

200731051A

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薬ゾニサミドの 神経保護作用に関する臨床研究

平成19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20(2008)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神経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 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	-----	13
	神経毒に対するゾニサミドの保護作用 —MPTP、PSI に対する作用— 愛媛大学大学院病態治療内科 野元 正弘	-----	14
	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とマウスによる検討— 自然科学研究機構生理学研究所 南部 篤	-----	17
	ゾニサミド投与によるラット線条体および大脳皮質の遺伝子プロファイル 国立精神・神経センター武蔵病院神経内科 村田 美穂	-----	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	-----	22
	パーキンソン病患者における Zonisamide の長期投与効果の検討 和歌山県立医科大学神経内科 近藤 智善	-----	23
	関節リウマチにおけるRLSの頻度 -パイロットスタディ- 国立病院機構相模原病院神経内科 長谷川 一子	-----	26
III.	開催会議	-----	29
IV.	班構成員名簿	-----	31
V.	研究成果の発刊に関する一覧	-----	33

I. 主任總括研究報告

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

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：ゾニサミドの神経保護作用の確認とその作用機序の解明を多面的に進めた。今年度の研究により、ZNSは①強力なキノン体生成抑制、グルタチオン増加作用により神経保護作用を *in vivo*, *in vitro* で示し、このグルタチオン増加作用は非活性型アストログリアの増殖及びアストログリアでのシスチン取り込み増加作用によることを明らかにした。これはアストロサイトを介する神経保護作用という新たな神経保護作用のメカニズムを見出したといえる。②PIP3/Akt系を活性化し、FKHRL1の活性化を介し著明なMnSOD発現増加作用をもつことを明らかにした。これらの結果はZNSが複数の作用点に強力に作用して神経保護効果を発揮することを示し、同時にZNSがPDのみならず多くの神経変性疾患に対し、神経保護効果を期待できることを示唆している。さらに③ZNSはドパミン神経障害に対し、ドパミン神経細胞の活動性を維持する方向に作用する。④ZNSはPDで認める淡蒼球内節、視床下核ニューロンの異常発火パターンを改善すること、脳内での作用点は淡蒼球は否定的で現時点では線条体が考えられる。⑤DNAアレイではZNS投与後線条体でnegative feedbackによると思われるGLT-1の発現低下を認める。⑥進行期PD患者でZNSの1年以上の投与後も効果が持続すること、年間症状悪化率が既報データより低く、進行を遅らせている(神経保護作用)可能性があることを明らかにした。また、PD自然発症マウスでの神経保護作用の証明と機序の解明のための準備を進めた。SNP chipを用いて、疾患感受性遺伝子を明らかにするとともにZNSの効果判定マーカーとなる多型の同定を進めている。

A. 研究目的

すでに我々はゾニサミド(ZNS)の抗パーキンソン(PD)作用とその作用機序を明らかにした。さらにZNSが*in vitro*, *in vivo*で神経保護作用をもつことを見出し、この作用機序を明らかにし、臨床的に意味のある神経保護作用であることを示すために研究を進めた。具体的には、1) ZNSがL-dopaによるキノン体生成増加を強力に抑制すること、脳内グルタチオンを著明に増加させること、さらにPDモデルで障害側黒質線条体系のドパミン神経の脱落を有意に抑制することを明らかにしたことから、脳内グルタチオンの増加作用のメカニズムを明らかにする。

2) PIP3/Akt系を介する神経保護作用のメカニズムを明らかにする、3) モノアミン代謝の変化から神経細胞への作用を明らかにする、4) モデルサルでのZNSの脳内での作用点を明らかにする。5) PD自然発症

マウスを用いて*in vivo*でのZNSの神経保護作用とその機序を明らかにする、6) DNAアレイを用いてZNSのモノアミン系以外への作用を明らかにする、7) 500K SNP chipを用いて、ZNSの効果判定マーカーを明らかにする、8) PD患者でのZNSの長期効果の持続及び、進行抑制効果を明らかにする、9) ZNSの適応拡大の一つとしてのRestless Leg Syndrome(RLS)への効果を評価するために、RLSの有病率を明らかにする、などを目的に多面的に研究を進めた。

1) グルタチオン増加作用を介する神経保護作用(*in vivo* & *in vitro*) (浅沼)

B. 方法

昨年までにZNSのグルタチオン合成増加作用について、グルタチオン合成酵素、抱合酵素の蛋白量は変化しないことを明らかにし、アストログリアの関与が示唆されたことから、

① ZNS のドパミン含有神経細胞、アストログリアでのグルタチオン及びその関連酵素への作用

ドパミン含有細胞 CATHa 細胞及びアストログリア C6 細胞の継代 24 時間後に ZNS (1-100 μ M) を添加し、24 時間後に、グルタチオン量の定量、グルタチオン合成酵素 (GCL), シスチン/グルタミン酸トランスポーター (xCT), 及びそれらの発現をプロモートする転写因子 Nrf2 蛋白の変化を western blot にて解析した。

② マウスへの ZNS 投与による線条体アストログリアへの影響

正常雄性 ICR マウスに ZNSNa 30mg/kg, i. p.) 7 日間後に還流固定後凍結脳切片を作成し、総アストログリアの指標である S100 β の免疫染色を行った。

③ ZNS 投与による片側 PD モデル線条体でのアストログリア、シスチン取り込みへの作用

片側線条体に 6OHDA を投与して作成した、PD モデルマウスに L-dopa/carbidopa (50/5 mg/kg, i. p.) または ZNSNa (30mg/kg, i. p.) を 7 日間投与し、投与終了 1 日後に還流固定、凍結脳切片を作成した。チロシン水酸化酵素 (TH), dopamine transporter の免疫染色を行い、さらに S100 β (総アストログリア), GFAP (活性型アストログリア), xCT 染色を行った。

C. 結果

① ZNS のドパミン含有神経細胞、アストログリアでのグルタチオン及びその関連酵素への作用

グルタチオン増加はドパミン含有細胞では認めず、アストログリア C6 細胞でのみ、著明に増加し、xCT 発現増加を伴っていた。

② マウスへの ZNS 投与による線条体アストログリアへの影響

ZNS は線条体内 S100 β 陽性アストログリアを増加させた。

③ ZNS 投与による片側 PD モデル線条体でのアストログリア、シスチン取り込みへの作用

L-dopa はドパミン神経障害に対して影響はなかったが、GFAP 陽性アストロサイトの活性化は増悪させた。

ZNS は障害側線条体の GFAP 陽性活性型アストロサイトの増殖を悪化させることなく

有意に xCT 発現を増加させた。また、非障害側線条体の S100 β 陽性アストログリアを増加させた。

D. 考察

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のシスチンの取り込み機構を持たず、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とりこみ、システイン生成に依存している。今回の結果は、ZNS の大脳基底核での著明なグルタチオン増加作用は、ZNS が非活性型アストログリアの増殖を促進し、さらにアストログリア上のシスチン・グルタミン酸トランスポーターの発現誘導を引き起こし、アストログリアでのシスチン取り込みを増加させ、結果的に神経細胞でのグルタチオン増加させることを明らかにした。

この結果は、アストロサイトを介する神経保護作用という新たな神経保護作用のメカニズムを見出したといえる。同時に ZNS が PD のみならず他の神経変性疾患にも神経保護効果が期待できることを示唆している。

2) DA, MPP+による神経細胞毒性に対する ZNS の神経保護作用 (in vitro) (服部)

B. 方法

SH-SY5Y 細胞をレチノイン酸により分化誘導後、ZNS 100 μ M、ついで、DA 10 μ M、または MPP+ 50 μ M を添加し、MTT reduction assay にて、細胞生存能を判定した。さらに、western blot 法にて ZNS 添加後の細胞内蛋白 (リン酸化 PTEN, リン酸化 PI3K, リン酸化 Akt, リン酸化 FKHL1, MnSOD) の変化を検討した。

C. 結果

ZNS は DA, MPP+毒性に対し有意な細胞保護効果を示した。同時にリン酸化 PTEN, リン酸化 PIP3, 及びその下流の Akt 及び FKHL1 (Foxo3a) 転写因子のリン酸化蛋白の増加を認めた。さらに MnSOD の著明な発現増加を認めた。

D. 考察

ZNS は PIP3/Akt 経路を活性化し、さらにその下流の転写因子である FKHL1 のリン酸化修飾を促進した。FKHL1 は酸化ストレスに対する survival factor として注目されており、MnSOD の転写を促進することが

いられている。実際、今回、我々は MnSOD の著明な発現増加を明らかにしており、ZNS が、PTEN, PIP3/Akt, FKHL1, MnSOD の一連の系を強く活性化することを示し、これが DA, MPP+ の神経毒性からの神経保護作用の作用機序であることを明らかにした。これは ZNS が PD のみならず他の神経変性疾患に対する神経保護役としても有望であることを示唆している。

3) モノアミン代謝からみた ZNS の神経活性化作用 (in vivo) (野元)

B. 方法

① C57Bl/6 マウスに MPTP 15mg/kg を 2 時間後と 4 回投与し、MPTP 投与 1 時間前に 1 回のみ、ZNS 40mg/kg, または selegiline 5 mg/kg を皮下投与した。7 日後に線条体の DA 及び代謝産物を HPLC にて測定した。

② Common marmoset に MPTP 2.5mg/kg 1 日 1 回 3 日間、または proteasome inhibitor (PSI) 3mg/kg 1 日 1 回隔日で計 4 回皮下投与した。さらにそれぞれに ZNS 40mg/kg を MPTP または PSI 投与 1 時間前に毎回皮下投与した。投与開始後 2 週間後に線条体の DA 及び代謝産物を HPLC にて測定した。

C. 結果

① マウスでは、ZNS 1 回投与では MPTP による線条体 DA 含量の低下に ZNS はほとんど影響しなかった。DA 代謝 (DOPAC+HVA/DA) は正常群 0.17±0.01, MPTP 投与群 0.41±0.04, MPTP+ZNS 群 0.68±0.14, MPTP+selegiline 群 0.31±0.13 と、ZNS により DA 代謝が亢進した。

② Common marmoset では MPTP 群の DA 含量は対照群の 0.6%, MPTP+ZNS 群は 3.6% であった。DA 代謝 (DOPAC+HVA/DA) は正常群平均 0.92, MPTP 投与群平均 0.19, MPTP+ZNS 群平均 0.68 と ZNS 投与により増加した。

D. 考察

DA 代謝の亢進は DA 神経の活動性の上昇を示している。ZNS はマウス、サルどちらも MPTP による DA 神経障害に対して DA 神経の活動性を保つ方向に作用していると考えられた。

4) モデルサルでの ZNS の作用点の検討 (南部)

B. 方法

タイワンザル及びアカゲザルを用いて、まず正常な状態での淡蒼球内節 (GPi)・外節 (GPe)、視床下核 (STN) から単一ニューロン活動を記録し、その後 MPTP を一側内頸動脈に投与し、ヘミパーキンソンモデルを作成し、その後再度同様にニューロン活動を記録した。その後 L-dopa, ZNS を静脈内投与し、症状及びニューロン活動の変化を調べた。

C. 結果

PD モデルサルではバースト発射や発振活動など異常発射パターンを認めた。L-dopa+ZNS 投与ではパーキンソン症状の改善とともに、GPi, STN の異常発射パターンは消失、あるいは減弱した。ZNS 単独投与でも GPi, STN の異常発射パターンは正常化される傾向にあった。Gpi に ZNS を局所投与しても変化はなく、線条体への局所投与では全身投与と同様の結果を得た。

D. 考察

ZNS は PD で認める GPi, STN の異常発射パターンを改善する。局所投与の結果から現時点では ZNS の作用点は GPi ではなく、線条体であると考えられた。

5) PD 自然発症マウスを用いた ZNS の神経保護作用の評価 (南部)

B.C. 方法・結果

転写因子 Engrailed-1 (En1) と Engrailed-2 (En2) のダブルミュータントマウス En1 (+/-), En2 (-/-) は出生時は正常であるが、生後 3 ヶ月ごろまで DA ニューロンの減少が続くことが知られている (Sgado, et al. 2006)。南部らはこのマウスを用いて ZNS の神経保護作用の評価を計画している。今年度はこの動物をドイツから輸入し、クリーン化を行い、さらに中脳 DA ニューロンの減少を確認した。

来年度はこのマウスを用い、ZNS の神経保護作用を確認し、作用機序の解明を進める。

6) ZNS によるラット線条体、大脳皮質の遺伝子発現プロファイル (村田)

B. 方法

これまでに我々は、ZNS によりドパミン含有神経の THmRNA 発現が増加することを明らかにしているが、黒質以外の線条体、

大脳皮質での mRNA 発現に対する作用を明らかにするためにラットに ZNS 群 (ZNS 50mg/kg in 0.5% tragantgum 1ml) 対照群 (0.5% tragantgum 1ml) として、それぞれ 14 日間 1 日 1 回経口投与し、最終投与後各 4 匹を 2 時間後、残りの 4 匹を 12 時間後に断頭し、大脳皮質、線条体を摘出し、片側分を用いて、total RNA を抽出し、Gene Chip (Affymetrix) にて、発現解析を行った。

C. 結果

発現遺伝子の有意な変動は極めて少なく、31099 個の遺伝子のうち、Perfect match; PM と Miss match; MM の差から有意な発現と評価でき、かつ 180% 以上の上昇でしかもコントロール群と有意差を認めた遺伝子で、translocated locus などを除外すると、有意な変動は 5 遺伝子のみであった。すなわち、線条体で 2 時間後、12 時間後とも低下は rRNA promoter binding protein と glial high affinity glutamate transporter (GLT-1) のみであった。

線条体、12 時間後には A kinase (PRKA) anchor protein 5, DEAD/H box peptide 26 が上昇していた。

大脳皮質では最終投与 2 時間後に sodium iodine symporter の発現が上昇していた。

D. 考察

ZNS 投与により線条体、大脳皮質での遺伝子変化は予想以上に少なかった。GLT-1 は glia への glutamate 取り込みにかかわる蛋白質である。Glutamate による細胞毒性から GLT-1 (ヒトでは EAAT-2) 蛋白質の増加が細胞保護的に作用する可能性がある。今回の検索では GLT-1 mRNA の発現は ZNS 投与により低下していたが、preliminary には ZNS 投与により GLT-1 蛋白質量の増加を認めており、蛋白質増加に伴う negative feedback の可能性が示唆された。今後、対側のサンプルを用いて、GLT-1 蛋白質量の発現について検討する予定である。

7) 遺伝子多型とパーキンソン病の発症リスク及び ZNS の効果 (戸田)

B. 方法

① 候補遺伝子関連解析

PD 患者 1403 人、対照 1938 人を対象に TaqMan 法でタイピングし大規模関連解析を行った。

② 500K SNP chip を用いた関連解析

イルミナ Hap550 アレイを用い、Genome Wide Association Study (GWAS) を行った。PD 患者 1000 検体、理研コントロール 2500 検体の SNP 型を判定し、疾患対象関連解析を行う。このうち 120 人は ZNS 投与例で、関連解析データ処理により、効果判定マーカーとなる多型を同定する。

C. 結果

① 昨年までに見出した α -synuclein, FGF20 に加え、calbindin 1 を同定した ($p = 7.1 \times 10^{-5}$, オッズ比 1.34)。組み合わせ解析では α -synuclein のリスクアレル (2+) 群では FGF20 と PD の関連はより強くなったが、calbindin 1 と PD との関連は有意差がなくなった。一方、 α -synuclein のリスクアレル (-) 群では、calbindin 1 と PD との関連はより強くなり (オッズ比 1.70)、FGF20 と PD の関連は有意差がなくなった。② SNP chip 検索はタイピングが終了したところで、現在関連解析を進めている。

D. 考察

Calbindin 1 はカルシウム結合蛋白質で神経保護作用を持つと考えられている。組み合わせ解析から、calbindin 1 は α -synuclein とは独立に、一方、FGF20 は α -synuclein と相互的に PD 発症に関与していることが示唆される。

8) PD における ZNS の長期投与効果 (近藤)

B. 方法

1 年以上維持療法として ZNS 服薬を継続した PD 患者のうち、ZNS 休薬に同意を得た 12 名 (平均年齢 70.9 歳平均罹患期間 7.5 年) を対象とした。Hoehn and Yahr (H-Y), UPDRS, Parkinson's disease Questionnaire-39 (PDQ-39), Zung Self-reported Depression Scale (SDS) にて、1 年前 (ZNS 投与中)、休薬前、休薬 1 ヶ月後に評価し、比較した。認容性は問診にて行い必要な場合血液、尿検査を行った。

C. 結果

ZNS 休薬後 UPDRS III (motor score) は 9.8 (SD: 5.7) から 15.3 (9.3)、運動症状のなかでは固縮が 0.8 (1.2) から 2.7 (1.8) へと有意に悪化した。

ZNS 投与中の 1 年間の変化としては、H-Y は 1.8 (0.7) から 1.8 (0.7) で不変、UPDRS III

は 10.6(4.4)から 9.8(5.7)と 0.8 の改善。UPDRS II(ADL score)は 7.6(3.1)から 8.5(4.9), 0.9 の悪化であった。

治療中に認容性に問題はなかった。

D. 考察

休薬後に有意な症状の悪化を認め、ZNS の抗 PD 効果は 1 年以上にわたり維持されていることが明らかになった。また、認容性にも問題はなく、長期にわたる PD の治療薬として使用可能であることも確認した。

Schrag ら(2007)は年間症状悪化率を H-Y 0.3, UPDRS II 2.8, UPDRS III 2.9 と報告しており、今回の ZNS 投与下での H-Y 不変、UPDRS II 0.9, UPDRS III -0.8 は ZNS 投与群で進行が遅い可能性(神経保護作用)を示唆する結果であった。

9) 関節リウマチにおける Restless Leg Syndrome(RLS)の頻度(長谷川)

B. 方法

これまでに ZNS が RLS に効果があることを明らかにしたことから、RLS の疫学調査を進めている。昨年は腎不全患者での RLS の有病率が 32.1%であることを示したが、今回は関節リウマチ(RA)における有病率について検討した。

国立病院機構相模原病院リウマチ科に通院中で同意を得られた RA 患者 259 名に RLS(International RLS Study Group 1995 による)の有無、症状の発現時間帯、重症度、貧血の有無について調査した。

C. 結果

RLS の有病率は 8.8%(男性 16.7%, 女性 8.7%)で男性が女性より 2 倍高く、若年者に多かった。重症度は様々で、貧血の合併は RLS の有無で差はなかった。

D. 考察

RLS の頻度はコーカソイドでは 5-10%とされるが、わが国では 65 歳以上の健常人で 1.06%(男性 0.48%, 女性 1.16%)とされている(Mizuno S, et al. 2005)。今回の調査で RA では有病率が高く、かつ、男性、若年者に多いという特徴を見出した。

E. 結論

今年度の研究により、ZNS は①強力なキノン体生成抑制、グルタチオン増加作用により神経保護作用を in vivo, in vitro で示

し、このグルタチオン増加作用は非活性型アストログリアの増殖及びアストログリアでのシスチン取り込み増加作用によることを明らかにした。これはアストロサイトを介する神経保護作用という新たな神経保護作用のメカニズムを見出したといえる。

② PIP3/Akt 系を活性化し、FKHRL1 の活性化を介し著明な MnSOD 発現増加作用をもつことを明らかにした。以上の 2 点は ZNS が複数の作用点に強力に作用して神経保護効果を発揮することを示している。さらにこれらは ZNS が PD のみならず多くの神経変性疾患に対し、神経保護効果を期待できることを示唆している。

さらに③ ZNS はドパミン神経障害に対し、ドパミン神経細胞の活動性を維持する方向に作用する。④ ZNS は PD で認める淡蒼球内節、視床下核ニューロンの異常発火パターンを改善すること、脳内での作用点は淡蒼球は否定的で現時点では線条体が考えられる。⑤ DNA アレイでは ZNS 投与後線条体で negative feedback によると思われる GLT-1 の発現低下を認める。⑥ 進行期 PD 患者で ZNS の 1 年以上の投与後も効果が持続すること、年間症状悪化率が既報データより低く、進行を遅らせている(神経保護作用)可能性があることを明らかにした。また、PD 自然発症マウスでの神経保護作用の証明と機序の解明のための準備を進めた。SNP chip を用いて、疾患感受性遺伝子を明らかにするとともに ZNS の効果判定マーカーとなる多型の同定を進めた。

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
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

II. 分担研究報告

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

ゾニサミドのドパミン神経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 准教授

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 助教

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ドパミン(DA)、L-DOPAによるキノン体障害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。また、昨年度はPDモデル完成後のゾニサミド連日投与により、障害側黒質線条体路のDA神経の脱落が有意に抑制されるというDA神経保護効果を明らかにした。本年度は、ゾニサミドのDA神経保護効果ならびに脳内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、アストログリアおよびPDモデルマウスを用いて、ゾニサミドのGSH合成関連分子、グリア細胞でのアミノ酸トランスポーター関連因子への作用について検討した。ゾニサミド(1-100 μM)の持続添加により、DA含有神経細胞ではGSHに変化はなかったが、アストログリアC6細胞においては細胞増殖を伴ったGSH量の増加が認められ、この時シスチン/グルタミン酸トランスポーターの発現も増加していた。マウスへのゾニサミドNa(30 mg/kg, *i.p.*)の連日投与により、脳内GSHは著増するが、キノン消去系酵素、GSH合成酵素 glutamate cysteine ligase は影響されず、線条体の非活性型アストログリアの増殖が認められた。また、6-OHDA注入による片側PDモデル完成後にゾニサミドNa(30 mg/kg, *i.p.*)連日投与を行うと、障害側黒質線条体路のDA神経の脱落が有意に抑制され、障害側線条体の活性型アストログリアにおけるシスチン/グルタミン酸トランスポーターの発現の増加がみられた。神経細胞におけるGSH合成は、アストログリア上に存在するシスチン/グルタミン酸トランスポーターを介して取り込まれたシスチンからのシステインおよびGSH合成に依存している。今年度の研究結果から、ゾニサミドが非活性型アストログリアの増殖を促進し、あるいはアストログリア上のシスチン/グルタミン酸トランスポーターの発現誘導を引き起こし、アストログリアでのシスチン取り込みを増加させ、結果的に神経細胞でのGSH量を増加させるメカニズムを明らかにできた。今後、このようなゾニサミドのアストログリアの増殖作用とGSH合成に関わるアミノ酸取り込みの神経・アストログリア連関の修飾能に着目して、アストログリアの増殖にはたらく諸因子、シスチン/グルタミン酸トランスポーターの発現増加にかかわる因子、さらにはグルタミン酸トランスポーターの発現に対するゾニサミドの作用の有無について検討を行う。

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。この L-DOPA 誘発キノン体障害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た。

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、キノン体障害性消去にはたらくこと、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、線条体組織でのキノン還元酵素 NQO-1 やその転写因子の Nrf2 の蛋白発現はゾニサミド連日投与により影響されなかったから、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 誘発性のキノン体障害性にして保護・抑制効果を発揮する可能性が高いと考えられた。

しかし、昨年度の検討では、線条体組織でのグルタチオン合成酵素、グルタチオン抱合酵素の蛋白発現は、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は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なかった。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が想定された。

また昨年度は、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、障害側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というドパミン神経保護効果を明らかにした。このゾニサミドのドパミン神経保護効果にも、前述のグルタチオン増加作用が関与していることが考えられた。

そこで本年度は、ゾニサミドのドパミン神経保護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、アストログリアおよびパーキンソン病モデルマウスを用いて、ゾニサミドのグルタチオン合成関連分子、グリア細胞でのアミノ酸トランスポーター関連因子への作用について検討した。

B. 研究方法

1. ドパミン含有神経細胞、アストログリア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) およびラット由来アストログリア C6 細胞 (2.8×10^4 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 μM ）を添加し、1 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), アストログリアでのグルタチオン基質となるシスチンの取り込み部位のシスチン/グルタミン酸トランスポーター(xCT), およびそれらの発現をプロモートする転写因子 Nrf2 蛋白の変化を Western blot 法で測定した。

2. 正常マウスへのゾニサミド連日投与による線条体アストログリアへの影響

正常雄性 ICR マウスにゾニサミド Na (30 mg/kg, i. p.) を 7 日間連日投与し、投与終了 1, 3, 7 日後に 4% paraformaldehyde で灌流固定し、凍結脳切片を作製した。線条体を含む脳切片を用いて、総アストログリアの指標である S100 β の免疫染色を行った。

3. 片側パーキンソン病モデルマウスの線条体アストログリアならびにシスチンの取り込み部位へのゾニサミド連日投与の効果

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 週間後) 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。さらに、S100 β および活性型アストログリアの指標である GFAP と xCT の二重染色を行った。

C. 研究結果

1. ドパミン含有神経細胞, アストログリア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 にゾニサミド

(1-100 μM) の 1, 5 日間持続添加を行ったが、グルタチオン量の増加は認められなかった。また、GCL 蛋白発現は不変であった。一方、アストログリア C6 細胞においては、ゾニサミド (1-100 μM) の 1 日間持続添加により細胞増殖を伴ったグルタチオン量の増加が認められ、この時 xCT の発現も増加していた。

2. 正常マウスへのゾニサミド連日投与による線条体アストログリアへの影響

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のゾニサミド Na (30 mg/kg, i. p.) を連日投与したところ、線条体内の S100 β 陽性アストログリアの増加が認められた。

3. 片側パーキンソン病モデルマウスの線条体アストログリアならびにシスチンの取り込み部位へのゾニサミド連日投与の効果

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 週間後より 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、L-DOPA 投与はこれらのドパミン神経障害に対して影響しなかったが、GFAP 陽性のアストログリアの活性化に対しては増悪させた。ゾニサミド Na (30 mg/kg, i. p.) の単独連日投与は、障害側線条体の GFAP 陽性活性型アストログリアの増殖に影響することなく、有意に xCT の発現を増加させた。

また、正常マウスへのゾニサミド連日投与の効果と同様に、ゾニサミド Na (30 mg/kg, i. p.) の単独連日投与は、非障害側線条体の S100 β 陽性アストログリアを増加させた。

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・神経障害性に対して保護・抑制効果を発揮することを示している。

前述したように、昨年までの研究成果から、キノン体消去系諸因子や神経でのグルタチオン合成系あるいは代謝系諸因子はゾニサミドは影響しないことが解った。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。また、ゾニサミドの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培養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、L-DOPA 誘発性のキノン体障害性にして保護・抑制効果を発揮する可能性が高いと考えられた。そこで本年度は、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明らかにするために、ドパミン含有神経細胞、アストログリアおよびパーキンソン病モデルマウスを用いて、ゾニサミドのグルタチオン合成関連分子、グリア細胞でのアミノ酸トランスポーター関連因子への作用について検討した。

今回の検討で、ゾニサミドの持続添加によりドパミン含有神経細胞ではグルタチオン量に変化はないものの、アストログリア C6 細胞においては細胞増殖を伴ったグルタチオン量の増加が認められた。また、この時アストログリア上に特異的に局在するシスチンの取り込み機構であるシスチン/グルタミン酸トランスポーター(xCT)の発現も増加していた。このようなシスチンの取り込み機構の発現増加は、パー

キンソン病モデルマウスでも見られた。すなわち、片側パーキンソン病モデル完成後にゾニサミド連日投与を行うと、障害側線条体の活性型アストログリアにおける xCT の発現の増加がみられた。

さらに、興味深いことに、アストログリア C6 細胞にゾニサミドを添加したところ細胞増殖がみられ、マウスへのゾニサミドの連日投与によっても線条体の非活性型アストログリアの増殖が認められた。

これらの研究結果から、ゾニサミドが非活性型アストログリアの増殖を促進し、あるいはアストログリア上の xCT の発現誘導を引き起こし、アストログリアでのグルタチオン合成の基質になるシスチンの取り込みを増加させ、結果的に神経細胞でのグルタチオン量を増加させるというメカニズムを明らかにできた。昨年度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報告したが、このゾニサミドのドパミン神経保護効果にグルタチオン増加作用が関与していることも考えられる。今後、ゾニサミドのアストログリアの増殖作用とグルタチオン合成に関わるアミノ酸取り込みの神経・アストログリア関連の修飾能に着目して、アストログリアの増殖にはたらく因子、xCT の発現増加にかかわる因子、さらにはグルタミン酸トランスポーターの発現に対するゾニサミドの作用の有無について検討を行う。

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、片側パーキンソン病モデルへの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するというドパミン神経保護効果を有しているが、今年度の検討で、ゾニサミドが非活性型アストログリアの増殖を促進し、あるいはアストログリア上のシスチン/グルタミン酸トランスポーターの発現誘導を引き起こし、アストログリアでのシスチンの取り込みを増加させ、結果的に神経細

胞でのグルタチオン量を増加させるというグルタチオン増加作用の発現機序を明らかにできた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- ① 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.*, 414: 263-267, 2007.
- ② Sogawa, C., Sogawa, N., Tagawa, J., Fujino, A., Ohyama, K., Asanuma, M., Funada, M., Kitayama, S.: 5-Methoxy-N, N-diisopropyltryptamine (Foxy), a selective and high affinity inhibitor of serotonin transporter. *Toxicol. Lett.*, 170: 75-82, 2007.
- ③ Miyazaki, I., Asanuma, M., Hozumi, H., Miyoshi, K. and Sogawa, N.: Protective effects of metallothionein against dopamine quinone-induced dopaminergic neurotoxicity. *FEBS. Lett.*, 581: 5003-5008, 2007.
- ④ Asanuma, M. and Miyazaki, I.: Common anti-inflammatory drugs are potentially therapeutic for Parkinson's disease? *Exp. Neurol.*, 206: 172-178, 2007.
- ⑤ Asanuma, M., Miyazaki, I., Diaz-Corrales, F.J., Miyoshi, K., Ogawa, N. and Murata, M.: Preventing effects of a novel anti-parkinsonian agent zonisamide on dopamine quinone formation. *Neurosci. Res.*, 60: 106-113, 2008.
- ⑥ Narimatsu, S., Yonemoto, R., Masuda, K., Katsu, T., Asanuma, M., Kamata, T., Katagi, M., Tsuchihashi, H., Kumamoto, T., Ishikawa, T., Naito, S., Yamano, S. and Hanioka, N.: Oxidation of 5-methoxy-N, N-diisopropyltryptamine in rat liver microsomes and recombinant cytochrome P450 enzymes. *Biochem. Pharmacol.*, 75: 752-760, 2008.
- ⑦ Narimatsu, S., Kiryu, K., Yonemoto, R., Yoshino, M., Kobatake, M., Kazamori, D., Hagino, S., Masuda, K., Katsu, T., Asanuma, M., Kumamoto, T., Ishikawa, T., Funae, Y., Yamano, S., Hanioka, N. and Naito, S.: The roles of amino acid residues at positions 216 and 219 in the structural stability and metabolic functions of rat cytochrome P450 2D1 and 2D2. *Chem.-Biol. Interact.*, in press.
- ⑧ Shimizu, M., Miyazaki, I., Higashi, Y., Eslava-Alva, M.J., Diaz-Corrales, F.J., Asanuma, M. and Ogawa, N.: Specific induction of PAG608 in cranial and spinal motor neurons of L-DOPA-treated parkinsonian rats. *Neurosci. Res.*, in press.
- ⑨ Hozumi, H., Asanuma, M., Miyazaki, I., Fukuoka, S., Kikkawa, Y., Kimoto, N., Kitamura, Y., Sendo, T., Kita, T. and Gomita, Y.: Protective effects of interferon-gamma against methamphetamine-induced neurotoxicity. *Toxicol. Lett.*, in press.
- ⑩ Miyazaki, I. and Asanuma, M.: Dopaminergic neuron-specific oxidative stress caused by dopamine itself. *Acta Med. Okayama*, in press.
- ⑪ Asanuma, M. and Miyazaki, I.: Nonsteroidal anti-inflammatory drugs in experimental parkinsonian models and Parkinson's disease. *Curr. Pharm. Design*, in press.

2. 学会等発表

- ① 浅沼幹人, 宮崎育子, 穂積宏彰, 十川紀夫: パーキンソン病モデル線条体での L-DOPA 誘発キノン体生成とシステイン基含有分子. 第 48 回日本神経学会総会, 名古屋, 2007, 5, 17.
- ② 浅沼幹人, 宮崎育子: p53 関連因子 PAG608 の L-DOPA 投与パーキンソン病モデルの運動ニューロンでの特異的発現. 第 34 回日本

脳科学会, 出雲, 2007, 6, 8.

- ③ 宮崎育子, 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神経障害に対するメタロチオネインの作用. 第34回日本脳科学会, 出雲, 2007, 6, 8.
- ④ 宮崎育子, 穂積宏彰, 三好 耕, 浅沼幹人: ドパミンキノン神経毒性におけるグリアでのグルタチオン合成関連分子の変化. 第29回日本生物学的精神医学会・第37回日本神経精神薬理学会, 札幌, 2007, 7, 12.
- ⑤ 穂積宏彰, 宮崎育子, 喜多大三, 北村佳久, 千堂年昭, 五味田裕, 浅沼幹人: メタンフェタミン神経毒性に關与する炎症・免疫関連分子の網羅的検索. 第29回日本生物学的精神医学会・第37回日本神経精神薬理学会, 札幌, 2007, 7, 12.
- ⑥ 竹島美香, 田中弓子, 宮崎育子, 浅沼幹人, 喜多大三: ビスフェノールAの培養モノアミン神経系への作用. 第29回日本生物学的精神医学会・第37回日本神経精神薬理学会, 札幌, 2007, 7, 12.
- ⑦ 三好 耕, 宮崎育子, 浅沼幹人: 神経細胞1次繊毛の生物学的意義の検討. 第29回日本生物学的精神医学会・第37回日本神経精神薬理学会, 札幌, 2007, 7, 12.
- ⑧ 三好 耕, 宮崎育子, 浅沼幹人: Pericentrin変異マウスを用いた神経細胞1次繊毛の機能解析. Neuro 2007 (第30回日本神経科学大会・第50回日本神経化学会大会・第17回日本神経回路学会大会 合同学会), 横浜, 2007, 9, 10.
- ⑨ 宮崎育子, 穂積宏彰, 三好 耕, 浅沼幹人: ドパミンキノン神経毒性におけるグルタチオン合成関連分子のグリアでの変化. Neuro

2007 (第30回日本神経科学大会・第50回日本神経化学会大会・第17回日本神経回路学会大会 合同学会), 横浜, 2007, 9, 12.

- ⑩ 浅沼幹人, 宮崎育子, 三好 耕, 穂積宏彰, 十川紀夫: ドパミンキノン誘発神経障害に対するメタロチオネインの保護効果. Neuro 2007 (第30回日本神経科学大会・第50回日本神経化学会大会・第17回日本神経回路学会大会 合同学会), 横浜, 2007, 9, 12.
- ⑪ 浅沼幹人, 宮崎育子, 三好 耕, 穂積宏彰, 十川紀夫: システイン基含有分子としてのメタロチオネインのドパミンキノン誘発神経障害に対する保護効果. メタロチオネインおよびメタルバイオサイエンス研究会 2007, 徳島, 2007, 9, 28-29.
- ⑫ Miyazaki, I. and Asanuma, M.: Glutathione-increasing mechanism of a novel anti-parkinsonian agent zonisamide in the basal ganglia. 37th Annual Meeting of Society for Neuroscience, San Diego, 2007, 11.4.
- ⑬ Asanuma, M. and Miyazaki, I.: Protective effects of a novel anti-parkinsonian agent zonisamide on dopamine quinone-related neurotoxicity. 37th Annual Meeting of Society for Neuroscience, San Diego, 2007, 11.4.

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： 抗パーキンソン病薬として認知されている Zonisamide の神経保護作用の可能性およびそのメカニズムについて検討した。Zonisamide は、ドパミンおよび MPP+ といった酸化ストレスにともなう神経毒性をもつ薬剤に対し神経細胞保護効果をもつことが確認できた。また Zonisamide による細胞内の伝達シグナルを解析することで保護効果の機序を明らかにしようと試みた。

A 研究目的

抗癲癇薬として使用されるゾニサミドには、抗パーキンソン病の治療薬としての有用性が示され、新規薬剤として期待されている。これまでの研究において Zonisamide がドパミンおよび MPP+ が惹起する酸化ストレスから細胞を保護することが invitro 実験にて確認された。この保護作用メカニズムを解明することは、パーキンソン病の進行を食い止める新たな薬剤として位置づける根拠となる。

B 研究方法

ドパミン作動性神経と同様な機能をもつヒト神経芽細胞腫株（SH-SY5Y 細胞）は 100uM の Retinoic acid により分化誘導の後、ゾニサミド 100uM を培養液に添加、その後神経細胞毒性をもつ薬剤を付加、細胞生存能を測定することで保護効果を検討した。細胞保護効果判定にはミトコンドリアの機能活性をみる MTT reduction assay 法を使用した。またゾニサミド添加後の細胞内タンパク解析も同時に施行した。タンパク質の解析には、SDS-PAGE および Western blott 法を用い PVDF membrane にタンパク質を転写後特異的抗体により目的とするタンパク質を特定した。今回の実験では、構造の類似している2種類の薬剤 Diazoxide および Ethoxzolamide をコントロールとして使用した。

倫理面での配慮では、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ていない。

C 研究結果：

Retinoic acid 500nM および 100uM の zonisamide を培養液中に添加し 10uM の Dopamine HCl を添加した細胞の 6 時間後に MTT reduction assay の結果は、ゾニサミド投与では有意に細胞機能の障害が抑制された。また 50uM の MPP+ にても同様の結果が得られた。コントロール薬剤では保護効果は認められなかった。

Western blott 法による細胞内タンパク質の発現解析の結果、リン酸化 PTEN の蛋白量増加が確認できた。またリン酸化 PI 3 K の増加およびその下流に存在する Akt および FKHL1 (Foxo3a) 転写因子のリン酸化タンパクの増加が認められた。

この結果は Zonisamide が Akt/PI3 経路を活性化し最終的に FKHL1 タンパクのリン酸化を誘導していると考えられた。FKHL1 タンパクはリン酸化により不活性化され apoptosis 関連タンパクの転写を抑制することが知られている。また FKHL1 のリン酸化は MnSOD の転写発現を促進することが報告されている。本研究においても MnSOD の著明な発現増加が認められ FKHL1 のリン酸化と合わせ Zonisamide の保護効果の本質をなすものと考えられた。

E 研究結果の発表

国内外の発表はなし

F 知的財産権の出願・登録状況

なし

神経毒に対するゾニサミドの保護作用
—MPTP、PSI に対する作用—

久保円、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

神経毒の 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) および proteasome inhibitor (PSI) は dopamine 神経を障害することが報告されている。マウスとマーモセットを使用して、これらの神経毒の dopamine 神経に対する作用に対する zonisamide の作用を検討した。

MPTP 投与により C57 BL/6 の線条体 dopamine 含有量は低下した。Zonisamide の投与により MPTP 投与動物 dopamine 代謝は亢進したが、selegiline 投与動物では観察されなかった。MPTP を投与した common marmoset では、dopamine 含有量が顕著に低下した。Zonisamide 投与により、MPTP を処置した動物の dopamine 代謝は亢進した。PSI 投与では線条体 dopamine 含有量に変化は見られなかった。

C57 BL/6 および common marmoset における検討から zonisamide には線条体の dopamine 代謝を促進させる作用があると示唆された。

A. 研究目的

マウスと common marmoset を用いて、神経毒である MPTP と PSI の dopamine 神経細胞障害に対するゾニサミドの作用を検討する。

B. 研究方法

実験 1

マウス(C57 BL/6) に薬物を投与し、7 日後に線条体の dopamine および代謝物質を高速液体クロマトグラフィーにて測定した。

Dopamine 神経毒として、MPTP を投与した。

- MPTP 群：MPTP 15 mg/kg を 2 時間ごとに 4 回(計 60 mg/kg) 皮下に投与した。
- zonisamide + MPTP 群：zonisamide 40 mg/kg を MPTP 投与の 1 時間前に皮下に 1 回のみ投与した。
- selegiline + MPTP 群：selegiline 5 mg/kg を MPTP 投与の 1 時間前に皮下に 1 回のみ投与した。

MPTP を投与しないグループを正常対照動物とし

た。

- 対象群：生理食塩水を皮下に投与した。
- zonisamide 群：zonisamide 40 mg/kg を皮下に 1 回のみ投与した。
- DMSO 群：20% DMSO を皮下に 1 回のみ投与した。

実験 2

Common marmoset に対して MPTP あるいは PSI を皮下投与した。Zonisamide 群では MPTP を投与する 1 時間前に zonisamide 40 mg/kg を皮下に投与した。投与を開始して 2 週間後に線条体の dopamine 代謝物質を高速液体クロマトグラフィーにて測定した。

- MPTP 群：MPTP 2.5 mg/kg を 1 日 1 回、3 日連続 (計 7.5 mg/kg) 皮下投与した。
- zonisamide + MPTP 群：zonisamide 40 mg/kg を MPTP 投与の 1 時間前に毎回 (計 120 mg/kg) 皮下に投与した。
- PSI 群：PSI 3mg/kg を 1 日 1 回、隔日で 4 回 (計

12 mg/kg) 皮下投与した。

- zonisamide + PSI 群: zonisamide 40 mg/kg を PSI 投与の1時間前に毎回 (計 160 mg/kg) 皮下に投与した。

薬物

Zonisamide は dimethyl sulfoxide (DMSO) に懸濁し、生理食塩水で 20% に調整して皮下投与した。MPTP は生理食塩水に溶解して皮下投与した。PSI (Z-Ile-Glu (O-t-butyl)-Ala-Leucinal) 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

C57 BL/6 の正常対照群における線条体 dopamine 含有量は $15.76 \pm 0.52 \mu\text{g/g}$ (mean \pm SE, n=8) であった。MPTP の投与により、線条体 dopamine は 2.25 ± 0.38 (14.3 %) に、zonisamide 群では 2.37 ± 0.52 (15.0 %) に減少した (p<0.001)。Selegiline 群では dopamine は 13.08 ± 1.93 (83.0 %) で、減少していなかった。線条体における dopamine 代謝は正常対照群では、 0.17 ± 0.01 (mean \pm SE, n=8)、MPTP 投与群では 0.41 ± 0.04 、zonisamide 群では 0.68 ± 0.14 、selegiline では 0.31 ± 0.13 であり、zonisamide 群では正常対照群に比べて代謝が亢進していた (p<0.05) (Fig 1)。

Common marmoset の被殻の dopamine 含有量は正常対照群では 15.62, 21.94, 12.57 $\mu\text{g/g}$ 、MPTP 投与群では 0.10, 0.09 $\mu\text{g/g}$ であった。Zonisamide 群では 0.88, 0.32 $\mu\text{g/g}$ であった。Dopamine 代謝は正常対照群では 1.22, 0.82, 0.71、MPTP 群では 0.16, 0.21、zonisamide 群では 0.82, 0.53 であった。PSI 群では dopamine の減少はみられなかった (Fig 2a, 2b)。

脳内モノアミン測定結果

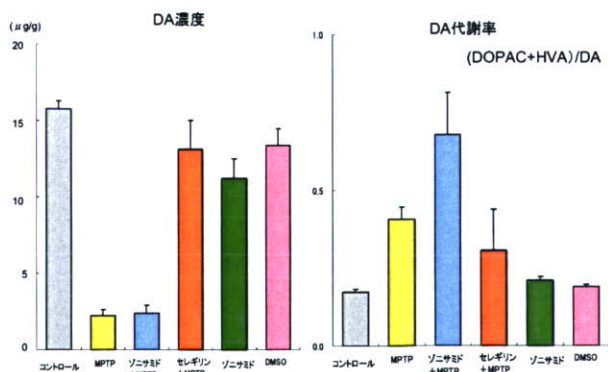


Fig 1. マウス脳内 dopamine 濃度

脳内ドパミン濃度 -被殻-

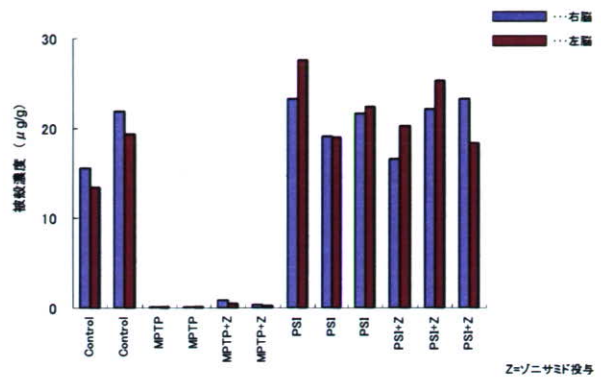


Fig 2a. common marmoset 被殻 dopamine 濃度

脳内ドパミン代謝率 -被殻-

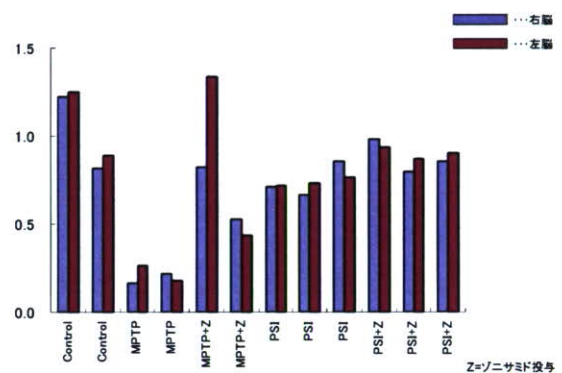


Fig 2b. common marmoset 被殻 dopamine 代謝

D 考察と結論

Zonisamide は C57BL/6 および common marmoset において MPTP により障害された dopamine 神経細胞の代謝を亢進させた。Dopamine 代謝の亢進は dopamine 神経の活動性の上昇を表している。このことから、zonisamide は MPTP による dopamine 神経の障害に対して、dopamine 神経の活動性を保つ方向に作用していると考えられる。以上から zonisamide には、dopamine 神経障害に対して保護的に作用することが示唆される。

F. 健康管理情報

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Fabbrini G, Brotchie JM, Grandas F, Nomoto M, Goetz CG. Levodopa-Induced Dyskinesias. Movement Disorders 22(10) : 1379-1389, 2007.
- 2) Nagai M, Nishikawa N, Yabe H, Moritoyo H, Moritoyo T, Shigematsu Y, Nomoto M. Dopamine agonists and valvular heart

- disease in Japanese patients with Parkinson's disease.
J Neurol 254(S4) : IV54-IV57, 2007.
- 3) Iwata S, Nomoto M, Miyata A.
Microarray Analysis of Laser Capture Microdissected Substantia Nigra Pars Compacta after a Single Administration of MPTP in Common Marmosets.
Jpn. J. Neuropsychopharmacol 27 : 161-166, 2007.
- 4) 矢部 勇人, 野元正弘
ふるえの治療
Modern Physician 27(1) : 40-43, 2007.
- 5) 永井将弘, 野元正弘
パーキンソン病治療薬・塩酸ロピニロール, entacapon, ゴニサミド, rotigotine, istradefylline
医薬ジャーナル新薬展 2007 43(S-1) : 302-306, 2007.
- 6) 永井将弘
パーキンソン病治療における非運動合併症とれもろ 57 : 14-15, 2007.
- 7) 野元正弘
特集 / アカデミアにおける Clinical Research/Trial Center はどうあるべきか - 各国の現状をふまえた提言 - 4. ハイテルベルグ大学病院における臨床薬理学講座 (第6内科)
臨床薬理 38(2) : 69-71, 2007
- 8) 田代英哉, 佐川庸, 岡田憲三, 黒河達雄, 曾我浩之, 渡邊良平, 安岡康夫, 本田和男, 渡部祐司, 雁木淳一, 明比俊, 増田潤, 野元正弘
乳癌術後補助化学療法における Docetaxel + Cyclophosphamide (TC) 療法の安全性
癌と化学療法 34(3) : 393-396, 2007.
- 9) 永井将弘
パーキンソン病患者と病的賭博について
とれもろ 58 : 14-15, 2007.
- 10) 野元正弘
薬物と神経筋障害 : 診断と治療の進歩 I. 薬物による神経障害 2. 中枢神経障害の機序
日本内科学会雑誌 96(8) : 14-18, 2007.
- 11) 西川典子, 野元正弘
Parkinson 病の精神症状
神経内科 66(1) : 84-87, 2007.
- 12) 西川典子, 永井将弘, 矢部勇人, 森豊浩代子, 森豊隆志, 野元正弘
Parkinson 病の運動合併症状に対する apomorphine の治療効果
神経治療学 24(4) : 503-508, 2007.
- 13) 野元正弘
国際共同治験推進会議 in Beppu - 推進に向けて現場は何をすべきか - 責任医師の立場から (2)
臨床評価 35(2) : 212-217, 2007.
- 14) 矢部勇人, 永井将弘, 森豊隆志, 奥田文悟, 野元正弘
片頭痛に合併した繰り返す脳梗塞の 1 例
神経内科 67(3) : 295-298, 2007.
- 15) 野元正弘
神経疾患治療薬の現状と展望
Clinical Neuroscience 25(11) : 1204-1206, 2007.
2. 学会発表
- 1) The Movement Disorders Society's 11th International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders, Istanbul, 6.3-7, 2007. Nagai M, Kubo M, Nishikawa N, Yabe H, Nomoto M.
Inter-individual variations of plasma concentrations of amantadine hydrochloride in patients with Parkinson's disease.
- 2) 第 18 回霧島神経薬理フォーラム, 愛媛, 8.24, 2007.
永井将弘
パーキンソン病治療薬に対する臨床薬理学的アプローチ : 薬物と個体
- 3) The 3rd China-Japan Joint Meeting of Basic and Clinical Pharmacology, Dalian : China, 8.24, 2007.
Nomoto M.
Pharmacokinetic characteristics of agents applied in the treatment of Parkinson's disease.
1. 特許取得
2. 実用新案登録
その他

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

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とマウスによる検討—

分担研究者 南部 篤 自然科学研究機構生理学研究所 教授
研究協力者 橘 吉寿 自然科学研究機構生理学研究所 助教
佐野裕美 難治性疾患克服研究事業 リサーチレジデント

ゾニサミドの抗パーキンソン病作用の機序を明らかにする目的で、パーキンソン病モデルサルにゾニサミドを投与し大脳基底核のニューロン活動の変化を調べたところ、ゾニサミドは淡蒼球や視床下核で観察されるバースト発射や振動活動を正常化させることが明らかとなった。また、ゾニサミドの神経保護作用を探る目的で、遺伝子改変パーキンソン病モデルマウスにゾニサミドの投与を始めた。

南部 篤・自然科学研究機構生理学研究所・教授

A. 研究目的

抗てんかん薬として日本で開発されたゾニサミドが抗パーキンソン病作用を持つことが解ってきたが、その作用機序については不明な点が多い。本研究では、(1) パーキンソン病モデルサルにゾニサミドを投与し、大脳基底核のニューロン活動の変化を調べる、(2) ゾニサミドの神経保護作用を探る目的で、遺伝子改変によって作成されたパーキンソン病モデルマウスにゾニサミドの投与を行う。

B. 研究方法

(1) タイワンザルおよびアカゲザルを用い、まず正常な状態で、淡蒼球内節・外節、視床下核から単一ニューロン活動を記録し、自発発射パターンを調べておく。次に MPTP 神経毒を一側の内頸動脈に注入することにより、ヘミパーキンソン病モデルを作成する。その後、上記と同様の手法で、パーキンソン病の際の淡蒼球や視床下核のニューロン活動を記録する。さらに、ゾニサミドや L-dopa を全身投与（静脈内投与）し、症状の改善、ニューロン活動の変化を調べる。また、記録しているニューロンの近傍にゾニサミドを局所注入する。本実験は、自然科学研究機構岡崎 3 機関動物実験委員会で承認され、また「自然科学研究機構岡崎 3 機関における動物実験に関する指針」に従って行われた。

(2) ゾニサミドの神経保護作用を検討するためには、適切なモデル動物が必要である。ところで、転写因子 Engrailed-1 (En1) と Engrailed-2 (En2) のダブルミュータントマウスのうち、En1 ヘテロかつ En2 ノックアウトマウスにおいてパーキンソン病様所見が認められることが報告されている (Sgado et al., PNAS, 103(41), 15424-15427, 2006)。En1 と En2 は、ほぼ全ての中脳ドーパミンニューロンにおいて、

分化した直後から発現が認められ、成体においても発現が持続する。野生型マウスでは、生後から生後 14 日にかけて中脳ドーパミンニューロンの数が減少するが、それ以降、一定に留まるのに対し、En1 ヘテロ+En2 ノックアウトマウスでは、出生時には野生型マウスと有意差はないが、生後 3 ヶ月ごろまでドーパミンニューロンの減少が続く。このようなことから、本マウスが、ゾニサミドのドーパミンニューロン保護作用を調べる上において、最適ではないかと考え、本モデル動物の導入を行った。本実験は、自然科学研究機構岡崎 3 機関動物実験委員会生理学研究所組換え DNA 実験安全委員会で承認され、また「自然科学研究機構岡崎 3 機関における動物実験に関する指針」に従って行われた。

C. 研究結果

(1) 正常サルにおいて、バースト発射や発振活動といった異常発射パターンを示す基底核ニューロンは数少ない。他方、パーキンソン病モデルサルにおいて、これら異常発射パターンを示す基底核ニューロンが多数観察された。パーキンソン病モデルサルに L-dopa+ゾニサミドの静脈内併用投与を行うと、パーキンソン症状の改善と共に、淡蒼球内節や視床下核ニューロンのバースト発射や発振活動といった異常発射パターンは消失あるいは減弱した。また、ゾニサミド単独の静脈内投与により、L-dopa の効果に及ばないまでも、淡蒼球内節ニューロンの異常発射パターンは改善される傾向にあった。しかし、これらの核にゾニサミドを局所注入しても、異常発射パターンの正常化といった現象は観察されなかった。

(2) En1 と En2 のダブルミュータントマウスをドイツから輸入し、クリーン化を終えた。En1 ヘテロかつ En2 ノックアウトマウスについて経時的に調べたところ、報告されているような中脳ドーパミン作動性ニューロンの減少を確認することができた。現在、ゾニサミドの連続投与を開始したところである。