

博士論文

fMRIを用いた麻酔下ラットにおける
ドーパミンD1受容体の薬理学的機能評価

木村 友香

2023年4月18日

奈良先端科学技術大学院大学
先端科学技術研究科

本論文は奈良先端科学技術大学院大学 先端科学技術研究科に
博士(理学) 授与の要件として提出した博士論文である。

木村 友香

審査委員:

池田 和司 教授 (主指導教員)

佐藤 嘉伸 教授 (副指導教員)

稲垣 直之 教授 (副指導教員)

吉本 潤一郎 客員教授 (副指導教員)

fMRIを用いた麻酔下ラットにおける ドーパミンD1受容体の薬理的機能評価

木村 友香

内容梗概

ドーパミンD1受容体 (D1R)は、統合失調症、パーキンソン病や注意欠陥多動性障害などの疾患と関連することが示唆されており、治療標的として考えられている。しかしながら、未だにD1Rの神経生理学的機能は完全には明らかになっていないのが現状である。近年、fMRIやPETなどの画像解析法は、脳神経活動変化や受容体占有率をラットなどの実験動物からヒトまで同じ手法を用いて非侵襲的に測定できるため、中枢領域の創薬において重要であると考えられている。これまで、pharmacological functional MRI (phfMRI)は、薬理的介入に起因して誘発される局所的な血行動態変化を評価するために使用されてきた。このことからphfMRIは、非臨床研究と臨床研究をつなぎ、また特定の受容体の神経生理学的機能を理解するために有用なツールであると考えられる。fMRIで捉えられる神経活動に伴う信号値変化の根底には、血液酸素濃度依存性 (blood oxygenation level dependent: BOLD) 効果があり、これまでの臨床および非臨床研究では、BOLD信号が神経細胞活動変化の信頼できる指標となることが示されてきた。

本研究では、D1Rの神経生理学的機能評価を目的として、phfMRIを用いて、麻酔下ラット脳内におけるD1R作用に関連するBOLD信号変化を11.7TのMRIスキャナーを使用して調査した。D1特異的に作用するD1Rアゴニスト、D1Rアンタゴニスト投与によるBOLD信号変化を経時的に解析したところ、生理食塩水を投与したコントロール群と比較して、D1Rアゴニスト投与群では、線条体、視床、前頭前野、および小脳でBOLD信号の有意な増加を誘発した。一方で、D1Rアンタゴニスト投与群では、コントロール群と比較して、線条体、視床、および小脳でBOLD信号の有意な減少が認められた。以上のことから、D1R発現脳領域においてD1Rに関連するBOLD信号変化を検出することができ、また、D1Rアゴニストとイソフルラン麻酔の神経活動への影響を評価するため、mRNAレベルでc-fos初期遺伝子の発現レベルを測定した。その結果、イソフルラン麻酔の有無にかかわらず、D1Rアゴニスト投与によりBOLD信号の有意な増加が認められた脳領域においてc-fos発現レベルが上昇した。以上より、本研究では、phfMRIを用いることでD1Rアゴニスト/アンタゴニストによる直接的なD1R活性化/阻害によるBOLD信号変化が捉えられ、生体におけるD1R機能を神経生理学的に評価できることが示された。

キーワード

Pharmacological functional MRI; Dopamine D1 receptor; BOLD effect; ultra-high-field MRI; Brain imaging

Ultra-high-field pharmacological functional MRI of dopamine D1 receptor-related interventions in anesthetized rats

Yuka Kimura

Abstract

The dopamine D1 receptor (D1R) is associated with schizophrenia, Parkinson's disease, and attention deficit hyperactivity disorder. Although the receptor is considered a therapeutic target for these diseases, its neurophysiological function has not been fully elucidated. Pharmacological functional MRI (phfMRI) has been used to evaluate regional brain hemodynamic changes induced by neurovascular coupling resulting from pharmacological interventions, thus phfMRI studies can be used to help understand the neurophysiological function of specific receptors. Herein, the blood oxygenation level-dependent (BOLD) signal changes associated with D1R action in anesthetized rats was investigated by using a preclinical ultra-high-field 11.7-T MRI scanner. PhfMRI was performed before and after administration of the D1-like receptor agonist (SKF82958), antagonist (SCH39166), or physiological saline subcutaneously. Compared to saline, the D1-agonist induced a BOLD signal increase in the striatum, thalamus, prefrontal cortex, and cerebellum. At the same time, the D1-antagonist reduced the BOLD signal in the striatum, thalamus, and cerebellum by evaluating temporal profiles. PhfMRI detected D1R-related BOLD signal changes in the brain regions associated with high expression of D1R. We also measured the early expression of c-fos at the mRNA level to evaluate the effects of SKF82958 and isoflurane anesthesia on neuronal activity. Regardless of the presence of isoflurane anesthesia, c-fos expression level was increased in the region where positive BOLD responses were observed with administration of SKF82958. These findings demonstrated that phfMRI could be used to identify the effects of direct D1 blockade on physiological brain functions and also for neurophysiological assessment of dopamine receptor functions in living animals.

Keywords:

Pharmacological functional MRI; Dopamine D1 receptor; BOLD effect; ultra-high-field MRI; Brain imaging

* Doctoral Dissertation, Graduate School of Science and Technology, Nara Institute of Science and Technology, April 18, 2023.

目次

緒論	1
本論	3
第一章 phfMRIを用いた評価	3
第一節 BOLD信号変化マッピング	5
第二節 各脳領域における経時的なBOLD信号変化	11
第三節 小括	15
第二章 c-fosを用いた評価	16
総括	21
結論	23
謝辞	24
参考文献	25
業績リスト	30

图目录

Fig.1 Flow diagram of the MRI protocol used in the study -----	7
Fig. 2. BOLD signal change maps following s.c. injection of the D1-like receptor agonist, SKF82958. -----	8
Fig. 3. BOLD signal change maps following s.c. injection of D1-like receptor antagonist, SCH39166. -----	9
Fig. 4. Change in mean BOLD signal intensity during the course of experiment (% from the baseline) in the striatum (A), thalamus (B), PFC (C), and cerebellum (D). -----	13
Fig. 5. Effects of SKF82958 on c-fos mRNA expression level under awake conditions or under isoflurane anesthesia conditions, in the striatum (A), thalamus (B), and PFC (C). --	18

表目录

緒論

近年、国内において精神疾患を有する総患者数は年々増加傾向にある。今後、社会の高齢化が進むことで、様々な精神疾患の患者数はますます増加することが予想され、それは社会的な問題とされている [1]。

抗精神病薬の歴史は、1950年代に統合失調症治療薬として開発されたクロルプロマジンから始まった。クロルプロマジンは、第一世代抗精神病薬(フェノチアジン系)として分類されており、ドーパミンD2受容体 (D2R) に親和性を持ち、神経伝達物質の結合を競合的に阻害することで薬効を示すことがわかっている。その他、第一世代抗精神病薬としてはブチロフェノン系薬剤であるハロペリドールがよく知られている。これらの第一世代抗精神病薬は強力なD2R阻害作用を有する一方で、副作用として振戦や筋強剛など錐体外路症状を呈することが問題となった。その後、この第一世代の副作用を減じる薬理学的メカニズムを有する第二世代抗精神病薬(5H-2A受容体遮断・他の受容体に関与+緩いD2R遮断・D2R部分作動薬)が開発された。第二世代抗精神病薬は、従来の第一世代抗精神病薬と比較すると格段に錐体外路症状などの副作用の発現が抑えられている。しかしながら、依然として副作用のない新たな作用機序を持つ新薬が求められている。

本研究で着目したドーパミン神経系は、統合失調症、パーキンソン病、注意欠陥多動性障害 (ADHD) などの精神疾患・神経変性疾患の病態生理に対する関与が示唆されており、抗精神病薬の治療薬の標的となることが報告されている [2-4]。現在までに、ドーパミン受容体は5つのサブタイプを有し、薬理学的にD1様受容体 (D1R, D5R) とD2様受容体 (D2R, D3R, D4R) の2つに大別される。これまでの研究では、ドーパミンD2/D3受容体 (D2R/D3R) およびドーパミントランスポーター (dopamine transporter: DAT) が神経疾患の病因に関連しているとして研究が盛んに行われてきた(先に述べたような統合失調症の古典的ドーパミン仮説である)。現在、統合失調症とパーキンソン病の主な治療薬は、それぞれD2R/D3Rアンタゴニストとアゴニストである [5-7]。また、DATを阻害し、シナプスおよびシナプス外ドーパミンを増加させるメチルフェニデートは、現在ADHDの第一選択薬である [8]。一方、ドーパミンD1受容体(D1R)は、治療標的として注目されているものの、未だにD1Rの神経生理学的機能は完全には明らかになっていないのが現状である。

D1Rは、尾状核、側坐核、黒質、前頭前皮質 (prefrontal cortex: PFC) に高発現している [9, 10]。この受容体は、黒質、中脳、中脳皮質のドーパミン経路に沿った神経伝達に不可欠であり [11]、これらの経路に沿った神経伝達は脳の運動制御、ワーキングメモリー、注意、報酬処理機能を維持していることがわかっている [12-15]。このようにD1Rは脳の様々な機能に対して重要な役割を担っている。本論文は、D1Rの脳全体の神経生理学的機能について、近年中枢領域の創薬において着目されている薬理的機能的磁気共鳴画像法 (Pharmacological functional magnetic resonance imaging: phfMRI) を実施することで、D1Rの神経生理学的機能を評価した。本研究によって、新たな抗精神病薬開発に繋がる有益な知見を得たため、博士論文としてまとめた次第である。

本論

第一章 phfMRIを用いた評価

近年、機能的磁気共鳴画像法 (functional magnetic resonance imaging: fMRI) やポジトロン断層撮影 (Positron Emission Tomography :PET) などの画像解析法は、脳神経活動変化や受容体占有率をラットなどの実験動物からヒトまで同じ手法を用いて非侵襲的に測定できるため、中枢領域の創薬において重要であると考えられている。

fMRIは、1990年頃から脳機能を解明する技術として使用されてきた。この非侵襲的な機能的イメージング技術は、脳の血流変化に基づいて神経活動(神経細胞の電氣的活動)を間接的に測定する手法である。このfMRIで捉えられる神経活動に伴う信号値変化の根底には、血液酸素濃度依存性 (blood oxygenation level dependent: BOLD) 効果がある [16]。

BOLD効果のメカニズムは以下のとおりである。血液の主血球成分である赤血球には、ヘモグロビンが含まれており、反磁性を示す酸素化ヘモグロビンと常磁性を示す脱酸素化ヘモグロビンに分けられる。反磁性体が多い領域では、周囲の磁場の均一性が低下し、磁気共鳴信号 (MRI画像における信号値) が低下する。この信号低下がBOLD効果である。

fMRI では、BOLD 効果に鋭敏なT2, T2* 強調画像を撮像することで脳機能の画像化を行っている [17, 18]。ある局所的な脳領域において、神経活動が生じるとそれに伴って酸素が消費され、脱酸素化ヘモグロビンが増加する(つまり、MRI画像の信号値が低下する)。次に、神経細胞に酸素を供給するために局所脳血流量が増大し、酸素化ヘモグロビンが流入・脱酸素化ヘモグロビンが減少する。常磁性を示す脱酸素化ヘモグロビンが減少することで、磁場の均一性が上昇し、MRI画像の信号値が上昇する。このように、fMRIは血液中の脱酸素化ヘモグロビン量に応じて生じる信号値の変化を見ており、間接的に神経活動を評価する手法であるといえる。

これまでの臨床および非臨床研究では、Lauritzenら [19] に記載されている実験に基づきBOLD信号が神経細胞活動変化の信頼できる指標となることが示されてきた。さらに、薬理的fMRI (phfMRI) は、冒頭で述べたとおり、医薬品開発において独自の地位

を確立している。これまでphfMRIは、特定の受容体の神経生理学的機能の評価や薬理的介入の効果を評価するために使用されてきた [20-22]。また、これまでにphfMRIがin vivoでドーパミン神経伝達を含む神経伝達物質の機能変化を調べるために有用な非侵襲的ツールとなることが報告されている [23]。このことからphfMRIは、非臨床研究と臨床研究をつなぎ、また特定の受容体の神経生理学的機能を理解するために有用なツールであると考えられる。

臨床では1.5Tや3Tという磁場強度が一般的であるが、本研究では、それよりもはるかに強力な磁場を発生する小動物用11.7TのMRIスキャナーを使用した。11.7TのMRIスキャナーを利用するメリットとしては、磁場強度が上がることによるS/N比向上(高い空間分解能での撮像が可能)が挙げられる。ある研究では、11.7TのMRIスキャナーを用いることにより、高感度化が実現し、平面分解能が50 μ m程度の分解能で明瞭な画像が得られたという報告がある [24]。本研究では、11.7TのMRIスキャナーを使用しているため、比較的優れた空間解像度で画像の信号値の変化を直接測定することができ、より正確に神経の活動部位を特定できると考えられる。また、11.7TのMRIスキャナーを使用することにより、より大きくT2が強調されるためBOLDによる微小な信号変化をより強調して観測できるという利点がある。

本研究を実施するにあたり、先行研究について調査を実施した。これまでphfMRIは、様々な受容体アゴニストやアンタゴニストに対する反応を研究するために使用されてきた。ドーパミン系に関しては、Haginoら [25] が、D2Rが存在する視床下部などの特定の脳領域において、ブロモクリプチン(D2Rアゴニスト)は正のBOLD信号変化を示し、ハロペリドール(D2Rアンタゴニスト)は負のBOLD信号変化を示したと報告している。この結果から、D2RアゴニストとD2Rアンタゴニストは、アゴニストによる正のBOLD信号変化とアンタゴニストによる負のBOLD信号変化という、相反するphfMRI反応をもたらす可能性が示された。一方、本研究にて着目した、D1Rに関する直接的な反応をphfMRIで調べた研究はほとんどなく、phfMRIを用いてD1R活性化/阻害によるBOLD信号変化を検証した報告は本研究が初めてであった。

第一節 BOLD信号変化マッピング

実験方法

動物

動物種は、Wistar系雄性ラット21匹(8週齢、株式会社チャールズリバーラボラトリーズジャパン)を使用し、D1Rアゴニスト投与群(n=7)、D1Rアンタゴニスト投与群(n=7)、生理食塩水投与群(n=7)の3つの処置群に振り分けた。ラットは、実験の1週間前に温度(22±2°C)および湿度(55±10%)制御された動物室内に搬入され、12時間/12時間の明暗サイクルで3匹/ケージで集団飼育し、餌と水を自由に摂取できるようにした。

化合物

D1RアゴニストであるSKF82958 (6-chloro-2,3,4,5-tetrahydro-1-phenyl-3-[2-propenyl]-1H-3-benzazepine-7,8-diol hydrobromide) は Sigma-Aldrichから購入した。D1RアンタゴニストであるSCH39166 ([6aS-trans]-11-chloro-6,6a,7,8,9,13b-hexahydro-7-methyl-5H-benzo[d]naphth[2,1-b]azepin-12-ol hydrobromide) は Tocris Bioscienceから購入した。先行文献 [26, 27] より、SKF82958は0.6 mg/mL、SCH39166は0.2 mg/mLの濃度で生理食塩水に溶解させ、5 mL/kgで皮下投与することにした。また、コントロール群としては、生理食塩水を投与した。

fMRI実験プロトコル

fMRI実験は、大阪大学 免疫学フロンティア研究センターが所有する小型動物用11.7 Tesla vertical-bore Bruker Avance II MR imaging system (Bruker Biospin) を用いて実施した。全画像は、送受信用のボリューム高周波(RF)コイル(m2m Imaging Corp.)およびParaVision 5.1 ソフトウェア(Bruker)を使用して取得した。

ラットは、吸入麻酔器に連結したノーズコーンを介して1-2%イソフルラン(Abbott Laboratories)で麻酔をかけた。呼吸数は、MR対応モニタリングシステム(SA Instruments, Inc.)で実験中は確認を行った。まず、ラットを麻酔して正向反射が消失していることを確

認した後、動物を特注ホルダーに入れて、切歯バーと粘着テープを使って頭部を固定することで頭部の動きを最小限に抑えた。その後、fMRI実験中にMRI装置から動物を取り出さずに化合物を投与するため、輸液ラインとともに輸液カニューレを動物の背部皮下に挿入し、粘着テープで固定した。

MRI撮像方法やプロトコルは、以下の通りである。

まずは、脳全体の構造を把握するために、2次元RARE法(2D multi-slice rapid acquisition with a relaxation enhancement sequence)にて参照画像を撮像した。2次元RARE法の撮像プロトコルは、repetition time (TR) = 6,000 ms、echo time (TE) = 43.9 ms、RARE factor = 16、field of view (FOV) = 3.0 cm × 3.0 cm、slice thickness = 0.5 mm、matrix = 256 × 256 × 48、acquisition time = 12 minであった。その後、BOLD fMRIデータを取得するために、multi-slice RARE法を用いて撮像した。multi-slice RARE法の撮像プロトコルは、TR = 4,166.7ms、TE = 60ms、RARE factor = 16、FOV = 3.0cm × 3.0cm、slice thickness = 1.0mm、matrix = 128 × 128 × 24、acquisition time = 5 min / measurement pointであった。

fMRI画像データは、D1R アゴニストであるSKF82958、D1RアンタゴニストであるSCH39166、またはコントロールである生理食塩水を皮下投与する前に60分間連続して取得した。投与後は、90分間にわたって継続してfMRI画像データを取得した。各動物について、fMRI画像データの総取得時間は約150分であった(Fig. 1)。

解析方法

MRIで撮像した全ての画像データは、MATLAB 2015a (The MathWorks, Inc.) の Statistical Parametric Mapping 12 (SPM12) ソフトウェア (The Wellcome Centre for Human Neuroimaging, UCL Queen Square Institute of Neurology) を用いて分析した。東北大学加齢医学研究所が提供しているラット全脳テンプレート [28] を用いて、すべての形態画像において、解析精度を上げるためにSkull strippingにより頭蓋を除去し、brain maskingを実施した。realignment, normalization to a template, smoothingなどの画像前処理を実施した後、「on/off model」を適用して、化合物投与前後のBOLD画像の統計的な差異を評価した。fMRI画像データは30分毎に集計し、Pre 0-30 min, Post 30-60 min, 60-90 min,

90-120 min の4つに分けて統計解析を実施した (Fig. 1)。

二次解析は、fMRIの活性化コントラストパターンとしてt-コントラストマップ (t-map) を生成するために行った。t-mapは、fMRI研究において、神経活動を描写するためによく使用される解析手法である [29]。生成されたt-mapは、対応する解剖学的脳領域にオーバーレイされた。統計的パラメトリックマップのグループ統計的有意性は、SKF82958投与群 vs 生理食塩水投与群、SCH39166投与群 vs 生理食塩水投与群の比較により、化合物投与後のBOLD信号変化の t-コントラストとして表示された。クラスターレベル解析は、統計的有意性を $p < 0.05$ (Family Wise Error [FWE]-corrected, cluster size > 450 pixels, $T > 2.68$) とし、時点における多重比較の補正をせずに実施した。

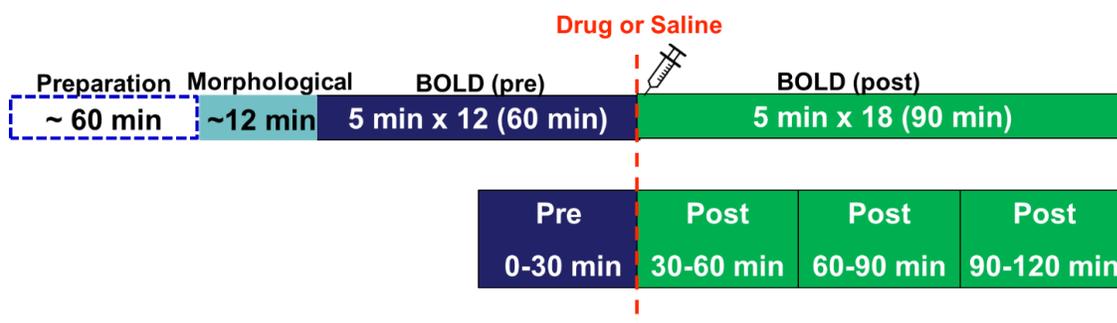


Fig. 1. Flow diagram of the MRI protocol used in the study

結果

Fig. 2およびFig. 3は、D1RアゴニストであるSKF82958およびD1RアンタゴニストであるSCH39166をラットに投与した際の脳内BOLD信号変化を表している。全体としては、D1Rアゴニスト投与群およびD1Rアンタゴニスト投与群のいずれも、コントロール群と比較して、BOLD信号変化を引き起こした。

D1RアゴニストであるSKF82958投与群では、Post 0-30 minで主に上丘と小脳においてBOLD信号が増加し、Post 60-90 minまで持続した (Fig. 2A)。また、SKF82958は、Post 30-60 minおよびPost 60-90 minにおいて、嗅覚下皮質、線条体および視床におけるBOLD信号を増加させた (Fig. 2A)。SKF82958によって生じた有意なBOLD信号の減少

は、Post 0-30 minで顔面核周辺の脳領域で検出された (Fig. 2B)。

一方、D1RアンタゴニストであるSCH39166投与群では、Post 0-30 minで、視床と小脳におけるBOLD信号が減少し、Post 60-90 minまで持続した (Fig. 3B)。また、Post 60-90 minには線条体および上丘で有意なBOLD信号の減少が認められた (Fig. 3B)。一方、Post 30-60 minおよびPost 60-90 minでは、脳下垂体皮質でBOLD信号の有意な増加が観察された (Fig. 3A)。

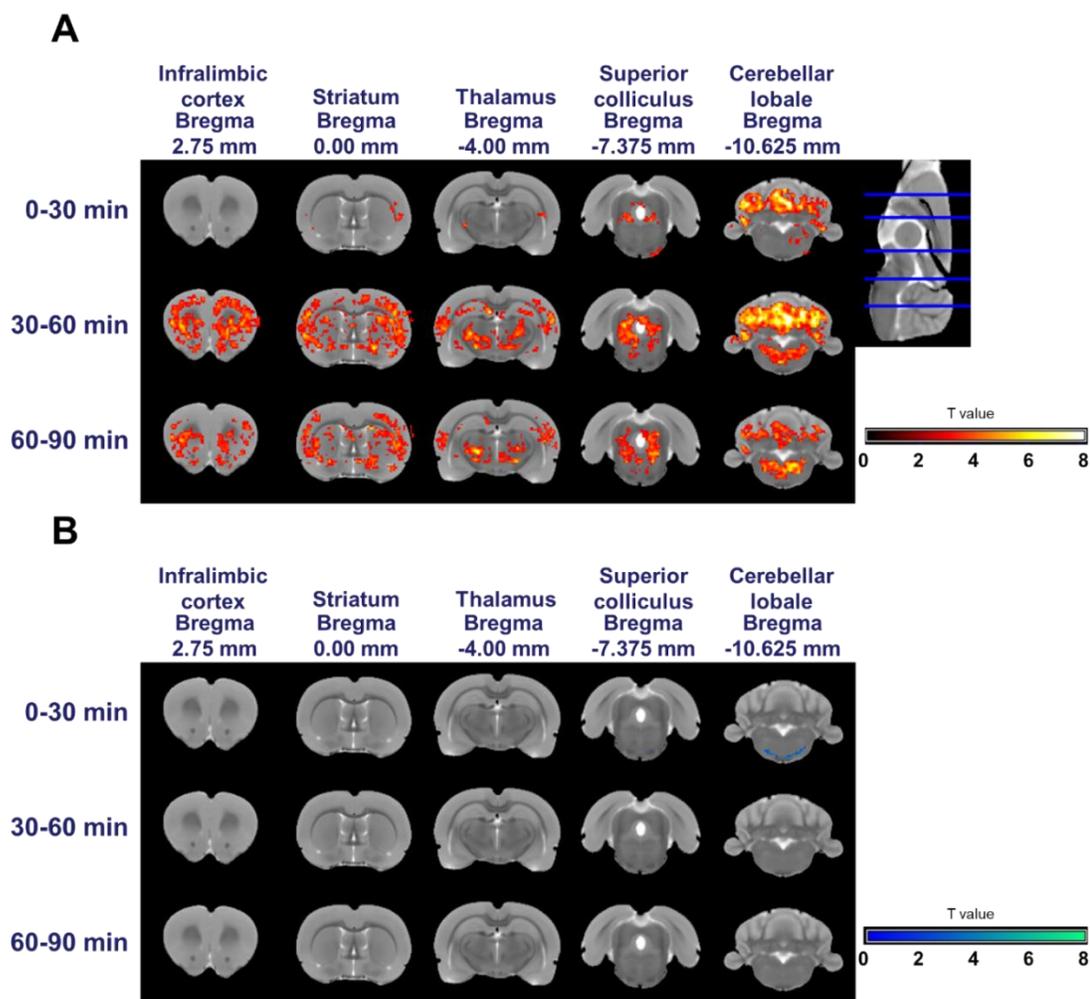


Fig. 2. BOLD signal change maps following s.c. injection of the D1-like receptor agonist, SKF82958. The maps represent the contrast between saline treated and SKF82958 treated animals. The maps in (A) show the regions with increased BOLD signals. Those in (B) show the regions with decreased BOLD signals. Scale bar indicates the random effect T

values.

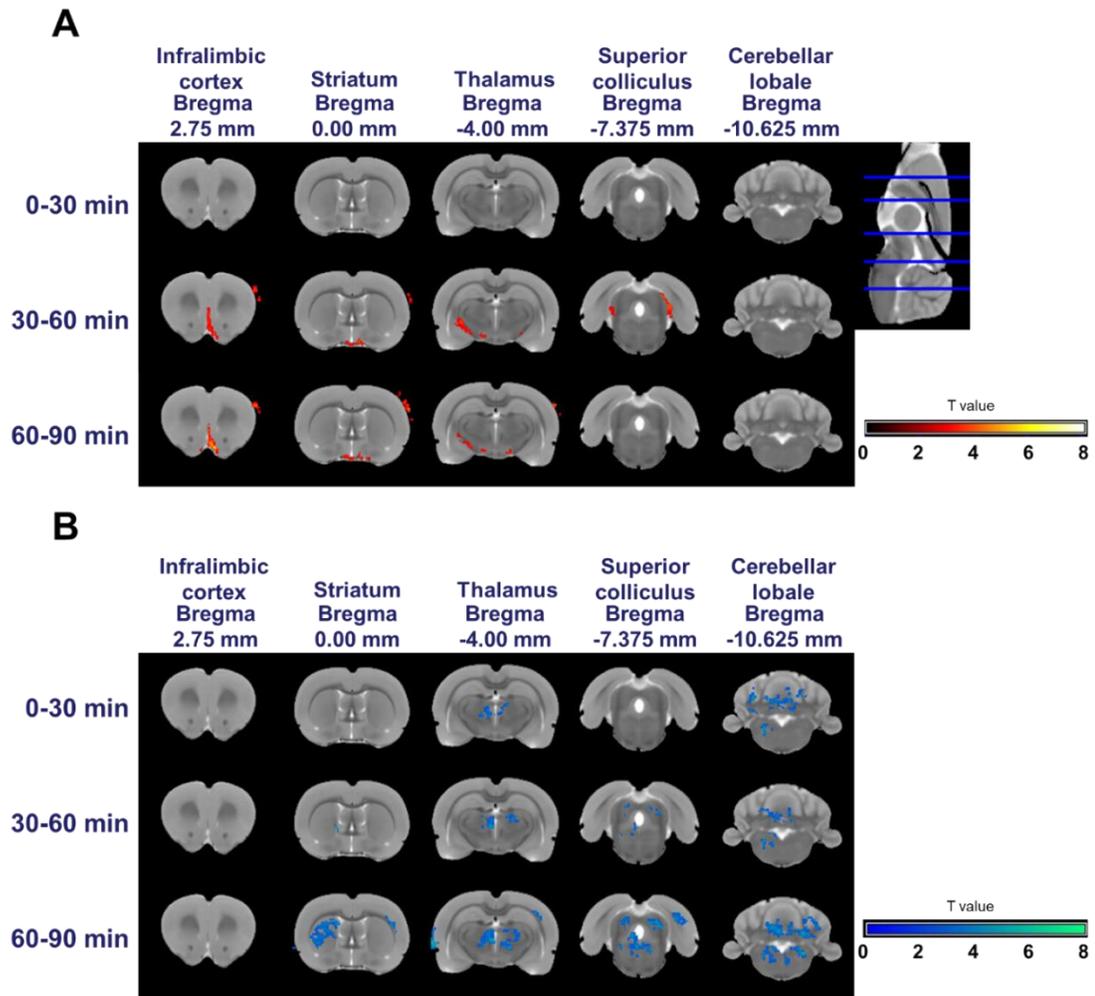


Fig. 3. BOLD signal change maps following s.c. injection of D1-like receptor antagonist, SCH39166. The maps represent the contrast between saline treated and SCH39166 treated animals. The maps in (A) show the regions with increased BOLD signals. Those in (B) show the regions with decreased BOLD signals. Scale bar indicates the random effect T values.

考察

本節では、phfMRIを用いてDIR活性化/阻害による脳領域におけるBOLD信号変化を検証した。その結果、DIRアゴニストとDIRアンタゴニストは、主に線条体、視床、嗅覚下

皮質、小脳など、ドーパミン作動性経路が確立されている脳領域 [9, 10, 30] で異なる BOLD信号変化を引き起こすことがわかった。これらの脳領域は、精神疾患における運動機能、ワーキングメモリー、注意、報酬処理機能を維持していることが示唆されている [12-15]。また、Guitart-Masipら [31] は、皮質下領域のBOLD信号変化が、ドーパミン作動性経路と認知機能に関連していることを報告している。以上のことから、本節での結果は、D1Rの生理的役割を反映していると考えられる。

また、D1Rに関する直接的なBOLD信号変化を検証した研究ではないものの、Dixonら [32]は、アンフェタミンを単独またはD1RアンタゴニストであるSCH23390で前処理した後の脳内活動変化について報告している。アンフェタミンは、ヒト研究において薬理チャレンジ剤として広く用いられており、上記の研究では、SCH23390はPFC、線条体、淡蒼球、視床、海馬、下帯束、小脳におけるアンフェタミン誘発BOLD信号を抑制することを示した [32]。この結果は、本研究で報告したとおり、線条体、視床、脳下垂体、小脳などの脳領域におけるD1R阻害に対するBOLD反応と一致する。一方、先行報告 [32]とは対照的に、本研究では淡蒼球と海馬に有意なBOLD信号変化は認められなかった。この相違は、実験プロトコルの違いによるものと考えられる。先行研究がアンフェタミン誘発性のドーパミン遊離(ドーパミン伝達亢進)に対するD1R阻害に焦点を当て、アンフェタミン投与による機能的反応を調査したのに対し、本研究では特に直接的なD1R阻害 (D1R活性化も含める) に着目した。

第二節 各脳領域における経時的なBOLD信号変化

実験方法

動物

第一章 第一節と同上。

化合物

第一章 第一節と同上。

fMRI実験プロトコル

第一章 第一節と同上。

解析方法

線条体、視床、PFC、小脳において、各動物の経時的なBOLD信号を測定した。

Paxinos-Watson rat brain atlas [33] を参考に、ITK-SNAP [34] (ver.3.4.0) を用いて形態画像の脳領域を手動でセグメンテーションした。形態画像とセグメント化した関心領域 (Region of Interest: ROI) をそれぞれのphfMRI画像に重ね合わせ、平均的なBOLD信号の時間変化を描出した。化合物投与前の 0-, 5-, 10-, 15-, 20-, 25-minuteの各時点での平均BOLD信号を算出し、これらの平均値をベースラインとして減算した。

統計解析は、GraphPad Prism7 (GraphPad Software Inc.) を用いて、二元配置分散分析 (two-way ANOVA)、事後検定としてBonferroni検定を実施した。

結果

Fig. 4は、線条体 (Fig. 4A)、視床 (Fig. 4B)、PFC (Fig. 4C)、小脳 (Fig. 4D) におけるBOLD信号強度の時間経過を示している。ROIにかかわらず、全体のBOLD信号はD1RアゴニストであるSKF82958投与後に増加し、D1RアンタゴニストであるSCH39166投与後に減少した (Fig. 4)。全体としては、D1Rアゴニスト投与群およびD1Rアンタゴニスト投与群の両方が、コントロール群と比較してBOLD信号の変化を引き起こした。

脳領域毎に分散分析 (ANOVA) の結果をまとめると、線条体では、ANOVA により、化合物投与 ($F(2, 18) = 16.61, p < 0.0001$)、時間 ($F(17, 306) = 1.99, p = 0.0117$) およびそれ

らの交互作用 ($F(34, 306) = 3.473, p < 0.0001$) に有意差が認められた。視床では、ANOVAにより、化合物投与 ($F(2, 18) = 17.26, p < 0.0001$) および化合物投与と時間の交互作用 ($F(34, 306) = 2.624, p < 0.0001$) が有意に示されたが、時間 ($F(17, 306) = 0.7394, p = 0.7614$) は有意ではなかった。PFCでは、ANOVAにより、化合物投与 ($F(2, 18) = 2.885, p = 0.0819$)、時間 ($F(17, 306) = 6.2, p < 0.0001$) およびそれらの交互作用 ($F(34, 306) = 2.05, p = 0.0008$) の効果が有意に認められた。小脳では、ANOVAにより、化合物投与 ($F(2, 18) = 7.015, p = 0.0056$)、時間 ($F(17, 306) = 17.57, p < 0.0001$) およびそれらの交互作用 ($F(34, 306) = 3.253, p < 0.0001$) の有意差が認められた。

D1RアゴニストであるSKF82958を投与した動物の線条体では、コントロール群と比較して、45 min からシグナル強度が有意に高くなり、115 min でもこの効果は持続していた (Fig. 4A)。視床では、55 min からシグナルが有意に高くなり、105 min までにオーバーした (Fig. 4B)。PFCも60 min から90 min にかけて有意に高い信号を示し、徐々にベースラインに戻った (Fig. 4C)。小脳の傾向も同様で、すなわち45 min から90 min の間に有意に高くなり、徐々にベースラインに戻った (Fig. 4D)。

D1RアンタゴニストであるSCH39166を投与すると、D1Rアゴニスト投与群と比較して逆の傾向が見られた。線条体のBOLD信号はD1Rアンタゴニスト投与後に低下し、投与後110 min および115 min でもコントロール群と比較して有意に低いままであった (Fig. 4A)。視床の信号も同様のパターンを示し、D1Rアンタゴニスト投与後40 min、75 min、105 min 以降でコントロール群と比較して有意な差が認められた (Fig. 4B)。PFCと小脳でも同様の傾向が認められたが、有意性は限られた時間ポイントでしか見られなかった (Fig. 4D)。

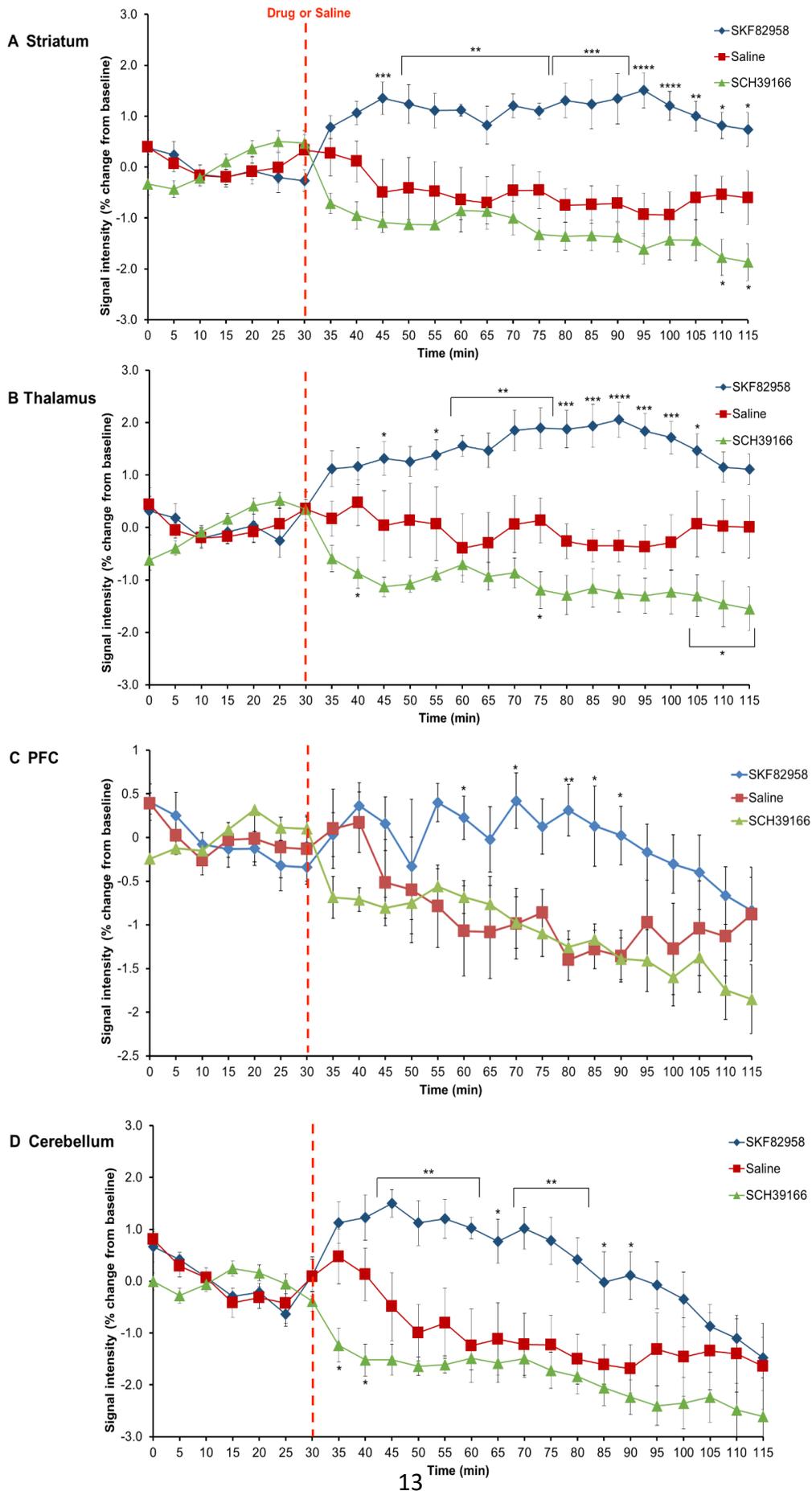


Fig. 4. Change in mean BOLD signal intensity during the course of experiment (% from the baseline) in the striatum (A), thalamus (B), PFC (C), and cerebellum (D). Blue line, SKF82958; red line, saline; green line, SCH39166. Data are represented as the mean \pm SEM. SEM (n = 7). *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001 vs. saline-treated group (two-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparisons test).

考察

本節では、phfMRIを用いて、線条体、視床、PFC、小脳において、各動物の経時的なBOLD信号を測定した。その結果、全体的な傾向として(各脳領域に程度の差が認められるが)、コントロール群と比較してD1Rアゴニスト投与群では正のBOLD信号変化を、D1Rアンタゴニスト投与群では負のBOLD信号変化を引き起こした。特に、PFCと小脳でコントロール群の平均BOLD信号値が経時的に減弱しており、イソフルランによる麻酔の影響であると考えられた。

第三節 小括

ドーパミン神経系は、統合失調症、パーキンソン病、注意欠陥多動性障害 (ADHD) などの精神疾患・神経変性疾患の病態生理に対する関与が示唆されており、抗精神病薬の治療薬の標的となることが報告されている。しかしながら、D1Rは、治療標的として注目されているものの、未だにD1Rの神経生理学的機能は完全には明らかになっていないのが現状である。そこで本章では、phfMRIを用いて直接的なD1R活性化/阻害による脳領域におけるBOLD信号変化を検証した。その結果、D1Rアゴニストとアンタゴニストは、主に線条体、視床、嗅覚下皮質、小脳など、ドーパミン作動性経路が確立されている脳領域で異なるBOLD信号変化を引き起こすことがわかった。また、線条体、視床、PFC、小脳において、経時的なBOLD信号を測定したところ、コントロール群と比較してD1Rアゴニスト投与群では正のBOLD信号変化を、D1Rアンタゴニスト投与群では負のBOLD信号変化を引き起こすことがわかった。以上の結果から、本章での結果は、D1Rの生理的役割を反映していると考えられた。次章では、脳における代表的な最初期遺伝子であるc-fosを測定することによって、本章で認められたBOLD信号変化がD1R活性化による神経活動を反映しているかを確認し、本章第二節で見られたようなBOLD信号値の経時的な減弱がイソフルラン麻酔による影響であるかどうかを検証した。

第二章 c-fosを用いた評価

神経細胞が活性化することによって最初に誘導されてくる遺伝子群は最初期遺伝子 (Immediate Early Gene: IEG) と呼ばれている。IEGの中でも最も古くから知られているのがc-fosであり、神経細胞においては、脱分極刺激、神経伝達物質やホルモン、ストレスなどの神経活動を活性化する様々な刺激がc-fos発現を引き起こすことが知られている [35]。そのため、c-fos発現は神経活動の間接的な指標として利用されており、神経でのc-fos mRNA発現量の増加は神経活動があったことを示している。

本章では、第一章で認められたBOLD信号変化がD1R活性化による神経活動を反映しているかを確認し、第一章第二節でコントロール群のBOLD信号値が経時的に減弱していたことを踏まえて、イソフルラン麻酔下では覚醒状態よりも神経活動が低下するという仮説を検証するために、c-fos mRNA発現量の変化を測定することにした。

実験方法

動物

動物種は、Sprague-Dawley系雄性ラット 21匹 (7週齢、株式会社チャールズリバーラボラトリーズジャパン) を使用し、覚醒状態での生理食塩水投与群 (n = 5) ; 覚醒状態でのD1Rアゴニスト投与群 (n = 5) ; イソフルラン麻酔下での生理食塩水投与群 (n = 5) ; イソフルラン麻酔下でのD1Rアゴニスト投与群 (n = 6) の4つの処置群に振り分けた。ラットは、実験の1週間前に温度 (22±2°C) および湿度 (55±10%) 制御された動物室内に搬入され、12時間/12時間の明暗サイクルで3匹/ケージで集団飼育し、餌と水を自由に摂取できるようにした。脳組織のc-fos発現は、各ラットで測定した。

化合物

D1RアゴニストであるSKF82958 (6-chloro-2,3,4,5-tetrahydro-1-phenyl-3-[2-propenyl]-1H-3-benzazepine-7,8-diol hydrobromide) は Sigma-Aldrichから購入した。先行文献 [25, 26] より、SKF82958は0.6 mg/mLの濃度で生理食塩水に溶解させ、5 mL/kgで皮下投与することにした。また、コントロール群として、生理食塩水を投与した。

c-fos実験プロトコル

イソフルラン麻酔条件下では、覚醒状態よりも神経活動が低下する可能性があると考え、SKF82958 (3 mg/kg) または生理食塩水を皮下投与したイソフルラン麻酔下動物および覚醒動物で、c-fos mRNA発現量を測定した。

RNeasy Mini Kit (Qiagen N.V.)を除くすべての化合物およびRNA解析用キットは、Thermo Fisher Scientific Inc. から入手した。まず、動物の体重を測定し、動物にSKF82958または生理食塩水を投与した。その後、イソフルラン麻酔または覚醒下で動物を静置し、投与60分後に、断頭によってラットを安楽死させてから全脳を摘出した。全脳のうち、線条体、視床、PFCを解剖で摘出し、-80 °Cで凍結してから、RNA安定化液 (RNAlater) 中で固定した。各サンプルにおいて、RNeasy Mini Kitを用いてRNAを精製し、RiboGreen RNA Quantification Kitを用いて定量化した。Total RNA (1.0 µg)をHigh-capacity cDNA Reverse Transcription Kitを用いてcDNAに変換した。リアルタイム定量ポリメラーゼ連鎖反応は、cDNA (50 ng)、c-fos (Rn00487426-g1) の遺伝子特異的プライマー、18S rRNA (T Eukaryotic 18S rRNA Endogenous Control)、TaqMan Gene Expression Master Mixを含む反応液20 µlで行った。反応は、Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR system (サーマルサイクリング条件: 50 °C 2 分、95 °C 10 分、95 °C 15 秒[40 サイクル]、60°C 1 分)。収集したデータはすべて $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ 法 [36]で解析し、ハウスキーピング遺伝子である18S rRNAに正規化した。c-fos mRNA発現量の相対的変化は、覚醒状態での生理食塩水群をコントロール群として平均値で補正することにより算出した。

解析方法

統計解析は、GraphPad Prism7 (GraphPad Software Inc.) を用いて、二元配置分散分析(two-way ANOVA)、事後検定としてBonferroni検定を実施した。

結果

イソフルラン麻酔がDIR関連の神経細胞変化にどのような影響を与えるのかを評価するために、SKF82958 (3 mg/kg) または生理食塩水を皮下投与したイソフルラン麻酔下動

物および覚醒下動物のc-fos mRNA発現量を測定した。Fig. 5は、線条体(Fig. 5A)、視床(Fig. 5B)、PFC(Fig. 5C)において、覚醒状態の生理食塩水投与群を1とした際の、D1RアゴニストであるSKF82958投与群の相対的なc-fos mRNA量を示したものである。その結果、イソフルラン麻酔の有無にかかわらず、D1Rアゴニストは線条体、視床、PFCにおいてc-fos mRNAの発現レベルを増加させた。しかしながら、覚醒状態でのD1Rアゴニストによる線条体、視床、PFCのc-fos mRNA発現レベルの増加は、イソフルラン麻酔条件下では減弱した。これらの結果は、イソフルラン麻酔がD1Rを発現する脳領域およびD1Rを発現する脳領域と、間接的に関連する脳領域において、神経活動を低下させることを示唆した。

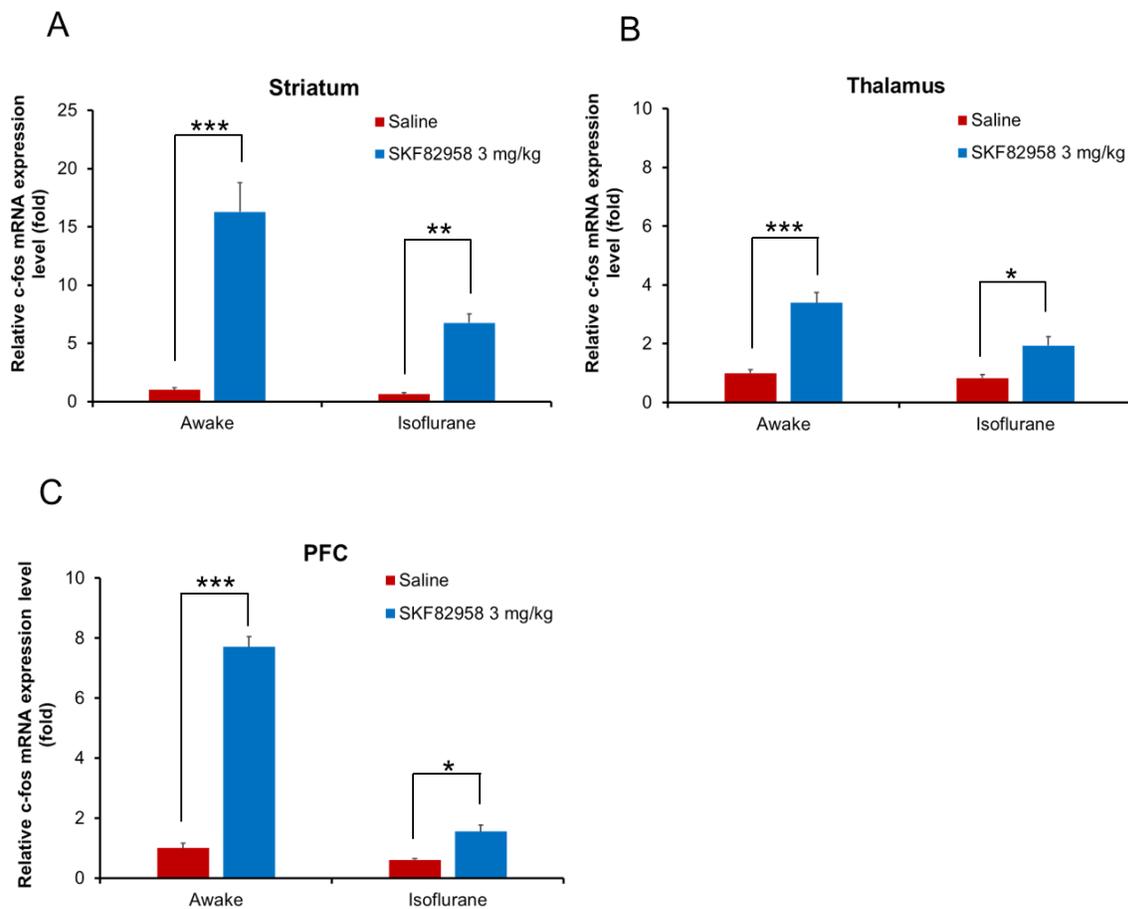


Fig. 5. Effects of SKF82958 on c-fos mRNA expression level under awake conditions or

under isoflurane anesthesia conditions, in the striatum (A), thalamus (B), and PFC (C). Data are represented as the mean \pm SEM (n = 5 or 6). *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.0001 vs. saline-treated group (two-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparisons test).

考察

本章では、第一章で認められたBOLD信号変化がD1R活性化による神経活動を反映しているかを確認し、第一章第二節でコントロール群のBOLD信号値が経時的に減弱していたことを踏まえて、イソフルラン麻酔下では覚醒状態よりも神経活動が低下するという仮説を検証するために、c-fos mRNA発現量の変化を測定することにした。その結果、イソフルラン麻酔の有無にかかわらず、D1Rアゴニストは線条体、視床、PFCにおいてc-fos mRNAの発現レベルを増加させた。また、覚醒状態でのD1Rアゴニストによる線条体、視床、PFCのc-fos mRNA発現レベルの増加は、イソフルラン麻酔条件下では減弱していたことから、仮説のとおり、イソフルラン麻酔下では覚醒状態よりも神経活動が低下することが明らかとなった。

5-HT_{1B/2C}受容体アゴニストである m-chlorophenylpiperazine を用いて、BOLD fMRIとc-fos発現測定を比較した先行研究がある [37]。その結果、両手法において、m-chlorophenylpiperazine によって、低食欲、不安、ホルモン分泌を媒介する大脳辺縁系脳領域が活性化したことが示唆された。また、Starkら [37] は、c-fosが発現した脳領域と正のBOLD信号が認められた脳領域との間に相関関係があったことを報告している。本研究でも、D1RアゴニストであるSKF82958の投与により正のBOLD信号変化が認められた領域で、c-fos発現レベルが上昇していた。逆に、Starkらの研究 [37] では、c-fosタンパク質が誘導された領域や誘導されなかった領域では、fMRIによって負のBOLD信号が検出された。負のBOLD信号については議論の余地があり、BOLD信号が低下する一般的な仮説として、hemodynamic steal 仮説 (blood-steal 仮説) がある [38-40]。いくつかの研究では、負のBOLD信号変化が認められる領域は、酸素供給量と代謝が低下しており、神経細胞の活性が低下していることが示されている [41,42]。これらの研究では、代謝の低下と脳血

流の局所的減少が負のBOLD信号を引き起こすことを示唆している。

D1様受容体であるD1RとD5Rは、膜貫通ドメインにおいて80%の配列類似性を有している [43] ため、D1RとD5Rはアゴニストやアンタゴニストによって薬理的に区別することは困難である。SKF82958のD5Rの対する選択性は明らかにされていないが、先行研究 [44] によると、SKF82958による回転行動が選択的D1RアゴニストであるSCH23390によって阻害されたことから、SKF82958に対する薬理反応は主にD1Rを介して惹起されることを示唆した。また、脳全体でD5R mRNAの発現量はD1R mRNA量よりも少なかった [45, 46]。従って、SKF82958に対するBOLD信号応答は、主にD1Rを介したものであると考えることができる。

脳領域の微小血管にはD1RおよびD5RのmRNAが発現しており、ドーパミン作動薬に伴う血行動態カップリングを測定する上で、ドーパミンの血管系への直接的な作用は無視できない [47]。Choiら [47] は、ドーパミンが微小血管に発現するD1Rに反応する可能性を示唆したが、本研究ではc-fos実験で神経細胞の活性化を確認しており、神経細胞に発現するD1Rへの反応が検出できていると考えている。

また、本研究では、非臨床のイメージング研究においては一般的に使用され、麻酔深度のコントロールが容易であるイソフルランを麻酔薬として選択した [48]。イソフルランなどの麻酔薬は、脳内一酸化窒素濃度への影響を介して脳血流や代謝に関与し、BOLD効果に影響を与える可能性がある [49]。本研究では、覚醒状態と比較して麻酔状態でc-fos発現量が30~70%減少した。特に、PFCのc-fos発現量は麻酔状態で70%減少したが、phfMRIでは麻酔状態でもこの神経活動変化を定性的に評価することができた。以上のことから、本研究では、D1R高発現脳領域を含む特定の脳領域において、D1Rに関連したBOLD信号変化を捉えることができたと考えられる。

総括

D1Rは、統合失調症、パーキンソン病や注意欠陥多動性障害などの疾患と関連することが示唆されており、治療標的として考えられているものの、未だにD1Rの神経生理学的機能は完全には明らかになっていないのが現状である。

本研究では、近年中枢領域の創薬において着目されているphfMRIを用いて、D1R活性化/阻害による脳領域におけるBOLD信号変化を検証し、D1Rの神経生理学的機能を評価した。その結果、D1RアゴニストとD1Rアンタゴニストは、主に線条体、視床、嗅覚下皮質、小脳など、ドーパミン作動性経路が確立されている脳領域 [9, 10, 30] で異なるBOLD信号変化を引き起こすことがわかった。また、線条体、視床、PFC、小脳の各脳領域において、経時的なBOLD信号変化を測定したところ、D1Rアゴニストは正のBOLD信号変化を、D1Rアンタゴニストは負のBOLD信号変化を引き起こすことがわかった。これらの脳領域は、精神疾患における運動機能、ワーキングメモリー、注意、報酬処理機能を維持していることが示唆されており [12-15]、この結果は、D1Rの生理的役割を反映していると考えられる。

また、phfMRIで認められたBOLD信号変化がD1R活性化による神経活動を反映しているかを確認し、イソフルラン麻酔下では覚醒状態よりも神経活動が低下するという仮説を検証するために、神経活動の指標であるc-fos mRNA発現量を測定した。その結果、イソフルラン麻酔の有無にかかわらず、D1Rアゴニストは線条体、視床、PFCにおいてc-fos mRNAの発現レベルを増加させた。また、覚醒状態でのD1Rアゴニストによる線条体、視床、PFCのc-fos mRNA発現レベルの増加は、イソフルラン麻酔条件下では減弱していたことから、仮説のとおり、イソフルラン麻酔下では覚醒状態よりも神経活動が低下することが明らかとなった。本研究では、D1RアゴニストであるSKF82958の投与により正のBOLD信号変化が認められた領域で、c-fos発現レベルが上昇していたことから、D1R高発現脳領域を含む特定の脳領域において、D1Rに関連したBOLD信号変化を捉えることができたと考えられる。

以上のことから、本研究ではphfMRIによって様々な脳領域におけるD1Rを介した神経活動を経時的に定量できることを実証した。phfMRIは、D1Rを含むドーパミン作動性経路の神経生理学的機能を解明するために有用なツールであり、パーキンソン病などの病態生理を解析する非侵襲的な機能的イメージング技術として、さらに改良することができると考えている。将来的には、phfMRIを介して非臨床研究と臨床研究をつなぐことで、新たな抗精神病薬開発に繋がることが期待される。

結論

本研究では、phfMRIを用いて直接的なD1R活性化/阻害による脳領域におけるBOLD信号変化を検証し、D1Rの神経生理学的機能を評価した結果、以下の結論を得た。

1. D1RアゴニストとD1Rアンタゴニストは、主に線条体、視床、嗅覚下皮質、小脳などドーパミン作動性経路が確立されている脳領域で異なるBOLD信号変化を引き起こした。
2. 線条体、視床、PFC、小脳において、経時的なBOLD信号を測定したところ、コントロール群と比較してD1Rアゴニスト投与群では正のBOLD信号変化を、D1Rアンタゴニスト投与群では負のBOLD信号変化を引き起こした。
3. 覚醒状態またはイソフルラン麻酔下において、D1Rアゴニストは線条体、視床、PFCにおいて神経活動の指標となるc-fos mRNAの発現レベルを増加させた。
4. phfMRIによって、D1R高発現脳領域を含む特定の脳領域において、D1Rに関連したBOLD信号変化を捉えることができ、直接的なD1R活性化/阻害による脳領域におけるBOLD信号変化はD1Rの生理的役割を反映していることを示唆した。

以上、phfMRIによって様々な脳領域におけるD1Rを介した神経活動を経時的に定量できることを実証した。また、phfMRIは、D1Rを含むドーパミン作動性経路の神経生理学的機能を解明し、パーキンソン病などの精神神経疾患の病態生理を解析するツールとして活用できる可能性を見出した。今後、phfMRIを介して非臨床研究と臨床研究をつなぐことで、新たな抗精神病薬開発に繋がることを期待する。

謝辞

本稿を終えるにあたり、終始御指導、御鞭撻を賜りました、大阪大学大学院生命機能研究科特任教授 吉岡芳親先生に謹んで感謝いたします。

また、本研究にあたり、終始熱心なご指導と貴重な御助言を頂きましたUniversity of Copenhagen Center for Translational Neuromedicine Associate Professor 森勇樹先生に心から感謝申し上げます。

さらに本研究を遂行する上で、貴重な御指導と御協力を賜りました、住友化学株式会社 バイオサイエンス研究所 市原準二氏に深謝いたします。

また本研究に際し、温かい御指導と御助言を頂き、また直接実験にもご協力下さいました住友ファーマ株式会社 再生・細胞医薬事業推進室 中澤俊介氏、リサーチディビジョン 基盤技術研究ユニット 西郡寛太郎氏に、心より御礼申し上げます。

さらに本研究を遂行する上で、多大な御協力と御助言を賜りました、奈良先端科学技術大学院大学情報科学研究科の皆様感謝いたします。

加えて本研究を遂行するにあたり、技術協力を賜りました、岩手医科大学医歯薬総合研究所助教授 樋口さとみ先生、岩手医科大学医歯薬総合研究所 上野育子先生、岩手医科大学医歯薬総合研究所教授 佐々木真理先生に感謝申し上げます。

また、本研究において御助言を賜りました、University of Copenhagen Center for Translational Neuromedicine Dr. Ryszard Stefan Gomolka に心から感謝申し上げます。

参考文献

- [1] 厚生労働省. “参考資料”. 厚生労働省ホームページ. 2022.
<https://www.mhlw.go.jp/content/12200000/000940708.pdf> (参照 2023-03-24)
- [2] Yang AC, Tsai SJ. New Targets for Schizophrenia Treatment beyond the Dopamine Hypothesis. *Int J Mol Sci*. 2017;18(8):1689.
- [3] Connolly BS, Lang AE. Pharmacological treatment of Parkinson disease: a review. *JAMA*. 2014;311(16):1670-1683.
- [4] Bobb AJ, Castellanos FX, Addington AM, Rapoport JL. Molecular genetic studies of ADHD: 1991 to 2004. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2005;132B(1):109-12
- [5] Howes OD, Kambitz J, Kim E, et al. The nature of dopamine dysfunction in schizophrenia and what this means for treatment. *Arch Gen Psychiatry*. 2012;69(8):776-786.
- [6] Seeman P. Parkinson's disease treatment may cause impulse-control disorder via dopamine D3 receptors. *Synapse*. 2015;69(4):183-189.
- [7] Ashok AH, Mizuno Y, Volkow ND, Howes OD. Association of Stimulant Use With Dopaminergic Alterations in Users of Cocaine, Amphetamine, or Methamphetamine: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Psychiatry*. 2017;74(5):511-519.
- [8] Gatley SJ, Pan D, Chen R, Chaturvedi G, Ding YS. Affinities of methylphenidate derivatives for dopamine, norepinephrine and serotonin transporters. *Life Sci*. 1996;58(12):231-239.
- [9] Dearry A, Gingrich JA, Falardeau P, Fremeau RT Jr, Bates MD, Caron MG. Molecular cloning and expression of the gene for a human D1 dopamine receptor. *Nature*. 1990;347(6288):72-76.
- [10] Fremeau RT Jr, Duncan GE, Fornaretto MG, et al. Localization of D1 dopamine receptor mRNA in brain supports a role in cognitive, affective, and neuroendocrine aspects of dopaminergic neurotransmission. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88(9):3772-3776.

- [11] Anden NE, Carlsson A, Dahlstroem A, Fuxe K, Hillarp NA, Larsson K. Demonstration and mapping out of nigro-neostriatal dopamine neurons. *Life Sci* (1962). 1964;3:523-530.
- [12] Beaulieu JM, Gainetdinov RR. The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. *Pharmacol Rev*. 2011;63(1):182-217.
- [13] Sawaguchi T, Goldman-Rakic PS. D1 dopamine receptors in prefrontal cortex: involvement in working memory. *Science*. 1991;251(4996):947-950.
- [14] Goldman-Rakic PS, Castner SA, Svensson TH, Siever LJ, Williams GV. Targeting the dopamine D1 receptor in schizophrenia: insights for cognitive dysfunction. *Psychopharmacology (Berl)*. 2004;174(1):3-16.
- [15] Arnsten AF. The neurobiology of thought: the groundbreaking discoveries of Patricia Goldman-Rakic 1937-2003. *Cereb Cortex*. 2013;23(10):2269-2281.
- [16] Ogawa S, Lee TM, Kay AR, Tank DW. Brain magnetic resonance imaging with contrast dependent on blood oxygenation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87(24):9868-9872.
- [17] Buxton RB, Wong EC, Frank LR. Dynamics of blood flow and oxygenation changes during brain activation: the balloon model. *Magn Reson Med*. 1998;39(6):855-864.
- [18] Logothetis NK, Pauls J, Augath M, Trinath T, Oeltermann A. Neurophysiological investigation of the basis of the fMRI signal. *Nature*. 2001;412(6843):150-157.
- [19] Lauritzen M. On the neural basis of fMRI signals. *Clin Neurophysiol*. 2008;119(4):729-730.
- [20] Borsook D, Becerra L, Hargreaves R. A role for fMRI in optimizing CNS drug development. *Nat Rev Drug Discov*. 2006;5(5):411-424.
- [21] Leslie RA, James MF. Pharmacological magnetic resonance imaging: a new application for functional MRI. *Trends Pharmacol Sci*. 2000;21(8):314-318.
- [22] Wise RG, Tracey I. The role of fMRI in drug discovery. *J Magn Reson Imaging*. 2006;23(6):862-876.

- [23] Chen YC, Galpern WR, Brownell AL, et al. Detection of dopaminergic neurotransmitter activity using pharmacologic MRI: correlation with PET, microdialysis, and behavioral data. *Magn Reson Med*. 1997;38(3):389-398.
- [24] Hayasaka N, Nagai N, Kawao N, et al. In vivo diagnostic imaging using micro-CT: sequential and comparative evaluation of rodent models for hepatic/brain ischemia and stroke. *PLoS One*. 2012;7(2):e32342.
- [25] Hagino H, Tabuchi E, Kurachi M, et al. Effects of D2 dopamine receptor agonist and antagonist on brain activity in the rat assessed by functional magnetic resonance imaging. *Brain Res*. 1998;813(2):367-373.
- [26] Miller B, Marks LA, Koller JM, Newman BJ, Bretthorst GL, Black KJ. Prolactin and fMRI response to SKF38393 in the baboon. *PeerJ*. 2013;1:e195. Published 2013 Oct 29.
- [27] McQuade RD, Duffy RA, Anderson CC, et al. [3H]SCH 39166, a new D1-selective radioligand: in vitro and in vivo binding analyses. *J Neurochem*. 1991;57(6):2001-2010.
- [28] Valdés-Hernández PA, Sumiyoshi A, Nonaka H, et al. An in vivo MRI Template Set for Morphometry, Tissue Segmentation, and fMRI Localization in Rats. *Front Neuroinform*. 2011;5:26.
- [29] Reimold M, Slifstein M, Heinz A, Mueller-Schauenburg W, Bares R. Effect of spatial smoothing on t-maps: arguments for going back from t-maps to masked contrast images. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2006;26(6):751-759.
- [30] Abd Wahab DY, Gau CH, Zakaria R, et al. Review on Cross Talk between Neurotransmitters and Neuroinflammation in Striatum and Cerebellum in the Mediation of Motor Behaviour. *Biomed Res Int*. 2019;2019:1767203.
- [31] Guitart-Masip M, Salami A, Garrett D, Rieckmann A, Lindenberger U, Bäckman L. BOLD Variability is Related to Dopaminergic Neurotransmission and Cognitive Aging. *Cereb Cortex*. 2016;26(5):2074-2083.
- [32] Dixon AL, Prior M, Morris PM, Shah YB, Joseph MH, Young AM. Dopamine antagonist modulation of amphetamine response as detected using pharmacological MRI. *Neuropharmacology*. 2005;48(2):236-245.

- [33] Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates, 5th ed. Burlington, MA: Academic Press; 2004.
- [34] Yushkevich PA, Piven J, Hazlett HC, et al. User-guided 3D active contour segmentation of anatomical structures: significantly improved efficiency and reliability. *Neuroimage*. 2006;31(3):1116-1128.
- [35] Morgan JI, Curran T. Stimulus-transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible proto-oncogenes fos and jun. *Annu Rev Neurosci*. 1991;14:421-451. doi:10.1146/annurev.ne.14.030191.002225
- [36] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods*. 2001;25(4):402-408.
- [37] Stark JA, Davies KE, Williams SR, Luckman SM. Functional magnetic resonance imaging and c-Fos mapping in rats following an anorectic dose of m-chlorophenylpiperazine. *Neuroimage*. 2006;31(3):1228-1237.
- [38] Devor A, Ulbert I, Dunn AK, et al. Coupling of the cortical hemodynamic response to cortical and thalamic neuronal activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(10):3822-3827.
- [39] Harel N, Lee SP, Nagaoka T, Kim DS, Kim SG. Origin of negative blood oxygenation level-dependent fMRI signals. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2002;22(8):908-917.
- [40] Kannurpatti SS, Biswal BB. Negative functional response to sensory stimulation and its origins. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2004;24(6):703-712. doi:10.1097/01.WCB.0000121232.04853.46
- [41] Hamzei F, Dettmers C, Rzanny R, Liepert J, Büchel C, Weiller C. Reduction of excitability ("inhibition") in the ipsilateral primary motor cortex is mirrored by fMRI signal decreases. *Neuroimage*. 2002;17(1):490-496.
- [42] Stefanovic B, Warnking JM, Pike GB. Hemodynamic and metabolic responses to neuronal inhibition. *Neuroimage*. 2004;22(2):771-778.
- [43] Sunahara RK, Guan HC, O'Dowd BF, et al. Cloning of the gene for a human dopamine D5 receptor with higher affinity for dopamine than D1. *Nature*. 1991;350(6319):614-619.

- [44] Yurek DM, Hipkens SB. Intranigral injections of SCH 23390 inhibit SKF 82958-induced rotational behavior. *Brain Res.* 1994;639(2):329-332.
- [45] Khan ZU, Gutiérrez A, Martín R, Peñafiel A, Rivera A, de la Calle A. Dopamine D5 receptors of rat and human brain. *Neuroscience.* 2000;100(4):689-699.
- [46] Araki KY, Sims JR, Bhide PG. Dopamine receptor mRNA and protein expression in the mouse corpus striatum and cerebral cortex during pre- and postnatal development. *Brain Res.* 2007;1156:31-45.
- [47] Choi JK, Chen YI, Hamel E, Jenkins BG. Brain hemodynamic changes mediated by dopamine receptors: Role of the cerebral microvasculature in dopamine-mediated neurovascular coupling. *Neuroimage.* 2006;30(3):700-712.
- [48] Sakai EM, Connolly LA, Klauck JA. Inhalation anesthesiology and volatile liquid anesthetics: focus on isoflurane, desflurane, and sevoflurane. *Pharmacotherapy.* 2005;25(12):1773-1788.
- [49] Matsuoka H, Watanabe Y, Isshiki A, Quock RM. Increased production of nitric oxide metabolites in the hippocampus under isoflurane anaesthesia in rats. *Eur J Anaesthesiol.* 1999;16(4):216-224.

業績リスト

[学術論文]

Kimura Y, Nakazawa S, Nishigori K, Mori Y, Ichihara J, Yoshioka Y. Ultra-high-field pharmacological functional MRI of dopamine D1 receptor-related interventions in anesthetized rats. *Pharmacol Res Perspect*. 2023;11(2):e01055.

[学会抄録]

Pharmacological functional MRI analysis of dopamine D1 receptor interventions with 11.7 T high field MRI scanner

○ Yuka.Kimura, Shunsuke Nakazawa, Kantaro Nishigori, Yuki Mori, Junji Ichihara, Yoshichika Yoshioka

Society for neuroscience 2017 (Washington D.C., U.S.A.)