

日本医療研究開発機構 創薬基盤推進研究事業 事後報告書

I 基本情報

研究開発課題名： ゾニサミドの抗パーキンソン病薬作用機構の解明

Elucidation of the molecular mechanisms of Zonisamide as an antiparkinson medicine.

研究開発実施期間：平成 29 年 5 月 1 日～令和 2 年 3 月 31 日

研究開発代表者 氏名：赤松 和土

Wado Akamatsu

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：

学校法人順天堂 順天堂大学 大学院医学研究科ゲノム・再生医療センター 教授

Professor, Center for Genomic and Regenerative Medicine, Juntendo University School of Medicine

II 研究開発の概要

(目的)

ゾニサミド(ZNS)は抗てんかん薬として 1989 年から用いられている薬剤であるが、パーキンソン病(PD)患者への投与によって PD の運動症状を著明に改善することが明らかになり、臨床試験・治験を経て長期的効果を維持する新たな PD 治療薬として 2009 年 3 月に承認された。ZNS は神経保護作用を有することが知られており、従来のドパミン補充療法に併用される画期的な薬剤として極めて有用であることが明らかになってきたが、臨床における最大の問題点は、PD 患者の中で ZNS が著効する症例と効果が乏しい症例が混在している点、患者ドパミン神経細胞におけるゾニサミド作用機序は多くが不明であるという点である。そのため、現在の使用方法が ZNS の抗 PD 作用に対して最適化されているかは検証の余地がある。本研究では申請者らが平行して行う難治性疾患実用化研究事業で順天堂大学に構築する 300 検体を目標とする孤発性 PD 患者 iPS 細胞ライブラリーと付随する臨床情報データベースを用いて、各患者における ZNS 反応性(使用歴)と当該患者体細胞から樹立した iPS 細胞由来ドパミンニューロンにおける表現型の改善効果を併せて検証し、患者由来 iPS 細胞で患者自身のゾニサミド有効性を評価するシステムを構築することを目的とした。さらに分担者の服部・斉木らが AMED-CREST 事業で取得しつつある患者検体のメタボローム解析結果を参照、ZNS 反応例・不応例それぞれの iPS 細胞における ZNS 作用時のメタボローム解析を既に取得済みの患者メタボローム解析結果と併せて解析し、ZNS 著効例と不応例を区別しその薬効を予測するバイオマーカーの同定と作用機序の解明を試みた。現在は作用機序不明である ZNS の分子機構が解明とバイオマーカー同定を目指した。

(方法・結果)

1) 順天堂大学に細胞を蓄積済みの孤発性パーキンソン病症例におけるゾニサミド(ZNS)反応性の評価

まず検体採取時の ZNS 治療の有無を確認した。ZNS は PD 患者に対して一定の運動機能改善あるいは off 時間の短縮効果を認めるため、ZNS 治療群を「効果が明らかな群」と「効果が明らかなではない群」に分類

し、さらに非治療群の中でも「過去の ZNS 治療歴が明らかな群」を抽出した。上記患者に関しての臨床情報（ZNS 使用歴・効果）のフォローを研究期間内（2017-2019）通して行い、定期的に評価を行なった。情報は順天堂脳神経内科が管理するデータベースに登録した。カルテ情報を元に ZNS 内服有無（研究期間中に ZNS を内服していた患者は合計 132 名、男性 61 名・女性 71 名）を確認し、ZNS 治療群から「運動機能改善が自覚的あるいは他覚的に明らかな群」と「効果が明らかではない群」を抽出し、継続的に通院している症例の ZNS 治療効果を評価した。ZNS 内服開始後 1 年後の運動症状（Hoehn and Yahr ステージ）は、改善・変化無し、増悪に分類し登録した。結果的に順天堂 PD データベース内の ZNS 服用状況が登録され、症状の改善が記載された定量的なデータベースが構築される成果があった。当該データは今後の PD 病態研究・創薬研究においても引き続き活用可能な重要な資産である。本事業終了後もデータベースへの ZNS 服用状況は登録を継続する予定である。

2) PD 患者由来 iPS 細胞における ZNS 薬効評価システムの構築：

① 遺伝性 PD-iPS 細胞検体ドパミン神経細胞における PD 関連表現型に対する ZNS の効果の検証

申請者らがすでに樹立している各種の遺伝性 PD-iPS 細胞を小スケール（96well ベース）でドパミン神経細胞に分化誘導し、神経分化時に ZNS を培地に添加することによる細胞脆弱性や PD 特異的な表現型の改善を定量・評価した。これまでに樹立した遺伝性 PD-iPS 細胞のうち、複数の iPS 細胞において、増加している細胞死が ZNS 添加によって有意に減少した。それらの細胞は通常スケールでドパミン神経細胞分化誘導し、濃度依存的に細胞死が有意に減少することを確認した。遺伝性 PD のうち、特定のタイプで iPS 細胞由来ドパミン神経細胞で亢進している細胞死を ZNS が抑制することを明らかにした。

② 孤発性 PD-iPS 細胞検体ドパミン神経細胞における PD 関連表現型に対する ZNS の効果の検証

申請者らがすでに樹立している孤発性 PD-iPS 細胞をドパミン神経細胞に分化誘導し、神経分化時に ZNS を培地に添加することによる細胞脆弱性や PD 特異的な表現型の改善を定量・評価した。代表者の赤松が同時に進めている AMED 難治性疾患実用化研究事業（17ek0109244）「疾患 iPS 細胞を用いた遺伝性・孤発性パーキンソン病の新規治療薬探索」で樹立済みの健常および孤発性 PD-iPS 細胞検体をドパミン神経に誘導し、細胞死や α シヌクレイン等を指標に ZNS の薬効評価を行った。孤発性 PD 症例における細胞死の増加は遺伝性症例とは異なり全例で見られるわけではなかったが、全体で統計処理をするとコントロール群よりも細胞死は亢進していた。現在までに難治性疾患実用化研究事業で樹立した約孤発性 PD-iPS 細胞のうち、約 50 検体（コントロール 9 症例を含む）をドパミン神経細胞に分化誘導し培地中に ZNS を加えて細胞死と α シヌクレイン蓄積を指標に ZNS の効果を評価したところ、そのうち 3 症例では細胞死と α シヌクレイン蓄積が同時に ZNS 添加によって改善された。有効な症例も著効例とそうでない例があり、解析数を増やすことによって、このシステムが ZNS 反応性と作用機構を解明していく重要なツールになると十分に期待できる。本研究で解析した各孤発性 iPS 細胞における ZNS 反応性は、今後これらの iPS 細胞を他のプロジェクトで使用する際に重要な情報となるであろう。

3) 臨床情報および iPS 細胞における ZNS 反応性に基づく分類とメタボローム解析結果の解析：

研究項目 2 で ZNS 添加によって iPS 細胞の表現型が回復した 3 症例のうち、2 症例は当該患者において ZNS 内服 1 ヶ月後から運動症状である安静時振戦が大きく改善していた。1 症例は ZNS 内服を行っていない症例であった。これら 3 症例の疾患進行は緩やかで、それぞれの罹病期間は 8 年間、17 年間、18 年間であり、全症例が 2019 年 12 月現在も Hoehn and Yahr ステージ III（薬効が十分に得られている場合）である。しかし、ZNS を内服している 2 症例は Mini mental State Examination にて何れも 23 点以下（満点 30 点）を示しており、認知機能低下を合併しているが、そのうち 1 症例は運動症状発症後

17 年間でも認知機能低下を示していない (PD の認知症合併率は発症後 10 年後で約 40%、20 年後で約 80%とされている (Nat Rev Neurol 13:217, 2017))。これらの結果から iPS 細胞モデルにおいて ZNS による PD 表現型の回復が良好なものは、臨床表現型においても良性の経過を示す可能性が示唆された。これが ZNS の効果によるものなのか、そもそも ZNS に反応が良好な例が良性の経過を辿る症例なのかはさらに検証が必要であるが、我々の構築した遺伝性・孤発性 iPS 細胞モデルは、本研究で用いた評価方法によって実際の患者の ZNS 薬効と一定の相関性があると考えられた。メタボロームからの解析に関しては現状では著効と思われる症例が多くないために、iPS 細胞の結果からバイオマーカー探索を行うためには、更なる iPS 細胞の解析結果を待つ必要があると思われる。一方で既に ZNS 内服により脂肪酸 β 酸化の改善を報告しており (Ueno et al Cells 2018)、これは過去の ZNS によるミトコンドリア保護効果ともよく一致した (Ann Neurol 67:239, 2010)。本知見は ZNS の薬理作用を PD 患者体内で初めて明らかにしたものであり、本知見を元に、本年度後半に研究開発計画 1 で臨床情報から分類された ZNS 反応症例・不応症例に関して、すでに蓄積されているメタボローム解析および追加解析を行い、有意な差を示す代謝経路を同定する。

4) 患者および iPS 細胞メタボローム解析からの ZNS 作用機序の解明

前述した項目 3 のバイオマーカー探索まで至っていないため、当初の予定通り iPS 細胞の結果とメタボロームの結果を融合させて ZNS の作用メカニズムの解明に至るまでは本来の計画通りには到達していないが、iPS 細胞、メタボロームそれぞれで作用機序の解明に繋がる結果は得られている。

Research Summery

(Purpose)

Zonisamide (ZNS) has been used as an antiepileptic drug since 1989 and was approved in March 2009 as a new PD treatment with long-term efficacy following clinical and investigational studies showing that ZNS significantly improves PD motor symptoms when administered to Parkinson's disease (PD) patients. Although ZNS is known to have neuroprotective effects and has been shown to be extremely useful as a breakthrough adjunct to conventional dopamine replacement therapy, the greatest clinical problems are that ZNS has been shown to be effective in a limited population of PD patients, and the mechanism of action of ZNS in patient dopamine neurons is largely unknown. The purpose of this study is to establish a system to evaluate the effectiveness of ZNS in patients using patient-derived iPS cells, using a library of iPS cells and an accompanying clinical information database, which was constructed at Juntendo University as part of the applicant's parallel research project for practical application of intractable diseases. In addition, Hattori and Saiki performed the metabolomic analysis of these sporadic patient in AMED-CREST project. We aimed to clarify the molecular mechanism of ZNS and identify biomarkers related to ZNS responsiveness.

(Method and Results)

1) Evaluation of Zonisamide reactivity in sporadic Parkinson's disease patients in Juntendo Hospital

First, we checked for the presence of ZNS treatment at the time of sample collection. Because ZNS improves motor function or shortens off-time in PD patients, the ZNS-treated group was divided into two groups: those with a clear effect and those without a clear effect, and among the non-treated groups, those with a clear history of previous ZNS treatment were selected. Clinical information regarding the above patients was followed throughout the study period and evaluated periodically. The information was entered into a database maintained by Juntendo Neurology. We evaluated the efficacy of ZNS treatment in patients who were continuously attending the hospital. 1 year after starting ZNS, motor symptoms (Hoehn and Yahr stage) were classified as improvement, no change, or exacerbation. As a result, the Juntendo PD database of ZNS medication status was registered and a quantitative database of symptom improvement was established. We plan to continue the registration of ZNS dosage status in the database after the completion of the project.

2) Development of a ZNS drug efficacy evaluation system using PD- iPS cells

A variety of familial PD-iPS cells already established by the applicants were differentiated into dopaminergic neurons on a small scale (96-well base), and the addition of ZNS to the medium during neuronal differentiation was used to quantify and evaluate improvements in cellular vulnerability and PD-specific phenotypes. Among the familial PD-iPS cells established so far, the increased cell death was significantly reduced by ZNS addition in several types iPS cells. We also evaluated the efficacy of ZNS using sporadic PD-iPS cell samples.

3) Classification of sporadic PD cases based on ZNS reactivity in iPSC-derived neurons

Approximately 50 of the sporadic PD-iPS cells were differentiated into dopaminergic neurons, and ZNS was added to the medium to evaluate the effect of ZNS using cell death and alpha-synuclein accumulation as indicators. In three of these cases, the phenotypes were improved. Of the three patients whose iPS cell phenotype was restored by ZNS addition, two had significant improvement in the patient's motor symptoms of resting tremor after one month of ZNS treatment; one patient did not receive ZNS. These results suggest that a good PD phenotype recovery by ZNS in the iPS cell model may also show a benign course in the clinical phenotype. As there are currently not many cases that appear to be significant with respect to the analysis from the metabolome, we will have to wait for further iPS cell analysis results to conduct biomarker searches from the iPS cell results. On the other hand, we have already reported improvement in fatty acid beta-oxidation with zonisamide medication (Uno et al Cells 2018), and based on these findings, our goal is to identify metabolic pathways that show significant differences by performing already accumulated metabolomic and additional analyses on zonisamide-responsive and refractory cases classified from clinical information.

4) Elucidation of the mechanism of ZNS action based on patient and iPS cell metabolome analysis

Since we have not yet explored the biomarker, we have not yet found correlation between the results of iPS cells and metabolome to elucidate the mechanism of action of ZNS as originally planned, but we will continue our research to elucidate the mechanism of action in both iPS cells and metabolome.