

令和元年6月12日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K01634

研究課題名(和文) 注意欠陥多動性障害はどのように発症するのか：クレアチンを標的とした機序の検討

研究課題名(英文) How does ADHD develop? : Targeting on creatine metabolism in brain

研究代表者

黒澤 裕子 (KUROSAWA, YUKO)

東京医科大学・医学部・講師

研究者番号：90623108

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：注意欠陥多動性障害の主症状である多動を示す、脳クレアチントランスポーター遺伝子ノックアウトマウスを対象とした。まず、自発的活動量、運動機能、認知機能などの基礎的データ採取を行った。その後、神経細胞膜上に発現すべきクレアチントランスポーターの発現がなくても神経細胞内に移行し、生体内でリン酸化され、ATP合成能を有するクレアチン類似物質であるcyclocreatineを9週間、飲水経路で経口投与した。その結果、海馬依存性記憶能力は有意に向上し、その記憶力は同年齢のコントロールマウスと同レベルとなった。一方、多動に改善は認められなかった。多動を誘発する機序について、今後更なる検討が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

学童期児童の5-10%が罹患し、その約半数の症状は生涯持続するといわれている最も発症頻度の高い行動障害が注意欠陥多動性障害(ADHD)である。ADHD発症には、大脳前頭前野における神経伝達物質(ドパミン等)の作用低下の関与が指摘されているものの、多動や認知機能障害を引き起こす機序の詳細は現時点ではよくわかっていない。そこで、多動を示す脳特異的クレアチン欠乏マウスを対象とし、クレアチン類似物質の経口投与を行い、症状の改善がみられるか検討した。その結果、認知機能に大幅な改善は認められたものの、依然として多動症状を認めた。多動や注意欠陥を発症する機序の詳細について、今後さらに検討が必要である。

研究成果の概要(英文)：In this study, we used brain-specific creatinine transporter knockout mice which show hyperactivity that is the main symptom of attention deficit hyperactivity disorder. First, we evaluated baseline values of home cage locomotor activity, motor function and cognition. Then, we started 9 weeks of oral administration of cyclocreatine, a creatine analog capable of synthesizing ATP in vivo, via drinking water. As a result, hippocampus-dependent memory improved significantly, and the memory was at the same level as age-matched control mice. On the other hand, hyperactivity symptoms did not change. Further studies are needed to clarify the mechanism of inducing hyperactivity.

研究分野：エネルギー代謝

キーワード：クレアチン 注意欠陥多動性障害 多動 認知機能

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

## 1. 研究開始当初の背景

### (1)注意欠陥多動性障害 (ADHD)

注意欠陥多動性障害 (ADHD) は、不注意、多動、認知機能障害を主症状とする精神障害の 1 つである。学童期児童の 5-10% が罹患し、その約半数の症状は生涯持続するともいわれる、最も発症頻度の高い行動障害である。ADHD 患者の脳 (特に灰白質) には萎縮がみられ、発症には、大脳の前頭前野における神経伝達物質 (ドパミン等) の作用低下の可能性が指摘されているものの、多動や認知機能障害を引き起こすメカニズムの詳細は現時点ではよくわかっていない。

### (2)脳におけるクレアチンの役割

高強度運動時の骨格筋エネルギー供給系として必須のクレアチン/クレアチンリン酸による ATP 合成系は、中枢神経系においても重要な役割を担っている。神経伝達物質の放出、膜電位の維持、カルシウム濃度の恒常性維持、イオン勾配の保持のほか、成長円錐の活性化や軸索伸長にも関与していると考えられており、ニューロンの情報伝達および脳の恒常性維持に対して重要な役割を担っている。ADHD 患者の脳のエネルギー代謝を評価した先行研究において、脳クレアチンレベルの低下を認めていることから、クレアチンが ADHD 発症に関与している可能性が考えられる。

### (3)脳におけるクレアチン欠乏が示す臨床症状

1990 年代以降、3 種類の遺伝子変異による、ヒト脳クレアチン欠乏症の報告がなされている。これら 3 疾患の患者に共通する臨床症状は、脳クレアチン濃度の著しい低下と、そこから引き起こされる重篤な認知機能障害、精神遅滞、多動 (= 錐体外路性運動障害の 1 症状) および脳萎縮である。以上の臨床症状は、ADHD 患者に見られる症状と酷似しているうえ、ADHD 患者には脳クレアチン低下が認められることから、脳クレアチン欠乏モデル動物は、ADHD の発症機序を探索するモデルに有用と考えた。

### (4)モデル動物の作製：脳クレアチン欠乏マウス (クレアチントランスポーター遺伝子ノックアウトマウス)

申請者らは、ヒト脳クレアチン欠乏疾患の 1 つであるクレアチントランスポーター遺伝子 (SLC6A8) 変異の臨床報告を世界で初めて行うと同時に、その動物モデルを作成し、ヒト患者との類似性を検討した。その結果、Slc6a8 遺伝子を欠損させたマウスは、遺伝子発現が DNA / RNA レベルで著明に低下し、脳クレアチン濃度は低値 (正常マウスの 10~20%) を示すとともに、多動、学習障害、短期/長期記憶障害を呈した。本マウスは、申請当時、世界で唯一の疾患モデルであった。

### (5)錐体外路性運動障害

運動は、随意運動を司る錐体路系と、その他の錐体外路系に分類できる。錐体外路性運動系は、随意運動を行う際、全身の骨格筋をバランスよく動かすことにより運動を円滑に行う調節をしており、錐体外路性運動系が障害されると、多動 (注意欠陥多動性障害)、不随意運動 (舞踏病) 等の症状を呈することが知られている。錐体外路性運動系には、小脳、大脳皮質、大脳基底核等が関与するといわれているが、その神経機構の詳細は明らかにはなっていない。これらの部位は、脳におけるクレアチンの局在部位と一致しており、脳クレアチン欠乏症患者は錐体外路性運動障害を示すことが判明している。

### (6)正常な認知機能発揮に果たす海馬クレアチンの役割

クレアチンはまた、海馬での局在も認められている。海馬は、学習や新たな長期記憶の刻み

こみに必須の部位であり、さらにニューロンの新生が起こる数少ない脳部位の1つと考えられている。脳クレアチン欠乏症患者の認知機能障害からも予測される通り、学習・記憶にクレアチンが重要な働きをしていることは明らかであるものの、その作用機序の詳細は現時点では不明である。

#### (7)クレアチン類似物質 (Cyclocreatine) 投与による障害された機能改善の試み

クレアチントランスポーター遺伝子ノックアウトマウスでは、神経細胞膜上に発現すべきクレアチントランスポーターが欠落しているため、神経細胞内にクレアチンを取り込むことができない。そこで、クレアチンより脂溶性が高く、膜上での取り込みが容易なクレアチン類似物質である cyclocreatine を同マウスに経口投与したところ、機序は不明ながら、神経細胞内での cyclocreatine の取り込みが確認された。同時に、リン酸化された cyclocreatine (= ATP 合成能を有する) も検出された。以上のことから、cyclocreatine は、同モデル動物の機能改善に有望な物質と考えられる。

### 2. 研究の目的

「脳クレアチン欠乏マウス」および「コントロールマウス」を対象として、クレアチン類似物質の経口投与を行い、異常行動および障害された認知機能が改善されるか否か、検証すること。

### 3. 研究の方法

#### 【ノックアウトマウス作製】

2ヶ月齢 Slc6a8 flox/flox マウスと脳特異的 Cre brain +/- マウスの1対1の掛け合わせを合計5ペア行い、得られた産仔の尾部で遺伝子型判定を行った。

#### 【遺伝子型判定】

ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 法を用いて、生後21日齢マウスの尾部における flox および Cre の有無を確認することにより、遺伝子型判定を行った。

#### 【実験対象】

生後6ヶ月齢の Slc6a8 脳特異的ノックアウトマウスオス(-/y) 10匹、コントロールオス(+/y) 10匹 (合計2群20匹)

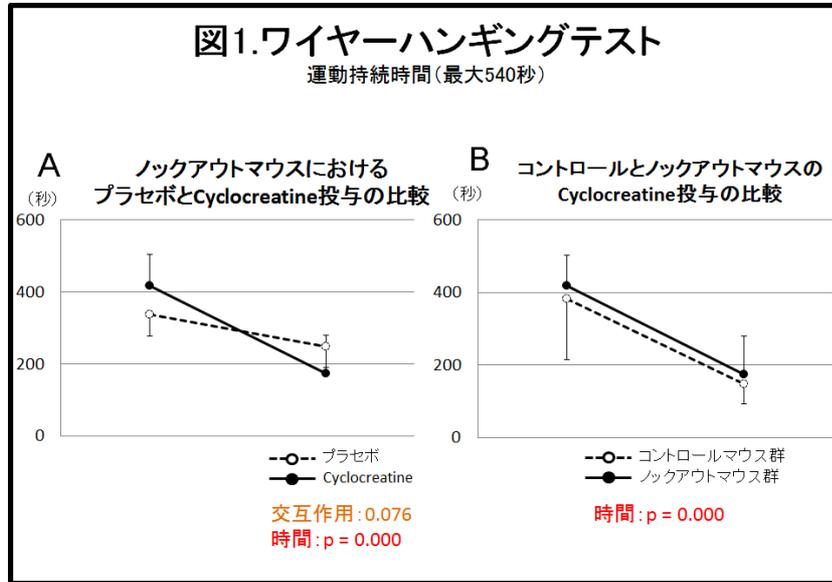
#### 【実験プロトコール】

先行研究にて既に投与効果が認められている投与量・投与期間である 0.28mg/kg 体重/日 (= 20g/70kg 体重/日) の cyclocreatine 経口投与 (ノックアウトマウス5匹とコントロールマウス5匹) もしくはプラセボ投与 (ノックアウトマウス5匹とコントロールマウス5匹) を連続9週間行い、9週間の投与前後、運動機能試験 (ワイヤーハンギングテスト、梁歩行試験) 行動観察 (飼育ケージ内での自発的活動量測定)、認知機能試験 (新奇物質探索試験) を実施し、cyclocreatine 経口投与の効果を検証した。cyclocreatine は、マウスの飲み水に溶解して与えた。投与期間中は各飼育ケージ当たり1匹ずつマウスを飼育し、各マウスの1日当たりの飲水量を連日実測したのち、cyclocreatine の濃度調整をその都度行い、標的投与量を維持した。

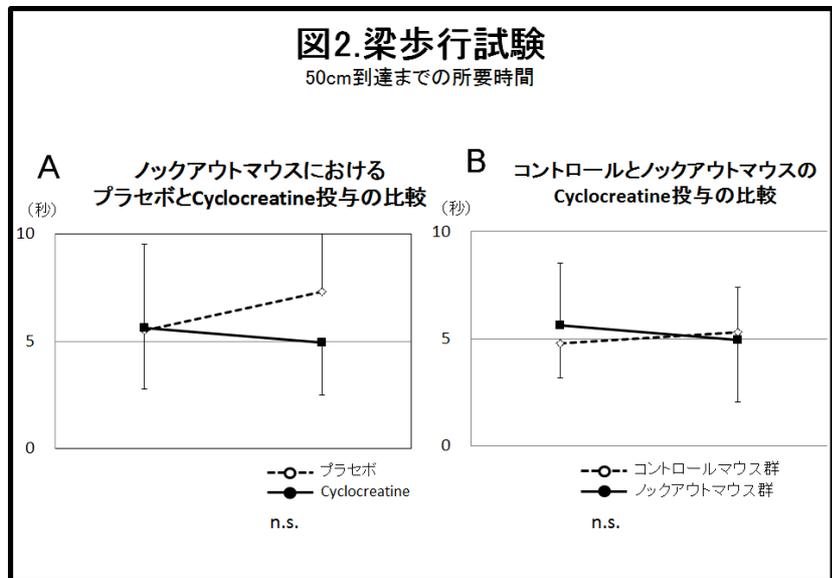
### 4. 研究成果

(1) 運動機能: ワイヤーハンギングテスト (図1)

9週間のプラセボもしくは Cyclocreatine 投与前後、ワイヤーハンギングテストを実施し、筋力（握力）を評価した。その結果、ノックアウトマウスに投与したサプリメントの種別（プラセボもしくは cyclocreatine）の相違による影響は特に認められなかったものの、筋力は、両サプリメント投与群ともに、投与9週間後に有意な低下を示した（図1A）。同様に、コントロールマウスとノックアウトマウスに対する cyclocreatine 投与効果を比較検討した図1Bでも、9週間後に有意な低下を認めた（図1B）。この変化は、加齢に伴う筋力低下を示していると考えられ、加齢に起因する筋力低下に対し、cyclocreatine 投与は効果を示さなかった。



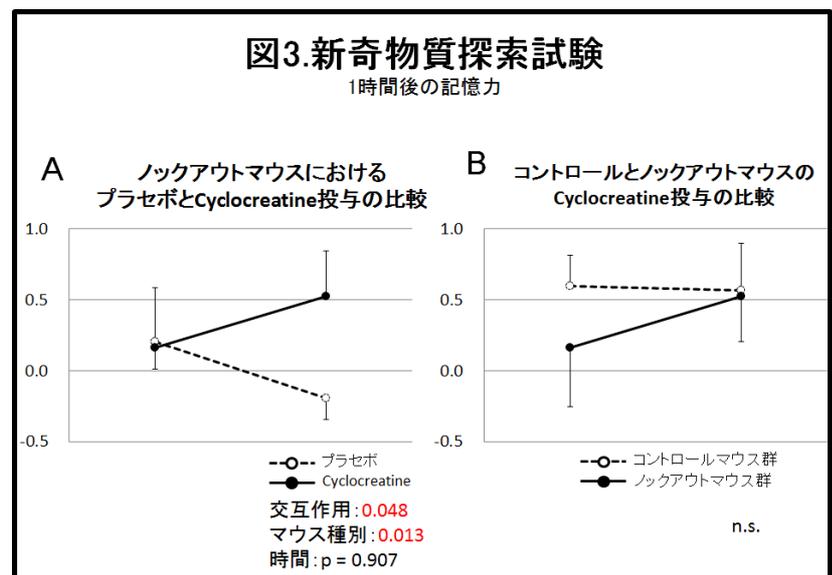
示した（図1A）。同様に、コントロールマウスとノックアウトマウスに対する cyclocreatine 投与効果を比較検討した図1Bでも、9週間後に有意な低下を認めた（図1B）。この変化は、加齢に伴う筋力低下を示していると考えられ、加齢に起因する



筋力低下に対し、cyclocreatine 投与は効果を示さなかった。

(1) 運動機能：梁歩行試験（図2）

9週間のプラセボもしくは cyclocreatine 投与前後、梁歩行試験を実施し、平衡感覚および協調運動機能を評価した。その結果、サプリメント



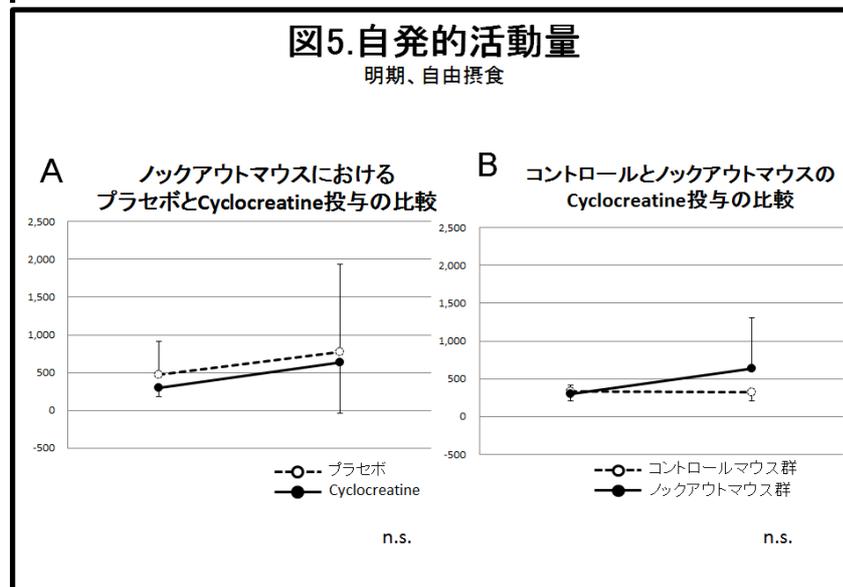
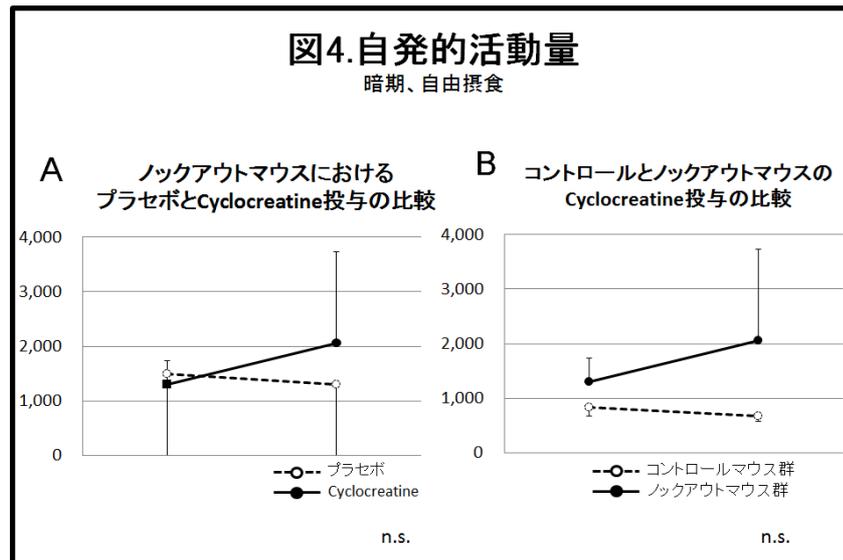
種別（プラセボもしくは cyclocreatine）の相違、およびマウス種別（コントロールおよびノックアウト）の相違に対し、cyclocreatine 投与は特に影響を示さなかった（図2A、2B）。

(2) 認知機能：新奇物質探索試験（図3）

9週間のプラセボもしくは cyclocreatine 投与前後、新奇物質探索試験を実施し、海馬依存性記憶力を評価した。その結果、ノックアウトマウスに対する cyclocreatine 投与効果を認め、9週間の cyclocreatine 投与による記憶力の有意な向上を認めた(図 3A)。また、9週間の cyclocreatine 投与後に、コントロールマウスおよびノックアウトマウスの間に、新奇物質探索試験のインデックス値に違いを認めなかったことから(図 3B)、9週間の cyclocreatine 投与により、コントロールマウスと同レベルまで海馬依存性記憶力が改善された可能性が考えられた。

(3)行動：自発的活動量測定(図 4,5)

明期(図 4)および暗期(図 5)における、飼育ケージ内での赤外線を用いた自発的活動量の測定では、サプリメント種別(プラセボもしくは cyclocreatine)の相違、およびマウス種別(コントロールおよびノックアウト)の相違に対し、cyclocreatine 投与は特に効果を示さなかった(図 2A、2B)。



引用文献

1. Wyss M, Kaddurah-Daouk R. Creatine and creatinine metabolism. *Physiol Rev.* 2000;80(3): 1107-1213.
2. DeGrauw TJ, Cecil KM, Byars AW, Salomons GS, Ball WS, Jakobs C. The clinical syndrome of creatine transporter deficiency. *Mol Cell Biochem.* 2003;244(1-2):45-48. doi: 10.1023/A:1022487218904.
3. Cecil KM, et al. Irreversible brain creatine deficiency with elevated serum and urine creatine: a creatine transporter defect? *Ann Neurol.* 2001;49(3):401-404. doi: 10.1002/ana.79.

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 0件)  
[学会発表](計 0件)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

該当なし

〔その他〕

該当なし

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：浜岡 隆文

ローマ字氏名：HAMAOKA, takafumi

所属研究機関名：東京医科大学

部局名：医学部

職名：主任教授

研究者番号(8桁): 70266518

研究分担者氏名：本間 俊行

ローマ字氏名：HOMMA toshiyuki

所属研究機関名：大東文化大学

部局名：スポーツ健康科学部

職名：准教授

研究者番号(8桁): 90392703

研究分担者氏名：涌井 佐和子

ローマ字氏名：WAKUI, sawako

所属研究機関名：順天堂大学

部局名：スポーツ健康科学部

職名：先任准教授

研究者番号(8桁): 00360959

研究分担者氏名：大黒 多希子

ローマ字氏名：DAIKOKU, takiko

所属研究機関名：金沢大学

部局名：学際科学実験センター

職名：教授

研究者番号(8桁): 30767249

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：ジョセフ F. クラーク

ローマ字氏名：CLARK, joseph