

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患克服研究事業

新規抗パーキンソン病ゾニサミドの
神経保護作用に関する臨床研究班

平成18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19（2007）年 3月

目 次

I.	主任総括研究報告		
	新規抗パーキンソン病薬ゾニサミドの神経保護作用に関する臨床研究 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		
	ゾニサミドのドパミンキノン毒性に対する保護効果ならびに 脳内グルタミン酸増加作用の発現機序 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	-----	7
	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	-----	12
	プロテアソーム阻害薬投与時のサル行動とドパミン神経細胞の検討 愛媛大学大学院病態治療内科 野元 正弘	-----	13
	Zonisamide の神経保護作用の臨床的評価 国立精神・神経センター武蔵病院神経内科 村田 美穂	-----	16
	新規抗パーキンソン病薬ゾニサミドの神経保護作用に関する臨床研究 -パーキンソン病モデルサルによる検討- 自然科学研究機構生理学研究所 南部 篤	-----	18
	実験的振戦に対する Zonisamide の効果の薬理学的解明 和歌山県立医科大学神経内科 近藤 智善	-----	20
	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	-----	21
	腎不全患者におけるRLSの頻度 国立病院機構相模原病院神経内科 長谷川 一子	-----	22
III.	開催会議	-----	25
IV.	班構成員名簿	-----	27
V.	研究成果の発刊に関する一覧	-----	29

I 総括報告書

新規抗パーキンソン作用薬ゾニサミドの神経保護作用に関する臨床研究

主任研究者 村田美穂 国立精神・神経センター武蔵病院・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、その作用機序の解明を進めるとともに、神経保護作用の実験的検証及び臨床的検証について多面的に研究を進めた。神経保護作用としては、ZNS がパーキンソンモデルマウスの黒質細胞障害に対して有意な保護作用を示すこと、ラット線条体内のGSHを著明に増加させることを明らかにし、さらにその作用機序として、ZNS がグリア細胞のシスチン取り込みに関与している可能性を示した。また、Akt/PTEN系のanti-apoptotic signal pathwayを介しての細胞保護作用も示すことを明らかにした。これらの神経保護作用を臨床的に証明するための方法論の検討を行った。ZNSの4-7年の長期投与では進行例でも良好な効果を維持できており、神経保護作用も期待できる。新たな作用機序として、パーキンソン病で認める淡蒼球、視床下核の異常発火パターンをZNSが正常化すること、ZNSが黒質緻密層の細胞にK電流を介してバーストをおこさせることを明らかにした。また、ドパミン系以外の系による抗振戦作用を明らかにした。Proteasome阻害剤によるコモンマセットのパーキンソン病モデル作成、プールSNP array法の確立などにより、今後の研究の基礎固めを行った。

分担研究者

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

研究のなかで、ZNSが強い神経保護作用をもつことを実験的に明らかにした。ZNSはその抗パーキンソン作用の作用機序も極めて多面的であり、様々な効果を持つことを明らかにしたが、神経保護作用についても現時点までにZNSが脳基底核のグルタミン量を著明に増加させること、パーキンソン病(PD)モデルラットにL-dopaを投与すると惹起されるキノン体生成を強力に抑制すること、培養細胞におけるMPP+毒性及び高濃度ドパミンによる毒性に対し、ZNSが強い保護効果を示すことなどZNSが多面的な神経保護作用を持つことを明らかにしてきた。

A. 研究目的

主任研究者らは臨床経験から日本で開発された抗てんかん薬ゾニサミド(以下ZNS)が抗パーキンソン作用を示すことを発見し、大規模臨床治験を進め、現在抗パーキンソン病薬としての使用申請中である。我々はこの薬剤の効果の確認とともに抗パーキンソン作用の作用機序を解明してきた。この

本研究はこれらの神経保護作用のメカニズムを明らかにすること、この神経保護作用を臨床的に有意なものであることを示す

こと、さらに、これまで明らかにしてきた抗 PD 作用の作用機序を明らかにし、抗 PD 作用及び神経保護作用がより強い新たな日本発の薬剤の開発につなげることを目的にしている。

B. 研究方法・研究結果・考察

1) 神経保護作用の作用機序の解明

① グルタチオン関連

浅沼らはZNSのグルタチオン増加効果の作用機序を明らかにするために、マウス由来ドパミン含有細胞CATHa細胞を用いて、ZNS投与によるグルタチオン増量効果を検討した。また、マウスにZNSを投与し、グルタチオン増加作用を確認するとともにドパミンキノン還元・消去するNADPH:quinone oxidoreductase (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GCL、グルタチオン抱合酵素GSTの蛋白変化をwestern blot法にて解析した。その結果、ZNSはマウスで脳内GSHを強力に増加させるにもかかわらず、線条体でNQO1, Nrf2, GCL, GST発現の増加は認めず、CATHa細胞でもGSH増加を認めなかった。神経細胞はGSH合成に必要なシステイン前駆体のシスチンの取り込み機構を持たないために神経細胞でのGSH合成はアストログリアでのシスチン取り込み、システイン生成に依存している。これらのことから、ZNSがグリア細胞のシスチン取り込み、システイン生成に作用している可能性が示唆された。

さらに浅沼らは6-OHDA注入による片側パーキンソン病モデルマウスに7日間ZNS連日投与を行い、アポモルフィンでの回転運動を確認ののち、L-DOPA / carbidopa (50/5 mg/kg, i. p.) およびZNSNa (30 mg/kg, i. p.) を7日間連日投与し、投与終了1日後に灌流固定し、黒質および線条体のドパミン神経細胞および神経終末の障害について免疫染色で検討した。

その結果、障害側黒質線条体路のDA神経

の脱落は、L-DOPA投与の有無に関わらず、ZNS投与により有意に抑制された。ZNSは6-OHDA注入3週後から投与されており、このZNSの神経保護効果は6-OHDA自体の急性期のキノン化、ラジカル生成に対する抑制効果ではなく、むしろミトコンドリア呼吸鎖障害などによる持続性の酸化ストレスに対する抑制効果に基づくと考えられ、GSH増加作用が関与しているとも考えられる。このようにZNSは毒物投与の長時間かけての細胞障害に対する神経保護作用を示しており、ヒトパーキンソン病の発症後にも効果のある可能性が高いことが明らかになった。

② 抗apoptosis作用

服部らは、レチノイン酸で分化誘導したヒト神経芽細胞種株(SH-SY5Y細胞)を用いて、100uMZNSがdopamine及びMPP+毒性に対し神経保護作用をもつことを見出した。この保護効果の作用機序を明らかにするために、ZNS添加下のSH-SY5Y細胞内発現たんぱく質及びシグナル伝達機構についてSDS-PAGE, Western blot法にて検討した。その結果、ZNS 100uM添加群ではリン酸化PTEN(phosphatase and tensin homolog)たんぱく質の増加及びAkt1, FOXO3A(Forkhead transcription factor)のリン酸化を確認した。PTEN, Akt, FOXO3Aのリン酸化はantiapoptotic pathwayとして知られている。FOXO3AはAkt pathwayの最終機転とされており、ZNSがAkt pathwayの最終機転をリン酸化して不活性化することで細胞死抑制に作用していることが推測された。

③proteasome 関連

野元らはパーキンソン病におけるドパミン神経細胞死にproteasome機能の低下が関与し、proteasome阻害剤投与(PSI)によりげっ歯類では黒質ドパミン神経細胞に変性を生じることが報告されていることに注目し、霊長類でのPSIによるモデルはまだ報告がないことから、コモン・マーモセットによる、より詳細な検討を計画した。PSIによる

霊長類でのパーキンソンモデルの解析とそれに対する ZNS の効果、作用機序を明らかにするために、本年度はまず、予備実験としてコモン・マーモセットでの PSI によるパーキンソンモデル作成を行った。

コモン・マーモセット 2 頭に Z-Ile-Glu(O-t-butyl)-Ala-Leucinal (PSI) 18.0mg/kg を、1 頭にコントロールとして溶解液を 2 週間で計 6 回 投与し自発運動量を 24 時間記録し、3 ヶ月後に断頭、脳内モノアミン量を測定した。その結果、ドパミン代謝率に対応した運動量の低下を確認し、PSI 投与により、神経細胞変性を起こす可能性に矛盾しないデータを得た。今後、PSI 投与期間を延長し、さらに検討を進める。

2) 神経保護作用の臨床評価

① ZNS の長期効果

村田は ZNS の抗 PD 作用の発見者であることから、最も長く ZNS 投与 PD 患者の経過を観察している。そこで ZNS 投与 4 - 7 年間の患者について、その臨床症状及び抗 PD 薬量の経過について検討した。

その結果、7 割が ZNS 投与後 4 年間までは投与前より改善した状態を維持できた。ZNS 開始時の平均罹患期間は 7.4 年であるので、進行期にこのような改善を維持できるのは高く評価される。効果不十分と思われた症例も ZNS 中止により悪化し、再開により改善するため、効果はあると考えられ、患者の希望により内服が継続されている。経過・年齢ともマッチさせた ZNS 非投与患者 12 例に比較すると、ZNS 群は症状改善及びその維持が良好であるといえた。

② 神経保護作用の臨床評価方法

上記のような進行期における症状改善・維持は神経保護作用の一端を示したともいえないことはないが、評価は困難である。PD における細胞死の速度は発症早期により速いとされ、早期の細胞死速度を抑制することを臨床的に証明することが期待される。

当初、本研究班では ZNS の神経保護作用について PD 早期例を対象に臨床的な検証を行いたいと計画していた。しかし、これまでに神経保護作用の評価としてなされたいくつかの研究 (FDA での大規模研究も含めて) はいずれも方法論に問題が提起され、2006 年 11 月の 11th International Congress of Parkinson's disease and Movement Disorders では、現時点では神経保護作用を評価する適切な方法論はなく、今後作り出さなければならないという結論となった。そのような状況を考慮し、大規模臨床研究ではなく評価方法の考案を行うこととした。

PD の L-dopa の効果持続時間はドパミン神経障害 (残存神経終末と考えられるが) に依存する。L-dopa 静脈内持続投与後の症状改善の程度の効果持続時間によりドパミン神経障害の程度を評価する。血中 L-dopa 濃度は HPLC にてモニターする。この方法を用いて予備的に検討したところ、L-dopa 静注では経口投与と異なり、ドパ脱炭酸酵素阻害剤を添加しなくても血中 dopamine, HVA はほとんど上昇しないことが明らかになった。今後症例を増やして検討する。

3) ZNS の抗パーキンソン作用の作用機序の解明

これまでに我々は ZNS が THmRNA 増加を介して dopamine 合成を亢進すること、中等度の monoamine oxydase (MAO) 阻害活性をもつこと、ドパミン受容体、ドパミントランスポーターには親和性をもたないことなどを明らかにしてきた。今年度からはドパミン系以外への作用を明らかにし、新たな抗パーキンソン病薬の開発につなげていく。

① 大脳基底核ニューロン活動に対する作用

南部らはタイワンザルにて MPTP によるパーキンソンモデルを作成し、淡蒼球、視床下核で MPTP 投与後はパーキンソン病患者と同様の異常自発放電パターンを確認し

た。このモデルに ZNS を単独投与することにより、これらの異常発振活動が減少し、正常化する傾向にあることを見出した。

さらにラット黒質緻密部を含むスライスを用いての検討で、ZNS は黒質緻密層のニューロンにバースト発射を起こさせることを明らかにした。ZNS は K 電流の抑制によりバーストを増やしていると考えられた。ZNS は T type Ca channel blocker であることが知られているが、Ca イメージングでは ZNS により細胞内 Ca の大きな変動は見られず、現時点では Ca の関与は少ないと考えられた。

② ZNS の振戦改善効果の作用機序

近藤らは tacrine 誘発性振戦 (tremorous jaw movements; TMJs) を用いて ZNS の効果を検討したところ、ZNS は TMJs を用量依存性に抑制した。しかもこの効果は reserpine によるモノアミン枯渇状態やドパミン受容体の強いアンタゴニストである haloperidol 過剰投与状態でも出現し、ZNS がドパミンあるいはモノアミン系とは異なる作用機序の抗振戦効果を持つことを明らかにした。すでに近藤らはハルマリン振戦 (本態性振戦モデル) および、本態性振戦患者での ZNS の効果を報告しており、ZNS が様々なタイプの振戦に有効である可能性を示した。

4) ZNS を用いた PD のオーダーメイド医療確立への試み

戸田らは孤発性 PD 感受性遺伝子を明らかにするために 27000 個のマイクロサテライト (MS) マーカーを用いた pooled DNA 法によるゲノムワイド MS 関連解析を行い、 $p < 0.0001$ の MS を 3 個発見した。さらに多数の候補遺伝子、SNP マーカーを用いた関連解析により、孤発性 PD の確実な感受性遺伝子として synuclein を同定した。これらの大規模関連解析をより速くより廉価に進めるために新たにプール SNP array 手法を

確立した。今後この方法を用いて ZNS の薬効に影響する SNP を同定し、テーラーメイド医療の確立をめざす。すでに ZNS を投与し効果を確認しえた 100 人分の DNA を収集し、来年度プール SNP array 法にて検索予定である。

5) 腎不全患者における RLS の頻度

長谷川らは ZNS の RLS 改善効果を経験したことから、多数例の RLS での効果を確認する予定である。今年度はその予備調査として、腎不全患者における RLS の頻度を調査した。RLS の有病率は欧米では 5-10% であるが、アジアでは低く、わが国では 1% 程度とされている。今回の透析患者での有病率は 32.1% と高く、ZNS は透析患者でも安全にしようできることから、今後、有効性を検証する予定である。

(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。

E. 結論

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、その作用機序の解明を進めるとともに、神経保護作用の実験的検証及び臨床的検証について多面的に研究を進めた。神経保護作用としては、ZNS がパーキンソンモデルラットの黒質細胞障害に対して有意な保護作用を示すこと、ラット線条体内の GSH を著明に増加させることを明らかにし、さらにその作用機序として、ZNS がグリア細胞のシスチ

ン取り込みに関与している可能性を示した。また、Akt/PTEN 系の anti-apoptotic signal pathway を介しての細胞保護作用も示すことを明らかにした。これらの神経保護作用を臨床的に証明するための方法論の検討を行った。ZNS の 4-7 年の長期投与では進行例でもよい効果を維持できしており、神経保護作用も期待できる。新たな作用機序として、ZNS が PD で認める淡蒼球、視床下核の異常発火パターンを正常化すること、黒質ドパミン細胞に K 電流を介してバーストをおこさせることを明らかにした。また、ドパミン系以外の系による抗振戦作用を明らかにした。Proteasome 阻害剤によるコモンマーモセットの PD モデル作成、プール SNP array 法の確立などにより、今後の研究の基礎固めを行った。

F. 研究発表

1. 論文発表

別紙記載

2. 学会発表

別紙記載

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

II 分担報告書

ゾニサミドのドパミンキノン毒性に対する保護効果 ならびに脳内グルタチオン増加作用の発現機序

分担研究者： 浅沼 幹人

岡山大学大学院医歯薬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

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科脳神経制御学講座神経情報学

研究要旨

これまでに、パーキンソン病(PD)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するゾニサミド同時投与の強力な抑制効果、ゾニサミド連日投与による脳内グルタチオン(GSH)に対する著明な増加作用ならびに*in vitro*におけるドパミン(DA)、L-DOPA自動酸化系におけるキノン体のメラニンへの変換能を見だし、小胞外細胞質内の過剰DA、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。本年度は、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GSH増加作用のメカニズムを明らかにするために、DA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酵素、GSH関連酵素への作用、さらにDA神経保護効果について検討した。ゾニサミドはマウスへの14日間連日投与により強力な脳内GSH増加作用を有しているにもかかわらず、線条体組織でのキノン消去系酵素、GSH合成酵素glutamate cysteine ligase (GCL)、GSH抱合酵素の蛋白発現は影響されず、DA含有神経細胞においてゾニサミドを持続添加してもGSH増加は認められず、キノン体生成に対するゾニサミドの抑制効果もGCL阻害薬で影響されなかった。神経細胞はGSH合成に必要なシステインの前駆体シスチンの取り込み機構を欠いており、神経細胞でのGSH合成はアストログリアでのシスチン取り込み、システイン生成に依存している。これらのことから、ゾニサミドがグリア細胞のシスチン取り込み、システイン生成に作用している可能性が考えられる。一方、片側線条体への6-OHDA注入による片側パーキンソン病モデルに7日間ゾニサミド連日投与を行ったところ、障害側黒質線条体路のDA神経の脱落は、L-DOPA投与の有無に関わらず、ゾニサミド投与により有意に抑制された。ゾニサミドは6-OHDA注入3週間後から投与されており、このゾニサミドの神経保護効果は6-OHDA自体の急性期のキノン化、ラジカル生成に対する抑制効果ではなく、むしろミトコンドリア呼吸鎖障害などによる持続性の酸化ストレスに対する抑制効果に基づくと考えられ、またGSH増加作用が関与しているとも考えられる。

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、細胞障害性にはたらく。このようなL-DOPAおよびドパミンの神経毒性が、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ことは、我々の既報を含む多くの研究で明らかにされている。

これまでに、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、正常マウスへの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著明に増加すること、さらにゾニサミドNa塩が*in vitro*のドパミン、L-DOPA自動酸化系においてキノン体を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、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、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のいずれかあるいは複数に基づくと考えられる。グルタチオンは自らのシステイン残基によりキノン体と結合し、キノン体毒性除去にはたらくこと、また一般的な活性酸素種による酸化ストレスに対しても消去するようにはたらくことから、なかでもゾニサミドのグルタチオン増加作用に着目している。

そこで本年度は、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明らかにするために、ドパミン含有神経細胞および片側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酵素、グルタチオン関連酵素への作用について検討した。さらに、パーキンソン病モデルにおいてL-DOPA 誘発キノン体生成に対してゾニサミドが保護効果を発揮する際に、ドパミン神経障害に対しても保護効果があるか否かについても組織学的に検討した。

B. 研究方法

1. ドパミン含有神経細胞でのグルタチオンおよびその関連酵素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 (1.0×10^5 cells/cm²) を用いて、継代 24 時間後に、ゾニサミド原末 (最終濃度 1-100 μ M) を添加し、1, 5 日間培養し、グルタチオン量を測定した。また、グルタチオン合成酵素 glutamate cysteine ligase (GCL= γ -glutamylcysteine synthetase) 蛋白の変化を Western blot 法で測定した。さらに、ゾニサミド原末添加 (最終濃度 1-100 μ 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 μ M) の同時添加の効果についても検討した。

2. 正常マウスへのゾニサミド連日投与による線条体キノン消去系酵素、グルタチオン関連酵素への影響

正常雄性 ICR マウスにゾニサミド Na (10-50 mg/kg, i. p.) を 14 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、cell lysate を抽出した。ドパミンキノンを還元・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 GCL およびグルタチオン抱

合酵素 glutamyl-S-transferase (GST) の蛋白の変化を Western blot 法で解析した。

3. 片側パーキンソン病モデルマウスでの L-DOPA 誘発キノン体毒性ならびにドパミン神経障害に対するゾニサミド連日投与の保護効果

雄性 ICR マウスの片側線条体に

6-hydroxydopamine (6-OHDA) を注入し作製した片側パーキンソン病モデルを用いて、6-OHDA 注入 2 週後にアポモルフィン誘発回旋運動を確認し、さらに 1 週間後 (6-OHDA 注入 3 週間) より 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 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およびドパミン神経終末の指標となるドパミントランスポーターの免疫染色を行った。

C. 研究結果

1. ドパミン含有神経細胞でのグルタチオンおよびその関連酵素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 (1-100 μ M) の 1, 5 日間持続添加を行ったが、マウスへの in vivo 投与でみられるようなグルタチオン量の増加は認められなかった。また、ゾニサミド持続添加 (6 時間, 1 日間, 5 日間) によっても GCL 蛋白発現は不変であった。さらに、ゾニサミド原末の持続添加により 1 日目, 5 日目においてキノプロテイン量はそれぞれ増加, 減少するが、グルタチオン合成酵素 GCL の阻害薬である BSO を同時添加しても、これらのキノプロテイン量の変化には全く影響しなかった。

2. 正常マウスへのゾニサミド連日投与による線条体キノン消去系酵素、グルタチオン関連酵素への影響

マウス大脳基底核のグルタチオン量を著増させることが確認できている用量, 期間のゾニサミド Na 連日投与 (10-50 mg/kg, i. p., 14 日間) を行い、線条体のキノン還元酵素 NQO1, グルタチオン合成酵素 GCL, グルタチオン抱合酵素 GST の蛋白発現の変化を検討したが、いずれもゾニサミド連日投与により変化しなかった。

3. 片側パーキンソン病モデルマウスでの L-DOPA 誘発キノン体毒性ならびにドパミン神経障害に対するゾニサミド連日投与の保護効果

6-OHDA の線条体注入により作製した片側パーキンソンモデルマウスに 6-OHDA 注入 3 週間

より 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、ドパミン神経障害に対するゾニサミドの保護効果について組織学的に検討した。障害側黒質緻密層のチロシン水酸化酵素陽性のドパミン神経細胞の著明な脱落ならびに障害側線条体のチロシン水酸化酵素、ドパミントランスポーター陽性シグナルの著明な減少が認められた。これらのドパミン神経障害を示す変化に対して L-DOPA 投与は影響しなかった。しかし、これらの障害側黒質緻密層のドパミン神経細胞の脱落ならびに障害側線条体でのドパミン神経障害は、L-DOPA 投与の有無に関わらず、ゾニサミド投与 (30 mg/kg, i. p.) により有意に抑制された。とくに、障害側黒質緻密層のドパミン神経細胞の脱落に対する抑制効果が顕著であった。

D. 考察

パーキンソン病モデルへの L-DOPA 連日投与による障害側線条体での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、さらに、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著明に増加することを、これまでに明らかにしてきた。そして、これらの結果は、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示している。

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、前述したように、昨年までの研究成果から、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、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に基づくと考えられる。われわれはグルタチオンは自らのシステイン残基によりドパミンキノンと結合し、キノン体毒性消去にはたらくことを明らかにしている。また、一般的な活性酸素種による酸化ストレスに対してもグルタチオンが抗酸化物質としてはたらくことはよく知られている。したがって、3つの可能性のなかでも、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、すなわちゾニサミドがグルタチオン合成系あるいは代謝系に作用し、グルタチオンを増加させることによって、L-DOPA 誘発性のキノン体毒性にして保護・抑制効果を発揮する可能性が高いと考えられた。そこで今回は脳内グルタチオン増加作用のメ

カニズムを明らかにするために、ドパミン含有神経細胞および片側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酵素、グルタチオン関連酵素への作用について検討した。

ゾニサミドは *in vivo* 連日投与により強力な脳内グルタチオン増加作用を有しているにもかかわらず、線条体組織でのキノン還元酵素 NQO-1 やグルタチオン合成酵素 GCL, グルタチオン抱合酵素 GST の蛋白発現は、ゾニサミド連日投与により影響されず、ドパミン含有神経細胞においてゾニサミドを持続添加してもグルタチオン増加は認められず、キノン体生成に対するゾニサミドの抑制効果も GCL 阻害薬で影響されなかった。これらの結果は、GCL 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ないという昨年までの結果と合致しており、少なくともゾニサミドはグルタチオン合成酵素の発現および活性は変化していないと考えられる。しかし、グルタチオン増加作用について *in vivo* での強い作用とドパミン含有神経細胞での無効との間に乖離があることから、ゾニサミドのグリア細胞への作用の可能性を考える必要があるかもしれない。神経細胞はグルタチオン合成に必要なシステインの前駆体シスチンの取り込み機構を欠いており、神経細胞でのグルタチオン合成はアストログリアでのシスチン取り込み、システイン生成に依存している。これらのことから、ゾニサミドがグリア細胞のシスチンの取り込み、システイン生成に作用し、結果的に神経細胞でのグルタチオン量を増加させている可能性も考えられる。今後、アストログリアでのシスチン取り込み、システイン生成にかかわる輸送系蛋白やそれらの転写を調節する因子などへのゾニサミドの影響について、ゾニサミドを連日投与した片側パーキンソン病モデルマウスおよびゾニサミドを持続添加した培養アストログリアを用いて免疫染色などにより検討する必要がある。

一方、パーキンソン病モデルにおいて L-DOPA 誘発キノン体生成に対してゾニサミドが保護効果を発揮する際に、実際にドパミン神経変性および障害に対してゾニサミド投与がどのような作用を及ぼすか明らかにするために、L-DOPA で惹起されるキノン体生成に対する強力な抑制効果がみられた場合と同じ 6-OHDA 線条体注入による片側パーキンソンモデルマウスに L-DOPA およびゾニサミドを連日投与し、ドパミン神経障害に対するゾニサミドの保護効果について組織学的に検討した。

片側パーキンソン病モデルの障害側黒質緻

密層のドパミン神経細胞の脱落ならびに障害側線条体でのチロシン水酸化酵素陽性シグナル(ドパミン神経軸索)とドパミントランスポーター陽性シグナル(ドパミン神経終末)の減少は著明で、非障害側の約20%程度にまで減少していた。過剰量のL-DOPAがドパミン神経障害を惹起することについては異論があるが、モデル動物での実験あるいは培養神経細胞レベルでは認められる。しかし、今回L-DOPA投与はこれらのドパミン神経障害を示す変化に対して影響しなかった。これは今回用いた6-OHDA線条体注入パーキンソン病モデルの黒質線条体系ドパミン神経障害が高度なために、L-DOPA投与による増悪効果が現れなかったのかもしれない。

興味深いことに、今回の検討で片側パーキンソン病モデルへのゾニサミド連日投与により、黒質線条体系のドパミン神経の脱落を有意に抑制できることを明らかにできた。この効果は、L-DOPA投与の有無に関わらず認められ、とくに、障害側黒質緻密層のドパミン神経細胞の脱落に対する抑制効果が顕著であった。ゾニサミド投与は6-OHDA注入3週間後から開始していることから、ゾニサミドは6-OHDA自体の急性期のキノン化、ラジカル生成を抑制しているのではなく、むしろミトコンドリア呼吸鎖障害などにより惹起される持続性の酸化ストレスに対して保護効果を発揮していると考えられる。さらに、このゾニサミドのドパミン神経保護効果に、前述のグルタチオン増加作用が関与していることも考えられ、今後ゾニサミドの脳内グルタチオン増加作用のメカニズムを詳細に検討する予定にしている。このメカニズムおよびゾニサミドの作用点を明らかにすることで、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、さらに新たなパーキンソン病治療薬、方策の開発につながると期待できる。

E. 結論

ゾニサミドはin vivo連日投与により強力な脳内グルタチオン増加作用を有しているにもかかわらず、グルタチオン合成酵素には作用しておらず、ドパミン含有神経細胞においてグルタチオン増加は認められなかった。これらのことから、ゾニサミドがアストログリアでのシスチン取り込み、システイン生成にかかわる輸送系蛋白やそれらの転写を調節する因子などに作用し、結果的に神経細胞でのグルタチオン量を増加させている可能性も考えられた。

また、片側パーキンソン病モデルへのゾニサミド連日投与により、黒質線条体系のドパミン

神経の脱落を抑制できることを明らかにした。この神経保護効果にもグルタチオン増加作用が関与している可能性が考えられる。

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.: 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.
- ② 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.*, 20: 571-573, 2006 (published online January 10, 2006).
- ③ Narimatsu, S., Yonemoto, R., Saito, K., Takaya, K., Kumamoto, T., Ishikawa, T., Asanuma, M., Funada, M., Kiryu, K., Naito, S., Yoshida, Y., Yamamoto, S. and Hanioka, N.: Oxidative metabolism of 5-methoxy-*N,N*-diisopropyltryptamine (Foxy) by human liver microsomes and recombinant cytochrome P450 enzymes. *Biochem. Pharmacol.*, 71: 1377-1385, 2006.
- ④ Miyoshi, K., Onishi, K., Asanuma, M., Miyazaki, I., Diaz-Corrales, F.J. and Ogawa, N.: Embryonic expression of pericentrin suggests universal roles in ciliogenesis. *Dev. Genes Evol.*, 216: 537-542, 2006 (published online March 14, 2006).
- ⑤ Asanuma, M. and Miyazaki, I.: Nonsteroidal anti-inflammatory drugs in Parkinson's disease: possible involvement of quinone formation. *Expert Rev. Neurother.*, 6: 1313-1325, 2006.
- ⑥ 宮崎育子, 浅沼幹人: カテコールアミン神経特異的酸化ストレスとしてのキノン体毒性とその防御. 吉川敏一編, 酸化ストレスフリーラジカル医学生物学の最前線 Ver.2, 医歯薬出版, 東京, 2006, pp241-244.
- ⑦ Tanaka, K., Ogawa, N. and Asanuma, M.: Molecular basis of 6-hydroxydopamine-induced caspase activations due to increases in oxidative stress in the mouse striatum. *Neurosci. Lett.*, 410: 85-89, 2006.
- ⑧ Miyoshi, K., Asanuma, M., Miyazaki, I., Matsuzaki, S., Tohyama, M. and Ogawa, N.:

Characterization of pericentrin isoforms in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 351: 745-749, 2006.

- ⑨ Asanuma, M., Miyazaki, I., Higashi, Y., Diaz-Corrales, F.J., Shimizu, M., Miyoshi, K. and Ogawa, N.: Suppression of p53-activated gene, PAG608, attenuates methamphetamine-induced neurotoxicity. *Neurosci. Lett.*, in press.
2. 学会等発表
- ① 浅沼幹人, 宮崎育子, 小川紀雄: シナプス小胞外遊離ドパミンからのドパミンキノン障害性とその消去による神経保護効果. 第33回日本脳科学会, 旭川, 2006, 6, 2.
- ② 宮崎育子, 浅沼幹人, 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ドパミンアゴニストの作用. 第33回日本脳科学会, 旭川, 2006, 6, 2.
- ③ 宮崎育子, 清水雅子, Francisco J. Diaz-Corrales, Maria F. Esraba-Alba, 浅沼幹人: アポトーシス促進因子 PAG608 の L-DOPA 投与パーキンソン病モデル脊髄運動ニューロンでの特異的発現. 第29回日本神経科学大会, 京都, 2006, 7, 20.
- ④ 三好 耕, 宮崎育子, 浅沼幹人: Pericentrin は発達期大脳皮質の神経一次繊毛の基部に局在する. 第29回日本神経科学大会, 京都, 2006, 7, 21.
- ⑤ Miyoshi K., Miyazaki, I. and Asanuma, M.: Involvement of pericentrin in the formation of neuronal primary cilia. 第28回日本生物学的精神医学会・第36回日本神経精神薬理学会・第49回日本神経化学会大会合同年会, 名古屋, 2006, 9, 14.
- ⑥ 宮崎育子, 浅沼幹人, 小川紀雄: Dopamine quinone-related neurotoxicity and potential neuroprotective agents. 第28回日本生物学的精神医学会・第36回日本神経精神薬理学会・第49回日本神経化学会大会合同年会, 名古屋, 2006, 9, 15.
- ⑦ 浅沼幹人, 喜多大三, 日名俊行, 宮崎育子, 小川紀雄, 北村佳久, 千堂年昭, 五味田裕: Effect of methylphenidate on excess extra-vesicular dopamine-induced dopaminergic neurotoxicity. 第28回日本生物学的精神医学会・第36回日本神経精神薬理学会・第49回日本神経化学会合同年会, 名古屋, 2006, 9, 16.
- ⑧ 浅沼幹人, 宮崎育子, 北市清幸: メタンフェタミン急性神経毒性におけるドパミンキノン体生成の関与とキノン消去による

阻止. シンポジウム II 覚せい剤による神経傷害の生化学, 臨床画像, そして修復・治療, 第18回日本アルコール精神医学会・第9回ニコチン・薬物依存研究フォーラム平成18年度合同学術総会, 千葉, 2006, 9, 29.

- ⑨ Miyazaki, I., Asanuma, M., Diaz-Corrales, F.J. and Ogawa, N.: Protective effects of a novel anti-parkinsonian agent zonisamide on dopamine quinone-related neurotoxicity. 10th International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders, Kyoto, 2006, 10, 31.
- ⑩ Asanuma, M., Miyazaki, I., Diaz-Corrales, F.J. and Ogawa, N.: A novel anti-parkinsonian agent zonisamide increases glutathione levels in the basal ganglia. 10th International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders, Kyoto, 2006, 10, 31.

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

Zonisamide のもつ神経保護作用についての基礎的研究

分担研究者 服部信孝 順天堂大学医学部脳神経内科

研究要旨： 抗てんかん薬である Zonisamide は抗パーキンソン病薬としての有用性を持つが、その一方で Dopamine および MPP+ が誘導する酸化ストレスに対し保護効果をもつ可能性が検討されている。保護効果のメカニズムを細胞内の伝達シグナル解析を通しその機序を明らかにしようと試みた。

A 研究目的

抗てんかん薬としてこれまで使用されてきた Zonisamide には、さまざまな作用機序が報告されているが、その作用は Carbonic anhydrase の阻害、T 型カルシウムチャンネルの阻害、または電位依存性 Na チャンネルの阻害、また GABA レセプター類似ベンゾジアゼピンレセプターのアロステリック阻害作用など多岐にわたっている。Zonisamide がパーキンソン病治療薬として有用との報告がなされ、古くて新しい新規抗パーキンソン病製剤として期待されるようになった。我々は、これまでに酸化的ストレス下に置かれた培養細胞に対し Zonisamide が細胞保護効果をもつことを確認した。本研究は保護効果を分子生物学的側面からアプローチしその機序解明を目的とした。

B 研究方法

ドパミン作動性神経と同様の機能をもつヒト神経芽細胞腫株（SH-SY5Y 細胞）を 10 μ M の Retinoic acid により分化誘導の後、ゾニサミド 100 μ M 濃度培養液にて培養、細胞内発現蛋白質およびシグナル伝達機構を SDS-PAGE および Western blott 法にて解析した。

倫理面での配慮

本研究は培養細胞を使用した実験であり、倫理面での問題は生じない。

C 研究結果

100 μ M zonisamide 培養液にて培養を行った細胞群ではリン酸化 PTEN (Phosphatase and tensin homolog) タンパク質の増加が確認された。またその下流を担う Serine/ Threonine kinase である Akt 1 タンパク質のリン酸化が生じることを確認した。Akt pathway の最終機転とされる Forkhead transcription factor (FOXO3A) のリン酸化が確認できた。

D. 考察

PTEN、Akt および FKHRL1 (FOXO3A) のリン酸化は Anti-apoptotic signal pathway として報告されている。とくに FKHRL1 (FOXO3A) のリン酸化タンパク質の増加は、Zonisamide が Akt pathway の最終機転として FKHRL1 をリン酸化し Inactivate することにより anti-apoptotic な作用を示していることが推測された。

E 研究結果の発表

The 11th International Congress of Parkinson's Diseased and Movement Disorders (2006)

ポスターセッションにて発表。Highlight poster として選出された。

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

プロテアソーム阻害薬投与時のサルの行動とドパミン神経細胞の検討

久保田、西川典子、野元正弘
愛媛大学大学院病態治療内科

分担研究者 野元 正弘 愛媛大学大学院病態治療内科教授

研究要旨

神経変性の機序としては不溶蛋白質の蓄積が挙げられており、蛋白質の処理を行なう proteasome の機能が神経細胞死に関与する可能性が指摘されている。実験的には proteasome inhibitor (PSI) をげっ歯類に投与することにより黒質ドパミン神経細胞に変性を生じるとの報告がある。このことから、2頭のコモン・マーモセットに対して proteasome inhibitor の Z-Ile-Glu(O-t-butyl)-Ala-Leucinal を投与した。1頭のコモン・マーモセットには溶解液を同様に投与し、動物の行動を観察した。観察には、ビデオ撮影と自発運動量の測定装置を用いた。投与を開始して3ヵ月後に脳内のモノアミン濃度を検討した。

PSI を投与した2頭のコモン・マーモセットのうち、1頭において一過性の運動量低下が観察された。また3ヵ月後の線条体ドパミン代謝率は、対照動物よりもPSI投与動物で高かった。

A. 研究目的

コモン・マーモセット3頭を用いて、PSI の作用について予備的な検討を行なった。

B. 研究方法

実験

小型の新世界サルであるコモン・マーモセット(3~4歳、雌雄)に選択的なドパミン神経毒の Z-Ile-Glu(O-t-butyl)-Ala-Leucinal (PSI) 18.0mg/kg を2週間かけて計6回投与した。対照動物には溶解液の45%エタノールを投与した。サルの運動量は、赤外線を用いた、自発運動量測定装置を用いて、24時間記録した。最初のPSIを投与してから3ヶ月後に断頭、脳内モノアミン量を測定した。

薬物

PSI はエタノールに懸濁し、水で45%に調製して、投与した。

C. 研究結果

PSI を投与した2頭のコモン・マーモセットのうち、1頭(PSI.1)において一過性の運動量低下が観察され、運動量は開始時の半分程度に低下し

た。また3ヵ月後の線条体ドパミン代謝率は、尾状核で対照動物(0.44) PSI.1(0.54) PSI.2(0.61)、被殻で対照動物(0.71) PSI.1(0.84) PSI.2(1.14)となり、対照動物よりもPSI投与動物で高かった

(Fig)。

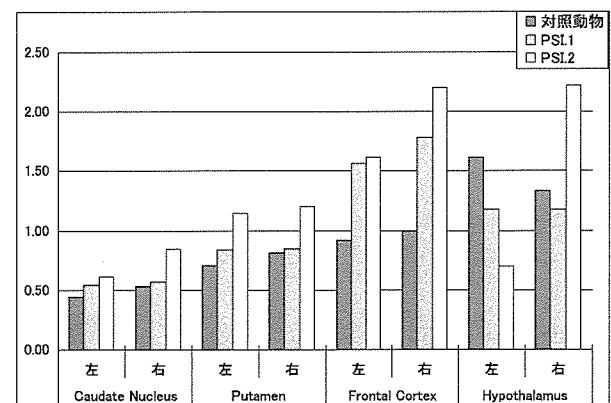


Fig. 線条体ドパミン代謝率

D. 考察と結論

コモン・マーモセットを用いて proteasome の神経変性における関与を検討するために、予備実

験を行ったところ、PSI を投与した動物で、DA 代謝率が上昇していた。DA 神経が障害を受けると、代謝率は上昇する (Masahiro Nomoto, et al. "Increased dopamin turnover in the putamen after MPTP treatment in common marmosets." Brain Research 767 (1997) :235-238.)。このことから今回の予備的研究では、PSI の投与により神経が変性を起こす可能性に矛盾しない結果を得た。今後は、PSI の投与期間を延長してさらに検討を行なう。

F. 健康管理情報

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Masahiro Nomoto
Pharmacological consideration of the symptoms resistant to dopaminergic Therapy. Parkinsonism and related disorders, 2006, Oct;12 Suppl 2:S83-7. Epub 2006 Jul 11
- 2) T. Shimizu, S. Iwata, A. Miyata, T. Fukuda, M. Nomoto
Delayed L-DOPA-induced hyperalgesia
Pharmacology, Biochemistry and Behavior 85(2006)643-647
- 3) Masahiro Nomoto, Masahiro Nagai, Akiko Nakatsuka, Noriko Nishikawa, Hayato Yabe, Hiroyoko Moritoyo, Takashi Moritoyo, Takuo Nomura.
Pharmacokinetic characteristics of agents applied in the treatment of Parkinson's disease.
J Neurol. 2006 Aug;253 Suppl 3:iii53-iii59.
- 4) Akiko Nakatsuka, Masahiro Nagai, Hayato Yabe, Noriko Nishikawa, Takuo Nomura, Hiroyoko Moritoyo, Takashi Moritoyo & Masahiro Nomoto.
Effect of clarithromycin on the pharmacokinetics of cabergoline
In healthy controls and in patients with Parkinson's disease.
Journal of Pharmacological Sciences, 100:59-64, 2006.
- 5) 野元正弘
中毒治療における適応外使用の倫理
中毒研究 20 : 27-30, 2007.
- 6) 野元正弘
ドパミンアゴニストのより良い治療選択を探る

- Pharma Medica 24(10):133-135, 2006.
- 7) 野元正弘
医療現場で期待される治療薬—パーキンソン病について—
PHARMSTAGE, 6(8):70-72, 2006.
 - 8) 西川典子, 野元正弘
特集「パーキンソン病とうつ」
3. 神経伝達物質からみたパーキンソン病のうつ
1) カテコラミン代謝の面からみたパーキンソン病のうつ
医薬ジャーナル社, Depression Frontier 4(2):16-20, 2006
 - 9) 永井将弘, 野元正弘
今後出てくる新しい治療法
Pharma Medica, 24(9):57-60, 2006.
 - 10) 西川典子, 野元正弘 MAO-B 阻害薬、COMT 阻害薬の効果と安全性に関するエビデンス
最新医学社, 最新医学別冊:115-121, 2006
 - 11) 永井将弘, 野元正弘
HTLV-I 関連脊髄症 (HAM) の病態と治療
愛媛医学, 25(2):87-91, 2006.
 - 12) 永井将弘, 野元正弘
神経疾患の適応外使用薬—エビデンスからの視点
EBM ジャーナル, 7(3):66-71, 2006.
 - 13) 永井将弘
パーキンソン病と便秘
パーキンソン病 臨床の諸問題, :257-260, 2006.
 - 14) 森豊隆志, 野元正弘
RNA 干渉による創薬
神経治療学 Reprinted from Neurological Therapeutics 23(1):37-43, Jan 2006.
 - 15) 野元正弘, 中塚晶子, 森豊隆志, 森豊浩代子, 永井将弘
代替医療, 特に健康食品の副作用, 合併症について
臨床薬理 Jpn J Clin Pharmacol Ther 37(2) Mar 2006

2. 学会発表

- 1) 第 6 回 CRC と臨床試験のあり方を考える会議 (2006 大宮)
・山崎知恵子, 岡田明美, 西内尚子, 岡本千恵, 山下梨沙子, 村瀬光春, 森豊隆志, 荒木博陽, 野元正弘
「愛媛大学医学部附属病院ネットワーク治療における「訪問 CRC」の活動」
・岡田明美, 山下梨沙子, 山崎知恵子, 西内尚子, 岡本千恵, 村瀬光春, 森豊隆志, 荒木博陽,

野元正弘

「大学病院の複数診療科による治験実施体制の構築」

2) 第 11 回日本神経感染症学会 (2006 三重)

野元正弘

「HAM 患者治療におけるバイオマーカーとしての髄液中ネオプテリン量の変化」

3) The 8th International Congress of Neuroimmunology (2006 名古屋)

Masahiro Nagai, Hayato Yabe, Noriko Nishikawa, Hiroyoko Moritoyo, Takashi Moritoyo, Masahiro Nomoto.

「Alteration of Cerebrospinal Fluid Neopterin Levels in Patients with HTLV-I-associated Myelopathy Treated with High-dose Methylprednisolone」

4) The Movement Disorder Society's 10th International Congress (2006 京都)

・M Nomoto

「Future perspectives in the treatment of L-Dopa induced Dyskinesia」

・M Nagai, H Yabe, N Nishikawa, H Moritoyo, T Moritoyo, Y Shigematsu, M Nomoto

「Valvular heart disease in Japanese patients with Parkinson's disease」

・Noriko Nishikawa, Masahiro Nagai, Hayato Yabe, Hiroyoko Moritoyo, Takashi Moritoyo, Masahiro Nomoto

「Siblings of SCA type2 with heterogenous neurodegenerative disorders」

5) 第 12 回日本薬剤疫学会学術総会 (2006 横浜)

永井将弘, 重松裕二, 森豊隆志, 西川典子, 矢部勇人, 森豊浩代子, 納光弘, 野元正弘

「心臓弁膜症とパーキンソン病の治療」

6) 第 27 回日本臨床薬理学会年会 (2006 東京)

・森豊隆志, 山崎知恵子, 岡田明美, 西内尚子, 岡本千恵, 山下梨沙子, 村瀬光春, 荒木博陽, 野元正弘

「愛媛大学医学部附属病院ネットワーク治験の構築」

・永井将弘, 重松裕二, 矢部勇人, 西川典子, 森豊浩代子, 森豊隆志, 野元正弘

「麦角トパミンアゴニスト関連心臓弁膜症の頻度とその対応について」

7) 第 81 回日本神経学会中国・四国地方会 (2006 岡山)

矢部勇人, 西川典子, 永井将弘, 森豊浩代子, 森豊隆志, 野元正弘

「バセドー眼症に合併した重症筋無力症の 1 例」

8) 国際共同治験推進会議 in Beppu (2007 別府)

野元正弘

「責任医師の立場から」

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
2. 実用新案登録

C. その他

Zonisamide の神経保護作用の臨床的評価

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：Zonisamide (ZNS) の抗パーキンソン作用の7年までの長期効果を明らかにし、これをもとに ZNS の神経保護作用について考察し、神経保護作用の臨床的評価方法について検討した。ZNS 長期投与群では7/10 人が投与開始4年間まで ZNS 併用前より改善した状態を維持可能であった。この結果は ZNS のパーキンソン症状に対する効果とともに実験データで示された神経保護作用の臨床効果を示唆している可能性があった。これを今後臨床的に検証するために、これまでなされた神経保護作用を評価した臨床研究を検討し、L-dopa infusion test を考案した。

A. 研究目的

Zonisamide (ZNS) の抗パーキンソン作用の長期効果(4-7年)を明らかにし、ZNS の神経保護振戦作用を臨床的に明らかにするための評価方法を確立する。

B. 研究方法

1) パーキンソン症状改善目的で ZNS を4-7年投与した10例について、その臨床経過、薬物投与量について、UPDRS III, Yahr 重症度及びLEDD(L-dopa equivalent daily dose)にて評価した。

さらに発症年齢、罹患期間が同等で、ZNS を投与されていない12例とその効果、経過を比較した。

2) 本研究班でこれまでに培養細胞、モデル動物において、ZNS が神経保護作用を示すことを明らかにしてきたが、これを臨床的に証明するための評価方法について検討した。

C. 研究結果

1) ZNS 投与群は発症年齢44-55歳、現在の年齢47-66歳、現在の罹患期間8-21年、平均12.4年(ZNS 投与開始時平均罹患期間は7.4年)、現在までのZNS 投与期間は4年5例、6年3例、5年および7年が各1例であった。

UPDRS III の改善は全例1年後に投与前より改善し、7例は4年以上効果が持続した。4年未満で投与前よりスコアが悪化した患者は3例は全例休薬を試みたが、振戦悪化あるいはon時間の短縮を認め、本人の希望で継続投与となった。4年目は投与前よりは改善しているものの3年目よりはやや悪化している患者が多く、LEDD も3年目まではほぼ維持できたが、4年目以降は増量の傾向にあった。Yahr 重症度は2例以外は全例改善または維持されていた。

なお、発症3年目にL-dopa との併用を開始した1例はZNS 併用5年、PD 罹患期間8年の現在もご

く軽度の体の重さ以外は極めて良好なコントロールを維持している。

ZNS 投与群の投与開始時期が一定でないため、ZNS 非投与群との比較は困難であったが、経過7年目以降4年以上、Yahr 重症度を維持できた症例は3例のみで、ZNS 群がより改善を維持できていた。

2) 神経保護効果の臨床評価はこれまでに、レボドパ治療開始までの期間をゴールとした DATATOP study, TCH346 study, 11 CIT SPECT または DAT(dopamine transporter) PET を用いた CALM-CIT, REAL-PET study, delayed-start 法の TEMPO study があるが、いずれも臨床的な新規神経保護効果があるという結論にはいたらなかった。これは薬剤の効果の問題はあるが、方法論が確立していないことが最大の問題点であるとされている。DAT の画像評価は最も有力と考えられたが、シナプス間隙のドパミン量の増加により影響を受けるために、軽度の改善では評価が困難であった。これらから、2006年初頭はまだ、delayed start 法は評価できるという報告もあったが、ELLDOPA study などの結果も考慮し、国際的に、現時点ではパーキンソン病における神経保護効果を臨床的に評価するための適切な評価方法がないという結論となった。

黒質細胞変性の指標として、L-dopa の効果持続時間の短縮が報告されている。これを用いて、L-dopa infusion test (L-dopa 持続静注(1mg/kg/hr, 2hr)後の臨床症状(歩行時間及び、指タック速度)の悪化速度の評価を行う)により、残存細胞数を推定できる可能性が考えられた。なお、今回の検討では、L-dopa 静脈内持続投与では血中dopamine, HVA はほとんど上昇しないことを明らかにした。

D. 考察

1) 平均罹患期間7.4年の患者でZNS投与により、70%は4年間は投与前より改善した状況を維持し、さらに3年間は他の抗パ剤の増量なしに投与前より改善した状況を維持できたことは、ZNSの効果が長期に持続することを示し、また、かなり進行する時期であることを考慮すると臨床的な神経保護作用を示している可能性も示唆された。しかし、ZNS非投与群との比較の問題点として、サンプル数が少ないこと以外に、1) PDにおけるドパミン神経細胞死は指数対数的に進行し、初期がもっとも早く、発症10年後には残存細胞数は20%程度になるため、発症後10年間ほどの時期かにより進行の速度が異なること、2) 正常でも加齢による細胞減少があるため、し、進行度の年齢を加味する必要があること、3) 発症10年間の細胞減少の速度には個体差が大きいこと4) PDは薬剤効果により症状は大きく異なるため、同じ細胞障害度でも適切な薬剤投与により、臨床効果が極めてよい状況を維持できる可能性もある。つまり、症状増悪の速度が速く見える症例のなかに、治療が適切でないものも含まれる可能性を否定できないこと、などの問題点が挙げられた。

2) 2006年初頭には上記のdelayed start法は評価できるという報告もあったが、ELLDOPA studyなどの結果も考慮し、現時点ではパーキンソン病における神経保護効果を臨床的に評価するための適切な評価方法がないというのが国際的にも結論となっている。そのため、今回、予定していた、ZNSの神経保護効果を評価する大規模臨床研究は施行しないことにした。

代替方法として、L-dopa infusion testによる細胞変性の評価方法を考案し、今後これを検証することにした。今回の検討によりL-dopa静脈内持続投与方法ではcarbidopaなどのドパ脱炭酸酵素阻害薬を併用せずに検査を施行できることが判明した。

E. 結論

ZNSは平均罹患期間7.2年の中期以降の患者の70%で4年間投与前より症状の改善した状態を維持できた。ZNS非投与群に比べより良好な経過を示すことができたか(神経保護作用を示せたか)の評価は現時点では困難である。これまでの臨床研究の結果からL-dopa infusion testでの神経細胞死の評価方法を考案し、今後これを検討することとした。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) Murata M. Pharmacokinetics of L-dopa. Special reference to food and aging. J Neurol 2006; 253[Suppl 3] III/47-III/52

(2) Murata M, Hasegawa K, Kanazawa I, The Japan Zonisamide on PD Study Group. Zonisamide improves motor function in Parkinson disease. A randomized, double-blind study. Neurology 2007; 68: 45-50.

(3) Fnayama M, Li Y, Tomiyama H, Yosino H, Imamichi Y, Yamamoto M, Murata M, Toda T, Mizuno Y, Hattori N. LRRK2 G2385R variant is a risk factor for Parkinson disease in Asian population. Neuro Report (in press)

(4) 村田美穂, 塚本 忠: 神経変性疾患 パーキンソン病 北村 聖編 臨床病態学 ニューヴェルヒロカワ 東京 2006, pp105-112.

(5) 村田美穂. : ドパミン作動薬の効果と安全性に関するエビデンス. 別冊 神経4 パーキンソン病 最新医学社 2006; 107-114.

(6) 村田美穂. : パーキンソン病—最近の話題—. 別冊 神経4 パーキンソン病 最新医学社 2006; 232-240.

(7) 馬場正之, 村田美穂, 横地房子. : Parkinson病に対するプラミペキソールの長期継続投与試験. 神経内科 2006; 65(6): 575-580.

(8) 村田美穂. : 特集: パーキンソン病の診断と治療の進歩 進行期パーキンソン病治療の問題点 日本医師会雑誌 2006; 43-46.

(9) 村田美穂. : パーキンソン病の治療 薬物療法. Clinical Neuroscience 2007; 25: 82-85.

2. 学会発表

Murata M, Teraoka Y, Aoki Y, et al. Effective threshold concentration and L-dopa dose of Japanese patients with Parkinson's disease. 12th International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders. Kyoto, 2006.

H. 知的財産権の出題・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし