

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：34304

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06451

研究課題名(和文)代謝負荷が関わる精神神経疾患の共存症とシアル酸修飾

研究課題名(英文)Psychiatric comorbidity that metabolic tolerance is involved and sialylation

研究代表者

加藤 啓子(Kato, Keiko)

京都産業大学・生命科学部・教授

研究者番号：90252684

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：てんかんの発症と、うつ、不安症は、薬剤の副作用を含めて併発率が高く、それぞれに随伴する症状を共存症と呼ぶ。また、こうした一連の精神疾患に罹患すると、肥満や心臓血管障害といった代謝疾患の併発率も著しく上昇するが、ゲノムワイド関連研究(GWAS)カタログにより、ヒトST3Gal4が、血中のアルカリホスファターゼ(ALP)、タンパク質、コレステロール値に関連することが知られていた。今回、マウスSt3Gal4もヒトST3Gal4と同様の代謝パラメータに関連することを証明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、シアル酸転移酵素・St3Gal4が担当するシアル酸修飾が、代謝変化を伴う情動変化を示すこと、そしてこの変化はヒトにも外挿できる可能性を示唆している。これまでに、St3Gal4欠損マウスが示す不安様行動の亢進が、血中ALP(アルカリホスファターゼ)値の上昇と正の相関を示し、さらに、視床におけるALP活性低下と負の相関を示すことを見つけた。St3Gal4欠損マウスは、情動機能と代謝疾患の共存に関与するモデルであることを示すことができたことから、精神疾患と代謝疾患の共存症の発症機構を研究するモデルマウスを提案することができた。

研究成果の概要(英文)：The global prevalence of epilepsy, depression, anxiety, epilepsy, and schizophrenia show comorbidity with each other. Further, metabolic disorders including the side effects of drugs, show high comorbidity with psychiatric disorders, such as obesity and cardiovascular diseases. Genome-wide association studies (GWAS) catalog has previously indicated that single-nucleotide polymorphisms of ST3GAL4 are associated with alkaline phosphatase (ALP), proteins, and cholesterol in the blood. Previous research has shown that mouse St3Gal4 regulates the onset of epilepsy, depression, and anxiety through its expression levels in the thalamic neurons. This study demonstrated that mouse St3Gal4 is also associated with metabolic parameters similar to human ST3Gal4. This study suggests that St3Gal4 deficient mice help to investigate how to incident comorbidity between emotional behaviors and metabolic aberration.

研究分野：実験動物学, 神経化学, 糖質生物学

キーワード：シアル酸転移酵素 うつ・不安症 側頭葉てんかん 扁桃体 視床 代謝 アルカリホスファターゼ

## 1. 研究開始当初の背景

てんかん患者の 1/3 が、睡眠障害、うつ、不安症や統合失調症等を併発する一方で、うつや統合失調症患者が、多剤服用の後、てんかん発症を罹患することも知られている。さらに、こうした一連の精神神経疾患に罹患すると、肥満や糖尿病、心臓血管障害や代謝疾患の併発率も著しく上昇する。こうした一連の共存症は、薬剤の副作用がその原因のひとつと考えられている一方で、いまだそのメカニズムは不明であった。

申請者らは、側頭葉てんかんモデルマウスを用いて、てんかん発作誘導に関わる分子基盤の解明を目指した分子スクリーニングをおこなった。その結果、シアル酸転移酵素 St3gal4 がてんかん発症に必須の分子であることを見つけ、St3gal4 を欠損したマウスが、てんかん発症を消失した副作用として、うつや不安様症状、睡眠障害を発症するマウスであることを発見した。また St3gal4 欠損マウスが、体重の減少に伴い血中のトリグリセリドの減少と高アルカリフォスファターゼ (ALP) 値を示す一方で、ヒト ST3GAL4 遺伝子多型が、高脂質血症を含む脂質代謝系異常、高アルカリフォスファターゼ値、冠状動脈疾患に影響を与えることが知られていた。

さらに申請者らは、側頭葉てんかんモデルマウスと St3gal4 欠損マウスの尿中の最終代謝産物を調べることにより、てんかん～うつ・不安症に関連する代謝産物を捉えるため、尿中の揮発性有機化合物 (volatile organic compounds, VOC) を、固相マイクロ抽出 (SPME) - ガスクロマトグラフ質量分析 (GC-MS) により分析していた。その結果、マウスのてんかんやうつ・不安症と特異的に量の相関を示す VOC を検出した。

St3Gal4 は、マウス脳・視床中継核神経細胞に発現し、特に感覚系中継核神経細胞で刺激応答性に発現を示す。またその欠失により、視床内側膝状体 (聴覚系中継核) において、2,3-結合のシアル酸結合 N 型糖鎖が減少する知見を得ていた。

上述した背景より、St3Gal4 と相互作用する分子や、St3Gal4 によりシアル酸付加される糖タンパク質を見つけることが、てんかん～うつ・不安症の発症や、代謝異常による共存症の発症機構を知ることに繋がると考えた。

## 2. 研究の目的

前項目で述べた様に、本研究では St3Gal4 と相互作用する分子や、St3Gal4 によりシアル酸付加される糖タンパク質を探索することを目指した。また、St3Gal4 の mRNA は、脳では視床ニューロンが刺激に応答した発現を示す一方で、腸管では結腸陰窩で強い発現を示すことが知られている。そこで、脳と腸管における代謝変化を観察し、St3Gal4 の発現量に相関して存在する分子の分布や機能を解析することで、てんかん～うつ・不安症の発症や、代謝異常による共存症に関わる分子を捉えることとした。

## 3. 研究の方法

### (1) St3gal4 受容体基質・糖タンパク質を同定

#### (1)-1. 扁桃体刺激誘導型てんかんモデルマウス・視床へのアジド糖 ManNAz 投与とアジド化された糖タンパク質の検出

扁桃体刺激誘導型てんかんモデルマウスの作製

一連の動物実験は、日本学術会議 (2006 年) の「動物実験の適正実施ガイドライン」(2006 年) に基づき実施し、京都産業大学動物実験倫理委員会 (承認番号 2017-08, 2018-08,

2019-07, 2019-08, 2020-10, 2021-07) により承認された実験計画指針に準拠し、実施した。イソフルラン麻酔下で、8 週齢マウスの扁桃体外側基底核（左側）に刺激電極（陰極）のタングステン線を挿入し（ブレグマ A -2.0, L 3.0, V 4.5mm）、刺激電極（右側、陽極）及び脳波測定用電極（両側）を脳表に挿入した（ブレグマ A 2.0, L 1.5mm）。さらに、視床前核（右側）に ManNAz 投与用カニューレを挿入した（A -3.8, L 4.0, V 4.2 mm）。手術ストレス 1 週間除去後、覚醒状態のマウスへ、軽微な刺激を 1 日 1 度導入し [450  $\mu$ A, 60Hz, 200  $\mu$ s duration, for 2sec; electrical stimulator (SEN-3301, 日本光電社製)& isolator (SS-202J)], 約 2-3 週間かけててんかん発作を誘導し、扁桃体キンドリングマウス（側頭葉てんかんモデルマウス）を作成した。

#### 視床前核への ManNAz 投与と視床前核抽出液の回収

発作を獲得したてんかんモデルマウスと手術後未刺激マウスへ、2 日に 1 回、2  $\mu$ L を 0.5  $\mu$ L / min の速度で、計 5 回 ManNAz (Click-IT®) を投与した。ManNAz は、人工脳脊髄液により濃度調整した（10 mM / 2  $\mu$ L, 人工脳脊髄液: 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 1mM MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM Glucose, 10 mM HEPES, pH 7.4, Tris-base により滴定）。ManNAz 投与部位の可視化に、Trypan blue (Nakarai, 355-25, 2  $\mu$ g /  $\mu$ L) を用いた。

安楽死後の 18 週齢マウス（てんかんモデルマウス：雄 5 匹、手術後未刺激マウス：雄 5 匹）の脳を摘出後、人工脳脊髄液内で、500  $\mu$ m にスライス（スライサー-5100mz, ショーシン EM 株式会社）し、視床をマイクロナイフで切り出し回収した。

氷上の 20 mM Tris - HCl, pH 7.4, 0.15 M NaCl, PMSF, protease inhibitor cocktail (SIGMA, P8340) に視床片を入れ、素早くホモジネートし、氷上で 15 分間静置後、13,000 rpm (HITACHI, S55A2-0172 rotor), 2 分間遠心し上清を回収した（可溶性画分）。次に沈渣を 20 mM Tris - HCl, pH 7.4, 2 % Triton X - 100, PMSF, protease inhibitor cocktail に懸濁した後、素早くホモジネートし、氷上で 10 分間静置後、39,000 rpm, 10 分間遠心し上清を回収した（膜画分）。

#### シアル酸化糖タンパク質の検出

常法に従い、クリック反応 (Click-IT®) を行った。5-15% SDS-ポリアクリルアミドグラディエントゲルを調整し、7.5  $\mu$ g ~ 30  $\mu$ g サンプルを電気泳動した。ゲルを PVDF 膜に転写後、Streptavidin - POD conjugate (Takara) と反応後、ECL (Amersham, RPN2109) の蛍光を観察した (LAS - 4000, FUJIFILM) にて蛍光を観察した。

(1)-2. St3Gal4 欠損マウス視床におけるアルカリフォスファターゼ (ALP) の発現分布と St3Gal4 との相互作用の検討

#### 血漿中 ALP 測定と脳切片における ALP 活性測定

血漿中 ALP は、ラボアッセイ™ALP (FUJIFILM) を用いた。次に、マウス新鮮脳を 14  $\mu$ m 冠状断に薄切し（クリオスタット Leica CM1950）、シランコートスライドガラスに接着させた。風乾後、4%パラホルムアルデヒド-0.1M リン酸緩衝液, pH7.4, 20 分間氷上で固定した。AP 緩衝液（100mM Tris-HCl, pH9.5, 100mM NaCl）で洗浄後、AP 緩衝液, 50mM MgCl<sub>2</sub> に置換後、BCIP/NBT 基質 (Roche) と反応させることにより、脳切片上で ALP 酵素活性を示す脳領域の分布を観察した。次に、中隔（ブレグマ A 1.0 mm）、視床（ブレグマ A -0.2 ~ -2.7 mm）を含む冠状断切片を、色の反転、二値化処理後、体積（1.5 mm<sup>2</sup>\*シグナル強度）を算出した (Win Roof バージョン 3.3)。

#### 血漿中 ALP、視床 ALP 活性と音恐怖記憶の相関性の検討

音恐怖条件付け試験は、常法により 3 日間の連続した試験である。条件付け試験 (Day 1, 180 秒間, バックグラウンド音 50 dB, 220 Lux): マウスを入れてから 60 秒後に White noise (70 dB), 10 秒間, 2 回聞かせる (条件刺激, CS)。9 秒目に 1 秒間のフットショック (0.3 mA, 無条件刺激, US) を与え、移動距離 (cm) と不動時間 (秒) を計測する。文脈記憶試験 (Day 2, 300 秒間): 条件付け試験時と同様の環境下で、マウスの移動距離 (cm) と不動時間 (秒) を計測する。音手掛かり試験 (Day 3, 180 秒間, バックグラウンド音 55 dB, 50 Lux): マウスを入れてから 60 秒後に White noise (70 dB) を 30 秒間聞かせ (CS), その後 90 秒間計測した (Time FZ1, 小原医科工業株式会社)。

血漿中 ALP ,視床 ALP 活性 ,体重 ,音手がかり試験時の 180 秒間当たりの不動時間について , Pearson の相関係数 , 線形回帰分析 , 2 次多項式解析をおこない , 各項目間の相関性を検討した。

## (2) St3gal4 欠損マウスの脳と腸管の代謝変化の解析

St3gal4 ゲノム exon3 に mCherry を挿入した St3Gal4<sup>mCherry</sup>-KI マウスを用いた , 脳と腸管における mCherry 発現分布

St3Gal4<sup>mCherry</sup>-KI マウス脳から total RNA を抽出し , mCherry の発現を RT-PCR により検出した。また結腸から取り出した便 10 μg を 10%SDS- ポリアクリルアミドに電気泳動し , ゲルを PVDF 膜に転写後 , 抗 RFP 抗体 (MBL, PM005) と反応後 , ECL (Amersham, RPN2109) の蛍光を観察した (LAS - 4000, FUJIFILM) にて蛍光を観察した。

St3Gal4<sup>mCherry</sup>-KI マウスをイソフルラン麻酔下で 4%パラホルムアルデヒド-0.1M リン酸緩衝液 , pH7.4 にて灌流固定した後 , 組織透明化技術 CUBIC(東京化成工業株式会社)により , 脳を透明化し , 光シート顕微鏡 (基礎生物学研究所・野中茂紀氏との共同研究) により観察した。

扁桃体刺激誘導型 てんかんモデルマウスの腸内細菌産生 VOC の特定と尿 VOC との比較

固相マイクロ抽出法により , 尿及び , 盲腸便が含む揮発性有機化合物 (VOC) をガスクロマトグラフィ質量分析器を用いて分析し , 盲腸便に含まれる VOC の量と尿中 VOC との相関性を検討した。

尿は氷上において , 2mL ガラスバイアル中に 200 μL ずつに分注した後封印し , 65 °C で 15 分間処理した。バイアル内のヘッドスペース中の VOC を SPME 繊維により 45 °C で 60 分間抽出した。次に , VOC を含む SPME 繊維を GC の注入口に挿入し , 240 °C にて 30 分間脱着させた。GC-MS 装置には 60 メートルの InertCap PureWAX カラム (カラム内直径 0.25mm, フィルム厚さ 0.5 μm, 10 m pro-guard line, 2m transfer line 付き (信和化工株式会社製)) を使用した。質量分析装置の前に用いたクロマトグラフィ分析条件は , 次の通りであった。40 °C にて 10 分間保持し , 1 分間あたり 5 °C の昇温条件で 240 °C まで熱を掛けた後 , 240 °C にて 10 分間保持した。ヘリウムガスを 60cm / 秒の定速で流した。質量分析装置の処理パラメータは次の通りであった。イオン源温度 200 °C , インターフェース温度 240 °C , イオン化エネルギー 70eV , スキャン頻度は 35m/z ~ 300m/z までを 1 回あたり 0.2 秒とした。ピークの特定は , NIST14 標準参照データベース (NIST / EPA / NIH マス・スペクトル・ライブラリ (Wiley10)) を用いて , 標品の保持時間との比較により確認した。

## 4 . 研究成果

### (1) St3gal4 受容体基質・糖タンパク質を同定

#### (1)-1. 扁桃体刺激誘導型 てんかんモデルマウス・視床へのアジド糖 ManNAz 投与とアジド化された糖タンパク質の検出

手術後未刺激マウスに比べて , てんかんモデルマウスでは , 250kD より大きい分子量のバンドの存在が確認できた。以前に実施した , <sup>3</sup>H-ManNAc をマウス大脳皮質に注入 2 日後に , 粗精製した膜画分タンパク質の電気泳動を行った結果と同様であった。しかしながら , 単一のバンドではなくブロードなバンドであった。今後 , 以下の 2 点の検証が必要であると考えられる。

ManNAz 投与後の視床で SiaNAz が合成されていることを確認する必要がある。具体的には , HPLC で DMB 化 SiaNAz や DMB 化 NeuAc を分離 , 検出する必要がある。

てんかん誘導刺激を与えた St3Gal4 欠損マウスに ManNAz を投与した視床に ManNAz を投与することで , St3Gal4 によるシアル酸修飾のないコントロールを対象とする必要がある。

#### (1)-2. St3Gal4 欠損マウス視床におけるアルカリフォスファターゼの発現分布と St3Gal4 との相互作用の検討

St3gal4 欠損マウスは , 恐怖条件付け試験における音恐怖のレベルが血漿 ALP 値と負の相

関性を示すと共に、視床における ALP 活性と正の相関を示すことがわかった。このことから、St3Gal4-ALP 軸が、中枢～末梢系における情動行動と代謝の併存に関与していることが示唆された。特に、視床ニューロンにおける St3Gal4 の発現の低下が、ALP 活性の低下をもたらしたことから、ALP は細胞外で働く酵素であることから、St3Gal4 によりシアル酸化された糖タンパク質が細胞膜上あるいは細胞外で ALP と相互に作用する可能性が示唆された。

## (2) St3Gal4 欠損マウスの脳と腸管の代謝変化の解析

St3Gal4 ゲノム exon3 に mCherry を挿入した St3Gal4<sup>mCherry</sup>-KI マウスを用いた、脳と腸管における mCherry 発現分布

St3Gal4<sup>mCherry</sup>-KI マウス脳から total RNA を抽出し、mCherry の発現を RT-PCR により検出した結果、mCherry mRNA の検出に成功した。次に、結腸便のウエスタンブロッティングにより、結腸ベン由来の mCherry が抗 RFP 抗体により検出に成功した。一方で、Cherry の発現が、脳、腸共に、蛍光顕微鏡下で観察することができなかったことから、脳を透明化後、光シート顕微鏡にて観察したところ、mCherry を含まないマウス脳にないシグナルが、St3Gal4<sup>mCherry</sup>-KI マウス脳で観察することができた。現在、発現細胞の特定を試みている。St3Gal4<sup>mCherry</sup>-KI マウスの視床における mCherry 発現ニューロンの特定が叶えば、mCherry 発現ニューロンを採取し、糖鎖構造を決定すると共に、単離した mCherry 発現ニューロンに特異的な糖タンパク質を検出することができる。

扁桃体刺激誘導型てんかんモデルマウスの腸内細菌産生 VOC の特定と尿 VOC との比較

てんかん～うつ・不安症のモデルマウスで変化を示した尿中 VOC の多くは、既存の原著論文から、食事から体内に入り、腸内細菌による代謝を含む体内動態を経て、尿中の VOCs として排泄される可能性が示唆されていた。そこで、盲腸便に同様の VOC が含まれる可能性を調べたところ、てんかんバイオマーカー VOCs である硫黄系有機化合物・methanthiol と 2,3,5-trithiahexane が、尿と盲腸共に、著しく低下していたことがわかった。現在、てんかん発症による腸内細菌叢の変化を知るために、便に含まれる 16SDNA を解析中である。

本研究期間内に、St3Gal4 と相互作用する分子や、St3Gal4 によりシアル酸付加される糖タンパク質を同定することは叶わなかったが、アジド糖 ManNAz を用いた研究では今後の課題が見え、新たに ALP が St3Gal4 と視床で相互作用する可能性を見つけたことができた。さらに St3Gal4<sup>mCherry</sup>-KI マウス脳において、St3Gal4 の視床ニューロンの可視化が mCherry で確認することができたことから、mCherry ラベルニューロンを特定し単離する目標に一步近づいた。最後に、てんかんモデルマウス腸内の代謝産物 VOC が、尿中の最終代謝産物 VOC と一致したことから、腸内細菌の変化が、てんかんと代謝異常の共存症に強く影響することを証明することができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Fujita Akiko, Okuno Takaya, Oda Mika, Kato Keiko	4. 巻 15
2. 論文標題 Urinary volatilome analysis in a mouse model of anxiety and depression	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0229269
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0229269	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Fujita Akiko, Ihara Kazushige, Kawai Hisashi, Obuchi Shuichi, Watanabe Yutaka, Hirano Hirohiko, Fujiwara Yoshinori, Takeda Yoichi, Tanaka Masashi, Kato Keiko	4. 巻 2
2. 論文標題 A novel set of volatile urinary biomarkers for late-life major depressive and anxiety disorders upon the progression of frailty: a pilot study	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Discover Mental Health	6. 最初と最後の頁 20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s44192-022-00023-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 藤田明子, Siriporn Tangsudjai, 奥野貴也, 太田 真菜美, 利川 泰博, 織田美伽, 加藤啓子
2. 発表標題 うつ・不安症モデルSt3gal4欠損マウスにおける代謝変化
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田中 朋也, 利川 泰博, 太田 真菜美, 藤田明子, 加藤啓子
2. 発表標題 側頭葉てんかんモデルマウスでのてんかん発作がもたらす共存症について-てんかん共存症としての肥満・糖尿病-
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Siriporn Tangsudjai、藤田明子、奥野貴也、織田美伽、加藤啓子
2. 発表標題 シアル酸転移酵素ST3Gal IV欠損が引き起こす代謝負荷と精神疾患共存症
3. 学会等名 第39回JSCR年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤田明子、Siriporn Tangsudjai、奥野貴也、織田美伽、加藤啓子
2. 発表標題 St3gal4欠損マウスにおける血漿脂質代謝解析とヒトGWAS形質の検証
3. 学会等名 第39回JSCR年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田中 朋也、藤田 明子、利川 泰博、太田 真菜美、加藤 啓子
2. 発表標題 扁桃体刺激側頭葉てんかんモデルマウスにおける肥満・糖尿病共存症
3. 学会等名 第69回実験動物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 楠 達也、田村聡哉、廣田暖奈、太田知沙、加藤啓子
2. 発表標題 視床感覚中継核におけるシアル酸転移酵素St3gal4欠損が聴覚系プレパルス抑制の低下に及ぼす影響
3. 学会等名 第69回実験動物学会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 サルコペニアのバイオマーカー	発明者 加藤啓子, 藤田明子, 岡卓也, 大淵修一, 河合恒	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2023-062843	出願年 2023年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

京都産業大学 教員紹介 <a href="https://www.kyoto-su.ac.jp/faculty/professors/ls/kato-keiko.html">https://www.kyoto-su.ac.jp/faculty/professors/ls/kato-keiko.html</a>
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	藤田 明子  (Fujita Akiko)  (60535003)	京都産業大学・生命科学部・研究員   (34304)	
研究分担者	黒坂 光  (Kurosaka Akira)  (90186536)	京都産業大学・生命科学部・教授   (34304)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------