

(第 12 号様式)

学 位 論 文 の 要 約 (研 究 成 果 の ま と め)

氏 名 城賀本 敏宏

学位論文名 リスターフーディッドラットは注意欠陥多動性障害の新たな動物モデルである

学位論文の要約

【緒言】注意欠陥・多動性障害(ADHD)は、多動性、衝動性、不注意が主な 3 症状であり、世界中の子供に影響する一般的な神経発達障害であり、成人期以降も ADHD の症状がしばしば持続する。ADHD の薬理的介入には、現在、精神刺激薬と非精神刺激薬がある。メチルフェニデート(MP)は精神刺激薬であり、アトモキセチン(ATX)とグアンファシン(GAF)は一般的に非精神刺激薬である。この 3 つの薬は、ADHD の行動学的な症状を改善させるが、副作用があり、重度な ADHD 症例にはしばしば効果がみられない。より安全で効果的な治療を行うためには、ADHD の根底にある分子細胞メカニズムを明らかにする必要がある。ADHD の病因や病態生理を明らかにするためには、ヒトの ADHD 症例でみられる、特徴的な ADHD の行動と遺伝学的な異常を有する適切なモデル動物が用いられるべきである。さらに、理想的な ADHD モデルは、知的障害(ID)と学習障害、自閉スペクトラム症(ASD)のような他の神経発達障害と区別されるべきである。ADHD モデル動物としてこれまでに多くの近郊系ラットや遺伝子改変マウスが用いられているが、中でもドーパミントランスporter欠損(DAT-KO)マウスや自然発症高血圧ラット(SHR)が、一般的に ADHD モデル動物として利用されてきた。しかし、DAT-KO マウスは、多動性と衝動性は有しているが、学習記憶能力が障害されている。SHR は、高血圧を伴う他、運動量が少なく落ち着いているという根本的な問題があった。今回、聴原性てんかんモデルとして用いられている外交系ラット Lister hooded rat (LHR)が、新たな ADHD モデルとなりうることを明らかにした。

【材料と方法】全ての実験は、愛媛大学動物実験委員会により承認されており、愛媛大学動物実験規則に従って行われた。Wistar 及び SHR、LHR が、12 時間の明暗周期で、1 ケージに 4 匹ずつ飼育した。食餌制限実験中を除き、餌と水を自由に摂取させた。

行動実験：オープンフィールド(OF)、高架式十字路(EPM)、明暗箱(L/D)、落下テスト、モリス水迷路テスト(MWM)を用いて、連日この順番で 1 日 1 テストを行い、3 系統のラットの行動に関して評価した。LHR と Wistar ラットに関しては、さらに八方向放射状迷路(RM)、社会性テストを行った。全ての行動実験は、19-22 時の暗期に行い、ビデオトラッキングシ

システムを用いてビデオ記録を行った。

食餌制限：食餌制限の行動への影響を評価するため、8週齢の Wistar ラットを、衝動性の評価試験である 5-CSRTT のプロトコルに従い、5日間、食餌制限をしない群の体重の 85% まで食餌制限を行った。食餌制限を行った Wistar ラット、食餌制限のない Wistar ラット、LHR で、7日間連続して OF 試験を行った。Wistar ラットには落下テストも行った。

薬理的介入：ATX、GAF、MP を生食に溶解し、それぞれ 0.5ml 皮下注射した。ATX は 0.1-0.5mg/kg、GAF は 0.1-0.9mg/kg を、それぞれ行動実験の 2 時間前に投与し、MP は 1 または 5mg/kg を行動実験の 0.5 時間前に投与した。

免疫蛍光組織化学：ラットを PBS で 2 分間還流した後、4%パラホルムアルデヒドで 10 分間灌流した。前頭前野から 10 μ m の厚さの凍結切片を作成した。切片を c-Fos、MeuN、チロシンヒドロキシラーゼ(TH)の抗体を用いて染色した。

イムノブロッティング：ラットの前頭前野を電気泳動し、ニトロセルロースに転写し、 β -アクチン、シナプシン I、タウ、TH 及び c-Fos 抗体でイムノブロッティングを行った。

前頭前野のモノアミン量：行動実験を行った 3 系統のラットから、厚さ 2mm の右の前頭前野を摘出し、ノルアドレナリン(NA)、ドーパミン(DA)、及びセロトニン(5-HT)量を、HPLC を用いて測定した。

qPCR：行動実験を行ったラットの前頭前野を摘出し、total RNA を調整、次いで cDNA を作成した。各遺伝子のプライマーを作成して qPCR を行った。

【結果】OF、EPM、L/D、及び落下テストでは、ADHD の特徴である多動性、不注意及び衝動性行動を LHR が最も示した。八方向放射状迷路、社会性テスト、及びモリス水迷路テストでは、LHR が自閉症及び知的障害に特徴的な行動を示さなかった。ADHD に一般的に使用される非精神刺激性治療である ATX と GAF が、LHR の ADHD 様行動を改善した。内側前頭皮質における c-Fos、シナプシン I 及びタウタンパク質の発現レベルは、Wistar ラットと比較して LHR で増加していた。LHR は、モノアミン含有量に違いはなかったが、ADHD に関連する様々な遺伝子(*Cdh13*, *Drd5*, *Foxp2*, *Maoa*, *Sema6d*, *Slc9a9*, 及び *St3gal3*)の LHR の前頭前野での mRNA 発現レベルと TH 蛋白発現レベルは、Wistar ラットや SHR と比較して低かった。

【考察】複数の行動実験から、ADHD モデル動物として一般的に用いられている SHR は、衝動性と不注意性はみられたものの、多動ではなかった。LHR は、SHR よりもヒト ADHD 症例に関連する重要な遺伝子発現の変化を示した。ニューロンの活性化の増加は、LHR の内側前頭皮質で観察された。

【結論】これらの結果より、ADHD の病態生理を研究し、ADHD に対する新たな薬理的介入方法の開発のためには、LHR が SHR よりもより適切な ADHD モデル動物であると考えられる。

この動物実験は、愛媛大学医学部の動物実験の倫理委員会によって承認されている。なお、この学位論文の内容は、以下の原著論文に既に公表済である。

主論文：Jogamoto T, Utsunomiya R, et al.: Lister hooded rats as a novel animal model of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Neurochemistry International* 141, 2020 DOI : org/10.1016/j.neuint.2020.104857