

平成 2 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791302

研究課題名（和文）磁気共鳴画像法による生体脳内免疫細胞動態追跡法の開発

研究課題名（英文）Development of in-vivo imaging method for immune cell tracking in mouse brain by using magnetic resonance imaging

研究代表者

森 勇樹（Mori, Yuki）

大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・特任助教（常勤）

研究者番号：10559355

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000 円、（間接経費） 990,000 円

研究成果の概要（和文）：小動物用超高磁場11.7テスラ磁気共鳴画像（MRI）装置を用いて、MRI用の造影剤である磁性酸化鉄ナノ粒子に標識されたマウス生体内の単球・マクロファージの動態を1細胞レベルで経時的に追跡する方法を確立した。超高磁場MRI装置の利用だけでなく、撮像対象であるマウス脳に最適化したブロープコイルの開発や撮像パラメータの改良、使用する磁性粒子の最適化によって、格段に高い時空間分解能を実現し、従来困難とされた1細胞レベルの細胞分布を生体マウス脳内で経時的に追跡することが可能であった。また、病態発生時だけでなく、正常時においても、末梢組織マクロファージが脳内へ浸潤することを視覚的に描出することに成功した。

研究成果の概要（英文）：We established highly sensitive in-vivo imaging techniques for sequential monitoring of cell migration in the mouse brain at the single-cell level by using 11.7 T high-field magnetic resonance imaging (MRI) scanner. MRI with intravenous administration of superparamagnetic particles of iron oxide (SPIO) can be used to successfully monitor the transmigration of peripheral phagocytes into healthy and inflamed brains, as intracellular absorbed-SPIO can pass through the blood-brain barrier. We successfully detected single cells in live animal brains by achieving images of high spatio-temporal resolution as a result of high SNR. In addition to the high magnetic field, improvements in MR techniques; such as the custom-made RF coil, optimization of MR parameters and optimization of contrast agents, were significant factors for this achievement.

研究分野：医歯薬学

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：磁気共鳴画像法 免疫細胞動態 細胞追跡 神経免疫学

1. 研究開始当初の背景

(1) 数年前まで、脳は「免疫特権の器官」と考えられ、血液脳関門の存在によって免疫反応や炎症に影響を受けないものとされていた。しかし、近年の研究の結果、脳が免疫系や損傷された組織からの信号に応答し、炎症反応を起こすことがわかり、今では「神経免疫学」は非常に活発な研究領域である。脳脊髄神経系の自己免疫疾患とされている多発性硬化症をはじめ、アルツハイマー病や脳卒中でも免疫細胞の関与が重要であることが示されてきているが、病態形成機序の解明や治療法の開発に直結するような免疫細胞動態の評価手段が無いのが現状である。

(2) 一方で、近年の技術改良によって高磁場化が進む MRI は、感度の向上により、高い分解能で生体内を非侵襲的に視覚化することが可能である。研究代表者らは、11.7 T 超高磁場 MRI 装置により、末梢皮下に存在する食食細胞が所属リンパ節へ到達する様子を 1 細胞レベルで検出し、その細胞動態を経時的に追跡することに成功した。

(3) また MRI は、CT など他のモダリティに比べ、中枢神経病変の描出に優れており、拡散強調画像 (Diffusion Weighted Image: DWI) などの撮像法により、超急性期脳虚血の病巣描出を容易に行うことが可能である。細胞レベルの動態を追跡出来る高い空間分解能と、従来の脳病態評価法を組み合わせることで、免疫細胞の脳病態形成への関与を視覚的に捉えることが期待できる。

2. 研究の目的

本研究では、小動物用超高磁場 11.7 T MRI の免疫細胞動態検出能向上のため、プローブコイル及び造影剤の最適化を行い、生体脳内の正常時及び病態形成時の免疫細胞動態を捉える新しい評価法を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) マウス脳内における 1 細胞レベルの細胞追跡を図るため、高い時空間分解能が必要である。そのため、対象とする雄性 C57BL6/J マウス(6-10 週齢)の頭部の測定に最適化したプローブコイルと、それに対応する動物用固定具の選定、開発を行った。

(2) 培養単球由来マクロファージの超常磁性酸化鉄粒子(Superparamagnetic particles of iron oxide: SPIO)の取込みを、異なる条件の磁性粒子を添加して観察。また、SPIO を生体内に直接投与した際の各細胞の取込みを検証し、*in vivo* MRI でコントラスト効果を観察した。同時に生体内食食細胞の標識に最適な SPIO の粒径、投与量の検討を行った。

(3) 生体内で標識された免疫細胞の脳内への

浸潤、移動を評価するのに最適な MRI 撮像パラメータを検討した。

(4) 正常マウスにおける評価に加え、病態モデル動物として、腹腔内リポポリサッカライド (LPS) 注入による全身性炎症モデルマウスおよび実験的脳虚血モデルマウスを作成し、SPIO を尾静脈投与した際の脳における造影効果の違いを比較した。

4. 研究成果

(1) マウス生体頭部の観察のため、内径 25 mm、20 mm、および 15 mm のポリウムコイル(いずれも m2m 社製)、また直径 12 mm の表面コイルを自作し、脳全体の信号/ノイズ比、および均一性を検討したところ、内径 15 mm のポリウムコイルを用いることで、高感度かつ脳全体を均一に画像構成出来た。イソフルラン麻酔下にて測定を行う必要があるため、内径 15 mm のコイルに合うマウス用フェイスマスクを自作した。また、同時に頭蓋を固定する工夫により、数時間～1 日程度の長時間体動を抑え、均一な MRI 画像を作成することが可能であった。

(2) SPIO は、生体毒性が少なく、かつ効率良く単球およびマクロファージなどの食食細胞に取り込まれる 50-60 nm のカルボキシデキストラン修飾された粒子を用いた。また、生体脳内での細胞分布を観察するためには、鉄濃度にしてマウス体重 1g あたり 0.14 mg 程度が最適であることが分かった。

(3) SPIO による造影効果を強調する T2*強調画像法を Fast Low Angle Shot(FLASH)法を用いて撮像し、平面分解能が 50 μm $\times$ 50 μm 、スライス厚が 300 μm 程度の高解像 MRI 画像を撮像することで、SPIO を捕食した末梢の食食細胞が脳内に浸潤する様子を確認した。1 回の撮像時間は 20 分であった。

(4) SPIO の静脈内投与により、正常および全身性炎症モデル動物の脳内細胞動態を非侵襲的かつ経時的に観察可能であった (図 1)。病態マウスのみならず正常マウスの脳においても、SPIO 投与から 48 時間後に複数のドット状の信号低下が観察された (図 2)。また 1 週間程度で、脳内から排出されることも観察された (図 2)。

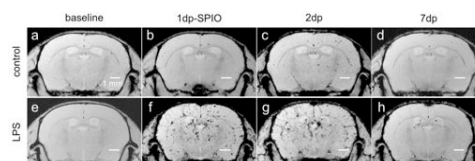


図 1 : SPIO による経時的脳内信号変化

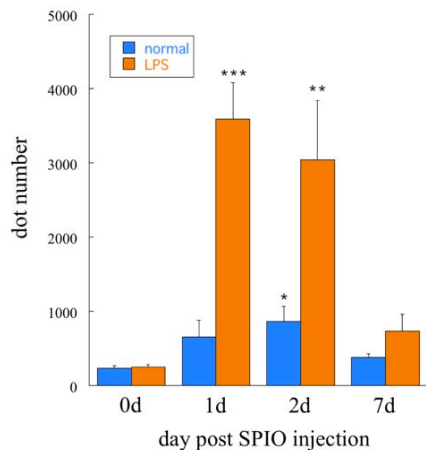


図2：脳内ドット数の経時変化

(5) クロドロン酸リポソームを予め生体内に投与しておくことで、生体内のマクロファージを死滅させることができるが、クロドロン酸リポソームを腹腔内投与したマウスで、上記と同様に SPIO を静脈内投与しても、脳内における信号低下は確認出来なかった（図3）。また貪食細胞に認識されにくい磁性粒子（ステルス性粒子）を静脈内投与しても、脳内の信号変化は観察されなかった（図3）。

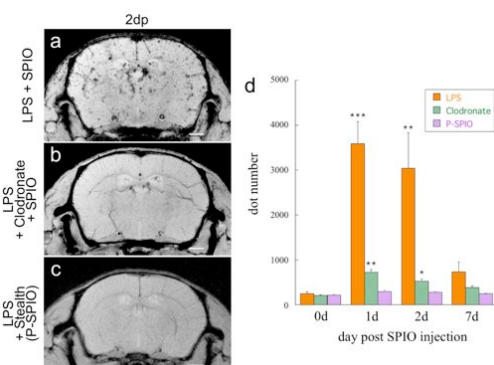


図3：クロドロン酸リポソーム投与とステルス性粒子を用いた脳内ドット数の変化

(6) 生体外で SPIO を用いて標識した培養マクロファージを、静脈より生体内に戻すと、SPIO を直接生体内に投与したもの（図1）と同様に、脳内に複数のドット状の信号低下が観察された（図4）。

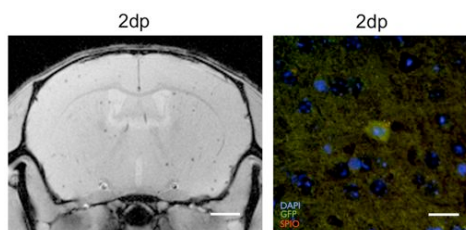


図4：標識細胞を用いた検討

(7) 同方法を実験的脳虚血モデル動物に適応することで、虚血傷害部位に徐々に集積するマクロファージの時間的推移を追跡することが可能であった（図5）。

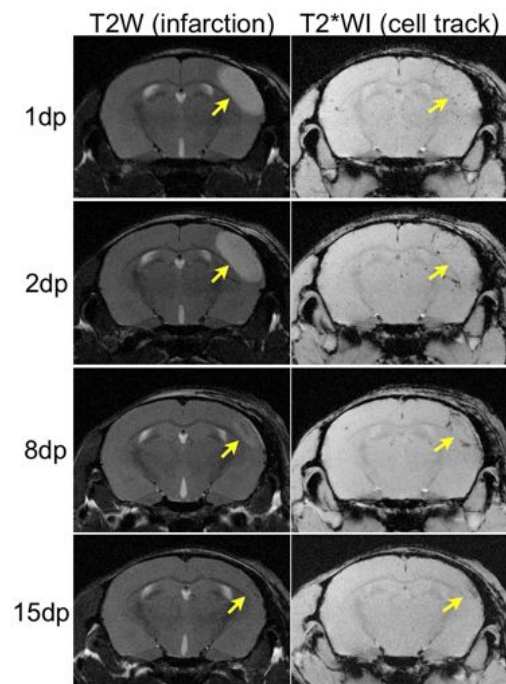


図5：脳虚血モデルマウスにおける免疫細胞動態追跡

(8) SPIO を静脈内投与すると、血中の貪食細胞が粒子を捕食し、その細胞の動態を MRI で観察できることが示された。脳においては、血液脳関門の存在により、粒子が直接脳実質内に入り込むことができないが、血液中で粒子を貪食した（標識された）細胞が脳内に侵入することは可能であると考えられる。組織染色の結果から、脳実質内のマクロファージや好中球が SPIO を取り込んでおり、さらに MRI では1細胞レベルの細胞分布を捉える能力を持つことが確認された。今回の結果は、正常時および病態時の免疫細胞の脳内への出入りを経時的に捉えるのに、MRI が応用可能であることが分かった。

(9) 生きた動物の脳における免疫細胞の出入りを非侵襲的かつ経時的に追跡した報告は過去に無く、超高磁場 MRI を用いた本研究によって初めて観察されたものである。超高磁場 MRI と磁性粒子を利用した本法を他の病態モデル動物などに応用することで、病態進行や遅延に対する免疫細胞の関与をより詳細に解明することに繋がり、神経と免疫系のクロストークを視覚的に評価する新たな免疫細胞動態評価法となることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

- ① 森 勇樹、朱 大松、吉岡 芳親、磁気共鳴法を用いたダイナミックな免疫現象の可視化を目指して、JSMI Report、査読有、Vol. 5、2012、pp.9-14
- ② 森 勇樹 他、磁性粒子を用いた末梢組織マクロファージの脳内浸潤の経時的観察、日本磁気共鳴医学会雑誌、査読有、34 巻、2013、pp. 14-17
- ③ Mori Y et al., Early pathological alterations of lower lumbar cords detected by ultrahigh-field MRI in a mouse multiple sclerosis model, International Immunology、査読有、Vol.26、No. 2、pp. 93-101

〔学会発表〕(計 13 件)

- ① Mori Y、Visualization of immune cell dynamics in mouse brain with MRI、21st annual meeting of international society of magnetic resonance in medicine、2012 年 5 月 5-11 日、Melbourne、Australia
- ② Mori Y、Non-invasive visualization of immunological responses in mice with high field MRI at 11.7 T、8th international forum on multimedia and image processing、World automation congress、2012 年 6 月 24-28 日、Puerto Vallarta、Mexico
- ③ 森 勇樹、正常および病態モデルマウスにおける脳内免疫細胞動態の描出、第 40 回日本磁気共鳴医学会大会、2012 年 9 月 6-8 日、京都
- ④ Yoshioka Y、Mori Y、In vivo visualization of immune cells in the central nervous system、Towards comprehensive understanding of immune dynamism (TCUID 2012)、2012 年 10 月 29-31 日、大阪
- ⑤ Mori Y、Temporal changes in lower-lumbar spinal cord in EAE mouse、22nd annual meeting of international society of magnetic resonance in medicine、2013 年 4 月 20-26 日、Salt Lake City、USA
- ⑥ Mori Y、In vivo monitoring of immune cell migration in mouse brain by using high-field MRI、13th European school of neuroimmunology、2013 年 7 月 3-6 日、Porto、Portugal
- ⑦ 森 勇樹、高感度 MRI 装置を用いた多発性硬化症モデルマウス腰髄における急性期病態変化の評価、第 41 回日本磁気共鳴医学会大会、2013 年 9 月 19-21 日、徳島
- ⑧ 陳 挺、森 勇樹 他、新規酸化鉄造影剤とリゾビストのマウス体内分布の比較、第 41 回日本磁気共鳴医学会大会、2013

年 9 月 19-21 日、徳島

- ⑨ 森 勇樹、磁性粒子を用いた末梢組織マクロファージの脳内浸潤の経時的観察、第 41 回日本磁気共鳴医学会大会、2013 年 9 月 19-21 日、徳島
- ⑩ Mori Y、In vivo MRI monitoring of immune cell migration in mouse brain by using superparamagnetic nanoparticles、International symposium on nanomedicine、招待講演、2013 年 11 月 7-9 日、福岡
- ⑪ 森 勇樹、MR イメージングを用いた経時的脳内免疫細胞動態追跡、第 2 回臨床免疫核医学研究会、招待講演、2014 年 1 月 20 日、大阪
- ⑫ 森 勇樹、MR イメージングを用いた経時的免疫細胞動態追跡、第 2 回熊本大学イメージングセミナー、招待講演、2014 年 4 月 25 日、熊本
- ⑬ Mori Y、Sequential and time-lapse MRI monitoring of peripheral macrophage recruitment and migration in mouse brain、23rd annual meeting of international society of magnetic resonance in medicine、2014 年 5 月 10-16 日、Milan、Italy

〔その他〕

受賞：

- ① 第 41 回日本磁気共鳴医学会大会学術奨励賞(大会長賞) 受賞(ポスタータイトル：磁性粒子を用いた末梢組織マクロファージの脳内浸潤の経時的観察)、2013 年 9 月 20 日
- ② 日本磁気共鳴医学会学会賞 バイエル学術奨励賞国際飛躍賞 受賞(受賞対象発表：Temporal Changes in Lower-Lumbar Spinal Cord in EAE Mouse (多発性硬化症モデルマウス下位腰髄における急性期病態変化の評価))、2013 年 12 月 18 日

ホームページ：

<http://biofunc.ifrec.osaka-u.ac.jp>

6. 研究組織

(1)研究代表者

森 勇樹 (MORI, Yuki)

大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・特任助教(常勤)

研究者番号：10559355