

令和 2 年 7 月 8 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K19853

研究課題名(和文)透明化脳と拡散MRIによる脳の加齢・変性における検討：病理と画像の3次元対比

研究課題名(英文) Assessment of brain change by aging and neurodegeneration using transparent brain and diffusion MRI: 3 dimensional comparison of imaging with pathology

研究代表者

佐藤 香菜子 (Sato, Kanako)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：80755520

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：正常加齢による脳微細構造と脳内神経ネットワークの変化を解明する目的で、マウス脳による基礎研究を行った。

正常マウス脳を対象とし、拡散MRIの最新の手法と脳透明化技術を用いて、画像と病理の対比を行った。マウス脳で加齢性変化が起こる可能性がある前交連と海馬について、神経線維交叉部と平行部のそれぞれで神経線維の密度と方向のばらつきを画像的に評価し、病理所見と比較した。神経線維の方向のばらつきは画像と病理所見との間で一致し、この結果により、最新の拡散MRIを用いて正常加齢による脳内構造の変化が病理レベルでの評価可能であることが確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

難病といわれる種々の神経変性疾患の予後を改善するためには、画像による早期診断と正確な評価が重要な役割を果たす。そのためには、病理所見に対応した脳微細構造の評価が可能な画像診断法の開発が望まれている。この研究では、最新の拡散MRIにより正常加齢による脳微細構造と脳内神経ネットワークの変化が解明可能であることが示され、神経変性疾患の脳内構造と比較するベースラインを確立する一歩となった。このような画像と病理の対比研究の蓄積により、将来的には、MRIにより生体の全脳を細胞レベルで評価し、疾患の病態解明や治療方針の決定に活用できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：To understand change of microstructure and neural networks in the brain by aging, we performed basic research using mouse brain.

We compared imaging findings and pathological findings of normal mouse brain. A new method of diffusion MRI and a histological method to render the mouse brain transparent were used for analysis. Neurite density and degree of orientation dispersion of nerve fibers were compared between areas containing crossing fibers (crossing areas) and parallel fibers (parallel areas) in the anterior commissure and the hippocampus. Degree of orientation dispersion of nerve fibers was consistent with pathological findings. The results validated that this new diffusion MRI method has potential to assess microstructural change of the brain by aging at pathological level.

研究分野：脳神経画像診断

キーワード：拡散MRI NODDI 透明脳 脳微細構造

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

難病といわれる種々の神経変性疾患は、治療法だけでなく、診断法や評価法についても課題が多い。予後を改善するためには早期診断が重要であるが、従来の画像診断法では限界があり、病理所見に対応した脳微細構造の評価が可能な画像診断法の開発が望まれている。微細構造レベルで神経変性疾患の診断や評価を正確に行うためには、まず加齢により脳に生じる病理的变化を画像で評価するためのベースラインを確立し、変性による変化と比較することが必要である。

加齢や変性では、軸索や樹状突起の変性や神経細胞・髄鞘脱落、グリオシスなどの微細な構造変化に加え、3次元的に脳内ネットワークなどの破綻などが起こることが知られている。これらを評価可能な最新の手法として、画像的には拡散MRI、表理的には脳透明化技術がある。両者を併用して病理と画像の対比を行うことで、加齢や変性により起こる変化について、脳全体の構造と微細構造の双方からの説明が可能と考えられる。

2. 研究の目的

脳正常加齢変化についての検討はこれまでMRIや剖検脳の病理研究により行われてきたが、3次元のかつ細胞レベルでの画像と病理の対比はされていない。さらに疾患脳と比較するための正常脳での画像評価法について、病理学的裏付けのあるベースラインは確立されていない。

そこで、正常加齢による脳微細構造と脳内神経ネットワークの変化を解明し、神経変性疾患の脳内構造と比較するベースライン確立することを目指し、マウス脳による基盤研究を行った。本研究では、正常マウス脳において、加齢による神経線維の変化について病理と画像の相関を明らかにすることを目的として、透明化脳と拡散MRI画像の対比を行った。

3. 研究の方法

脳構造の微細な変化を生体で評価するツールとして様々なMRIの撮像法が開発されてきたが、中でも拡散MRIは組織内の水分子の拡散異方性を通して神経線維の描出を可能にした画期的な手法で、fractional anisotropy (FA)やapparent diffusion coefficient (ADC)などの拡散示標を用いて脳白質・灰白質の微細構造を定量化することができる。近年では、病理と対比できるレベルでさらに詳細に微細構造を定量化する手法が開発されている。特にNeurite orientation dispersion and density imaging (NODDI)は、新たな水拡散モデルに基づき線維のばらつきを評価できる方法として、注目されている。従来の代表的な拡散示標であるFAでは、神経の変性程度を定量化する際に、脳脊髄液や交差線維による影響と区別できないことが問題視されていたが、NODDIではそれらを区別し真の変性を評価することができる。intra-cellular volume fraction (Vic)とorientation dispersion index (ODI)はそれぞれ神経線維の密度とばらつき程度を表す示標で、脳微細構造に関する新たな情報を付加できると考えられている。

一方、病理学的に近年注目されている技術としては、clear, unobstructed brain imaging cocktails and computational analysis (CUBIC)を始めとする脳透明化技術が挙げられる。切片化された組織で脳を観察する従来法と異なり、脳全体を透明化することで、脳神経の損傷なしに、神経ネットワークや神経細胞配列を細胞レベルの超高解像度の3次元画像として取得することが可能となってきている。

正常マウス脳の加齢による病理的变化と拡散MRIとの相関を調べるため、マウス脳の前交連と海馬について、CUBICを用いて透明化した神経線維の密度とばらつき程度を病理的に観察し、NODDI解析で得られたVicとODIとの相関を調べた。

4. 研究成果

(1)対象と撮像方法

マウスは、神経軸索構造の観察が容易な軸索蛍光発色マウス(Thy1-YFPマウス)を対象とした。26週のマウス脳に対してCUBICを使用した透明脳化処理を行い、7TのMRIを用いて撮像した。

拡散MRIとしては、EPI法を使用して30軸、4つのb値(711, 1261, 2000, 2855 s/mm²)を設定して撮像し、スライス厚0.15mm、スライス枚数100枚の画像を得た。得られた拡散MRI画像から、NODDIのパラメータであるVicマップとODIマップを作成した。

(2)解析部位

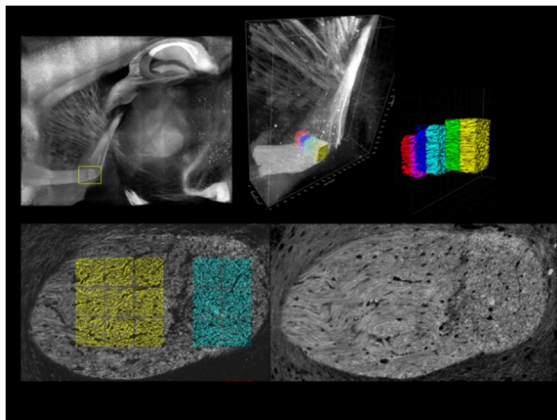
脳の部位は、前交連と海馬の線維が交叉している部分と平行な部分を両方含む領域を対象とした。図1に示すように、前交連左側から7切片、海馬のA1領域から1切片を取り出し、切片上で75μm四方の関心領域を設定した。これらの切片と関心領域に対応する部位をVicマップとODIマップ上で特定し、前交連については12ボクセル、海馬については20ボクセルを解析の関心領域ROIとして設定した。

(3)統計解析

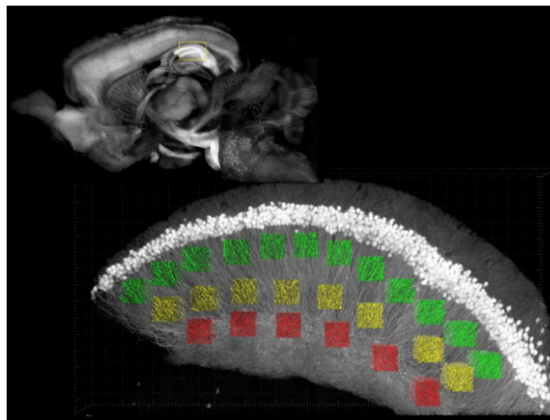
ROI内の神経密度、Vic、ODIを線維の交叉部と平行部の2群に分けて平均し、t検定にて群間比較を行った。また神経密度とVicについてはピアソン相関係数を算出し、相関を調べた。

図1 病理切片上でのROI設定

(a)前交連



(b)海馬



(a)前交連の神経線維交叉部と平行部の移行域付近の矢状断7切片上で、主に交叉部を含む前方領域と主に平行部を含む後方領域のそれぞれに75 μ m四方のROIを複数設定した。

(b)海馬のA1領域の矢状断で、主に交叉部を含む下方領域と主に平行部を含む上方領域のそれぞれに75 μ m四方のROIを複数設定した。

(4)結果

神経線維密度とVic、ODIの神経交叉部と平行部についての統計結果を表1、図2に示す。

神経線維密度は、海馬では神経交叉部では平行部と比べて有意に高かった(P=7.91E-07)。前交連では有意差はなかった。神経線維密度とVicとの間に相関はみられなかった。Vicについては神経交叉部と平行部で有意差はみられなかった。ODIは、前交連と海馬の両部位において、神経交叉部では平行部と比べて有意に高かった(前交連：P=0.0247、海馬：P=0.00022)。

表1 神経線維密度、Vic、ODIの神経交叉部と平行部の間での比較

前交連	交叉部	平行部	p 値
神経線維密度(%)	44.2 ± 4.06	42.9 ± 3.58	n.s.
Vic	0.778 ± 0.0685	0.847 ± 0.173	n.s.
ODI	0.227 ± 0.169	0.0178 ± 0.0108	0.0247*

海馬	交叉部	平行部	p value
神経線維密度(%)	17.6 ± 1.67	12.06 ± 1.51	7.91E-07***
Vic	0.339 ± 0.0316	0.362 ± 0.0357	n.s.
ODI	0.589 ± 0.0856	0.373 ± 0.0997	0.000219**

各数値は平均値 ± 標準偏差を表す。

*P < 0.05, **P < 0.001, ***P < 0.0001

Vic; intracellular volume fraction, ODI; orientation dispersion index.

図2 神経線維密度、Vic、ODIの神経交叉部と平行部の間での比較

図2(a) 前交連

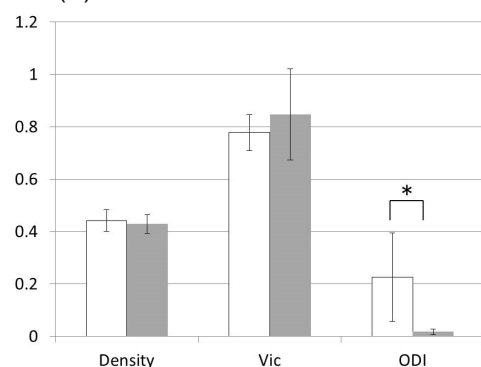


図2(b)海馬

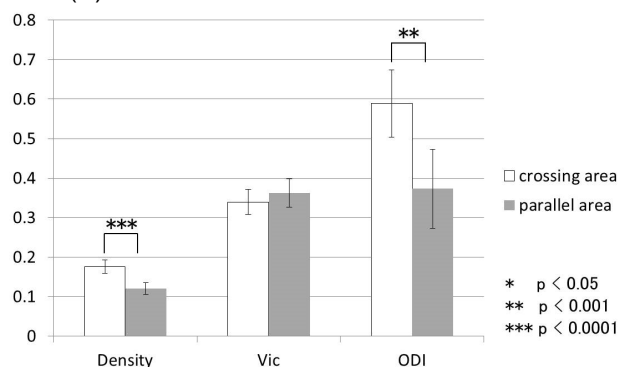


図2(a) 前交連では、ODIは神経交叉部では平行部と比較して有意に高かった。

図2(b) 海馬では、神経線維密度とODIは神経交叉部では平行部と比較して有意に高かった。

Vic; intracellular volume fraction, ODI; orientation dispersion index.

(4)考察

NODDI は最新の拡散 MRI 解析法の 1 つであり、神経線維の密度や方向、また浮腫のように等方向への水の拡散が予想される領域を区別できる。従来の拡散解析の代表的なパラメータである FA は、これらの変化を区別できず、神経変性によりおこる変化と交叉線維と脳脊髄液の混在がしばしば問題となっていたが、NODDI ではこれらを区別し、病理学的変化をより反映した結果を得ることができる。

ODI は神経線維のばらつきの大きさを表すパラメータで、脳の微細構造の解明においてに新たな情報をもたらすと考えられている。この研究で、ODI は前交連と海馬ともに神経交叉部では平行部と比較して有意に高いという結果が得られた。これまで画像と病理の 3 次元的対比は行われておらず、ODI の病理学的裏付けはとられていなかったが、この研究結果により ODI の有用性が病理的にも確認された。

Vic は神経線維の密度を表すと考えられているが、前交連では神経線維密度と Vic のいずれにも有意差がみられず、今回病理学的に有意な裏付けはできなかった。また海馬領域では神経線維密度と Vic の間に逆の傾向がみられた。これは、海馬には様々な種類の神経線維が含まれ、YFP で認識される線維が一部分のみであることが原因である可能性がある。これは透明脳化技術の盲点といえる。

その他の盲点としては、MRI と病理の 1 ピクセル単位のサイズが異なること、透明脳化处理により脳のサイズや微細構造が変化することが挙げられる。これらにより、画像との対比の際に位置合わせが不正確となる可能性は考えられるが、この研究では透明脳化の過程で脳の形状に大きな変化はみられなかったため、少なくとも神経線維の方向は保たれていたと考える。

拡散 MRI は、生体での非侵襲的な微細構造評価に大きな期待ができる撮像法である。画像と病理の対比により各パラメータの病理学的裏付けをとることは、脳の微細構造の画像評価を確立する上での基礎となる。本研究では、ODI が病理レベルで神経線維のばらつきの程度と相関していることが示された。このような画像と病理の対比研究の蓄積により、将来的には、MRI により生体の全脳を細胞レベルで評価し、疾患の病態解明や治療方針の決定に活用できる可能性がある。

(5)参考文献

- Colgan N, Siow B, O'Callaghan JM, et al. Application of neurite orientation dispersion and density imaging (NODDI) to a tau pathology model of Alzheimer's disease. *Neuroimage* 2016;125:739-744.
- Zhang H, Schneider T, Wheeler-Kingshott CA, et al. NODDI: practical in vivo neurite orientation dispersion and density imaging of the human brain. *Neuroimage* 2012;61:1000-1016.
- Susaki EA, Tainaka K, Perrin D, et al. Whole-brain imaging with single-cell resolution using chemical cocktails and computational analysis. *Cell* 2014;157:726-739.
- Kamagata K, Kerever A, Yokosawa S, et al. Quantitative histological validation of diffusion tensor MRI with twophoton microscopy of cleared mouse brain. *Magn Reson Med Sci* 2016;15:416-421.
- Kamagata K, Kerever A, Yokosawa S, et al. Quantitative histological validation of diffusion tensor MRI with twophoton microscopy of cleared mouse brain. *Magn Reson Med Sci* 2016;15:416-421.
- Mori S, Zhang J. Principles of diffusion tensor imaging and its applications to basic neuroscience research. *Neuron* 2006;51:527-539.
- Sato K, Ishigame K, Ying SH, et al. Macro- and microstructural changes in patients with spinocerebellar ataxia type 6: assessment of phylogenetic subdivisions of the cerebellum and the brain stem. *Am J Neuroradiol* 2015;36:84-90.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sato K, Kerever A, Kamagata K, Tsuruta K, Irie R, Tagawa K, Okazawa H, Arikawa-Hirasawa E, Nitta N, Aoki I, Aoki S.	4. 巻 6
2. 論文標題 Understanding microstructure of the brain by comparison of neurite orientation dispersion and density imaging (NODDI) with transparent mouse brain.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Acta Radiologica Open	6. 最初と最後の頁 1-6
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/2058460117703816.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Sato K, Kerever A, Kamagata K, Aoki S.
2. 発表標題 Advanced diffusion MR imaging (NODDI) : comparison with a transparent mouse brain
3. 学会等名 Organization of Human brain Mapping (国際学会)
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	青木 茂樹 (Aoki Shigeki) (80222470)	順天堂大学・放射線診断学講座・教授 (32620)	
連携研究者	鎌形 康司 (Kamagata Koji) (60568153)	順天堂大学・放射線診断学講座・準教授 (32620)	
連携研究者	ケレバール オーレリアン (Kerever Aurelien) (70623594)	順天堂大学・老人性疾患病態・治療研究センター・ポスドク (32620)	