

平成 30 年 5 月 2 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26430071

研究課題名(和文) 0-17同位体標識水を造影剤としたMRIによる脳内循環の画像化と脳傷害の診断

研究課題名(英文) MRI imaging of the glymphatic system after focal brain injury by using 17O-H₂O

研究代表者

森田 光洋 (MORITA, Mitsuhiro)

神戸大学・理学研究科・准教授

研究者番号：50297602

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：酸素の安定同位体¹⁷Oで標識された水を造影剤としたMRIにより脳脊髄液と脳組織間液の流れ(脳内循環)を画像化する方法を開発するとともに、局所性脳傷害が脳内循環に与える影響を検討した。その結果ガドリニウム錯体を造影剤とした場合は脳内循環が画像化されたが、¹⁷O-H₂Oでは困難であった。脳脊髄液と血液の間における水の交換が予想以上に大きく、脳脊髄液に投与した¹⁷O-H₂Oが速やかに血液中に排出されてしまったと考えられる。このため、蛍光色素を用いて脳内循環の評価し、大脳皮質の局所に作製した閉鎖性脳傷害は、急性期において広範な脳内循環の不全を引き起こし、アミロイドを加速する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The MRI imaging of cerebrospinal and interstitial fluid dynamics (the glymphatic system) developed by using inert ¹⁷O-H₂O, and the influence of focal brain injury on the glymphatic system was investigated. Even though gadolinium complex injected cerebrospinal fluid successfully imaged glymphatic flow by MRI, we failed to detect the signal from ¹⁷O-H₂O injected in the same way. The enhancing efficacies measured by phantom was similar between these contrasting agents, thus ¹⁷O-H₂O was likely excluded from the brain by the water exchange between cerebrospinal fluid and blood flow. We further analyzed glymphatic system by using fluorescent tracers and found that the glymphatic system broadly impaired during the acute phase of focal cerebral injury. In addition, the increase of beta-amyloid was found in the injured hemisphere of Alzheimer model mice.

研究分野：神経科学

キーワード：脳脊髄液 脳傷害 MRI アルツハイマー病

1. 研究開始当初の背景

(1) 脳内循環に関する研究の進展; 毛細血管からリンパ管の間を流れる組織間液は、死細胞や老廃物を除去し、細胞外環境を正常に保つ役割を担っている。一方、脳にはリンパ管がないことが古くから知られており、脳における組織間液の動態は長い間不明であった。しかし近年、脳脊髄液が血管周辺スペースから脳組織内に流入して組織間液になることが明らかになりつつあり、この一連の流れが Glymphatic system (以下「脳内循環」) として提唱されている¹⁾。

(2) 脳内循環を指標とした診断; 脳内循環がアルツハイマー病の原因物質であるアミロイドの除去に寄与するとの知見が蓄積しつつあり、脳内循環の不全と神経・精神疾患の関連が示唆されている¹⁾。このような背景から、脳内循環を画像化することができれば、診断に有用な情報が得られると考えられた。研究開発当初、すでにガドリニウム錯体を造影剤として用いた MRI によりげっ歯類の脳内循環が画像化されていたが²⁾、ガドリニウム錯体をヒトの脳内に投与することは、安全性の問題から困難であり、臨床利用は不可能であると考えられていた。

2. 研究の目的

本研究では、脳内循環を画像化する新しい手段として、酸素の安定同位体 ^{17}O で標識された水 $^{17}\text{O}\text{-H}_2\text{O}$ を造影剤とした MRI の利用を試みた。水はガドリニウム錯体と違い、脳内における毒性が問題とならない。また本研究では、この画像化技術の有用性を実証するために、独自に開発した閉鎖性頭部外傷モデルである光傷害マウス³⁾を利用することとした。すなわち、局所性脳傷害が脳内循環に与える影響を画像化するとともに、画像化された脳内循環の不全と、アミロイド蓄積の関連性を明らかにすることを目指した。 $^{17}\text{O}\text{-H}_2\text{O}$ を造影剤とした MRI により脳内循環が画像化され、これによって明らかとなった脳内循環の不全がアミロイド蓄積と相関すれば、アルツハイマー病をはじめとする神経精神疾患の早期診断に新しい可能性が開かれる。

3. 研究の方法

(1) $^{17}\text{O}\text{-H}_2\text{O}$ を造影剤とした MRI; $^{17}\text{O}\text{-H}_2\text{O}$ を用いて人工脳脊髄液を調整し、大槽から注入した。これにより造影された脳脊髄液の動態を MRI により撮像した。一部の実験では生理食塩水で希釈したがドリニウムを造影剤として同様に用いた。

(2) 脳内循環の蛍光標識; Cy5 で標識されたオバルブミンをマウスに大槽から注入した。その後、マウスをホルマリン固定し、大脳皮質を平板化および透明化し²⁾、これを共焦点レーザー顕微鏡により撮像することで三次元画像を再構築した。

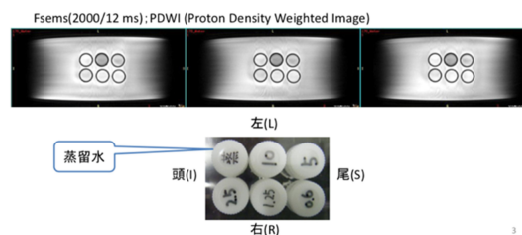
(3) 脳血管の蛍光標識; Cy3 で標識されたオバルブミンとゼラチンを含むリン酸緩衝

液を、ホルマリン固定したマウスの上行動脈に注入した。こうして得られた大脳皮質の脳血管を(2)と同じ方法で3次元画像として再構築した。

(4) 脳傷害の作製; 独自に開発した光傷害マウス³⁾の手法で局所性脳傷害を作製した。

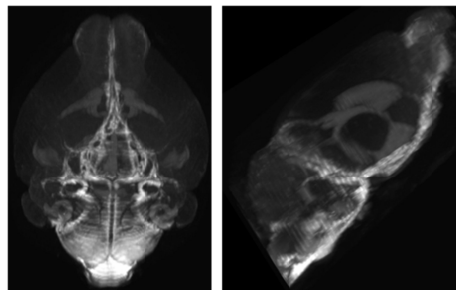
4. 研究成果

(1) $^{17}\text{O}\text{-H}_2\text{O}$ を造影剤とした脳内循環の画像化; $^{17}\text{O}\text{-H}_2\text{O}$ の希釈液をファントムとして MRI で撮像し、造影剤として十分な感度であることを確認した(図1)。 $^{17}\text{O}\text{-H}_2\text{O}$ を用いて調整した人工脳脊髄液をマウス大槽に注入し、MRI で撮像したが、脳内循環の造影は見られなかった。



(図1) $^{17}\text{O}\text{-H}_2\text{O}$ (ファントム) のシグナル (MRI)

すでに動物実験において脳内循環の造影が報告されているがドリニウム錯体を大槽から注入して MRI で撮像したところ、脳表面の血管が造影されたため、ガドリニウム錯体ならば、現有の MRI 設備により脳内循環を画像化できることが確認された(図2)。このことは、脳脊髄液中に投与された $^{17}\text{O}\text{-H}_2\text{O}$ が、速やかに脳から排出されたことを示唆している。血中に投与した $^{18}\text{O}\text{-H}_2\text{O}$ (^{18}O は放射性核種) を PET で撮像することによる、脳血流の画像化が、すでに診断に用いられている。この場合、 $^{18}\text{O}\text{-H}_2\text{O}$ が脳において速やかに血液中から脳実質に移行するため、脳脊髄液中に投与した $^{17}\text{O}\text{-H}_2\text{O}$ もまた、血液中の H_2O と速やかに交換された可能性が高い。脳脊髄液と血液の間における H_2O の交換については不明な点が多く、本研究ではドブタミンなどの薬物を用いて脳血流を増減させた際の $^{17}\text{O}\text{-H}_2\text{O}$ の撮像も試みたが、造影効果の改善には至らな

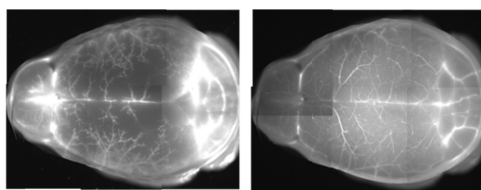


(図2) ガドリニウム錯体による脳内循環の造影があった。

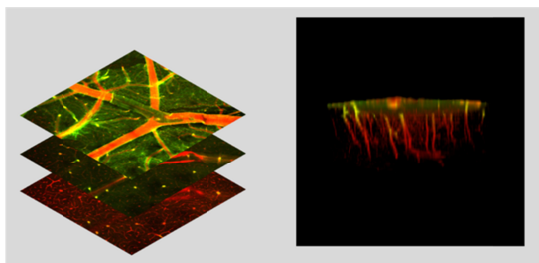
(2) 蛍光色素を用いた脳内循環と脳血管の画像化; $^{17}\text{O}\text{-H}_2\text{O}$ を造影剤とした MRI による脳内循環の画像化が困難であったことを踏まえ、蛍光色素を用いた検討を行うことにした。

すでに蛍光色素を大槽から注入し、その分布を蛍光顕微鏡で画像化することが行われており、この方法によって脳内循環の基本的な概念が確立されている¹⁾。これら一連の研究では、脳組織切片の蛍光観察が中心であるため、目的とする血管の全体像を得ることが困難であった。そのため、本研究では脳内循環と脳血管を二重蛍光標識し、さらに組織切片作成ではなく、透明化により脳内循環と脳血管の全体像を解析した。具体的には、正常マウスの大槽または上行動脈から蛍光色素を注入し、それぞれ脳脊髄液と血管を標識した(図3)。

ここから大脳皮質を切り出して、平板化および透明化を行い、大脳皮質の表面から共焦点レーザー顕微鏡で画像化し、3次元画像を再構築した(図4)。

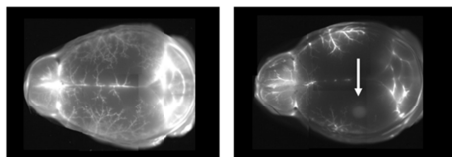


(図3) 脳内循環(左)と脳血管(右)の二重蛍光標識



(図4) 脳内循環と脳血管の3次元画像

(3) 局所性脳傷害に伴う脳内循環の不全；脳傷害急性期(傷害1週間)の脳内循環および脳血管を(2)の方法で画像化したところ、損傷周辺のみならず、広範な領域において脳内循環の不全が見られた(図5)。これをさらに定量的に評価するため、貫通動脈沿いに分布する蛍光標識された脳脊髄液の量を比較したところ、正常マウスに比べて、損傷周辺の広範な領域で蛍光の減少が見られた。このことは、傷害が局所的であっても、脳浮腫などによる脳圧の上昇により血管周辺スペースが圧迫されることで減少し、脳内循環が不全となることを示している。



(図5) 正常(左)と傷害1週間(右、矢印)の脳内循環

(4) 脳内循環の不全と アミロイド集積；アルツハイマー病モデル $APP^{NL-G-F/NL-G-F}$ に同様の局所性脳傷害を作製し、アミロイドの蓄積を検討した。その結果、傷害数週間の損傷

周辺部位では、アミロイドの減少がみられた。これは、損傷に伴いミクログリアが活性化され、ダメージを受けた組織とともにアミロイドを除去したことを反映していると考えられる。これに対して、傷害数ヶ月におけるアミロイドの分布を検討した結果、損傷を受けた大脳半球の広範な領域でアミロイドの増加が見られた。このことは、脳傷害に伴う脳内循環の不全が、アミロイドの集積を加速させたことを示唆している。

<引用文献>

- 1) Iliff et al, A paravascular pathway facilitates CSF flow through the brain parenchyma and the clearance of interstitial solutes, including amyloid. *Sci Transl Med* 4:147ra111 (2012)
- 2) Iliff et al, Brain-wide pathway for waste clearance captured by contrast-enhanced MRI. *J Clin invest* 123, p1299-309 (2013)
- 3) Suzuki et al, Astrocyte activation and wound healing in intact-skull mouse after focal brain injury. *Eur J Neurosci*, 36, p3653-64 (2012)
- 4) Ke et al, SeeDB: a simple and morphology-preserving optical clearing agent for neuronal circuit reconstruction. *Nature Neurosci*, 16, p1154-61 (2013)

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 13 件)

Kobayashi, Y., Ronan da Silva, Kumanogoh, H., Miyata, S., Sato, C., Kitajima, K., Nakamura, S., Morita, M., Hayashi, F., Maekawa, S., Ganglioside contained in the NAP-22 fraction prepared from the detergent-resistant membrane microdomain of rat brain inhibits the phosphatase activity of calcineurin. *J Neurosci Res* 98(9), 1462-70, (2015) 査読あり

Maekawa S., Kobayashi, Y., Morita, M., and Suzaki, T., Tight binding of NAP-22 with acidic membrane lipids., *Neurosci Lett* 600, 244-8 (2015) 査読あり

Morita, M., Nakane, A., Maekawa, S. and Kudo, Y., Pharmacological characterization of the involvement of protein kinase C in oscillatory and

non-oscillatory calcium increases in astrocytes. *J Pharm Sci* 129(1), 38-42 (2015) 査読あり

Morita, M., Nakane, A., Fujii, Y., Maekawa, S. and Kudo, Y. High cell density upregulates calcium oscillation by increasing calcium store content via basal mitogen-activated protein kinase activity, *PLoS ONE* 10(9):e0137610. (2015) 査読あり

Furube, E. Morita, M. Miyata, S., Characterization of neural stem cells and their progeny in the sensory circumventricular organs of adult mouse. *Cell & Tissue Research* 363(2), 347-65 (2015) 査読あり

Yamashiro, K., Fujii, Y., Maekawa, S. and Morita, M. Multiple pathways for elevating extracellular adenosine in the rat hippocampal CA1 region characterized by adenosine sensor cells. *J Neurochem* 140(1), 24-36 (2017) 査読あり

Sakai Y., Asakura, Y., Morita, M. and Takahashi, T. Concise synthesis of hydroxy -methyl fatty acid ethyl esters, *Chem. Pharm. Bull* 65(12):1195-1198 (2017) 査読あり

Fujii, Y., Maekawa, S. and Morita, M., Astrocyte calcium waves propagate proximally by gap junction and distally by extracellular diffusion of ATP released from volume-regulated anion channels. *Sci Rep* 7, p13115 (2017) 査読あり

Takagi, T., Furube, E., Nakano, Y., Morita, M., and Miyata, S. (2017). Microglia are continuously activated in the circumventricular organs of mouse brain. *J Neuroimmunol* 査読あり

Yamashiro, K., Morita, M., Novel aspects of extracellular adenosine dynamics revealed by adenosine sensor cells. *Neural Regen Res* 12(6), p881-885 (2017) 査読あり

Maruyama, Y., Ueno, S., Morita, M., Hayashi, F., and Maekawa, S., Inhibitory effect of several sphingolipid metabolites on calcineurin, *Neurosci Lett*, 673, p132-135 (2018) 査読あり

Ueno, S., Miyoshi, H., Maruyama, Y., Morita, M. and Maekawa, S., Interaction of dynamin I with NAP-22, a neuronal protein enriched in the

presynaptic region. *Neurosci Lett*, 675, p59-63 (2018) 査読あり

Hiratsuka, D., Furube, E., Taguchi, K., Tanaka, M., Morita, M. and Miyata, S., Remyelination in the medulla oblongata of adult mouse brain during experimental autoimmune encephalomyelitis, *J Neuroimmunol*, 319, p41-54 (2018) 査読あり

[学会発表](計 20 件)

Fujii, Y. Yamashiro, K. and Morita, M. Two adenosine release mechanisms in rat hippocampus Neuroscience 2014 (日本神経科学会 横浜)

森田光洋、木村寛之、佐治英郎、金井泰和、畑澤順、脂肪酸関連プローブ BMIPP を用いた脳組織再生の画像化、第 5 4 回日本核医学会学術総会、2014.11.6-8

Watanabe, A and Morita, M., STAT3 signaling in perilesional nestin-expressing reactive astrocyte is required for cortical recovery after closed-head injury. Neuroscience 2014 (日本神経科学会 横浜)

Yuumi Kobayashi, Ronan V. da Silva, Haruko Kumanogoh, Mitsuhiro Morita, Shun Nakamura, Shohei Maekawa, NAP-22 は CaN の脱リン酸化酵素活性を阻害する Neuroscience 2014 (日本神経科学会 横浜)

Eriko Furube, Mitsuhiro Morita, Seiji Miyata, Neural stem cells and progenitor cells in the sensory circumventricular organs of adult mouse, Neuroscience 2014 (日本神経科学会 横浜)

Morita, M. and Watanabe, A. STAT3 Signaling in Perilesional Nestin-Expressing Reactive Astrocyte is Required for Cortical Recovery after Closed-Head Injury. (2014) Society for Neurosci, Washington DC, Poster Abstract 522.16

前川昌平、小林優美、小田垣真一、大谷ミア、林文夫、森田光洋、Lipid-induced oligomerization of NAP-22、第 8 6 回日本生化学会、京都国際会館、2014.10

Morita, M., Tsuji, E. and Watanabe, A. Ablation of nestin-expressing reactive astrocytes after cortical tissue regeneration in a closed-head injury model. 第 3 8 回 日本神経科学会 (2015 神戸)

Sakakibara, R. and Morita, M. Broad impairment of the flow of cerebrospinal fluid, glymphatic system after focal closed head injury 第38回 日本神経科学会(2015 神戸)

Morita, M., Watanabe, A., Tsuji, E. and Maekawa, S. Perilesional nestin-expressing reactive astrocyte is required for cortical recovery after focal brain injury and ablated after wound healing. XII European Meeting on Glial Cells in Health and Disease (Euroglia 2015, Bilbao)

Morita, M. and Fujii Y. Two distinct propagation mechanisms underlying mechanically-induced calcium waves in astrocytes, 10th FENS Forum of Neuroscience 2016, Copenhagen, poster

Morita, M. and Fujii Y. Proximal propagation of mechanically-induced calcium wave between astrocytes is mediated by gap junction, while distal propagation is mediated by diffusion of ATP released by volume-regulated anion channel. 第39回 日本神経科学会(2016 横浜)

森田光洋、骨髄間葉系幹細胞によるアストロサイトの神経幹細胞への脱分化促進、第38回神経組織培養研究会(2016 横浜)

Hiratsuka, D., Furube, E., Morita, M., Miyata S., Generation of new oligodendrocytes in the medulla oblongata of mice by EAE-induced demyelination 第40回 日本神経科会(2017 東京)

Morita, M. Okazaki, N, Tsuji, E., Multiple origins of perilesional nestin-expressing reactive astrocytes following closed-head injury, 第40回 日本神経科会(2017 東京)

Furube, E., Hiratsuka, D., Taguchi, K., Tanaka, M., Morita, M., Miyata, S., Localization of neural stem cells and stroke-induced generation of new neurons and glia in the medulla oblongata 第40回 日本神経科会(2017 東京)

Saito, Y., Morita, M., Bone marrow derived mesenchymal stem cells promote the multipotency of nestin-expressing reactive astrocytes 第40回 日本神経科会(2017 東京)

森田光洋、岡崎夏樹、松田ひなた、辻恵里佳、脳損傷周辺に集積するネスチン陽性活性化アストロサイトは複数の由来を持つ、第60回 日本脳循環代謝学会(2017 大阪)

齋藤喜仁、森田光洋、骨髄間葉系幹細胞によるアストロサイトの多分可能促進、第60回 日本脳循環代謝学会(2017 大阪)

Morita, M., Okazaki, N., Tsuji, E., MULTIPLE ORIGINS OF PERILESIONAL NESTIN-EXPRESSING REACTIVE ASTROCYTES FOLLOWING CLOSED-HEAD INJURY, ISN (2017 Paris)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森田光洋 (MORITA, Mitsuhiro)
神戸大学大学院理学研究科・准教授
研究者番号：50297602

(2) 連携研究者

吉岡芳親 (YOSHIOKA, Yoshichika)
大阪大学先導的学際研究機構・教授
研究者番号：00174897