

片側パーキンソン病モデルマウスにおける  
脳内インフュージョンシステムを用いた  
メマンチンの薬効解析

2020

小川 允利

# 目次

略語表.....	3
緒言.....	4
第一節：序論.....	6
第二節：実験材料および方法.....	9
2-1. 使用動物.....	9
2-2. 6-OHDA 片側 PD モデルマウスの作成.....	9
2-3. 後肢に表れる障害の評価.....	10
2-4. Levodopa/Benserazide 投与.....	10
2-5. Levodopa 誘発性ジスキネアの評価.....	10
2-6. 回転運動の評価.....	11
2-7. iCBI デバイス設置 MMT の投与.....	11
2-8. 免疫組織化学的解析.....	12
2-8-1. 切片の作成.....	12
2-8-2. 免疫蛍光染色.....	12
2-8-3. Nissl 染色.....	13
2-8-4. 検鏡と定量.....	13
2-9. 統計解析.....	14
第三節：実験結果.....	15
3-1. 片側 PD モデルマウスの作成と後肢に表れる障害性ステップの評価.....	15
3-2. LID モデルの作成と iCBI デバイスによる MMT の薬効評価.....	16
第四節：考察.....	20
引用文献.....	23
謝辞.....	33
FIGURE REGENDS.....	34
FIGURES.....	40

## 略語表

AADC	L-amino acid decarboxylase
AIMs	abnormal involuntary movement scale
ANOVA	analysis of variance
BSA	bovine serum albumin
BBB	blood-brain barrier
CMC	carboxymetyl cellulose
COMT	catechol-O-methyl transferase
DA	dopamine
DBS	deep brain stimulation
GDNF	glial cell line-derived neurotrophic factor
iCBI	intracerebral brain infusion
Levodopa	L-dihydroxyphenylalanine
LID	levodopa-induced dyskinesia
MFB	medial forebrain bundle
mGluR	metabotropic glutamate receptor
MAO	monoamine oxidase
MMT	memantine
MPP <sup>+</sup>	1-methyl-4-phenylpyridinium ion
MPTP	1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine
MSN	medium spiny neuron
NMDA	<i>N</i> -methyl-D-aspartate
PB	phosphate buffer
PD	Parkinson's disease
PBS	phosphatate-buffered saline
ROS	reactive oxygen species
S.E.M	standard error of the mean
TH	tyrosine hydroxylase
TSA	tyramide signal amplification
6-OHDA	6-hydroxydopamine

## 緒言

パーキンソン病 (PD) は、安静時振戦、筋固縮、無動、姿勢反射障害の 4 つの特徴を有する進行性の難治性神経変性疾患である。また、便秘などの自律神経症状、鬱、睡眠障害、認知症などの非運動症状を高頻度に併発する多系統疾患である。PD は、加齢に伴う神経疾患の中では、アルツハイマー病に次いで患者数が多い<sup>1)-3)</sup>。本邦での有病率は 100-180 人/10 万人とされているが、加齢も発症に寄与することから、超高齢化社会を迎える本邦において、さらに患者数が増えることが予測される。

PD の病理学的特徴は、黒質-線条体のドパミン神経細胞が変性、脱落して、投射先の線条体でドパミン量が減少することにより、運動症状を呈すると考えられている<sup>4),5)</sup>。一般的に、ドパミン作動性神経細胞が黒質で 50-60% 減少し、それに伴い線条体のドパミン量が 70-80% 減少すると PD 症状を示すようになる<sup>5)</sup>。

実験動物を用いた PD モデルの作成には、1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) や、6-hydroxydopamine (6-OHDA) などの神経毒が用いられる。MPTP は全身投与により容易に血液脳関門を通過し、グリア細胞に取り込まれ、モノアミン酸化酵素 monoamine oxidase (MAO) の酸化作用により 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP<sup>+</sup>) に変換され、ドパミントランスポーターを介してドパミン神経細胞に取り込まれ、ミトコンドリア呼吸鎖の complex 1 を阻害することにより神経細胞死を引き起こす<sup>6)</sup>。一方 6-OHDA は血液脳関門を通過できないため、脳内に直接投与することでドパミン神経細胞およびノルアドレナリン神経細胞をともに変性、脱落させるが、ノルアドレナリン再取り込み阻害剤と併用することにより、ドパミン作動性神経細胞に対して特異的に作用できる。

これにより **6-OHDA** は、ドパミントランスポーターを介してドパミン神経細胞に取り込まれ、**MPTP** と同様にミトコンドリア呼吸鎖の **complex 1** を阻害し、活性酸素種 **reactive oxygen species (ROS)** の産生により酸化ストレスが増加して神経細胞死が引き起こされることが知られている<sup>6)</sup>。このような **PD** モデル動物は、**PD** の病態解析や新規治療薬・治療法の前臨床評価系として重要である。

現在、**PD** の進行を抑制する神経保護薬は承認されておらず、薬物療法を中心とした対症療法が行われている。薬物療法では主として、ドパミン前駆体である **levodopa** と、その分解を抑制し中枢移行を高めることを目的とした **MAO** 阻害薬やカテコール-O-メチル基転移酵素 **catechol-O-methyl transferase (COMT)** 阻害剤が併用される。また、ドパミン **D2** 受容体アゴニストも治療薬として用いられている。**Levodopa** 療法は **PD** の運動症状に対して著効することから、現在でも薬物療法のゴールドスタンダードであるが、長期投与は、**ON-OFF** 現象など治療効果の揺らぎや、不随意運動性の副作用であるジスキネジアを引き起こし、**PD** 患者の **QOL** を著しく低下させる<sup>7)-9)</sup>。またジスキネジアは一度形成されると改善することはなく、悪化する一方である<sup>10)</sup>。そのため、これらの問題を回避できる新たな治療薬、治療法の探索・研究が必要とされている。

## 第一節：序章

カテコールアミン神経毒の一つである 6-OHDA は、実験動物脳内の黒質、線条体、またはその間を結ぶ軸索線維である medial forebrain bundle (MFB) を標的に直接投与すると PD 症状を呈することから PD の薬効評価系として古くから使用されている<sup>11),12)</sup>。齧歯類の片側 6-OHDA 投与モデルでは、障害側への自発回転運動を示し、この回転運動はドパミン受容体アゴニストの apomorphine やドパミン前駆体 levodopa により反転することが薬理的指標の一つである<sup>13)-15)</sup>。また、前肢に表れる障害の指標として、左右前肢の使用頻度を評価するシリンダーテストやステッピングテストが確立されており<sup>16)-19)</sup>、これらの試験も PD 治療薬の薬効評価に利用されている<sup>20),21)</sup>。一方で、本モデルマウスやラットの後肢に表れる障害に関してはほとんど解析がなされておらず、薬効評価の対象にもなっていない。PD 患者の下肢に表れる運動障害も臨床症状の一つであることを考えると<sup>22)</sup>、片側 PD モデルマウスの後肢に表れる障害が、PD 運動症状と薬効評価の指標になりうることを期待される。

PD 薬物療法のゴールドスタンダードとして知られる levodopa は、末梢投与すると血液脳関門を通過し、芳香族 L-アミノ酸脱炭酸酵素 L-amino acid decarboxylase (AADC) によりドパミンに変換され、線条体で不足したドパミンを補充するために広く使用されている。しかし、本薬剤の長期間にわたる使用は、不随意運動性の副作用である levodopa 誘発性ジスキネジア (LID) や、薬効不安定でドパミン過剰と不足の状態を繰り返す ON-OFF 現象などを引き起こす<sup>23)-25)</sup>。LID は、5 年以上持続的に levodopa 治療を受けた PD 患者のうち 80% 以上で症状を呈する<sup>26)</sup>。LID を発症した PD 患者に対して、電気的な脳深部刺激 deep brain stimulation (DBS) 療法は

著効するが、長期間のフォローアップに依ればその効果は次第に薄れ、一般的に QOL は術前以下まで低下する<sup>27)</sup>。したがって、LID や PD の治療薬の薬効が無効になる OFF 状態を改善するような、新たな治療的介入方法を開発することが、PD 治療の課題となっている。

PD 症状は、線条体において、黒質-線条体ドパミン神経入力と皮質-線条体のグルタミン酸神経入力のバランスが崩れることで生じる<sup>28),29)</sup>。黒質-線条体ドパミン神経細胞の変性脱落は、線条体へのドパミン入力を減少させ、線条体では相対的に皮質-線条体グルタミン酸入力が高まる。過剰なグルタミン酸入力は調節不全性のシナプス可塑性を誘発し、これは LID 発症の根底にあるメカニズムとしてよく研究されている<sup>30)</sup>。LID の発症には、線条体中型有棘神経細胞 medium spiny neuron (MSN) に発現しているドパミン D1 受容体とグルタミン酸受容体が相互に関係しており、後者の中では特に N-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体とメタボトロピック（代謝調節型）グルタミン酸受容体の関連が考えられている<sup>30)-33)</sup>。実際に、NMDA 受容体またはメタボトロピックグルタミン酸受容体 (mGluR4, mGluR5) を特異的な標的とした経口投与薬剤による臨床試験が実施されている<sup>32)</sup>。現在 PD と LID 治療の臨床では、NMDA 受容体アンタゴニストであるアマンタジンの経口投与が、PD 患者の LID 症状を減弱する効果を有することから使用を推奨されている<sup>33)</sup>。しかし、その治療効果は低く、他方で様々な副作用も呈することから臨床上の使用が制限される。

脳疾患に対する薬物療法では、一般的に薬剤の経口投与が行われているが、血液脳関門 blood-brain barrier (BBB) 透過性によっては脳内移行率が低いこと、全身性の副作用が問題になることも多い。これを回避する方法の一つに、脳内インフュージョン技術 intracerebral brain infusion (iCBI) technique が挙げられる。この方法では脳内に

薬剤を直接投与することから、**BBB** を考慮する必要が無く、全身性の副作用が発現する懸念も少ない一方で、外科的手術やミニポンプなどの薬物投与デバイスを必要とし、それに伴う合併症や長期間適用に対する忍容性などの問題もあり、これまで実用化が困難であった。**PD** 治療研究における **iCBI** 技術の検討は、実験動物でも臨床研究においても長い歴史がある<sup>34)-36)</sup>。最近、英国の **Whone** らは、**PD** 患者に対してグリア細胞由来神経栄養因子 **glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF)** を間欠的に被殻内注入する、精巧な薬物送達システムの臨床適用研究の結果を報告した<sup>37)</sup>。この論文に依れば、**GDNF** の薬効効果は認められなかったものの、デバイスの安全性や有害事象発現などに大きな問題は無かった。**PD** を含む不随意運動症の治療においては、特定の脳内神経核を標的にした **DBS** 療法が広がっていることから、**DBS** 電極を薬物送達カニューレに置換して、薬剤を脳内局所に連続的かつ可変容量で投与して補充や変更も可能な、新しい **iCBI** 技術の実用化に期待が高まっている。

そこで本論文では、**6-OHDA** 片側 **PD** モデルマウスにおける新しい **iCBI** デバイスを用いた薬効評価系の有効性検証を目的として、以下の実験研究結果を報告する。はじめに、**6-OHDA** 片側 **PD** モデルマウスの後肢に表れる障害をビデオ撮影し観察し、**PD** 運動症状と **levodopa** による薬効の評価指標を行動薬理学的に確立した。続いて、同モデルマウスに **levodopa** を慢性投与して **LID** 様症状を発現させ、新しい **iCBI** デバイスとして、障害側背側線条体を標的に **iPRECIO™ brain infusion system** を設置した。このデバイスを介して、認知症治療薬として臨床適応されている **NMDA** 受容体アンタゴニスト・メマンチン (**MMT**)<sup>38)</sup> を持続的に投与し、**LID** 様症状と **PD** 運動症状に対する薬効を行動薬理学的に検討した。



## 第二節：実験材料および方法

### 2-1. 使用動物

本研究では、8 週齢の雄性 C57BL/6 マウス (Nihon SLC, Shizuoka, Japan) を用いた。飼育環境は、温度 25 °C、湿度 50 ± 10% 明暗サイクル 12 時間 (8:30-20:30 点灯) とし、自由摂食、自由飲水とした。全ての動物実験は、徳島大学動物実験委員会が定めた実験動物指針に沿って行われた (委員会許可番号 : T28-65、T2019-58)。

### 2-2. 6-OHDA 片側 PD モデルマウスの作成

ノルアドレナリントランスポーター阻害作用を有する三環系抗うつ薬 desipramine hydrochloride (Wako, Osaka, Japan) と、モノアミン酸化酵素阻害薬である pargyline hydrochloride (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) を saline に溶かし、それぞれを 1 mg/kg および 2 mg/kg の用量でマウスに腹腔内投与した。投与 15 分後、マウスを 2% isoflurane (Sigma-Aldrich)、70% N<sub>2</sub>O、30% O<sub>2</sub> の混合気体を用いて吸入麻酔を行った。麻酔が十分に効いたマウスを脳定位固定装置 (Narishige, Tokyo, Japan) に固定後、Bregma に対し、AP: -1.2 mm、ML: +1.1mm、DV: 5.0mm に位置する右側 MFB を標的とした<sup>39)</sup>。6-OHDA-HCl (Sigma-Aldrich) は 0.2 % ascorbic acid を含む saline に濃度 15 mg/mL になるよう溶解し、マイクロシリンジ (Hamilton, Reno, NV, USA) と電動マイクロインジェクター (Narishige) を用いて流速 0.24 μL/min で 0.2 μL 注入した。投与後 6-OHDA を注入部位から拡散させるため 5 分放置してから注入針を抜き、頭皮を縫合糸で縫合後、脳定位固定装置から外した。

投与から 2 週間後、マウスを 2L ビーカーに入れて 30 分間自発回転運動を観察し、総回転数の 80% 以上が障害側方向への回転であり、かつ 0.5 mg/kg の Apomorphine (Sigma-Aldrich) 腹腔内投与により回転方向が健常側へ反転したマウスを、片側 PD モデルマウスとして以降の実験に使用した (Figure 1A-C)。

### **2-3. 後肢に表れる障害の評価**

マウスを 600 mL ビーカーに入れ、自発的な後肢のステップをビーカーの底面部分から 5 分間ビデオ録画し、VLC media player を用い 0.3-0.5 倍速の低速で再生しながら、左右それぞれの後肢ステップ数をカウントした末梢の運動障害は、正中線交差により 6-OHDA による脳の障害側 (ipsilateral, 右) と健常側 (contralateral, 左) が左右逆転して表れることから、左右それぞれの後肢ステップ数を合算して総ステップ数とし、これに対する患側 (contralateral, 左) のステップ数を評価した。

### **2-4. Levodopa/Benserazide 投与**

末梢 AADC 阻害薬である benserazide HCl (Sigma-Aldrich) は saline に、levodopa は 0.5% CMC 入りの saline にそれぞれ溶解した。片側 PD モデルマウスに対して 21 日間毎日、12.5 mg/kg の benserazide HCl を投与し、その 20 分後に 15 mg/kg の levodopa を腹腔内投与した。

マウスは 6-OHDA を投与していない対照 6-OHDA (-) 群と、回転運動と後肢の障害ステップにより片側 PD モデルの指標を満たした 6-OHDA (+) 群で評価した。

### **2-5. Levodopa 誘発ジスキネジアの評価**

Levodopa 誘発ジスキネジアの評価には、AIMs スコアを用いた。AIMs スコアは、levodopa 投与を行ってから 10 分毎に 150-180 分間記録した<sup>40)</sup>。AIMs スコアは、axial (障害側の反対側 (健常側) に向かって首と上半身を捻った姿勢)、forelimb (健常側の前肢の異常な動き、健常側の後肢を掴むような動き)、および orolingual (顎の動き、または舌を突出する動き) の、計 3 つの異なるパラメーターを観察しスコア化したものの合計得点からなる (Figure 1D-F)。これらのパラメーターは、以下の基準に沿って、それぞれ 0 から 4 の 5 段階でスコア化した：0、異常な動きが全く見られない；1、観察時間の半分未満；2、観察時間の半分以上；3、常に行われているが刺激により止まる；4、常に行われており、刺激によって止まらない。

## **2-6. 回転運動の評価**

LID モデルマウスにおける自発回転運動は<sup>41)</sup>、levodopa 投与 6 時間後、2-3 に記載した方法と同様に障害側への回転率により評価した。また apomorphine 誘発回転運動も同様に、levodopa 投与 6 時間後に 0.5 mg/kg の apomorphine を腹腔内に投与し健常側への回転数により評価した。

## **2-7. iCBI デバイス設置と MMT の投与**

マウスを 2% isoflurane (Sigma-Aldrich)、70% N<sub>2</sub>O、30% O<sub>2</sub> の混合気体を用いて吸入麻酔した後、iPRECIO<sup>TM</sup> programmable micro infusion pump (Model SMP-300, Primetech Co., Tokyo, Japan) を腰部皮下に埋め込んだ。Infusion cannula は Bregma に対し、AP: +0.3 mm、ML: +2,3mm、DV: +3.0mm に位置する<sup>39)</sup>、右側 (6-OHDA 障害側) 線条体を標的に設置した。MMT HCl (Wako) は、0.01 M PBS に

溶解し、infusion pump リザーバーに充填した。また、濃度ごとに異なる MMT 溶液をリザーバー内にて交換・充填した。iCBI デバイスのプログラムは、iPRECIO<sup>®</sup> Management Software IMS-300 を用いて、動物 ID（投与する薬剤種、動物の個体 No. など）、投与量単位と流速（1 uL/hr）、投与日数（12 日）を入力・設定した。プログラムした情報は、Wi-Fi により iCBI デバイスに転送した。さらにポンプが作動して設定したプログラム通りに正しく投与されているか、6 時間毎に Wi-Fi で iCBI デバイス毎のログを取得して PC 上で確認した。また異なる濃度の MMT 溶液は、3 日毎に充填・交換した。

## **2-8. 免疫組織化学的解析**

### **2-8-1. 切片の作成**

Levodopa 最終投与後、マウスに sodium pentobarbital 溶液（50 mg/mL）を 0.1 mL 腹腔内投与し、麻酔を行った。次にマウスの心臓の左心室にカニューレを挿入し、0.9% saline を灌流して血液を除去した後に、0.1 M phosphate buffer (PB,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.02884mol,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  0.09004 mol) に溶解した 4% paraformaldehyde 溶液にて灌流固定した。固定後、全脳を摘出して同一固定液内で一晩放置した。Sucrose 濃度を 20% → 30% の順に上昇させた sucrose/0.01 M PBS に 1 日ずつ浸漬した後、線条体から bregma 0.38~0.74 mm の範囲で、クライオスタットにて厚さ 16  $\mu\text{m}$  の切片を作成し、染色するまで 0.05%  $\text{NaN}_3$  を含む PBS で 4 °C 中にて保存した。

### **2-8-2. 免疫蛍光染色**

Individual Indirect Reagent Pack (Perkin Elmer, Shelton, CT, USA) を用いた<sup>42)</sup>。内在性 peroxidase の活性化を抑制するために、0.6% hydrogen peroxidase を含む PBS で 15 分間処理し、0.01 M PBS で 5 分間ずつ計 3 回洗浄した。以下、切片の洗浄は、全て同一条件で行った。次に 3% BSA/PBS で 60 分間インキュベートしブロッキング後、同一溶液で希釈した一次抗体溶液 (anti-tyrosine hydroxylase (TH) antibody, Millipore, 1:200,000) を用いて<sup>42)</sup>、室温で 18 時間インキュベートした。切片を洗浄し、Histofine Simple Stain HRP 標識の二次抗体 (Nichirei, Tokyo, Japan) を用いて 45 分インキュベートした。切片を洗浄し、Fluorescein Amplification Regent を Amplification Diluent で 1:100 に希釈し、遮光して室温で 15 分間インキュベートした。切片を洗浄後、スライドガラスに貼り付けた。

### **2-8-3. Nissl 染色**

切片を室温で 1 日乾燥させた後、0.1% クレシルバイオレット水溶液に 10 分間浸漬し、95% エタノールを用いて脱色し、適切な染色像が得られるよう分別した。100% EtOH にて 5 分間脱水し、キシレンを 5 分間ずつ計 2 回透徹処理を行った後に、スライドガラスを被せてエンテランニュー顕微鏡用速乾性封入剤 (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) とともに封入した。

### **2-8-4. 検鏡と定量**

Olympus BX51 顕微鏡 (Olympus, Tokyo, Japan) にて観察、撮影し、Adobe Photoshop CS4 を用いて、色調、コントラスト、明るさなどを調整した。

また、線条体 TH 陽性線維密度の計測は、画像解析ソフト (WinRoof Ver.5, Mitani Co., Fukui, Japan) を用いた。

## **2-9. 統計解析**

全ての値は  $\text{mean} \pm \text{S.E.M}$  で表し、二群間比較には *paired two-tailed t-test* もしくは *Mann-Whitney U-test* を用いた。多重比較は、*one-way analysis of ANOVA* もしくは *two-way analysis of ANOVA* による解析を行い、これに続き *Scheffe's post hoc test*、*Fisher's PLSD test* または *Bonferroni's post-hoc test* により有意差検定を行い、有意水準を 5% 未満に設定した。統計解析と検定には、*GraphPad Prism 7 software* (GraphPad Software Inc., San Diego, CA; USA) を使用した。

## 第三節：実験結果

### 3-1. 片側 PD モデルマウスの作成と後肢に表れる障害性ステップの評価

マウス脳右側の MFB に 6-OHDA を投与して 2 週間後、行動薬理的および免疫組織化学的解析により、片側 PD モデルマウスとしての妥当性を検証した。健常側 (contralateral) への自発回転運動は、6-OHDA を投与していないマウスでは 50% 程度であるのに対し、6-OHDA 投与したマウスでは有意に低下しており、このマウスに 0.5 mg/kg の Apomorphine を投与すると回転方向は反転し、健常側への回転率に有意な増加が見られた (Figure 2A)。Figure 2A で得られた回転率の算出に用いた、各群マウスの総回転数を比較したところ、6-OHDA 投与の有無で総回転数に差は見られなかったが、Apomorphine 投与群では他の群と比較して統計上有意に総回転数が増加した (Figure 2B)。チロシン水酸化酵素 tyrosine hydroxylase (TH) はドパミン合成の律速酵素であり、ドパミン神経細胞マーカーとして知られている。この酵素に対する特異的抗体を用いた免疫組織化学的解析を行ったところ、6-OHDA を投与した障害側 (lesion side) における TH 陽性線維密度が、投与をしていない反対側 (non-lesion side) と比較して低下しており、これを定量したところ反対側のおよそ 30% 程度まで有意に減少していた (Figure 2C, D)。したがって、本モデルマウスは片側 PD モデルとして妥当であると判断された。

このような片側 PD モデルマウスに、saline あるいは levodopa (1 mg/kg および 3 mg/kg) を腹腔内投与して観察用ビーカーに入れ投与 10 分後から 5 分間ビデオ撮影し、前節 2-3 に記載した方法により左右後肢の自発ステップ数を測定した (Figure 3A)。マウス後肢の 5 分間の総ステップ数は、6-OHDA 投与の有無による差はみら

れなかったが、levodopa の投与群では、用量依存的に増加し、3 mg/kg 投与群では control 群および 6-OHDA 群のいずれと比較しても有意に増加した (Figure 3B)。続いて、左側 (contralateral) 後肢の使用頻度を総ステップ数に対する割合として算出したところ、6-OHDA 投与マウスの左側の後肢の使用頻度は control 群と比較して有意に減少しており、これに levodopa を投与すると用量依存的かつ統計上有意に回復した (Figure 3C)。さらに右側 (ipsilateral) 後肢の使用頻度も同様に解析したところ、6-OHDA 投与マウスでは左側後肢とは逆に control 群と比較して有意に増加しており、これに levodopa を投与すると用量依存的かつ統計上有意に減少した (Figure 4A)。また 6-OHDA 投与マウスの後肢を観察中、通常は左右交互のステップが、右側後肢のみ連続した使用もしばしばみられたことから、その詳細を解析した。右側後肢の 2 回連続したステップ (Figure 4B) および 3 回連続したステップ (Figure 4C) は、いずれも 6-OHDA 群で増加しており、それらはいずれも levodopa 投与によって用量依存的に減少した (Figure 4B,C)。

後肢の障害解析に使用したビデオ映像を用いて、同一条件下の回転運動を解析したところ、6-OHDA 投与群では、control 群に比較して健常側 (contralateral) への回転率が著しく低下しており、これは levodopa 投与によって用量依存的に回復した (Figure 5)。以上の結果から、本項で検討した 6-OHDA 片側 PD モデルマウスの後肢に表れる障害性ステップは、PD 運動障害と薬効評価の新たな指標として妥当であることが示された。

### **3-2. LID モデルの作成と iCBI デバイスによる MMT の薬効評価**



本項では、6-OHDA 片側 PD モデルマウスとして、自発回転運動、apomorphine 誘発回転運動、および前項にて確立した後肢の障害性ステップの、3 つの評価基準を全て満たしたマウスを使用した。Figure 6A に実験スケジュールを示す。前節 2-5 に示した方法に従って、片側 PD モデルマウスに 15 mg/kg の levodopa を 21 日間投与して、AIMs スコアの評価から LID モデルマウスを確立した。Figure 6B に示す通り、片側 PD モデルマウスにおいて levodopa 投与開始から 21 日目に、投与後 10 分毎の AIMs スコアを 180 分にわたって記録し解析したところ、levodopa 投与 10 分後から AIMs スコアが増加して 60 分以上高い ON 状態が観察され、その後 120 分を超えると AIMs スコアは消失した (Figure 6B)。計測時間 180 分の AIMs スコアを合算して比較したところ、6-OHDA 投与群で著しく増加していることが確認された (Figure 6C)。Levodopa 投与によって、このような AIMs スコアの顕著な増加を示したマウスを、LID モデルマウスとした。

一方、levodopa 投与から 6 時間後の LID モデルマウスは、ドパミン枯渇を反映した OFF 状態になり、Figure 7A-7C に示すように PD 運動症状が観察された。Figure 7A に示す自発回転運動は、自発的な障害側への回転率が有意に上昇し、Figure 7B に示す Apomorphine 誘発回転運動は自発回転運動から反転して健常側への回転数が有意に増加し、Figure 7C に示す後肢のステップは左側 (contralateral) の使用率が有意に減少した。すなわち前項にて検討した PD 運動症状の 3 条件を全て満たしていた。

このように LID 症状と PD 運動症状を呈したマウスの障害側背側線条体を標的に、前節 2-7 に示した方法によって iCBI デバイスを設置した (Figure 8A)。行動薬理的な実験終了後に線条体組織切片を作成して顕微鏡観察したところ、Figure 8B

に示す図と同様、実際にカニューレの先端が線条体内まで達していることが確認された (Figure 8B, C)。また、この組織切片を Nissl 染色したところ、カニューレ痕周辺のおそらくグリオシスと思われる細胞集合を除いては、特に組織の損傷は見られなかった (Figure 8D)。

障害側背側線条体を標的に iCBI デバイスを設置したマウスにおいて control 群は 0.01 M PBS を、MMT 群は、MMT を 0.28 ng/ $\mu$ L (very low)、1.12 ng/ $\mu$ L (low)、4.48 ng/ $\mu$ L (medium)、17.93 ng/ $\mu$ L (high) の 4 つの濃度設定で、各々 3 日間ずつ、流速 1.0  $\mu$ L/hr にて合計 12 日間持続的に投与をした。MMT の持続投与開始と同時に、1 日 1 回の levodopa 投与の再開した (Figure 6A)。

各々の MMT 濃度の投与最終日に AIMs スコアを評価し、LID に対する MMT の薬効を検討した。Very low および low では、PBS 群と MMT 群の間に 10 分ごとの AIMs スコアの差は見られず、60 分以上 AIMs スコアの上昇が観察された (Figure 9A, B)。Medium では、PBS 群の AIMs スコアが levodopa 投与後 120 分まで上昇しているのに対し、MMT 投与群では PBS 群より早く減少し、90 分後にはほとんど消失し (Figure 9C)、high では、計測時間全てを通じて 10 分ごとの AIMs スコアが PBS 群より著しく低下しており、スコアのピーク値とプラトー相の 20 分後から 60 分後においても PBS 群のおよそ 50% 程度まで減少していた (Figure 9D)。計測時間 180 分の AIMs スコアを合算して比較したところ、very low および low では PBS 群と MMT 群間で 統計上有意差は見られなかったが、medium から high では MMT の濃度依存的に減少しており、high の投与最終日 (Day 42) には、PBS 群のみならず very low および low と比較しても有意に減少した (Figure 9E)。このように iCBI デバイスによる片側 PD モデルマウス背側線条体

への MMT インフュージョンは、濃度依存的に AIMS スコアを減少させ、LID を抑制することが示された。

次に、片側 PD モデルマウスの PD 運動症状に対する、MMT の薬効を評価した。本評価は、自発回転運動 (Figure 10A, D)、apomorphine 誘発回転運動 (Figure 10B) および後肢の障害性ステップ (Figure 10C, E) により、MMT 投与開始日 (Day 31) と投与最終日 (Day 42) の、levodopa 腹腔内投与 6 時間後にそれぞれ解析した。障害側への自発回転率は、MMT 投与開始日 (very low) には PBS 群との間に差は見られなかったが、MMT 投与最終日 (high) には、PBS 群や投与開始日の MMT 群 (very low) に比較して統計上有意に減少した (Figure 10A)。なおいずれの群間においても、自発回転数の総数に差は見られなかった (Figure 10D)。Apomorphine 誘発回転数も、自発回転率と同様に、投与開始日の PBS 群と MMT 群 (very low) の間に差は見られなかったが、投与最終日の MMT 群 (high) では、PBS 群や投与開始日の MMT 群 (very low) と比較して健常側への回転数は統計上有意に減少していた (Figure 10B)。さらに、左側後肢 (contralateral) 障害性ステップを解析したところ、投与開始日の PBS 群と MMT 群 (very low) 間に有意差は見られず、使用頻度が減少したままであったが、投与最終日の MMT 群 (high) における左側後肢の使用頻度は 50% 程度まで統計上有意に回復していた (Figure 10C)。なお、いずれの測定日においても、左右後肢の総ステップ数に各群間の有意差は見られなかった (Figure 10E)。

このように iCBI デバイスによる片側 PD モデルマウスの背側線条体への MMT インフュージョンは、PD 運動症状を抑制することが示された。

## 第四節：考察

本論文では、6-OHDA 片側 PD モデルマウスの後肢にみられる障害性ステップが、PD 運動症状と薬効評価の解析指標になることを初めて示すとともに、障害側背側線条体を標的に設置した iCBI デバイスを介して脳内インフュージョンした MMT が、LID 様症状および PD 運動症状をいずれも減弱させる治療効果を有することを初めて報告した。

本論文で用いた片側 6-OHDA 片側 PD モデルマウスは、PD 治療薬の薬効評価に広く使用されており、自発回転運動および apomorphine 誘発回転運動などの回転数・回転率の評価に加えて、左右前肢の使用頻度を評価するシリンダーテストやステップピングテストなどにより解析されているが<sup>16)-19)</sup>、マウスの後肢に表れる障害に関してはこれまでほとんど解析されていなかった。PD 患者の重症度を評価する Unified Parkinson's Disease Rating Scale (UPDRS) には、動作緩慢、無動、歩行障害などの運動障害が評価項目に含まれており<sup>22)</sup>、下肢の障害も主要な PD 症状の一つであることから、PD 実験動物モデルでこれに相当する評価指標を確立することは、病態解析や新規治療法・治療薬の開発において、検出力を高める観点から有意義であると考えられる。本モデルマウスにおいては、右側脳内 MFB に 6-OHDA を投与すると、正中線交差により左側後肢に障害が表われ、その使用頻度が有意に低下し、逆に右側後肢の使用頻度が上昇していた。このような左右非対称性は、おそらく左側後肢の障害を補うように、右側後肢の使用率が上昇したことによると考えられる。またこのような後肢の使用頻度に見られる非対称性は、levodopa により用量依存的に解消されたことから、PD モデル動物の解析指標として、表面妥当性、構成妥当性およ

び予測妥当性を満たすことが示された。今後、本解析指標が新規 PD 治療法や治療薬の探索・開発に利用されることが期待される。

続いてこの片側 PD モデルマウスにおいて、本研究では **iCBI technique** により、**iPRECIO™ micro infusion pump** を用いた障害側背側線条体への **MMT** 直接投与を実施した。従来の **iCBI technique** では、浸透圧ポンプやシリンジポンプなどが広く用いられてきたが、浸透圧ポンプは薬剤の投与量変更や交換が困難であり、シリンジポンプは実験動物と薬液注入機器を物理的に接続する必要があることから、実験動物の行動を制限する。これに対して **iPRECIO™ micro infusion pump** は、プログラム制御型で皮下に完全に埋設できることから実験動物の行動を制限することなく、あらかじめ設定した任意の投与スケジュールや投与量および投与速度によって、標的局所に精密かつ可変用量で薬液投与が可能であり、また皮下のリザーバーに簡単にアクセスできることから薬液の交換、補充も可能な、画期的デバイスである<sup>43),44)</sup>。実験動物では主として末梢で利用され、本システムを使用した **iCBI** はこれまで全く報告されておらず、本研究が初めての例となる。

本研究において、**LID** モデルマウスに対する **iCBI** デバイスを用いた **MMT** インフュージョンは、**LID** 様症状と **PD** 運動症状のいずれに対しても有意な治療効果を示したことから、本法は、**levodopa** 療法が長期化して **LID** などの副作用が発現した **PD** 病相後期の患者に対して有効であることが期待される。

線条体 **NMDA** 受容体<sup>45)</sup>の過剰な活性化は、**LID** の発症と **PD** 運動症状が主体となる **OFF** 状態発現の両方に深く関わっていると考えられており<sup>28),29),31),46)</sup>、実際に臨床でも、**LID** や **PD** 運動症状を示す **PD** 患者において **NMDA** 受容体アンタゴニストのアマンタジンと **MMT** の有用性が報告されている<sup>47)-51)</sup>。しかしアマンタジン

の経口投与は、心臓、胃腸、皮膚などの末梢臓器・組織で副作用を呈する<sup>32),49)</sup>。また脳内 **NMDA** 受容体は、線条体のみならず広範囲に分布してシナプス可塑性の制御に関わっていることから、精神症状や幻覚の発現、学習や記憶など認知機能に対する悪影響が懸念される<sup>52)</sup>。アマンタジンと **MMT** はともにアダマンタン骨格を有する化学構造上の類似性を示すことから、いずれも末梢投与する限りこれらの副作用は不可避であり、臨床で使用可能な用量が制限される<sup>53)</sup>。近年、アルツハイマー病患者に対する多剤比較のメタアナリシス研究が実施され、**MMT** の経口投与の安全性が示されたが<sup>54)</sup>、**PD** 患者の治療には **MMT** の適応が得られておらず、適切な用量や投与期間も不明である。また、**LID** を発症した片側 **6-OHDA** モデルラットでは、**MMT** もしくはアマンタジンの腹腔内単回投与が **LID** 症状を軽減するものの、数日間投与すると、その効果は消失することが報告されており、薬剤耐性が発現した可能性が示唆されている<sup>55)</sup>。臨床研究でも、ジスキネジアを発症した患者にアマンタジンを継続投与すると、8 ヶ月以内に有効性が消失することが報告されている<sup>56)</sup>。アマンタジンと **MMT** の **LID** 治療における薬剤耐性発現機構が、中枢性あるいは末梢性であるのか不明であるが、継続的な経口または全身投与によって生じる薬剤耐性が、治療の有効性を制限するのであれば、物理的侵襲に伴う合併症などのリスクを考慮しても、薬理的 **DBS** のような **iCBI** デバイスを用いた線条体内への直接的な薬物送達システムを開発する価値は、十分あると考えられる。本研究結果がその実用化に向けた嚆矢となり、今後 **non-human primate** 等での検証を経て、**PD** 治療において臨床応用されることを期待する。

## 引用文献

- 1). Lang AE, Lozano AM. N. (1998). N. Parkinson's disease. First of two parts. *Engl J Med*, 339: 1044-1053.
- 2). Lang AE, Lozano AM. N. (1998). Parkinson's disease. Second of two parts. *Engl J Med*, 339: 1130-1143.
- 3). Moore DJ, West AB, Dawson VL, Dawson TM. (2005). Molecular pathophysiology of Parkinson's disease. *Annu Rev Neurosci*, 28: 57-87.
- 4). Samii, A., Nutt, J.G., Ransom, B.R. (2004). Parkinson's disease. *Lancet* 363, 1783–1793.
- 5). Agid Y. (1991). Parkinson's disease. pathophysiology. *Lancet* 337: 1321-1324.
- 6). Bové, J., Perier, C. (2012). Neurotoxin-based models of Parkinson's disease. *Neuroscience* 211, 51–76.
- 7). Obeso, J. A., Grandas, F., Vaamonde, J., Luquin, M. R., Artieda, J., Lera, G., et al. (1989). Motor complications associated with chronic levodopa therapy in Parkinson's disease. *Neurology* 39, 11–19.

- 8). Luquin, M. R., Scipioni, O., Vaamonde, J., Gershanik, O., and Obeso, J. A. (1992). Levodopa-induced dyskinesias in Parkinson's disease: clinical and pharmacological classification. *Mov. Disord.* 7, 117–124.
- 9). Rascol, O., Brooks, D. J., Korczyn, A. D., De Deyn, P. P., Clarke, C. E., and Lang, A. E. (2000). A five-year study of the incidence of dyskinesia in patients with early Parkinson's disease who were treated with ropinirole or levodopa. *Mov. Disord.* 342, 1484–1491.
- 10). Brotchie, J. M. (2005). Nondopaminergic mechanisms in levodopa-induced dyskinesia. *Mov. Disord.* 20, 919–931.
- 11). Ungerstedt, U. (1968). 6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. *Eur. J. Pharmacol.* 5, 107–110.
- 12). Iancu, R., Mohapel, P., Brundin, P., Paul, G. (2005). Behavioral characterization of a unilateral 6-OHDA-lesion model of Parkinson's disease in mice. *Behav. Brain Res.* 162, 1–10.
- 13). Miklyaeva, E.I., Whishaw, I.Q. (1996). HemiParkinson analogue rats display active support in good limbs versus passive support in bad limbs on a skilled



reaching task of variable height. *Behav. Neurosci.* 110, 117–125.

- 14). Whishaw, I.Q., Li, K., Whishaw, P.A., Gorny, B., Metz, G.A. (2003). Distinct forelimb and hind limb stepping impairments in unilateral dopamine-depleted rats: use of the rotarod as a method for the qualitative analysis of skilled walking. *J. Neurosci. Meth.* 126, 13–23.
- 15). Glajch, K.E., Fleming, S.M., Surmeier, D.J., Osten, P. (2012). Sensorimotor assessment of the unilateral 6-hydroxydopamine mouse model of Parkinson's disease. *Behav. Brain Res.* 230, 309–316.
- 16). Olsson, M., Nikkhah, G., Bentlage, C., Björklund, A. (1995). Forelimb akinesia in the rat Parkinson Model: differential effects of dopamine agonists and nigral transplants as assessed by a new stepping test. *J. Neurosci.* 15, 3863–3875.
- 17). Iancu, R., Mohapel, P., Brundin, P., Paul, G. (2005). Behavioral characterization of a unilateral 6-OHDA-lesion model of Parkinson's disease in mice. *Behav. Brain Res.* 162, 1–10.
- 18). Blume, S.R., Cass, D.K., Tseng, K.Y. (2009). Stepping test in mice: a reliable approach in determining forelimb akinesia in MPTP-induced Parkinsonism. *Exp. Neurol.* 219, 208–211.

- 19). Heuer, A., Smith, G.A., Lelos, M.J., Lane, E.L., Dunnett, S.B. (2012). Unilateral nigrostri- atal 6-hydroxydopamine lesions in mice I: motor impairments identity extent of dopamine depletion at three different lesion sites. *Behav. Brain Res.* 228, 30–43.
- 20). Lunblad, M., Andersson, M., Winkler, C., Kirik, D., Wierup, N., Cenci, M.A. (2002). Pharmacological validation of behavioral measures of akinesia and dyskinesia in a rat model of Parkinson’s disease. *Eur. J. Neurosci.* 15, 120–132.
- 21). Francardo, V., Recchia, A., Popovic, N., Andersson, D., Nissbrandt, H., Cenci, M.A. (2011). Impact of the lesion procedure on the profiles of motor impairment and molecular responsiveness to L-dopa in the 6-hydroxydopamine mouse model of Parkinson’s disease. *Neurobiol. Dis.* 42, 327–340.
- 22). Fahn, S., Elton, R. (1987). Members of the UPDRS Development Committee. The unified Parkinson’s disease rating scale. In: Fahn, S., Marsden, C.D., Calne, D.B., Gold- stein, M. (Eds.), *Recent Development in Parkinson’s Disease*, vol. 2. Macmillan Healthcare Information, Florham Park, pp. 153–164.
- 23). Jenner P. (2008). Molecular mechanisms of L-DOPA-induced dyskinesia. *Nat Rev Neurosci.* 9:665-77.

- 24). Olanow CW, Obeso JA, Stocchi F. (2006) Drug Insight: continuous dopaminergic stimulation in the treatment of Parkinson's disease. *Nat Clin Pract Neurol.* 2:382-92
- 25). Jankovic J. (2005) Motor fluctuations and dyskinesias in Parkinson's disease: Clinical manifestations. *Mov. Disord.* Suppl 11:S11-6
- 26). Ahlskog JE, Muenter MD. (2001). Frequency of levodopa-related dyskinesias and motor fluctuations as estimated from the cumulative literature. *Mov Disord.* 16: 448-58.
- 27). Limousin P, Foltynie T. (2019). Long-term outcomes of deep brain stimulation in Parkinson disease. *Nat Rev Neurol.* 15: 234-42.
- 28). Greengard P. (2001). The neurobiology of slow synaptic transmission. *Science.* 294: 1024-30.
- 29). Brichta L, Greengard P, Flajolet M. (2013). Advances in the pharmacological treatment of Parkinson's disease: targeting neurotransmitter systems. *Trends Neurosci.* 36: 543-54.

- 30). Picconi B, Hernández LF, Obeso JA, Calabresi P. (2018). Motor complications in Parkinson's disease: striatal molecular and electrophysiological mechanisms of dyskinesias. *Mov Disord.* 33; 867-76.
- 31). Goto S. (2017) Striatal  $G_{\alpha\text{olf}}$ /cAMP signal-dependent mechanism to generate levodopa-induced dyskinesia in Parkinson's disease. *Front Cell Neurosci.* 11: 364.
- 32). Litim N, Morissette M, Di Paolo T. (2017). Metabotropic glutamate receptors as therapeutic targets in Parkinson's disease: An update from the last 5 years of research. *Neuropharmacology.* 115: 166-79.
- 33). Mellone M, Gardoni F. (2018). Glutamatergic mechanisms in L-DOPA-induced dyskinesia and therapeutic implications. *J Neural Transm (Vienna).* 125: 1225-36.
- 34). Woicichowsky C, Guilarte TR, May CH, Vesper J, Wagner HNJr, Vogel S. (1995). Intrastratial dopamine infusion reverses compensatory increases in D2-dopamine receptors in the 6-OHDA lesioned rat. *Neurodegeneration.* 4: 161–9.
- 35). Carta M, Lindgren HS, Lundblad M, Stancampiano R, Fadda F, Cenci MA. (2006). Role of striatal L-DOPA in the production of dyskinesia in 6-hydroxydopamine lesioned rats. *J Neurochem.* 96: 1718–27.

- 36). Lang AE, Gill S, Patel NK, Lozano A, Nutt JG, Penn R, et al. (2006). Randomized controlled trial of intraputamenal glial cell line-derived neurotrophic factor infusion in Parkinson's disease. *Ann Neurol.* 59: 459-66.
- 37). Whone A, Luz M, Boca M, Woolley M, Mooney L, Dharia S, et al. (2019). Randomized trial of intermittent intraputaminal glial cell-derived neurotrophic factor in Parkinson's disease. *Brain.* 142:512-525.
- 38). Parsons CG, Danysz W, Quack G. (1999). Memantine is a clinically well tolerated N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonist--a review of preclinical data. *Neuropharmacology.* 38: 735-67.
- 39). Paxinos G, Franklin KBJ. (2001). The mouse brain in stereotaxic coordinates, Ed 2. San Diego: *Academic Press.*
- 40). Morigaki R, Okita S, Goto S. (2017). Dopamine-induced changes in G<sub>o1f</sub> protein levels in striatonigral and striatopallidal medium spiny neurons underlie the genesis of L-DOPA-induced dyskinesia in parkinsonian mice. *Front Cell Neurosci.* 11: 26.
- 41). Boix J, Padel T, Paul G. (2015). A partial lesion model of Parkinson's disease in

mice – Characterization of a 6-OHDA-induced medial forebrain bundle lesion.  
*Behav Brain Res.* 284: 196-206.

42). Morigaki R, Goto S. (2016). Putaminal mosaic visualized by tyrosine hydroxylase immunohistochemistry in the human neostriatum. *Front Neuroanat.* 10: 34.

43). Abe C, Tashiro T, Tanaka K, Ogihara R, Morita H. (2009). A novel type of implantable and programmable infusion pump for small laboratory animals. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 59: 7-12.

44). Tan T, Watts SW, Davis RP. (2011). Drug delivery: enabling technology for drug discovery and development. iPRECIO micro infusion pump: programmable, refillable, and implantable. *Front Pharmacol.* 2: 44.

45). Traynelis SF, Wollmuth LP, McBain CJ, Menniti FS, Vance KM, Oqden KK, et al. (2010). Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacol Rev.* 62: 405-96.

46). Ahmed I, Bose SK, Pavese N, Ramlackhansingh A, Turkheimer F, Hotton G, et al. (2011). Glutamate NMDA receptor dysregulation in Parkinson's disease with dyskinesias. *Brain.* 134: 979-86.

- 47). Perez-Lloret S, Rascol O. (2018). Efficacy and safety of amantadine for the treatment of L-DOPA-induced dyskinesia. *J Neural Transm (Vienna)*. 125: 1237-50.
- 48). Varanese S, Howard J, Di Rocco A. (2010). NMDA antagonist memantine improves levodopa-induced dyskinesias and "on-off" phenomena in Parkinson's disease. *Mov Disord*. 25: 508-10.
- 49). Moreau C, Delval A, Tiffreau V, Defebvre L, Dujardin K, Duhamel A, et al. (2013). Memantine for axial signs in Parkinson's disease: a randomised, double-blind, placebo-controlled pilot study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 84: 552-5.
- 50). Vidal EI, Fukushima FB, Valle AP, Villas Boas PJ. (2013). Unexpected improvement in levodopa-induced dyskinesia and on-off phenomena after introduction of memantine for treatment of Parkinson's disease dementia. *J Am Geriatr Soc*. 61: 170-2.
- 51). Victorin K, Widner H. (2016). Memantine and reduced time with dyskinesia in Parkinson's disease. *Acta Neurol Scand*. 133: 355-60.
- 52). Paoletti P. (2011). Molecular basis of NMDA receptor functional diversity. *Eur J*

*Neurosci.* 33: 1351-65.

- 53). Pahwa R, Tanner CM, Hauser RA, Isaacson SH, Nausieda PA, Truong DD, et al. (2017). ADS-5102 (amantadine) extended-release capsules for levodopa-induced dyskinesia in Parkinson disease (EASE LID Study): A randomized clinical trial. *JAMA Neurol.* 74: 941-9.
- 54). Li D, Zhang Y, Zhang W, Zhao P. (2019). Meta-analysis of randomized controlled trials on the efficacy and safety of donepezil, galantamine, rivastigmine, and memantine for the treatment of Alzheimer's disease. *Front Neurosci.* 13: 472.
- 55). Tronci E, Fidalgo C, Zianni E, Collu M, Stancampiano R, Morelli M, et al. (2014). Effect of memantine on L-DOPA-induced dyskinesia in the 6-OHDA-lesioned rat model of Parkinson's disease. *Neuroscience* 265: 245-252.
- 56). Thomas A, Iacno D, Luciano AL, Armellino K, Di Iorio A, Onofrij M. (2004). Duration of amantadine benefit on dyskinesia of severe Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 75:141–3. Available online at: <https://jnnp.bmj.com/content/75/1/141.long>.



## 謝辞

本研究の遂行にあたり、終始御懇篤なるご指導とご鞭撻を賜りました、徳島大学大学院 医歯薬研究部 神経病態解析学分野 准教授 笠原二郎先生、並びに徳島大学大学院 医歯薬研究部 難治性神経疾患病態研究分野 特任教授 後藤恵先生に、謹んで感謝の意を表します。

本研究に際し、数多くのご尽力を頂きました徳島大学大学院 医歯薬研究部 神経病態解析学分野 周禹氏、辻諒佑修士、並びに同分野の皆様にご心より御礼申し上げます。

## FIGURE LEGENDS

**Figure 1.** Representative pictures of 6-OHDA-induced hemi-parkinsonism mice.

**(A-C)** Rotational behaviors. **(A)** Non-lesioned mice. **(B)** Spontaneous rotations ipsilateral to 6-OHDA-lesioned side. **(C)** Apomorphine-induced contralateral turns.

**(D-F)** AIMs test. Levodopa-induced abnormal involuntary movements in mice with hemi-parkinsonism caused by 6-OHDA lesions. Pictures show the axial **(D)**, limb **(E)** and oral **(F)** behaviors.

**Figure 2.** Generation of 6-OHDA-induced hemi-parkinsonian mice.

**(A)** Rotation to contralateral side indicated as % of total counts in a 30-min test. Values are expressed as mean  $\pm$  SEM ( $n = 5$ ,  $F_{2,12} = 363.6$ ,  $***P < 0.005$  vs. control). One-way ANOVA followed by Scheffe's *post hoc* test.

**(B)** Total number of turns in 30 min. Values are expressed as mean  $\pm$  SEM ( $n = 5$ ,  $F_{2,12} = 77.164$ ,  $***P < 0.005$  vs. control,  $###P < 0.005$  vs. 6-OHDA). One-way ANOVA followed by Scheffe's *post hoc* test.

**(C)** Representative image of TH immunostaining in the striatum of a unilateral 6-OHDA-lesioned mouse. Scale bar indicates 500  $\mu\text{m}$ .

**(D)** Quantitative analysis of striatal TH immunoreactivity (IR) indicated by density (A.U., arbitrary unit). Values are expressed as mean  $\pm$  SEM ( $n = 5$ ,  $***P < 0.005$  vs. non-lesioned side). Two-tailed *t*-test.

**Figure 3.** Evaluation of hind limb steps.

**(A)** Topological configuration of the analyzed hind limb.

**(B)** Total count of spontaneous hind limb steps in a 5-min test. Values are expressed as mean  $\pm$  SEM ( $n = 5$ ,  $F_{3,16} = 6.24$ ,  $*P < 0.05$  vs. control,  $^{\#}P < 0.05$  vs. 6-OHDA).

**(C)** Steps of the contralateral hind limb, indicated as % of total counts. Values are expressed as mean  $\pm$  SEM ( $n = 5$ ,  $F_{3,16} = 10.2$ ,  $*P < 0.05$  vs. control,  $^{\#}P < 0.05$ ,  $^{###}P < 0.005$  vs. 6-OHDA). One-way ANOVA followed by Scheffe's *post hoc* test.

**Figure 4.** Evaluation of sequential ipsilateral hind limb steps in a 5-min test.

**(A)** Steps of the ipsilateral hind limb, indicated as % of total counts.

**(B)** Counts of sequential double steps in the ipsilateral hind limb. Values are expressed as mean  $\pm$  SEM ( $n = 5$ ,  $F_{3,16} = 2.83$ ).

**(C)** Counts of sequential triple steps in the ipsilateral hind limb. Values are expressed as mean  $\pm$  SEM ( $n = 5$ ,  $F_{3,16} = 7.35$ ,  $*P < 0.05$  vs. control,  $^{\#}P < 0.05$  vs. 6-OHDA).

One-way ANOVA followed by Scheffe's *post hoc* test. Values are expressed as mean  $\pm$  SEM ( $n = 5$ ,  $F_{3,16}=10.2$ ,  $*P < 0.05$  vs. control,  $^{\#}P < 0.05$ ,  $^{###}P < 0.005$  vs. 6-OHDA). One-way ANOVA followed by Scheffe's *post hoc* test.

**Figure 5.** Evaluation of levodopa-induced rotation. Rotation to contralateral-to-lesion side indicated as % of total counts in a 5-min test. Values are expressed as mean  $\pm$  SEM ( $n = 5$ ,  $F_{3,16} = 10.67$ ,  $*P < 0.05$  vs. control,  $^{###}P < 0.005$  vs. 6-OHDA). One-way ANOVA followed by Fisher's PLSD test.

**Figure 6.** Generation of dyskinetic mice for the intracerebral brain infusion (iCBI) experiments.

**(A)** Timeline of experimentations (see “Experimental Methods” section). Dyskinetic mice were implanted with programmable intracerebral brain infusion (iCBI) systems equipped with iPRECIO™ micro infusion pumps at day 28. After a recovery of 3 days, they restarted receiving daily levodopa/benserazide treatments for the next 12 days. Simultaneously, MMT-treated dyskinetic mice received continuous intrastriatal infusion of MMT 0.28 ng/μl at a flow rate of 1.0 μl/h for the first 3 days (days 31–33), MMT 1.12 ng/μl at a flow rate of 1.0 μl/h for the next 3 days (days 34–36), MMT 4.48 ng/μl at a flow rate of 1.0 μl/h for the next 3 days (days 37–39), and MMT 17.93 ng/μl at flow rate of 1.0 μl/h for the last 3 days (days 40–42). In parallel, PBS-treated dyskinetic mice received 0.01 M PBS infusion under the same protocol. AIMs tests for MMT- or PBS-treated mice were done at days 33, 36, 39, and 42.

**(B)** Time course of the abnormal involuntary movements (AIMs) scored every 10 min over a period of 180 min after the last levodopa administration in naïve mice and 6-hydroxydopamine (6-OHDA)-lesioned mice. Data are means ± SEM at each time point (naïve mice, n = 10; 6-OHDA-lesioned mice, n = 14).

**(C)** Total AIMs score in naïve mice and 6-OHDA-lesioned mice with levodopa administration at day 21. 6-OHDA (–) (n = 10); 6-OHDA (+) (n = 14). Data are means ± SEM. \*\*\* $P < 0.005$  vs. naïve mice; Two-tailed  $t$ -test.

**Figure 7.** PD symptoms analyzed in dyskinetic mice.

**(A)** Spontaneous rotations ipsilateral to 6-OHDA-lesioned side percent of total in mice with or without 6-OHDA lesions. 6-OHDA (–) (n = 6); 6-OHDA (+) (n = 6). Data are means ± SEM. \*\**P* < 0.01 vs. 6-OHDA (–); Mann-Whitney *U*-test.

**(B)** Counts of apomorphine-induced contralateral turns per 30 min in mice with or without 6-OHDA lesions. 6-OHDA (–) (n = 6); 6-OHDA (+) (n = 6). Data are means ± SEM. \*\**P* < 0.01 vs. naïve controls; Mann-Whitney *U*-test.

**(C)** Counts of hind limb steps. Steps of the contralateral hind limb as % of the total count in the naïve controls (n = 6) and Hemi-PD mice (n = 6). Data are means ± SEM. \**P* < 0.05 vs. naïve; Mann-Whitney *U*-test.

**Figure 8.** Implant of iCBI device and tissue image in mice.

**(A–D)** Schematic representation of the iCBI system, in which the pump and tubing were implanted completely under the skin **(A)**. The infusion cannula implanted into the dopamine-depleted striatum **(B)**, together with the image of striatum after fixation and removal of the cannula **(C)**, and with a Nissl-stained image **(D)**. Scale bars show 0.5 mm in **(C)** and 100 μm in **(D)**.

**Figure 9.** Effects of intrastriatal memantine (MMT) infusion on levodopa-induced abnormal involuntary movements (AIMs) in dyskinetic mice.

**(A–D)** Time-sequential changes in the AIM scores every 10 min over a period of 180 min after the last levodopa administration in mice with intrastriatal infusion of PBS (n = 7) or MMT (n = 7) at day 33 **(A)**, day 36 **(B)**, day 39 **(C)**, and day 42 **(D)**.

**(E)** Total AIMs score in mice with intrastriatal infusion of PBS or MMT at days 33, 36, 39, and 42. Data are means  $\pm$  SEM. A significant effect of the MMT infusion treatment is found [two-way ANOVA:  $F_{(\text{group} \times \text{dose})3,48} = 5.856$ ,  $P = 0.0017$ ]. Bonferroni's *post-hoc* test: PBS day 33 vs. MMT day 33, not significant (N.S.); PBS day 36 vs. MMT day 36, N.S.; and PBS day 42 vs. MMT day 42,  $***P < 0.001$ . Significant differences in the severity of AIMs at days 33, 36, and 42 are found (Bonferroni's *post-hoc* test: MMT day 33 vs. MMT day 42,  $##P < 0.01$ ; MMT day 36 vs. MMT day 42,  $$$P < 0.01$ ).

**FIGURE 10.** Effects of intrastriatal memantine (MMT) infusion on parkinsonian signs in the dyskinetic mice.

**(A)** Spontaneous rotations ipsilateral to the 6-OHDA-lesioned side percent of the total in the groups of PBS infusion at day 31 (PBS day 31, n = 7), MMT infusion at day 31 (MMT day 31, n = 7), PBS infusion at day 42 (PBS day 42, n = 7), and MMT infusion at day 42 (MMT day 42, n = 7). Data are means  $\pm$  SEM. A significant effect of MMT infusion [two-way ANOVA:  $F_{(\text{group} \times \text{dose})1,24} = 10.25$ ,  $P = 0.0038$ ] is observed. Bonferroni's *post-hoc* test: not significant (N.S.); MMT day 31 vs. MMT day 42,  $**P < 0.01$ ; PBS day 42 vs. MMT day 42,  $###P < 0.001$ .

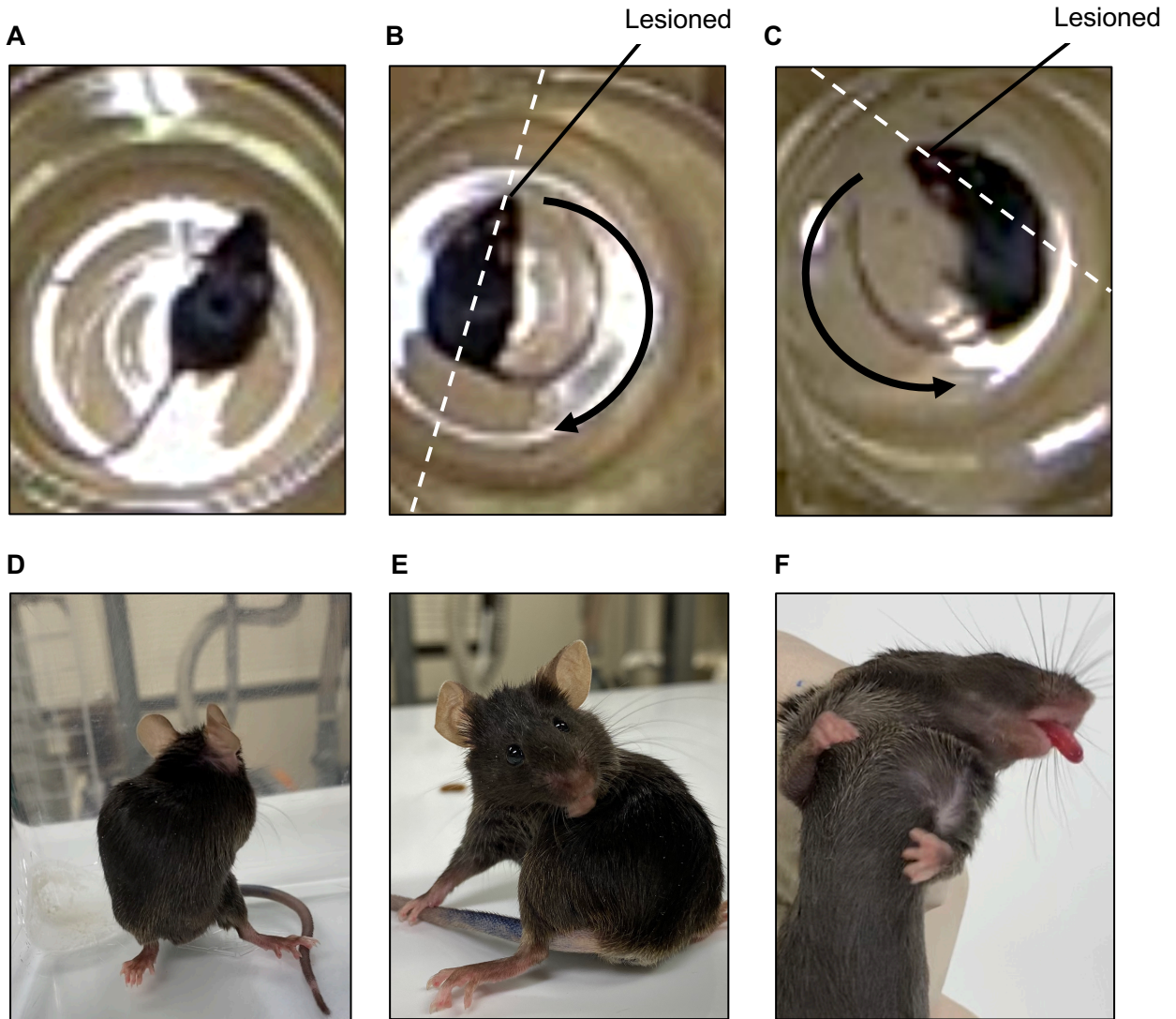
**(B)** Counts of apomorphine-induced contralateral turns per 30 min in the groups of PBS day 31 (n = 6), MMT day 31 (n = 6), PBS day 42 (n = 6), and MMT day 42 (n = 6).

Data are means  $\pm$  SEM. A significant effect of MMT infusion [two-way ANOVA:  $F_{(\text{group} \times \text{dose})1,20} = 9.608$ ,  $P = 0.0056$ ] is found. Bonferroni's *post-hoc* test: not significant (N.S.); MMT day 31 vs. MMT day 42,  $*P < 0.05$ ; PBS day 42 vs. MMT day 42,  $###P < 0.001$ .

**(C)** Spontaneous contralateral hind limb steps as % of the total in PBS day 31 ( $n = 5$ ), MMT day 31 ( $n = 5$ ), PBS day 42 ( $n = 5$ ), and MMT day 42 ( $n = 5$ ). Data are means  $\pm$  SEM. A significant effect of MMT infusion [two-way ANOVA:  $F_{(\text{group} \times \text{dose})1,16} = 7.891$ ,  $P = 0.0126$ ] is found. Bonferroni's *post-hoc* test: not significant (N.S.); MMT day 31 vs. MMT day 42,  $***P < 0.001$ ; PBS day 42 vs. MMT day 42,  $\#P < 0.05$ .

**(D)** Total number of turns in spontaneous rotations summed with both ipsi- and contra-lateral directions. Data are means  $\pm$  SEM. No significance was observed [two-way ANOVA:  $F_{(\text{group} \times \text{dose})1,24} = 6.507$ ,  $P = 0.0434$ ].

**(E)** Total number of steps summed with both ipsi- and contra-lateral hind limbs. Data are means  $\pm$  SEM. No significance was observed [two-way ANOVA:  $F_{(\text{group} \times \text{dose})1,16} = 0.3957$ ,  $P = 0.5634$ ].

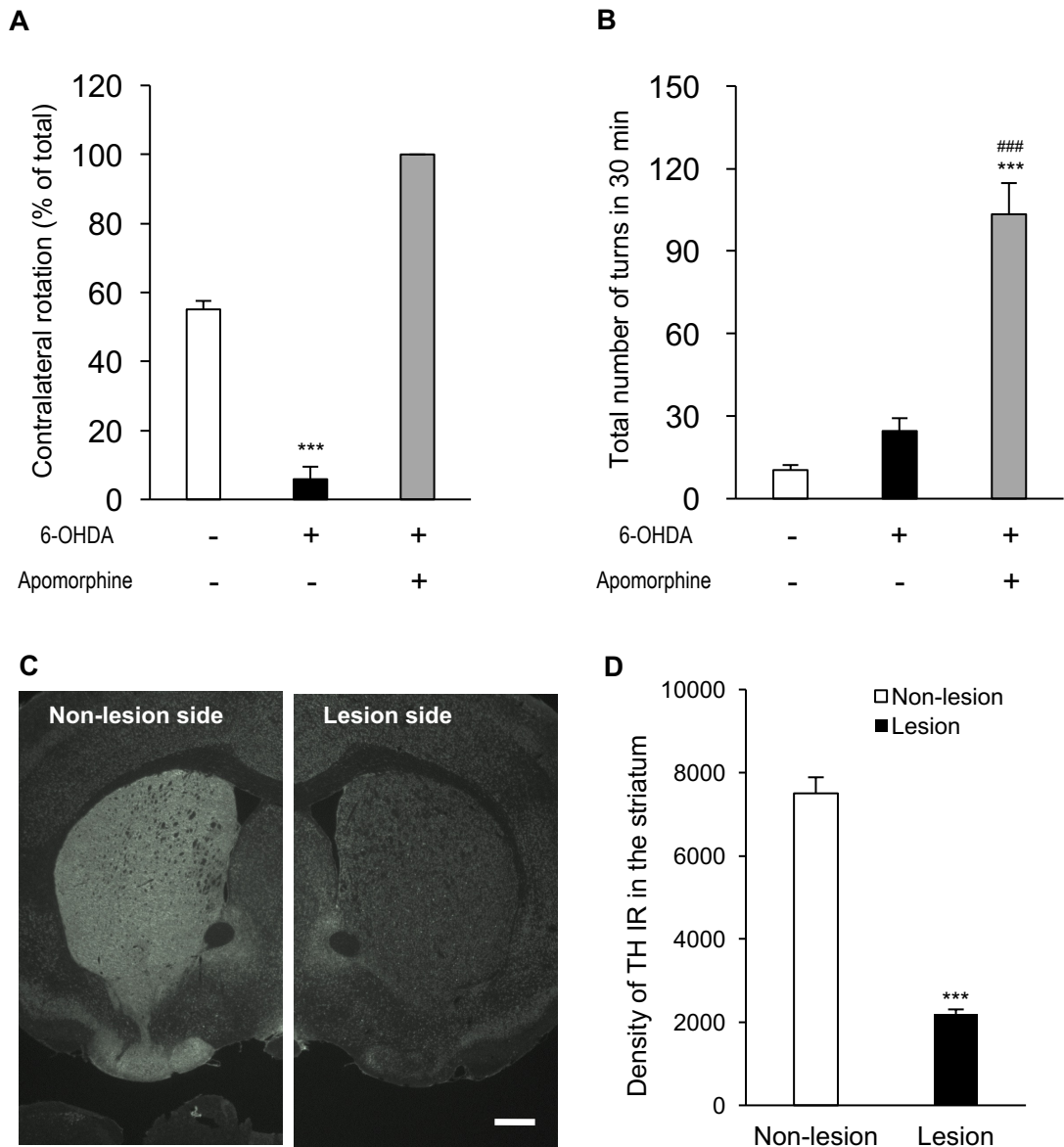


**Figure 1**

Representative pictures of 6-OHDA-induced hemi-parkinsonism mice.

**(A-C)** Rotational behaviors. **(A)** Non-lesioned mice. **(B)** Spontaneous rotations ipsilateral to 6-OHDA-lesioned side. **(C)** Apomorphine-induced contralateral turns. **(D-F)** AIMs test. Levodopa-induced abnormal involuntary movements in mice with hemi-parkinsonism caused by 6-OHDA lesions. Pictures show the axial **(D)**, limb **(E)** and oral **(F)** behaviors.





## Figure 2

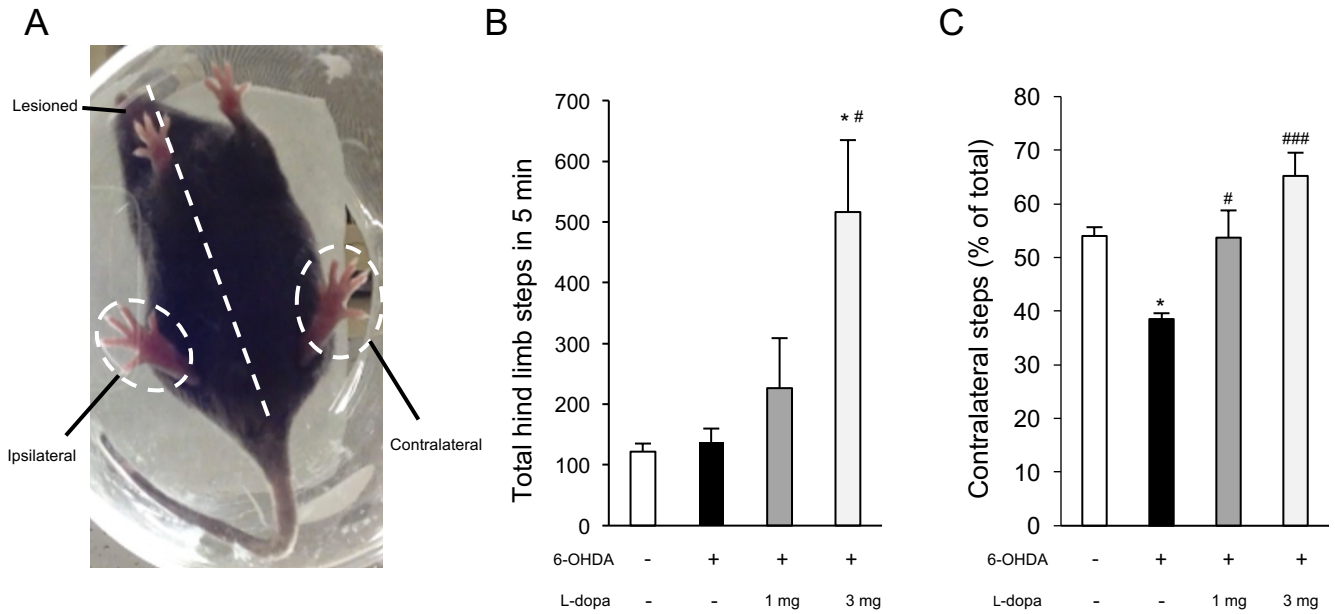
Generation of 6-OHDA-induced hemi-parkinsonian mice.

**(A)** Rotation to contralateral side indicated as % of total counts in a 30-min test. Values are expressed as mean  $\pm$  SEM ( $n = 5$ ,  $F_{2,12} = 363.6$ ,  $***P < 0.005$  vs. control). One-way ANOVA followed by Scheffe's *post hoc* test.

**(B)** Total number of turns in 30 min. Values are expressed as mean  $\pm$  SEM ( $n = 5$ ,  $F_{2,12} = 77.164$ ,  $***P < 0.005$  vs. control,  $###P < 0.005$  vs. 6-OHDA). One-way ANOVA followed by Scheffe's *post hoc* test.

**(C)** Representative image of TH immunostaining in the striatum of a unilateral 6-OHDA-lesioned mouse. Scale bar indicates 500  $\mu$ m.

**(D)** Quantitative analysis of striatal TH immunoreactivity (IR) indicated by density (A.U., arbitrary unit). Values are expressed as mean  $\pm$  SEM ( $n = 5$ ,  $***P < 0.005$  vs. non-lesioned side). Two-tailed *t*-test.



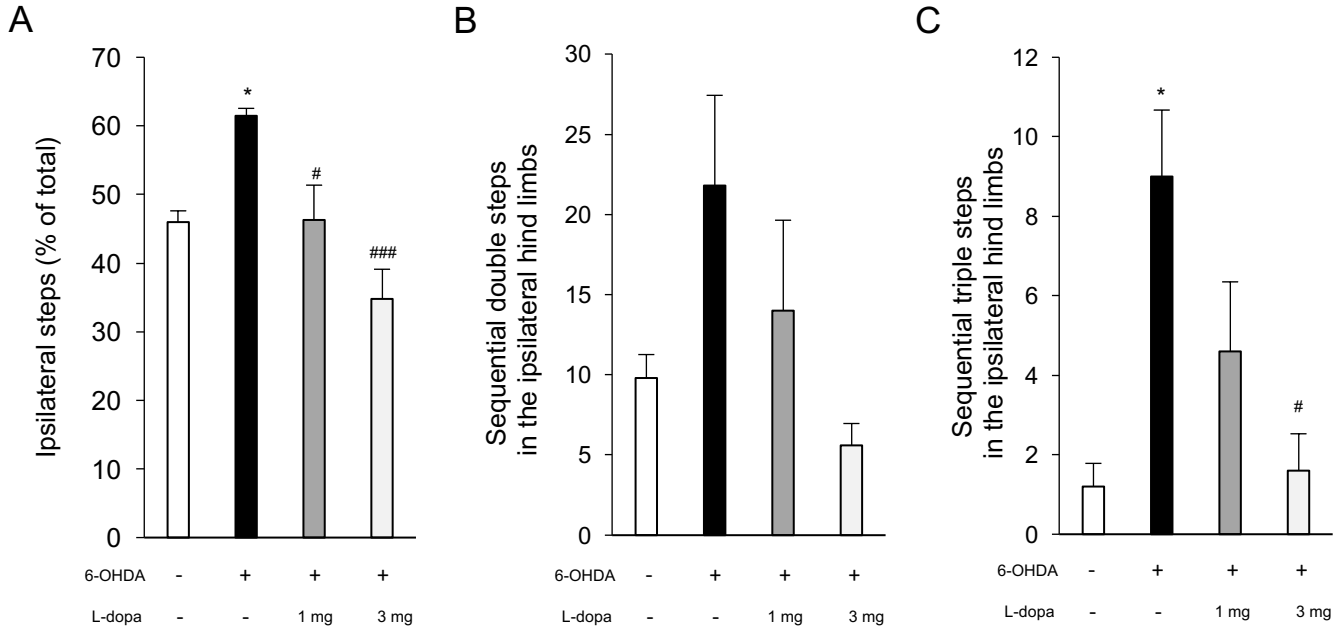
### Figure 3

Evaluation of hind limb steps.

**(A)** Topological configuration of the analyzed hind limb.

**(B)** Total count of spontaneous hind limb steps in a 5-min test. Values are expressed as mean  $\pm$  SEM ( $n = 5$ ,  $F_{3,16} = 6.24$ ,  $*P < 0.05$  vs. control,  $\#P < 0.05$  vs. 6-OHDA).

**(C)** Steps of the contralateral hind limb, indicated as % of total counts. Values are expressed as mean  $\pm$  SEM ( $n = 5$ ,  $F_{3,16} = 10.2$ ,  $*P < 0.05$  vs. control,  $\#P < 0.05$ ,  $###P < 0.005$  vs. 6-OHDA). One-way ANOVA followed by Scheffe's *post hoc* test.



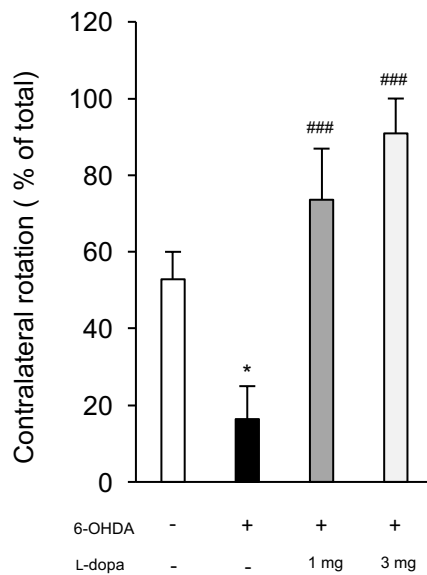
#### Figure 4

Evaluation of sequential ipsilateral hind limb steps in a 5-min test.

**(A)** Steps of the ipsilateral hind limb, indicated as % of total counts.

**(B)** Counts of sequential double steps in the ipsilateral hind limb. Values are expressed as mean  $\pm$  SEM ( $n = 5$ ,  $F_{3,16} = 2.83$ ).

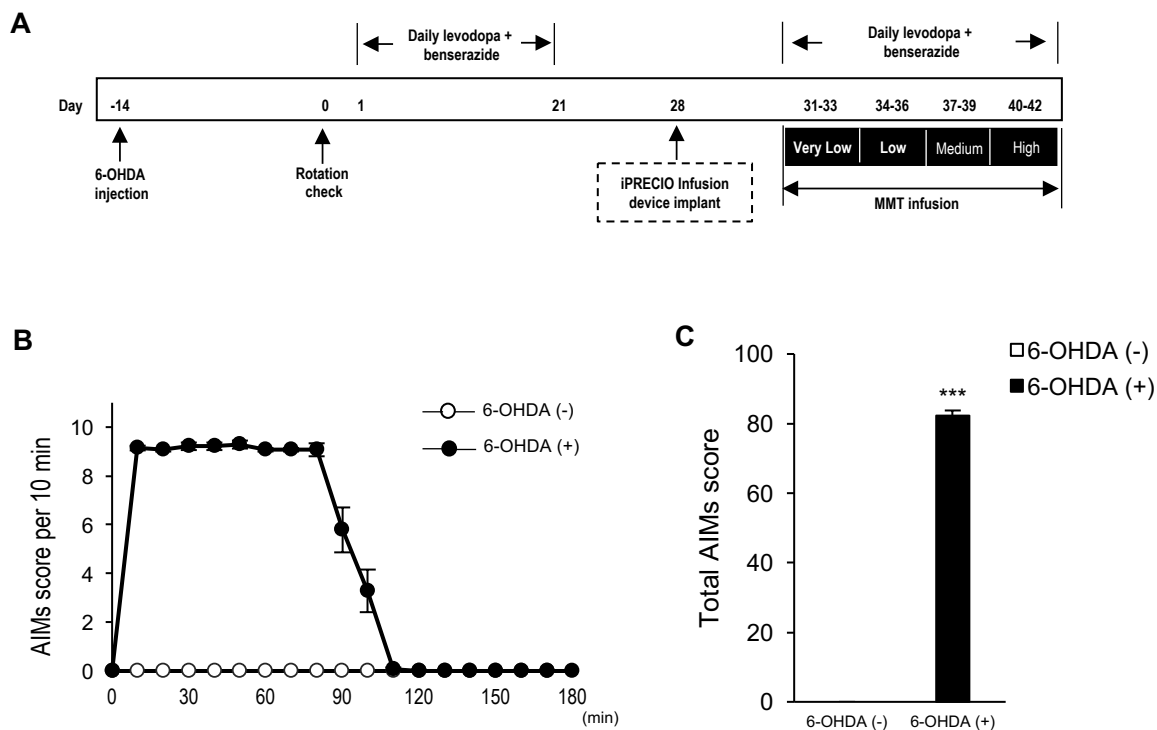
**(C)** Counts of sequential triple steps in the ipsilateral hind limb. Values are expressed as mean  $\pm$  SEM ( $n = 5$ ,  $F_{3,16} = 7.35$ ,  $*P < 0.05$  vs. control,  $#P < 0.05$  vs. 6-OHDA). One-way ANOVA followed by Scheffe's *post hoc* test. Values are expressed as mean  $\pm$  SEM ( $n = 5$ ,  $F_{3,16} = 10.2$ ,  $*P < 0.05$  vs. control,  $#P < 0.05$ ,  $###P < 0.005$  vs. 6-OHDA). One-way ANOVA followed by Scheffe's *post hoc* test.



**Figure 5**

Evaluation of levodopa-induced rotation.

Rotation to contralateral-to-lesion side indicated as % of total counts in a 5-min test. Values are expressed as mean  $\pm$  SEM ( $n = 5$ ,  $F_{3,16} = 10.67$ ,  $*P < 0.05$  vs. control,  $###P < 0.005$  vs. 6-OHDA). One-way ANOVA followed by Fisher's PLSD test.

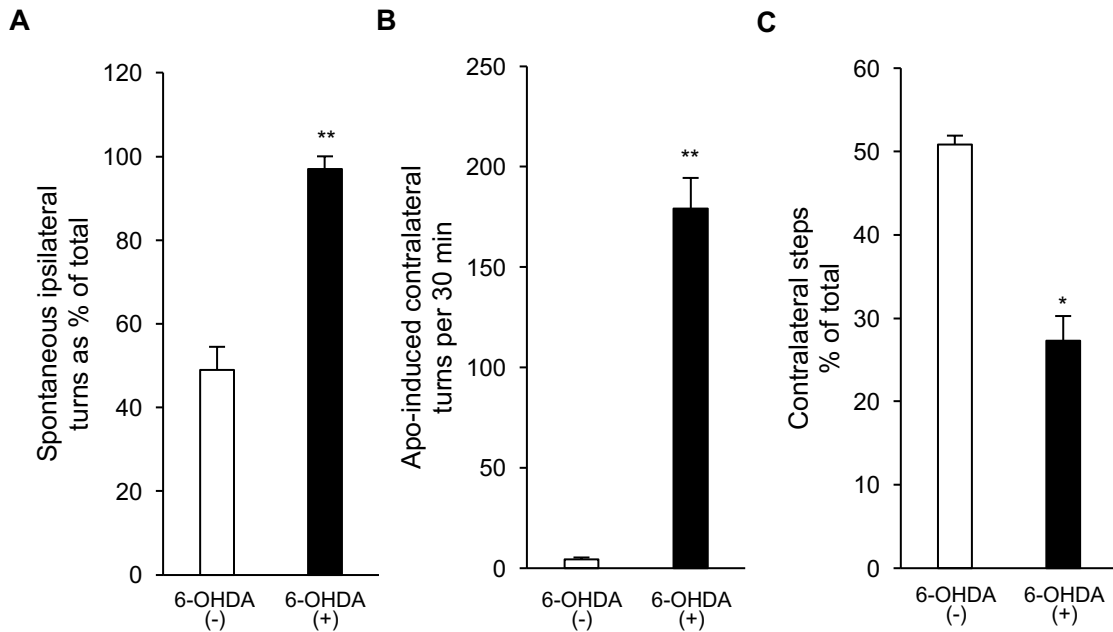


**Figure 6**

Generation of dyskinetic mice for the intracerebral brain infusion (iCBI) experiments. **(A)** Timeline of experimentations (see “Experimental Methods” section). Dyskinetic mice were implanted with programmable intracerebral brain infusion (iCBI) systems equipped with iPRECIO™ micro infusion pumps at day 28. After a recovery of 3 days, they restarted receiving daily levodopa/benserazide treatments for the next 12 days. Simultaneously, MMT-treated dyskinetic mice received continuous intrastriatal infusion of MMT 0.28 ng/μl at a flow rate of 1.0 μl/h for the first 3 days (days 31–33), MMT 1.12 ng/μl at a flow rate of 1.0 μl/h for the next 3 days (days 34–36), MMT 4.48 ng/μl at a flow rate of 1.0 μl/h for the next 3 days (days 37–39), and MMT 17.93 ng/μl at flow rate of 1.0 μl/h for the last 3 days (days 40–42). In parallel, PBS-treated dyskinetic mice received 0.01 M PBS infusion under the same protocol. AIMs tests for MMT- or PBS-treated mice were done at days 33, 36, 39, and 42.

**(B)** Time course of the abnormal involuntary movements (AIMs) scored every 10 min over a period of 180 min after the last levodopa administration in naïve mice and 6-hydroxydopamine (6-OHDA)-lesioned mice. Data are means ± SEM at each time point (naïve mice, n = 10; 6-OHDA-lesioned mice, n = 14).

**(C)** Total AIMs score in naïve mice and 6-OHDA-lesioned mice with levodopa administration at day 21. 6-OHDA (-) (n = 10); 6-OHDA (+) (n = 14). Data are means ± SEM. \*\*\**P* < 0.005 vs. naïve mice; Two-tailed *t*-test.



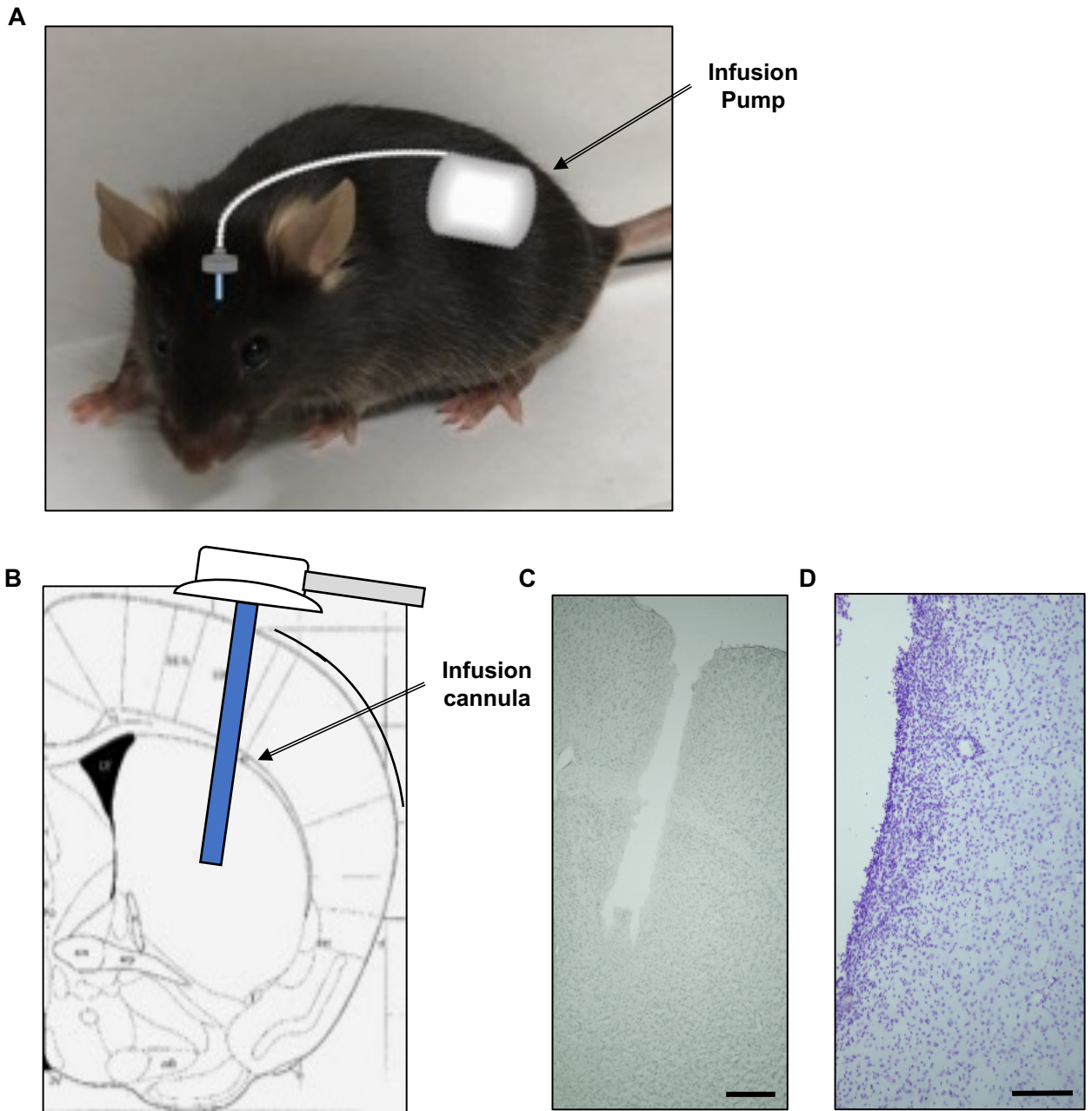
### Figure 7

PD symptoms analyzed in dyskinetic mice.

**(A)** Spontaneous rotations ipsilateral to 6-OHDA-lesioned side percent of total in mice with or without 6-OHDA lesions. 6-OHDA (-) (n = 6); 6-OHDA (+) (n = 6). Data are means  $\pm$  SEM. \*\* $P < 0.01$  vs. 6-OHDA (-); Mann-Whitney *U*-test.

**(B)** Counts of apomorphine-induced contralateral turns per 30 min in mice with or without 6-OHDA lesions. 6-OHDA (-) (n = 6); 6-OHDA (+) (n = 6). Data are means  $\pm$  SEM. \*\* $P < 0.01$  vs. naïve controls; Mann-Whitney *U*-test.

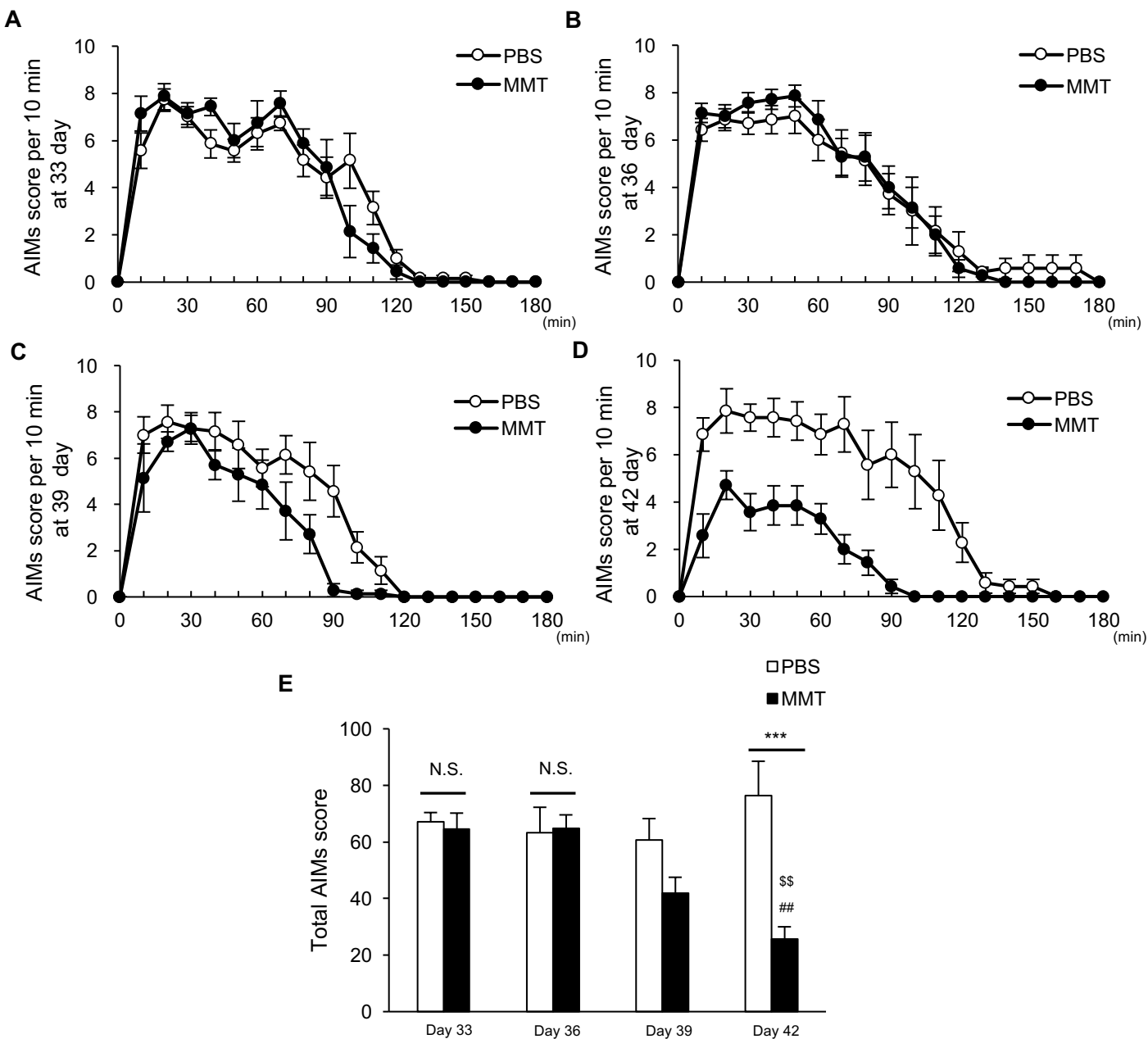
**(C)** Counts of hind limb steps. Steps of the contralateral hind limb as % of the total count in the naïve controls (n = 6) and Hemi-PD mice (n = 6). Data are means  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$  vs. naïve; Mann-Whitney *U*-test.



### Figure 8

Implant of iCBI device and tissue image in mice.

(A–D) Schematic representation of the iCBI system, in which the pump and tubing were implanted completely under the skin (A). The infusion cannula implanted into the dopamine-depleted striatum (B), together with the image of striatum after fixation and removal of the cannula (C), and with a Nissl-stained image (D). Scale bars show 0.5 mm in (C) and 100  $\mu$ m in (D).



**Figure 9**

Effects of intrastratial memantine (MMT) infusion on levodopa-induced abnormal involuntary movements (AIMs) in dyskinetic mice.

(A–D) Time-sequential changes in the AIM scores every 10 min over a period of 180 min after the last levodopa administration in mice with intrastratial infusion of PBS (n = 7) or MMT (n = 7) at day 33 (A), day 36 (B), day 39 (C), and day 42 (D).

(E) Total AIMs score in mice with intrastratial infusion of PBS or MMT at days 33, 36, 39, and 42. Data are means ± SEM. A significant effect of the MMT infusion treatment is found [two-way ANOVA:  $F_{(\text{group} \times \text{dose})3,48} = 5.856, P = 0.0017$ ].

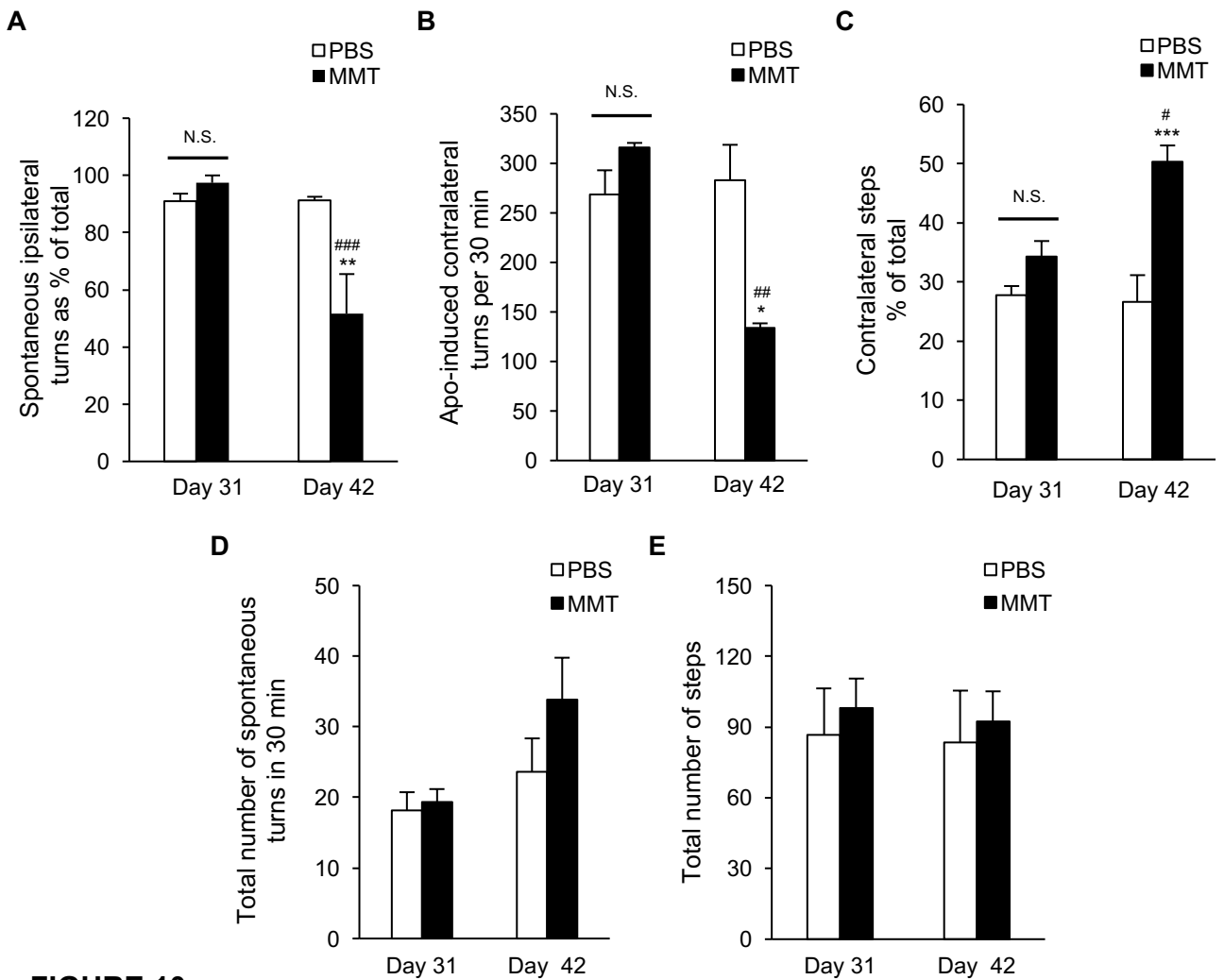
Bonferroni's *post-hoc* test: PBS day 33 vs. MMT day 33, not significant (N.S.);

PBS day 36 vs. MMT day 36, N.S.; and PBS day 42 vs. MMT day 42, \*\*\* $P < 0.001$ .

Significant differences in the severity of AIMs at days 33, 36, and 42 are found (Bonferroni's *post-hoc* test: MMT day 33 vs. MMT day 42, ## $P < 0.01$ ; MMT

day 36 vs. MMT day 42, \$\$ $P < 0.01$ ).





**FIGURE 10**

Effects of intrastratial memantine (MMT) infusion on parkinsonian signs in the dyskinetic mice.

**(A)** Spontaneous rotations ipsilateral to the 6-OHDA-lesioned side percent of the total in the groups of PBS infusion at day 31 (PBS day 31,  $n = 7$ ), MMT infusion at day 31 (MMT day 31,  $n = 7$ ), PBS infusion at day 42 (PBS day 42,  $n = 7$ ), and MMT infusion at day 42 (MMT day 42,  $n = 7$ ). Data are means  $\pm$  SEM. A significant effect of MMT infusion [two-way ANOVA:

$F_{(\text{group} \times \text{dose})1,24} = 10.25, P = 0.0038]$  is observed. Bonferroni's *post-hoc* test: not significant (N.S.); MMT day 31 vs. MMT day 42,  $**P < 0.01$ ; PBS day 42 vs. MMT day 42,  $###P < 0.001$ .

**(B)** Counts of apomorphine-induced contralateral turns per 30 min in the groups of PBS day 31 ( $n = 6$ ), MMT day 31 ( $n = 6$ ), PBS day 42 ( $n = 6$ ), and MMT day 42 ( $n = 6$ ). Data are means  $\pm$  SEM. A significant effect of MMT infusion [two-way ANOVA:  $F_{(\text{group} \times \text{dose})1,20} = 9.608, P = 0.0056]$  is found. Bonferroni's *post-hoc* test: not significant (N.S.); MMT day 31 vs. MMT day 42,  $*P < 0.05$ ; PBS day 42 vs. MMT day 42,  $###P < 0.001$ .

**(C)** Spontaneous contralateral hind limb steps as % of the total in PBS day 31 ( $n = 5$ ), MMT day 31 ( $n = 5$ ), PBS day 42 ( $n = 5$ ), and MMT day 42 ( $n = 5$ ). Data are means  $\pm$  SEM. A significant effect of MMT infusion [two-way ANOVA:  $F_{(\text{group} \times \text{dose})1,16} = 7.891, P = 0.0126]$  is found. Bonferroni's *post-hoc* test: not significant (N.S.); MMT day 31 vs. MMT day 42,  $***P < 0.001$ ; PBS day 42 vs. MMT day 42,  $\#P < 0.05$ .

**(D)** Total number of turns in spontaneous rotations summed with both ipsi- and contra-lateral directions. Data are means  $\pm$  SEM. No significance was observed [two-way ANOVA:

$F_{(\text{group} \times \text{dose})1,24} = 6.507, P = 0.0434]$ .

**(E)** Total number of steps summed with both ipsi- and contra-lateral hind limbs. Data are means  $\pm$  SEM. No significance was observed [two-way ANOVA:  $F_{(\text{group} \times \text{dose})1,16} = 0.3957, P = 0.5634]$ .