

図8 新奇物体認識試験における行動評価

定する。訓練試行時には、総探索時間に対するいずれかのオブジェクトへの探索時間の割合(%)を、保持試行においては総探索時間に対する新奇オブジェクトに対する探索時間の割合(%)を探索嗜好性として算出し、後者を視覚的物体認識記憶の指標とする。PCP (10 mg/kg) を2週間連続投与したマウスでは、最終投与から7日間の休薬後も視覚的物体認識記憶障害が認められる(47)(図8C)。PCP連続投与マウスで認められる視覚的物体認識記憶障害は訓練試行前にハロペリドール(0.3~1.0 mg/kg)を投与しても緩解されないが、アリピプラゾール(0.03~0.1 mg/kg)を投与することによって緩解される(47)(図8C)。

おわりに

統合失調症のモデル動物に関する知見とモデル動物の評価方法について概説した。覚せい剤およびPCP投与による薬理的動物モデルは比較的容易に作成することができ、現在も多くの新規抗精神病薬のスクリーニングに用いられている。新生仔期腹側海馬損傷動物をはじめとする神経発達障害モデルは薬理的モデルに比べ、より臨床に即していると考えられるが、作製までの時間や手間などが多い(表1)。また、統合失調症の発症には単一遺伝子でなく、いくつかの遺伝子が関与していること、遺伝因子だけでなく環境因子もその発症には関与すると考えられているため、単一の遺伝子を改変させたマウスでは統合失調症のモデル動物として限界があると思われる(表2, 3)。今後、より病態を反映した動物モデルの作製を試みるためにこれらの動物モデル間の相違点を詳細に検討することが必要であり、こうした研究が、統合失調症の原因解明や治療に結びつくことを願っている。

表1 仮説に基づいた統合失調症動物モデル

動物	覚醒剤投与モデル	遺伝子改変マウス		PCP 投与モデル		遺伝子改変マウス			新生仔期腹側海馬損傷	周産期感染 (Poly I:C 投与)	新生仔期PCP 投与
		DAT 欠損		急性投与	連続投与	NR1KD	NR1 点変異	NR2A 欠損			
陽性症状	運動量・常同行動	増加 b) 7)	増加 a, b) 15)	増加 b) 32, 33, 86)	行動感作 b) 32, 39, 86)	増加 a) 29)	増加 a) 30)	増加 a) 31)	増加 a, b) 50, 53)	増加 b) 59)	増加 b) 68, 69)
陰性症状	社会性行動試験	変化なし 14)	変化なし 15)	低下 87)	低下 14, 40)	低下 29)	-	-	低下 54)	低下 62)	-
	強制水泳試験	変化なし 13)	亢進 15)	-	低下 13, 41-43)	-	-	-	-	-	低下 65)
認知障害	プレパルス・インヒビション試験	障害 8, 89)	障害 15)	障害 35, 36)	障害 c) 93)	障害 94)	変化なし 30)	変化なし 95)	障害 55)	障害 59, 62)	障害 66)
	放射状迷路 T 型迷路試験など	障害 9)	-	障害 34)	障害 44, 45, 91)	-	-	-	障害 56)	障害 61)	障害 67)
	水探索試験	-	-	障害 37)	障害 46)	-	-	障害 31)	-	-	-

DAT: dopamine transporter, PCP: phencyclidine, Poly I:C: polyriboinosinic-polyribocytidilic acid

NR1KD: NR1 の発現が 5~10%. NR1 点変異: NR1 のグリシン結合部位を点変異

a) 新規環境下における運動量の増加, b) 精神刺激薬による運動量の増加, c) 最終投与 6 時間以降では障害なし

表2 DISC1 遺伝子改変マウスにおける行動異常

動物	試験	DISC1 欠損	DISC1 点変異	DISC1 欠損 + PCP	DISC1 点変異 + PCP	DISC1 欠損 + PCP + 新生仔期腹側海馬損傷	DISC1 点変異 + PCP + 新生仔期腹側海馬損傷
陽性症状	運動量・常同行動	変化なし	変化なし	増加 ^{a)}	増加 ^{a) 74)}	増加 ^{a) 75)}	増加 ^{b)}
陰性症状	強制水泳試験	-	低下	変化なし	低下 ⁷⁴⁾	-	低下
	テイルサスペンション試験	-	-	-	-	-	低下
	社会性行動試験	-	低下	変化なし	-	低下 ⁷⁵⁾ (攻撃性増加)	-
認知障害	プレパルス・インヒビション試験	変化なし	障害	障害	障害 ⁷⁴⁾	障害 ⁷⁵⁾	障害
	音驚愕反応試験	変化なし	変化なし	低下	-	-	変化なし
	T 型迷路試験	障害	障害	障害	-	-	障害
	レイテント・インヒビション試験	-	障害	障害	-	-	障害
	Y 迷路試験	-	-	-	変化なし ⁷⁴⁾	-	-
	モリス水迷路試験	-	変化なし	変化なし	変化なし ⁷⁴⁾	障害 ⁷⁵⁾ (プローブ試験)	-
新奇物体認識試験	-	-	-	-	-	-	障害

DISC1: Disrupted-in-schizophrenia-1

a) 新規環境下における運動量の増加, b) 精神刺激薬による運動量の増加

表3 統合失調症関連遺伝子改変マウスにおける行動異常

陽性症状	運動量・常同行動	増加 ^{a)} 78, 80)	変化なし ^{a)} 81)	減少 ^{a)} / 増加 ^{b)} 83)	増加 ^{a)} 84)	増加 ^{a)} 85)
陰性症状	社会性行動試験	—	攻撃性増加 ⁸¹⁾	—	低下 ⁸⁴⁾	—
	放射状迷路試験	—	—	—	障害 ⁸⁴⁾	—
認知障害	ブレパルス・インヒビション試験	障害 ⁸⁰⁾	変化なし ⁸¹⁾	変化なし ⁸²⁾	障害 ⁸⁴⁾	障害 ⁸³⁾

COMT: catechol-O-methyl-transferase, PRODH: proline dehydrogenase, PACAP: Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide

a) 新規環境下における運動量の増加, b) 精神刺激薬による運動量の増加

文献

- 1) Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders: DSM-IV. 4th ed. American Psychiatric Association; 1994. p.282.
- 2) Harrison PJ. Brain. 1999;122:593-624.
- 3) Mouri A, et al. Neurochem Int. 2007;51:173-184.
- 4) Seeman P, et al. Science. 1975;188:1217-1219.
- 5) Srisurapanont M, et al. Int J Neuropsychopharmacol. 2003;6:347-352.
- 6) Robinson TE, et al. Brain Res. 1986;396:157-198.
- 7) Castall B, et al. Brain Res. 1977;123:89-111.
- 8) Swerdlow NR, et al. J Neurosci. 2000;20:4325-4336.
- 9) Aultman JM, et al. Psychopharmacology. 2001;153:353-364.
- 10) Kamei H, et al. Biol Psychiatry. 2006;59:75-84.
- 11) Khodayari N, et al. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet. 2004;129:10-12.
- 12) Ralph RJ, et al. J Neurosci. 2001;21:305-313.
- 13) Noda Y, et al. Br J Pharmacol. 1995;116:2531-2537.
- 14) Qiao H, et al. Neuroreport. 2001;12:11-15.
- 15) Spieleswoy C, et al. Behav Pharmacol. 2000;11:279-290.
- 16) Kapur S, et al. Am J Psychiatry. 2001;158:360-369.
- 17) Carlsson A, et al. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2001;41:237-260.
- 18) Javitt DC, et al. Am J Psychiatry. 1991;148:1301-1308.
- 19) Carlsson A, et al. Life Sci. 1997;61:75-94.
- 20) Coyle JT. Cell Mol Neurobiol. 2006;26:365-384.
- 21) Emamian ES, et al. J Neurosci. 2004;24:1561-1564.
- 22) Akbarian S, et al. J Neurosci. 1996;16:19-30.
- 23) Ohtsuki T, et al. Mol Psychiatry. 2001;6:211-216.
- 24) Rice SR, et al. Mol Psychiatry. 2001;6:274-284.
- 25) Itokawa M, et al. Pharmacogenetics. 2003;13:271-278.
- 26) Heresco-Levy U, et al. Biol Psychiatry. 2004;55:165-171.
- 27) Heresco-Levy U, et al. Biol Psychiatry. 2005;57:577-585.
- 28) Heresco-Levy U, et al. Am J Psychiatry. 2002;159:480-482.
- 29) Mohn AR, et al. Cell. 1999;98:427-436.
- 30) Ballard TM, et al. J Neurosci. 2002;22:6713-6723.
- 31) Miyamoto Y, et al. J Neurosci. 2001;21:750-757.
- 32) Noda Y, et al. Eur J Pharmacol. 1995;286:291-297.
- 33) Nabeshima T, et al. Neurosci Lett. 1987;76:335-338.
- 34) Danysz W, et al. Neuropharmacology. 1988;27:653-656.
- 35) Linn GS, et al. Psychopharmacology (Berl). 2003;169:3-4.
- 36) Fejgin K, et al. Psychopharmacology (Berl). 2007;191:377-385.
- 37) Noda A, et al. Neuropsychopharmacology. 2001;24:451-460.
- 38) Nabeshima T, et al. Psychopharmacology (Berl). 1986;89:334-337.
- 39) Nagai T, et al. Neuroreport. 2003;14:269-272.
- 40) Wang D, et al. Neuropharmacology. 2007;52:1179-1187.

- 41) Enomoto T, et al. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*. 2007;29:291-301.
- 42) Noda Y, et al. *Eur J Pharmacol*. 1997;324:135-140.
- 43) Murai R, et al. *Behav Brain Res*. 2007;180:152-160.
- 44) Jentsch JD, et al. *Neuropsychopharmacology*. 1997;17:92-99.
- 45) Noda Y, et al. *Soc Neurosci Abstr*. 2000;653:3.
- 46) Mouri A, et al. *Mol Pharmacol*. 2007;71:1589-1609.
- 47) Nagai T, et al. *Psychopharmacology (Berl)*. 2009;202:315-328.
- 48) Enomoto T, et al. *Mol Pharmacol*. 2005;68:1765-1774.
- 49) Weinberger DR. *Lancet*. 1995;346:552-557.
- 50) Lipska BK, et al. *Neuropsychopharmacology*. 1993;9:67-75.
- 51) Bachevalier J, et al. *Biol Psychiatry*. 1999;46:329-339.
- 52) Lipska BK, et al. *Neuropsychopharmacology*. 2000;23:223-239.
- 53) Richtand NM, et al. *Neuropsychopharmacology*. 2006;31:77-89.
- 54) Becker A, et al. *Psychopharmacology (Berl)*. 1999;144:333-338.
- 55) Kamath A, et al. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2008;11:1085-1096.
- 56) Lipska BK, et al. *Neuropsychopharmacology*. 2002;27:47-54.
- 57) Lipska BK, et al. *J Neurosci*. 2002;22:2835-2842.
- 58) Brown AS. *Schizophr Bull*. 2006;32:200-202.
- 59) Ozawa K, et al. *Biol Psychiatry*. 2006;59:546-554.
- 60) Zuckerman L, et al. *Neuropsychopharmacology*. 2003;28:1778-1789.
- 61) Meyer U, et al. *Neurosci Biobehav Rev*. 2005;29:913-947.
- 62) Ibi D, et al. *Neurosci Res*. 2009;64:297-305.
- 63) Pearce IA, et al. *FEBS Lett*. 1987;223:143-147.
- 64) Contestabile A. *Brain Res Rev*. 2000;32:476-509.
- 65) du Bois, et al. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2009;33:37-40.
- 66) Wang C, et al. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003;304:266-271.
- 67) Broberg BV, et al. *Behav Brain Res*. 2008;190:160-163.
- 68) Wang CZ, et al. *Neuropsychopharmacology*. 2007;32:1178-1194.
- 69) Wang CZ, et al. *Neuropsychopharmacology*. 2008;33:2442-2455.
- 70) St Clair D, et al. *Lancet*. 1990;336:13-16.
- 71) Millar JK, et al. *Hum Mol Genet*. 2000;90:1415-1423.
- 72) Koike H, et al. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103:3693-3697.
- 73) Clapcote SJ, et al. *Neuron*. 2007;54:387-402.
- 74) Hikida T, et al. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104:14501-14506.
- 75) Pletnikov MV, et al. *Mol Psychiatry*. 2008;13:173-186.
- 76) Shen S, et al. *J Neurosci*. 2008;28:10893-10904.
- 77) Hahn CG, et al. *Nat Med*. 2006;12:824-828.
- 78) Stefansson H, et al. *Am J Hum Genet*. 2002;71:877-892.
- 79) Rimer M, et al. *Neuroreport*. 2005;16:271-275.
- 80) O'Tuathaigh CM, et al. *Neuroreport*. 2006;17:79-83.
- 81) Gogos JA, et al. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:9991-9996.
- 82) Gogos JA, et al. *Nat Genet*. 1999;21:434-439.
- 83) Paterlini M, et al. *Nat Neurosci*. 2005;8:1586-1594.
- 84) Miyakawa T, et al. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:8987-8992.
- 85) Tanaka K, et al. *J Neurosci*. 2006;26:5091-5097.
- 86) Kitaichi K, et al. *J Pharmacol Sci*. 1994;66:181-189.
- 87) Sams-Dodd F. *J Neurosci Methods*. 1995;59:157-167.
- 88) Kumari V, et al. *Schizophr Res*. 2002;55:139-146.
- 89) Andersen MP, et al. *Psychopharmacology (Berl)*. 2001;156:291-304.
- 90) Haut MW, et al. *Psychiatry Res*. 1996;65:15-22.
- 91) Goetghebeur P, et al. *Psychopharmacology (Berl)*. 2009;202:287-293.
- 92) Exner C, et al. *Psychiatry Res*. 2006;142:39-52.
- 93) Martinez ZA, et al. *Neuropsychopharmacology*. 1999;21:28-39.
- 94) Duncan GE, et al. *Behav Brain Res*. 2004;153:507-519.
- 95) Takeuchi T, et al. *Eur J Neurosci*. 2001;14:153-160.

臨床に役立つ薬学研究的進歩(知見)

精神科医療では、薬剤師の介入が治療効果に大きな影響を及ぼすことが知られているが、精神科専門薬剤師にはさらに高度な知識によって、診断・治療の進歩に対する貢献も求められている。

知識を常に利用できる状態にしておくためには、キーワードとその位置づけを整理し、フォローアップしておくことも欠かせない。今号では薬学研究的最新の知見について、「基礎」の立場から岡山大学大学院医歯薬学総合研究科医薬管理学の北村佳久准教授に、「臨床」の立場から名城大学薬学部病態解析学研究室の野田幸裕教授と同教室の大橋美月先生に解説していただいた。

基礎の観点から

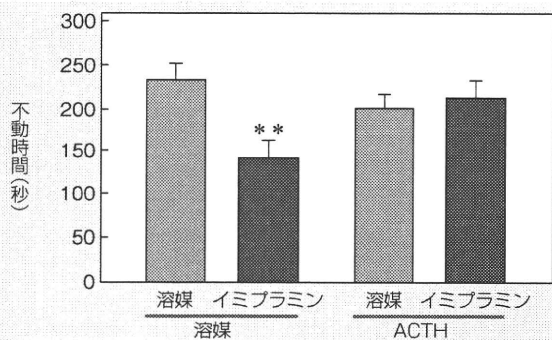
はじめに

近年の急激な社会構造の変化と多様化により、精神疾患は増加の一途をたどっている。中でも感情障害であるうつ病は患者数の増加のため大きな社会問題となっている。これまで、数多くの抗うつ薬が開発され治療に大きな貢献をもたらし、近年ではノルアドレナリン作動性・特異的セロトニン作動性抗うつ薬(noradrenergic and specific serotonergic antidepressant; NaSSA)が臨床応用されている。しかしながら、既存の抗うつ薬によって治療できるうつ病の割合は約7割といわれており、その病態は十分に解明されていない。基礎研究者は治療抵抗性うつ病の病態解明および次世代の抗うつ薬の創薬研究を推進する必要がある。本稿では筆者が取り組んでいる治療抵抗性うつ病のモデル動物の作製について簡単に説明する。

治療抵抗性うつ病モデル作製

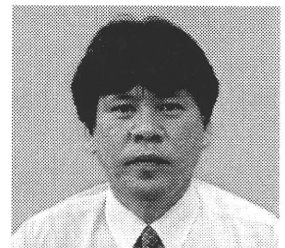
うつ病の発症について考えるとき、ある種のうつ病的素因を持つ患者に各種ストレス(肉体的・精神的)が加わって、その結果うつ状態が出現すると考えられている。このストレス刺激に対する内分泌系の応答システムとして視床下部-下垂

図1 ラット強制水泳法を用いたイミプラミン投与による不動時間短縮効果に対するACTHの影響



イミプラミン: 10mg/kg 腹腔内投与、14日間
各値は平均値±標準偏差(n=8)
** : p<0.01(溶媒群との比較、Dunnettの多重比較検定)

体-副腎皮質(hypothalamic-pituitary-adrenal; HPA)系がよく知られている。そこでこのHPA系の過活動に着目し、下垂体ホルモンであるadrenocorticotrophic hormone(ACTH; 副腎皮質刺激ホルモン)を投与したラットを用い、治療抵抗性うつ病の動物モデルとしての有用性について検討を行った。実験には代表的抗うつ薬スクリーニングモデルである強制水泳法を用い、三環系抗うつ薬であるイミプラミンを用いて検討を行った。



岡山大学大学院医歯薬学総合研究科
医薬管理学准教授
北村佳久先生

その結果、ACTH反復投与ラットではイミプラミンの不動時間短縮作用(抗うつ様作用)は抑制された(図1)。既存の多くの抗うつ薬はこの不動時間を短縮させことから、ACTH反復投与ラットは治療抵抗性うつ病の動物モデルとしての有用性が考えられる。

神経細胞新生から見たうつ病の病態像

近年の脳機能画像解析研究的進歩によりうつ病における海馬の萎縮が報告されるようになり、うつ病の神経解剖学的異常が知られるようになってきた。また、1990年代になって脳由来神経栄養因子(brain-derived neurotrophic factor; BDNF)が脳内における神経回路網の形成や発達、さらにはその生存に重要な役割を担っていることが明らかとされ、うつ病患者では血清BDNF濃度が健常人と比較して有意に低いこと、さらに抗うつ薬を服用させると、うつ病の改善に従って血清BDNF濃度が正常化することが報告されている。海馬領域においても抗うつ薬投与で神経細胞新生が認められることが明らかになり、BDNFおよび海馬における神経細胞新生の促進作用が抗うつ作用に関与していると考えられている。前述のACTH反復投与ラットにおいてBDNF含量の低下および神経細胞新生の抑制が認められていることから、治療抵抗性

うつ病の病態およびその改善には神経細胞新生が関与している可能性が考えられる。

NaSSAの使用により、うつ病に対する薬物治療は新しい

臨床現場の 観点から

はじめに

統合失調症を初めとする精神疾患の発症分子機構を解明し、新たな予防・治療戦略や診断体系を確立するためには、臨床検体を用いた候補遺伝子の関連解析や連鎖解析、実験動物を用いた精神疾患発症脆弱性候補分子の探索およびその候補分子の機能評価系の確立など、臨床的側面と基礎的側面の双方からアプローチする必要がある。ここでは、最近の遺伝子研究の進歩について概説する。

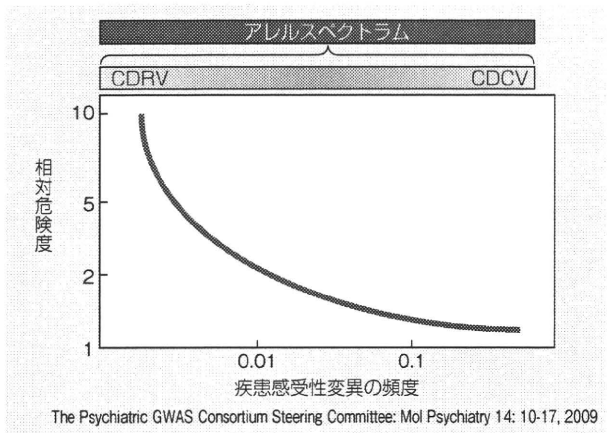
遺伝子研究の2つの方向

現在までに統合失調症や双極性障害などに関する様々な発症脆弱性遺伝子が同定されている。2003年にヒトゲノムプロジェクトが完了し、ヒトの全遺伝子約22,000個の塩基配列が解読されたことにより遺伝子研究は飛躍的な進展を遂げた。現在、精神疾患の遺伝子研究の方向性は大きく2つに分けられる。

第1には、統合失調症(発症頻度1%)のような発症頻度の高い疾患(common disease)が遺伝と関係している場合、原因となる遺伝子変異は、単一集団内において家系が異なっても共通している(common variant)ことが多いという、CDCV仮説(common disease common variants hypothesis)に基づいた遺伝子研究である。

全ゲノム上の一塩基多型(SNP; Single Nucleotide Polymorphism)を網羅的にタイプする全ゲノム関連解析(GWAS; genome wide association study)がこれに当たる。

図1 疾患感受性変異の頻度と相対危険度



時代に突入したと言える。しかしながら、これら薬剤にも抵抗を示す治療抵抗性うつ病の存在は問題であり、今後は既存の抗うつ薬に抵抗性を示す治療抵抗性うつ病に対しても有効な治療薬の開発が望まれる。

CDCV仮説では、疾患と関連する遺伝子多型は何百種類存在し、ひとつの変異の疾患への関与は1.1~1.5倍程度と考えられている。ヒトは誰もが疾患に関連する脆弱性遺伝子を持ち、偶然に多数受け継いだヒトが発症すると推定されている。GWASの網羅的解析によって関連遺伝子が急速に同定されると期待されていたが、小さなリスクの遺伝子の同定には、何千、何万という臨床サンプルが必要で、当初の期待どおりにはいかなかった。

第2には、発症に関連するリスクの大きい遺伝子であるが、非常に稀な変異(rare variant)が疾患に関与しているというCDRV仮説(common disease rare variants hypothesis)に基づいた遺伝子研究である。たとえば、統合失調症を高頻度で発症するスコットランドの大家系において1番染色体長腕と11番染色体長腕の均衡転座が認められ、この1番染色体転座断片からDISC1(Disrupted In Schizophrenia-1)が変異遺伝子として同定された。

アレルスペクトラム

現在では、CDCV仮説とCDRV仮説の両者が統合失調症の発症に関与しているとする「アレルスペクトラム」という認識がもたらされている(図1)。網羅的解析方法(トランスクリプトーム解析やプロテオーム解析など)は、遺伝子のみならずタンパク質の発現解析にも応用されている。たとえば、トランスクリプトーム解析のExon Arrayは、エクソンレベルでプローブを配置することにより、遺伝子の発現だけでなく選択的スプライシング現象も解析が可能である。我々は、こうした網羅的解析法を用いて精神疾患患者群と健常者群で異なる発現変化を示した遺伝子やタンパク質を見出しており、脳機能における役割、診断に有用なバイオマーカーとして臨床応用が可能かどうか検討している。

これらの研究により、精神疾患の発症・病態機序が詳細に解明され、ゲノム情報に基づいた精神疾患のテーラーメイド医療の確立にも繋がるものと思われる。



名城大学薬学部病態解析学研究室
教授

野田幸裕 先生

特集 動物行動からみた精神障害モデル

統合失調症モデル動物に認められる行動異常

安藤 雄¹⁾, 野田 幸裕¹⁾, 毛利 彰宏²⁾, 鍋島 俊隆²⁾

¹⁾名城大学大学院薬学研究科病態解析学Ⅰ

²⁾名城大学学術フロンティア推進事業比較認知科学研究所・大学院薬学研究科薬品作用学教室

1. はじめに

統合失調症は、主に思春期以降に発症する慢性・進行性の精神疾患であり、幻覚や妄想などの陽性症状、感情の平板化や意欲低下などの陰性症状に加え、注意力、記憶保持や実行機能の低下などの認知障害といった多彩な精神症状を呈する。新たな治療戦略を考えるためには臨床研究に加え、適切な病態モデル動物を用いた神経機能障害の解明や新規治療薬の有効性の評価を行なうための基礎研究が必要である。これまでに集積されてきた臨床および基礎研究における知見から、統合失調症の病態に関していくつかの仮説（ドパミン過剰仮説、グルタミン酸低下仮説、神経発達障害仮説）が提唱されている。それぞれの仮説に基づき、その病態を反映したモデル動物の作製が試みられている（表1¹⁻⁴⁾）。一方、統合失調症の病因には遺伝的要因が関与していることが家系研究、双生児研究、養子研究などから示唆されており、統合失調症の候補遺伝子を改変させたモデル動物も作製されている（表2, 3^{1,4)}）。一般に、モデル動物が具備すべき要件として、ヒトと動物において行動上認められる表面的な症状の類似性があるかの「表面妥当性 (face validity)」, 神経学的所見, 病理学的所見などの病態の一部を適切に反映しているかどうかの「構成概念妥当性 (construct validity)」, 動物での薬物反応性がヒトの病的状態での改善効

果を反映しているか否かの「予測妥当性 (predictive validity)」が挙げられる。本稿では、紙面の都合上、これまでに報告されてきた統合失調症モデル動物に認められる行動異常に焦点を絞って紹介する。なお、各行動実験の詳細な結果に関しては、文献1~4で確認して頂きたい。

2. ドパミン作動性神経系機能亢進モデル (表1¹⁻⁴⁾)

クロルプロマジンやハロペリドールなどの第一世代抗精神病薬がドパミンD₂受容体拮抗作用を示し、その拮抗作用と抗精神病薬としての臨床力価がよく相関すること、中脳辺縁系のドパミン作動性神経を興奮させる覚せい剤（アンフェタミンやメタンフェタミン）は乱用者において統合失調症の陽性症状に類似した症状を引き起こすことから、統合失調症の陽性症状はドパミン作動性神経の過活動に起因するという「ドパミン過剰仮説」が提唱されている。この仮説に基づいて覚せい剤投与動物モデルが作製され、新規治療薬の開発に利用されている。低用量（1~5mg）の覚せい剤を動物に急性投与すると、ドパミン作動性神経の過活動によって自発運動量の増加および常同行動が誘発される。この運動量の増加に対してある薬物が抑制作用を示せば統合失調症の陽性症状に対する治療効果を反映していると考えられている。

表1 仮説に基づいた統合失調症動物モデル（文献1-4より引用改変）

仮説		ドパミン過剰仮説		グルタミン酸低下仮説					神経発達障害仮説		
動物	覚醒剤投与モデル	遺伝子	PCP投与モデル	遺伝子改変マウス			新生仔期腹側海馬損傷	周産期感染 (PolyI:C投与)	新生仔期PCP投与		
		変更マウス		急性投与	連続投与	NR1KD				NR1点変異	NR2A欠損
陽性症状	運動量・常同行動	増加 ^{a)}	増加 ^{a,b)}	増加 ^{b)}	行動感作 ^{a)}	増加 ^{a)}	増加 ^{a)}	増加 ^{a)}	増加 ^{a,b)} <small>(文献1,4)</small>	増加 ^{b)} <small>(文献5)</small>	増加 ^{b)} <small>(文献12,13)</small>
陰性症状	社会性行動試験	変化なし	変化なし	低下	低下	低下	—	—	低下 ^{a,b)}	低下 ^{a,b)}	—
	強制水泳試験	変化なし	亢進	変化なし	低下	—	—	—	—	—	低下 ^{a,b)}
認知障害	プレパルス・インヒビション試験	障害	障害	障害	障害 ^{c)}	障害	変化なし	変化なし	障害 ^{a,b)}	障害 ^{a,b,c)}	障害 ^{a,b)}
	放射状迷路試験 T型迷路試験	障害	障害 ^{a,b)}	障害	障害	—	—	—	障害 ^{a,b)}	—	—
	水探索試験	—	—	障害	障害	—	—	障害	—	—	—
	新奇物体認識試験	障害 ^{a,b)}	—	—	障害	—	—	—	—	障害 ^{a,b,c)}	—
	恐怖条件付け 学習試験	—	—	—	障害	—	—	障害	—	—	—
	潜在抑制試験	—	—	—	—	—	—	—	—	障害 ^{a,b)}	—
	モリス水迷路試験	—	—	—	—	—	—	障害	障害	—	障害 ^{a,b)}
	セットシフティング試験	—	—	障害	障害	—	—	—	—	—	障害 ^{a,b)}

PPI: pre-pulse inhibition, DAT: dopamine transporter, PCP: phencyclidine, Poly I:C: polyriboinosinic-polyribocytidilic acid
NR1KD: NR1の発現が5-10%, NR1点変異: NR1のグリシン結合部位を点変異

a) 新奇環境下における運動量の増加, b) 精神刺激薬による運動量の増加, c) 最終投与6時間以降では障害なし

文献1: Kamei H, et al. Biol Psychiatry. 2006; 59: 75-84. 文献2: Gainetdinov RR, et al. Science. 1999; 283: 397-401. 文献3: Lipska BK, et al. Neuropsychopharmacology. 1993; 9: 67-75. 文献4: Richtand NM, et al. Neuropsychopharmacology. 2006; 31: 77-89. 文献5: Becker A, et al. Psychopharmacology (Berl). 1999; 144: 333-338. 文献6: Kamath A, et al. Int J Neuropsychopharmacol. 2008; 11: 1085-1096. 文献7: Lipska BK, et al. Neuropsychopharmacology. 2002; 27: 47-54. 文献8: Ozawa K, et al. Biol Psychiatry. 2006; 59: 546-554. 文献9: Ibi D, et al. Neurosci Res. 2009; 64: 297-305. 文献10: Zuckerman L, et al. Neuropsychopharmacology. 2003; 28: 1778-1789. 文献11: Meyer U, et al. Neurosci Biobehav Rev. 2005; 29: 913-947. 文献12: Wang CZ and Johnson KM. Neuropsychopharmacology. 2007; 32: 1178-1194. 文献13: Wang CZ, et al. Neuropsychopharmacology. 2008; 33: 2442-2455. 文献14: du Bois, et al. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 2009; 33: 37-40. 文献15: Wang C, et al. J Pharmacol Exp Ther. 2003; 304: 266-271. 文献16: Broberg BV, et al. Behav Brain Res. 2008; 190: 160-163.

覚せい剤投与動物ではプレパルス・インヒビション (PPI) 試験における情報処理障害, T型迷路試験における作業記憶障害 (急性投与) および新奇物体認識試験における視覚的認知記憶障害 (連続投与) も示す。

臨床において覚せい剤が主に作用するドパミントランスポーター (DAT) の遺伝子の変異は統合失調症発症との間に相関が認められ⁹⁾, DAT遺伝子欠損マウスにおいては自発運動量の増加およびPPI試験における情報処理障害が認められる。しかし, 覚せい剤依存者は統合失調症様の陰性症状をほとんど示さず, 覚せい剤投与動物やDAT遺伝

子欠損マウスでも陰性症状の指標となる社会性行動の低下や強制水泳試験における意欲の低下などの行動異常を示さないことから, 「ドパミン過剰仮説」は統合失調症の陰性症状を反映していないという問題がある。このモデルの欠陥は, ドパミンD2受容体拮抗を主作用とする第一世代抗精神病薬は陽性症状に有効であるが, 陰性症状には効果が乏しいとされる点を反映している点である¹⁰⁾。「ドパミン過剰仮説」もセロトニン, ノルアドレナリン, グルタミン酸, γ-アミノ酪酸 (GABA) など複数の神経伝達物質の変化を含めた仮説に修正されつつあるように¹¹⁾, 覚せい剤投与動物モデル

も改良が必要である。

3. グルタミン酸作動性神経系機能低下モデル (表1¹⁻⁴)

1970年代に米国において乱用されていた非競合的N-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体拮抗薬であるフェンシクリジン (PCP) は、薬物依存者に精神症状 (PCP精神病) を惹起することから、統合失調症にはNMDA受容体機能の低下が関係しているという「グルタミン酸低下仮説 (NMDA受容体機能低下仮説)」が提唱されている。NMDA受容体 (NR1, NR2A, NR2B, NR2C, NR2Dなどのサブユニットから構成) 機能を低下させるため遺伝子改変技術を利用してNR1の発現量を正常の5~10%に減少させたNR1ノックダウン (KD) マウス、NR1のグリシン結合部位を点変異させたマウスおよびNR2Aを欠損させたマウスは自発運動量の増加をはじめとする統合失調症様の精神行動障害を示すことが知られている。

PCPは、他のNMDA受容体拮抗薬 (ケタミンやジブシルピン) の中でもっとも知見が多い薬物である。PCPは単回投与すると自発運動量および常同行動の増加、放射状迷路試験における作業記憶障害、PPI試験における情報処理障害、水探索試験における潜在学習障害など、陽性症状および認知障害の指標となる行動障害を示す。

PCP依存患者が摂取を中止した後も、その精神症状が数週間持続する様に、動物モデルでも行動変化が持続する。たとえば、PCPを連続投与した実験動物は、休薬後も陽性症状に類似した行動変化として自発運動量の行動感作、陰性症状の指標となる行動変化として社会性行動試験における社会性行動の低下および強制水泳試験における無動状態の長期間増強を示す。また、認知障害の指標となる行動変化として、T型迷路試験または8方向放射状迷路試験における作業記憶障害が認めら

れる。他にもPCP連続投与動物モデルでは水探索試験における潜在学習障害、新奇物体認識試験における視覚的認知記憶障害および恐怖条件付け学習試験における連合学習障害などが知られている。このようにPCP連続投与動物では陰性症状や認知障害の指標となる行動変化が認められることから、PCP連続投与マウスは新規治療薬のスクリーニングに有用であることが示唆されている。

4. 神経発達障害仮説に基づく動物モデル (表1¹⁻⁴)

統合失調症は思春期以降に発症し、患者において海馬の体積減少や側脳室の拡大が認められるが、死後脳の剖検結果では脳内にグリオーシスが認められない。これらの知見から、統合失調症の病態および脳内の構造変化には発達過程や成熟時期の異常が関与すると考えられており、「神経発達障害仮説」に基づいたモデル動物の作製がなされている。

4-1. 新生仔期腹側海馬損傷動物モデル

新生仔期に腹側海馬を破壊することで成熟期以降に統合失調症様症状を惹起することがラットおよびサルを用いた研究において確認されている。すなわち、ラットにおける海馬損傷動物モデルは興奮性細胞毒性を持つイボテン酸を生後7日目の新生仔の両側腹側海馬に注入し局所的に細胞を障害することで作製されている。このモデル動物は統合失調症に類似した行動異常を示し、成熟期以降に顕著となる。たとえば、偽手術 (コントロール) 群と比較し、新奇環境下における運動量 (自発運動量) や覚せい剤誘発運動量の増加、社会性行動の低下、PPI試験における情報処理障害、T型迷路試験における作業記憶障害が生後56日目以降に顕著に認められる。これらの行動障害は生後35日目では認められず、成熟ラットの腹側海馬を同様の方法で破壊した場合には、このような行動

異常は認められない。したがって、この行動変化はイボテン酸による腹側海馬の破壊による直接的な影響ではなく、神経発達過程において二次的な結果として起こるものと考えられている。一方、イボテン酸の代わりに特異的ナトリウムチャンネル阻害薬のテトロドトキシンを新生仔期の両側腹側海馬に注入することにより、永久的な組織破壊を起こさず一時的な機能障害を起こし、神経発達障害を誘発した動物モデルも作製されている。本モデル動物では、生後56日目において自発運動量、覚せい剤およびジゾシルビン誘発運動量の増加が認められる¹⁾。

4-2. 周産期感染モデル

統合失調症の発症には、胎生中期に母親がインフルエンザに感染するなどの初期要因が疫学的に関連している。合成二本鎖RNAである polyribonucleosinic-polyribocytidilic acid (Poly I:C) を妊娠マウスに投与すると、母胎の免疫系が賦活化されこの母体から生まれたマウスは、生理食塩水投与(コントロール)群と比較し、成熟期以降、覚せい剤誘発運動量の増加、PPI試験での情報処理障

害、潜在抑制試験での注意力障害、モリス水迷路試験での作業記憶障害、新奇物体認識試験における認知障害など統合失調症に類似した行動異常を示す。これらの障害は、幼若期には認められない。ヒトの妊娠中期に当たるマウスの出生2日後から5日間に Poly I:C を投与すると、新奇物体認識試験における認知障害、PPI試験での情報処理障害や社会性行動の低下が認められる。

4-3. 新生仔期PCP投与モデル

NMDA受容体は脳の発達において、神経の分化、生存および重複したシナプスの除去などの様々な重要な役割を果たしている。神経発達過程である胎生期および新生児期にPCPを投与しNMDA受容体機能を低下させた統合失調症動物モデルが提唱されている。たとえば、ラットの新生仔期である7, 9および11日齢時にPCP (10mg/kg) を3回投与すると成熟期に強制水泳試験における意欲低下、PPI試験における情報処理障害、セットシフティング試験における作業記憶障害が認められる。低用量のPCP (2mg/kg) を投与することによって惹起される運動過多は、コントロール群に比

表2 DISC1 遺伝子改変マウスにおける行動異常 (文献3より引用改変)

		129S6/SvEv マウス		DISC1 ミスセンス変異マウス		ドミナントネガティブ DISC1 トランスジェニックマウス		相同組換え DISC1 トランスジェニックマウス	胎生期 DISC1 ノックダウンマウス
				31L	100P				
陽性症状	運動量・常同行動	変化なし	変化なし	増加 ^{a)}	増加 ^{a)}	増加 ^{a)}	変化なし	増加 ^{a)}	
	強制水泳試験	—	低下	変化なし	低下	—	低下	—	
陰性症状	テイルサスペンション試験	—	—	—	—	—	低下	—	
	社会性行動試験	—	低下	変化なし	変化なし	低下 (攻撃性増加)	—	—	
認知障害	ブレバリス・インヒビション試験	変化なし	障害	障害	障害	変化なし	—	障害	
	音覚覚醒反応試験	—	変化なし	低下	—	—	—	変化なし	
	T型迷路試験	障害	障害	障害	—	—	—	障害	
	潜在抑制試験	—	障害	障害	—	—	障害	—	
	Y迷路試験	—	—	—	変化なし	—	—	—	
	モリス水迷路試験	—	変化なし	変化なし	変化なし	障害 (プローブ試験)	—	—	
	新奇物体認識試験	—	—	—	—	—	—	障害	

DISC1 : Disrupted-in-schizophrenia-1

a) 新奇環境下における運動量の増加, b) 精神刺激薬による運動量の増加

べ有意に増強する。

5. 統合失調症関連遺伝子に基づく動物モデル (表2^aおよび3^a)

ヒトゲノムの全塩基配列の解読の成功や一塩基多型 (single nucleotide polymorphism: SNP) などの研究の進展により, 統合失調症に関連した多くの候補遺伝子が見出されている。たとえば, スコットランドの大家系において1番染色体長腕と11番染色体長腕の均衡転座が認められ, この転座が精神疾患の発症と関連がある。この1番染色体転座断片からDISC1 (Disrupted In Schizophrenia-1) が同定された。転座によってDISC1のC末端側の257アミノ酸が欠失していた。また, 統合失調症の死後脳では, ニューレグリン-1/Erb-4シグナルが亢進しており, NMDA受容体の機能低下に関与している。アイスランドの統合失調症患者とニューレグリン-1とのハプロ解析の結果, 相関が認められている。これら候補遺伝子が統合失調症の病態にどのように関与しているかを検討するため, 遺伝子改変マウスが作製され, 行動学的解析が行なわれている。DISC1の遺伝子変異マウスとして, 129S6/SvEVマウスにはDISC1遺伝子の第6エクソンに自然発症の25塩基の欠失変異があり, 129S6/SvEVマウスをC57BL/6Jマウスと交配し, そのDISC1の欠失を持つC57BL/6Jマウスが作製され

ている。また, DISC1の31番目のグルタミンがロイシン (Gln31Leu: 31L) および100番目のロイシンがプロリン (Leu100Pro: 100P) に置換されたDISC1ミスセンス変異マウス (31Lマウスおよび100Pマウス) が2系統作製されている。他にも, 臨床知見に類似したC末端が欠落したヒトDISC1を過剰発現させることにより, 内在性のDISC1の機能を低下させたドミナントネガティブDISC1トランスジェニックマウス [CaMKIIプロモーターの制御下でC末端が欠落したヒトDISC1 (1-597アミノ酸) を前脳特異的に発現させたトランスジェニックマウス] やTet-off遺伝子発現およびCaMKIIプロモーターを制御してfTAを発現するシステムを用いて, 上記と同様に前脳特異的にC末端が欠落したヒトDISC1 (1-573アミノ酸) を発現させたトランスジェニックマウスが作製されている。第9エクソンの途中で切断されたマウスDISC1のDNAに相同組換えしたDISC1遺伝子変異マウスも作製されている。我々は, 子宮内エレクトロポレーション法を用いて神経発達過程の大脳皮質においてDISC1の発現を抑制したKDマウスを作製している。その行動学的解析の結果, 覚せい剤投与による運動量の増加の亢進, 新奇物体認識試験における視覚的認識記憶の低下, T型迷路試験における作業記憶障害およびPPI試験における情報処理障害が認められている。ニューレグリン-1の遺

表3 統合失調症関連遺伝子改変マウスにおける行動異常 (文献4より引用改変)

遺伝子		NRG-1	COMT	PRODH	CN	PACAP
陽性症状	運動量・常同行動	増加 ^{a)}	変化なし ^{a)}	減少 ^{a)} 増加 ^{b)}	増加 ^{a)} ^{b)}	増加 ^{a)}
陰性症状	社会性行動試験	—	攻撃性増加	—	低下	—
認知障害	放射状迷路試験	—	—	—	障害 ^{a)} ^{b)}	—
	プレパルス・インヒビション試験	障害	変化なし	障害	障害	障害
	潜在抑制試験	障害 ^{a)} ^{b)}	—	—	障害	—
	恐怖条件付け学習試験	—	—	障害 ^{a)} ^{b)}	変化なし ^{a)} ^{b)}	—

NRG-1: neuregulin 1, COMT: catechol-o-methyl-transferase, PRODH: proline dehydrogenase, CN: calcineurin

PACAP: pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide

a) 新奇環境下における運動量の増加, b) 精神刺激薬による運動量の増加,

文献1: Rimer M, et al. Neuroreport. 2005; 16: 271-275. 文献2: Paterlini M, et al. Nat Neurosci. 2005; 8: 1586-1594. 文献3: Zeng H, et al. Cell. 2001; 107: 617-629.

伝子改変マウスとして、EGF様ドメイン、イムノグロブリン様ドメインおよび膜貫通ドメインをそれぞれ欠失させたものが作製されている。いずれのホモ型改変マウスも致死性であるため、ヘテロ型を用いて行動解析が行なわれている。その他に、COMT (catechol-o-methyl-transferase) やPRODH (proline dehydrogenase) などの遺伝子改変マウスが作製されている。

6. 遺伝子改変マウスの行動解析に基づく動物モデル (表3)

近年では、遺伝子改変技術の進歩により、染色体からある遺伝子の発現を欠失させ、種々の行動学的解析を行ない、ある種の異常を見出すことで、その遺伝子の正常機能を知ることができる。さらに、Cre-loxPなどの遺伝子組換え技術の進歩により部位特異的あるいは時期特異的な遺伝子発現調節をもたらすことも可能になってきている。このような技術を用いて、遺伝子改変マウスが作製されており、カルシニューリン (Calcineulin) やPACAP (Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide) などのタンパクと統合失調症の病態との関連性が注目されている。カルシニューリンはプロテイン・ホスファターゼ2Bとして知られており、カルシウム・カルモジュリン依存性のセリン/スレオニン脱リン酸化酵素である。また、脱リン酸化活性部位をもつカルシニューリンA (CnA) とカルシウム結合部位をもつ調節サブユニットであるカルシニューリンB (CnB) から構成されるヘテロ二重体タンパクである。前脳特異的にCnBを欠損させたマウスが作製され、行動解析が行なわれている。PACAPはC末端がアミド化された27残基のアミノ酸からなる神経ペプチドであり、3量体Gタンパク型の受容体と結合し、神経伝達物質調節因子および神経栄養因子として働いていることが示されている。PACAP遺伝子欠損マウスが作製

され、行動解析の結果、統合失調症の一面を示していると考えられている。

7. おわりに

統合失調症モデル動物に認められる行動異常について概説した。覚せい剤およびPCP投与による薬理的動物モデルは比較的容易に作製することができ、現在も多くの新規抗精神病薬のスクリーニングに用いられている。新生仔期腹側海馬損傷動物をはじめとする神経発達障害モデルは薬理的モデルに比べ、より臨床に即していると考えられるが、作製までの時間や手間などが多い。また、統合失調症の発症には単一遺伝子だけでなく複数の遺伝子の関与に加え、環境因子もその発症に関与すると考えられているため、単一の遺伝子を改変させたマウスでは統合失調症のモデル動物として限界があると思われる。今後、より病態を反映した動物モデルの作製を試みるためにこれらの動物モデル間の相違点を詳細に検討することが必要であり、こうした研究が統合失調症の原因解明や治療に結びつくことを願っている。

文 献

- 1) Enomoto T, et al. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 2007; **29**: 291-301.
- 2) Mouri A, et al. *Neurochem Int.* 2007; **51**: 173-184.
- 3) 野田幸裕ら 日本神経精神薬理雑誌 (Jpn. J. Neuropsychopharmacol.) 2009; **29**: 47-53.
- 4) 野田幸裕ら 日薬理誌 (Folia Pharmacol. Jpn.) 2007; **130**: 117-123.
- 5) Khodayari N, et al. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2004; **129**: 10-12.
- 6) Kapur S and Seeman P. *Am J Psychiatry.* 2001; **158**: 360-369.
- 7) Carlsson A, et al. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2001; **41**: 237-260.
- 8) Lipska BK and Weinberger DR. *Neuropsychopharmacology.* 2000; **23**: 223-239.
- 9) Lipska BK, et al. *J Neurosci.* 2002; **22**: 2835-2842.

Forum Minireview

Basic and Translational Research on Proteinase-Activated Receptors: Regulation of Nicotine Reward by the Tissue Plasminogen Activator (tPA) – Plasmin System via Proteinase-Activated Receptor 1Taku Nagai¹, Toshitaka Nabeshima², and Kiyofumi Yamada^{1,*}¹Department of Neuropsychopharmacology and Hospital Pharmacy, Nagoya University Graduate School of Medicine, 65 Tsuruma-cho, Showa-ku, Nagoya 466-8560, Japan²Department of Chemical Pharmacology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Meijo University, Nagoya 468-8503, Japan

Received July 3, 2008; Accepted September 24, 2008

Abstract. Nicotine, a primary component of tobacco, is one of the most abused drugs worldwide. Mesolimbic dopaminergic neurons mediate the rewarding effects of abused drugs, including nicotine. We show that the tissue plasminogen activator (tPA) – plasmin system regulates nicotine-induced reward and dopamine release in the nucleus accumbens (NAc) by activating proteinase-activated receptor 1 (PAR₁). Nicotine-induced conditioned place preference and dopamine release in the NAc are diminished in tPA knockout (tPA^{-/-}) mice. The defect of nicotine-induced dopamine release in tPA^{-/-} mice is reversed by microinjection of either exogenous tPA or plasmin into the NAc. Acute nicotine treatment increases tPA protein levels and promoted the release of tPA into the extracellular space. The expression of PAR₁ on dopaminergic neurons is evident and the activation of PAR₁ by plasmin is demonstrated by assaying GTP-γS binding. Finally, nicotine-induced conditioned place preference and dopamine release are diminished in PAR₁^{-/-} mice. These findings suggest that targeting the tPA-plasmin-PAR₁ system would provide new therapeutic approaches for the treatment of nicotine dependence.

Keywords: dependence, dopamine, nicotine, proteinase-activated receptor 1 (PAR₁), tissue plasminogen activator (tPA)

Introduction

Tissue plasminogen activator (tPA), a serine protease that catalyzes the conversion of plasminogen (plg) to plasmin, plays an important role in fibrinolysis. This protease cascade is tightly regulated by the actions of serine protease inhibitors, of which plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) and neuroserpin are the major cognate serpins for tPA, while plasmin is inhibited by α₂-antiplasmin (1). Accumulating evidence has demonstrated that tPA is involved in synaptic plasticity and remodeling, directly by itself or indirectly through plasmin. For instance, tPA is directly involved in long-term potentiation (LTP) by acting on low-density

lipoprotein receptor-related proteins (2) and NMDA receptors (3). On the other hand, neurite outgrowth (4), cell migration (5, 6), and amyloid-β degradation induced by tPA (7, 8) are mediated by plasmin. In addition, recent studies have demonstrated the role of tPA in the regulation of neurotransmitter release. Depolarization-evoked dopamine release in the NAc (9) as well as norepinephrine release from hearts (10) are diminished in tPA-deficient (tPA^{-/-}) mice compared with wild-type mice. We have demonstrated that the tPA-plasmin system plays an important role in the rewarding effects of abused drugs, including methamphetamine and morphine (11 – 16).

Plasmin is known to degrade several extracellular matrix proteins, such as laminin (17), and converts pro-brain-derived neurotrophic factor to its mature form (18). Alternatively, plasmin was recently demonstrated to activate proteinase-activated receptor 1 (PAR₁) (19).

*Corresponding author. kyamada@med.nagoya-u.ac.jp

Published online in J-STAGE

doi: 10.1254/jphs.08R04FM

PAR₁ belongs to the cell surface G-protein-coupled receptor family and has seven transmembrane domains and an extracellular N-terminus (20). In addition to plasmin, PAR₁ is activated by a highly selective group of serine proteases, including thrombin (20), Xa (21), and activated protein C (22). Proteolytic activation of the PAR₁ by serine proteases at the N-terminus results in unmasking of the tethered ligand sequence, which then binds to a specific binding site for the tethered ligand on extracellular loop 2 and causes receptor activation through G-protein subunits, G_{α_q} , G_{α_i} , and $G_{\alpha_{12/13}}$ (23–25). Cleavage of PAR₁ at Arg₄₁ by plasmin can lead to receptor activation, whereas plasmin cleaves downstream of the activating site on PAR₁, subsequently terminating the signaling by removing the tethered ligand (19, 26). In this review, we briefly summarize our data indicating that the tPA-plasmin-PAR₁ system regulates the rewarding effect of nicotine (27).

Nicotine and dependence

Nicotine, a primary component of tobacco, is one of the most abused drugs worldwide. Repeated tobacco smoking leads to nicotine addiction, which in turn causes devastating health problems, including heart disease, lung disease, and cancer. It is estimated that nearly two billion people smoke on a regular basis and four million people die each year because of diseases associated with tobacco smoking (28); however, approximately 80% of smokers who attempt to quit on their own relapse within the first month of abstinence and only about 3% remain abstinent at 6 months (29).

Nicotine rapidly reaches the brain through smoking and nicotine binds to nicotinic acetylcholine (ACh) receptors (nAChRs) in the central nervous system. nAChRs are pentameric, ligand-gated ion channels abundant in the central nervous system (30). Twelve neuronal subunits have been identified, designated $\alpha 2$ to $\alpha 10$ and $\beta 2$ to $\beta 4$, which potentially assemble in multiple combinations with a broad range of pharmacological and electrophysiological properties (31). Thus, many nAChR subtypes exist because most subunits can form heteromeric channels, whereas subsets $\alpha 7$ to $\alpha 10$ may form homomeric channels. Nicotine exerts its positive reinforcing effects by acting on $\alpha 4\beta 2$ nAChRs. In mice, targeted deletion of the $\beta 2$ subunit gene eliminates the behavioral effects of nicotine, including self-administration (32). Reinserting the $\beta 2$ subunit gene in $\beta 2$ knockout mice restores behavioral responses to nicotine (33). Single nucleotide point mutation in the $\alpha 4$ subunit causes hypersensitivity to nicotine-induced reward behavior (34).

Stimulation of nAChRs by nicotine results in the

release of a variety of neurotransmitters, including dopamine, noradrenaline, serotonin, glutamate, GABA, and opioid peptide (35). In particular, dopaminergic neurons possess high-affinity nAChRs on cell bodies and terminals (36). Activation of the mesocorticolimbic dopamine system, which originates in the midbrain ventral tegmental area (VTA) and projects to the nucleus accumbens (NAc), has been implicated in the positive reinforcing (rewarding) effects of nicotine and other drugs of abuse (37, 38). Lesioning dopamine neurons in the brain prevent nicotine self-administration in rats (39); thus, nicotine activates the brain reward system through dopamine release.

Regulation of nicotine-induced dopamine and ACh release by tPA-plasmin system

Nicotine-induced dopamine release is dose-dependently potentiated by microinjections of either exogenous tPA or plasmin into the NAc (27). In contrast, microinjection of PAI-1 into the NAc inhibits nicotine-induced dopamine release. Microinjection of tPA and plasmin by themselves had no effect on basal levels in the NAc, whereas PAI-1 slightly but significantly decreased basal extracellular dopamine levels (27), suggesting that the endogenous tPA-plasmin system regulates dopamine release in the NAc. These findings indicate that the tPA-plasmin system regulates nicotine-induced dopamine release in the NAc. Regulation of nicotine-induced dopamine release by the tPA-plasmin system has also been confirmed in tPA^{-/-} mice. Extracellular dopamine levels in the NAc are markedly increased by nicotine stimulation in wild-type mice, but are diminished in tPA^{-/-} mice (27). Microinjection of either recombinant tPA or plasmin into the NAc dramatically restores the level of dopamine in tPA^{-/-} mice (27). These results suggest that the defect in nicotine-induced dopamine release in tPA^{-/-} mice is due to a deficiency of tPA in the NAc, not to a developmental malfunction. Furthermore, tPA modulates nicotine-induced dopamine release, probably by converting plg to plasmin in the NAc.

We have reported that morphine-induced dopamine release is markedly diminished in tPA^{-/-} mice and plg^{-/-} mice compared to wild-type mice (11). Microinjection of tPA or plasmin into the NAc dramatically increased morphine-induced dopamine release in tPA^{-/-} mice, as observed in wild-type mice, although microinjection of tPA into the VTA had no effect on morphine-induced dopamine release in the NAc of tPA^{-/-} mice (11). In addition, microinjections of either exogenous tPA or plasmin into the NAc of tPA^{-/-} mice restored the defect of high-potassium-evoked dopamine

release in the NAc of the mutant mice (9). It is plausible that plasmin converted from plg by tPA may have a role in the regulation of dopamine release in the NAc.

In contrast, there is no difference in high-potassium-evoked ACh release in the hippocampus between wild-type and tPA^{-/-} mice (9). Nicotine-induced ACh release is also slightly but significantly decreased in the striatum and the hippocampal CA1 subfield of tPA^{-/-} mice (27). Accordingly, it is likely that the nicotine-induced release of ACh is also regulated, at least in part, by the tPA-plasmin system, although the contribution may be minimal.

Regulation of tPA release induced by nicotine

tPA is stored in synaptic vesicles in the nervous system and released into the extracellular space by a depolarization stimulus (40, 41). Thus, if nicotine-induced dopamine release is modulated under the control of the tPA-plasmin system, nicotine should increase extracellular tPA activity in the NAc. Single nicotine treatment significantly increases tPA activity in the NAc (27). The effect of nicotine is dose-dependent and is completely inhibited by pretreatment with the nAChR antagonist mecamylamine. Furthermore, nicotine-induced increase in extracellular tPA activity in the NAc is inhibited by pretreatment with either the dopamine D₁ antagonist SCH23390 or the dopamine D₂-receptor antagonist raclopride (27). These results suggest that nicotine stimulates tPA release through both nACh and dopamine receptors.

Regarding the regulation of tPA release in the nervous system, previous studies using primary cultured hippocampal neurons demonstrated that tPA resides in dense-core granules that move to postsynaptic dendritic spines and that high-potassium-induced depolarization elicits a slow calcium-dependent exocytotic release of tPA in spines (41). Furthermore, it is suggested that phospholipase D1 (PLD1) functions endogenously to regulate tPA secretion in cultured hippocampal neurons (42). The mechanisms by which drugs of abuse increase extracellular tPA activity in the NAc has been demonstrated in vivo. The dopamine D₁-receptor agonist SKF38393 significantly increases extracellular tPA activity in the NAc (43). The effect of SKF38393 is blocked by pretreatment with the dopamine D₁-receptor antagonist SCH23390. Microinjection of Rp-cAMPs, a protein kinase A (PKA) inhibitor, into the NAc completely blocks the effect of SKF38393. Lesions of presynaptic dopaminergic neurons by 6-hydroxydopamine have no effect on the basal and SKF38393-induced tPA activity in the NAc (43). Systemic administration of morphine and methamphetamine increases

extracellular tPA activity in the NAc, and these effects are completely blocked by pretreatment with SCH23390 and raclopride (43). Taken together, it is suggested that activation of postsynaptic dopamine D₁ receptors in the NAc leads to an increase in extracellular tPA activity via PKA signaling. Furthermore, dopamine D₂ receptors are also involved in the release of tPA induced by morphine and methamphetamine (43).

Nicotine-induced tPA release is also confirmed in vitro by using cultured hippocampal neurons. The addition of nicotine to the culture medium results in a concentration-dependent increase in tPA activity (27). Nicotine-induced tPA release is completely blocked by pretreatment with a selective $\alpha 7$ subunit-containing nAChR ($\alpha 7$ nAChR) antagonist, methyllycaconitine, and partially blocked by a $\alpha 4\beta 2$ subunit-containing nAChR ($\alpha 4\beta 2$ nAChR) antagonist, dihydro- β -erythroidine. These findings suggest that nicotine directly promotes the release of tPA from neurons via the activation of both $\alpha 7$ and $\alpha 4\beta 2$ nAChRs. Accordingly, the following scenario is proposed for nicotine-induced tPA release in the NAc (Fig. 1): nicotine activates dopamine release through the activation of high-affinity nAChRs on presynaptic dopaminergic neurons, and the resultant activation of postsynaptic dopamine D₁ and D₂ receptors would cause tPA release from dense-core granules in postsynaptic dendritic spines, as demonstrated recently with fluorescent tPA chimeras (41).

RAR₁ as a target molecule of the tPA-plasmin system

A previous study has demonstrated high levels of PAR₁ mRNA in dopaminergic neurons in the substantia nigra/VTA (44). PAR₁ immunoreactivity in the NAc and VTA appears to be partially co-localized with tyrosine hydroxylase (TH), a marker for dopaminergic neurons (27). A PAR₁ agonist peptide, TRAP7, increases [³⁵S]GTP γ S binding in the striatal membranes containing the NAc, and the effect is completely inhibited by a PAR₁ antagonist peptide, tyrTRAP7 (27). Plasmin also increases [³⁵S]GTP γ S binding, which is antagonized by tyrTRAP7 (27). These findings indicate the functional expression of PAR₁ in presynaptic dopaminergic neurons, which is activated by plasmin.

Regulation of dopamine release by tPA-plasmin system via PAR₁

Microinjection of tyrTRAP7 into the NAc significantly reduces nicotine-induced dopamine release, although the antagonist has no effect on basal dopamine levels (27). Co-microinjection of tyrTRAP7 with plasmin into the NAc of tPA^{-/-} mice significantly

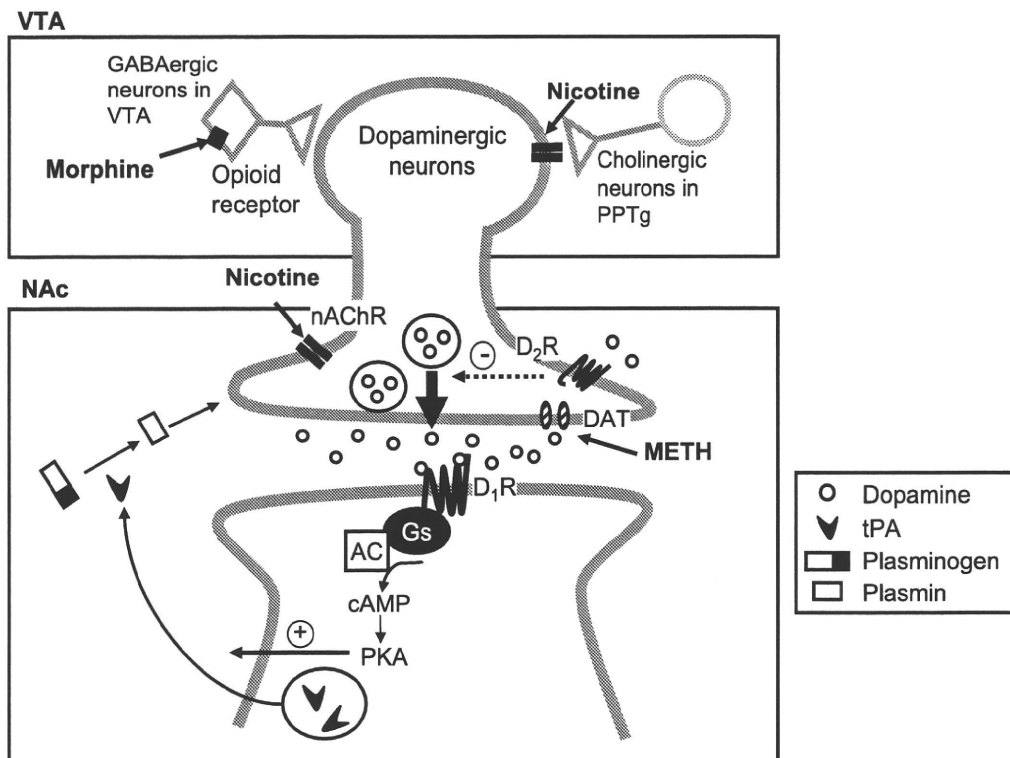


Fig. 1. Possible mechanisms by which abused drugs increase extracellular tPA activity in the NAc in vivo. Abused drugs, including morphine, methamphetamine (METH), and nicotine, increase the amount of dopamine released in the NAc through interaction with their respective target molecules and activate post-synaptic dopamine receptors, especially D₁ receptors (D₁R). The D₁R coupled to Gs protein activate cAMP/PKA signaling upon activation of adenylate cyclase (AC). Activation of the D₁R-cAMP-PKA pathway leads to an increase in extracellular tPA activity in the NAc. PPTg, pedunculo-pontine tegmental nucleus. Modified from Ref. 43 with permission from Wiley-Blackwell Publishing.

attenuates the rescue effect of plasmin on the defect of nicotine-induced dopamine release in tPA^{-/-} mice. In addition to this pharmacological evidence, nicotine-induced dopamine release in the NAc is markedly diminished in PAR₁^{-/-} mice compared with that in wild-type mice (27). It is likely that PAR₁ expressed on the dopaminergic nerve terminals in the NAc is an essential component for the modulation of nicotine-induced dopamine release by the tPA-plasmin system. Interestingly, microinjection of the PAR₁ antagonist, tyrTRAP7, into the NAc significantly reduces morphine-induced dopamine release in the NAc (45). The PAR₁ antagonist also blocks the ameliorating effect of plasmin on the defect of morphine-induced dopamine release in the NAc of tPA^{-/-} mice (45).

Nicotine reward and tPA-plasmin-PAR₁ system

Various behavioral tests have been used to study the neuronal substrates of addiction-related brain abnormalities such as reward, craving, and relapse. These include self-stimulation, self-administration, and conditioned place-preference tests (46). In the condi-

tioned place preference test, the rewarding properties of drugs of abuse are associated with the particular characteristics of a given environment (place); after conditioning, the animal prefers to spend more time in the drug-associated environment.

The tPA^{-/-} and plg^{-/-} mice show defects of morphine- and methamphetamine-induced conditioned place preference (11, 13). The rewarding effects of nicotine are also markedly diminished in tPA^{-/-} mice (27). There are no differences in dopamine-induced increases in [³⁵S]GTPγS binding, apomorphine-induced hyperlocomotion, and TH protein levels between wild-type and tPA^{-/-} mice (11). Accordingly, it is unlikely that the decrease in the rewarding effect of nicotine in tPA^{-/-} mice is due to dysfunctional dopamine receptors. Rather, as described in the previous section, the defect of nicotine-induced dopamine release in the NAc may be responsible for the marked reduction of nicotine reward in tPA^{-/-} mice. Moreover, nicotine fails to induce place preference in PAR₁^{-/-} mice. Taken together, it is suggested that the tPA-plasmin-PAR₁ system plays a crucial role in the rewarding effects of nicotine.

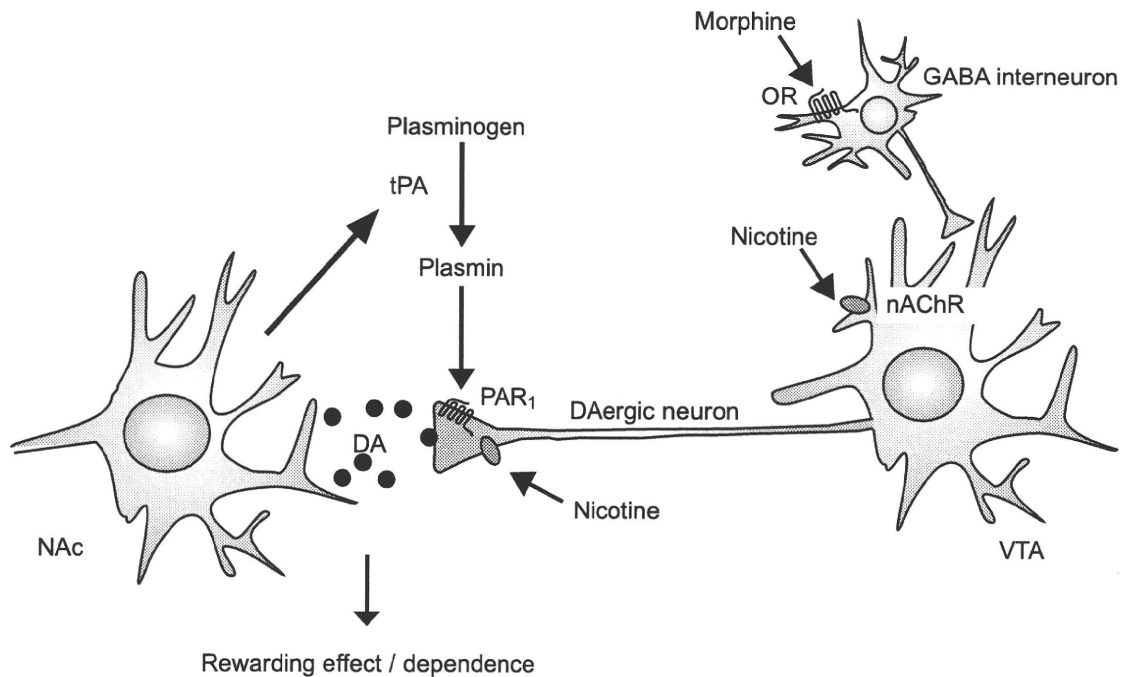


Fig. 2. Regulation of nicotine reward by tPA-plasmin system via proteinase-activated receptor₁. Nicotine increases tPA expression, and its secretion in neuronal cells of the nucleus accumbens (NAc), by activating nicotinic acetylcholine receptor (nAChR). The tPA-plasmin system regulates nicotine-induced dopamine (DA) release through activation by plasmin of proteinase-activated receptor₁ (PAR₁) expressed on DAergic neurons and is thereby involved in the rewarding effect. PAR₁ is also involved in the enhancement of morphine-induced DA release. OR, opioid receptor; VTA, ventral tegmental area. Modified from Ref. 47 with permission.

Conclusion

It is demonstrated that the tPA-plasmin system regulates nicotine-induced dopamine release and conditioned place preference through activation by plasmin of PAR₁ expressed on dopaminergic neurons. PAR₁ also participates in the enhancement of morphine-induced dopamine release and hyperlocomotion (45). These findings suggest that PAR₁ is a molecular target for the tPA-plasmin system to regulate nicotine- and morphine-induced dopamine release in the NAc (Fig. 2) (47).

The pharmacotherapy most widely used for managing tobacco dependence and withdrawal is nicotine replacement therapy (NRT) (48). NRT makes it easier to abstain from tobacco by replacing, at least partially, the nicotine formerly obtained from tobacco and thereby proving some nicotine effects. Clinical studies suggested that NRT suppressed some withdrawal symptoms, but left smokers vulnerable to craving and relapse when they confronted smoking cues (49). Recently, varenicline, a selective $\alpha 4\beta 2$ nAChR partial agonist, was approved for use as a smoking cessation aid (50). The partial agonist activity of varenicline at the $\alpha 4\beta 2$ nAChR promotes a low level of dopamine release, which reduces withdrawal symptoms. Through its higher affinity, low

efficacy, and relatively long half-life compared to nicotine, varenicline is able to block the $\alpha 4\beta 2$ nAChR activation induced by nicotine during a smoking cessation relapse. In addition to $\alpha 4\beta 2$ nAChR, we propose that targeting the tPA-plasmin–PAR₁ system would provide new approaches to the treatment of nicotine dependence.

Acknowledgments

This work was supported, in part, as Research on Risk of Chemical Substances, Health, and Labour Sciences Research Grants from the Ministry of Health, Labor, and Welfare, Japan; Academic Frontier Project for Private Universities (2007–2011) from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology of Japan; Grants-in-Aid for Scientific Research (19390062, 19790053) from the Japan Society for the Promotion of Science; and a grant from the Smoking Research Foundation, Japan.

References

- 1 Collen D. Ham-Wasserman lecture: role of the plasminogen system in fibrin-homeostasis and tissue remodeling. *Hematology*

- Am Soc Hematol Educ Program. 2001;1-9.
- 2 Zhuo M, Holtzman DM, Li Y, Osaka H, DeMaro J, Jacquin M, et al. Role of tissue plasminogen activator receptor LRP in hippocampal long-term potentiation. *J Neurosci*. 2000;20:542-549.
 - 3 Nicole O, Docagne F, Ali C, Margail I, Carmeliet P, MacKenzie ET, et al. The proteolytic activity of tissue-plasminogen activator enhances NMDA receptor-mediated signaling. *Nat Med*. 2001;7:59-64.
 - 4 Krystosek A, Seeds NW. Plasminogen activator release at the neuronal growth cone. *Science*. 1981;213:1532-1534.
 - 5 Moonen G, Grau-Wagemans MP, Selak I. Plasminogen activator-plasmin system and neuronal migration. *Nature*. 1982;298:753-755.
 - 6 Seeds NW, Basham ME, Haffke SP. Neuronal migration is retarded in mice lacking the tissue plasminogen activator gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:14118-14123.
 - 7 Melchor JP, Pawlak R, Strickland S. The tissue plasminogen activator-plasminogen proteolytic cascade accelerates amyloid-beta ($A\beta$) degradation and inhibits $A\beta$ -induced neurodegeneration. *J Neurosci*. 2003;23:8867-8871.
 - 8 Tucker HM, Kihiko M, Caldwell JN, Wright S, Kawarabayashi T, Price D, et al. The plasmin system is induced by and degrades amyloid-beta aggregates. *J Neurosci*. 2000;20:3937-3946.
 - 9 Ito M, Nagai T, Kamei H, Nakamichi N, Nabeshima T, Takuma K, et al. Involvement of tissue plasminogen activator-plasmin system in depolarization-evoked dopamine release in the nucleus accumbens of mice. *Mol Pharmacol*. 2006;70:1720-1725.
 - 10 Schaefer U, Machida T, Vorlova S, Strickland S, Levi R. The plasminogen activator system modulates sympathetic nerve function. *J Exp Med*. 2006;203:2191-2200.
 - 11 Nagai T, Yamada K, Yoshimura M, Ishikawa K, Miyamoto Y, Hashimoto K, et al. The tissue plasminogen activator-plasmin system participates in the rewarding effect of morphine by regulating dopamine release. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:3650-3655.
 - 12 Nagai T, Kamei H, Ito M, Hashimoto K, Takuma K, Nabeshima T, et al. Modification by the tissue plasminogen activator-plasmin system of morphine-induced dopamine release and hyperlocomotion, but not anti-nociceptive effect in mice. *J Neurochem*. 2005;93:1272-1279.
 - 13 Nagai T, Noda Y, Ishikawa K, Miyamoto Y, Yoshimura M, Ito M, et al. The role of tissue plasminogen activator in methamphetamine-related reward and sensitization. *J Neurochem*. 2005;92:660-667.
 - 14 Yamada K, Nagai T, Nabeshima T. Drug dependence, synaptic plasticity, and tissue plasminogen activator. *J Pharmacol Sci*. 2005;97:157-161.
 - 15 Yan Y, Yamada K, Mizoguchi H, Noda Y, Nagai T, Nitta A, et al. Reinforcing effects of morphine are reduced in tissue plasminogen activator-knockout mice. *Neuroscience*. 2007;146:50-59.
 - 16 Fukakusa A, Nagai T, Mizoguchi H, Otsuka N, Kimura H, Kamei H, et al. Role of tissue plasminogen activator in the sensitization of methamphetamine-induced dopamine release in the nucleus accumbens. *J Neurochem*. 2008;105:436-444.
 - 17 Nakagami Y, Abe K, Nishiyama N, Matsuki N. Laminin degradation by plasmin regulates long-term potentiation. *J Neurosci*. 2000;20:2003-2010.
 - 18 Lee R, Kermani P, Teng KK, Hempstead BL. Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science*. 2001;294:1945-1948.
 - 19 Kuliopulos A, Covic L, Seeley SK, Sheridan PJ, Helin J, Costello CE. Plasmin desensitization of the PAR1 thrombin receptor: kinetics, sites of truncation, and implications for thrombolytic therapy. *Biochemistry*. 1999;38:4572-4585.
 - 20 Vu TK, Hung DT, Wheaton VI, Coughlin SR. Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell*. 1991;64:1057-1068.
 - 21 Riewald M, Kravchenko VV, Petrovan RJ, O'Brien PJ, Brass LF, Ulevitch RJ, et al. Gene induction by coagulation factor Xa is mediated by activation of protease-activated receptor 1. *Blood*. 2001;97:3109-3116.
 - 22 Riewald M, Petrovan RJ, Donner A, Mueller BM, Ruf W. Activation of endothelial cell protease activated receptor 1 by the protein C pathway. *Science*. 2002;296:1880-1882.
 - 23 Grand RJ, Turnell AS, Grabham PW. Cellular consequences of thrombin-receptor activation. *Biochem J*. 1996;313:353-368.
 - 24 Dery O, Corvera CU, Steinhoff M, Bunnett NW. Proteinase-activated receptors: novel mechanisms of signaling by serine proteases. *Am J Physiol*. 1998;274:C1429-C1452.
 - 25 Coughlin SR. Thrombin signalling and protease-activated receptors. *Nature*. 2000;407:258-264.
 - 26 Loew D, Perrault C, Morales M, Moog S, Ravanat C, Schuhler S, et al. Proteolysis of the exodomain of recombinant protease-activated receptors: prediction of receptor activation or inactivation by MALDI mass spectrometry. *Biochemistry*. 2000;39:10812-10822.
 - 27 Nagai T, Ito M, Nakamichi N, Mizoguchi H, Kamei H, Fukakusa A, et al. The rewards of nicotine: regulation by tissue plasminogen activator-plasmin system through protease activated receptor-1. *J Neurosci*. 2006;26:12374-12383.
 - 28 CDC. Cigarette smoking among adults in the United States, 2002. *Morbidity and Mortality World Report*. 2002;51:300-303.
 - 29 Hughes JR, Gulliver SB, Fenwick JW, Valliere WA, Cruser K, Pepper S, et al. Smoking cessation among self-quitters. *Health Psychol*. 1992;11:331-334.
 - 30 Corringer PJ, Le Novere N, Changeux JP. Nicotinic receptors at the amino acid level. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2000;40:431-458.
 - 31 McGehee DS, Role LW. Physiological diversity of nicotinic acetylcholine receptors expressed by vertebrate neurons. *Annu Rev Physiol*. 1995;57:521-546.
 - 32 Picciotto MR, Zoli M, Rimondini R, Léna C, Marubio LM, Pich EM, et al. Acetylcholine receptors containing the $\beta 2$ subunit are involved in the reinforcing properties of nicotine. *Nature*. 1998;391:173-177.
 - 33 Maskos U, Molles BE, Pons S, Besson M, Guiard BP, Guilloux JP, et al. Nicotine reinforcement and cognition restored by targeted expression of nicotinic receptors. *Nature*. 2005;436:103-107.
 - 34 Tapper AR, McKinney SL, Nashmi R, Schwarz J, Deshpande P, Labarca C, et al. Nicotine activation of $\alpha 4^*$ receptors: sufficient for reward, tolerance, and sensitization. *Science*. 2004;306:1029-1032.
 - 35 Dani JA, De Biasi M. Cellular mechanisms of nicotine addiction. *Pharmacol Biochem Behav*. 2001;70:439-446.
 - 36 Zoli M, Moretti M, Zanardi A, McIntosh JM, Clementi F, Gotti C. Identification of the nicotinic receptor subtypes expressed on dopaminergic terminals in the rat striatum. *J Neurosci*. 2002;22:

- 8785–8789.
- 37 Picciotto MR. Nicotine as a modulator of behavior: beyond the inverted U. *Trends Pharmacol Sci.* 2003;24:493–439.
- 38 Benowitz NL. Neurobiology of nicotine addiction: implications for smoking cessation treatment. *Am J Med.* 2008;121(4 Suppl 1):S3–S10.
- 39 Corrigan WA, Franklin KB, Coen KM, Clarke PB. The mesolimbic dopaminergic system is implicated in the reinforcing effects of nicotine. *Psychopharmacology.* 1992;107:285–289.
- 40 Gualandris A, Jones TE, Strickland S, Tsirka SE. Membrane depolarization induces calcium-dependent secretion of tissue plasminogen activator. *J Neurosci.* 1996;16:2220–2225.
- 41 Lochner JE, Honigman LS, Grant WF, Gessford SK, Hansen AB, Silverman MA, et al. Activity-dependent release of tissue plasminogen activator from the dendritic spines of hippocampal neurons revealed by live-cell imaging. *J Neurobiol.* 2006;66:564–577.
- 42 Zhang Y, Kanaho Y, Frohman MA, Tsirka SE. Phospholipase D1-promoted release of tissue plasminogen activator facilitates neurite outgrowth. *J Neurosci.* 2005;25:1797–1805.
- 43 Ito M, Nagai T, Mizoguchi H, Sato K, Hayase M, Otsuka N, et al. Activation of postsynaptic dopamine D1 receptors promotes the release of tissue plasminogen activator in the nucleus accumbens via PKA signaling. *J Neurochem.* 2007;103:2589–2596.
- 44 Weinstein JR, Gold SJ, Cunningham DD, Gall CM. Cellular localization of thrombin receptor mRNA in rat brain: expression by mesencephalic dopaminergic neurons and codistribution with prothrombin mRNA. *J Neurosci.* 1995;15:2906–2919.
- 45 Ito M, Nagai T, Mizoguchi H, Fukakusa A, Nakanishi Y, Kamei H, et al. Possible involvement of protease-activated receptor-1 in the regulation of morphine-induced dopamine release and hyperlocomotion by the tissue plasminogen activator-plasmin system. *J Neurochem.* 2007;101:1392–1399.
- 46 Balster RL. Drug abuse potential evaluation in animals. *Br J Addict.* 1991;86:1549–1558.
- 47 Nagai T. [Study on the mechanism of neuropsychological abnormalities induced by drugs of abuse]. *Folia Pharmacol Jpn (Nippon Yakurigaku Zasshi).* 2007;129:354–359. (in Japanese)
- 48 Henningfield JE, Fant RV, Buchhalter AR, Stitzer ML. Pharmacotherapy for nicotine dependence. *CA Cancer J Clin.* 2005;55:281–299.
- 49 Shiffman S, Ferguson SG, Gwaltney CJ, Balabanis MH, Shadel WG. Reduction of abstinence-induced withdrawal and craving using high-dose nicotine replacement therapy. *Psychopharmacology.* 2006;184:637–644.
- 50 Hays JT, Ebbert JO, Sood A. Efficacy and safety of varenicline for smoking cessation. *Am J Med.* 2008;121:S32–S42.

A novel molecule 'shati' increases dopamine uptake via the induction of tumor necrosis factor- α in pheochromocytoma-12 cells

Minae Niwa,*†‡ Atsumi Nitta,† Xiaobo Cen,† Kiyoyuki Kitaichi,§ Norio Ozaki,* Kiyofumi Yamada† and Toshitaka Nabeshima†‡

*Department of Psychiatry, Nagoya University Graduate School of Medicine, Nagoya, Japan

†Department of Neuropsychopharmacology and Hospital Pharmacy, Nagoya University Graduate School of Medicine, Nagoya, Japan

‡Department of Chemical Pharmacology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Meijo University, Nagoya, Japan

§Department of Pharmacology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Nagasaki International University, Nagasaki, Japan

Abstract

The psychostimulant properties of methamphetamine (METH) are associated with an increase in extracellular dopamine (DA) levels in the brain, via facilitation of DA's release from pre-synaptic nerve terminals and inhibition of its reuptake through DA transporter. Recently, we have demonstrated that tumor necrosis factor- α (TNF- α) increases DA uptake and inhibits METH dependence. Moreover, we have clarified 'shati' identified in the nucleus accumbens of mice treated with METH is involved in METH dependence. In the present study, we investigated the effects of TNF- α on DA uptake in PC12 cells and established a PC12 cell line transfected with a vector containing shati cDNA to examine the precise mechanism behind the role of shati in DA uptake. Moreover, we examined

the relationship between shati and TNF- α . TNF- α increased DA uptake via the mitogen-activated protein kinase kinase pathway and inhibited the METH-induced decrease in DA uptake in PC12 cells. Transfection of the vector containing shati cDNA into PC12 cells, induced the expression of shati and TNF- α mRNA, accelerated DA uptake, and inhibited the METH-induced decrease in DA uptake. These results suggest that the functional roles of shati in METH-regulated behavioral changes are mediated through inhibition of the METH-induced decrease in DA uptake via TNF- α .

Keywords: addiction, dopamine (DA) uptake, methamphetamine, shati, tumor necrosis factor- α (TNF- α).

J. Neurochem. (2008) **107**, 1697–1708.

The abuse of methamphetamine (METH) has significant psychiatric and medical consequences, including dependence, psychosis, overdose, and even death (Rawson *et al.* 2002). Drugs of abuse, including METH, modulate the activity of mesolimbic dopaminergic neurons, projecting from the ventral tegmental area to the nucleus accumbens

D2-R, dopamine D2 receptor; DA, dopamine; DAT, dopamine transporter; DV, dorsoventral; ERK1/2, extracellular signal-regulated kinase 1/2; FBS, fetal bovine serum; GABA, γ -aminobutyric acid; GBR 12909, [1-(2[bis(4-fluorophenyl)-methoxy]ethyl)-4-(3-phenylpropyl)piperazine] bimesylate hydrate; GFP, green fluorescent protein; GNAT, GCN5-related N-acetyltransferase; JNK, c-Jun N-terminal kinase; MAO, monoamine oxidase; MAP, mitogen-activated protein; MEK, mitogen-activated protein kinase kinase; METH, methamphetamine; ML, mediotlateral; NAc, nucleus accumbens; NF- κ B, nuclear factor- κ B; p38, p38 mitogen-activated protein kinase; PC12, pheochromocytoma-12; PCR, polymerase chain reaction; PD98059, 2-(2-amino-3-methoxyphenyl)-4H-1-benzopyran-4-one; RIP, serine and threonine protein kinase receptor-interacting protein; RT-PCR, reverse transcription-polymerase chain reaction; shati-AS, shati antisense oligonucleotide; shati-SC, shati-scrambled oligonucleotide; SLC6, solute carrier 6; TH, tyrosine hydroxylase; TNFR I, tumor necrosis factor type I receptor; TNF- α , tumor necrosis factor- α ; TRAF2, TNF receptor-associated factor 2; VMAT-2, vesicular monoamine transporter; VTA, ventral tegmental area.

Received August 17, 2008; revised manuscript received October 6, 2008; accepted October 8, 2008.

Address correspondence and reprint requests to Toshitaka Nabeshima, PhD, Department of Chemical Pharmacology, Meijo University Graduate School of Pharmaceutical Sciences, 150 Yagotoyama, Tenpaku-ku, Nagoya 468-8503, Japan. E-mail: tnabeshi@ccmfs.meijo-u.ac.jp

Abbreviations used: AMPH, amphetamine; ANOVA, analysis of variance; AP, anteroposterior; cDNA, complementary DNA; CNS, central nervous system; CSF, cerebrospinal fluid; D1-R, dopamine D1 receptor;