

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15882

研究課題名（和文）ミクログリアに注目した注意欠陥多動性障害の病態生理解明と新規治療法の開発

研究課題名（英文）Elucidation of pathophysiology and development of new treatments for attention deficit hyperactivity disorder focusing on microglia

研究代表者

城賀本 敏宏 (Jogamoto, Toshihiro)

愛媛大学・医学系研究科・助教

研究者番号：10781346

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000 円

研究成果の概要（和文）：Lister Hooded Rat (LHR)を用いて、ADHD様行動に与える養育環境の影響について検討した。3つの木製の小屋、回し車、3つの餌場などを備えた環境でLHR(豊かな環境群)を飼育し、通常ケージで飼育したLHR(対照群)の行動と比較した。豊かな環境群は、オープンフィールド試験で行動量が3日目に有意に減少した。対照群は逆に2日目以降行動量が増加し、多動性が観察された。不注意や衝動性を計測する落下試験では、豊かな環境群は約10%が落下したのに対し、対照群は約90%が落下した。豊かな環境での飼育によりADHD様行動が改善することを示した (Cells 2022, 11, 3649)。

研究成果の学術的意義や社会的意義

豊かな環境での飼育によりADHD様行動が改善し、その改善には前頭葉内側部の神経細胞活動の低下を伴っていることが判明した。しかし、前頭葉内側面は社会性に関わる重要な脳領域であり、この部位の神経細胞活動の低下が真に望ましい変化であるのか疑問が残る。実際、ADHD成人症例での社会的不適応は多動や不注意が問題というより、他者への配慮や他者の気持ちの理解の不足が原因と思われるケースが多い。そこで、毎日愛情を持ってLHRと遊び共に楽しく過ごす時間を持つ「愛情ある飼育(loving rearing; LR)」を行なっている。今後、養育環境における愛情の存在がLHRのADHD様行動を改善するか検討予定である。

研究成果の概要（英文）：Using Lister Hooded Rats (LHRs), we investigated the influence of the parenting environment on ADHD-like behaviors. LHRs (enriched environment group) were reared in an environment equipped with three wooden sheds, a running wheel, and three feeding stations, and the behaviors were compared with those of LHRs (control group) reared in regular cages. In the enriched environment group, the amount of activity decreased significantly on the third day in the open field test. In the control group, on the other hand, the amount of activity increased from the second day onward, and hyperactivity was observed. In a drop test, which measures inattention and impulsivity, those in the enriched environment fell about 10 percent of the time, compared to about 90 percent of those in the control group. It was shown that ADHD-like behaviors were ameliorated by rearing in an enriched environment (Cells 2022, 11, 3649).

研究分野：Pediatric Neurology

キーワード：ADHD 豊かな環境 最初期遺伝子 行動実験 RNAseq 養育環境

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

注意欠陥多動性障害(ADHD)は最も頻度の高い発達行動障害である。申請者は、黒いまだら模様をもつ Lister hooded rat (LHR)が多動性・不注意・衝動性を示し、ADHD 関連遺伝子の発現低下があり、ADHD 治療薬で行動が改善するなど優れた ADHD モデルであることを示した。さらに、LHR の大脳の内側前頭皮質で神経細胞活動が亢進し、ミクログリアのシナプス貪食が低下していることを見出した。本研究では、ミクログリアの活性、特にシナプス貪食能と ADHD 様行動との関連、ミクログリア活性低下の原因遺伝子の解明を進め、ミクログリアの活性制御による ADHD の新規治療法の開発を目指す。

2. 研究の目的

Lister hooded rat(LHR)が、SHR や DAT-KO マウスを遥かに凌駕する非常に優れた注意欠陥多動性障害(ADHD)モデル動物であることを申請者は証明した。マウスは基本的に社会性に劣るため、行動発達障害の研究ではラットの利用が好ましい。自閉スペクトラム症(ASD)と異なり、ADHD 研究ではミクログリアの関与はほとんど示されていないため、ミクログリアの活性と ADHD 様の行動との関連を研究する目的である。ミクログリアの活性低下をきたす原因となる遺伝子の抽出を行い、薬理学的実験も含めて、多動性・不注意・衝動性が結びついている可能性を追究し、その病態生理・病因の解明につなげようという研究である。LHR を用いて、効果を認めているクレンブテロールも含め、研究を通じてより安全な新たな薬物治療薬を提示したり、養育環境を変えたりすることで、ADHD 様行動が改善するかどうか、また ADHD 様行動に与える養育環境の影響と脳の分子細胞生物学的変化について明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

- 1) ミクログリアの活性低下が、最も根本的な変化であるのか? RNAseq による解析 FACS 分取ミクログリアの RNAseq (Wistar ラットミクログリアとの比較) 一次培養ミクログリアの RNAseq (Wistar ラットミクログリアとの比較) PrL 組織の RNAseq (Wistar ラット PrL との比較)
- 2) 上記解析結果を踏まえ、ADHD 様行動につながる遺伝子発現変化(ノックダウン、ノックアウト、強制発現のいずれか)を、マウスミクログリア細胞株に生じさせる。ノックダウンの場合は、ラット一次培養ミクログリアに適応する。増殖能、移動能、起炎症反応、貪食能、ノルアドレナリン等神経伝達物質に対する反応を調べる。有意な結果が得られた場合に、遺伝子改変マウス・遺伝子改変 LHR の作成を行う。
- 3) カテコールアミンに関連する研究 : アトモキセチンなど ADHD 治療薬は、ノルアドレナリンまたはドーパミン作用の増強をもたらす薬物である。我々は、ミクログリアの非活性化状態では、ノルアドレナリンは 2 受容体を通じて貪食能を活性化させると考えており、青斑核ノルアドレナリン系の異常がより根本的な原因である可能性も検討する。青斑核ノルアドレナリン合成系酵素の発現レベルの Wistar ラットとの比較 青斑核ノルアドレナリン神経細胞破壊剤 DSP-4 投与 ノルアドレナリン前駆物質 L-DOPS の利用 HPLC によるノルアドレナリン、ドーパミンおよびその分解産物の測定
- 4) ミクログリアが貪食除去するシナプスの解明 : ミクログリアが低活性であると、シナプシン I が増え、PrL 神経細胞の活動性が高まる。シナプシン I の増加は、グルタミン酸作動性興奮性シナプスの増加によるものかは不明である。・FACS 分取ミクログリアに取り込まれたシナプス成分をウエスタンブロッティングにより興奮性か抑制性か解析する。免疫組織染色による解析と組み合わせる。
- 5) ミクログリア活性化療法の開発・クレンブテロールを始め、ミクログリア活性化剤(グリシンやセリンなども含む)を投与し、ADHD 様行動の改善を調べる。

【ADHD 様行動に与える養育環境の影響】

- 1) 95cm x 55cm x 115cm という高さや広さのある大きなケージに、3つの木製の小屋、回し車、3つの餌場と2つの水場、階段や梯子、登り棒などを備えた環境で LHR(豊かな環境群)を飼育する。このような豊かな環境での飼育を行った LHR を 40cm x 25cm x 14cm の通常ケージで飼育した LHR(対照群)の行動を比較する。
- 2) 豊かな環境飼育の ADHD 様行動への影響に関して、分子細胞生物学的背景を探るために、前頭葉組織を分散し、FACS を行う。また、行動がおとなしい Wistar ラット、対照群、豊かな環境群から前頭前野内側部 (prelimbic region) 組織から全 RNA を抽出し、次世代シーケンサーにより遺伝子発現を比較する。

4. 研究成果

- 1) ADHD の多動性、衝動性、不注意は PrL の神経細胞の過剰活動に関連するか。:Lister hooded rat (LHR)と Wistar の前頭葉内側部前辺縁皮質 PrL における遺伝子発現を NGS により網羅的に調べた結果、神経細胞活動のマーカーとして知られる cFos mRNA の他、Egr2 や Arc のような Immediate early genes の発現が亢進していることが明らかになった。
- 2) ADHD 治療薬のアトモキセチン・グアンファシンは PrL 神経細胞の c-Fos 発現を低下させるか。:アトモキセチン投与により、cFos 発現は減少した(ウエスタンブロッティングによる)

が、グアンファシンは影響がなかった。

- 3) 脳内ミクログリアの活性低下は、造血系での骨髄系細胞の活性または増殖システムの異常に根本的な原因があるか。: LHR と Wistar ラット前頭葉のミクログリアの活性や細胞数について、FACS と免疫組織化学により分析した結果、LHR ではミクログリア細胞数がやや少なく、ミクログリアの貪食能に関わる CD11b の発現が低下していることが判明した。さらに両者の末梢血を CD11b と CD45 に対する抗体を用いて FACS で分析したところ、LHR では末梢血中のリンパ球が多く、顆粒球・単球が少なく CD11b 発現レベルも低いことが明らかになった。
- 4) 脳内ミクログリア活性を上昇させることで、ADHD 様行動障害が改善するか。: 2 アドレナリン受容体作動薬であるクレンブテロールの投与により、前頭葉のフローサイトメトリーにおいて、クレンブテロール投与群でミクログリアの CD11b 発現と FS、SS が有意に増加し、ミクログリアの活性化が確認できた。さらに、クレンブテロールを投与し行動実験を行ったところ、クレンブテロールは LHR の不注意、衝動性といった ADHD 様行動を有意に改善した。

【ADHD 様行動に与える養育環境の影響】

- 1) 豊かな環境群は 7 日間連続で行動量を測定するオープンフィールド試験で急速に慣れが生じ、行動量が 3 日目に有意に減少した。一方、対照群は逆に 2 日目以降行動量が増加する ADHD 児によく見られる多動性が観察された。不注意や衝動性を計測する落下試験では、豊かな環境群は約 10% が落下したのに対し、対照群は約 90% が落下した。このように、豊かな環境での飼育により ADHD 様行動が改善することを示した (Cells 2022, 11, 3649)。
- 2) 前頭葉組織を分散し、FACS を行ったが、ミクログリアに関して有意な変化は見出せなかった。そこで、行動がおとなしい Wistar ラット、対照群、豊かな環境群から前頭前野内側部 (prelimbic region) 組織から全 RNA を抽出し、次世代シーケンサーにより遺伝子発現を比較した。その結果、Fos、Egr2、Arc などの最初期遺伝子群の発現レベルは、Wistar ラットと豊かな環境群では同程度であるが対照群では亢進していた。これらの結果は、前頭葉内側面の神経活動亢進が ADHD 様の多動と関連し、豊かな環境での飼育がその神経細胞活動を抑制して落ち着いた行動をもたらすことを示唆している。

【今後の研究の推進方策】

豊かな環境での飼育により ADHD 様行動が改善し、その改善には前頭葉内側部の神経細胞活動の低下をともなっていることが判明した。しかしながら、前頭葉内側面は社会性に関わる重要な脳領域であり、この部位の神経細胞活動の低下が真に望ましい変化であるのか疑問が残る。実際、ADHD 成人症例での社会的不適応は多動や不注意が問題というより、他者への配慮の不足や他者の気持ちの理解の不足が原因と思われるケースが多い。そこで、現在、毎日愛情を持って LHR と遊び共に楽しく過ごす時間を持つ「愛情ある飼育 (loving rearing; LR)」を行なっている。preliminary な実験結果では、LR 群は連続オープンフィールドで行動量が低下すること、落下試験で落下しなくなること、我々が新たに創出した見知らぬ仔ラットへの配慮を測る「優しさテスト」で優れた結果を示した。今後、さらに実験数を増やし、養育環境における愛情の存在が LHR の ADHD 様行動を改善するのかさらに検討を進め、前頭前野の遺伝子発現を網羅的に調べる。さらに、ミクログリアの変動があるのか、FACS により調べる。また LHR の ADHD 様行動の改善をもたらすアトモキセチンと愛情のどちらが優れているか比較検討を行う。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Utsunomiya Ryo, Mikami Kanta, Doi Tomomi, Choudhury Mohammed E., Jogamoto Toshihiro, Tokunaga Naohito, Ishii Eiichi, Eguchi Mariko, Yano Hajime, Tanaka Junya	4. 巻 11
2. 論文標題 Rearing in an Enriched Environment Ameliorates the ADHD-like Behaviors of Lister Hooded Rats While Suppressing Neuronal Activities in the Medial Prefrontal Cortex	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 3649 ~ 3649
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cells11223649	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Jogamoto Toshihiro
2. 発表標題 Lister hooded rats as a suitable animal model of attention-deficit hyperactivity disorder
3. 学会等名 第64回日本小児神経学会学術集会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------