

ドパミン神経保護及び神経ネットワークの再構築

北村佳久

Dopaminergic Neuroprotection and Reconstruction of Neural Network Tiara

Yoshihisa KITAMURA

Department of Neurobiology, Kyoto Pharmaceutical University, 5 Nakauchi-cho, Misasagi, Yamashina-ku, Kyoto 607-8414, Japan

(Received May 11, 2010)

Parkinson's disease (PD) is an age-related neurodegenerative disorder in whose brain massive loss of dopaminergic neurons and formation of Lewy bodies occur in the substantia nigra (SN). L-Dihydroxyphenylamine (L-DOPA) substitution is still considered the gold standard of antiparkinsonian drug therapy. However, there has been little information available on neuroprotective and regenerative therapies. Recently, we have found that pramipexole and talipexole (D_2/D_3 -dopaminergic agonists) inhibit dopaminergic neurotoxin-induced production of reactive oxygen species and apoptotic cell death. In addition, treatment with these drugs induces enhancement of anti-apoptotic Bcl-2 expression and inhibition of α -synuclein aggregation. Interestingly, recent study suggests that pramipexole treatment delays the progression of early PD symptom. On the other hand, we investigated the transplantation strategy for PD by assessing whether double-transplants of mouse embryonic stem (ES) cell-derived neurons in the striatum (ST) and SN, or subthalamic nucleus (STN), induce functional recovery in rat hemi-parkinsonian model. The study indicates that both the involvement of ST as a place of transplantation and the number of ES cell-derived neurons are essential factors for efficacy on PD animal model. Interestingly, an invertebrate planarian can regenerate complete organs, including a well-organized central nervous system (brain), within about 7 days. The regeneration process of the planarian dopaminergic neural network (tiara) may be divided into five steps: 1) anterior blastema formation, 2) brain rudiment formation, 3) brain pattern formation, 4) the formation of dopaminergic tiara, and 5) functional recovery of dopaminergic motor regulation, with several kinds of genes and molecular cascades acting at each step.

Key words—dopaminergic neuron; neuroprotection; neural regeneration; neural network reconstruction; planarian brain; Parkinson's disease

1. はじめに

老年期に高頻度に発症する難治性進行性神経変性疾患の1つとしてパーキンソン病 (PD) がある。PD 脳において、黒質-線条体 (尾状核, 被殻) 系のドパミン神経の著しい脱落, さらに生き残っているドパミン神経細胞体内での変性 α -シヌクレインを主成分とした凝集体 (レビー小体) 形成が知られている。しかし, PD に対する治療薬はいまだに, 対症療法薬がほとんどである。現在, 日本は世界最高レベルの長寿国, さらに少子高齢化社会となりつつあり, 老年期に発症する PD の根本的治療を目指

した新規治療法の開発及び創薬は大変重要である。私は, ラット及びマウスを用いて非麦角系 D_2/D_3 受容体アゴニスト, 抗酸化分子及びケミカルシャペロンなどのドパミン神経保護メカニズムを解析, さらにマウス胚性幹細胞及び扁形動物プラナリアの全能性幹細胞を用いてドパミン神経ネットワークの再構築を目指した研究を展開している。本総説では, これまでに得られた私たちの研究成果を中心に, 脳ドパミン神経の保護及び再生について紹介する。

2. ドパミン神経細胞の保護

ヒトの運動の詳細な制御メカニズムはいまだに不明であるが, 3つの大きな調節系, つまり 1) 運動野から錐体交叉を経て脊髄側索を下降し, 前角細胞から筋へ至る錐体路 (筋を直接制御する系), 2) 大脳皮質から小脳を経由する経路 (運動を記憶して正確な動作を可能にする系), そして 3) 黒質ドパミ

京都薬科大学薬学部生命薬科学系病態生理学分野
(〒607-8414 京都市山科区御陵中内町5)

e-mail: yo-kita@mb.kyoto-phu.ac.jp

本総説は, 平成22年度日本薬学会学術振興賞受賞を記念して記述されたものである。

ン神経により調節を受ける経路, が想定されている。黒質ドパミン神経は線条体に投射しており, D_1 及び D_2/D_3 受容体を介して, 直接経路及び間接経路の線条体神経系を, それぞれ促進及び抑制的に調節している。この二重調節は, 同側性の筋の緊張を制御し, 滑らかな運動を可能としている。PDにおけるドパミン神経の著しい脱落は, 直接経路及び間接経路のいずれを経由しても, 結果として淡蒼球内節の神経活動を亢進させる方向に作用し, 最終的には視床及び運動野の活動を抑制することになる。¹⁾ このため, 無動・寡動及び筋固縮の症状が出てくる。ヒトの黒質緻密帯には, ドパミン神経が約45万個存在する。²⁾ 正常なヒトと比べ, 黒質ドパミン神経細胞数が約50%以下, 線条体のドパミン量が約20%以下になるとPDを発症すると考えられている。³⁾ 一方, 正常なマウス及びラットの黒質緻密帯には1.5-3万個存在しているが,⁴⁾ 黒質ドパミン神経細胞数が約10%以下, 線条体のドパミン量が約5%以下にならないと寡動を呈さない。^{5,6)} このため, ラットあるいはマウスにおいては, 負荷を与えない状態で運動機能障害(パーキンソン病様症状, パーキンソニズム)を引き起こすPD動物モデルを作製するのが困難である。現在, 家族性PDなどの研究からPD関連遺伝子が10数種類同定されているが, 典型的なパーキンソニズムを示す遺伝子欠損あるいは遺伝子導入マウスの作出には成功していない。このため, パーキンソニズムを示す動物モデルを作製する場合, ドパミン神経毒の6-hydroxydopamine (6-OHDA), 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) あるいはロテノン(農薬・魚毒)などが用いられている。⁷⁻¹⁰⁾

私たちは, 最初MPTP処置C57BL/6マウスの実験中に, 非麦角系 D_2/D_3 受容体アゴニスト(タリペキソール及びプラミペキソール)投与により, 線条体におけるドパミン神経終末の機能障害が抑制されることを見出した。¹¹⁾ つまり, これらの薬物がドパミン受容体アゴニスト作用¹²⁾のみならず, ドパミン神経保護作用を持つ可能性を示唆していた。プラミペキソール塩酸塩水和物(ピ・シフロール[®])は1997年に米国と欧州連合で承認・販売され日本では2003年12月に承認されている。一方, タリペキソール塩酸塩(ドミン[®])は1996年日本でのみ承認・販売されている。それまで, D_2 受容体アゴニ

ストはドパミン受容体刺激による行動障害の改善という対症療法的な機能回復作用しかないと考えられていたので, すぐにドパミン神経細胞モデルとして頻用されているヒトSH-SY5Y細胞におけるタリペキソール及びプラミペキソールの神経保護メカニズムについて解析した。その結果, これら非麦角系 D_2/D_3 受容体アゴニスト処置は, アポトーシス抑制因子のBcl-2タンパク質発現を増強することによりドパミン神経毒MPP⁺誘発アポトーシスの抑制作用¹³⁾及び神経発芽・伸展作用,¹⁴⁾カスパーゼ3及び9の抑制作用,¹⁵⁾活性酸素種(ROS)のスキャベンジ作用,^{4,13)}さらに α -シヌクレイン凝集抑制作用^{4,15)}を示すことを明らかとした(Fig. 1)。これらのことを総合すると非麦角系 D_2/D_3 受容体アゴニストはPDの発症及び症状の進行を遅らすことが期待できそうである。^{16,17)}事実, 欧米においてプラミペキソールの服用により, 初期のPD症状の進行が遅延されると報告され, 早期PD患者への投与の有効性が示された。^{18,19)}

また, これまでに私たちはドパミン神経保護作用を示す薬物として, 免疫抑制薬(タクロリムス),²⁰⁾プロテアソーム抑制薬(ラクタシスチン, MG-132),^{6,21)}ケミカルシャペロン(4-フェニル酪酸),²²⁾中枢性 α_7 -ニコチン受容体のアゴニスト(ニコチン)²³⁾及びアロステリック活性化リガンド(ガランタミン)²⁴⁾などを見出している。ガランタミンは欧米ではアルツハイマー型認知症の治療薬として使用されている。PD発症後, 認知症を併発する患者も多いため, ガランタミンなど中枢性ニコチン受容体刺激薬の今後にも期待したい。

3. 胚性幹細胞及びマイクログリアによるドパミン神経の保護及び再生

基本的には, 神経保護薬はPD発症及び発症後の進行を遅らせることは可能であるが, 根本的治療法ではない。PDの根本的治療法として最近, ヒト胚性幹(embryonic stem, ES)細胞²⁵⁾あるいは人工多



北村佳久

京都薬科大学病態生理学分野・准教授。
1983年広島大・医・総合薬を卒業。
1988年北海道大で薬学博士取得。1994年京都薬大・助教授。2007年より現職。この間, 富山薬大・和漢薬研, 基生研・形態形成, 北海道大・薬・薬効, フライブルク大・医・精神薬理に在籍。趣味は子どもと鴨川散策。

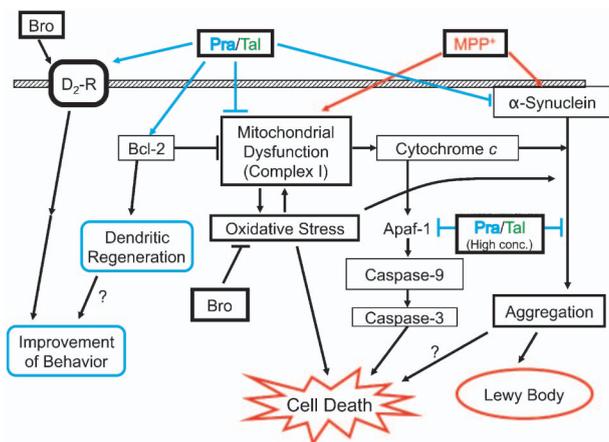


Fig. 1. Schematic Illustration of Possible Neuroprotective Mechanism of D₂/D₃-receptor Agonists

Bro, bromocriptine; Pra, pramipexole; Tal, talipexole; MPP⁺, 1-methyl-4-phenylpyridinium ion.

能性幹 (induced pluripotent stem, iPS) 細胞²⁶⁾を用いた再生医療が期待されている。また、中大脳動脈閉塞 (MCAO)-再灌流した脳梗塞モデルラットの黒質-線条体ドパミン神経では、逆行性に神経細胞死及び機能障害が引き起こされる。²⁷⁾そこで、私たちは井上教授 (京都大・再生医科学研) と共同研究を行い、マウス ES 細胞をニコチンアミドとラミニン処理により神経細胞に分化させた ES 由来神経 (ES-N) 細胞と未分化のマウス ES 細胞を、6-OH-DA 処置 PD ラット及び脳梗塞ラットの脳内に移植し、神経薬理的、行動薬理的に解析した。

PD ラットにおいて、6-OHDA 傷害側の線条体に 2-6 万個の ES-N 細胞を移植すると運動機能障害は移植後 2 週目以降改善し最終評価を行った 17 週目まで改善維持していたが、黒質あるいは視床下核への移植では運動機能は改善しなかった。^{28,29)}これは、成体の脳構造はできあがっており、移植されたドパミン神経が新たに線条体まで軸索を伸長できないためと考えられる。興味深いことに、同時に線条体と黒質 (あるいは視床下核) に ES-N を移植すると線条体だけに移植するよりも良好な運動機能の回復が認められた (Fig. 2)^{28,29)}が、生着した分化ドパミン神経細胞数は個体によって異なっていた。パーキンソニズムを引き起こす線条体ドパミン量の閾値には種差及び個体によってばらつきはあるが (約 5-20% 程度)、ドパミン神経機能が数%-10 数%でも回復して閾値を超えれば運動障害は劇的に改善すると考えられる (Fig. 3)。一方、未分化 ES 細胞

の PD ラットへの移植では運動機能障害は改善されず、一部には奇形腫 (テラトーマ) の形成が認められた。

これに対して脳梗塞ラットでは、ES-N 細胞ばかりでなく、ES 細胞の線条体移植によっても機能改善が認められた。³⁰⁾つまり、中大脳動脈閉塞-再灌流により逆行性に黒質のドパミン神経細胞死は約 25% 引き起こされ、機能障害 (TH 発現が減少・消失) も約 25% 引き起こされた。これが ES 細胞移植により 20%、ES-N 細胞移植により 25% 改善された。³⁰⁾これらのことから、ドパミン神経毒では引き起こされませんが、脳梗塞-再灌流により線条体の微小環境 (niche) が変化しサイトカインや神経栄養因子などが分泌され、線条体内で ES 細胞がドパミン神経に分化したり、傷害した黒質ドパミン神経が逆行性に機能回復したと推定される。さらに、新生仔ラット前脳から培養調製したマイクログリアを脳梗塞ラットの脳室内に移植すると傷害領域に浸潤し、神経細胞死及び運動機能障害が抑制された。^{31,32)}これは、外来性マイクログリアが脳梗塞領域に生着し、脳内微小環境の正常化及び神経栄養因子の産生を介して神経保護作用を発揮したと考えられる。興味深いことに、非常に数は少ないが、外来性マイクログリア由来細胞で神経細胞マーカー MAP2 を発現している細胞が認められた。³²⁾この結果は、*in vivo*においてもマイクログリアが脱分化し神経細胞に分化転換し得ることを示唆している。^{33,34)}一方、未分化の ES 細胞及び iPS 細胞には腫瘍化の危険性が知られているが、細胞株によりテラトーマ形成率が異なること、またマウス脳梗塞 (MCAO) の微小環境変化により、移植されたマウス iPS 細胞から神経細胞への分化は促進されるが、同時にテラトーマ形成率が著しく増加することも報告された。³⁵⁾このように細胞の株化・継代培養及び脳梗塞-再灌流においてどのような微小環境の変化が生じるのか今後の課題である。

私たちは田辺三菱製薬との共同研究において、ヒト未分化 ES 細胞と ES 細胞由来神経幹細胞の遺伝子発現様式をマイクロアレイにて分析した。そして、ヒト神経幹細胞に高発現する 9 個の膜タンパク質遺伝子のうち脳に特異的に発現する glycoprotein M6A (GPM6A) に着目し、マウス及びヒト ES 細胞から神経細胞への分化能について解析した。ES

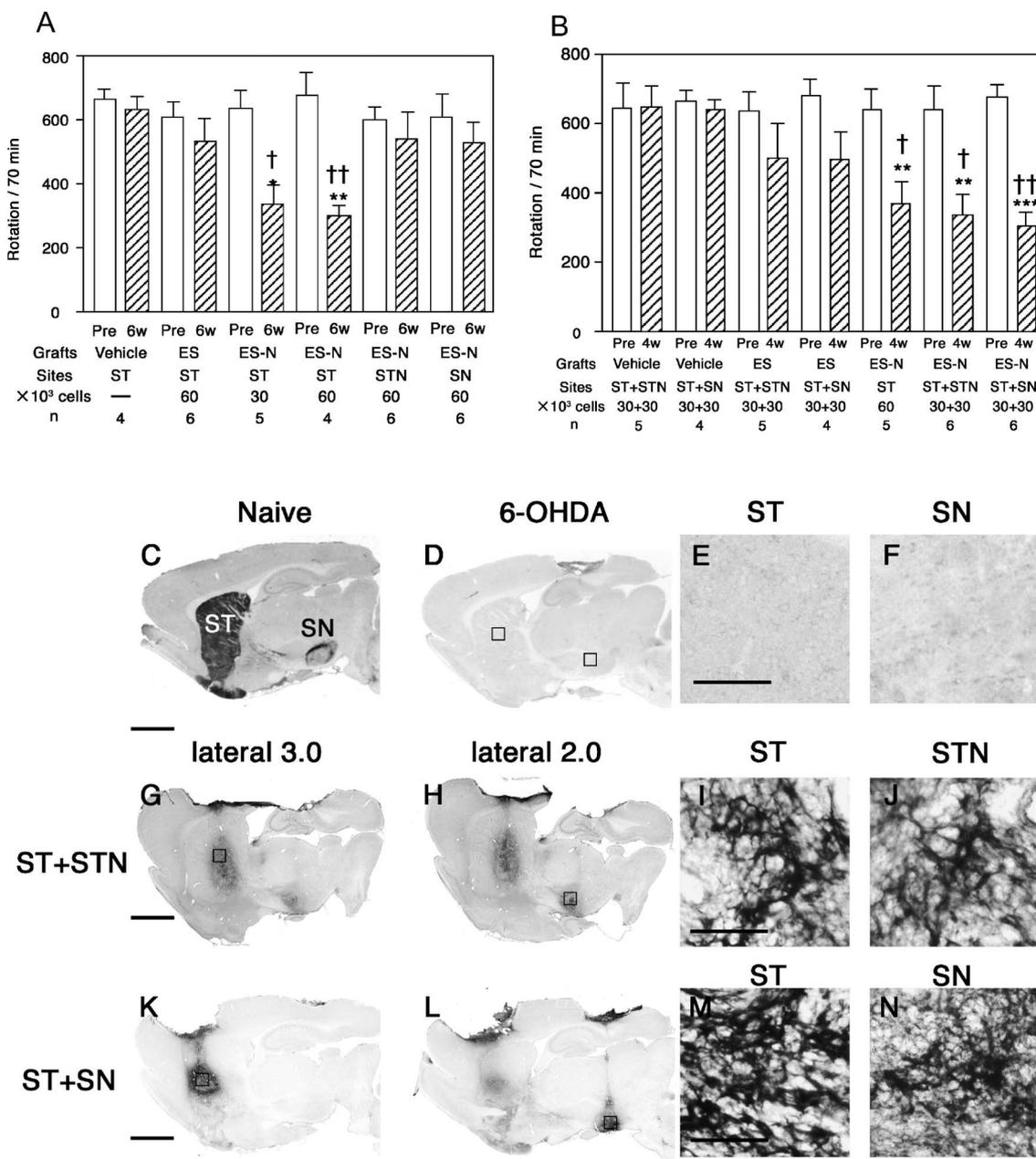


Fig. 2. Effects of Transplantation of ES Cell-derived Neurons in Hemiparkinsonian Rats

Methamphetamine-induced rotation in single- (A) or double- (B) transplanted hemiparkinsonian rats. Significances: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. vehicle graft. † $p < 0.05$, †† $p < 0.01$ vs. pre-transplantation. C-N; Representative sagittal sections of hemiparkinsonian rat brains with the double-transplants of ES cell-derived neurons (ES-N). Low magnification, bar represents 3 mm. High magnification of transplanted regions (boxes) in the striatum (ST), subthalamic nucleus (STN) and substantia nigra (SN). Bar represents 40 μ m.

細胞はヒトとマウスでかなり性質が異なることが知られているが、GPM6A の遺伝子導入により神経幹細胞、さらに神経細胞へと比較的高率に分化誘導すること、また神経細胞の移動も促進的に制御することが示唆された。^{36,37)} つまり、ES 細胞・iPS 細胞など多能性幹細胞から神経細胞への分化プロセスは、ヒト及びマウスで共通する部分が多いと推定される。今後、もっと分化効率がよく選択的にドパミン

神経に分化できる誘導方法の確立に期待したい。2010 年に入って間もなく、マウス皮膚細胞から iPS 細胞を介さずに、3 個の遺伝子導入 (*Ascl1*, *Brn2*, *Myt1l*) により直接、誘導型神経 (induced neuronal, iN) 細胞に分化させることが可能であると報告された。³⁸⁾ つまり、哺乳動物の最終分化した体細胞においても、ある種の条件下では明確な脱分化 (iPS 細胞化) を経ずに直接神経細胞に分化転換

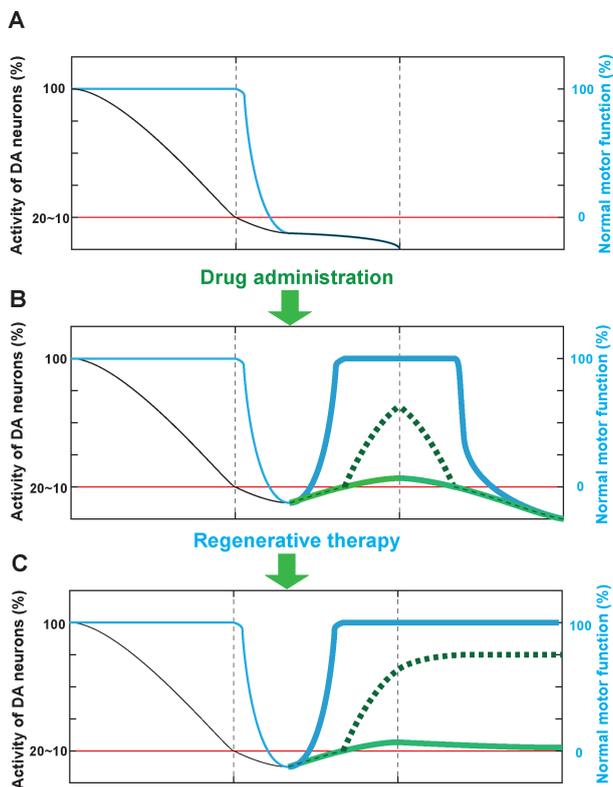


Fig. 3. Hypothetical Models and Therapeutic Approaches of Parkinson's Disease

A, Parkinsonian progression. B, Effect of drug administration. C, Possible effects of regenerative therapy. Red line: the threshold of dopaminergic activity in the striatum (about 10–20%). Green lines: slight recovery (a solid line) and marked recovery (a dotted line) of striatal dopaminergic activity. Blue line: motor function. When striatal dopaminergic activity gets over the threshold by either slight or marked recovery, motor function becomes normal-like behavior.

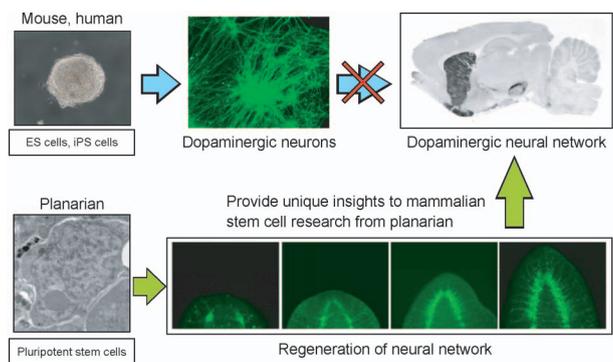


Fig. 4. Schematic Drawing of the Difference of Mammalian Stem Cells and Planarian Stem Cells

Although many researchers succeeded in establishing the methods for generation of dopaminergic neurons from ES cells or iPS cells, nobody succeeded in reconstructing the third-dimensional (3-D) dopaminergic neural networks from these cells. In contrast, planarians can regenerate 3-D neural networks from pluripotent stem cells. Therefore, there are possibilities that planarians provide unique insights to mammalian stem cell research.

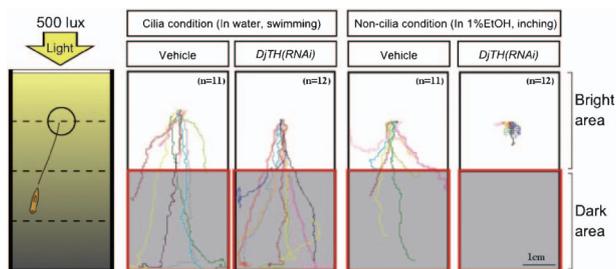


Fig. 5. Behavioral Analysis of *DjTH(RNAi)* Planarians

We have established the analytical method for motor function contributed by dopaminergic neurons. When planarians were treated with 1% ethanol solution, the epithelial cilia were removed from the body surface. At that time, planarians did not smoothly swim in water, and showed slowly inching behavior like inchworm. Although *DjTH(RNAi)* planarians could go away from light source by smoothly swimming into water, the inching behavioral activity of *DjTH(RNAi)* animals were significantly reduced in non-cilia condition (into 1% ethanol).

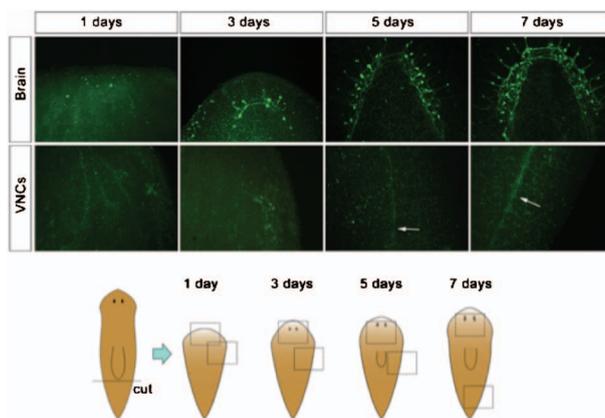


Fig. 6. Regeneration Process of Dopaminergic Tiara and Axon after Decapitation

On the first day after decapitation, either *DjTH*-immunopositive neurons and axonal projection were not detected in the future brain region and the tail region, respectively. On the third day, *DjTH*-immunopositive neurons began to be detected at future brain region. On the fifth day, the number of *DjTH*-immunopositive neurons was increased and formed complicated networks. Axonal projection from the head region began to be detected at the tail region. On the seventh day, *DjTH*-immunopositive dopaminergic tiara was completely reconstructed like a naive planarian. VNCs, ventral nerve cords.

できるようである。今後、その分化転換メカニズムの解明、さらには薬物処置により分化転換が制御できることが望まれる。

以上のことから、幹細胞を用いた細胞移植はPDの根本的治療法として期待できる。このドパミン神経細胞の保護及び再生のメカニズムとして次の4つが考えられる：1) 移植細胞から分泌される因子が宿主(ホスト)の神経細胞死を抑制する；2) 移植細胞から分泌される因子がホスト神経幹細胞からの神経新生を促進する；3) 移植細胞が脳内で新たな神経ネットワークを形成する；4) 脳傷害(変性)

部位の微小環境変化により移植細胞によるホスト神経保護及び神経新生を促進する。また、生着する移植細胞数が少なくても運動機能回復できるため、実際には細胞移植による治療効果はこれら4つの作用が組み合わさって発揮されると推定される。一方で、ES細胞・iPS細胞を用いた治療戦略の課題として、1) ES及びiPS細胞から目的とする神経細胞への分化誘導効率の向上及び安定性、2) 分化・未分化細胞の選別（未分化細胞の残存によるテラトーマ形成のリスク軽減）、3) 効果的な移植部位及び移植方法の確立、4) 移植細胞の生着率の向上、5) 再生医療における創薬開発、などが残されている。

神経疾患のうち、PDは細胞移植療法が最も多く行われている。ヒト中絶胎児脳の中脳腹側組織（黒質を含む領域）が主に用いられており、有効性を示すには4-8体分の胎児組織が必要とされている。^{2,39,40} このため、倫理面や免疫拒絶反応の点からいまだに一般的治療法として確立されてない。一方で、劇的な効果も認められ、移植後10年以上経っても移植細胞が生存し臨床効果も持続している症例もある。しかし、胎児移植細胞の生着率は数%-10%程度と低く、中でもドパミン神経細胞は生着し難いとされている。胎児神経細胞移植は現実的には非常に困難であるが、これまでに約400例の手術例が報告されている。これらの臨床例の結果を踏まえつつ、さらに骨髄（あるいは臍帯血）由来幹細胞、ES細胞、iPS細胞及びiN細胞の利点を生かしながら実用化に向けての基礎研究が加速することを願っている。

4. プラナリア脳のドパミン神経機能

プラナリアは、体長0.5-2cmの淡水棲の生物で、自然界では流れの穏やかな清流の石の下や葉っぱの裏などの暗所に隠れるように棲んでいる。分類学的には扁形動物門に属し、前後軸・左右軸・背腹軸を持つ原始的な左右相称動物である。プラナリアは、最初に『脳』を獲得した生物で、頭部に存在する脳と体幹部の腹側に存在する2本の腹側神経索からなる集中神経系を構築している。興味深いことに、哺乳動物の脳領域形成に関与するホメオボックス遺伝子である*Otx/otp* 相同遺伝子がプラナリア脳においても領域特異的に発現することが明らかにされている。⁴¹⁻⁴³ ES細胞、iPS細胞及びiN細胞では二次元的に神経細胞に分化転換できるが、神経ネ

ットワークの三次元構築化には成功していない（Fig. 4）。唯一、笹井教授（理研CDB）のグループによりヒトES細胞からヒト胎児大脳皮質とよく似た4層の組織構造の形成には成功しているが、成人の6層の大脳皮質構造には至っていない。⁴⁴ そこで、全身が再生可能なプラナリアに着目し、プラナリアを用いた新規PDモデルの作製と薬物作用を検討した。現在、薬学・医学領域における実験動物として哺乳動物であるラット・マウスが一般的である。しかし近年、動物愛護・生命倫理の観点から、哺乳動物など脊椎動物の生物医学実験には実験的苦痛を伴う実験などにおいて、実験動物の使用数を減らす努力が求められている。⁴⁵ そのため、発生生物学領域の遺伝子解析の結果から、無脊椎動物のショウジョウバエ（*Drosophila*）や線虫（*C. elegans*）などもモデル生物としての有用性が認識されつつある。しかし、ショウジョウバエや線虫は発育過程で幼虫から成虫に変態し、また薬物を一定用量処置することが困難である。一方、プラナリア（*Dugesia japonica*）は線虫よりも原始的な生物であるが、変態は行わず自切による個体増殖が可能であり、また淡水棲生物なので一定濃度の薬物処置が容易である。したがって、プラナリアはショウジョウバエや線虫よりも薬学・医学領域で今後の代替実験に有用、かつ適していると考えられる。⁴⁶ 実際、MPTPやロテノン処置によるプラナリアの個体死はD₂/D₃受容体アゴニスト（タリペキソール及びプラミベキソール）及びカスパーゼ阻害薬（z-VAD.fmk, z-DEVD.fmkなど）により抑制された。^{47,48}

私たちは、阿形教授（京都大・理・生物物理、理研CDB）との共同研究において哺乳動物の脳と同様に、プラナリア脳においてもドパミン、 γ -アミノ酪酸（GABA）、セロトニン（5-HT）及びアセチルコリン（ACh）の神経ネットワークが形成されていることを世界で最初に明らかとした。⁴⁹⁻⁵³ また、プラナリア脳のドパミン神経ネットワーク構造が女性の飾冠であるティアラに似ていることから、この神経ネットワークを『dopaminergic tiara（ドパミン神経ティアラ）』と名付けた。⁴⁹ この冠上部に約20個、冠基部に約40個のドパミン神経細胞が存在し、互いにネットワーク（ティアラ構造）を形成している。また、ドパミン神経細胞体は腹側神経の咽頭基部より頭部側に発現しているが、尾部側には発

現していない。しかし、ドパミン神経の軸索は尾部の先端まで伸長している。プラナリアの遊走・移動行動は、体表に生えた線毛と体内の筋肉を使った運動により制御されている。エタノール処理で線毛を除去すると、プラナリアは筋肉を使って尺取虫のような動きで移動する。この時、RNA 干渉法 (RNAi) によりドパミン合成の律速酵素であるチロシン水酸化酵素 (DjTH) の mRNA 発現をノックダウンさせドパミン量を減少させると、線毛による移動には全く影響を与えないが、筋肉を使った運動が著しく抑制された (Fig. 5)。私たちは、この症状をプラナリアのパーキンソニズムと考えている。⁴⁹⁾ 一方、哺乳動物のドパミン受容体アゴニストとして知られる SKF-38393, クインピロール, アポモルヒネ, プロモクリプチンあるいは過剰なドパミン放出を誘発するメタンフェタミン (日本薬学会初代会頭の長井長義先生が 1893 年にエフェドリンより合成・発明) を野生型プラナリアに投与すると、スクリュウ型及び C 型の異常運動 (ハイパーキネジア) をするようになり、アンタゴニストのスルピリドにより無動・寡動を呈する。一方、DjTH 遺伝子をノックダウンしたプラナリアでは、メタンフェタミンによる異常運動は著しく抑制されたが、プロモクリプチンによる異常行動は抑制されなかった。これは、DjTH ノックダウンプラナリアにはドパミン合成ができないため、メタンフェタミンによる内因性のドパミン放出はできないが、プロモクリプチンは内因性のドパミンに関係なくドパミン受容体を刺激したためハイパーキネジアが起きたと考えられる。⁴⁹⁾ このように、内因性のドパミン及び哺乳動物のドパミン受容体アゴニスト及びアンタゴニストによってもプラナリアの運動は影響を受ける。地球上に発生した生物の中で『脳』を最初に獲得したプラナリアにおいて、既にドパミン神経系による運動機能調節システムが確立されていたことは驚くべきことである。残念ながら、まだプラナリア (*Dugesia japonica*) のドパミン受容体遺伝子のクローニングには至っていないが、地中海産プラナリア (*Schmidtea mediterranea*) のゲノムが最近解読されており遺伝子レベルでの解析が飛躍的に進むと期待される。⁵⁴⁾

5. ドパミン神経ティアラの再構築

プラナリアの高い再生能力は、全身の細胞の 10-20% を占める全能性幹細胞 (ネオブラスト) による

もので、前後軸・左右軸・腹背軸の位置情報を認識し、さらに細胞移動・分化を制御することにより、脳を含むすべての組織を再生する。プラナリア脳の再生過程は 5 段階に分類することができる。⁴¹⁻⁴³⁾ まず第 1 段階 (再生芽形成期, 0-24 時間) では、切断面の閉口 (創傷治癒) に引き続き、再生芽 (白い構造物) が形成される。この段階では *noggin* 様遺伝子が重要で、また再生芽はこれ以降の再生過程における位置情報の再編成 (インターカレーション) を促す司令塔として機能する。第 2 段階 (脳原基形成期, 1-2 日) では、線維芽細胞増殖因子 (FGF) 受容体様遺伝子 (*nou-darake*) が発現した部分に脳原基が形成される。第 3 段階 (脳パターン形成期, 2-3 日) では、頭部に形成された脳原基は細胞増殖を繰り返しながら、前後軸・左右軸・腹背軸に沿った立体的パターン形成が行われる。この時期に発現する遺伝子が *wnt* ファミリー及び *Otx/otp* 関連遺伝子で、総合的な位置情報が決定される。第 4 段階 (神経回路網形成期, 3-5 日) では、複雑な神経ネットワークの再構築が始まる。つまり、ドパミン, GABA, 5-HT, ACh などの神経伝達物質の合成酵素が発現し始め、さらに *netrin* ファミリー分子やその受容体、免疫グロブリン様細胞接着分子 (Ig-CAM) ファミリーや、*robo*, *slit* など神経の軸索伸展や細胞接着に関与する遺伝子群も発現する。また、この時期に神経終末部でのエンドサイトーシスに関与する *clathrin* も発現してくる。第 5 段階 (機能回復期, 5-7 日) では、脳神経のシナプス機能増強因子 (*eye53*, *SNAP25*) が発現する。プラナリアは光に対して負の走行性を示すが、頭部切断 5 日以降に劇的に回復する。これらプラナリアの脳再生プロセスで働く遺伝子群は、脊椎動物の発生プロセスにおける脳形成で働く遺伝子群と類似している。

ドパミン神経ティアラの再構築を詳細に観察すると、頭部再生 3 日目 (第 4 段階) にドパミン神経細胞体が数個出現し、4-6 日の間では神経細胞体数の増加及び神経軸索を伸展し、さらに正確にネットワークを形成し、そして 7 日目には正常個体と同様のネットワークを再構築する (Fig. 6)。^{42,49)} ここで興味深いのは、頭部再生に伴って起こる腹側神経索に沿ったドパミン神経軸索の再生・伸長である。頭部を切断すると、残された尾部断片でのドパミン神経軸索は完全に消失する。その後、ドパミン神経細

胞体の出現に伴い、腹側神経索に沿って尾部へのドパミン神経軸索の伸長が観察される (Fig. 6)。一方、哺乳動物ではドパミン神経を黒質に移植しても、軸索は線条体へは伸長できない。このプロセスに関与する因子はいまだ明らかではないが、プラナリア再生脳に新たに形成されたドパミン神経から、既存の胴体の尾部先端まで左右一本ずつの軸索が再び伸長する現象は大変興味深い。

このようにプラナリアは全能性幹細胞を駆使して、7日間という短期間でほぼ完全にドパミン神経ティアラを再構築し、脳内の正しい位置に再配置するだけでなく、以前と全く同じ機能的な神経ネットワークを形成できる。この再生プロセスを「ドパミン神経細胞形成」、「神経ネットワーク再構築」、「神経機能の回復」のように段階的に解析することにより、ドパミン神経ティアラの再構築を司る分子メカニズムを解明することでヒト iPS 細胞などの多能性幹細胞を用いた神経再生、特にパーキンソン病の根治再生医療を目指して新たな視点からアプローチできると確信している。

謝辞 本研究の遂行にあたり、無理難題な共同研究をお願いしても快く引受けて頂きました先生方、ご懇篤なるご指導・ご支援さらに自由な研究環境を与えて頂きました京都薬科大学教授・谷口隆之先生を始め京都薬科大学の関係諸氏、休息は微々たるアルコールしかないにもかかわらず昼夜を問わず根気よくハードワークをこなしてくれた病態生理学分野の教室員・大学院生・学部学生諸君に深く感謝致します。また、ブレインサイエンスに魅せられて研究室の門をたたいて以来、終始ご指導・ご鞭撻を賜りました野村靖幸先生（北海道大学名誉教授）、江口吾朗先生（基礎生物学研究所名誉教授）並びに故・瀬川富郎先生（広島大学名誉教授）に厚く御礼申し上げます。

REFERENCES

- 1) Lang A. E., Lozano A. M., *N. Engl. J. Med.*, **339**, 1130–1143 (1998).
- 2) Lang A. E., Lozano A. M., *N. Engl. J. Med.*, **339**, 1044–1053 (1998).
- 3) Riederer P., Wuketich S., *J. Neural Transm.*, **38**, 277–301 (1976).
- 4) Inden M., Kitamura Y., Tamaki A., Yanagida T., Shibaike T., Yamamoto A., Takata K., Yasui H., Taira T., Ariga H., Taniguchi T., *Neurochem. Int.*, **55**, 760–767 (2009).
- 5) Hefti F., Melamed E., Sahakian B. J., Wurtman R. J., *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **12**, 185–188 (1980).
- 6) Inden M., Kondo J., Kitamura Y., Takata K., Nishimura K., Taniguchi T., Sawada H., Shimohama S., *J. Pharmacol. Sci.*, **97**, 203–211 (2005).
- 7) Itano Y., Kitamura Y., Nomura Y., *Neurochem. Int.*, **25**, 419–424 (1994).
- 8) Kitamura Y., Inden M., Miyamura A., Kakimura J., Taniguchi T., Shimohama S., *Neurosci. Lett.*, **333**, 25–28 (2002).
- 9) Inden M., Kondo J., Kitamura Y., Takata K., Tsuchiya D., Nishimura K., Taniguchi T., Sawada H., Shimohama S., *Biog. Amines*, **17**, 281–291 (2003).
- 10) Shimohama S., Sawada H., Kitamura Y., Taniguchi T., *Trends Mol. Med.*, **9**, 360–365 (2003).
- 11) Kitamura Y., Kohno Y., Nakazawa M., Nomura Y., *Jpn. J. Pharmacol.*, **74**, 51–57 (1997).
- 12) Kohno Y., Kitamura Y., Nakazawa M., Nomura Y., *Pharmacometrics*, **52**, 233–241 (1996).
- 13) Kitamura Y., Kosaka T., Kakimura J., Matsuoka Y., Kohno Y., Nomura Y., Taniguchi T., *Mol. Pharmacol.*, **54**, 1046–1054 (1998).
- 14) Takata K., Kitamura Y., Kakimura J., Kohno Y., Taniguchi T., *Brain Res.*, **872**, 236–241 (2000).
- 15) Kakimura J., Kitamura Y., Takata K., Kohno Y., Nomura Y., Taniguchi T., *Eur. J. Pharmacol.*, **417**, 59–67 (2001).
- 16) Kitamura Y., Kakimura J., Taniguchi T., *Biol. Pharm. Bull.*, **25**, 284–290 (2002).
- 17) Kitamura Y., Taniguchi T., Shimohama S., Akaike A., Nomura Y., *Neurochem. Res.*, **28**, 1035–1045 (2003).
- 18) Parkinson study group, *JAMA*, **284**, 1931–1938 (2000).
- 19) Parkinson study group, *JAMA*, **287**, 1653–1661 (2002).
- 20) Kitamura Y., Itano Y., Kubo T., Nomura Y., *J. Neuroimmunol.*, **50**, 221–224 (1994).

- 21) Sawada H., Kohno R., Kihara T., Izumi Y., Sakka N., Ibi M., Nakanishi M., Nakamizo T., Yamakawa K., Shibasaki H., Yamamoto N., Akaike A., Inden M., Kitamura Y., Taniguchi T., Shimohama S., *J. Biol. Chem.*, **279**, 10710–10719 (2004).
- 22) Inden M., Kitamura Y., Takeuchi H., Yanagida T., Takata K., Kobayashi Y., Taniguchi T., Yoshimoto K., Kaneko M., Okuma Y., Taira T., Ariga H., Shimohama S., *J. Neurochem.*, **101**, 1491–1504 (2007).
- 23) Takeuchi H., Yanagida T., Inden M., Takata K., Kitamura Y., Yamakawa K., Sawada H., Izumi Y., Yamamoto N., Kihara T., Uemura K., Inoue H., Taniguchi T., Akaike A., Takahashi R., Shimohama S., *J. Neurosci. Res.*, **87**, 576–585 (2009).
- 24) Yanagida T., Takeuchi H., Kitamura Y., Takata K., Minamino H., Shibaie T., Tsushima J., Kishimoto K., Yasui H., Taniguchi T., Shimohama S., *Neurosci. Res.*, **62**, 254–261 (2008).
- 25) Thomson J. A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S. S., Waknitz M. A., Swiergiel J. J., Marshall V. S., Jones J. M., *Science*, **282**, 1145–1147 (1998).
- 26) Takahashi K., Tanabe K., Ohnuki M., Narita M., Ichisaka T., Tomoda K., Yamanaka S., *Cell*, **131**, 861–872 (2007).
- 27) Yanagisawa D., Kitamura Y., Inden M., Takata K., Taniguchi T., Morikawa S., Morita M., Inubushi T., Tooyama I., Taira T., Iguchi-Ariga S. M. M., Akaike A., Ariga H., *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **28**, 563–578 (2008).
- 28) Inden M., Kim D., Gu Y., Kitamura Y., Kondo J., Tsuchiya D., Taniguchi T., Shimohama S., Akaike A., Sumi S., Inoue K., *J. Pharmacol. Sci.*, **96**, 53–64 (2004).
- 29) Inden M., Kim D., Qi M., Kitamura Y., Yanagisawa D., Nishimura K., Tsuchiya D., Takata K., Hayashi K., Taniguchi T., Yoshimoto K., Shimohama S., Sumi S., Inoue K., *Neurosci. Lett.*, **387**, 151–156 (2005).
- 30) Yanagisawa D., Qi M., Kim D., Kitamura Y., Inden M., Tsuchiya D., Takata K., Taniguchi T., Yoshimoto K., Shimohama S., Akaike A., Sumi S., Inoue K., *Neurosci. Lett.*, **407**, 74–79 (2006).
- 31) Kitamura Y., Takata K., Inden M., Tsuchiya D., Yanagisawa D., Nakata J., Taniguchi T., *J. Pharmacol. Sci.*, **94**, 203–206 (2004).
- 32) Kitamura Y., Yanagisawa D., Inden M., Takata K., Tsuchiya D., Kawasaki T., Taniguchi T., Shimohama S., *J. Pharmacol. Sci.*, **97**, 289–293 (2005).
- 33) Yokoyama A., Yang L., Itoh S., Mori K., Tanaka J., *Glia*, **45**, 96–104 (2004).
- 34) Kitamura Y., Yanagisawa D., Takata K., Taniguchi T., *Curr. Anaesth. Crit. Care*, **20**, 142–147 (2009).
- 35) Kawai H., Yamashita T., Ohta Y., Deguchi K., Nagotani S., Zhang X., Ikeda Y., Matsura T., Abe K., *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **30**, 1487–1493 (2010).
- 36) Michibata H., Okuno T., Konishi N., Wakimoto K., Kyono K., Aoki K., Kondo Y., Takata K., Kitamura Y., Taniguchi T., *Stem Cells Dev.*, **17**, 641–651 (2008).
- 37) Michibata H., Okuno T., Konishi N., Kyono K., Wakimoto K., Aoki K., Kondo Y., Takata K., Kitamura Y., Taniguchi T., *Stem Cells Dev.*, **18**, 629–639 (2009).
- 38) Vierbuchen T., Ostermeier A., Pang Z. P., Kokubo Y., Südhof T. C., Wernig M., *Nature*, **463**, 1035–1041 (2010).
- 39) Freed C. R., Greene P. E., Breeze R. E., Tsai W. Y., DuMouchel W., Kao R., Dillon S., Winfield H., Culver S., Trojanowski J. Q., Eidelberg D., Fahs S., *N. Engl. J. Med.*, **344**, 710–719 (2001).
- 40) Olanow C. W., Goetz C. G., Kordower J. H., Stoessl A. J., Sossi V., Brin M. F., Shannon K. M., Nauert G. M., Perl D. P., Godbold J., Freeman T. B., *Ann. Neurol.*, **54**, 403–414 (2003).
- 41) Agata K., *Scholarpedia*, **3**, 5558 (2008).
- 42) Nishimura K., Kitamura Y., Agata K., *Brain & Nerve*, **60**, 307–317 (2008).
- 43) Nishimura K., Yamamoto H., Kitamura Y., Agata K., “Brain and Neural Networks, Planaria: A Model for Drug Action and Abuse,” eds. by Raffa R. B., Rawls S. M., Landes Bioscience, Austin, 2008, pp. 4–12.
- 44) Eiraku M., Watanabe K., Matsuo M., Kawada M., Yonemura S., Matsumura M., Wataya T., Nishiyama A., Muguruma K., Sasai Y., *Cell Stem Cell*, **3**, 519–532 (2008).

- 45) Ohno Y., *Yakugaku Zasshi*, **128**, 735–740 (2008).
- 46) Kitamura Y., Shimohama S., Akaike A., Taniguchi T., *Jpn. J. Pharmacol.*, **84**, 237–243 (2000).
- 47) Kitamura Y., Kakimura J., Taniguchi T., *Jpn. J. Pharmacol.*, **78**, 23–29 (1998).
- 48) Kitamura Y., Inden M., Sanada H., Takata K., Taniguchi T., Shimohama S., Orii H., Mochii M., Agata K., Watanabe K., *J. Pharmacol. Sci.*, **92**, 137–142 (2003).
- 49) Nishimura K., Kitamura Y., Inoue T., Umesono Y., Sano S., Yoshimoto K., Inden M., Takata K., Taniguchi T., Shimohama S., Agata K., *Develop. Neurobiol.*, **67**, 1059–1078 (2007).
- 50) Nishimura K., Kitamura Y., Inoue T., Umesono Y., Yoshimoto K., Takeuchi K., Taniguchi T., Agata K., *Neurosci. Res.*, **59**, 101–106 (2007).
- 51) Nishimura K., Kitamura Y., Umesono Y., Takeuchi K., Taniguchi T., Agata K., *Neuroscience*, **153**, 1103–1114 (2008).
- 52) Nishimura K., Kitamura Y., Inoue T., Umesono Y., Yoshimoto K., Taniguchi T., Agata K., *Neurochem. Int.*, **53**, 184–192 (2008).
- 53) Nishimura K., Kitamura Y., Taniguchi T., Agata K., *Neuroscience*, **168**, 18–30 (2010).
- 54) Robb S. M., Ross E., Sanchez Alvarado A., *Nucleic Acids Res.*, **36**, D599–D606 (2008).