

厚生労働科学研究費補助金  
難治性疾患克服研究事業

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

平成17年度 総括・分担研究報告書

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

平成18(2006)年 3月

# 目 次

I.	主任総括研究報告		
	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 国立精神・神経センター武蔵病院神経内科	村田 美穂	----- 1
II.	分担研究報告		
	ゾニサミドの長期効果と神経保護作用 国立精神・神経センター武蔵病院神経内科	村田 美穂	----- 5
	ゾニサミドの L-DOPA 誘発キノン体毒性に対する保護効果の発現メカニズム 岡山大学大学院医歯学総合研究科脳神経制御学講座神経情報学	浅沼 幹人	----- 8
	Levodopa 抵抗性のすくみ足に対する Zonisamide (ZNS)の効果の検討 和歌山県立医科大学神経内科	近藤 智善	----- 15
	パーキンソン病の遺伝子多型と発症リスクおよびゾニサミドの薬剤効果の研究 大阪大学大学院医学系研究科臨床遺伝学	戸田 達史	----- 16
	日本発の新しい抗パーキンソン病作用薬ゾニサミドの臨床研究に関する研究 愛媛大学医学部臨床薬理学講座	野元 正弘	----- 17
	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 ーパーキンソン病モデルサルによる検討ー 自然科学研究機構生理学研究所	南部 篤	----- 22
	Zonisamide のもつ神経保護作用についての基礎的研究 順天堂大学部脳神経内科	服部 信孝	----- 24
	ゾニサミドにパーキンソン病発症予防効果はあるか 国立相模原病院神経内科	長谷川 一子	----- 25
III.	開催会議		----- 27
IV.	班構成員名簿		----- 31
V.	研究成果の発刊に関する一覧		----- 33

# I 総括報告書

## 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

主任研究者 村田 美穂 国立精神・神経センター武蔵病院・第二病棟部長

研究要旨：主任研究者が発見したゾニサミド(ZNS)の抗パーキンソン作用について、長期臨床効果、抗パーキンソン作用の発現機序および神経保護作用の解析など ZNS の抗パーキンソン作用について多面的に研究を進めた。パーキンソン病(PD)に対する臨床効果は大規模長期観察により、効果はほぼ投与 16 週後までに発現し、1 年後まで持続、かつ経過とともにより改善する傾向があることを明らかにした。また、PD 以外のパーキンソン症候群におけるすくみ足、restless leg 症候群への効果も少数例で確認した。PD 作用機序についてはコモンマーマセットとラットでの ZNS の作用の比較から、被殻におけるドパミン代謝抑制作用が選択的 MAOB 阻害薬である selegiline とは異なる作用機序であることが示唆された。また、ZNS が単独で PD モデルサルモネラ淡蒼球の神経活動を正常化させることを見出した。神経保護作用については、ZNS はキノン体除去作用をもつが、実際に *in vivo* でキノン体を中心とした細胞質過剰ドパミンによる神経毒性に対し ZNS が保護効果を示すことを明らかにした。今後、オーダーメイド医療、新規薬剤の開発を視野に、作用機序、神経保護作用についての検討を進める。

### 分担研究者

近藤智善 和歌山県立医大・教授  
野元正弘 愛媛大学医学部・教授  
南部 篤 生理学研究所・教授  
浅沼幹人 岡山大学大学院・助教授  
服部信孝 順天堂大学医学部・助教授  
戸田達史 大阪大学大学院・教授  
長谷川一子 国立相模原病院・医長

が益々使いにくくなることも想定され、厚生労働行政において今後一層大きな問題になると考えられる。また、PD は疾患単位として独立しているものの、経過や中核となる症状、薬物への反応性などから、いくつかの病型が存在すると考えられているが、薬剤の使い分けはいまだ混乱している。従って現在のパーキンソン病治療においては 1) wearing-off 現象のコントロール、2) 経済的かつ最高の効果を得られる薬物の組み合わせの選択の 2 点が最も重要な問題であり、これらを解明することは PD 患者の QOL 上も医療財政上も強く求められている。主任研究者らが抗 PD 作用を発見したゾニサミド(ZNS) は我が国で開発された抗てんかん薬で、すでに 10 年以上使用され、安全性も確立している薬剤である。本研究班では ZNS を適正に使用し、その薬理学的効果と経済効果を明らかにするために、1) 臨床的に ZNS の抗パーキンソン作用の確認と、著明な効果を得られる人の特徴抽出などにより、

### A. 研究目的

パーキンソン病長期治療においてはレボドパの効果持続時間が短縮し、服薬に伴い症状が大きく変動する wearing-off 現象の出現が最大の問題となっている。wearing-off 現象を改善するために開発された多くの薬剤をもってしても効果は不十分で、しかもこれらの薬剤は高価であるために、患者の負担も大きくまた医療財政をも逼迫させている。包括医療の導入によりこれらの薬剤

パーキンソン病のオーダーメイド医療の確立につなげる。2) 培養細胞系及びモデル動物を用いた ZNS の作用発現機序の解明、

3) 神経保護作用を中心とした ZNS の未知の効果についての検討を進めてきた。本年度は昨年までの成果をふまえ、臨床的には長期効果の評価、パーキンソン関連病態への効果の評価、ZNS 単独での脳内神経回路に対する効果、ZNS の保護作用について研究を進めた。

## B. 研究方法・研究結果・考察

### 1) ZNS の長期効果について大規模での検討

昨年度、PD 患者 12 名での 3 年以上の長期効果を評価したところ、抗 PD 効果は 1 年以上持続すること、投与初期から効果を得られるが、その後も経過とともに改善する傾向があることが見出された。しかし、12 名という少数例であったため、今年度は主任研究者が医学専門家としてかかわった開発元の長期試験のケースカードを再検討した。平均年齢 64.3 歳、平均罹患期間約 9 年の PD 患者 92 例を対象に長期投与試験を行った。1 年間観察しえた 62 例のうち、37 例 59.8% が 4 週目までに UPDRS でなんらかの改善を示し、そのほとんどは 16 週目にさらに改善し、16 週目に始めて改善した患者を含め 85% が 16 週までに症状改善を示した。しかもその後も経過とともにやや改善する傾向を認めた。これまでの進行例を対象とした抗 PD 薬の治験の報告では海外からのものも含めいづれも 6 ヶ月後以降は効果が減弱している。進行例における ZNS のこの結果はこれまでの本研究班での基礎研究で明らかになった神経保護作用の臨床効果を示唆していると考えられた。平均 ZNS 投与量は 48.4mg/d で、主な副作用は傾眠 10.9%(22/92)、気力低下 10.9%(22/92)、悪心 9.8%(9/92) 食欲減退 9.8%(9/92)、うつ病 8.7%(8/92)、ジスチリア 7.6%(7/92)、幻覚 7.6%(7/92) であった。有害事象の発現時期は比較的初期に多く、長期投与でとくに増加する傾向はなかった。

### 2) ZNS の抗パーキンソン効果の作用機序

野元は昨年度ラットを用いたマイクロダイアリシス法により、ZNS が線条体においてドパミン取り込み阻害 and/or ドパミン代謝抑制作用によるものであることを見出した。ZNS はすでに MAOB 阻害作用をもつことを明らかにしたが、マーモセットではサルに比較

して、線条体における MAOB 量は少ない。以上から、ZNS と選択的 MAOB 阻害剤である selegiline との作用の違いを明らかにするために、マーモセットとラットでの細胞外ドパミン量の変化について検討した。祖 0 の結果、selegiline ではコモンマーモセットではドパミン量が増加したが、ラットでは全く増加しなかったのに対し、ZNS は両者ともに明らかなドパミンの増加を認め、selegiline とは異なる機序でドパミン代謝に作用していることを明らかにした。なお、これは *in vitro* での MAO 阻害活性実験において、ZNS はドパミンを基質としたときに最も高い MAO 阻害活性を示すという基質特異性をもつことと関連すると考えられた。

一方、南部は生理学的に ZNS の作用機序を明らかにするために、サルのパーキンソンモデルを用いて大脳基底核のニューロン活動と臨床症状を調べた。正常の淡蒼球ニューロンはバースト発射や発振活動はほとんどないが、PD モデルサルでは著明に増加している。ZNS は淡蒼球のこれら異常神経活動や大脳皮質刺激に対する応答様式を正常化する傾向にあることを明らかにした。これらの結果は ZNS が単独で脳内神経回路網の正常化に作用することを示している。また、淡蒼球のバースト発射や発振活動が振戦の原因であることが強く示唆されており、ZNS が PD の振戦のみならず本態性振戦などに効果を示すことの機序を示している可能性がある。

### 3) ZNS の神経保護作用についての検討

服部は ZNS の *in vitro* での確認と細胞内伝達シグナルに対する作用を明らかにするために、まず、500 nM retinoic acid で分化誘導した SHSY-5Y 細胞を用いて、5 $\mu$ M dopamine HCl 及び 50 $\mu$ M MPP+による細胞毒性にたいする 500nM, 1mM ZNS の効果を MTT assay にて検討した。その結果、ZNS は dopamine 及び MPP+による神経毒性に対し著明な神経保護作用を示した。さらに Western blot により ZNS 添加後の細胞内蛋白解析を行ったところ、parkin, DJ-1 については変化を認めなかったが、細胞の生存を制御する PTEN については活性型のリン酸化

PTEN 蛋白量を増加させることを明らかにした。今後この意味づけ、細胞生存維持における ZNS の細胞内伝達機構における作用について明らかにしていく必要がある。

浅沼は前年度までに ZNS が脳内グルタチオン増加作用と in vitro でドパミン自動酸化系でのキノン体のメラニンへの速やかな変換能をもつこと、PD モデル動物に L-dopa 投与にて惹起されるキノン体生成の増加を ZNS 同時投与によりほぼ完全に抑制できることを見出し、小胞体外細胞質内の過剰ドパミン、L-dopa によるキノン体毒性に対し ZNS が保護的に作用することを明らかにした。この結果を基に今年度はこの保護作用の発現メカニズムを明らかにするために、ドパミン含有培養神経細胞、パーキンソン病モデルマウスを用いて、ZNS のドパミンキノン還元酵素 NQO-1 の発現、及びこの発現に関与する転写因子 Nrf2、グルタチオン合成酵素 (GCL) の蛋白および mRNA の発現、GCL 阻害剤の効果などについて検討した。その結果、ZNS 投与により、NQO-1 はむしろ減少し、Nrf2、GCL の発現は影響されず、GCL 阻害薬によっても ZNS の保護効果は影響されなかった。以上から、ZNS の L-dopa 誘発キノン体毒性に対する保護・抑制効果はその脳内グルタチオン増加作用やキノン対消去系因子への賦活作用に基づく可能性は低く、むしろ、小胞外細胞質内の過剰ドパミン、L-dopa に対する安定なメラニンへの変換能が関与していると考えられた。近年開発が進んでいるドパミン系薬剤や、ドパミン産生神経幹細胞の臨床応用において、効果が期待される一方、細胞内過剰ドパミンをどのように制御するかという点が最も危惧されていることを考慮すると、本研究の結果は現有または今後開発されるドパミン系薬剤の副作用の防止にも ZNS が役立つことを示唆しているといえる。

#### 4) オーダーメイド医療に向けて

今後、オーダーメイド医療の確立をめざし、SNP 検索を含めた解析により、ZNS の効果の出現しやすい症例についての特徴付けを進める予定である。このために戸田は多数の候補遺伝子 SNP による関連解析をより経済的かつ時間を節約して進めるために、

pooled DNA 法による、高速タイピングの系を確立し、これと invader 法を用いて、孤発性 PD 感受性遺伝子の検索を行い、 $\alpha$ -synuclein (SNCA) 遺伝子の intron 4 上に存在する SNP0070 に  $p=5.0 \times 10^{-10}$  という極めて高い関連を見出した。さらに剖検脳前頭葉での SNCA 発現レベルは PD 関連アレルの数と正の相関を持つ傾向にあることを見出した。また、このほかに数個の疾患感受性遺伝子を現在解析中である。

村田は ZNS 投与患者の協力を得て、DNA 抽出と効果の解析を進めており、現在までに約 100 例のサンプル収集を終えている。今後、150 例を目標に収集し、SNCA をはじめとした疾患感受性遺伝子 SNP 及び、その他の ZNS の薬効に関与すると考えられる SNP について検討し、テーラーメイド化を目指す。

#### 5) ZNS のパーキンソン病関連病態に対する効果

近藤はこれまでに ZNS が PD の振戦のみならず本態性振戦にも効果があることを示した。今年度は L-dopa 無効のすくみ足がリズム形成障害であり、反復動作のリズムが PD の振戦サイクルに収斂することがすくみ現象であるという仮説に基づき、ZNS の L-dopa 無効のすくみ足への効果を UPDRS および Freezing of Gait Questionnaire (FOGQ) にて評価した。進行性核上性麻痺 (PSP)、純粋無動症 (PA)、治療抵抗性 PD、脳血管性パーキンソニズムを対象とした。このうち、PSP (2/5)、PA (1/2) に自覚的な改善が、PSP2 例では FOGQ で 30%以上の改善を認めた。この結果から ZNS のドパミン系以外の効果発現機序が示唆された。これには本研究で南部らが示した、ZNS の淡蒼球の神経活動の正常化作用が関与している可能性がある。

(倫理面への配慮)

1) 研究対象者に対する人権擁護の問題、インフォームドコンセントなどについては十分配慮し、臨床研究、ヒトゲノム・遺伝子解析研究のそれぞれの倫理指針に基づき、各研究施設の倫理委員会の承認のもとに行った。

2) 動物実感においては動物愛護に十分配慮

し、各研究施設の動物実験の指針に沿って行った。

### C. 結論

今年度は昨年までの成果をもとに ZNS の臨床効果、作用機序、神経保護作用、パーキンソン病以外の病態への応用、オーダーメイド医療確立に向けたタイピングなど ZNS の適正な使用のために多角的な研究を展開した。臨床効果は約 100 名での 1 年間の評価にて ZNS の抗 PD 効果はこれまでの薬剤とことなり 6 ヶ月以上改善した効果を持続できることのみならず、1 年後まで、経過とともにより改善する傾向があることを明らかにした。これは本研究で明らかにしてきた ZNS の神経保護作用の臨床効果を示唆しているものと考えられる。

作用機序としては新たに ZNS 単独で PD モデルサルの淡蒼球の神経活動パターンの正常化に作用することを明らかにした。これは ZNS 単独での効果を裏付けるほか、本研究班で明らかにしてきた L-dopa 抵抗性の振戦、すくみ足などへの ZNS の効果の作用発現機序を示している可能性が高い。また、線条体での細胞外ドパミン量増加作用について、同様の作用をもつ特異的 MAOB 阻害剤である selegiline とは異なる作用機序であることを明らかにした。

神経保護作用については、ZNS が dopamine HCl, MPP+ に対してドパミン含有細胞で著明な神経保護作用を示すこと、さらにこのとき、細胞の生存を制御する活性型のリン酸化 PTEN 蛋白量を増加させることを明らかにした。また、ZNS は小胞外細胞質内の過剰ドパミン、L-dopa を速やかに安定なメラニンに変換することにより、治療中の小胞体外細胞質内の過剰ドパミン、L-dopa 治療によるキノン体毒性に対し保護的に作用することを明らかにした。

オーダーメイド治療を視野に入れた ZNS の効果と関連遺伝子 SNP との解析については、サンプル数が不十分で解析にはいたらなかったが、実験系を確立し、PD 疾患感受性遺伝子として  $\alpha$ -synuclein 遺伝子多型を明らかにした。今後これらの遺伝子の SNP について解析を進める予定である。

### D. 研究発表

#### 1. 論文発表

別紙記載

#### 2. 学会発表

別紙記載

### E. 知的所有権取得状況

#### 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

## II 分 担 報 告 書



## ゾニサミドの長期効果と神経保護作用

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

研究要旨：ゾニサミドの抗パーキンソン作用についてはこの3年間でほぼ確立したと考えられるが、そのような作用が長期に持続するかどうかについて、検討した。自験12例については3年間の長期効果をすでに見ているが、今回平均罹患期間約9年、平均年齢64.3歳の約100例について、1年間にわたり抗パーキンソン作用及び副作用について評価した。その結果、投与4週後から有意な改善を認め、1年後まで効果は持続し、しかも経過とともにより改善する傾向にあった。進行例での長期改善効果は、これまでの基礎実験から示されたゾニサミドの神経保護作用を臨床的に示唆したものと考えられた。

### A. 研究目的

ゾニサミド(ZNS)の抗パーキンソン作用の長期効果について、検討し、神経保護効果を期待できるかどうかを検証する。

### B. 方法

ZNSの抗パーキンソン病薬としての承認申請のための治験の一環として、主任研究者が医学専門家としてかわり、長期投与試験を行った。さらにその結果について、併用薬物量の変化と長期効果との関連、などについて、詳細に評価を行った。

対象患者はL-dopa治療でwearing-off、dyskinesiaなど治療上の問題点のあるパーキンソン病患者で、ZNS投与量は25-100mg/d(朝食後1回投与)で適宜増減とした。投与前、投与後4, 16, 28, 40, 52-56週後にそれぞれ、Yahr重症度、UPDRS、臨床所見などを評価した。

### C. 研究結果

#### 1. 対象

平均年齢64.3歳、平均罹患期間104ヶ月、平均UPDRS 37.6、開始時平均Yahr重症度(on/off: 2.4/3.3)の92例について、長期投与を開始した。中止例は30例で投与開始4週までに9例、12週までに17例と約60%が投与12週までに中止された。中止例の原因は症状悪化、あるいは有害事象の出現が12例、対象外であることが判明したものが3例、残りは充

分な効果がえられなかったためと思われる、本人あるいは家族からの中止の申し出によるものであった。

#### 2. 臨床効果

平均ZNS投与量は48.4mg/d。UPDRS II on, II off, III, はいずれも投与前に比較して投与4週後から有意に改善( $p < 0.001$ )し、しかも経過とともにより改善する傾向にあった。また、wearing-off, dyskinesiaなどを評価するpart IVについても28週後以降有意に改善( $p = 0.033-0.004$ )し、これも同様に経過とともにより改善する傾向にあった。

症状の改善が充分でない例が脱落し、よいものだけが残るために、相対的に経過とともに改善するようにみえる可能性を考慮し、52週以上継続しえた62例のみについて、同様の解析を行った。しかし、結果は同様に経過とともに改善する傾向を確認できた。

なお、この間にL-dopaなどの抗PD薬の増量は1例のみである。また、dyskinesia増強のために抗PD薬を減量した症例は8例であった。

52週以上継続しえた症例の症状改善の時間経過を検討したところ、4週目ですでにUPDRSのなんらかの項目で改善を示した患者が37例(59.7%)、16週目の評価で始めて改善した患者が16例(25.8%)で16週までに85%が改善していた。

また、4週目に改善を認めた患者のほとんどが16週後にさらに改善していた。少数ながら28週、40週後に始めて効果を認めた患者もいた。なお、脱落例を含めた92例中、75%に症状改善を認めた。

### 3. 安全性

主な副作用は 傾眠 10.9%(22/92)、気力低下 10.9%(22/92)、悪心 9.8%(9/92) 食欲減退 9.8%(9/92)、うつ病 8.7%(8/92)、ジスレギア 7.6%(7/92)、幻覚 7.6%(7/92)であった。有害事象の発現時期は比較的初期に多く、長期投与でとくに増加する傾向はなかった。

### D. 考察

長期効果については、昨年度、自験例12例で、3-5年間の経過を報告した。このなかで、ZNS 投与開始直後に著明に改善し、その後さらに1-1.5年後までより改善する症例を認めた。これについては、本来進行性の疾患であるPDのしかも進行例においては、ある薬剤を付加したことにより1年後に、より改善するということは通常考えにくく、これまでの抗PD薬の治験でも通常投与6ヶ月以降には症状は緩徐に増悪しており、1年後までより改善するという結果の報告はなかった。これらをかながみ、しかも少数例での結果であったため、考察は効果が持続するというのみにとどめた。

しかし、今回の研究では、ZNSのPD症状改善効果は持続するのみでなく、1年後まで、より改善する傾向にあることを確認した。この結果は、これまでに本研究班の班員が基礎実験で示してきた、ZNSの神経保護作用を臨床的に示唆する所見と考えられる。今後、ZNSの神経保護効果について、臨床的により明らかにし、PDの初期治療のあり方について提言できるエビデンスを構築していく必要がある。

また、症状改善の経過は52週以上観察しえた症例では4週後にすでに60%（4週後に評価しえた83例中54.2%）が改善し、そのほとんどが16週後にはさらに改善していた。また、16週後に始めて症状改善を認めた患者を含めると約85%が16週の時点でなんらかの症状改善を認めていた。

### E. 結論

ZNSの抗PD効果の初出は4週後までに60%、16週までに85%であった。有害事象は出現する場合は比較的早く、経過とともに増加する傾向はなかった。

1年間の継続投与により、PD症状の明らかな改善効果は持続し、しかも1年後まで経過とともにより改善する傾向にあった。この結果はこれまでの抗PD薬では認められていない現象であり、基礎研究から得られたZNSの神経保護作用を臨床的に示唆する所見と考えられた。今後、ZNSの神経保護効果について、臨床的により明らかにし、PDの初期治療のあり方について提言できるエビデンスを構築していく必要がある。

### F. 研究発表

#### 1. 主な論文発表

- Mizuta I, Satake W, Nakabayashi Y, Ito C, Suzuki S, Momose Y, Nagai Y, Oka A, Inoko H, Fukae J, Saito Y, Sawabe M, Murayama S, Yamamoto M, Hattori N, Murata M, Toda T. Multiple candidate gene analysis identifies {alpha}-synuclein as a susceptibility gene for sporadic Parkinson's disease. Hum Mol Genet 2006; 15:1151-1158
- Wang YL, Lui W, Wada E, Murata M, Wada K, Kanazawa I. Clinico-pathological rescue of a model mouse of Huntington's disease by siRNA. Neurosci Res 2005; 53: 241-249
- 村田美穂. :パーキンソン病の診断基準・病型分類・重症度 内科疾患の診断基準・病型分類・重症度. 内科 2005; 95(6) : 1531-1536.
- 村田美穂. :今日のパーキンソン病の診療—パーキンソン病治療のポイント—パーキンソン病治療ガイドラインとtailor made 治療. Modern Physician 2005; 25(8) : 941-944.

2. 主な学会発表

1. Murata M. Zonisamide improves motor function in Parkinsonian patients: A nation-wide, double-blind, placebo-controlled trial. 16<sup>th</sup> International Congress on Parkinson's Disease and Related Disorders Berlin (Germany) 2005, June.
2. 佐竹 渉, 廣田勇二, 百瀬義雄, 水田依久子, 田宮 元, 猪子序英俊, 佐古田三郎, 山本光利, 服部信孝, 村田美穂, 戸田達史. : マイクロサテライト多型による孤発性パーキンソン病のゲノムワイド関連解析 第46回日本神経学会総会・鹿児島 2005年5月

G. 知的所有権取得状況

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

## ゾニサミドの L-DOPA 誘発キノン体毒性に対する保護効果の発現メカニズム

分担研究者： 浅沼 幹人

岡山大学大学院医歯学総合研究科脳神経制御学講座神経情報学 助教授

研究協力者： 宮崎育子，小川紀雄

岡山大学大学院医歯学総合研究科脳神経制御学講座神経情報学

### 研究要旨

前年度までにゾニサミドが脳内グルタチオン増加作用と *in vitro* のドパミン，L-DOPA 自動酸化系でのキノン体のメラニンへの速やかな変換能を有していること，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生成の増加に対して，ゾニサミド同時投与が強力な抑制効果を有することを見だし，小胞外細胞質内の過剰ドパミン，L-DOPA によるキノン体毒性に対しゾニサミドが保護的に作用することを明らかにした。そこで，その保護効果の発現メカニズムを明らかにする目的で，ドパミン含有神経細胞およびパーキンソン病モデルマウスを用いて，ゾニサミドのキノン消去系諸因子，グルタチオン関連酵素への作用について検討した。培養ドパミン系細胞へのゾニサミドの 5 日間持続添加により，細胞内ドパミンの有意な減少とそれに並行したキノン蛋白結合体（キノプロテイン）量の減少，ドパミン・DOPA クロムの増加が認められた。小胞外細胞質内のフリーのドパミンを増加させた状態においても，ゾニサミド同時添加によりキノン生成は有意に抑制された。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ドパミンキノン還元酵素 NQO1 の発現量は，ゾニサミド同時投与によりむしろ完全に抑制された。NQO-1 の発現をプロモートする転写因子 Nrf2 の発現量もゾニサミド投与により影響されなかった。ドパミン含有細胞やパーキンソン病モデル線条体におけるグルタチオン合成酵素 GCL の蛋白および mRNA 発現は，ゾニサミド添加・投与により影響されなかった。さらに，ゾニサミド原末添加によるキノプロテイン量の減少は，GCL 阻害薬 BSO 同時添加によって全く影響されなかった。また，ゾニサミド原末もドパミン，L-DOPA のドパミン・DOPA クロムへの変換を増強させた。以上の結果から，ゾニサミドの L-DOPA 誘発キノン体毒性に対する保護・抑制効果は，その脳内グルタチオン増加作用やキノン体消去系因子への賦活作用に基づく可能性は低く，むしろ小胞外細胞質内の過剰ドパミン，L-DOPA に対する安定なメラニンへの変換能が関与している可能性が考えられた。また，ゾニサミドの脳内グルタチオン増加作用は，グルタチオンの代謝抑制作用に基づく可能性が示唆された。

### A. 研究目的

L-DOPA およびドパミンは細胞質のシナプス小胞外で過剰となった場合，自動酸化によりキノン体を生成し機能蛋白とシステイ

ニル化合物を形成して，あるいはクロム体からラジカル体を生成して，細胞障害性に働く。このような L-DOPA およびドパミンの神経毒性は，グルタチオンなどのキノン消

去系諸因子により抑制される。本研究では、細胞質過剰ドパミンによるキノン体生成を介した神経障害機構に対するゾニサミドの効果について検討した。一昨年度は、ゾニサミドの脳内グルタチオンへの作用とドパミン自動酸化への効果について検討し、ゾニサミド連日投与により大脳基底核のグルタチオン量が増加すること、さらにゾニサミドNa塩はin vitroのドパミン、L-DOPA自動酸化系においてキノン体を速やかにメラニンへと変換する作用を有することを見いだした。また、昨年度は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生成の増加に対して、ゾニサミドの同時投与が強力な抑制効果を有することを見いだした。これらより、小胞外細胞質内の過剰ドパミン、L-DOPAによるキノン体生成を介した神経毒性に対してゾニサミドが保護効果を有している可能性が考えられた。

このL-DOPA誘発キノン体毒性に対するゾニサミドの保護・抑制効果のメカニズムについては、①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、②ゾニサミドの著明な大脳基底核グルタチオン増加作用のいずれかあるいは両者に基づくか、あるいは③ゾニサミドがキノン還元酵素あるいはその発現をプロモートする転写因子などキノン体消去系諸因子への賦活作用を有する可能性もあると考えられた。そこで、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するゾニサミドの保護効果の発現メカニズムを明らかにする目的で、ドパミン含有神経細胞およびパーキンソン病モデルマウスを用いて、ゾニサミドのキノン消去系諸因子、グルタチオン関連酵素への作用について、キノン蛋白結合体(キノプロテイン)ならびにキノン消去系諸因子とグルタチオン関連酵素の蛋白およびそれらのmRNAを指標として検討した。また、in vitroのドパミン、L-DOPA自動酸化系へのゾニサミド原末の作用についても検討した。

## B. 研究方法

### 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およびキノン体消去系諸因子への作用

片側線条体に6-hydroxydopamine (6-OHDA)を注入し作製した片側パーキンソン病モデルICRマウスを用いて、アポモルフイン誘発回旋運動を確認の後、L-DOPA/carbidopa (50/5 mg/kg, i.p.)およびゾニサミドNa (30 mg/kg, i.p.)を7日間連日投与し、投与終了1日後に線条体組織をとりだし、線条体のキノプロテイン量をNBT-glycinate法(Paz, 1991)で測定した。また、線条体のグルタチオン量も測定した。ドパミンキノン還元・消去するNADPH:quinone oxidoreductase 1 (NQO1)、その発現をプロモートする転写因子Nrf2、グルタチオン合成酵素glutamate cysteine ligase (GCL=  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase)およびグルタチオン抱合酵素glutamyl-S-transferase (GST)の蛋白・mRNAの変化をWestern blot法、RT-PCR法で解析した。

### 2. ドパミン含有神経細胞でのキノン体生成へのゾニサミドの作用

マウス由来ドパミン含有細胞CATH.a細胞( $1.0 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup>)を用いて、継代24時間後に、ゾニサミド原末(最終濃度1-100  $\mu$ M)を添加し、1, 5日間培養し、キノプロテイン量を測定し、ドパミン・DOPAクロムを1% Triton X-100による抽出液の吸光度(A475)測定により、ドパミン、DOPAC, HVA濃度をHPLCで、GCL蛋白の変化をWestern blot法でそれぞれ測定した。また、ゾニサミド原末添加(最終濃度1-100  $\mu$ M, 1, 5日間)によるキノプロテイン量の変化に対するグルタチオン合成酵素GCL阻害薬BSO (5, 10  $\mu$ M)の同時添加の効果についても検討した。さらに、チロシン水酸化酵素(TH)によるL-DOPA生成を高めるtetrahydrobiopterin (BH4: 100  $\mu$ M)と小胞モノアミントランスポーター(VMAT2)阻害薬ケタンセリン (10  $\mu$ M)のゾニサミドとの同

時添加のキノプロテイン量に対する効果についても検討した。

### 3. in vitro のドパミン, L-DOPA 自動酸化系へのゾニサミド原末の効果

ドパミン, L-DOPA (1 mM) にゾニサミド原末(最終濃度 200  $\mu$ M) を in vitro で加え(反応系 pH 7), 経時的にドパミン・DOPA クロム生成量を吸光度(A475)測定により定量した。

## 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およびキノン体消去系諸因子への作用

パーキンソンモデルマウスへの L-DOPA 7 日間連日投与(50 mg/kg, i. p.) による障害側線条体でのキノプロテインの著明な増加はゾニサミドの同時投与(30 mg/kg, i. p.) 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。

また, グルタチオン関連酵素やキノン還元酵素などのキノン消去系諸因子の変化についても検討した。グルタチオン合成酵素 GCL の catalytic subunit の mRNA の線条体での発現はゾニサミド投与により変化は認められなかった。障害側線条体で L-DOPA 連日投与により増加していた NQO1 の発現増加は, ゾニサミド同時投与でむしろ抑制された。また, NQO1 発現をプロモートする転写因子 Nrf2 の mRNA の線条体での発現は, ゾニサミド投与により不変であった。GST 蛋白発現は L-DOPA とゾニサミドの連日投与群の障害側線条体において著明に低下していた。

### 2. ドパミン含有神経細胞でのキノン体生成へのゾニサミドの作用

ドパミン含有細胞 CATH. a 細胞にゾニサミドを持続添加したところ, 1 日目にドパミン, DOPAC 濃度の増加傾向が認められたが, HVA およびドパミン代謝回転は不変であった。また, ドパミンの増加に一致してキノプロテイン量の有意な増加が認められた。さらにゾニサミド持続添加 5 日目では, 逆にゾニサミド濃度依存的な細胞内ドパミンの有意

な減少が認められ, DOPAC, HVA は不変であった。この時, ドパミンの減少に一致してキノプロテイン量の有意な減少が認められ, ドパミン・DOPA クロムは増加していた。ゾニサミド持続添加(6 時間, 1 日間, 5 日間)により GCL 蛋白発現は不変であった。ゾニサミド原末添加による 1, 5 日目におけるキノプロテイン量の変化に対して, グルタチオン合成酵素 GCL 阻害薬 BSO 同時添加は全く影響しなかった。

BH4 (100  $\mu$ M) とケタンセリン (10  $\mu$ M) のゾニサミドとの同時添加を行うと, ゾニサミド濃度依存的にキノプロテイン量の減少が認められた。

### 3. in vitro のドパミン, L-DOPA 自動酸化系へのゾニサミドの効果

ドパミン, L-DOPA (1 mM) にゾニサミド原末(200  $\mu$ M) を加えると, 30 分後~3 時間後にゾニサミド非添加群に比してドパミン・DOPA クロム生成量の有意な増加が認められた。

## 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認められるキノプロテインの増加が, ゾニサミドの同時投与によりほぼ完全に抑制されることを昨年度見出した。また, 本年度の培養ドパミン神経細胞を用いた検討においても, BH4 とケタンセリン添加により小胞外細胞質内のフリーのドパミンを増加させドパミンキノン体生成を高めた状態においては, ゾニサミド添加がキノン体を減少させることを見出した。これらの結果より, ゾニサミドが小胞外細胞質の過剰ドパミン, L-DOPA によるキノン体生成・神経毒性に対して保護・抑制効果を発揮することを明らかにできた。

この L-DOPA 誘発キノン体毒性に対するゾニサミドの保護・抑制効果のメカニズムについては, 昨年までの研究で明らかになったように, ①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, ②ゾニサミドの著明な大脳基底核グルタチオン増加作用のいずれかあるいは両者に基づく

か、あるいは③ゾニサミドがキノン還元酵素 NQO1 あるいはその発現をプロモートする転写因子 Nrf2 などのキノン体消去系諸因子への賦活作用を有する可能性もあると考えられた。

そこで、キノン還元酵素 NQO1 などのキノン消去系諸因子の変化についても検討したところ、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なくむしろ完全に抑制された。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。また、Nrf2 の発現量もゾニサミド投与により影響されなかった。これらの結果からは、ゾニサミドがキノン体消去系因子への賦活作用を有する可能性は低いと考えられる。今後、NQO1 活性自体への影響について検討する必要がある。

また、ゾニサミドの脳基底核グルタチオン増加作用のメカニズムについて検討した。グルタチオン合成酵素 GCL の mRNA のパーキンソン病モデル線条体での発現は、ゾニサミド投与により影響されず、ドパミン含有細胞 CATH. a へのゾニサミド添加によっても GCL 蛋白発現は不変であった。しかし、グルタチオンを蛋白に抱合させる GST の蛋白発現は、パーキンソン病モデルへの L-DOPA とゾニサミドの連日投与群の障害側線条体において著明に低下していたことから、ゾニサミド連日投与による脳基底核のグルタチオン増加は、グルタチオンの代謝抑制作用に基づく可能性が示唆された。今後、グルタチオンを分解する  $\gamma$

-glutamyltranspeptidase や GST (グルタチオン抱合酵素) の酵素活性へのゾニサミドの作用について、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必要がある。さらに、グルタチオン合成酵素 GCL 阻害薬 BSO 同時添加によっても、ゾニサミド原末添加による 1, 5 日目におけるキノプロテ

ン量の増加・減少は全く影響されなかったことから、ゾニサミドの L-DOPA 誘発キノン体毒性に対する保護・抑制効果はその脳内グルタチオン増加作用に基づくものではないと考えられる。

培養ドパミン系細胞へのゾニサミドの 5 日間持続添加によっても、パーキンソン病モデルでの結果と同様に、ゾニサミドの濃度依存的な DOPAC, HVA の増加を伴わない細胞内ドパミンの有意な減少とそれに並行したキノプロテイン量の減少、ドパミン・DOPA クロムの増加が認められた。これは、ゾニサミドによるドパミンのメラニンへの変換を示唆しているのかもしれない。さらに、培養ドパミン系細胞において、BH4 とケタンセリンにより L-DOPA 生成を高めドパミンの小胞内への取り込みを阻害し、小胞外細胞質内のフリーのドパミンを増加させると、ゾニサミド同時添加によりキノン生成は有意に抑制された。これは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の抑制効果に合致する。また、ゾニサミド Na 塩だけでなくゾニサミド原末もドパミン、L-DOPA のドパミン・DOPA クロムへの変換を増強させた。これらの結果から、L-DOPA 誘発キノン体毒性に対するゾニサミドの保護・抑制効果には、小胞外細胞質内の過剰ドパミン、L-DOPA に対する安定なメラニンへの変換能が関与している可能性が示唆された。RI・蛍光標識ドパミンとゾニサミドとの相互作用について解析することにより、その作用様式が解明できると考えられる。

また、培養ドパミン系細胞へのゾニサミドの短期間添加 (1 日間; SH-SY5Y 細胞での TH 発現増加の際の添加時間) により TH の活性亢進を示唆する一次的なドパミン、DOPAC 濃度の増加傾向がみられたこと、マウスへのゾニサミド前投与により 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 (昨年度) ことは、ゾニサミドが TH への活性化作用を有することとも合致する。しかし、効果が一次的であり、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。

いずれにしても、パーキンソン病モデルへのL-DOPA連日投与あるいは培養ドパミン神経細胞へのBH4とケタンセリン添加に代表される小胞外細胞質の過剰ドパミン、L-DOPAによるキノン体生成および神経毒性を抑制・阻止し、さらに抗酸化にはたらくグルタチオン量を増加させ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の長期投与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。

今後、ドパミンとゾニサミドとの相互作用についてのさらなる解析を行い、 $\gamma$ -glutamyltranspeptidase, GST, GCLなどのグルタチオン関連酵素やNQO1の酵素活性自体へのゾニサミドの作用について、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し、ゾニサミドのL-DOPA誘発キノン体毒性に対する保護・抑制効果ならびに脳内グルタチオン増加作用のメカニズムを解明する必要がある。これにより、ゾニサミドの効果発現の条件、相互作用因子、補助因子などを明らかにできると考えられる。

## E. 結論

小胞外細胞質の過剰ドパミン、L-DOPAによるキノン体生成および神経毒性に対するゾニサミドの保護・抑制効果は、その脳内グルタチオン増加作用やキノン体消去系因子への賦活作用に基づく可能性は低く、むしろ小胞外細胞質内の過剰ドパミン、L-DOPAに対する安定なメラニンへの変換能が関与している可能性が考えられた。

## 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., 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*, 133: 117-135, 2005.

- ② Machida, Y., Chiba, T., Takayanagi, A., Tanaka, Y., Asanuma, M., Ogawa, N., Koyama, A., Iwatsubo, T., Ito, S., Jansen, P.H., Shimizu, N., Tanaka, K., Mizuno, Y. and Hattori, N.: Common anti-apoptotic roles of parkin and  $\alpha$ -synuclein in human dopaminergic cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 332: 233-240, 2005.
- ③ 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.*, 27: 533-539, 2005.
- ④ Miyazaki, I., Asanuma, M., Diaz-Corrales, F.J., Miyoshi, K. and Ogawa, N.: Dopamine agonist pergolide prevents levodopa-induced quinoprotein formation in parkinsonian striatum and shows quenching effects on dopamine-semiquinone generated in vitro. *Clin. Neuropharmacol.*, 28: 155-160, 2005.
- ⑤ Ogawa, A., Nakamura, K., Matsubara, H., Fujio, H., Ikeda, T., Kobayashi, K., Miyazaki, I., Asanuma, M., Miyaji, K., Kusano, F., Date, H. and Ohe, T.: Prednisolone inhibits proliferation of cultured pulmonary artery smooth muscle cells of patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Circulation*, 112: 1806-1812, 2005.
- ⑥ Diaz-Corrales, F.J., Asanuma, M., Miyazaki, I., Miyoshi, K. and Ogawa, N.: Centrosome overduplication induced by rotenone treatment affects the cellular distribution of p53 tumor suppressor protein in the neuroblastoma B65 cell line. *Psychiat. Clin. Neurosci.*, 60: S26-34, 2006.
- ⑦ Miyazaki, I., Asanuma, M., Diaz-Corrales, F.J., Fukuda, M., Kitaichi, K., Miyoshi, K. and Ogawa, N.: Methamphetamine-induced



dopaminergic neurotoxicity is regulated by quinone formation-related molecules. *FASEB J.*, 10.1096/fj.05-4996fje. Published online January 10, 2006.

- ⑧ Ogawa, N., Asanuma, M., Miyazaki, I., Diaz-Corrales, F.J. and Miyoshi, K.: L-DOPA treatment from the viewpoint of neuroprotection: Possible mechanism of specific and progressive dopaminergic neuronal death in Parkinson's disease. *J. Neurol.*, 252 (Suppl 4): iv23-iv31, 2005.
- ⑨ 浅沼幹人, 宮崎育子: 薬物依存・毒性発現にかかわる分子の分子生物学的検索法—網羅的プロファイリングを中心に. *日本薬理学雑誌*, 126: 30-34, 2005.
- ⑩ 浅沼幹人: ドパミン受容体アゴニストによるドパミンニューロン死の制御. *Clinical Neuroscience*, 23: 1342-1343, 2005.
- ⑪ 浅沼幹人, 小川紀雄: 酸化ストレスによる神経障害と神経保護療法—ドパミン神経特異的酸化ストレスとしてのキノン体毒性. *医学のあゆみ*, 215: 785-792, 2005.
- ## 2. 学会等発表
- ① Ogawa, N., Asanuma, M., Miyazaki, I. and Diaz-Corrales, F.J.: Dopamine agonist pergolide prevents levodopa-induced quinoprotein formation in parkinsonian striatum and shows quenching effects on dopamine-semiquinone generated in vitro. 9th International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders, New Orleans, 2005, 3, 7.
- ② Francisco J. Diaz-Corrales, 浅沼幹人, 宮崎育子, 三好 耕, 小川紀雄: ロテノンのドパミン神経毒性における中心体-微小管構成異常の関与. 第13回カテコールアミンと神経疾患研究会, 東京, 2005, 4, 23.
- ③ 浅沼幹人, 宮崎育子, 小川紀雄: パーキンソン病モデル線条体に特異的な L-DOPA 誘発キノン体生成. 第46回日本神経学会総会, 鹿児島, 2005, 5, 26.
- ④ 宮崎育子, 浅沼幹人, 小川紀雄: 過剰ドパミンおよびメタンフェタミン誘発ドパミン神経障害における共通因子としてのキノン体生成. 第32回日本脳科学会, 千葉, 2005, 6, 3.
- ⑤ 浅沼幹人, 宮崎育子, 小川紀雄: ドパミン神経特異的酸化ストレスとしてのドパミンキノンに対するシステイン基含有分子の消去作用. 第32回日本脳科学会, 千葉, 2005, 6, 3.
- ⑥ 浅沼幹人: ドパミン神経特異的酸化ストレスとしてのドパミンキノン生成. 第27回日本生物学的精神医学会・第35回日本神経精神薬理学会合同年会, シンポジウム2「ドパミン神経の脆弱性とその保護」, 大阪, 2005, 7, 6.
- ⑦ 宮崎育子, 浅沼幹人, Francisco J. Diaz-Corrales, 三好 耕, 清水雅子, 北市清幸, 小川紀雄: キノン生成体のメタンフェタミン急性ドパミン神経毒性発現における関与. 第27回日本生物学的精神医学会・第35回日本神経精神薬理学会合同年会, 大阪, 2005, 7, 7.
- ⑧ 田中健一, 福原薫子, 浅沼幹人, 小川紀雄: レボドパは6-ヒドロキシドパミン由来の小胞体ストレスを増悪するがドパミンアゴニスト併用は抑制する. 第27回日本生物学的精神医学会・第35回日本神経精神薬理学会合同年会, 大阪, 2005, 7, 7.
- ⑨ Francisco J. Diaz-Corrales, Masao Asanuma, Ikuko Miyazaki, Ko Miyoshi and Norio Ogawa: Aggregation of proteins in the centrosome and its importance in the neurodegenerative process. 第27回日本生物学的精神医学会・第35回日本神経精神薬理学会合同年会, 大阪, 2005, 7, 8.
- ⑩ 浅沼幹人, 清水雅子, 宮崎育子, Francisco J. Diaz-Corrales, 三好 耕, 小川紀雄: パーキンソン病モデルへの L-DOPA 投与により誘発されるアポトーシス促進因子 PAG608 の運動ニューロンでの特異的発現. 第28回日本神経科学大会, 横浜, 2005, 7, 26.
- ⑪ 三好 耕, 大西一成, 浅沼幹人, 宮崎育

- 子, Francisco J. Diaz-Corrales, 小川紀雄 : 発達期マウスにおける pericentrin の発現解析. 第 28 回日本神経科学大会, 横浜, 2005, 7, 26.
- ⑫ 宮崎育子, 浅沼幹人, Francisco J. Diaz-Corrales, 清水雅子, 三好 耕, 小川紀雄 : メタンフェタミン神経毒性発現におけるキノン生成の関与. 第 28 回日本神経科学大会, 横浜, 2005, 7, 27.
- ⑬ 浅沼幹人, 宮崎育子, 清水雅子, 小川紀雄 : p53 関連アポトーシス促進因子 PAG608 のパーキンソン病モデル線条体での L-DOPA 投与による特異的誘導と脳神経核運動ニューロンでの特異的局在. 第 3 回神経科学研究会, 東京, 2005, 9, 17.
- ⑭ 浅沼幹人, 宮崎育子, Francisco J. Diaz-Corrales, 難波正義, 小川紀雄 : Transplantation of tyrosinase cDNA-transfected hepatocytes into the atriatum of hemi-parkinsonian model. 第 48 回日本神経化学会, 福岡, 2005, 9, 28.
- ⑮ 宮崎育子, 辻 武史, 浅沼幹人, Francisco J. Diaz-Corrales, 三好 耕, 小川紀雄 : Mechanism of protective effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs on methamphetamine-induced neurotoxicity. 第 48 回日本神経化学会, 福岡, 2005, 9, 28.

#### 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

## Levodopa 抵抗性のすくみ足に対する Zonisamide (ZNS)の効果の検討

分担研究者 近藤智善 和歌山県立医科大学教授

L-DOPA 無効のすくみ足は陳旧性パーキンソン病 (PD) にみられるが、その臨床生理学的検討から原因として一種のリズム形成障害があり、反復動作のリズムが PD の振戦サイクルに収束することがすくみ足の現象であるという仮説がある。われわれは ZNS の振戦に有効であることから、すくみ足にも ZNS の効果が期待できると考え、進行性核上性麻痺 (PSP) 5 例、純粋無動症 (PA) 2 例、脳血管性パーキンソニズム 2 例、陳旧性 PD 1 例を対象に ZNS のすくみ足に対する効果の検討を行った。症状変化の評価は Unified Parkinson's Disease Rating Scale (UPDRS), Freezing of Gait Questionnaire (FOGQ) (Gilidi, et al. 2000) を用いて行った。その結果、PSP 2 例、PA 1 例において FOGQ スコアの改善がえられた。ZNS にはドパミン作動性以外の効果発現機序があると考えられた。難治性の症状に対する ZNS の治療的有用性が注目された。

### A. 研究目的

L-DOPA 無効のすくみ足に対する Zonisamide (ZNS)の効果の検討を行う。

### B. 研究方法

L-DOPA 抵抗性のすくみ足をみとめる進行性核上性麻痺 (PSP) 5 例、純粋無動症 (PA) 2 例、経過 16 年ですくみ足が治療抵抗性にみられるパーキンソン病 (PD) 1 例、脳血管性パーキンソニズム 2 例が対象である。ZNS を 100～300 mg/day 投与し、UPDRS, FOGQ のスコアで効果の有無を評価した。

(これらの試験は和歌山医大の倫理委員会の承認を得て行った。)

### C. 研究結果

PSP 2 例、PA 1 例に自覚的改善を得た。UPDRS では 20%以上スコアが変化した症例はなかった。FOGQ では PSP 2 例において 30%以上スコアが低下 (改善) した症例があった。D.

### 健康危険情報

3 症例において、眠気を認めたが、薬剤の中止によって消失し、健康に危険な状況は生じなかった。

### E. 研究発表

#### 1. 論文発表

Morita S, et al: Parkinsonism & related Disord  
11:101-103, 2005

Miwa H, et al: Neurosci Lett 380(1-2):93-98,  
2005

Kodama R, et al.: Genes to Cells 10:1211-1219,  
2005

#### 2. 学会発表

第 24 回日本神経治療学会 (2006 年 7 月) 発表予定

### F. 知的財産権の出願・準備状況

#### 1. 特許出願

なし

#### 2. 実用新案登録

なし

#### 3. その他

なし

パーキンソン病の遺伝子多型と発症リスクおよびゾニサミドの薬剤効果の研究

(分担)研究者 戸田達史<sup>1)</sup>

研究協力者 水田依久子<sup>1)</sup>、佐竹渉<sup>1)</sup>、齊藤祐子<sup>2)</sup>、村山繁雄<sup>2)</sup>、岡晃<sup>3)</sup>、  
猪子英俊<sup>3)</sup>、山本光利<sup>4)</sup>、服部信孝<sup>5)</sup>、村田美穂<sup>6)</sup>

<sup>1)</sup>大阪大学大学院医学系研究科臨床遺伝学、<sup>2)</sup>東京都老人総合研究所脳ゲノム、  
<sup>3)</sup>東海大学分子生命科学2、<sup>4)</sup>香川県立中央病院神経内科、<sup>5)</sup>順天堂大学脳神経内科、  
<sup>6)</sup>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)感受性遺伝子を明らかにするため、121個の候補遺伝子上の計268個のSNPsを関連解析して二段階スクリーニングの結果、*α-synuclein (SNCA)*遺伝子のintron 4上に存在するSNP0070に $p=5.0 \times 10^{-10}$ という極めて強い関連を見出した。SNP0070周辺領域を29個のSNPsを用いて連鎖不平衡解析を行い、SNP0070を含めて6個のSNPsがPDと極めて強い関連( $p=2.0 \times 10^{-9}$ - $1.7 \times 10^{-11}$ )を示した。剖検脳前頭葉でのSNCA発現レベルはPD関連アレルの数と正の相関を持つ傾向があった。SNCAは孤発性PDの確実な感受性遺伝子であり、今後はZonisamideの薬効に影響するSNPなどが、同定されると考えられる。

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とともにZonisamideの薬効に影響するSNPを同定し、テーラーメイド化をめざす。

B.研究方法

PD候補遺伝子上のSNPをInvader法によりタイピングしてカイニ乗検定により関連解析を行う。一次スクリーニングは患者・対照各190人を、二次は患者882人・対照938人対象にした。遺伝子発現レベルの解析は定量RT-PCR法を用いた。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、平成16年12月28日改正)」を遵守し、文書によるインフォームドコンセントを得た。剖検脳は高齢者ブレインバンク(東京都老人医療センター/東京都老人総合研究所)および順天堂大学脳神経内科との共同研究による。

C.研究結果

候補遺伝子121個上の計268個のSNPsから*α-synuclein (SNCA)*遺伝子のintron 4上のSNP0070が $p=5.0 \times 10^{-10}$ という極めて強い関連を見出した。連鎖不平衡解析の結果、SNP0070を含めて6個のSNPsがPDと強く関連していた( $p=2.0 \times 10^{-9}$ - $1.7 \times 10^{-11}$ )。Haplotype関連解析では単独のSNPを下回るp値は見出せなかった。剖検脳前頭葉でのSNCA発現レベルはPD関連アレルの数と正の相関を持つ傾向があった。

D.考察

遺伝統計学的にSNCAは確実にPD感受性遺伝子である。SNCAはPDの病理であるLewy小体に含まれ、高発現がPD発症に関与するという説

が有力である。剖検脳におけるSNCA発現レベル解析の結果はこの説に合致する。

E.結論

SNCAはPDの確実な感受性遺伝子である。今後は数個の疾患感受性遺伝子やZonisamideの薬効に影響するSNPなどが、同定されると考えられ、テーラーメイド化が期待される。

F.健康危険情報

特になし

G.研究発表

1.論文発表

- 1) Nishioka K, et al. Ann Neurol Epub on 2005 Dec 15
- 2) Ishikawa K et al: Am J Hum Genet 77, 280-296, 2005
- 3) Li Y, et al Neurology 64:1955-1957, 2005
- 4) Mizuta I, et al. Hum Mol Genet 15 1151-1158 2006
- 5) Tomiyama H et al: Mov Disord (in press)

2.学会発表

- 1) 日本神経化学会(2005)
- 2) 日本人類遺伝学会(2005)
- 3) アメリカ人類遺伝学会(2005)
- 4) 日本神経学会(2005)
- 5) AD-PD(2005)
- 6) COE国際シンポ(2005)

H.知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

特になし