

令和元年6月15日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18933

研究課題名(和文)統合失調症における認知機能障害の原因解明と治療法への探求

研究課題名(英文)Study for the cognitive functional disorder in schizophrenia

研究代表者

宇野 恭介(Uno, Kyosuke)

富山大学・大学院医学薬学研究部(薬学)・助教

研究者番号：30608774

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：精神疾患関連因子Shati/Nat8lはうつ病や統合失調との関連性が示唆されている。本研究ではこのShati/Nat8l遺伝子改変(Shati KO)マウスを用いて行動薬理学、および電気生理学的解析を行い認知機能との関連性を検討した。Shati KOマウスでは野生型(WT)マウスに比べて、認知行動の障害が雌性マウスでのみ確認された。本マウスでの電気生理学検討により雌性マウスではシナプス長期増強(LTP)の減弱が確認された。Shati KOマウスでのこれらの障害は、海馬CA3領域へのアデノ随伴ウイルスを用いたShati/Nat8lの発現増強によりWTマウスと同程度まで回復した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

統合失調症患者においては陽性症状・陰性症状・認知機能障害が主な症状であるが、一貫して全ての患者に発現している症状は認知機能障害である。統合失調症にはグルタミン・ドパミンなど様々な仮説が提唱されているが、現在までにShati遺伝子は様々な精神疾患に関連することを報告してきており、さらにこの遺伝子が認知記憶障害にも関与していることが判明すれば、モデル動物作成が未だ確定されていない統合失調症モデル動物として今後の統合失調症の病因解明などに大いなる進捗が期待できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Novel molecule Shati/Nat8l is considered that associate with psychiatric diseases such as depression and schizophrenia. In this study, we carried out various behavioral and electrophysiological study using Shati KO mice to clarify the contribution of Shati/Nat8l on the cognitive function in mice. Impairment of cognitive dysfunction in the Y-maze and novel object recognition were observed only in Shati KO female mice. Furthermore, injection of adeno associated virus vector of Shati/Nat8l into hippocampal CA3 region of Shati KO ameliorated these cognitive dysfunctions in the female mice. Also in the electrophysiology test, the LTP of Shati KO mice were significantly decreased compared with wild type mice of female mice.

研究分野：神経精神薬理学

キーワード：統合失調症 認知機能障害

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

わが国における認知症の患者数は、年々増加してきている。平成 20 年ではアルツハイマー型認知症患者が約 32 万 3 千人、血管性および原因不明の認知症患者が 12 万 3 千人に上り、深刻な問題となっている。認知症は中枢神経システムの機能低下により発症する。認知症の症状には中核症状である記憶障害と認知機能障害の他に、幻覚・妄想、睡眠障害、抑うつ、不安等の周辺症状があり、日常生活を円滑に過ごすことが困難になる。そのため、効果的な認知症治療のために記憶や認知機能のメカニズムを解明することが必須である。学習や記憶については、行動を観察するだけでなく、組織、細胞及び分子レベルでの研究が進められており、脳内では海馬が重要な役割を果たしていることが明らかになっている。海馬では、その CA3 領域から CA1 領域にかけてシェイファー側枝が伸びており、CA3 細胞での興奮電流が軸索を通して CA1 領域に伝わり、軸索終末のシナプス間隙からグルタミン酸等の興奮性アミノ酸が放出される (Koerner et al., 1982)。これは NMDA 受容体依存型の長期増強 (long-term potentiation: LTP) と呼ばれており、記憶の細胞・分子メカニズムのひとつであると考えられている (Lynch., 2004)。一方、代謝型グルタミン酸受容体 (mGluR) は自己受容体としてグルタミン酸神経の前シナプス終末に発現しており、グルタミン酸放出を調節している (Niswender et al., 2010)。このように、記憶の基盤メカニズムは、グルタミン酸による複雑な制御を受けている。



■1 SHATI

一方、我々は、覚せい剤であるメタンフェタミンをマウスに連続投与することによって側坐核で mRNA 発現量が増加する、Shati (図 1) と名付けた新規タンパク質について研究を進めている (Niwa et al., 2007)。Shati は N-アセチル転移酵素であり、アスパラギン酸から N-アセチルアスパラギン酸 (NAA) を生合成する (Ariyannur et al., 2010)。さらに、NAA はグルタミン酸と結合することによって N-アセチルアスパラギン酸-グルタミン酸 (NAAG) となり、この NAAG は、グループ 代謝型グルタミン酸受容体のひとつ mGluR3 を活性化させて神経伝達物質として働く (Neale., 2011)。NAA および NAAG は脳内に高濃度で存在しており、海馬 CA1 領域における NMDA 受容体依存型の電流を減少させる (Bergeron et al., 2007)。また、アルツハイマー病患者の死後脳では、海馬において NAA および NAAG が減少している (Jaarsma et al., 1994)。しかし、NAAG が海馬依存型の記憶においてどのような役割をはたしているかは明らかとはなっていない。

我々は Shati 遺伝子欠損マウス (KO マウス) を保有しており、統計学的な結果は未だ不確定であるが、ホモ欠損マウスにおいて出産数の異常が観察されている。さらにワイルドタイプ (WT) マウスと比較して子宮重量や骨密度に変化が認められる。

我々はさらに Shati の遺伝子発現制御機構についても検討を行っており、Shati 遺伝子の転写開始点上流の順次欠損配列を組み込んだルシフェラーゼベクターを作成することによりプロモーターアッセイを行った。Shati 遺伝子の発現制御メカニズムとして、CREB シグナルが関与する可能性が示唆される結果を得られている。

### 2. 研究の目的

上記のような研究背景より Shati 遺伝子は mGluR3 や CREB シグナルを介してエストロゲンと関連し、マウスにおける記憶学習制御機構に密接に関与している可能性が示唆される。本研究においては 1) エストロゲン作用と Shati 遺伝子の関連性の有無を明らかにし、2) エストロゲンと Shati 遺伝子と記憶学習の関連性についての検討を行う。1) については、Shati KO マウスを用いた表現形解析を行う。性ホルモンであるエストロゲンは、骨粗鬆症との密接な関係があることは周知の事実であり、予備実験中で得られた出産率や骨密度測定などにより検討する。2) についても Shati KO マウスを用いた脳内シグナリングについて電気生理学的解析や、各種行動実験をもとに行う。

### 3. 研究の方法

雌性の Shati KO マウスを用いてエストロゲンを測定するなど、マウスの表現系解析を行いエストロゲンと Shati 遺伝子の関連性を検討した。さらに同上のマウスを用いて認知記憶学習についての行動実験を行った。さらに、急性スライスを作成し、電気生理学的解析を行い検討した。またそれらの変化に対して、アデノ随伴ウイルスを用いて回復実験を行い、その影響について再検討した。

研究内容 (1) Shati KO マウスを用いたエストロゲン関連との表現系解析

Shati 遺伝子とエストロゲン経路との関連性を検討する目的で、Shati KO マウスを用いた表現系解析を行った。

【(1)-A: 子宮重量の測定】子宮重量を測定することにより、子宮へのエストロゲン作用の変化を検討した。

【(1)-B: 骨密度測定】骨密度を測定することにより骨粗鬆症あるいは骨大理石病の可能性を検討した。Shati K0 マウスを用いて骨組織染色を行い骨密度の計測を行った。

【(1)-C: 骨形態計測】さらに詳細な解析を行う目的で、骨形態計測を行う。骨構造に関するパラメータ、骨形成に関するパラメータ、骨吸収に関するパラメータを計測した。

【(1)-D: 血中および各脳組織におけるエストロゲン濃度測定】血中および各脳組織におけるエストロゲン濃度を測定した。

研究内容(2) Shati K0 マウスを用いた認知記憶学習に関する行動解析

Shati K0 マウスを用いて認知記憶学習を確認する行動実験を行った。

【(2)-A; Locomotion test】アクリル製の四角い箱中にマウスを入れて自由に行動させ、5分ごとに計1時間行動量を測定した。

【(2)-B; Y-maze test】Y字型迷路のアームの先端にマウスを置き、アームに侵入した回数と、連続した3回のアーム侵入がすべて異なった回数を計測し、交替行動率(%)を算出した。

【(2)-C; Novel object recognition test】アクリル製の四角い箱の中に、マウスを入れて3日間馴化後、4日目に、2つの物体を箱の中に取り付け、マウスがそれぞれの物体にアプローチする回数、時間を測定した。24時間経過後に、2つの物体のうち片方を新しい物体に置き換えて、4日目同様に箱の中にマウスを10分間入れて物体にアプローチする回数と時間を測定した。

【(2)-D; 文脈学習試験】マウスを実験チャンパー内で2分間放置した後、ブザー音による刺激と0.8mAの電気ショックが与え30秒間(ブザー音 13秒間, ブザー音 + 電気ショック 2秒間、インターバル 15秒間)を1セットとし、4セットの計2分間行った。conditioning終了後マウスはホームケージに戻しconditioningの1日後と7日後にcontextual testを行う。マウスをconditioning時と同じチャンパーに入れ、2分間の無動時間を測定した。さらにcontextual testの2時間後にtone testを行った。マウスをconditioning時とは異なる実験チャンパーに入れ、無動時間を測定する。この時30秒間(ブザー音 15秒間, インターバル 15秒間)を1セットとし、4セットの計2分間測定した。

研究内容(3) Shati K0 マウスを用いた電気生理学的解析および分子生物学的解析

MED64CHを用いShati K0 マウスの電気生理学的解析を行うことにより、電気生理学的解析を行った。

【(3)-A; 電気生理学実験】マウスの脳を断頭により取り出し、氷冷の人工脳脊髄液下での海馬の冠状切片を作製しバースト刺激を与え、標準刺激による応答を1時間記録した。

研究内容(4) アデノ随伴ウイルス(AAV)を用いた検討。

上記研究内容(1)~(3)で得られた結果を元にAAVを用いた回復実験を行った。

【(4)-A; AAVを用いた研究】上記の研究で得られた結果をもとに、Shati K0 マウスに対してAAVを用い回復実験を行う。

#### 4. 研究成果

研究成果(1) Shati K0 マウスを用いたエストロゲン関連との表現系解析

Shati 遺伝子とエストロゲン経路との関連性を検討する目的で、Shati K0 マウスを用いた表現系解析を行った。子宮重量はK0 マウスで有意な増加が認められた。パラフィン切片を作成し骨密度を測定したところ大腿骨にて骨密度の有意な増加が観察され、また骨形態計測を行ったところ骨組織量、骨梁数及び枝分かれ数が有意に増加していた。また血中のエストロゲン濃度の有意な増加が観察された。これらの結果よりShati K0 マウスではエストロゲンの増加を伴う骨密度の上昇が確認された。

研究成果(2) Shati K0 マウスを用いた認知記憶学習に関する行動解析

Shati K0 マウスを用いて認知記憶学習を確認する行動実験を行った。

【(2)-A; Locomotion test】を測定したところShati K0 マウスでは行動量の上昇が雌雄差なく観察された。

【(2)-B; Y-maze test】により交替行動率を算出したところ雌性のShati K0 マウスでのみ交替行動率の低下が観察された。

【(2)-C; Novel object recognition test】によりマウスの空間認知機能を測定したところ雌性のShati K0 マウスでのみ認知機能の障害が観察された。

【(2)-D; 文脈学習試験】を行ったところ両マウスにおいて著明な変化は観察されなかったが、Shati K0 マウスでは電流の強さに対してのすくみ行動の出現が有意に低い電流値で影響が観察された。

研究成果(3) Shati K0 マウスを用いた電気生理学的解析および分子生物学的解析

MED64CHを用いShati K0 マウスの電気生理学的解析を行うことにより、電気生理学的解析を行った。

【(3)-A; 電気生理学実験】を行ったところShati K0 マウスの雌雄両性においてLTPの有意な減少が観察された。

研究内容(4) アデノ随伴ウイルス(AAV)を用いた検討。

上記研究内容(1)~(3)で得られた結果を元に AAV を用いた回復実験を行った。

【(4)-A; AAV を用いた研究】上記の研究で得られた結果をもとに、雌性の Shati KO マウスに対して AAV を用い回復実験を行ったところ、KO マウスで認められていた交替行動率および空間認知機能の減弱について有意な回復が観察された。

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 4 件)

1. 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*. 2017 Mar; 2012(3): e0174196. DOI: 10.1371/journal.pone.0174196. eCollection 2017.
2. Miyamoto Y, Iegaki N, Fu K, Ishikawa Y, Sumi K, Azuma S, Uno K, Muramatsu SI, Nitta A. Striatal N-Acetylaspartate Synthetase Shati/Nat8L Regulates Depression-Like Behaviors via mGluR3-Mediated Serotonergic Suppression in Mice. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2017 Dec; 20(12): 1027-35. DOI: 10.1093/ijnp/pyx078.
3. 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*. 2017 Dec; 7(1): 16872. DOI: 10.1038/s41598-017-17151-1.
4. Uno K, Kikuchi Y, Iwata M, Uehara T, Matsuoka T, Sumiyoshi T, Okamoto Y, Jinno H, Takada T, 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. *PLoS One*. 2016 Jun 27;11(6):e0157959. doi: 10.1371/journal.pone.0157959.

### 〔学会発表〕(計 16 件)

1. 宇野恭介、宮西肇、宮崎杜夫、袖山健吾、藤原俊之、村松慎一、新田淳美。線条体の Shati/Nat8L はうつ様症状発症の脆弱性を決定づける。第 92 回日本薬理学会年会；2019 Mar 14-16；大阪。
2. 宮西肇、宇野恭介、岩田美奈、菊池佑、山森英長、安田由華、大井一高、橋本亮太、住吉太幹、新田淳美。SHATI/NAT8L の血中 DNA メチル化は未治療のうつ病患者において上昇する。第 92 回日本薬理学会年会；2019 Mar 14-16；大阪。
3. HADDAR MERIEM、宇野恭介、東克憲、村松慎一、新田淳美。前頭前皮質の Shati/Nat8L 過剰発現はメタンフェタミン誘発性の場所嗜好性を減弱する。第 92 回日本薬理学会年会；2019 Mar 14-16；大阪。
4. 宇野恭介、宮西肇、宮崎杜夫、袖山健吾、藤原俊之、村松慎一、宮本嘉明、新田淳美。マウス線条体の Shati/Nat8L はうつ様症状発症に脆弱性を示す。第 139 回日本薬学会年会；2019 Mar 20-23；千葉。
5. Uno K, Endo K, Sumi K, Meriem H, Miyamoto Y, Muramatsu SI, Nitta A, Cognitive dysfunction induced by the deletion of NAA synthase Shati/Nat8L in mice. 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (WCP2018 Kyoto); 2018 Jul 1-6; Kyoto
6. Noike H, Sumi K, Uno K, Tomohiro T, Hatanaka Y, Miyamoto Y, Nitta A. Behavioral impairment associated with dysfunction of myelination by Shati/Nat8L deficit in mice. 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (WCP2018 Kyoto); 2018 Jul 1-6; Kyoto
7. Miyanishi H, Uno K, Miyazaki T, Sodeyama K, Fuziwara T, Muramatsu SI, Miyamoto SI, Nitta A. Vulnerability of social defeats in the overexpressed striatal SHATI/NAT8L in mice. 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (WCP2018 Kyoto); 2018 Jul 1-6; Kyoto
8. Haddar M, Uno K, Muramatsu SI, Nitta A. Attenuation of the formation of CPP by methamphetamine in Shati/Nat8L overexpressed mice in the prefrontal cortex. CINP 31th World Congress (CINP2018); 2018 Jun 16-19; Vienne
9. Uno K, Endo K, Sumi K, Hadda Mr, Muramatsu SI, Miyamoto Y, Nitta A. Sexual differences of cognitive impairment induced by deletion of Shati/Nat8L. CINP 31th World Congress (CINP2018); 2018 Jun 16-19; Vienne
10. 新田淳美、鷲見和之、野池悠、宮本嘉明、宇野恭介。SHATI/NAT8L 欠損マウスにおける脳ミエリン形成遅延による社会性能力の低下。第 133 回日本薬理学会近畿部会；2018 Jun 1；広島。
11. Miyanishi H, Uno K, Miyazaki T, Sodeyama K, Fuziwara T, Muramatsu SI, Miyamoto Y,

- Nitta A. Effects of SHATI/NAT8L overexpression in the striatum on social stress sensitivity in mice. 第 60 回日本神経化学会大会 ; 2017 Sep 7-9 ; 仙台 .
12. 東 颯太, 宮本嘉明, 家垣典幸, 傳 柯荃, 鷺見和之, 石川雄大, 村松慎一, 宇野恭介, 新田淳美. マウス線条体での Shati/Nat8l 過剰発現によるセロトニン神経系を介する情動性調節. 第 68 回薬理学会北部会 ; 2017 Sep 15-16 ; 山形 .
  13. 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 Apr 27-29; Bali .
  14. Uno K, Sumi K, Meriem H, Muramatsu SI, Miyamoto Y, Nitta A. Deletion of Shati/Nat8L in mice show antianxiety, and sexual differences of learning ability. 第 90 回日本薬理学会年会 ; 2017 Mar 15-17 ; 長崎 .
  15. 宇野恭介, 宮崎杜夫, 宮本嘉明, 新田淳美.: マウス側坐核における Shati/Nat8L の発現制御メカニズムの解析. 第 38 回日本生物学的精神医学会・第 59 回日本神経化学大会; 2016 Sep 8-10; 福岡.
  16. 宇野恭介, 宮崎杜夫, 宮本嘉明, 袖山健吾, 新田淳美.: 精神疾患関連遺伝子 Shati/Nat8L の遺伝子発現メカニズムの解析. 第 18 回応用薬理シンポジウム; 2016 Aug 5-6; 名古屋.
  17. Sodeyama K, Fuzisawa K, Miyazaki T, Uno K, Muramatsu S, Nabeshima T, Miyamoto Y, Nitta A.: Overexpression of Shati/Nat8L in the dorsal striatum induces depression-like behaviors in mice. 30th CINP World Congress of Neuropsychopharmacology; 2016 Jul 3-5; Seoul .
  18. Miyamoto Y, Inagaki R, Sato K, Muramatsu S, Nabeshima T, Uno K, Nitta A.: Presynaptic protein Piccolo knockdown in the prefrontal cortex induces cognitive and emotional impairment in mice. 30th CINP World Congress of Neuropsychopharmacology; 2016 Jul 3-5; Seoul .
  19. 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 Nov 11-15; San Diego.
  20. 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 Jul 2-3; ソウル.

〔図書〕(計 1 件)

1. Nitta A, Noike H, Sumi K, Miyanishi H, Tanaka T, Nagakura M, Iegaki N, Kaji JI, Miyamoto Y, Muramatsu SI, Uno K. Shati/Nat8L 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 by Akaike A, Shimohama S, Misu Y, Springer Nature; 2018 Apr; p.89-111

〔産業財産権〕

出願状況 (計 件)

名称 :  
 発明者 :  
 権利者 :  
 種類 :  
 番号 :  
 出願年 :  
 国内外の別 :

取得状況 (計 件)

名称 :  
 発明者 :  
 権利者 :  
 種類 :  
 番号 :  
 取得年 :  
 国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。