

マグネシウムによるパーキンソン病の予防・治療効果に関する研究 :モデルマウスへの投与を通して

小柳 清光¹, 孫 立元², 鈴木 絵美¹, 朴 英善³, 橋本 智代^{1,4},
小杉 有希⁵, 高濱 祥子⁶, 河上 江美子⁷, 藤田 雅代⁷, 橋本 款⁷

¹ 信州大学医学部神経難病学, ² 桂林医学院神経病学(中国),

³ 首都医科大学北京天壇病院神経内科(中国), ⁴ 産業医科大学神経内科,

⁵ 東京都健康安全研究センター, ⁶ 聖泉大学人間学部,

⁷ 東京都医学総合研究所運動・感覚システム研究分野

概要 パーキンソン病は中年以降に発症して震えや固縮を来し、長期になると認知症や寝たきりになることがある神経難病である。患者数が極めて多い一方、原因は不明で、主病変である黒質ドパミン神経細胞死を防ぐ、あるいは傷害された神経機能を回復させる、という根本的な予防・治療法は今も無い。一方、マグネシウム(Mg)はパーキンソン病患者脳に生じる α -シヌクレインの凝集を阻害する事が知られ、神経変性疾患では唯一、患者髄液中での減少が報告されている。パーキンソン病ではミトコンドリア障害や酸化ストレスなどによって神経細胞死が惹起される、と報告されてきたが、Mgは強い抗酸化ストレス作用とミトコンドリア保護作用を有し、神経保護作用を発揮することが報告されている。

私どもは、Mgがパーキンソン病の予防・治療薬とにならないか、と考へ、ラット黒質培養細胞を用いた(*in vitro*)パーキンソンモデル(MPP⁺ [1-methyl-4-phenylpyridinium] 曝露)への予防・治療実験を行い、培養液中 Mg 濃度を通常の 1.5 倍に増やすことで、「予防実験」でも、「治療実験」でも、その有効性を確認した(*Hashimoto, Oyanagi et al., Brain Res 2008*)。

本研究はこのような背景に基づいて、世界でも初めて、生体(*in vivo*)パーキンソンモデルへの Mg による予防/治療効果を検証した。外因性の神経毒によるパーキンソンモデルとして MPTP [1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine] 投与マウス、および遺伝子異常に基づくパーキンソンモデルであるヒト α -シヌクレイン遺伝子組換えマウスを用いた。MPTP 実験群へは硫酸 Mg を浸透圧ポンプで脳室内持続投与を開始した後 MPTP を注射し、シヌクレイン遺伝子組換えマウスには脳内 Mg 濃度を上げると報告されている Magnesium L-Threonate を生後 20 週から 32 週まで飲用させた。結果は、ヒト α -シヌクレイン遺伝子組換えマウスへの Magnesium L-Threonate 飲用には効果が明瞭でなかったが、MPTP マウスへの **Mg 投与は、黒質ドパミン神経細胞死を抑制した。即ち、脱落するはずの神経細胞のおよそ 70%を生存せしめた。**本研究結果は、Mg がパーキンソン病の根本的な予防・治療薬となる可能性を提示した。

1. 研究目的

パーキンソン病の根本的治療・予防薬を開発・発見し、疾患を克服することを本研究の目的とする。

パーキンソン病は中年以降に発症して震えや固縮を来し、長期になると認知症や寝たきりになることがある神経難病である。パーキンソン病は、中脳の黒質ドパミン神経細胞などが死ぬ事によって発症するが、原因は不明で、

神経細胞死のメカニズムとしては、 α -シヌクレインが凝集したレビー小体の出現と小胞体ストレス、ミトコンドリアを中心とした酸化ストレス、などが報告されて来たが⁽¹⁻¹⁰⁾、これら全ての病的事象が一元的連続的に解明されたとは言いがたい。

パーキンソン病における神経細胞死を防ぐ、あるいは傷害された神経機能を回復させる、という根本的な予防・

治療法は今も無い。種々の内服薬は、神経細胞死によって枯渇する神経伝達物質の補充療法であり、脳深部刺激療法では電極を視床下核などまで刺入するため侵襲が大きく、不効例も多い。てんかん治療中に偶然パーキンソン病への有効性が日本で発見され、2009年適応が認められた「ゾニサミド」⁽¹¹⁾であるが、適応2年余りを経て、黒質神経細胞死を止める根本的治療であるか、疑問が持たれるようになった。一方、マグネシウム(Mg)はパーキンソン病患者に生じる α -シヌクレインの凝集を阻害し、レビー小体の形成を妨げる事が知られ⁽¹²⁾、神経変性疾患では唯一、患者髄液中での減少が報告され⁽¹³⁾、酸化ストレス等に対する数多くの神経保護作用も報告されている⁽¹⁴⁻²⁰⁾。

私どもは、低 Mg、低カルシウム摂取が原因と言われるグアム島のパーキンソン認知症の研究を30年間余り続けて来た(*Oyanagi et al., Acta Neuropathol 1986, Brain 2007 等論文計 31 編*)⁽²¹⁾。これにヒントを得てパーキンソン認知症の原因を確認する実験を企て、世界でも初めて、ラットを用いた「世代にまたがる Mg 欠乏が黒質ドパミン神経細胞死を惹起する」ことを見出した(*Oyanagi et al. 米国神経病理学会ワイル賞 [最優秀論文賞] 2002*)⁽²²⁾。この裏返しとして、Mg がパーキンソン病の予防・治療薬とならないか、と考え、ラット黒質培養細胞を用いた(*in vitro*)パーキンソンモデル(MPP⁺ [1-methyl-4-phenylpyridinium] 曝露)への予防・治療実験を行い、培養液中 Mg 濃度を通常の1.5倍に増やすことで、「予防実験」でも、「治療実験」でも、その有効性を確認した(*Hashimoto, Oyanagi et al., Brain Research 2008*)⁽²³⁾。

本研究はこのような背景に基づいて、世界でも初めて、生体(*in vivo*)パーキンソンモデルへの Mg による予防/治療効果を検証した。外因性の神経毒によるパーキンソンモデルとして MPTP [1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine] 投与マウス、および遺伝子異常に基づくパーキンソンモデルであるヒト α -シヌクレイン遺伝子組換えマウス⁽²⁴⁾を用いた。

残念ながら、血中 Mg 濃度が上昇しただけでは脳脊髄液の M 濃度は上がらないことを既に前実験で確認したので⁽²⁵⁾、MPTP マウスへは硫酸 Mg を浸透圧ポンプで脳室内持続投与を開始した後 MPTP を注射し、シヌクレイン遺伝子組換えマウスには、生後 20 週から 32 週まで、脳内 Mg 濃度を上げると報告されている Magunesium L

-Threonate⁽²⁶⁾を飲用させ、所見を観察解析して、下記する成果を上げた。

2. 研究方法

2.1 Mg の脳室内/線条体投与方法

硫酸 Mg (コンクライト-Mg [500 mM], ニプロファーマ社)を用い、下記 MPTP の注射4日前から、浸透圧ポンプリザーバー (Alzet, Cupertino, CA, USA) (容量 100 μ l)を用い、カニューレ (Brain Infusion Kit 3, Alzet) 先端は側脳室または線条体内に留置し、排出量 0.11 μ l/hr (#1004 Alzet, 4週間持続投与可能)、0.25 μ l/hr (#1002, 2週間持続投与可能)、0.5 μ l/hr (#1007D, 1週間持続投与可能)、1.0 μ l/hr (#1003D, 3日間持続投与可能)を選択して使用し Mg を投与した。

マウス (C57BL/6, 生後 8 週齢オス) をネンブタールで麻酔後、定位脳固定装置 (SR-6R, ナリシゲ, 東京) で固定し、定法に則って (i) 左側脳室へは、頭蓋骨ブレグマから、左へ 1 mm、後方へ 0.25 mm の位置で頭蓋骨にドリルで径 1 mm の穴を開け、カニューレを 2 mm 刺入した。(ii) 左線条体へは、ブレグマから、左へ 1 mm、前方へ 1 mm の位置で穴を開け、カニューレを 3 mm 刺入した (図 1)。本実験に先立ち、それぞれ 2 匹のマウスで、カニューレから 1% トレイジンプルーを注入した後、深麻酔で死亡させた後剖検して、色素の拡散を観察し、カニューレ先端部が、それぞれ側脳室、線条体に正確に存在していた事を確認した。

2.2 MPTP の投与方法

マウス (C57BL/6, 生後 8 週齢オス) への MPTP 注射は常法に倣って、生食に溶解させ、Mg 投与開始 4 日後に、20 mg/kg 体重を、2 時間おきに 1 日 4 回 (午前 10 時, 午後 0 時, 午後 2 時, 午後 4 時)、2 日間腹腔注射した。



図 1. C57BL/6 に設置したカニューレと浸透圧ポンプ

2. 3 Mg-MPTP マウスの飼料と飲水

Mgを脳内投与した後 MPTPを注射した群、およびその対照群は、通常のマウス用飼料と、水道水を滅菌フィルター処理した水を自由摂取させた。

2. 4 Mg-MPTP およびその対照マウスの屠殺時期

MPTP 注射群は、注射3週後、対照群は、生後11週で、深麻酔後環流固定または頸椎脱臼で屠殺した。

2. 5 ヒト α -シヌクレイントランスジェニックマウス ($\text{h}\alpha$ -Syn tg マウス)の作成

$\text{h}\alpha$ -Syn tg マウスは mThy-1 の exon2 から exon4 にヒト α -シヌクレインカセット (nt 53-475; Genbank accession No. L08850) が挿入されたマウスである⁽²⁴⁾。ヒト α -シヌクレインカセットはヒトの脳 mRNA から RT-PCR により作製し、mThy-1 カセットの exon2 から exon4 の間に挿入したベクターを作製した後、C57BL/6 \times DBA/2F1 の受精卵にマイクロインジェクション法で遺伝子導入され、ヒト α -シヌクレインの発現量が高い line が $\text{h}\alpha$ -Syn tg マウスとして作製された (図 2)⁽²⁴⁾。

本研究では、 $\text{h}\alpha$ -Syn tg マウスのメスと C57BL/6N のオスを掛け合わせ繁殖させたマウスを使用した。繁殖したマウスは生後 4 週にジェノタイプチェックを行った。マウス尾を 5 mm 採取し 1.5 ml チューブに入れ、Cell Lysis Solution (QIAGEN) 150 μ l と Proteinase K (20 mg/ml, Wako) 1 μ l を添加し混和した後、55°C で一晩培養し溶解させた。溶解液は遠心し上澄み 5 μ l を別のチューブに取り dH₂O 95 μ l を加えて希釈し、これをサンプル DNA として使用した。PCR の検出に用いたプライマーは、Forward: gac ggg tgt gac agc agt agc c, Reverse: gat gat ggc atg cag cac tgg で、PCR 産物は 349 bp である。PCR は 1 サンプルにつき 2X Ampdirect plus (島津製作所, 京都市) 10 μ l、dH₂O 7.9 μ l、Forward プライマー 0.5 μ l、Reverse プライマー 0.5 μ l、サンプル DNA 1 μ l を混和し、LA Taq (タカラバイオ, 大津市) 0.1 μ l を添加した。PCR の伸長反応は 60°C、30 秒で 30

サイクル行った。PCR 反応物は 1.0% アガロースゲルを用い 30 mV で 30 分間、電気泳動により分離後、トランスイルミネーターにゲルを乗せて UV 照射をすることで PCR 産物の有無の確認を行った。PCR 産物が確認できたマウスを $\text{h}\alpha$ -Syn tg マウスとし、同腹の non-tg マウスを野生型マウスとして実験に用いた。

2. 6 Magnesium L-Threonate の調整と投与

Magnesium L-Threonate (C₄H₇O₅.C₄H₇O₅.Mg, IS Chemical Terchnology LTD) は、飲用によりラット脳内 Mg 濃度を上昇させる、と報告されたものである⁽²⁶⁾。Magnesium L-Threonate は 3.0 mg/ml で通常の飲水に添加し、 $\text{h}\alpha$ -Syn tg マウスおよびその対照に飲用させた。体重約 30 g のマウスは一日あたり 6 ml の飲水を摂取する事を確認しており、およそ 50 mg/kg/day の Mg²⁺ を摂取したことになる。飲水投与期間は生後 20 週~32 週の 12 週間行った。

2. 7 $\text{h}\alpha$ -Syn tg およびその対照マウスの屠殺時期

生後 32 週に深麻酔後灌流固定またはエーテル深麻酔により屠殺した。

2. 8 運動機能解析

Mg-MPTP 投与群および $\text{h}\alpha$ -Syn tg 並びにそれらの対照マウスは、毎週 1 回程度、体重計測と肉眼による行動観察、足跡試験、ロタロッド試験を行った。

2. 9 大槽からの髄液採取と Mg²⁺ 定量

我々の以前の報告⁽²⁷⁾と同様に行った。麻酔後マウス後頸部を皮切し、27 ゲージ翼状針で大槽から髄液を 1-2 μ l 採取した。ミリ Q 水で 1,000 倍に希釈後、誘導結合プラズマ質量分析装置を用いて Mg²⁺ 濃度を計測した⁽²⁷⁾。

2. 10 灌流固定と標本作成

深麻酔後、4% パラフォルムアルデヒド (4PFA) で経心的に灌流固定し脳を取り出して 24 時間 4PFA に浸潤固定後、冠状断し所定のレベルを切り出しパラフィンに包埋した。

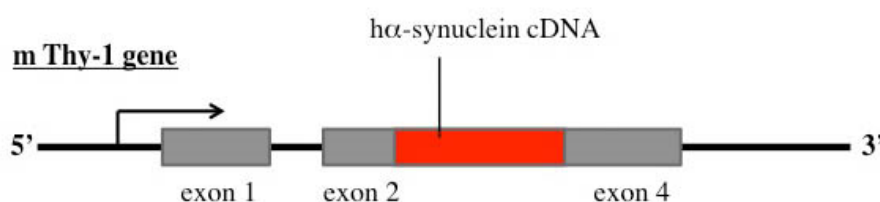


図 2. ヒト α -シヌクレイン cDNA カセットの挿入

The Mouse Brain (Franklin KBJ, Paxinos G, 2008)⁽²⁷⁾の Figure 57-58 のレベルで 5 μm 厚連続切片を作成して Hematoxylin-Eosin 染色、Klüver-Barrera 染色を行い、チロシン水酸化酵素 (TH) 免疫染色は、5 枚毎の切片 6 枚に施行し、黒質緻密層 (図3 SNC) の、核を有する陽性細胞数を計測した。

TH 免疫染色は、切片を HemoD (ファルマ, 東京) に 10 分間ずつ 4 回浸してパラフィン除去を行い、100% エタノールを 3 回、90% エタノールを 1 回、70% エタノールを 1 回それぞれ 5 分間ずつ浸すことで再加水し、流水で 10 分間洗浄した。内因性ペルオキシダーゼの不活化のため、1% H₂O₂ に 30 分間浸したのち流水で 10 分間洗浄し、PBST に 10 分間浸してなじませた後、PBST で希釈した 10% 非動化ウマ血清 (GIBCO, Germany) をブロッキング液として切片に滴下し、30 分間静置した。切片上の 10% 非動化ウマ血清を捨て余分な液体を振り落とし、ブロッキング液で希釈した mouse anti-tyrosine hydroxylase モノクローナル抗体 (1:2000, Chemicon, Temecula, USA) を滴下し、4°C で 17 時間反応させた。PBST で 10 分間 3 回洗浄した後、Biotinylated horse anti-mouse IgG (H+L) (1:200, Vector Laboratories, Inc. CA, U.S.A) を滴下し 37°C で 1 時間反応させた。PBST で 10 分間 3 回洗浄した後、Vectastain Elite ABC kit (Vector Laboratories, Inc. CA, U.S.A) の ABC 液を滴下し室温にて 1 時間反応させた。PBST で 10 分間 2 回洗浄後、50 mM Tris HCl (pH 7.6) に浸してなじませ、DAB (SIGMA-Aldrich Corporation, St Louis, MO) 5 mg と 1 M イミダゾール 2.5 ml を 50 mM Tris

HCl (pH 7.6) 47 ml に添加し混和した後、30% H₂O₂ を 10 μl 添加し、切片を浸して 3 分 30 秒反応させた。流水で 10 分間洗浄し、ヘマトキシリンに数秒浸して核染色し流水で 15 分間色出しをした後、70% エタノール 1 回、90% エタノール 1 回、100% エタノール 3 回を 3 分間ずつ、HemoD に 5 分間ずつ 4 回浸して脱水を行い、エンテランニュー (Merck Millipore, Germany) で封入した。

2. 11 TH 免疫染色陽性細胞数を計測した動物数

Mg-MPTP 投与群の対照は 8 匹、Mg の対照マウス左側脳室投与群では、0.11 μl/hr は 4 匹、0.25 μl/hr、0.5 μl/hr、1.0 μl/hr は各 1 匹である。対照マウスの左線条体への Mg 投与群では、0.11 μl/hr、0.25 μl/hr、0.5 μl/hr は各 1 匹、1.0 μl/hr は 3 匹である。MPTP を投与した群は計 10 匹、Mg を側脳室へ投与中に MPTP を注射した群では、Mg 0.11 μl/hr は 6 匹、0.25 μl/hr も 6 匹、Mg を左線条体へ投与中に MPTP を注射した群では、Mg 0.11 μl/hr は 6 匹、0.25 μl/hr は 2 匹である。

α-Syn tg および wild では、wild 3 匹、wild への Magnesium L-Threonate 投与が 1 匹、α-Syn tg が 2 匹、α-Syn tg への Magnesium L-Threonate 投与が 1 匹である。

2. 12 黒質 TH 陽性神経細胞数の統計処理

ウインドウズ・コンピュータのエクセル 2007 を使用してデータ入力し、一元配置分散分析法 (One-factor ANOVA: analysis of variance, オーエムエス出版, 東京, 2009) を用いて各群間で統計処理を行った。

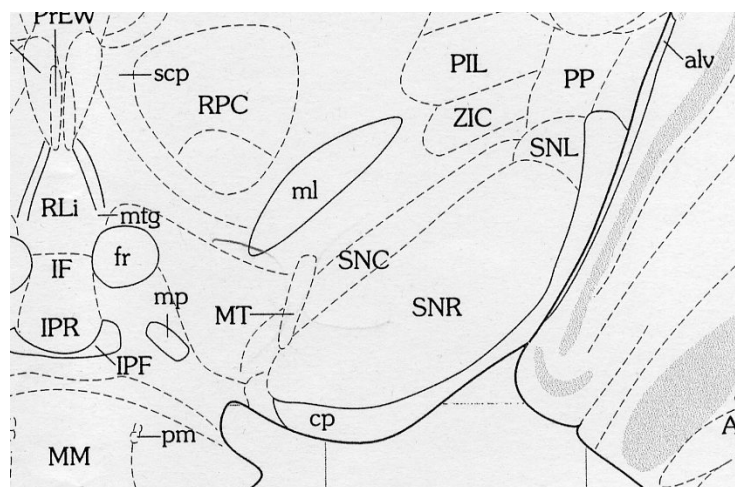


図3. 標準化したレベル。SNC:黒質緻密層 「The Mouse Brain」⁽²⁸⁾から

3. 研究結果

3.1 運動機能解析結果

MPTP 注射群では、運動量が顕著に減少した。Mg 投与後の MPTP 注射群でも運動量は減少して認められた。足跡試験では、MPTP 注射群では歩幅が狭く、左右に蛇行し、前肢と後肢の重なりが不良であった。Mg 投与後の MPTP 注射群では、それらがやや改善したように見えた。

hα-Syn tg の体重は wild のほぼ9割程度であった。wild に比して hα-Syn tg は落ち着きが無く、始終動き回った。足跡試験では、wild は歩幅が十分で、左右への蛇行が無く、前肢に後肢が重なったが、hα-Syn tg では歩幅がやや狭く、前肢と後肢が重ならなかった。Magnesium L-Threonate を飲ませた hα-Syn tg も wild も、所見はそれぞれ不変であった。ロタロッド試験では、wild は数秒から十数秒間落下せずに乗っていることが可能であったが、hα-Syn tg は、ロッドが動き始めた直後に(1秒以内で)全匹が毎回落下した。それは、Magnesium L-Threonate を飲ませた hα-Syn tg でも同様であった。

3.2 大槽の髄液 Mg²⁺濃度

C57BL/6 対照の大槽クモ膜下腔 Mg 濃度は 0.7~1.0 mM で、0.11 μl/hr 浸透圧ポンプ使用では、MPTP 注射群も非注射群も、側脳室投与群で 1.0~1.5 mM、線条体投与群では 0.9~1.2 mM であった。0.25 μl/hr 浸透圧ポンプ使用では、側脳室投与群で 1.0 mM、線条体投与群でも 1

mM であった。0.5 μl/hr 浸透圧ポンプ使用では、側脳室投与群で 1 mM、線条体投与群で 0.8~1 mM であった。1.0 μl/hr 浸透圧ポンプ使用では、側脳室投与群で 1.5~2 mM、線条体投与群で 0.6~1.9 mM であった(図4)。

hα-Syn tg の大槽 Mg 濃度は 1.1 mM、wild は 0.9~1.2 mM であった。Magnesium L-Threonate 飲水群では、hα-Syn tg は 1.2 mM で、wild は 1.0~1.4 mM であった(図5)。

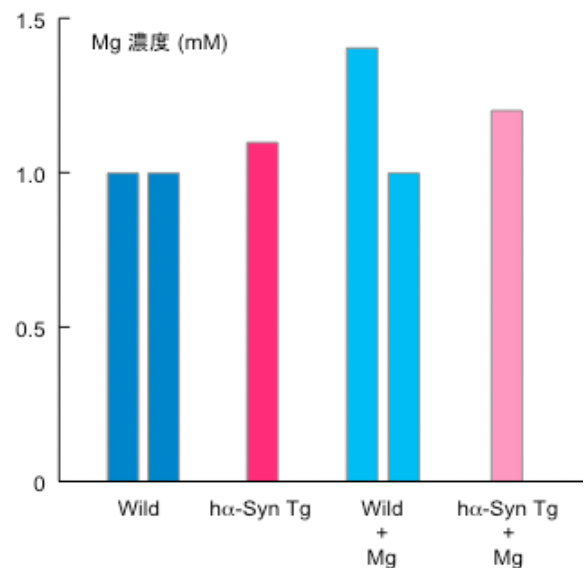


図5. hα-Syn tg および wild への Magnesium L-Threonate 投与と脳脊髄液中の Mg 濃度

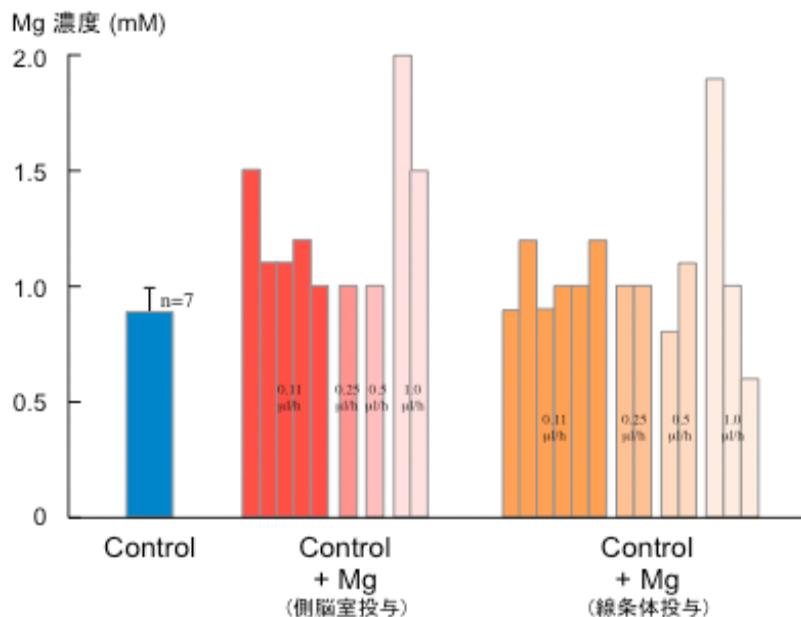


図4. C57BL/6 への Mg 投与と脳脊髄液中の Mg 濃度

3. 3 C57BL/6「対照」マウスへの Mg 投与による黒質ドパミン神経細胞への影響

対照 C57BL/6 への Mg 投与は、黒質に組織学的変化を来さず、ドパミン神経細胞脱落も来さなかった(図 6)。

3. 4 C57BL/6 マウスへの MPTP 注射と Mg 投与による黒質ドパミン神経細胞への影響

MPTP 注射によって、黒質ドパミン神経細胞は、対照のほぼ 3 分の 1 近くまで脱落した。しかし、予め側脳室または線条体に Mg が持続投与されていた群では、脱落するはずの神経細胞のおよそ 70%を生存せしめた。この所見では、0.25 $\mu\text{l/hr}$ より 0.11 $\mu\text{l/hr}$ の方がより有効のようにみてとれた(図 7, 8)。

3. 5 $\alpha\text{-Syn tg}$ および wild への Mg 投与による黒質ドパミン神経細胞への影響

検索数が未だ十分でなく、結論的な所見ではないが、wild への Magnesium L-Threonate の投与は明らかな変化を来さなかった。 $\alpha\text{-Syn tg}$ の黒質ドパミン神経細胞は、wild のおよそ 80%程度であり、Magnesium L-Threonate の投与による脱落阻止ははっきりしなかった(図 9)。

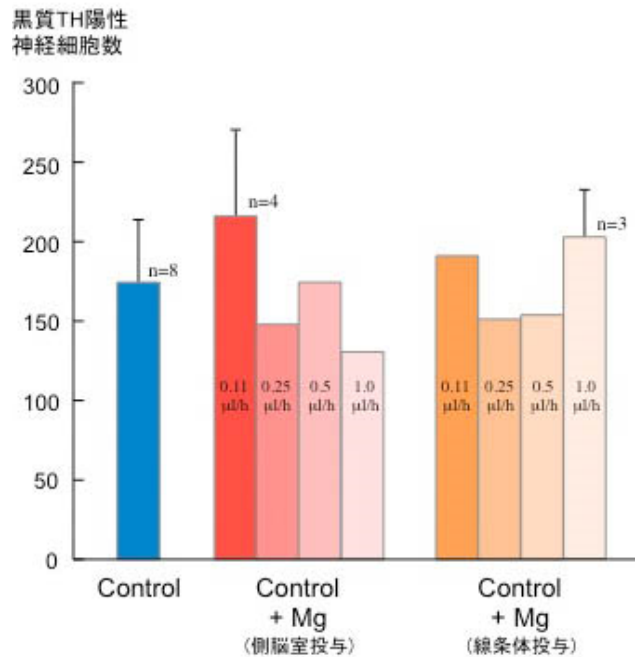


図 6. 対照 C57BL/B6 への Mg 投与後の黒質ドパミン神経細胞数

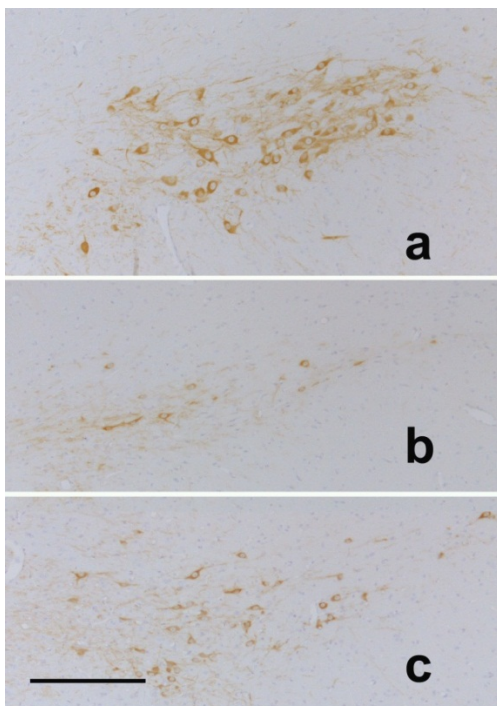


図 7. C57BL/6 黒質の TH(チロシン水酸化酵素)免疫染色陽性神経細胞。a: 対照, b: MPTP 注射, c: Mg 側脳室投与中(0.11 $\mu\text{l/hr}$ ポンプ使用)に MPTP 注射。Bar: 200 μm 。

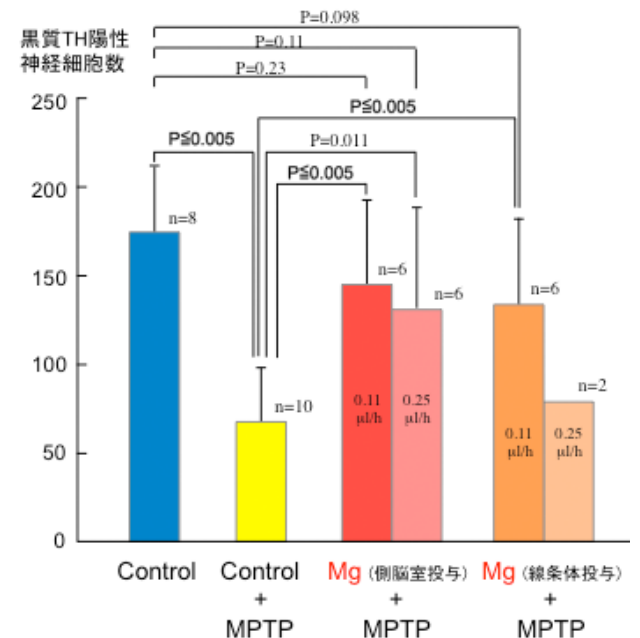


図 8. C57BL/6 マウスへの MPTP 注射と Mg 投与の黒質ドパミン神経細胞への影響。Mg 投与はドパミン神経細胞死を、顕著にかつ有意に抑制した。

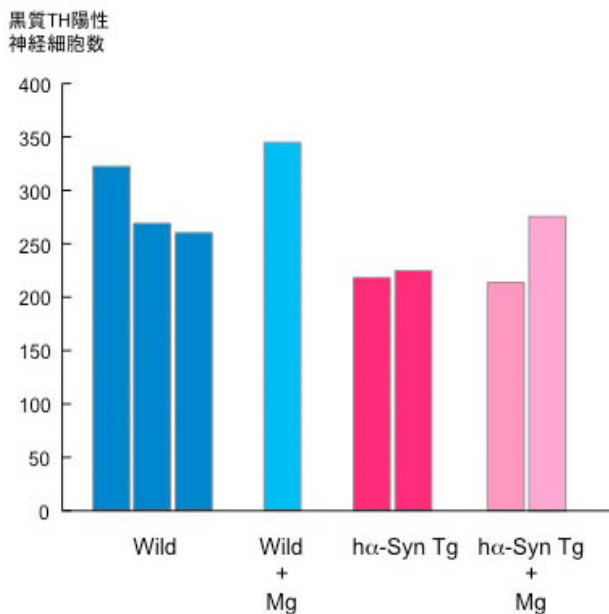


図 9. hα-Syn tg および wild への Magnesium L-Threonate 投与による黒質ドパミン神経細胞への影響

4. 考察

PD は、患者のおよそ 90%が孤発性であり、残り 10%程度が家族性であると言われている。孤発性 PD の神経病理学的特徴は、黒質や青斑核の神経細胞内レビー小体の出現と神経細胞脱落である^(2,3)。レビー小体は異常にリン酸化したα-シヌクレインが凝集した封入体であり、異常なリン酸化α-シヌクレインが沈着する事と、ユビキチンプロテアソームに関連する alpha-synuclein や Parkin、UCHL-1 などの遺伝子異常が家族性パーキンソン病に見出された事⁽²⁸⁻³⁰⁾などから、小胞体ストレスが神経細胞死を惹起する、という説が、またミトコンドリアの Complex I などに異常が発見されたこと⁽¹⁰⁾、ミトコンドリア関連の PINK1 遺伝子異常が家族性パーキンソン病に発見された事⁽³¹⁾、また黒質ドパミン神経細胞を死に至らしめる MPTP がミトコンドリアからの酸化ストレスを惹起する物質である事^(32,33)などから、パーキンソン病の黒質ドパミン神経細胞は酸化ストレスや小胞体ストレスによって死ぬ、と考えられてきた。

このような報告に基づいて、PD の生体 (*in vivo*) モデル作成のため、プロテアーゼ阻害薬 rotenone や、カスパーゼ 9 および 3 によってアポトーシスを惹起するという 6-hydroxydopamine (6-OHDA) など、またミトコンドリア毒であり酸化ストレスを生じるという paraquat、annonacin、MPTP などがマウス、サルなどに投与され、パーキンソン

モデルとして使用されてきた^(34,35)。

Mg は、ヒトで欠乏すれば痙攣を惹起することが知られているが、過剰摂取による中毒症は極めて稀であるという^(19,36)。一方 Mg には数多くの神経保護作用が知られており、例えばカルシウムチャネルからの過剰なカルシウム流入による細胞死を防ぐ事、ミトコンドリアから生じる酸化ストレスを防ぎ、細胞死を抑制する事などが報告されている⁽¹⁴⁻²⁰⁾。

本実験での、C57BL/6 マウスへの Mg (硫酸 Mg, 500 mM) 投与では、側脳室または線条体への投与で 0.11 μl/hr ポンプ使用の場合、クモ膜下腔の Mg 濃度は、平均 1.2 mM へと、対照群の 0.9 mM の 30%程度上昇した。0.25 μl/hr、0.5 μl/hr ポンプを使用した場合のクモ膜下腔 Mg 濃度の上昇もほぼ同程度であった。一方、1.0 μl/hr ポンプを使用した場合は、側脳室投与の場合も、線条体投与の場合も、クモ膜下腔の Mg 濃度は 2 mM 程度まで上昇する個体も認められた。これらの所見からは、設置した浸透圧ポンプとカニューレはほぼ規格通りに作動した、と考えられた。

hα-Syn tg のクモ膜下腔 Mg 濃度は 1.1 mM、wild は 0.9~1.2 mM であり、Magnesium L-Threonate 飲水群では、hα-Syn tg は 1.2 mM、wild は 1.0~1.4 mM と、上昇傾向を示した。Magnesium L-Threonate は、高齢ラットへの飲用によって脳内の Mg 濃度が 10-20%程度上昇し、認知障害を抑制した、と報告された⁽²⁶⁾ものである。本実験での観察個体数は極めて少ないが、hα-Syn tg およびその wild マウスでも、ラットとほぼ同程度の Mg 濃度の上昇を生じる可能性が考えられた。

C57BL/6 対照マウスでは、上記の範囲の Mg 濃度上昇によっては黒質ドパミン神経細胞には脱落が生じなかった。hα-Syn tg の wild でも、この範囲の Mg 濃度上昇によっては黒質ドパミン神経細胞には脱落が生じない可能性が示された。

C57BL/6 への MPTP 投与によって黒質ドパミン神経細胞数は対照のおよそ 3 分の 1 まで脱落した。しかし予めの Mg 投与によって、脱落するはずの神経細胞のおよそ 70%を生存せしめた。脳脊髄液の Mg 濃度を、正常より 30%程度上昇させることで、黒質ドパミン神経細胞死を抑制した。このためには、0.11 μl/hr ポンプを使用した方が 0.25 μl/hr ポンプより有効である傾向が見られた。

MPTP 注射マウスへの予防・治療実験は数多くの薬物などで試みられており、近年の報告では、本 Mg 投与実験とほぼ同程度の神経細胞死の抑制を示したものも見られる⁽³⁷⁻⁴²⁾。しかしその殆どの薬剤は実験薬であって、現時点でヒトに投与出来る「薬」としては認可されて居ない。一方本実験で投与した「硫酸 Mg」は既にヒトへの薬剤として認可され、血中 Mg 濃度の調整などに通常使われて居るのである。中毒量に関しても研究が進んでいる。今後、Mg の効果が幾種かのパーキンソン病モデルで明確になれば、ヒトへの応用は比較的容易ではないか、と考えた。

h α -Syn tg では、黒質ドパミン神経細胞は wild の 80%程度まで減少していたが、Magnesium L-Threonate 飲用による神経細胞減少の抑制は明瞭ではなかった。今回は h α -Syn tg と wild の観察匹数が少なく、明瞭な実験結果に至って居らず、今後個体数を増やして実験する必要がある。また今回は、Magnesium L-Threonate の飲用は生後 20 週に開始して、屠殺した 32 週まで継続したものである。今後の実験では、もっと早期から Magnesium L-Threonate の飲用を開始する群を追加して所見を検証する必要がある。

パーキンソン病における神経細胞死を防ぐ、あるいは傷害された神経機能を回復させる、という根本的な予防・治療法は今も無い。現在行われている種々の内服薬は、神経細胞死によって枯渇する神経伝達物質の補充療法であり、てんかん治療中に偶然パーキンソン病への有効性が日本で発見され、2009 年ヒトパーキンソン病への適応が認められた「ゾニサミド」であるが、適応 2 年余りを経て、黒質神経細胞死を止める根本的な治療であるか、疑問が持たれるようになった。

このような現状で、本研究結果は、Mg がパーキンソンモデルの黒質神経細胞死を抑制することを示した。すなわち Mg がパーキンソン病の根本的な予防・治療薬となる可能性を提示した。

謝 辞

本研究を推進するに当たり、西 克典先生(西内科神経内科クリニック)、Dr. Neil P. Murphy、佐郡和人(理化学研究所脳科学総合研究センター神経回路メカニズム研究グループ)、望月秀樹先生(順天堂大学、現:大阪大学)、

壬 勇日先生、古田晶子先生(順天堂大学)、高田昌彦先生(東京都神経科学総合研究所、現:京都大学霊長類研究所)、今西美知子様、植田弘子様(東京都神経科学総合研究所、現:東京都医学総合研究所)、浅川美果様(信州大学医学部)から技術的支援や指導を頂きました。記して感謝申し上げます。

5. まとめ

本研究は、パーキンソン病の革新的根本的な新規治療・予防薬の開発を目指して、世界でも初めて、Mg による予防/治療効果を生体 (*in vivo*) パーキンソンモデルで検証した。外因性の神経毒によるパーキンソンモデルとして MPTP [1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine] 投与マウス、および遺伝子異常に基づくパーキンソンモデルであるヒト α -シヌクレイン遺伝子組換えマウスを用いて、MPTP 実験群へは硫酸 Mg を浸透圧ポンプで脳室内持続投与を開始した後 MPTP を注射し、シヌクレイン遺伝子組換えマウスには脳内 Mg 濃度を上げると報告されている Magnesium L-threonate を生後 20 週から 32 週まで飲用させた。結果は、ヒト α -シヌクレイン遺伝子組換えマウスへの Magnesium L-threonate 飲用には効果が明瞭でなかったが、MPTP マウスへの Mg 投与は、黒質ドパミン神経細胞死を抑制した。即ち、脱落するはずの神経細胞のおよそ 70%を生存せしめ、Mg がパーキンソン病の根本的な予防・治療薬となる可能性を提示した。

6. 展 望

本研究結果は、現在根本的な治療法が無いパーキンソン病を、Mg で予防・治療出来る可能性を提示した。そのための必要条件は、脳脊髄液の Mg 濃度を 30%程度上昇させることである。これについては、私どもの研究から、血中 Mg 濃度を上昇させても脳脊髄液の Mg 濃度は上がらないことを確認しているため、現時点では脳室に直接 Mg を投与する事が必要である。しかしそれも、「深部脳電極刺激療法」としてパーキンソン病患者に行われている視床下核などへの電極刺入手術に比べれば、手術手技としては極めて簡単であり、体内に埋め込んだ小型ポンプなどから Mg を脳室へ微量かつ持続的に注入することは問題無く可能であると思われる。本実験で投与した「硫酸 Mg」は既にヒトへの薬剤として認可され、血中 Mg 濃度の調整など

に通常使われて居るものである。中毒量に付いても研究が進んでいる。幾種かのパーキンソン病モデルでの Mg の効果が明確になれば、ヒトへの応用は比較的容易ではないか、と思われる。

また、本実験で少数匹しか報告出来なかった Magnesium L-Threonate 飲用実験であるが、脳脊髄液の Mg 濃度の上昇傾向をつかむ事が出来た。今後多数例でこれを検索し、Magnesium L-Threonate 飲用で脳脊髄液の Mg 濃度を 30%程度上昇せしめるかどうか、確認する。それが確認出来れば、「飲み薬」でパーキンソン病が予防・治療可能となる道が拓ける。

本助成(助成番号 1028)によるこれまでの研究成果一覧

1. Oyanagi K, Hashimoto T. Magnesium in Parkinson's disease: an update in clinical and basic aspects. In: Vink R, Nechifor M, eds, Magnesium in the central nervous system. University of Adelaide Press, South Australia, pp229-236, 2011

文献

1. Parkinson J. *An essay on the shaking palsy*. Neely and Jones, ed. Whittingham and Rowland for Sherwood, London, 1817
2. Lewy FH. Paralysis agitans. In: *Pathologische Anatomie* (Lewandowsky M, ed). *Handbuch der Neurologie*, vol. 3. Berlin, Springer, 1912, pp920-933.
3. Jellinger K. Parkinson's disease. In: Dickson DW, Weller RO, eds. *Neurodegeneration. The molecular pathology of dementia and movement disorders*. 2nd ed. Wiley-Blackwell, Oxford, 2011, pp194-223
4. Alam ZI, Jenner A, Daniel SE, Lees AJ, Cairns N, Marsden CD, Jenner P, Halliwell B. Oxidative DNA damage in Parkinsonian brain; An apparent selective increase in 8-Hydroxyguanine levels in substantia nigra. *J Neurochem* 1997; 69 :1196-1203
5. Zhang J, Perry G, Smith MA, Robertson D, Olson SJ, Graham DG, Montine TJ. Parkinson's disease is associated with oxidative damage to cytoplasmic DNA and RNA in substantia nigra neurons. *Am J Pathol* 1999;

- 154: 1423-1429
6. Ambani LM, Van Woert MH, Murphy S. Brain peroxidase and catalase in Parkinson disease. *Arch Neurol* 1975; 32: 114-118
7. Dalfo E, Protero-Otin M, Ayala V, Martinez A, Pamplona R, Ferrer I. Evidence of oxidative stress in the neocortex in incidental Lewy body disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 2005; 64: 816-830
8. Zhang J, Perry G, Smith MA, Robertson D, Olson SJ, Graham DG, Montine TJ. Parkinson's disease is associated with oxidative damage to cytoplasmic DNA and RNA in substantia nigra neurons. *Am J Pathol* 1999; 154: 1423-1429
9. Hattori N, Tanaka M, Ozawa T, Mizuno Y. Immunohistochemical Studies on complexes I, II, III, and VI of mitochondria in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 1991; 30: 563-571
10. Jellinger KA. The role of iron in neurodegeneration : prospects for pharmacotherapy of Parkinson's disease. *Drugs Aging* 1999; 14: 115-140
11. Yokoyama H, Yano R, Kuroiwa H, Tsukada T, Uchida H, Kato H, Kasahara J, Araki T. Therapeutic effect of a novel anti-parkinsonian agent zonisamide against MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) neurotoxicity in mice. *Metab Brain Dis* 2010; 25: 135-143
12. Golts N, Snyder H, Frasier M, theisler C, Choi P, Wolozin B. Magnesium inhibits spontaneous and iron-induced aggregation of alpha-synuclein. *J Biol Chem* 2002; 277: 16116-16123
13. Bocca B, Alimonti A, Senofonte O, Pino A, Violante N, Petrucci F, Sancesario G, Forte G. Metal changes in CSF and peripheral compartments of parkinsonian patients. *J Neurol Sci* 2006; 248: 23-30
14. Eskes R, Antonsson B, Osen-Sand A, Montessuit S, Richter C, Sadoul R, Mazzei G, Nichols A, Martinou JC. Bax-induced cytochrome C release from mitochondria is independent of the permeability transition pore but highly dependent on Mg²⁺ ions. *J Cell Biol* 1998; 143: 217-224

15. Nowak L, Bregestovski P, Ascher P, Herber A, Prochiantz A. Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurons. *Nature* 1984; 307: 462-465
16. Mayer ML, Westbrook GL, Guthrie PB. Voltage-dependent block by Mg²⁺ of NMDA responses in spinal cord neurones. *Nature* 1984; 309: 261-263.
17. Lin JY, Chung SY, Lin MC, Cheng FC. Effects of magnesium sulfate on energy metabolites and glutamate in the cortex during focal cerebral ischemia and reperfusion in the gerbil monitored by a dural-probe microdialysis technique. *Life Sci* 2002; 71: 803-811
18. Cojocaru M, Cojocaru IM, Muuroi C, Botezat M, Lazar L, Duruta A. Serum magnesium concentrations in migraine with aura. *Advances in Magnesium research: new data* 2006, pp31-35
19. Saris NE, Mervaala E, Karppanen H, Khawaja JA, Lewenstam A. Magnesium. An update on physiological, clinical and analytical aspects. *Clin Chim Acta* 2000; 294: 1-26.
20. Oyanagi K, Hashimoto T. Magnesium in Parkinson's disease: an update in clinical and basic aspects. In: Vink R, Nechifor M, eds. *Magnesium in the central nervous system*. University of Adelaide Press, South Australia, 2011, pp229-236
21. Oyanagi K, Hashimoto T, Yamazaki M. Parkinsonism-dementia complex. In: Dickson DW, Weller RO, eds. *Neurodegeneration. The molecular pathology of dementia and movement disorders*. 2nd ed. Wiley-Blackwell, Oxford, 2011, pp171-178
22. Oyanagi, K, Kawakami E, Kikuchi-Horie K, Ohara K, Ogata K, Takahama S, Wada M, Kihira T, Yasui M. Magnesium deficiency over generations in rats with special references to the pathogenesis of the parkinsonism-dementia complex and amyotrophic lateral sclerosis of Guam. *Neuropathology* 2006; 26: 115-128
23. Hashimoto T, Nishi K, Nagasao J, Tsuji S, Oyanagi K. Magnesium exerts both preventive and ameliorating effects in an in vitro rat Parkinson disease model involving 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺) toxicity in dopaminergic neurons. *Brain Res* 2008; 1197: 143-151
24. Rockenstein E, Mallory M, Hashimoto M, Song D, Shults CW, Lang I, Masliah E. Differential neuropathological alterations in transgenic mice expressing α -synuclein from the platelet-derived growth factor and Thy-1 promoters. *J Neurosci Res* 2002; 68: 568-578
25. Sun L, Kosugi Y, Kawakami E, Piao Y-S, Hashimoto T, Oyanagi K. Magnesium concentration in the cerebrospinal fluid of mice and its response to changes in serum magnesium concentration. *Magnes Res* 2009; 22: 266-272
26. Slutsky I, Abumaria N, Wu LJ, Huang C, Zhang L, Li B, Zhao X, Govindarajan A, Zhao MG, Zhuo M, Tonegawa S, Liu G. Enhancement of learning and memory by elevating brain magnesium. *Neuron* 2010; 65: 165-177
27. Franklin KBJ, Paxinos G. *The Mouse Brain*. Elsevier, Amsterdam, 2008
28. Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A, Pike B, Root H, Rubinstein J, Boyer R, Stenroos ES, Chandrasekharappa S, Asanassiadou A, Papapetropoulos T, Johnston WG, Lazzarini AM, Duvoisin RC, Di Iorio G, Golbe LI, Nussbaum RL. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 1997; 276: 2045-2047
29. Singleton AB, Farrer M, Johnson J, Singleton A, Hague S, Kachergus J, Hulihan M, Peuralinna T, Dutra A, Nussbaum R, Lincoln S, Crawley A, Hanson M, Maraganore D, Adler C, Cookson MR, Muentner M, Baptista M, Miller D, Blancato J, Hardy J, Gwinn-Hardy K. Alpha-synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science* 2003; 302: 841
30. Kitada T, Asakawa S, Hattori N, Matsumine H, Yamamura Y, Minoshima S, Yokochi M, Mizuno Y, Shimizu N. Mutations in the *parkin* gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* 1998; 392: 605-608
31. Valente EM, Abou-Sleiman PM, Caputo V, Muqit

- MMK, Harvey K, Gispert S, Ali Z, Del Turco D, Bentivoglio AR, Healy DG, Albanese A, Nussbaum R, González-Maldonado R, Deller T, Salvi S, Cortelli P, Gilks WP, Latchman DS, Harvey RJ, Dallapiccola B, Auburger G, Wood NW. Hereditary Early-Onset Parkinson's Disease Caused by Mutations in *PINK1*. *Science* 2004; 304: 1158-1160
32. Bove J, Prou D, Perier C, Przedborski S. Toxin-induced models of Parkinson's disease. *Neurotherapeutics* 2005; 2: 484-494
33. Nakamura K, Bindokas VP, Marks JD, Wright DA, Frim DM, Miller RJ, Kang UJ. The selective toxicity of 1-methyl-4-phenylpyridinium to dopaminergic neurons: the role of mitochondrial complex I and reactive oxygen species revisited. *Mol Pharmacol* 2000; 58: 271-278
34. Champy P, Hoglinger GU, Feger J, Gleye C, Hocquemiller R, Laurents A, Guerineau V, Laprevote O, Medija F, Lombes A, Michel PP, Lannuzel A, Hirsch EC, Ruberg M. Annonacin, a lipophilic inhibitor of mitochondrial complex I, induces nigral and striatal neurodegeneration in rats. *J Neurochem* 2004; 88: 63-69
35. Smeyne RJ, Jackson-Lewis V. The MPTP model of Parkinson's disease. *Brain Res. Mol Brain Res* 2005; 134: 57-66
36. Cojocaru M, Cojocaru IM, Muuroi C, Botezat M, Lazar L, Duruta A. Serum magnesium concentrations in migraine with aura. *Advances in Magnesium research: new data* 2006, pp31-35
37. Chung CC, Kim SR, ParkJ-Y, Chung ES, Park KW, Won SY, Bok E, Jin M, Park ES, Yoon S-H, Ko HW, Kim Y-S, Jin BK. Fluoxetine prevents MPTP-induced loss of dopaminergic neurons by inhibiting microglial activation. *Neuropharmacol* 2011; 60: 963-974
38. Huh SH, Chung YC, Piao Y, Jin MY, Son HJ, Yoon NS, Hong JY, Youngmi K. Pak YK, Kim YS, Hong JK, Hwang O, Jin BK. Ethyl Pyruvate Rescues Nigrostriatal Dopaminergic Neurons by Regulating Glial Activation in a Mouse Model of Parkinson's Disease. *J Immunol* 2011; 187: 960-969
39. Shen LI and Xiao-Ping PU. Neuroprotective Effect of Kaempferol against a 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-Induced Mouse Model of Parkinson's Disease. *Biol. Pharm. Bull.* 2011; 34: 1291—1296
40. Kidd SK, Schneider JS. Protective effects of valproic acid on the nigrostriatal dopamine system in a 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson's disease. *Neuroscience* 2011; 194: 189-194
41. Bao X-Q, Kong X-C, Qian C, Zhang D. FLZ protects dopaminergic neuron through activating protein kinase B/mammalian target of rapamycin pathway and inhibiting RTP801 expression in Parkinson's disease models. *Neuroscience* 2012; 202: 396-404
42. Annadurai Anandhana, Kuppusamy Tamilselvama, Thangaiyan Radhigaa, Shalinee Raob, Musthafa Mohamed Essac, Thamilarasan Manivasagam. Theaflavin, a black tea polyphenol, protects nigral dopaminergic neurons against chronic MPTP/probenecid induced Parkinson's disease. *Brain Research* 2012; 1433: 104-113

Effectiveness of Magnesium for Prevention of Death of Dopaminergic Neurons in the Substantia Nigra in Parkinson Disease Mice Model

Kiyomitsu Oyanagi ¹, Liyuan Sun ², Emi Suzuki-Kouyama ¹, Piao Yingshan ³, Tomoyo Hashimoto ^{1,4},
Yuki Kosugi ⁵, Sachiko Takahama ⁶, Emiko Kawakami ⁷, Masayo Fujita ⁷, Makoto Hashimoto ⁷

¹Department of Brain Disease Research, Shinshu University School of Medicine, ²Department of Neurology, Guilin Medical University, ³Department of Neurology, Beijing Tiantan Hospital, Capital Medical University, ⁴Department of Neurology, University of Occupational and Environmental Health, ⁵Department of Environmental Health and Toxicology, Tokyo Metropolitan Institute of Public Health, ⁶Seisen University, ⁷Division of Sensory and Motor Systems, Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science

Summary

Parkinson disease (PD) is a neurodegenerative disease occurring in middle-aged and aged humans characterized by clinical symptoms including tremor and festination, and by neuropathological features involving the appearance of Lewy bodies in the substantia nigra and substantia innominata. After establishment of the disease as an entity, it has been clarified that dopaminergic neurons in the ventral tegmental area, noradrenergic neurons in the locus coeruleus and motor vagal nucleus, serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus, and neurons in the sympathetic ganglia and visceral autonomic nervous system are involved in the disease, showing neuronal loss and presence of Lewy bodies. For treatment of the disease, there have been no effective means to prevent the death of neurons in PD.

The present study was propelled based on the following studies preceded by the authors: 1. a significant loss of dopaminergic neurons was observed exclusively in the substantia nigra of 1-year-old rats after exposure to low Mg intake over generations (*Oyanagi et al., 2006*), and 2. effectiveness of Mg administration in a rat PD model involving culture of ventral mesencephalic-striatal cells with 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺) was elucidated (*Hashimoto, Oyanagi, et al., 2008*).

This is the first report to document a significant and striking effectiveness of Magnesium (Mg) in prevention of death of dopaminergic neurons in the substantia nigra in a PD mice model using MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine).