

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：13201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659347

研究課題名(和文)漢方薬の薬効を利用したADHD発症因子の探索同定と機能解析

研究課題名(英文)Kampo medicine pharmacology-based clarification and identification of etiologic factors and their function responsible for ADHD

研究代表者

松本 欣三 (MATSUMOTO, KINZO)

富山大学・和漢医薬学総合研究所・教授

研究者番号：10114654

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：隔離飼育(SI)マウスの異常行動とADHD症状の類似性に着目し、ADHDの発症機構とそれに対する漢方薬の効果を検討した。SIマウスでは注意様行動、社会性、恐怖条件付け記憶に障害が現れた。ADHD治療薬メチルフェニデート(MPH)は注意様行動と社会性の障害を、アセチルコリン分解酵素阻害剤は恐怖記憶の障害を改善したことから、モデルの有用性が示唆された。SI動物では漢方薬酸棗仁湯(SST)の反復投与がMPH様の効果を示し、精神疾患や情動記憶に重要なEgr-1の発現に対するSIの抑制効果も軽減した。以上から、SSTはADHDの一部の症状の改善に有用で、それにはEgr-1系が関与する可能性が推測された。

研究成果の概要(英文)：Based on our hypothesis that social isolation (SI) induces behavioral abnormalities similar to attention deficit (AD) hyperactivity disorder (ADHD), we explored Kampo medicine-responsible factors which may be involved in ADHD. SI induced AD-like behaviors and impaired sociability and fear memory. The anti-ADHD drug methylphenidate (MPH) improved the AD-like behavior and sociability deficit, while the acetylcholinesterase inhibitor tacrine ameliorated fear memory deficits. SI-induced down-regulation of Egr-1, a factor involved in emotional and cognitive function was reversed by THA. These results further supported our hypothesis. The administration of sansonin-to (SST), a Kampo medicine for patients with neurologic symptoms and insomnia, showed the MPH-like effects and tended to improve fear memory in SI animals. These results suggest that SST is beneficial for the treatment of some symptoms of ADHD and that the effects of SST are at least in part due to the Egr-1 system in the brain.

研究分野：医歯薬学

 キーワード：隔離飼育 注意欠陥多動性障害モデル 注意様行動 社会性 恐怖条件付け記憶 漢方薬 発症因子  
 初期増殖応答蛋白1

### 1. 研究開始当初の背景

注意欠陥・多動性障害 (ADHD) は、不注意、多動、衝動性の3症状を特徴とする。一般に、男児に多発する疾患とされてきたが、必ずしも性差はなく、成人後も障害が維持されることが近年、明らかになった。治療には主にメチルフェニデート (MPH) が用いられるが、適切な病態モデルがないため、病因解明には至っていない。

### 2. 研究の目的

本研究は隔離飼育ストレス負荷 (SI) 動物の示す異常行動が ADHD に類似することから、SI 動物における漢方薬の薬効を利用して、ADHD 様症状の発症因子と発症を抑制する機能性分子を解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 動物モデル

実験では4週齢の雄性または雌性マウスを1-6週間隔離飼育 (SI) 若しくは群居飼育 (5匹/ケージ) 後、実験に用いた。

#### (2) 行動評価

社会性試験：新規物体認知試験を改変して実施した。改変型試験は訓練試行と試験試行から成る。訓練試行では同一形状の透明アクリル製チャンパー2個を対角上に置いた50cm四方の観察箱内にマウスを5分間入れ、自由に探索させた。試験試行はその30分後に行った。試験試行では、アクリル製チャンパーの一つに未処置マウスを入れ、訓練試行させたマウスを再度、観察箱内に5分間入れて自由行動させた。この間、各アクリル製チャンパーの位置から2cm以内に侵入し、チャンパー側に頭部と体躯を向けている時間を自動追尾装置 SMART<sup>®</sup>を用いて測定した。未処置マウスのチャンパーにより長く関心を示している場合、社会性有りと判定した。

水探索試験：空間的注意力の指標として水探索試験による潜在学習能を評価した。試験で用いる装置は30cm立方体の観察箱とそれに接続し、マウスが侵入可能な10cm立方体の小箱から構成される。本試験の訓練試行では、小箱の天井に飲用水用ノズルを床面より5cmの高さに設置した条件でマウスを装置内に5分間入れて自由探索させた。マウスを24時間絶水させた後、試験試行を行った。試験試行では小箱天井に設置した飲用水用ノズルを床面より7cmの位置に設置した。マウスを再び装置内に5分間入れ、ノズルを介して引水するまでの時間を潜在学習能として測定した。

攻撃性試験：攻撃性評価には resident-intruder 法を用い、マウス間の接触行動を20分間ビデオ記録した。SIマウスを resident とし、そのケージ内に群居飼育マウス (intruder) を入れて、探索行動に続く立ち上がり行動や

尾部振動による威嚇行動、レスリング、及び噛みつき行動を指標に、観察時間 (20分間) 中発現する時間を攻撃性として測定した。

短期記憶試験：短期記憶の評価には空間的作業記憶を評価する改変型 Y 迷路試験及び非空間的作業記憶を評価する新規物体認知試験を用いた。各試験は先に我々が報告した方法 (改変型 Y 迷路試験, Yamada M. et al., J. Ethnopharmacol. 135: 737-746, 2011; 新規物体認知試験: Zhao Q. et al., J. Pharmacol. Sci. 103: 360-373, 2007) に準じて実施した。

長期記憶試験：恐怖条件付け試験を用いて長期記憶を評価した。本試験は隔離飼育開始の3~6週間後に先に我々が報告した方法 (Yamada M. et al., J. Ethnopharmacol. 135: 737-746, 2011) に準じて行った。本試験は訓練試行と試験試行から成り、訓練試行ではマウスを装置内に3分間入れ、自由行動をさせた後、音刺激を20秒間与え、更に電気ショックと組み合わせて1分間の inter-trial interval で5回繰り返して与えた。最終電気ショック負荷の1分後、マウスをホームケージに戻した。訓練試行の24時間後に場所刺激を与えて文脈恐怖条件付け記憶を想起させた。またその直後若しくは4日後に音刺激のみを与えて音条件付け恐怖記憶を評価した。各記憶の評価には観察時間内にマウスが表出するフリージング行動をビデオ記録し、SMART<sup>®</sup>により画像解析した。

#### (3) 薬物投与

参照薬：ADHD 治療薬でドパミントランスポーター阻害活性を有する MPH および抗認知症薬でアセチルコリン分解酵素阻害活性を有するタクリン (THA) を参照薬として用いた。これらの薬物は基本的に行動試験の30分前に腹腔内投与した。

漢方薬：漢方薬としては主に酸棗仁湯を用いた。酸棗仁湯は酸棗仁や知母等の生薬をはじめ、5種の生薬からなる漢方方剤で、主に不眠症、嗜眠症、抑うつなどの神経症に適用される。本研究では酸棗仁湯 (400 - 800 mg/kg, 経口) を隔離飼育開始2週間後に単回投与または隔離飼育期間中投与してその効果を評価した。

#### (4) 神経化学的解析

初期増殖応答蛋白1 (Egr-1) : ADHD 様症状の発症に関連する因子を探索する目的で先ず統合失調症などの精神疾患患者で発現低下が報告されている Egr-1 に注目し、そのマウス脳組織内発現を免疫染色法で解析した。また SI の及ぼす影響を定量的に検討する為に Egr-1 遺伝子及び蛋白を常法に従って、それぞれリアルタイム PCR 法及びウエスタンブロット法で測定した。

海馬内神経細胞シグナリング関連蛋白：情動行動や情動記憶に関わる脳組織である海馬内の神経細胞シグナリング機能に及ぼす SI 及び薬物の影響を検討するため，Egr-1 や CaMKII $\alpha$ ，CREB 及びそれらの活性型であるリン酸化体(p-CaMKII，p-CREB)の発現量をウエスタンブロット法で解析した。

#### 4. 研究成果

##### 1) ADHD 様症状発現に関わる脳内因子候補

SI で変動する脳内因子を探索する目的で定量的遺伝子解析法，蛍光免疫組織法及びウエスタンブロット法を用いて検討した結果，隔離飼育動物では異常行動の発症と平行して Egr-1 発現量は低下した(Fig. 1)が，他の Egr ファミリー蛋白の発現量には変化がなかった。Egr-1 と精神疾患との関連性が示唆されていることから，Egr-1 が ADHD 様症状の発現の少なくとも一部に関わる可能性が推測された。

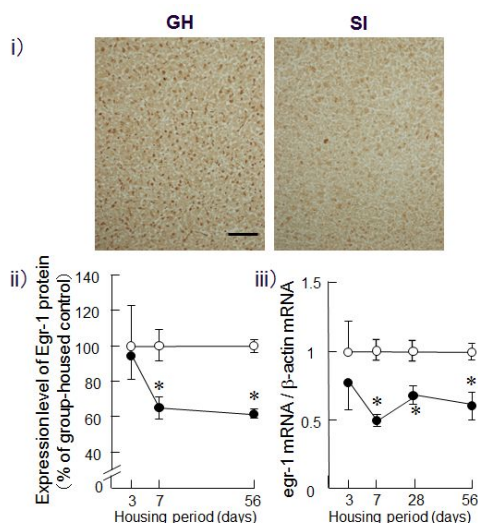


Fig. 1 SI-induced changes in Egr-1 expression in the frontal cortex. The 4-week-old mice were housed in group or socially isolated for 3–56 days before the experiments. i) Typical immunohistochemical images of Egr-1 expression in the frontal cortex. ii) Expression levels of Egr-1 protein analyzed from the data of immunohistochemistry. Scale bar: 100  $\mu$ m. iii) Changes in the level of Egr-1 mRNA quantitated by real-time PCR. Open and closed circles represent GH and SI group, respectively. \*P<0.05 vs. GH. (Matsumoto et al., Neurosci Res. 2012)

##### 2) SI で誘導される異常行動

SI 動物では隔離飼育開始 1 週間後より潜在学習行動試験で評価した注意力行動が GH 群と比べ有意に障害されることが明らかとなった。更に 1 週間隔離飼育後，5 週間群居飼育したマウスにおいても注意力行動の有意な低下が認められたことから，注意様行動の障害は持続性であることが示唆された (Fig.

2)。SI により誘導される注意様行動の障害は雌性マウスでも観察されたことから雌雄差がないことが解った。

一方，SI による攻撃性亢進は雄マウスでのみ観察されたことから注意様行動の障害は攻撃性亢進とは異なる脳内機構で発症すると考えられた。これらに加え，SI は改変型 Y 迷路試験や新規物体認知試験で評価した短期の作業記憶には影響を与えないものの，長期の文脈的記憶及び音条件付け恐怖記憶のような情動記憶の障害も明らかとなった。

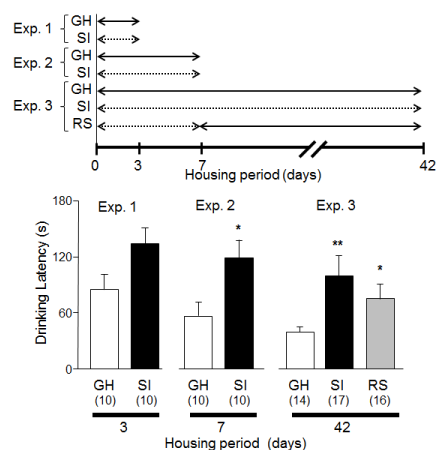


Fig. 2 Effects of SI and re-socialization on drinking latency in the water-finding test. The male mice housed in a group or socially isolated for 3 (Exp. 1), 7 (Exp. 2), and 42 days (Exp. 3) were used in the experiments. After a 1-week SI period, the animals were re-socialized by housing in group for 5 weeks. \*p<0.05, \*\*p<0.01 vs. the respective GH (Ouchi et al., Behav Brain Res. 2013)

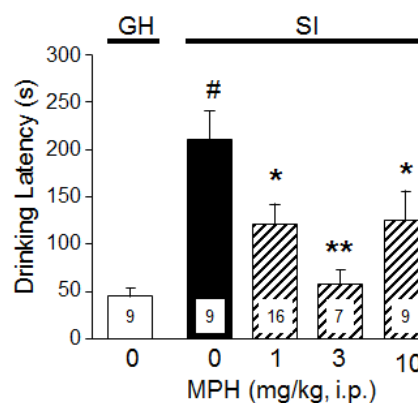


Fig. 3 The effect of methylphenidate (MPH) on SI-induced changes of drinking latency in the water finding test The water-finding test was conducted. The numbers of animals used are indicated in each column. #p<0.05 vs. GH mice. \*p<0.05, \*\*p<0.01 vs. saline-administered SI group. (Ouchi et al., Behav Brain Res. 2013)

ADHD 治療薬 MPH は隔離飼育動物の注意力を改善(Fig. 3)したが，長期記憶には無効であった。他方，コリンエステラーゼ阻害剤タ

クリンは長期記憶の障害を改善したほか、海馬内 Egr-1 発現量も回復させた。

### 3) SI で誘導される恐怖条件付け記憶障害の機構と関与する因子

SI で恐怖条件付け記憶が障害される機構を記憶の獲得と固定の段階で精査したところ、記憶の獲得よりも寧ろ固定の過程が障害されることが示唆された。更に SIS により海馬内シナプス可塑性に重要なシグナリング系蛋白である CREB, CaMKII, 及び NMDA/AMPA 型グルタミン酸受容体のリン酸化が低下することが明らかになり、Egr-1 シグナルに加え、シグナル伝達機構の機能低下が文脈的記憶や情動記憶の障害に関わる可能性が推測された。さらに SI で誘導される恐怖条件付け記憶の障害及び海馬内神経シグナリング・Egr-1 シグナリング系の機能低下は何れも THA 投与により改善されたことから、SI によりコリン神経系機能障害されることが解った。

### 4) SI で誘導される社会性低下

ADHD 症状に関連する指標として社会性に及ぼす SI の影響を検討するために、新規物体認知行動試験法の変法 (Fig. 4) を用い、社会性行動を解析した。その結果、GH 動物では明らかな社会性行動が認められたのに対し、SI 動物では障害されていることが明らかになった。一方、SI による社会性低下は MPH で改善されたほか、MPH で改善された社会性はドパミン D2 受容体拮抗薬で再び消失した (Fig. 4)。これらからドパミン系の機能変化が SI 動物における社会性低下の一因と考えられた。

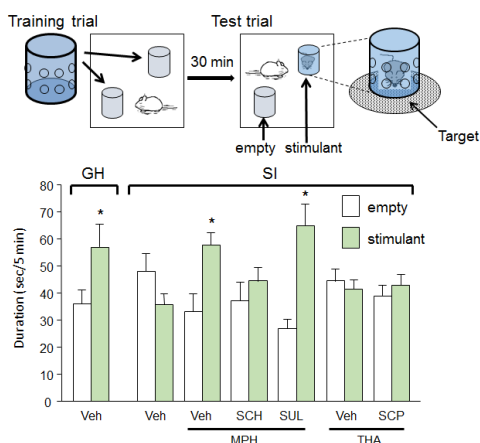


Fig. 4 SI-induced deficit in sociability and its reversal by MPH. In the training trial, animals were allowed to freely explore the arena in which two identical empty chambers were placed, and acclimatized to the experimental environment and procedure for 5 min. In the test trial, the time a mouse spent exploring around the stimulant and empty chambers was measured as an index of sociability. \* $p < 0.05$  vs. the time each mouse spent around the empty chamber (Okada et al., Neuroscience 2015)

### 5) 漢方薬酸棗仁湯の効果

上述の参照薬で得られた成績を踏まえ、漢方薬の有用性を検討した。酸棗仁湯 (SST) エキスをヒト臨床用量の約 10-45 倍の用量で投与した場合の SI 動物の ADHD 様症状に対する影響を 2 つの条件で調べた。まず隔離飼育開始 2 週間後に SST を単回投与して注意様行動を指標に調べて結果、障害に対する有意な改善は認められなかった。一方、隔離飼育開始 2 週間後より 2 週間、エキスを飲水投与したところ、用量依存性に注意様行動の障害が改善された (Fig. 5)。また同様に SST エキスを 3 週間投与しても注意様行動の障害は有意に改善されることが明らかになり、少なくとも継続的投与が重要であると考えられた。一方、小児や婦人の神経症、不眠症等に適用される甘麦大棗湯についても SI 動物の注意行動の障害に対する改善効果が認められた。

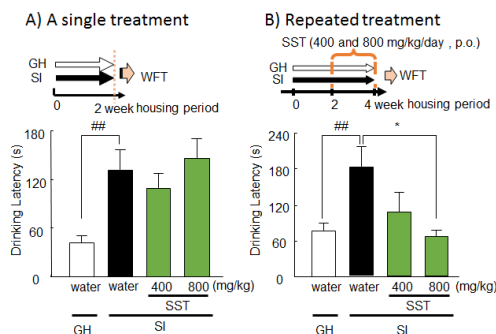


Fig. 5 Effects of SST on SI-induced deficit in attention deficit-like behavior in the water finding test (WFT). A: Two weeks after starting social isolation, SST at doses of 400-800 mg/kg was orally administered and then the WFT was conducted. B: The administration of SST was conducted for 2 weeks after starting SI. ## $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$  (Ouchi, Tsushima et al., unpublished data).

次に、改変型新規物体認知試験を用い SI 動物の社会性に対する SST の効果を、SST 投与開始の 2 週間後に調べた結果、有意に SI で消失した社会性を回復させることが解った。

一方、SI による文脈的恐怖記憶および音条件付け恐怖記憶 (情動記憶) の障害に対する SST の効果についても調べたところ、本方剤は恐怖記憶障害を改善する傾向もあり、大脳皮質及び海馬内 Egr-1 発現量を改善したことから、恐怖記憶の障害にも有効性が期待された。投与量や投与期間等についての更なる検討が必要であるが、少なくとも本方剤の作用に Egr-1 またはその発現系が重要であると推測された。また注意様行動及び社会性の障害に対して SST 等の漢方薬が一部、MPH 類似の効果を示したことから、その作用にドパミン神経系の機序が関与することが推測された。以上を考慮すると、SST が ADHD の少なくとも一部の症状の改善・予防に有用である

可能性がある。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 4 件)

- 1) Okada R., Fujiwara H., Mizuki D., Araki R., Yabe T., Matsumoto K.: Involvement of dopaminergic and cholinergic systems in social isolation-induced deficits in social affiliation and conditional fear memory in mice, *Neuroscience* 299: 134-145, 2015 (査読有り).
- 2) Okada R., Tsushima R., Fujiwara H., Tsunezama K., Matsumoto K.: Social isolation-induced fear memory deficits is mediated by down-regulated neuro-signaling systems Egr-1 expression in the brain, *Neurochem. Res.* 39: 875-882, 2014 (査読有り).
- 3) Ouchi H., Ono K., Murakami Y., Matsumoto K.: Social isolation induces deficit of latent learning performance in mice: a putative animal model of attention deficit/hyperactivity disorder, *Behav. Brain Res.* 238: 146-158, 2013 (査読有り).
- 4) Matsumoto K., Ono K., Ouchi H., Tsushima R.-H., Murakami Y.: Social isolation stress down-regulates cortical early growth response 1 (Egr-1) expression in mice, *Neurosci. Res.* 73: 257-262, 2012 (査読有り).

[学会発表](計 5 件)

- 1) Okada R., Han Y.Y., Fujiwara H., Tsushima R., Zhao Q., Araki R., Yabe T., Matsumoto K.: Kanbakutaisoto ameliorates social isolation rearing-induced deficits of sociability and fear memory in mice, 第 88 回日本薬理学会年会, 2015 年 3 月 18 日 ~ 2015 年 3 月 20 日, 名古屋国際会議場 (名古屋)
- 2) 岡田 亮, 藤原博典, 津島遼平, 李峰, 常山幸一, 松本欣三: 隔離飼育マウス行動障害に対する酸棗仁湯の改善効果の検討, 第 65 回日本薬理学会北部会, 2014 年 9 月 26 日 ~ 2014 年 9 月 27 日, コラッセふくしま (福島)
- 3) 岡田 亮, 松本欣三, 水木太脩, 藤原博典: 隔離飼育ストレスによる社会性及び恐怖記憶障害とその発症機序, 第 87 回日本薬理学会年会, 2014 年 3 月 19 日 ~ 2014 年 3 月 21 日, 仙台国際センター (仙台)
- 4) 岡田 亮, 藤原博典, 津島遼平, 李峰, 常山幸一, 松本欣三: 隔離飼育ストレスで誘発される恐怖条件付け記憶の障害とその発症機序, 第 64 回日本薬理学会北部会, 2013 年 9 月 13 日, 旭川市大雪

クリスタルホール (旭川)

- 5) Matsumoto K., Ouchi H., Tsushima R., Okada R., Fujiwara H.: Possible relationship between Egr-1 downregulation and behavioral abnormality in socially isolated mice, 第 86 回日本薬理学会年会, 2013 年 03 月 21 日 ~ 2013 年 03 月 23 日, 福岡国際会議場(福岡)

## 6. 研究組織

- (1) 研究代表者 松本 欣三

(MATSUMOTO KINZO)

富山大学・和漢医薬学総合研究所・教授  
研究者番号: 10114654

- (2) 研究分担者 常山 幸一

(TSUNEYAMA KOICHI)

徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部・教授  
研究者番号: 10293341

研究分担者 李 峰

(LE FENG)

富山大学・和漢医薬学総合研究所・助教  
研究者番号: 80623016