

# Nicotine 誘発振戦の発現メカニズム解析

2017

國澤 直史



## 目次

緒言	1
第1章 Nicotine 誘発振戦の発現メカニズム解析	3
1 緒言	
2 実験方法	
2-1 使用動物	
2-2 Nicotine による振戦行動の評価	
2-3 Nicotine 誘発振戦に対する nicotine 連日投与の影響評価	
2-4 Nicotine 誘発振戦の発現に関連する nACh 受容体の同定	
2-5 Fos タンパク質を指標とした脳内興奮部位の探索	
2-6 脳部位電気破壊実験	
2-7 使用薬物	
2-8 統計学的処理	
3 結果	
3-1 Nicotine により誘発される振戦行動の評価	
3-2 Nicotine 反復投与による振戦発現の変化	
3-3 Nicotine 誘発振戦に対する nACh 受容体拮抗薬の影響	
3-4 Fos 発現を指標とした nicotine 誘発振戦関連部位の探索	
3-4-1 大脳皮質領域における Fos 発現解析	
3-4-2 大脳辺縁系領域における Fos 発現解析	
3-4-3 大脳基底核および脳幹部領域における Fos 発現解析	
3-5 Nicotine による Fos 発現上昇に対する nACh 受容体拮抗薬の影響	
3-6 Nicotine 誘発振戦に対する PirC および IO 電気破壊の影響	

4 考察

5 結語

第 2 章 5-HT 神経系による nicotine 誘発振戦調節機構の解析 . . . . . 13

1 緒言

2 実験方法

2-1 使用動物

2-2 Nicotine による振戦行動の評価

2-3 Nicotine 誘発振戦に対する 5-HT 受容体作動薬の影響評価

2-4 *P*-chlorophenylalanine (PCPA) による 5-HT 神経不活化実験

2-5 Nicotine 誘発振戦に対する 5-HT 受容体拮抗薬の影響評価

2-6 使用薬物

2-7 統計学的処理

3 結果

3-1 Nicotine 誘発振戦に対する 5-HT 受容体作動薬の影響

3-2 8-OH-DPAT の nicotine 誘発振戦増強作用に対する  
5-HT 神経不活化の影響

3-3 Nicotine 誘発振戦に対する 5-HT 受容体拮抗薬単独投与の影響

4 考察

5 結語

総括 . . . . . 21

論文目録 . . . . . 23

謝辞・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 24

引用文献・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 25

図および表・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 34

## 緒言

振戦は、手足や首などの体の一部あるいは全身性に見られる不随意の律動的な振るえを呈する錐体外路系運動障害である。振戦の代表的なものには、本態性振戦とパーキンソン病振戦がある。本態性振戦は、振るえのみを主症状とする疾患であり、動作時に現れる動作時振戦や、上肢を持ち上げるなどの姿勢を保持しているときに出現する姿勢時振戦がある<sup>1-6)</sup>。一方、パーキンソン病振戦はパーキンソン病や薬剤性パーキンソン症候群の症状として現れる振戦であり、主に安静時に振るえが出現する<sup>3, 5, 6)</sup>。本態性振戦とパーキンソン病振戦の発現には、それぞれ下オリーブ核-小脳系および大脳基底核系領域の神経活動の異常が関与していることが報告されているが<sup>7-9)</sup>、詳細な発症メカニズムは不明である。その他、ストレス、不安、疲労、喫煙、ある種の薬物（抗精神病薬、キサンチン製剤、ホルモン剤など）、アルコールの離脱症状（禁断症状）によっても振戦が誘発される<sup>10-18)</sup>。

Nicotine はタバコに含まれる代表的な活性成分であり、精神賦活作用、抗パーキンソン病作用、認知機能促進作用、依存形成作用など様々な薬理作用を示す<sup>19-22)</sup>。一方、過度の喫煙やタバコの誤飲、nicotine 製剤の誤用により振戦などの運動興奮症状が誘発されることが知られており<sup>11, 13-17, 23-25)</sup>、また、nicotine は本態性振戦を悪化させることが報告されている<sup>26)</sup>。

上記で述べた nicotine の多彩な作用は、nicotine 性アセチルコリン (nACh) 受容体の活性化を介すると考えられている。一般に、神経系に分布する nACh 受容体は、9つの $\alpha$ サブユニット ( $\alpha 2 \sim \alpha 10$ ) と3つの $\beta$ サブユニット ( $\beta 2 \sim \beta 4$ ) から構成されるホモまたはヘテロ 5 量体の陽イオンチャネル内蔵型受容体であることが知られている<sup>27-29)</sup>。nACh 受容体は nicotine などのリガンドの結合に伴い、

Na<sup>+</sup>イオンなどの陽イオンを細胞内へ流入させ、神経興奮をもたらす。脳内では特に、 $\alpha 7$ サブユニットのホモ 5 量体である  $\alpha 7$  nACh 受容体と、 $\alpha 4$  および  $\beta 2$  サブユニットのヘテロ 5 量体からなる  $\alpha 4\beta 2$  nACh 受容体が豊富に存在し、中枢神経系において重要な役割を果たしている<sup>27-31)</sup>。Nicotine による振戦発現にも、これら中枢の nACh 受容体が関与すると考えられるが、その詳細な発現メカニズムは未だ不明である。

そこで本研究では、nicotine による振戦発現のメカニズムを明らかにする目的で、各種 nACh 受容体拮抗薬を用いた行動薬理学的評価ならびに神経興奮マーカーである Fos タンパク質の発現を指標とした免疫組織学的評価を行った。さらに、nACh 受容体は前シナプス性の機能として、セロトニン (5-HT) をはじめとする様々な神経伝達物質の遊離調節を行っていることが知られていることから<sup>32-38)</sup>、5-HT 神経系による nicotine 誘発振戦の発現調節メカニズムを明らかとする目的で、nicotine 誘発振戦に対する各種 5-HT 受容体関連薬の影響を評価した。

第 1 章では「Nicotine 誘発振戦の発現メカニズム解析」、第 2 章では「5-HT 神経系による nicotine 誘発振戦調節機構の解析」について記述する。

## 第1章 Nicotine 誘発振戦の発現メカニズム解析

### 1 緒言

Nicotine は、nACh 受容体を介し、抗パーキンソン病作用や認知機能改善作用など様々な薬理作用を示す一方で<sup>19-22)</sup>、運動興奮症状として振戦を誘発する<sup>11, 13-17)</sup>。また、喫煙習慣のあるヒトでは nicotine による振戦がより強く誘発されることや<sup>39)</sup>、nicotine の投与によりヒトの本態性振戦が増悪することが報告されている<sup>26)</sup>。しかし、nicotine がどの脳部位に作用し、どのような作用様式で運動興奮症状を誘発するのか、その詳細なメカニズムは、未だ不明である。

そこで本研究では、nicotine 誘発振戦の発現メカニズムを明らかにする目的で、各種 nACh 受容体拮抗薬を用いた行動薬理的評価を行った。また、nACh 受容体を介する振戦発現の原因部位を探索する目的で、神経興奮マーカーである Fos タンパク質の発現を指標とした免疫組織学的評価ならびに脳局所電気破壊実験を行った。なお、Fos タンパク質は、最初期遺伝子 *c-fos* の遺伝子産物であり、神経興奮に応答して速やかに発現が誘導される。そのため、Fos タンパク質の発現解析は、てんかんや振戦などの病態に関連する脳部位の特定や、痛みやストレス刺激、薬物などによって神経興奮がもたらされる脳部位の特定などに広く用いられている<sup>40-45)</sup>。

### 2 実験方法

#### 2-1 使用動物

実験動物には、6~8 週齢の ddY 系雄性マウス（日本 SLC）および SD 系雄性ラット（日本 SLC）を使用した。動物は、一定の照明サイクル（明期：8:00 時



より 12 時間)、恒温 (24±1℃)、湿度 (55±5 %) の飼育室において、標準固形飼料 (オリエンタル酵母社製) および水道水を自由に摂取させて飼育した。約 1 週間の予備飼育後、実験に使用した。

## 2-2 Nicotine による振戦行動の評価

動物に nicotine (マウス : 0.5~2 mg/kg、ラット : 1, 2 mg/kg) を腹腔内投与後、観察ケージ (25×42×20 cm) 内で振戦行動を 15 分間評価した。振戦評価には、4 段階振戦スコア (0 : 変化なし、1 : 頭部、尾部に限って見られる軽度な振戦、挙尾、2 : 上幹に見られる中程度の振戦、挙尾、3 : 全身性の顕著な振戦) を用いた。

## 2-3 Nicotine 誘発振戦に対する nicotine 連日投与の影響評価

ラットに nicotine (1 mg/kg/day, i.p.) を 14 日間連日投与し、日々の nicotine による振戦行動を評価した。振戦行動評価は、2-2 項と同様の方法で行った。

## 2-4 Nicotine 誘発振戦の発現に関連する nACh 受容体の同定

Nicotine 誘発振戦の発現に関連する nACh 受容体を同定する目的で、nicotine 誘発振戦に対する各種 nACh 受容体拮抗薬の影響を評価した。nACh 受容体拮抗薬には、サブユニット非選択的 nACh 受容体拮抗薬 mecamylamine (MEC ; 1 mg/kg, i.p.)、 $\alpha 4\beta 2$  nACh 受容体拮抗薬 dihydro- $\beta$ -erythroidine (DH $\beta$ E ; 5 mg/kg, i.p.)、 $\alpha 7$  nACh 受容体拮抗薬 methyllycaconitine (MLA ; 10 mg/kg, i.p.)、末梢性  $\alpha 3\beta 4$  nACh 受容体拮抗薬 hexamethonium (1 mg/kg, i.p.) を用いた。また、nicotine 誘発振戦に対するムスカリン性アセチルコリン受容体拮抗薬 scopolamine (2 mg/kg, i.p.) の影響についても併せて評価した。各薬物を nicotine (1 mg/kg, i.p.) 投与 15 分

前に処置し、nicotine 誘発振戦に及ぼす影響を評価した。振戦行動は、2-2 項と同様の方法で評価した。

## 2-5 Fos タンパク質を指標とした脳内興奮部位の探索

2-2 項および 2-3 項における nicotine (1 mg/kg, i.p.) 投与から 2 時間後に、動物をペントバルビタール (80 mg/kg, i.p.) にて深麻酔し、次いで開胸後、心室より 4%ホルムアルデヒド液を灌流して脳を固定した。その後、脳を摘出し、4%パラホルムアルデヒド溶液内で 4°Cにて 24 時間以上保存した。摘出した脳より厚さ 30  $\mu\text{m}$  の冠状切片をマイクロスライサー (DK-3000, Dosaka EM Co., Ltd., Kyoto) により作成した。次いで、脳切片を 0.3% Triton X-100 含有リン酸緩衝液にて洗浄し、2%正常ウサギ血清と室温にて 2 時間ローテートすることにより、ブロッキング操作を行った。ブロッキング後、切片を 2%正常ウサギ血清に溶解させた一次抗体 goat anti c-Fos IgG (1:4000, Santa Cruz Biotechnology) と 4°Cにて 36 時間反応させた。一次抗体との反応後、切片をリン酸緩衝液で洗浄し、ビオチン標識二次抗体 rabbit anti-goat IgG (1:1000, Vector Laboratories) と室温にて 2 時間反応させ、その後 0.3%過酸化水素水中で 30 分間インキュベートし、内因性ペルオキシダーゼを不活性化させた。リン酸緩衝液で洗浄後、アビジン-ビオチン標識酵素複合体 (Avidin-Biotinylated enzyme Complex, Vectastain ABC Kit, Vector Laboratories) と室温にて 2 時間反応させ、ジアミノベンジジン法により染色を行った。

Fos 発現の解析では、1) 大脳皮質領域：mPFC (内側前頭前皮質)、CgC (帯状回皮質)、MC (大脳皮質運動野)、SC (大脳皮質体性感覚野)、AIC (無顆粒島皮質)、Pir (梨状葉皮質)、Apir (扁桃核梨状葉移行部)、AuC (聴覚皮質)、DLEnt (背外側嗅内皮質)、2) 大脳辺縁系領域：AcC (側坐核コア領域)、AcS

(側坐核シェル領域)、BLP (扁桃核外側基底核)、BMP (扁桃核内側基底核)、PMCo (扁桃体内側皮質核)、MePV (扁桃核内側核後方腹側部)、MePD (扁桃核内側核後方背側部)、CA (海馬アンモン角)、DG (海馬歯状回門部)、MHb (内側手綱核)、LHb (外側手綱核)、3) 大脳基底核および脳幹部領域：LS (外側中隔核)、dlST (背外側線条体)、dmST (背内側線条体)、GP (淡蒼球)、PT (視床紐傍核)、PV (視床室傍核)、AM (視床前内側核)、VM (腹内側視床核)、AH (視床下部前核)、RPC (赤核)、SNr (黒質網様部)、SNc (黒質緻密部)、Sol (孤束核)、IO (下オリーブ核) の全 44 部位について、 $250 \times 250 \mu\text{m}^2$  の grid 内に含まれる Fos 免疫陽性細胞数を計測した。

## 2-6 脳局所電気破壊実験

脳固定装置 (Narishige, SR-6, Tokyo) を用いて、ペントバルビタール (40 mg/kg, i.p.) により麻酔したラットの脳を固定した。次いで、頭皮を切開し、マイクロドリルを用いて頭蓋骨に小穴を開け、PirC (bregma より後方 2.5 mm、横  $\pm 5.4$  mm、脳表面より深さ 6.5 mm の位置) あるいは IO (bregma より後方 14.2 mm、横  $\pm 0.8$  mm、脳表面より深さ 9 mm の位置) にステンレス製の双極同心電極を刺入し、1 mA の直流電流を 15 秒間流すことで、両側の PirC、IO を電気破壊した。各部位の電気破壊から 2~4 日の回復期間の後、nicotine (1 mg/kg, i.p.) を投与し、2-2 項と同様の方法で振戦行動を評価した。

## 2-7 使用薬物

Nicotine、MEC hydrochloride、MLA citrate、hexamethonium chloride、scopolamine methyl bromide は Sigma-Aldrich 社より、DH $\beta$ E hydrobromide は Tocris 社より購入した。MEC は、予め 1% lactate により溶解した後、0.9% 生理食塩水で希釈して

使用した。他の薬物は全て、0.9%生理食塩水で溶解し、使用した。

## 2-8 統計学的処理

実験結果は、平均値±標準誤差で示した。振戦スコアの比較は、2群間における検定では Mann-Whitney's U 検定（ノンパラメトリック）を、3群間以上の有意差検定では、まず Kruskal-Wallis の順位検定を行い、有意差が認められた場合には Steel-Dwass 多重比較検定（ノンパラメトリック）を行った。Fos 発現の比較では、2群間における検定では Student's t-test（パラメトリック）を、3群間以上の有意差検定では、一元配置分散分析を行い、有意差が認められた場合には Tukey 多重比較検定（パラメトリック）を行った。以上の検定において、 $P < 0.05$  のとき、有意差ありと判定した。

## 3. 結果

### 3-1 Nicotine により誘発される振戦行動の評価

動物に nicotine (0.5~2 mg/kg, i.p.) を投与し、誘発される振戦行動を評価した。その結果、マウスおよびラットともに、用量依存的に振戦行動が誘発された（マウス： $\chi^2 = 18.3525$ ,  $df = 3$ ,  $P = 0.0004$ 、ラット： $\chi^2 = 15.2923$ ,  $df = 2$ ,  $P = 0.0005$ ) (Fig. 1)。また、nicotine による振戦行動は動作時において顕著であり、すべての動物で投与 15 分以内に消失した。

### 3-2 Nicotine 反復投与による振戦発現の変化

慢性的な喫煙者では、非喫煙者と比較して nicotine による振戦がより顕著に誘発されることが報告されている<sup>39)</sup>。そこで、ラットに nicotine (1 mg/kg/day, i.p.) を 14 日間連日投与し、日々の振戦行動を評価した。その結果、nicotine 誘発振戦は次第に増強し、投与 13 日目 ( $U(8) = 1.5$ ,  $P = 0.0160$ ) および 14 日目 ( $U(8) =$

0.5,  $P = 0.0114$ ) には投与初日と比較して統計学的に有意な増強に達した (Fig. 2)。

### 3-3 Nicotine 誘発振戦に対する nACh 受容体拮抗薬の影響

Nicotine 誘発振戦の発現に関連する nACh 受容体サブタイプを同定する目的で、nicotine 誘発振戦に対する各種 nACh 受容体拮抗薬の影響を評価した。その結果、nicotine 誘発振戦は、非選択的 nACh 受容体拮抗薬 MEC ( $P = 0.0002$ ) および  $\alpha 7$  nACh 受容体拮抗薬 MLA ( $P = 0.0042$ ) により有意に抑制された。一方、 $\alpha 4\beta 2$  nACh 受容体拮抗薬 DH $\beta$ E は、nicotine 誘発振戦を僅かに抑制したが、統計学的に有意なものではなかった (Fig. 3)。また、nicotine 誘発振戦の発現に、末梢性の nACh 受容体あるいはムスカリン性アセチルコリン (mACh) 受容体が関与しているかを明らかにする目的で、末梢性  $\alpha 3\beta 4$  nACh 受容体拮抗薬 hexamethonium および mACh 受容体拮抗薬 scopolamine の影響を評価した。しかし、nicotine 誘発振戦に対する hexamethonium および scopolamine の影響は認められなかった (Fig. 4)。

### 3-4 Fos 発現を指標とした nicotine 誘発振戦関連部位の探索

Nicotine 誘発振戦に関連する脳内興奮部位を明らかにする目的で、3-1 項において nicotine (1 mg/kg, i.p.) を投与した動物から摘出した脳を用いて、Fos 発現量を解析した。Fos 陽性細胞数は、Fig. 5 に示す 44 部位について計測した。

#### 3-4-1 大脳皮質領域における Fos 発現解析

大脳皮質領域における Fos 発現を解析した結果、いずれの部位においても nicotine (1 mg/kg, i.p.) 投与による有意な Fos 発現変化は認められなかった。しかし、nicotine 投与群では、対照群 (生理食塩水投与群) と比較して、PirC4 における Fos 陽性細胞数が約 3 倍増加した (Fig. 6)。

### 3-4-2 大脳辺縁系領域における Fos 発現解析

大脳辺縁系領域の Fos 発現を解析した結果、MHb において、nicotine による有意な Fos 発現上昇が認められた ( $P = 0.0445$ )。しかし、側坐核、扁桃核、海馬などでは、nicotine による Fos 発現への影響は認められなかった (Fig. 7)。

### 3-4-3 大脳基底核および脳幹部領域における Fos 発現解析

大脳基底核および脳幹部領域の Fos 発現を解析した結果、延髄領域の IO において、nicotine による有意な Fos 発現上昇が認められた ( $P = 0.0359$ )。また、統計学的な有意差には至らなかったが、nicotine 投与群では Sol における Fos 発現が約 5 倍に増加した。一方、nicotine は大脳基底核領域、間脳領域、黒質における Fos 発現に影響を及ぼさなかった (Fig. 8)。

## 3-5 Nicotine (1 mg/kg, i.p.) による Fos 発現上昇に対する

### nACh 受容体拮抗薬の影響

3-4 項で、PirC4、MHb、Sol、IO において nicotine 投与による Fos 発現上昇が示された。そこで次に、上記 4 部位について、nicotine による Fos 発現上昇に対する MEC、DH $\beta$ E、MLA の影響を評価した。Nicotine (1 mg/kg, i.p.) 投与より、PirC4 ( $P = 0.0045$ )、MHb ( $P < 0.0001$ )、Sol ( $P = 0.0001$ )、IO ( $P < 0.0001$ ) の全部位において有意な Fos 発現の上昇が認められた。そして、これら nicotine による Fos 発現上昇は、MEC (PirC4 :  $P = 0.0264$  ; MHb、Sol、IO :  $P < 0.0001$ ) および MLA (PirC4 :  $P = 0.0357$  ; MHb :  $P = 0.0008$  ; Sol、IO :  $P < 0.0001$ ) により有意に抑制された。一方、DH $\beta$ E は、MHb ( $P = 0.0374$ ) および Sol ( $P = 0.0428$ ) の Fos 発現を有意に抑制したが、PirC4 および IO の Fos 発現には影響を与えな

かった (Fig. 9)。この結果から、nicotine による PirC4 および IO の Fos 発現上昇には、nicotine 誘発振戦と同様に、 $\alpha 7$  nACh 受容体が主に関与していることが示された。

### 3-6 Nicotine 誘発振戦に対する PirC および IO 電気破壊の影響

3-3 項および 3-5 項から、nicotine 誘発振戦に対する各種 nACh 受容体拮抗薬の反応性と、nicotine による PirC および IO の Fos 発現上昇に対する各種 nACh 受容体拮抗薬の反応性が一致することが示された。つまり、nicotine 誘発振戦と、PirC および IO での Fos 発現上昇は、MEC と MLA によって有意に抑制されたが、DH $\beta$ E による影響は受けなかった。このことから、PirC4 および IO が nicotine 誘発振戦に関連する部位であることが示唆された。そこで次に、nicotine 誘発振戦の原因核を明らかにする目的で、PirC4 および IO の電気破壊実験を行った。その結果、IO を電気破壊した動物では、nicotine (1 mg/kg, i.p.) による振戦発現が有意に抑制された ( $P = 0.0017$ )。一方、PirC を電気破壊した動物では、nicotine 投与により sham 群と同程度の振戦行動が現れた (Fig. 10)。

## 4 考察

本研究より、nicotine は、精神賦活作用や認知機能促進作用などを示す比較的  
低用量 (0.5-1 mg/kg, i.p.) であっても振戦を誘発することが明らかとなった。また、nicotine 反復投与によって nicotine 誘発振戦が次第に増強することが確認された。この nicotine 誘発振戦は、非選択的 nACh 受容体拮抗薬 MEC により完全に抑制されたが、末梢性  $\alpha 3\beta 4$  nACh 受容体拮抗薬 hexamethonium による影響を受けなかった。この結果は、nicotine 誘発振戦の発現には、中枢の nACh 受容体が関与していることを示唆する。さらに、 $\alpha 7$  nACh 受容体拮抗薬 MLA が nicotine

誘発振戦を抑制した一方で、 $\alpha 4\beta 2$  nACh 受容体拮抗薬 DH $\beta$ E による影響がほとんど認められなかったことから、nicotine 誘発振戦の発現には主に、 $\alpha 7$  nACh 受容体が関与していることが明らかとなった。

Fos 免疫組織染色の結果、振戦用量の nicotine (1 mg/kg, i.p.) 投与により、PirC、MHb、Sol、IO における Fos 発現が有意に増加した。また、これら nicotine による Fos 発現上昇が MEC により拮抗されたことから、nicotine が nACh 受容体を介して Fos 発現を増加させたことが示された。実際に、これら 4 部位には nACh 受容体が豊富に存在していることが報告されており<sup>46-49)</sup>、本研究で示された Fos 発現上昇は nicotine による振戦行動、あるいは精神賦活作用や認知機能改善作用と関連していると考えられる。また、nicotine による MHb と Sol の Fos 発現上昇は、DH $\beta$ E および MLA により有意に抑制された。一方で、PirC4 および IO の Fos 発現上昇は、nicotine 誘発振戦と同様に、MLA により抑制されたが、DH $\beta$ E による影響は受けなかった。このことから、PirC および IO が nicotine 誘発振戦に関連する部位である可能性が示された。さらに、IO を電気破壊実験した動物では nicotine 誘発振戦が抑制されたことから、IO が nicotine 誘発振戦の原因核であることが示唆された。

以上より、nicotine 誘発振戦の発現には  $\alpha 7$  nACh 受容体を介した IO の過剰興奮が関与していることが示唆された (Fig. 11)。IO は、小脳皮質からの唯一の出力ニューロンであるプルキンエ細胞に登上線維を伸ばしている。この下オリブ核-小脳系は、運動のリズム発生や運動協調性、姿勢反射に関わっており、ヒトの本態性振戦との関連が報告されている<sup>50-54)</sup>。また、当研究室では本態性振戦モデルラットである Tremor (TRM) rat の振戦発現の原因核が IO であることを見出している<sup>55)</sup>。一方、nicotine による振戦発現は、本態性振戦と同様に動作時において顕著であることや、nicotine により本態性振戦患者の振戦が増悪す



ることが報告されている<sup>26)</sup>。本研究結果は、nicotine 誘発振戦と本態性振戦が、一部共通の発現メカニズムを介していることおよび本態性振戦の発症に nACh 受容体が重要な役割を果たしていることが示唆する。

## 5 結語

本研究結果より、nicotine 誘発振戦の発現には  $\alpha 7$  nACh 受容体を介した IO の過剰興奮が関与していることが明らかとなった。また、nicotine 誘発振戦と本態性振戦の発現メカニズムが一部共通している可能性が示唆された。

## 第2章 5-HT 神経系による nicotine 誘発振戦調節機構の解析

### 1 緒言

第1章より、nicotine 誘発振戦の発現には、 $\alpha 7$  nACh 受容体を介した IO の過剰興奮が関与していることが示された。また、IO は本態性振戦との関連が報告されている脳部位であることから、nicotine 誘発振戦と本態性振戦の発現メカニズムが一部共通していることが示唆された。

一方、nicotine は、シナプス前終末に存在する nACh 受容体を介して、5-HT やドパミンなど神経伝達物質の遊離を促進することが知られている<sup>32-38)</sup>。また、MAO 阻害薬である harmaline は、脳内 5-HT 量を増加させ、ヒトの本態性振戦に類似する振戦行動を誘発することが報告されている<sup>56-62)</sup>。これらの知見から、nicotine 誘発振戦においても、5-HT 神経系が重要な機能を担っていると考えられる。

5-HT 神経は、起始核である縫線核から、大脳皮質や大脳辺縁系、小脳など広範な脳領域に投射しており、摂食行動や睡眠といった本能行動や情動、認知など様々な中枢機能の調節に関わっている。5-HT 受容体は、5-HT<sub>1</sub> から 5-HT<sub>7</sub> の 7 種類のサブファミリーからなり、14 個のサブタイプ (5-HT<sub>1A</sub>、5-HT<sub>1B</sub>、5-HT<sub>1D</sub>、5-HT<sub>1E</sub>、5-HT<sub>1F</sub>、5-HT<sub>2A~2C</sub>、5-HT<sub>3</sub>、5-HT<sub>4</sub>、5-HT<sub>5A</sub>、5-HT<sub>5B</sub>、5-HT<sub>6</sub>、5-HT<sub>7</sub>) が存在する<sup>63,64)</sup>。また、自己受容体として、5-HT<sub>1A</sub> 受容体が細胞体上に存在しており、5-HT<sub>1B/1D</sub> 受容体がシナプス前終末に存在している。我々の研究室では以前に、5-HT<sub>1A</sub> 受容体の活性化および 5-HT<sub>2</sub>、5-HT<sub>3</sub>、5-HT<sub>6</sub> 受容体の阻害により、錐体外路系運動障害 (カタレプシー、ブラジキネジア、アキネジアなど) が改善することを見出している<sup>65-69)</sup>。しかし、nicotine によって誘発される振戦と 5-HT 神経系の関連については未だ不明である。そこで本研究では、5-HT 神

経系による nicotine 誘発振戦調節メカニズムを明らかにする目的で、nicotine 誘発振戦に対する各種 5-HT 受容体関連薬の影響を評価した。

## 2 実験方法

### 2-1 使用動物

実験には、6~8 週齢の ddY 系雄性マウス（日本 SLC）を使用した。動物は、一定の照明サイクル（明期：8:00 時より 12 時間）、恒温（ $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ ）、湿度（ $55\pm 5\%$ ）の飼育室において、標準固形飼料（オリエンタル酵母社製）および水道水を自由に摂取させて飼育した。約 1 週間の予備飼育後、実験に使用した。

### 2-2 Nicotine による振戦行動の評価

動物に nicotine（1 mg/kg）を腹腔内投与後、観察ケージ（ $25\times 42\times 20\text{ cm}$ ）内で振戦行動を評価した。Nicotine 投与後、1、3、5、7、9 分の時点で、振戦行動の指標として、振戦強度および振戦持続時間を 1 分間測定した。振戦強度の評価には、第 1 章 2-2 項で示した 4 段階振戦スコアを用いた。各ポイントにおける振戦スコアおよび振戦持続時間それぞれの合計値を算出し、振戦行動の評価に用いた。

### 2-3 Nicotine 誘発振戦に対する 5-HT 受容体作動薬の影響評価

Nicotine 誘発振戦に対する 5-HT 受容体作動薬の影響を評価する目的で、5-HT<sub>1A</sub> 受容体作動薬 8-hydroxydipropylaminotetraline（8-OH-DPAT；1, 3 mg/kg, i.p.）、5-HT<sub>2</sub> 受容体作動薬 2,5-dimethoxy-4-iodoamphetamine（DOI；0.1-1 mg/kg, i.p.）、5-HT<sub>3</sub> 受容体作動薬 SR-57227（1, 3 mg/kg, i.p.）を nicotine（1 mg/kg, i.p.）投与 15 分前に処置した。また、5-HT 受容体拮抗薬との併用実験では、5-HT<sub>1A</sub> 受容体拮

抗薬 WAY-100135 (10 mg/kg, i.p.) を 8-OH-DPAT と、5-HT<sub>2</sub> 受容体拮抗薬 ritanserin (3 mg/kg, i.p.) を DOI とそれぞれ併用投与した。振戦評価は、2-2 項と同様の方法で行った。

#### 2-4 *P*-chlorophenylalanine (PCPA) による 5-HT 神経不活化実験

5-HT 合成酵素(トリプトファン水酸化酵素)阻害剤 PCPA (300 mg/kg/day, i.p.) を 3 日間連続で投与することにより、マウスの 5-HT 神経を不活化した。3 日目の PCPA 投与から 2 時間後に、nicotine (1 mg/kg, i.p.) を投与し、2-2 項と同様の方法で振戦行動を評価した。また、nicotine 投与 15 分前 (PCPA 投与 105 分後) に 8-OH-DPAT を処置し、5-HT 神経を不活化した動物の nicotine 誘発振戦に対する 8-OH-DPAT の影響を評価した。

#### 2-5 Nicotine 誘発振戦に対する 5-HT 受容体拮抗薬の影響評価

Nicotine 誘発振戦に対する 5-HT 受容体拮抗薬単独の影響を評価する目的で、WAY-100135 (10 mg/kg, i.p.)、ritanserin (3 mg/kg, i.p.)、5-HT<sub>3</sub> 受容体拮抗薬 ondansetron (1 mg/kg, i.p.)、5-HT<sub>6</sub> 受容体拮抗薬 SB-258585 (10 mg/kg, i.p.) を nicotine 投与 15 分前に処置した。振戦評価は、2-2 項と同様の方法で行った。

#### 2-6 使用薬物

Nicotine、8-OH-DPAT hydrobromide、DOI hydrochloride、ritanserin、ondansetron hydrochloride dehydrate、PCPA methylester hydrochloride は Sigma-Aldrich 社より、WAY-100135 dihydrochloride、SR-57227 hydrochloride、SB-258585 hydrochloride は Tocris 社より購入した。8-OH-DPAT、WAY-100135、ritanserin は、予め 1% lactate により溶解した後、0.9% 生理食塩水で希釈して使用した。他の薬物は全て、0.9%

生理食塩水で溶解し、使用した。

## 2-7 統計学的処理

実験結果は、平均値±標準誤差で示した。各ポイントにおける振戦強度および振戦持続時間の比較では、二元配置分散分析を行い、有意差が認められた場合には Tukey 多重比較検定（パラメトリック）を行った。合計振戦スコアおよび合計振戦持続時間の比較は、2 群間における検定では Mann-Whitney's U 検定（ノンパラメトリック）を、3 群間以上の有意差検定では、まず Kruskal-Wallis の順位検定を行い、有意差が認められた場合には Steel-Dwass 多重比較検定（ノンパラメトリック）を行った。以上の検定において、 $P < 0.05$  のとき、有意差ありと判定した。

## 3 結果

### 3-1 Nicotine 誘発振戦に対する 5-HT 受容体作動薬の影響

Nicotine 誘発振戦の発現および調節に 5-HT 受容体が関与しているのかを明らかにする目的で、nicotine 誘発振戦に対する 5-HT 受容体作動薬の影響を評価した。その結果、5-HT<sub>1A</sub> 受容体作動薬 8-OH-DPAT (3 mg/kg, i.p.) を前処置した動物では、nicotine (1 mg/kg, i.p.) 投与 3 分後から振戦強度および振戦持続時間の増加が認められた (Fig. 12)。また、8-OH-DPAT (1, 3 mg/kg, i.p.) は、nicotine 誘発振戦の合計振戦スコアを有意に増強した ( $\chi^2 = 7.5454$ ,  $df = 2$ ,  $P = 0.0230$ )。合計振戦持続時間については、統計学的に有意な差とはならなかったものの、8-OH-DPAT による増加傾向が示された (Fig. 13)。一方、5-HT<sub>2</sub> 受容体作動薬 DOI (1 mg/kg, i.p.) は、8-OH-DPAT とは対照的に、nicotine 投与直後から振戦抑制作用を示した (Fig. 14)。さらに、DOI (0.1-1 mg/kg, i.p.) は nicotine 誘発振戦の合

計振戦スコアおよび合計振戦持続時間を用量依存的に抑制した（合計振戦スコア： $\chi^2 = 10.2614$ ,  $df = 3$ ,  $P = 0.0165$ 、合計振戦持続時間： $\chi^2 = 8.9805$ ,  $df = 3$ ,  $P = 0.0296$ ）（Fig. 15）。しかし、5-HT<sub>3</sub>受容体作動薬 SR-57227（1, 3 mg/kg, i.p.）は、nicotine 誘発振戦に対して影響を与えなかった（Fig. 16, 17）。

次いで、8-OH-DPAT の nicotine 誘発振戦増強作用および DOI の nicotine 誘発振戦抑制作用に対する拮抗実験を行った。Nicotine 投与 15 分前に、8-OH-DPAT（3 mg/kg, i.p.）と 5-HT<sub>1A</sub>受容体拮抗薬 WAY-100135（10 mg/kg, i.p.）を同時に投与した結果、8-OH-DPAT による nicotine 誘発振戦の振戦強度増強作用は WAY-100135 により拮抗された（ $\chi^2 = 7.8434$ ,  $df = 2$ ,  $P = 0.0198$ ）（Fig. 18）。同様に、DOI の nicotine 誘発振戦抑制作用は、5-HT<sub>2</sub>受容体拮抗薬 ritanserin（3 mg/kg, i.p.）により有意に拮抗された（合計振戦スコア： $\chi^2 = 6.4341$ ,  $df = 2$ ,  $P = 0.0401$ 、合計振戦持続時間： $\chi^2 = 10.2281$ ,  $df = 2$ ,  $P = 0.0060$ ）（Fig. 19）。

### 3-2 8-OH-DPAT の nicotine 誘発振戦増強作用に対する 5-HT 神経不活化の影響

3-1 項より、5-HT<sub>1A</sub>受容体作動薬 8-OH-DPAT が nicotine 誘発振戦増強作用を有することが示された。5-HT<sub>1A</sub>受容体は、ポストシナプス側だけでなく、自己受容体として 5-HT 神経細胞体上にも存在している。そこで、プレシナプス側あるいはポストシナプス側どちらの 5-HT<sub>1A</sub>受容体が nicotine 誘発振戦に関与するのかを明らかにする目的で、5-HT 神経の不活化実験を行った。5-HT 神経の不活化は、過去の報告と同様に<sup>65)</sup>、5-HT 合成酵素阻害剤 PCPA（300 mg/kg/day, i.p.）を 3 日間連続で投与することにより行った。この条件により、縫線核における 5-HT 神経が 90%以上減少することを確認しており、プレシナプス側に存在する 5-HT<sub>1A</sub>受容体の機能を除外できると考えられる。

PCPA によって 5-HT 神経を不活化させた動物に対して、nicotine（1 mg/kg, i.p.）

を投与した結果、PCPA 非処置群と同等の振戦行動が誘発された (Fig. 20)。また、PCPA 処置群に対して、8-OH-DPAT (3 mg/kg, i.p.) を nicotine (1 mg/kg, i.p.) 投与 15 分前に処置した結果、対照群 (PCPA および生理食塩水前処置群) と比較し、nicotine 誘発振戦の合計振戦スコア ( $\chi^2 = 16.2402$ ,  $df = 2$ ,  $P = 0.0003$ ) および合計振戦持続時間 ( $\chi^2 = 11.8635$ ,  $df = 2$ ,  $P = 0.0027$ ) が有意に増加した (Fig. 20)。このことから、8-OH-DPAT の nicotine 誘発振戦増強作用には、ポストシナプス側の 5-HT<sub>1A</sub> 受容体が関与していることが明らかとなった。

### 3-3 Nicotine 誘発振戦に対する 5-HT 受容体拮抗薬単独投与の影響

Nicotine 誘発振戦の発現自体に 5-HT 受容体が直接関与しているのかを明らかにする目的で、nicotine 誘発振戦に対する 5-HT 受容体拮抗薬単独投与の影響を評価した。その結果、5-HT<sub>1A</sub> 受容体拮抗薬 WAY-100135 (10 mg/kg, i.p.) を nicotine (1 mg/kg, i.p.) 投与 15 分前に処置した動物では、nicotine 誘発振戦の合計振戦スコア ( $U(14) = 6$ ,  $P = 0.0051$ ) および合計振戦持続時間 ( $U(14) = 7$ ,  $P = 0.0081$ ) が有意に抑制された (Fig. 21)。一方、3-1 項において、DOI の nicotine 振戦抑制作用に対する拮抗作用を示した ritanserin (3 mg/kg, i.p.) は、単独では nicotine 誘発振戦に影響を及ぼさなかった (Fig. 22)。また、5-HT<sub>3</sub> 受容体拮抗薬 ondansetron (1 mg/kg, i.p.) (Fig. 23)、5-HT<sub>6</sub> 受容体拮抗薬 SB-258585 (10 mg/kg, i.p.) (Fig. 24) は、nicotine 誘発振戦に対して作用を示さなかった。

## 4 考察

第 1 章では、nicotine が本態性振戦と類似したメカニズムを介して、動作時において顕著な振戦行動を誘発することが明らかとなった。一方で、本態性振戦モデルである harmaline 振戦の発現に、脳内 5-HT 量の増加が関与していること

が報告されており<sup>58-60</sup>、また、nicotine は、シナプス前終末に存在する nACh 受容体を介して 5-HT 遊離を促進することが知られている<sup>32-34,37</sup>。これらの知見から、nicotine 誘発振戦の発現に 5-HT 神経系が重要な役割を果たしていると考えられるが、その詳細なメカニズムは不明である。そこで本研究では、5-HT 神経系による nicotine 誘発振戦の調節メカニズムを明らかとする目的で、nicotine 誘発振戦に対する各種 5-HT 受容体関連薬の影響を評価した。

Nicotine 誘発振戦と 5-HT<sub>1A</sub> 受容体の関連について検討した結果、nicotine 誘発振戦は 5-HT<sub>1A</sub> 受容体作動薬 8-OH-DPAT により増強され、この nicotine 誘発振戦増強作用は、5-HT<sub>1A</sub> 受容体拮抗薬 WAY-100135 により拮抗された。さらに、WAY-100135 は単独で、nicotine 誘発振戦の発現を抑制した。このことから、nicotine 誘発振戦の発現には、5-HT<sub>1A</sub> 受容体の活性化が関与していることが明らかとなった。また、5-HT 合成酵素阻害剤 PCPA によって 5-HT 神経を不活化させた動物においても、8-OH-DPAT の nicotine 振戦増強作用が顕著に現れたことから、nicotine は主にポストシナプス側に存在する 5-HT<sub>1A</sub> 受容体を介して振戦を誘発することが示唆された。第 1 章で nicotine 誘発振戦の発現に関与していることが示された  $\alpha 7$  nACh 受容体は、5-HT 神経のシナプス前終末にも存在しており、5-HT 遊離を調節している<sup>32,33</sup>。また、nicotine 誘発振戦の原因核である IO には、 $\alpha 7$  nACh 受容体と 5-HT<sub>1A</sub> 受容体が多く存在していることが報告されている<sup>70,71</sup>。これらのことから、nicotine は  $\alpha 7$  nACh 受容体を介して 5-HT 遊離を促進し、ポストシナプス側の 5-HT<sub>1A</sub> 受容体を活性化させることで IO の過剰興奮を引き起こすと考えられる (Fig. 25)。

5-HT<sub>2</sub> 受容体は、5-HT<sub>1A</sub> 受容体と同様に、IO を含む脳幹領域に多く発現しており、下オリーブ核—小脳系のリズム発生を制御していることが報告されている<sup>72,73</sup>。本研究では、5-HT<sub>2</sub> 受容体作動薬 DOI が nicotine 誘発振戦を有意に抑制



し、この DOI による nicotine 誘発振戦抑制作用は、5-HT<sub>2</sub> 受容体拮抗薬 ritanserin により拮抗された。この結果から、5-HT<sub>2</sub> 受容体の活性化は、nicotine 誘発振戦を抑制することが明らかとなった。しかし、ritanserin 単独投与による nicotine 誘発振戦への影響が認められなかったことから、5-HT<sub>2</sub> 受容体は nicotine 誘発振戦の発現自体には、直接的に関与していないことが示唆された (Fig. 25)。

一方、nicotine 誘発振戦と、5-HT<sub>3</sub> 受容体および 5-HT<sub>6</sub> 受容体の関連は認められなかった。我々はこれまでに、5-HT<sub>1A</sub> 受容体の活性化および 5-HT<sub>2</sub>、5-HT<sub>3</sub>、5-HT<sub>6</sub> 受容体の阻害により、カタレプシーやブラジキネジア、アキネジアといったパーキンソン病様症状の発現が抑制されることを見出している<sup>65-69)</sup>。これら 5-HT 受容体関連薬に対する反応性の相違は、nicotine 誘発振戦とパーキンソン病様症状 (パーキンソン病振戦) における 5-HT 神経系の調節メカニズムが異なっていることを示唆する。

## 5 結語

本研究結果より、nicotine 誘発振戦の発現にはポストシナプス側の 5-HT<sub>1A</sub> 受容体の活性化が一部関与していることが明らかとなった。また、5-HT<sub>1A</sub> 受容体以外に、5-HT<sub>2</sub> 受容体が nicotine 誘発振戦を抑制的に調節していることが示された。さらに、nicotine 誘発振戦と本態性振戦が一部共通の発現メカニズムを介していることを考慮すると、本態性振戦をはじめとする振戦治療の新たな標的分子として 5-HT 受容体が有用であることが示唆される。

## 総括

振戦は、体の一部あるいは全身性に見られる不随意の律動的な振るえを呈する錐体外路系運動障害である。振戦の代表的なものに、本態性振戦とパーキンソン病振戦があるが、**nicotine** など一部の薬物によっても振戦が誘発される<sup>11, 13-17)</sup>。**Nicotine** による振戦は、過度の喫煙やタバコの誤飲、**nicotine** 製剤の誤った使用などの毒性症状によるものであると考えられるが、その詳細な発現メカニズムは未だ不明である。一方、**nicotine** はシナプス前終末に存在する **nACh** 受容体を介して、**5-HT** など神経伝達物質の遊離を促進することが知られているが<sup>32-38)</sup>、**nicotine** 誘発振戦の発現機構における **5-HT** 神経系の役割については不明な点が多い。そこで本研究では、**nicotine** による振戦の発現メカニズムを解析するとともに、**5-HT** 神経系による **nicotine** 誘発振戦調節機構について検討した。

各種 **nACh** 受容体拮抗薬を用いた行動薬理学的評価および神経興奮マーカー **Fos** タンパク質の発現を指標とした免疫組織学的評価の結果、**nicotine** 誘発振戦の発現には、 $\alpha 7$  **nACh** 受容体を介した **IO** の過剰興奮が関与していることが明らかとなった。**IO** は、小脳皮質からの唯一の出力ニューロンであるプルキンエ細胞に登上線維を伸ばしており、運動のリズム発生などに深く関わっている<sup>50-54)</sup>。また、我々は本態性振戦モデルラット **TRM rat** の振戦発現に **IO** の過剰興奮が関与していることを見出している<sup>55)</sup>。これらの知見は、**nicotine** 誘発振戦と本態性振戦が一部、共通の発現メカニズムを介していることを示唆する。

**Nicotine** 誘発振戦に対する各種 **5-HT** 受容体関連薬の影響を評価した結果、**nicotine** 誘発振戦の発現にはポストシナプス側に存在する **5-HT<sub>1A</sub>** 受容体の活性化が一部関与しており、また、**5-HT<sub>2</sub>** 受容体が **nicotine** 誘発振戦を抑制的に調節していることが示唆された。**5-HT<sub>1A</sub>** 受容体および **5-HT<sub>2</sub>** 受容体は、**IO** を含む脳幹部領域に多く発現しており、下オリーブ核—小脳系の機能を制御しているこ

とが報告されている<sup>70-73</sup>)。また、5-HT 神経のシナプス前終末に存在する  $\alpha 7$  nACh 受容体が 5-HT の遊離促進機能を有することが報告されている<sup>32,33</sup>)。このことから、nicotine 誘発振戦の発現には、 $\alpha 7$  nACh 受容体を介した 5-HT 遊離と、ポストシナプス側に存在する 5-HT<sub>1A</sub> 受容体の活性化および IO の過剰興奮が関与していることが示唆された。

本研究より、 $\alpha 7$  nACh 受容体の活性化を介した下オリーブ核ニューロンの過剰興奮によって振戦が誘発されることが示された (Fig. 11)。また、nicotine 誘発振戦の発現には 5-HT 神経系が深く関与しており、 $\alpha 7$  nACh 受容体の活性化による 5-HT 遊離と 5-HT<sub>1A</sub> 受容体の活性化が振戦発現に一部関与していることが示唆された (Fig. 25)。さらに、nicotine 誘発振戦と本態性振戦の発現メカニズムが類似していることから、今後、nACh 受容体や 5-HT 受容体を標的とした新たな振戦治療薬の開発が期待される。

## 論文目録

以下に報告論文を記載する。

- 1) Nicotine evokes kinetic tremor by activating the inferior olive via  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptors.

Kunisawa N, Iha HA, Shimizu S, Tokudome K, Mukai T, Kinboshi M, Serikawa T, Ohno Y.

Behav. Brain Res. 314:173-180 (2016).

- 2) Serotonergic modulation of nicotine-induced kinetic tremor in mice.

Kunisawa N, Iha HA, Nomura Y, Onishi M, Matsubara N, Shimizu S, Ohno Y.

J. Pharmacol. Sci. 134:131-138 (2017).

以上

## 謝辞

本研究を進めるにあたり、終始懇切なる御指導ご鞭撻を賜りました、大野行弘教授に深甚なる謝意を表します。また、日常の議論を通じて種々お力添えを頂きました河合悦子講師ならびに清水佐紀助教に深く感謝致します。

最後に、本研究に多大なるご協力を頂戴しました、大阪薬科大学 薬品作用解析学研究室員の皆様に心から感謝の意を表します。

## 引用文献

- 1) Boecker H, Wills AJ, Ceballos-Baumann A, Samuel M, Thompson PD, Findley LJ, Brooks DJ. The effect of ethanol on alcohol-responsive essential tremor: a positron emission tomography study. *Ann Neurol.* 39:650–658 (1996).
- 2) Brennan KC, Jurewicz EC, Ford B, Pullman SL, Louis ED. Is essential tremor predominantly a kinetic or a postural tremor? A clinical and electrophysiological study. *Mov. Disord.* 17:313-316 (2002).
- 3) Crawford P, Zimmerman EE. Differentiation and diagnosis of tremor. *Am. Fam. Physician.* 83:697-702 (2011).
- 4) Louis ED. The primary type of tremor in essential tremor is kinetic rather than postural: cross-sectional observation of tremor phenomenology in 369 cases. *Eur. J. Neurol.* 20:725-727 (2013).
- 5) Elias WJ, Shah BB. Tremor. *JAMA.* 311:948-954 (2014).
- 6) Sharma S, Pandey S. Approach to a tremor patient. *Ann. Indian Acad. Neurol.* 19:433-443 (2016).
- 7) Espay AJ, Revilla FJ. Cerebellar limb tremor and inferior olivary hypertrophy. *Neurology.* 67:1250 (2006).
- 8) Buijink AW, Broersma M, van der Stouwe AM, van Wingen GA, Groot PF, Speelman JD, Maurits NM, van Rootselaar AF. Rhythmic finger tapping reveals cerebellar dysfunction in essential tremor. *Parkinsonism Relat Disord.* 21:383-388 (2015).

- 9) Ohno Y, Shimizu S, Tokudome K, Kunisawa N, Sasa M. New insight into the therapeutic role of the serotonergic system in Parkinson's disease. *Prog. Neurobiol.* 134:104-121 (2015).
- 10) Graham JD. Static tremor in anxiety states. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 8:57-60 (1945).
- 11) Maykoski KA, Rubin MB, Day AC. Effect of cigarette smoking on postural muscle tremor. *Nurs. Res.* 25:39-43 (1976).
- 12) Weir RL. Extrapramidal dysfunction in alcoholism. *J. Natl. Med. Assoc.* 72:121-126 (1980).
- 13) Lippold OC, Williams EJ, Wilson CG. Finger tremor and cigarette smoking. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 10:83-86 (1980).
- 14) Shiffman SM, Gritz ER, Maltese J, Lee MA, Schneider NG, Jarvik ME. Effects of cigarette smoking and oral nicotine on hand tremor. *Clin. Pharmacol. Ther.* 33:800-805 (1983).
- 15) Gomita Y, Suemaru K, Furuno K, Araki Y. Tail-tremor induced by exposure to cigarette smoke in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 40:453-455 (1991).
- 16) Morgan JC, Sethi KD. Drug-induced tremors. *Lancet. Neurol.* 4:866-876 (2005).
- 17) Lin CY, Yeh CH, Chang TT, Kao CH, Tsai SY. Smoking, dopamine transporter, and hand tremor. *Clin. Nucl. Med.* 37:35-38 (2012).
- 18) Chandra S, Hayashibe M, Thondiyath A, Ramalingam M. Differential analysis of muscle fatigue induced elbow and wrist tremor in controlled laparoscopic manoeuvring. *Int. J. Med. Robot.* 13 (2017).
- 19) Swan GE, Lessov-Sclaggar CN. The effects of tobacco smoke and nicotine on cognition and the brain. *Neuropsychol. Rev.* 17:259-273 (2007).

- 20) Vieyra-Reyes P, Mineur YS, Picciotto MR, Túnez I, Vidaltamayo R, Drucker-Colín R. Antidepressant-like effects of nicotine and transcranial magnetic stimulation in the olfactory bulbectomy rat model of depression. *Brain Res. Bull.* 77:13-18 (2008).
- 21) Mineur YS, Picciotto MR. Nicotine receptors and depression: revisiting and revising the cholinergic hypothesis. *Trends. Pharmacol. Sci.* 31: 580-586 (2010).
- 22) Harrington L, Viñals X, Herrera-Solís A, Flores A, Morel C, Tolu S, Faure P, Maldonado R, Maskos U, Robledo P. Role of  $\beta 4^*$  Nicotinic Acetylcholine Receptors in the Habenulo-Interpeduncular Pathway in Nicotine Reinforcement in Mice. *Neuropsychopharmacology.* 41:1790-1802 (2016).
- 23) Bastlund JF, Berry D, Watson WP. Pharmacological and histological characterisation of nicotine-kindled seizures in mice. *Neuropharmacology.* 48:975-983 (2005).
- 24) Lobina C, Carai MA, Froestl W, Mugnaini C, Pasquini S, Corelli F, Gessa GL, Colombo G. Activation of the GABAB receptor prevents nicotine-induced locomotor stimulation in mice. *Front. Psychiatry.* 2:76 (2011).
- 25) Lenoir M, Tang JS, Woods AS, Kiyatkin EA. Rapid sensitization of physiological, neuronal, and locomotor effects of nicotine: critical role of peripheral drug actions. *J Neurosci.* 33: 9937-9949 (2013).
- 26) Marshall J, Schnieden H. Effect of adrenaline, noradrenaline, atropine, and nicotine on some types of human tremor. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 29:214-218 (1966).
- 27) Gotti C, Zoli M, Clementi F. Brain nicotinic acetylcholine receptors: native subtypes and their relevance. *Trends. Pharmacol. Sci.* 27:482-491 (2006).



- 28) Dani JA, Bertrand D. Nicotinic acetylcholine receptors and nicotinic cholinergic mechanisms of the central nervous system. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 47:699-729 (2007).
- 29) Faure P, Tolu S, Valverde S, Naudé J. Role of nicotinic acetylcholine receptors in regulating dopamine neuron activity. *Neuroscience.* 282:86-100 (2014).
- 30) Taly A, Corringer PJ, Guedin D, Lestage P, Changeux JP. Nicotinic receptors: allosteric transitions and therapeutic targets in the nervous system. *Nat. Rev. Drug Discov.* 8:733-750 (2009).
- 31) Colombo SF, Mazzo F, Pistillo F, Gotti C. Biogenesis, trafficking and up-regulation of nicotinic ACh receptors. *Biochem. Pharmacol.* 86:1063-1073 (2013).
- 32) Tucci SA, Genn RF, File SE. Methyllaconitine (MLA) blocks the nicotine evoked anxiogenic effect and 5-HT release in the dorsal hippocampus: possible role of alpha7 receptors. *Neuropharmacology.* 44:367-373 (2003).
- 33) Aznar S, Kostova V, Christiansen SH, Knudsen GM. Alpha 7 nicotinic receptor subunit is present on serotonin neurons projecting to hippocampus and septum. *Synapse.* 55:196-200 (2005).
- 34) Shearman E, Rossi S, Sershen H, Hashim A, Lajtha A. Locally administered low nicotine-induced neurotransmitter changes in areas of cognitive function. *Neurochem. Res.* 30:1055-1066 (2005).
- 35) Liang Y, Boules M, Shaw AM, Williams K, Fredrickson P, Richelson E. Effect of a novel neurotensin analog, NT69L, on nicotine-induced alterations in monoamine levels in rat brain. *Brain Res.* 1231:6-15 (2008).
- 36) Westphalen RI, Gomez RS, Hemmings HC Jr. Nicotinic receptor-evoked hippocampal norepinephrine release is highly sensitive to inhibition by isoflurane.

- Br. J. Anaesth. 102:355-360 (2009).
- 37) Czubak A, Nowakowska E, Golembiowska K, Kus K, Burda K, Metelska J. Effect of venlafaxine and nicotine on the level of neurotransmitters and their metabolites in rat brains. *J Physiol Pharmacol.* 61:339-346 (2010).
- 38) Huang M, Felix AR, Kwon S, Lowe D, Wallace T, Santarelli L, Meltzer HY. The alpha-7 nicotinic receptor partial agonist/5-HT3 antagonist RG3487 enhances cortical and hippocampal dopamine and acetylcholine release. *Psychopharmacology (Berl).* 231:2199-2210 (2014).
- 39) Perkins KA, Epstein LH, Stiller RL, Sexton JE, Debski TD, Jacob RG. Behavioral performance effects of nicotine in smokers and nonsmokers. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 37:11-15 (1990).
- 40) Morgan JJ, Cohen DR, Hempstead JL, Curran T. Mapping patterns of c-fos expression in the central nervous system after seizure. *Science.* 237:192-197 (1987).
- 41) Herrera DG, Robertson HA. Activation of c-fos in the brain. *Prog. Neurobiol.* 50:83-107 (1996).
- 42) Ohno Y, Ishihara S, Mashimo T, Sofue N, Shimizu S, Imaoku T, Tsurumi T, Sasa M, Serikawa T. Scn1a missense mutation causes limbic hyperexcitability and vulnerability to experimental febrile seizures. *Neurobiol. Dis.* 41:261-269 (2011).
- 43) Ohno Y, Okano M, Masui A, Imaki J, Egawa M, Yoshihara C, Tatara A, Mizuguchi Y, Sasa M, Shimizu S. Region-specific elevation of D1 receptor-mediated neurotransmission in the nucleus accumbens of SHR, a rat model of attention deficit/hyperactivity disorder. *Neuropharmacology.* 63:547-554 (2012).
- 44) Iha HA, Kunisawa N, Tokudome K, Mukai T, Kinboshi M, Shimizu S, Ohno Y.

- Immunohistochemical analysis of Fos protein expression for exploring brain regions (foci) related to central nervous system (CNS) disorders and drug actions. In Philippu A, editor. *In vivo neuropharmacology and neurophysiology*. New York: Springer. p.p.389-408 (2016).
- 45) Iha HA, Kunisawa N, Shimizu S, Tokudome K, Mukai T, Kinboshi M, Ikeda A, Ito H, Serikawa T, Ohno Y. Nicotine Elicits Convulsive Seizures by Activating Amygdalar Neurons. *Front. Pharmacol.* 8:57 (2017).
- 46) Sheffield EB, Quick MW, Lester RA. Nicotinic acetylcholine receptor subunit mRNA expression and channel function in medial habenula neurons. *Neuropharmacology.* 39:2591-2603 (2000).
- 47) O'Leary KT, Loughlin SE, Chen Y, Leslie FM. Nicotinic acetylcholine receptor subunit mRNA expression in adult and developing rat medullary catecholamine neurons. *J. Comp. Neurol.* 510:655-672 (2008).
- 48) Machaalani R, Kashi PK, Waters KA. Distribution of nicotinic acetylcholine receptor subunits alpha7 and beta2 in the human brainstem and hippocampal formation. *J. Chem. Neuroanat.* 40:223-231 (2010).
- 49) Shih PY, Engle SE, Oh G, Deshpande P, Puskar NL, Lester HA, Drenan RM. Differential expression and function of nicotinic acetylcholine receptors in subdivisions of medial habenula. *J. Neurosci.* 34:9789-9802 (2014).
- 50) Boecker H, Wills AJ, Ceballos-Baumann A, Samuel M, Thompson PD, Findley LJ, Brooks DJ. The effect of ethanol on alcohol-responsive essential tremor: a positron emission tomography study. *Ann. Neurol.* 39:650–658 (1996).
- 51) Welsh JP, Llinás R. Some organizing principles for the control of movement based on olivocerebellar physiology. *Prog. Brain Res.* 114:449-461 (1997).

- 52) Espay AJ, Revilla FJ. Cerebellar limb tremor and inferior olivary hypertrophy. *Neurology*. 67:1250 (2006).
- 53) Libster AM, Lefler Y, Yaron-Jakoubovitch A, Yarom Y. Ataxia and the olivo-cerebellar module. *Funct. Neurol*. 25:129-133 (2010).
- 54) Buijink AW, Broersma M, van der Stouwe AM, van Wingen GA, Groot PF, Speelman JD, Maurits NM, van Rootselaar AF. Rhythmic finger tapping reveals cerebellar dysfunction in essential tremor. *Parkinsonism Relat. Disord*. 21:383-388 (2015).
- 55) Ohno Y, Shimizu S, Tataru A, Imaoku T, Ishii T, Sasa M, Serikawa T, Kuramoto T. Hcn1 is a tremorigenic genetic component in a rat model of essential tremor. *PLoS One*. 10:e0123529 (2015).
- 56) Milner TE, Cadoret G, Lessard L, Smith AM. EMG analysis of harmaline-induced tremor in normal and three strains of mutant mice with Purkinje cell degeneration and the role of the inferior olive. *J. Neurophysiol*. 73:2568–2577 (1995).
- 57) Wang G, Fowler SC. Concurrent quantification of tremor and depression of locomotor activity induced in rats by harmaline and physostigmine. *Psychopharmacology*. 158:273–280 (2001).
- 58) Massaro EJ. *Handbook of Neurotoxicology*. Totowa, NJ: Humana Press. p.237. ISBN 0-89603-796-7 (2002).
- 59) Mehta H, Saravanan KS, Mohanakumar KP. Serotonin synthesis inhibition in olivo-cerebellar system attenuates harmaline-induced tremor in Swiss albino mice. *Behav. Brain Res*. 145:31-36 (2003).
- 60) Arshaduddin M, Kadasah S, Al Deeb S, Al Moutaery K, Tariq M. Exacerbation of harmaline-induced tremor by imipramine. *Pharmacol. Biochem. Behav*. 81:9-14

(2005).

- 61) Miwa H. Rodent models of tremor. *Cerebellum*. 6:66–72 (2007).
- 62) Kolasiewicz W, Kuter K, Wardas J, Ossowska K. Role of the metabotropic receptor subtype 1 in the harmaline-induced tremor in rats. *J. Neural. Transm.* 116:1059–1063 (2009).
- 63) Gerhardt CC, van Heerikhuizen H. Functional characteristics of heterologously expressed 5-HT receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 334:1-23 (1997).
- 64) Alex KD, Pehek EA. Pharmacologic mechanisms of serotonergic regulation of dopamine neurotransmission. *Pharmacol. Ther.* 113:296-320 (2007).
- 65) Ohno Y, Shimizu S, Imaki J, Ishihara S, Sofue N, Sasa M, Kawai Y. Evaluation of the antibradykinetic actions of 5-HT<sub>1A</sub> agonists using the mouse pole test. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* 32:1302-1307 (2008).
- 66) Ohno Y. Therapeutic role of 5-HT<sub>1A</sub> receptors in the treatment of schizophrenia and Parkinson's disease. *CNS Neurosci. Ther.* 17:58-65 (2011).
- 67) Ohno Y, Imaki J, Mae Y, Takahashi T, Tatara A. Serotonergic modulation of extrapyramidal motor disorders in mice and rats: role of striatal 5-HT<sub>3</sub> and 5-HT<sub>6</sub> receptors. *Neuropharmacology.* 60:201-208 (2011).
- 68) Ohno Y, Shimizu S, Tokudome K. Pathophysiological roles of serotonergic system in regulating extrapyramidal motor functions. *Biol. Pharm. Bull.* 36:1396-1400 (2013).
- 69) Shimizu S, Mizuguchi Y, Ohno Y. Improving the treatment of schizophrenia: role of 5-HT receptors in modulating cognitive and extrapyramidal motor functions. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets.* 12:861-869 (2013).

- 70) Duncan JR, Paterson DS, Kinney HC. The development of nicotinic receptors in the human medulla oblongata: inter-relationship with the serotonergic system. *Neuroscience*. 144:61-75 (2008).
- 71) Machaalani R, Say M, Waters KA. Serotonergic receptor 1A in the sudden infant death syndrome brainstem medulla and associations with clinical risk factors. *Acta Neuropathol.* 117:257-265 (2009).
- 72) Say M, Machaalani R, Waters KA. Changes in serotonergic receptors 1A and 2A in the piglet brainstem after intermittent hypercapnic hypoxia (IHH) and nicotine. *Brain Res.* 1152:17-26 (2007).
- 73) Best AR, Regehr WG. Serotonin evokes endocannabinoid release and retrogradely suppresses excitatory synapses. *J. Neurosci.* 28:6508-6515 (2008).