

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月12日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10195

研究課題名(和文)機能分子を標的とした注意欠如多動性障害の診断法・治療法の開発

研究課題名(英文) Development of functional molecule-targeted diagnostic and therapeutic agents for attention deficit hyperactivity disorder

研究代表者

毛利 彰宏 (Mouri, Akihiro)

藤田医科大学・保健学研究科・准教授

研究者番号：20597851

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：注意欠陥・多動性障害(ADHD)の治療薬開発を行うモデル動物は少ない。本研究では、NMDA受容体拮抗薬であるフェンサイクリジン(PCP)連続投与マウス、およびプロスタグランジン受容体の一つであるEP1遺伝子欠損マウスをADHDモデル動物として評価し、それらを用いた治療薬開発を行った。行動変化、神経機能、治療薬応答性から、PCP連続投与動物およびEP1遺伝子欠損マウスをADHDモデル動物として評価することができた。また、国立台湾大学との共同研究より、イボタクサギの有効成分であるHispidulinがPCP連続投与により誘発される行動障害に有効であることを明らかにすることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでの注意欠如多動性障害(ADHD)の治療薬(メチルフェニデートとアトモキセチン)は前頭前皮質のドーパミンやノルアドレナリンによる神経伝達を活性化させる。しかし、対症療法になるため、根本的なADHDの治療には至っていない。本研究では、ADHDの発症や病態に関与が示唆されているホルモンやサイトカインなどの機能分子を標的とし、分子生物学、神経化学および行動薬理学を駆使し、分子から神経細胞、さらに個体に至るまで包括的にADHDの発症機序と病態の解明を行った。その結果、ADHDの発症や病態に関連した機能分子(プロスタグランディン・NMDA受容体)を標的とした根本的な新規治療薬の開発を目指した。

研究成果の概要(英文)：Attention defect hyperactivity disorder (ADHD) is characterized by inattention, hyperactivity, impulsivity, and social deficit. But there are few ADHD model animals for development of therapeutic agents. In this study, We evaluated the phencyclidine (PCP)-treated mouse and EP1 knockout mouse as ADHD animal model and developed the anti-ADHD drug. Based on the behavioral and neurological experiments, anti-ADHD drug responsibility, PCP-treated mouse and the EP1 knockout mouse have good validities for ADHD animal model. We clarify that Hispidulin, which is a flavone isolated from Clerodendrum inerme (L.) Gaertn (CI), is effective for behavioral abnormalities in the PCP-treated mice.

研究分野：精神医学

キーワード：注意欠如多動性障害 機能性分子 プロスタグランディン NMDA受容体

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

## 1 . 研究開始当初の背景

注意欠陥・多動性障害 ( ADHD ) は多動性 , 不注意 , 衝動性などを特徴とする精神疾患である . 小児の ADHD の有病率は 3 ~ 6% と非常に高く , 大半は成人後も障害が認められる . 勉学や仕事を長時間持続できないなど , 就学や就職に著しく障害をきたし , ADHD による社会的損失は非常に高い . ADHD の診断は多くの精神疾患と同様に精神科医による問診で行われている . ADHD の早期発見 , 適切な治療を行うために , 他科でも発症の有無 , 重症度 , および治療薬応答性を診断できるバイオマーカーによる診断法の開発が求められている . ADHD の発症・病態は , 遺伝的要因と環境的要因による前頭前皮質のドーパミンやノルアドレナリン作動性神経系の機能低下が考えられている . 実際に遺伝子解析において , ドパミントランスポーター ( DAT ) , ノルアドレナリントランスポーター ( NAT ) および , ドパミン  $D_1 \cdot D_4$  受容体 , アドレナリン  $\alpha_2$  受容体の遺伝子多型と ADHD の関連が報告されている . 治療薬であるメチルフェニデートとアトモキセチンはそれぞれ DAT , NAT を阻害し , 神経伝達を賦活する . しかし , その依存性や副作用から使用に制限があり , 難治性例も多く , 新規治療薬の開発が求められている .

## 2 . 研究の目的

ADHD は就学や就職に著しく障害をきたし , その社会的損失は非常に高い . ADHD の早期発見 , 適切な治療を行うために , 精神科以外の診療科でも発症の有無 , 重症度 , および治療薬応答性を診断できるバイオマーカーによる診断法の開発が求められている . 一方 , 治療薬であるメチルフェニデートとアトモキセチンはその依存性や副作用から使用に制限があり , 難治性例も多く , 新規治療薬の開発が求められている . 本研究の目的は ADHD の発症や病態に関与が示唆されているホルモンやサイトカインなどの機能分子に注目し , 基礎・臨床研究のクロストークにより , それらを標的としたバイオマーカーによる ADHD の新規治療薬もしくは予防薬を開発することである .

## 3 . 研究の方法

EP1 遺伝子欠損マウスは京都大学大学院医学研究科創薬医学講座成宮周教授より供された . フェンシクリジン塩酸塩 ( PCP ) は名城大学大学院薬学研究科の古川宏教授が合成したものを供与された . 行動学的検討は日周行動量測定試験 , 断崖回避試験 , 社会性行動試験 , 新奇物体認知試験 , 水探索試験を行った . 生化学的検討は , *In vivo* マイクロダイアリシス法 , ウェスタンブロット法 , 免疫染色法を行った . 本実験計画は藤田医科大学動物実験委員会で承認され , 藤田医科大学動物実験指針および Principles of Laboratory Animal Care ( National Institutes of Health Publication, 85-23, 1985 ) に準じて行った .

## 4 . 研究成果

### 4.1. EP1 遺伝子欠損マウスの ADHD モデル動物としての妥当性

日周行動量測定試験により , EP1 遺伝子欠損マウスは日周リズムに応じた夜行性の自発運動量変化を示し , 明期・暗期共に野生型マウスの自発運動量と差は認められなかった ( Fig. 1A ) . また , 1 日間の食餌量 , 飲水量にも差は認められなかった ( Fig. 1B, C ) . EP1 遺伝子欠損マウスの社会性行動について検討するため , 社会性行動試験を行った . EP1 遺伝子欠損マウスの社会性行動時間は野生型マウスのそれと比較して有意に短縮した ( Fig. 1D ) . 次に EP1 遺伝子欠損マウスの衝動性について検討するため , 断崖回避試験を行った . EP1 遺伝子欠損マウスの jumping latency は野生型マウスのそれと比較して有意に短縮した ( Fig. 1E ) . EP1 遺伝子欠損マ

ウスに衝動性の亢進が認められることが示唆された。EP1 遺伝子欠損マウスに社会性の低下が惹起されることが示唆された。EP1 遺伝子欠損マウスの物体認知記憶について検討するため、新奇物体認知試験を行った。新奇物体認知試験の訓練試行における探索嗜好率は、すべての群間に有意な差は認められなかった (Fig. 1F)。保持試行における EP1 遺伝子欠損マウスの新奇物体に対する探索嗜好率は、野生型マウスのそれと比較して有意に低下した (Fig. 1G)。EP1 遺伝子欠損マウスに物体認知記憶の障害が認められることが示唆された。以上の結果より、ADHD モデル動物としての表現妥当性が認められた。

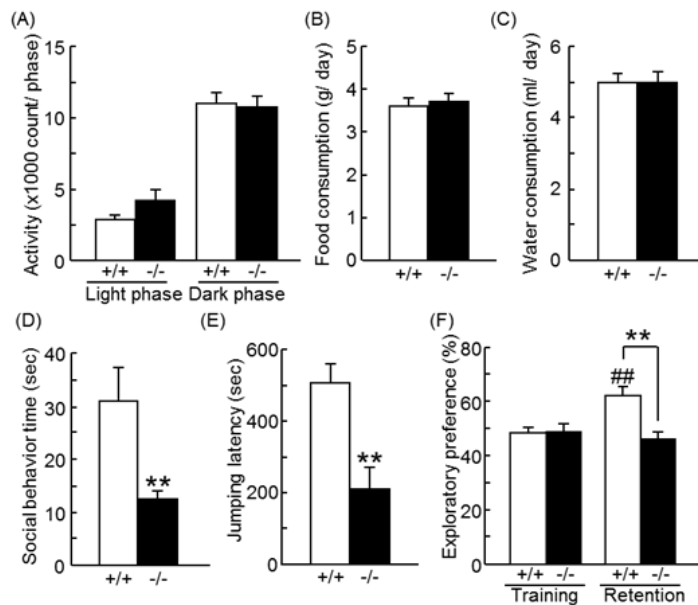


Fig. 1: Normal circadian rhythm and ADHD-like behaviors in EP1 knockout mice. Activity in dark and light phases (A), daily food (B) and water (C) consumptions, social behavior time in social interaction test (D), jumping latency in cliff avoidance test (E), and exploratory preference in novel object recognition test (F). Each column represents the mean  $\pm$  SEM. \*\* $p < 0.01$  vs wild-type mice. ## $p < 0.01$  vs each training trial. +/+ : wild-type, -/- : EP1 knockout mice.

さらに、EP1 遺伝子欠損マウスのこれら ADHD 様の行動異常は、抗 ADHD 薬であるメチルフェニデートおよびアトモキセチンにより緩解作用が認められ、ADHD モデル動物としての予測妥当性が認められた。ADHD 患者では前頭皮質を中心としたドパミン作動性神経系機能低下が認められるが、EP1 遺伝子欠損マウスの前頭皮質におけるドパミン細胞外遊離能には異常が認められなかった。野生型マウスの前頭皮質に認められるドパミン D1 受容体アゴニストによる ERK および DARPP32 のリン酸化は、EP1 遺伝子欠損マウスでは有意に認められなかった。すなわち、EP1 遺伝子欠損マウスではドパミン D1 受容体機能低下による前頭皮質ドパミン機能の低下が示唆され、ADHD モデル動物としての構成妥当性が認められた。EP1 遺伝子欠損マウスを用いた新たな ADHD 治療薬の開発が期待される。

#### 4.2. フェンサイクリジン連続投与マウスの ADHD モデル動物としての妥当性

PCP 連続投与マウスにおいて、ADHD 様の行動異常 [水探索試験のテスト試行における finding latency の延長 (認知機能低下)、社会性行動試験における社会性行動時間の短縮 (社会性の低下)、および断崖回避試験における jumping latency の短縮 (衝動性の亢進)] が認められ、ADHD モデル動物としての表現妥当性が認められた。さらに、PCP 連続投与マウスのこれら ADHD 様の行動異常は、抗 ADHD 薬であるメチルフェニデートおよびアトモキセチンにより緩解作用が認められ、ADHD モデル動物としての予測妥当性が認められた。ADHD 患者では前頭皮質を中心としたドパミン作動性神経系機能低下が認められ、PCP 連続投与マウスの前頭皮質におけるドパミン細胞外遊離能に低下が認められた。PCP 連続投与マウスの前頭皮質に認められる NR1 のリン酸化の低下が認められた。すなわち、PCP 連続投与マウスではドパミン D1 受容体機能低下による前頭皮質ドパミン機能の低下が示唆され、ADHD モデル動物としての構成妥当性が認められ

た。PCP 連続投与マウスを用いた新たな ADHD 治療薬の開発が期待される。

#### 4.3. フェンサイクリジン連続投与マウスに対するヒスピズリンの効果

ヒスピズリンは *Clerodendrum inerme* (L.) Gaertn (CI) の葉から分離されるトリヒドロキシフラボンである。ヒスピズリンはチック障害に効果があることが知られている。国立台湾大学の Lih-Chu Chiou 教授と共同研究により、ヒスピズリンが ADHD に対する治療効果が認められるか共同研究を行った。ヒスピズリンは PCP 連続投与マウスの細胞外ドパミン量を約 2 倍に増加した。次に、PCP 連続投与マウスに認められた社会性行動の低下に対するヒスピズリンの作用について検討するため、社会性行動試験を行った。ヒスピズリンの投与により、PCP 連続投与マウスに認められる社会性行動の時間の短縮が有意に延長した (Fig. 2)。PCP 連続投与マウスに認められた社会性行動の低下に対するヒスピズリンの緩解作用の機序を詳細に検討するために、ドパミン D1 受容体拮抗薬である SCH 23390 を用い、社会性行動試験を行った。SCH 23390 はいずれもヒスピズリンによる社会性行動の時間の延長に対して拮抗作用を示した (Fig. 2)。これらの結果より、PCP 連続投与マウスに認められる社会性行動の低下に対するヒスピズリンの緩解作用は、ドパミン D1 受容体を介することが示唆された。本研究によりヒスピズリンが PCP 連続投与マウスに認められる行動障害に対して緩解作用を示したことから、新しい抗 ADHD 治療薬としての可能性を示すことができた。

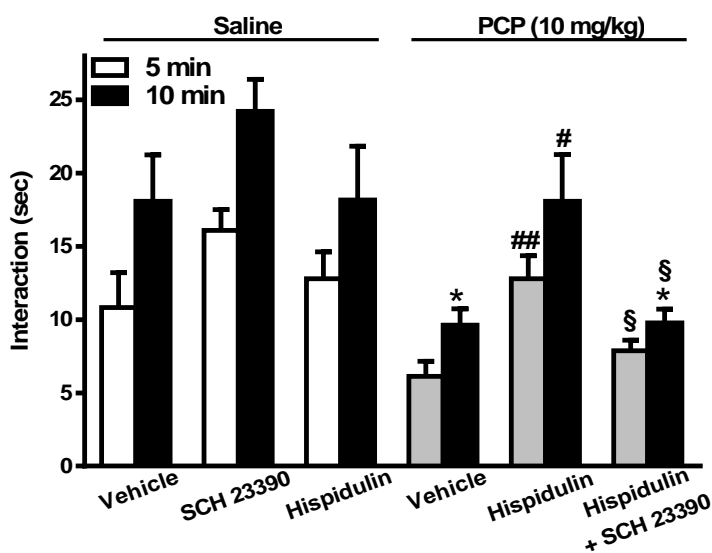


Fig. 2: Hispidulin attenuated social withdrawal by activating dopamine D1 receptors (D1Rs) in chronic PCP-treated mice. Hispidulin (10 mg/kg) was administered intraperitoneally 10 min before the social interaction test, and SCH 23390 (0.02 mg/kg) was injected subcutaneously 10 min before hispidulin administration. Data are presented as the mean  $\pm$  the standard error of the mean (N = 8-10). \*p < 0.05 vs. the vehicle-treated/saline-treated mice; #p < 0.05, ##p < 0.01 vs. the vehicle-treated/PCP-treated mice; \$ p < 0.05 vs. the PCP-treated/hispidulin-treated mice.

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 20 件)

- 1: Teshigawara T, Mouri A, Kubo H, Nakamura Y, Shiino T, Okada T, Morikawa M, Nabeshima T, Ozaki N, Yamamoto Y, Saito K. Changes in tryptophan metabolism during pregnancy and postpartum periods: Potential involvement in postpartum depressive symptoms. *J Affect Disord.* 2019 May 17;255:168-176. doi: 10.1016/j.jad.2019.05.028.
- 2: Fujigaki H, Mouri A, Yamamoto Y, Nabeshima T, Saito K. Linking phencyclidine intoxication to the tryptophan-kynurenine pathway: Therapeutic implications for schizophrenia. *Neurochem Int.* 2019 May;125:1-6. doi: 10.1016/j.neuint.2019.02.001.
- 3: Hasegawa S, Yoshimi A, Mouri A, Uchida Y, Hida H, Mishina M, Yamada K, Ozaki N, Nabeshima T, Noda Y. Acute administration of ketamine attenuates the impairment of social behaviors induced by social defeat stress exposure as juveniles via activation of

- $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) receptors. *Neuropharmacology*. 2019 Apr;148:107-116. doi: 10.1016/j.neuropharm.2018.12.020.
- 4: Tran HQ, Shin EJ, Hoai Nguyen BC, Phan DH, Kang MJ, Jang CG, Jeong JH, Nah SY, Mouri A, Saito K, Nabeshima T, Kim HC. 5-HT(1A) receptor agonist 8-OH-DPAT induces serotonergic behaviors in mice via interaction between PKC $\delta$  and p47phox. *Food Chem Toxicol*. 2019 Jan;123:125-141. doi: 10.1016/j.fct.2018.10.049.
- 5: Yamamoto Y, Yamasuge W, Imai S, Kunisawa K, Hoshi M, Fujigaki H, Mouri A, Nabeshima T, Saito K. Lipopolysaccharide shock reveals the immune function of indoleamine 2,3-dioxygenase 2 through the regulation of IL-6/stat3 signalling. *Sci Rep*. 2018 Oct 29;8(1):15917. doi: 10.1038/s41598-018-34166-4.
- 6: Tran HQ, Lee Y, Shin EJ, Jang CG, Jeong JH, Mouri A, Saito K, Nabeshima T, Kim HC. PKC $\delta$  Knockout Mice Are Protected from Dextromethorphan-Induced Serotonergic Behaviors in Mice: Involvements of Downregulation of 5-HT(1A) Receptor and Upregulation of Nrf2-Dependent GSH Synthesis. *Mol Neurobiol*. 2018 Oct;55(10):7802-7821. doi: 10.1007/s12035-018-0938-7.
- 7: Hasegawa S, Miyake Y, Yoshimi A, Mouri A, Hida H, Yamada K, Ozaki N, Nabeshima T, Noda Y. Dysfunction of Serotonergic and Dopaminergic Neuronal Systems in the Antidepressant-Resistant Impairment of Social Behaviors Induced by Social Defeat Stress Exposure as Juveniles. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2018 Sep 1;21(9):837-846. doi: 10.1093/ijnp/pyy038.
- 8: Chiou LC, Lee HJ, Ernst M, Huang WJ, Chou JF, Chen HL, Mouri A, Chen LC, Treven M, Mamiya T, Fan PC, Knutson DE, Witzigmann C, Cook J, Sieghart W, Nabeshima T. Cerebellar  $\alpha(6)$ -subunit-containing GABA(A) receptors: a novel therapeutic target for disrupted prepulse inhibition in neuropsychiatric disorders. *Br J Pharmacol*. 2018 Jun;175(12):2414-2427. doi: 10.1111/bph.14198.
- 9: Yamazaki M, Yamada H, Munetsuna E, Ishikawa H, Mizuno G, Mukuda T, Mouri A, Nabeshima T, Saito K, Suzuki K, Hashimoto S, Ohashi K. Excess maternal fructose consumption impairs hippocampal function in offspring via epigenetic modification of BDNF promoter. *FASEB J*. 2018 May;32(5):2549-2562. doi: 10.1096/fj.201700783RR.
- 10: Sobue A, Ito N, Nagai T, Shan W, Hada K, Nakajima A, Murakami Y, Mouri A, Yamamoto Y, Nabeshima T, Saito K, Yamada K. Astroglial major histocompatibility complex class I following immune activation leads to behavioral and neuropathological changes. *Glia*. 2018 May;66(5):1034-1052. doi: 10.1002/glia.23299.
- 11: Mouri A, Ukai M, Uchida M, Hasegawa S, Taniguchi M, Ito T, Hida H, Yoshimi A, Yamada K, Kunimoto S, Ozaki N, Nabeshima T, Noda Y. Juvenile social defeat stress exposure persistently impairs social behaviors and neurogenesis. *Neuropharmacology*. 2018 May 1;133:23-37. doi: 10.1016/j.neuropharm.2018.01.016.
- 12: Goto A, Yoshimi A, Nagai T, Ukigai M, Mouri A, Ozaki N, Noda Y. Human neutrophils show decreased survival upon long-term exposure to clozapine. *Hum Psychopharmacol*. 2017 Nov;32(6). doi: 10.1002/hup.2629.
- 13: Matsumoto Y, Niwa M, Mouri A, Noda Y, Fukushima T, Ozaki N, Nabeshima T. Adolescent stress leads to glutamatergic disturbance through dopaminergic abnormalities in the prefrontal cortex of genetically vulnerable mice. *Psychopharmacology (Berl)*. 2017 Oct;234(20):3055-3074. doi: 10.1007/s00213-017-4704-8.
- 14: Mouri A, Noda Y, Niwa M, Matsumoto Y, Mamiya T, Nitta A, Yamada K, Furukawa S, Iwamura T,

Nabeshima T. The involvement of brain-derived neurotrophic factor in 3,4-methylenedioxymethamphetamine-induced place preference and behavioral sensitization. *Behav Brain Res.* 2017 Jun 30;329:157-165. doi: 10.1016/j.bbr.2017.04.052.

15: Tashiro T, Murakami Y, Mouri A, Imamura Y, Nabeshima T, Yamamoto Y, Saito K. Kynurenine 3-monooxygenase is implicated in antidepressants-responsive depressive-like behaviors and monoaminergic dysfunctions. *Behav Brain Res.* 2017 Jan 15;317:279-285. doi: 10.1016/j.bbr.2016.09.050.

16: Kubo H, Hoshi M, Mouri A, Tashita C, Yamamoto Y, Nabeshima T, Saito K. Absence of kynurenine 3-monooxygenase reduces mortality of acute viral myocarditis in mice. *Immunol Lett.* 2017 Jan;181:94-100. doi: 10.1016/j.imlet.2016.11.012.

17: Goto A, Mouri A, Nagai T, Yoshimi A, Ukigai M, Tsubai T, Hida H, Ozaki N, Noda Y. Involvement of the histamine H4 receptor in clozapine-induced hematopoietic toxicity: Vulnerability under granulocytic differentiation of HL-60 cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2016 Sep 1;306:8-16. doi: 10.1016/j.taap.2016.06.028.

18: Toriumi K, Oki M, Muto E, Tanaka J, Mouri A, Mamiya T, Kim HC, Nabeshima T. Prenatal phencyclidine treatment induces behavioral deficits through impairment of GABAergic interneurons in the prefrontal cortex. *Psychopharmacology (Berl).* 2016 Jun;233(12):2373-81. doi: 10.1007/s00213-016-4288-8.

19: Mouri A, Ikeda M, Koseki T, Iwata N, Nabeshima T. The ubiquitination of serotonin transporter in lymphoblasts derived from fluvoxamine-resistant depression patients. *Neurosci Lett.* 2016 Mar 23;617:22-6. doi: 10.1016/j.neulet.2016.01.064.

20: Aoyama Y, Toriumi K, Mouri A, Hattori T, Ueda E, Shimato A, Sakakibara N, Soh Y, Mamiya T, Nagai T, Kim HC, Hiramatsu M, Nabeshima T, Yamada K. Prenatal Nicotine Exposure Impairs the Proliferation of Neuronal Progenitors, Leading to Fewer Glutamatergic Neurons in the Medial Prefrontal Cortex. *Neuropsychopharmacology.* 2016 Jan;41(2):578-89. doi: 10.1038/npp.2015.186.

〔図書〕(計 5 件)

1-4: 毛利彰宏 野田幸裕: 章 疾患と薬物治療 薬物依存 薬物治療学 第 5-8 版(吉尾 隆, 野田幸裕ら 編), 南山堂 2016-2019

5: 毛利彰宏: 第 5 章中枢神経系の疾患の薬, 病態, 治療 I 中枢神経系の構造と機能 . II 全身麻酔薬, 中枢興奮薬の薬理および臨床適応 . 疾患薬理学 (成田 年, 野田幸裕ら 編), 137-151, ネオメディカル 2016

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名: 鍋島俊隆

ローマ字氏名: Toshitaka Nabeshima

所属研究機関名: 藤田医科大学大学院

部局名: 保健学研究科

職名: 客員教授

研究者番号(8桁): 70076751

※科研費による研究は, 研究者の自覚と責任において実施するものです . そのため, 研究の実施や研究成果の公表等については, 国の要請等に基づくものではなく, その研究成果に関する見解や責任は, 研究者個人に帰属されます .