

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860996

研究課題名(和文) 高感度MRIを用いた免疫細胞動態追跡による脳病態形成機序の解明

研究課題名(英文) Understanding the brain pathology with individual immune cell tracking using high-field MRI scanner

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) 2,900,000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、磁性酸化鉄ナノ粒子に標識されたマウス生体内単球・マクロファージの1細胞解像度での動態解析を実現した。時間・空間分解能ともに従来に比べ改善し、四次元細胞追跡が可能となった。実験的脳虚血モデル動物における脳障害領域と正常領域での細胞動態を定量的に解析することが可能となった。生体脳内に浸潤する単球・マクロファージの移動速度、直進性や移動の方向性が、正常部と脳障害領域で顕著な違いが存在することが示された。マウス脳内の免疫細胞動態を生きたまま、非侵襲かつ経時的に解析した報告はこれまでになく、新規の免疫学的評価法として有用である。

研究成果の概要(英文)：We established highly sensitive in-vivo imaging techniques for sequential monitoring of intrinsic monocytes/macrophages migration in the mouse brain at the single-cell level by using 11.7T high-field magnetic resonance imaging (MRI) scanner. We have successfully improved the spatio-temporal resolution of MRI for cellular tracking and created a 4D cellular tracking dataset of intrinsic monocytes/macrophages in the living mouse brain. In addition, we conducted quantitative analysis of individual cells using this dataset. In this procedure, we found a significant difference in velocity and migration patterns between the contralateral and the ipsilateral cortex in the mouse stroke model.

研究分野：生体機能イメージング

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

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年の研究より、中枢神経系の自己免疫疾患とされている多発性硬化症やアルツハイマー病、脳卒中の病態に免疫細胞の関与があることを裏付ける証拠が報告されており、いまや「神経免疫学」は非常に活発な研究領域である。

(2) しかしながら、脳や脊髄のような深部組織中の免疫細胞自体の振る舞いを、生きたまま経時的に追跡することは困難であり、免疫細胞が病態形成へどのように関与しているかについては十分な知見が得られていない。

(3) SPIO を静脈内投与すると、血中の貪食細胞が粒子を捕食し、その細胞の生体内での動態を MRI で観察できる。

(4) 脳においては、血液脳関門の存在により、血中に投与した粒子がそのまま直接脳実質内へ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。

(5) 超高磁場 MRI 装置では、脳の外で標識された細胞(特に単球・マクロファージ)の脳内への浸潤とその細胞の動態を、非侵襲かつ 1 細胞レベルで経時観察することが可能である。

(6) しかしながら、研究開始当時は数時間オーダーでの細胞分布を捉えるに過ぎず、1 つ 1 つの細胞のダイナミックな動態を解析するためには、時間分解能の改良が必要であった。

(7) 同時に、病態変化に伴う、免疫細胞の特異的な分布や移動を 1 細胞レベルで視覚化するために、病態評価と細胞動態を同時に観察する必要がある。

(8) ダイナミックな生体脳内における細胞動態を視覚的に追跡し、また、その動きのパターンやスピードを定量的に計測することができれば、免疫細胞の病態への関与及び病態形成機序、治療過程の解明につながることを期待される。

2. 研究の目的

超高磁場 11.7T 磁気共鳴画像(MRI)装置の利用に加え、高感度プローブコイルの開発、撮像パラメータの最適化により、生体内における免疫細胞を 1 細胞レベルの空間分解能で描出するとともに、時間分解能の向上により、生体内の細胞が正常時及び脳病態変化に従いどのような振る舞いをするかを視覚的に捉え、免疫細胞と脳病態形成機序の関係性を明らかにすることを目的に研究を行った。

3. 研究の方法

(1) プローブコイル・測定パラメータの改良
(1-1) 測定対象には雄性 C57BL/6J マウスを用いた。プローブコイルはその直径が小さい程、測定感度が高くなるため、生体マウス頭部の MRI 測定に最適なプローブコイルを検討し、開発した。

(1-2) 測定パラメータの最適化を行い、時間分解能の改良によって、1 細胞追跡に耐え得る測定法の開発を行った。

(2) 病態モデル動物を用いた免疫細胞追跡
(2-1) 正常マウスに加え、実験的脳梗塞モデルマウスを作成し、正常組織と病変部位の細胞動態の違いについて比較検討した。

(2-2) 病変部位の描出と細胞追跡を同時に行うための測定パラメータを開発した。

(3) 細胞動態解析

(3-1) 脳全体の細胞動態を視覚的に描出すると同時に、細胞の移動距離や特異的な領域への集積を評価するため、蛍光顕微鏡等で用いられる画像解析技術を MRI に応用し、細胞 1 つ 1 つの動態を定量的に評価することを試みた。

(3-2) 高精細に長時間にわたる画像データを用いるため、撮像途中に起こる体動の補正やアーチファクトなどによる信号変化の補正を自動的に行うプログラムを作成し、標識細胞の移動を強調させた。

(3-3) 高精細 3D-4D 画像解析ソフトウェアを用い、1 細胞ごとの動きを抽出、時系列データを作成し、動画として細胞の動きを視覚的に描出した。また、2 次元画像だけでなく、3 次元画像を構成し、脳全体の細胞動態を解析した。

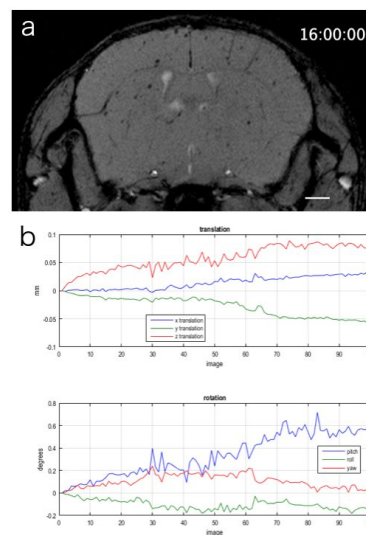


図 1: 細胞分布(a)と位置補正プロファイル(b,c)。

4. 研究成果

(1) マウス生体頭部には、直径 15mm のポリウムコイルを用いることで細胞追跡に耐え得る感度を実現し、同時に撮像中の頭蓋の固定・安定、十分な磁場均一性を担保するのに最適であった。

(2) 上記プローブコイルを用い、測定パラメータの調整を行ったことにより、従来より測定感度が飛躍的に向上した。それに伴い、空間分解能を向上させることに成功した。平面分解能が $50 \mu\text{m} \times 50 \mu\text{m}$ 、スライス厚が $100 \mu\text{m}$ の高解像度 MRI 画像を、全脳を対象範囲に撮像することで、マウス脳全体に分布する標識細胞(浸潤マクロファージ: 図 1 黒点部)を三次元で描出することが可能であった(図 1、2)。

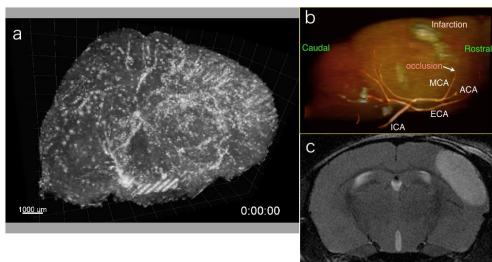


図 2 : 四次元細胞追跡動画(a)と脳虚血領域(b,c)の同時計測

(2) さらに、時間分解能の向上に成功し、従来は 1 回の撮像あたり数時間オーダー必要であった撮像時間を 10 分以下まで短縮することが可能になり、個別の細胞のダイナミックな動態を観察することが可能になった。

(3) 体動補正・信号補正法を応用することで、数時間～十数時間の継続的な細胞追跡を実現することが可能であった。(図 1)

(4) 上記の時空間分解能の向上および後処理を行うことにより、三次元の細胞描出に時間

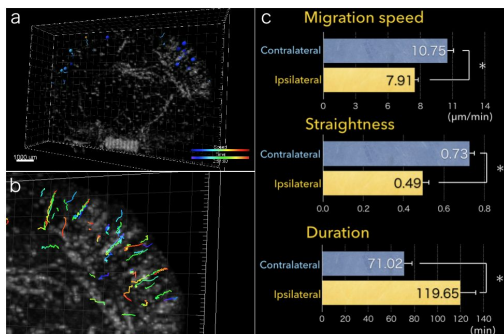


図 3 : 細胞動態の定量的解析。移動速度(a)と軌跡(b)より脳梗塞領域と正常側で移動パターンに違いが観察された。

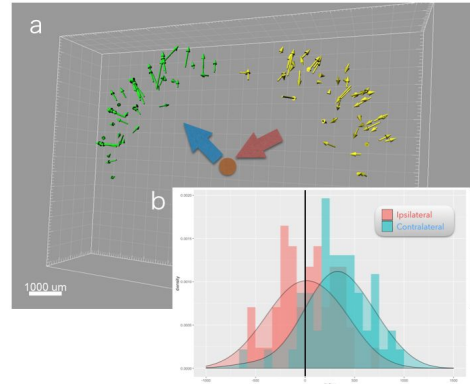


図 4 : 標識細胞の移動の方向性の違い。正常半球皮質(a, 緑矢印)と患側半球皮質(a, 黄矢印)に存在する標識細胞がそれぞれ脳中心に対して異なった移動パターンを示した。

軸を加えた四次元細胞追跡を、生体マウス脳において実施可能になった。(図 2 a)

(5) 同手法を実験的脳虚血モデル動物に適応し、脳障害領域と細胞分布を同時に計測することが可能になり(図 2 b,c)、虚血傷害部位と正常半球において、標識された浸潤マクロファージの動態に違いがあることを定量的に評価することが可能であった。(図 3)

(6) T2 強調画像にて高信号に描出される脳虚血梗塞塞内の標識細胞は、移動スピード・直進性・停滞時間などが正常側に比べ低下していた。(図 3)

(6) 同時に、標識細胞の移動の方向性に変化が見られ、正常組織では主に静脈の走行と並行して脳深部から脳表に向かって標識細胞が移動していたのに対し、脳虚血梗塞塞では、脳表から脳深部に向かっていくものが多く観察された。(図 4)

(7) 生きた動物の脳における免疫細胞のダイナミックな動態追跡を非侵襲的に行っ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。本研究結果から、MRI を用いた細胞追跡技術は、病態の有無によりその移動パターンに違いが観察されたことから、脳障害形成・治療過程の免疫細胞の作用機序について新しい知見をもたらすことが期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 10 件)

- Makita Y, Inoue M, Katayama N, Lee HH, Abe T, Inui YC, Mori Y, Yoshioka Y, Honda Y, Gamoh S, Shimizutani K, Fujiwara S, Ogawa A. Mono- and

- dinuclear gadolinium(III) complexes of tris(4-carboxy-3-benzyl-3-azabutyl) amine: Synthesis and relaxation properties. *Polyhedron* 2016; 107:148-152.
2. Arima Y, Kamimura D, Atsumi T, Harada M, Kawamoto N, Nishikawa N, Stofkova A, Ohki T, Higuchi K, Morimoto Y, Wieghofer P, Okada Y, Mori Y, Sakoda S, Saika S, Yoshioka Y, Komuro I, Yamashita T, Hirano T, Prinz M, Murakami M. A pain-mediated neural signal induces relapse in multiple sclerosis models. *eLife* 2015; 4. doi: 10.7554/eLife.08733. [Epub]
 3. Saito S, Sawada K, Mori Y, Yoshioka Y, Murase K. Brain and arterial abnormalities following prenatal X-ray irradiation in mice assessed by magnetic resonance imaging and angiography. *Congenit Anom.* 2014; 55:103-6.
 4. Saito S, Mori Y, Tanki N, Yoshioka Y, Murase K. Factors affecting the chemical exchange saturation transfer of Creatine as assessed by 11.7 T MRI. *Radiol Phys Technol.* 2014; 8:146-152.
 5. Mori Y, Chen T, Fujisawa T, Kobashi S, Ohno K, Yoshida S, Tago Y, Komai Y, Hata Y, Yoshioka Y. From Cartoon to Real Time MRI: In Vivo Monitoring of Phagocyte Migration in Mouse Brain. *Sci Rep* 2014; 4:6997.
 6. Tsukasaki Y, Komatsuzaki A, Mori Y, Ma Q, Yoshioka Y, Jin T. Short-Wavelength Infrared Emitting Multimodal Probe for Non-Invasive Visualization of Phagocyte Cell Migration in Living Mice. *Chem Comm* 2014; 50:14356-14359.
 7. Mori Y, Chen T, Yoshioka Y. Visual review: MRI immuno-imaging. *Infection Inflammation Immunity* 2014; 44: 229-238. Review, in Japanese.
 8. Mori Y, Murakami M, Arima Y, Zhu D, Yoshioka Y. Temporal Changes in Lower-Lumbar Spinal Cord in EAE Mouse. *Japanese J Magn Reson Med* 2014; 34: 96-99. in Japanese.
 9. Saito S, Sawada K, Hirose M, Mori Y, Yoshioka Y, Murase K. Diffusion Tensor Imaging of Brain Abnormalities Induced by Prenatal Exposure to Radiation in Rodents. *PloS One* 2014; doi: 10.1371/journal.pone.0107368.
 10. Zhao H, Aoshi T, Kawai S, Mori Y, Konishi A, Ozkan M, Fujita Y, Haseda Y, Shimizu M, Kohyama M, Kobiyama K, Eto K, Nabekura J, Horii T, Ishino T, Yuda M, Hemmi H, Kaisho T, Akira S, Kinoshita M, Tohyama K, Yoshioka Y, Ishii KJ, Coban C. Olfactory plays a key role in spatiotemporal pathogenesis of cerebral malaria. *Cell Host Microbe* 2014; 15: 551-563.
- 〔学会発表〕(計 26 件)
1. Mori Y, et al. Sequential and Time-Lapse MRI Monitoring of Peripheral Macrophage Recruitment and Migration in Mouse Brain. Joint Annual Meeting ISMRM-ESMRMB、2014年5月10-16日、Milan, Italy
 2. Yoshioka Y, Chen T, Mori Y, et al. New Magnetic Nanoparticle for Kidney Function. Joint Annual Meeting ISMRM-ESMRMB、2014年5月10-16日、Milan, Italy
 3. Fukunaga M, Masumura M, Koda S, Shimonaga T, Nakamura R, Mori Y, Yoshioka Y. Histological Correlation of Manganese Enhanced MRI in the Demyelinating Disease Model Brain. Joint Annual Meeting ISMRM-ESMRMB、2014年5月10-16日、Milan, Italy
 4. Mori Y, et al. In vivo MRI monitoring of inflammatory alterations and cellular dynamics in the central nervous system, World Automation Congress (WAC)、2014年8月3-7日、Waikoloa, HI, USA
 5. Kobashi S, Mori Y, et al. Image alignment for single-cell imaging of macrophage in the mouse brain using 11.7T MRI, World Automation Congress (WAC)、2014年8月3-7日、Waikoloa, HI, USA
 6. Nakane Y, Ma Q, Mori Y, et al. Near-infrared fluorescent nanoprobe for non-invasive multimodal tissue imaging, World Automation Congress (WAC)、2014年8月3-7日、Waikoloa, HI, USA
 7. 森勇樹、MRI でマウス生体内の免疫細胞の動きを視る、第23回日本バイオイメージング学会学術集会、招待講演、2014年9月4-6日、大阪
 8. 森勇樹、他. 超高磁場MRIを用いた生体内免疫細胞脳内浸潤の1細胞レベル可視化についての検討、第23回日本バイオイメージング学会学術集会、2014年9月4-6日、大阪
 9. 森勇樹、他. 磁気共鳴画像法を用いた脳内免疫細胞動態の追跡、第37回日本神経科学大会、2014年9月11-13日、横浜
 10. 森勇樹、超高磁場MRイメージングを用いた生体内免疫細胞動態追跡、第42回日本磁気共鳴医学会学術集会、招待講演、2014年9月18-20日、京都
 11. 森勇樹、他. Time-lapse MRIによるダ

- イナミックな脳内細胞動態追跡の検討、第42回日本磁気共鳴医学会学術集会、2014年9月18-20日、京都
12. 陳挺、森勇樹、他. 磁性粒子を用いた糸球体腎炎モデルマウスの評価、第42回日本磁気共鳴医学会学術集会、2014年9月18-20日、京都
 13. 程振宇、森勇樹、他. SPIO-Induced Signal Changes Correlated with EAE Development in the Lower Lumbar Spinal Cord、第42回日本磁気共鳴医学会学術集会、2014年9月18-20日、京都
 14. 吉田将太、森勇樹、吉岡芳親. 小動物用11.7T MRI装置で使用できる感染マウス用密閉コンテナの試作、第42回日本磁気共鳴医学会学術集会、2014年9月18-20日、京都
 15. Mori Y, Yoshioka Y. Non-invasive single cell-tracking in mouse brain by using time-lapse MRI, 12th International Congress of Neuroimmunology, 2014年11月9-13日、Mainz, Germany
 16. Mori Y, et al. MRI monitoring of single immune cell migration crawling around inside living brain. International Symposium "Neural Mechanisms of Vision and Cognition", 2015年3月2-3日、Osaka, Japan
 17. Chen T, Mori Y, et al. New magnetic nanoparticle for kidney function. International Symposium "Neural Mechanisms of Vision and Cognition", 2015年3月2-3日、Osaka, Japan
 18. 森勇樹、超高磁場MRイメージングを用いた生体内免疫細胞動態追跡、兵庫県大シミュレーション学研究所招待セミナー、招待講演、2015年3月10日、兵庫
 19. Mori Y, et al. In vivo monitoring of immune cell kinetics with time-lapse MRI in the ischemic lesion of mouse brain. Annual Meeting ISMRM, 2015年6月1-5日、Toronto, Canada
 20. Chen T, Mori Y, et al. Visualization of lupus nephritis using SPIO. Annual Meeting ISMRM, 2015年6月1-5日、Toronto, Canada
 21. 森勇樹、超高磁場MRイメージングを用いた生体脳内免疫細胞動態追跡、第67回日本細胞生物学会、招待講演、2015年6月30日-7月2日、東京
 22. 陳挺、森勇樹、他. SPIOを用いたループス腎炎の評価、第43回日本磁気共鳴医学会大会、2015年9月10-12日、東京
 23. Tashita A, Kobashi S, Mori Y, et al. Macrophage tracking using the Hungarian algorithm in time lapse MR images. 7th International Conference on Emerging Trends in Engineering & Technology, 2015年11月18-20日、Kobe, Japan
 24. Dung DTM, Fukushima S, Mori Y, et al. Tri-modal imaging techniques Cathodoluminescence (CL) - Near Infrared (NIR) and Magnetic resonance imaging (MRI) with lanthanides doped Gd₂O₃. The 2nd East-Asia Microscopy Conference (The Himeji Chamber of Commerce and Industry (HCCI)), 2015年11月24-27日、Himeji, Hyogo, Japan
 25. Sugimoto K, Mori Y, et al. Expression of oxytocin receptor in ischemic lesions of rat brain: protection of oxytocin for injured neurons. 第93回日本生理学会大会、2016年3月22-14日、札幌
 26. 田下徳起、小橋昌司、森勇樹、他. マウス脳11.7TタイムラプスMR画像を用いた1細胞レベルのマクロファージ動態評価法、電子情報通信学会医用画像研究会、2016年5月19-20日、名古屋

〔その他〕

ホームページ等

<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