyl Oxidase (LOX) 活性に対する Diethyldithiocarbamate (DEDTC) の効果の検討

帝京大学 医学部 小児科
廣木伴子、藤澤千恵、宮澤未緒、小川英伸、児玉浩子

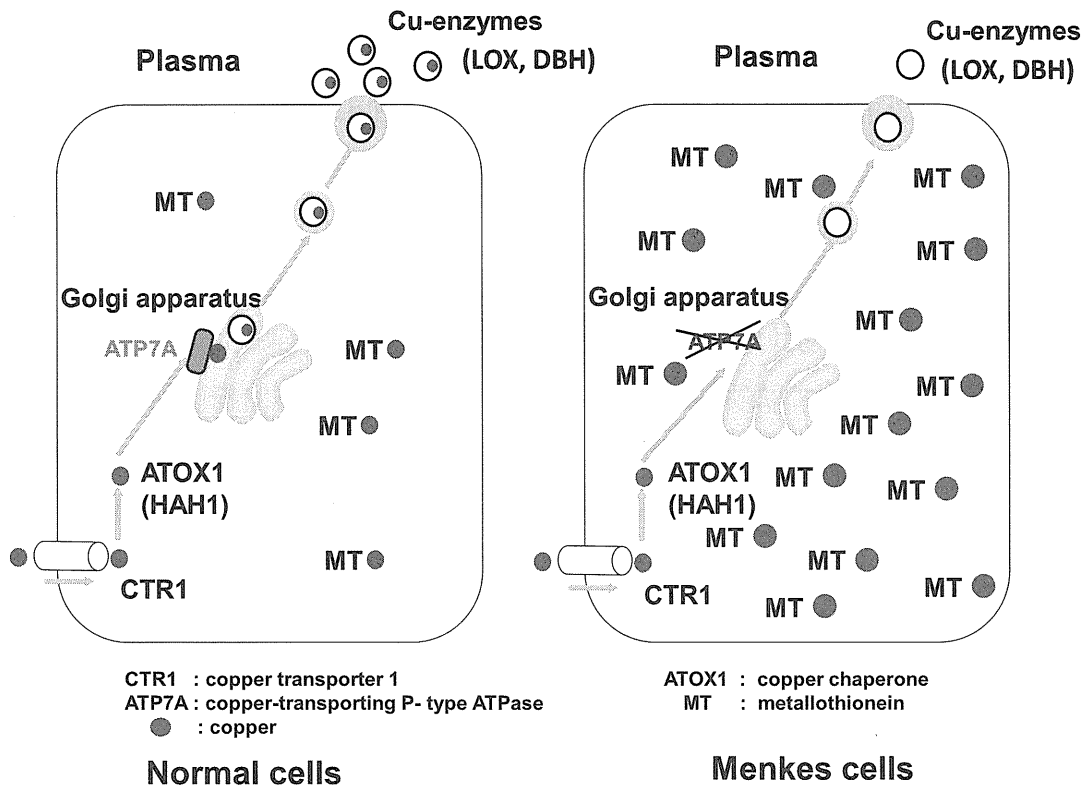
はじめに

Menkes病は銅輸送蛋白であるATPase (ATP7A)遺伝子異常による先天性銅代謝異常疾患である。ATP7Aは細胞内で銅のサイトソルからゴルジ体および細胞外への輸送を司っている。ゴルジ体の銅は分泌銅酵素として、細胞外に分泌される。ATP7A機能不全であるMenkes病細胞では、銅がゴルジ体へ輸送されないため、コラーゲン架橋を司る分泌銅酵素Lysyl Oxidase (LOX)活性の低下が生じ、重篤な結合織異常を呈する。非経口銅投与によってもゴルジ体への銅輸送は改善されないため、LOX活性は改善されず、結合織異常に対しては効果がない。したがって、Menkes病治療においては、投与した銅を有効的にゴルジ体膜や細胞膜を通過させることが重要である。Disulfiram(ジスルフィラム)は、Diethyldithiocarbamate (DEDTC)の二量体であり、体内で速やかにDEDTCに還元される。我々は、以前、Menkes病モデルマウスを用いて、銅と脂溶性キレート剤DEDTCの併用投与が血液脳関門での銅の輸送に有効であることを示した。今回は、Menkes病皮膚線維芽細胞を用いて、分泌銅酵素LOX活性を指標としてDEDTCの有効性について検討した。

Menkes病の銅代謝病態



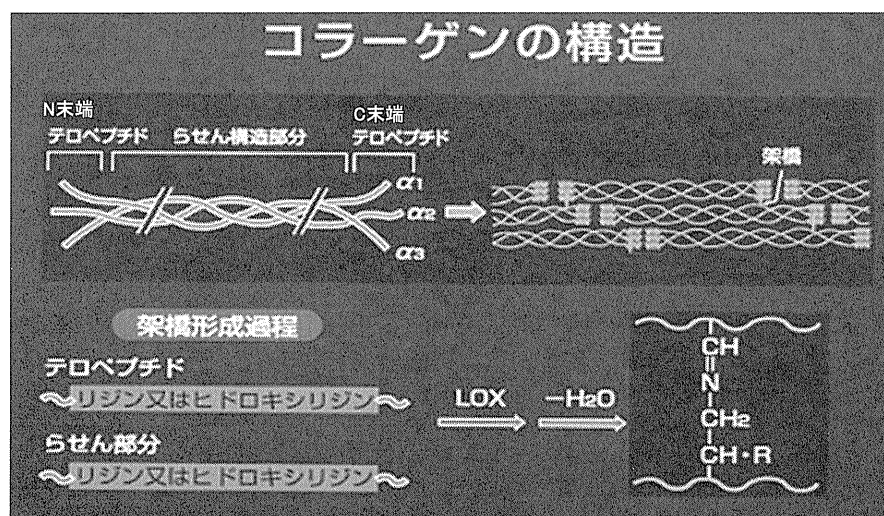
Menkes病の細胞内銅代謝病態



Menkes病で活性が低下する銅酵素と症状の関連

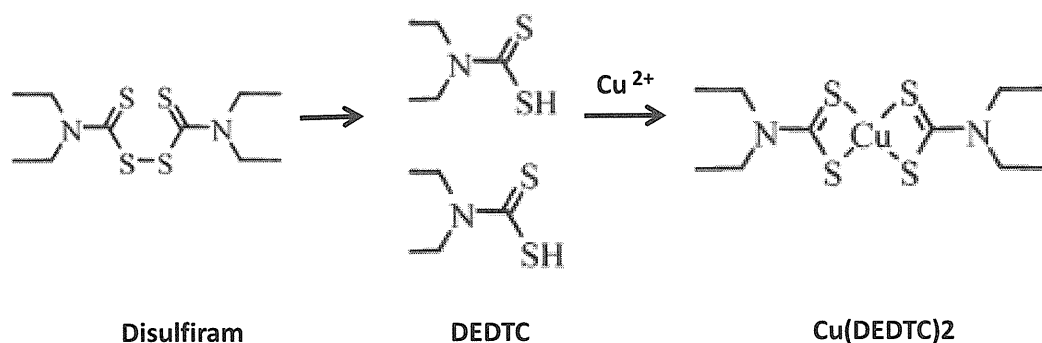
活性低下する銅酵素	症状(胎内由来の銅が欠乏する生後2カ月以降に著明になる)
チトクロームCオキシダーゼ (ミトコンドリア)(CCO)	低体温 進行性脳障害(重篤)
チロシナーゼ(サイトソル)	皮膚色素低下(色白)
サルファヒドリルオキシダーゼ (サイトソル)	毛髪異常 (赤毛、捻転毛、結節性裂毛)
ドーパミン-β-ヒドロキシラーゼ (DBH)(分泌酵素)	血圧低下 血管脆弱(硬膜下出血、血管蛇行)
リシルオキシダーゼ(LOX) (分泌酵素)	膀胱憩室 皮膚過伸展 骨変化(骨粗鬆症、骨折)

リシルオキシダーゼ(LOX):
分泌銅酵素、コラーゲン架橋の律速酵素



Diethyldithiocarbamate (DEDTC)は脂溶性キレート薬
DisulfiramはDEDTCの二量体であり、体内で速やかにDEDTCに還元される。

- ・体内でDEDTCと銅が結合し、油性になり、膜(細胞膜、ゴルジ体膜)を通過するのではないか？



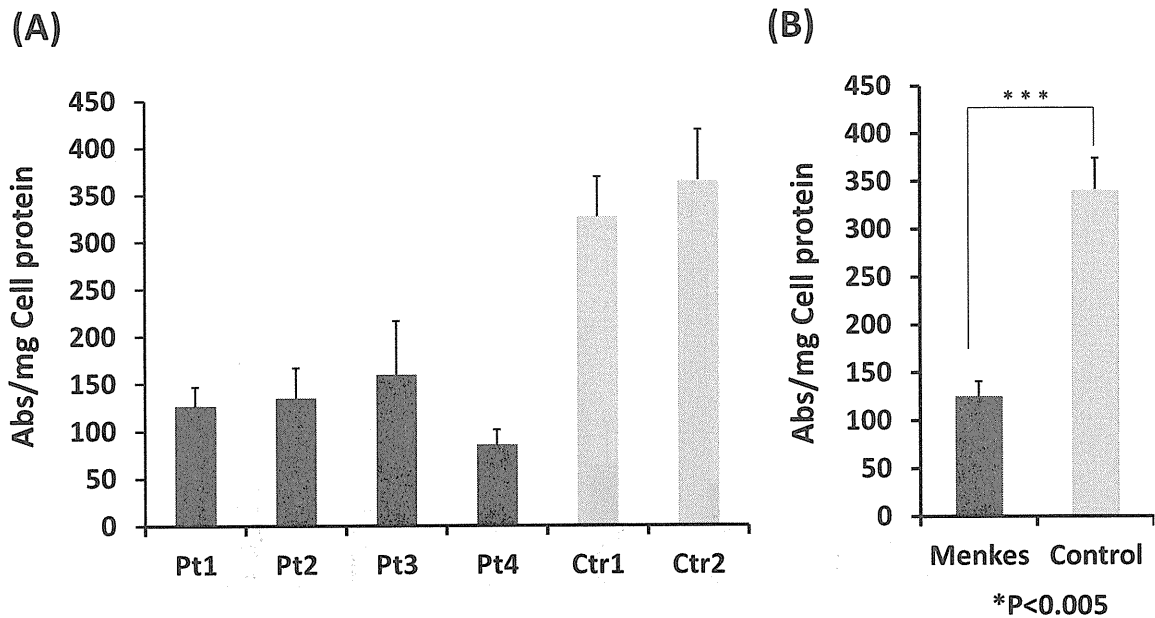
方法

帝京大学で採取、培養した後、保存しているヒト皮膚線維芽細胞を使用した。Menkes病および正常(Control)皮膚線維芽細胞を通常培地で培養したのち、DEDTC $0.2 \mu\text{M}$ 添加、又は無添加で48時間培養した。その後、培養上清を回収し上清中のLysyl Oxidase (LOX) 活性を測定した。また、細胞内銅濃度を測定した。

Table 1. Menkes病症例概要

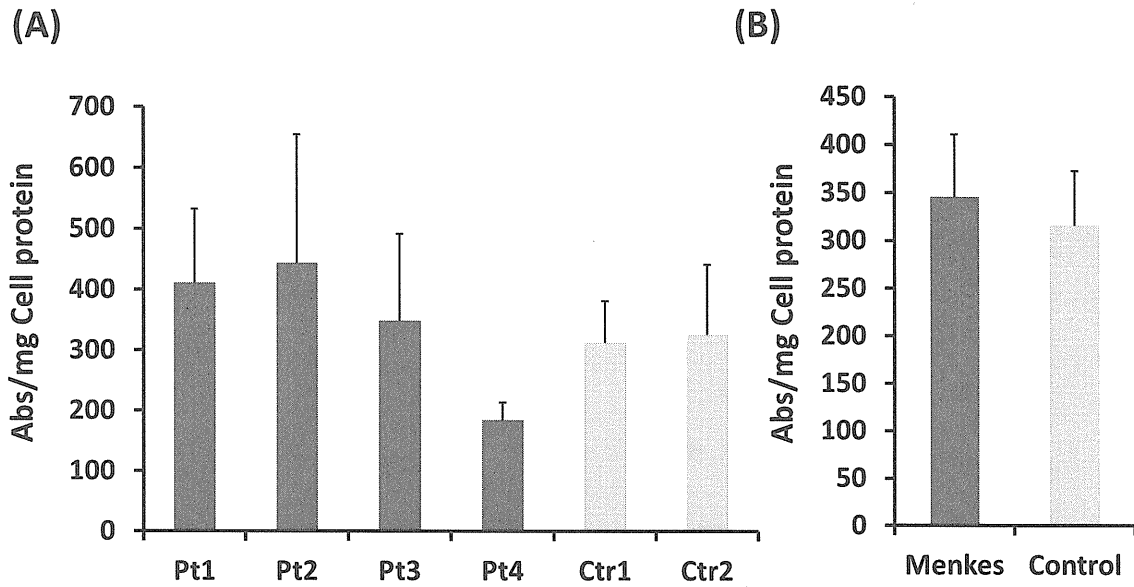
	Pt1	Pt2	Pt3	Pt4
生年月日	2009/8/29	1989/5/10	2009/11/9	1997/8/6
在胎	38w4d	-	36w4d	38w2d
出生時体重	2970	-	2536	2556
網	17	8	24	16
セルロプラスミン	5.6	9	8.4	11
遺伝子変異	No analyze	C644T 3ナンセンス	C4060G 20ミスセンス	C3101T 15ナンセンス
毛髪異常	あり	-	-	やや褐色
家族病歴	母方伯父	兄弟	あり	母方伯父
初診症状	生後2ヵ月;嘔吐、哺乳 不良、低体温	-	出生後多呼吸	生後1日;血便、呼吸器 障害
脳検査	2ヵ月:硬膜下血腫 4ヵ月:脳萎縮	-	脳血管蛇行	大脳動脈蛇行

細胞上清中のLysyl Oxidase (LOX)活性



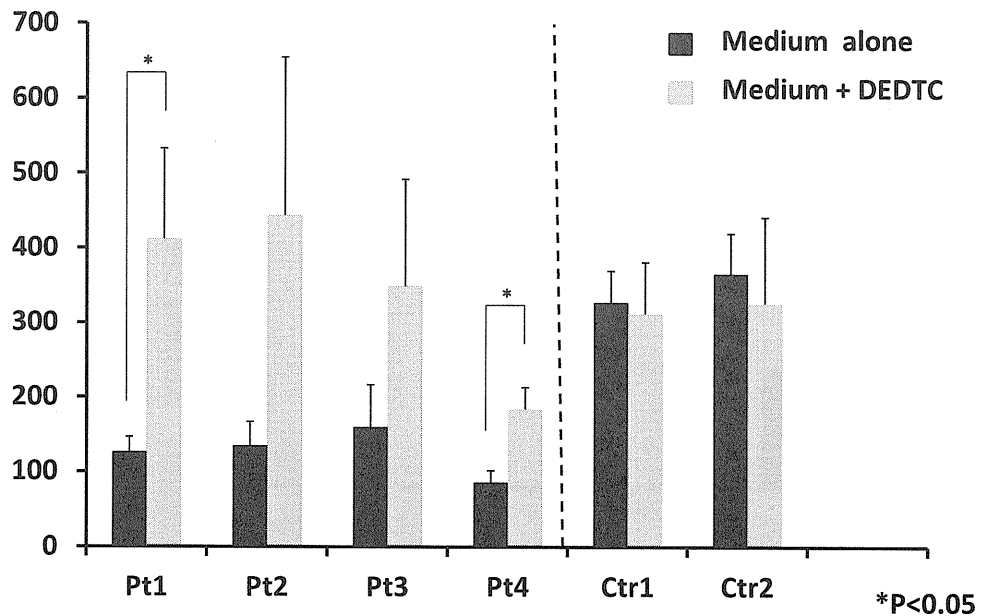
Pt1~Pt4: Menkes disease fibroblast, Ctr1, 2: Control fibroblasts

DEDTC刺激後の細胞上清中のLysyl Oxidase (LOX)活性



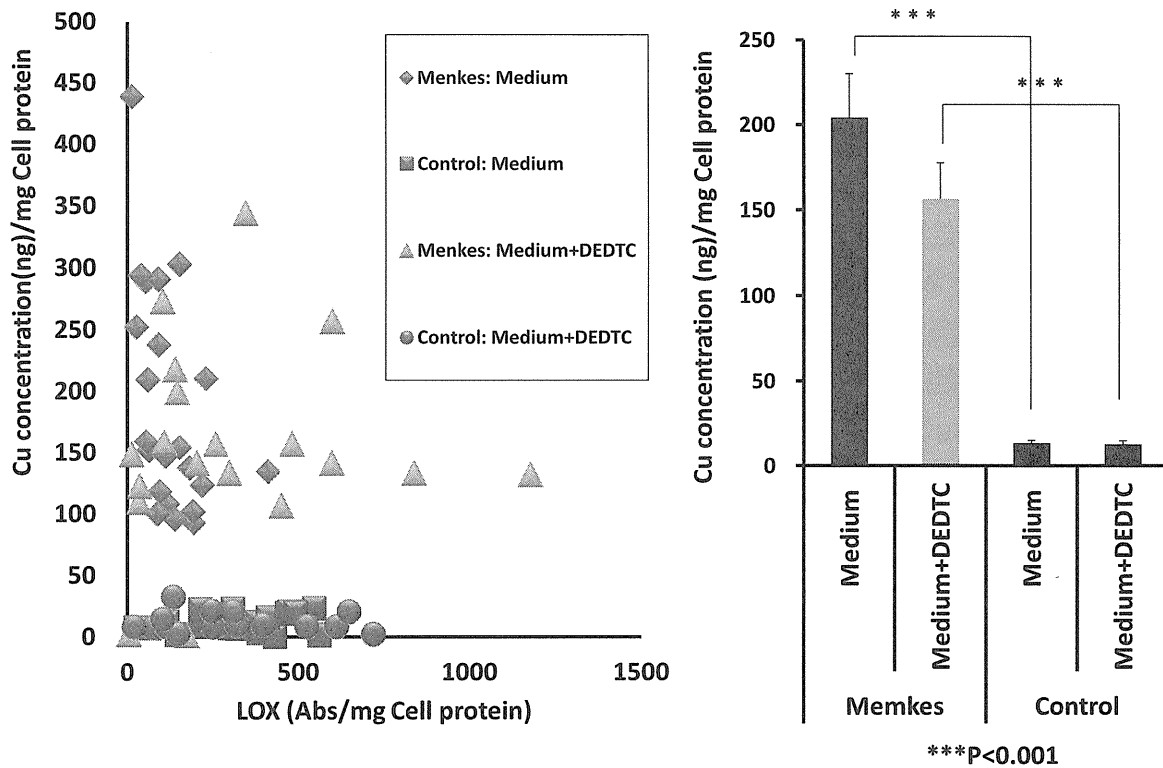
Pt1~Pt4: Menkes disease fibroblast, Ctr1, 2: Control fibroblasts

DEDTC添加によるLysyl Oxidase (LOX) 活性の変化



Pt1~Pt4: Menkes disease fibroblast, Ctr1, 2: Control fibroblasts

細胞内銅濃度とLysyl Oxidase (LOX)活性の関係



結果

1. Menkes病線維芽細胞の培養上清中のLysyl Oxidase (LOX)活性は正常線維芽細胞(コントロール)と比べて顕著に低値を示した。
2. 培地にDEDTCを添加することにより、Menkes病線維芽細胞の培養上清中のLOX活性は上昇し、コントロールとの差は認められなくなった。一方、コントロール線維芽細胞においてはDEDTC添加によるLOX活性の上昇は認められなかった。
3. 細胞内銅濃度は、従来の報告と同様に、Menkes病線維芽細胞ではコントロールと比べて有意に高値を示した。培地にDEDTCを添加した場合のMenkes病細胞内銅濃度は、DEDTC無添加の場合に比べて減少する傾向が認められたが有意な差ではなかった。

考察

培地に脂溶性キレート剤DEDTCを添加してMenkes病繊維芽細胞を培養した結果、Lysyl Oxidase (LOX)活性の著しい改善が認められた。このことから細胞内のサイトゾルに蓄積していた銅がDEDTCと結合して、ゴルジ体内に輸送され、分泌銅酵素であるLOXと結合し、LOX活性を改善させたと考えられた。

更に銅の細胞内動態などを検討することにより、細胞内銅輸送におけるDEDTCの効果を確認する必要がある。

また、Menkes病またはOccipital Horn症候群モデルマウスを用いて、DEDTCの結合織異常に対する効果を、コラーゲンやエラスチン架橋のマーカーなどを解析することによって、in vivoにおいて検証する。

重篤な結合織異常の主な要因であるLOX活性の動向をin vitro及びin vivoで評価できる方法を確立することは、有効な治療法開発のために、将来的にも重要な課題である。

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～

2012年2月19日(日)

田中 智次

アジェンダ

I. 前回の要望

II. 今回の要望

I .前回の要望

☆銅投与を低侵襲で行えるようにしてほしい。

☆ノックピンは、水溶液に溶けにくい性質を持っているので喉に詰まり易く、飲みにくい事があるので改良してほしい。

☆出産時の先天性代謝異常症検査項目にメンケス病を加えてほしい。

☆多くの先生方との情報交換・共有を行って頂きたい。
また、看護師の方にもメンケス病の症状等の知識を持ってほしい。

☆病院・クリニック等の産婦人科の先生や看護師の方と情報交換をしてほしい。

II .今回の要望

☆出産時から3ヶ月以内にヒスチジン銅注射をすれば神経障害を予防できると言われているが、「結合織は予防できない」という事を知らない患者の家族が多い。

また患者の家族によっては間違った知識を覚え、ブログに載せたりしている事がある。

もっと具体的に、患者の家族へ説明をして頂きたい。

(EX: 筋肉が硬直する病気)

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Gu Y, Kodama H, Kato T.	Congenital abnormalities in Japanese patients with Menkes disease.	Brain Dev.			In press
Kodama H, Fujisawa C, Bhadhprasit W.	Inherited Copper Transport Disorders: Biochemical Mechanisms, Diagnosis, and Treatment.	Curr Drug Metab.	13(3)	237-250	2012
Kodama H, Fujisawa C, Bhadhprasit W.	Pathology, clinical features and treatments of congenital copper metabolic disorders -focus on neurologic aspects.	Brain Dev.	33(3)	243-251	2011
Mogensen M, Skjorringe T, Kodama H, Silver K, Horn N, Moller LB.	Exon duplications in the ATP7A gene: frequency and transcriptional behaviour.	Orphanet J Rare Dis.	6	73 (1-11)	2011
Aso K, Okano Y, Takeda T, Sakamoto O, Ban K, Iida K, Yamano T, Shinkaku H.	Spectrum of glutamate dehydrogenase mutations in Japanese patients with congenital hyperinsulinism and hyperammonemia syndrome.	Osaka City Med J.	57(1)	1-9	2011
Ozawa K, Ishikawa H, Maruyama Y, Nagata T, Nagase H, Itani Y, Kurosawa K, Yamanaka M.	Congenital omphalocele and polyhydramnios: A study of 52 cases.	Fetal Diagn Ther.			In press
Soneda A, Teruya H, Furuya N, Yoshihashi H, Enomoto K, Ishikawa A, Matsui K, Kurosawa K.	Proportion of malformations and genetic disorders among cases encountered at high-care unit in a children's hospital.	Eur J Pediatr.			In press
Kurosawa K, Masuno M, Kuroki Y.	Trends in occurrence of twin births in Japan.	Am J Med Genet A.			In press
Saitsu H, Osaka H, Sugiyama S, Kurosawa K, Mizuguchi T, Nishiyama K, Nishimura A, Turusaki Y, Doi H, Miyake N, Harada N, Kato M, Matsumoto N.	Early infantile epileptic encephalopathy associated with the disrupted gene encoding Split-Robo Rho GTPase activating protein 2 (SRGAP2).	Am J Med Genet A.			In press

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Hayashi S, Imoto I, Aizu Y, Okamoto N, Mizuno S, Kurisawa K, Okamoto N, Honda S, Araki S, Mizutani S, Numabe H, Saitoh S, Kosho T, Fukushima Y, Mitsubuchi H, Endo F, Chinen Y, Kosaki R, Okuyama T, Ohki H, Yoshihashi H, Ono M, Takeda F, Ono H, Yagi M, Matsumoto H, Makita Y, Hata A, Inazawa J.	Clinical application of array-based comparative genomic hybridization by two-stage screening for 536 patients with mental retardation and multiple congenital anomalies.	J Hum Genet.	56(2)	110-124	2010
Nagase H, Ishikawa H, Nishikawa T, Kurisawa K, Itani Y, Yamanaka M.	Prenatal management of the fetus with lethal malformation: from a study of oligohydramnios sequence.	Fetal Pediatr Pathol.	30(3)	145-149	2011
Hannibal MC, Buckingham KJ, Ng SB, Ming JE, Beck AE, McMillin MJ, Gildersleeve HI, Bigham AW, Tabor HK, Mefford HC, Cook J, Yoshiura K, Matsumoto T, Matsumoto N, Miyake N, Tonoki H, Naritomi K, Kaname T, Nagai T, Ohashi H, Kurosawa K, Hou JW, Ohta T, Liang D, Sudo A, Morris CA, Banka S, Black GC, Clayton-Smith J, Nickerson DA, Zackai EH, Shaikh TH, Donnai D, Nishikawa N, Shendure J, Bamshad MJ.	Spectrum of MLL2 (ALR) mutations in 110 cases of Kabuki syndrome.	Am J Med Genet A.	155(7)	1511-1516	2011
Takagi M, Hori N, Chinen Y, Kurosawa K, Tanaka Y, Oku K, Sakata H, Fukuzawa R, Nishimura G, Spranger J, Hasegawa T,	Heterozygous C-propeptide mutations in COL1A1: osteogenesis imperfecta type IIC and dense bone variant.	Am J Med Genet A.	155(9)	2269-2273	2011
Miyake N, Yamashita S, Kurosawa K, Miyatake S, Tsurusaki Y, Doi H, Saito H, Matsumoto N.	A novel homozygous mutation of DARS2 may cause a severe LBSL variant.	Clin Genet.	80(3)	293-296	2011
Niihori T, Aoki Y, Okamoto N, Kurosawa K, Ohhashi H, Mizuno S, Kawame H, Inazawa J, Ohura T, Arai H, Nabatame S, Kikuchi K,	HRAS mutations identified in Costello syndrome patients can induce cellular senescence: possible implications for the pathogenesis of Costello	J Hum Genet.	56(10)	707-715	2011

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kuroki Y, Miura M, Tanaka T, Ohtake A, Omori I, Ihara K, Mabe H, Watanabe K, Niijima S, Okano E, Numabe H, Matsubara Y.	syndrome.				
Saito Y, Kubota M, Kurosawa K, Ichihashi I, Kaneko Y, Hattoti A, Komaki H, Nakagawa E, Sugai K, Sasaki M.	Polymicrogyria and infantile spasms in a patient with 1p36 deletion syndrome.	Brain Dev.	33(5)	437-441	2011
児玉浩子	先天性銅代謝異常の進歩と課題	脳と発達	44(2)	107-112	2011
児玉浩子、藤澤千恵、小川英伸	微量元素の代謝異常症を見逃していませんか?	小児内科	42(7)	1172-1179	2011
小川英伸、児玉浩子	先天性代謝疾患・principles and practice	内分泌・代謝		321-332	2011
新宅治夫	疾患からみる臨床検査の進めかたーアミノ酸代謝異常が疑われるとき	小児科診療	74	329-339	2011
齊藤三佳、新宅治夫	早産児の取り扱い	ペリネイタルケア	30(2)	129-134	2011
清水教一	Wilson病が疑われる時	小児科診療	74	315-319	2011
清水教一	Wilson病	日本先天代謝異常学会誌	27	25-30	2011
清水教一	Wilson病に対する亜鉛治療の実際	亜鉛栄養治療	2	30-34	2011
黒澤健司	確定診断とその進め方	遺伝子医学MOOK別冊「遺伝カウンセリングハンドブック」福島義光編 メディカルドゥ		58-59	2011
黒澤健司	先天奇形、先天奇形症候群、Dysmorphology	遺伝子医学MOOK別冊「遺伝カウンセリングハンドブック」福島義光編 メディカルドゥ		76-79	2011

