

令和 2 年 5 月 25 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10064

研究課題名(和文) 注意欠如多動性障害(ADHD)における細胞接着分子Arcadlinの関与

研究課題名(英文) A new model of attention deficit/hyperactivity disorder (ADHD) related with Arcadlin

研究代表者

竹宮 孝子 (Takemiya, Takako)

東京女子医科大学・看護学部・准教授

研究者番号：70297547

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)：arcadlin遺伝子欠損マウスには新規環境において多動、衝動性、注意欠如、コミュニケーション不良が見られたことから、arcadlinの欠如が注意欠如多動性障害(ADHD)の発生機序に関わる可能性を見出した。また、全脳・線条体が小さく、扁桃体のスパイン密度が高いなどのヒト小児ADHDや自閉症スペクトラム障害との共通点もあり、発達障害の発生メカニズムにarcadlinの欠如が関わる可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ADHDは衝動性、注意欠如、多動を特徴とする発達性の行動障害である。治療薬としてメチルフェニデート(MPH)が使われ、ADHDの発生機序にドパミン異常が関係すると考えられている。しかし、ADHDの20～30%にはMPHの効果がなくドパミン以外の機序の存在が示唆されていた。本研究成果から、細胞接着分子のプロトカドヘリン arcadlin/PCDH8 (Arcadlin) の欠損がドパミン系とは異なる機序でADHDの発生に関わることが推察された。本成果はADHD発生機序解明および新しい治療戦略の糸口として、その社会的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：Attention deficit/hyperactivity disorder (ADHD) is characterized by hyperactivity, impaired sustained attention, impulsivity, and learning disability concerning with dopamine in prefrontal cortex. Reduction of neuronal excitability via NMDA receptor antagonism is associated with impulsivity and hyperactivity. Arcadlin is induced in neurons by NMDA dependent synaptic activity.

We hypothesized that inhibition of Arcadlin was related with the mechanisms of NMDA inhibiting ADHD and investigated whether arcadlin knockout mice (ko) revealed ADHD like behavior. Hyperactivity and impulsivity was found in ko. The size of striatum and whole brain was significantly small in ko, which is also reported in ADHD children. In addition, ko kept working memory and spatial learning and memory, suggesting there is no learning disorder concerning with the function of prefrontal cortex and hippocampus in ko. Therefore, inhibition of Arcadlin showed ADHD and might be the mechanism of NMDA-blocking ADHD.

研究分野：神経科学、小児神経

キーワード：Arcadlin 注意欠如多動性障害(ADHD) 多動性 衝動性 扁桃体 スパイン密度 線条体

1. 研究開始当初の背景

細胞接着分子のプロトカドヘリン arcadlin/PCDH8 (Arcadlin) は、てんかん動物モデルの発作後に脳内で著しく誘導され¹⁾、神経可塑性を調節していることから²⁾³⁾、Arcadlin は脳の重要な機能に深く関わると考えられる。著者は、その arcadlin ノックアウトマウス(acad^{-/-})の行動に多動性と衝動性があることを偶然発見し、注意欠如多動性障害 (attention-deficit/hyperactivity disorder: ADHD) と Arcadlin の関係に注目した。ADHD は衝動性、注意散漫、多動を特徴とする発達性の行動障害であり前頭前野の萎縮例も報告されている⁴⁾。また、ヒト ADHD 児の多動の 70~80%にはメチルフェニデート (MPH) が効果を示し、ADHD 動物モデルのドパミントランスポーターノックアウトマウスの多動も MPH 投与で抑制されることから、ADHD にはドパミン系の異常が関係すると考えられている⁵⁾。しかし、ADHD の 20~30%に MPH が効果を示さないことについては、未だそのメカニズムは不明である。一方、生後数日間に N-methyl-D-aspartate (NMDA) antagonist を複数回投与されたマウスは成育後に多動が見られることがわかった⁶⁾。これは脳の発達期に神経活動が抑制されると後天的に多動が表れる可能性を示したが、そのメカニズムはまだ解明されていない。Arcadlin は神経活動依存的に誘導されシナプス形成に関わるため、脳発達の臨界期に NMDA antagonist によって神経活動が抑制されれば Arcadlin の発現も低下する。この『神経活動抑制による Arcadlin の発現低下』が神経シナプス形成に影響し、多動を引き起こすのではないかと考えられた。そこで、本研究は acad^{-/-}の行動特性や脳の形態変化を調べ Arcadlin の発現低下に関わる新たな ADHD のメカニズムを追求した。

2. 研究の目的

本研究は、Arcadlin の発現低下が ADHD 発生の新たな機序に関わるという仮説の下、acad^{-/-}の行動量や特性、薬物効果解析、脳の画像解析、神経細胞の樹状突起のスパイン密度測定を行い、新たな ADHD モデルとしての acad^{-/-} の特徴を明確化して、ADHD の発生機序解明に迫ることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究は、「acad^{-/-}に ADHD モデルの特徴はあるが、ドパミン系 ADHD モデルの特徴はない」という仮説の下、「acad^{-/-}に多動性、衝動性は見られるが作業記憶等の障害はなく、多動に対して MPH の抑制効果はなく、大脳皮質の体積減少もない」と仮定して検証した。いずれの実験も野生型マウス (wt) と acad^{-/-}を比較検討した。まず、acad^{-/-}の多動・衝動性を多角的に検証し、恐怖条件付け記憶・社会性・作業記憶・空間記憶を評価したのち、脳内の神経樹状突起のスパイン形態変化を測定した。さらに、MPH による行動量変化、MRI による脳各部位の大きさの変化を測定した。

- (1) 新規環境下での行動変化はオープンフィールド試験 (OFT)、Y 字迷路試験 (YMT)、明暗箱試験 (DLT)、十字迷路試験 (PMT) で観察した。また、慣れた環境としてホームケージ内での短時間・長時間の移動量も計測した。
- (2) 受動的回避的学習 (PAT) によって恐怖条件付き学習記憶の変化を測定し、社会性 (SI) については、ネット形成とともに wt 同士、acad^{-/-}同士の 2 匹間の追跡・接触行動を測定した。
- (3) 作業記憶は YMT から、空間記憶は水迷路試験 (WMT) から評価した。

- (4) 一連の行動解析が終了した後、マウスの脳については Golgi 染色を行い、Imaris ソフトでスパインの形態変化を自動評価した。
- (5) 別群の wt および acad^{-/-} マウスについて、OFT で 30 分間観察・記録を行った後、生理食塩水または MPH を腹腔内に投与し、その後続けて OFT での行動記録を 70 分間行った。行動実験は全てビデオ録画し、マウスの移動距離は行動自動解析ソフトを用いて測定・算出して、acad^{-/-} 群と wt 群において値を比較した。
- (6) 別群の wt および acad^{-/-} マウスを用いて小動物用 MRI を用いて大脳皮質、線条体、海馬の面積を 6 スライスで測定し 6 枚の面積の合算値について acad^{-/-} 群と wt 群で比較した。

4. 研究成果

- (1) 新規空間における OFT、YMT では acad^{-/-} は wt に比べ移動距離が有意に長かった (図 1)。

DLT の明暗移動では初回明所移動時間が有意に短いとともに明所移動回数が有意に多く (図 2)、PMT においても明所移動回数が有意に多く明所滞在時間が有意に長かった。しかし、慣れたホームケージでは移動距離に有意差は認められなかった (図 3)。

行動解析から、acad^{-/-} は wt に比べ新規空間での多動と衝動性が認められたが、慣れた空間ではその特徴が現れないことから、acad^{-/-} の行動変化は環境変化によって誘発されることがわかった。

- (2) PAT においては、acad^{-/-} に有意な学習遅延が認められ、SI では後方から近づく following の時間が、acad^{-/-} は有意に長かった。つまり、acad^{-/-} は恐怖条件付けの学習記憶が悪く、他者との距離感をつかみにくいコミュニケーション障害がある可能性が示唆された。

- (3) YMT では作業記憶の低下もなく、WMT の空間記憶には有意差がなかった (図 4)。これらの結果から海馬や前頭前野に関係する学習記憶機能に障害はないと考えられた。一方、WMT24 時間後のプローブテストにおいて、一時的に記憶の低下が示された。この結果は、acad^{-/-} における注意欠如の可能性がある。

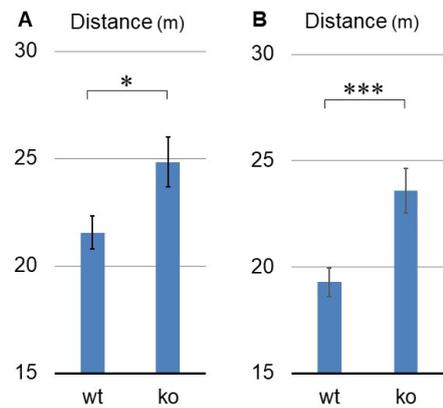


図1. 新規環境における移動距離
A: OFT, B: YMT, *p<0.05, ***p<0.001.
wt: 野生型マウス, ko: arcadlinノックアウトマウス.

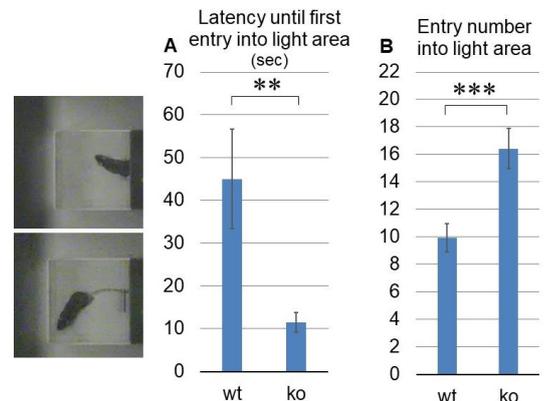


図2. 明暗新規環境における移動特性 (DLT)
A: 初回明所移動潜時, B: 明所移動回数, **p<0.005, ***p<0.001.
wt: 野生型マウス, ko: arcadlinノックアウトマウス.

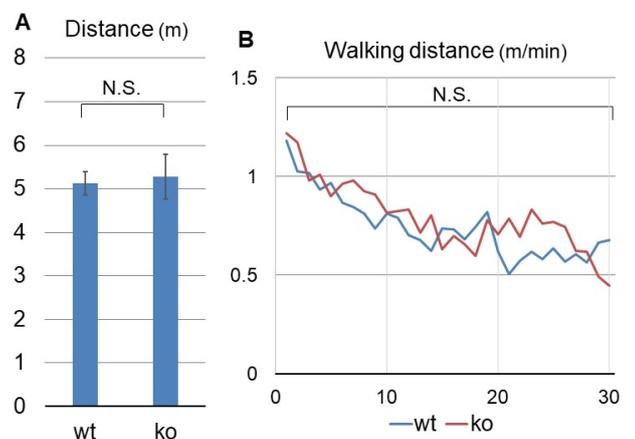


図3. ホームケージ環境における移動距離
A: 5分観察, B: 30分観察
wt: 野生型マウス, ko: arcadlinノックアウトマウス.

(4) *arcad*^{-/-}は恐怖条件づけの学習記憶が有意に悪かったことから、情動を制御する扁桃体における神経細胞の樹状突起のスパイン密度を計測した結果、*arcad*^{-/-}のスパイン密度が有意に高いことがわかった。また、スパインの形態分類では Mashroom 型の密度には差がなく、Long Thin の密度が有意に高いこともわかった。*Arcadlin* がスパイン密度を制御するということは、これまでの培養細胞の実験ではわかっていたが、それが *in vivo* の扁桃体において実証でき、恐怖条件づけ学習記憶の低下との関連も示唆された。

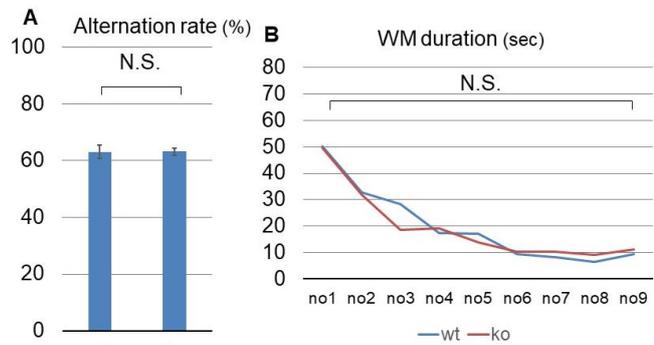


図4. 記憶機能
A: YMT, B: WMT
wt: 野生型マウス, ko: *arcadlin*ノックアウトマウス.

- (5) MPH 投与前後の行動量の変化においては、*arcad*^{-/-}は過活動が続き、MPH で多動が抑制されるドパミン系 ADHD モデルとは異なる反応を示した。
- (6) 脳 MRI では、海馬と大脳皮質の大きさについては両群に有意差がなかったが、脳全体および線条体の大きさについては wt に比べて *arcad*^{-/-}が有意に小さいことがわかった。近年、小児 ADHD の大規模調査において、コントロール群に比べて線条体が小さいというデータが示されており、また、自閉症スペクトラム障害と扁桃体の樹状突起のスパイン密度の関係もわかってきた。本研究の結果から、発達障害の発生メカニズムの 1 つに *Arcadlin* の発現低下が関わる可能性が示唆された。

以上の結果から、*arcad*^{-/-}には ADHD モデルとしての特徴はあるが、ドパミン系 ADHD モデルの特徴はないことから、*Arcadlin* の発現低下が ADHD の新しい機序に関わる可能性が示唆された。

<引用文献>

- 1) Yamagata K, et al. *Neuron*. 1993;11(2):371-86.
- 2) Yasuda S, et al. *Neuron*. 2007;56(3):456-71.
- 3) Sugiura H, et al. *Neuroscientist*. 2009;15(1):90-104.
- 4) Hart H, et al. *Neurosci Biobehav Rev*. 2012;36(10):2248-56.
- 5) Takamatsu Y, et al. *Curr Mol Med*. 2015;15(3):245-52.
- 6) Oliveira-Pinto J, et al. *Neurotoxicol Teratol*. 2015;50:43-52.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Takemiya Takako, Kawakami Marumi, Takeuchi Chisen	4. 巻 19(11)
2. 論文標題 Endothelial Microsomal Prostaglandin E Synthetase-1 Upregulates Vascularity and Endothelial Interleukin-1 in Deteriorative Progression of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 E3647
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms19113647	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 -
1. 著者名 Takemiya Takako	4. 巻 6
2. 論文標題 Potential Roles of Prostaglandin E2 and Interleukin-1 in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Multiple Sclerosis	6. 最初と最後の頁 1
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4172/2376-0389.1000225	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Takemiya T, Takeuchi C, Kawakami M.	4. 巻 18(12)
2. 論文標題 Microsomal Prostaglandin E Synthase-1 Facilitates an Intercellular Interaction between CD4(+) T Cells through IL-1 Autocrine Function in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci.	6. 最初と最後の頁 E2758
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390 / ijms 18122758	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 -
1. 著者名 Takemiya T, Fumizawa K, Yamagata K, Iwakura Y, Kawakami M.	4. 巻 11
2. 論文標題 Brain Interleukin-1 Facilitates Learning of a Water Maze Spatial Memory Task in Young Mice.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Front Behav Neurosci.	6. 最初と最後の頁 202
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fnbeh.2017.00202.	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 -

1. 著者名 Takemiya Takako	4. 巻 2(8)
2. 論文標題 Endothelial prostaglandin E2 regulates neuronal injury after seizure via activation of astrocytes	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Neurol Neuromed.	6. 最初と最後の頁 9-12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.29245/2572.942X/2017/8.1148	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5件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Takako Takemiya, Marumi Kawakami, Kanato Yamagata, Shin Yasuda, Kousuke Izumi
2. 発表標題 A new model of attention deficit/hyperactivity disorder (ADHD) related with Arcadlin
3. 学会等名 WFSBP Asia Pasific Regional Congress of Biological Psychiatry (WFSBP 2018 KOBE) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takako Takemiya, Marumi Kawakami, Kanato Yamagata, Shin Yasuda, Kousuke Izumi
2. 発表標題 A new model of attention deficit/hyperactivity disorder (ADHD) related with Arcadlin
3. 学会等名 第40回日本生物学的精神医学会・第61回日本神経化学学会大会 合同年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takako Takemiya, Marumi Kawakami
2. 発表標題 Endothelial Microsomal Prostaglandin E Synthetase-1 Upregulates Vascularity and Endothelial Interleukin-1 in Deteriorative Progression of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis
3. 学会等名 第41回日本神経科学大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takako Takemiya, Kanato Yamagata, Yoichiro Iwakura, Marumi Kawakami.
2. 発表標題 Cortical Interleukin-1 facilitates learning the spatial memory task in the water maze in young mice.
3. 学会等名 第60回日本神経化学学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Marumi Kawakami, Chisen Takeuchi, Takako Takemiya
2. 発表標題 Endothelial Microsomal Prostaglandin E Synthetase-1 Upregulates Vascularity and Endothelial Interleukin-1 in Deteriorative Progression of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis
3. 学会等名 第42回日本神経科学大会・第62回日本神経化学学会大会 合同年会
4. 発表年 2019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
研究 分担者	安田 新 (Yasuda Shin) (20392368)	公益財団法人東京都医学総合研究所・脳発達・神経再生研究 分野・研究員 (82609)	