

氏 名 めりえむ はっだーる  
Meriem Haddar

学位の種類 博士（薬学）

学位記番号 富医薬博甲第 314 号

学位授与年月日 令和元年 9 月 27 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 博士課程  
薬学専攻

学位論文題目  
Effects of overexpression of Shati/Nat81 in the medial  
prefrontal cortex on the dependence by  
methamphetamine and cognitive dysfunction in mice  
(マウス前頭前皮質における Shati/Nat81 の過剰発現の  
メタンフェタミン依存症と認知機能障害への影響)

論文審査委員

(主査) 教授 笹岡 利安

(副査) 教授 東田 千尋

(副査) 教授 新田 淳美 (指導教員)

# 論文内容の要旨

## Introduction

The medial prefrontal cortex (mPFC) is a part of the prefrontal cortex that is involved in several neuronal functions. Although mPFC dysfunctions are associated with many psychiatric and neuronal disorders, mechanism underlying these actions has not been clarified. mPFC is described as a control board that receives inputs from various brain areas, especially the hippocampus, process them and conveys them as outputs to cortical and subcortical structures. mPFC also projects glutamatergic neurons to the nucleus accumbens (NAc), an important brain region involved in drug addiction.

Shati/Nat8l was identified in the NAc of mice treated with methamphetamine (METH). Shati/Nat8l is an *N*-acetyltransferase that produces *N*-acetylaspartate (NAA) from aspartate and acetyl-CoA. In this study, I focused on the implication of a novel molecule, Shati/Nat8l, in methamphetamine-induced dependence, and cognitive dysfunction. Previous reports showed that Shati/Nat8l overexpression in the NAc is able to decrease extracellular dopamine (DA) and attenuate METH-induced DA increase in the NAc, and that its overexpression promotes neuronal outgrowth in neuronal cell culture.

Shati/Nat8l is highly expressed in the prefrontal cortex of mice, comparing to other brain regions. In my study, I investigated the role of Shati/Nat8l in mPFC in METH-induced behavioural and biological alterations, and involvement in cognitive dysfunction.

### **1. Inhibitory effects of Shati/Nat8l overexpression in the medial prefrontal cortex on methamphetamine-induced preference in mice<sup>1,2</sup>**

In order to study the role of Shati/Nat8l in the mPFC on METH dependence, I injected adeno-associated vector (AAV) containing Shati/Nat8l in the mPFC to overexpress Shati/Nat8l (mPFC-Shati/Nat8l). Three weeks later, conditioned place preference (CPP) and locomotor activity tests were carried out with METH stimulation by subcutaneous (*s.c*) injection. Interestingly, Shati/Nat8l overexpression in the mPFC

attenuated METH-induced CPP but did not change hyperlocomotion. Next, I attempted to clarify the role of Shati/Nat8l in mPFC on METH-induced CPP, to investigate the action of Shati/Nat8l on reward system by exploring its biological relationship between mPFC and NAc. It is well known that METH induces increase of DA levels in the NAc, therefore I performed *in vivo* microdialysis for the measurement of extracellular DA levels from NAc before and after METH stimulation. Appealingly, basal levels (before METH stimulation) of extracellular DA were significantly decreased in the NAc of mPFC-Shati/Nat8l mice compared to control mice (mPFC-Mock). Moreover, overexpression of Shati/Nat8l in the mPFC suppressed METH-induced DA increase in the NAc. Since mPFC projects mainly glutamatergic neurons to the NAc, I also measured the basal levels of glutamate in the NAc and surprisingly, glutamate levels were decreased in the NAc. Shati/Nat8l produces NAA, and NAA binds to glutamate and generates *N*-acetylaspartylglutamate (NAAG). NAAG is an agonist of metabotropic glutamate receptor group II (mGluR group II) and is increased in brain areas overexpressing Shati/Nat8l. Therefore, mGluR group II antagonist was directly perfused to the NAc followed by METH injection (s.c). mGluR group II antagonist restored METH-induced DA increase in the NAc. Consecutively, the histochemical studies were done on the brain circuitry involved in METH related pharmacological effects. mPFC projection neurons were co-expressed with the proteins marker of medium-sized spiny neuron (MSN), dopamine- and cAMP-regulated neuronal phosphoprotein (DARPP-32). Likewise, DARPP-32 was colocalized with VTA GABAergic subtype marker, neuronal nitric oxide synthase (nNOS) in VTA.

Shati/Nat8l overexpression in mPFC regulates METH-induced reward behaviour by acting on the reward system through NAc.

## **2. Alteration of cognitive function by Shati/Nat8l overexpression in the mPFC in mice<sup>3</sup>**

mPFC is considered to integrate information from cognitive function related brain areas. The implication of mPFC in decision making when there is many information to process at the same time was also reported. In this study, the role of Shati/Nat8l in mPFC was investigated in cognitive function. AAV containing Shati/Nat8l was injected into the mPFC to overexpress Shati/Nat8l (mPFC-Shati/Nat8l) mice. Three weeks later, serial behavioral experiments including object location and object-in-context tasks, contextual and cued fear conditioning tests were performed. Interestingly, mPFC-Shati/Nat8l mice showed impairment in spatial memory and discrimination as observed in object location and object-in-context task compared to mPFC-Mock group.

Nevertheless, Shati/Nat8l overexpression in the mPFC was not able to alter contextual and cued fear memory. In a previous report from my laboratory, Shati/Nat8l overexpression in the mPFC showed enhanced neuronal outgrowth which suggests the involvement of Shati/Nat8l for the supporting development. Subsequently, I assessed the effect of Shati/Nat8l on synaptophysin and post synaptic protein-95 (PSD-95) expression in the mPFC of Shati/Nat8l overexpressed mice by immunohistochemistry study. PSD-95 and synaptophysin puncta in mPFC of mPFC-Shati/Nat8l showed a tendency to decrease comparing to Mock group. Moreover, mPFC-Shati/Nat8l also showed a tendency to decrease synapses in the mPFC. These results suggest a negative effect of Shati/Nat8l on the post and presynaptic proteins in mPFC-Shati/Nat8l group. The overexpression of Shati/Nat8l in the mPFC negatively impacts cognitive function, and this effect might be mediated by reduced synaptic activity.

## Conclusions

Shati/Nat8l overexpression in the mPFC attenuated METH-induced reward by regulating neurotransmitters in the NAc via glutamate and mGluR group II. Moreover, Shati/Nat8l overexpression in the mPFC impaired memory related tasks by other mechanisms. These results provide novel activity of Shati/Nat8l in the mPFC and new insight on mPFC controlling the function of glutamate and dopaminergic neurons in the NAc.

These results might benefit the current understanding of the mechanism of action of Shati/Nat8l and help finding new therapies for the disorders related to the mPFC.

参考文献：

1. Haddar M, Uno K, Azuma K, Muramatsu S, Nitta A. Inhibitory effects of Shati/Nat8l overexpression in the medial prefrontal cortex on methamphetamine - induced conditioned place preference in mice. *Addiction Biology*. doi: 10.1111/adb.12749.
2. Haddar M, Uno K, Hamatani K, Muramatsu S, Nitta A. Regulatory system of mGluR group II in the nucleus accumbens for methamphetamine-induced dopamine increase by the medial prefrontal cortex. *Neuropsychopharmacology* doi.org/10.1002/npr2.12068.
3. Haddar M, Azuma K, Uno K, Muramatsu S, Nitta A. Inductive effects of overexpression of Shati/Nat8l in mice medial prefrontal cortex on the cognitive dysfunction. *under preparation*

# 学位論文審査の要旨

前頭前皮質(medial prefrontal cortex; mPFC) は、多くの神経機能に関与している脳部位である。mPFC は、精神疾患や認知機能障害に関係していると考えられているが、その詳細なメカニズムは明らかにされていない。mPFC は、様々な脳領域、特に海馬からの入力を受け取り、他の脳部位に情報を出力することで、行動制御に重要な役割を果たしていることが分かっている。また、mPFC はグルタミン酸作動性ニューロンを有し、薬物依存において重要な脳領域である側坐核へ投射をしている。

Shati/Nat8l は、覚醒剤メタンフェタミンを連続投与したマウスの側坐核で発現が増加する分子として見出された。Shati/Nat8l は、aspartate と acetyl-CoA から *N*-acetyl-aspartate (NAA) を生合成する *N*-アセチルトランスフェラーゼである。Shati/Nat8l の側坐核における過剰発現が、細胞外ドーパミンを減少させ、メタンフェタミンにより誘発されるドーパミンの増加を減弱させることが報告されている。また、培養神経細胞を用いた実験では、Shati/Nat8l の神経細胞への過剰発現は、神経突起の伸長を促進することも示されている。申請者は、メタンフェタミン依存性と認知機能障害の mPFC における Shati/Nat8l の役割を検討した。

## 1. mPFC における Shati/Nat8l 過剰発現によるメタンフェタミンの場所嗜好性抑制効果<sup>1,2</sup>

メタンフェタミン嗜好性に対する mPFC の Shati/Nat8l の機能を検討するために、Shati/Nat8l を含むアデノ随伴ベクターを mPFC に注入し、Shati/Nat8l 過剰発現マウス (mPFC-Shati/Nat8l マウス) を作製した。メタンフェタミンを皮下投与し、条件付け場所嗜好性 (CPP) 試験および自発運動量の測定を行った。mPFC での Shati/Nat8l 過剰発現は、メタンフェタミンによる場所嗜好性を減弱させたが、自発運動量の増加は抑制しなかった。メタンフェタミン投与の前後で側坐核の細胞外ドーパミン量を検討するためにマイクロダイアリス試験を行った。mPFC-Shati/Nat8l マウスの細胞外ドーパミン基礎遊離量とメタンフェタミン投与によるドーパミンの増加率は、コントロールマウスと比較して減少していた。mPFC は主にグルタミン酸作動性ニューロンを側坐核に投射していることから、側坐核のグルタミン酸量を測定したところ、mPFC-Shati/Nat8l の側坐核のグルタミン酸遊離量が減少していた。

Shati/Nat8l は NAA を生成し、NAA はグルタミン酸に結合することで、*N*-acetylaspartylglutamate (NAAG) を生合成する。NAAG は代謝型グルタミン酸受容体 (mGluR) グループIIのアゴニストであり、Shati/Nat8l を過剰発現する脳領域で増加することから、mGluR グループII拮抗剤を側坐核に直接灌流し、メタンフェタミンを投与した。

mGluR グループII拮抗剤は、側坐核のメタンフェタミンによるドーパミン遊離量の増加を抑制した。次に、組織免疫化学的な検討を行った。mPFC から投射している神経細胞上で、中型有棘神経細胞のマーカーである dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein (DARPP-32) が発現していた。DARPP-32 は、VTA GABA 作動性サブタイプマーカーの一酸化窒素合成酵素 (nNOS) とも共局在していた。これらの知見から、mPFC での Shati/Nat8l の過剰発現は、側坐核を介して報酬を司る神経系に作用することにより、メタンフェタミンによる嗜好行動を調節していると考えられた。

## 2. マウスの mPFC での Shati/Nat8l 過剰発現による認知機能の変化<sup>3</sup>

mPFC は、認知機能の関係する情報を統合しているとされている。また、多くの情報を同時に処理する必要がある意思決定においても、mPFC が関与していることが報告されている。そこで、申請者は、認知機能における mPFC の Shati/Nat8l の関与を検討した。mPFC-Shati/Nat8l マウスを用いて、記憶に関する行動実験および恐怖条件付け試験を行った。mPFC-Shati/Nat8l マウスは、コントロール群マウスと比較して、空間記憶の低下を示した。一方、mPFC-Shati/Nat8l の過剰発現は、短期および長期的な恐怖記憶に対する障害は観察されなかった。組織免疫化学的な検討により、mPFC-Shati/Nat8l マウスにおける synaptophysin (Syn) と post synaptic protein-95 (PSD-95) の発現量を測定した。mPFC-Shati/Nat8l マウ

スの mPFC における Syn と PSD-95 の発現量は、コントロール群マウスと比較して、減少する傾向を示した。さらに、mPFC での Shati/Nat8l 過剰発現は、mPFC でのシナプスを減少させる傾向も示した。これらの結果は、mPFC-Shati/Nat8l がプレシナプスとポストシナプスタンパク質に対し障害を与える可能性を示唆している。以上、mPFC での Shati/Nat8l の過剰発現は認知機能を障害し、その原因の一部には、シナプス活性の低下によるものと考えられた。

mPFC での Shati/Nat8l の過剰発現は、グルタミン酸および mGluR グループ II による側坐核の神経伝達物質の遊離量の減少を介して、メタンフェタミンの嗜好性を減少させた。さらに、mPFC での Shati/Nat8l の過剰発現は、シナプスの障害を誘導し、空間記憶を低下させた。これらの結果より、mPFC の Shati/Nat8l は、側坐核のグルタミン酸およびドーパミン作動性ニューロンの機能を制御するという新知見を得た。本結果は、Shati / Nat8l の作用メカニズムの理解を深め、mPFC に関連した障害への新たな治療法の発見に役立つと考えられる。

**主査および副査は、申請者 Haddar Meriem氏に面接を行うとともに論文内容を審査し、博士(薬学)の学位を授与するに値すると判断した。**

1. Haddar M, Uno K, Azuma K, Muramatsu S, Nitta A. Inhibitory effects of Shati/Nat8l overexpression in the medial prefrontal cortex on methamphetamine - induced conditioned place preference in mice. *Addictional Biology*. doi: 10.1111/adb.12749. (2019)
2. Haddar M, Uno K, Hamatani K, Muramatsu S, Nitta A. Regulatory system of mGluR group II in the nucleus accumbens for methamphetamine-induced dopamine increase by the medial prefrontal cortex. *Neuropsychopharmacology Reports*. <https://doi.org/10.1002/npr2.12068>. (2019)
3. Haddar M, Azuma K, Uno K, Muramatsu S, Nitta A. Inductive effects of overexpression of Shati/Nat8l in mice medial prefrontal cortex on the cognitive dysfunction. 投稿準備中