

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04662

研究課題名(和文)危険ドラッグの生体への障害メカニズムおよびShati/Nat81による保護効果

研究課題名(英文)Protective effects of Shati/Nat81 on the dysfunction induced by addictive drugs

研究代表者

新田 淳美(Nitta, Atsumi)

富山大学・大学院医学薬学研究部(薬学)・教授

研究者番号：20275093

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：薬物依存関連分子Shati/Nat81が、危険ドラッグによる異常行動や依存性を抑制するかどうかを検討した。危険ドラッグは、覚醒剤と類似した構造を持つカチノン系と大麻と類似した構造を持つカンビノイド系に大別される。前者と後者を代表する物質として、metamphetamine (MAP) および tetrahydrocannabinol (THC) を用い、それぞれをマウスへ投与した時の薬理効果へのShati/Nat81の作用を検討した。Shati/Nat81を側坐核過剰発現したマウスではMAPの作用を抑制し、THCの薬理作用については抑制傾向が観察された。

研究成果の概要(英文)：“Kiken Drugs” are including two type of chemical compounds, cathinone and cannabinoid derivatives. Shati/Nat81 was originally isolated from the nucleus accumbens of mice as a methamphetamine-related molecule. Since then, Shati/Nat81 has been characterized as an N-acetyltransferase 8-like protein that catalyzes N-acetylaspartate (NAA) synthesis from aspartate and acetyl-coenzyme A. The pharmacological effects of methamphetamine were inhibited in Shati/Nat81-overexpressed mice, in locomotor activity test and conditioned preference tests. Tetrahydrocannabinol (THC) did not occur the significant dependent effects, but induced anxiety-like behaviors. The anxiety-like behaviors were not depressed in the Shati/Nat81-overexpressed mice. These results suggest that Shati/Nat81 has inhibitory effects on the phthe one type of “Kiken Drugs”, but does not another.

研究分野：神経精神薬理学、薬物治療学、医療薬学

キーワード：Shati/Nat81 危険ドラッグ THC メタンフェタミン AAV マウス

1. 研究開始当初の背景

他の乱用薬物以上に危険ドラッグに関する身体への影響についての情報発信は、薬学研究者に対して、要請されている事柄の1つであった。平成 27 年前後、国民が最も関心を持っていた危険ドラッグの身体へのダメージについては、科学的な解明はほとんどなされていず、詳細な検討と治療法の確立が社会から強く望まれていた。我々は、覚醒剤メタンフェタミンを連続投与したマウス脳で発現量が増加している分子として、Shati を見出した。Shati/Nat8l は、*N*-acetyl aspartate (NAA) や NAA-glutamate (NAAG) の産生促進を介して覚醒剤をマウスに投与した時におこる異常行動や神経細胞膜上に存在するドパミントランスポーターの機能障害を抑制することを見出していた。薬物依存のメカニズムに Shati/Nat8l が関与していることを解明した我々の研究の意義は大きい。本分子が生合成経路に関与している NAA や NAAG は、脳に最も多く存在するアミノ酸であり、統合失調症などの精神疾患の画像診断へも活用され、乱用薬物に対する精神異常にも関連している可能性が十分に考えられている。しかし、最近、関心が高まっている危険ドラッグとの関係については、まだ、全く不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、危険ドラッグの身体へ与える影響やその機構を明確にした上で、健康被害の抑制に Shati/Nat8l を活用することができるかの検討を目的としていた。また、本分子転写開始プロモーター部位を検討することで、800 以上ある違法ドラッグの危険性を *in vitro* で簡便にスクリーニング方法に繋げることも可能と考えていた。現在、我が国および世界的にも緊急性を要している危険ドラッグの毒性発現メカニズムを解明しつつ、Shati/Nat8l を Key 分子として、今までに世界的にも全くなされていなかった乱用薬物依存患者への治療薬開発や、膨大な数がある危険ドラッグの危険度の予想へもつなげようとするものである。

3. 研究の方法

(1) 危険ドラッグの身体依存、精神依存および神経毒性についての検討

本研究で扱う危険ドラッグをそれぞれマウスに投与して、マウス側坐核からのドパミン遊離量およびグルタミン酸遊離量を *in vivo* マイクロダイアリシスで測定した。実験には、脳固定器で側坐核にカニューレを挿入し、HPLC での測定を行った。

(2) 危険ドラッグの神経細胞死に与える影響についての検討

ドパミンやグルタミン酸の放出量が著しく増加した化合物については、神経細胞死を誘導する可能性があることから、マウス胎仔海

馬から採取した組織を分散した初代海馬培養神経細胞へ添加して、細胞数を計数した。培養神経細胞の細胞死については、アポトーシスかどうかについては、ウエスタンブロットなどを用いて、関連タンパクの検討を行った。ネクローシスの可能性も考え、核染色を行った。危険ドラッグの中から、Tetrahydrocannabinol (THC) については、電気生理学的な実験も実施し、危険ドラッグが神経伝達に影響を与えているかどうかを検討した。

(3) 危険ドラッグの依存性形成についての検討

各種危険ドラッグの依存性の検討には行動量の測定や薬物場所嗜好性反応試験を行った。

(4) 危険ドラッグ投与後の脳内各部位での Shati/Nat8l 発現量の変化の検討

危険ドラッグそれぞれを 1 回、または 1 日 1 回 21 日間投与したマウスの脳各部位（前頭葉皮質、側坐核、線条体および海馬）を用いて、mRNA を抽出し、リアルタイム RT-PCR 法にて発現量の変化を検討した。

(5) 危険ドラッグの脳に与える障害に対する Shati/Nat8l の抑制効果の検討

Shati/Nat8l を脳局所的に過剰発現させるためには、アデノ随伴ウイルスベクター (AAV ベクター) を用いる。AAV ベクターは連携研究者として自治医科大学神経内科村松慎一教授に作成を依頼した。村松教授は、AAV ベクターを用いて神経変性疾患の患者への遺伝子治療に成功しており、ウイルスベクター作成については、第一人者である。すでに臨床研究でヒトに対して用いられているほど、安全で効率のよい AAV ベクターを作成している。Shati/Nat8l を組み込んだものを側坐核または海馬に注入し、部位を特定して発現を増加させた。これらのマウスを用いて、Shati/Nat8l と危険ドラッグの関係を明確にした。

(6) 危険ドラッグが誘導する脳神経細胞死に対する Shati/Nat8l の抑制効果

我々は、神経細胞に効率的に遺伝子導入をすることができるヌクレオフェクターを所有している。マウス培養神経細胞を用いて、高効率に Shati/Nat8l を発現させ、同細胞に対して、細胞死に対する Shati/Nat8l の抑制効果を確認した。

(7) Shati/Nat8l のプロモーターが危険ドラッグによって、活性化されるかどうかを検討する

Shati/Nat8l のプロモーター部位を我々は同定し、*in vivo* および *in vitro* で、覚醒剤メタンフェタミンで活性化される。危険ドラ

ッグにおいても活性化されるかどうかを、まず、遺伝子導入をした培養細胞で検討を行った。もし、神経細胞死や依存性の発現とプロモーター活性の程度に相関があれば、本試験系が、危険ドラッグの毒性評価に用いることができる可能性がある。

4. 研究成果

(1) 危険ドラッグの身体依存、精神依存および神経毒性についての検討

カンナビノイド系薬物の代表として THC をマウスに投与したところ、不安作用や鎮痛作用が見出された。一方、条件付け場所嗜好性は成立しなかった。他のグループからの過去の論文では、条件付け場所嗜好性試験の前に 10 日間の連続投与をしておくことで嗜好性が発現することが報告されていたため、同じ条件で我々も検討を行ったが、明確な嗜好性は観察されなかった。

(2) THC の毒性に対する Shati/Nat8l の抑制作用

THC を培養細胞に添加しても、細胞死は観察されなかった。また、マウスに投与した時の異常行動に対して、Shati/Nat8l の側坐核発現増強によって、抑制傾向が観察された。

(3) THC 投与後の脳内 Shati/Nat8l mRNA の発現量の変化

THC を 10 日間投与したマウスの脳を用いて Shati/Nat8l mRNA の発現量の変化を検討したところ、側坐核での発現量増加が観察され、THC による報酬システム系が Shati/Nat8l と関連している可能性が示された。

(5) 考察

危険ドラッグを試薬として購入し、マウスを用いての実験も行ったが、法規制が厳しく、研究用としても購入することが難しくなり、THC を中心として研究を実施した。THC は天然の大麻からの抽出物であることから、ロット間でのバラツキがあり、研究結果の偏差に結びつく面があった。それらの問題点に対して、実験の回数を増やすことで克服をし、成果を得た。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 16 件)

Toriumi K, Tanaka J, Mamiya T, Alkam T, Kim KC, Nitta A, Nabeshima T, Shati/Nat8l knockout mice show behavioral deficits ameliorated by atomoxetine and methamphetamine. *Behav Brain Res*, 339; 207-214 (2018)
DOI: 10.1016/j.bbr.2017.11.040.

Fu K, Miyamoto Y, Sumi K, Saika E, Muramatsu S, Uno K, Nitta A, Overexpression of transmembrane protein 168 in the mouse nucleus accumbens induces anxiety and sensorimotor gating deficit. *PLoS One* 12; e0189006 (2017)

DOI: 10.1371/journal.pone.0189006

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. *Sci Rep*, 7; 16872 (2017)
DOI: 10.1038/s41598-017-17151-1.

Fu K, Miyamoto Y, Otake K, Sumi K, Saika E, Matsumura S, Sato N, Ueno Y, Seo S, Uno K, Muramatsu S, Nitta A, Involvement of the accumbal osteopontin-interacting transmembrane protein 168 in methamphetamine-induced place preference and hyperlocomotion in mice. *Sci Rep*, 7; 13084 (2017)
DOI: 10.1038/s41598-017-13289-0

Miyamoto Y, Iegaki N, Fu K, Ishikawa Y, Sumi K, Azuma S, Uno K, Muramatsu S, Nitta A Striatal *N*-acetylaspartate synthetase Shati/Nat8l regulates depression-like behaviors via mGluR3-mediated serotonergic suppression in mice. *Int J. Neuropsychopharmacol.* (2017)
DOI: 10.1093/ijnp/pyx078

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*, 30;329:157-165 (2017)
DOI: 10.1016/j.bbr.2017.04.052.

Uno K, Miyazaki T, Sodeyama K, Miyamoto Y, Nitta A, Methamphetamine induces Shati/Nat8L expression in the mouse nucleus accumbens via CREB- and dopamine D1 receptor-dependent mechanism. *PLoS One*. 12; e0174196 (2017)
DOI:10.1371/journal.pone.

Uno K, Kikuchi Y, Iwata M, Uehara T, Matsuoka T, Sumiyoshi T, Okamoto Y, Jinno H, Takada T⁷, Furukawa-Hibi Y, Nabeshima T, Miyamoto Y, Nitta A, Decreased DNA methylation in the Shati/Nat8l promoter in both patients with schizophrenia and a methamphetamine-induced murine model of schizophrenia-like phenotype.

PLoSOne. 11: e0157959 (2016)
DOI: 10.1038/s41598-017-13289-0.

Fu K, Lin H, Miyamoto Y, Wu C, Yang J, Uno K, Nitta A, Pseudoginsenoside-F11 inhibits methamphetamine-induced behaviors by regulating dopaminergic and GABAergic neurons in the nucleus accumbens. *Psychopharmacology (Berl)*. 233: 831-840 (2016)
DOI: 10.1038/s41598-017-13289-0.

Uno K, Nishizawa D, Seo S, Takayama K, Matsumura S, Sakai N, Ohi K, Nabeshima T, Hashimoto R, Ozaki N, Hasegawa J, Sato N, Tanioka F, Sugimura H, Fukuda KI, Higuchi S, Ujike H, Inada T, Iwata N, Sora I, Iyo M, Kondo N, Won MJ, Naruse N, Uehara-Aoyama K, Itokawa M, Yamada M, Ikeda K, Miyamoto Y, Nitta A. The piccolo intronic single nucleotide polymorphism rs13438494 regulates dopamine and serotonin uptake and shows associations with dependence-like behavior in genomic association study. *Cur. Mol. Med.* 15: 265-274. (2015)
DOI:10.2174/1566524015666150330145722

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)
DOI: 10.1097/WNR.0000000000000416.

Toriumi K, Mamiya T, Song Z, Honjo T, Watanabe H, Tanaka J, Kondo M, Mouri A, Kim HC, Nitta A, Fukushima T, Nabeshima T, Deletion of SHATI/NAT8L decreases the N-acetylaspartate content in the brain and induces behavioral deficits, which can be ameliorated by administering N-acetylaspartate. *Eur Neuropsychopharmacol*. 25: 2108-2117. (2015)
DOI:10.1016/j.euroneuro.2015.08.003

[学会発表](計54件)

Uno K, Miyazaki T, Miyamoto Y, Nitta A, Induction system of Shati/Nat8L expression by methamphetamine via dopamine D1 signaling pathway. The 5th Congress of AsCNP 2017; 2017

Miyamoto Y, Hamatani K, Inagaki R,

Sato K, Muramatsu SI, Nabeshima T, Uno K, Nitta A.: The combination of presynaptic cytomatrix protein Piccolo knockdown in the prefrontal cortex and mild social defeat stress induces schizophrenia-like behaviors in mice. The 5th Congress of AsCNP 2017; 2017

Nitta A, Novel molecules, Shati/Nat8l, Piccolo and TMEM168, protect methamphetamine dependence in mice. Joint AsCNP-ASNP meeting (JM02 Addiction research collaborations in Asia). The 5th Congress of AsCNP 2017; 2017

新田淳美, 依存性薬物の薬理作用発現を抑制する分子群 行動薬理的・生化学的研究. シンポジウム 19 依存性薬物の光と影. 第 39 回日本生物学的精神医学会・第 47 回日本神経精神薬理学会合同年会; 2017

新田淳美, マウス in vivo マイクロダイアリス法を用いた薬物依存研究. 第 55 回日本生体医工学会大会; 2016

新田淳美, 新規分子 Shati/Nat8l の基礎研究成果をもととしたトランスレシヨナルリサーチ. 第 18 回応用薬理シンポジウム; 2016.

Miyamoto Y, Fu K, Iegaki N, Sumi K, Furukawa-Hibi Y, Muramatsu S, Nabeshima T, Uno K, Nitta A, N-acetylaspartate synthetase Shati/Nat8l-overexpressed mice. *Neuroscience* 2016; 2016

Fu K, Miyamoto Y, Saika E, Muramatsu S, Uno K, Nitta A, Effects of TMEM168 overexpression on methamphetamine-induced hyperlocomotion and place preference, and anxiety in mice via regulating dopaminergic and GABAergic neuronal systems in the nucleus accumbens of mice. *Neuroscience* 2016; 2016 Nov 11-15; San Diego.

新田淳美, 宮崎杜夫, 菊地佑, 袖山健吾, 日比陽子, 鍋島俊隆, 宮本嘉明, 宇野恭介, マウス側坐核における Shati/Nat8L の発現制御メカニズム. 第 46 回日本神経精神薬理学会; 2016

宮崎杜夫, 宇野恭介, 菊池佑, 日比陽子, 鍋島俊隆, 宮本嘉明, 新田淳美, メタンフェタミンはドパミン D1 受容体

シグナルの活性化によって Shati/Nat8I を上方制御する. 日本薬理学会第 88 回 年会 2015

新田淳美, 宮崎杜夫, 岩田美奈, 菊地 佑, 袖山健吾, 宇野恭介, 新規分子 Shtai/Nat8I による薬物依存および精神 疾患の治療を目指すためのストラテジ ー. 医療薬学フォーラム 2015; 2015

宇野恭介, 鷺見和之, 松村祥平, 宮本 嘉明, 古川-日比陽子, 鍋島俊隆, 村松 慎一, 新田淳美, 培養神経細胞における 精神疾患関連分子 Shati/Nat8I の突起伸 長への影響. 第 66 回日本薬理学会北部; 2015

岩田美奈, 宇野恭介, 宮崎杜夫, 袖山 健吾, 山森英長, 藤本美智子, 安田由 華, 橋本亮太, 宮本嘉明, 鍋島俊隆, 武田雅俊, 新田淳美, 精神疾患患者に おける末梢血中 SHATI/NAT8L の DNA メチ ル化率の低下. 第 45 回日本神経精神薬 理学会年会; 2015

宮本嘉明, 佐藤慶治, 稲垣良, 村松慎 一, 鍋島俊隆, 宇野恭介, 新田淳美, マウス前頭前皮質での Piccolo ノック ダウンによるシナプス機能障害. 第 45 回日本神経精神薬理学会年会; 2015

新田淳美, マウス前頭前皮質における Piccolo 発現低下による統合失調症様 行動の誘導. 第 45 回日本神経精神薬理 学会年会; 2015

宮本嘉明, 宇野恭介, 鍋島俊隆, 新田 淳美, ドパミン神経系における N-アセ チルトランスフェラーゼ Shati/Nat8I を 介した機能制御メカニズム. 平成 27 年 度アルコール・薬物依存関連学会合同学 術総会; 2015

〔図書〕(計 1 件)

Nitta A, Noike H, Sumi K, Miyanishi H, Tanaka T, Nagakura M, Iegaki N, Kaji JI, Miyamoto Y, Muramatsu SI, Uno K, Shati/Nat8I and N-acetylaspartate (NAA) have important roles in regulating nicotinic acetylcholine receptors in neuronal and psychiatric diseases in animal models and humans “Nicotinic Acetylcholine Receptor Signaling in Neuroprotection” Ed Springer Nature

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称: プロポリスのミセル化抽出物を有効成

分とする認知機能改善剤

発明者: 新田淳美、鷺見和之、野池 悠、宇 野恭介

権利者: 国立大学法人富山大学

種類: 特許

番号: P2017-148780

出願年月日: 平成 28 年 8 月 1 日

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.pha.u-toyama.ac.jp/yakuchi/top.html>

<http://sai-jisedai.jugem.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新田 淳美 (NITTA, Atsumi)

富山大学大学院医学薬学研究部 (薬学)・教 授

研究者番号: 20275093

(2) 研究分担者

宮本 嘉明 (MIYAMOTO, Yoshiaki)

富山大学大学院医学薬学研究部 (薬学)・准 教授

研究者番号: 20449101

宇野 恭介 (UNO, Kyosuke)

富山大学・大学院医学薬学研究部 (薬学)・ 准教授

研究者番号: 20449101

(3) 連携研究者

村松 慎一 (MURAMATSU, Shin-Ichi)

自治医科大学・教授

研究者番号: 10239543