

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：82502

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2023

課題番号：18K18375

研究課題名（和文）新規反応性ナノ造影剤による自由行動下における全脳網羅的神経脱分極MRI法の開発

研究課題名（英文）Development of comprehensive neurodepolarization MRI method under freely behavioral rodents using novel contrast agents

研究代表者

佐藤 千佳（SATO, Chika）

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・量子生命科学研究所・研究員

研究者番号：70772888

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、全脳の賦活領域の計測・解析を自由行動下で行う技術開発を目的とした。これを達成するため、脳の機能性を反映するマンガン造影MRI法とex vivo（組織を生体外に取り出した状態）での高い空間解像度での撮影手法を組み合わせた手法を開発した。また広視野二光子顕微鏡と機能的MRIのマルチモダル計測手法を確立し、これらの画像を重ね合わせる技術の検討を行った。これらにより、高解像度でのマンガン造影画像の取得が実現され、異なるモダリティ間の同一領域の比較が可能となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

機能的MRIは、時空間分解能は低いものの、自由行動下での全脳の機能計測が可能な手法である。一方で脳全体の挙動は個々の神経活動を検出するだけでは理解が困難であり、脳の情報処理機構を解明するためには細胞集団としての活動を検出することも重要である。本研究により神経活動の詳細な解析が可能になり、脳の機能的な理解が深まる。また精神疾患モデル動物に適用することで疾患の原因解明や新たな診断・治療法の開発が期待できる。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to develop techniques for measuring and analyzing whole-brain activation regions under free-moving conditions. To achieve this, we developed a method combining manganese-enhanced MRI (MEMRI), which reflects brain functionality, with ex vivo high spatial resolution imaging techniques. Additionally, we established a multimodal measurement method using wide-field two-photon microscopy and functional MRI, and investigated techniques for co-registering these images. These advancements enabled the acquisition of high-resolution manganese-enhanced images and facilitated the comparison of identical regions across different modalities.

研究分野：脳神経科学

キーワード：MRI

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

これまでに開発されてきた自由行動下での脳機能計測法は、個々の神経活動の検出を目指すものが多く、脳全体の活動を3次元かつ *in vivo* で検出可能な手法が存在しない。例えば高い時空間分解能が特徴的な膜電位感受性色素や pH 感受性色素を用いた手法は、組織の深さ方向の情報が制限される。一方で、広い計測範囲で脳全体の活動を計測する手法の1つに、BOLD (blood oxygenation level-dependent) 法による機能的磁気共鳴画像法(functional magnetic resonance imaging, fMRI)がある。しかしながら本手法は時空間分解能が低いこと、血流量とヘモグロビンの酸素結合状態の変化として神経活動を“間接的”にとらえたものであり、高解像度での研究において神経活動との乖離が指摘されている。

### 2. 研究の目的

本申請は、「自由行動下での全脳神経脱分極の3次元 MRI マッピング」を可能とする技術開発を目的とし、申請者はマンガン造影 MRI 技術と反応性ナノ粒子技術を組み合わせることでその実現を目指す。マンガン造影 MRI による脳の賦活領域、BOLD 法による賦活領域、実際の神経活動との相違を解析するための手法の開発を試みた。

### 3. 研究の方法

実験動物としてマウス (C57BL/6, 雄, 10~30 週齢) を使用した。MRI 計測には 7T 前臨床 MRI (Avance-III, Bruker Biospin) と冷却式 RF コイルを用いた。

#### (1) *ex vivo* MEMRI 法の開発

塩化マンガン ( $MnCl_2$ , 50mM, 100mg/kg) をマウス尾静脈から投与し、22 時間後に *in vivo* MRI 計測を実施した。撮影完了後に 4%パラホルムアルデヒドにより灌流固定を行い、*ex vivo* MRI 計測を実施した。

#### (2) *ex vivo* MEMRI 法を用いた三次元軸索トレース法の開発

塩化マンガン ( $MnCl_2$ , 50mM, 100mg/kg) を右線条体に投与し、22 時間後に *in vivo* 計測、灌流固定、*ex vivo* MRI 計測を (1) と同様の手順で実施した。

#### (3) 覚醒行動下での広視野二光子顕微鏡と fMRI のマルチモダル計測解析系の開発

一般的に用いられている fMRI 計測による脳の賦活領域とマンガン造影による賦活領域が一致するかどうかを確認し、その賦活が神経活動に依存するものかどうかを検討するため、広視野二光子顕微鏡と fMRI 計測が可能な行動実験課題の設定と解析方法を検討した。

#### (4) 広視野二光子顕微鏡画像と fMRI 画像のレジストレーション手法の検討

広視野二光子顕微鏡画像を MRI 画像と重ね合わせるため、血管構造をマーカーとし、画像同士の重ね合わせの手順を検討した。広視野二光子顕微鏡計測においては課題完了後に血管構造を撮影した。MRI 計測に関しては、fMRI 計測から 1 週間後に MR angiography (MRA) を撮影した。2%イソフルラン麻酔下で尾静脈ラインを留置し、麻酔下の状態で T2W 撮像した。造影剤投与前の MRA 撮像後、血管造影剤(GadoSpin P)を尾静脈ラインより投与し、造影剤投与後の撮影を行った。解析には血管造影剤投与後画像と投与前画像の差分画像を MRA 画像として用いた。

### 4. 研究成果

#### (1) *ex vivo* MEMRI 法の開発

高解像度での三次元全脳観察のため、固定脳での MRI 計測を試みたところ、そのコントラストは *in vivo* での計測結果と類似し、固定後 7 日目にはマンガンによるコントラストの増強作用が減弱した。ガドリニウム溶液への浸漬により、コントラストの変化は認められたが、固定組織へのマンガンの保持作用への効果は認められなかった。

(2) *ex vivo* MEMRI 法を用いた三次元軸索トレース法の開発軸索トレース法における固定組織中のマンガン造影効果を検討したところ、固定組織においても観察された (図 1)。(1)(2)の結果から本手法は脳の形態学的あるいは機能的三次元イメージングの基盤技術となること、*ex vivo* MRI による信号雑音比を改善するためには、固定組織中のマンガンを保存する方法の開発が必要となることが示

唆された。

(3) 覚醒行動下での広視野二光子顕微鏡と fMRI のマルチモダル計測解析系の開発

両モダリティで同じ課題遂行時の行動計測および解析をするための課題設定および装置の開発を実施した。課題は体性感覚刺激課題と視覚刺激課題を検討し、高堂らにより報告されたクレードル<sup>1</sup>を導入することとした。

(4) 広視野二光子顕微鏡画像と fMRI 画像のレジストレーション手法の検討

広視野二光子顕微鏡は、多くの細胞の活動性を同時に計測・解析が可能であるが、計測している細胞の解剖学的な同定精度が高くない。MRI 研究で作成された脳地図を二光子顕微鏡画像に適用し、どの脳領域の神経細胞なのかを精度高く推定するため、レジストレーションの手法を検討した。血管構造を目印とし、Advanced Normalization Tools (ANTs, <http://stnava.github.io/ANTs/>)<sup>2</sup> を用いてレジストレーションする手法を検討した。本手法の検討により、これらの空間解像度や撮影範囲の大きく異なるモダリティの画像を重ね合わせ、比較することが可能となった。

今後は本研究で開発した手法や知見をさらに発展させ、脳活動全体の賦活領域をより詳細に把握できるように改良を進める。

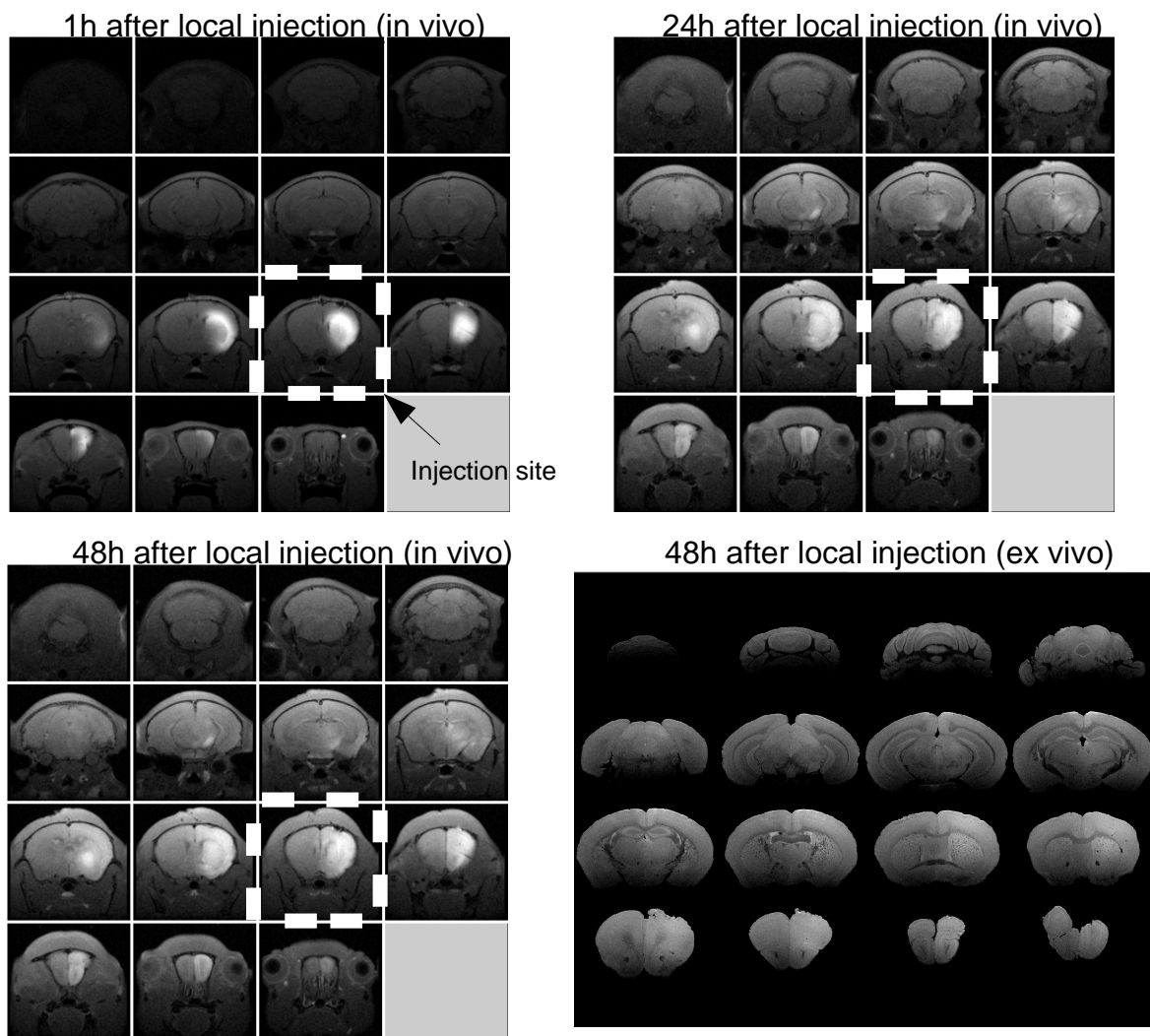


図 1. ex vivo MEMRI を用いた 3 次元軸索トレーサー

<引用文献>

1. Takado Y, Takuwa H, Sampei K, Urushihata T, Takahashi M, Shimojo M, Uchida S, Nitta N, Shibata S, Nagashima K, Ochi Y, Ono M, Maeda J, Tomita Y, Sahara N, Near J, Aoki I, Shibata K, Higuchi M. MRS-measured glutamate versus GABA reflects excitatory versus inhibitory neural activities in awake mice. *J Cereb Blood Flow Metab* (2022)42(1):197-212
2. Avants BB, Tustison NJ, Song G, Cook PA, Klein A, Gee JC. A reproducible evaluation of ANTs similarity metric performance in brain image registration. *Neuroimage*(2011)54:2033-2044

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Grandjean Joanes, Chika Sato, et al.	4. 巻 205
2. 論文標題 Common functional networks in the mouse brain revealed by multi-centre resting-state fMRI analysis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 NeuroImage	6. 最初と最後の頁 116278 ~ 116278
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuroimage.2019.116278	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Sato Chika, Sawada Kazuhiko, Wright David, Higashi Tatsuya, Aoki Ichio	4. 巻 12
2. 論文標題 Isotropic 25-Micron 3D Neuroimaging Using ex vivo Microstructural Manganese-Enhanced MRI (MEMRI)	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Frontiers in Neural Circuits	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fncir.2018.00110	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 間島慶、田桑弘之、佐藤千佳、八幡憲明
2. 発表標題 両眼視野闘争のメカニズム解明に向けた計測・解析技術基盤構築
3. 学会等名 量子生命科学大会第3回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Sato Chika, Mimura Koki, Minamimoto Takafumi, Yahata Noriaki
2. 発表標題 The reproducibility of resting-state functional network analysis in marmoset functional MRI
3. 学会等名 第48回日本磁気共鳴医学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Chika Sato, Kazuhiko Sawada, David K.Wright, Tatsuya Higashi, Ichio Aoki
2. 発表標題 Development of structural ex vivo “MRI staining” using manganese-enhanced MRI (MEMRI)
3. 学会等名 ISMIR JPC 4th annual meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroyuki Takawa, Chika Sato, Noriaki Yahata
2. 発表標題 Toward uncovering neural principles of the binocular rivalry: a two-photon mesoscope study
3. 学会等名 3rd QST International Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Chika Sato, Kazuhiko Sawada, David K. Wright, Tatsuya Higashi, Ichio Aoki
2. 発表標題 「ex vivo MEMRI法」の開発：全脳微小構造の高解像度イメージング
3. 学会等名 量子生命科学研究会・第2回学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Chika Sato, Kazuhiko Sawada, David K. Wright, Tatsuya Higashi, Ichio Aoki
2. 発表標題 マンガン造影MRI (MEMRI)によるマウス脳ex vivoマイクロイメージング法
3. 学会等名 第46回日本磁気共鳴医学会大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
シンガポール	Singapore Bioimaging Consortium			