

令和元年6月19日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K09862

研究課題名(和文) 脳に発現する免疫分子MHCの注意欠如・多動性障害への関与

研究課題名(英文) Involvement of immune molecule MHC expressed in the brain in attention deficit/hyperactivity disorder

研究代表者

中原 大一郎 (NAKAHARA, Daiichiro)

宮崎大学・医学部・研究員

研究者番号：80128389

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：主要組織適合遺伝子複合体抗原クラスI (MHC-I) の機能を欠損するマウスは多動、衝動性の亢進、および注意散漫などのヒト注意欠如・多動性障害 (ADHD) によく似た症状を示した。また、MHC-I 機能欠損マウスの脳では、側坐核ドーパミン1受容体 (D1R) の発現が増加していた。さらに、このマウスに ADHD 治療薬であるメチルフェニデートを投与すると、多動、衝動性および注意障害のいずれの症状も改善した。また、側坐核のD1Rを有するニューロンのc-Fos発現はメチルフェニデートにより著明に抑制された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

MHC-I機能欠損マウスは、動物モデルとして、表面的妥当性、予測的妥当性、および構成的妥当性の3つの基準を概ね満たしており、長い間不明のままにあるADHDの病態メカニズムの解明に一步近づくことが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Mice deficient in the function of major histocompatibility complex antigen class I (MHC-I) showed a human attention deficit/hyperactivity disorder-like phenotype, such as hyperactivity, motor impulsiveness, and inattention. In addition, expression of nucleus accumbens dopamine 1 receptor (D1R) was increased in MHC-I deficient mice. Administration of methylphenidate, a treatment for ADHD, to these mice ameliorated all symptoms of hyperactivity, impulsiveness and attention disorders. Furthermore, c-Fos expression of neurons with D1R in nucleus accumbens was significantly suppressed by methylphenidate.

研究分野：行動神経科学

キーワード：主要組織適合遺伝子複合体 注意欠如・多動性障害 側坐核 ドーパミン受容体 メチルフェニデート

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我々は、90年代後半から2000年代にかけて作成された様々な遺伝子改変マウスの中から、ドーパミン機能の異常を示す動物を見つける試みに取り組んだ。その結果、野生型マウスに比べ、暗期における移動活動量が著しく多く、またコカイン反復投与による移動活動量の漸次的な増加(すなわち行動感作)が3倍を超える、顕著な多動を示す遺伝子改変マウスを見つけた。ドーパミン依存性の多動を示す、この遺伝子改変マウスは主要組織適合遺伝子複合体クラス I (MHC-I)を構成する分子を欠損していた。しかし、驚いたことに、MHC-Iの脳における役割は全く知られていなかった。脳は免疫特権器官と考えられていたからである。最近になって、MHC-Iは健常な脳細胞にも発現することが分かり、脳における新たな役割として、視覚経路の発達に伴って一時的に形成される過剰なシナプスの刈り込みに関与することが明らかにされている。MHC-Iは、視覚路だけでなく、中脳のドーパミン神経細胞とその投射領域にも発現する。したがって、MHC-I機能が欠損するとドーパミン神経路に形成される過剰シナプスの刈り取りが障害され、ドーパミン依存性行動に何らかの変化がもたらされる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究では、MHC-I欠損型マウスのドーパミン依存性行動の特徴とその神経基盤を明らかにすることを目的とした。

(1)まず、ドーパミンが関与する様々な行動機能について調べた。すなわち、網羅的行動テストバッテリーを用いて、新奇場面における活動量、自発活動量の概日リズム、ドーパミン作動薬に対する活動量の反応、認知機能、行動の柔軟性、衝動性行為と選択、注意機能、社会的行動および感覚運動情報処理機能を測定した。また、活動量、衝動性及び注意機能に及ぼすメチルフェニデートの効果を調べた。

(2)次に、定量的PCR法を用いて、ドーパミン起始核と投射野におけるドーパミン合成酵素、トランスポーター、ドーパミンD1受容体とD2受容体のmRNAの発現量を調べた。また、免疫染色法を用いて、側坐核におけるドーパミンD1受容体とD2受容体をそれぞれ有するニューロンの活動に及ぼすメチルフェニデートの効果を調べた。ニューロン活動の指標にはc-Fos発現を用いた。

3. 研究の方法

実験には、MHCクラスI分子の発現に関与する2-microglobulin(2m)およびTAP1遺伝子のダブルノックアウト(2m^{-/-}TAP1^{-/-})マウス(MHC-I欠損型マウス)と野生型マウスを使用した。

(1)行動実験：両群マウスにおいて、オープンフィールドにおける明期と暗期の活動量とホームケージにおける活動量の2週間にわたる概日リズムを測定した。次にドーパミン受容体D1とD2のアゴニスト(SKf81297とQuinpirole)によって誘発される活動量について用量依存効果を調べた。さらにドーパミントランスポーター阻害薬であるコカインについても用量依存効果を測定した。また、インテリケージを用いて、空間学習課題と逆転学習課題における認知機能と行動の柔軟性、単純反応時間課題における運動性衝動性と注意機能および遅延価値割引課題における認知性衝動性、さらに社会行動テストによる社会的相互作用と社会的認知、聴覚性驚愕反射テストによるプレパルス抑制を測定した。加えて、上記の課題において、多動、衝動性及び注意障害に及ぼすメチルフェニデートの効果を両群マウスで比較した。

なお、認知機能の測定にはインテリケージを用いた。この装置はケージの四隅にマウスが一匹入れる程度の小部屋(学習コーナー)を有し、それぞれのコーナーには2本の水瓶が設置されている。水瓶の飲み口の前にはドアが設けられており、ノーズボークするとドアが開放され、水(報酬)を得ることができる。コーナーの入り口にはIDセンサーが設置されており、皮下にIDタグを埋め込んだマウスが通過することにより個体識別が可能である。1ケージ最大16匹の行動を自動測定し、個体毎に学習課題を自動制御することが出来る。本研究では2ケージのインテリケージを用いて効率的に実験を進めた。

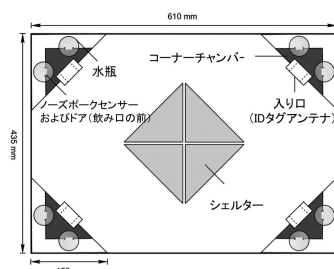


図1 インテリケージの俯瞰図。ケージの4隅に小部屋(学習コーナー)が設けられており、入り口には皮下に埋め込んだIDタグを読み取るアンテナが設置されている。それぞれのコーナーには水瓶が2本設置されており、飲み口の前にはノーズボークすることによって開閉できるドアがある。

(2)PCRと免疫組織化学実験：MHC-I欠損によるドーパミン機能への影響を調べるため、起始核(中脳腹側被蓋野と黒質)と投射野(側坐核、線条体、前頭前野)を取り出し、ドーパミン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

合成酵素、ドーパミントランスポーター、ドーパミン D1 受容体と D2 受容体の mRNA の発現量を定量的 PCR 法により調べ、野生型マウスと MHC-1 欠損型マウスで比較した。また、側坐核におけるドーパミン D1 受容体を有するニューロンと D2 受容体を有するニューロンの総数を免疫染色法により調べ、両群マウスで比較した。さらに、c-Fos をニューロン活動の指標として、ドーパミン D1 受容体を有するニューロンとドーパミン D2 受容体を有するそれぞれのニューロン活動に及ぼすメチルフェニデートの影響について調べ、両群マウスで比較した。

4. 研究成果

(1) 行動実験

オープンフィールドにおける活動量：野生型マウスに比べ、MHC-1 欠損型マウスの移動活動量は暗期において有意に多かった。しかし、明期の活動量については、群間差は見られなかった。

ホームケージにおける自発活動量の日内リズム：と同様に、野生型マウスに比べ、MHC-1 欠損型マウスの移動活動量は夜間においてのみ有意な増加を示した。この結果から、MHC-1 欠損型マウスは、夜間の活動期において、多動を生じることが示唆された。

活動量に及ぼすドーパミン D1, D2 受容体作動薬の効果：両群マウス共に、ドーパミン D1 受容体アゴニストにより用量依存性に移動活動量が増加した。しかし、増加反応は、野生型マウスに比べ、MHC-1 欠損型マウスにおいて有意に大きかった。一方、ドーパミン D2 受容体アゴニストにより移動活動量は用量依存性に減少した。しかし、減少反応に群間差は見られなかった。

活動量に及ぼすドーパミントランスポーター阻害薬の効果：と同様に、用量依存性に増加した移動活動量は、野生型マウスに比べ、MHC-1 欠損型マウスにおいて有意に大きかった。この結果から、MHC-1 欠損型マウスが示す多動にはドーパミン系の活動亢進が関与する可能性が示唆された。

空間学習課題と逆転学習課題の認知機能と行動の柔軟性：空間学習課題では4つのコーナーのうち、一つを報酬コーナーに割り当てた。報酬コーナーでノーズポークを行うと、3秒間水瓶の前のドアが開放され、水を飲むことが出来た。非報酬コーナーでのノーズポークでは水を飲むことは出来なかった。この課題を5日間行った後、逆転学習課題を5日間行った。逆転学習における報酬コーナーは原学習の対角線上のコーナーとした。両課題において、報酬コーナー以外でのノーズポーク反応の割合と逆転学習における以前の報酬コーナーへのノーズポーク反応の割合を解析したところ、空間学習と逆転学習の両成績に群間差は見られなかった。また、行動柔軟性の指標となる、固執反応についても群間差は見られなかった。

単純反応時間課題における運動性衝動性と注意機能：単純反応時間課題では、マウスは全てのコーナーで報酬を得ることが出来た。一回ノーズポークすると、1秒、2秒、3秒のいずれかの遅延が挿入され、遅延後にドア上部のライトが3秒間点灯した。ライトが点灯している間にノーズポークすると水を飲むことが出来た。すなわち、マウスはライトが点灯するまで待つこととライトが点灯している間にノーズポークすることの2つが求められた。点灯前の反応（フライング）は衝動性、点灯後の反応潜時は注意の指標として用いられ、この課題を7日間行った。その結果、MHC-1 欠損型マウスのフライング率は、野生型マウスに比べ、有意に高かった。また、反応潜時も、野生型マウスに比べ、MHC-1 欠損型マウスで著しく遅延した。すなわち、MHC-1 欠損により運動性衝動性が高まり、注意が散漫になることが示唆された。

遅延価値割引課題における認知性衝動性：遅延価値割引課題では、すぐにもらえる少ない報酬を得る選択穴（SS側）と後でもらえる大きな報酬を得る選択穴（LL側）を用意した。SS側をノーズポークした場合、すぐに（遅延0秒）ドアが開放され、1.5秒の間水を飲むことが出来た。一方、LLを選択した場合には、0、2、4、8、16秒の遅延が挿入され、遅延後にドアが開放され、15秒間水を飲むことが出来た。その結果、遅延後にもらえる大きな報酬を選択する割合は、遅延時間の延長と共に減少した。両群マウスの減少率に有意差は見られなかった。

社会行動テストによる社会的相互作用と社会的認知：通り抜け可能な3つの部屋からなるケージの中央の部屋に被験マウスを入れ、自由に行動させ、左右の部屋でマウスが滞在した時間を記録した後、「見知らぬ」マウス1を入れた格子ケージを滞在時間の短かった部屋に置き、被験マウスとマウス1の接触時間（社会的相互作用の指標）を測定した。さらに、「見知らぬ」マウス2を入れた格子ケージをマウス1と反対側の部屋に置き、被験マウスとマウス2の接触時間（社会的認知の指標）を測定した。その結果、見知らぬマウス1との接触時間、すなわち社会的相互作用と見知らぬマウス2との接触時間すなわち社会的認知のいずれにおいてもMHC-1 欠損型マウスと野生型マウスの間に有意な時間差は認められなかった。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

聴覚性驚愕反射テストによるプレパルス抑制：マウスに大きな音を聞かせると驚愕反応が起こるが、この驚愕反応は、大きな音の前に少し小さな音を聞かせると抑制される（プレパルス抑制）。まず、マウスをプラスチック製のシリンダーに入れ、初期音(110dB と 120dB)のみを聞かせる2試験を行い、その後初期音(74dB と 78dB)とそれに続く音(110dB と 120dB)をそれぞれ組み合わせた4試験をランダムに繰り返し、聴覚性驚愕反射量を測定した。その結果、プレパルス抑制の値は、野生型マウスと MHC-1 欠損型マウスの間で差は認められなかった。

ヒトの ADHD 治療薬として有効であるメチルフェニデートの多動に及ぼす効果を測定した。薬物は測定前に腹腔内に投与した。その結果、少量のメチルフェニデートの投与により MHC-1 欠損型マウスの多動が抑制された。また、単純反応時間課題で測定される、衝動性と持続的注意の指標に対するメチルフェニデートの効果を測定した。薬物は飲水による口腔内投与とした。その結果、メチルフェニデートの反復投与により、単純反応課題における MHC-1 欠損型マウスと野生型マウスのフライング率（衝動性の指標）の差が消失した。さらに、両群マウスの反応潜時（持続的注意の指標）の差も消失した。すなわち、メチルフェニデートの投与により、MHC-1 欠損型マウスにおいて見られる多動、衝動性、不注意の行動障害が改善されることが示唆された。

(2) PCR と免疫組織化学実験

まず、ドーパミン起始核（腹側被蓋野、黒質）と投射野（側坐核、線条体、前頭前野）におけるチロシン水酸化酵素、ドーパミントランスポーターおよびドーパミン受容体 mRNA の発現量について解析した。その結果、野生型マウスと比較して、MHC-1 欠損型マウスの側坐核ドーパミン D1 受容体 mRNA の発現量に有意な増加が認められた。しかし、チロシン水酸化酵素、ドーパミントランスポーターおよびドーパミン D2 受容体 mRNA の発現量には違いが認められなかった。次に、二重染色法を用いて、側坐核のドーパミン D1 受容体と D2 受容体をそれぞれ有するニューロンについて、c-Fos 発現に及ぼすメチルフェニデートの効果を調べた。その結果、MHC-1 欠損型マウスでは、野生型マウスに比べ、ドーパミン D1 受容体を有するニューロンにおける c-Fos 発現数が有意に多いことがわかった。D2 受容体を有するニューロンの c-Fos 発現数については両マウスで違いは見られなかった。また、メチルフェニデートの少量投与により、両群マウスで共に、ドーパミン D1 受容体を有するニューロンの c-Fos 発現数が減少した。さらに、その減少は MHC-1 欠損型マウスにおいてより顕著であった。一方、D2 受容体を有するニューロンについては、メチルフェニデート投与効果は観察されなかった。この結果から、MHC-1 欠損型マウスでは、少量のメチルフェニデート投与によりドーパミン D1 受容体を有するニューロン活動が著明に抑制されることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1, Murakami G, Edamura M, Furukawa T, Kawasaki H, Kosugi I, Fukuda A, Iwashita T, Nakahara D. “MHC class I in dopaminergic neurons suppresses relapse to reward seeking” *Sci Adv.* 4(3):eaap7388, 2018 (査読有)

〔学会発表〕(計 1 件)

1, Suenaga T, Yukie M, Nakahara D. “Effects of prenatal stress on neuronal morphology of the medial prefrontal cortex in rats”, The 78th Meeting of the Japanese Society for Animal Psychology, 2018

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：村上 元

ローマ字氏名：(MURAKAMI, Gen)

所属研究機関名：埼玉医科大学

部局名：医学部

職名：専任講師

研究者番号(8桁)：70613727

(2) 研究協力者

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

研究協力者氏名：末永 叔子

ローマ字氏名：(SUENAGA, Toshiko)