

令和元年6月21日現在

機関番号：32620

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H07097

研究課題名(和文)脳透明化技術と次世代拡散MRIによる精神・神経疾患の病態解明

研究課題名(英文)Elucidation of pathophysiology of neurological disorder by brain transparency and next generation diffusion MRI

研究代表者

ケレベール オレリアン(Kerever, Aurelien)

順天堂大学・医学部・特任助教

研究者番号：70623594

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：老化および精神神経疾患において脳内ネットワークの巧緻性破綻が注目され、オリゴデンドロサイトによる“髄鞘のチューニング”が重要であることがわかってきた。しかし、脳微細構造変化の評価は従来のMRIでは3次元構造の観察が難しく、“髄鞘のチューニング”の解析には限界があった。申請者は、微細構造変化を超高解像度・3次元画像で観察する組織学的データとの比較から、将来的に新たな精神神経疾患の早期診断マーカー開発に寄与することを目指した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

未分化オリゴデンドロサイトの挙動を詳細に解析し、将来的に新たな精神神経疾患の早期診断マーカー開発に寄与することを目指した。「脳透明化技術」と「拡散MRI」の連携により、老化および精神神経疾患における脳内ネットワークの微調整の解明に一役を担った。

研究成果の概要(英文)：Deterioration of intracerebral networks occurs in aging and neuropsychiatric disorders, and "myelination tuning" by oligodendrocytes has been found to be important. However, evaluation of brain ultrastructural changes is difficult to observe with conventional MRI, and analysis of "myelination tuning" is limited. The applicants aimed to contribute to the development of new diagnostic markers for neuropsychiatric disorders in the future, in comparison with histological data obtained by observing ultrastructural changes in ultra-high resolution and three-dimensional images.

研究分野：放射線学

キーワード：oligodendrocyte myelin chondroitin sulfate MRI

1. 研究開始当初の背景

統合失調症、鬱病、自閉症といった精神疾患において髄鞘の不具合が関与していることが次々と報告されており、オリゴデンドロサイトによる脳機能の微調整が注目されている。その解析のため、脳構造の微細な変化を *in vivo* で評価するツールとして、様々な拡散 MRI や高精細 3D-T1 強調像が近年に提案され、脳の微細構造変化や脳内ネットワークの変化を検出することが可能となってきた。特に拡散 MRI は、組織内の水分子拡散を通して、脳白質・灰白質の微細構造を定量化することが可能であり、神経軸索径や神経軸索密度、樹状突起のばらつきの程度なども定量可能となってきている。協力研究者の青木は、これらの技術を用いて、正常加齢により前頭葉灰白質及び白質の萎縮が加齢と特に負相関を示すこと、視床や基底核など深部灰白質の正常加齢による変化の検出に成功した (Neuroradiology 2010, NMR Biomed. 2010 他)。ただし、拡散 MRI による評価はあくまで数学モデルに乗っ取った推定モデルに過ぎず、病理学的な裏付けは必ずしも十分ではない。これらの構造変化の病理的な裏付けとして剖検脳を評価する際にも、切片化された組織では脳全体の神経ネットワークや細胞配列、樹状突起など 3 次元構造の評価は困難であった。これに対して申請者は、CLARITY に代表される様々な脳透明化技術(図 1)が、脳全体の神経ネットワークや神経細胞配列を 1 細胞レベルで 3 次元画像の取得ができることに着目し、脳機能解析に役立ててきた。この技術をもって、申請者の所属する老研センターと神経放射線学講座は共同して、平成 27 年よりマウスモデルにおいて、この評価方法確立を試み報告してきた (Magn Reson Med Sci. 2015, Magn Reson Med Sci. 2016, Acta Radiologica Open in press)。特に申請者は髄鞘コントロールにより神経ネットワークを制御するオリゴデンドロサイトの役割を研究対象としており、“MRI による脳微細構造変化の *in vivo* 評価”と“死後脳の透明脳化による神経ネットワークの網羅的な解析”の両面から脳の形態学的微細変化を詳細に捉えることが疾患脳の“髄鞘のチューニング”を比較するベースラインとして欠かせないとの着想に至り、本研究の計画を策定した。

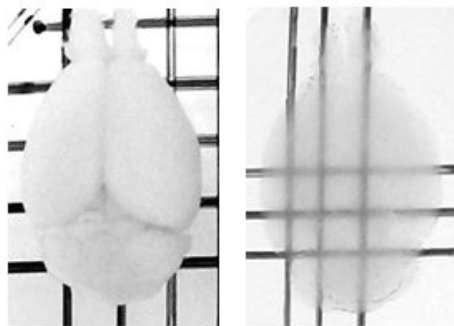


図1 透明脳化された正常マウス脳
左: 透明脳化前、右: 透明脳化後
この手法は、簡便かつ、脳構造を大きく変化させない、そのまま免疫染色が可能、という利点がある(Chung K, et al. Nature 2013)

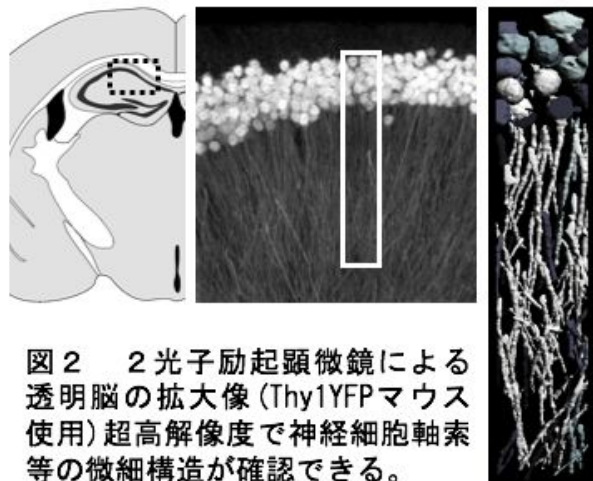


図2 2光子励起顕微鏡による透明脳の拡大像 (Thy1YFPマウス使用) 超高解像度で神経細胞軸索等の微細構造が確認できる。

2. 研究の目的

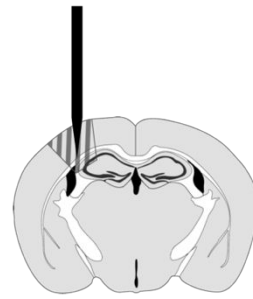
老化および精神神経疾患において、神経軸索変性・樹状突起長減少・神経細胞脱落など、微細変化による脳内ネットワークの巧緻性破綻が注目される。しかし、その脳微細構造変化の評価は従来の MRI では困難であり、剖検脳における切片化組織の評価においても、細胞配列、樹状突起など 3 次元構造の観察が難しく限界がある。これに対して申請者は、微細構造変化を超高解像度・3 次元画像で観察することを近年に可能とした「脳透明化技術」と「拡散 MRI」で突破口を開きつつある。本研究の目的は透明脳化技術及び拡散 MRI 解析の両方の解析手法の情報を比較調査し、灰白質と白質の髄鞘形成と神経細胞間連携を正常、加齢、疾患モデルマウスで解析するための評価方法を立案することである。特に、

この研究期間では、神経ネットワーク形成と維持における髄鞘チューニングの主役である成体脳における未分化オリゴデンドロサイトの挙動解明を目的として進めた。将来的に精神神経疾患の早期診断マーカー開発に寄与する。

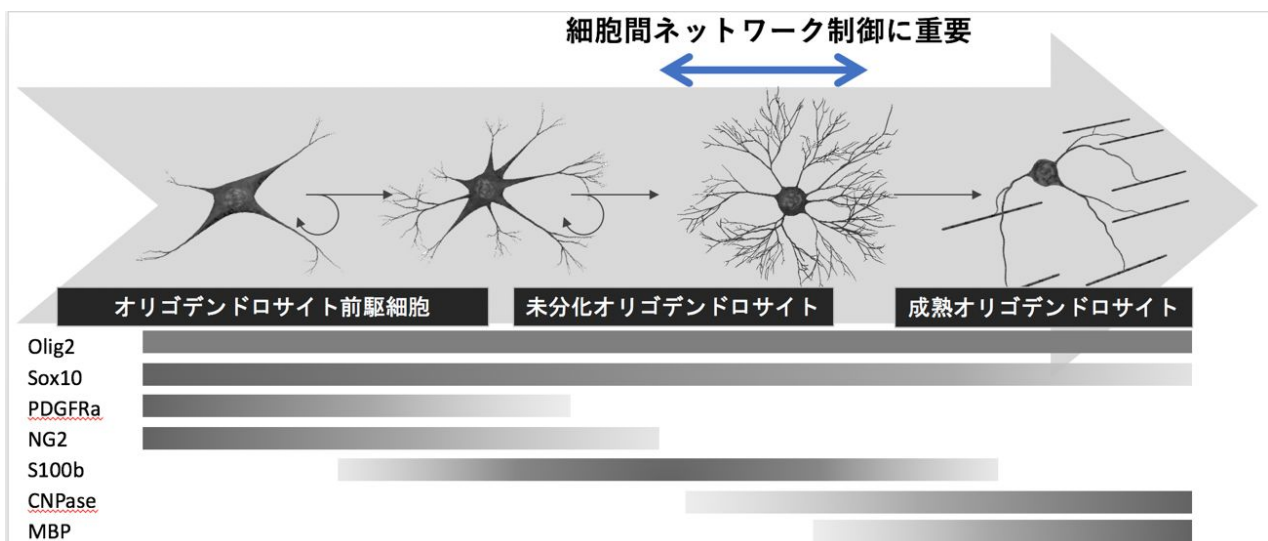
3. 研究の方法

脱髄領域の作成： 成体脳における未分化オリゴデンドロサイトを活性化させるため、脱髄・再髄鞘化モデルマウスを作成する。

脳地図をもとに定量的に脳梁近傍の脳皮質（1.5 mm posterior to the bregma, 2.5 mm lateral to the bregma and 2.0 mm deep from the skull surface.）に lysolecithin (LPC; Sigma) を注入し脱髄巣を作成する。生食を同部位に注入したマウスを対照群とする。髄鞘崩壊期（LPC 注入 7 日後）にマウス脳を採取し、ミエリン（MBP 免疫染色、fluoromyelin 染色）脱髄巣の範囲と程度を確認を行う（3D microscopy）。



脱髄領域におけるオリゴデンドロサイトの挙動の解析： 成体脳に存在するオリゴデンドロサイト前駆細胞は第四のグリア細胞と称され、神経ネットワーク維持に重要と考えられており、本研究でも注目した。下記のマーカーを使用し、詳細な分類を試みる。



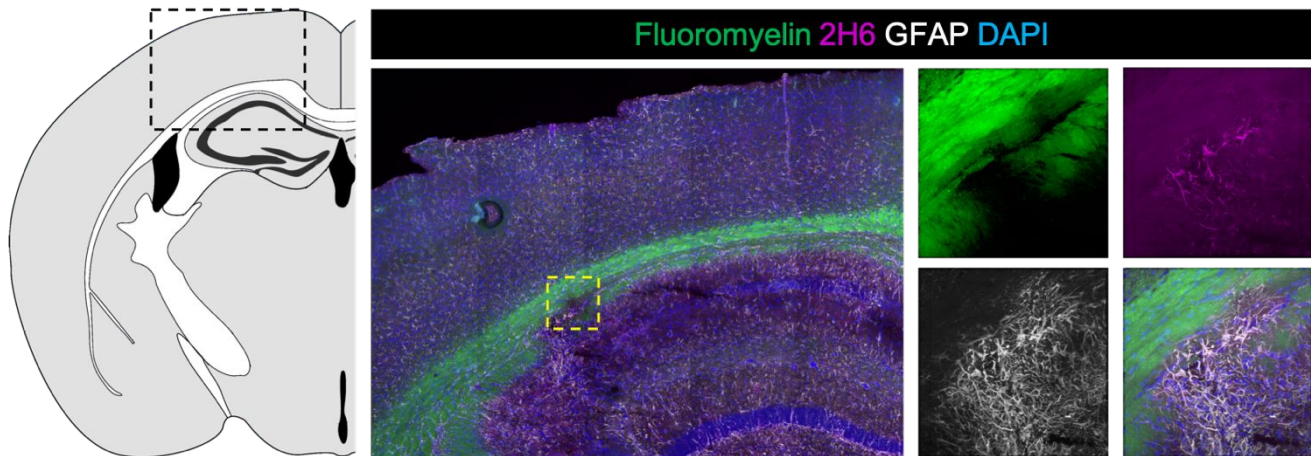
MRI 撮像方法

マウスを麻酔下に in vivo で 9.4 テスラ MRI を用いて、3D-T2 強調像 (RARE シーケンス) multi-shell 拡散 MRI 撮像を行う。得られた MRI 画像データについては数学解析ソフトである Matlab 上で動作する画像解析ソフト Statistical Parametric Mapping (SPM) や FMRIB Software Library 4.1.5 (FSL) で提供されている TBSS (Smith et al, Neuroimage 2006)、Free surfer を用いて画像解析を行う。浸透圧や透明脳化処理過程により透明脳に伸縮が生じるため、固定後に撮像した MRI 画像の処理に際して、in vivo 撮像した 3DT1 強調像で脳サイズ補正を行う。

MRI データ評価 1)3D-T2 強調像について VBM 手法を用いて、脳容積・灰白質容積の縦断的評価を行う。2)拡散 MRI データについて、拡散テンソル解析、拡散尖度解析、NODDI 解析、MR G-ratio 解析を行い、脳白質、灰白質変性を定量評価し、軸索径、軸索密度、軸索・髄鞘比をはじめとした脳内の微細な構造変化を定量化する。さらに拡散テンソル解析には脳コネクトーム解析を追加して行う。

4. 研究成果

1. 脱髄・再髄鞘化モデルマウスの作成と解析プロトコルの確立を開始した。脱髄領域の作成として、脳地図をもとに定量的に脳梁近傍の脳皮質に LPC を注入し脱髄巣を作成することに成功した。脱髄巣における白質及び灰白質の軸索変性の評価には神経細胞が蛍光ラベルされる Thy-1 YFP マウスを用いるが、4%PFA 還流固定後 MRI 撮像を行った後、1mm の冠状断切片を作成し CUBIC と SCALE 法を用いて透明化することに成功した。脳梁及び脳皮質における脱髄の確認のための免疫染色の条件が確立された(図3)。



2. 灰白質の脱髄巣の領域確認は、白質部分と比較し、難しいことがわかった。今回のプロトコルより広い範囲での脱髄巣の作成が必要と考えた。

3 ヒト MRI データ評価のための解析手法整備を行った。脳容積・灰白質容積を評価する従来手法である Voxel based morphometry の解析パイプライン整備に加え、拡散テンソル解析、拡散尖度解析、NODDI 解析、MR G-ratio、ミエリンイメージング(T1/T2)による脳内微細構造の定量化を行う解析環境の整備を行った。さらにこれらの最先端 MRI 定量値による精度良い灰白質評価を行うため、種々の定量値の灰白質マッピングを可能とする最先端の Human connectome project パイプラインを導入した。

今後の課題

今後は、脱髄巣における白質及び灰白質の軸索変性の評価には神経細胞が蛍光ラベルされる Thy-1 YFP マウスを用いて実験を進める。適切な範囲の脱髄巣が決定されたのち、再髄鞘化開始期の 3D microscopy: ミエリン髄鞘化の範囲と程度の確認と MRI 画像との比較を行う。オリゴデンドロサイト前駆細胞のリクルート及び分化の程度と範囲の検証する。さらに、再髄鞘化完成期、髄鞘化の範囲と程度の確認と MRI 画像の比較する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

1 The intellectual disability gene PQBP1 rescues Alzheimer's disease pathology
Hikari Tanaka, Kanoh Kondo, Xigui Chen, Hidenori Homma, Kazuhiko Tagawa, Aurelian Kerever, Shigeki Aoki, Takashi Saito, Takaomi Saido, Shin-ichi Muramatsu, Kyota Fujita, Hitoshi Okazawa *Mol Psychiatry*. 2018; 23(10): 2090-2110. Published online 2018 Oct 3. doi: 10.1038/s41380-018-0253-8

2. The Relationship between Neurite Density Measured with Confocal Microscopy in a Cleared Mouse Brain and Metrics Obtained from Diffusion Tensor and Diffusion Kurtosis Imaging
Ryusuke Irie, Koji Kamagata, Aurelien Kerever, Ryo Ueda, Suguru Yokosawa, Yosuke Otake, Hisaaki Ochi, Hidekazu Yoshizawa, Ayato Hayashi, Kazuhiko Tagawa, Hitoshi Okazawa, Kohske Takahashi, Kanako Sato, Masaaki Hori, Eri Arikawa-Hirasawa, Shigeki Aoki *Magn Reson Med Sci*. 2018; 17(2): 138-144.

3. Understanding microstructure of the brain by comparison of neurite orientation dispersion and density imaging (NODDI) with transparent mouse brain
Kanao Sato, Aurelien Kerever, Koji Kamagata, Kohei Tsuruta, Ryusuke Irie, Kazuhiko Tagawa, Hitoshi Okazawa, Eri Arikawa-Hirasawa, Nobuhiro Nitta, Ichio Aoki, Shigeki Aoki *Acta Radiol Open*. 2017 Apr; 6(4): 2058460117703816. Published online 2017 Apr 17.

〔学会発表〕(計3件)

第 46 回日本磁気共鳴医学会大会

拡散 MRI による Alzheimer 病モデルマウスにおける A β 沈着関連、海馬微細構造変化の観察。
池之内穰、入江隆介、鎌形康司、堀正明、武中祐樹、田川一彦、岡澤均、畑純一、羽賀柔、Aurelien
Kerever、平澤恵理、青木茂樹

2018 日本結合組織学会抄録

自閉症モデルマウス大脳皮質体性感覚野におけるコンドロイチン硫酸構造の欠損とオリゴデン
ドロサイト分化パターンの関連
加藤可那、ケレベール オレリアン、鈴木佑治、平澤恵理

2018 日本結合組織学会抄録

脱細胞脳組織を用いた 3 次元神経新生モデルの最適化
大野竜暉、吉村祐輔、辻裕介、オレリアン・ケレベール、平澤(有川)恵理

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号 (8 桁)：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。