

パーキンソン病におけるレドックス

植田勇人

キーワード：パーキンソン病, フリーラジカル, 抗酸化システム, レドックス, ゾニサミド

Parkinson disease, free radical, antioxidant system, redox, zonisamide

抄録：フリーラジカル（以後、ラジカルと略）発生はドパミン代謝における宿命的過程でもあり、パーキンソン病とその治療薬を考える上で重要な分子種である。過酸化水素と遷移金属との反応で発生するラジカルは、パーキンソン病の成因のみならず治療経過にも多角的に関与していると考えられる。一方 α トコフェロール—アスコルビン酸系、グルタチオンやSODなどの抗酸化系は、生物が進化していく過程で紫外線曝露などの激しい酸化ストレスから防御するために獲得した強固な防御システムであり、ラジカルを巧みな仕組みで効率的に還元し消去している。このようにして健康な生体では酸化・還元バランスである「レドックス」はその均衡を保っているが、様々な原因でこの均衡が崩壊することで疾病病態が形成される。パーキンソン病の成因やその後の病態経過もレドックス均衡から眺めることが出来る。またドパミン補充療法やドパミン受容体アゴニストを投与しても効果不十分なパーキンソン病症例に、ゾニサミド追加投与の有効性が報告されている。ゾニサミドの追加投与が脳内ドパミン量を増加させ、かつドパミン代謝で崩れやすいレドックス是正効果も有していることがその分子背景のようである。既にin vitro 実験においてはゾニサミドそのものがヒドロキシラジカルや水素ラジカルの消去能を持ち、さらにin vivo 実験でも急性ゾニサミド投与は脂溶性の抗酸化能の亢進することが知られている。ゾニサミドの薬理効果には様々なものが提唱されているが、ドパミン増加作用とドパミン代謝によるラジカル攻撃の緩和作用がゾニサミドのパーキンソン病治療薬としての特異性であろう。抗てんかん薬としてのゾニサミドにはてんかん発作の抑制と神経保護作用という“dual action”がみられるように、パーキンソン病のレドックス是正にも作用点を有するゾニサミドの効果を勘案すると、そこにもやはりパーキンソン病治療における“dual action”を見いだすことが出来る。

(自律神経, 46: 181~185, 2009)

パーキンソン病

パーキンソン病とは安静時振戦、筋固縮、無動・寡動、姿勢反射障害を4大症状とする進行性変性疾患である。黒質のドパミン神経細胞の変性が主体病理で、

本邦の有病率は人口10万人あたり100~150人と推定されている¹⁾。発症年齢は50~65歳に多いが、高齢になるほど発病率が増加する。パーキンソン病の病因は未だ明らかにされていないが、神経細胞変性の機序として酸化的ストレス（特に黒質の鉄の役割とミトコンドリア呼吸酵素の異常)²⁾、環境毒(salsolinolなど)^{3,4)}・遺伝的素因説^{5)~7)}などの仮説が提唱されている。ここでは酸化ストレスによるパーキンソン病の病態形成につ

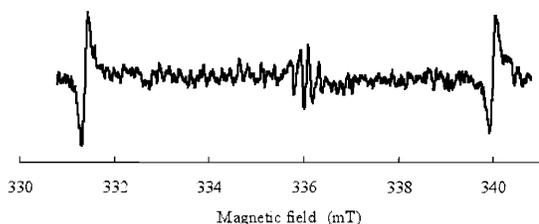


図1 試験管内で6-OHDAの水溶液を作成するとDAセミキノン(図1)と6-OHDAセミキノンが生じる。10⁻⁵M 6-OHDA から10⁻⁶M程度のDAセミキノンが生じる。1分子の6-OHDAが1分子の6-OHDAキノンに酸化される過程で、1分子の過酸化水素と、2分子の水素ラジカルを生じ、さらに酸化が進むと過酸化水素からヒドロキシラジカルが生じ、膜の過酸化が進行する。

いていくつかの論文検証も含めて考察したい。

神経細胞膜の過酸化障害の進行によって組織ネクローシスが誘導されるが、アスコルビン酸・ α トコフェロール・還元型グルタチオン(GSH)などの酸化還元システムの疲弊によってさらに過酸化障害は重篤化する。酸化・還元反応を指すレドックスという化学量論上の言葉が最近生体病理の解釈に用いられるようになった。酸化還元反応が同時に起こる関係上、その均衡崩壊という表現は化学量論上異質ではあるが、生体にとって不都合な酸化(生体膜の過酸化障害など)がある組織部位で進行し、抗酸化システムによる修正が効かなくなった場合、あるいは病理完成前後の酸化還元均衡を比較すると一方向性へのシフトが持続し病態生理を形成することがあり、便宜上「レドックス均衡が崩壊した」と表現する。

黒質緻密部の神経障害

ドパミンのMAO-Bによる代謝により過酸化水素を発生するが、パーキンソン病では抗酸化システムの一つGSHが低下していることが報告されている⁸⁾⁹⁾。その結果ドパミン代謝に伴って発生する過酸化水素が消去されず、遷移金属である鉄イオンとの反応(フェントン・ハーバー・ウエイズ反応¹⁰⁾)により高活性のヒドロキシラジカルが生じ、神経細胞の脱落が黒質緻密部(元来鉄イオンの含有量が高い組織¹¹⁾¹²⁾)その他の組織で起きる。この過程が、パーキンソン病のラジカル仮説の中核である²⁾¹³⁾。しかし、後述するようにヒトパーキンソン病の緩徐な病態進行のなかでこのラジカルによる酸化プロセスがどのタイミングで起こるか、持続

的に酸化が起き続けるのかがラジカル仮説の難しい点である。

パーキンソン病のモデル作成

ラジカル仮説によってこの病態を解釈するうえで、ヒトパーキンソン病の症状に近似したモデル動物を作成し分子生化学的な解釈を加えていくことが新規治療戦略上でも重要なプロセスである。6-hydroxydopamine(6-OHDA)を一側のドパミン神経線維に取り込ませ、ラジカル破壊を起こし黒質線条体のドパミン系機能をラジカルによって傷害させたモデルが頻用されている¹⁴⁾。6-OHDAは酸化されてキノン体になる。試験管内において6-OHDAを生理食塩水に溶解した場合、酸化され電子スピン共鳴(electron spin resonance; ESR)装置上でキノン体が観察される(図1)。内側前脳束(medial forebrain bundle; MFB)に6-OHDAを注入すると軸索輸送され上行・下行性ドパミン神経線維が破壊される。6-OHDA注入によってラジカルによるドパミン神経線維の破壊が進行することは、ラジカル捕捉剤(POBN)による実験で6-OHDA注入(破壊)側線条体からのみ過酸化障害を示唆するESR信号が観察されることから裏付けられる(図2)。さらにドパミン遊離促進剤のメタンフェタミン投与でラットが破壊側への回転運動が観察されることから、6-OHDAによるドパミン神経線維の障害を確認することが出来、モデル完成としている¹⁵⁾。このモデル作成方法はパーキンソン病のラジカル仮説に準拠し形成されるもので、多角的な生化学的検証が行われている。興味深い点は6-OHDA注入急性期には過酸化障害を示す図2のようなラジカルの発生は確認されるが、モデル完成後の慢性期にはこのようなラジカル発生は観察されなかった。完成したパーキンソン病モデルにおいては積極的にラジカル発生を示唆するESR信号の確認は出来なかったが、次に示すパーキンソン病モデル動物の線条体で抗酸化システムの疲弊が観察されることから、相対的なラジカルへの脆弱性が推測される。パーキンソン病におけるラジカル仮説の発展的解釈である。

病態モデルにおけるレドックス解析

脳組織のレドックスを解析するにあたって、いくつかの注意事項がある。脳組織のホモジェネートを試料としてレドックスを解析する際、酸素との反応や組織間でのホモジェネート時間の不均一性などの条件が入

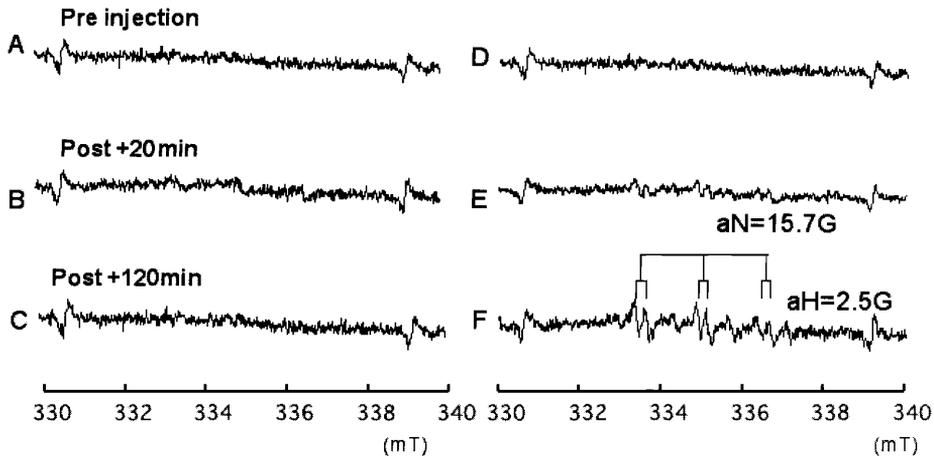


図2 一側(左)MFBへの6-OHDA注入前後における線条体でのPOBNスピンアダクト。A, B, Cは右側線条体, D, E, Fは左側線条体。左線条体において6-OHDA注入20分後からラジカルが検出された(E, F)。ラジカルは窒素、水素の超微細分裂から脂肪酸ラジカルと同定された。

るため、組織の酸化状態が正しく反映されず、比較が困難になる。また、麻酔下でのレドックス解析も行われているが一般的に麻酔によって抗酸化システムは増強されることからレドックスを正しく評価できない¹⁶⁾。よって嫌気下で試料をESRなどの検出器に誘導する必要がある。次に記載するニトロキシドラジカル消去速度から脳内レドックスを検証する方法でも、高濃度のニトロキシドラジカルの生体投与は神経細胞の脱分極を誘発する関係で、検出限界のニトロキシドラジカル濃度を投与して病態レドックスを描出することが求められる。

ニトロキシドラジカル法によるレドックス解析

脳マイクロダイアリースにて神経細胞外液を回収し灌流液をESRのキャビティに直接誘導することによって、レドックス状態の変動検証を嫌気下で試みることができる(図3参照)。図3は雄性Wistar系ラットにマイクロダイアリースプローブを脳定位術にて線条体に固定し、ESRに組織外液を送っている図である。次に脳血管閥門通過性ニトロキシドラジカル(3-methoxycarbonyl-2, 2, 5, 5-tetramethylpyrrolidine-1-oxyl; PCAM)を腹腔内投与し線条体から回収されるPCAMのESR信号強度を観察する。PCAMのようなニトロキシドラジカル消去速度の遅延は抗酸化システムの減弱を、一方消去速度の促進は抗酸化システムの増強を意味する¹⁷⁾。6-OHDAで一側MFBを破壊し

たラットの黒質線条体ドパミン線維の破壊側と健常側での線条体におけるニトロキシドラジカルの消去速度を比較した。その結果、抗酸化システムの疲弊を意味するニトロキシドラジカル消去速度の遅延が破壊側で観られた。しかしながら、モデル完成後の慢性期においては破壊側においても健常側においても図2のようなラジカルをESR装置の感度($10^{-6}\text{M}\sim 10^{-7}\text{M}$)にて捕捉することは出来なかった。よってラジカル仮説によってこのモデルを説明するならば、抗酸化システムが疲弊しているために黒質線条体でラジカル発生が容易になっていると表現されるであろう。

パーキンソン病治療薬とレドックス

L-DOPAによるドパミンの補充療法はパーキンソン病薬物治療の基幹を成す。上市されている脳内移行を高めたL-DOPA製剤の長期使用がどのようにレドックスに影響してくるかを観るために、L-DOPA(50 mg/kg)とベンゼラジドを一週間反復投与し、線条体における抗酸化システムを計測した。その結果、L-DOPAの投与は線条体抗酸化システムを減弱させた。

セレギニンとゾニサミド

MAO-Bによるドパミン酸化が細胞障害機序に重要な役割を果たしており¹⁸⁾、セレギリンはその活性を阻害することで細胞変性を抑制している可能性が考えられている。パーキンソン病における神経変性機序に関

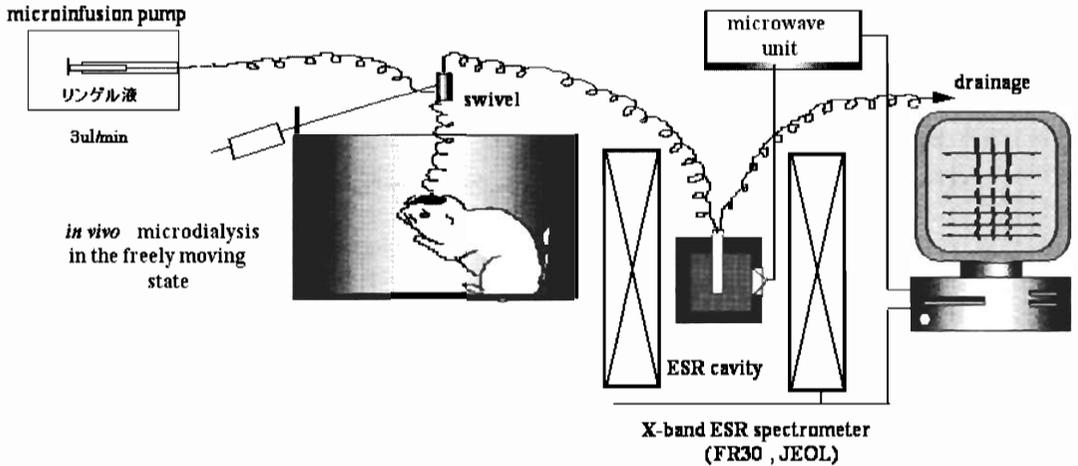


図3 マイクロダイアリーシス—ESR法. このデバイスによって、マイクロダイアリーシスによって回収される標的組織の細胞外液中のラジカルのESRシグナル強度を嫌気下で追跡できる. シグナル強度の減衰速度から半減期を計算し、生体の抗酸化システムの強弱を推測した.

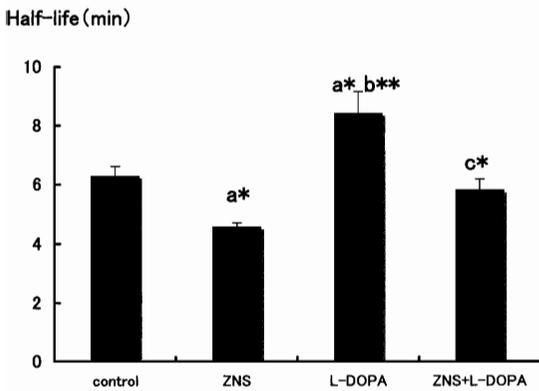


図4 縦軸はニトロキシドラジカル消去速度の半減期を示す. 半減期が長い傾向を示すグループでは抗酸化システムの疲弊が示唆される. 健康なラットの線条体でニトロキシドラジカル消去速度を計測した場合のグラフである. L-DOPAを反復投与(1週間)した線条体では半減期が延長しレドックス酸化シフトが認められたが、ZNSの併用によって酸化シフトが是正される成績が得られた.

統計は一要因(グループ)分散分析を用いた. 主効果が有意であったため、(F3.53 = 8.682 (P = 0.000)) 多重比較を行った. a*: P < 0.05 vs. control, b **: P < 0.01 vs. ZNS, c*: P < 0.05 vs. L-DOPA (Tukeyテスト)

するラジカル説や神経毒素説に加え上記実験内容に示される患側線条体の抗酸化システムの脆弱性が潜在することを考えると、セレギリンの神経保護作用は興味深い作用点である. またゾニサミドのL-DOPA製剤の併用療法は細胞外ドパミン濃度を上昇させることで難治性病態の改善を窺う事例が多い¹⁾. ゾニサミドには水素ラジカルやヒドロキシラジカルの消去作用が報告されているが、L-DOPA製剤の反復投与による抗酸化システムの脆弱化にどんな影響をもつかを検討した. 方法論は先述したニトロキシドラジカル消去速度の測定を利用した. 正常ラットにL-DOPAの反復投与を行うと、やはり線条体の抗酸化システムは脆弱化してきたが、ゾニサミドとの併用によってその脆弱化は抑止された(図4). L-DOPAの投与はパーキンソン病の薬物治療における主軸であるが、ZNSとの併用はDAの増加をもたらすとともに、L-DOPAによって生じるレドックス不均衡の是正もたらされる.

まとめ

パーキンソン病におけるラジカルの関与は過去の文献ですでに提唱されてきたものであるが、今回はラジカルと抗酸化システムの均衡(レドックス均衡)に注目しパーキンソン病モデル動物の成因やL-DOAP補充療法へのゾニサミド併用療法についての機序を強調して記述した. そのなかでパーキンソン病病態のラジ

カル仮説はラジカル発生のみではなく抗酸化システムの疲弊も念頭に入れた「レドックス仮説」という表現の妥当性にも触れた。レドックス均衡の是正の観点からパーキンソン病治療におけるゾニサミドの combination therapy が次世代の治療ストラテジーとして重要性を帯びてくると思われる。ただラジカルの関与やレドックスの崩壊はパーキンソン病の成因仮説として受け入れられているが、6-OHDA 注入ラットに観られた結果とヒトパーキンソン病におけるラジカルの関与との相同性については今後も慎重に議論される必要がある。6-OHDA 注入モデルでも明確に出来なかったように、実際のヒトパーキンソン病態でもどの時点でラジカル発生が観られるか、どのような機序でレドックスが崩壊していくかについてはさらに深く掘り下げられるべきである。

§ 文 献

- 1) 村田美穂. 治療薬 パーキンソン病治療薬 パーキンソン病治療薬の問題点と今後望まれる薬剤. 日本薬理学雑誌 2008; 131: 281—284.
- 2) 近藤智善, 羽鳥浩三. パーキンソン病とフリーラジカル. 神経精神薬理 1994; 16: 199—208.
- 3) 松原和夫. パーキンソン病と内因性・外因性神経毒. 臨床神経学 2004; 44: 474.
- 4) 尾崎由博, 坂本健太郎, 石塚真由美ら. パーキンソン病発症に関わるノルサルツリノールと遷移金属の相乗的毒性効果. 日本薬学会 126 年会講演要旨集 2006; (3): 183.
- 5) 戸田達史, 佐竹 渉, 水田依久子ら. Genome-wide association study of Parkinson's disease. 日本生化学会大会・日本分子生物学会年会合同大会講演要旨集. 2007; 80 回・30 回, 2S16—15.
- 6) 高橋良輔. パーキンソン病の分子機構 最近の知見. 臨床神経学 2008; 48: 510.
- 7) Murata M. Novel therapeutic effects of the anti-convulsant, zonisamide, on Parkinson's disease. Curr Pharm Des 2004; 10: 687—693.
- 8) 宮崎育子, 穂積宏彰, 三好 耕ら. 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. 日本神経精神薬理学雑誌 2007; 27: 289.
- 9) Miyazaki I, Hozumi H, Miyoshi K, et al. Glutathione synthesis-related molecule in astrocytes in dopamine quinone neurotoxicity. 神経化学 2007; 46: 628.
- 10) Puppo A, Halliwell B. Formation of hydroxyl radicals from hydrogen peroxide in the presence of iron. Is haemoglobin a biological Fenton reagent? Biochem J 1988; 249: 185—190.
- 11) 川上拓男, 井手亜里, Watt F. 放射光を用いた鉄の化学状態分析—パーキンソン病猿の脳組織. Biomedical Research on Trace Elements 2003; 14: 210—214.
- 12) 佐々木真理, 遠山稿二郎, 柴田恵理ら. 3 Tesla MRI による黒質の分子イメージング 鉄と神経メラニンの二重コントラスト表示. 日本磁気共鳴医学会雑誌 2005; 25: 36—38.
- 13) 宮崎育子, 浅沼幹人. 【酸化ストレス フリーラジカル医学生物学の最前線】酸化ストレスと老化・疾患 老化・脳神経疾患 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. 医学のあゆみ 2006; 別冊 (酸化ストレス Ver. 2): 241—244.
- 14) Tanaka K, Ogawa N. Dopamine agonist cabergoline inhibits levodopa-induced caspase activation in 6-OHDA-lesioned mice. Neuroscience Research 2005; 51: 9—13.
- 15) Inden M, Kim D, Gu Y, et al. Pharmacological Characteristics of Rotational Behavior in Hemiparkinsonian Rats Transplanted With Mouse Embryonic Stem Cell-Derived Neurons. Journal of Pharmacological Sciences 2004; 96: 53—64.
- 16) Ueda Y, Doi T, Nagatomo K, et al. Protective role of pentobarbital pretreatment for NMDA-R activated lipid peroxidation is derived from the synergistic effect on endogenous anti-oxidant in the hippocampus of rats. Neurosci Lett 2007; 417: 46—49.
- 17) Ueda Y, Doi T, Nagatomo K, et al. In vivo activation of N-methyl-D-aspartate receptors generates free radicals and reduces antioxidant ability in the rat hippocampus: Experimental protocol of in vivo ESR spectroscopy and microdialysis for redox status evaluation. Brain Res 2007; 1178: 20—27.
- 18) 牧田圭弘, 相澤仁志, 橋本和季ら. 未治療パーキンソン病に対する塩酸セレギリンのハイドロキシラジカル消去能. 臨床神経学 2005; 45: 1119.