

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H04536

研究課題名(和文) 高分子造影剤動態解析による脳循環機構の解明とその医療応用

研究課題名(英文) Elucidation of cerebral circulation by the use of polymeric MRI contrast agents

研究代表者

横山 昌幸 (Yokoyama, Masayuki)

東京慈恵会医科大学・医学部・教授

研究者番号：20220577

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：血液から脳脊髄液へ高分子が移行し得ることを、MRIを用いて、その移行部位も含めて解明した。その移行性、つまり血液脳脊髄液関門(BCSFB)の高分子透過性は、生体側が幼若であること、およびマンニトール投与に高まることが判明した。また、マンニトール投与による透過性亢進の程度は血液脳関門(BBB)よりも高いものであることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来測定の対象になっていなかった血液脳脊髄液関門の高分子透過性という、基礎的な生体挙動をMRIの手法でその透過部位も含めて明らかにすることに成功した学術的価値は高いと考えられる。また、その透過性は様々な要因によって亢進し得ることから、脳神経疾患の病理に新しい解明の糸口を与える可能性がある。

研究成果の概要(英文)：This study revealed by the used of MRI and MRI-contrast agents that macromolecules transferred from the blood into the cerebrospinal fluid, and that this transfer was site-specific among several cerebrospinal-fluid-containing sites in the brain. This transfer, in other words, enhancement of the blood-cerebrospinal fluid barrier's (BCSFB's) permeability was observed to be enhanced by young ages of mouse and by mannitol pre-injection. Mannitol is known to enhance blood brain barrier's (BBB's) permeability, but the enhancement degree was found to be much higher for BCSFB than for BBB.

研究分野：ドラッグデリバリーシステム

キーワード：Glymphatic system アルツハイマー病 高分子MRI造影剤 低分子MRI造影剤 Gd蓄積 MRI 脳循環

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

(1) Glymphatic system (GLS) と脳体液循環

脳体液循環は、血液と脳脊髄液の2つの循環から成るモデル(図1A)が従来の常識であった。脳脊髄液は大容量の腔だけを通るため、薬物の脳実質組織への到達経路は毛細血管を通る血液のみと考えられてきた。第3の脳循環として Glymphatic system (GLS) を含むモデル(図1B)が2012年に提唱された。GLSは脳脊髄液の一部が動脈周囲腔を經由し、脳実質組織の間質液となった後、静脈周囲腔を経て静脈に至る(図2)。GLSには、①～④の境界があり、移動物質を大きさでふるい分けしているが、その機能の詳細は不明である。GLSは脳実質と直に接する間質液を経るので、タンパク質、造影剤と薬物の脳神経細胞への運搬・排泄経路として重要である。また、GLSがアルツハイマー病原アミロイドペプチドを脳実質組織から排泄することが分かっている。よって、病原となる高分子の境界移動挙動(どの大きさの高分子が、どのような速度で)を知ることは、GLSの運搬・排泄機能の解明を通じ、脳生理・代謝機能と脳神経疾患病理を理解するために不可欠な情報である。また、この排泄機能不全を画像化できれば、脳神経疾患の新規診断法になる可能性がある。GLSは、脳組織切片とlive顕微鏡観察、MRI等で研究されているが、GLSの存在を立証する定性的な理解に留まっている現状である。図2に示すGLSの4つ境界の中で、脳実質組織への運搬に重要な境界を、どの大きさの高分子が、どの速度で移動するかの問いに定量的に答えるのが本研究である。この移動の定量的な解析は、GLS機能解明において学術的に重要な課題であると共に、アルツハイマー病等の脳神経疾患の新規画像診断法開発につながる臨床的波及力を有している。

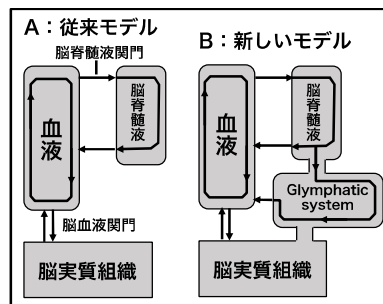


図1 脳循環モデルの変遷

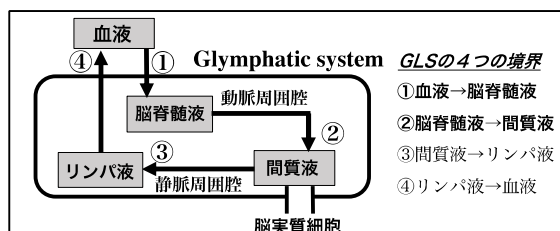


図2 Glymphatic systemとその4つの境界

(2) 低分子 Gd(ガドリニウム)キレート型 MRI 造影剤の脳蓄積

低分子 Gd キレートは、MRI 造影剤として1980年代から臨床で多用されたが、2014年に鎖状 Gd キレートが、脳の歯状核と淡蒼球に Gd が蓄積する問題が示され、その大部分が使用停止となった。最近、Gd 脳蓄積が GLS 経由で起こることが臨床で示された。(但し、血液脳関門経路は否定されていない)蓄積は、キレートから解離した Gd^{3+} によって起こる。鎖状より Gd^{3+} 解離性の低い環状造影剤でも、低濃度の Gd 蓄積がみられ、この問題は未解決である。低分子造影剤は、血液 脳脊髄液 GLS と移動する。一方、一般に高分子は血液 脳脊髄液を移動しない。以上より「高分子 Gd キレートは GLS 経由の Gd 脳蓄積のない安全な造影剤?」の問いに対し、本研究は、血液と GLS 経由の Gd 蓄積を定量的に測定して答える。

以上の2つの背景を合わせると、「高分子 MRI 造影剤の GLS 境界の移動(運搬・排出)を定量的(分子量と速度)に測定することが、GLS機構の解明と、安全な MRI 造影剤開発の両方に貢献することとなる。

2. 研究の目的

高分子 MRI 造影剤の Glymphatic system (GLS) の境界での移動の分子量依存性(特に低分子 MRI 造影剤との違い)を定量的に解析することで、GLS 循環機構を解明し、GLS 機能と脳神経疾患の病態との相関を求め、新規な脳神経疾患 MRI 診断法開発に向けた高分子造影剤の安全性を証明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 高分子 MRI 造影剤の作製

多様な分子量で Gd 結合力の強い、高分子 MRI 造影剤を作製する。

(2) GLS 循環の分子量依存性解析

図2に示した、造影剤の脳実質組織送達に重要な境界上流に、多様な分子量の高分子造影剤を投与して MRI 測定し、この2つの境界移動における分子量依存性と速度を解析することで、GLS 循環機構の解明を行う。

(3) GLS 循環機能と病態との関係解析

GLSの機能が、脳神経疾患によって受ける影響と、脳神経疾患の病因との関係について慢性脳神経疾患モデルであるアルツハイマー病(AD)モデルマウスを用いて解析する。

4. 研究成果

(1)高分子MRI造影剤の合成

本研究で使用するMRI造影剤は次の3系統である。1)低分子造影剤 臨床で用いられているGd-DOTAを購入して用いた。2)通常の高分子造影剤 ポリグルタミン酸ベースでキレート剤を介してGdイオンを結合したものである。ベースとなるポリグルタミン酸の平均分子量は1万、3万、10万の3種類を作成した。3)PEG-ポリアスパラギン酸ブロックコポリマーにキレート剤を介してGdイオンを結合したもので、直径約30nmの高分子ミセル構造を形成することで分子量数百万の分子量の高分子造影剤として働く。この分子量の大きく異なる3系統、5種類の造影剤で、血液 脳実質組織、血液 脳脊髄液移行の分子量依存性を調べた。

(2)アルツハイマー病(AD)モデルマウスの確立

APP^{NL-G-F}ノックインマウスを理化学研究所から提供をうけて、その継代・交配を東京慈恵会医科大学動物施設内で確立した。このADモデルマウスは、AD症状発現が早く、3ヶ月齢からアミロイドの脳蓄積が観察される。このマウスを用いて、アミロイドが発現する前の1ヶ月齢から、記憶障害の神経症状が起こる6ヶ月よりも後の9ヶ月齢までの、高分子物質に対する血液から脳実質および脳脊髄液への透過性変化を観察することが可能となった。

(3)大槽内造影剤投与による造影剤分布観察

脳脊髄液の最も容易な投与箇所とされる大槽は、マウスでは1.5mm程度の大きさであり、これにもれなく正確に投与することは技術的に難しい。文献にあった2つの方法を比較したところ、首後の皮膚と筋肉を切開し、硬膜を露出させて35Gの針で2-3μL程度投与する方法が、投与失敗と他の部位への漏れが少なく、投与された造影剤が明確にMR画像で観察できることが分かった。ただし、この方法でもMRIで確認した大槽内投与の成功確率は30%位であった。そこで、脳定位注入装置を購入して組み合わせたところほぼ100%の成功確率となった。この投与方法によって、大槽内に投与した後の脳脊髄液内での分布動態3時間までを調べたが、低分子MRI造影剤と高分子造影剤による差はなかった。よって、この測定条件内で脳脊髄液内での低分子と高分子の動態を比べることはできなかった。一方、この方法によって得たMRI脳脊髄液像で、下記研究成果(4)~(6)の脳脊髄液の貯留する(各脳室、水道、腔)を同定することができ、(4)~(6)での部位別MRI造影を解析することを可能とした。

(4)正常マウスでのMRI造影剤の血液から脳脊髄液への移行挙動解析

C57BL/6Jメスの6~8週齢のマウスを「通常齢・正常マウス」として血液内に投与したMRI造影剤の脳脊髄液移行挙動を解析した。

低分子造影剤Gd-DOTAでは、0.42mmol Gd/kgの投与量ではほとんど脳脊髄液の造影は得られないが、2.5mmol Gd/kgの大きな投与量にすると第四脳室、第三脳室、側脳室等で明確な造影が見られた。一方、分子量1万、3万、10万の高分子造影剤では0.10mmol Gd/kgの低い投与量で第四脳室と腔の一箇所(名称はない)で造影が見られる例があった。ただし、その確率は20-30%位であり、脳脊髄液が造影される個体とそうでない個体があった。一方、同じ実験を3週齢の「若い」マウスで行うと、造影される割合が高まり、分子量10万の場合には図3の第四脳室での造影(投与1分後の矢印三角形の造影)に示すように3/3の全匹造影が観察された。

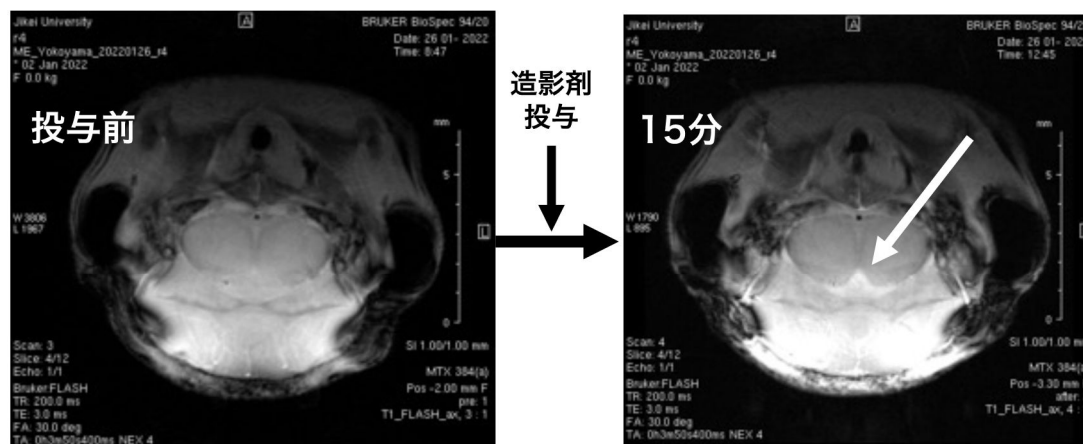


図3 「若い」正常マウスでの高分子MRI造影剤の第四脳室への集積

以上のことから、以下の事柄が導かれる。

- [1] 造影剤投与後 15 分後で造影効果は最大となり、その後 3 時間まで観察しても造影効果が不変(高分子造影剤の場合)か、造影効果は低下した(低分子造影剤の場合)。よって、以下の解析は投与前と投与後の MR 像を比較することで解析を実行した。
- [2] 分子量 10 万程度までを透過させる経路が第四脳室と腔の一箇所の血液脳脊髄液関門(BCSFB)にある。
- [3] BCSFB の透過経路は、固型がんでの EPR 効果のように顕著で全てのマウスに起こるのではなく、生体の状態変化によって開くようになる。
- [4] 幼若という因子は明確に BCSFB での造影剤透過を亢進させる。

(5) AD モデルマウスにおける高分子 MRI 造影剤の血液から脳組織への移行挙動解析

高分子ミセル造影剤が、AD モデルマウスの症状発現の前に、あるいは症状進行に従って、血液から脳実質、および血液から脳脊髄液移行挙動に変化があるかを調べた。つまり、AD マウスにおいて血液脳関門(BBB)及び血液脳脊髄液関門(BCSFB)の高分子透過性に変化があるかを、高分子ミセル造影剤を用いて調べた。結果は、1ヶ月齢、2ヶ月齢、3ヶ月齢、5ヶ月齢、7ヶ月齢、9ヶ月齢全てにおいて、上記(4)の正常マウスの通常齢(6-8週齢)の高分子ミセル造影剤と同様に、BBB 透過性は無く、BCSFB 透過性はほとんど増加を見せなかった。以上より、AD マウスの症状進行につれて、BBB あるいは BCSFB の透過性亢進を示して、それが AD 病状進行に影響するという仮説は否定された。ただし、下記(6)の実験結果が示すように、血液から脳脊髄液への透過性を亢進させる薬剤を用いて検討する今後価値はあると判断する。AD マウスが、これらの薬剤のトリガーを受けやすく、そのトリガーによって BBB あるいは BCSFB の透過性亢が大きく亢進して AD 病状進行を促進する可能性が残る。今後の検討課題である。

(6) 薬剤による MRI 造影剤の血液から脳脊髄液への移行挙動への影響

BCSFB の透過性を变化させる薬剤の候補としてマンニトールとニトログリセリンを用いた。マンニトールは BBB を一時的に破壊する薬物としてよく知られており、ニトログリセリンは固型がんの血管透過性亢進現象の EPR 効果を高める薬物として知られている。

マンニトールを前投与して造影剤を投与すると、くも膜下腔を除く全ての観察部位で脳脊髄液造影が顕著に高まった。ただし、この実験では脳実質への透過促進は観察されなかった。これはマンニトールの一時的透過促進効果は、BBB よりも BCSFB に対して、より大きいと言える。

一方、ニトログリセリン前投与では造影効果の増進は無かった。ただし、マンニトール+ニトログリセリンの両者前投与では、マンニトール単独の前投与よりも造影効果の増進は高いように見えた。この両者前投与の効果があるかは、今後の検討課題である。

以上の結果からは、低分子のみではなく高分子も BCSFB を透過し得ること、および幼若といった生体の要素によりその透過性は亢進することが分かった。また、BCSFB を透過挙動は BBB に似てマンニトールによって透過は顕著に促進したが、その薬剤(マンニトール)感受性は BBB よりも高いものであった。

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 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Masayuki Yokoyama, Kouichi Shiraishi	4. 巻 3
2. 論文標題 Stability evaluation of Gd chelates for macromolecular MRI contrast agents.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Magnetic Resonance Materials in Physics	6. 最初と最後の頁 527-536
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10334-019-00805-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Machi Suka, Takamasa Kido, Wataru Yoshioka, Eri Hachisuka, Hiroto Okoshi, Takashi Yamauchi, Hiroshi Hano, Takashi Okano, Masayuki Yokoyama, and Hiroyuki Yanagisawa	4. 巻 448
2. 論文標題 Single intratracheal administration of cross-linked water-soluble acrylic acid polymer causes acute alveolo-interstitial inflammation and the subsequent fibrotic formation possibly via the TGF- β 1 pathway in the lung of rats.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Toxicology,	6. 最初と最後の頁 152647
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.tox.2020.152647	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 横山昌幸、白石貢一
2. 発表標題 MRI造影剤のGd蓄積リスクの低減：高分子造影剤の戦略
3. 学会等名 第15回日本分子イメージング学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

医用エンジニアリング研究部
http://www.jikei.ac.jp/academic/course/24_gazou.html

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
研究分担者	白石 貢一 (Shiraishi Koichi) (40426284)	東京慈恵会医科大学・医学部・准教授 (32651)	
研究分担者	小松 鉄平 (Komatsu Teppei) (60723856)	東京慈恵会医科大学・医学部・助教 (32651)	

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
---------	---------