

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K11674

研究課題名(和文)細胞の微細構造と拡散モデル式との相関

研究課題名(英文) Estimation of the sub-cellular diffusion using multi-exponential fitting model

研究代表者

佐々木 美穂 (SASAKI, Miho)

長崎大学・病院(歯学系)・助教

研究者番号：10437874

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、細胞内の水分子の拡散を細胞外と区別し、細胞内小器官の変化を捉えるための理論的モデルの構築を目的とした。方法は3T-MRI装置にて、培養細胞及びこれより抽出した成分(核、細胞膜、細胞内膜、クロマチン、DNA)の超高b値拡散強調撮像を行い、多項指数関数近似法を用いて解析した。その結果、細胞内の拡散を細胞外と区別して3段階の速度値に区別可能で、細胞質器質、細胞膜・内膜系、核内部の拡散を反映していると推定された。また健康人脳組織への応用も可能であった。以上研究目的は達成され、これを応用する事により細胞増殖や細胞死などの多様な生命現象を捉えるための有用な情報を提供できると考える。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究を臨床応用し、生体組織や各種疾患・病変の細胞内の水分子の拡散を細胞外のそれと区別して評価し、その特徴や病変ごとの違いなどを明らかにする事ができれば、拡散現象を通して細胞増殖や細胞死、さらには癌化などといった多様な生命現象に伴う核や細胞内小器官の変化を2次元/3次元的に捉える事が可能で、更に病期の診断や治療効果判定に有用なデータを非侵襲的に提供できると考えられ、学術的・社会的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)： The aim of this study was to establish the theoretical model for the assessment of restricted diffusion using extremely high b-value diffusion-weighted MRI and reveal the sub-cellular water diffusivity distinguishing from extracellular water. We performed diffusion-weighted MRI of the cell block and cellular-components (nucleus, plasma membrane, organelle membrane, chromatin and DNA) and calculated the diffusion coefficients using multi-exponential curve fitting algorithms. As a result, sub-cellular diffusions were divided into three compartments, suggesting the diffusivities of cytosol, plasma/organelle membranes and intra-nuclear structures. Therefore, we have shown the potential of diffusion-weighted MR imaging with extremely high b-values for estimating subcellular water diffusivity, which could provide the useful information for the various biological process in the cell, including intracellular transport, protein-DNA/RNA interactions, cell division and cell death processes.

研究分野：歯科放射線学

キーワード：拡散強調MRI 細胞内拡散 制限拡散

1. 研究開始当初の背景

(1) 拡散強調 MRI での水分子の拡散の評価と問題点

拡散強調 MRI (DWI) は、組織中の水分子の動き=拡散現象を画像化する撮像法で、今日の頭頸部画像診断においては欠かせない検査法である [1, 2]。DWI では拡散の影響を見るための磁場強度 (b 値) が大きくなるにつれて組織の信号強度 (S) が曲線的に減少する現象を利用している (図 1)。現在臨床では、低めの b 値 (0 -1000 s/mm²) から信号減衰の傾きである見かけの拡散係数 (D) が計算される事が多いが、これは主に細胞外の水分子の動きを反映しているに過ぎない。

近年、高磁場強度 MRI 装置の普及に伴い、数千 (s/mm²) の超高 b 値を用いた DWI が可能となっている。超高 b 値を用いることにより、細胞内のさまざまな構造により制限された、より小さな異なる拡散現象を捉えられると考えられ、臨床応用も試みられている [3, 4] が、詳細はまだ解明されていない。

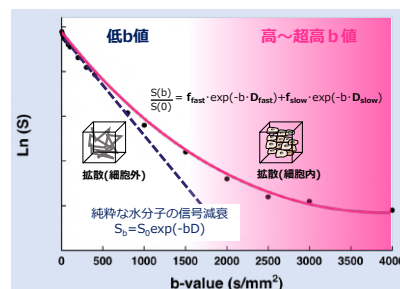


図1. DWIにおけるb値と信号強度(S)の関係

2. 研究の目的

そこで今回の研究では上記の指数関数モデルをさらに発展させ、培養細胞を用いた in vitro 実験にて細胞内拡散係数を求めるモデル式を構築し、細胞内微細構造の拡散を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 材料

今回の in vitro 実験では以下の①～⑥の6種類の細胞試料を作成した。試料はそれぞれ3本ずつ作成した。

①細胞ペレット試料

通法により培養した CV-1 (サル腎臓由来線維芽細胞; 接着細胞) 及び U937 (ヒトリンパ腫由来組織球細胞; 浮遊細胞) 細胞、それぞれ 3×10^7 個をリン酸緩衝液 (PBS) と共にエッペンドルフセイフロックチューブに満たし、185×g で5分間遠心し、ペレット状にした。またこれとは別にペレット化する前の細胞について、株式会社 花市電子顕微鏡技術研究所 (愛知県岡崎市) に依頼し透過型電子顕微鏡 (TEM) 像を得た。

②細胞ペレットの等張/低張液処理試料

U937 細胞 3×10^7 個を使用し、上記①と同様にエッペンドルフセイフロックチューブ内でペレット化させた後、等張液処理として NaCl 濃度 150mM のトリスバッファーに30分浸漬、低張液処理として NaCl 濃度 0m の純水に30分浸漬させた。これとは別に、低張液処理による細胞サイズの変化を調べるために、ハンディ型自動セルカウンター Septor 2.0 (MERK MILLIPORE) を用いて処理直後から3時間後まで細胞の直径 (各20個) を経時的に測定した。また上記1.と同様にペレット化する前の細胞の TEM 像を得た。

③核ペレット試料

CV-1 細胞 6×10^7 個を使用し、バッファーA (10mM HEPES, 1.5mM MgCl₂, 10mM KCl, 0.5mM DTT) や、バッファーB (バッファーA+0.5% Nonident P-40) 処理等により細胞膜を破壊し核成分を抽出、遠心処理により PBS 中でペレット化させた。

④細胞膜および細胞内膜抽出液試料

CV-1 細胞 4×10^7 個を使用し、Minute™ Plasma Membrane Protein Isolation Kit (invent biotechnologies, inc.) を用いて細胞の可溶化処理を行い、遠心分離等により細胞膜成分と細胞内膜成分に分け、それぞれ PBS 中に懸濁させた。

⑤クロマチン抽出液試料

CV-1 細胞 8×10^6 個を使用し、SimpleChIP Enzymatic Chromatin IP Kit (Cell Signaling TECHNOLOGY) を用いてクロマチンをクロスリンクし、超音波処理にて細胞膜や核膜を破壊、遠心処理により PBS 中に可溶性クロマチンとして抽出・懸濁させた。

⑥CV-1 細胞 4×10^7 個を使用し、ISOGENOME (NIPPON GENE CO., LTD.) を用いて細胞を溶解、エタノール沈殿、エタノール洗浄を行い、ゲノム DNA を抽出。8mM NaOH で溶解させた後、HEPES 溶液で中和した。最終的に DNA 濃度 30 μg/ml となるように PBS を用いて調整した。

(2) MRI 撮像

MRI 撮像は研究代表者らが所属する施設に既存の静磁場強度3テスラの装置 (MAGNETOM Skyra, Siemens Healthineers 社製) を使用した。小撮像視野で高精細な撮像が可能な4チャンネル・スペシャル・パーパス・コイル2つを並行に設置できるスタンドを作成し、コイルの間にプラスチック容器を置いた。プラスチック容器内には細胞などの試料を入れたエッペンドルフチューブを位置付けるためのシリコン製テーブルを作成し、試料を置いた容器内に水を満たした状態で MRI 撮像を行った。図2にコイルとプラスチック容器及び細胞試料を入れたエッペンドルフチューブの配置を示す。試料を入れたプラスチック容器は MRI ガントリー内に位置付けた後、

プラスチック容器内の水の動きが無くなるまで5分間静置後し、T1強調像、T2強調像及び0~4000(s/mm²)の間に15段階のb値を設定したDWI像を撮像した(図3)。DWI撮像後、細胞試料が含まれる部位、または液体試料の場合はチューブ中央部に楕円形の関心領域(ROI)を設定し、各々のb値における信号強度を測定した。MRI撮像条件の詳細を表1に示す。

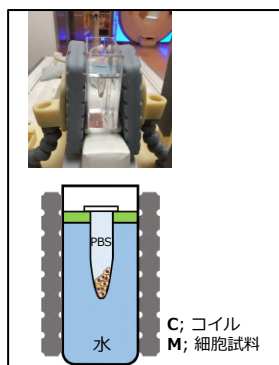


図2. MRI撮像時の試料の位置付け

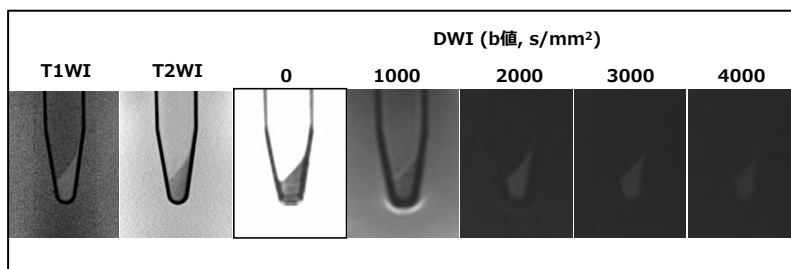


図3. 細胞試料のMRI像

表1. MRI撮像条件

	T1強調撮像	T2強調撮像	拡散強調撮像
高速撮像	Turbo spin-echo	Turbo spin-echo	Single-shot spin-echo EPI
TR (msec)	500	4000	3000
TE (msec)	14	99	263
b-value (s/mm ²) (加算回数)			0(3), 400(3), 800(3), 1000(3), 1200(5), 1400(5), 1600(5), 1800(5), 2000(5), 2200(10), 2400(10), 2600(10), 3000(10), 3200(10), 4000(10)
FOV (mm)	80	80	80
Thickness (mm)	2	2	2
Voxel size (mm)	0.4 x 0.4 x 2.0	0.4 x 0.4 x 2.0	0.4 x 0.4 x 2.0
scan time (min/sec)	58s	48s	15min 51s

(3) 多項指数関数を用いた拡散係数の計算法

① DWIにおけるb値-信号強度曲線の多項指数関数を用いた近似法について

DWIにおける、b値と組織の信号強度(S)の減少を、複数の異なる速度の拡散係数(D1~Dx)とその値が占める割合(f1~fx)を変数として、以下に示す様な多項指数関数近似を行った。

$$S_b = S_0 [f_1 \cdot \exp(-b \cdot D_1) + \dots + f_x \cdot \exp(-b \cdot D_x)]$$

$$\text{ただし } f_1 + \dots + f_x = 1$$

従って、今回の研究ではこの式を応用して各々の試料の拡散係数を求めた。多項指数関数近似については、グラフ作成用ソフトウェアKaleidaGraph 4.5 (HULINKS)の最小二乗回帰プログラムを用いた。解析方法は、カスタム回帰曲線の定義画面上に上記の数式を入力し、未知のパラメータであるDやfの初期推測値を指定し計算を行わせるものである。初期推測値の設定によりDやfは様々な値が算出されるため、同時に算出される決定係数(R²)を参考に、R²が1に最も近くなる様なDやfの値を採用した。

② 各々の試料の拡散係数の近似法

細胞ペレットの拡散については、図4に示す様に4つの拡散係数のコンパートメントを仮定し、4項指数関数近似を行った。すなわち拡散係数が最も大きい(速い)ものから順に fast diffusion、moderate diffusion、slow diffusion、strictly slow diffusionとし、それぞれ細胞外液(水)、細胞質基質、膜構造及び核内部の構造の拡散を表すと仮定した。核ペレットについては核外の水、核膜近傍及び核内部構造の3コンパートメント、その他の膜構造やクロマチン、DNAについてはこれらの構造物と水の2コンパートメントに区分し指数関数近似を行った。

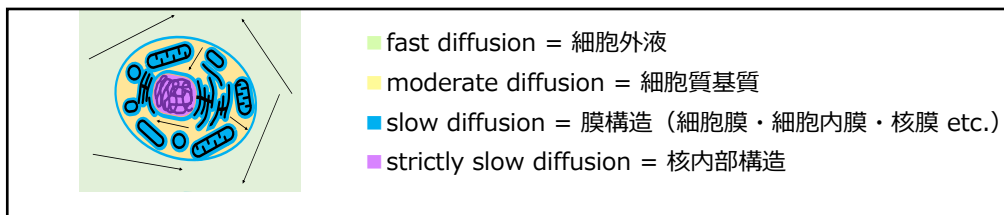


図4 細胞内・外拡散の4コンパートメントモデル

(4) 多項指数関数を用いた拡散係数近似法によるヒト脳組織拡散係数の評価

上記で確立した拡散係数の近似法を用いてヒト脳白質と灰白質の拡散係数の区別を試みた(長

崎大学大学院医歯薬学総合研究科・歯学系臨床研究倫理委員会、承認番号 19010901)。対象はインフォームドコンセントが得られた健康者 1 名で、前述と同様に b 値 0~4000 (s/mm²) の頭部の拡散強調 MRI を撮像した。得られた画像から 大脳灰白質と白質領域に直径 5~7mm の円形の関心領域をそれぞれ 10 箇所設定し、前述と同様に 4 項指数関数近似を行い拡散係数を求めた。

4. 研究成果

①細胞ペレットの拡散係数の 4 項指数関数近似

図 5 に 4 項指数関数近似を用いて CV-1 と U937 細胞ペレットの拡散係数 D (D1~D4, $\times 10^{-3}$ mm²/s) 及びその割合 f (f1~f4, %) を求めた結果を示す。

CV-1 と U937 細胞の拡散係数を比較すると、最も早いものから 3 つ (D1~D3) の拡散係数が 2 つの細胞で大きく異なっていた。これは 2 つの細胞の膜構造の違いを反映していると思われる。TEM 像では CV-1 の方が U937 よりも辺縁の凹凸不正が目立っており、細胞外の水分子の動きにくさが D1 の値の違いを説明していると考えられ、D2 や D3 についても細胞内の構成要素の膜構造や配置状態の違いで説明可能と思われる。一方、D4 については CV-1 も U937 も同じ値を示し、最も遅い拡散係数については細胞による違いはなく一定であると考えられる。

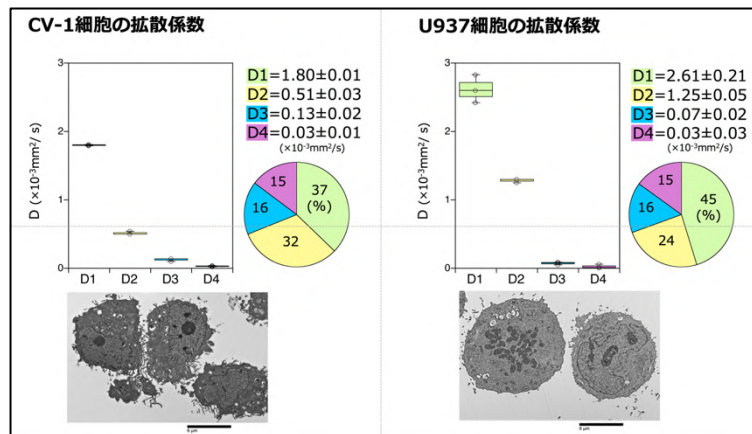


図 5. 細胞の拡散係数

②細胞ペレットの等張/低張液処理試料の 4 項指数関数近似

図 6 に等張液及び低張液処理を行った U937 細胞ペレットの結果を示す。等張液と比較し低張液処理により肉眼的に細胞容積は明らかに増大し、TEM 像では低張液処理により細胞は膨潤し内部に小さな小胞が散在、核は丸く膨潤していた。細胞径は処理開始から最初の 5 分で著明に増大 (p<0.005, Steel-Dwass test) して

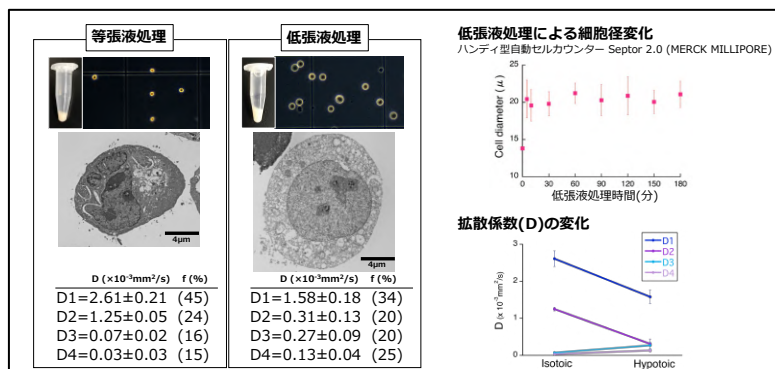


図 6. 等張液・低張液処理と細胞ペレット拡散係

おり、それ以降は 180 分後まで明らかなサイズの増大は認めなかった。等張液と低張液処理を比較すると、D1 及び D2 は低張液処理により大きく減少、D3 と D4 はやや増加していた。このことは、従来の b 値 0~1000 までを用いて mono-exponential fit で計算した場合の主として細胞外の水分子の動きを表す拡散係数では明らかにされなかった細胞内構造の変化が拡散係数に及ぼす影響を表していると考えられる。

③細胞内構成要素の拡散係数

図 7 に細胞内構成要素の計算結果を示す。全ての構成要素の拡散係数とも、最大の拡散係数 (D1 コンパートメント) は試料調整に用いた水や PBS 由来の拡散係数を表していると考えられる。細胞ペレット (D1=1.80) や核ペレット (D1=1.27) では細胞膜や細胞内膜懸濁液試料と比較し、水分子が動き回ることができる間隙が狭くなるため他よりも値が小さくなったと考えられる。また、D2~D4 については細胞内の拡散係数を表すと推測されるが、D3 の拡散係数が全ての試料間で比較的近い値 (0.13~0.24) となったことは注目し値する。Eida ら[5]は FCS (蛍光相関分光法) を用いて生細胞の細胞内外の拡散係数を測定し報告しているが、それによると細胞外と比較し、細胞内の拡散係数は低く、細胞内では細胞膜や核膜、核内部の拡散係数が同程度に低く、細胞質の拡散係数はそれらよりやや高いという結果であった。今回の我々の実験結果では、細胞質内に存在する細胞内膜やクロマチンはおそらく同程度の拡散係数を有していると推定され、それらより大きな値を示した D2 コンパートメントは細胞質基質や核原型質液体成分の拡散に相当すると推定される。DNA は最も遅い拡散係数の D4 に区分された。しかしながら本来の核の内部の DNA 濃度はこれよりもはるかに高いため[6]、この値は真の値を示しているとは言えないであろう。

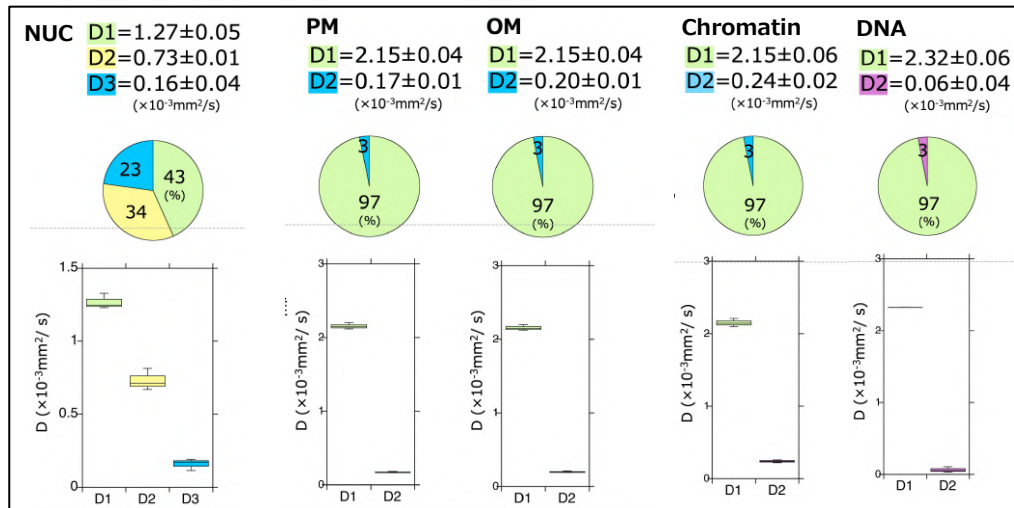


図7. 細胞内構成要素の拡散係数の指数関数近似結果

④多項指数関数を用いた拡散係数近似法によるヒト脳組織拡散係数の評価

図8および表2に健常ヒト脳組織灰白質(GM)と白質(WM)の拡散係数を4項指数関数近似で解析した結果を示す。灰白質も白質も4項指数関数近似で解析する事が可能であり(GM; $R^2=0.9994$ 、WM; $R^2=0.9996$)、もっとも値の大きな拡散D1はGMとWMで有意差は見られなかった($p=0.791$)が、D2についてはWMが有意に大きく($p=0.004525$)、D3とD4はGMが有意に大きい(D3; $p=0.0002409$ とD4; $p=0.0001817$)という結果が得られた。これらは灰白質と白質の細胞の微細構造の違いを反映した結果と考えられる。以上の様に異なる拡散係数を評価可能な本法は生体組織にも応用可能であり、種々の病変、疾患の病態解明に新たな有用な情報を提供してくれるものと期待する。

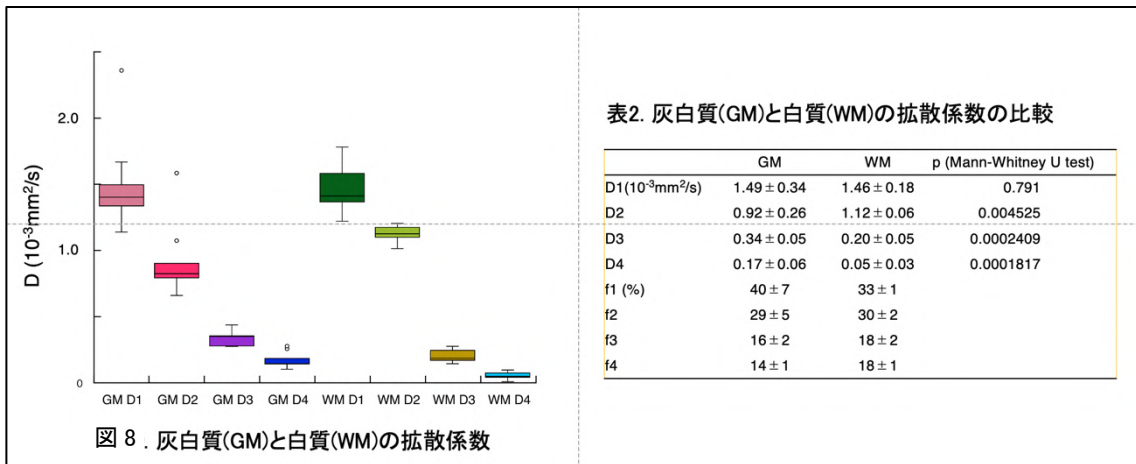


図8. 灰白質(GM)と白質(WM)の拡散係数

【引用文献】

1. Apparent diffusion coefficient mapping for sinonasal diseases: differentiation of benign and malignant lesions. Sasaki M, Eida S, Sumi M, Nakamura T. AJNR Am J Neuroradiol. 2011 Jun-Jul;32(6):1100-6. doi: 10.3174/ajnr.A2434. Epub 2011 Mar 10.
2. Diffusion-weighted MR imaging of ameloblastomas and keratocystic odontogenic tumors: differentiation by apparent diffusion coefficients of cystic lesions. Sumi M, Ichikawa Y, Katayama I, Tashiro S, Nakamura T. AJNR Am J Neuroradiol. 2008 Nov;29(10):1897-901. doi: 10.3174/ajnr.A1266. Epub 2008 Aug 21.
3. A Modified Tri-Exponential Model for Multi-b-value Diffusion-Weighted Imaging: A Method to Detect the Strictly Diffusion-Limited Compartment in Brain. Zeng Q, Shi F, Zhang J, Ling C, Dong F, Jiang B. Front Neurosci. 2018 Feb 26;12:102. doi: 10.3389/fnins.2018.00102. eCollection 2018.
4. In vivo measurement of cytoplasmic organelle water fraction using diffusion-weighted imaging: Application in the malignant grading and differential diagnosis of gliomas. Ling C, Shi F, Zhang J, Jiang B, Dong F, Zeng Q. Medicine (Baltimore). 2019 Nov;98(46):e17949. doi: 10.1097/MD.00000000000017949.
5. Length of intact plasma membrane determines the diffusion properties of cellular water. Eida S, Van Cauteren M, Hotokezaka Y, Katayama I, Sasaki M, Obara M, Okuaki T, Sumi M, Nakamura T. Sci Rep. 2016 Jan 11;6:19051. doi: 10.1038/srep19051.
6. Quantitative determination of nuclear pore complexes in cycling cells with differing DNA content. G G Maul, L Deaven. Cell Biol. 1977 Jun;73(3):748-60. doi: 10.1083/jcb.73.3.748.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佐々木 美穂、佛坂 由可
2. 発表標題 3テスラ超高b値拡散強調MRIを用いた 細胞内拡散係数の推定
3. 学会等名 第75回NPO法人口腔科学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐々木 美穂、佛坂 由可、片山 郁夫、榮田 智、高木 幸則、角 美佐、中村 卓
2. 発表標題 高磁場・超高b値 拡散強調MRIを用いた細胞内拡散係数の推定
3. 学会等名 日本歯科放射線学会第60回学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐々木 美穂、佛坂 由可、片山 郁夫、榮田 智、角 美佐、中村 卓
2. 発表標題 高磁場・超高b値における拡散強調撮像法
3. 学会等名 日本歯科放射線学会第58回学術大会
4. 発表年 2017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
研究分担者	佛坂 由可 (HOTOKEZAKA Yuka) (10244089)	長崎大学・病院（歯学系）・講師 (17301)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	中村 卓 (NAKAMURA Takashi) (30172406)	長崎大学・医歯薬学総合研究科（歯学系）・客員研究員 (17301)	
研究分担者	高木 幸則 (TAKAGI Yukinori) (30295084)	長崎大学・医歯薬学総合研究科（歯学系）・助教 (17301)	
研究分担者	片山 郁夫 (KATAYAMA Ikuo) (80295089)	長崎大学・医歯薬学総合研究科（歯学系）・助教 (17301)	
研究分担者	榮田 智 (EIDA Sato) (80325662)	長崎大学・医歯薬学総合研究科（歯学系）・助教 (17301)	
研究分担者	角 美佐 (SUMI Misa) (90284702)	長崎大学・医歯薬学総合研究科（歯学系）・教授 (17301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関