

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。

実験3

コモン・マーモセットに MPTP を投与し、MPTP 投与1時間前にゾニサミド、セレギリンあるいは生食を投与した。3日間投与し、最初の MPTP 投与の14日間あとに中脳のチロシン水酸化酵素に対する免疫染色を行い、黒質ドパミン細胞の障害度を検討した。

薬物

Zonisamide は dimethyl sulfoxide (DMSO) に懸濁し、生理食塩水で20%に調整した。MPTP は生理食塩水に溶解し、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。セレギリンは生食に懸濁した。いずれも皮下に投与した。

C. 研究結果

結果1

C57 BL/6J の正常対照群における線条体ドパミン含有量は $15.76 \pm 0.52 \mu\text{g/g}$ (mean \pm SE, n=8) であった。MPTP の投与により、線条体ドパミンは 2.25 ± 0.38 (14.3%) に、zonisamide 群では 2.37 ± 0.52 (15.0%) に減少した ($p < 0.001$)。セレギリン群ではドパミンは 13.08 ± 1.93 (83.0%) で、減少していなかった。線条体におけるドパミン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 、ゾニサミド群では 0.68 ± 0.14 、セレギリンでは 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)。

結果2

コモン・マーモセットの線条体ドパミン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。ドパミン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)。

結果3

黒質の TH 陽性細胞数は、正常対照群 238.33 ± 25.86 に対して、MPTP 単独投与群 30.00 ± 6.81 と減少していたが、ゾニサミド投与群は 60.67 ± 1.77 、セレギリン投与群は 112.33 ± 17.70 と、共に単独投与群に比して、TH 陽性細胞数は保たれていた (Fig 1)。また、残存している黒質の TH 陽性細胞の面積 (μm^2) を測定

したところ、正常動物では 424.29 ± 51.32 、ゾニサミド投与群では 273.42 ± 20.64 に対して、セレギリン投与群では 319.02 ± 26.52 は、MPTP 単独投与群 158.69 ± 20.77 より大きかった (Fig 2)。また、TH 陽性神経細胞の樹状突起・軸索の形態はゾニサミド群、セレギリン群では MPTP 単独投与群よりも、よく保たれていた。

脳内モノアミン測定結果

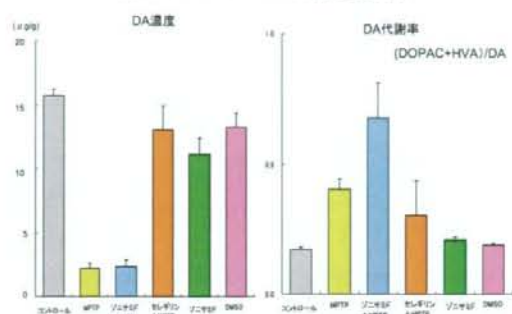


Fig 1. マウス脳内 dopamine 濃度

脳内ドパミン濃度 -被殻-

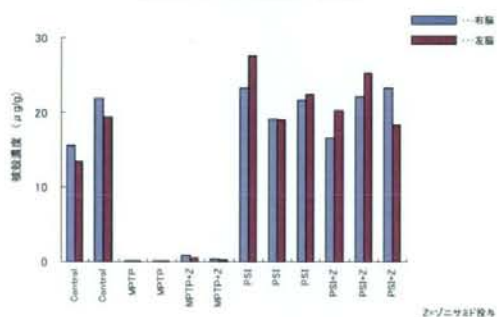


Fig 2a. common marmoset 被殻 dopamine 濃度

脳内ドパミン代謝率 -被殻-

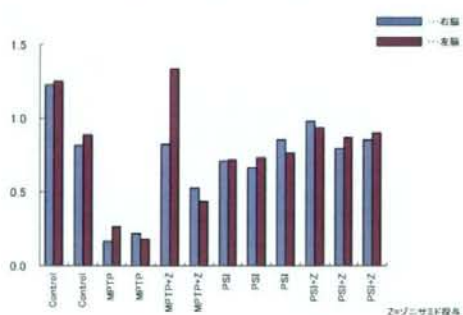


Fig 2b. common marmoset 被殻 dopamine 代謝

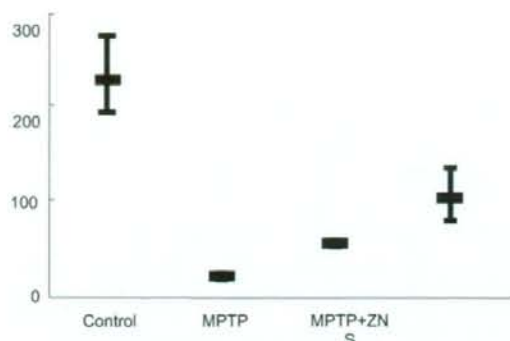


Fig 3. 黒質 TH 陽性細胞の数 各 n=3

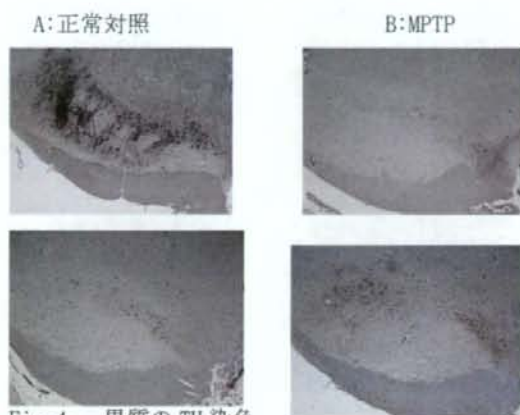


Fig 4. 黒質の TH 染色

D 考察と結論

Zonisamide は C57BL/6 およびコモン・マーモセットにおいて MPTP により障害されたドパミン神経細胞の代謝を亢進させた。ドパミン代謝の亢進はドパミン神経の活動性の上昇を表していることから、zonisamide は MPTP により障害されたドパミン神経の活動性の回復を促進していると考えられる。また、MPTP による線条体ドパミン含有量の低下はゾニサミドでは抑制されなかったが、黒質 TH 陽性細胞数はゾニサミドにより低下が抑制されていた。以上から zonisamide は、MPTP によるドパミン神経障害に対して保護的に作用し、また、その後の回復を促すことが示唆される。

F. 健康管理情報

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 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) Fabbrini G, Brotchie JM, Grandas F, Nomoto M, Goetz CG. Levodopa-Induced Dyskinesias. *Movement Disord* 22: 1379-1389, 2007.

5) 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.

6) 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.

7) 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.

8) 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.

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

10) 野元正弘. 中毒性疾患 今日の治療指針 医学書院 東京 2008.

11) 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

12) 荒木博陽, 野元正弘. 医薬品過誤プレアボイド 南江堂 東京 2008.

13) 永井将弘. 内科診療科の臨床薬理 臨床薬理

39:135-136, 2008.

14) 野元正弘 治験担当医の研修 臨床薬理
39:45-50, 2008.

15) 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.

16) 矢部勇人, 野元正弘. ふるえの治療
Modern Physician 27(1):40-43, 2007.

17) 永井将弘, 野元正弘
パーキンソン病治療薬・塩酸ロビニロール,
entacapone, ゾニサミド, rotigotine,
istradefylline
医薬ジャーナル新薬展 2007 43(S-1):302-306,
2007.

18) 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.

19) 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
かー各国の現状をふまえた提言ー 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

20) 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.

21) 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.

22) 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.

23) 西川典子, 野元正弘. Parkinson 病の精神
症状. 神経内科 66(1):84-87, 2007.

24) 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.

25) 野元正弘. 国際共同治験推進会議 in Beppu
ー推進に向けて現場は何をすべきかー 責

任医師の立場から(2) 臨床評価 35(2):
212-217, 2007.

26) 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.

27) 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) 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) 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. The Movement Disorder Society's
12th International congress of Parkinson's
Disease and Movement Disorders, Chicago, June.
22-28, 2008.

4) 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

5) 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.

6) 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～第2回 Movement Disorder Society, Japan 学術集会, 京都, 10. 2-4, 2008.

7) 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 野元正弘 第18回霧島神経薬理フォーラム, 愛媛, 8. 24,

2007.

8) Nomoto M. Pharmacokinetic characteristics of agents applied in the treatment of Parkinson's disease. The 3rd China-Japan Joint Meeting of Basic and Clinical Pharmacology, Dalian: China, 8. 24, 2007.

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 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、L-dopaほど強力でないが、ゾニサミド単独投与においても、抗パーキンソン病作用があると考えられた。また、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に対して、神経保護作用があることが明らかとなった。

研究分担者

橋 吉寿

自然科学研究機構生理学研究所・助教

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が、その作用機序については不明な点が多い。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、(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ことににより、ゾニサミドの作用機序を調べる(2) 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を探る、ことを目的としている。

B. 研究方法

(1) マカクサルを用い、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神経毒を一侧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。

(2) 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られる。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。

これら動物実験は、自然科学研究機構岡崎3機関動物実験委員会にて承認され、「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実験安全委員会にて承認された。

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 +/-; 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

L-dopa投与、ゾニサミド投与、両者の併用投与によって、淡蒼球ニューロン・視床下核ニューロンにおける異常発射パターンの正常化が観察された。これまでの研究から、パーキンソン病モデル動物で見られたようなバースト発射や振振活動が、振戦さらには無動の原因となることが強く示唆されている。これらのことから、L-dopaほど強力でないが、ゾニサミド単独投与においても、抗パーキンソン病作用があると考えられる。一方、ゾニサミドの淡蒼球局所投与では、このような変化が観察されなかったことから、ゾニサミドの作用部位としては、他の基底核部位、例えば線条体、黒質緻密部などが考えられる。

疾患モデルマウスを用いた研究においては、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

ゾニサミド単独投与では症状を改善する程の効果はないが、淡蒼球ニューロン活動を正常化させる傾向にあることから、ゾニサミド単独でも抗パーキンソン病作用があると考えられた。また、その作用部位としては、淡蒼球以外が考えられた。また、疾患モデルマウスを用いた研究においては、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。

F. 研究発表

論文発表

- Kita H, Chiken S, Tachibana Y, Nambu A (2006) Origins of GABA_A and GABA_B receptor mediated responses of globus pallidus induced after stimulation of the putamen in the monkey. *J Neurosci* 26: 6554-6562
- Miyachi S, Lu X, Imanishi M, Sawada K, Nambu A, Takada M (2006) Somatotopically arranged inputs from putamen and subthalamic nucleus to primary motor cortex. *Neurosci Res* 56: 300-308
- 南部篤 (2006) DBS に神経生理学が寄与できること。臨床脳波 48: 327-336
- Kita H, Chiken S, Tachibana Y, Nambu A (2007) Serotonin modulates pallidal neuronal activity in the awake monkey. *J Neurosci* 27: 75-83
- Lu X, Miyachi S, Ito Y, Nambu A, Takada M (2007) Topographic distribution of output neurons in cerebellar nuclei and cortex to somatotopic map of primary motor cortex. *Eur J Neurosci* 25: 2374-2382
- Kanamatsua T, Otsuki T, Tokuno H, Nambuc A, Takada M, Okamoto K, Watanabe H, Umeda M, Tsukada Y (2007) Changes in the rates of the tricarboxylic acid (TCA) cycle and glutamine synthesis in the monkey brain with hemiparkinsonism induced by intracarotid infusion of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP): Studies by non-invasive ¹³C-magnetic resonance spectroscopy. *Brain Res* 1181: 142-148.
- Nambu A (2007) Globus pallidus internal segment. GABA and the Basal Ganglia: From Molecules to Systems. Eds Tepper JM, Abercrombie ED, Magill PJ, Bolam JP, Amsterdam, pp135-150
- 南部篤 (2007) 大脳基底核をめぐる 6 つの問題。Annual Review 神経 pp15-26
- 南部篤 (2007) 脳の損傷・病態モデルによる研究: パーキンソン病を中心に、ブレイン・マシン・インターフェース 脳と機械をつなぐ、オーム社, pp126-138
- 南部篤 (2007) 大脳基底核の神経回路から大脳基底核疾患の病態を理解する。神経変性疾患のサイエンス, 南山堂, pp156-169
- 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
- Chiken 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

Nambu A (2006. 2) Basal ganglia oscillations and movement disorders. The 11th Otto Loewi Conference, The Rhythmic Brain (Eilat, Israel).

南部篤 (2006. 7) 定位脳手術の神経生理学的基盤 第 29 回日本神経科学大会 (京都)

知見聡美、田風、高田昌彦、長谷川一子、南部篤 (2006. 7) ジストニアモデルマウスにおける小脳プルキンエ細胞も活動 第 29 回日本神経科学大会 (京都)

畑中伸彦、高良沙幸、橋吉寿、高田昌彦、南部篤 (2006. 7) 運動課題遂行中のサルにおける線条体ニューロン活動への GABA 作動性調節 第 29 回日本神経科学大会 (京都)

宮地重弘、澤田香織、岡戸晴生、南部篤、高田昌彦 (2006. 7) 黒質ドーパミンニューロンにおけるカルビンディン強制発現によりパーキンソン病が抑制される 第 29 回日本神経科学大会 (京都)

橋吉寿、岩室宏一、高田昌彦、南部篤 (2006. 7) パーキンソン病にみられる異常な淡着球ニューロン活動を改善する新たな可能性 第 29 回日本神経科学大会 (京都)

高良沙幸、畑中伸彦、橋吉寿、高田昌彦、南部篤 (2006. 7) 運動野から入力を受けるサル線条体ニューロンの運動課題遂行中の活

動様式 第 29 回日本神経科学大会 (京都)

Takada M, Miyachi S, Sawada K, Inoue K, Okado H, Nambu A (2006. 10) Recruitment of calbindin into dopaminergic nigrostriatal neurons protects against the onset of Parkinsonian motor signs.

36th Annual Meeting of Society for Neuroscience (Atlanta, USA)

Yumoto N, Lu X, Miyachi S, Nambu A, Fukai T, Takada M (2006. 10) Neural activity dependent on prediction and detection of elapsed time in macaque area 9. 36th Annual Meeting of Society for Neuroscience (Atlanta, USA)

Lu X, Miyachi S, Ito Y, Nambu A, Kitazawa S, Takada M (2006. 10) Somatotopic organization of inferior olive as evidenced by multisynaptic inputs to primary motor cortex. 36th Annual Meeting of Society for Neuroscience (Atlanta, USA)

岩室宏一、橋吉寿、齊藤延人、南部篤 (2007. 1) 霊長類の視床下核の体部位局在についての検討. 第 46 回日本定位・機能神経外科学会 (福岡)

岩室宏一、橋吉寿、齊藤延人、南部篤 (2007. 3) サルの視床下核における大脳皮質運動領野からの投射様式. 第 84 回日本生理学会大会 (大阪)

南部篤 (2007. 5) 大脳基底核の構造と機能. 第 27 回脳神経外科コンgres 総会 (仙台)

南部篤 (2007. 6) 大脳基底核の謎. 第 22 回日本生体磁気学会 (岡崎)

南部篤 (2007. 7) Functions and circuits of the basal ganglia: toward understanding pathophysiology of dystonia. 第 49 回日本小児神経学会総会サテライトシンポジウム 2: ジストニアシンポジウム (大阪)

南部篤 (2007. 7) モデル動物および患者の神経活動から、ジストニアの病態について考える. ジストニアの疫学、病態、治療に関する研究班平成 19 年度 夏季ワークショップ (東京)

南部篤 (2007. 8) 大脳皮質-大脳基底核ループ. 第 22 回日本大脳基底核研究会 (旭川)

- Nambu A, Hatanaka N, Takara S, Tachibana Y & Takada M (2007, 9) Information processing in the striatum of behaving monkeys. IBAGS IX - International Basal Ganglia Society 9th Triennial Meeting (Egmond aan Zee, Netherlands)
- Tachibana Y, Iwamuro H, Kita H, Takada M & Nambu A (2007, 9) Origins of abnormal beta-band oscillatory discharges in basal ganglia neurons of parkinsonian monkeys. IBAGS IX - International Basal Ganglia Society 9th Triennial Meeting (Egmond aan Zee, Netherlands)
- Iwamuro H, Tachibana Y, Saito N & Nambu A (2007, 9) Organization of motor cortical inputs to the subthalamic nucleus in the monkey. IBAGS IX - International Basal Ganglia Society 9th Triennial Meeting (Egmond aan Zee, Netherlands)
- 畑中伸彦、高良沙幸、橋吉寿、高田昌彦、南部篤 (2007.9) 運動課題遂行中のサルにおける淡蒼球ニューロン活動のグルタミン酸および GABA 作動性調節. 第 30 回日本神経科学大会 (横浜)
- 橋吉寿、岩室宏一、高田昌彦、南部篤 (2007.9) パーキンソン病モデルサルの大脳基底核ニューロンに見られる異常発振. 第 30 回日本神経科学大会 (横浜)
- 知見聡美、Pullanipally Shashidharan、南部篤 (2007.9) 全身性ジストニアモデルマウスにおける大脳基底核の異常活動. 第 30 回日本神経科学大会 (横浜)
- 高良沙幸、畑中伸彦、高田昌彦、南部篤 (2007.9) 運動野から入力を受けるサル淡蒼球ニューロンの運動課題遂行中の活動様式. 第 30 回神経科学大会 (横浜)
- 岩室宏一、橋吉寿、齊藤延人、南部篤 (2007.9) 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 30 回日本神経科学大会 (横浜)
- 南部篤 (2007.10) 大脳皮質は基底核から何を受け、基底核に何をしているか? 第 1 回 Movement Disorder Society, Japan 学術集会 (東京)
- 橋吉寿、岩室宏一、南部篤 (2007.10) 大脳基底核疾患における視床下核-淡蒼球内節投射の重要性. 第 54 回中部日本生理学会・第 100 回近畿生理学談話会 (津)
- 知見聡美、Pullanipally Shashidharan、南部篤 (2007.10) ジストニアモデルマウスにおける大脳基底核ニューロンの活動様式. 第 54 回中部日本生理学会・第 100 回近畿生理学談話会 (津)
- 高良沙幸、畑中伸彦、高田昌彦、南部篤 (2007.10) 運動野から入力を受けるサル被殻投射ニューロンの運動課題遂行中の活動様式. 第 54 回中部日本生理学会・第 100 回近畿生理学談話会 (津)
- Yumoto N, Lu X, Miyachi S, Nambu A, Fukui T & Takada M (2007.11) Effect of prefrontal cortex inactivation on reproduction of memorized time. Neuroscience 2007 (San Diego, USA)
- Lu X, Miyachi S, Ito Y, Nambu A, Kitazawa S & Takada M (2007.11) Arrangement of cerebellar interpositus nucleus neurons projecting multisynaptically to primary motor cortex vs prefrontal cortex. Neuroscience 2007 (San Diego, USA)
- Takahara D, Hoshi E, Hirata Y, Inoue K, Miyachi S, Nambu A & Takada M (2007.11) A neuronal pathway for conditional motor behavior: organization of multisynaptic input to dorsal premotor cortex from inferior temporal cortex in macaque monkeys. Neuroscience 2007 (San Diego, USA)
- 南部篤 (2007.12) 大脳基底核の構造と機能. 第 15 回神経科学の基礎と臨床 (大阪)
- 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)

額額大輔、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

てー (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）

研究報告書

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。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を解析することで保護効果の機序を明らかにしようとしてみた。結果として Zonisamide は PIP3/Akt 経路の活性化により FOXO3a 転写因子の活性化と MnSOD の発現増加により保護効果を示すことが確認された。

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、新規薬剤として認証された。パーキンソン病治療薬はどれも症状の改善効果は期待できるが、病態の進行を抑制する効果は期待できない。われわれは、Zonisamide の神経保護効果を検討することでパーキンソン病の進行抑制効果の可能性につき検討しようとしてみた。

ドパミンおよび MPP+ が惹起する酸化ストレスは中脳黒質神経細胞の変性を促し、パーキンソン病発症に関与または人工的にパーキンソン病モデルを作る手段として使用されてきた。これらの酸化ストレスから神経細胞を保護することが invitro 実験にて確認できれば、パーキンソン病の進行抑制薬としての一翼を担える可能性が生じる。

われわれは、まずこの保護作用につき検討し、その後メカニズムにつき検討することで、期待される保護作用の分子機構を解明することに努めた。

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 100 μ M の Retinoic acid により分化誘導の後、ゾニサミド 100 μ M 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。細胞生存能力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。またゾニサミド添加後の細胞内タンパク質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：

Dopamine および MPP+ の神経毒による細胞死は Zonisamide 投与群でコントロール群に比較し有意に抑制された。保護効果が確認できたため、分子機構につき検討した。遺伝性パーキンソン病の原因遺伝子産

物であるタンパク Pakin、PINK1、等の検討したところ PTEN のタンパク質動態が変化することを確認。リン酸化 PTEN (Phosphatase and tensin homolog) タンパク質の増加が確認された。その下流を担う Serine/ Threonine kinase である Akt1 タンパク質のリン酸化が生じることも確認した。そして 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 FKHL1 (FOXO3A) のリン酸化は Anti-apoptotic signal pathway として報告されている。とくに FKHL1 (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 FKHL1 をリン酸化し Inactivate すること anti-apoptotic な作用を示していることが推測されている。

FOXO3a は MnSOD の発現を制御していることが報告されており MnSOD の発現についても検討した。その結果 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。Antiapoptotic 作用の確認には Staurosporine により誘導される Caspase 3、9 の発現量は Zonisamide 投与において優位に抑制されることにより確認した。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。

近年、Autophagy による神経細胞変性が報告され始めており本研究においても同様のメカニズムについて検討した。結果として Autophagy mechanism を抑制することはなく Zonisamide 自体が神経変性と関連することはないことが証明された。

E 研究結果の発表

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

ポスターセッションにて発表
第 49 回日本神経学会総会にて発表 (2008 年横浜)

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）
分担研究年度終了報告書

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、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。本研究では、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、アストログリア、初代培養神経・グリア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。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。ゾニサミドが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グルタチオン増加作用の発現機序を明らかにできた。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と考えられる。

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、細胞障害性に働く。このようなL-DOPA およびドパミンの神経毒性は、グルタチオンなどのキノン消去系諸因子により抑制されることを分担研究者らは既に報告した。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り、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。

そこで本研究では、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、アストログリア、初代培養神経・グリア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。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

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)、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 μM)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)、アストログリアでのグルタチオン基質となるシステインの取り込み部位のシステイン/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。さらに、ゾニサミド原末添加(最終濃度1-100 μM, 1, 5日間)によるキノブ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 μM)の同時添加の効果についても検討した。

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、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 (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。

また、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。

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、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、および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影響

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マウスを用いて、6-OHDA注入2週後にア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

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。

一方、アストログリアC6細胞においては、ゾニサミド(1-100 μ M)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。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、ゾニサミド(100 μ M)の1日間持続添加により線条体初代培養アストログリアにおいても有意な増殖促進が認められた。

正常マウスへのゾニサミド連日投与による線条体キノロン消去系酵素、グルタチオン関連酵素、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、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、線条体のキノロン還元酵素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。しかし、ゾニサミドNa(30 mg/kg, i. p.)の連日投与により、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。

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、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、および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影響

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た。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。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。ゾニサミド(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 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、これまでの研究成果から、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対して保護・抑制効果を発揮する可能性が高いと考えられた。そこで本研究では、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、アストログリア、初代培養神経・グリア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。これらの結果より、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。

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た。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。さらに、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 GFAP 陽性活性化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、C6 アストログリア細胞および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、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化型アストログリアの増殖が認められた。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S100β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。

一方、実際にパーキンソン病モデルでの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とドパミントランスポーター陽性シグナルの減少は著明で、非障害側の約20%程度にまで減少していた。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・アストログリア連関の修飾能に着目して、アストログリアからのS100β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、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。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と考えられる。

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: S18-26, 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.
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.
 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.*, 414: 263-267, 2007.
 10. 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.
 11. 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.
 12. Asanuma, M. and Miyazaki, I.: Common anti-inflammatory drugs are potentially therapeutic for Parkinson's disease? *Exp. Neurol.*, 206: 172-178, 2007.
 13. 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.
 14. 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.
 15. 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.
 16. 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.
17. 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.
 18. Miyazaki, I. and Asanuma, M.: Dopaminergic neuron-specific oxidative stress caused by dopamine itself. *Acta Med. Okayama*, 62: 141-150, 2008.
 19. Asanuma, M. and Miyazaki, I.: Nonsteroidal anti-inflammatory drugs in experimental parkinsonian models and Parkinson's disease. *Curr. Pharm. Design*, 14: 1428-1434, 2008.
 20. 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.
 21. 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.
 22. Miyazaki, I. and Asanuma, M.: Approaches to prevent dopamine quinone-induced neurotoxicity. *Neurochem. Res.*, 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.
 11. 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.
 12. 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 回日本脳科学学会, 出雲, 2007, 6, 8.
 13. 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 回日本脳科学学会, 出雲, 2007, 6, 8.
 14. 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.
 15. 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.
 16. 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.
 17. 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.
 18. 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.
 19. 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.
 20. 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.
 21. 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.
 22. 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.
 23. 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.
 24. 田中健一, 八木崇夫, 吉田和代, 定金浩嗣, 浅沼幹人: クリアアポイダシ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.
 25. 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.
 26. 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.
27. 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.
28. 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.
29. 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.
30. 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.
31. 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.
32. 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.
33. 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.
34. 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.
35. 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.
36. 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.
37. 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.
38. 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.
39. 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