

学位論文審査結果の要旨

氏名	城賀本 敏宏
審査委員	主査 上野 修一 副査 大八木 保政 副査 松元 隆 副査 鍋加 浩明 副査 重川 誠二

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

審査結果の要旨

【緒言】注意欠陥・多動性障害(Attention-deficit hyperactivity disorder, ADHD)は、小児期にみられる神経発達障害で、多動性・衝動性・不注意が主症状であり、成人期以降もしばしば病態が持続する。ADHDの分子細胞メカニズムはまだ不明であり、病因や病態生理の解明には、適切なモデル動物を用いた解析が望まれる。これまでADHDモデル動物として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、ADHDモデル動物として利用されてきたが、DAT-KOマウスは、多動性と衝動性を示すが、ADHDではみられない学習記憶能力が障害されている点、SHRは高血圧を伴い多動性が少ない点など問題がある。今回、聴原性てんかんモデルのLister hooded rat (LHR)が、新たなADHDモデルとなると考え検討した。

【材料と方法】Wistar系ラット(WTR)及びSHR、LHRを用いた。12時間明暗周期で飼育し、食餌制限実験中を除き餌と水は自由に摂取させた。

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、モリス水迷路(MWM)試験を用い、行動評価した。WTRとLHRは、さらに八方向放射状迷路(RM)、社会性試験を行った。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記録した。

食餌制限：8週齢 WTR は衝動性評価試験 Five-choice serial-reaction time task (5-CSRTT) のプロトコールに従い、食餌制限をしない群の 85%まで体重を落とすよう食餌制限を行った。食餌制限を行った WTR、行わない WTR、LHR を用い、7日間連続し OF 試験を行った。WTR には落下テストも行った。

薬理的介入：ADHD の治療薬メチルフェニデート (MP)、アトモキセチン (ATX) 0.1-0.5mg/kg、グアンファシン (GAF) 0.1-0.9mg/kg を行動実験の 2 時間前に投与した。刺激薬である 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：各動物は屠殺後、PBS で 2 分間還流し、4%パラホルムアルデヒドで灌流固定した。前頭前野から 10 μ m 厚の凍結切片を作成し、c-Fos、MeuN、チロシンヒドロキシラーゼ (TH) 抗体を用い染色した。

ウエスタンブロット：ラット前頭前野を電気泳動後 β -アクチンを標準として、シナプシン I、タウ、TH 及び c-Fos 抗体で行った。

前頭前野のモノアミン量：厚さ 2mm の右前頭前野を摘出し、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 にて測定した。

qPCR：左前頭前野を摘出後、逆転写し、サイバーグリーン法にて定量した。

なお、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った。

【結果】 WTR をコントロールとして、SHR および 5-CSRTT プロトコール後の WTR を ADHD のモデルとして、LHR と比較した。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。RM、社会性及び MWM 試験では、LHR は自閉症及び知的障害に特徴的な行動を示さなかった。LHR に ATX と GAF を投与すると ADHD 様行動が改善された。LHR 内側前頭皮質での c-Fos、シナプシン I 及びタウタンパク質発現量は、WTR と比較し増加していた。LHR の前頭前野のモノアミン含有量は WTR と差はなかったものの、ADHD 関連遺伝子 (*Cdh13*, *Drd5*, *Foxp2*, *Maoa*, *Sema6d*, *Slc9a9*, 及び *St3gal3*) の mRNA 発現量と TH タンパク質量は、WTR や SHR と比較し低かった。

【考察・結論】 複数の行動実験から LHR は ADHD のモデルであることを示した。また、LHR を用いて ADHD に関連する可能性のある遺伝子発現変化を確認した。今回の研究から、LHR は ADHD の病態生理を研究し新たな創薬につながる適切な ADHD モデル動物であると考えられた。

令和 3 年 1 月 25 日に開催された公開審査会では、申請者は英語で提出論文や関連領域について発表した。その後、審査委員より、研究を始めた経緯、他の疾患モデルを含め LHR の特徴、薬物効果の差異、免疫系を介した発症メカニズムの仮説など多くの質問が行われたが、申請者は適切に応答した。本論文はすでに国際一流誌に受理されており、審査委員は、申請者が本論文関連領域に対して学位授与に値する十分な見識と能力を有することを全員一致で確認し、本論文が学位授与に値すると判定した。