

09. Disorders of Trace Elements and Vitamins (1)

*O-049*

**EFFECTS OF CHELATORS ON COPPER BIODISTRIBUTION IN MENKES DISEASE MODEL MICE AS EVALUATED WITH SMALL ANIMAL PET IMAGING**

Nomura S<sup>1</sup>, Nozaki S<sup>2</sup>, Takeda T<sup>1</sup>, Ninomiya E<sup>1</sup>, Kudo S<sup>1</sup>, Hamazaki T<sup>1</sup>, Fujioka H<sup>1</sup>, Hayashinaka E<sup>2</sup>, Wada Y<sup>2</sup>, Hiroki T<sup>3</sup>, Fujisawa C<sup>3</sup>, Kodama H<sup>3</sup>, Watanabe Y<sup>2</sup>, Shintaku H<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Osaka City University of Medicine, Osaka, Japan*

<sup>2</sup>*RIKEN CMIS, Kobe, Japan*

<sup>3</sup>*Teikyo University of Medicine, Tokyo, Japan*

**Background:** Menkes disease is an inherited disorder of copper metabolism caused by dysfunctional ATP7A. Copper deficiency causes multisystemic disorders with severe neurodegeneration. Although subcutaneous injection of histidine-copper is a mainstay of treatment of Menkes disease, neurological improvement remains limited. Furthermore, accumulation of injected copper in the kidney potentially degrades renal function.

**Objectives:** We investigated the effects of two copper chelators on biodistribution of injected copper by using microPET.

**Materials and Methods:** C3H/He mice were used as control groups and macular mice were used as Menkes disease model. Mice were pretreated with chelators (disulfiram and/or penicillamine) for 30 minutes before copper injection. Continuous microPET imaging was performed for 4 hours after <sup>64</sup>CuCl<sub>2</sub> injection.

**Results:** Injected copper barely distributed to the brain, and accumulated in kidney without urinary excretion in macular mice. 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.

**Conclusion:** MicroPET imaging was useful to evaluate the effects of chelators on copper-biodistribution. Combined use of disulfiram and penicillamine may improve clinical outcomes of Menkes disease.

# Effects of chelators on copper biodistribution in Menkes disease model mice by using microPET

Shiho NOMURA<sup>1</sup>, Satoshi NOZAKI<sup>3</sup>, Taisuke TAKEDA<sup>1</sup>, Eiichi NINOMIYA<sup>1</sup>, Satoshi KUDO<sup>1</sup>, Takashi HAMAZAKI<sup>1</sup>, Hiroki FUJIOKA<sup>1</sup>, Emi HAYASHINAKA<sup>3</sup>, Yasuhiro WADA<sup>3</sup>, Tomoko HIROKI, Chie FUJISAWA<sup>2</sup>, Hiroko KODAMA<sup>2</sup>, Yasuyoshi WATANABE<sup>3</sup>, Haruo SHINTAKU<sup>1</sup>

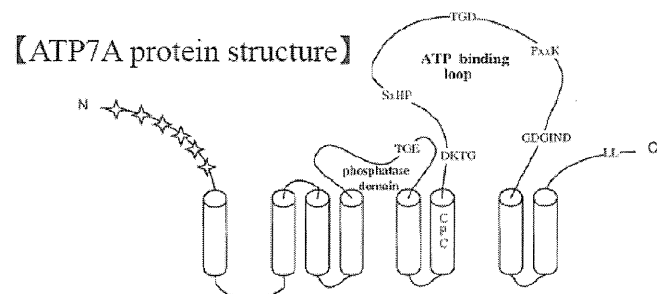
<sup>1</sup> Department of Pediatrics, Osaka City University Graduate School of Medicine, Osaka, Japan

<sup>2</sup> Department of Pediatrics, Teikyo University School of Medicine, Tokyo, Japan

<sup>3</sup> RIKEN Center for Molecular Imaging Science, Hyogo, Japan

## Background (1)

- ✓ Menkes disease (MD) is an inherited disorder of copper metabolism caused by dysfunctional ATP7A. Copper shortage causes multisystemic disorders with severe neurodegeneration.
- ✓ Subcutaneous copper-injection is mainstay of treatment for MD but has limited clinical efficacy.



*Voskoboinik I & Camakaris J.J Bioenerg Biomembr. 2002 Oct;34(5):363-71.*

## Background (2)

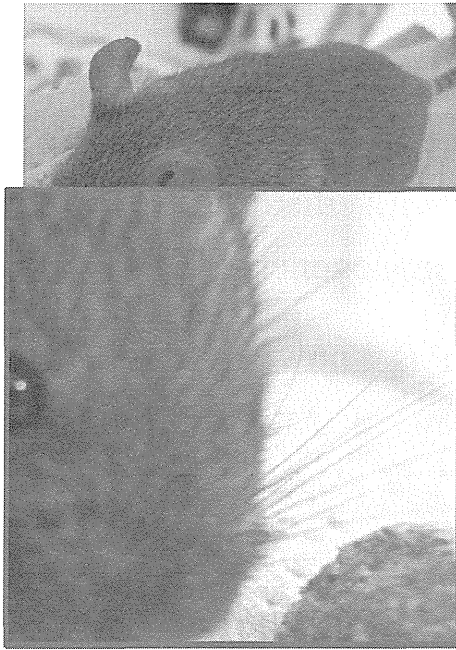
- ✓ In recent years, our group and others propose that combined use of copper with disulfiram (lipophilic chelator) is effective for neurodegeneration in MD\*.
- ✓ Long-term copper injection is known to cause copper accumulation in the kidney of MD and potentially degrades renal function.

*\* Kodama et. al. Current Drug Metabolism. 2012,13,237-250*

## Objective/hypothesis

We investigated the effects of two types of chelators on copper biodistribution in MD model mice by using microPET.

Wild type mouse  
(C3H strain)



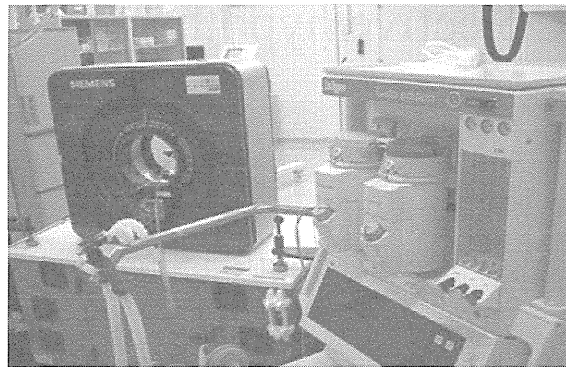
Macular mouse  
(MD model mouse)



Light colour coat and curly vibrissae.

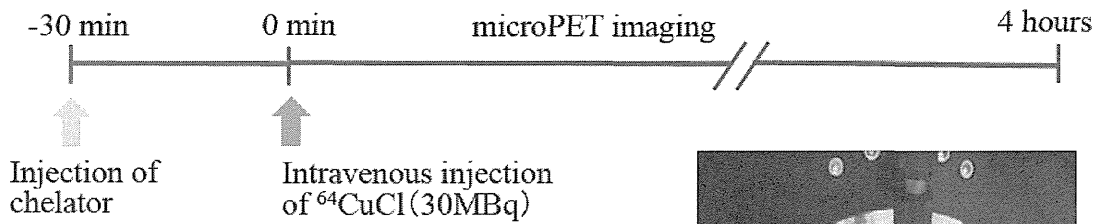
## About microPET (PET for small animals)

microPET Focus220  
(Siemens, USA)  
Spatial resolution  
1.4mm



- ✓ The molecular imaging by using microPET progresses by improvement of resolution and tracer fabrication techniques.
- ✓ MicroPET can analyze the quantitative molecular dynamic state in the living body noninvasively.

## Materials & Methods



### 【Animals】

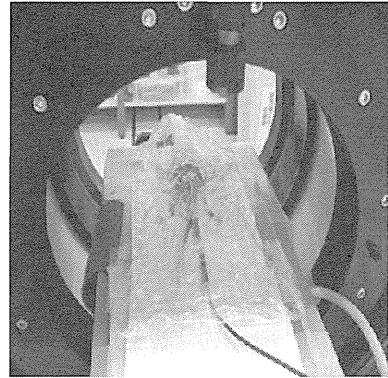
- Wild type mice (Male, 4 to 5 weeks)
- Macular mice (Male, 4 to 8 weeks)

### 【Anesthesia】

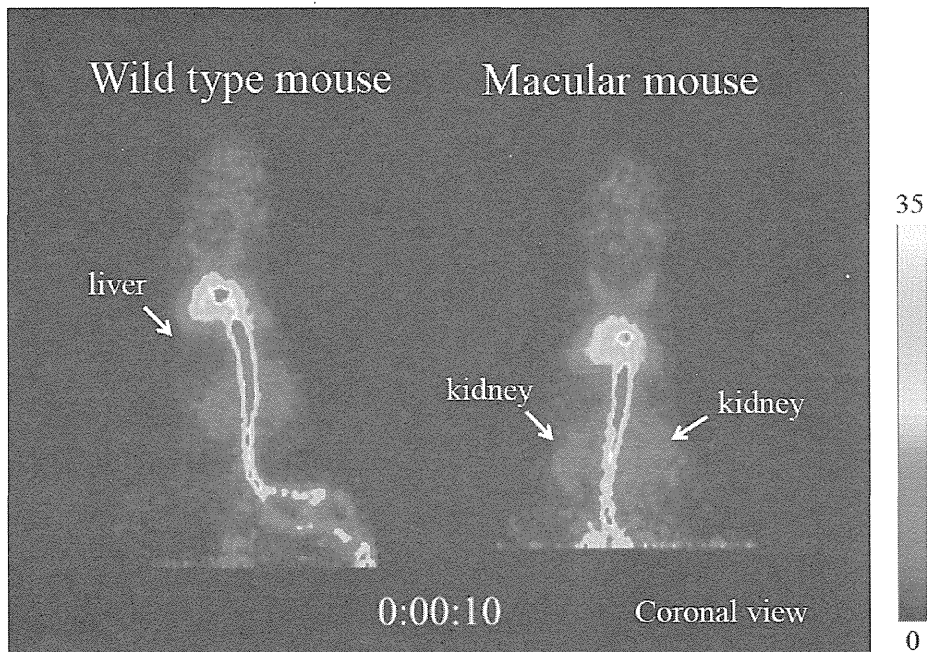
Inhalation anesthesia used isoflurane and  $\text{N}_2\text{O}$

### 【Copper chelators】

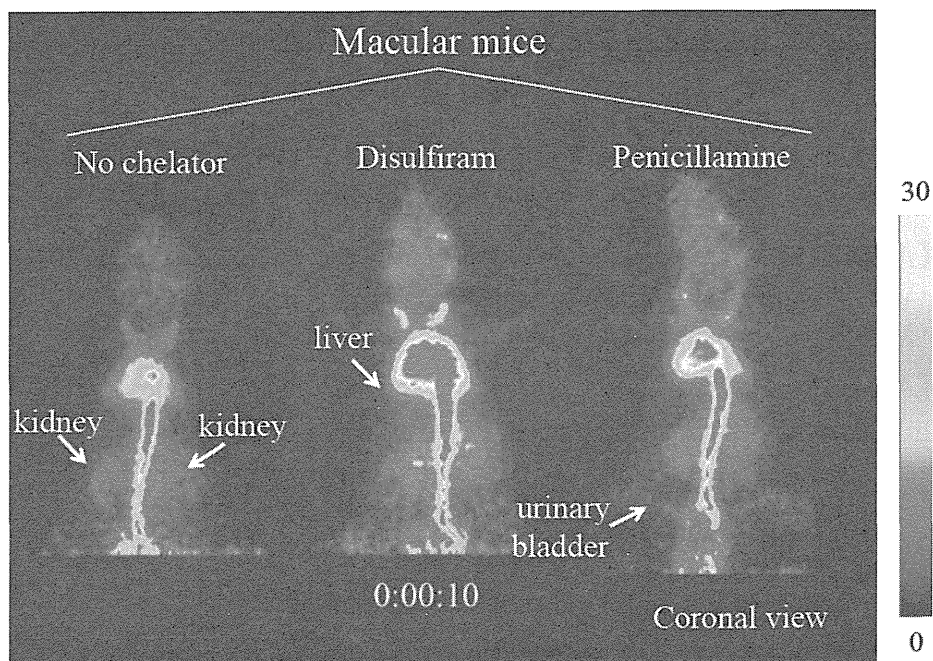
- Disulfiram (Lipophilic chelator) was injected intraperitoneally. (100mg/kg/dose)
- Penicillamine (Hydrophilic chelator) was injected subcutaneously. (100-200mg/kg/dose)



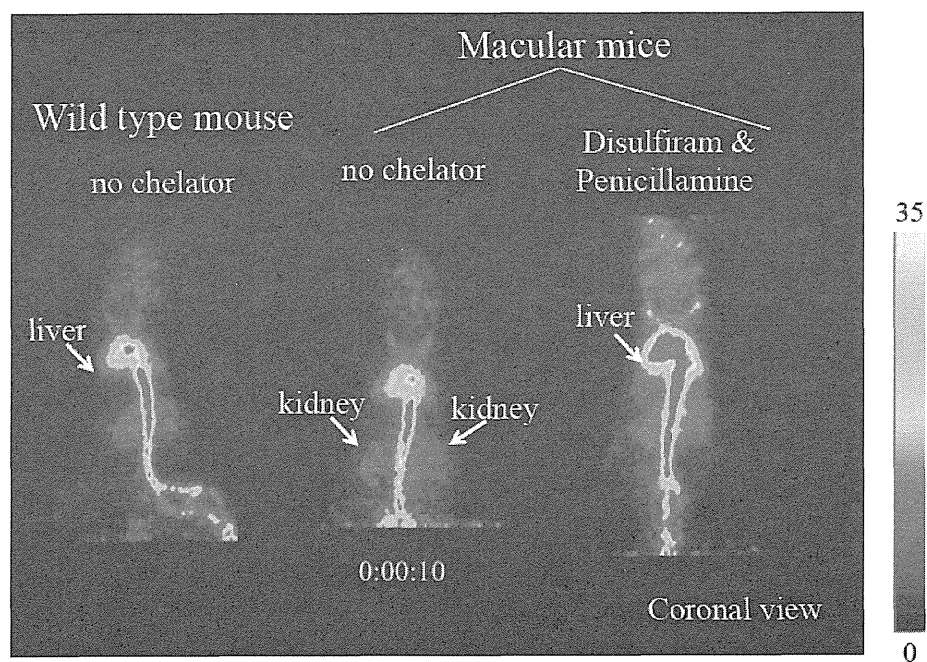
Macular mice showed abnormal copper accumulation in the kidney.



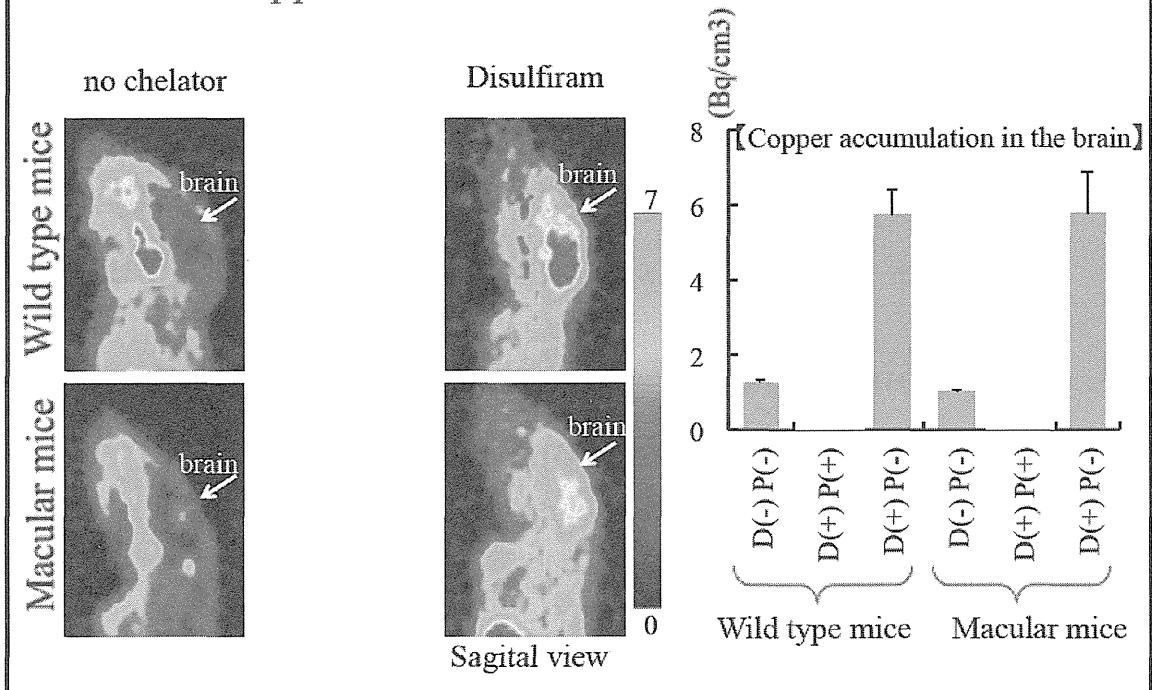
Disulfiram induced liver accumulation whereas penicillamine enhanced urinary excretion.



Combined use of disulfiram and penicillamine improved abnormal copper-biodistribution of macular mice.



Combined use of disulfiram and penicillamine also increased copper accumulation in the brain.



## Summary

- ✓ Macular mice showed abnormal copper accumulation in the kidney.
- ✓ Disulfiram increased copper accumulation in the brain and the liver.
- ✓ Penicillamine enhanced urinary excretion and decreased copper accumulation in the kidney.
- ✓ Combined use of disulfiram and penicillamine improved abnormal copper-biodistribution of macular mice.

## Conclusion

- ✓ MicroPET imaging was useful to evaluate the effects of chelators on copper-biodistribution.
- ✓ Combined use of disulfiram and penicillamine may improve clinical outcomes of MD.

## Acknowledgments

### TEAM SHINTAKU (OCU)

*Takashi Hamazaki  
Hiroki Fujioka  
Taisuke Takeda  
Eiichi Ninomiya  
Satoshi Kudo*



### TEAM WATANABE (CMIS)

*Yasuhiro Wada, Satoshi Nozaki, Emi Hayashinaka*

### TEAM KODAMA (Teikyo University)

*Chie Fujisawa, Tomoko Hiroki*



***P-372***

**EFFECT OF DIETHYLDITHIOCARBAMATE (DEDTC) ON  
LYSYL OXIDASE (LOX) ACTIVITY IN THE CULTURED  
SKIN FIBROBLASTS FROM PATIENTS WITH MENKES  
DISEASE**

Hiroki T<sup>1</sup>, Fujisawa C<sup>1</sup>, Miyazawa M<sup>1</sup>, Ogawa E<sup>1</sup>, Kodama H<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Dep Pediat, Teikyo Univ School of Med, Tokyo, Japan*

Menkes disease (MD) is an X-linked disorder characterized by progressive neurodegeneration and connective tissue abnormalities due to the defect of a copper-transporting ATPase (ATP7A). In affected cells, copper transport by ATP7A from cytosol to Golgi apparatus is disturbed, resulting in reduction of the activities of copper-dependent enzyme such as lysyl oxidase (LOX). Connective tissue disorders are caused by the reduced LOX activity. The current subcutaneous administration of copper histidine does not improve connective tissue disorder, because the administered copper is not transported into Golgi apparatus due to ATP7A defects. In this study, we investigated the effect of Diethyldithiocarbamate (DEDTC), a lipophilic chelater on LOX activity using the cultured skin fibroblasts from MD patients. The skin fibroblasts were cultured with or without 0.2  $\mu$ M DEDTC for 48 hours and LOX activities in culture media were assayed. Without DEDTC, LOX activities in the culture media of MD fibroblasts were significantly lower than those of control fibroblasts. With DEDTC, LOX activities in the culture media of MD fibroblasts were remarkably increased and there was no significant difference in LOX activities between MD and control fibroblasts, suggesting that DEDTC can improve copper transport from cytosol to Golgi apparatus and consequently the activity of copper-dependent LOX.

The American Society of Human Genetics 62<sup>th</sup> Annual Meeting  
(2012.11.6-10 San Francisco, USA)

**729F**

**Standard value of urine HVA/VMA ratio in the early neonatal period to screen for Menkes disease.** M. Yagi, N. Kusunoki, T. Lee, H. Awano, T. Yokota, A. Miwa, A. Shibata, I. Morioka, Y. Takeshima, K. Iijima. Dept Pediatrics, Kobe Univ Graduate Sch Med, Kobe, Hyogo, Japan.

**[Background]** Menkes disease (MD) is a lethal, X-linked recessive disorder of copper metabolism dominated by neurodegenerative symptoms and connective tissue disturbance. Early treatment with parenteral copper-histidine has been shown to improve clinical outcomes. However, early detection is difficult because clinical abnormalities are subtle in early neonatal period. Previously, it was reported that decreased activity of dopamine  $\beta$ -hydroxylase, a copper-dependent enzyme, leads to increased urine homovanillic acid/vanillylmandelic acid (HVA/VMA) ratio in MD patients, and the urine HVA/VMA ratio (cut-off value:4.0) is a useful screening method for MD [Matsuo et al. *J Inherit Metab Dis.* 2005]. However, there is no data of urine HVA/VMA ratio in neonates. **[Purpose]** To examine the standard value of urine HVA/VMA ratio in early neonatal period. **[Methods]** Concentration of urine HVA and VMA from 54 neonates with a gestational age from 32 to 41 weeks at 1 or 4 days of age were measured by high-performance liquid chromatography. **[Results & Discussion]** Among all samples, HVA concentrations ranged from 5.0 to 245.1  $\mu\text{g}/\text{mg}$  creatinine (mean  $\pm$  SD=26.4  $\pm$  43.0), VMA concentrations ranged from 3.9 to 23.7  $\mu\text{g}/\text{mg}$  creatinine (mean  $\pm$  SD=7.34  $\pm$  2.93), and HVA/VMA ratios ranged from 0.725 to 29.1 (mean  $\pm$  SD=3.35  $\pm$  4.28). Three samples had extremely high HVA/VMA ratios; 9.21, 17.7 and 29.1. All of three were collected from the cases treated with catecholamine on their collection date. The treatment with catecholamine influences HVA and VMA measurements. Among 51 samples except the three with catecholamine treatment, HVA/VMA ratios ranged from 0.725 to 4.66 (mean  $\pm$  SD=2.45  $\pm$  0.75). These values were similar to previously reported urine HVA/VMA ratios at 6 months of age which was used as a control data to determine the cut-off value. These data suggest that the urine HVA/VMA ratio can be an effective screening method for MD in early neonatal period as well.

## 第 54 回日本小児神経学会総会

(平成 24 年 5 月 17 日～19 日、札幌)

家族歴に Menkes 病を認める新生児 3 例の臨床像の検討

Clinical Manifestations of neonates with/without Classical Menkes Disease

神戸大学大学院小児科学

帝京平成大学健康メディカル学部健康栄養学科\*

八木麻理子、李知子、栗野宏之、森岡一朗、児玉浩子\*、竹島泰弘

【緒言】 Menkes 病は、銅輸送蛋白の異常により銅が欠乏し、中枢神経障害などを引き起こす先天性銅代謝異常症である。生後 2 ヶ月以内の銅補充開始により中枢神経障害を予防・軽減できる場合があり、早期診断は重要だが、新生児期には特異所見は少ない。私達は、Menkes 病 3 家系の新生児（罹患男児 1 例、非罹患男児 2 例）の臨床像を比較し、早期診断の手がかりを検討した。

【症例 1】 在胎 36 週、2536g で出生。母方叔父 Menkes 病（遺伝子診断未）。毛髪は褐色で軽度の縮れあり。血清銅は 24 $\mu$ g/dl(日齢 2)から 15 $\mu$ g/dl(日齢 16)へ低下。尿 HVA/VMA 比は cut off 値:4 を超える高値 (4.9~8.0) であった。経口銅負荷試験で血清銅の上昇なく罹患児と診断。日齢 21 より銅補充療法を開始。遺伝子解析でミスセンス変異(c.4060C>G)を同定。【症例 2】 在胎 37 週、2946g で出生。兄 Menkes 病 (c.3989A>G)。毛髪はやや褐色だが縮れなし。血清銅は 32 $\mu$ g/dl(日齢 2)から 52 $\mu$ g/dl(日齢 19)へ上昇、尿 HVA/VMA 比は cut off 値未満を推移(1.4~3.6)。遺伝子解析で非罹患児と診断。【症例 3】 在胎 33 週、1796g で出生。兄 Menkes 病 (c.2499insC)。毛髪は褐色だが縮れなし。血清銅は 42 $\mu$ g/dl(日齢 1)から 52 $\mu$ g/dl(日齢 15)へ上昇。尿 HVA/VMA 比は、ドパミン使用中の日齢 1 は高値(10.97)だったが、中止後 cut off 値未満へ低下(1.6~2.5)。遺伝子解析で非罹患児と診断。

【考察】 3 例とも出生前診断は行っておらず、Menkes 病発症のリスクを踏まえ慎重に診察した。罹患児で Menkes 病に特徴的な縮れた毛髪を認めたが、軽微であり見逃す危険性もあった。一方、罹患児では血清銅は徐々に低下、尿 HVA/VMA 比も高値を示した。Menkes 病の早期診断には、その可能性を念頭におき毛髪所見等を注意深く診察すると共に、血清銅の経時的変化、尿 HVA/VMA 比をみるのが有用である可能性がある。

平成24年度「厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業」

テーマ 公開シンポジウム

2月 平成25年

11日(月)  
午前11時～午後3時

# 「難病・希少疾患を 理解し克服する」



【会場】 帝京大学講堂

本部棟4階・第1会議室

住所: 東京都板橋区加賀2丁目11-1

電話: 03-3964-1211 (代表)

内線48352 (小児科遺伝代謝研究室)

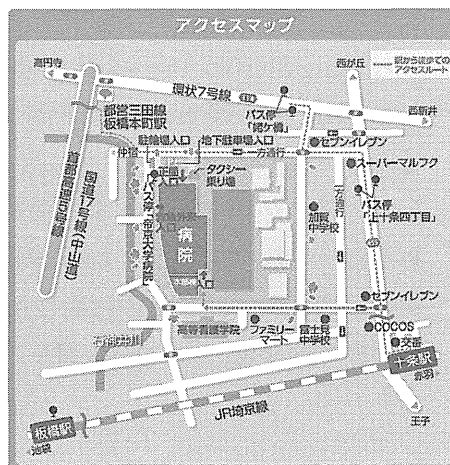
【定員】 100名

事前申込が必要です

下記宛てにメールでお申し込みください。

アドレス: [yuu1220@med.teikyo-u.ac.jp](mailto:yuu1220@med.teikyo-u.ac.jp)

【参加費】 無料



地図 (<http://www.teikyo-u.ac.jp/hospital/guidance/map/index.html>)

【主催】

・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 (研究代表 帝京大学 客員教授 児玉浩子)

平成24年度「厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業」  
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**

- (1) Menkes 病・occipital horn 症候群の調査、診断と治療  
(2) メンケス病家族会からの要望



11:00	開場	開会の辞：児玉浩子（帝京大学医学部小児科）
11:05	第1部	<b>児玉班</b> <b>座長：児玉浩子（帝京大学医学部小児科）</b> ①「メンケス病・オクチピタルホーン症候群：難治性疾患克服事業2年間のまとめと今後の課題」 演者：児玉浩子（帝京大学小児科） ②「microPETを用いたメンケス病モデルマウスの銅体内分布におけるキレート剤の効果に関する研究」 演者：野村志保（大阪市立大学大学院医学研究科発達小児医学教室） ③「早期新生児期の尿 HVA/VMA 比の基準値の検討」 演者：八木麻理子（神戸大学大学院医学研究会内科系講座小児科学） ④「メンケス病・オクチピタルホーン症候群におけるジスルフィラム療法の効果について」 演者：小川英伸（帝京大学小児科）
12:05		<b>昼 食</b>
13:30		<b>第2部</b> <b>座長：八木麻理子（神戸大学大学院医学研究会内科系講座小児科学）</b> メンケス病家族会代表：田中智次 メンケス病家族会：萩原里美
14:00		<b>討論・懇談</b>
14:50		閉会

memo

# Menkes病・Occipital horn症候群 におけるジスルフィラムの 治療効果について

帝京大学医学部小児科  
小川英伸・児玉浩子

## 背景

- Menkes病の治療にはヒスチジン銅投与が行われているが、血液脳関門を通過しないため神経症状の改善がみられず、また、ゴルジ体へ輸送されず分泌銅酵素が合成されないため結合織障害の改善がみられない。
- Occipital horn症候群は分泌銅酵素の欠乏による結合織障害が主症状であり、有効な治療法がない。
- 油性キレート剤DEDTC (Diethyldithiocarbamate)投与により、脳内銅濃度および脳内cytochrome c oxydase活性が上昇することが動物実験で示され、DEDTCが神経細胞やゴルジ体への銅輸送を促進する可能性が示唆された。

## ジスルフィラム *Disulfiram*

- DEDTC (Diethyldithiocarbamate) の二量体で体内で速やかにDEDTCへ還元される。
- ノックピン® (抗酒癖剤) として薬価収載されている。肝ALDH酵素阻害により、少量のアルコール摂取で体内のアセトアルデヒド濃度が上昇し、顔面紅潮、熱感、頭痛、悪心、嘔吐などの症状が出現する。  
副作用：発疹、肝機能異常など。  
血中濃度半減期 $7.3 \pm 1.5$ h。  
成人投与量100～500mg/日、分1～3。

## 目的

- Menkes病 (MD) およびOccipital horn症候群 (OHS) 患者においてジスルフィラムの有用性を検討する。

# 方法

- ノックピン®（ジスルフィラム）投与経験のある施設から検査データおよび症状の変化に関する情報を提供頂いた。
- 投与量は、おおむね維持量100mg/日を目標に、初期量10～60mg/日から経口投与開始したが、施設により違いはあった。
- メンケス病ではヒスチジン銅を併用しているが、主治医の判断で随時投与量は変動されている。

## 症例概要-1

	KN	HM	JT
性別	男	男	男
現年齢 (生年月日)	16歳2ヶ月 (1996/12/11)	12歳1ヶ月 (2001/01/10)	9歳11カ月 (2003/03/01)
出生状況	36週、2870g	39週、2956g	36週、2874g
診断根拠	・ATP7A遺伝子 Ex3-5重複	・ATP7A遺伝子 608AA欠失	・ATP7A遺伝子 A3989G
ヒスチジン銅 開始年齢 (投与量)	8ヶ月 (6,750μg/週)	10ヶ月 (900μg/週)	6ヶ月 (1,200-2,250μg/週)



## 症例概要-2

	HT	AG	FO
性別	M	M	M
現年齢 (生年月日)	8歳5ヵ月 (2004/09/03)	4歳2ヵ月 (2008/11/22)	3歳3ヵ月 (2009/11/09)
出生状況			36w4d、2536g
診断根拠	・ ATP7A遺伝子 C1370T	・ ATP7A遺伝子 変異未確定?	・ ATP7A遺伝子 C4060G
ヒスチジン銅 開始年齢 (投与量)	1y2m (800μg/週)	8m (1mlx2/週)	21d (2,100μg/週)

## 症例概要-3

	SH	KM(OHS)
性別	女	男
現年齢 (生年月日)	11歳9ヵ月 (2001/04/25)	20歳6ヵ月 (1992/07/18)
出生状況	39週、2300g	40週、3416g
診断根拠	・ Fibroblastに 銅蓄積 ・ ATP7A遺伝子 変異見いだせず	・ ATP7A遺伝子 Splice site mutation (Int6) →Exon6 skip
ヒスチジン銅	1歳2ヵ月 (4,800μg/週)	ジスルフィラム開始時は 非投与

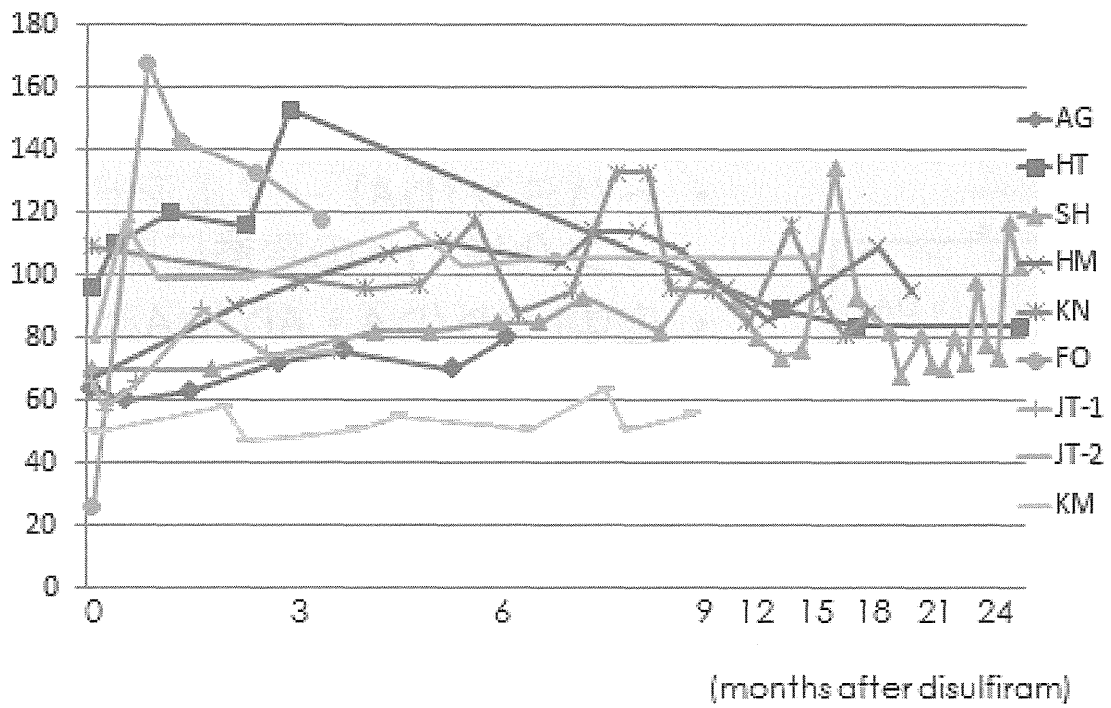
# ジスルフィラム投与による変化

	投与年齢	投与量	症状変化など
NK	14y8m-	100mg/d	・変化認めず。
HM	9y5m-	100mg/d	・よく笑う。表情や動きが豊かになった。上肢の運動が盛んになった。
JT-1	4y0m- 4y3m	2mg/kg/d	・わずかながら喃語増加、食事時間短縮
JT-2	8y0m-	10mg/kg/d	・不随意運動あり一旦中止。再開後、視線合う、追視しっかり、合目的的上肢運動、食事時間短縮、よく笑う。けいれん増加。
HT	2y4m-	100mg/d	・表情・食欲改善、よく笑う
AG	2y0m-		・笑うようになった。
FO	1y5m- 1y9m	10mg/kg/d	・活動性低下。4ヶ月後に低血糖あり中止。
SH	8y4m-	100mg/d	・機嫌良くなり意思表示が増えた。
KM	18y3m-	100mg/d	・変化認めず。

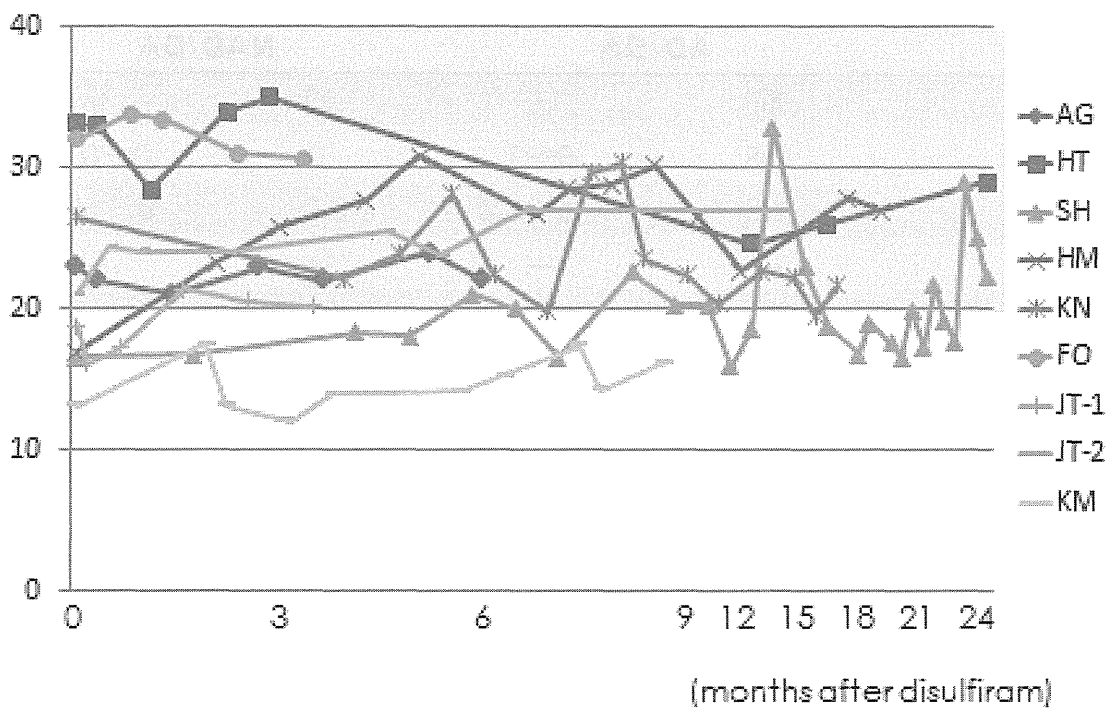
## 検査項目

- ・ 血中銅・セルロプラスミン濃度：消化管からの銅吸収が改善して血中濃度が増加するか？
- ・ 血中ノルアドレナリン（NAD）/ドパミン（DA）比、アドレナリン（AD）/DA比、尿中VMA/HVA比：分泌銅酵素であるDopamine  $\beta$  hydroxylase活性が上昇し、これらの指標が増加するか？
- ・ 腰椎骨密度：結合織改善の指標となるか？

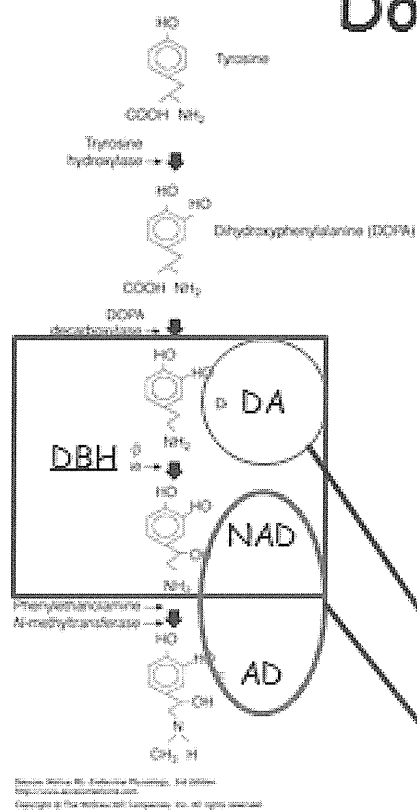
# 血中銅値



# 血中セルロプラスミン値



# Dopamine $\beta$ hydroxylase (DBH)



- 分泌銅酵素のひとつ。
- ドパミン (DA)  $\rightarrow$  ノルアドレナリン (NAD) への変換に関与。
- 血中 NAD/DA  $\cdot$  AD/DA あるいは尿中 VMA/HVA が DBH 活性の指標となる。

## 血中 AD/DA $\cdot$ NAD/DA

	AD/DA		NAD/DA	
	前	後	前	後
KN	0.5	0~1	0	0~0.25
HM	1.5	0.5~1.5	0.01	0.6~1.6
JT	—	—	—	—
HT	—	0~1	—	0.53~1
AG	0	0	1.69	0~0.56
FO	—	—	—	—
SH	1.5	0.5~1.5	1.6	0.6~1.5
KM	1.5	1~1.5	1.5	1

- AD/DA  $\cdot$  NAD/DA 比は DBH 活性の指標となる。ジスルフィラム治療開始前後で明らかな上昇はみられなかった。