

機関番号： 24303
研究種目： 基盤研究 (C)
研究期間： 2008 ~ 2010
課題番号： 20591455
研究課題名 (和文) 多核種 NMR 脳機能分子イメージングによる神経組織再生メカニズムの解析

研究課題名 (英文) Analysis of the mechanism of neuronal regeneration by using multi-nuclei magnetic resonance methods with molecular imaging of brain function

研究代表者

成瀬 昭二 (NARUSE SHOJI)
京都府立医科大学・医学研究科・准教授
研究者番号： 50106407

研究成果の概要 (和文)：

多核種NMR脳機能分子イメージングの種々の技法を実用化し“神経細胞の再生”と“免疫系と脳機能との関連”に関する解析への適用をおこなった。(1) マンガン増感磁気共鳴画像法 (MEMRI)を実験的脳虚血モデルでの神経細胞再生・線維連絡の解析・グリア変化の解析に適用した。結果、①Ca²⁺チャンネル開口に依存した神経細胞興奮賦活の検出、②神経細胞やグリアへの取り込みによる細胞の機能を反映した高分解能画像の取得、③軸索輸送による神経線維走向の画像化、が可能となった。(2)抗原抗体反応を検出するため、MR感受性物質 (Fe, Gd) を結合させた高分子の動物体内分布画像化の検討を行った。また腫瘍免疫特異性反応リンパ球にMR感受性物質を吞食させる基礎的技術開発をも行った。しかし、特異免疫機能を残して分布を画像化することは現時点では困難であった。(4) 臨床装置で2次元MRS法(2D-COSY, 2D-JPRESS)を用いて、脳内のアミノ酸 (NAA、Glutamate等) の分布画像化と解析が可能となった。種々のNMR脳機能分子イメージング法は神経細胞再生の解析に有用である。

研究成果の概要 (英文)：

We have developed multi-nuclear magnetic resonance method with molecular imaging for the analysis of neuronal function and regeneration as followings; (1) Neuronal activation imaging by using manganese-enhanced MRI (MEMRI) which is based on the theory that Mn²⁺ can enter into neuronal cell in conjunction with Ca²⁺ during the neuronal activation; This method could clearly demonstrate the neuronal activation of the sensory area in rat and the structure of neuronal fibers in rat olfactory groove, optic radiation and cortical layers. During the recovery period after experimental ischemia, the enhanced area by MEMRI corresponded to the GFAP-positive astroglia were observed in the peripheral region of the ischemic core, indicating the reactive astrogliosis. (2) Magnetic resonance technique which can visualize antigen-antibody reaction in the brain: The imaging of macromolecule combined with magnetic resonance sensitive materials (Fe, Gd) could be obtained *in vitro*, but it was difficult to apply this method to *in vivo* study. (3) We have developed 2D-MRS method on the clinical MRI scanner by using 2D-JPRESS and 2D-COSY methods. Brain metabolites were detected sensitively by 2D-MRS method. The multi-nuclear MR methods are useful to examine the brain function and neuronal regeneration non-invasively.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：磁気共鳴医学・放射線医学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・放射線科学

キーワード：磁気共鳴法 (MRI)、脳機能分子イメージング、Mn-enhanced MRI (MEMRI)、神経細胞再生、2次元磁気共鳴スペクトル、免疫、超高速化学シフト画像

1. 研究開始当初の背景

Functional MRI (fMRI)に代表されるように、磁気共鳴法(NMR)には脳機能や代謝を非侵襲的に画像解析できる大きな特徴があり、臨床および脳科学分野で広く用いられている。しかし、このNMRにはまだまだ多彩な能力が秘められており、未応用分野も多く残されている。私達は、早くからNMRにて脳神経疾患の解析を行い、数々のNMR技法を実用化し、更なる応用発展の研究を続けている。一方、最近の神経科学領域での研究の大きな流れは、ゲノム解明が進み、発現するタンパクや糖鎖、代謝物質などの分子の働きと脳機能との関連性の解明に移っている。特に、脳内でのこれら物質の分布や働きを画像化して解析する方法(分子イメージング)の実用化が望まれている。中でも、*in vivo*で非侵襲的に画像化でき、多彩な能力を有するNMR法の応用に大きな期待が寄せられている。そこで、我々は自らのNMR技法の技術力を最大限発揮して、種々のNMR脳機能分子イメージングの技法を開発してきた。今回、これらの方法を発展・実用化し、また新たな方法も開発して、脳機能の解明と脳神経疾患解析への応用を行う研究計画を立てた。特に、二つの重要なテーマに関して検討を行いたい。一つは、“神経組織の再生”であり、もう一つは、神経細胞自身に対する自己・非自己認識に関係する免疫系の特異性と脳機能や病態との関連についてである。前者に関しては、神経幹細胞の発見や神経栄養因子の検出などの基礎研究にて神経細胞の再生が確認されているが、これまでは病理学的・生化学的

研究や主で、*in vivo*動物実験に関しては殆どなされていない。しかし今回開発する多核種NMR脳機能分子イメージング法を応用すれば、動物実験及び臨床的検討も可能となり、“神経組織再生”に関して新たな展開が開ける。また、“免疫系の特異性”に関しては、種々の抗体とMRI感受性物質を結合させた化合物や、MR感受性物質を取り込ませた免疫系細胞や腫瘍細胞特異性免疫反応リンパ球など、を多核種NMR脳機能分子イメージング法で検出することにより、それらの分布・動態の画像解析が可能となり、免疫反応解析の新しい展開が開けると考えられる。

2. 研究の目的

具体的な研究の目的は、従来開発してきた種々の多核種NMR脳機能分子イメージング法を実用化すると共に、新たなNMR技法を開発し、動物実験モデルで神経細胞再生機構の解明と免疫特異性の解明への応用を行うことにある。更に、これら技法の臨床への適用の可能性を検討したい。即ち、代表的な方法として(1) マンガン増感磁気共鳴画像法(Mn-enhanced MRI)にて以下のような脳機能分子イメージングを得る技法を実用化し解析を行う。①神経細胞興奮によるカルシウムチャンネル開口に依存した神経賦活を検出する手法、②神経およびグリア細胞内に取り込ませ、細胞の形態および機能を反映した高分解能画像を取得する技法、③軸索輸送による脳組織内神経線維のトレーシングを可能にする技法、を開発する。(2) 高分子化学・生体材料学の専門研究者との共同で、抗原抗体反応を検出するための高分子とそれ

にNMR感受性物質を結合させたComplexの開発を行い、脳各部位での特異性物質（細胞膜糖鎖など）の分布の画像化を試みる。また、病態モデルでは腫瘍免疫特異性反応リンパ球にNMR感受性物質を吞食させて、その動態をmicroimagingで観察する。(3) 2次元MRスペクトロスコピー（MRS）法をin vivoで実用化し、神経細胞特有のアミノ酸（NAA、Glutamate等）の分布を測定し神経細胞の代謝活性・特異性を解析する。

本研究は、脳活動を分子レベルで解析できる多核種NMR脳機能分子イメージング法を実用化し、in vivo動物基礎実験で神経組織再生や免疫特異性の解明への適用を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

大きく分けて3項目の研究からなる。第一は、種々のNMR脳機能分子イメージング法を改良・実用化し、それらを脳機能の解明と脳神経疾患解析の研究に適用できるようにすること。第二はこれらを用いて、動物実験モデルでのin vivo解析への適用を行い、第三は、これらを基に臨床適用の可能性を検討すること、である。まず種々の方法に関する基礎的検討を行い、それに引き続き、以下のようなNMR脳機能分子イメージングの実用化と動物基礎実験での解析・検討を行い、可及的に臨床装置への適用を試みる。研究装置として動物用NMR装置（4.7T, Biospec, Bruker）と臨床用MR装置（1.5T Signa Horizon LX, GE）を用いた。

(1) Mn-enhanced MRIによる脳機能分子イメージングの実用化：①ニューロンの興奮にて生じるシナプスでの Ca^{2+} の出入りと共役する Mn^{2+} の動態を捉えることにより神経細胞の賦活が画像化される、②神経細胞、グリア細胞内に Mn^{2+} を取り込ませ、細胞の形態および機能を微細に反映する超高分解能MRI画像（10 μ mオーダー）を取得する、③ Mn^{2+} を媒体として、軸索輸送による脳組織内神経線維の3次元トレーシングを可能にする。

(2) 動物実験として以下のモデルを用いる。

①脳梗塞モデル：Wistar ratに中大脳動脈閉塞モデル（Suture model）およびPulsinelliの大脳広範囲虚血モデルを作成する。何れも、虚血および再開通を行い、ニューロンの再生変化を観察する。

②細胞中毒モデル：代謝性神経変性モデルとして、Triethyl-tin (TET) 1mg/kgを7日間連日投与して神経細胞体の代謝変化

と白質のミエリン鞘の高度断裂と高度脳浮腫病態を作成する。

③これら各動物モデルの病態極期から回復期にかけて連続的に、多核種NMR脳機能分子イメージングで神経細胞の形態的、代謝的回復過程を検討する。

(3) 2次元MRS法の生体適用の実用化：2次元相関MRS法を実用化して、従来のMRSでは不可能であるアミノ酸（Glutamine, Taurine等）やシグナル伝達に重要なイノシトールリン酸の分相関布の検出を可能にする。

(4) 免疫情報の磁気共鳴画像化：NMR感受性物質と抗体高分子との結合体の開発およびその画像化。

①抗体と同程度の高分子及びCD3, TCR γ , δ などの抗体とNMR感受性物質（ Mn^{2+} , Fe^{3+} , Gd^{3+} 等）との結合（標識）技術を完成する。②次いで、樹状細胞、NK細胞などの免疫細胞表面とこれらNMR感受性標識抗体との抗原抗体結合を超高分解能MRIで画像化する技術を完成させる。

③さらに、免疫細胞にNMR感受性物質を吞食させて、担がんマウス移植の固形腫瘍（CSAIM）と反応させ、その結合を超高分解能MRIで検出することより腫瘍細胞膜特異性抗原に反応する免疫細胞の分布と動態をin vivoで画像化する方法を確立する。これにて、腫瘍の特異的検出とその場での治療効果の同時判定を可能ならしめる方法の確立を目指す。

4. 研究成果

初年度は主に多核種NMR脳機能分子イメージングの開発を行い、続く2, 3年度は動物実験と臨床応用可能性の検討を行った。

(1)マンガン増感磁気共鳴画像法による脳機能分子イメージングの開発：低濃度 Mn^{2+} を投与してEPIで画像化する方法（Mn-enhanced MRI (MEMRI)）及びDynamic activity-induced manganese dependent (DAIM-MRI)を開発した。この方法は、神経細胞の脱分極の情報を画像化できる画期的な方法である。これを、ラット脳虚血モデルに適用して、虚血病巣周囲の脳組織の可塑性の画像化の検討を行い、可塑性領域の判定に用いられ得ることを検討した。その結果、MEMRIで示される虚血病巣と拡散強調画像や脳灌流画像で示される異常部位とに相違があり、MEMRIがより正確に病巣部を示すことが認められた（図1）。

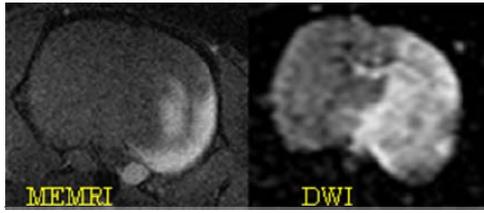


図1. ラット中大脳動脈結紮後のMRI
(MEMRI (結紮直後)、DWI (結紮 90 分後))
(Aoki I, et al. Magn Reson Med 2003, 50:7-12)

虚血病巣の可塑性に関しては、MEMRI、拡散強調画像、脳灌流画像との組み合わせで検討する必要があることが示された。また、外傷モデルおよび脳虚血モデルで、組織修復に関係して gliosis の領域も MEMRI にて信号強度変化が認められ、astroglia が神経組織修復に大きく関与していることが認められた。

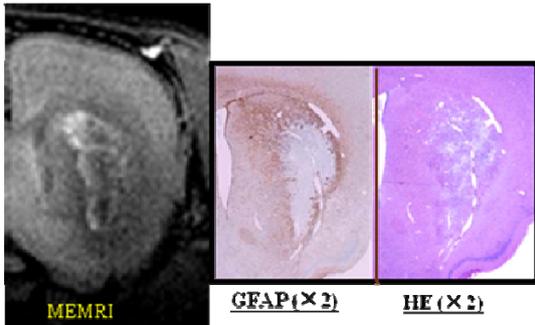


図2. ラット脳虚血後(MCAO) 11 日、MEMRI で astrogliosis の信号増強が認められる (Kawai Y. et al. NeuroImage. 2010, 49:3122-31)

その他、MEMRIでは神経細胞、グリア細胞内に Mn^{2+} を取り込ませて信号強度変化を強調させることにより細胞の形態および機能を微細に反映する超高分解能MRI画像が得られた。

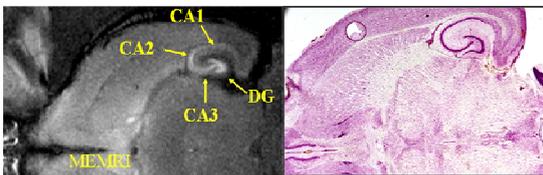


図3. MEMRI による超高分解能画像：
海馬の層構造が明瞭に認められる (Aoki I. et al. NeuroImage. 2004, 22:1046-59)

(2) MR感受性物質を結合させた高分子の開発とそのMR画像化：高分子ポリマーと Mn^{2+} や Fe^{2+} との emulsion を作製し、その in vitro MRI

画像を撮像して、緩和時間 (T1,T2) の変化と画像変化を検討した。T1,T2 共に濃度依存性の緩和時間変化と画像変化が認められた。この成果を基に、腫瘍免疫に特異性に反応するリンパ球にMR感受性物質を吞食させる基礎的技術開発を行った。しかし、特異免疫機能を残してMR感受性物質を接合することは現時点では困難であり、今後の研究課題として残された。

(3) 2次元NMR法の生体への適用：従来では時間的制約から実用性は困難とされていた2次元相関MRS (2D JPRESS, 2D L-COSY) をはじめて可能としてが、それを臨床用超高磁場装置 (3.0T) で適用を行った。その結果、通常のMRSでは不可能であった物質 (glutamine/glutamate, glutathione, GABA, Threonine 等) が検出できた。今後、本方法による代謝面からの脳損傷時の神経細胞の回復過程の解析、各種脳機能に関連した代謝物質の変化の解析、各種の病態解析、等への応用への可能性が開けた。

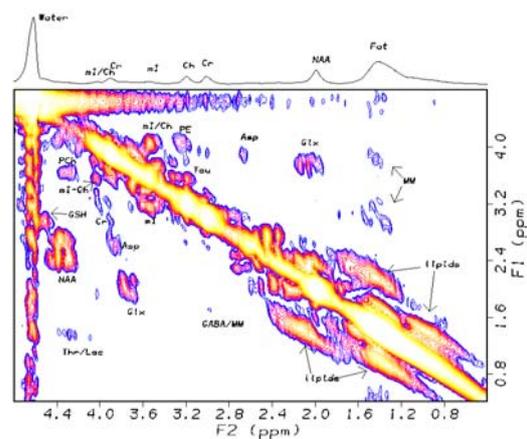


図4. ヒト脳(白質優位)の2D-MRS (L-COSY)
(Thomas MA, Naruse S et al: NMR Biomed, 2003, 16: 245-251)

(4) 水分子を tracer とする非侵襲脳血流画像による脳組織の血流再開通と神経細胞回復との関連の検討：ラット脳虚血再開通モデルを用で、血流低下領域と水分子拡散低下領域との可塑性の違いと、薬剤によるその保護可否を検討した。その結果、血流低下と拡散低下領域との mismatch 領域で脳保護薬物による脳可塑性の向上を認める結果が得られた。

以上の結論として、Mn-enhanced MRI は神経細胞再生の画像解析法として動物実験では一定の目的が達成できた。臨床応用へは

Mn の毒性をいかに軽減するか依存しており、今後の研究の課題として残った。また、2次元 MRS 技術の応用も臨床応用が可能となった。免疫系の *in vivo* の画像化に関しては更なる検討が必要であった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 12 件)

- ① Morisaki S, Kawai Y, Umeda M, Tanaka C, et al. (11 人、9 番目) : In Vivo Assessment of Peripheral Nerve Regeneration by Diffusion Tensor Imaging. *J Magn Reson Imag*, 査読有, 33, 2011, 535-542.
- ② Kawai Y, Aoki I, Umeda M, Higuchi T, Tanaka C, et al. (8 人、8 番目) : In vivo visualization of reactive gliosis using manganese-enhanced magnetic resonance imaging. *NeuroImage*. 査読有, 49, 2010, 3122-3131
- ③ Maeda K, Yamamoto H, Umeda M, Tanaka C, et al. (6 人、5 番目) : Neural correlates of color-selective metacontrast in human early retinotopic areas. *J Neurophysiol*, 査読有, 104, 2010, 2291-2301.
- ④ 尾藤良孝, 平田宏司, 河合裕子, 恵飛須俊彦, 田中忠蔵, 他 (12 人、12 番目) : Diffusion-Weighted Line-Scan Echo-Planar Spectroscopic Imagingによる代謝物拡散計測の精度向上、日本磁気共鳴医学会雑誌、査読有、30, 2010, 36-38
- ⑤ 成瀬昭二: 女性の脳梁が太いというのは本当か? *Clinical Neuroscience*, 査読無, 27, 2009, 110-111
- ⑥ Inoue Y, Aoki I, Mori Kawai Y, Ebisu T, Tanaka C, et al. (10 人、10 番目) : Detection of necrotic neural response in super-acute cerebral ischemia using activity-induced manganese-enhanced (AIM) MRI. *NMR in Biomedicine* 査読有, 23: 2009, 304-312
- ⑦ Shimizu Y, Umeda M, Aoki I, Higuchi T, Tanaka C, et al. (6 人、6 番目) : Neuronal response to Shepard's tones. An auditory fMRI study using multifractal analysis. *Brain Res*. 査読有 1186: 2008, 113-126
- ⑧ Kimura K, Watanabe Y, Umeda M, Arima Y, Watsuji Y, Tanaka C, et al. (7 人、7 番目) : Quantitative analysis of the relation between soft tissue stiffness palpated from the body surface and tissue hemodynamics in the

human forearm. *Physiological Measurement*, 査読有, 28, 2008, 1495-1505

〔学会発表〕(計 20 件)

- ① Naruse S: Our Historical Experience in the Application of MRS in the Field of Neurological Diseases. 2010 Annual Meeting of Chinese Medical Association-Taipei, 2010.6.27, Taipei Veterans General Hospital, Taipei, Taiwan
- ② Kawai Y, Umeda M, Naruse S, Higuchi T, Tanaka C, et al.: Detection of Brain Activity During Chronic Pain Using Activity-Induced Manganese -Enhanced MRI in the Rat. 18th Annual Meeting of International Society for Magnetic Resonance in Medicine (ISMRM), 2010.5.1-7, Stockholm, Sweden
- ③ Bito Y, Hirata K, Ebisu T, Kawai Y, Tanaka C, et al.: Correction of Eddy Currents for Time-domain-interleaved Blipped-phase-encoding Echo-planar Spectroscopic Imaging. 18th Annual Meeting of ISMRM, 2010.5.1-7, Stockholm, Sweden.
- ④ Bito Y, Hirata K, Ebisu T, Tanaka C, Kawai Y, et al.: Water Suppression for Diffusion-Weighted Line-Scan Echo-Planar Spectroscopic Imaging. 18th Annual Meeting of ISMRM, 2010.5.1-7, Stockholm, Sweden.
- ⑤ Bito Y, Hirata K, Ebisu T, Tanaka C, Kawai Y, et al.: Motion Artifact Reduction Using Bipolar Diffusion Gradients in Diffusion-Weighted Echo-Planar Spectroscopic Imaging. 18th Annual Meeting of ISMRM, 2010.5.1-7, Stockholm, Sweden.
- ⑥ Kawai Y, Yasuda Y, Tateishi N, Umeda M, Naruse S, Fujita S, Tanaka C, et al : Detection of signal enhancement in the hippocampus after transient Forebrain ischemia using manganese-enhanced MRI. World Molecular Imaging Congress, 0718A, 2010.9.8-11, Kyoto, Japan.
- ⑦ Bito Y, Hirata K, Kawai Y, Umeda M, Tanaka C, et al. : Diffusion-Weighted Line-Scan Echo-Planar Spectroscopic Imaging for Improved Accuracy in Metabolite Diffusion Imaging. 17th Annual Meeting of ISMRM, 2009.4.21, Honolulu, USA
- ⑧ Watanabe Y, Kimura K, Tanaka C, Umeda M, et al. : Dynamic DTI During Muscle Contraction by Electrical Stimulation. 17th

Annual Meeting of ISMRM, 2009.4.20,
Honolulu, USA

- ⑨ Bito Y, Sirai T, Hirata S, Umeda M, Tanaka C,
et al.: Parallel Line-scan Echo-planar
Spectroscopic Imaging. 17th Annual Meeting
of ISMRM, 2009.4.23, Honolulu, USA
- ⑩ Watanabe Y, Umeda M, Tanaka C, et al.: A
new imaging of muscle deformation applied
electrical stimulation using MRI. 36th
International Congress of Physiological
Sciences. 2009.7.29, Kyoto, Japan
- ⑪ Kimura K, Watanabe Y, Umeda M, Tanaka C,
et al.: Diffusion-Weighted Line-Scan Echo
-Planar Spectroscopic Imaging for Improved
Accuracy in Metabolite Diffusion Imaging.
36th International Congress of Physiological
Sciences. 2009.7.29, Kyoto, Japan
- ⑫ Kawai Y, Umeda M, Watanabe Y, Higuchi T,
Tanaka C: Glial tissue imaging at ischemic
lesion by MEMRI using manganese oral
administration. 16th Annual Meeting of
ISMRM, 2008.5.15, Toronto, Canada

〔図書〕 (計 1 件)

- ① 田中忠蔵、成瀬昭二、樋口敏宏、梅田雅宏：
エヌ・ティー・エス、小川誠二、上野照剛
(監修) 非侵襲・可視化技術ハンドブック、
「第3節 解剖学的画像としてのMRI –
正常編」: 2007, 18-27, 総 1192 頁

6. 研究組織

(1) 研究代表者

成瀬 昭二 (NARUSE SHOJI)
京都府立医科大学・医学研究科・准教授
研究者番号: 50106407

(2) 研究分担者

西村 恒彦 (NISHIMURA TSUNEHICO)
京都府立医科大学・医学研究科・教授
研究者番号: 70237733

田中 忠蔵 (TANAKA CHUZO)
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