

令和 2 年 9 月 5 日現在

機関番号：72611

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10421

研究課題名(和文) 次世代型拡散MRIイメージングによる骨格筋AQP4動態可視化法の開発

研究課題名(英文) Development of visualization method of dynamics of skeletal muscle AQP4 using next generation diffusion MRI imaging

研究代表者

畑 純一 (Hata, Junichi)

公益財団法人実験動物中央研究所・ライブイメージングセンター・研究員

研究者番号：00568868

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：骨格筋線維は速筋線維と遅筋線維のタイプに分類でき、収縮特性、ミトコンドリア容量、エネルギー機構など幾つかの異なる構造・機能をもっている。その中の一つとしてAQP4発現の差がある。本研究では、骨格筋QSIにおける拡散計測用傾斜磁場を多段階的に可変応用し、拡散変異分布を正規ガウス分布から非ガウス分布へと変化させ、分布の変化速度より細胞膜内外間における水分子交換量を計測する機能法の開発を行った。結果、仮説である水分子の細胞膜透過を加味した膜透過量計測の3情報を追加した6次元拡散MRI計測をマウス骨格筋を対象として行い成功した。本開発技術にて骨格筋細胞の構造とその機能の可視化が可能となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞の構造と水分子の細胞膜透過機能を区別し可視化することができた。この開発と発見は非常に興味深く、当初の計画以上に価値のある結果を生み出し、骨格筋機能解析による、筋萎縮、運動タイプ、トレーニング効果、筋肉疾患評価など、体積だけではなく遅筋や速筋の分布などの機能的な計測することが可能となる。また、骨格筋のみならず生体における疾患解明や機能解析に貢献することができる新規技術開発である。

研究成果の概要(英文)：The skeletal muscle fibers can be classified into fast and slow types, and have several different structures and functions, including contractile properties, mitochondrial capacity, and energy mechanisms. There is the difference in AQP4 expression, too. In the present study, we applied the gradient magnetic field for measurement of diffusion in skeletal muscle QSI in multiple steps, and developed a method to change the distribution of diffusion mutations from normal Gaussian to non-Gaussian, and to measure the amount of water exchange between inside and outside the cell membrane based on the rate of change of the distribution. As a result, six-dimensional diffusion MRI measurements were successfully performed on mouse skeletal muscle with the addition of three information on membrane permeation measurement including the hypothesis that water molecules permeate the cell membrane. This technology enabled us to visualize the structure and function of skeletal muscle cells.

研究分野：磁気共鳴医学

キーワード：磁気共鳴画像法 拡散強調画像 超高磁場MRI q-space imaging 骨格筋 アクアポリン 遅筋 速筋

## 1. 研究開始当初の背景

アクアポリン(Aquaporin:AQP)は細胞膜に存在するタンパク質であり、水分子を特異的に透過させる役割を果たしている(P. Agre, et al., Science, 1992)。細胞膜の水分子通過路が見つかったことは生命科学の歴史上で非常に大きな功績であり、2003年にノーベル化学賞を受賞した。生体の構成要素のうち約7割近くが水分子(H<sub>2</sub>O)で占められており、生命現象において水分子の重要性は言うまでもない。哺乳類では13種類のAQPサブファミリーが発見されており、このうちAQP4が発現している。骨格筋の筋線維は形態学的、機能学的な観点から数種類のタイプに分類される。主に遅筋線維(slow twitch: SW, type1線維)と速筋線維(fast twitch: FT, type2線維)とに大別される。これらは、収縮特性、エネルギー特性、疲労耐性などの特性が大きく異なる。AQP4は線維タイプの中でも、解糖系速筋線維と酸化-解凍系速筋線維の線維膜にて強力に発現し、細胞内への水分子流入を促進している(S. Schiaffino, et al., Phys. Rev., 2011)。しかしながら、骨格筋の機能や構造、疾患とAQP4の関連性に関してわずかな報告はあるものの研究報告はとて乏しい現状である。これには計測の困難さが挙げられており、AQP4と骨格筋の関連性を深く理解するためにも水分子挙動の可視化、AQP4機能動態のダイナミック計測法といった機能計測、解析法の開発が望まれている。このような骨格筋の機能に重要なAQPの動態を生体で解析するためには、新たな磁気共鳴画像(Magnetic Resonance Imaging: MRI)の測定法を開発することが必須である。

MRI法を用いた水分子拡散計測法は、1965年に提案され(E.O.Stejskal, et al, J Phys Chem, 1965)、この水分子拡散計測法を用いることにより、水分子の運動方向とその速度を計測することが可能となる。その方向性を追跡することで、白質線維の可視化を可能とする手法が提案され(Mori S, et al, Ann Neurol, 1999)、特定の神経線維構造およびそのネットワークの評価などに用いられている。また、水分子の運動速度、移動距離を計測することで、制限構造サイズを推定するq-space imaging: QSIと呼ばれる手法が提案された(Callaghan PT. et al, Nature, 1991)。当初、QSIはNMR分野における多孔物質に対する研究目的で報告された。このQSIを生体に応用することで組織の水分子制限拡散を解析でき、マイクロサイズの構造情報を計測することが可能となる。やがて、生体応用への報告として、脳疾患による細胞の変形(King MD, et al. Magn. Reson. Med., 1994)や、赤血球の形状評価(Kuchel PW, et al. Magn. Reson. Med., 1997)などの報告がなされ、q-space imagingは臨床応用へ大きな期待が寄せられている。

## 2. 研究の目的

骨格筋線維は速筋線維と遅筋線維のタイプに分類でき、収縮特性、ミトコンドリア容量、エネルギー機構など幾つかの異なった構造・機能をもっている。その中の一つとしAQP4発現の差がある。AQP4は水分子を選択的に輸送し、細胞膜内外での水分子交換の促進を担っている。申請者がこれまで進めてきた研究から、骨格筋QSIにおける拡散計測用傾斜磁場を多段階的に可変させ応用することで、拡散変異分布は正規ガウス分布から非ガウス分布へと変化することが分かった。この分布の変化速度より細胞膜内外間における水分子交換量を計測でき、骨格筋AQP4の機能動態計測が可能になるという着想に至った。この仮説を実証するため、MRIパルスプログラム開発に加え、細孔ファントム、健常マウス、AQP4ノックアウトマウスにて水分子の動態計測を行う。MRI計測後に、筋切片によるATPase染色法、AQP4抗体染色後に顕微鏡画像との相関解析による妥当性評価を行うことで、QSIを応用したAQP4動態計測法の確立を試みることが本研究の目的である。

## 3. 研究の方法

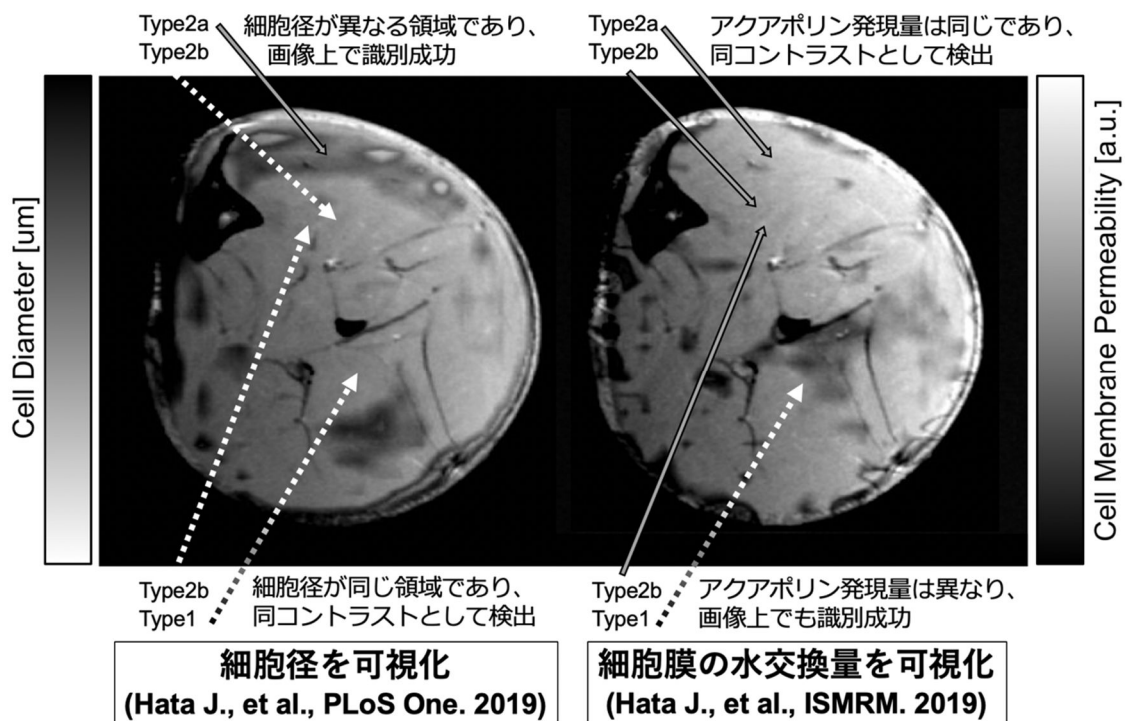
平成29年度の研究方法として、7テスラ動物実験用MRI装置に対し多段階的に拡散時間を設定可能とするQSI法のパルスプログラミング、実験機への実装を行った。実装後、細孔ファントムを用いて骨格筋AQP4動態を計測するためのパラメータ設定・調整を行った。実験には実験動物中央研究所のMRI装置(Bluker社、Biospec 7.0T)を使用した。他に本研究では得られたデータからAQP4動態の可視化をするための解析用プログラムの開発が必要となる。このため、実験環境の構築と共に解析法の開発を進めた。次年度より進める骨格筋切片作成・染色画像の取得には高度な技能を必要とするため、技能の取得も進めた。手法としてはまず披験筋を切断採取し、剪刀で断端を整え、その後に液体窒素にて冷却したイソペンタンで凍結ブロックを作成し、切片作成、ATPase・AQP4抗体染色を行った。平成30年度以降は完成した実験環境にてマウスの下腿部骨格筋におけるAQP4機能動態計測を開始した。また、同時に前年度に習得した筋切片によるATPase・AQP4抗体染色を行い、光学顕微鏡により観察、取得し画像解析ソフトウェアにて開発した次世代型のQSI法による計測データと比較し妥当性の評価を行った。健常マウス、AQP4ノックアウトマウスにより本手法の妥当性を確立した後、筋ジストロフィーモデルマウスに開発手法を適用し生体下でのダイナミックな動態計測を試みることで、骨格筋AQP4動態を捉えられるかどうか、筋ジストロフィーの程度を分類できるかどうかを運動量解析、骨格筋AQP4発現量等と比較評価し、前臨床研究として臨床展開への応用の可能性を模索する。

#### 4. 研究成果

骨格筋線維は速筋線維と遅筋線維のタイプに分類でき、収縮特性、ミトコンドリア容量、エネルギー機構など幾つかの異なった構造・機能をもっている。その中 の一つとし AQP4 発現の差がある。本研究では、骨格筋 QSI における拡散計測用傾斜磁場を多段階的に可変させ応用することで、拡散変異分布は正規ガウス分布から非ガウス分布へと変化させ、分布の変化速度より細胞膜内外間における水分子交換量を計測でき、骨格筋アクアポリン 4 の機能動態計測法は開発することにある。この目的を達成するために本年度は、生体組織のマイクロ構造情報を取得することを可能とする多段階的に拡散時間を可変実行させることが可能なパルスプログラミングの設計と 7 テスラ動物実験用 MRI 装置への実装を行った。主に誘発エコー法をベースとしたパルスシーケンスシステムを設計した。また、開発シーケンスを用い細孔ファントムを用い、本手法の計測試験を各種行った。本研究ではマウスを対象とし手法の確立を目的としている。このため、マウス下腿部に対し MRI 計測が可能となるような実験系、システムの構築をはかった。MRI 計測の後に、切片画像等を用いて比較を行うためそれともなう手技の確立も図った。また来年度以降に生体応用する際にアクアポリン 4 分布計測の目途を たてるためアクアポリン 4 抗体染色によるマウス下腿部骨格筋におけるアクアポリン 4 の分布を確認することができた。染色像の結果、アクアポリン 4 はタイプ 1 系組織には発現せず、タイプ 2 系組織にのみ発現することを確認した。

開発を行ったプログラムにて実験を行った結果、アクアポリン 4 の影響だけでなく、細胞径の影響も大きく受けることが判明した。この影響を取り除くためには拡散時間を可変とさせたデータを追加し、これまでのデータセットよりさらに 1 次元増やした解析が必要と判断した。このためのパルスプログラム、解析アルゴリズムの開発を追加で行った。結果、理論的にはあるが細胞径に依存せず、アクアポリン 4 の機能動態を観測可能な実験パルスプログラムと解析アルゴリズムを構築した。

ここまでにて発見した知見を元に開発手法の修正を試み、動物実験を行なった。具体的に、従来用いられている生体 3 次元拡散 MRI に拡散方向性を加味した多軸計測、拡散制限性を加味した制限計測、仮説である水分子の細胞膜透過を加味した膜透過量計測の 3 情報を追加した 6 次元拡散 MRI 計測をマウス骨格筋を対象として行なった。これらを解析することで、骨格筋細胞の構造とその機能の可視化を目指した。結果、前年度発見した知見とそれに基づく仮説通り、細胞の制限構造とアクアポリン 4 などの水分子の細胞膜透過機能を区別し可視化することができた。この開発と発見は非常に興味深く、当初の計画以上に価値のある結果を生み出し、骨格筋のみならず生体における疾患解明や機能解析に貢献することができる新規技術開発となった。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Haga Y, Hata J, Uematsu A, Seki F, Komaki Y, Mizumura M, Nishio M, Kaneko T, Kishi N, Okano H, Furukawa A.	4. 巻 -
2. 論文標題 MR Imaging Properties of ex vivo Common Marmoset Brain after Formaldehyde Fixation.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Magn Reson Med Sci.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.2463/mrms.	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 -
1. 著者名 Sakai T, Hata J, Ohta H, Shintaku Y, Kimura N, Ogawa Y, Sogabe K, Mori , Okano HJ, Hamada Y, Shibata S, Okano H, Oishi K.	4. 巻 59(6)
2. 論文標題 The Japan Monkey Centre Primates Brain Imaging Repository for comparative neuroscience: an archive of digital records including records for endangered species.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Primates.	6. 最初と最後の頁 553-570
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1007/s10329-018-0694-3.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Junichi Hata, Sakiko Mizuno, Yawara Haga, Masayuki Shimoda, Yae Kanai, Kazuhiro Chiba, Hideyuki Okano, Masaya Nakamura and Keisuke Horiuchi	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Semi-quantitative Evaluation of Muscle Repair by Diffusion Tensor Imaging in Mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 JBMR Plus	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1002/jbm4.10040	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 -
1. 著者名 Ryutaro Yano, Junichi Hata, Yoshifumi Abe, Fumiko Seki, Keitaro Yoshida, Yuji Komaki, Hideyuki Okano, Kenji F. Tanaka	4. 巻 17
2. 論文標題 Quantitative temporal changes in DTI values coupled with histological properties in cuprizone-induced demyelination and remyelination	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Neurochemistry International	6. 最初と最後の頁 186-197
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1016/j.neuint.2017.10.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 6件）

1. 発表者名 Junichi Hata, Takayuki Obata, Yasuhiko Tachibana, Yawara Haga, Mai Mizumura, Nakashima Daisuke, Yasushi Sera, Masaya Nakamura, and Hideyuki Okano
2. 発表標題 Evaluation of cell permeability using Time-Dependent Diffusion MRI in the Skeletal Muscle
3. 学会等名 International Society of Magnetic Resonance in Medicine Japanese Chapter 3rd Annual Scientific Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Junichi Hata, Kanehiro Fujiyoshi, Osahiko Tsuji, Yuji Komaki, Keigo Hikishima, Masaya Nakamura, and Hideyuki Okano
2. 発表標題 Validity of skeletal muscle fiber type distinguished using q-space imaging
3. 学会等名 International Society of Magnetic Resonance in Medicine 25th Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Daisuke Nakashima, Fujita Nobuyuki, Hata Junichi, Nagura Takeo, Fujiyoshi Kanehiro, Okano Hideyuki, Jinzaki Masahiro, Matsumoto Morio, Nakamura Masaya
2. 発表標題 Q-Space Imaging Is a Novel Technique to Evaluate Intervertebral Disc Degeneration
3. 学会等名 International Society of Magnetic Resonance in Medicine 25th Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Daisuke Nakashima, Nobuyuki Fujita, Junichi Hata, Takeo Nagura, Kanehiro Fujiyoshi, Hideyuki Okano, Masahiro Jinzaki, Morio Matsumoto, Masaya Nakamura
2. 発表標題 Q-space imaging is a novel technique to evaluate intervertebral disc degeneration
3. 学会等名 The International Society for the Study of the Lumbar Spine 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Junichi Hata, Daisuke Nakashima, Yawara Haga, Kanehiro Fujiyoshi, Osahiko Tsuji, Yuji Komaki, Masaya Nakamura, and Hideyuki Okano
2. 発表標題 Application of q-Space MRI for the Visualization of skeletal muscle function
3. 学会等名 International Society of Magnetic Resonance in Medicine Japanese Chapter 2nd Annual Scientific Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Daisuke Nakashima, Nobuyuki Fujita, Junichi Hata, Takeo Nagura, Kanehiro Fujiyoshi, Hideyuki Okano, Masahiro Jinzaki, Morio Matsumoto, Masaya Nakamura
2. 発表標題 The Novel And Quantitative MRI Technique: Q-space Imaging To Evaluate Intervertebral Disc Degeneration
3. 学会等名 Basic And Clinical Study; ORS 2018 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 MRIによる遅筋、速筋を区別する方法	発明者 畑純一 中島大輔 中村雅也	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2017-118731	出願年 2017年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
研究協力者	藤吉 兼弘  (Fujiyoshi Kanehiro)  (80365303)	慶應義塾大学・医学部・研究員   (32612)	
研究協力者	小牧 裕司  (Komaki Yuji)  (10548499)	公益財団法人実験動物中央研究所・ライブイメージングセンター・室長代理   (72611)	