

[別紙 1]

論文の内容の要旨

論文題目 zonisamide の抗パーキンソン作用機序に関する研究

指導教官 辻 省次教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 11 年 4 月入学

医学博士課程

脳神経医学専攻

氏名 堀内 恵美子

序論

パーキンソン病 (Parkinson's disease 以下 PD) は臨床的に振戦、固縮、寡動、姿勢反射障害を四主徴とし、病理学的には中脳黒質緻密層のドパミンニューロンの選択的神経細胞死を特徴とする神経変性疾患である。変性の結果、線条体でドパミン含量低下をきたすことが報告されて以来、薬物による対症的治療がはやくから確立してきた。その中でもレボドパは極めて良い効果を示すが、長期治療中に効果持続時間が短縮し、薬剤濃度減少に伴って効果が減弱する“wearing-off 現象”(W-O) が出現することが大きな問題となる。W-O の原因はドパミン神経終末減少の結果ドパミン神経の再取込み、保持が困難となること、レボドパの血中半減期が 1 時間程度と短いことなどが考えられる。対策としては、半減期の比較的長いアゴニスト、中枢でのレボドパの効果を持続させる MAO-B (モノアミン酸化酵素 B) 阻害剤、日本では治験中であるが末梢血液中のレボドパ代謝を抑制する COMT (カテコール-O-メチルトランスフェラーゼ) 阻害剤などが臨床的に使用されているがこれらを併用してもなお、W-O はコントロールし難い。長時間作用するレボドパ様の薬剤の開発が必要とされてきた。

1.背景 zonisamide の抗パーキンソン作用

私の共同研究者が長期に PD として経過観察してきた患者が痙攣発作をおこした際、抗痙攣薬 (antiepileptic drug: AED) である zonisamide (ZNS) を投与した。ZNS

は日本で開発され、10年以上にわたり使用されている AED である。作用機序としては、T 型 Ca^{2+} チャンネル阻害作用を有し、GABA (γ アミノ酪酸) 系には影響を及ぼさないことが知られている。ZNS 投与の結果、痙攣発作消失のみならず PD の症状が劇的に改善した。症状のコントロール不十分な PD 患者 9 例について ZNS のオープン試験を行い、うち 8 名については長期 (2~3 年) にわたり経過観察した。

対象・方法 患者には試験内容を十分説明し同意を得た。発端症例を含む 10 人の平均年齢は 57 歳で、平均罹患期間は 9.7 年、7 例が W-O を有し、3 例では認めなかった。drug off (off) 時の H-Y 重症度の平均は 3.8 であった。これらの患者にこれまでに用いてきた抗パーキンソン病薬に加え ZNS 50-200 mg / 日を投与し、投与前、12 週後、その後の長期経過観察では 6 ヶ月毎に Unified Parkinson's Disease Rating Score (UPDRS)、“off” 時の Hoehn-Yahr 重症度 (H-Y 重症度) 及び患者日誌による一日の“off” 時間により評価した。

結果 “off” 時の UPDRS part II (activities of daily life) は平均で 22.3 から 12.3 に、H-Y 重症度は平均で 3.8 から 2.8 に“off” 時間も平均 5.9 時間から 1.2 時間と著明な改善をみた。一方、十分量のレボドパを投与しているにも関わらず改善できなかったすくみなどの症状に対しては効果を示さなかった。また ZNS は PD に対しては、抗痙攣作用を期待して処方するよりも少量 (50~100 mg) で効果を示した。副作用は極めて少なく、軽い口渇程度であった。尚、試験終了後、発端症例を含め 9 例は 2 年以上にわたり投与を続けたが、ZNS の効果は持続し、levodopa equivalent daily dose も 4 例で減少した。

考察 ZNS は少量で著明な抗 PD 効果を示した。特に W-O の改善に著効を示し、一方レボドパ不応性の症状には明らかな効果を見出せなかったことから作用機序の一つとして持続的にドパミン系を刺激する可能性が考えられた。

2.ZNS の抗パーキンソン作用の発現機序

目的 ZNS の抗パーキンソン作用機序を明らかにするためにラット及びヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞を用いて、主にドパミン系に対する影響について検討した。

対象・方法 正常ラットに ZNS 0、20、50 mg/kg を 14 日間連日経口投与した後、線条体試料を用いて 1) HPLC-ECD system (Neurochem; ESA) によるドパミンとその代謝産物：3,4- dihydroxyphenylalacetic acid (DOPAC) と homovanillic acid (HVA) の定量、2) Hendry & Iversen 変法によるドパミン産生の律速酵素 Tyrosine hydroxylase (TH) 活性の測定、3) Western blot 法による TH 蛋白定量、4) List & Seeman 変法による線条体膜分画の D1・D2 ドパミンレセプター結合試験、5)

Tipton & Youdim の isotope 法による MAO 阻害能測定を行った。尚、屠殺時に頸動脈より採取した血液で ZNS 血中濃度を測定した。

SH-SY5Y 細胞培地に ZNS 20 μ M 及び特異的 T 型 Ca^{2+} チャネル遮断剤のニッケル (NiCl_2) 100 μ M、特異的 SK channel 遮断剤の apamin (300 nM) を投与し、0、3、6、12、24 時間後に細胞を収穫した。この試料を用いて 1) Western blot 法による TH 蛋白定量、2) real time PCR 法による TH mRNA と GAPDH mRNA の定量を行った。実験結果は多重比較検定 (Dunnett, Turkey-Kramer 法) により解析した。

結果 ZNS 14 日連日経口投与 2 時間後の血中濃度は 20 mg/kg 投与群で 17.8 ± 4.4 、50 mg/kg 投与群で $29.9 \pm 6.6 \mu\text{g/ml}$ であった。ラット線条体では、ZNS によりドパミン含有量が用量依存性に上昇した (コントロール: 0.328 ± 0.097 , 20 mg/kg: 0.572 ± 0.060 , 50 mg/kg: $0.853 \pm 0.222 \text{ pmol}/\mu\text{g protein}$)。DA 代謝回転 ((HVA+ DOPAC) / DA) は 50 mg/kg 投与群 (0.361 ± 0.021) でコントロール (1.322 ± 0.584) と比し有意に低下していた ($p < 0.05$) がこの低下は HVA、DOPAC 含有量に有意な差が認められなかったことからドパミン産生亢進そのものを反映していると考えた。更に TH 活性は用量依存性に上昇した (コントロール: 1.81 ± 0.45 , 20 mg/kg: 2.24 ± 0.19 , 50 mg/kg: $2.49 \pm 0.37 \text{ pmol}/\text{mg protein}/\text{hour}$)。また TH immunoactivity は control の 129% ($p < 0.05$) に有意に増加した。また、ZNS は MAO-B に対して IC_{50} : 28 μ M と軽度の阻害能を有した。尚、0 nM-100 μ M の範囲では、D1 及び D2 受容体に対する親和性を示さなかった。SH-SY5Y 細胞では、ZNS (20 μ M) 投与 24 時間後に TH 蛋白量が増加した (129%, $p < 0.05$)。TH mRNA/ GAPDH mRNA は TH 蛋白の上昇 (24 時間) 投与に先行して、12 時間後にコントロールの 1.8 倍に上昇した ($p < 0.001$)。また NiCl_2 (100 μ M), apamin (300 nM) 投与 24 時間後に、TH 蛋白は順にコントロールの 1.20 倍、1.23 倍に増加した ($p < 0.05$)。それに先行して TH mRNA/ GAPDH mRNA は投与 12 時間後に順にコントロールの 1.50 倍、1.91 倍の上昇を認めた ($p < 0.05$)。

考察 ZNS は、TH mRNA 量及び TH 蛋白量増加を介してドパミン合成を亢進した。MAO-B 阻害能は選択的 MAO-B 阻害薬である selegiline より遥かに軽度であった。また D1 及び D2 受容体への親和性は認めなかった。ドパミン放出、再取りこみや GABA 系には影響を及ぼさないことが既に報告され、アドレナリン、セロトニン、グルタミン酸、アデノシンなど他の受容体に対する親和性は有さないことが大日本製薬との共同実験で示されているため、ドパミン合成亢進が PD に対する主な作用機序であると考えた。ZNS は T 型 Ca^{2+} チャネル遮断作用を有するが

2002 年、T 型 Ca^{2+} チャンネル遮断剤によりマウス中脳黒質ドパミンニューロンのバーストが増加することが報告された (Wolfalt and Roeper)。TH mRNA 量の増加のメカニズムとしては、1) ZNS が転写調節に関与する 2) T 型 Ca^{2+} チャンネル遮断剤として二次的にドパミン合成を増加させる、という 2 つの仮説が考えられる。特異的 T 型 Ca^{2+} チャンネル遮断剤及びそれに機能的リンクする SK チャンネルの遮断剤である apamin により TH mRNA が増加することを示したことは、バースト増加の結果ドパミン放出が増加し、二次的に TH mRNA 量が増加するという仮説を支持すると考える。

4. 今後の展望

T 型 Ca^{2+} チャンネルを介した TH 増加についての仮説を確認するため、ラットの中脳スライスに ZNS を投与し、黒質ドパミンニューロンのバーストに及ぼす影響を検討したい。現在、PD に対する臨床効果については全国規模で多施設共同二重盲検試験が進行中である。ZNS は PD に使用される薬剤としては“TH mRNA 増加を介したドパミン合成亢進”というこれまでにない作用機序を有すると考えられる。今後同様の作用をもつより強力な薬剤の開発につながることを期待している。