

(第3号様式)

学位論文要旨

氏名 城賀本 敏宏

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

学位論文要旨

【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ポーター欠損(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。

氏名 城賀本 敏宏

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のプロトコールに従い、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又は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。

キーワード (3~5)	リスターフーディッドラット(LHR) 注意欠陥多動性障害(ADHD) c-Fos 前頭前野 モノアミン
-------------	---