



Fig 3 黒質のTH染色

D 考察と結論

MPTPの投与によりコモン・マーモセットの線条体ドパミンはほとんど消失し、ゾニサミドの前投与では抑制されないことを昨年度に報告した。本年度は形態学的に中脳のTH免疫染色を行い、黒質ドパミン細胞に対するMPTPおよび、ゾニサミドの作用を検討した。その結果、MPTPにより黒質ドパミン細胞はほとんど、減少した。セレギリンの前投与により細胞数は約半数まで
ゾニサミドはコモン・マーモセットにおいてMPTPによる黒質神経細胞の障害を抑制した。

F. 健康管理情報

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Zonisamide increases dopamine turnover in the striatum of mice and common marmosets treated with MPTP. Hayato Yabe, Mohammed Emamussalehin Choudhury, Madoka Kubo, Noriko Nishikawa, Masahiro Nagai, Masahiro Nomoto. J Pharmacol Sci in press

2) Plasma amantadine concentrations in patients with Parkinson's disease. Nishikawa N, Nagai M, Moritoyo T, Yabe H, Nomoto M. Parkinsonism relat Disord 2009, in press

3) Masahiro Nomoto, Noriko Nishikawa, Masahiro Nagai, Hayato Yabe, Akiko Nakatsuka, Hiroyoko Moriyoto, Takashi Moritoyo, Madoka Kubo. Inter-and intra-individual variation in L-dopa pharmacokinetics in the treatment of Parkinson's disease. Parkinsonism relat Disord 15: S21-S24, 2008.

4) 矢部 勇人, 野元 正弘. ドパミン作動薬の効果と安全性に関する最近の知見. PROGRESS IN MEDICINE. 28:49-52, 2008.

5) 野元 正弘. COMT阻害薬とドパ脱炭酸酵素阻害薬(DCI). Current Therapy 26:72-80, 2008.

6) 野元 正弘. パーキンソン病 総合臨床 57:600-603, 2008.

7) 野元 正弘. 中毒性疾患 今日の治療指針 医学書院 東京 2008.

8) 野元 正弘. 筋弛緩薬, 局所麻酔薬. シンプル薬理学 4版 南江堂 東京 2008

9) 荒木博陽, 野元 正弘. 医薬品過誤ブレアポイド 南江堂 東京 2008.

10) 永井将弘. 内科診療科の臨床薬理 臨床薬理 39:135-136, 2008.

11) 野元 正弘. 治験担当医の研修 臨床薬理 39:45-50, 2008. 12) 野元 正弘. 自主臨床研究審査の課題と問題点-IRBの現状と課題- 臨床評価 36(2):447-451, 2008.

2. 学会発表

1) M Kubo, N Nishikawa, H Yabe, M Nagai, H Moritoyo, T Moritoyo, M Nomoto. Zonisamid increased metabolism of dopamine neurons in MPTP-treated C57BL/6 and common marmosets. The Movement Disorder Society's 12th International congress of

Parkinson' s Disease and Movement Disorders, Chicago, June. 22-28, 2008.

2) Nishikawa, M Kubo, M Nagai, M Nomoto
Content of L-dopa in Mucuna pruriens-the different contents in original or modified beans, and on the methods of cookings. The Movement Disorder Society' s 12th International congress of Parkinson' s Disease and Movement Disorders, Chicago, June. 22-28, 2008.

3) 西川典子, 永井将弘, 久保円, 矢部勇人, 森
豊浩代子, 森豊隆志, 野元正弘
パーキンソン病における上部消化管機能が
L-dopa の動態に与える影響

3) 永井将弘, 西川典子, 矢部勇人, 野元正弘
Entacapone 併用による L-DOPA 薬物動態の
変化第 26 回日本神経治療学会総会, 横浜
市, 6. 26-27, 2008.

4) 第 2 回 Movement Disorder Society, Japan
学術集会, 京都, 10. 2-4, 2008.
永井将弘, 久保円, 西川典子, 矢部勇人, 野元正
弘 L-dopa を含む食品「八升豆」 ～含有量と
血中動態～

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

南部 篤 自然科学研究機構生理学研究所 教授

要旨 ゾニサミドの神経保護作用について調べるため、遺伝子改変によって作製されたパーキンソン病モデルマウスにゾニサミドを投与したところ、中脳ドーパミンニューロンや線条体ドーパミン神経終末の脱落が抑制されることが明らかとなった。

研究分担者
佐野 裕美
自然科学研究機構生理学研究所・特任助教

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。また、神経保護作用をもつ可能性も指摘されている。本研究では、遺伝子改変によって作製されたパーキンソン病モデルマウスにゾニサミドを投与し、ゾニサミドの神経保護作用について調べた。

B. 研究方法

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。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* ヘテロノックアウト (*En1* +/-) かつ *En2* ホモノックアウト (*En2* -/-) マウスにおいてパーキンソン病様の表現型が認められることが報告されている (Sgado et al., 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ことが知られている。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し、それ以降、ほぼ一定に留まる。これに対し、*En1* ヘテロノックアウトかつ *En2* ノックアウトマウス (*En1* +/-; *En2* -/-) では、出生時には野生型マウスと中脳ドーパミンニューロンの数に有意差はないが、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。このことから、本マウスが、ゾニサミドの神経保護作用を調べる上で、パーキンソン病モデル動物として最適ではないかと考えた。

野生型マウスと *En1* +/-; *En2* -/- マウスに生理食塩水またはゾニサミドを生後 21 日から約 2 ヶ月間、1 日 2 回腹腔内投与した。これらのマウスの中脳におけるドーパミンニューロンを抗 tyrosine hydroxylase (TH) 抗体で可視化し、TH 陽性細胞の数を比較した。また、線条体におけるドーパミンニューロンの神経終末も抗 dopamine transporter (DAT) 抗体で可視化し、比較した。

本動物実験は、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、「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。また、遺伝子改変動物に関しては、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た。

C. 研究結果

En1 +/-; *En2* -/- マウスにおける黒質緻密部のドーパミンニューロンは生理食塩水投与群よりゾニサミド投与群において有意に多く認められた。この結果より、ゾニサミドは *En1* +/-; *En2* -/- マウスのドーパミンニューロンに対して神経保護作用を持つことが明らかとなった。しかし、野生型マウスにおける生理食塩水投与群およびゾニサミド投与群と *En1* +/-; *En2* -/- マウスにおけるゾニサミド投与群を比較すると、*En1* +/-; *En2* -/- マウスにおけるゾニサミド投与群のドーパミンニューロンは野生型マウスほど多く認められず、ゾニサミドの神経保護作用は緩やかであることが示唆された。また、線条体におけるドーパミンニューロンの神経終末は、野生型マウスにおける生理食塩水投与群およびゾニサミド投与群と *En1* +/-; *En2* -/- マウスにおけるゾニサミド投与群で同程度の DAT 陽性線維が観察された。

D. 考察

本実験結果により、ゾニサミドがドーパミンニューロンに対して神経保護作用を持つことが明らかとなった。今後は、神経保護作用の機序について調べるため、ゾニサミドがアポトーシス関連分子や神経栄養因子に与える影響について検討したい。

E. 結論

遺伝子改変によって作製されたパーキンソン病モデルマウスにゾニサミドを投与したところ、ゾニサミドが、中脳ドーパミンニューロンや線条体ドーパミン神経終末の脱落を抑制することが明らかとなった。

F. 研究発表

論文発表

Tachibana Y, Kita H, Chiken S, Takada M,

Nambu A (2008) Motor cortical control of internal pallidal activity through glutamatergic and GABAergic inputs in awake monkeys. *Eur J Neurosci* 27: 238-253

Chicken S, Shashidharan P, Nambu A (2008) Cortically evoked long-lasting inhibition of pallidal neurons in a transgenic mouse model of dystonia. *J Neurosci* 28: 13967-13977

Nambu A (2008) Seven problems on the basal ganglia. *Curr Opin Neurobiol* (in press)

Nambu A (2009) Basal ganglia: physiological circuits. In: Squire LR (ed.) *Encyclopedia of Neuroscience*, volume 2, pp. 111-117. Oxford: Academic Press.

Hatanaka N, Tokuno H, Nambu A, Takada M (2009) Transdural doppler ultrasonography monitors cerebral blood flow changes in relation to motor tasks. *Cereb Cortex* (in press).

学会発表

- 南部篤 (2008. 4) 大脳基底核による最適運動制御. 移動知ワークショップ「移動知の新展開」(東京)
- Nambu A (2008. 6) Dynamic model of the basal ganglia functions and movement disorders. 上原記念生命科学財団シンポジウム2008 Systems Biology: The Challenge of Complexity (Tokyo)
- 南部篤 (2008. 7) 私の主張: 定位脳手術時の記録データは宝の山である. 第23回日本大脳基底核研究会 (山梨)
- Nambu A (2008. 7) Cortico-basal ganglia loop and movement disorders. Riken BSI Symposium. Cutting Edge of Neural Circuit Study (Wako)
- 南部篤, 橋吉寿, 喜多均, 西林宏起, 小倉光博, 板倉徹 (2008. 7) ステレオ手術時に記録されたヒト淡蒼球の神経活動. 第31回日本神経科学大会 (東京)
- 知見聡美, Pullanipally Shashidharan, 南部篤 (2008. 7) 全身性ジストニアモデルマウスにおける淡蒼球ニューロンの異常な活動様式と大脳皮質刺激に対する応答様式. 第31回日本神経科学大会 (東京)
- 高良沙幸, 畑中伸彦, 高田昌彦, 南部篤 (2008. 7) サル線条体介在ニューロンの活動様式. 第31回日本神経科学大会 (東京)
- 瀧本大輔, 知見聡美, 宮地重弘, 三上章允, 南部篤 (2008. 7) 運動皮質-視床下核投射の機能の解明. 第31回日本神経科学大会 (東京)
- 岩室宏一, 橋吉久, 齊藤延人, 南部篤 (2008. 7) サルの淡蒼球における大脳皮質運動領野からの視床下核を介した投射様式. 第31回日本神経科学大会 (東京)
- 太田力, 知見聡美, 笹岡俊邦, 勝木元也, 黒川信, 南部篤 (2008. 7) ドーパミン D2 受容体ノックアウトマウスにおける大脳基底核ニューロンの異常な活動様式. 平成20年度 日本動物学会中部支部大会 (富山)
- 南部篤 (2008. 10) 深部脳波は何を計っているか? 脳プロワークショップ (京都)
- 南部篤 (2008. 10) 大脳基底核神経回路とパーキンソン病モデルについて. 脳プロワークショップ (京都)
- 南部篤 (2008. 11) 大脳基底核の謎. 第39回中部化学関係学協会支部連合秋季大会 (名古屋)
- 南部篤 (2008. 12) 脳科学への期待と限界. 総研大合同フォーラム「未来ある人類社会の構築」(葉山)
- 南部篤 (2008. 12) 運動制御の神経回路. 多次元共同脳科学推進センターシンポジウム-総合的に脳科学を理解する人材育成に向けて- (東京)
- 畑中伸彦, 高良沙幸, 高田昌彦, 南部篤 (2008. 12) 運動課題遂行中のサル線条体における神経活動とそのGABA作動性調節. 生理研研究会「大脳皮質-大脳基底核連関と前頭葉機能」(岡崎)
- 南部篤 (2008. 12) 大脳基底核による運動選択. 動物の運動制御に関する研究討論会 (仙台)
- 岩室宏一, 齊藤延人, 南部篤 (2009. 1) サルの視床下核ニューロンの kinesthetic responses. 第48回日本定位・機能神経外科学会 (東京)

- G. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む。)
- 1 特許取得
なし
 - 2 実用新案登録
なし
 - 3 その他
なし

厚生労働科学研究費補助金（ゾニサミド研究事業）
総括・分担）研究 20 年度報告書
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。これまでの研究で Zonisamide は、Dopamine 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についても MnSOD の発現量を増加させることが確認できている。本年度はさらに発展的に研究をすすめることでさらなる保護効果の機序解明に努めた。

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。また前年度において Zonisamide 投与が Akt/PIP3 経路の活性化を促し下流である FKHL1 タンパクのリン酸化を促進し、MnSOD の発現量を上昇させることを報告した。本年度ではさらなるストレス抑制効果と再現性の確立に力点を置き研究を進めた。

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、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。また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：

MnSOD の発現量は時間依存的、また濃度依存的に上昇することが確認された。時間的には 48 時間が最大であり濃度 200uM にて最大の発現量を Western Blotting 法にて確認した。また 0.1uM の Staurosporine により誘導される Cleaved caspase3/9 の発現量は Zonisamide 投与において優位に抑制された。この結果は Dopamine および MPP+ 以外の薬剤による細胞死も抑制する可能性が示唆された。また Zonisamide の autophagy に関する検討では、Zonisamide は autophagy に関与しないことが示された。

E 研究結果の発表

第 49 回日本神経学会総会にて発表

F 知的財産権の出願・登録状況

なし

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

ゾニサミドのアストログリアの増殖促進作用の発現機序ならびに
パーキンソン病モデルにおけるドパミン神経保護効果

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ならびに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を明らかにした。また、一昨年度は 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ドパミン (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。さらに昨年度は、ゾニサミドが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 xCT 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、結果的に神経での GSH 量を増加させることを明らかにした。本年度は、ゾニサミドのアストログリアの増殖促進作用のメカニズムを明らかにし、PD モデルでの DA 神経保護効果を再確認するために、培養アストログリアおよび PD モデルマウスを用いて検討した。ゾニサミド (100 μM) の 24 時間持続添加により、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、このゾニサミドによる C6 細胞の増殖効果は、抗 S100 β 抗体の添加により抑制された。また、線条体初代培養アストログリアにおいてもゾニサミド (100 μM) の 24 時間持続添加により有意な増殖促進が認められた。マウスへのゾニサミド (30 mg/kg, i. p.) の連日投与により、脳内 GSH は著増し、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、片側 PD モデルの 6-OHDA 注入 3 週後に障害側黒質緻密層ならびに障害側線条体の DA 神経細胞の著明な脱落と障害がみられ、4 週後においても維持され、むしろ増悪していたが、これらの黒質線条体系の DA 神経の脱落は 6-OHDA 注入 3 週間からのゾニサミド (30 mg/kg, i. p.) 1 週間連日投与により有意に抑制された。アストログリアから分泌される S100 β 蛋白は、アストログリアの増殖を促進させることが知られている。これまでの研究結果を総合すると、ゾニサミドはアストログリアからの S100 β 蛋白分泌を促進させることによりアストログリアの増殖を促進し、あるいは活性型アストログリア上の xCT の発現誘導によりアストログリアでの GSH 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 GSH 量を増加させるというメカニズムを明らかにできた。さらに、片側 PD モデルへのゾニサミド連日投与が、黒質線条体系の DA 神経の脱落に対して確かに保護効果を発揮していることを確認できた。

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、一昨年度の検討では、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。そこで昨年度は、ゾニサミドがS100β陽性の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xCT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、結果的にニューロンでのグルタチオン量を増加させることを明らかにした。

また一昨年度は、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、ゾニサミドのアストログリアの増殖促進作用のメカニズムを明らかにし、パーキンソン病モデルでのドパミン神経保護効果を再確認するために、培養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検討した。

B. 研究方法

1. 培養アストログリアの増殖およびグルタチオンへのゾニサミドの作用

ラット由来アストログリア C6 細胞 (2.8×10^4 cells/cm²) およびラット胎児 (E15) 由来線条体初代培養アストログリア (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 μ M) を添加し、1 日間培養し、グルタチオン量を測定した。また、総アストログリア細胞数を Hoechst 核染色により測定した。

2. 片側パーキンソン病モデルマウスでの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運動を確認し、3 群に分けた。さらに 1 週間後 (6-OHDA 注入 3 週後) に 1 群は 4% paraformaldehyde で灌流固定し、残りの 2 群は 6-OHDA 注入 3 週後より 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 (6-OHDA 注入 4 週後) に灌流固定し、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、総アストログリアの指標である S100 β の染色を行った。

C. 研究結果

1. 培養アストログリアの増殖およびグルタチオンへのゾニサミドの作用

ゾニサミド (100 μ M) の 24 時間持続添加により、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た。このゾニサミドによるアストログリア C6 細胞の増殖効果は、抗 S100 β 抗体の添加により抑制された。また、線条体初代培養アストログリアにおいても、ゾニサミド (100 μ M) の 24 時間持続添加により有意な増殖促進効果が認められた。

2. 片側パーキンソン病モデルマウスでの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

マウスにゾニサミド 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。

6-OHDA の線条体注入により作製した片側パーキンソン病モデルマウスに 6-OHDA 注入 3 週後より 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、投与前 (6-OHDA 注入 3 週後) と比較することにより、パーキンソン病モデルでの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再評価した。 6-OHDA 注入 3 週後に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、4 週後においても維持され、あるいはむしろ増悪していたが、これらの黒質線条体系のドパミン神経の脱落は 6-OHDA 注入 3 週後からのゾニサミド Na (30 mg/kg, i.p.) 1 週間連日投与により抑制された。

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、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という神経アストログリア連関が存在する。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

からも、昨年までにグルタチオン合成における神経アストログリアに関して着目し、ゾニサミドは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には影響せず、S100 β 陽性の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の発現誘導を引き起こすことを明らかにした。このようなアストログリアへの作用により、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。また、昨年度の検討で、大脳基底核のグルタチオン量を著増させる用量のゾニサミドNa(30 mg/kg, i. p.)をマウスに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だけでなく、細胞間隙でのS100 β 陽性シグナルの増強も認められた。S100 β 蛋白は分泌性タンパクで、アストログリアの増殖を促進させることが知られている。そこで本年度は、ゾニサミドのアストログリアの増殖促進作用のメカニズムを明らかにするために、培養アストログリアを用いてS100 β の分泌に対するゾニサミドの効果について検討した。

今回の検討においても、ゾニサミドの持続添加によりアストログリアC6細胞において細胞増殖を伴ったグルタチオン量の増加が認められた。さらに、線条体初代培養アストログリアにゾニサミドを添加したところ、同様に細胞増殖促進効果がみられた。さらに、ゾニサミドによるC6細胞の増殖効果は、抗S100 β 抗体の添加により抑制された。S100 β 蛋白は主にアストログリアから分泌され、autocrine的にアストログリアの増殖を促進させることが知られている。

これらの研究結果から、ゾニサミドが、アストログリアからのS100 β 蛋白分泌を介して非活性型アストログリアの増殖を促進し、あるいは活性型アストログリア上のxCTの発現誘導を引き起こすことによって、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。

一昨年度、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した。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た。しかし、6-OHDA注入パーキンソン病モデルでは1-2ヶ月後にドパミン神経障害は快復する。そこで、ゾニサミド連日投与の神経保護効果を再確認するために、今回ゾニサミド投与前後の障害の程度を比較した。

6-OHDA注入3週後の黒質ならびに線条体でのドパミン神経細胞の著明な脱落と障害は、4週間後においても維持されており、あるいはむしろ増悪しており、少なくとも3-4週間後に快復傾向は認められなかった。そして、これらの黒質線条体系のドパミン神経の障害は6-OHDA注入3週間からのゾニサミドの1週間連日投与により抑制されることを確認できた。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、アストログリアからのS100 β 蛋白の分泌を促進させる因子、xCTの発現増加にかかわる因子に対するゾニサミドの作用の有無について検討を行う。また、これらにはたらく薬剤を明らかにすることで、さらには新たなパーキンソン病治療薬、方策の開発を期待できる。

E. 結論

ゾニサミドがアストログリアからのS100 β 蛋白分泌を促進させ、非活性型アストログリアの増殖を促進させていることを明

らかにした。これまでの研究結果を総合すると、ゾニサミドはアストログリアからのS100 β 蛋白分泌を介した非活性型アストログリアの増殖を促進し、あるいは活性型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すことによって、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を増加させるというメカニズムを明らかにできた。さらに、片側パーキンソン病モデルへのゾニサミド連日投与が、黒質線条体系のドバミン神経の脱落に対して確かに保護効果を発揮していることを再確認できた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- ① Asanuma, M., Miyazaki, I., 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.
- ② 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.
- ③ 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.*, 177: 123-129, 2008.
- ④ 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.*, 172: 11-21, 2008.

- ⑤ 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.*, 60: 355-363, 2008.
- ⑥ Miyazaki, I. and Asanuma, M.: Dopaminergic neuron-specific oxidative stress caused by dopamine itself. *Acta Med. Okayama*, 62: 141-150, 2008.
- ⑦ Asanuma, M. and Miyazaki, I.: Nonsteroidal anti-inflammatory drugs in experimental parkinsonian models and Parkinson's disease. *Curr. Pharm. Design*, 14: 1428-1434, 2008.
- ⑧ Diaz-Corrales, F.J., Asanuma, M., Miyazaki, I., Miyoshi, K., Hattori, N. and Ogawa, N.: Dopamine induces supernumerary centrosomes and subsequent cell death through Cdk2 up-regulation in dopaminergic neuronal cells. *Neurotox. Res.*, 14: 295-305, 2008.
- ⑨ Tsuji, T., Asanuma, M., Miyazaki, I., Miyoshi, K. and Ogawa, N.: Reduction of nuclear peroxisome proliferator-activated receptor γ expression in methamphetamine-induced neurotoxicity and neuroprotective effects of ibuprofen. *Neurochem. Res.*, in press.
- ⑩ Miyazaki, I. and Asanuma, M.: Approaches to prevent dopamine quinone-induced neurotoxicity. *Neurochem. Res.*, in press.

2. 学会等発表

- ① 田中健一, 八木崇夫, 吉田和代, 定金浩嗣, 浅沼幹人: クリフアポイダンステストを用いた不安関連行動の評価に関する研究. 第81回日本薬理学会年会, 横浜, 2008, 3, 17.
- ② 竹島美香, 田中弓子, 染矢 恵, 村田麻衣子, 宮崎育子, 浅沼幹人, 喜多大三: フラボン配糖体バイカリンの培養ドパミン神経系への作用. 第81回日本薬理学会年会, 横浜, 2008, 3, 18.
- ③ 穂積宏彰, 浅沼幹人, 宮崎育子, 福岡早紀, 吉川友理, 木本直孝, 北村佳久, 千堂年昭, 喜多大三, 五味田 裕: メタンフェタミン急性神経毒性に対する IFN- γ の保護効果. 第81回日本薬理学会年会, 横浜, 2008, 3, 18.
- ④ 長町智子, 宮崎育子, 江本清香, 土居真穂, 川崎博巳, 浅沼幹人, 北村佳久, 千堂年昭, 五味田 裕: ラット海馬神経細胞及びアストロサイトの形態学的変化に対する ACTH 反復投与の影響. 第81回日本薬理学会年会, 横浜, 2008, 3, 18.
- ⑤ 浅沼幹人: グルタチオン: 新しいパーキンソン病治療戦略. ランチョンセミナー 18, 第49回日本神経学会総会, 横浜, 2008, 5, 16.
- ⑥ 浅沼幹人: 脳における酸化ストレス評価の落とし穴. シンポジウム2「酸化ストレス評価の現状と問題点」, 第61回日本酸化ストレス学会学術集会, 京都, 2008, 6, 19.
- ⑦ 三好 耕, 笠原恭輔, 宮崎育子, 浅沼幹人: Pericentrin 変異マウスを用いた神経細胞繊毛の機能解析. 第31回日本神経科学大会, 東京, 2008, 7, 10.
- ⑧ 浅沼幹人, 福岡早紀, 穂積宏彰, 宮崎育子, 北村佳久, 千堂年昭, 喜多大三: メタンフェタミン神経毒性に対するインターフェロン γ の保護効果における PPAR γ の関与. 第51回日本神経化学学会大会, 富山, 2008, 9, 12.
- ⑨ 宮崎育子, 吉川友理, 木本直孝, 三好 耕, 浅沼幹人: L-DOPA 投与に特異的な活性化アストロサイトにおけるメタロチオネインの発現誘導. 第51回日本神経化学学会大会, 富山, 2008, 9, 13.
- ⑩ 三好 耕, 笠原恭輔, 宮崎育子, 浅沼幹人: 神経細胞1次繊毛の精神疾患への関与. 第51回日本神経化学学会大会, 富山, 2008, 9, 13.
- ⑪ 三好 耕, 笠原恭輔, 宮崎育子, 浅沼幹人: 神経細胞1次繊毛は情動や摂食に関与する. 第2回アジア・太平洋生物学的精神医学会, 第30回日本生物学的精神医学会, 富山, 2008, 9, 13.
- ⑫ 笠原恭輔, 三好 耕, 宮崎育子, 浅沼幹人: マウス脳の神経細胞1次繊毛に対する向精神薬の作用. 第2回アジア・太平洋生物学的精神医学会, 第30回日本生物学的精神医学会, 富山, 2008, 9, 13.
- ⑬ 浅沼幹人: ドパミン神経保護に関するトランスレーショナルリサーチ. 神経化学の若手研究者育成セミナー 9. 「神経伝達機構の基礎研究と病態研究それぞれの魅力」, 第51回日本神経化学学会大会, 富山, 2008, 9, 12-13.
- ⑭ 宮崎育子, 吉川友理, 木本直孝, 三好 耕, 浅沼幹人: グリアでのメタロチオネイン発現誘導によるドパミン神経保護効果. 第18回日本臨床精神神経薬理学会・第38回日本神経精神薬理学会合同大会, 品川, 2008, 10, 1.
- ⑮ 染矢 恵, 村田麻衣子, 竹島美香, 宮崎育子, 浅沼幹人, 喜多大三: テアニンの培養モノアミン神経およびグリア細胞系への作用. 第18回日本臨床精神神経薬理学会・第38回日本神経精神薬理学会合同大会, 品川, 2008, 10, 2.
- ⑯ Kitamura, Y., Kitagawa, K., Miyazaki, T., Nagamachi, T., Doi, M., Miyazaki, I., Asanuma, M., Sendo, T., Kawasaki, H., Gomita, Y.: Development of animal model of treatment-resistant-depression in rats -Effects of antidepressants on the duration of immobility of ACTH-treated rats in the forced swim test-. 38th Annual Meeting of

Society for Neuroscience, Washington D.C.,
2008, 11.16.

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

Ⅲ. 開催会議

20年度班会議

日時：2009年2月7日（土） 11:00～16:00

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：村田美穂、金澤一郎、浅沼幹人、宮崎育子、近藤智善、久保 円、佐野裕美、戸田達史、南部 篤、野元正弘、チョウドリー エムディ エマムソサレヒン
長谷川一子、堀内恵美子、町田 裕、河尻澄宏、佐藤栄人、三輪英人、畑中仲彦、堤 悦子、藤田晶子、山根容子
(以上21名)

～プログラム～

11:00～ ご挨拶 村田美穂

11:10～11:35

- ① 実験的パーキンソン病振戦モデルに対するゾニサミドの効果
○三輪英人、久保友美、梶本賀義、浜喜和、近藤智善 和歌山県立医科大学神経内科

11:35～12:00

- ② パーキンソン病治療におけるゾニサミドの長期効果—9年間までの follow up
○村田美穂 国立精神・神経センター病院 神経内科

12:00～12:25

- ③ 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

○戸田達史^{1) 2)}、佐竹涉¹⁾、水田依久子¹⁾、三井純³⁾、長谷川一子⁴⁾、辻省次³⁾、中村祐輔⁵⁾、山本光利⁶⁾、服部信孝⁷⁾、村田美穂⁸⁾

¹⁾ 大阪大学院臨床遺伝、²⁾ 神戸大学神経内科、³⁾ 東京大学神経内科、⁴⁾ 国立病院機構相模原病院神経内科、⁵⁾ 東京大学医科学研究所、⁶⁾ 香川県立中央病院神経内科、⁷⁾ 順天堂大学脳神経内科、⁸⁾ 国立精神・神経センター病院神経内科

12:25~13:25 昼食

13:25~13:50

- 4 喘息患者における restless legs syndrome についての検討
○堀内恵美子¹⁾ 釣木澤尚実²⁾, 押方智也子²⁾, 長谷川真紀²⁾, 秋山憲義²⁾, 公文 彩¹⁾
1. 相模原病院神経内科
2. 相模原病院アレルギー科

13:50~14:15

- 5 ソニサミドの神経保護作用の可能性について
—コモンマーモセット黒質神経細胞の免疫組織学的検討—
○チョウドリー エムディ エマムソサレヒン¹⁾、森豊 隆志¹⁾、久保 円¹⁾、矢部 勇人¹⁾、
山宮 公子²⁾、松田 正司²⁾、野元 正弘¹⁾
1) 愛媛大学大学院病態治療内科学
2) 同 解剖学・発生学

14:15~14:40

- 6 ソニサミドの神経保護作用—遺伝子改変パーキンソン病モデルマウスによる検討—
○佐野裕美, 南部 篤
生理学研究所・生体システム研究部門

14:40~15:05

- 7 Zonisamide の神経細胞保護機構についての検討
○河尻澄宏, 町田 裕, 斉木臣二, 佐藤栄人, 服部信孝
順天堂大学医学部脳神経内科

15:05~15:30

- 8 ソニサミドのアストログリアの増殖促進作用の発現機序ならびにパーキンソン病モデルにおける
ドパミン神経保護効果
○浅沼幹人, 宮崎育子

15:30~16:00 総合討論

IV. 班構成員名簿

「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班」

(H18-難治 - 一般 - 005)

平成 20 年度班構成員

	氏 名	所 属	職 名
主任研究者	村田 美穂	国立精神・神経センター病院神経内科	第2病棟 部長
分担研究者	浅沼 幹人	岡山大学大学院医歯学総合研究科 神経制御学講座神経情報学	准教授
	近藤 智善	公立大学法人和歌山県立医科大学医学部 神経内科学	教授
	戸田 達史	大阪大学大学院医学研究科遺伝医学講座 臨床遺伝学	教授
	南部 篤	岡崎大学共同利用機関法人自然科学研究機構 生理学研究所生体システム研究部門	教授
	野元 正弘	愛媛大学大学院医学系研究科病態治療内科学	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	順天堂大学医学部附属順天堂医院 脳神経内科	教授
事務局	山根 容子	国立精神・神経センター病院 第2病棟部長室 〒187-8551 東京都小平市小川東町 4-1-1 Tel. 042-346-2712(3419) Fax. 042-346-1735	

V. 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（平成 20 年度）

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
Kanagawa M, <u>Toda T.</u>	Fukutin and Fukuyama congenital muscular dystrophy		Glycoscience Lab Manual	Elsevier Science Publishers	Japan	2008	309-312
<u>Nambu A.</u>	Basal ganglia;physiological circuits	Squire LR	Encyclopedia of Neuroscience	Academic Press	Oxford	2009	111-117
<u>野元正弘.</u>	中毒性疾患		今日の治療指針	医学書院	東京	2008	115-116
<u>野元正弘.</u>	筋弛緩薬, 局所麻酔薬		シンプル薬理学改訂第4版	南江社	東京	2008	87-93
荒木博陽, <u>野元正弘.</u>			医薬品過誤 プレアボイド —落とし穴に 気をつけて	南江社	東京	2008	

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
Asanuma, M., Miyazaki, I., Diaz-Corrales, F.J., Miyoshi, K., Ogawa, N. and <u>Murata, M.</u>	Preventing effects of a novel anti-parkinsonian agent zonisamide on dopamine quinone formation.	Neurosci. Res.	60	106-113	2008
Narimatsu, S., Yonemoto, R., Masuda, K., Katsu, T., <u>Asanuma, M.</u> , 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
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.	177	123-129	2008

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.	172	11-21	2008
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.	60	355-363	2008
Miyazaki, I. and Asanuma, M.	Dopaminergic neuron-specific oxidative stress caused by dopamine itself.	Acta Med. Okayama	62	141-150	2008
Asanuma, M. and Miyazaki, I.	Nonsteroidal anti-inflammatory drugs in experimental parkinsonian models and Parkinson's disease.	Curr. Pharm. Design	14	1428-1434	2008
Diaz-Corrales, F.J., Asanuma, M., Miyazaki, I., Miyoshi, K., Hattori, N. and Ogawa, N.	Dopamine induces supernumerary centrosomes and subsequent cell death through Cdk2 up-regulation in dopaminergic neuronal cells.	Neurotox. Res.	14	295-305	2008
Tsuji, T., Asanuma, M., Miyazaki, I., Miyoshi, K. and Ogawa, N.	Reduction of nuclear peroxisome proliferator-activated receptor α expression in methamphetamine-induced neurotoxicity and neuroprotective effects of ibuprofen.	Neurochem. Res.	in press		
Miyazaki, I. and Asanuma, M.	Approaches to prevent dopamine quinone-induced neurotoxicity.	Neurochem. Res.	in press		
Noriko Nishikawa, Masahiro Nagai, Takashi Moritoyo, Hayato Yabe, Masahiro Nomoto	Plasma amantadine concentrations in patients with Parkinson's disease	Parkinsonism & Related Disorders	2008 Sep 26 [Epub ahead of print]		
Masahiro Nomoto, Noriko Nishikawa, Masahiro Nagai, Hayato Yabe, Akiko Nakatsuka, Hiroyoko Moriyoto, Takashi Moritoyo, Madoka Kubo	Inter- and intra-individual variation in L-dopa pharmacokinetics in the treatment of Parkinson's disease	Parkinsonism and Related Disorders	15(1)	S21-S24	2009