

令和元年9月5日現在

機関番号：82502

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2015～2018

課題番号：15H04910

研究課題名（和文）MRIを用いた細胞膜水透過性の可視化とその生体応用研究

研究課題名（英文）Visualization of cell membrane water permeability for in vivo MRI

研究代表者

小畠 隆行（Obata, Takayuki）

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・放射線医学総合研究所 分子イメージング診断治療研究部・次長（定常）

研究者番号：00285107

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,200,000円

研究成果の概要（和文）：In vitro実験で確立した細胞膜水透過性測定法をげっ歯類でのin vivo実験に応用し、そのエビデンスを踏まえ、ヒトMRIに応用することを目的とした。

In vitro追加実験を行い、In vivo応用への基盤強化を図った。生体を模したファントムを作成し、生体での細胞膜水特性測定のためのMRIプロトコルを開発した。In vitro実験では存在しない微小循環の影響を定量的に評価するため、片側慢性低還流モデルマウスを用いて本測定法に対する影響を調査した。脳梗塞モデルマウスを用いて透過性定量値と病態の関係を示した。基礎研究の結果を踏まえ、ヒトMRI研究に適したプロトコル開発を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腫瘍の悪性度や治療効果で大きく変わるといわれている細胞膜水透過性であるが、これは摘出標本で測定することが困難で、生体そのままでの測定が必要となる。細胞レベルでの測定報告は多いものの、In vivo応用されたケースは極めて少なく、ヒトへの応用性のあるものは皆無といってよい状況であった。そのような中で、本手法は広く臨床で応用されているMRIを用いた非侵襲的な測定技術で、実現できれば新たなバイオマーカーとして有益な生体情報を提供できる可能性がある。本研究で得られたIn vitro・In vivoの結果から近い将来の臨床応用の可能性を示す複数のエビデンスが得られたことは大きな意義があると考えられる。

研究成果の概要（英文）：We aimed to apply the measurement method of cell membrane water permeability established in experiments in vitro to in vivo experiments in rodents. Based on the evidences we also tried to apply it to human MRI.

Additional in vitro experiments were conducted to strengthen the evidence for in vivo applications. A in-vivo-like phantom experiment was performed to adjust the in vivo MRI protocol. In order to quantitatively assess the effects of microcirculation that do not exist in in vitro experiments, the effects were investigated using a unilateral chronic low reflux model mouse. Based on the results of basic research, we obtained feasible results about cell membrane permeability in human using our proposal method.

研究分野：放射線医学

キーワード：MRI 細胞膜水透過性 水拡散 アクアポリン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞膜の水透過性(以降、膜透過性)は腫瘍や脳浮腫などで大きく変化することが報告されている。しかし、現在の画像診断技術で膜透過性を定量的に測定できるものはないため、その変化を定量的に測定できれば臨床診断としての有用性は極めて高いと考えられる。

水の拡散が画像化できる拡散強調 MRI は、がん診断・脳梗塞急性期診断など様々な臨床診断に広く利用されている。細胞膜を透過する水の情報もこの拡散強調 MRI 信号に含まれているはずだが、拡散強調 MRI 信号を理解するために用いられる生体内水拡散モデルでは細胞膜を水を遮蔽する壁にとらえ、一般的には膜透過性は考慮に入れられていない。

膜透過性がモデルに入っていない理由としては、従来法では拡散測定時間が短く膜透過性を考慮しなくても誤差が小さく影響が少ないことと、モデルが複雑になること。さらにその検証が難しいことがあげられる。

そこで、我々は *in vitro* の実験において独自の拡散測定時間可変法を開発し、膜透過を考慮に入れた比較的簡便な水拡散モデルを作成し、膜透過性の定量測定を可能とした。また、近年の研究で膜蛋白アクアポリン(AQP)は水チャネルとして機能し、細胞膜を介する水の透過を制御していることが解ってきているので、この AQP 発現制御細胞を用いて光イメージング膜透過性定量結果との比較研究を行い、新しい手法の妥当性を示した(小島隆行、第 42 回日本磁気共鳴医学会大会(京都)2014;34.S: S4-4)。

本手法は非侵襲的・短時間測定で臨床に十分応用可能で、*in vitro* 実験から動物実験、臨床応用までの迅速なステップアップが必要と考えられる。実際、膜透過性の異常をきたす疾患の報告は多い。これらの膜透過性変化を定量的に観測することで、早期診断や治療適応、その効果判定を行うことができると考えられる。

2. 研究の目的

In vitro 実験で確立した細胞膜水透過性測定法をげっ歯類での *in vivo* 実験に応用し、ノックアウトマウス・モデルマウスを用いて病態とのリンクを探る。さらにこれらのエビデンスを踏まえ、ヒト MRI 研究・臨床に応用し、細胞膜水透過性に変化をきたす疾患や治療の診断に対する有効性を検討する。

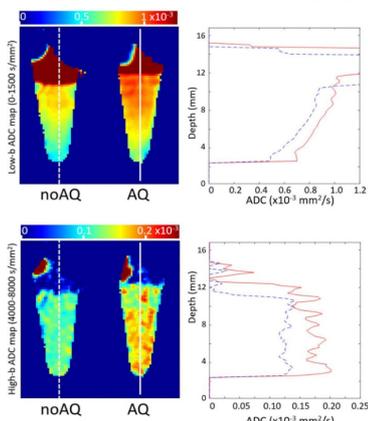
3. 研究の方法

- (1) In vitro 実験の定量性向上を目的とした実験: *In vivo* 応用に向けての確認事項を調査し追加実験を行い、*In vivo* 応用への基盤強化を図った(雑誌論文 1)。
- (2) In vivo への応用に向けた基礎実験 1: 生体を模したファントムを作成し、その精度調整を行った。また、そのファントムを用いて生体での細胞膜水特性測定のための MRI プロトコルを開発した(雑誌論文 2)。
- (3) 細胞膜水透過性測定に対する微小血流の影響評価: *In vitro* 実験では存在しない微小循環の影響を定量的に評価するため、片側慢性低還流モデルマウスを用いて本測定法に対する影響を調査した(雑誌論文 3)。
- (4) 急性脳梗塞マウスなどを用いた細胞膜水透過性定量測定: 本研究では、急性の脳虚血モデルマウスに提案手法を適用し、虚血領域における細胞膜水透過の変化を観測した(学会発表 1)。
- (5) ヒト MRI 測定への応用研究:基礎研究の結果を踏まえ、健常ボランティアを対象とした初期的な検討を行った(学会発表 2)。

4. 研究成果

- (1) In vitro 実験の定量性向上を目的とした実験: *in vivo* 応用に向けての確認事項を調査し追加実験を行い、*In vivo* 応用への基盤強化を図った(雑誌論文 1)。

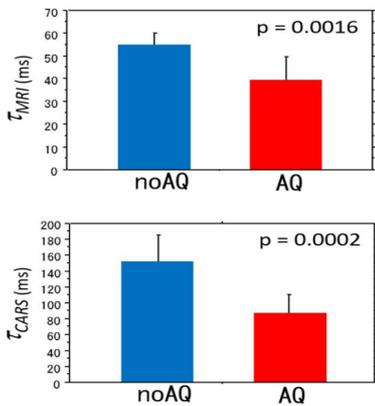
アクアポリン-4 発現細胞 (AQ) および非発現細胞 (noAQ) に対して、マルチ b マルチ拡散時間を使った拡散強調磁気共鳴画像法を実施し、2 つの細胞型からのシグナル間の明らかな違いを示した(図 1)。データ



は、コンパートメント間交換を含む 2 コンパートメント(細胞内および細胞外の空間)モデルを用いて解釈した。細胞内の水分子の拡散が制限されると、細胞内拡散係数は拡散時間に反比例することを仮定した新しいモデルである。このモデルで得られた水交換時間の推定値を、独立した光学イメージング技術(coherent anti-Stokes Raman scattering imaging, CARS)を用いて測定されたものと比較し、両方の技術で同様の傾向を得ることができた(図 2)。このことは我々の提案手法が定量的に細胞膜水透過性を計測できていることを示唆するものであった。

図 1 アクアポリン非発現細胞(noAQ)と発現細胞(AQ)の ADC マップと、そのプロファイル。PCR チューブに細胞を入れ遠沈後に拡散強調画像を取得し、ADC を計算した。一般的に用いられる b 値(0~1500 s/mm²)で計算された

ADC マップでは深さ方向での変化が大きいが(左上) 細胞膜水透過性に主に関連すると考えられている高い b 値 (4000~8000 s/mm²) で計算された ADC マップでは比較的均質で発現の有無による違いの方が顕著であった(左下)。プロファイル(右図)はサンプルの中心部(左図の破線と実線)の ADC 値を表している。



縦軸が深さ方向で横軸は ADC、赤実線が AQ、青破線が noAQ の変化である。

図 2 b 値による変化と拡散時間による変化を開発したモデル解析に入力し得られた細胞内外交換時間 (MRI) と、一分子水定量できる光学イメージング法 (coherent anti-Stokes Raman scattering imaging, CARS) で得られた交換時間 (CARS) 得られた交換時間の値には開きがあったものの、同様な傾向を持ち、アクアポリン発現の有無で有意な差を認めた。なお、定量値の違いに関しては、(a) MRI は検出できる水は比較的移動性に富むものなので値が小さくなった、(b) 重水は水とわずかに特性が違うため CARS での交換時間が長くなった、などの理由が考えられる。

(2) In vivo への応用に向けた基礎実験 1: 生体を模したファントムを作成し、その精度調整を行った。また、そのファントムを用いて生体での細胞膜水特性測定のための MRI プロトコルを開発した(雑誌論文 2)。方法: 最初のファントムは、多数の平行な微細孔を持つガラス製のキャピラリープレートと (CP) 熱収縮チューブでまとめられたポリエチレン繊維 Dyneema の束 (Dy) を用いた (図 3)。動物用 7 T MRI スキャナーで、高解像度マルチショットエコープラナーイメージング (EPI) 拡散強調画像取得を 37.7 および 97.7 ms の拡散時間 (Tdiff) で行った。Z 方向に平行 (軸方向) および垂直方向 (径方向) に拡散勾配をかけて、14 ステップで 0~8000 s/mm² の b 値で画像を取得しました。一方、3T MRI スキャナーで取得したデータを使用して、臨床機器での測定値が 7T MRI の結果と一致していることを確認した。結果: Tdiff = 37.7 および 97.7 ms での軸方向における b 値依存性シグナル減衰は、両方のファントムについて類似していた (図 4)。径方向において、Dy は両方の Tdiff について生体組織のものと同様の b 値依存性の信号減衰を示したが、CP ではやや上に凸となるようなカーブを描き、かつ、Tdiff の変化に大きな影響を受けた (図 4)。パラメータ推定値は 3T と 7T の MRI で同様だった。これらのエビデンスを参考にヒトを含めた In vivo での MRI 水透過性測定プロトコルを作成した。

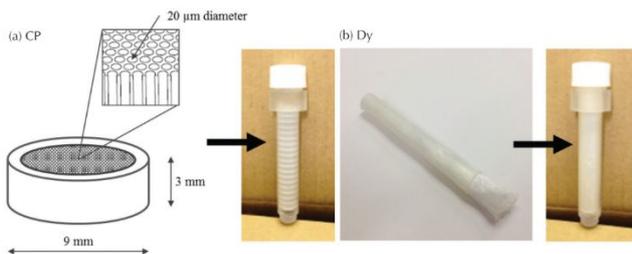


図 3 多数の平行な微細孔を持つガラス製のキャピラリープレートと (CP) 熱収縮チューブでまとめられたポリエチレン繊維 Dyneema の束 (Dy)

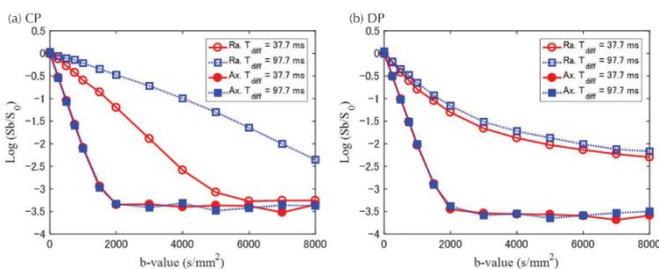


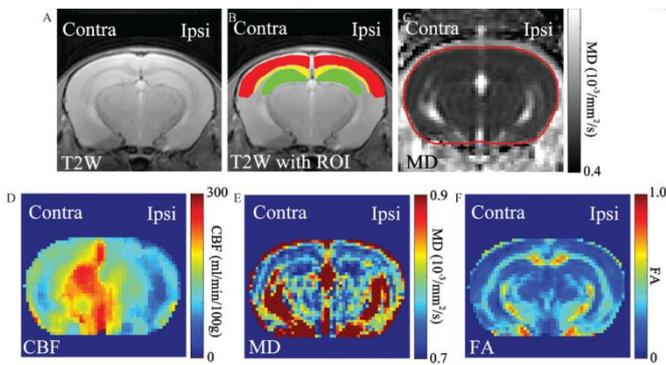
図 4 CP (左), Dy (右) それぞれの b 値依存性の信号変化。軸方向に MPG を印加した場合は (□、○) は Tdiff に依存せず、類似した変化を示した。一方、径方向に MPG を印加した場合は (●、○) Dy では Tdiff が違っても大きな差がないのに対し、CP では信号に大きな違いがいられた。

(3) 細胞膜水透過性測定に対する微小血流の影響評価: In vitro 実験では存在しない微小循環の影響を定量的に評価するため、片側慢性低還流モデルマウスを用いて本測定法に対する影響を調査した(雑誌論文 3)。

方法: 拡散強調画像法 (DWI) では、水の拡散だけでなくボクセル内の毛細管流、すなわち、intravoxel incoherent motion (IVIM) も信号に寄与する。したがって、arterial spin-labeling (ASL) MRI を使用して CBF 変化の影響をモニターしながら、片側総頸動脈閉塞 (UCCA) 実施後 4 週間の慢性低灌流モデルマウスの脳における DWI シグナル変化を評価した。

結果: すべての個体から良好な CBF 画像・DWI 画像が取得できた (図 5)。単純な t 検定では、CBF のみ対照側と閉塞側の脳間に有意差があり、平均拡散係数 (MD)・分数異方性 (FA) には有意差はなかった(図

6). しかし、ピアソン相関分析では MD が CBF と強く相関を示したので、共変量として CBF を用いて共分散分析 (ANCOVA) を行った (図 7)。その結果、反対側と同側の間で MD の有意差が見られた。結論: 病理学的診断に DWI ベースの情報を使用する場合は、CBF 関連のシグナルの変化を考慮する必要があることが示唆された。



緑) に設定した。

以上のエビデンスに基づいて、In vitro で作成した解析モデルに微小循環の要素を除外するための変更を加えた。

図 5 T2 強調画像 (A) および、解析に用いた関心領域 (B) 解析対象領域 (C の赤線内)、各指標でのマップ (D-F)。T2 強調画像では明らかな左右差はない (A)、CBF では明らかな左右差があるが (D)、MD・FA では左右差ははっきりしない (E・F)。関心領域は Dorsal cortex (B, 赤)、corpus callosum with external capsule (CC+EC) (B, 黄)、Hippocampus (B,

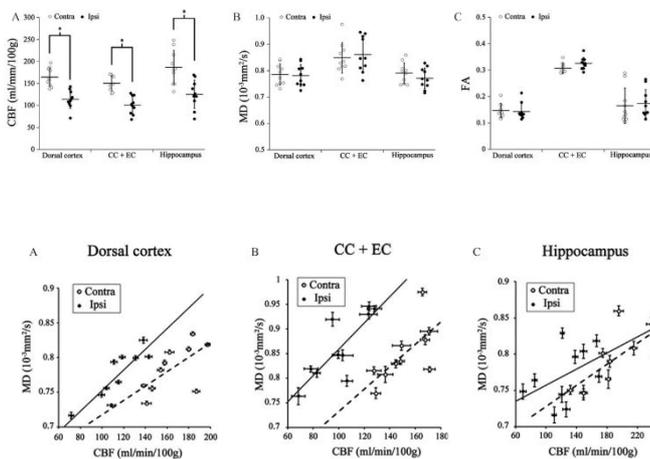


図 6 それぞれの関心領域での各指標の値。CBF はどの領域でも病側と対側で有意差を認めたが (A)、MD および FA では有意差はなかった。

図 7 横軸を CBF、縦軸を各指標にした時の病側・対側の散布図と近似直線。各指標と CBF との間には強い相関があり、共分散分析が必要なことが示唆される。

(4) 急性脳梗塞マウスなどを用いた細胞膜水透過性定量測定:

本研究では、急性の脳虚血モデルマウスに提案手法を適用し、虚血領域における細胞膜水透過の変化を観測した。さらなる検討は必要だが、虚血領域におけるコンパートメント間の水交換の亢進を測定することが可能であった。本手法が脳梗塞の診断に有用なバイオマーカーを提供できるか可能性を示す実験結果と考えられた。

国際学会プロシーディング・論文発表をまだ行っていないため、詳細な報告は省略する。手法・結果などを記述した日本磁気共鳴学会大会の抄録の一部を以下に示す(学会発表 1)。

==

モデルマウスは片側の中大脳動脈をシルク糸で結紮することで作成し、手術の 3 時間後に MRI 撮像を行った。DWI は 3 種の拡散時間 (40、70、100ms) において、それぞれ複数の b 値 (0~8000) で測定し、上記の手法により、水の交換率 (移行係数)、Cr の割合、Cr における水の mean displacement ($|x|$)、Ch における拡散係数 (Dh) を計算した。モデルマウスの虚血部を T2 強調画像及び DWI より同定し、対側健常部と比較した。虚血部において水の交換率は大きな値となり、この結果は先行研究と矛盾しなかった。また、虚血部では Cr の割合が大きくなったが、 $|x|$ の変化はわずかであった。これは虚血部での変化がこれまでに報告されているような細胞膨化よりも炎症細胞浸潤等による細胞数の増加や beading のような変化であることを示唆している。なお、Dh は虚血部と健常部で近い値となったが、その病的意義は不明である。さらに検討が必要だが、虚血領域におけるコンパートメント間の水交換の亢進を測定できる本手法は、脳梗塞の診断に有用なバイオマーカーを提供できるかもしれない。

==

(5) ヒト MRI 測定への応用研究:

基礎研究の結果を踏まえ、健常ボランティアを対象とした初期的な検討を行った(学会発表 2)。

方法

7人の女性健常ボランティア（20～33歳、平均24）を対象にマルチbマルチ拡散時間 - DWIを取得した。それぞれ2つのMPG方向で、0から4000秒/mm²までの11個のb値を選択した。拡散時間（ Δ ）は43.4、63.4、および83.4ミリ秒に設定した。関心領域（ROI）は、左内被膜（PLIC）の皮質脊髄路および左中心半円窩（CS）の深部白質に手動で設定した。自由水ファントムおよび純粋な制限拡散ファントム（キャピラリープレート（CP））を参考のため取得した。

解析モデル

ここで使用したモデルはIn vitro 実験で提案した我々のモデルを生体用に修正したものである。生体では組織がより複雑となるため、細胞内および類似する拡散コンポーネントを制限拡散コンポーネント（RDC）、細胞外および類似する拡散コンポーネントをHindered 拡散コンポーネント（HDC）と分類した（それらの割合を f_r および f_h とした）。ある拡散時間（DT）で測定された信号は、RDC（ $C_r(DT)$ ）とHDC（ $C_h(DT)$ ）からの信号の合計として表わした。RDCは、拡散係数（ D_r ）がDTに反比例するコンパートメントとして定義された。この拡散を定義するために補助独立変数（ A ）を設定した（ $A = D_r \times DT$ ）。HDCは、DTとは無関係に拡散するコンポーネントとして定義された。この研究では、HDCの拡散係数（ D_h ）は0.0012 mm²/秒に固定した。コンパートメント間の交換は、RDCからHDCへの交換時間（ t_r ）とHDCからRDCへの交換時間（ t_h ）によって定義され、独立変数 A 、 f_r 、および t_r が計算された。PLICとCSの間の変数を統計的に比較した（Wilcoxonの符号付き順位検定; $P < 0.05$ を有意と見なした）。

結果

CPではb値とほぼ直線的な強いDT依存性が見られたが、自由水中ではDT依存性は見られなかった（図8上段）。PLICおよびCSでは、DT依存性は高いb値で見られた（図8下段）。DTが $\Delta = 43.4$ から63.4ミリ秒に増加するとシグナル強度は上昇またはわずかに減少し、その後さらに $\Delta = 63.4$ から83.4ミリ秒にDTを増加させると減少した（図8、下段）。

観測された信号強度は、提案モデルの計算パラメータから得られた信号変化曲線とよく一致していた（図8下段）。PLICの f_r と t_r の中央値はCSのそれよりも大きく、有意差を認めた。統計的差異は A には見られなかった（表1）。

拡散時間を変えることにより、特徴的な変化を認めたものの、測定できるb値や拡散時間に限界があり、さらなるハードウェアの進歩が期待された。なお、現在は一部のMRI装置でより強い傾斜磁場発生が可能となっており、より詳細なデータ取得が可能となっている。

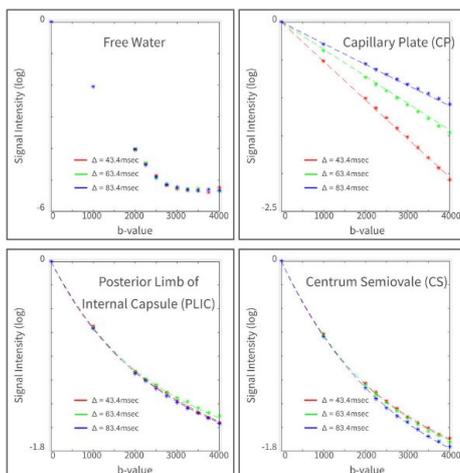


図8 各領域のb値依存性信号変化（拡散時間により色分けしている）。自由水では拡散時間（ Δ ）に依存せず、直線的な変化でノイズフロアーに至っている。CPでは直線的ではあるものの Δ の値で信号は大きく変化している。PLIC、CSはBi-exponential様の信号変化を示し、 Δ の違いで高b値の領域に変化があるが、両部位でその傾向は異なる。

表1 提案モデルで求めた各指標

	A ($\times 10^{-6}$ mm ²)	f_r	t_r (msec)
PLIC (min, max)	3.86 (3.25, 4.41)	0.53 (0.47, 0.58)	75.0 (71.3, 79.1)
CS (min, max)	4.04 (3.77, 4.26)	0.45 (0.42, 0.47)	67.3 (61.0, 76.6)
P-value*	0.6845	0.016	0.047

*Wilcoxon signed-rank test; $P < 0.05$ was regarded significant

A : variable to define the diffusion coefficient of RDC ($A = D_r \times DT$); f_r : fraction of RDC; t_r : exchange time from RDC to HDC.

まとめ：

本研究課題では、In vitro で実証したMRIを用いた細胞膜水透過性定量法のIn vivoへの展開を試みた。ファントム実験により最適パラメータを抽出し、げっ歯類での基礎研究により撮像法を確立し、急性脳梗塞

モデルマウスを用いた病態評価と、健常ボランティアを対象とするヒト MRI 応用の基礎検討を行った。基礎検討に基づいたモデルを用いることにより応用研究で有意な細胞膜水透過性変化を観測することができ、本手法の有用性を示すことができた。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

1. Obata T, Kershaw J, Tachibana Y, Miyauchi T, Abe Y, Shibata S, Kawaguchi H, Ikoma Y, Takuwa H, Aoki I, Yasui M. Comparison of diffusion-weighted MRI and anti-Stokes Raman scattering (CARS) measurements of the inter-compartmental exchange-time of water in expression-controlled aquaporin-4 cells. Scientific reports 2018;8(1):17954.
<https://www.nature.com/articles/s41598-018-36264-9>
2. Tachibana A, Tachibana Y, Kershaw J, Sano H, Fukushi M, Obata T. Comparison of Glass Capillary Plates and Polyethylene Fiber Bundles as Phantoms to Assess the Quality of Diffusion Tensor Imaging. Magn Reson Med Sci 2018;17(3):251-258.
https://www.jstage.jst.go.jp/article/mrms/17/3/17_mp.2017-0079/_article
3. Urushihata T, Takuwa H, Seki C, Tachibana Y, Takahashi M, Kershaw J, Takado Y, Aoki I, Higuchi M, Ito H, Obata T. Water Diffusion in the Brain of Chronic Hypoperfusion Model Mice: A Study Considering the Effect of Blood Flow. Magn Reson Med Sci 2018;17(4):318-324.
https://www.jstage.jst.go.jp/article/mrms/17/4/17_mp.2017-0149/_article

〔学会発表〕(計 2 件)

1. Urushihata T, Takuwa H, Tachibana Y, Takahashi M, Aoki I, Obata T. Multi-b-value multi-diffusion-time DWI を用いた、脳虚血マウスにおけるコンパートメント間水交換率測定 Measurement of inter-compartmental water exchange using multi-b and multi diffusion-time DWI in focal cerebral ischemia model mice. 第 45 回日本磁気共鳴医学会 大会 2017 September; 宇都宮. p 265.
2. Tachibana Y, Obata T, Tsuchiya H, Omatsu M, Koizumi M, Kishimoto R, Feiweier T, Tsuji H. Diffusion-weighted imaging with multiple diffusion time to assess water-exchange between restricted and hindered diffusion components in vivo. 2016; Proceedings of the ISMRM 25th Annual Scientific Meeting and Exhibition Suntec, Singapore. p 2040.

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.nirs.qst.go.jp/rd/structure/rccpt/amr-diag/index.php>

6 . 研究組織

(1)分担研究者

該当者なし

(2)研究協力者(採択期間においては連携研究者)

青木伊知男

Aoki, Ichio

生駒洋子

Ikoma, Yoko

川口拓之

Kawaguchi, Hiroshi

田桑弘之

Takuwa, Hiroyuki

立花泰彦

Tachibana, Yasuhiko

安井正人

Yasui, Masato