

氏 名 すみ かずゆき
鷲見 和之

学 位 の 種 類 博士（薬科学）

学 位 記 番 号 富医薬博甲第 269 号

学位授与年月日 平成 30 年 3 月 23 日

学位授与の要件 富山大学学位規則第 3 条第 3 項該当

教 育 部 名 富山大学大学院医学薬学教育部 博士後期課程
薬科学専攻

学 位 論 文 題 目 精神疾患関連分子 SHATI/NAT8L の神経細胞軸索伸長
およびマウス脳発達への影響に関する研究

論 文 審 査 委 員

(主査)	教 授	松本 欣三
(副査)	教 授	酒井 秀紀
(副査)	教 授	新田 淳美 (指導教員)

論文内容の要旨

近年、精神疾患に罹患する患者数が増加している。精神疾患の多くは、青年期に発症することから、患者は病気と生涯向き合っていかなければならず、長期的な薬物療法を行わなければならない場合が多い。しかし、いずれの精神疾患に対しても完治に至る治療薬や治療法は、ほとんど確立しておらず、副作用が問題となる場合も多い。そのため、より良い治療薬の開発を目指して、発症原因の解明に向けたさらなる研究に対する社会的要請度は高い。このような現状の中、私の研究室では、覚醒剤メタンフェタミンを連続投与した精神病モデルマウスの脳側坐核で発現が増大する分子として「Shati」を報告した。Shati は、Aspartate と Acetyl-CoA から N-acetyl-aspartate (NAA) を生合成するアセチル転移酵素 N-acetyltransferase-8 like protein (NAT8L) であることも報告され、現在では、SHATI/NAT8L と表記されている。SHATI/NAT8L が生合成する NAA は、脳内で非常に多く存在するアミノ酸でありながら、精神・神経機能との関係が永年にわたって不明であった。最近、NAA の脳内含量が H-magnetic resonance spectroscopy (MRS) を用いて、患者にとって非侵襲的な検査である脳画像システムで測定することができるようになり、精神疾患と NAA の脳内含量との関係がいくつかの臨床研究で明らかになってきた。統合失調症、注意欠損多動性障害、アルツハイマー型認知症などの精神・神経疾患患者の様々な脳部位の NAA 含量が有意に減少していることが報告され、NAA を合成する SHATI/NAT8L が精神疾患と関連している可能性が推察される。加えて、SHATI/NAT8L が合成する NAA は、グルタミン酸と縮合することによって、N-アセチルアスパルチルグルタミン酸 (NAAG) となり、NAAG は、代謝型グルタミン酸受容体 3 (mGluR3) のアゴニストであることが分かっている。近年、mGluR3 は、うつ病等の精神疾患治療薬の標的分子としても注目されている。しかし、SHATI/NAT8L の神経細胞への影響、また、脳発達過程における役割については明らかになっていない。そこで、本研究では、SHATI/NAT8L が精神・神経疾患発症と結びつく生理機能を解明するために神経薬理学的研究を行った。

1. 培養マウス神経細胞における SHATI/NAT8L の生理機能の検討¹⁾

Shati/Nat8l mRNA のマウス脳内発現分布を *in situ* hybridization 法を用いて調べた。*Shati/Nat8l* mRNA は、マウス全脳に広く分布していたが、特に前頭前皮質での発現量が多かった。連続切片を用いた脳内細胞種のマーカータンパク質との組織免疫染色によって、*Shati/Nat8l* が神経細胞に発現していることが分かった。次に、*Shati/Nat8l* を組み込んだアデノ随伴ウイルス (adeno-associated virus ; AAV) ベクターを用いて、マウス初代培養神経細胞への影響を検討した。その結果、SHATI/NAT8L を過剰発現した神経細胞では、

対照群と比較して神経軸索の伸長が促進されたが、樹状突起の伸長や形態には影響を及ぼさなかった。そこで、SHATI/NAT8L の神経軸索の伸長促進が mGluR3 を介している可能性を考え、アゴニストである NAAG を添加したが神経軸索の伸長促進作用は観察されなかった。さらに、受容体アンタゴニストの LY341495 を作用させたが、SHATI/NAT8L による突起伸長促進作用は阻害されなかった。次に、SHATI/NAT8L とエネルギー代謝の関係を検討するために、神経細胞内の ATP 含量を測定した結果、SHATI/NAT8L を過剰発現した神経細胞では、ATP の含量が有意に増加していた。これらの結果から、SHATI/NAT8L は、NAAG を介した作用ではなく、エネルギー代謝の増大を介して神経突起の伸長を促進した可能性が示された。

2. SHATI/NAT8L ノックアウトマウスを用いた SHATI/NAT8L の脳発達過程における髄鞘形成への影響²⁾

SHATI/NAT8L ノックアウトマウス (*Shati*^{-/-}) を用いて、SHATI/NAT8L の脳での生理機能を検討した。その結果、青年期 (8-9 週令) の *Shati*^{-/-} では、脳における各種細胞種 (ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイト、ミクログリア等) の細胞数や細胞の分布に野生型マウス (*Shati*^{+/+}) と比較して、顕著な差異は観察されなかったが、幼若期 (3 週令) では、前頭前皮質のオリゴデンドロサイトのマーカータンパクであるミエリン塩基性タンパクの発現量が減少しており、髄鞘形成の障害が観察された。また、青年期 (8-9 週令) マウスを用いて行動薬理的な試験を行ったところ、*Shati*^{-/-} は、3 チャンバーテストを用いた社会性行動の低下や高架式十字迷路での試験で衝動性の有意な増加が観察された。これらの行動異常の原因を検討するために、SHATI/NAT8L が合成する NAA を青年期 (8-9 週令) の *Shati*^{-/-} の側脳室に 3 日間投与を行ったが、行動異常は改善されなかった。NAA は、オリゴデンドロサイトで酢酸とアスパラギン酸に分解され、Acetyl-CoA の合成に必須であることが分かっているが、NAA を末梢投与しても脳へは移行せず、頭蓋骨が柔らかく側脳室内投与のカニューレションが技術的に困難な幼若マウス脳への直接投与は不可能である。そこで、私は、脳の発達過程での NAA の影響を検討するために、glyceryltriacetate (GTA) を *Shati*^{-/-} へ経口投与することにした。GTA は、経口投与後速やかに代謝を受け酢酸へ分解され、脳に移行することから、NAA と同様に Acetyl-CoA を生成するための酢酸を脳へ供給できるからである。幼若期から青年期にかけて GTA を経口投与 (7 日齢から離乳の 21 日齢まではゾンデを用いて 1 日 2 回の投与を行い、22 日齢から 56 日齢までは飲水に添加) した。その結果、青年期の *Shati*^{-/-} が示す社会性の異常や衝動性は、幼若期からの GTA の投与、即ち、酢酸の補充により抑制された。さらに、幼若期 (3 週令) における髄鞘形成の遅延も GTA を 7 日齢から 21 日齢までの投与によって抑制された。以上の結果から、SHATI/NAT8L は、オリゴデンドロサイトに酢酸を供給することで、マウス脳の発達時の髄鞘形成に関与していることが示された。また、幼若期に SHATI/NAT8L または NAA が脳で減少していることが、青年期以降での行動異常に繋がることも分かった。これらの研究成果と、脳で NAA の合成をする酵素は

SHATI/NAT8L だけであることを考え合わせると、SHATI/NAT8L が脳発達過程で減少することが、発達障害を含む精神疾患の原因の 1 つである可能性が示唆された。

3. マウス前頭前皮質における SHATI/NAT8L 過剰発現による行動変化

SHATI/NAT8L は前頭前皮質に多く発現していること、また、精神疾患の中でも子供での患者数が多い自閉症患者では、NAA 量が前頭前皮質で増加していることから、前頭前皮質で SHATI/NAT8L を過剰発現させたマウスを用いて行動薬理的検討を行った。AAV を用いて、前頭前皮質で SHATI/NAT8L を過剰発現させたマウス(PFC-Shati)と対照群として PFC-Mock を作成した。AAV 注入の 1 カ月後には、PFC-Shati の前頭前皮質では、PFC-Mock と比較して *Shati/Nat8l* mRNA 発現量が 9 倍に増加していた。PFC-Shati では、PFC-Mock と比較して、新規環境下での自発運動量の増加、Y 迷路試験法における自発的交代行動の減少、新規物体試験法での認知能力の低下が観察されたが、社会性行動、うつ様行動および不安行動を示す試験法では変化が観察されなかった。

前頭前皮質は、統合失調症をはじめ多くの精神疾患で変化が観察される脳部位であり、側坐核からの神経投射を受けており、一方で、線条体へ投射をするなど、情動システムの上でも重要な脳部位である。SHATI/NAT8L を増加させたことで、記憶障害という生体にとってはマイナスとなる行動変化が観察されたことは非常に興味深いことであり、そのメカニズムの解明が今後の課題である。

これらの研究成果から、SHATI/NAT8L は脳では神経細胞に存在し、培養神経細胞の軸索伸長に働いていること、さらに、マウス脳の発達過程では、髄鞘形成に関与し、社会性の確立や衝動性の抑制に寄与していること、精神疾患患者で異常が観察されることが多い脳部位である前頭前皮質で増加させることで記憶障害が誘発されることが分かった。これらの神経機能の変化から、SHATI/NAT8L が精神疾患の発症に深く関連していることが明確となった。SHATI/NAT8L および SHATI/NAT8L の合成する NAA が、精神疾患の新たな治療標的となることが期待される。

【参考文献】

- 1) Sumi K, Uno K, Matsumura S, Miyamoto Y, Furukawa-Hibi Y, Muramatsu S, Nabeshima T, Nitta A, Induction of neuronal axon outgrowth by Shati/Nat8l by energy metabolism in mice cultured neurons. *Neuroreport*. 26:740-746 (2015)
- 2) Sumi K, Uno K, Noike H, Tomohiro T, Hatanaka Y, Furukawa-Hibi Y, Nabeshima T, Miyamoto Y, Nitta A, Behavioral impairment in SHATI/NAT8L knockout mice via dysfunction of myelination development. *Scientific Reports*.7:16872 (2017)

学 位 論 文 審 査 の 要 旨

近年、精神疾患に罹患する患者数が増加している。精神疾患の多くは、青年期に発症することから、患者は病気と生涯向き合っていかなければならず、長期的な薬物療法を行わなければならない場合が多い。しかし、いずれの精神疾患も完治に至る治療薬や治療法は、ほとんど確立しておらず、副作用が問題となる場合も多い。そのため、より良い治療薬の開発を目指して、発症原因の解明に向けた研究に対する社会的要請度は高い。このような現状の中、申請者の鷺見和之氏が所属する薬物治療学研究室では、覚醒剤メタンフェタミンを連続投与した精神病モデルマウスの脳側坐核で発現が増大する分子として「Shati」を報告している。Shati は、Aspartate と Acetyl-CoA から N-acetyl-aspartate (NAA) を合成するアセチル転移酵素 N-acetyltransferase-8 like protein (NAT8L) であることも報告され、現在では、SHATI/NAT8L と表記されている。精神・神経疾患患者の様々な脳部位の NAA 含量が有意に減少していることが報告され、NAA を合成する SHATI/NAT8L が精神疾患と関連している可能性が推察されている。加えて、SHATI/NAT8L が合成する NAA は、グルタミン酸と縮合することによって、N-アセチルアスパルチルグルタミン酸 (NAAG) となり、NAAG は、代謝型グルタミン酸受容体 3 (mGluR3) のアゴニストであることが分かっている。近年、mGluR3 は、うつ病等の精神疾患治療薬の標的分子としても注目されている。しかし、SHATI/NAT8L の神経細胞への影響、また、脳発達過程における役割については明らかになっていない。そこで、鷺見氏は本研究において、SHATI/NAT8L が精神・神経疾患発症と結びつく生理機能を解明するために神経薬理学的研究を行った。

培養マウス神経細胞における SHATI/NAT8L の生理機能の検討¹

Shati/Nat8l mRNA のマウス脳内発現分布を *in situ* hybridization 法を用いて調べた。Shati/Nat8l mRNA は、マウス全脳に広く分布していたが、特に前頭前皮質での発現量が多かった。連続切片を用いた脳内細胞種のマーカータンパク質との組織免疫染色によって、Shati/Nat8l が神経細胞に発現していることが分かった。次に、Shati/Nat8l を組み込んだアデノ随伴ウイルス (adeno-associated virus ; AAV) ベクターを用いて、マウス初代培養神経細胞への影響を検討した。その結果、SHATI/NAT8L を過剰発現した神経細胞では、対照群と比較して神経軸索の伸長が促進されたが、樹状突起の伸長や形態には影響を及ぼさなかった。そこで、SHATI/NAT8L の神経軸索の伸長促進が mGluR3 を介している可能性を考え、アゴニストである NAAG を添加したが神経軸索の伸長促進作用は観察されなかった。さらに、受容体アンタゴニストの LY341495 を作用させたが、SHATI/NAT8L による突起伸長促進作用は阻害されなかった。次に、SHATI/NAT8L とエネルギー代謝の関係を検討するために、神経細胞内の ATP 含量を測定した結果、SHATI/NAT8L を過剰発現した神経細胞では、ATP の含量が有意に増加していた。これらの結果から、SHATI/NAT8L は、NAAG を介した作用ではなく、エネルギー代謝の増大を介して神経突起の伸長を促進した可能性が示された。

SHATI/NAT8L ノックアウトマウスを用いた SHATI/NAT8L の脳発達過程における髄鞘形成への影響²

SHATI/NAT8L ノックアウトマウス (Shati-/-) を用いて、SHATI/NAT8L の脳での生理機能を検討した。その結果、青年期 (8-9 週令) の Shati-/- では、脳における各種細胞種 (ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイト、ミクログリア等) の細胞数や細胞の

分布に野生型マウス (Shati+/+) と比較して、顕著な差異は観察されなかったが、幼若期 (3 週齢) では、前頭前皮質のオリゴデンドロサイトのマーカータンパクであるミエリン塩基性タンパクの発現量が減少しており、髄鞘形成の障害が観察された。また、青年期マウスを用いて行動薬理学的な試験を行ったところ、Shati-/- は、3 チャンバーテストを用いた社会性行動の低下や高架式十字迷路での試験で衝動性の有意な増加が観察された。これらの行動異常の原因を検討するために、SHATI/NAT8L が合成する NAA を青年期の Shati-/- の側脳室に 3 日間投与を行ったが、行動異常は改善されなかった。NAA は、オリゴデンドロサイトで酢酸とアスパラギン酸に分解され、Acetyl-CoA の合成に必須であることが分かっていたが、NAA を末梢投与しても脳へは移行せず、側脳室内投与のカニューレーションが技術的に困難な幼若マウス脳への直接投与は不可能である。そこで、鷺見氏は、脳の発達過程での NAA の影響を検討するために、Glyceryltriacetate (GTA) を Shati-/- へ経口投与することを試みた。GTA は、経口投与後、速やかに代謝を受け酢酸へ分解され、脳に移行することから、NAA と同様に Acetyl-CoA を生成するための酢酸を脳へ供給できるからである。幼若期から青年期にかけて GTA を経口投与 (7 日齢から離乳の 21 日齢まではゾンデを用いて 1 日 2 回の経口投与を行い、22 日齢から 56 日齢までは飲水に添加) した。その結果、青年期の Shati-/- が示す社会性の異常や衝動性は、幼若期からの GTA の投与、即ち、酢酸の補充により抑制された。さらに、幼若期における髄鞘形成の遅延も GTA の 7 から 21 日齢までの投与によって抑制された。以上の結果から、SHATI/NAT8L は、オリゴデンドロサイトに酢酸を供給し、マウス脳の発達時の随鞘形成に関与していることを示すことができた。また、幼若期に SHATI/NAT8L または NAA が脳で減少していることが、青年期以降での行動異常に繋がることも分かった。これらの研究成果と、脳で NAA の合成をする酵素は SHATI/NAT8L だけであることを考え合わせると、SHATI/NAT8L が脳発達過程で減少することが、発達障害を含む精神疾患の原因の 1 つである可能性を示唆することができた。

SHATI/NAT8L は脳では神経細胞に存在し、培養神経細胞の軸索伸長に働いていること、さらに、マウス脳の発達過程では、髄鞘形成に関与し、社会性の確立や衝動性の抑制に寄与していること、これらの神経機能の変化から、SHATI/NAT8L が精神疾患の発症に深く関連していることを鷺見氏は本研究で明らかにした。本研究成果は、SHATI/NAT8L および SHATI/NAT8L の合成する NAA が、精神疾患の新たな治療標的につながる知見となり、新規治療薬の創生に寄与すると考えられる。

主査及び副査は、申請者 鷺見和之氏の本学位論文の内容を精査するとともに面接審査を行い、鷺見 和之氏が博士 (薬科学) の学位を受けるに十分に値すると判断した。

1. Sumi K, Uno K, Matsumura S, Miyamoto Y, Furukawa-Hibi Y, Muramatsu S, Nabeshima T, Nitta A, Induction of neuronal axon outgrowth by Shati/Nat8l by energy metabolism in mice cultured neurons. *Neuroreport*. **26**:740-746 (2015)
2. Sumi K, Uno K, Noike H, Tomohiro T, Hatanaka Y, Furukawa-Hibi Y, Nabeshima T, Miyamoto Y, Nitta A, Behavioral impairment in SHATI/NAT8L knockout mice via dysfunction of myelination development. *Scientific Reports*. **7**:16872 (2017)