

平成 21 年 6 月 17 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007-2008

課題番号：19591708

研究課題名 (和文) Neurogenesis imaging の開発-内在性神経幹細胞の活動の画像化

研究課題名 (英文) Development of neurogenesis imaging - visualization of endogeneous neural stem cell

研究代表者

樋口 敏宏 (HIGUCHI TOSHIHIRO)

明治国際医療大学・医学教育研究センター・教授

研究者番号 80218700

研究成果の概要：

成体脳にも中枢神経損傷後の神経再生において重要な役割を果たすと考えられる神経幹細胞が存在する。本研究では内在性神経幹細胞による神経再生の過程を in vivo において画像化するために、マンガン(Mn)造影 MRI (MEMRI) を応用した手法の開発を行った。動物実験用 MRI 装置を用いて MEMRI 測定法の改良と最適化を行った。次いでラットの脳虚血モデルを対象に撮影を行い、虚血に伴う造影効果が確認され、glia 細胞などの集積を反映することが明らかとなった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野： 医歯薬学

科研費の分科・細目： 外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：脳血管障害学，内在性神経幹細胞，神経再生，マンガン，MRI，脳虚血

1. 研究開始当初の背景

1) 成体脳にも細胞分裂を行い新たに神経細胞を供給する内在性神経幹細胞が存在し、中枢神経損傷後の神経再生においては、この内在性神経幹細胞の賦活化が重要であることは知られている。神経幹細胞は神経細胞のみではなく、さまざまな因子による誘導と抑制によって神経膠細胞 (グリア) や脳室上衣細胞へ分化すると

同時に、遊走して目的部位で機能を確立することがあきらかになってきている。これらの神経再生の研究は、従来、組織学的手法により行われてきており、生体での画像化および解析の手法はまだ確立していない。

2) 中枢神経系の in vivo での非侵襲的画像

化は1980年代に、磁気共鳴画像法(MRI)が導入されて以来、長足の進歩を遂げた。形態的および組織組成的診断には日常的に臨床で重要な技術として用いられており、さらに水分子拡散状態を反映する画像法(拡散強調画像:DWI)により超急性期脳梗塞の診断が可能となった。また、脳機能の賦活にともなう局所脳血流増加をとらえる画像法(脳機能画像:fMRI)により脳機能研究が推進された。最近ではMRI造影効果の強い酸化鉄微粒子にて標識された胚性幹細胞(ES細胞)の移植後の遊走、分化の画像化や、酵素活性に反応する造影剤の導入によって遺伝子の発現をin vivoで画像化する手法、あるいはたった1個の標識細胞を画像化する手法など、MRIの撮像技術は細胞イメージングおよび分子イメージングの段階に入ってきている。

2. 研究の目的

1) 本研究ではMRIの多彩な撮像技術を応用して、神経再生のin vivoでの画像化法(neurogenesis imaging)の開発を目的とした。

2) われわれはこれまでMRI造影効果の強いMn(マンガン)に注目し、Mnの軸索輸送を画像化することによる神経軸索経路トレースや、Mnの神経組織への取り込みにより嗅脳、大脳、小脳、海馬における層構造の明瞭な画像化(マンガン造影MRI, manganese-enhanced MRI: MEMRI)および一過性全脳虚血後の遅発性神経細胞死による海馬神経細胞の脱落の画像化、さらに感覚刺激やグルタミン酸投与や脳虚血にともなう神経細胞の脱分極においてCa²⁺イオンと同様に細胞内に流入するMnにより脳内の賦活領域の画像化(神経細胞賦活画像: AIM: Activity induced manganese enhanced)などのいずれも生体での画像測定に成功してきた。

3) 本研究ではこれらのMnを使用する造影MRIの中でもMEMRIを応用して、成体脳に存在する内在性神経幹細胞が賦活され分化、増殖し、目的部位に向かって移動、生存する状態をin vivo MRIにより画像化する技術を開発する。この画像化法が実現すれば、脳損傷後の神経再生を同一個体において経時的に追跡することが可能となり、神経再生を促進するために必要な治療法の解明に極めて有用な手段となる。とくに、成長因子やサイトカイン、さらにGABAやdopamine系神経伝達物質などによる内在性神経幹細胞の至適な賦活およびグリアへの分化制御の方法など

の解明が可能となる。また、この画像化法は、神経再生における神経幹細胞やES細胞、ヒトNT2細胞、骨髄間葉系幹細胞、臍帯血幹細胞などの細胞移植後の細胞分化、移動の研究への応用も可能である。

3. 研究の方法

動物実験用MRI装置(4.7テスラ水平型MRI装置, Bruker社製, 現有設備)を用いてMEMRI測定法の改良と最適化を行い、実験的脳虚血モデルを対象として内在性神経幹細胞の増殖、移動を高感度で捉えるneurogenesis imaging法を開発するための基礎的検討を行う。

1) Mnにより造影された少数の細胞を捉えるための高感度MEMRI測定法を確立する。

Mnは強い造影効果を有するが、少数の細胞にわずかに取り込まれた状態を効率よく検出するためには、MRI測定法の感度をより高くし、高分解能測定を可能とすることが必要である。測定コイルの改良、ノイズの低減、測定パルスシーケンスの改良と測定パラメータの最適化、さらに撮影された多くの断層画像の詳細な経時的解析システムの構築を行う。

2) 実験的脳虚血モデルを作成しneurogenesis imaging法の基礎的検討を行う。

実験的脳虚血モデルは、従来から作成し研究に用いてきているラットの1) 中大脳動脈一過性閉塞モデル(temporary MCA occlusion: tMCAO)と2) 四主幹動脈結紮による一過性前脳虚血モデルを対象とする。それぞれのモデルにおいて脳虚血作成後、経時的にMRIの撮影を行い、Mnによる造影所見の解析を行う。

4. 研究成果

1) 動物実験用MRI装置を用いてMEMRI測定法の改良と最適化を行った。Mnにより造影された少数の細胞を捉えるため測定コイルの改良、ノイズ対策、測定パルスシーケンスの改良と測定パラメータの最適化を行い、高分解能測定を可能とした。

2) 中大脳動脈一過性閉塞モデル

(temporary MCA occlusion: tMCAO)

Sprague Dawley ratを対象として60分間の中大脳動脈閉塞後、血流再開を行って一過性脳虚血を作成し、1日後、11日後、21日後にMEMRIおよびDWI, T2WIを撮影した。1日後ではDWI, T2WIにて脳梗塞病巣部の信

号強度変化を認めたが、MEMRI では Mn の取り込みは見られなかった。1 1 日後には脳梗塞周辺部に MEMRI にて Mn の取り込みによる信号強度の増大を認めた。この信号強度の変化は、組織学的検討により GFAP 染色にて陽性を示す glia 細胞の増生領域に相当していた。これらの変化は 2 1 日後にも継続していた。(図 1)

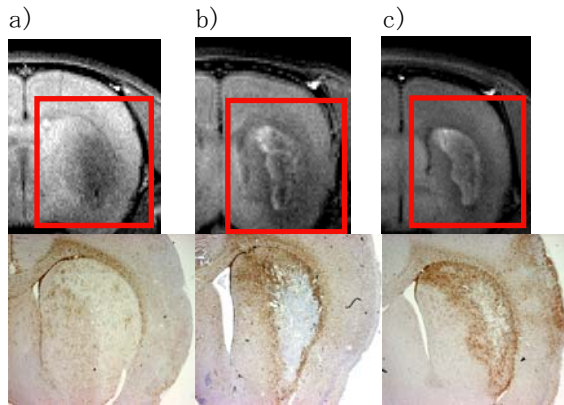


図 1 ラット中大脳動脈一過性脳虚血モデルにおける MEMRI (上段) と GFAP 染色 (下段)
a) 1 日後, b) 11 日後, c) 21 日後

3) 四主幹動脈結紮による一過性前脳虚血モデル

Wistar rat を対象として 10 分間の四主幹動脈結紮を行って一過性前脳虚血を作成した。虚血 72 時間後に行った MEMRI では海馬の CA1 領域において信号上昇が確認され、約 10% の T1 値の短縮が観察された。虚血損傷部のミクログリアの活性を反映する可能性が示唆された。(図 2)

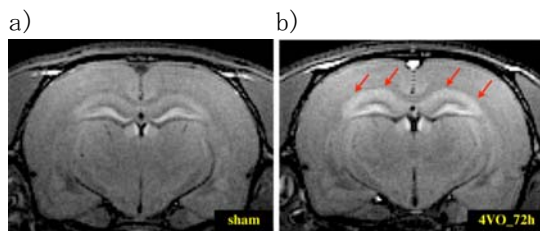


図 2 ラット一過性前脳虚血モデルにおける MEMRI。a) sham operation, b) 一過性前脳虚血 72 時間後の MEMRI

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

① Shimizu Y, Umeda M, Mano H, Aoki I, Higuchi T, Tanaka C. Neuronal response to Shepard's tones. An auditory fMRI study using multifractal analysis. Brain Research, 査読有り, 1186, 113-126, 2007

② 田中忠蔵、青木伊知男、河合裕子、梅田雅宏、樋口敏宏、マンガン造影 MRI による分子イメージング。映像情報, 査読無し, 39, 366-371, 2007

③ 福永雅喜、梅田雅宏、樋口敏宏、田中忠蔵、MR 撮像法による臨床応用 fMRI による脳機能の診断。日独医報, 査読無し, 52, 413-422, 2007

[学会発表] (計 17 件)

① Kawai Y, Umeda M, Watanabe Y, Higuchi T, Tanaka C, Glial tissue imaging at ischemic lesion by MEMRI using manganese oral administration. ISMRM, 2008. 5, Toronto (Canada)

② Watanabe Y, Kimura K, Umeda M, Higuchi T, Tanaka C, Dynamic DTI during muscle contraction by electrical stimulation. ISMRM, 2008. 5, Toronto (Canada)

③ Bito Y, Hirata K, Shirai T, Yamamoto K, Soutome Y, Ebisu T, Umeda M, Kawai Y, Higuchi T, Tanaka C, Lactate-Discriminating Echo-Planar Spectroscopic Imaging at 7 T. ISMRM, 2008. 5, Toronto (Canada)

④ Bito Y, Shirai T, Hirata K, Taniguchi Y, Hirata K, Otake Y, Soutome Y, Ochi H, Ebisu T, Umeda M, Kawai Y, Higuchi T, Tanaka C, Parallel Line-Scan Echo-Planar Spectroscopic Imaging. ISMRM, 2008. 5, Toronto (Canada)

⑤ Bito Y, Hirata K, Ebisu T, Kawai Y, Otake Y, Hirata S, Shirai T, Soutome Y, Ochi H, Umeda M, Higuchi T, Tanaka C, Diffusion-Weighted Line-Scan Echo-Planar Spectroscopic Imaging for Improved Accuracy in Metabolite Diffusion Imaging. ISMRM, 2008. 5, Toronto (Canada)

⑥河合裕子、梅田雅宏、渡邊康晴、樋口敏宏、田中忠蔵、ラットに対する低濃度の塩化マンガン水溶液投与による造影効果の検討。日本磁気共鳴医学会大会，2008.9，旭川(北海道)

⑦河合裕子、梅田雅宏、渡邊康晴、樋口敏宏、田中忠蔵、脊髄神経損傷モデルにおける末梢神経のADCの変化。日本磁気共鳴医学会大会，2008.9，旭川(北海道)

⑧乾千珠子、梅田雅宏、佐々木耕太、大井康浩、吉岡芳親、大澤五住、清山昭敏、マンガン造影法による味覚嫌悪学習の脳神経機構の研究。日本磁気共鳴医学会大会，2008.9，旭川(北海道)

⑨村瀬智一、河合裕子、梅田雅宏、渡邊康晴、樋口敏宏、田中忠蔵、低濃度マンガン静注による組織の緩和時間変化。日本磁気共鳴医学会大会，2008.9，旭川(北海道)

⑩渡邊康晴、梅田雅宏、木村啓作、樋口敏宏、田中忠蔵、電気刺激によって生じる筋収縮のeigen value。日本磁気共鳴医学会大会，2008.9，旭川(北海道)

⑪梅田雅宏、乾千珠子、大澤五住、吉岡芳親、河合裕子、渡邊康晴、樋口敏宏、田中忠蔵、C6培養細胞へのMnの影響と培養液の¹³C/¹Hスペクトルによる解析。日本磁気共鳴医学会大会，2008.9，旭川(北海道)

⑫尾藤良孝、平田宏司、河合裕子、恵飛須俊彦、白猪亨、平田智嗣、五月女悦久、梅田雅宏、田中忠蔵、7T MRIにおける乳酸分離スペクトロスコーピックイメージング:脳虚血モデルラットによる検証。日本磁気共鳴医学会大会，2008.9，旭川(北海道)

⑬Watanabe Y, Kimura K, Umeda M, Higuchi T, Tanaka C, High Time Resolution DWI of Muscle Contraction During Electrical Stimulation. ISMRM, 2007. 6, Berlin

⑭Kawai Y, Aoki I, Matsumoto N, Umeda U, Higuchi T, Kershaw J, Silva AC, Tanaka C, Detection of Reactive Gliosis Using Manganese-Enhanced MRI (MEMRI). ISMRM, 2007.6, Berlin

⑮渡邊康晴、梅田雅宏、木村敬作、樋口敏宏、田中忠蔵、High Temporal Resolution

Imaging of Muscle Deformation by Electrical Stimulation, 日本磁気共鳴医学会大会，2007.9，神戸

⑯真野博彰、梅田雅宏、樋口敏宏、福永雅喜、田中忠蔵、安静時脳のファンクショナルコネクティビティ 高齢群と若年群の比較。日本磁気共鳴医学会大会，2007.9，神戸

⑰尾藤良孝、平田宏司、白猪亨、山本由香里、五月女悦久、恵飛須俊彦、河合祐子、梅田雅宏、樋口敏宏、田中忠蔵、7T MRIによる乳酸スペクトルスコーピックイメージング。日本磁気共鳴医学会大会，2007.9，神戸

[図書] (計 3 件)

①梅田雅宏、オーム社、NMR 現象・放射線技術学シリーズ、MR 撮像技術学 改訂 2 版: 自由誘導とスピネコー・励起緩和。2008, 54-68

②Yamamoto H, Ban H, Fukunaga M, Tanaka C, Umeda M, and Ejima Y, Nova publishers, Visual Cortex: New Research A large- and Small-Scale Functional Organization of Visual Field Representation in the Human Visual Cortex. 2008, 195-222

③田中忠蔵、成瀬昭二、樋口敏宏、梅田雅宏、エヌ・ティー・エス、非侵襲・可視化技術ハンドブック-ナノ・バイオ・医療から情報システムまで-「解剖学的画像としてのMRI-正常編」の章担当，2007. 18-27

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

樋口 敏宏 (HIGUCHI TOSHIHIRO)

明治国際医療大学・医学教育研究センター・教授

研究者番号: 80218700

(2) 研究分担者

田中 忠蔵 (TANAKA CHUZOU)

明治国際医療大学・医学教育研究センター・教授

研究者番号：80163541

梅田 雅宏 (UMEDA MASAHIRO)
明治国際医療大学・医学教育研究センター・
准教授
研究者番号：60223608

青木 伊知男 (AOKI ICHIO)
独立行政法人放射線医学総合研究所・分子イ
メージング研究センター・上席研究員
研究者番号：10319519

渡辺 康晴 (WATANABE YASUHARU)
明治国際医療大学・医学教育研究センター・
助教
研究者番号：90454537

(3)連携研究者
なし