

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500395

研究課題名(和文) 注意欠陥多動性障害モデル動物での豊かな環境飼育による脳内ドパミン神経系の変化

研究課題名(英文) Altered dopaminergic system by environmental enrichment in ADHD model rat

研究代表者

飛田 秀樹 (HIDA, HIDEKI)

名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：00305525

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：注意欠陥多動性障害モデルラットのSHRラットを用い、発育期の外部環境(豊かな環境飼育、通常飼育、孤独な環境飼育)による情動行動の変化と脳内ドパミン神経系の変化をコカイン&アンフェタミン調節性転写物(CART)に注目し解析した。

その結果、豊かな環境飼育(EE)群では、他群に比べオープンフィールド試験で多動性が減少、社会性試験で社会性が亢進していた。EE群では、CART発現が扁桃体で上昇し、免疫染色により中心核での強い発現が確認された。さらにパルプアルブミン非陽性のGABA陽性細胞に共発現することも確認された。本研究から、発育期の環境がCARTを介して情動行動の形成に影響することが示された。

研究成果の概要(英文)：To investigate the relation between environmental enrichment (EE) during the period of development and formation of emotion, spontaneously hypertensive rat (SHR) were allowed to EE for 5 weeks from P25, followed by assessment of emotional behavior and analysis in dopaminergic system focusing on cocaine and amphetamine regulated transcript (CART).

In open-field test, total distance (parameter for hyperactivity) and locomotion speed (impulsivity) were decreased in EE-grown rats. In cylinder test, more quick adaptation to novelty was shown in EE. CART is enhanced by EE in the amygdala (Amy) by real-time PCR, and many CART-positive cells was observed in the Amy, especially in the central nucleus of amygdala (CeA). CART colocalized in GABAergic cells that were not immunoreactive to parvalbumin and calretinin. Data suggested that EE induced CART expression in CeA that colocalized in GABAergic neurons probably relating to decreased hyperactivity and anxiety-like behavior in SHR.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経科学一般

キーワード：enrichment emotion growth CART dopamine amygdala ADHD rat

1. 研究開始当初の背景

豊かな環境飼育とは、階段、トンネル、輪車等の運動遊具を含む広いケージの中で、運動遊具の配置および餌や水の配置の変換を週に2回行い、6-8匹の動物個体数にて飼育する環境をいう。従来の通常の飼育に比べ、豊富な運動遊具と広いケージの中による生理的な運動量の増加、多数の動物飼育による社会性の亢進、運動遊具および食餌の定期的な配置変換による探索様行動の亢進、の要素を含む環境であると考えられている。

豊かな環境による脳への作用として、シナプス可塑性と空間認知機能の亢進、神経新生の亢進、脳障害後の運動機能改善、が報告されている。特に、アルツハイマー病やハンチントン病の遺伝発症型モデル動物(遺伝要因)において、豊かな環境で飼育した動物(環境要因)では、発症の遅延と進行の抑制が報告された。

個体レベルの外部環境の変化が、如何に遺伝子/分子レベルで変化を与え、また障害された機能への影響、さらには行動発現に影響をもたらすのか、が大きな研究者の関心となっている。

一方、注意欠陥/多動性障害(ADHD)は学童の4-12%にみられ、男児に多い。「切れる子供」の問題とADHDとの関連(脳の発育と情動との関係)が指摘されている。脳内ドパミン(DA)神経系の異常が病因として上げられ、DA受容体4型(DRD4)、DAトランスポーター(DAT1)、などDA関連遺伝子異常がメタ解析から報告され、ADHDには遺伝因子が大きく関与している。(Hum Genet 126, 51-90, 2009)

しかし、環境要因の関与も知られている。ADHDは脳の発達/発育過程の疾患であり、発育環境を考慮したケア(適切な教育)という視点からも、発育期の外部環境(環境要因)が脳の発育と情動の形成に与える影響を科学的に詳細に解析することが重要である。

我々は、「外部刺激の多い豊かな環境飼育(環境要因)が、脳の発育と情動・行動制御にどのような影響を与えているか?」というテーマを、行動および脳内分子の両側面から解析を進めてきた。

2. 研究の目的

ADHDモデルラットとして、発育期に多動性や衝動性を示す自然発症型高血圧(SHR)ラットが用いられる。発育期に豊かな環境で飼育する(環境要因の変化)と、情動行動の発現に影響がもたらされるのか、また如何に遺伝子/分子レベルで脳内DA神経系に変化を与えるのか、についてADHDモデルのSHRを用いて解析が可能であると考えた。

具体的には以下の検討を行った。

- 1) 豊かな環境飼育によるSHRラットの行動変化(多動性/衝動性)を明らかにする。
- 2) 側坐核、扁桃核、内側前頭葉などの情動行動関連部位における脳内DA量の変化を

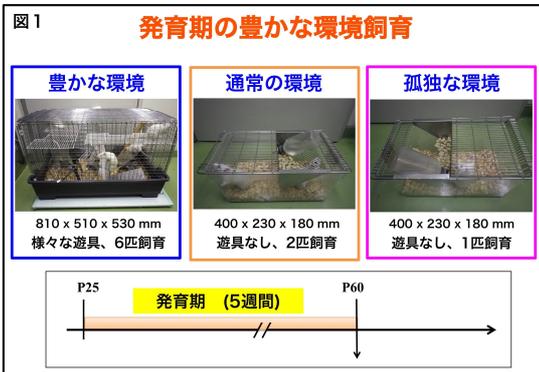
real-time DA測定法などを用いて検討し、DA神経系の変化を証明する。

3) 豊かな環境飼育による脳内変化をメタボローム解析し、情動行動の変化に連動する関連物質候補を検討する。

3. 研究の方法

(1) 豊かな環境飼育

雄SHR(自然発症型高血圧ラット:注意欠陥多動性障害モデル動物)を用い、通常飼育(SE:400×230×180mmの通常ケージ、餌・水の位置は固定で2匹飼育)、豊かな環境飼育(EE:810×510×530mmの大きなケージ、輪車、階段、トンネル等の遊具を入れ6-7匹飼育、遊具および水・餌の配置は2回/週の割合で配置変換する)、孤独環境(Iso:通常ケージ、餌・水の位置は固定で1匹飼育)を行った。(図1)



離乳直後の生後25日齢から成熟期までの生後60日齢までの発育期の5週間を上記の各条件で飼育した。

(2) 行動評価

オープンフィールドテスト

ラットを直径60cm高さ30cmの円形の新規環境空間の中央部にいれ、動物の行動を10分間ビデオに撮影した。全移動距離(cm)、歩行移動時の速さ(cm/sec)、直径30cmの中央部分への新入回数を行動解析ソフトsmartを用いて解析した。

社会性テスト

ラットを縦60cm横20cm高さ30cmの長方形空間の両端に、観測対象となるラットとその反対側に新規動物を同時にいれ、5分間の行動をビデオ撮影した。新規動物との距離(一定距離の範囲以内に滞在している時間をcontact時間と定義)sniffing回数とその時間を測定した。また、攻撃性の指標として両上肢を体の上に載せる回数を測定した。

(3) メタボローム解析

EE群、SE群、iso群のNAc組織を採取し、メタボローム解析をヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ(HMT)株式会社に委託した。

CE-TOFMSのカチオンモード、アニオンモードによる測定を実施し、検出ピークに対して m/z とMT値をもとにHMT 代謝物質ライブラリー及び Known-Unknownピークライブラリーに登録された物質を対象として解析を行った。

CE-TOFMS で検出されたピークは、自動積分ソフトウェアの Master Hands ver.2.9.0.9を用いて自動抽出し、ピーク情報として質量電荷比 (m/z)、泳動時間 (Migration time: MT)とピーク相対面積値を得た。

(4) real-time PCR 法

情動行動の発現に係る内側前頭皮質 (mPFC), 側坐核 (NAc), 扁桃体 (Amy), 海馬 (Hipo)の組織から Trizol にて RNA を抽出した。cDNA を作成したのち、ABI Prism 7000 sequence detection system を用い SYBER Green 試薬により定量 PCR を行った。用いたプライマーを以下に示す。

CART: sense 5' -GGATGATGCGTCCCATGAG-3',
antisense 5' -CAGCGCTTCAATCTGCAACA-3'
GAPDH: sense 5' -TGTGTCCGTCGTGGATCTGA-3',
antisense 5' CCTGCTTACCACCTTCTTGA-3'

(5) 免疫染色

基本的な固定は、麻酔後、経的に生理食塩水で脱血、4%パラホルムアルデヒドを用いて灌流固定を実施した。

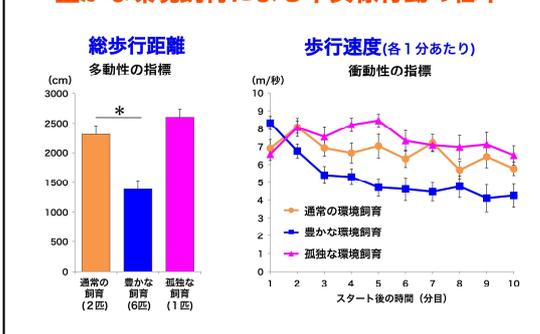
4. 研究成果

(1) 豊かな環境飼育による行動変化 オープンフィールドテスト

通常飼育 (SE) に比べ豊かな環境 (EE) で飼育した場合に、全移動距離は減少していた。孤独な環境 (Iso) では、SE と比べ移動距離に変化は認められなかった (図2左)。

また一分毎の最大歩行速度 (m/秒) を調べたところ、最初の1分目は EE でわずかに速い速度を示した。しかし、2分目以降には SE 及び iso に比べ、その速度が

図2 豊かな環境飼育による不安様行動の低下



有意に減少していた (図2右)

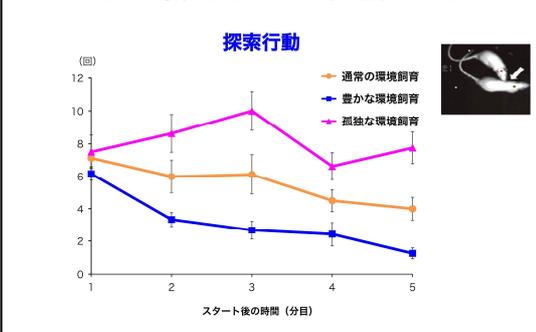
これらの結果から、発育期 EE によりの多動性および衝動性が減少していることが明

らかになった。

社会性テスト

SE に比べ豊かな環境 (EE) 飼育した場合に、sniffing 回数は減少した (図3)。

図3 豊かな環境飼育による社会性の亢進



(2) メタボローム解析による変動代謝物質

ライブラリー登録物質を対象として解析した結果、165 (カチオン 103, アニオン 62) のピークが候補化合物として考えられた。

SE に比べ EE で発現が多い物質に、Glutathione, Thiaprolin, 2-Deoxyglucose 6-phosphate, Methionine, noradrenalin, などが明らかになった。また、SE に比べ Iso で発現が多い物質に、thiaprolin, 3-Metxythylamine, Methionine sulfoxide, などが明らかになった。

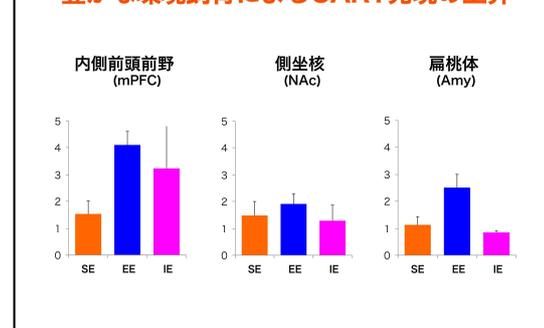
Noradrenalin量は、EE > SE > Iso の順に発現が異なり、また、3-Metoxythylamine は EE = SE < Iso の発現量変化が見られ、発育期の環境飼育の違いによるドパミン代謝の変化が明らかになった。

(3) 情動関連部位における遺伝子発現の変化

内側前頭皮質 (mPFC), 側坐核 (NAc), 扁桃体 (Amy) での cocaine- and amphetamine-related transcript (CART) の発現を調べた。

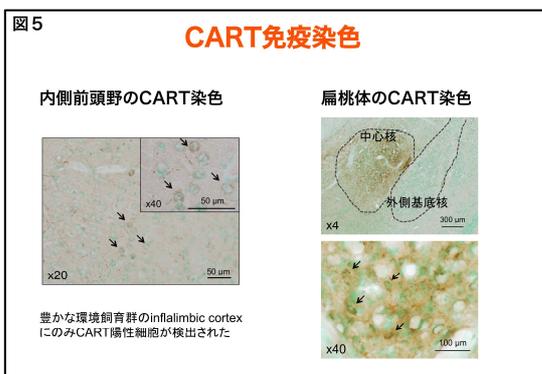
SE 群および Iso 群に比べ、EE 群の Amy において CART 発現が上昇していた。mPFC においても発現上昇の傾向が見られたが、NAc では変化は認められなかった (図4)。

図4 豊かな環境飼育による CART 発現の上昇



(4) CART 免疫染色

Amu および mPFC において, CART の発現局在を免疫染色で調べた。その結果、どの群の Amy においても CART 発現は中心核(CeA)に強く認められたが、外側基底核には認められなかった。(図5)



また、CART は GABA 陽性神経に発現することが明らかになった。さらに、CART は parvalbumin 非陽性であることが示された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 11 件)

Misumi S, Nishigaki R, Ueda Y, Watanabe Y, Shimizu Y, Ishida A, Jung CG, Hida H. Differentiation of oligodendrocytes from mouse induced pluripotent stem cells without serum. *Transl Stroke Res* 4(2), 149-157, 2013. doi: 10.1007/s12975-012-0250-1 査読あり

Lee HJ, Yamazaki Y, Tanaka KF, Furuya K, Sokabe M, Hida H, Takao K, Miyakawa T, Fujii S, Ikenaka K. Increased astrocytic ATP release resulted in enhanced excitability of the hippocampus. *Glia*, 61(2), 210-24, 2013. doi: 10.1002/glia.22427 査読あり

Masuda T, Croom D, Hida H, Kirov SA. Capillary blood flow around microglial somata determines dynamics of microglial processes in ischemic conditions. *Glia* 59(11); 1744-53, 2011. doi: 10.1002/glia.21220 査読あり

Ishida A, Tamakoshi K, Hamakawa M, Shimada H, Nakashima H, Masuda T, Hida H, Ishida K. Early onset of forced impaired forelimb use causes recovery of forelimb skilled motor function but no effect on gross sensory-motor function after capsular hemorrhage in rats. *Behav Brain Res* 225(1), 126-134, 2011. doi: 10.1016/j.bbr.2011.06.036 査読あり

Ishida A, Ueda Y, Ishida K, Misumi S, Masuda T, Fujita M, Hida H. Minor neuronal damage and recovered cellular

proliferation in the hippocampus after continuous unilateral forelimb restraint in normal rats. *J Neurosci Res* 89(6): 457-65, 2011. doi: 10.1002/jnr.22566 査読あり

[学会発表](計 12 件)

Shimizu Y, Yokoyama Y, Misumi S, Ishida A, Jung CG, Hida H. Higher expression of cocaine and amphetamine regulated transcript (CART) peptide in the amygdala rather than the medial prefrontal cortex in ADHD model rat. 第91回日本生理学会、2014年3月16-18日、鹿児島大学 群元キャンパス 鹿児島県

Yokoyama Y, Shimizu Y, Ueda Y, Misumi M, Ishida A, Jung C-G, Yokoi M, Hida H. Social behavior by umami intake during the period of development is enhanced by vagus nerve afferent in ADHD model rat. 第91回日本生理学会、2014年3月16-18日、鹿児島大学 群元キャンパス 鹿児島県

横山善弘、清水由布子、上田佳朋、三角吉代、石田章真、鄭 且均、横井基夫、飛田秀樹、発達期の経口うま味刺激における迷走神経を介した社会性亢進、第60回中部日本生理学会、2013年10月25-26日、岐阜大学医学部記念会館ホール 岐阜県

Shimizu Y, Yokoyama Y, Misumi S, Ishida A, Jung CG, Hida H. Behavioral effect of environmental enrichment on attention deficit hyperactivity disorder model rat: CART expression in the medial prefrontal cortex and the amygdala, 日本神経科学会 2013年06月20-23日、国立京都国際会館 京都府

Shimizu Y, Nishigaki R, Watanabe Y, Ueda Y, Misumi S, Masuda T, Hida H. Hyperactivity is reduced by environmental enrichment during growing period in an ADHD model rat accompanied with enhanced CART expression in medial prefrontal cortex. 北米神経科学会、2012年10月13-17日、アメリカ ニューオリンズ コンベンションセンター

Yokoyama Y, Shimizu Y, Misumi S, Ishida A, Yokoi M, Hida H. Oral intake of monosodium glutamate during growing period alters social behavior in a rat model of attention-deficit/hyperactivity disorder. 北米神経科学会、2012年10月13-17日、アメリカ ニューオリンズ コンベンションセンター

Shimizu Y, Nishigaki R, Yokoyama Y, Waatanabe Y, Mizumi S, Hida H.

Decreased anxiety-induced behavior by environmental enrichment both in SHR and Wistar rats. 日本神経科学会 2012年09月18~21日、名古屋国際会議場、名古屋市

Shimizu Y, Watanabe Y, Yokoyama Y, Cho R, Misumi S, Masuda T, Hida H. Reduced hyperactivity with CART expression in the prefrontal cortex in ADHD model rats. 第89回日本生理学会、2012年3月31日、松本文化会館 長野県

Shimizu Y, Cho Y, Nishigaki R, Watanabe Y, Masuda T, Misumi M, Hida H. Environmental enrichment in ADHD model rat: decreased hyperactivity and impulsivity in young spontaneously hypertensive rats. 北米神経科学会、2011年11月15日、アメリカ ワシントンDC コンベンションセンター

Shimizu Y, Ueda Y, Cho R, Nishigaki R, Hida H. Decrease in hyperactivity and impulsivity by environmental enrichment in attention deficit hyperactivity disorder model rat. 第34回日本神経科学会、2011年9月15日、横浜パシフィコ 横浜市

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

www.med.nagoya-cu.ac.jp/brain-physiol.dir/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

飛田 秀樹 (HIDA HIDEKI)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号： 00305525

(2) 連携研究者

三角 吉代 (MISUMI SACHIYO)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号： 70529148

増田 匡 (MASUDA TADASHI)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号： 10423641

(H23度~H24年度)

石田 章真 (ISHIDA AKIMASA)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号： 20632607

(H24度~H25年度)