



正常動物を用いた薬効評価モデルの構築とその創薬応用

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2021-03-24 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 西富, 晃平 メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.24729/00017272

大阪府立大学大学院
総合リハビリテーション学研究科
博士論文

正常動物を用いた薬効評価モデルの構築と
その創薬応用に関する研究

Construction of drug efficacy evaluation model using
normal animals and its application to drug discovery

2021 年 3 月

西富 晃平

目次

要約	1
緒言	3
第 1 章 AD 治療薬標的分子 BACE1 阻害による A β 減少を野生型マウスで定量 できる評価系の構築	
I. 研究の背景	6
II. 材料と方法	
1. マウスおよびヒト A β の N 末端断端を認識する抗 A β 抗体の作成および その性状解析	7
2. 野生型マウスの内因性 A β 検出のための ELISA 評価系構築	8
3. 野生型マウス初代培養神経細胞を用いた研究	8
4. BACE1 KO マウスを用いた動物評価	9
5. BACE1 阻害剤を用いた動物評価	9
III. 結果	
1. マウスおよびヒト A β の N 末端断端を認識する抗 A β 抗体獲得とその性 状解析	10
2. 野生型マウス内因性 A β 検出のための ELISA 系構築	12
3. マウス初代培養神経細胞を用いたセクレターゼ阻害による内因性 A β 変 化の検出	14
4. BACE1 KO マウス脳内 A β 減少の検出	16
5. BACE1 阻害剤による野生型マウス脳内 A β 減少の検出	17
6. BACE1 KO マウスおよび BACE1 阻害剤による野生型マウスでの APP プロセッシング変化	18
IV. 考察	20

第2章 幼若正常ラットを用いた ADHD に対する薬効薬理評価系の構築

I. 研究の背景	24
II. 材料と方法	
1. 使用動物	25
2. 測定装置	25
3. T字型迷路を用いた遅延価値割引課題の手順	
1) 馴化フェーズ	26
2) トレーニングフェーズ	26
3) テストフェーズ	27
4. 薬物処置	27
5. 前頭前皮質及び海馬中の NA 量の測定	28
6. 統計解析	29
III. 結果	
1. ラット遅延価値割引課題に対するメチルフェニデート, アトモキセチンおよびグアンファシンの効果	29
2. グアンファシンの効果における $\alpha 2A$ アドレナリン受容体の関与	33
3. DSP-4 処置ラットでの遅延価値割引課題に対するグアンファシンとアトモキセチンの効果	35
IV. 考察	37
第3章 総括	40
文献	42
謝辞	51
利益相反	51

要約

正常動物を用いた創薬研究への応用を行うため、アルツハイマー病(AD)治療薬標的分子 β -site APP cleavage enzyme 1(BACE1)阻害によるアミロイド β ペプチド(A β)減少を野生型マウスで定量できる評価系の構築および幼若正常ラットを用いた注意欠如・多動症(ADHD)に対する薬効薬理評価系の構築を試みた。

AD 治療薬標的分子 BACE1 阻害による A β 減少を野生型マウスで定量できる評価系の構築では、BACE1 阻害による A β 産生抑制及びその阻害に伴う分子変化が、野生型マウスにおいて捉えられるか検討した。BACE1 はアミロイド前駆たんぱく質(APP)から A β を切断する責任酵素のひとつであるため、AD 治療における創薬標的となっている。通常、動物における A β 産生抑制評価は、主に家族性 AD 変異を有したヒト APP 遺伝子が導入され、A β が過剰産生するトランスジェニック(Tg)マウスが使用されている。一方で臨床では AD の 90%以上が家族性 AD 変異型 APP や A β の過剰発現を伴わない孤発性であることから、BACE1 活性阻害の生理的状況における脳内 A β 抑制作用や APP プロセッシングの解明が必要であると考えられた。しかし既存のサンドイッチ酵素免疫測定法(ELISA)ではマウス A β を感度良く測定するものはなかった。そこで、新規にマウス A β を感度良く定量するために必要な抗体作成を行った結果、マウス A β のアミノ(N)末端断端を認識する 14F1 を獲得した。14F1 を用いてサンドイッチ ELISA 系を構築し、マウス初代培養神経細胞での BACE1 阻害による A β 産生抑制評価、BACE1 ノックアウト(KO)マウス及び BACE1 阻害剤投与マウスでの脳内 A β 産生抑制評価が適切に実施できることを示した。さらに、BACE1 KO マウス及び BACE1 阻害剤投与マウスでの APP プロセッシング変化、即ち BACE1 阻害に伴う APP 切断経路の変化も検出可能であることを示した。以上のように、正常動物での BACE1 阻害による A β 産生抑制を評価できる系を構築するとともに、作用点となる APP プロセッシングも評価可能であることを明らかにした。

幼若正常ラットを用いた ADHD に対する薬効薬理評価系の構築では、正常動物を用いて既存 ADHD 治療薬の有効性を示せるか、さらに標的分子の作用機序も明らかにできるか検討した。これまで ADHD 治療薬を用いた多くの非臨床研

究が実施されてきたが、治療薬全てが一貫して有効性を示す予測妥当性を有する評価系はなかった。そこで、ADHD 患者で特徴的に認められる衝動的選択行動(我慢して手に入る大きな報酬より、小さくても目先の報酬を求める行動)に注目し、幼若正常ラットを用いて本行動を模倣した評価系の構築を目指した。本行動を ADHD 患者と同様の評価方法である遅延価値割引課題を用いて検討した結果、作用機序が異なる ADHD 治療薬全てにおいて、ラット衝動的選択行動の改善が用量依存的に認められ、ADHD 症状に対して有益な効果があることを非臨床で再現することができた。さらに、ADHD 治療薬、選択的 $\alpha 2A$ アドレナリン受容体アゴニスト作用を有するグアンファシンの作用機序の検討も本評価系を用いて行った。その結果、グアンファシンのラット衝動的選択行動の改善は、 $\alpha 2A$ アドレナリン受容体拮抗薬との併用により消失すること、さらにノルアドレナリン神経終末が破壊されたラットを用いた評価から、後シナプスの $\alpha 2A$ アドレナリン受容体を介した作用であることが示唆された。以上のように、幼若正常ラットを用いることで、非臨床からも作用点が異なる ADHD 治療薬に対し、ADHD 症状に対して有益な効果があることが再現できたこと、加えて作用機序解明においても、有益な情報が得られることを明らかにできた。

以上 2 つの研究から、正常動物を用いることで、効率的且つ適切な評価が実施可能であることを明らかにした。さらに、本研究で構築された評価系は、AD および ADHD の新たな創薬標的の妥当性検証にも活用でき、創薬研究への応用の可能性を示した。

キーワード: 正常動物, BACE1, $A\beta$, 衝動的選択行動, $\alpha 2A$ アドレナリン受容体

緒言

動物試験は、これまで医学や科学の発展に大きな役割を果たしてきた¹。医薬品研究開発において動物試験は新薬候補物質のヒトへの投与の前に欠かすことのできないものであり、ヒトでの安全性および有効性を予測するために必須である²。動物試験では、正常動物と疾患モデル動物が用いられる。一般的に、正常動物は新薬候補化合物の薬効、薬物動態および安全性評価に、疾患モデル動物は各種疾患の病態解明および薬効評価に特に大きな役割を果たしている。

疾患モデル動物は、系統飼育モデルのような自然発症型、正常動物に疾患症状を誘発する薬物あるいは特殊飼料の給餌、外科的手術などの処置、病原菌・微生物の接種など行った人工的なもの、そして遺伝子組み換え技術の応用による遺伝子導入や KO 動物に大別される³。疾患モデル動物を用いた試験成績は新薬候補化合物の薬効評価、既存薬との差別化のための根拠、臨床における投与量設定の根拠、臨床有効性試験の成功確率の推定において、大きな役割を果たしている。しかし、課題として、疾患モデル動物の作成や維持には、高度な技術や高いコストが必要となる場合があり、簡便且つ迅速性に問題があることが挙げられる。また疾患モデル動物には、ヒト病態や発症機構への類似性、薬効のヒトへの外挿性、データの再現性が求められるが、精神疾患などこれらを満たすモデル作製は困難である場合が多い。そのため創薬研究開発プロセスの状況に合わせて、疾患モデル動物だけでなく正常動物を用いた評価が可能であるなら、効率的な創薬プロセスの向上に繋がると考えられる。

そこで、著者は、創薬研究プロセスで必要とされる状況に応じて、正常動物を用いた適切な評価モデルを構築し、効率的な活用を試みた。本研究では、第1章において、AD 治療薬標的分子 BACE1 阻害による A β 減少を野生型マウスで定量できる評価系の構築、第2章において、幼若正常ラットを用いた ADHD に対する薬効薬理評価系の構築を行い、正常動物を用いた創薬研究への応用を試みた。以下に、それぞれの研究について目的を記述した。

第 1 章 AD 治療薬標的分子 BACE1 阻害による A β 減少を野生型マウスで定量できる評価系の構築

BACE1 は APP から AD 原因物質である A β を最初に切断する責任酵素であり、AD 治療における創薬標的となっている⁴。動物における A β 産生抑制評価は、主に家族性 AD 変異を有したヒト APP 遺伝子が導入され、A β が過剰産生する Tg マウスが使用されている⁵。これらの Tg モデルマウスは、AD 病理像の特徴のひとつである老人斑様の A β プラークそして認知機能障害を示すため、有用な疾患モデル動物と言える。一方で臨床では AD の大部分が家族性変異型 APP や A β の過剰発現を伴わない孤発性 AD である⁶。そのため、正確には、ヒト孤発性 AD と同様に変異や過剰発現を伴わない生理的状況下での BACE1 活性阻害による脳内 A β 抑制作用を検討する必要があると考えられた。しかし、これまで生理的状況下すなわち野生型マウスやラット A β を正確且つ感度良く測定できるサンドイッチ ELISA はなかった。加えて野生型動物で脳内 A β 抑制作用が検討できれば、簡便迅速に、医薬品候補のスクリーニングや新規標的分子検証も可能となる。そこで、新規にマウス A β を感度良く定量するために必要な抗体作成を行い、マウス A β サンドイッチ ELISA 系の構築、そして BACE1 阻害による検証を行った。

第 2 章 幼若正常ラットを用いた ADHD に対する薬効薬理評価系の構築

精神疾患の動物モデルは、その根底にある発症機構の解明や非臨床における新薬候補化合物の治療効果の予測を行う上において欠かすことができない。疾患モデルにおいて、ヒトと動物で観察される症状の類似性を示す表面妥当性、症状を引き起こす原因のヒトと動物の間の類似性を示す構成妥当性、そして臨床で見られる治療効果が動物においても同様に再現できることを示す予測妥当性の 3 つすべてを満たすことが理想的であると言われている^{7,8}。しかし、多くの精神疾患では、動物の脳内で起っている事とヒトの脳内で起っている事が等しいという証拠を見い出せないため、適切な疾患モデルを確立することは困難である。そのため、これまで表面妥当性を中心に疾患モデルが構築されてきたが、創薬には、精神疾患に対する新薬候補化合物の臨床効果を予測する予測妥当性を示すモデル動物が必要となる⁹。

ADHD の動物評価に関しても、ADHD 治療薬を用いた多くの非臨床研究がこれまで実施されてきたが、治療薬全てが一貫して有効性を示すといった、いわゆる予測妥当性を示すモデル動物は存在しなかった⁹。そこで、ADHD 患者で特徴的に認められる衝動的選択行動 (我慢して手に入る大きな報酬より、小さくても目先の報酬を求める行動)^{10,11} に注目し、幼若正常ラットを用いて本行動を模倣した評価系の構築、そして予測妥当性および治療薬薬理作用の検証を行った。

以下、これらの研究について記述した。

第 1 章 AD 治療薬標的分子 BACE1 阻害による A β 減少を野生型マウスで定量できる評価系の構築

I. 研究の背景

AD は、不可逆的な進行性の神経変性疾患であり、認知機能（思考力、記憶力、論理的推理力など）が障害される。病理学的所見として、著明な脳委縮があり、組織学的には、神経細胞の高度の消失、残存した神経細胞内の線維束(神経原線維変化)と多数の老人斑が特徴である¹²。AD の本態は、老人斑を構成する A β と呼ばれるペプチドが脳内に蓄積することであると考えられており(A β 仮説)、これは APP から A β が切り出されて重合し、形成することが知られている¹³。

A β の産生は、APP から β -セクレターゼおよび γ -セクレターゼと呼ばれる酵素によって段階的に、それぞれ A β の N およびカルボキシ(C)末端が切断される¹³。 β -セクレターゼの本態である BACE1 と呼ばれるアスパラギン酸プロテアーゼは A β 産生の切断開始に寄与し、AD 病理において重要な役割を果たしていることから¹⁴⁻¹⁶、AD 治療薬の創薬標的となっている⁴。

これまで、BACE1 阻害を含む A β 産生の抑制効果を動物で評価する際には、上記セクレターゼ切断部位周辺で発見された家族性 AD 変異を有するヒト型 APP 遺伝子が導入され、A β が過剰産生する Tg マウスが使用されている。しかしながら、臨床では AD の 90%以上が家族性 AD 変異 APP や A β の過剰発現を伴わない孤発性であるため、Tg マウスを用いた評価アプローチは最適ではない可能性がある⁶。特に、一般的に用いられる Tg マウスは、スウェーデン型 APP 変異(APP^{swe})が導入されており、この変異は野生型 APP と比較して 50 倍以上効率的に BACE1 によって切断されることが知られているため¹⁷、孤発性 AD に対する BACE1 阻害剤の作用を正確に評価できないという課題があった。そのため、生理学的状況における脳内 A β 抑制作用や APP プロセッシングの解明が必要であると考えられたが、これまで野生型マウスにおける A β 産生変化を感度良く測定するサンドイッチ ELISA の評価系は存在しなかった。そこで、新規に野生型マウス A β の ELISA 定量方法の確立を行い、BACE1 KO マウスおよび BACE1 阻害剤を用いて、野生型マウスでの生理的条件下における BACE1 活性阻害の解

析を行った。

II. 材料と方法

1. マウスおよびヒト A β の N 末端断端を認識する抗 A β 抗体の作成およびその性状解析

マウスおよびヒト A β の N 末端断端を認識する抗 A β 抗体を獲得するため、免疫原として、部分ペプチドである A β 1-16(DAEFRHDSGYEVHHQK) を用いた。本ペプチドの C 末端にシステイン残基を付加しキャリアプロテインであるウシチログロブリンを結合させてマウス (BALB/c, チャールズズリバー) 免疫 (50 μ g/マウス) を毎週行った。4-6 回の免疫後、脾臓を分離し、X63Ag8 骨髄腫細胞と融合させクローンを獲得した。

獲得クローン抗体のエピトープとマウスおよびヒトに対する交差反応性を確認するため、マウスおよびヒト A β の様々な断片がコーティングされた 96 well プレート (Maxisorp, Nunc, Rochester, NY, USA) に対し、37°C で 30 分間、さらに西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) 結合抗マウス IgG 抗体 (500 ng/mL, IBL 社) を加えてインキュベートし、最終的に o-フェニレンジアミン二塩酸塩基質 (Sigma, St Louis, MO, USA) を用いて各クローン抗体と各種 A β 断片との反応性を可視化した。

ウエスタンブロットティング解析では、合成 A β ペプチドおよび APP 過剰発現 Tg マウスである Tg2576¹⁸ (Taconic, Hudson, NY, USA) の脳ホモジネートに対する抗体の反応性を確認した。サンプルは 15% SDS-PAGE ゲルを用いて電気泳動された後、PVDF 膜に転写された。3% スキムミルクでブロッキングした後、PVDF 膜を抗 A β 抗体クローンである 14F1, 82E1 および 6E10 をそれぞれ 1.5, 1.0 および 1.0 μ g IgG/mL の濃度でプローブし、その後 HRP 結合抗マウス IgG でシグナルを検出した。

免疫組織化学的解析では、Tg2576 マウス脳内に形成される老人斑様の A β プラーク¹⁸ に対する反応性を確認した。Tg2576 マウスは 4% パラホルムアルデヒドを含む 10 mM リン酸緩衝生理食塩水 (PBS), pH 7.4 で灌流固定され、20% スクロースを含む 100 mM PBS, pH 7.4 で脱水した後、4 μ m の厚さの脳切片を作成

した. 連続脳切片を抗 A β 抗体クローンである 14F1, 82E1 および 6E10 をそれぞれ 2.0, 1.0 および 2.0 μg IgG/mL の濃度で 1% ウシ血清アルブミン(BSA)および 0.05%アジ化ナトリウムを含む PBS 溶液と 4°Cで一晩インキュベートし, その後ビオチン化抗マウス IgG および検出キット(Vectastain ABC Kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)を使用してシグナルを検出した.

2. 野生型マウスの内因性 A β 検出のための ELISA 評価系構築

A β 1-40 の C 末端断端を認識するクローン 1A10¹⁹ を固相化抗体として, 96 well プレート(Maxisorp, Nunc, Rochester, NY, USA)を用い, 4°Cで一晩コーティングした. 4°Cで一晩ブロッキングした後, 標準品(合成ペプチドであるマウス A β 1-40)と測定サンプルを添加し, さらに 4°Cで一晩インキュベートした. HRP を結合させたクローン 14F1 を検出抗体として, プレートをインキュベートし, TMB 基質を用いてシグナルを検出した. また, 全長 A β 1-40 に対する特異性を決定するために, A β 断片である 2-40 および 3-40 に対するシグナル反応性や, マウスおよびヒトの交差反応性を決定するために, マウス A β 1-40 およびヒト A β 1-40 に対する反応性を検討した.

3. 野生型マウス初代培養神経細胞を用いた研究

マウス初代培養神経細胞は, 発生 17-18 日目のマウス(ICR, Charles River)胎仔の脳皮質および海馬から調製された後, B-27 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)を含む NeuroBasal 培地で培養され, 培養 6 日目に検討に用いた. γ -セクレターゼ阻害剤である DAPT (Calbiochem, San Diego, CA, USA)²⁰ および BACE1 阻害剤である Inhibitor IV(Calbiochem, San Diego, CA, USA)²¹ は, DMSO に溶解され, 最終的に 1% DMSO となるよう培地で 100 倍希釈された. 細胞と各濃度の各阻害剤が 24 時間処置された後, 回収された培地中のマウス A β は ELISA によって測定された. また阻害剤による細胞毒性の有無は増殖/生存(MTT)アッセイ(WST-8 kit; Kishida Chemical, Japan)により評価された.

4. BACE1 KO マウスを用いた動物評価

野生型, ヘテロ接合型およびホモ接合型 (それぞれ BACE +/+, BACE +/-お

よび BACE^{-/-} の遺伝子型を持つ BACE1 KO マウス²² の脳サンプルを、それぞれ 11 週齢の雌マウス 3 匹から採取した。脳サンプルは、脳重量比で 10 倍量の buffer (プロテアーゼ阻害剤カクテル (Sigma) を含む 250 mM sucrose, 50 mM Tris-HCl buffer, pH7.6) でホモジナイズされた。

A β ELISA 測定においては、脳ホモジネートを最終濃度が 1% となるように CHAPS (Sigma) と混合し、100,000 g, 45 分間、4°C で遠心分離し、その上清を測定サンプルとした。

また APP プロセッシングを解析するため、全長 APP, 可溶性アミロイド前駆タンパク α (sAPP α) 並びに可溶性アミロイド前駆タンパク β (sAPP β) の分子変化をウエスタンブロットティング法により検討した。各分子のポジティブコントロールとして、組み換えタンパク質を作成し、マウスモノクローナル抗 sAPP α 抗体 (clone 2B3, 5 μ g IgG/mL, IBL), ラビットポリクローナル抗 sAPP β 抗体 (2 μ g IgG/mL, IBL) およびラビットポリクローナル抗 APP C 末端認識抗体 (5 μ g IgG/mL, IBL) の特異性評価に用いた。

BACE1 KO マウス脳での sAPP β および sAPP α 検出においては、脳ホモジネートを最終濃度が 0.4% となるようジエチルアミンと混合し、100,000 \times g で 45 分間、4°C で遠心分離した。得られた上澄み液を SDS サンプルバッファーと混合し、15% SDS-PAGE ゲルを用いて電気泳動し、その後 PVDF 膜に転写した。非特異的結合を軽減するため、PVDF 膜を 3% スキムミルクでブロッキングした後、上記の抗 sAPP α 抗体あるいは抗 sAPP β 抗体を 1 次抗体として一晩プローブし、その後 HRP 結合 2 次抗体と室温で 2 時間インキュベートし、化学発光キット (Pierce, Rockford, IL, USA) を用いてバンドシグナルを検出した。バンドシグナルはデンシトメトリー分析装置 (Quantity One, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) で解析され、統計的有意性を t 検定で判定した。

5. BACE1 阻害剤を用いた動物評価

8 週齢 (体重 34.8 \pm 1.5g) の野生型雄マウス (ICR, Charles River) をコントロール群および薬物治療群で各 10 匹使用した。生理食塩水または BACE1 阻害剤である Inhibitor IV²¹ をブレグマから後方 0.7 mm, 横 1.8 mm, 深さ 2.5 mm の位置に、マウス 1 匹あたり生理食塩水または 10 μ g の Inhibitor IV を含む 2 μ l の

40%DMSO 溶液を脳室内投与した。投与 4 時間後、脳採取を行い、BACE1 KO マウスと同様の方法で A β ELISA 測定用およびウエスタンブロッティング解析用サンプルをそれぞれ調製した。

III. 結果

1. マウスおよびヒト A β の N 末端断端を認識する抗 A β 抗体獲得とその性状解析

多数のクローンをスクリーニングし、マウスおよびヒト A β の N 末端断端を認識する抗 A β 抗体として、クローン 14F1 を選抜した。様々な A β 断片を使用したプレートアッセイにより、14F1 のエピトープは A β のアミノ酸残基 1-4 (DAEF) であることがわかった。なお、本研究で用いた A β 抗体の一覧を表 1 に示す。

表 1. 本研究で用いた抗 A β 抗体

Antibodies		
Clone	Subclass	Specificity, human/rodent cross reactivity
14F1 ^a	IgG1	N-terminus end region-specific (Epitope: Abeta 1–4) Strong preference for mouse Abeta
82E1 ^b	IgG1	N-terminus end-specific (Epitope: Abeta 1–5) Strong preference for human Abeta
12B2 ^b	IgG1	Middle region-specific (Epitope: Abeta 17–28) Fully cross-reactive to human and rodent Abeta
1A10 ^b	IgG1	C-terminus end-specific (Epitope: Abeta 35–40) Fully cross-reactive to human and rodent Abeta

^a 図 1 および 2 を参照. ^b 文献 19 を参照.

次に、14F1 のマウスおよびヒト A β に対する交差反応性について、図 1 に示す。14F1 は、ヒトとマウスの両方の A β 合成ペプチドを検出するが、マウス A β に強く反応した (図 1 (iii), レーン H および M)。一方、陽性対照として用いた N 末端断端抗体である 82E1 (エピトープ : 1-5) および市販されている N 末端認識抗体である 6E10 (エピトープ : 3-8) は、ヒトに特異的な 5 番目のアミノ酸残基(DAEFR)がそれらのエピトープ内にあるためヒト A β に強く反応した (図 1 (i) および ii), レーン H および M)。これらの抗体は何れも APP 過剰発現 Tg マウスである Tg2576 脳ホモジネート中のヒト A β に対して反応性を示した (図 1, レーン Tg)。合成 A β ペプチドの結果同様、14F1 の Tg2576 脳サンプル中のヒト A β への反応性は、82E および 6E10 よりも弱かった。また 14F1 は、82E1 と同様に APP に対して反応性を示さなかった。この結果は、14F1 が A β N 末端断端抗体であることを示している。

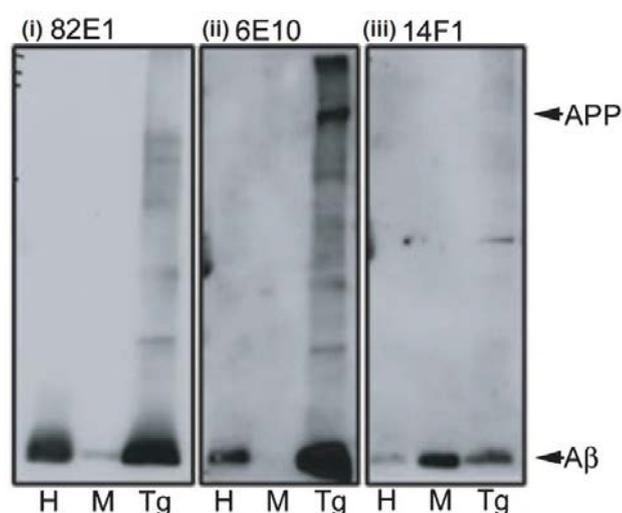


図 1. 14F1 のマウスおよびヒト A β に対する交差反応性. 合成ヒト(レーン H) およびマウス(レーン M)A β 並びに Tg2576 脳ホモジネート(レーン Tg)を用いて、APP および A β に対する反応性を調べた. 陽性対照抗体として、82E1 および 6E10 を用いた.

次に、Tg2576 マウス脳内に形成される老人斑様の A β プラークに対する 14F1 の反応性について、図 2 に示す。14F1 は、Tg2576 マウス脳連続切片において、82E1 および 6E10 と同様に A β プラークに対して反応性を示した。

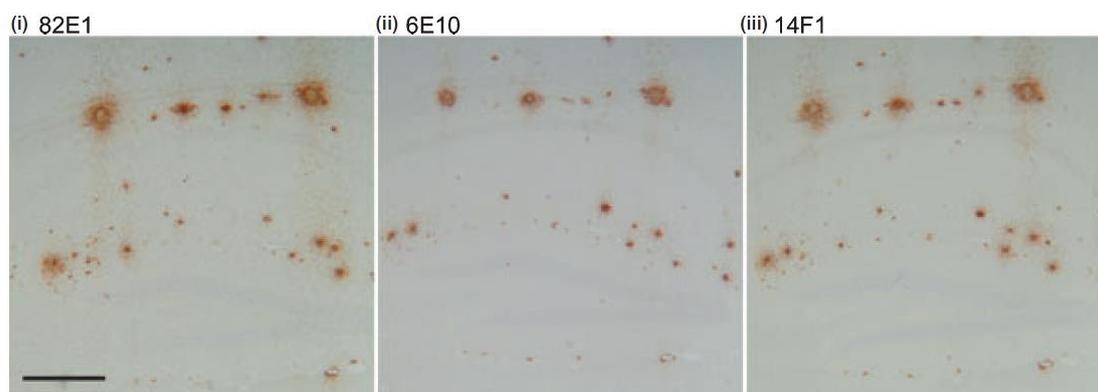


図 2. 14F1 の A β プラークに対する反応性。 Tg2576 マウスの脳連続切片を用いて、A β プラークに対する反応性を調べた。陽性対照抗体として、82E1 および 6E10 を用いた。図中の線は 200 μ m.

2. 野生型マウス内因性 A β 検出のための ELISA 系構築

次に、14F1 抗体を用いて、BACE1 阻害により抑制されるマウス A β を感度良く定量できるサンドイッチ ELISA の構築を行った。本研究で構築した 2 つの A β ELISA, 14F1 / 1A10 および 12B2 / 1A10 について、表 2 および図 3 に示す (各抗体の詳細は表 1 を参照)。12B2 / 1A10 で構成される ELISA は、ヒトとマウスの A β を同等に検出し、野生型マウスの脳ホモジネート中の内因性 A β を検出した。しかし、12B2 のエピトープ (エピトープ : 17-28) は、 α -セクレターゼと γ -セクレターゼの切断部位の間に位置している。したがって、12B2 / 1A10 ELISA は、 β -セクレターゼと γ -セクレターゼで切断される A β に加え、 α -セクレターゼと γ -セクレターゼの切断により産生される P3 と呼ばれるペプチド断片も検出する¹⁹。一方で、14F1 / 1A10 で構成される ELISA は、14F1 のエピトープが A β アミノ酸残基 1-4 の間にあり、且つ A β N 末端断端を認識し、1A10 が A β の C 末端断端 (エピトープ : 35-40) を認識するため、全長 A β 1-40 を検出する。全長 A β 1-40 に対する特異性を確認するため、A β 断片である A β 2-40 および 3-40 を用いて交差性を調べた結果、それぞれ 0.78% および 0.08% であった。またマウス A β 1-40 に

対する 14F1/1A10 ELISA の測定感度は、一桁台の fmol/mL (約 1 pg/ml) であり、マウス初代培養神経細胞の培養液および野生型マウス脳ホモジネート中の内因性全長 Aβ1-40 を検出した(図 4, 5 および 6).

表 2. 本研究で構築した Aβ ELISA

ELISAs	
Antibody combination	Specificity
14F1/1A10	Single digit fmol/mL sensitivity (equivalent to sub single digit pg/mL) Specific to full-length Abeta 1-40 Cross-reactivity to Abeta 2-40 and 3-40 is 0.78% and 0.08%, respectively
12B2/1A10	Single digit fmol/mL sensitivity (equivalent to sub single digit pg/mL) Detect Abeta x-40 including P3 ₄₀ fragment

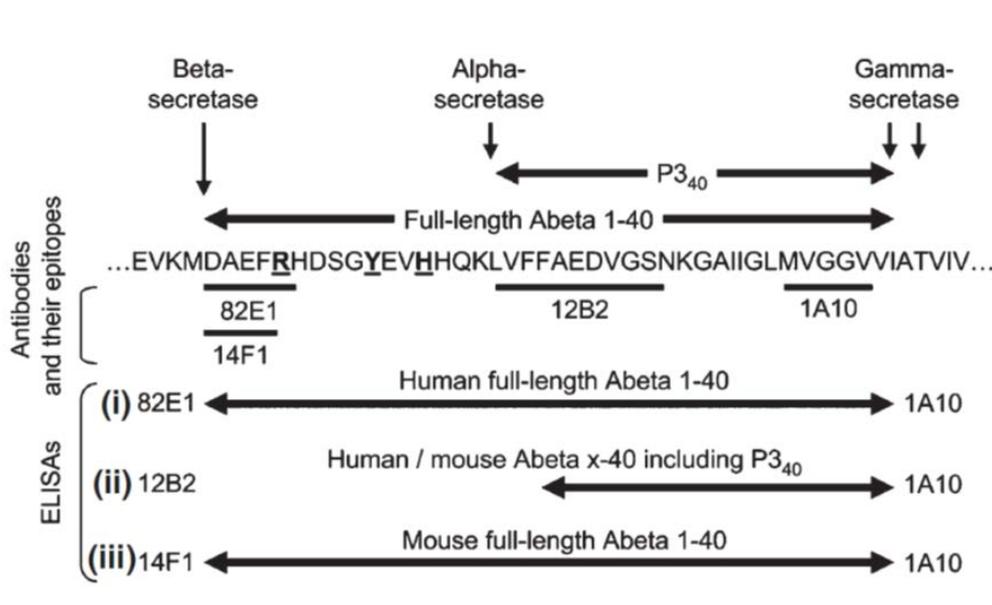


図 3. ELISA に用いた各抗体エピトープと検出可能な Aβ 種の相違. Aβ アミノ酸配列上の太字下線部で記載された 5, 10 および 13 番目のアミノ酸残基はヒト (5 ; R, 10 ; Y, 13 ; H) とマウス (5 ; G, 10 ; F, 13 ; R) で異なっている.

3. マウス初代培養神経細胞を用いたセクレターゼ阻害による内因性 A β 変化の検出

マウス初代培養神経細胞を用いて、 β および γ -セクレターゼ阻害剤である Inhibitor IV²¹ および DAPT²⁰ それぞれの A β 産生抑制作用を検討した。各阻害剤を処置した培養液中の A β は、2つの A β ELISA, 14F1/1A10 および 12B2/1A10 により測定された。その結果を図 4 に示す。 γ -セクレターゼ阻害剤で処置された初代培養神経細胞では、全長 A β 1-40 (14F1 / 1A10) および P3 交差反応性 A β x-40 (12B2/1A10) A β ELISA の両方で、同様の結果が得られた(図 4a)。BACE1 阻害剤の場合 (図 4b), P3 交差反応性 A β x-40 ELISA (12B2/1A10) によって検出された A β 量は、14F1/1A10 ELISA によって決定された全長 A β 1-40 よりも常に高かった。処置した最高濃度の 1 μ M では、全長 A β 1-40 ELISA は A β 産生の完全な阻害を示したが、P3 交差反応性 A β x-40 ELISA は 67%の A β 減少のみを示した(図 4b, 両矢印はこの相違を示す)。このとき、阻害剤全ての処置濃度における細胞毒性は、コントロール処置細胞の 10%未満であり、阻害剤の細胞毒性自身の影響はなかった。

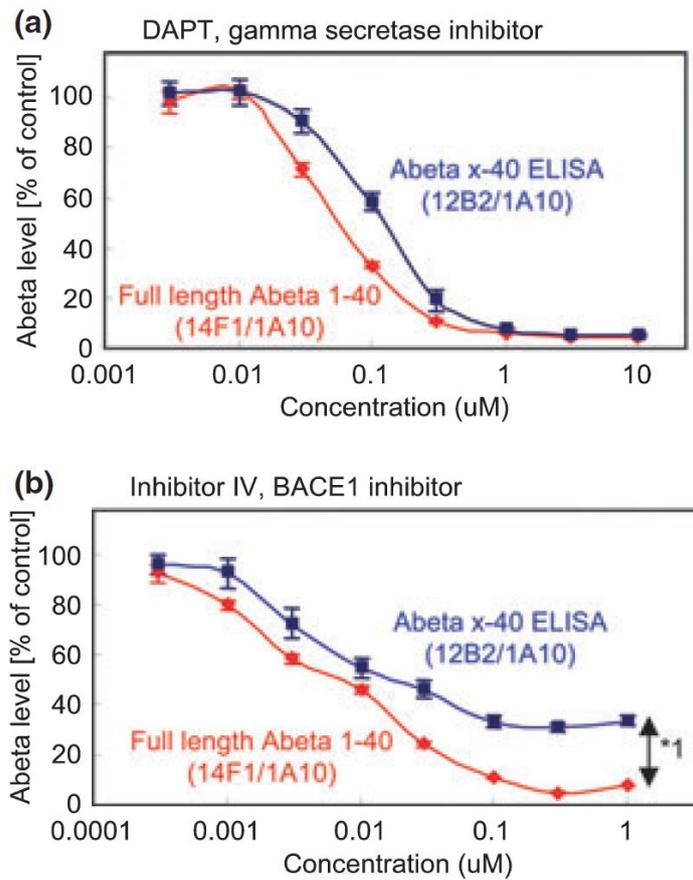


図 4. マウス初代培養神経細胞における β および γ -セクレターゼ阻害剤の $A\beta$ 減少作用. 各セクレターゼ阻害剤 (a: DAPT, b: Inhibitor IV)は 24 時間処置され, その細胞培養液中の全長 $A\beta$ 1-40 および $A\beta$ x-40 量は, それぞれ 14F1/ 1A10 (赤線) および 12B2/1A10 (青線) の ELISA により測定された.

4. BACE1 KO マウス脳内 A β 減少の検出

BACE1 KO マウスの脳内 A β を、14F1 / 1A10 および 12B2 / 1A10 ELISA を用いて測定した結果について、図 5 に示す。全長 A β 1-40 ELISA(14F1 / 1A10) において、BACE1 KO マウス(BACE1 -/-)脳ホモジネート中の A β シグナルを示す測定波長 450 nm の吸光度 (OD)(OD = 0.067-0.073) は、測定系のバックグラウンド値 (OD = 0.055-0.071) と変わらず、全長 A β 1-40 は 100 %消失していた。BACE1 ヘテロ接合型マウス(BACE1 +/-)の全長 A β 1-40 量は、野生型マウス(BACE1 +/+)と実質的に同じであった。一方、P3 交差反応性 A β x-40(12B2 / 1A10) A β ELISA において、BACE1 KO マウス(BACE1 -/-)脳ホモジネート中の A β 量は、野生型マウス(BACE1 +/+)と比較して有意な減少 ($p < 0.01$) ではあったが、33 %の減少のみであった。

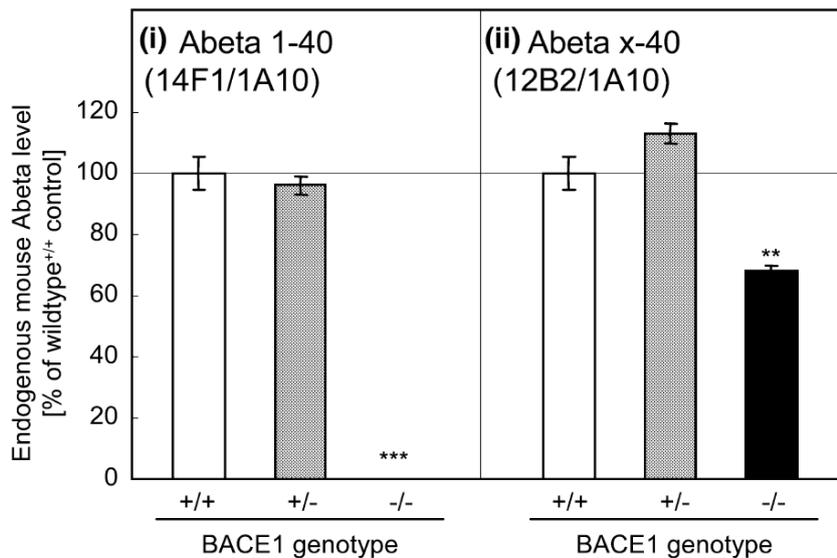


図 5. 遺伝的 BACE1 阻害によるマウス脳内 A β 減少の作用. 野生型(+/+), ヘテロ接合型(+/-)およびホモ接合型(-/-)マウス脳ホモジネート中の全長 A β 1-40 および A β x-40 量は、それぞれ 14F1/ 1A10 および 12B2/1A10 の ELISA により測定された。*** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ を示す(野生型マウス群との比較)

5. BACE1 阻害剤による野生型マウス脳内 A β 減少の検出

BACE1 阻害剤である Inhibitor IV を脳室内に投与した野生型マウスの脳内 A β を、14F1/1A10 および 12B2/1A10 ELISA を用いて測定した結果について、図 6 に示す。全長 A β 1-40 ELISA (14F1 / 1A10) では、BACE1 阻害剤投与群の全長 A β 1-40 量は、コントロール投与群と比較して、30%の有意な減少 ($p < 0.01$) が認められた。一方、P3 交差反応性 A β x-40 (12B2/1A10) A β ELISA では、BACE1 阻害剤投与によって、有意な A β 減少作用は認められなかった (13%の減少)。なお Inhibitor IV は脳内移行性が不十分なため、100 mg/kg 皮下投与時においても脳内 A β 減少は認められなかった。

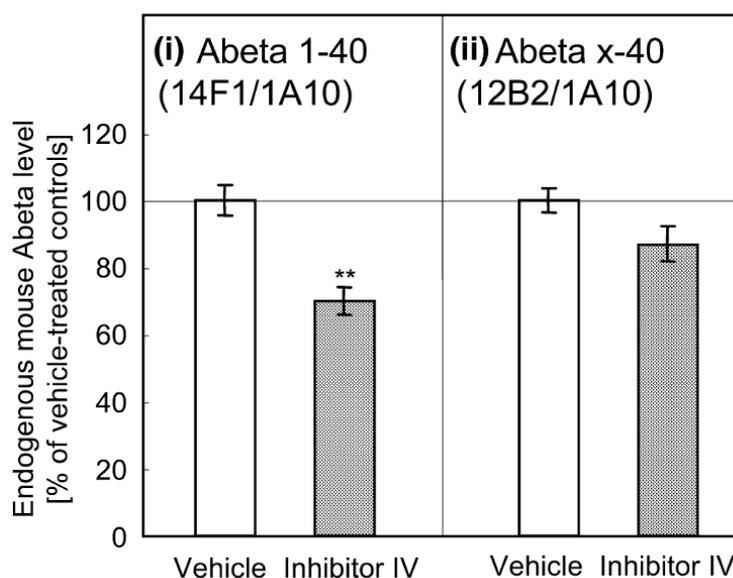


図 6. BACE1 阻害剤によるマウス脳内 A β 減少の作用. Inhibitor IV を脳室内投与した野生型マウスの脳ホモジネート中の全長 A β 1-40 および A β x-40 量は、それぞれ 14F1/1A10 および 12B2/1A10 の ELISA により測定された。** $p < 0.01$ を示す (Vehicle 投与群との比較)

6. BACE1 KO マウスおよび BACE1 阻害剤による野生型マウスでの APP プロセッシング変化

BACE1 阻害による APP プロセッシングの変化が、野生型マウスにおいて検出できるか、sAPP α および sAPP β に特異的な抗体を用いて、ウエスタンブロッティングにより検討した。その結果を図 7 に示す。最初に、sAPP α および sAPP β 抗体の特異性を、sAPP α , sAPP β および APP の組み換えタンパクを用いて検証した結果、sAPP α および sAPP β 特異的抗体は、互いに交差反応せず、未切断の APP に反応性を示さなかった(図 7a)。次に、BACE1 KO マウスおよび BACE1 阻害剤が投与された野生型マウスでの APP プロセッシング変化を検討した (図 7b)。BACE1 KO マウス(BACE1 $-/-$)の sAPP β は、タンパク質バンドが検出できず、完全に消失していた。一方、sAPP α は、野生型マウスと比較して 250 %増加し、この増加は有意であった ($p < 0.001$) (図 7b)。また BACE1 阻害剤である Inhibitor IV の脳室内投与によっても、有意な sAPP β 減少と sAPP α 増加が認められ、それぞれ 59 %の減少 ($p < 0.01$) および 60%の増加 ($p < 0.05$)であった。

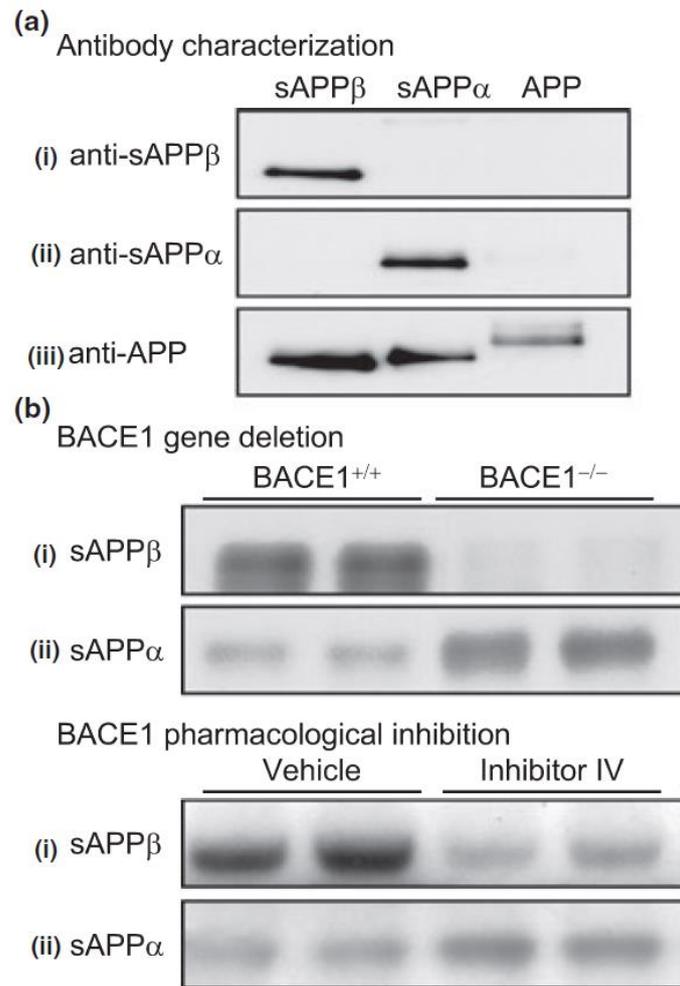


図 7. BACE1 阻害による APP プロセッシングの変化. (a) 組み換え sAPP α , sAPP β および APP を用いた sAPP α および sAPP β 抗体の特異性評価. (b) BACE1 KO マウス (n = 2) および BACE1 阻害剤, Inhibitor IV を脳室内投与した野生型マウス (n = 2) の脳ホモジネート中の sAPP α および sAPP β の変化.

IV. 考察

β -および γ -セクレターゼは AD の有望な治療標的であり、一般的に変異型ヒト APP を過剰発現する Tg マウスを用いて、これら阻害剤の評価が行われている。しかし、遺伝子変異により $A\beta$ の産生が増加する早期発症型 AD の症例は、AD 全体のわずか 5 %以下であり⁶、また APP 発現が孤発性の AD 症例で増加している明確な証拠はない。従って、生理学的に適切な条件下で、すなわち生理学的 APP 発現を有するマウスで治療薬候補を評価することが重要となる。著者らは、以前の研究で、 $A\beta$ N 末端断端抗体であるクローン 82E1 を作成し、C 末端抗体と組み合わせて全長 $A\beta$ を検出する ELISA を開発した¹⁹。しかし、82E1 はエピトープ内にヒト固有の 5 番目のアミノ酸残基を含み、野生型マウス脳内の内因性 $A\beta$ を検出するのに十分な感度がなかった。また、6E10 を含む多くの $A\beta$ N 末端抗体に関しても同様であった。本研究では、 $A\beta$ ペプチドのアミノ酸残基 1-4 内にエピトープを持つ N 末端断端抗体であるクローン 14F1 を作成した。 $A\beta$ のアミノ酸残基 1-4 はヒトとマウスで同一にもかかわらず、14F1 はマウス $A\beta$ に強く反応した。この結果は、ヒトとマウスの全長 $A\beta$ のコンフォメーションの違いにより、14F1 の反応性の相違が生じたと考えられる。この 14F1 と $A\beta$ 40 C 末端断端抗体である 1A10 で構成される ELISA (14F1/1A10)は、野生型マウス脳ホモジネート中の内因性全長 $A\beta$ 1-40 を検出することに成功した。本結果は、野生型マウスの全長 $A\beta$ の変化を検出できる ELISA の初めての報告となる。

また BACE1 阻害に対する正確な評価を行う上での有用性が本研究で示された。 γ -セクレターゼ阻害剤である DAPT²⁰は、マウス初代培養神経細胞で用量依存的に $A\beta$ 産生を減少させ、1 μ M で $A\beta$ 産生を完全に抑制させた。全長および P3 交差反応性 ELISA (それぞれ 14F1 / 1A10 および 12B2 / 1A10) は、 γ -セクレターゼ阻害剤 (DAPT) を用いた実験で同様の結果を示した。一方で、BACE1 阻害剤は、用量依存的に全長 $A\beta$ を有意に減少させたが、P3 交差反応性 x-40 ELISA では、動物実験での BACE1 阻害による APP プロセッシング変化で観察されたように、代償的な α -セクレターゼ切断の増加による P3 生成増加が原因で、完全な $A\beta$ 減少は認められなかった。これと同様の結果が、BACE1 KO マウスおよび BACE1 阻害剤による野生型マウスの内因性 $A\beta$ 検出でも認められた。過去の報

告でも、 α -セクレターゼと β -セクレターゼが APP 基質切断において競合することから²³、特に BACE1 阻害の評価をする場合、全長 A β のみの測定を行うべきと言える。

APP 切断には、主に 2 つのカスケードがあり、3 つのセクレターゼが関与している。 β -セクレターゼは、APP を切断して sAPP β と C99 断片を生成し、次に γ -セクレターゼは C99 を切断して A β を生成する。もうひとつの主なカスケードは、 α -セクレターゼが APP を切断し、sAPP α と C83 フラグメントを生成し、次に γ -セクレターゼは C83 を切断して P3 を生成する。さらに、これらの主な切断部位に加えて、異なる部位での切断が知られている。BACE1 を過剰発現する細胞では、A β の N 末端部位の切断だけでなく、A β ドメイン内のアミノ酸残基 10 と 11 番目の間で切断が起きる^{15,24,25}。本研究で用いた 12B2/1A10 ELISA は、野生型マウス脳ホモジネート中の内因性 A β を検出できたが、ただし、P3 断片 (A β 17-40) と交差反応する。別の市販されているマウス交差反応性 A β ELISA²⁶ には、A β のアミノ酸残基 11-16 内にエピトープを持つ BNT77²⁷ が含まれるが、本 ELISA は P3 と交差反応しないものの、A β 11-40 断片を検出する。野生型マウス全長 A β 1-40 以外の断片も検出することは、A β 低下治療戦略、特に BACE1 阻害に対する正確な評価を行う上では望ましくない。このことから、新しく開発された 14F1/1A10 ELISA は、利用価値が高く、A β 低下治療戦略を評価する上で、正確で有用な結果を提供することができると考えられる。

治療標的としての BACE1 に対する有用な情報も本研究で示された。BACE1 の酵素活性或いはタンパク質発現が孤発性 AD 脳で上昇していることから²⁸⁻³⁰、BACE1 は標的分子として、精力的に治療薬開発がされている。本研究で、BACE1 KO マウスの内因性全長 A β が完全に消失していることから、BACE1 が A β 産生に主に関与していることを再確認した。一方、完全な BACE1 遺伝子欠失 (BACE1 -/-) とは違い、ヘテロ接合型 BACE1 KO (BACE +/-) では、A β 産生変化はなかった。この結果は以前の報告と異なっており、ヘテロ接合型 BACE KO マウスを APP^{swE} 変異過剰発現 Tg マウスと交配し、A β 量が検討された報告では、A β プラーク出現前の段階で、A β 量はわずかに減少していた (~20%)³¹。また siRNA を用いた海馬内注射による一過性の BACE1 遺伝子発現抑制の検討では、APP^{swE} Tg マウスの A β 量を減少させた^{32,33}。このように、過剰な基質 (APP) の条件下で

は、BACE1 は抑制作用に対してより敏感となり、A β 産生抑制作用への影響は誇張される可能性がある。 γ -セクレターゼ阻害の場合においても、基質の量が A β 産生減少作用に影響を及ぼすことが知られている。 γ -セクレターゼ阻害剤である BMS-299897 は、生理学的な APP 発現を伴うモルモット^{34,35} や APP-YAC マウス³⁶ と比較して、APP 過剰発現 Tg マウスで高い有効性を示した。これは、APP を過剰発現する Tg マウスでセクレターゼ阻害の評価を行うと、誤った有効性予測が得られる可能性があることを示唆している。特にスウェーデン型の突然変異 APP^{swe} は、非常に効率的な BACE1 基質（野生型と比較して 50 倍以上）であり¹⁷、結果の解釈に注意する必要がある。従って、APP 過剰発現 Tg マウスは、病理学的あるいは行動学的観点からの評価に不可欠であるが、化合物評価の結果に対する APP 過剰発現や変異の影響を慎重に考慮する必要がある。

本研究では、14F1 / 1A10 ELISA を用いることで、BACE1 KO マウスおよび BACE1 阻害剤による野生型マウスの内因性 A β 量低下を正確に評価することができた。本結果は、タンパク質発現阻害および酵素阻害と両方のアプローチが治療的価値を持つ可能性があることを示唆している。ヘテロ接合遺伝子の欠失は内因性 A β 量を低下させなかったため、実質的な A β 減少には 50%を超える BACE1 タンパク質量低下がおそらく必要と考えられる。酵素阻害剤である Inhibitor IV（マウス初代培養神経細胞の 50%阻害濃度(IC₅₀)は 6 nM）は、有意ではあるが、30%減少のみの有効性にとどまった。AD 臨床効果にどれだけの A β 減少が必要であるか現時点では不明だが、目標値に対して正確に評価できる系が、化合物探索には望まれ、本研究で開発した 14F1 / 1A10 ELISA を用いた野生型動物を用いた評価は、有用であると考えられる。また BACE1 阻害は、野生型マウスで sAPP α 量を増加させた。sAPP α は、神経栄養性および神経保護作用を有することが報告されている³⁷⁻³⁹。つまり、BACE1 阻害は有害な A β を減少させるだけでなく、結果として生じる代償的な sAPP α 増加によっても好ましい効果をもたらすことが示唆される。

以上、本研究により、生理学的 APP 発現を伴う野生型マウスを使用した A β 低下戦略に必要な評価が可能となった。また APP 過剰発現 Tg マウス評価で生じる、BACE1 阻害を始めとする A β 低下戦略の治療効果を誇張する可能性を回避できるため、野生型動物での評価が不可欠である可能性を示した。マウスとラッ

ト A β アミノ酸配列は同一であるため、14F1/1A10 ELISA は、創薬研究で一般的に使用されるラットに対しても適用可能である。これらは、Tg マウス作成、維持或いは使用に伴う時間やコストを大幅に削減でき、容易且つ正確に候補化合物を評価できる利点をもたらす。野生型動物は、病理学のおよび行動学的な特徴を示さないが、初期評価として最適と考えられ、今後の治療薬開発は、野生型動物とモデル動物を利用目的に合わせて共に活用し、効率的な創薬実施に繋がると期待される。

第2章 幼若正常ラットを用いた ADHD に対する薬効薬理評価系の構築

1. 研究の背景

ADHD は、不注意および/または、多動・衝動性を顕著に示す行動パターンが複数の環境において持続的に見られ、それが日常生活、学習、社交、職業機能の著しい妨げとなっている病態である⁴⁰。小児の約半数が、成人においても持続し、成人にも認められる症状でもある⁴¹⁻⁴³。治療薬には、アンフェタミン、メチルフェニデート、アトモキセチンおよびグアンファシンがある。これら治療薬は、臨床で偶然にも有効性が発見された。アンフェタミン、メチルフェニデートおよびアトモキセチンは、ドパミン(DA) および/または ノルアドレナリン(NA)トランスporterを阻害することで、DA および NA 作動性神経伝達を増強する⁴⁴。選択的 $\alpha 2A$ アドレナリン受容体アゴニストであるグアンファシンは、上記薬剤とは異なり、DA または NA トランスporterに対して親和性を示さない^{45,46}。

治療薬の薬理作用あるいはヒトと動物研究から⁴⁷⁻⁴⁹、病態への DA や NA の関与が示唆されるが、ADHD 発症の原因は完全には解明されていない。そのため、治療薬すべて一致して有効性を示す、すなわち臨床予測妥当性がある *in vivo* 評価系はこれまで確立されておらず、新規治療標的の開発も進んでいない⁹。そこで、ADHD 患者で特徴的に認められる衝動的選択行動 (我慢して手に入る大きな報酬より、小さくても目先の報酬を求める行動) に注目し、幼若正常ラットを用いて、本行動を模倣した評価系の確立を目指した。本行動は ADHD 患者と同様の方法となる遅延価値割引課題により評価された。実際にメチルフェニデートが、ヒト^{50,51} と動物⁵²⁻⁵⁵ で遅延価値割引課題における衝動的選択行動の改善を示すことが報告されており、本課題を用いた評価は、ヒトと動物の橋渡し確度が高いと考えられた。本研究では、最初に予測妥当性、すなわち作用機序が異なるグアンファシンを含む既存 ADHD 薬で効果を示すかどうか検証し、さらに本評価系を用いて作用機序解析が可能であるか、選択的 $\alpha 2A$ アドレナリン受容体アゴニストであるグアンファシンを用いて検討を行った。

II. 材料と方法

1. 使用動物

幼若雄性 Wistar ラットは、14 日齢で Charles River Laboratories Japan から入手し、21 日齢で離乳、25 日齢で馴化、その後 29 日齢までトレーニングされ、32～36 日齢で薬剤投与された。ラットは、制御された環境条件下（ 23 ± 1 °C ; 12 : 12 時間の明暗サイクル）でケージごとに 2-3 匹飼育された。またラットは、パフォーマンスを確保するため以前の研究^{52,53}に従って Charles River Laboratories Japan の成長曲線に基づいて、自由摂食体重の約 80%の体重を維持するため、給餌制限された。体重の減少にもかかわらず、ラットは健康であり、正常な行動を示した。本実験は実験動物ケア評価認証協会(AAALAC)認証施設で、塩野義動物実験適正委員会承認の下、実験動物倫理規則に従い実施された。薬物治療と対照群は、体重および大報酬の選択数によりランダムに割り当てられた。

2. 測定装置

T 字型迷路は、以前の研究^{52,53}で用いられたものを少し改変して構築された。T 字型迷路装置の概略について、図 8 に示す。2 つの透明なプラスチックボックス（スタートと選択領域;長さ 10 cm × 幅 10 cm × 高さ 10 cm）、2 つの長方形の黒いプラスチック製ゴールボックス（長さ 18 cm × 幅 30 cm × 高さ 10 cm）、灰色のプラスチックチューブ（内径 7.5 cm）で作られた 3 本のアーム、このうちスタートアーム（長さ 30 cm）はスタートボックスから選択ボックスを繋ぎ、2 つのゴールアーム（長さ 35 cm）は、それぞれが選択ボックスとゴールボックスを繋いでいる。遅延価値割引課題中に報酬へのアクセスを遅延させるために使用された取り外し可能な灰色のプラスチックギロチンドアは、ゴールアームの両端に配置された（図 8 の B および C）。またスタートアームの入り口にもドアが設置された（図 8 の A）。各試行の前に、小さな報酬が右または左のゴールボックスのフードウェル内に配置され、大きな報酬がもう一方のゴールボックスに配置された。小さな報酬と大きな報酬は、それぞれ 1 つと 5 つのフードペレット(20 mg, Dustless Precision Pellets® Rodent, Purified, BioServ, Frenchtown, NJ, USA)を用いた。

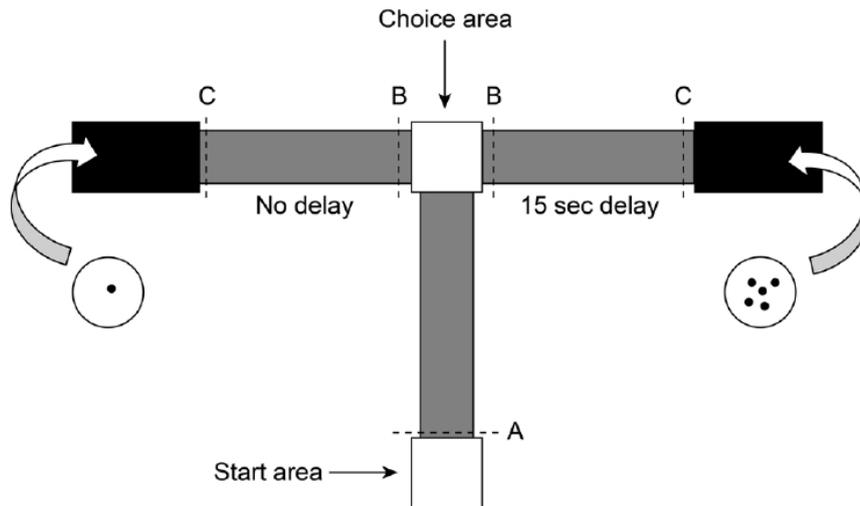


図 8. T 字型迷路を用いた遅延価値割引課題の実験装置の概略図. A, B および C はそれぞれギロチンドアの位置を示す.

3. T 字型迷路を用いた遅延価値割引課題の手順

実験手順は、以前に実施された方法^{52,53,56}とほぼ同様であるが、5日間連続して薬物評価を行うため、いくつかの変更を加えた。実験スケジュールについて、図 9 に示す。実験は、以下 3 つのフェーズで構成される。

1). 馴化フェーズ

ラットを同じ日に 3 回、毎回 5 分間迷路に慣れさせた。ラットは、スタートボックスに個別に置かれ、スタートアームに入ると、ドア A が閉じられ、ラットは T 字迷路を自由に探索し、両方のゴールボックスのフードウェルでフードペレットを食べることができる。

2). トレーニングフェーズ

ラットは、馴化日の直後の 4 日間連続して、小さな報酬と大きな報酬のどちらかを選択するように訓練された。各ラットは、ドア C が両方閉じられた状態でスタートボックスに入れられた。ラットが選択ボックスから 2 つのアームの片側に入ると、ドア B が閉じられ、ドア C がすぐに開かれた。ラットが完全にゴールボックスに入った瞬間、ドア C は再び閉じられた。ラットがペレットを食べ終わった後（通常 1 分未満）、ゴールボックスから静かに取り出した。その後、ラットを 1-2 分の試行間隔でホームケージに戻した。各ラットは、10 回の

試行を含む 1 日 1 回のセッションを受けた。4 日目のセッションで 90%以上大報酬選択しない場合は、その基準を超えるまで同じ日に追加のトレーニングを実施した。

3). テストフェーズ

トレーニングフェーズ後、ラットはランダムに対照群と薬物投与群に分類された。テストフェーズでは、それぞれ 10 回の試行を含む 5 回の連続した毎日のセッションが実施された。毎日のセッションでは、大報酬へのアクセスを許可する前に遅延が導入された。ドア C を両アームとも閉じた状態で、ラットをスタートボックスに静かに置き、ラットが選択ボックスから小報酬側のアームに入ると、ドア B を閉じ、ドア C をすぐに開いた。ラットが大報酬側のアームを選択したとき、ゴールボックスへのアクセスを許可する前に、15 秒の遅延時間を導入した。ラットは、毎日の各セッションの前に、生理食塩水 (NaCl 0.9%) または薬物のどちらかが投与された。また、薬物が方向感覚の喪失や報酬の識別障害等の他の効果を発現しないかどうかを検討するため、すぐに得られる大報酬を選択し続けるか連続 5 日間評価した。

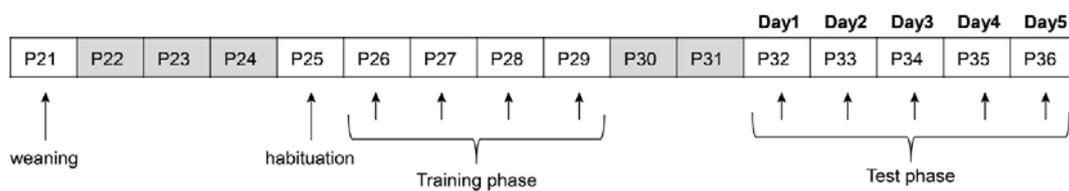


図 9. T 字型迷路を用いた遅延価値割引課題の実験スケジュールの概略図。Day 1 から Day 5 までのそれぞれ各日で、薬物投与され遅延大報酬選択数が評価された。灰色で囲まれた日程は、実験しない日を示す。

4. 薬物処置

T 字型迷路を用いたラット遅延価値割引課題の予測的妥当性を確認するため、異なる作用機序を持つ 3 種類の ADHD 治療薬を使用した。メチルフェニデートは、中枢神経刺激薬に分類され、DA および NA トランスポーターの阻害を介して、DA および NA 作動性神経を間接的に活性化させる⁴⁴。アトモキセチンとグアンファシンはどちらも非中枢神経刺激薬であるが、作用機序に相違がある。ア

トモキセチンは、選択的 NA トランスポーター阻害剤であり、前頭前皮質の細胞外 DA および NA 量を増加させ、NA 作動性および DA 作動性神経を間接的に活性化させる⁵⁷。グアンファシンは、選択的 $\alpha 2A$ アドレナリン受容体アゴニストであり、後シナプス $\alpha 2A$ アドレナリン受容体シグナルを直接増加させると考えられている⁵⁸。

衝動的な選択に対するグアンファシンの効果が、 $\alpha 2A$ アドレナリン受容体を介しているか検討するため、 $\alpha 2A$ アドレナリン受容体アンタゴニストである BRL44408 を用いた。本化合物は、 $\alpha 2A$ アドレナリン受容体に高い親和性($K_i = 8.5 \text{ nM}$) と他分子に対し 50 倍以上の選択的性を持つことが報告されている⁵⁹。実際、BRL44408 の全身投与は、マウス⁶⁰ およびラット^{61,62} の $\alpha 2A$ アドレナリン受容体を遮断することが報告されている。

本研究では、グアンファシンの効果が、後シナプスまたは前シナプスどちらの $\alpha 2A$ アドレナリン受容体を介しているかを検討するため、選択的前シナプス NA 神経毒である DSP-4 を用いた。DSP-4 は、血液脳関門を通過し、大脳皮質や海馬などのラット脳のさまざまな領域で NA 作動性神経の軸索終末を破壊することが報告されている⁶³。DSP-4 の腹腔内投与は、前シナプス $\alpha 2A$ アドレナリン受容体の数を減らし⁶⁴、大脳皮質および海馬において、前シナプス $\alpha 2$ アドレナリン受容体が調節する細胞外 NA 放出を弱めることが報告されている⁶⁵。

グアンファシン塩酸塩、メチルフェニデート塩酸塩、BRL44408 および DSP-4 は、Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) から、アトモキセチン塩酸塩は、東京化成から購入した。これらの薬物は、生理食塩水に溶解し用いた。メチルフェニデート、グアンファシンおよびアトモキセチンは、各テストセッションの 30 分前に 5 日間連続して腹腔内 (i.p.) 投与された。BRL44408 は、グアンファシン投与の 20 分前に i.p.投与された。DSP-4 は、ラット出生後 21 日目に i.p.投与された。BRL44408 を除く薬物投与は、2 ml/kg 体重で、BRL44408 は、5 ml/kg 体重で行われた。すべての薬物の投与量又は投与時間は、以前の研究方法に従って決定された^{53,62}。

5. 前頭前皮質および海馬中の NA 量の測定

行動評価の最初の日である 1 日目、または最終日である 5 日目のコントロー

ルおよび DSP-4 投与ラットを断頭により、安楽死させた。前頭前皮質および海馬サンプル（定位座標第 6 版⁶⁶のラット脳の図 7-14 の前縁皮質領域と図 68-85 の海馬）は、氷上にてブレードを用いて、4 mm 厚の冠状切片を作製し得られた。脳組織は、0.5 g あたり 1 ml の 4 mM 二亜硫酸ナトリウムと 1 mM エチレンジアミン四酢酸を含む 0.01 M 塩酸バッファーでホモジネートされ、その上清を NA ELISA (NoradrenalineResearchELISA™; Labor Diagnostika Nord GmbH and Co. KG, Nordhorn, Germany) により測定した。ELISA 反応後、マイクロプレートリーダー (ARVO MX-3, Parkin Elmer, Waltham, MA, USA) を用いて、各サンプルの吸光度 450 nm および 620 nm を測定した。サンプルの NA 濃度は、標準検量線を用いて決定した。

6. 統計解析

すべての結果は、平均±標準誤差 (SEM) として記載した。ベースライン時点での遅延大報酬の選択数は、一元配置分散分析(one-way ANOVA) を用いて解析した。薬物投与各日のベースライン値からの遅延大報酬選択数変化は、経時反復測定値の混合効果モデル (MMRM) および Dunnett の多重比較検定法を用いた。遅延大報酬選択数の 5 日間の総和は Dunnett の多重比較検定法を、グアンファシン投与群と BRL44408 併用投与群との比較は Tukey の多重比較検定法を、脳内 NA 含量は Student の t 検定法を用いて解析を行った。すべての統計分析は、SAS ソフトウェアバージョン 9.2 (SAS Institute, Cary, NC, USA)を用いて実行した。p < 0.05 の値を統計的に有意とした。

III. 結果

1. ラット遅延価値割引課題に対するメチルフェニデート、アトモキセチンおよびグアンファシンの効果

ADHD 治療薬であるメチルフェニデート、アトモキセチンおよびグアンファシンのラット衝動的選択行動に対する作用を、T 字型迷路を用いた遅延価値割引課題により検討した。これらの結果を図 10, 11 および 12 に示す。生理食塩水を投与した対照投与群は、試験 1 日目のセッション (10 回試行) 前半で、ほぼ大報酬を選択する傾向を示した。これは、ラットに対し、トレーニングフェーズでの

90%以上大報酬を選択する訓練を反映した。しかし、セッション後半では、15秒間の遅延に対する嫌悪のため、遅延なしの小報酬を選択する回数が増加した。試験2日目以降、対照投与群ラットの報酬選択行動は安定した。対照投与群のこれらのデータと比較して、メチルフェニデート、アトモキセチンおよびグアンファシンの反復投与が、遅延大報酬の選択頻度に及ぼす影響を調べた。ベースラインの大報酬選択回数に関して、各投与群間の相違は、いずれの薬物投与評価時でも見られなかった (すべての薬物で $p > 0.05$)。

対照投与群と比較して、メチルフェニデート投与群 (1, 3 および 6 mg/kg) は、各日の遅延大報酬選択数を有意に増加させた (6 mg/kg, 1日目と5日目, $p < 0.05$, 2-4日目, $p < 0.01$; 3 mg/kg, 2-3日目, $p < 0.05$) (図 10A)。また図 10B に示すように、5日間すべての遅延大報酬選択数の総和を対照群と比較したところ、メチルフェニデート投与群は、用量依存的な遅延大報酬選択数の増加を示した (対照群: 8.50 ± 0.89 , $n = 6$, メチルフェニデート投与群 3 mg/kg: 21.67 ± 2.39 , $n = 9$, $p < 0.001$ および 6 mg/kg: 29.11 ± 2.13 , $n = 9$, $p < 0.001$)。

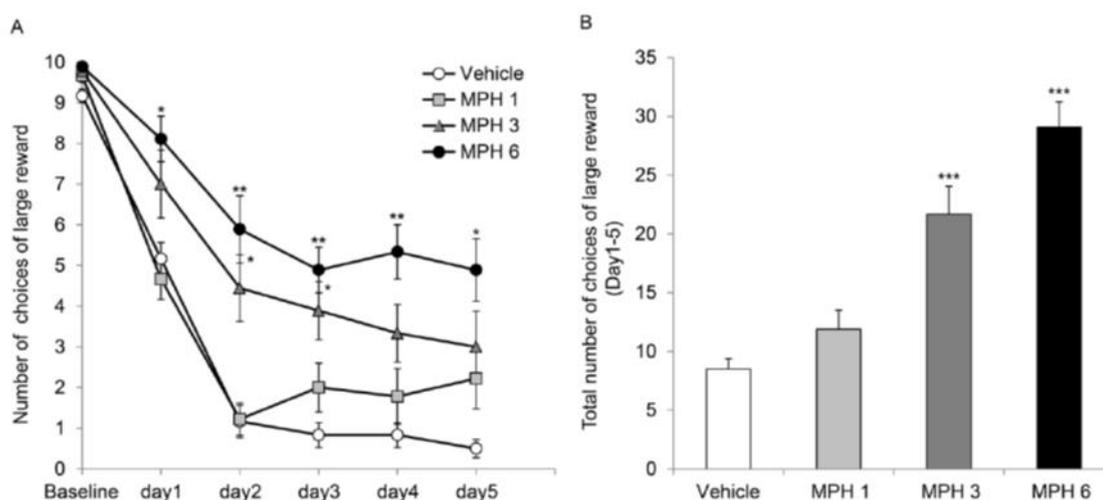


図 10. ラット遅延価値割引課題に対するメチルフェニデート(MPH, mg/kg, i.p.投与)の効果。(A) 各日の遅延大報酬選択数に対するメチルフェニデート (1, 3 および 6 mg/kg)の効果。(B) 5日間の遅延大報酬選択数の総和に対するメチルフェニデート (1, 3 および 6 mg/kg)の効果。ベースラインは、遅延がなかった最後のトレーニングセッションを示す。すべてのデータは、平均 \pm SEM で記載。薬物投与群は $n = 9$, 対照投与群は $n = 6$ のラットを用いた。** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ を示す(対照投与群との比較)。

アトモキセチン投与群 (0.1, 0.3, 1 および 3 mg/kg)もまた, 対照投与群と比較して, 各日の遅延大報酬選択数を有意に増加させた (3 mg/kg, 4 日目, $p < 0.01$, 5 日目, $p < 0.001$; 1 mg/kg, 5 日目, $p < 0.05$) (図 11A). 5 日間すべての遅延大報酬選択数の総和についても, アトモキセチン投与群は, 用量依存的な遅延大報酬選択数の増加を示した(対照群: 8.06 ± 0.75 , $n = 16$, アトモキセチン投与群 1 mg/kg: 14.00 ± 1.57 , $n = 16$, $p < 0.01$ および 3 mg/kg: 15.63 ± 1.40 , $n = 16$, $p < 0.001$) (図 11B).

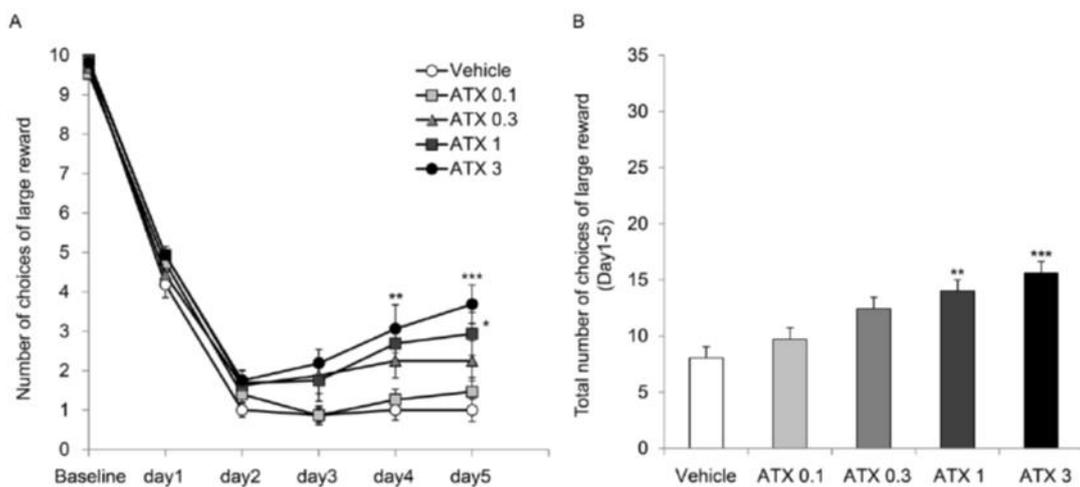


図 11. ラット遅延価値割引課題に対するアトモキセチン (ATX, mg/kg, i.p.投与) の効果. (A) 各日の遅延大報酬選択数に対するアトモキセチン (0.1, 0.3, 1 および 3 mg/kg) の効果. (B) 5 日間の遅延大報酬選択数の総和に対するアトモキセチン (0.1, 0.3, 1 および 3 mg/kg) の効果. ベースラインは, 遅延がなかった最後のトレーニングセッションを示す. すべてのデータは, 平均 \pm SEM で記載. 1 群あたり $n = 16$ (0.1 mg/kg 投与のみ $n = 15$) のラットを用いた. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ を示す(対照投与群との比較).

グアンファシン投与群 (0.1, 0.3, 1 および 3 mg/kg)もまた, 対照投与群と比較して, 各日の遅延大報酬選択数を有意に増加させた (3 mg/kg, 2-5 日目, $p < 0.001$; 1 mg/kg, 3 日目, $p < 0.05$, 4 日目, $p < 0.001$, 5 日目, $p < 0.01$) (図 12A). 5 日間すべての遅延大報酬選択数の総和についても, 対照群と比較してグアンファシン投与群は, 用量依存的な遅延大報酬選択数の増加を示した(対照群: 8.94 ± 1.16 , $n = 16$, グアンファシン投与群 1 mg/kg: 17.94 ± 1.62 , $n = 16$, $p < 0.001$ および 3 mg/kg: 24.44 ± 2.06 , $n = 16$, $p < 0.001$) (図 12B).

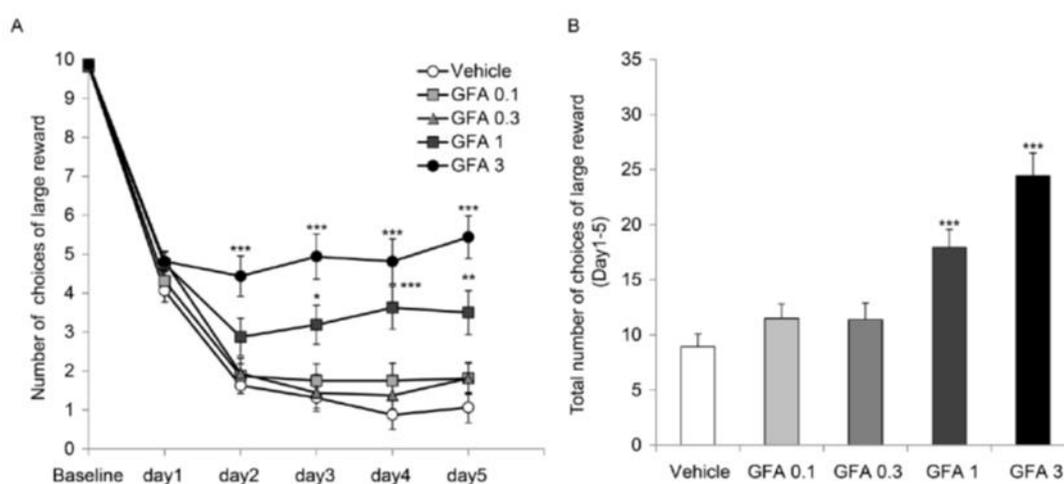


図 12. ラット遅延価値割引課題に対するグアンファシン (GFA, mg/kg, i.p.投与) の効果. (A) 各日の遅延大報酬選択数に対するグアンファシン (0.1, 0.3, 1 および 3 mg/kg) の効果. (B) 5 日間の遅延大報酬選択数の総和に対するグアンファシン (0.1, 0.3, 1 および 3 mg/kg) の効果. ベースラインは, 遅延がなかった最後のトレーニングセッションを示す. すべてのデータは, 平均 \pm SEM で記載. 1 群あたり $n = 16$ のラットを用いた. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ を示す(対照投与群との比較).

メチルフェニデート、アトモキセチンまたはグアンファシンが、方向感覚の喪失や報酬の識別障害等の他の効果を発現しないかどうかを検討するため、遅延なしの大報酬選択数に対する影響を調べた。メチルフェニデート、アトモキセチンおよびグアンファシンは、最高用量で大報酬選択数に有意な影響を与えなかった(表 3)。また、薬物投与ラットが、T字型迷路の2つのアームのうちの1つを選択できなかった試験は観察されなかった。このことから、方向感覚の喪失や報酬の識別障害等の他の要因が、本研究の結果に影響を与える可能性は低いと判断した。

表 3. 遅延のない条件下での大報酬選択数総和に及ぼす薬物の影響

Drug	Total number of choices of the large reward in 5 consecutive daily sessions of 10 trials
Vehicle	49.5 ± 0.34
Methylphenidate (6 mg/kg)	49.0 ± 0.63
Atomoxetine (3 mg/kg)	49.5 ± 0.34
Guanfacine (3 mg/kg)	49.0 ± 0.37

Data are indicated as the mean ± SEM, n = 6 animals per group. There were no significant differences between the groups.

2. グアンファシンの効果における $\alpha 2A$ アドレナリン受容体の関与

$\alpha 2A$ アドレナリン受容体の活性化が、遅延価値割引課題で観察されたグアンファシンの効果に関与しているかを調べるために、グアンファシン投与前に $\alpha 2A$ アドレナリン受容体アンタゴニスト BRL44408 を投与し、その影響を調べた。その結果を図 13 に示す。ベースラインの大報酬選択回数に関して、各投与群間の相違はなかった ($p > 0.05$)。グアンファシン (3 mg/kg) は、上記結果と同様に各日の遅延大報酬選択数 (3 mg/kg, 1 日目, $p < 0.05$, 2-5 日目, $p < 0.001$) だけでなく、5 日間の遅延大報酬選択数の総和 (対照+対照: 5.30 ± 0.94 , 対照 + グアンファシン: 21.60 ± 1.86 , 各群 n=10, $p < 0.001$) を有意に増加させた。BRL44408 (10 mg/kg) を前投与することで、グアンファシンの各日の遅延大報酬選択数 (3 mg/kg, 2-3 日目, $p < 0.05$, 4-5 日目, $p < 0.001$) および 5 日間の遅延大報酬選択

数の総和 (BRL44408 + グアンファシン: 9.90 ± 1.86 , $n = 10$, $p < 0.001$)の効果は、大幅に減少した. 対照投与群と比較して, BRL44408 投与群(10 mg/kg) 単独では, 各日の遅延大報酬選択数または遅延大報酬選択数の総和に影響を与えなかった (BRL44408 + 対照: 7.30 ± 1.33 , $n = 10$).

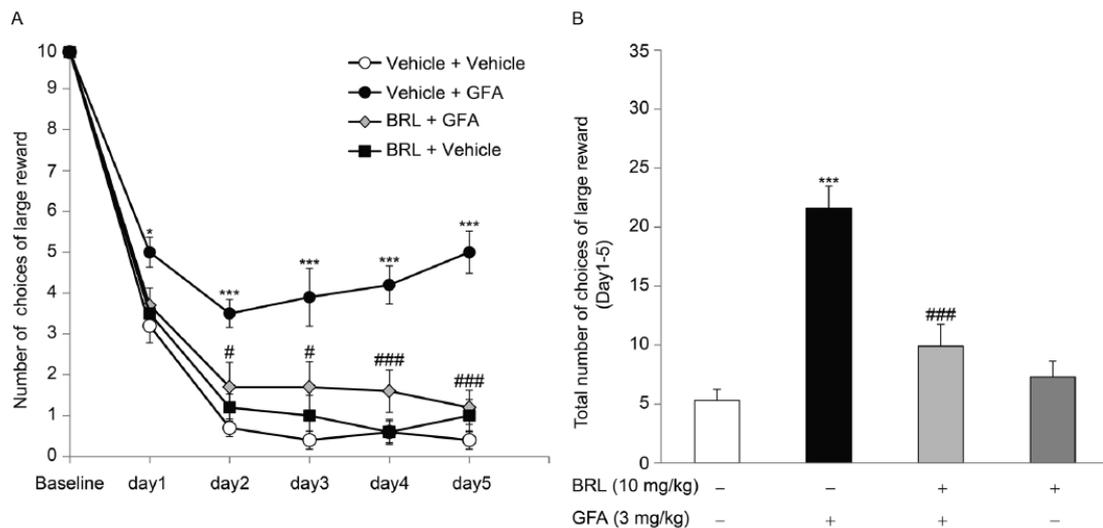


図 13. BRL44408 (BRL, mg/kg, i.p.投与) 前投与ラットを用いた遅延価値割引課題に対するグアンファシン (GFA) の効果. (A) グアンファシン (3 mg/kg) の各日の遅延大報酬選択数増加に対する BRL44408 (10 mg/kg) の効果. (B) グアンファシン (3 mg/kg) の 5 日間の遅延大報酬選択数の総和増加に対する BRL44408 (10 mg/kg) の効果. ベースラインは, 遅延がなかった最後のトレーニングセッションを示す. すべてのデータは, 平均 \pm SEM で記載. 1 群あたり $n = 10$ のラットを用いた. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ を示す (対照+対照群との比較). # $p < 0.05$, ### $p < 0.001$ を示す (対照 + グアンファシン群との比較).

3. DSP-4 処置ラットでの遅延価値割引課題に対する Guanfacin と Atomoxetine の効果

前シナプスまたは後シナプス, どちらの $\alpha 2A$ アドレナリン受容体が, Guanfacin のラット遅延価値割引課題に対する効果を介するのか, NA 神経毒 DSP-4 (40 mg/kg) で前処置したラットを用いて調べた. その結果を表 4 および図 14 に示す. 対照投与群と比較して, DSP-4 投与群は, テストフェーズの 1 日目と 5 日目において, 前頭前皮質および海馬の NA 量をそれぞれ 40-50% および 75-90% 有意に減少させた(表 4). DSP-4 投与そのものは, トレーニングや, 遅延なしの大報酬選択数に影響しなかった. 次に, DSP-4 処置ラットでの遅延価値割引課題に対する Guanfacin と Atomoxetine の効果を調べた. ベースラインの大報酬選択回数に関して, 各投与群間の相違はなかった ($p > 0.05$). Guanfacin (3 mg/kg) は, 各日の遅延大報酬選択数 (3 mg/kg, 1 日目, $p < 0.05$, 2-5 日目, $p < 0.001$) と 5 日間の遅延大報酬選択数の総和 (対照: 7.00 ± 0.86 , $n = 13$, Guanfacin: 25.07 ± 2.08 , $n = 14$, $p < 0.001$) を有意に増加させた. 一方, Atomoxetine は, 各日の遅延大報酬選択数 と 5 日間の遅延大報酬選択数の総和 (対照: 7.00 ± 0.86 , $n = 13$, Atomoxetine: 10.75 ± 1.21 , $n = 12$, $p < 0.001$) のいずれも有意な増加を示さなかった.

表 4. 前頭前皮質および海馬 NA 量に対する DSP-4 の効果.

Effects of DSP-4 on the noradrenaline level in the prefrontal cortex and hippocampus.

Drug	Prefrontal cortex (ng/g tissue)		Hippocampus (ng/g tissue)	
	Day 1	Day 5	Day 1	Day 5
Vehicle	53.4 ± 3.4	53.9 ± 3.4	39.9 ± 1.0	93.5 ± 6.7
DSP-4 (40 mg/kg)	$31.7 \pm 1.8^{**}$	$27.9 \pm 2.9^{**}$	$10.2 \pm 1.1^{**}$	$10.7 \pm 0.7^{**}$

Data are indicated as the mean \pm SEM; vehicle day 1 ($n = 6$), day 5 ($n = 8$); DSP-4 day 1 ($n = 7$), day 5 ($n = 10$). $^{**}p < 0.01$ compared with vehicle-treated controls.

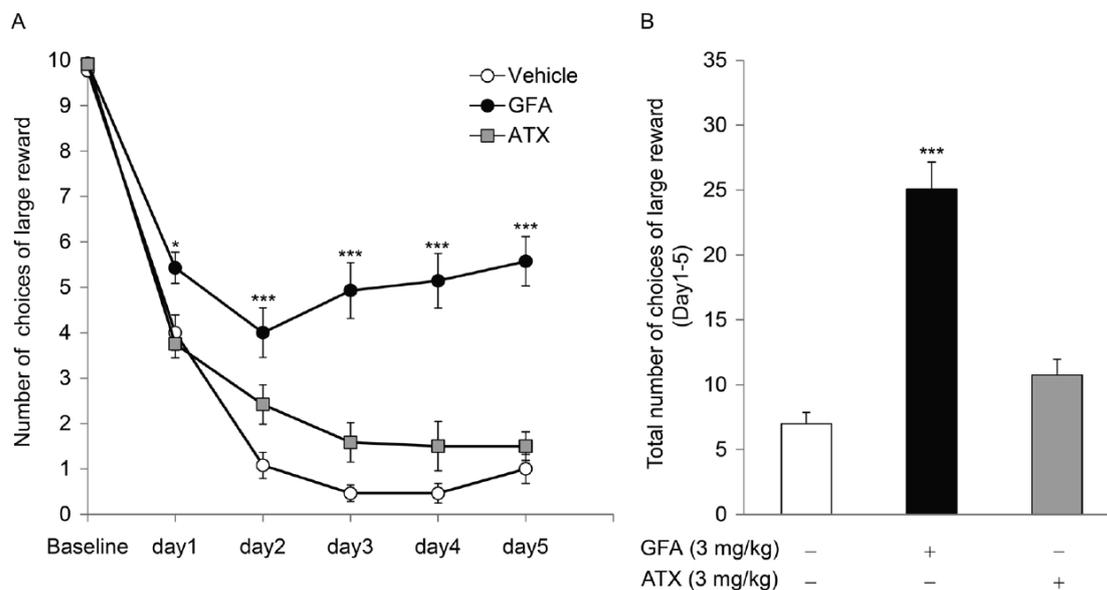


図 14. DSP-4 処置ラットでの遅延価値割引課題に対するグアンファシン(GFA)とアトモキセチン(ATX)の効果. (A) DSP-4 (40 mg/kg) 処置ラットでの各日の遅延大報酬選択数に対するグアンファシン (3 mg/kg) またはアトモキセチン (3 mg/kg)の効果. (B) DSP-4 (40 mg/kg) 処置ラットでの 5 日間の遅延大報酬選択数の総和 5 日間に対するグアンファシン (3 mg/kg) またはアトモキセチン (3 mg/kg)の効果. ベースラインは, 遅延がなかった最後のトレーニングセッションを示す. すべてのデータは, 平均 \pm SEM で記載. 1 群あたり対照群 $n=13$, グアンファシン投与群 $n=14$, アトモキセチン投与群 $n=12$ のラットを用いた. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ を示す(対照投与群との比較).

IV. 考察

衝動性は、先見の明のない行動として広く定義されており、ADHD 症状と関連している⁶⁷。衝動的選択は通常、遅延価値割引課題を用いて評価され、一般的に、ヒトまたは動物は、すぐに得られる小さな報酬と、長い遅延の後に得られる大報酬のどちらかを選択するように求められる。遅延大報酬あるいは即時小報酬のどちらが魅力的な選択であるかは、報酬量と遅延時間に応じて決まる。将来の大きな報酬を待てずに即時の報酬を好むという衝動的選択行動の変化は、ADHD^{10,11} や物質使用障害^{68,69} などの精神疾患に関与することが知られている。本研究では、幼若正常ラットを用いた遅延価値割引課題において、ADHD 治療薬であるメチルフェニデート、アトモキセチンおよびグアンファシンの衝動的選択行動の改善を示すことができた。グアンファシンのラット衝動的選択行動の改善は、本研究が初めての報告となる。さらに作用機序の解析から、グアンファシンの本効果は、後シナプス $\alpha 2A$ アドレナリン受容体を介することを示した。

NA および DA 遊離量を増加させるメチルフェニデートおよびアトモキセチン^{57,70,71} のラット衝動的選択行動の改善結果は、以前に報告された研究結果と一致しており⁵²⁻⁵⁵、メチルフェニデート(1-5 mg/kg)とアトモキセチン (1-3 mg/kg) の効果用量範囲も同等であった。興味深いことに、アトモキセチンの効果は評価期間中に徐々に増加したが (顕著な効果は3日目に最初に観察され、5日目まで持続)、メチルフェニデートは即効性があった(1-2日目)。アトモキセチンの遅延効果の正確な作用機序は不明であるが、青年期のラットにアトモキセチンを繰り返し投与すると、眼窩前頭皮質のシナプス可塑性マーカー調節を介して、成人期の衝動的選択行動が改善する報告がある⁷²。本報告からアトモキセチンの遅延効果は、反復投与による可塑性調節と関連があるかもしれない。またメチルフェニデートとアトモキセチンの効果作用発現の相違は、臨床でも観察されている⁷³。各薬剤の作用機序が効果作用発現の相違を生み出しているかどうかについては、今後の研究が必要である。これらの結果は、5日間の薬剤投与スケジュールを用いたラット遅延価値割引課題は、衝動的選択行動に対する薬効評価系として適切であることを示している。

本研究の目的のひとつは、本研究で確立された評価系が、上記薬剤と異なる作

用機序をもつグアンファシンに対してもラット衝動的選択行動の改善を示し、ADHD 治療薬すべてで効果を示す、つまり臨床予測妥当性があるのか調べることであった。グアンファシン(1 および 3 mg/kg) は、方向感覚の喪失や報酬の識別障害といったラット行動に影響を与えることなく、遅延大報酬選択数を有意に増加させ、衝動的選択行動を改善した。本結果は、遅延価値割引課題とは異なる評価パラダイムではあるものの、グアンファシンが ADHD 動物モデルの衝動性を改善するという以前の報告と一致した⁷⁴。著者が知る限り、グアンファシンがラット衝動的選択行動を改善させることを示した報告は、本研究が初めてとなる。

これまで作業記憶に対する $\alpha 2A$ アドレナリン受容体の関与は、多数報告されているが^{75,76}、衝動的な選択行動における本受容体の役割は明らかではない。本研究では、 $\alpha 2A$ アドレナリン受容体アンタゴニストである BRL44408 が、グアンファシンの効果を消失させた。同じ用量の BRL44408 が、ADHD のラットモデルにおける注意力/認知能力に対するグアンファシン(1 mg/kg, i.p.投与) の効果を消失させており⁶²、*in vivo* で $\alpha 2A$ アドレナリン受容体を遮断するには適切な用量であると考えられた。これらの結果は、 $\alpha 2A$ アドレナリン受容体の刺激が、遅延価値割引課題における衝動的な選択行動の改善に関与していることを示唆している。

$\alpha 2A$ アドレナリン受容体は、前シナプス前と後シナプスの両方で発現する。前頭前皮質の後シナプス $\alpha 2A$ アドレナリン受容体が空間作業記憶を含む認知機能の改善に関与していることが報告されている^{58,62} が、衝動的な選択行動における前シナプスおよび後シナプス $\alpha 2A$ アドレナリン受容体の役割は明らかではない。本研究では、選択的 NA 作動性神経毒である DSP-4 による前処置により、ラット前頭前皮質で NA 含有量が 40-50%、海馬で 75-90%有意に減少した。トレーニングフェーズとテストフェーズでのパフォーマンスに関して、対照投与ラットと DSP-4 投与ラットの間に相違はなかった。DSP-4 は、NA トランスポーターを介して青斑核から生じる大脳皮質および海馬の NA 作動性前シナプス終末を破壊する^{64,77}。さらに、DSP-4 処置によって、大脳皮質と海馬の前シナプス $\alpha 2A$ アドレナリン受容体の数が減少することが報告されている⁶⁵。そのため、DSP-4 処置ラットでグアンファシンの効果が維持されたという結果は、大脳皮

質や海馬において、前シナプスよりも後シナプスの $\alpha 2A$ アドレナリン受容体が衝動的選択行動に寄与していることが示唆される。

一方、DSP-4 処置ラットでアトモキセチンの効果は減弱した。アトモキセチンは、前頭前皮質の前シナプス NA トランスポーターの阻害を介して、細胞外 DA および NA 遊離量を増加させる⁵⁷。DSP-4 処置は、NA 作動性前シナプス終末を破壊し⁶⁴、アトモキセチンの作用である細胞外 NA 遊離量の増加を阻害するため⁷⁸、NA 作動性神経伝達の効果薬理的に減弱させると考えられる。これらの結果は、グアンファシンおよびアトモキセチンが異なる作用機序であり、それぞれ直接的および間接的に NA 作動性神経を刺激することを示唆している。

衝動的な選択行動に関与する脳部位のひとつとして、前頭前皮質である可能性が示された。海馬では、 $\alpha 2A$ アドレナリン受容体は主に前シナプス終末に位置しており⁷⁹⁻⁸¹、前頭前皮質では、受容体は前シナプスと後シナプスの両方に局在している⁸²。そのため、グアンファシンが前頭前皮質内の後シナプス $\alpha 2A$ アドレナリン受容体を介して効果を発揮することが示唆される。これらの知見は、前頭前皮質機能の不活性化が、ラット遅延価値割引における遅延大報酬選択数を低下させる報告と一致していた⁸³。またサルの前頭前皮質内の $\alpha 2A$ アドレナリン受容体が衝動制御に関与するという報告とも一致する^{84,85}。臨床においても、ADHD 患者の前頭前皮質は、その発達や機能活動が不十分であることが報告されている⁸⁶。さらなる研究が必要であるが、本研究でのグアンファシンの作用機序は、ADHD の神経生物学に関与している可能性がある。

以上、幼若正常ラットを用いることで、臨床での有効性同様に、作用機序が異なる ADHD 治療薬に対し、ADHD に特徴的である衝動的選択行動に対して有益な効果があることを再現できた。また作用機序解明においても、有益な情報が得られることを明らかにできた。本評価系は、ADHD 患者と同様の評価パラダイムで実施されること、また既存 ADHD 治療薬全ての薬効を捉えることに成功していること、関与する脳部位が ADHD と関連があることから、*in vivo* 評価として高い妥当性を有していると言える。このため ADHD に対する新規治療薬探索のための確度の高い *in vivo* 評価アセットとなり得る可能性があり、新規 ADHD 治療薬の創薬への応用が期待できると考えられる。

第3章 総括

新規治療薬を創製するためには、標的分子の理解とその候補物質の作用機序および薬理作用の検証が必要となる。この様な理由から、モデル動物にはヒトの病態や発症機構への類似性、薬効のヒトへの外挿性、データの再現性が求められる。しかしながら、疾患により、これらを満たすモデル作製は困難で、また高いコストや高度な技術が必要となる場合も多く、簡便且つ迅速性に課題があることが多い。本研究では、第1章において、AD治療薬標的分子 BACE1 阻害による A β 減少を野生型マウスで定量できる評価系の構築、第2章において、幼若正常ラットを用いた ADHD に対する薬効薬理評価系の構築を試みた。

第1章では、マウス A β の N 末端断端を認識する 14F1 抗 A β 抗体を獲得した。この 14F1 を用いて構築した A β ELISA 系により、マウス初代培養神経細胞での BACE1 阻害による正確な A β 産生抑制、BACE1 KO マウスおよび BACE1 阻害剤投与マウスでの正確な脳内 A β 産生抑制を評価できた。さらに BACE1 KO マウスおよび BACE1 阻害剤投与マウスでの APP プロセッシング変化、即ち BACE1 阻害に伴う APP 切断経路の変化も検出可能であることも明らかできた。

以上のように、正常動物での BACE1 阻害による A β 産生抑制を正確に評価できる系を構築するとともに、薬理作用を示す APP プロセッシング変化も評価可能であることを明らかにした。加えて、本研究で構築した薬効評価系は疾患モデル動物を用いることなく、簡便迅速に A β 産生抑制能およびその薬理作用の検証ができる点で、新薬候補のスクリーニングや新規標的分子検証に応用可能であると考えられた。

第2章では、ADHD 患者で特徴的に認められる衝動的選択行動に注目し、T 字型迷路を活用した幼若正常ラットでの遅延価値割引課題の構築を目指した。実験スケジュールは、5 日間毎日薬物投与と評価を行う工夫を行った。その結果、作用機序が異なる ADHD 治療薬すべてでラット衝動的選択行動の改善が用量依存的に認められ、臨床と同様に ADHD 症状に対して有益な効果があることを非臨床評価で再現することができた。このうち、グアンファシンのラット衝動的選択行動の改善は、本研究が初めての報告となる。さらに、本評価系を用いた作用機序解析から、グアンファシンは後シナプスの α 2A アドレナリン受容体を介し

て衝動的選択行動に寄与していることを明らかにした。

以上より、幼若正常ラットを用いることで、ADHD 症状に対して予測妥当性を示す薬効評価系を構築するとともに、作用機序解明においても、有益な情報が得られることを明らかにした。本評価系は、ADHD に対する新規治療薬探索のための確度の高い *in vivo* 評価アセットとなり得る可能性があり、新規 ADHD 治療薬の創薬に応用可能であると考えられた。

以上 2 つの研究から、正常動物を用いることで、効率的且つ適切な評価が実施可能であることを明らかにした。さらに、本研究で構築された評価系は、AD および ADHD の新たな創薬標的の妥当性検証にも活用でき、創薬研究への応用の可能性を示した。このように状況に応じた正常動物の薬効評価は、今後の医薬品等の研究開発に貢献できるものと期待される。

文献

1. Hackam DG, Redelmeier DA (2006) Translation of research evidence from animals to humans. *JAMA*, 296:1731-1732.
2. Guidance for Industry (2006) Nonclinical Safety Evaluation of Drugs or Biologic Combinations. Rockville, Md: US Dept of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research.
3. 新井裕幸, 倍味繁, 田原俊介ほか (2014) 疾患モデル動物の意義と役割 *日本薬理学雑誌*, 144:126-132.
4. Aisen PS (2005) The development of anti-amyloid therapy for Alzheimer's disease: from secretase modulators to polymerisation inhibitors. *CNS Drugs*, 19:989-996.
5. Hall AM, Roberson ED (2012) Mouse models of Alzheimer's disease. *Brain Res Bull*, 88:3-12.
6. Rocca WA, Hofman A, Brayne C, et al. (1991) Frequency and distribution of Alzheimer's disease in Europe: a collaborative study of 1980-1990 prevalence findings. The EURODEM-Prevalence Research Group. *Ann Neurol*, 30:381-390.
7. Willner P (1986) Validation criteria for animal models of human mental disorders: learned helplessness as a paradigm case. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 10:677-690.
8. Sagvolden T, Russell VA, Aase H, et al. (2005) Rodent models of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry*, 57:1239-1247.
9. Wickens JR, Hyland BI, Tripp G (2011) Animal models to guide clinical drug development in ADHD: lost in translation? *Br J Pharmacol*, 164:1107-1128.
10. Jackson JN, MacKillop J (2016) Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder and Monetary Delay Discounting: A Meta-Analysis of Case-Control Studies. *Biol Psychiatry Cogn Neurosci Neuroimaging*, 1:316-325.
11. Patros CH, Alderson RM, Kasper LJ, et al. (2016) Choice-impulsivity in children and adolescents with attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD): A meta-analytic review. *Clin Psychol Rev*, 43:162-174.

12. Mattson MP (2004) Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature*, 430:631-639.
13. Hardy J, Selkoe DJ (2002) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*, 297:353-356.
14. Sinha S, Anderson JP, Barbour R, et al. (1999) Purification and cloning of amyloid precursor protein beta-secretase from human brain. *Nature*, 402:537-540.
15. Vassar R, Bennett BD, Babu-Khan S, et al. (1999) Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science*, 286:735-741.
16. Yan R, Bienkowski MJ, Shuck ME, et al. (1999) Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer's disease beta-secretase activity. *Nature*, 402:533-537.
17. Tomasselli AG, Qahwash I, Emmons TL, et al. (2003) Employing a superior BACE1 cleavage sequence to probe cellular APP processing. *J Neurochem*, 84:1006-1017.
18. Hsiao K, Chapman P, Nilsen S, et al. (1996) Correlative memory deficits, A β elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science*, 274:99-102.
19. Horikoshi Y, Sakaguchi G, Becker AG, et al. (2004) Development of A β terminal end-specific antibodies and sensitive ELISA for A β variant. *Biochem Biophys Res Commun*, 319:733-737.
20. Dovey HF, John V, Anderson JP, et al. (2001) Functional gamma-secretase inhibitors reduce beta-amyloid peptide levels in brain. *J Neurochem*, 76:173-181.
21. Stachel SJ, Coburn CA, Steele TG, et al. (2004) Structure-based design of potent and selective cell-permeable inhibitors of human beta-secretase (BACE-1). *J Med Chem*, 47:6447-6450.
22. Cai H, Wang Y, McCarthy D, et al. (2001) BACE1 is the major beta-secretase for generation of A β peptides by neurons. *Nat Neurosci*, 4:233-234.
23. Skovronsky DM, Moore DB, Milla ME, et al. (2000) Protein kinase C-dependent alpha-secretase competes with beta-secretase for cleavage of amyloid-beta precursor protein in the trans-golgi network. *J Biol Chem*, 275:2568-2575.
24. Haass C, Schlossmacher MG, Hung AY, et al. (1992) Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature*, 359:322-325.

25. Gouras GK, Xu H, Jovanovic JN, et al. (1998) Generation and regulation of beta-amyloid peptide variants by neurons. *J Neurochem*, 71:1920-1925.
26. Fukumoto H, Tomita T, Matsunaga H, et al. (1999) Primary cultures of neuronal and non-neuronal rat brain cells secrete similar proportions of amyloid beta peptides ending at A beta40 and A beta42. *Neuroreport*, 10:2965-2969.
27. Suzuki N, Cheung TT, Cai XD, et al. (1994) An increased percentage of long amyloid beta protein secreted by familial amyloid beta protein precursor (beta APP717) mutants. *Science*, 264:1336-1340.
28. Fukumoto H, Cheung BS, Hyman BT, et al. (2002) Beta-secretase protein and activity are increased in the neocortex in Alzheimer disease. *Arch Neurol*, 59:1381-1389.
29. Holsinger RM, McLean CA, Beyreuther K, et al. (2002) Increased expression of the amyloid precursor beta-secretase in Alzheimer's disease. *Ann Neurol*, 51:783-786.
30. Yang LB, Lindholm K, Yan R, et al. (2003) Elevated beta-secretase expression and enzymatic activity detected in sporadic Alzheimer disease. *Nat Med*, 9:3-4.
31. Luo Y, Bolon B, Damore MA, et al. (2003) BACE1 (beta-secretase) knockout mice do not acquire compensatory gene expression changes or develop neural lesions over time. *Neurobiol Dis*, 14:81-88.
32. Laird FM, Cai H, Savonenko AV, et al. (2005) BACE1, a major determinant of selective vulnerability of the brain to amyloid-beta amyloidogenesis, is essential for cognitive, emotional, and synaptic functions. *J Neurosci*, 25:11693-11709.
33. Singer O, Marr RA, Rockenstein E, et al. (2005) Targeting BACE1 with siRNAs ameliorates Alzheimer disease neuropathology in a transgenic model. *Nat Neurosci*, 8:1343-1349.
34. Anderson JJ, Holtz G, Baskin PP, et al. (2005) Reductions in beta-amyloid concentrations in vivo by the gamma-secretase inhibitors BMS-289948 and BMS-299897. *Biochem Pharmacol*, 69:689-698.
35. Barten DM, Guss VL, Corsa JA, et al. (2005) Dynamics of {beta}-amyloid reductions in brain, cerebrospinal fluid, and plasma of {beta}-amyloid precursor protein transgenic mice treated with a {gamma}-secretase inhibitor. *J Pharmacol Exp*

- Ther, 312:635-643.
36. Lamb BT, Sisodia SS, Lawler AM, et al. (1993) Introduction and expression of the 400 kilobase amyloid precursor protein gene in transgenic mice. *Nat Genet*, 5:22-30.
 37. Schubert D, Behl C (1993) The expression of amyloid beta protein precursor protects nerve cells from beta-amyloid and glutamate toxicity and alters their interaction with the extracellular matrix. *Brain Res*, 629:275-282.
 38. Mattson MP, Cheng B, Culwell AR, et al. (1993) Evidence for excitoprotective and intraneuronal calcium-regulating roles for secreted forms of the beta-amyloid precursor protein. *Neuron*, 10:243-254.
 39. Mattson MP, Barger SW, Furukawa K, et al. (1997) Cellular signaling roles of TGF beta, TNF alpha and beta APP in brain injury responses and Alzheimer's disease. *Brain Res Brain Res Rev*, 23:47-61.
 40. American Psychiatric Association (2013) Diagnostic and statistical manual of mental disorders, 5th edn. American Psychiatric Pub, Washington, DC.
 41. Faraone SV, Biederman J, Mick E (2006) The age-dependent decline of attention deficit hyperactivity disorder: a meta-analysis of follow-up studies. *Psychol Med*, 36:159-165.
 42. Ebejer JL, Medland SE, van der Werf J, et al. (2012) Attention deficit hyperactivity disorder in Australian adults: prevalence, persistence, conduct problems and disadvantage. *PLoS One*, 7:e47404, doi:10.1371/journal.pone.0047404, <<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0047404>> [accessed 1 October 2017]
 43. Fayyad J, Sampson NA, Hwang I, et al. (2017) The descriptive epidemiology of DSM-IV Adult ADHD in the World Health Organization World Mental Health Surveys. *Atten Defic Hyperact Disord*, 9:47-65.
 44. Heal DJ, Cheetham SC, Smith SL (2009) The neuropharmacology of ADHD drugs in vivo: insights on efficacy and safety. *Neuropharmacology*, 57:608-618.
 45. Huss M, Chen W, Ludolph AG (2016) Guanfacine Extended Release: A New Pharmacological Treatment Option in Europe. *Clin Drug Investig*, 36:1-25.
 46. Arnsten AF, Jin LE (2012) Guanfacine for the treatment of cognitive disorders: a

- century of discoveries at Yale. *Yale J Biol Med*, 85:45-58.
47. Dalley JW, Robbins TW (2017) Fractionating impulsivity: neuropsychiatric implications. *Nat Rev Neurosci*, 18:158-171.
 48. Arnsten AF, Li BM (2005) Neurobiology of executive functions: catecholamine influences on prefrontal cortical functions. *Biol Psychiatry*, 57:1377-1384.
 49. Dalley JW, Mar AC, Economidou D, et al. (2008) Neurobehavioral mechanisms of impulsivity: fronto-striatal systems and functional neurochemistry. *Pharmacol Biochem Behav*, 90:250-260.
 50. Pietras CJ, Cherek DR, Lane SD, et al. (2003) Effects of methylphenidate on impulsive choice in adult humans. *Psychopharmacology (Berl)*, 170:390-398.
 51. Shiels K, Hawk LW, Jr., Reynolds B, et al. (2009) Effects of methylphenidate on discounting of delayed rewards in attention deficit/hyperactivity disorder. *Exp Clin Psychopharmacol*, 17:291-301.
 52. Bizot JC, Chenault N, Houze B, et al. (2007) Methylphenidate reduces impulsive behaviour in juvenile Wistar rats, but not in adult Wistar, SHR and WKY rats. *Psychopharmacology (Berl)*, 193:215-223.
 53. Bizot JC, David S, Trovero F (2011). Effects of atomoxetine, desipramine, d-amphetamine and methylphenidate on impulsivity in juvenile rats, measured in a T-maze procedure. *Neurosci Lett*, 489:20-24.
 54. Robinson ES, Eagle DM, Mar AC, Bari A, Banerjee G, et al. (2008) Similar effects of the selective noradrenaline reuptake inhibitor atomoxetine on three distinct forms of impulsivity in the rat. *Neuropsychopharmacology*, 33:1028-1037.
 55. van Gaalen MM, van Koten R, Schoffelmeer AN, et al. (2006) Critical involvement of dopaminergic neurotransmission in impulsive decision making. *Biol Psychiatry*, 60:66-73.
 56. Khani A, Kermani M, Hesam S, et al. (2015). Activation of cannabinoid system in anterior cingulate cortex and orbitofrontal cortex modulates cost-benefit decision making. *Psychopharmacology*, 232:2097-2112.
 57. Bymaster FP, Katner JS, Nelson DL, et al. (2002) Atomoxetine increases extracellular levels of norepinephrine and dopamine in prefrontal cortex of rat: a potential

- mechanism for efficacy in attention deficit/hyperactivity disorder. *Neuropsychopharmacology*, 27:699-711.
58. Wang M, Ramos BP, Paspalas CD, et al. (2007) Alpha2A-adrenoceptors strengthen working memory networks by inhibiting cAMP-HCN channel signaling in prefrontal cortex. *Cell*, 129:397-410.
 59. Dwyer JM, Platt BJ, Rizzo SJ, et al. (2010) Preclinical characterization of BRL 44408: antidepressant- and analgesic-like activity through selective alpha2A-adrenoceptor antagonism. *Int J Neuropsychopharmacol*, 13:1193-1205.
 60. Mantsch JR, Weyer A, Vranjkovic O, et al. (2010) Involvement of noradrenergic neurotransmission in the stress- but not cocaine-induced reinstatement of extinguished cocaine-induced conditioned place preference in mice: role for beta-2 adrenergic receptors. *Neuropsychopharmacology*, 35:2165-2178.
 61. Beyer CE, Lin Q, Rosenzweig-Lipson S, et al. (2006) Alpha 2A-adrenoceptors enhance the serotonergic effects of fluoxetine. *Eur J Pharmacol*, 539:164-167.
 62. Kawaura K, Karasawa J, Chaki S, et al. H (2014) Stimulation of postsynapse adrenergic alpha2A receptor improves attention/cognition performance in an animal model of attention deficit hyperactivity disorder. *Behav Brain Res*, 270:349-356.
 63. Ross SB, Stenfors C (2015) DSP4, a selective neurotoxin for the locus coeruleus noradrenergic system. A review of its mode of action. *Neurotox Res*, 27:15-30.
 64. Heal DJ, Butler SA, Prow MR, et al. (1993) Quantification of presynaptic alpha 2-adrenoceptors in rat brain after short-term DSP-4 lesioning. *Eur J Pharmacol*, 249:37-41.
 65. Prieto M, Giralt MT (2001) Effects of N-(2-chloroethyl)-N-ethyl-2-bromobenzylamine (DSP4) on alpha2-adrenoceptors which regulate the synthesis and release of noradrenaline in the rat brain. *Pharmacol Toxicol*, 88:152-158.
 66. Paxinos G, Watson C (2007) *The rat brain in stereotaxic coordinates*. 6th edn. Boston: Academic Press
 67. Winstanley CA, Eagle DM, Robbins TW (2006) Behavioral models of impulsivity in relation to ADHD: translation between clinical and preclinical studies. *Clin Psychol Rev*, 26:379-395.

68. Loree AM, Lundahl LH, Ledgerwood DM (2015) Impulsivity as a predictor of treatment outcome in substance use disorders: review and synthesis. *Drug Alcohol Rev*, 34:119-134.
69. Perry JL, Carroll ME (2008) The role of impulsive behavior in drug abuse. *Psychopharmacology (Berl)*, 200:1-26.
70. Kuczenski R, Segal DS (1997) Effects of methylphenidate on extracellular dopamine, serotonin, and norepinephrine: comparison with amphetamine. *J Neurochem*, 68:2032-2037.
71. Swanson CJ, Perry KW, Koch-Krueger S, et al. (2006) Effect of the attention deficit/hyperactivity disorder drug atomoxetine on extracellular concentrations of norepinephrine and dopamine in several brain regions of the rat. *Neuropharmacology*, 50:755-760.
72. Sun H, Cocker PJ, Zeeb FD, et al. (2012) Chronic atomoxetine treatment during adolescence decreases impulsive choice, but not impulsive action, in adult rats and alters markers of synaptic plasticity in the orbitofrontal cortex. *Psychopharmacology (Berl)*, 219:285-301.
73. Bushe CJ, Savill NC (2014) Systematic review of atomoxetine data in childhood and adolescent attention-deficit hyperactivity disorder 2009-2011: focus on clinical efficacy and safety. *J Psychopharmacol*, 28:204-211.
74. Sagvolden T (2006) The alpha-2A adrenoceptor agonist guanfacine improves sustained attention and reduces overactivity and impulsiveness in an animal model of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder (ADHD). *Behav Brain Funct*, 2:41.
75. Franowicz JS, Arnsten AF (1998) The alpha-2a noradrenergic agonist, guanfacine, improves delayed response performance in young adult rhesus monkeys. *Psychopharmacology (Berl)*, 136:8-14.
76. Franowicz JS, Kessler LE, Borja CM, et al. (2002) Mutation of the alpha2A-adrenoceptor impairs working memory performance and annuls cognitive enhancement by guanfacine. *J Neurosci*, 22:8771-8777.
77. Lyons WE, Fritschy JM, Grzanna R (1989) The noradrenergic neurotoxin DSP-4 eliminates the coeruleospinal projection but spares projections of the A5 and A7

- groups to the ventral horn of the rat spinal cord. *J Neurosci*, 9:1481-1489.
78. Liu YP, Huang TS, Tung CS, et al. (2015) Effects of atomoxetine on attention and impulsivity in the five-choice serial reaction time task in rats with lesions of dorsal noradrenergic ascending bundle. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 56:81-90.
 79. McCune SK, Voigt MM, Hill JM (1993) Expression of multiple alpha adrenergic receptor subtype messenger RNAs in the adult rat brain. *Neuroscience*, 57:143-151.
 80. Nicholas AP, Pieribone V, Hokfelt T (1993) Distributions of mRNAs for alpha-2 adrenergic receptor subtypes in rat brain: an *in situ* hybridization study. *J Comp Neurol*, 328:575-594.
 81. Scheinin M, Lomasney JW, Hayden-Hixson DM, et al. (1994) Distribution of alpha 2-adrenergic receptor subtype gene expression in rat brain. *Brain Res Mol Brain Res*, 21:133-149.
 82. Aoki C, Venkatesan C, Go CG, et al. (1998) Cellular and subcellular sites for noradrenergic action in the monkey dorsolateral prefrontal cortex as revealed by the immunocytochemical localization of noradrenergic receptors and axons. *Cereb Cortex*, 8:269-277.
 83. Churchwell JC, Morris AM, Heurtelou NM, et al. (2009) Interactions between the prefrontal cortex and amygdala during delay discounting and reversal. *Behav Neurosci*, 123:1185-1196.
 84. Ma CL, Arnsten AF, Li BM (2005) Locomotor hyperactivity induced by blockade of prefrontal cortical alpha2-adrenoceptors in monkeys. *Biol Psychiatry*, 57:192-195.
 85. Ma CL, Qi XL, Peng JY, et al. (2003) Selective deficit in no-go performance induced by blockade of prefrontal cortical alpha 2-adrenoceptors in monkeys. *Neuroreport*, 14:1013-1016.
 86. Shaw P, Lalonde F, Lepage C, et al. (2009) Development of cortical asymmetry in typically developing children and its disruption in attention-deficit/hyperactivity disorder. *Arch Gen Psychiatry*, 66:888-896.

謝辞

本論文作成において、ご指導をいただきました大阪府立大学院 総合リハビリテーション学科 教授 神谷重樹 先生に心から感謝申し上げます。また本論文を構成する論文において、ご指導いただきました 現グラクソスミスクライン社 ロンドン研究所 ディレクター 松岡康治 先生に深く感謝いたします。各研究において終始、ご助言をいただきました塩野義製薬株式会社・医薬研究本部の皆さま、免疫生物研究所株式会社の皆様を始めとする 共同研究者の皆様に深く感謝申し上げます。

利益相反

本論文の著者である 西富晃平は グアンファシン塩酸塩を製造販売している塩野義製薬株式会社の社員であり、塩野義製薬株式会社の少数株主である。