

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年3月31日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22592092

研究課題名（和文） 拡散強調MRイメージングを応用した再生軟骨分化評価法

研究課題名（英文） Regenerated cartilage differentiation evaluation method using diffusion weighted MR imaging

研究代表者

角 忠輝（SUMI TADATERU）

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：80284701

研究成果の概要（和文）：軟骨組織において、その分化、組織成熟の程度、さらには微細な石灰化の3次元構造などの非侵襲的評価は困難である。関節軟骨の質量の70-80%を構成する水分子は細胞膜や細胞外基質によってその運動が複雑に制限され、複数・多方向の拡散成分を示す。組織内水分子の運動性と軟骨の材料特性との関係を把握するために、MR拡散強調撮像におけるみかけの拡散係数は有用である。拡散現象に影響を与えるであろう周囲組織の灌流現象に関し、幾つかの悪性腫瘍から得られた拡散強調撮像を用いて、その関係性を考察し発表した。

研究成果の概要（英文）：The cartilage tissue, non-invasive evaluation their differentiation, the degree of tissue maturation, or three-dimensional structure of calcification further fine is difficult. The motion is limited by complex extracellular matrix and cell membrane, water molecules that make up 70-80% of the mass of the articular cartilage shows the diffuse component of multiple-multidirectional. In order to understand the relationship between the material properties of the cartilage and motility in the tissue water molecules, the apparent diffusion coefficient in the diffusion-weighted MR imaging is useful. Relates perfusion behavior of the surrounding tissue that would affect the diffusion behavior, using a diffusion weighted imaging obtained from several malignant tumors, presented to study the relationship.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012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：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・病態科学系歯学・歯科放射線学

キーワード：歯科放射線学一般

1. 研究開始当初の背景

患者自己骨髄に由来する間葉系幹細胞を用いた「再生培養骨組織」は変形性関節症、

慢性関節リウマチなどの患者に臨床応用されてきている。組織工学的手法（ティッシュエンジニアリング）を用いて、軟骨組織を3

次元的に再構築する軟骨の再生医療においては、非侵襲的な組織形成度の定性的あるいは定量的な評価法の確立が必要不可欠である。現時点では、骨の生成に関してはその石灰化度を生化学的にカルシウム量として計測することや、MDCT (Multidetector-row Computed Tomography) などの高解像度 CT を使って石灰化度を計測する方法が主流である。しかしながら、X線を使った CT では石灰化軟骨のせいぜい sub-millimeter レベルでの 3 次元構造は知ることが出来ても、移植した軟骨の分化、マイクロコピーレベルでの変化、移植組織成熟の程度、さらには微細な石灰化の 3 次元構造構築などを評価することはできない。

我々は今までに、正常マウス胎児の長管骨内軟骨内骨化過程の画像化を行い、得られた MR 画像を組織学的所見と比較検討することにより、胎生期長管骨の発生過程における MR イメージングの有用性を検証し報告した (Ichikawa Y, et al. Bone, 34, 619-628, 2004、図 1 参照)。

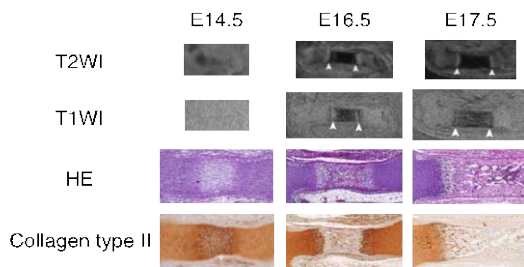
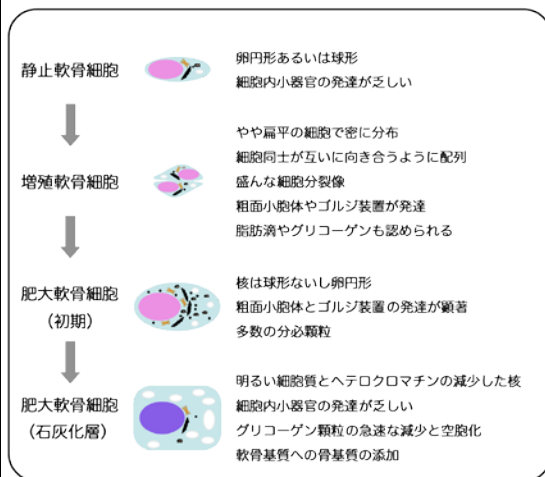


図 1. 胎生期長管骨の内軟骨内骨化過程

しかしながら、この研究では T1 強調像ならびに T2 強調像での、主に形態評価にとどまっていた。そこで我々は、細胞ならびに細胞間の様々な性状変化に関する基礎的検討として、性状を *in vitro* で変化させた際の拡散強調 MR イメージングを行い、その性状変化を ADC 値の変化として捉えることに成功した。

すなわち拡散強調 MR イメージングから得られる ADC 値を解析することによって、a) 細胞の大きさの変化、b) 膜の透過性の変化、c) 細胞内への脂肪の沈着、d) 細胞外マトリクスの粘調度の変化、e) 細胞の apoptosis といった細胞レベル、分子レベルでの変化を捉えることが出来ることがわかった。

骨の生成過程については、膜内骨化により形成される頭蓋の扁平骨や上顎骨、下顎骨、鎖骨を除いて、ほとんどの骨格は下図に示すように、多能性未分化間葉系幹細胞の凝集によって形成される軟骨原基から分化する内軟骨性骨化の過程を経て、最終的に肥大軟骨細胞はアポトーシスにより死滅し、骨組織と置



換される。

このように、軟骨はその形成分化過程で、軟骨細胞の内部性状、形態、周囲の環境を様々な状態に変化させながら成熟していくと考えられ、これらの分化過程に対して、拡散強調 MR イメージングを応用することで軟骨再生の過程を画像化し、その進行程度について ADC を解析することによって、図 3 の仮説図に示すように細胞レベル、分子レベルで

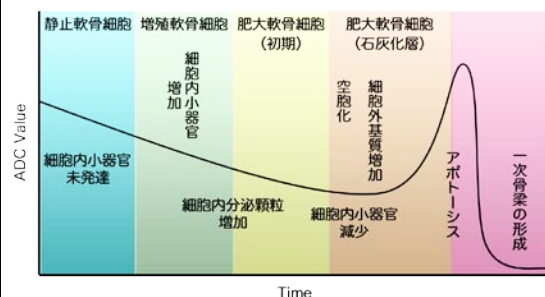


図 3. 軟骨内骨化過程の ADC (仮説図)

3 次元的に評価することができるであろう。

2. 研究の目的

(1) 本研究の目的は拡散強調 MR イメージングを用いて、再生軟骨組織の分子イメージン

グに挑戦し、軟骨再生医療における新しい評価方法を確立することである。

今回、我々は組織・細胞中に存在する「水」に注目した。関節軟骨は質量の70-80%が水分から構成されており、その内部では水分子が温度や周囲の環境に従ってランダムで自由な運動をする、いわゆる拡散現象が見られるが、軟骨内部の水分子は細胞膜や細胞外基質（コラーゲン、プロテオグリカン）によって運動が複雑に制限されるため、複数・多方向の拡散成分を示し、組織内の水分子の運動性と軟骨の材料特性との間には密接な関係が存在すると考えられる。従ってMRイメージングにおいて拡散強調撮像

(Diffusion-weighted image) を応用し、みかけの拡散係数 (apparent diffusion coefficient, 以下 ADC) を求めることで、軟骨組織の構造に関して分子レベルでの変化を捉えることが出来ると考えた。

(2) 内軟骨性骨化による骨新生の組織再生工学的手法が開発される昨今において、生体に対する非侵襲的な組織形成度の評価法については今も確立されていない。本研究ではティッシュエンジニアリングによる再生骨のDWIを得て、多次元方向のADCを解析することで、軟骨細胞が増殖・分化制御を受けていく際の程度・性状評価を行うための基礎データを取得、軟骨組織の水分子拡散性におよぼす影響について詳細な検討を行い、再生軟骨の微細組織構造評価への拡散強調MRイメージングの有用性を検討することを目標とする。

(3) 今回骨再生に関して、拡散強調MRイメージングにおけるADCを測定することにより、細胞や生体に対し非侵襲的に3次元的な構造評価をマイクロスケールで与えることが可能となり、これは今までにない新しい知見を得ると期待される。

3. 研究の方法

以下に述べる研究計画においては、再生軟骨形成過程評価のための基準作成プロセスに柔軟に対応できるよう、拡散強調MRイメージングをはじめとした画像診断学的手法

に加え、細胞生物学的ならびに病理組織学的手法を併用し、多角的に検討を加えられるよう勘案した。

【平成22年度】

(1) 3次元再生軟骨の作製

軟骨においては、通常の2次元培養法では大型の移植可能な軟骨組織を構築することが困難で、また病的欠損に応じて形状を制御する必要もあり、3次元培養による組織構築が必須である。

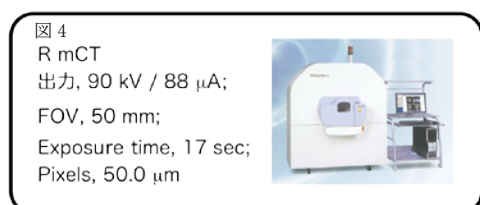
現在までに、模擬微少重力環境において細胞を培養液中に自由に浮かせ、ゆっくりと集合させて3次元組織を形成させる回転培養法が考案され、均質な成形可能な軟骨構築を行うために、細胞足場材料(スキャホールド)としてコラーゲンスポンジを用いると、形状の制御とともに均質な軟骨組織が形成され、そして短期間の培養により十分な力学的強度を得ることがわかった(Sakai S, et al. J. Orthop. Res. 27, 517-521, 2009, Ohyabu Y, et al. J. Biomater. Sci. Polym. Ed. 20, 1861-1874, 2009)。本研究ではこの方法により高精度の再生軟骨を作製する。

(2) Diffusion-weighted MR imaging における最適 b 値の決定

ADCの値は、 $ADC = \ln [S_1/S_2] / (b_2 - b_1)$ という式から与えられる。ここで、 b_1 、 b_2 はMPG (motion probing gradient) というグラジエントパルスの大きさ、印加時間、間隔によって決まるもので、どの程度拡散が強調されているかを示す値であり、 S_1 、 S_2 は b_1 、 b_2 それぞれを用いて撮像したときに得られる信号強度を示している。このように、ADCは使用するb値によって強調される生体现象が異なる。そこで本実験系における、b値と試料の信号強度、ADC値についての基礎データを取得するために、試料に対しb値を0-3000 (s/mm²) の間50 s/mm² 間隔で変化させたDWIを撮像し、各々のb値に対する試料全スライス平均信号強度から、 $b = 0$ (s/mm²) を100とする信号強度減衰曲線を作成する。目的とする試料を同定するのに十分なS/Nが得られる、もっとも高いb値を決定する。

(3) マイクロ X 線 CT を用いた試料の石灰化状態の 3 次元構造解析

動物実験用 3D マイクロ X 線 CT R_mCT (RIGAKU 社、本学先導生命科学支援センターに設置、下図) を用いて試料を撮影し、機器付属のソフトウェアにて、そのサイズ、骨化度の経時的变化を測定する。



染色法	目的
a) Hematoxylin-Eosin	
b) Safranin-O	プロテオグリカン生成
c) von Kossa	骨塩沈着
d) alkaline phosphatase	骨細胞分化
e) collagen Type II	軟骨成熟
f) collagen Type X	肥大軟骨分化
g) collagen Type I	骨成熟
h) osteocalcin	骨turnover

(4) 免疫組織化学的解析

凍結切片を作成し、上表に示す組織学的、免疫化学的染色を行い、分化の進行度についての検討を行う。

【平成 23 年度】

【平成 22 年度】に引き続き、作製した 3 次元軟骨組織の内軟骨性骨化の、*in vitro* における ADC を用いた画像評価を行う。

経時的に 3 次元再生軟骨組織を取り出し、拡散強調 MR イメージングを行い、マイクロ X 線 CT から得られる石灰化情報ならびに組織学的変化を参考に、再生組織の形成度を評価する。DWI を撮像する際の、a) 使用コイル、b) シーケンス、c) 撮像パラメータは前年度に準ずる。

【平成 24 年度】

最終年度は、生体内 (*in vivo*) における内軟骨性骨化の ADC を用いた画像評価に重点をおく。

作製した 3 次元再生軟骨組織をヌードマウ

ス背側皮下に移植し、生体内で内軟骨性骨化を起こし、その拡散強調 MR イメージングを行い、マイクロ X 線 CT から得られる石灰化情報ならびに組織学的変化を参考に、再生組織の形成度を評価する。生体に移植した際には、移植片周囲の灌流因子が拡散情報に影響を及ぼす可能性が考えられるため、適切な b 値を【平成 22 年度】2. と同様に決定した上で、得られた ADC 値の評価を行う。

4. 研究成果

3 次的に再構築された軟骨組織において、現時点では移植した軟骨の分化、移植組織成熟の程度、さらには微細な石灰化の 3 次元構造などを非侵襲的に評価することは困難である。関節軟骨の質量の 70-80% を構成する水分子は細胞膜や細胞外基質によって運動が複雑に制限されるため、複数・多方向の拡散成分を示し、組織内の水分子の運動性と軟骨の材料特性との間にある密接な関係を把握するために、MR 拡散強調撮像におけるみかけの拡散係数を求めることは非常に有用な知見を与えてくれる。ここで、DNA 複製や修復に関与する酵素 Flap endonuclease I (FEN-1) は、これが欠損した場合ヒトの細胞では紫外線やアルキル化剤による DNA 障害に際しその修復が不完全になり、細胞周期の S 期におけるチェックポイント機構が働かなくなる酵素であるが、我々が以前作成した、その機能を欠損させた遺伝子を、I 型コラーゲンのプロモータ下で発現させるようにしたトランスジェニックマウス (tg マウス) は、骨粗鬆症などの老化現象が進行しており、骨形成機序に異常をきたしている。このマウスから得られる細胞により、*in vitro* における組織 (細胞) 内拡散係数を正常マウスと比較しつつ測定することで、3 次的再生軟骨を作成するに当たっての基礎データを収集した。tg マウスより得られた肺線維芽細胞初代培養株を樹立させた (図 5, 6)。この細胞株と野生型マウスの肺線維芽細胞株を比較しつつ用いることにより、マウス個体ではできない実験系を組み立てることが可能となる。軟骨分化に関与する種々の遺伝子を過剰発現させたり、或いは siRNA を用いてそれらの発現を抑制して、軟骨分化のメカニズムを調べること

がこのステップでの主目標となる



図5 マウス骨髄から得られた線維芽細胞

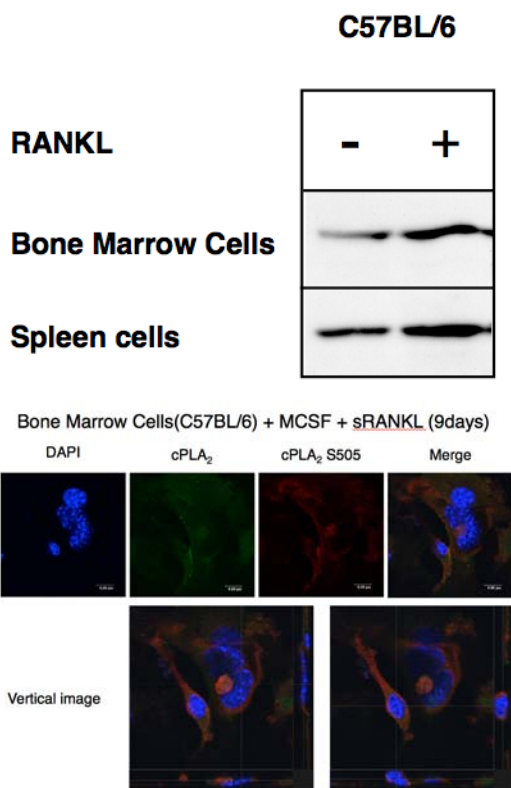


図6 マウス骨髄細胞活性化の試み

また、上記の拡散現象に影響を与えるであろうと考えられる周囲組織の灌流現象について、悪性腫瘍（副鼻腔腫瘍、悪性リンパ腫、鼻咽腔腫瘍、中咽頭腫瘍、唾液腺腫瘍）の撮像から得られた拡散強調撮像を用いて、その関係性を考察し、論文として発表した（以下5. 主な発表論文等参照）。

野生型としてC57BL/6マウス、変異型としてFEN-1欠損tgマウスの脛骨ならびに腓骨よ

り骨髄を採取し、プレート培養により得られた単層付着細胞懸濁液と、細胞足場材料としてのコラーゲンスポンジから軟骨組織を作製することを試みたが、組織片を作成するのに十分な量の細胞数が得られる変異型、野生型の線維芽細胞株を作成することが困難であり、よって均質な軟骨組織を得られず、現時点では再生軟骨組織を同定するのに十分なS/Nが得られる最適b値の設定までには至らなかった。

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5件）

(1) Sumi T, Takagi Y, Ichikawa Y, Sumi M, Kimura Y, Nakamura T. : Imaging features of the lacrimal and salivary glands of patients with IgG4-related Mikulicz' s disease: a report of three cases. Oral Radiology. 28:140-145, 2012. doi: 10.1007/s11282-012-0085-1 査読有

(2) Eida S, Hotokezaka Y, Katayama I, Ichikawa Y, Tashiro S, Sumi T, Sumi M, Nakamura T. : Apparent diffusion coefficient-based differentiation of cystic lesions of the mandible. Oral Radiology. 28:109-114, 2012. doi: 10.1007/s11282-012-0091-3 査読有

(3) Sumi M, Van Cauteren M, Sumi T, Obara M, Ichikawa Y, Nakamura T. : Salivary gland tumors: use of intravoxel incoherent motion MR imaging for assessment of diffusion and perfusion for the differentiation of benign from malignant tumors. Radiology. 263:770-777, 2012. doi: 10.1148/radiol.12111248 査読有

(4) Ichikawa Y, Sumi M, Sasaki M, Sumi T, Nakamura T. : Efficacy of diffusion-weighted imaging for the differentiation between lymphomas and carcinomas of the nasopharynx and

oropharynx: correlations of apparent diffusion coefficients and histologic features. AJNR Am J Neuroradiol. 33:761-766, 2012. doi: 10.3174/ajnr.A2834 査読有

(5) Sasaki M, Sumi M, Eida S, Ichikawa Y, Sumi T, Yamada T, Nakamura T. : Multiparametric MR imaging of sinonasal diseases: time-signal intensity curve- and apparent diffusion coefficient-based differentiation between benign and malignant lesions. AJNR Am J Neuroradiol. 32:2154-2159, 2011. doi: 10.3174/ajnr.A2675 査読有

[学会発表] (計6件)

(1) 角 美佐, 佐々木美穂, 角 忠輝, 木村泰男, 高木幸則, 柴田 智, 市川陽子, 中村 卓: Intravoxel incoherent motion (IVIM) MRI の唾液腺腫瘍への応用, 第16回臨床画像大会 (新潟), 2011年10月1日, プログラム・抄録集, P38, 2011.

(2) 木村泰男, 山田敏朗, 佐々木美穂, 高木幸則, 柴田 智, 市川陽子, 角 忠輝, 角 美佐, 中村 卓: iPadを利用した放射線画像教育システムの構築, 第16回臨床画像大会 (新潟), 2011年10月1日, プログラム・抄録集, P41, 2011.

(3) 市川陽子, 角 美佐, 佐々木美穂, 角 忠輝, 中村 卓: DWI of lymphomas and carcinomas in the nasopharynx and oropharynx, 第18回 国際歯顎顔面放射線学会 第52回日本歯科放射線学会総会・学術大会併催(広島), 2011年5月25日, プログラム・講演抄録集, P50, 2011.

(4) 佐々木 美穂, 木村 泰男, 角 忠輝, 片山 郁夫, 佛坂 由可, 中村 卓: 鼻・副鼻腔疾患のマルチパラメトリック MR イメージング, 第30回日本歯科放射線学会関西・九州合同地方会(北九州), 2010年12月11日, プログラム, P4, 2010.

(5) 角 美佐, 木村 泰男, 高木 幸則, 角 忠輝, 佐々木 美穂, 柴田 智, 市川陽子, 中村 卓: MR factor analysis を用いた被膜浸潤の診断, 第15回臨床画像大会(鹿児島), 2010年9月4日, プログラム・講演抄録集, P40, 2010.

(6) 角 忠輝, 木村泰男, 角 美佐, 中村 卓: PET/CT 検査において壊死病巣か・扁平上皮癌リンパ・節転移診断に与える影響, 第51回日本歯科放射線学会総会・学術大会(横浜), 2010年4月24日, プログラム・講演抄録集, P84, 2010.

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

角 忠輝 (SUMI TADATERU)

長崎大学・医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号: 80284701

(2) 研究分担者

角 美佐 (SUMI MISA)

長崎大学・医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号: 90284702

佐々木 美穂 (SASAKI MIHO)

長崎大学・大学病院・助教

研究者番号: 10437874

木村 泰男 (KIMURA YASUO)

長崎大学・医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号: 30253686

中村 卓 (NAKAMURA TAKASHI)

長崎大学・医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号: 30172406

(3) 連携研究者

該当なし