

1991)で測定した。また、グルタチオン量も測定した。ドパミンキノンを還元・消去する NADPH:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) の変化を Western blot 法で解析した。

2. パーキンソン病モデルへのゾニサミド前投与のドパミン神経保護効果

ICR マウス (雄性 7 週齢) にゾニサミド Na (30 mg/kg, i. p.) の 14 日間前投与を行い、片側線条体に 6-OHDA を注入し、片側パーキンソン病モデルを作製した。6-OHDA 注入 40 日後に、4% paraformaldehyde で灌流固定し、凍結脳切片を作製した。黒質あるいは線条体を含む脳切片を用いて、チロシン水酸化酵素の免疫染色を行った。

C. 研究結果

1. パーキンソン病モデルでの L-DOPA 誘発キノン体毒性に対するゾニサミド連日投与の保護効果

L-DOPA 連日投与により非障害側線条体ではキノプロテイン量は不変であったが、障害側線条体ではキノプロテインが有意に著明に増加していた。この L-DOPA 連日投与によるキノプロテイン増加はゾニサミドの同時投与によりほぼ完全に抑制された。しかし、線条体のグルタチオンはゾニサミドにより影響されなかった。線条体での NQO1 発現は L-DOPA 連日投与により障害側、非障害側ともに増加していたが、ゾニサミド同時投与で抑制された。

2. パーキンソン病モデルへのゾニサミド前投与のドパミン神経保護効果

ゾニサミド前投与は、アポモルフィン誘発回旋運動に対して阻止効果はなく、大脳基底核のグルタチオンも不変であったが、障害側黒質チロシン水酸化酵素陽性ドパミン神経細胞の減少に対しては有意ではないものの阻止傾向が認められた。

D. 考察

パーキンソン病モデルへの L-DOPA 連日投与により障害側線条体においてのみキノプロテインの増加が見られた。これは神経終末が脱落している病態では L-DOPA を連投すると自動酸化によりキノン体、キノプロテイン生成に働くフリーの小胞外細胞質内のド

パミンが増加することよると考えられる。昨年度報告したゾニサミドのグルタチオン増加作用ならびにドパミン、L-DOPA に対する安定なメラニンへの変換能とを考慮合わせると、L-DOPA による神経毒性に関係しているキノン体生成をパーキンソン病モデルにおいてほぼ完全に阻止するというゾニサミドの薬理作用は、パーキンソン病患者への L-DOPA の長期により生じる問題症状にゾニサミドが有効であるという臨床結果を裏付ける基礎データといえる。

このゾニサミドの L-DOPA 誘発キノン体毒性に対する保護・抑制効果のメカニズムについては、ゾニサミドのドパミン、L-DOPA に対する安定なメラニンへの変換能だけでなく、キノン体生成・消去系への作用を有する可能性も考えられる。そこで今回、キノン体とくにドパミンキノンを還元・消去する酵素である NQO1 の変化を検討したが、パーキンソン病モデルへの L-DOPA 連日投与により増加する NQO1 の発現量は、ゾニサミド同時投与により亢進されることなく完全に抑制された。これは L-DOPA 投与で増加したキノン体を消去すべく代償性に増加した NQO1 の発現が、ゾニサミド投与によりキノン体毒性が抑制あるいは消去されたことでみられなくなったことを示していると考えられる。今後、ゾニサミドが他のキノン体生成系あるいはキノン体消去系諸因子への作用を有しているかについて、パーキンソン病モデル・培養ドパミン系細胞を用いて検討する。

また、ゾニサミド前投与が 6-OHDA によるドパミン神経脱落に対し保護効果を有する傾向がみられたことは、ゾニサミドがチロシン水酸化酵素への活性化作用を有することとも合致する。しかし、保護効果発現に変動が見られることから、その評価と解釈にはさらに詳細な検討を要する。

E. 結論

パーキンソン病モデルに L-DOPA を投与した際に惹起されるキノン体毒性に対して、ゾニサミドの同時投与が強力な保護・抑制効果を有することを明らかにできた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Diaz-Corrales, F.J., Asanuma, M., Miyazaki, I. and Ogawa, N.: Rotenone induces disassembly of the Golgi apparatus in the rat dopaminergic neuroblastoma B65 cell line. *Neurosci. Lett.*, 354: 59-63, 2004.
- 2) Miyoshi, K., Asanuma, M., Miyazaki, I., Diaz-Corrales, F. J., Katayama, T., Tohyama, M. and Ogawa, N.: DISC1 localizes to the centrosome by binding to kendrin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 317: 1195-1199, 2004.
- 3) Higashi, Y., Asanuma, M., Miyazaki, I., Hattori, N., Mizuno, Y. and Ogawa, N.: Parkin attenuates manganese-induced dopaminergic cell death. *J. Neurochem.*, 89: 1490-1497, 2004.
- 4) Tanaka, K., Asanuma, M. and Ogawa, N.: Molecular basis of anti-apoptotic effects of immunophilin ligands on hydrogen peroxide-induced apoptosis in human glioma cells. *Neurochem. Res.*, 29: 1529-1536, 2004.
- 5) Higashi, Y., Asanuma, M., Miyazaki, I. and Ogawa, N.: Expression of metallothionein-III and cell death in differentiated catecholaminergic neuronal cells. *Neurol. Res.*, 26: 671-676, 2004.
- 6) Asanuma, M., Miyazaki, I., Higashi, Y., Tsuji, T. and Ogawa, N.: Specific gene expression and possible involvement of inflammation in methamphetamine-induced neurotoxicity. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1025: 69-75, 2004.
- 7) Miyazaki, I., Asanuma, M., Diaz-Corrales, F.J., Miyoshi, K. and Ogawa, N.: Direct evidence for expression of dopamine receptors in astrocytes from basal ganglia. *Brain Res.*, 1029: 120-123, 2004.
- 8) Asanuma, M., Miyazaki, I. and Ogawa, N.: Neuroprotective effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on neurodegenerative diseases. *Curr. Pharm. Des.*, 10: 695-700, 2004.
- 9) Hozumi, I., Asanuma, M., Yamada, M. and Uchida, Y.: Metallothioneins and neurodegenerative diseases. *J. Health Sci.*, 50: 323-331, 2004.
- 10) Asanuma, M., Miyazaki, I., Diaz-Corrales, F.J. and Ogawa, N.: Quinone formation as dopaminergic neuron-specific oxidative stress in pathogenesis of sporadic Parkinson's disease and neurotoxin-induced parkinsonism. *Acta Med. Okayama*, 58: 221-233, 2004.
- 11) 浅沼幹人, 宮崎育子: 遺伝子改変によるパーキンソン病モデル. *脳の科学*, 292 (2004年増刊号): 165-170, 2004.
- 12) 小川紀雄, 浅沼幹人, 田中健一: Parkinson病薬物治療の将来—進行抑制薬実現の可能性. *医学のあゆみ*, 208: 583-588, 2004.
- 13) 浅沼幹人, 宮崎育子, 小川紀雄: 実験的パーキンソニズムに使われる薬剤—MPTP, 6-ヒドロキシドパミンならびにロテノン. *医薬ジャーナル*, 40: 111-116, 2004.
- 14) 浅沼幹人: 酸化ストレスとミトコンドリア機能障害, 炎症反応—孤発性パーキンソン病とドパミン神経毒研究から得たもの. *内科*, 93: 611-615, 2004.
- 15) 小川紀雄, 浅沼幹人, 三好 耕: パーキンソン病における細胞死の機序. *日本臨床*, 62: 1629-1634, 2004.
- 16) Asanuma, M., Miyazaki, I., Diaz-Corrales, F.J., Shimizu, M., Tanaka, K. and Ogawa, N.: Pramipexole has ameliorating effects on levodopa-induced abnormal dopamine turnover in parkinsonian striatum and quenching effects on dopamine-semiquinone generated in vitro. *Neurol. Res.*, in press.
- 17) Diaz-Corrales, F.J., Asanuma, M., Miyazaki, I., Miyoshi, K. and Ogawa, N.:

Rotenone induces aggregation of gamma-tubulin protein and subsequent disorganization of the centrosome: Relevance to formation of inclusion bodies and neurodegeneration. Neuroscience, in press.

2. 学会発表

- 1) 浅沼幹人, 宮崎育子, 小川紀雄: マンガン誘発ドパミン神経毒性に対するパーキンの保護効果とドパミンキノンの関与. 第45回日本神経学会総会, 東京, 2004, 5, 13.
- 2) 浅沼幹人, 宮崎育子, 小川紀雄: メタンフェタミンのドパミン神経毒性におけるチロシナーゼの関与. 第31回日本脳科学会, 宮崎, 2004, 6, 11.
- 3) 宮崎育子, 浅沼幹人, 東洋一郎, 小川紀雄: マンガン誘発神経毒性に対するパーキンの保護効果とドパミンの関与. 第31回日本脳科学会, 宮崎, 2004, 6, 11.
- 4) 宮崎育子, 浅沼幹人, 三好耕, 小川紀雄, 船田正彦: 5MeO-DIPTのドパミン神経毒性に関する検討. 第34日本神経精神薬理学会, 東京, 2004, 7, 23.
- 5) 浅沼幹人: 薬物依存・毒性発現にかかわる分子の分子生物学的検索—網羅的プロファイリングを中心に. 薬理学サマーセミナー2004「ストレス, 不安, 依存—行動実験のあり方と戦略」, 葉山, 2004, 9, 1.
- 6) 浅沼幹人, 宮崎育子, 小川紀雄: マンガン誘発ドパミン神経毒性とパーキンの保護効果におけるキノン体生成の関与. 第47回日本神経化学大会・第27回日本神経科学大会, 大阪, 2004, 9, 21.
- 7) 三好耕, 大西一成, 浅沼幹人, 宮崎育子, Francisco Diaz, 小川紀雄: DISC1は中心体タンパク kendrinと結合する. 第47回日本神経化学大会・第27回日本神経科学大会, 大阪, 2004, 9, 22.
- 8) 宮崎育子, 浅沼幹人, 小川紀雄, 船田正彦: 5MeO-DIPTによるドパミン神経細胞毒性. 第47回日本神経化学大会・第27回日本神経科学大会, 大阪, 2004, 9, 22.
- 9) Asanuma, M., Miyazaki, I. and Ogawa, N.: Transplantation of tyrosinase-producing cells into

parkinsonian model. 34th Annual Meeting of Society for Neuroscience, San Diego, 2004, 10, 26.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
特になし
2. 実用新案登録
特になし
3. その他
特になし

日本発抗パーキンソン作用薬ゾニサミドの臨床研究
－ プロテアソーム系と細胞内封入体：新しい封入体細胞モデルの検討－

分担研究者 服部 信孝 順天堂大学脳神経内科・老人性疾患病態治療研究センター
研究協力者 野田 和幸 順天堂大学脳神経内科
町田 裕 順天堂大学脳神経内科

研究要旨：ゾニサミド(ZNS)の治療効果はMAO-B阻害効果もその作用機序の一つである。封入体形成にドパミン代謝と α -シヌクレインの関与が指摘されている。そしてプロテアソームの活性低下が α -シヌクレインの凝集体形成において重要な鍵を握っていることは間違いない。従ってゾニサミドの詳細な薬理学的作用や神経保護作用を持つ新規誘導体の開発には封入体形成のメカニズムを検討できるような *in vitro* の実験系の確立が必要である。パーキンソン病 (PD) では neuroinflammation と蛋白分解系の関与が指摘されている。両系に関与する I κ B α がヒト PD 剖検脳のレビー小体に存在していることを見出した。この I κ B α はリン酸化フォームであり、封入体内にはその他に SCF リガーゼの校正成分である ROC1, Cullin-1, Nedd8 が存在していた。更にドパミン神経細胞の特徴を持つ SH-SY5Y 細胞を使いプロテアソーム阻害剤を投与することで、同じ構成蛋白を持つ封入体形成を観察できた。このシステム系を用いて、封入体形成と細胞死が非依存的に関わっていることが分かった。更に我々は遺伝性 PD の原因遺伝子産物であるパーキンの機能解析からドパミンキノン体が細胞死の実行分子であることを見出した。キノン体と α -シヌクレイン複合体がレビー小体形成に関与していることが指摘されており、パーキンと α -シヌクレインがキノン体形成に関与していることが分かった。これら実験結果を踏まえて MAO-B 阻害作用のある ZNS の封入体形成への関与を検討した。封入体形成には ZNS は何ら影響を与えなかったが、ZNS 単独で濃度 1 μ M-100 μ M 間の濃度では神経保護的に作用した。SH-SY5Y 細胞は、MAO-B 活性を持たないことより MAO-B 阻害作用とは異なる機序で細胞保護を示していると考えている。

A. 研究目的

ゾニサミド (ZNS) のパーキンソン病 (PD) への治療効果は MAO-B 阻害効果もその作用機序の一つと考えられている。PD の病態解明に神経病理学的マーカーであるレビー小体形成機序を明らかにすることは PD の真の原因を解明する上で重要である。封入体形成にドパミンキノン体と α -シヌクレインの複合体形成が指摘されており、一方、若年性 PD の原因遺伝子パーキンの機能低下によりフリーのドパミンキノン体が増加することが明らかにされている。従って、レビー小体形成にドパミンキノン体、プロテ

アソームの活性低下がレビー小体形成において重要な鍵を握っていることは間違いない。従って ZNS の薬理学的作用の 1 つに MAO-B 阻害作用があることから、ZNS が封入体形成に影響を与える可能性が考えられる。ZNS の作用機序検討の為に *in vitro* の実験系の確立が必要である。昨年度はレビー小体形成のメカニズムの検討と培養細胞系を使った実験系の確立を目指した。炎症とプロテアソーム系の関与が指摘されており、昨年度にはリン酸化 I κ B α がレビー小体に存在していることを見出した。我々は、培養細胞 SH-SY5Y にプロテアソーム阻害剤を

加えてもヒト剖検脳と同様にリン酸化 I κ B α を同定できた。更にリン酸化 I κ B α のキナーゼ (IKK) を阻害するために合成ペプチドにて IKK を阻害し、I κ B α のリン酸化を抑制することができた。その結果、細胞内封入体形成を抑制できた。封入体の構成成分はヒト剖検脳レビー小体で観察されたものと類似しており、封入体形成の良きモデルとなることが分かった。このシステムを使って ZNS の封入体形成について検討した。

B. 研究方法

1) 封入体形成検討のための培養細胞系の確立

従来、封入体形成については過剰発現系を用いた研究が殆どである。そこで我々はヒト PD 剖検脳レビー小体と同様な構成成分が含むような培養細胞系の確立を目指した。ドパミン神経細胞の特徴を持っている SH-SY5Y 細胞を用いてプロテアソーム阻害剤である MG1323 を使った。

2) 封入体形成を確認した上で構成蛋白を検討する意味でヒト剖検脳で観察された各種蛋白について検討を加えた。用いた抗体は I κ B α , ubiquitin, cullin-1, NF- κ B, α -synuclein であった。

3) 上記実験系において封入体形成と細胞死の関連を検討するために cell viability を MTT で検討した。

3) ZNS の効果検討

上記培養細胞系を用いて細胞死への影響や封入体形成への影響を検討した。ZNS の濃度としては 1 μ M-1mM までとし、MTT にて cell viability を確認し、併せて封入体形成の頻度についても検討した。

C. 研究結果

リン酸化 I κ B α がレビー小体に存在していた。1例のみであるがびまん性レビー小体病においても皮質型レビー小体が同様に染色された。更に I κ B α 関連分子である ROC1, Nedd8, Cullin-1 についても検討したが全てレビー小体に局在していた。つまり SCF リガーゼの構成蛋白がレビー小体に存在していることになる。更に MG132 を SH-SY5Y 細胞

に添加したところヒト PD 剖検脳同様に封入体形成が観察され、封入体は SCF リガーゼの構成成分により成り立っていた。この系が封入体形成の良きモデルであることが示された。更に I κ B α のリン酸化酵素を阻害させると封入体形成が抑制された。Cell viability を検討すると細胞死と封入体形成には相関を認めなかった。この系に ZNS を加えて封入体形成に及ぼす影響を検討したが、封入体形成と細胞死の両要素に関し、何ら影響を与えなかった。しかしながら、ZNS 単独で SH-SY5Y 細胞に 1 μ M-100 μ M までの濃度では、細胞保護的に作用することが分かった。

D. 考察

封入体構成成分にリガーゼである SCF 複合体リガーゼの構成成分が認められた。更に SH-SY5Y 細胞にプロテアソーム阻害剤を添加して観察された封入体もまた SCF リガーゼの構成成分で染色された。この系を用いて I κ B α のリン酸化を選択的に阻害すると封入体形成が抑制されたが、細胞死と封入体には相関関係が観察されなかった。この系を用いて ZNS 単独、プロテアソーム阻害剤と ZNS の 2 系を検討したが、ZNS によるプロテアソーム系への影響はないと考えられた。少なくとも ZNS のプロテアソーム系への影響は少ないと言える。一方、ZNS 単独で細胞死に対し、保護的作用を示したことは ZNS の新規作用の可能性を示す。SH-SY5Y 細胞には、MAO-B 活性がないので MAO-B 阻害とは別の作用が推定された。

E. 結論

封入体形成に ZNS は影響を与えないことが推定された。ZNS がドパミン代謝に対し影響を与えていること、またドパミンキノン体形成に影響を与えている可能性があることより、今後はパーキン遺伝子ノックダウン法のシステムを使い、ドパミンキノン体が産生される系で ZNS の細胞死への影響を検討する予定である。更にチロシナーゼを発現させた SH-SY5Y 細胞を使いメラニン形成のあるシステムでの ZNS の影響を検討する予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

- 1) Hatano Y, Sato K, Elibol B, Yoshino H, Yamamura Y, Bonifati V, Shinotoh H, Asahina M, Kobayashi S, Ng Ar, Rosales RL, Hassin-Bear S, Shinar Y, Lu CS, Chang HC, Wu Chou YH, Atac FB, Kobayashi T, Toda T, Mizuno Y, Hattori N. : PARK6-linked autosomal recessive early-onset parkinsonism in Asian populations. *Neurology* 63:1482-1485, 2004.
- 2) Hatano Y, Li Y, Sato K, Asakwa S, Yamamura Y, Tomiyama H, Yoshino H, Asahina M, Kobayashi S, Ng Ar, Rosales RL, Hassin-Bear S, Shinar Y, Lu CS, Shimizu N, Toda T, Mizuno Y, Hattori N. : Novel PINK1 mutations in early-onset parkinsonism. *Ann Neurol* 56:424-427, 2004.
- 3) Hattori N, Mizuno Y. : Pathogenetic mechanisms of parkin in Parkinson's disease/ *Lancet* 364:722-724, 2004
- 4) Tanaka K, Suzuki T, Hattori N, Mizuno Y. : Ubiquitin, proteasome and parkin. *Biochim Biophys Acta*. 2004 Nov 29;1695(1-3):235-47.
- 5) Takahashi R, Imai Y, Hattori N, Mizuno Y. : Parkin and endoplasmic reticulum stress. *Ann NY Acad Sci* 99: 101-106, 2004
- 6) Tanaka M, Cabrera VM, Gonzalez AM, Larruga JM, Takeyasu T, Fuku N, Guo LJ, Hirose R, Fujita Y, Kurata M, Shinoda K, Umetsu K, Yamada Y, Oshida Y, Sato Y, Hattori N, Mizuno Y, Arai Y, Hirose N, Ohta S, Ogawa O, Tanaka Y, Kawamori R, Shamoto-Nagai M, Maruyama W, Shimokata H, Suzuki R, Shimodaira H. Mitochondrial genome variation in eastern Asia and the peopling of Japan. *Genome Res*. 14:1832-50, 2004
- 7) Higashi Y, Asanuma M, Miyazaki I, Hattori N, Mizuno Y, Ogawa N. : Parkin attenuates manganese-induced dopaminergic cell death. *J Neurochem*.

89:1490-7, 2004

- 8) 服部信孝. パーキンソン病の発症機序: 孤発型性パーキンソン病研究から家族性パーキンソン病研究へ. (日本神経学会賞受賞) *臨床神経学* 第44巻 第4号, 2004, pp241-262
- 9) 服部信孝. 3. パーキンソン病と Parkin. *実験医学* 第三章蛋白質修飾・分解異常と病気, Vol.22 No.2, 2004, pp180(286)-186(292)
- 10) 服部信孝. 常染色体劣性遺伝性若年性パーキンソンニズム. *週間医学のあゆみ* Vol.208 No.6, 医歯薬出版株式会社, 東京, 2003, pp 526-53
- 11) 服部信孝. 第八章 遺伝性パーキンソン病 1 Parkinson's disease1(SNC P): α -synuclein. *脳の科学* 第26巻増刊号, 星和書店, 東京, 2004, pp173-177
- 12) 服部信孝. 第八章 遺伝性パーキンソン病 2 Parkinson's disease2(Park2): パーキン. *脳の科学* 第26巻増刊号, 星和書店, 東京, 2004, pp178-186
- 13) 服部信孝. 臨床編 常染色体劣性遺伝子若年性パーキンソンニズム. *医学のあゆみ* Vol.208 No.6, 医歯薬出版株式会社, 東京, 2004, pp526-532
- 14) 服部信孝, 野田和幸. 《ここまでわかったパーキンソン病の発症機序と病態生理》[発症機序] ユビキチン・プロテアソーム系障害- 家族性パーキンソン病研究から得たもの. *臨床雑誌 内科4 特集パーキンソン病- 治療の問題点と今後の展開-*, 南光堂, 東京, 2004, pp616-622
- 15) 服部信孝. 特集 神経変性疾患治療への展望- 病態機序に基づく治療戦略-, *パーキンソン病の分子標的治療. 最新医学* 第59巻 第7号, 最新医学社, 大阪市, 2004, pp56-62

2. 学会発表及び講演

- 1) 服部信孝. シンポジウム6-1 パーキンソン病をめぐる最近の話題 パーキンソン病の発症機序-遺伝性パーキンソン病からのヒントをえて. *臨床神経* 44 第45回日本神経学会総会, 東京, 5月11日-14日, 2004
- 2) Hattori N, Yoshino H, Imamichi Y,

Mizuno Y. Parkin mutations in autosomal recessive early-onset parkinsonism (AR-EP). NO. 8th international congress of Parkinson's disease and Movement Disorders, Roma, June 14-17, 2004

3) 服部信孝, 町田 裕, 佐藤栄人, 波田野靖子, 波田野琢, 李 元哲, 佐藤健一, 水野美邦, 田中啓二, 高柳 淳, 浅川修一, 清水信義. パーキンソン病の発症機序: 遺伝型と孤発型パーキンソン病の共通メカニズム. 第11回日本遺伝子診療学会大会, 東京, 9月17日-18日, 2004

4) 服部信孝. パーキンソン病とはーその病態と今後の展望ー. パーキンソン病とうまくつきあうためにーひとりで悩まないでー, 静岡, 4月3日, 2004

5) 服部信孝. パーキンソン病の治療. 奈良県BIF発売記念学術講演会, 奈良, 4月15日, 2004

6) 服部信孝. パーキンソン病薬物治療と最新の研究. パーキンソン病学術講演会, 仙台, 6月26日, 2004

7) 服部信孝. パーキンソン病の発症機序ー最新の知見よりー. 第3回筑後地区パーキンソン病懇話会プログラム, 福岡, 7月14日, 2004

8) 服部信孝. パーキンソン病の発症機序: 遺伝型と孤発型パーキンソン病の共通メカニズム. 第11回日本市電氏診療学会大会シンポジウム, 東京, 9月17日, 2004

9) 服部信孝. パーキンソン病について. 順天堂大学・東京理科大学交流セミナー, 千葉, 9月25日, 2004

10) 服部信孝. パーキンソン病の基礎から臨床まで. 第5回パーキンソン病治療・症例検討会, 名古屋, 10月1日, 2004

11) 服部信孝. パーキンソン病の基礎から臨床まで. 第2回新潟パーキンソン病治療研究会, 新潟, 10月22日, 2004

12) 服部信孝. パーキンソン病の研究・診断・治療. 第10回青函神経疾患フォーラム, 青森, 11月6日, 2004

特許取得 なし

実用新案登録 なし

その他

服部信孝. 常染色体劣性若年性パーキンソン病の原因遺伝子の発見と機能解明. Thomson Scientific Academic Symposium表彰式ー最先端研究領域において活躍する日本の研究者を称えて, 11月2日, 東京, 2004

H. 知的財産権の出願・登録状況

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

マイクロサテライト多型によるゲノムワイド関連解析

分担研究者	戸田 達史	大阪大学ゲノム機能
研究協力者	佐竹 渉	大阪大学ゲノム機能、大阪大学神経内科
	廣田 勇士	大阪大学ゲノム機能
	百瀬 義雄	東京大学 CBI
	水田 依久子	大阪大学ゲノム機能
	田宮 元	東海大学分子生命科学
	猪子 英俊	東海大学分子生命科学、
	佐古田 三郎	大阪大学神経内科、
	山本 光利	香川県立中央病院神経内科、
	服部 信孝	順天堂大学神経内科
	村田 美穂	国立精神・神経センター武蔵病院神経内科

研究趣旨

孤発性パーキンソン病(PD)は、複数の遺伝的要因と環境要因を基盤として発症する多因子疾患である。我々は、PDの疾患感受性遺伝子の同定を目標として、27,000個のマイクロサテライト(MS)マーカーと pooled DNA 法を組み合わせたゲノムワイドな関連解析を行った。1次-3次スクリーニングを段階的に行い、候補領域を71領域まで絞り込んだ。この中には、同一アレルが一貫して強い関連を示すマーカーを含んでいた。今後、1-3次スクリーニングを通じて有意であったマーカーに関して、個別DNA検体タイピングを行い、関連が確認された領域を感受性候補領域と考え、SNPによる連鎖不平衡マッピングへと進める。

A. 研究目的

高齢化に伴い患者数の増加が予測される、孤発性PDの疾患感受性遺伝子を明らかにする。

B. 研究方法

pooled DNA法を用い、全ゲノム上に平均100kb間隔で分布する約27,000個のMS多型を利用した、ゲノムワイド関連解析を行った。別検体群(1次124検体、2次250検体、3次250検体、計624検体)を用いて1次2次3次スクリーニングを段階的に行い、候補領域を絞り込んだ。

DNA収集のための研究協力者からの採血の際には、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針(平成13年3月29日 文科省・厚労省・経産省告示第1号)」を遵守し、文

書によるインフォームドコンセントを得た。また、本研究は大阪大学大学院医学系研究科、東京大学大学院医学系研究科、順天堂大学医学部、香川県立中央病院の各倫理委員会の承認を得ている。

C. 研究結果

1-3次スクリーニング通して、 $p < 0.05$ (2×2 or $2 \times m$)の関連を認めるマーカーを、71マーカーまで絞り込んだ。また、同一アレルが1-3次スクリーニングで一貫して強い関連を示すマーカーを含んでいた。

D. 考察、E. 結論

1-3次スクリーニングを通じて有意であったマーカーに関して、各スクリーニングでのpooled DNAの構成する全患者、対照各々624

人(1次124人、2次250人、3次250人)を用いた、個別DNA検体タイピングを行い、pooled DNA法を用いたことによる偽陽性マーカーを排除する。個別検体タイピングで関連が確認された領域を感受性候補領域と考え、SNPによる連鎖不平衡マッピングへと進める。

相対危険度1.5程度の遺伝子多型を検出可能な関連解析をゲノムワイドに行うには、数百人規模の患者及び対照検体に対して、MSで数万、SNPで数十万程度のマーカーの検討(つまり数千万の遺伝子型判定)を要すと試算される。Pooled DNA法は、多検体処理により膨大となる実験量、費用を大幅に軽減する極めて有効な手段である。ゾニサミド治療有効群、無効群の遺伝的背景の差異を検索すべくしてデザインされる関連解析に応用可能であると考えられる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 水田、戸田. 日本臨床 62 (9): 1635-1640 (2004)
- 2) 佐竹、戸田. 神経研究の進歩 48 (5): 741-749 (2004)
- 3) Maraganore DM, ..., Toda T, et al. Ann Neurol 55:512-521, 2004
- 4) Hatano Y, ..., Toda T, et al. Ann Neurol 56:424-427, 2004
- 5) Hatano Y, ..., Toda T, et al. Neurology 63:1482-1485, 2004

2. 学会発表

日本神経学会 (2004)
日本人類遺伝学会 (2004)
Movement Disorders 国際学会 (2004)
アメリカ人類遺伝学会 (2004)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

特になし

restless legs syndrome に対するゾニサミドの効果

分担研究者 長谷川 一子 国立相模原病院神経内科医長

研究要旨 欧米ではレストレスレッグ症候群 restless legs syndrome:RLS がパーキンソン病患者:PD における夜間の運動症状として、一般高齢者において有病率の高い治療可能な病態として注目されてきている。本症は入眠障害の原因のみならず、日中の傾眠の要因ともされており、PD や一般高齢者の QOL を考慮するうえで重要な症候の一つである。RLS の発症病理にはドパミンの欠乏が推定されており、様々なドパミン作動薬が RLS のコントロールに使用されている。しかし、我が国では RLS が注目されているにもかかわらず、実際に治療を必要とする症例を経験することは少ない。今回、PD 症例および健常高齢者の RLS に対してゾニサミドの投与を行い RLS の良好なコントロールが可能であった。ゾニサミドの新しい適応疾患としての RLS について報告した。

A. 研究目的：

ゾニサミドは日本発の新しい抗パーキンソン病薬として検討が進んできている。パーキンソン病以外にもドパミン欠乏状態と考えられている病態に restless legs syndrome:RLS がある。欧米では高齢人口における有病率が 10%との報告があるが我が国では診療する機会が少ない。今回、パーキンソン病に伴う RLS と健常高齢者に見られた RLS を経験し、ゾニサミドの効果を検討した。

B. 研究方法，症例：

症例へのゾニサミド投与に当たっては、本薬物が海外で RLS に有用であるとの報告があること、副作用の頻度などについて十分な説明を行い同意を得た上で実施した。
症例 1；66 歳男性。発症 6 年目で PD のコントロール目的で受診した症例。主訴は PD のコントロールよりも、RLS のコントロールにあった。本症例は当初、RLS は入眠時のみにみられたが、次第に日中にも発現するようになり、受診時には昼過ぎより症状の軽減のために足踏みをしたり、屋内を歩き回ったりを繰り返して対処しており、無動による不如意感や疲労感、睡眠不足を訴えた。

本症例は来院時レボドパ製剤のみ服用であったため、ドパミンアゴニストその他を加え、先ず運動症状の軽減を図った。しかし、ADL が改善し完全に自立したにも拘わらず、依然として夕方ごろからの RLS を連日認めるためゾニサミド 100mg の追加服用を行った。これにより、RLS の頻度が減少し、睡眠不足と下肢の不快感が軽快した。

症例 2；84 歳女性。夜落ち着けないということで、内科を受診。身体には問題がないが、精神科でもなさそうだとこのことで、神経内科に依頼された。数年来夕方になると足がむずむずして外を歩き回らないと落ち着けなくなり、連日 24 時ごろまで外を歩き回っている。疲れてしまうし、かといって家でじっと静かにしていられないため困って来院。神経学的には異常なし。ゾニサミドを 100mg（夕）に投与開始したところ、動き回るのが 1 時間くらいに短縮したため、疲れにくくなり、入眠も容易となった。現在、200mg に増量し、経過良好である。

C. 研究結果

我が国では比較的稀な疾患である RLS 2 症例にゾニサミドの投与を行った。100mg～200mg の投与で症状は改善し、投与したその

夜から症状が軽快した。現在まだ2症例に対する経験に過ぎないが、特に副作用なく症状が速やかに軽減し、ゾニサミドはRSLの治療薬として有用と思われる。

海外でも特発性RLS17症例にゾニサミドを投与し有用であったとの報告がある。RLSの発症基盤にはドーパミンの不足状態が想定されている。一方、ゾニサミドの薬理学的効果は内因性、外因性ドーパミン神経の増強効果と考えられ、非PD症例のRLSに対するゾニサミドの投与は薬価の面からも有用であるといえる。

D. 結論

RLSは我が国の有病率は欧米人よりも低いとされる。今回RLSを認めた2症例についてゾニサミドの投与を行い有用と思われた。医療経済を考慮した場合、ドーパミンアゴニストよりも本薬物は有用と結論できる。

G. 研究発表 なし

F. 知的財産権の出願・登録状況 なし

開 催 会 議

16年度 班会議

日時：2005年1月22日（土） 11:00～15:00

場所：ホテルはあといん乃木坂健保会館 311号室
107-0062 東京都港区南青山1-24-4

議題：研究成果発表

出席者：浅沼幹人、金澤一郎、近藤智善、佐竹 渉、園田智弘、
南部 篤、中塚晶子、野元正弘、野田和幸、長谷川一子、
服部信孝、森田修平、村田美穂、山本光利、工藤里美、
藤田晶子

(以上16名)

班 構 成 員 名 簿

「日本発の新しい抗パーキンソン作用薬ゾニサミドの臨床研究班」

(H15-難治-01)

	氏 名	所 属	職 名
主任研究者	村田 美穂	国立精神・神経センター武蔵病院神経内科	第二病棟部長
分担研究者	野元 正弘	愛媛大学医学部臨床薬理学講座	教 授
	長谷川一子	独立行政法人国立病院機構 相模原病院神経内科	医 長
	服部 信孝	順天堂大学脳神経内科・老人性疾患病態治療 研究センター	助教授
	浅沼 幹人	岡山大学大学院医歯学総合研究科神経情報学 分野神経薬理化学	助教授
	近藤 智善	和歌山県立医科大学医学部神経内科	教 授
	戸田 達史	大阪大学大学院医学系研究科ゲノム機能分野	教 授
	南部 篤	自然科学研究機構生理学研究所 生体システム研究部門	教 授
研究協力者	山本 光利	香川県立中央病院神経内科	部 長
事務局	藤田 晶子	国立精神・神経センター 〒187-8551 東京都小平市小川東町 4-1-1 Tel042-341-1780 Fax042-346-1762	

研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書 籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
永井将弘, 野元正弘.	消化器官作用薬.	平井俊策	薬物による痴呆 痴呆症学 (2) 62	日本臨床社	東京	2004	498-502
近藤智善.	Parkinson病, 家族性Parkinson病.	平井俊策	薬物による痴呆 痴呆症学 (2) 62	日本臨床社	東京	2004	97-101
野元正弘.	筋弛緩薬, 局所麻酔薬.		シンプル薬理学	南江堂	東京	2004	93-100
Nambu A.	A New Dynamic Model of Cortico-Basal Ganglia Loop.	Mori S, Stuart DG, Wiesendanger M.	Brain Mechanisms for the Integration of Posture and Movement. Prog Brain Res 143	Elsevier	Amsterdam	2004	461-466
南部 篤.	大脳皮質と大脳基底核.	本郷利憲, 廣重 力, 豊田順一	標準生理学第6版	医学書院	東京	2005	359-386
長谷川一子.	パーキンソン病の内科的治療	山口徹, 北原光夫	今日の治療 2004	医学書院	東京	2004	634-636
長谷川一子.	パーキンソン病の治療 (1) 早期パーキンソン病の治療.	水野美邦, 近藤智善	よくわかるパーキンソン病のすべて	永井書店	大阪	2004	100-119
長谷川一子.	パーキンソン病の治療薬の種類, 特徴, 副作用, いつ使うか.	水野美邦	パーキンソン病治療薬の選び方と使い方	南江堂	東京	2004	
長谷川一子.	7) 食事上の注意 28) 排泄, 転倒, 服の着脱, 睡眠 29) スポーツ, 趣味, レクリエーションなど.	神奈川パーキンソン病の治療を考える会編	パーキンソン病セルフケアマニュアル	新樹社	東京	2004	
村田美穂.	パーキンソン病の治療 (4) 自律神経症状の治療.	水野美邦, 近藤智善	よくわかるパーキンソン病のすべて	永井書店	大阪	2004	152-159

雑 誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Diaz-Corrales FJ, <u>Asanuma M</u> , Miyazaki I, Ogawa N.	Rotenone induces disassembly of the Golgi apparatus in the rat dopaminergic neuroblastoma B65 cell line.	Neurosci Lett	354	59-63	2004
Miyoshi K, <u>Asanuma M</u> , Miyazaki I, Diaz-Corrales FJ, Katayama T, Tohyama M, Ogawa N.	DISC1 localizes to the centrosome by binding to kendrin.	Biochem Biophys Res Commun	317	1195-11 99	2004
Higashi Y, <u>Asanuma M</u> , Miyazaki I, <u>Hattori N</u> , Mizuno Y, Ogawa N.	Parkin attenuates manganese-induced dopaminergic cell death.	J Neurochem	89	1490-14 97	2004
Tanaka K, <u>Asanuma M</u> , Ogawa N.	Molecular basis of anti-apoptotic effects of immunophilin ligands on hydrogen peroxide-induced apoptosis in human glioma cells.	Neurochem Res	29	1529-15 36	2004
Higashi Y, <u>Asanuma M</u> , Miyazaki I, Ogawa N.	Expression of metallothionein-III and cell death in differentiated catecholaminergic neuronal cells.	Neurol Res	26	671-676	2004
<u>Asanuma M</u> , Miyazaki I, Higashi Y, Tsuji T, Ogawa N.	Specific gene expression and possible involvement of inflammation in methamphetamine-induced neurotoxicity.	Ann NY Acad Sci	1025	69-75	2004
Miyazaki I, <u>Asanuma M</u> , Diaz-Corrales FJ, Miyoshi K, Ogawa N.	Direct evidence for expression of dopamine receptors in astrocytes from basal ganglia.	Brain Res	1029	120-123	2004
<u>Asanuma M</u> , Miyazaki I, Ogawa N.	Neuroprotective effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on neurodegenerative diseases.	Curr Pharm Des	10	695-700	2004
Hozumi I, <u>Asanuma M</u> , Yamada M, Uchida Y.	Metallothioneins and neurodegenerative diseases.	J Health Sci	50	323-331	2004

Asanuma M, Miyazaki I, Diaz-Corrales FJ, Ogawa N.	Quinone formation as dopaminergic neuron-specific oxidative stress in pathogenesis of sporadic Parkinson's disease and neurotoxin-induced parkinsonism.	Acta Med Okayama	58	221-233	2004
浅沼幹人, 宮崎育子	遺伝子改変によるパーキンソン病モデル.	脳の科学 (2004増刊号)	292	165-170	2004
小川紀雄, 浅沼幹人, 田中健一.	Parkinson病薬物治療の将来—進行抑制薬実現の可能性.	医学のあゆみ	208	583-588	2004
浅沼幹人, 宮崎育子, 小川紀雄.	実験的パーキンソニズムに使われる薬剤—MPTP, 6-ヒドロキシドパミンならびにロテノン.	医薬ジャーナル	40	111-116	2004
浅沼幹人.	酸化ストレスとミトコンドリア機能障害, 炎症反応—孤発性パーキンソン病とドパミン神経毒研究から得たもの.	内科	93	611-615	2004
小川紀雄, 浅沼幹人, 三好 耕.	パーキンソン病における細胞死の機序.	日本臨床	62	1629-1634	2004
Asanuma M, Miyazaki I, Diaz-Corrales FJ, Shimizu M, Tanaka K, Ogawa N.	Pramipexole has ameliorating effects on levodopa-induced abnormal dopamine turnover in parkinsonian striatum and quenching effects on dopamine-semiquinone generated in vitro.	Neurol Res	in press		
Diaz-Corrales FJ, Asanuma M, Miyazaki I, Miyoshi K, Ogawa N.	Rotenone induces aggregation of gamma-tubulin protein and subsequent disorganization of the centrosome: Relevance to formation of inclusion bodies and neurodegeneration.	Neuroscience	in press		
Morita S, Miwa H, Kondo T.	Effect of zonisamide on essential tremor: a pilot crossover study in comparison with arotinolol.	Parkinsonism & related Disord	20	in press	2005
Nakanishi I, Kohmoto J, Miwa H, Kondo T.	A pilot cross over study of the effect of zonisamide and trihexyphenidyl on Parkinsonian tremor.	Movement Disorder	19(S9)	S147	2004
Morita S, Miwa H, Nakanishi I, Kondo T.	Effect of zonisamide on essential tremor:a pilot crossover study in comparison with arotinolol.	Movement Disorder	19, (S9)	S440	2004

Maraganore DM, Lesnick TG, Elbaz A, Chartier-Harlin M-C, Gasser T, Krueger R, Hattori N, Mellick GD, Quattrone A, Satoh J-i, <u>Toda T</u> , Wang J, Ioannidis JPA, Rocca WA, and the UCHL1 Global Genetics Consortium.	UCHL1 is a Parkinson's disease susceptibility gene.	Ann Neurol	55	512-521	2004
Popiel HA, Nagai Y, Onodera O, Inui T, Fujikake N, Urade Y, Strittmatter WJ, Burke JR, Ichikawa A, <u>Toda T</u> .	Disruption of the toxic conformation of the expanded polyglutamine stretch leads to suppression of aggregate formation and cytotoxicity.	Biochem Biophys Res Commun	317	1200-1206	2004
Akasaka-Manyo K, Manyo H, Kobayashi K, <u>Toda T</u> , Endo T.	Structure-function analysis of human protein O-linked mannose b1,2-N-acetylglucosaminyltransferase 1, POMGnT1.	Biochem Biophys Res Commun	320	39-44	2004
Longman C, Mercuri E, Cowan F, Allsop J, Brockington M, Jimenez-Mallebrera C, Kumar S, Rutherford M, <u>Toda T</u> , Muntoni F.	Antenatal and postnatal brain magnetic resonance imaging in muscle-eye-brain disease.	Arch Neurol	61	1301-1306	2004
Kurahashi H, Inagaki H, Yamada K, Ohye T, Taniguchi M, Emanuel BS, <u>Toda T</u> .	Cruciform DNA structure underlies the etiology for palindrome-mediated human chromosomal translocations.	J Biol Chem	279	35377-35383	2004
Hatano Y, Li Y, Sato K, Asakawa S, Yamamura Y, Tomiyama H, Yoshino H, Asahina M, Kobayashi S, Hassin-Baer S, Lu CS, Ng AR, Rosales RL, Shimizu N, <u>Toda T</u> , Mizuno Y, Hattori N.	Novel PINK1 mutations in early-onset parkinsonism.	Ann Neurol	56	424-427	2004
Ohtake H, Limprasert P, Fan Y, Onodera O, Kakita A, Takahashi H, Bonner LT, Tsuang DW, Murray IV, Lee VM, Trojanowski JQ, Ishikawa A, Idezuka J, <u>Murata M</u> , <u>Toda T</u> , Bird TD, Leverenz JB, Tsuji S, La Spada AR.	β -synuclein gene alterations in dementia with Lewy bodies.	Neurology	63	805-811	2004