

200834005B

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班

平成18-20年度 総合研究報告書

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

平成 21 (2009) 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班 国立精神・神経センター病院神経内科	村田 美穂	1
II.	分担研究報告		
	新しい抗パーキンソン病薬・Zonisamideの臨床的研究 および効果は発現機序に関する基礎的研究 和歌山県立医科大学神経内科	近藤 智善	7
	新規抗パーキンソン病薬ゾニサミドの長期効果と作用機序 国立精神・神経センター病院 神経内科	村田 美穂	9
	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	12
	新規抗パーキンソン病薬ゾニサミドの有効性探索に関するわが国における二次性 レストレスレッグ症候群の疫学に関する研究 国立病院機構相模原病院神経内科	長谷川 一子	14
	神経毒に対するゾニサミドの保護作用 愛媛大学大学院病態治療内科	野元 正弘	17
	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 生理学研究所・生体システム研究部門	南部 篤	22
	Zonisamide のもつ神経保護作用についての基礎的研究 順天堂大学医学部脳神経内科	服部 信孝	27
	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薬学総合研究所脳神経制御講座神経情報学	浅沼 幹人	28
III.	開催会議		37
IV.	班構成員名簿		45
V.	研究成果の発刊に関する一覧		49

# I. 総括報告書

## 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

主任研究者 村田 美穂 国立精神・神経センター病院・第2病棟部長

研究要旨:主任研究者が抗パーキンソン作用を発見したゾニサミド(ZNS)の神経保護作用の検証とその作用機序、抗PD効果とその作用機序、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 の神経保護作用を中心に多角的に研究を展開した。

培養細胞及びげっ歯類から霊長類まで、60HDA, MPTP, Engrailed mutant など、多様なドパミン神経細胞死のモデルに対し、ZNS が治療量で強い神経保護効果を示すことを示した。この強力な神経保護作用の作用機序としては ZNS が、1) 非活性化型アストログリア増殖の促進、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により、アストログリアでのシスチン取り込み増加を介して、神経細胞での著明なグルタチオン増加をおこすこと、2) PTEN, PIP3/Akt, FLHRL1, MnSOD の一連の系を活性化し、ミトコンドリア内に局在して活性酸素種を除去する MnSOD 発現量を著明に増加させることを明らかにした。これらの結果は ZNS がドパミン神経のみならず多くの神経変性疾患において、神経保護薬として効果を示すことを示唆している。

抗PD効果の作用点は、被殻、黒質と考えられ、L-dopa 併用により効果が増強されるが、ZNS 単独でも PD で認める基底核の異常発射パターンを正常化すること、ドパミン合成進行作用を示すことを明らかにした。また、ZNS がドパミン系を介さない、おそらく T 型 Ca チャネル阻害作用を介すると思われる、抗振戦作用を持つことを明らかにし、さらにこの作用機序としては振戦源そのものより運動回路網への作用であることを示した。

今後、今回見出したアストログリアの増殖因子とグルタチオン合成に係るアミノ酸取り込みの神経・アストログリア連関および、engrailed mutant mouse における神経保護効果の作用機序に注目し、新たな神経保護薬の開発に結び付けたい。

また、ZNSの著効例、無効例についての遺伝学的検索により、有効性に関連する候補SNPを見出した。今後症例数をふやし、関連を明らかにする予定である。

### 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・教授
戸田達史	大阪大学大学院・教授
南部 篤	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・助教授
長谷川一子	国立相模原病院・医長

認知症の合併により、患者、家族のみならず社会的にも大きな課題となっている疾患である。

L-dopa を初め多数の抗PD薬が開発され、治療効果は向上しつつあるが、いずれもPDの進行に伴って減少するドパミンをなんらかの形で補充するのみであるので、疾患の進行に伴い治療効果は低下する。ドパミン神経細胞変性を50%程度に抑制できれば、現存の薬剤でもかなりよい状態を維持できると考えられるが、変性の進行を抑制する神経保護薬はまだ存在せず、抗PD作用とともに神経保護作用を持つ薬剤の誕生が強く望まれている。

主任研究者はわが国で開発された抗てんかん薬ゾニサミド(ZNS)がすぐれた抗

### A. 研究目的

パーキンソン病(PD)はアルツハイマー病について頻度の高い神経変性疾患であり、高齢化に伴い患者数はますます増加し、しかも日常生活動作(ADL)の悪化や長期例における

PD 作用を持つことを 2001 年に発見し、その効果について、大規模臨床試験を進めるとともに、作用機序を明らかにしてきた。ZNS は抗てんかん薬としての開発も kindling model での痙攣抑制効果を指標として見出されたものであり、抗 PD 薬としての発見も実際の PD 患者での臨床効果の観察をきっかけにしている。つまり、既知の作用機序を指標に開発した薬剤ではなく、未知の作用機序である可能性もあり、しかも多機能をもつ物質である。

主任研究者らはこの薬剤の作用機序の研究のなかで、本薬剤の抗 PD 作用がドパミン合成亢進および中等度のモノアミン酸化酵素阻害作用によることを見出したが、さらに、ZNS はドパミン系を介さない著明な神経保護作用をもつことを見出した。この効果は臨床的に抗 PD 効果を得るのと同様の薬量で認めており、しかも、PD を対象とした長期投与試験では平均罹患期間が 9 年の進行例であるにも係らず、1 年間にわたり、より症状が改善する傾向にあったことから、臨床的に有意な神経保護作用が期待できると考えた。

以上より、本研究では、ZNS の神経保護作用について、1) 各種動物モデルおよび 2) 培養細胞系での検証、3) その作用機序の解明、4) 臨床的検証、PD の経過に対する ZNS の長期効果の検証、さらに、ZNS の抗 PD 効果の作用機序がまだ十分解明されていないことから、5) 抗 PD 薬としてのドパミン合成促進、中等度の MAOB 阻害作用以外の作用機序の解明、6) PD のオーダーメイド治療を視野にいれ、ZNS の効果の程度と関連する SNP の検索、7) PD 以外の疾患への ZNS の効果の検索を目的とした。

なお、神経保護作用の臨床的検証については、PD を対象とした神経保護薬の効果評価の方法論については国際的にも多くの論争があったため、1 年目は方法論の評価とし、方法論が確立した時点で大規模臨床試験を開始し、臨床的に実証したいと考えた。

本薬剤は 2009 年 1 月に新しい作用機序を持つ抗パーキンソン病薬として、製造販売承認を得た。

## B. 研究方法・研究結果・考察

### 1) 各種 PD 動物モデルでの ZNS の神経保

### 護作用の検証

#### a) 6OHDA マウス (浅沼)

6OHDA による片側 PD モデルを作成し 3 週後に ZNS を投与し、黒質ドパミン細胞及び線条体のドパミン神経終末数を対照と比較し、ZNS 投与群では有意に残存チロシン水酸化酵素 (TH) 陽性神経細胞及び、線条体の TH 陽性神経終末が多いことを確認した。さらに、3 週後に 1 週間 ZNS 投与群と対照群をつくり、4 週後に断頭し、3 週間後の検体と比較することで、進行中の変性に対し、ZNS が保護的に作用することを示した。

#### b) MPTP コモンマーモセット及びマウス (野元)

コモンマーモセットに MPTP を投与し、MPTP 投与 1 時間前に ZNS (40mg/kg) または selegiline (5mg/kg) 投与を 3 日間行い、TH 染色により、黒質ドパミン細胞数及び残存細胞面積を検討したところ、ZNS は selegiline よりも弱い、非投与群に比較してドパミン細胞数、残存面積とも高かった。

また、コモンマーモセットおよびマウスでの MPTP 及び ZNS 投与実験でドパミン代謝 [ (DOPAC+HVA) / DA ] を検討したところ、ZNS 投与群ではドパミン代謝の亢進を認めた。ドパミン代謝亢進はドパミン神経活動性を示していると考えられ、ZNS は MPTP によるドパミン神経障害に対し保護的に作用し、その後の回復を促すと考えられた。

#### c) PD 自然発症マウスモデル (南部)

パーキンソン病自然発症モデルと考えられている転写因子 Engrailed-1 (En1) と Engrailed-2 (En2) の double mutant mouse, En1 (+/-) En2 (-/-) (Sgado, et al. 2006) を用い、生後 3 週後より 2 ヶ月間 ZNS 投与を行い、中脳ドパミン神経細胞および線条体ドパミン神経終末について評価した。

En1 (+/-), En2 (-/-) で、中脳ドパミン作動性ニューロンの減少を確認した。ZNS は神経終末、中脳ドパミン神経の両者の減少を明らかに抑制し、ZNS の神経保護作用が示された。抑制作用は神経終末でより強かった。今後、この作用機序を明らかにしていく予定である。

### 2) 培養細胞におけるドパミン神経細

### 胞死モデルでのZNSの神経保護作用の検証 (服部)

MTT assay 及び、TUNEL染色を用いて、Retinoic acidで分化誘導したSH-SY5Y細胞を用いて、ドパミン(10 $\mu$ M)、MPP+(50 $\mu$ M)、staurosporine(0.5 $\mu$ M)による細胞死に対し、ZNS 100 $\mu$ Mが保護的に作用することを明らかにした。

#### 3) ZNSの神経保護作用の発現機序

##### a) キノン体消去作用 (浅沼)

60HDAによる片側PDモデルマウスにL-dopaを投与すると障害側線条体ではドパミンキノンが著明に増加するが、ZNSはこれをほぼ正常レベルにまで抑制することを見出した。このL-DOPA誘発キノン体障害性に対するZNSの保護・抑制効果のメカニズムとして、①ドパミン、L-DOPAに対する安定なメラニンへの変換、②著明なキノン体消去能を持つグルタチオンの増加、あるいは③キノン体消去系諸因子への賦活が考えられたが、キノン還元酵素NQO-1やその転写因子のNrf2の蛋白発現はZNS投与により影響されなかった。

##### b) グルタチオン増加作用 (浅沼)

正常マウスへの投与により、ZNSは用量依存的に線条体グルタチオン(GSH)を著明に増加させた。

##### c) グリアを介した神経保護作用 (浅沼)

ドパミン含有神経細胞培養液中にZNSを添加してもGSHの増加は認めなかったが、アストログリア系細胞では有意なGSH増加を認めた。このため、ZNSのアストログリアへの作用を検討したところ、ZNSは非活性型グリアの増殖作用および、グリアのシスチン・グルタミン酸トランスポーター(xCT)の発現増加作用を認めた。ZNSの非活性型グリア増殖作用はS100 $\beta$ 分泌を介していた。

片側PDモデルマウスではL-dopa投与により障害側線条体でGFAP陽性アストログリアの活性化を悪化させたが、ZNSはL-dopaの投与の有無にかかわらず、障害側線条体のGFAP陽性活性化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、非障害側線条体のS100 $\beta$ 陽性アストログリアを増加させた。

つまり、ZNSはS100 $\beta$ を介して非活性型グリアを増殖させ、あるいはグリア上のxCT発現誘導をおこすことで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した。

##### d) PI3K/Akt系活性化・MnSOD増加作用 (服部)

培養細胞系でZNSの強い神経保護作用を確認したことから、まず遺伝性パーキンソン病の原因遺伝子であるparkin, PINK1などに対する効果を検討したところ、PTEN(Phosphatase and tensin homolog)蛋白発現増加およびその下流のAkt1蛋白、さらにAkt pathwayの最終機転とされるForkhead transcription factor (FOXO3A)のリン酸化を確認した。PTEN, AktおよびFKHRL1 (FOXO3A)のリン酸化はAnti-apoptotic signal pathwayとして知られており、ZNSがPI3K/Akt系を介しFKHRL1をリン酸化しInactivateにすることでanti-apoptotic作用を示していることが推測された。

さらにFOXO3aが制御するMnSODの発現量はZNSの時間依存的、濃度依存的に上昇することを確認した。Staurosporineにより誘導されるCaspase 3の発現量はZNSにより有意に抑制され、ZNSのanti-apoptotic作用が確認された。

一方同様にAktを介するautophagyに対してはZNSは影響を与えなかった。

#### 4) ZNSのPD経過に対する長期効果

##### ① 1年間の長期効果 (近藤)

ZNSの併用が有効であったPD患者で、一年以上維持療法としてZNS服薬が継続され、ZNS休薬に同意した12例を対象に、ZNSの一ヶ月休薬前後のUnified Parkinson's Disease Rating Scale (UPDRS)運動スケールの点数を比較した。

ZNS休薬によってUPDRSの運動スケールの点数の増大が有意に認められ、ZNSの効果の持続が確認された。

##### ② 9年間までの長期効果 (村田)

ZNSを投与して5-9年間経過観察しえたパーキンソン病患者8例の臨床症状、抗パーキンソン病薬投与の経過について評価し、発症年齢、罹患期間が同等のZNS非投与群(11例)と比較した。

進行期PDではZNS投与により約3年間は投与直後の効果を維持し、4年目以降薬剤

増量をしたものの、観察期間中に on 時の Yahr 重症度が投与前より悪化したのは 1 例のみであった。ZNS 開始 4 年目以降でも ZNS の中止により症状悪化を認め、効果は持続していると考えられた。

進行期 ZNS 開始例においては発症後 10-15 年、早期開始例については 5-10 年の症状が ZNS 非併用例に比較して安定して良好な経過をとる傾向があり、ZNS の神経保護作用を示唆している可能性がある。今後臨床的な神経保護効果を評価するために多数例の集積が必要である。

①②とも観察中に問題となる副作用はなく、安全な薬剤であるといえた。

#### 5) ZNS の抗 PD 薬としての作用機序

##### a) 基底核ニューロンの発火パターンでの検討 (南部)

PD モデルサルに L-dopa 静脈内投与を行うと、PD 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等の異常発射パターンが消失あるいは減弱した。ZNS を併用投与するとこの L-dopa の作用が増強され効果持続時間が長くなった。ZNS 単独静脈内投与でも、L-dopa より軽度ではあるが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り、ZNS は単独でも抗 PD 効果を持つと考えられた。淡蒼球内節への ZNS 局所注入では異常発射パターンの正常化は認めなかったが、線条体では効果を認めたこと、すでに行ったスライス実験の結果から、作用部位は黒質、線条体と考えられた。

##### b) ZNS の抗振戦作用の作用機序 (近藤)

PD では静止時振戦が特徴的であるがあらゆるタイプの振戦が出現することが知られており、とくに、粗大な振戦には抗 PD 薬に抵抗性のものがあり、治療に難渋する。これまでに ZNS の本態性振戦に対する効果を明らかにしてきたことから、本研究では抗 PD 薬抵抗性の振戦に対する効果をまず臨床的に確認した。その上で、実験的振戦モデル (ハルマリン振戦及びタクリン誘発振戦) に対して ZNS が用量依存的に効果を示すことを見出した。さらに、これらの抗振戦作用はモノアミン枯渇薬やドパミン受容体遮断薬の影響を受けないことから、ドパミン系を介さない作用によることを明らかにした。なお、ZNS は T 型 Ca チャンネル阻

害薬であるが、最近、他の特異的 T 型 Ca チャンネル阻害薬が、ZNS と同様にハルマリン振戦を抑制することが報告され、ZNS の抗振戦作用は T 型 Ca チャンネル阻害作用を介したものである可能性が高い。

さらに、TJMs 出現時に大脳皮質、背側線条体及び側坐核で増加する c-Fos 発現が ZNS の用量依存的に抑制されることを明らかにし、ZNS による振戦抑制は大脳皮質-基底核系の神経細胞興奮を低下させた結果である可能性を示した。

##### c) ZNS のドパミン系以外のシステムへの作用の検索 (村田)

ZNS の新たな作用を見出すためにマイクロアレイを用いたスクリーニングを行った。ラットに ZNS 50mg/kg/day 14 日間 1 日 1 回経口投与し、最終投与後 2, 12 時間後の線条体及び大脳皮質より mRNA を抽出し、マイクロアレイにて発現解析を行った。

有意な発現を認めかつ、対照群に比較して有意に発現量が変化した遺伝子は 5 個のみであった。そのうち、rRNA promoter binding protein と GLT-1 は 2 時間後、12 時間後とも、線条体で有意に発現が低下していた。GLT-1 については、蛋白量増加に対する negative feedback の可能性が示唆された。また、2 倍以上の有意な変化を示した遺伝子が少なかったことから、ZNS は遺伝子発現レベルより、蛋白リン酸化などのレベルでの作用が多いことが示唆された。

##### 6) オーダーメイド医療を視野に ZNS の薬効を決定する SNP の検索 (戸田、村田)

より適正でかつ効率のよい治療のために、ZNS の効果を決定する SNP 検索を行った。

PD 疾患関連遺伝子検索のために、Illumina 社 HumanHap550 アレイを用いて、全ゲノム関連解析として PD 患者 1012 検体、コントロール 2573 検体の関連解析を行った。別検体で replication も行い、 $\alpha$ -synuclein 領域 ( $P=3.5 \times 10^{-16}$ ) の他に、calbindin 等との関連を明らかにした。

ZNS 投与患者で協力の得られた 110 例 (著効 (UPDRS III で 30%以上改善) : 56 例、有効 (UPDRS III で 10%以上改善) : 39 例、無効 (その他) : 16 例) について、再度臨床症状の差異などで明らかな違いがないことを確認のうえ、全ゲノム関連解析を

行い、有効例と無効例の差異、これらの疾患感受性遺伝子との関連について、検討し、 $P=10^{-5}$ 以下を示す SNP22 個を見出した。今後症例数をふやし、関連を明らかにしていく。

#### 6) Restless Leg Syndrome (RLS) に対する ZNS の効果及び、RLS の頻度 (長谷川)

ZNS の PD 以外の疾患への応用としてドパミン系薬剤が効果のある Restless Leg Syndrome (RLS) への効果をパイロット研究にてみいだしたため、RLS の有病率を検討した。わが国の特発性 RLS の有病率は 1% 程度とされているため、二次性 RLS について検討した。対象として、血液透析下の腎不全、慢性関節リウマチ、気管支喘息についてアンケート法にて調査したところ、腎不全では 32.1% (男性 22% 女性 38%)、関節リウマチ 7.1% (男性 11.5% 女性 7.9%)、気管支喘息 22% (男性 15.9% 女性 25.2%) で、とくに、腎不全、気管支喘息で有病率が高かった。今後 ZNS の RLS に対する効果を大規模に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) 動物実験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。

#### 4. 結論

培養細胞、げっ歯類から霊長類まで、高濃度ドパミン、staurosporine, 6OHDA, MPTP, Engrailed 遺伝子変異など、多様なドパミン神経細胞死のモデルに対し、ZNS が治療量で強い神経保護効果を示すことを示した。神経毒投与モデル動物では感性した障害も改善しており、しかも急性毒性のみでなく、慢性効果で神経保護作用を示した。これらの事実は慢性進行性の変性疾患である PD においても ZNS が神経保護作用を示すことを強く示唆している。この強力な神経保護作用の作用機序としては ZNS が、1) 非活性型アストログリア増殖の促進、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により、アストログリアでのシスチン取り込み増加を介して、神経細胞での著明なグルタチオン増加をおこすこと、2) PTEN, PIP3/Akt, FLHRL1, MnSOD の一連の系を活性化し、ミトコンドリア内に局在して活性酸素種を除去する、MnSOD 発現量を著明に増加させることを明らかにした。これらの結果は ZNS がドパミン神経のみならず、多くの神経変性疾患において神経保護薬として効果を示すことを示唆している。

抗 PD 効果の作用点は、被殻、黒質と考えられ、L-dopa 併用により効果が増強されるが、ZNS 単独でも PD で認める基底核の異常発射パターンを正常化すること、ドパミン合成亢進作用を示すことを明らかにした。また、ZNS がドパミン系を介さないおそらく、T 型 Ca チャンネル阻害作用を介する、抗振戦作用を持つことを明らかにした。さらにこの作用機序としては振戦源そのものより運動回路網への作用が示唆された。

今後、今回見出したアストログリアの増殖因子とグルタチオン合成に係るアミノ酸取り込みの神経・アストログリア連関および、engrailed mutant mouse における神経保護効果の作用機序に注目し、新たな神経保護薬の開発に結び付けたい。

また、ZNS の著効例、無効例についての遺伝学的検索は今後 PD 疾患感受性遺伝子の発見が進むに連れ、より情報が多くなると考えられる。ZNS は抗 PD 薬として 2009 年 1 月に承認されたことから、販売されるようになると、協力患者数も増加し、より大規模に検索可能となることから、今後も進めていきたいと考えている。

#### 5. 研究発表

- 1) 国内  
口頭発表 247 件  
原著論文による発表 29 件  
それ以外の発表 (レビュー等) 204 件
- 2) 国外  
口頭発表 79 件  
原著論文による発表 120 件  
それ以外の発表 (レビュー等) 13 件



1. 主な論文発表

2) 実用新案登録  
特になし

6. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

3) その他  
特になし

1) 特許取得  
特になし

新しい抗パーキンソン病薬・Zonisamideの臨床的研究  
および効果は発現機序に関する基礎的研究

(分担) 研究者 近藤智善

研究協力者 三輪英人、久保友美、梶本賀正、浜 喜和、中西一郎  
和歌山県立医科大学神経内科

研究要旨

Zonisamide (ZNS)を1年間以上の長期服用しているパーキンソン病患者 12 例を対象に、患者の了解の上で薬剤を休業し、中止前後の UPDRS スコアを指標に効果の確認を行った。また ZNS 連用中の安全性調査を行った。ZNS は長期にわたり有効かつ安全な薬剤と結論づけた。ZNS の抗振戦作用の機序を明らかにする目的で、パーキンソン病振戦の薬理学的モデルと提唱されている「タクリンにより誘発される振戦様顎運動」に対する ZNS の効果を確認し、薬理学的検討から、非ドパミン作用を介する作用である可能性を提唱した。また神経細胞興奮のマーカーである転写因子 c-Fos 発現を解析した。タクリン投与により脳内各部位において c-Fos 発現は顕著に増加するが、ZNS 投与により、大脳皮質、線条体、側坐核において c-Fos 発現が抑制された。ZNS は大脳皮質や基底核における神経活動を抑制的に制御していることが示唆され、これが抗振戦作用と関連する可能性が推定された。

A. 研究目的

1) 新規抗パーキンソン病薬・Zonisamide (ZNS) の有効性がパーキンソン病患者の長期治療中どの程度維持されるか、また ZNS 連用下における安全性はどうか、ZNS の長期服用が病気の進行に何らかの影響を及ぼすか、に関する臨床的検討を行った。

2) 近年、ZNS の抗振戦作用に関する報告が増加しつつあるが、その作用機序はまだ十分に解明されていない。抗コリンエステラーゼ阻害剤・タクリンの全身投与によって誘発されるげっ歯類の特徴的な振戦様顎運動 (tremulous jaw movement: TJMs) が、パーキンソン病振戦の薬理学的モデルとして提唱されている。われわれは、このモデルを用いて ZNS の効果発現機序に関する検討を薬理的、組織学的に検討した。

B. 研究方法

1) 対象は通常の抗パーキンソン病薬治療に加え ZNS の併用が有効であったパーキンソン病患者で、1年以上維持療法として ZNS 服薬が継続された患者で、ZNS 休業に同意した 12 例である。ZNS の一ヶ月休業前後の Unified Parkinson's Disease Rating Scale (UPDRS) 運動スケールの点数を比較した。服薬中の副作用について経過中随時問診し、随時一般血液検査を実施した。

2) 対象として雄 SD ラット (N=36) を用いた。タクリン 5 mg/kg 投与によって誘発された TJMs に対する ZNS (50, 5 mg/kg) の効果を検

討した。またレセルピン前処置 (ドパミン枯渇) やハロペリドール投与 (D2 受容体遮断) 処置が ZNS の作用にどのような影響を及ぼすかについて検討した。さらに、神経細胞興奮のマーカーである転写因子 c-Fos の発現について TJMs の定量終了後、対象脳の灌流固定を行い、c-Fos 蛋白発現を免疫組織学的に検出・視覚化し、大脳皮質、大脳基底核、視床、脳幹における c-Fos 発現を定量した。

(倫理面の配慮)

臨床および動物を用いた研究は和歌山県立医科大学倫理委員会および動物実験倫理委員会の承認のもとに行った。

C. 研究結果

1) ZNS 休業によって UPDRS の運動スケールの点数の増大が有意に認められ、ZNS の効果の持続が確認された。ZNS によると見られる副作用は見られなかった。

2) ZNS の投与によって、タクリン誘発 TJMs は用量依存的に抑制された。この TJMs の ZNS による抑制は、レセルピン前処置やハロペリドール (D2 ドパミン受容体遮断) による影響は受けなかった。c-Fos 発現はタクリン投与後、大脳皮質、線条体において顕著な増加が認められたが、ZNS 投与により、大脳皮質、背側線条体および側坐核 (腹側線条体) における発現増加は、用量依存的に抑制された。

D. 考察

1) ZNS の抗パーキンソン病薬としての長期有効性と安全性が確認された。

2) タクリン誘発 TJMs は、これまでの研究報告から大脳基底核起源の振戦と考えられているが、L-DOPA をはじめとするドパミン作動性薬剤や抗コリン役などの抗パーキンソン病薬で抑制されることから、TJMs はパーキンソン病振戦の薬理的モデルとみなされている。

ZNS はタクリン誘発 TJMs を抑制するが、ドパミンの枯渇や D2 受容体遮断薬によって影響されないことから、その機序はドパミン系を介さないものである可能性が示唆された。

タクリン投与による TJMs 発現下で、大脳皮質、線条体の c-Fos 発現が著増したが、ZNS 投与による TJMs 抑制下では、これらが有意に抑制された。すなわち ZNS 投与による大脳皮質-大脳基底核系の神経細胞興奮の低下が TJMs 抑制に寄与する可能性を示唆する。

これまでの報告では c-Fos 発現はドパミン欠乏状態の線条体でも著増することが知られており、いわゆる大脳基底核の間接経路の神経細胞活動増加に対応する所見と推定されている。タクリンで増強された線条体における c-Fos 発現が ZNS 投与によって抑制されたことは、ZNS の抗パーキンソン病作用が線条体神経

細胞の興奮性の制御による可能性を示唆しているのかもしれない。

#### E. 結論

パーキンソン病振戦の薬理的モデルと見なされているタクリン誘発 TJMs の抑制に関わる ZNS の作用について c-Fos の変動を用いて検討した。ZNS は、ドパミン作用とは別に、大脳皮質や基底核における神経活動を抑制的に制御している可能性が示唆された。

#### F. 健康被害情報 なし

#### G. 研究発表

1) Miwa H, Hama K, Kajimoto Y, Kondo T: Effects of zonisamide on experimental tremors in rats. *Parkinsonism Relat Disord* 14:33-36, 2008

2) Miwa H, Kubo T, Suzuki A, Kondo T: Effects of zonisamide on c-Fos expression under conditions of tacrine-induced tremulous jaw movements in rats: A potential mechanism underlying its anti-parkinsonian tremor effect. *Parkinsonism Relat Disord* 15:30-35, 2009

#### 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

## 新規抗パーキンソン病薬ゾニサミドの長期効果と作用機序

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

研究要旨: 新規抗パーキンソン病薬ゾニサミド(ZNS)の神経保護作用を臨床的に明らかにするために、評価方法の検討、ZNSの長期効果の評価を行った。さらに作用機序のスクリーニングとして、ZNS投与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の検討を行った。

評価方法については、残念ながら現時点でパーキンソン病における神経保護作用を臨床的に評価する方法は国際的にも確立しておらず、我々も国際的に認証される方法を新たに確立することができなかった。

9年間までの長期効果は高く、進行期PDではZNS投与により約3年間は最初の効果を維持し、4年目以降薬剤の増量等を行ったが、on時のYahr重症度が投与前より悪化したのは1例のみであった。一方、ZNS開始後4年目以降でもZNSの中止により症状悪化、また増量により症状改善を確認できた。発症早期に投与開始した2例では発症9-10年目も良好な状態を維持できていた。経過中、ZNSに関連する重大な有害事象は認めなかった。ZNSの併用により、進行例においては罹患期間10-15年の症状、早期例においては5-10年の症状が非併用例に比較して安定して良好な経過をとる傾向があった。

マイクロアレイを用いたZNSの作用のスクリーニングでは50mg/kg/day, 14日間経口投与の最終投与2及び12時間後の線条体及び大脳皮質にて発現解析を行った。有意な発現を認めかつ、有意な発現量変化を認めた遺伝子は非常に少なく5個のみであった。これはZNSの作用が遺伝子レベルより、蛋白質酸化などの転写後の調節が主体であることを示唆していると考えられた。有意な変化を示した遺伝子のうち、rRNA promoter binding protein と glial high affinity glutamate transporter (GLT-1)は線条体で2時間後、12時間後とも有意に発現が低下していた。GLT-1については蛋白質量増加に対するnegative feedbackの可能性が示唆された。

### A. 研究目的

動物実験、培養細胞により、ZNSが高い神経保護効果を持つことがあきらかになってきたことから、1) 臨床的な神経保護作用の評価方法を評価する。2) 抗パーキンソン病(PD)作用の発見者として、最も長期に抗PD作用を観察しえたことから、ZNSの抗PD作用の長期効果を明らかにし、さらに臨床例での神経保護効果について検討する。3) 多岐にわたるZNSの作用を明らかにしてきたことから、全く異なる作用点をみいだすために、マイクロアレイを用いた作用点のスクリーニングを行う。

### B. 方法

1) 神経保護作用の評価方法について、文献及び、国際会議での専門家との協議に

より、検討した。

2) PDに対する効果を期待してZNSの投与を継続し、5年以上9年間まで観察しえた8例に

ついて、UPDRS III, Yahr重症度、抗PD薬服薬量(LEDD: Levodopa Equivalent Daily Dose)を後方視的に検討した。ZNSの投与は倫理委員会の承認のもと、本人の書面同意を得て行われた。

3) Wistar 雄性ラット(体重; 200-250g)16匹を用い、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、最終投与後は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、速やかに凍結後、抽出したtotal RNA 3mgを用いて、Gene Chip(Affymetrix)にて、発現解析を行った。

Perfect Match(PM)とMis Match(MM)が有意に差がある遺伝子のみを対象として、その中でZNS群での発現が対照群の180%以上または55%以下であるものをピックアップした。

### C. 研究結果と考察

1) 神経保護作用の臨床評価方法

現時点までに国際的に認められた評価方法は確立していない。Dopamine transporter (DAT) scan を用いた方法及び delayed start 方式が一時評価されたが、現時点までにいずれの方法も適切でないという結論となった。なお、ZNS の場合、L-dopa 量を一定にし、長期間にわたり評価すれば、DAT scan を用いて評価できる可能性はあるが、わが国では DAT scan がいまだ導入されていないので、実施は不可能である。

## 2) ZNS の長期効果

症例：平均発症年齢 48.5 才、ZNS 開始時平均年齢 55.9 才、現在の平均 PD 罹患期間 14.5 年、平均 ZNS 投与期間は 7.3 年で、ZNS 投与量は 50-150mg/日であった。このうち 5 例は罹患期間 7 年以上の進行期に、3 例は罹患期間 3 年以内の早期に ZNS を開始した。いずれもそれまでの抗 PD 薬に ZNS を 1 日 1 回加えた。一方、対象群は平均発症年齢 49.4 才、平均 PD 罹患期間 13.7 年であった。

効果：ZNS 投与により、PD 症状は改善し、3 年間はほぼ同程度の効果を維持できた。4 年目以降はやや悪化し他の抗 PD 薬 (LEDD) が増量される傾向にあったが、観察期間中に on 時の Yahr 重症度が ZNS 投与前より悪化した症例は 1 例のみであった。進行期 ZNS 開始例では PD 発症後 13-15 年後に off 時の症状が一段階悪化しているが、

ZNS 非投与群に比較するとやや重症度が低い傾向にあった。

発症 3 年以内に ZNS の L-dopa との併用投与を開始した 3 例中 2 例は PD 罹患期間 9-10 年で、規則的な内服により、ほとんど症状のない状態を維持している。

ZNS 開始 4 年目以降でも ZNS 中止による症状悪化や、ZNS 増量による症状改善が見られた。

抗 PD 薬量 (LEDD) は ZNS 非投与群に比較して投与群では LEDD の増量経過が少ない傾向にあった。

## 有害事象：

- ① 熱中症にて死亡 (1 例)。前日まで発汗障害はなかったことが確認されており、ZNS による発汗障害によるものではないと考えた。
- ② 体重減少 (1 例) ZNS 開始 4 年目 (PD 発症 21 年目) に 1 年間で約 8Kg の体重減少を認め、ZNS の副作用を疑い、中止したところ、体重は変化しなくなったが、wearing-off 現象悪化のため、本人の強い

希望で、3 ヶ月後より ZNS を再開したが、その後体重減少は認めなかった。

- ③ 幻覚・妄想 (1 例) ZNS 開始 8 年目 (PD 発症 16 年目) にドパミンアゴニストの変更を契機に幻覚妄想出現。アゴニストの変更を契機にしていることから ZNS との関連はないと考えた。
- ④ 不随意運動 (4 例) もともとあった不随意運動の悪化例の 1 例以外はすべて軽症であった。いずれも ZNS 開始後 3 年は変化なく、抗 PD 薬が増量された 4 年目以降顕在化していることから、ZNS との関連は否定的であった。

## D. 考察

ZNS 投与により症状を改善できた症例は、進行期であっても約 3 年間効果を維持できている、その後徐々に悪化するものの、on 時の症状は比較的維持できていると考えられた。

ZNS 投与群では非投与群に比較して、発症 10-15 年後の状態は比較的良好であった。ドパミン神経障害が進行して長期治療の問題点が出現しやすい 7 年目以降の進行期に ZNS を投与することで、1-2 段階症状が改善し、これを 3 年程度持続したのち徐々に悪化するものの比較的良好な状態を維持できることによると考えられた。これは臨床症状の上からは ZNS 投与が経過の変局点になっていることを示しているが、この経過が症状改善効果のみであるか、神経保護効果を反映しているかを評価することは困難であった。

## 3) マイクロアレイを用いた ZNS の作用点のスクリーニング

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、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は 5 遺伝子のみであった。

このうち、rRNA promoter binding protein と glial high affinity glutamate transporter (GLT-1) は線条体において 2 時間後 12 時間後とも有意に低下していた。

変化を認めた遺伝子が非常に少なかった事実は ZNS の作用が遺伝子レベルの変化よりも、蛋白リン酸化など転写後の変化への作用が主体であることを示していると考えられた。

GLT-1 については浅沼らが ZNS により GLT-1 蛋白の増加を見出しており、これに対する negative feedback を見ているものと考えられた。

## E. 結論

1) 神経保護作用の臨床的評価方法を確立することはできなかった。今後さらに検討を進める必要がある。

2) ZNS の抗パーキンソン作用は長期に渡り安全に高い効果を維持することを明らかにした。進行期においても長期にわたり、投与前よりも良い状態を維持できたことは、動物実験などで示した ZNS の神経保護作用を臨床的に示している可能性もあると考えられた。

3) マイクロアレイを用いた ZNS の作用点のスクリーニングでは ZNS の作用は遺伝子レベルではなく、蛋白リン酸化などの転写後調節が主体と考えられた。ZNS 投与により線条体の GLT-1 遺伝子発現が有意に低下した。これは

negative feedback を示しているものと考えられた。

## 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

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>1,2)</sup>

研究協力者 佐竹渉<sup>1)</sup>、水田依久子<sup>1)</sup>、孫浩<sup>1)</sup>、三井純<sup>3)</sup>、角田達彦<sup>4)</sup>、  
長谷川一子<sup>5)</sup>、中島健二<sup>6)</sup>、渡邊雅彦<sup>7)</sup>、武田篤<sup>8)</sup>、猪子英俊<sup>9)</sup>、辻省次<sup>3)</sup>、  
中村祐輔<sup>10)</sup>、山本光利<sup>11)</sup>、服部信孝<sup>12)</sup>、村田美穂<sup>13)</sup>

- <sup>1)</sup> 大阪大学臨床遺伝、<sup>2)</sup> 神戸大学神経内科、<sup>3)</sup> 東京大学神経内科、<sup>4)</sup> 理研遺伝子多型解析センター、<sup>5)</sup> 国立病院機構相模原病院神経内科、<sup>6)</sup> 鳥取大学脳神経内科、<sup>7)</sup> 筑波大学神経内科、  
<sup>8)</sup> 東北大学神経内科、<sup>9)</sup> 東海大学分子生命科学 2、<sup>10)</sup> 東京大学医学研究所、<sup>11)</sup> 香川県立中央病院神経内科、<sup>12)</sup> 順天堂大学脳神経内科、<sup>13)</sup> 国立精神・神経センター病院神経内科

我々は多因子遺伝疾患である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に、種々のアプローチを進めてきた。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 *SNCA* や、新規の PD 感受性遺伝子 *calbindin1* を同定することができた。イルミナ Hap550 アレイを用いて、患者約 1000 人、対照 2500 人（最終計 8296 検体）の Genome wide association study (GWAS) やゾニサミド薬剤感受性 SNP の同定を行った。また rare variant としてゴーシェ遺伝子変異が確実な PD リスクであることを明らかにした。

#### 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、テラーメイド化をめざす。

#### B. C. 研究方法、研究結果

①ゲノムワイドマイクロサテライト関連解析  
124-250 人単位の pooled DNA と、27,158 個の MS マーカーを用いて、1-3 次スクリーニングを完了し、候補領域を 280 個所に絞り込んだ。113 個の MS に関して、個別検体を用いた関連の検証が終了し、 $P < 0.0001$  の MS を 3 個発見した。

#### ②中国における PD 大家系の発見

中国における、AD 形式で 3 世代にわたり連鎖する PD 大家系を見出した。既知の AD-PD 遺伝子は、*SNCA*、*LRRK2* のみであるが、これら近傍（数百 kb 内）の MS を用いて連鎖解析を行ったところ、本家系との連鎖は棄却された。全ゲノム連鎖解析では 1 2 番染色体に連鎖を認め、これは後に SCA2 であることが判明した。

#### ③候補遺伝子関連解析

我々は 121 個の候補遺伝子上の 268 個の SNPs を用いた大規模な関連解析により、*α-synuclein* を確実なパーキンソン病 (PD) 感受性遺伝子として同定し、報告した。また、白人で PD との関連が報告されていた *FGF20* の日本人での再現性も確認した。今回、さらに候補遺伝子を増やして新たな PD 遺伝子を同定し、*α-synuclein*、*FGF20* とともに統計学的相互

作用を解析した。遺伝子型タイピングは患者 1403 人、対照 1938 人を対象に TaqMan 法で行った。合計 137 個の候補遺伝子上の 302 個の SNPs の関連解析、および連鎖不平衡解析により、*α-synuclein* に続く第 2 の PD 遺伝子として、*calbindin1* を同定した ( $P = 7.1 \times 10^{-5}$ , オッズ比 1.34)。さらに、*α-synuclein* のリスクアレルを 2 つ持つ群では *calbindin1* と PD との関連の有意差は見られなくなったが、*FGF20* と PD との関連はより強くなった ( $P = 5.9 \times 10^{-6}$ , オッズ比 1.76)。これに対して、*α-synuclein* のリスクアレルを持たない群では、*calbindin1* と PD との関連はより強くなり (オッズ比 1.70)、*FGF20* と PD との関連は有意差がなくなった。

④500K SNP chip を用いた全ゲノム関連解析  
今回、Illumina 社 HumanHap550 アレイを用いて、PD 患者 1012 検体、コントロール 2573 検体の SNP 型を判定した。IBS 検定、Multidimensional scaling により、血縁者や非アジア人検体を除外し、患者 988 検体、コントロール 2521 検体で 438,886 SNP の関連解析を行った結果、最も有意であったのは、*α-synuclein* 領域の SNP ( $P = 6.2 \times 10^{-13}$  (trend model)) であった。関連を認めた上位 384 SNP について、別の患者 894 検体、コントロール 3893 検体（計 8296 検体）で replication 実験を行った。*α-synuclein* 領域は  $P = 3.5 \times 10^{-16}$  を示したが、それ以外にも有意に関連した領域を得ている。

#### ⑤ゾニサミドの薬効に関連する SNP

また、ゾニサミド有効例・無効例間(110例)で同様の SNP chip による関連解析を行い、効果判定マーカーとなる多型を同定することを試みた。内 22 個以上の SNP が  $P=10^{-5}$  以下を示し、例えば CYP20A1 は C アレルをもつと無効例が多いなど、明らかに偏りがあった。

#### ⑥ rare variant とゴーシェ病

リピドーシスのひとつゴーシェ病患者で PD を合併する例が報告されたことから、PD における GBA 遺伝子変異の保因者頻度を調べた研究が世界中で行われている。GBA 遺伝子の全 11 エクソンとその近傍を PD 患者 534 人、対照 544 人リシーケンスして塩基配列変化の有無を調べ、11 種類の疾患原性点変異が同定された。ヘテロで持つ保因者は PD 患者 534 人中 50 人 (9.4%)、対照 544 人中 2 人 (0.37%) であり、PD と GBA 変異は強く関連していた ( $p=6.9 \times 10^{-14}$ , オッズ比 28.0)。PD 患者で同定された変異は、日本人ゴーシェ病でみられる変異の分布とはかなり異なっていた。GBA 変異をもつ PD 患者の発症年齢 ( $52.5 \pm 7.4$ ) は変異を持たない PD 患者の発症年齢 ( $58.8 \pm 10.7$ ) よりも有意に低かった ( $p < 0.001$ )。親子または同胞で PD を発症している 34 家系について、GBA 変異を調べたところ、5 家系 (14.7%) において、家系内の患者で共通の変異がみられた。

#### D. E. 考察、結論

新規の PD 感受性遺伝子 *calbindin1* を同定した。*Calbindin1* はカルシウム結合蛋白であり、PD 患者の黒質で *calbindin1* 陰性神経の脱落が陽性神経の脱落よりも強いことから、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、*calbindin1* は  $\alpha$ -synuclein とは独立に、一方、*FGF20* は  $\alpha$ -synuclein と相互的に、PD 発症に関与していることが示唆される。

SNP chip では、同規模のプロジェクトが米国、ドイツで進行中であり、関連を認めた SNP に関しては、ドイツ人、米国人で再現性を検討し、PD 感受性 SNP を同定する。

また、ゾニサミド有効例・無効例間で効果判定マーカーとなる多型を組み合わせ検証する。

GBA 変異は確実な PD リスク因子であり、common disease multiple rare variant 仮説によるものである。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Mizuta I et al. *Hum Mol Genet* 15:1151-1158, 2006

Nishioka K et al. *Ann Neurol* 59:298-309, 2006

Tomiyama H et al. *Mov Disord* 21:1102-1108, 2006

Funayama M et al. *Neuroreport* 18:273-275, 2007

Satake W et al. *Neuroreport* 18:937-940, 2007

Nagai Y et al. *Nature Struct Mol Biol* 14:332-340, 2007

Kano H et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:19034-19039, 2007

Mizuta I et al. *Hum Genet* 124:89-94, 2008

Tomiyama H et al. *J Hum Genet* 53:1012-1015, 2008

Kumazawa R et al. *Arch Neurol* 65:802-808, 2008

Mitsui J et al. *Arch Neurol* (in press)

##### 2. 学会発表

日本神経学会 2006

日本人類遺伝学会 2006

アメリカ人類遺伝学会 2006

北米神経科学会 2006

2th GEO-PD 2006

日本神経学会 2007

日本人類遺伝学会 2007

アメリカ人類遺伝学会 2007

日本神経学会 2008

日本人類遺伝学会 2008

アメリカ人類遺伝学会 2008

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む) 特になし



新規抗パーキンソン病薬ゾニサミドの有効性探索に関するわが国における二次性レストレスレッグ症候群の疫学に関する研究

分担研究者： 所属施設 独立行政法人国立病院機構相模原病院  
氏 名 長谷川一子  
研究協力者： 所属施設 独立行政法人国立病院機構相模原病院  
氏 名 秋山一男， 鈴木尚美， 押方智也子， 谷口正実，  
堀内恵美子， 當間重人， 松井利浩， 島田浩太  
所属施設 相模原カウンセリングルーム  
氏 名 福山渉， 猿渡めぐみ， 公文彩

### 研究要旨

新規パーキンソン病薬であるゾニサミドは L-dopa 不足の病態に有用であることが，過去 3 年間の研究により明らかとされた。このため，今期は L-dopa 不足の他の病態としてよく知られているレストレスレッグ症候群に関する有効性を検討するための前段階として，レストレスレッグ症候群の有病率を調査した。わが国の特発性レストレスレッグ症候群の有病率は 1%程度とされているため，今回は二次性レストレスレッグ症候群を調査対象とした。また，対象とした疾患は血液透析下にある腎不全，慢性関節リウマチ，喘息と分担研究者がアクセスしやすい疾患として選定した。

#### 1. 研究目的

下記 2 項目について研究を行った。1) 新規抗パーキンソン病薬ゾニサミドの抗パーキンソン病作用について引き続き検討する，2) ドパミン欠乏が背景にあると考えられる疾患であるレストレスレッグ症候群 restless legs syndrome; RLS についての疫学調査，ゾニサミドの適応拡大について検討する。RLS については特発性 RLS について，わが国の有病率は 1%程度と低いため，二次性 RLS を対象とした。二次性 RLS の原疾患は分担研究者がアクセスしやすかつ，有病率が高い可能性がある疾患である血液透析下にある慢性腎不全，慢性関節リウマチ，喘息を対象として選定した。

#### 2. 研究方法

1) 臨床研究は前回村田班から継続して施行する。  
2) 慢性疾患による血液透析療法中の症例，慢性関節リウマチ症例，喘息患者についてまず，有病率

をアンケート方式により検討する。

アンケート方法は R，国際レストレスレッグズ症候群研究グループ（IRLSSG）の診断基準を用い，①じっと座っているときや横になっているとき，脚や手に気持ちの悪い感じが繰り返し起こったり，そのために脚を動かしたくてたまらなくなることがあるか②足や手を動かしたくてたまらない症状は休んでいたり，横になったり，座ったりしたときに出現したり，悪くなったりするか③脚や手を動かしたくてたまらなくなる衝動や脚の不快感は歩いたり，脚を動かすことによって楽になったりするか。④脚を動かしたくてたまらなくなる衝動や脚の不快感は，夕方や夜に悪化したり，夕方や夜のみにおこるか。以上の 4 つの質問により行い，原則として①に「はい」と答えた症例を RLS あり（probable RLS）とした。また，4 つの質問にすべて「はい」と答えている症例に関しては definite RLS とした。

(倫理面への配慮)

1) は IRB 委員会, 2) は倫理委員会の審査を受審し, 承認後, 患者に十分な説明を行い, 同意を得た患者についてのみ, アンケート調査を行った。

### 3. 研究結果及び考察

1) ゾニサミドの臨床的有効性は村田班長から別途報告されるため, 割愛した。

2) レストレスレッグ症候群の有病率:

慢性腎不全患者の RLS の有病率は 402 例中 96 例 (23.8%) と高頻度であった。性別では RLS 症例 96 例中男性 58 例, 女性 38 例で女性に多く, RLS 発症者の平均透析年数は 8.4 年, 平均年齢は 57.5 歳であった。RLS 非発症者と平均透析年数, 透析導入開始年齢については統計学的有意差がなかった。

関節リウマチ患者では調査対象 259 名 (男性 35 名, 女性 224 名, 平均年齢は 59.5±12.6 歳, 平均罹病期間は 15.2±11.4 年) で, RLS ありは 23 例 (男性 5 例, 女性 18 名) で有病率は 8.8% (男性 16.7%, 女性 8.7%) で, 男性優位であった。RLS 例は若年者に多い特徴があった。なお, 貧血ありとの回答は 23 名中 7 名で, 対象とした RA 患者全体の頻度と差異はなかった。

喘息患者では回答の調査対象 200 名 (男性 69 名, 女性 131 名, 平均年齢は 54.75±17.31 歳, 平均罹病期間は 21.84±17.83 年) で, RLS の症状があり患者 (probable RLS) は全体の 22% (44 名: 男性 11 名, 女性 33 名), definite RLS はの 10% (20 名: 男性 6 名, 女性 14 名) であった。4 項目のうち④を満たさない症例が多く, 喘息患者ではむずむず感と足を動かしたくなる衝動が夜間でなく, 日中のみの患者も少なくなかった。喘息患者には末梢神経障害を示す群である Churg-Straus 症候群などもあるが, これらの症例は調査対象からは除外した。念のため好酸球数について調査したが, RLS あり群で 360.24±220.97/ $\mu$ l, なし群で 290.56±249.75/ $\mu$ l と RLS あり群で高値をとる傾向 ( $p=0.086$ ) が認められた。RLS

あり群の平均年齢は 47.52±14.24 歳は (男性 51.91±18.41 歳, 女性 45.85±12.58 歳) で RLS なし群に比較して有意に若年で ( $p=0.000511$ ), この傾向は女性で顕著 ( $p=0.00014$ ) であった。喘息発作と RLS との関連は明らかではなかった。

### 4. 評価

1) 達成度について

ゾニサミドの臨床的有効性については, 班長と共に論文化することができ充分達成できた。RLS については慢性腎不全 (血液透析), 関節リウマチ, 喘息について検討し, それぞれ有病率を算出することができた。一部の症例についてはゾニサミドの投与を説明と同意の下でおこない, 有用との感触を得ることができた。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

ゾニサミドは安価な薬剤であり, 国家経済の視点からみて, 薬剤費抑制に関して意義があると思われる。また, 従来注目されていなかった二次性 RLS について調査を行い, 有病率が高いことを示すことができた。今後, 治療介入を行うことにより, よりよい病態が得られるようになると思われる。

3) 今後の展望について

ドパミン欠乏のある病態である RLS の実態が明らかとなってきたため, 治療介入が行われることが予測される。

4) 研究内容の効率性について

3 年間でゾニサミドの臨床効果を確認できたこと, 二次性 RLS の主な疾患における有病率を調査できたことなど, きわめて効率性の高い研究であった。

### 5. 結論

ゾニサミドは抗パーキンソン病薬として有用である。二次性 RLS の有病率は血液透析者 3.8%, 関節リウマチ 8.8%, 喘息 22% と, 頻度の高い併発症であるため, 治療介入が望まれる。

### 6. 研究発表

1) 国内 なし

2) 海外

論文発表

Murata M, Hasegawa K et al: Zonisamide improves motor function in Parkinson's disease: A randomized, double-blind,

placebo-controlled study. *Neurology* 2007; 68 : 45-50.

7. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む。）  
なし

神経毒に対するゾニサミドの保護作用

チャウドリー・ムハメド, 久保田, 森豊隆志, 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。このことからマウスとマーモセットを用いて、これらの神経毒の投与によるドパミン神経の障害に対する zonisamide の保護作用について検討した。MPTP 投与により C57 BL/6J マウスとコモン・マーモセットの線条体ドパミン含有量は低下した。PSI では変化はなかった。Zonisamide 投与により MPTP 後の線条体ドパミン量は変化しなかったが、MPTP を処置した動物のドパミン代謝はサル、マウスともに亢進した。黒質のチロシン水酸化酵素による染色では MPTP によりドパミン神経細胞はほとんど消失し、セレギリンではよく保たれていた。ゾニサミド群では MPTP の作用が軽度抑制されていた。

A. 研究目的

マウスとコモン・マーモセットを用いて、神経毒である MPTP と PSI のドパミン神経細胞障害に対するゾニサミドの作用を検討した。

B. 研究方法

実験 1

マウス (C57 BL/6J) に薬物を投与し、7 日後に線条体のドパミン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。

- ・ 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

コモン・マーモセットに対して 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