

令和 6 年 5 月 27 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07629

研究課題名（和文）拡散時間を用いた組織微細構造イメージング：筋萎縮性側索硬化症での検討

研究課題名（英文）Investigating the usefulness of time-dependent diffusion MRI in amyotrophic lateral sclerosis

研究代表者

神谷 昂平 (Kouhei, Kamiya)

東邦大学・医学部・講師

研究者番号：30749825

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,600,000円

研究成果の概要（和文）：筋萎縮性側索硬化症（ALS）症例において拡散時間(t)を変化させた拡散MRIデータを取得し、t依存性の健常群との差異を検討した。残念ながら当初仮説を立てたような数値的变化は捉えられなかった(t依存性の強さを示す係数には有意差が見られなかった)。一方で、long-tでの拡散係数には有意差があり、顕微鏡的に知られているALSでの軸索形状変化に合致する結果を得た。ただし同時に、この変化を捉えるには実用的には単一のtでの観察で十分である可能性も示唆された。tを固定した拡散尖度イメージング(DKI)においてはALS患者脳での皮質/皮質下白質の変化を捉えることが出来、かつ球症状との相関を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

筋萎縮性側索硬化症（ALS）は致死的かつ進行の早い疾患であり、初期の組織傷害を非侵襲的に捉えることのある。ALSでは軸索輸送障害や軸索中のミトコンドリアの形状と分布の変化が指摘されており、治療薬開発のターゲットの1つと考えられている。本課題では複数の拡散時間(t)で撮影した拡散MRIの解析によって軸索形状変化のマーカーを得られないか探索した。結果、tの長い極限での拡散係数に健常群との間に有意差があり上記軸索形状変化と合致する傾向を示した。複数tでの撮影は検査時間延長の観点で実用問題があるが、本結果からはALSの実用的なマーカーは単一の長いtでの撮影から得られる可能性が高いと推察される。

研究成果の概要（英文）：We investigated whether the dependence of axial and radial diffusivities on diffusion time yields clinically relevant biomarker of axonal morphology in the brains of patients with amyotrophic lateral sclerosis (ALS). The results showed that axial diffusivity in the long-t limit within the corticospinal tracts was greater in the patients, which may reflect the previously reported fragmentation of mitochondrion within the axons. However, practically, this increase of axial diffusivity could be captured with a single-t experiment and we could not establish an additional benefit of the multi-t acquisition, likely because the shortest diffusion time available was already close to the long-t limit. We also performed fixed-t DKI measurement, which demonstrated microstructural alterations in the brains of ALS patients. The ALS-related changes of DKI had spatial distribution in agreement with the knowledge from histology and showed correlation with bulbar dysfunction.

研究分野：拡散MRI

キーワード：拡散MRI 組織微細構造イメージング 筋萎縮性側索硬化症 拡散テンソルイメージング 拡散尖度イメージング 生体物理モデル 拡散時間 拡散係数

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

拡散 MRI は画像自体のボクセルサイズよりも遥かに小さいスケールの生体組織の特徴を反映するため、臨床的に有用なバイオマーカーをもたらすことが期待されている。拡散 MRI の臨床研究においては、MRI 信号の  $b$  値依存性を解析するアプローチが長く一般的であったが、近年では  $b$  値以外の撮像パラメータ (拡散時間  $[t]$ 、エコー時間  $[TE]$ 、 $b$ -tensor 等) をも変化させた多次元のデータを取得するアプローチが注目されている。特に、拡散時間依存性は、軸索や樹状突起の顕微鏡スケールの形態的特徴 (特に軸索径の長軸方向の変動  $[beading]$  や軸索内のミトコンドリアの存在) との関連が指摘されており  $[1-3]$ 、神経変性疾患における軸索傷害のマーカーとなる可能性がある。

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は致死かつ進行の早い疾患であり、不可逆な神経細胞死に至る前段階の組織傷害を非侵襲的に捉えることがとりわけ重要である。ALS の病態生理においては軸索輸送の障害や軸索中のミトコンドリアの形状と分布の異常が初期の変化として知られ  $[4,5]$ 、治療薬開発研究の重要なターゲットと考えられている。

### 2. 研究の目的

ALS 症例の中脳神経組織において拡散時間を用いた組織微細構造イメージングの有用性を検討することを目的とした。特に長軸方向の拡散係数  $D_{||}$  の  $t$ -依存性は軸索形状と関係しているとされており  $[1-3]$ 、ALS で指摘されている軸索形状の変化を捉えられることを期待した (図 1)。短軸方向の拡散係数  $D_{\perp}$  についても神経軸索の外径やパッキング密度と関連するとされており  $[1,2]$ 、ALS では軸索径の大きい運動線維が優先的に失われてゆくとため、 $D_{\perp}$  の  $t$ -依存性についても健常群と比較した。また、現在臨床研究で広く使用されている ( $t$  を固定した) 拡散尖度イメージング (DKI) や脳容積解析のためのデータも合わせて取得した。拡散尖度 (kurtosis) の意味合いはしばしば自由拡散からの逸脱具合、組織の複雑さ、等と説明され、 $t$ -依存性とは別な角度から神経組織の微細構造を見るものである (完全な自由拡散の場合には  $t$ -依存性はなく kurtosis もゼロである)。なお、この研究領域の先端では kurtosis の  $t$ -依存性も報告されているが、MRI 装置性能による制限と撮影時間延長による被検者負担の両面から、kurtosis の  $t$ -依存性の研究は自施設では行えない。そのため本課題では (1)  $D_{||}$  と  $D_{\perp}$  の拡散時間依存性、(2)  $t$  を固定した DKI の 2 つに分けて撮影と解析を行った。

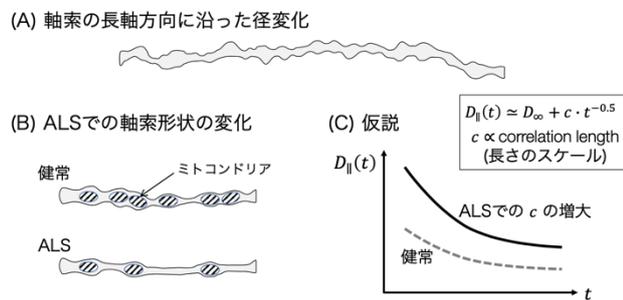


図 1  $D_{||}$  に関する研究者の仮説

### 3. 研究の方法

神経内科外来で ALS と診断された症例と健常対照群を募り、3T 装置を用いて研究用の脳拡散 MRI を撮影した。最終的に ALS と確定診断された 28 例と 17 例の健常者を解析対象とした。当初、ALS 症例については定期的に撮影を行い縦断的データを取得する計画であったが、進行の早い症例について MRI 撮影に耐えられない程にまで進行してしまったこと、研究期間中に COVID-19 の流行があり診療以外での来院を忌避されたことが重なり、2 回以上の MRI を取得できたのは 3 例にとどまった。

#### (1) 拡散時間依存性

拡散時間依存性の解析のための撮影には stimulated-echo acquisition mode (STEAM) シーケンスを使用し、拡散時間 35ms-300ms の範囲で拡散テンソルイメージング (DTI) 用のデータを取得した。ノイズ除去  $[6]$ 、Gibbs アーチファクト補正  $[7]$ 、歪み補正  $[8]$  を含む前処理の後、DTI の計算を行い、各拡散時間  $t$  における  $D_{||}$  と  $D_{\perp}$  のマップを得た。JHU 白質アトラスの皮質脊髄路を関心領域として領域内の  $D_{||}$  と  $D_{\perp}$  の平均値を取得し、下記の  $t$ -依存性の式  $[1,2]$  にフィッティングした。

$$D_{||}(t) \approx D_{||,\infty} + c_{||} \cdot t^{-0.5}$$

$$D_{\perp}(t) \approx D_{\perp,\infty} + c_{\perp} \cdot \ln(t/\tilde{t}_c)/t$$

式中のパラメータ  $D_{\infty}$  と  $c$  に関して、ALS 群 vs 健常群の比較を行った。

#### (2) 拡散尖度イメージング (DKI)

国際脳プロジェクトの標準化された MRI プロトコル  $[9]$  による撮影を行った。ALS での DKI の

研究は既に複数の先行報告があるが、本プロトコルはいずれの先行報告よりも高分解能での撮影を可能にしている (1.7mm isotropic voxel)。この優位性を活かすため、皮質の DKI 解析に特に注目をした。ノイズ除去[6]、Gibbs アーチファクト補正[7]、歪み補正[8]を含む前処理の後、DKI の各定量値マップを得た。構造的 T1 強調像、T2 強調像は Human Connectome Project (HCP) のパイプライン[10]で処理し、大脳皮質の DKI 定量値を HCP の LR32k surface 上にマッピング、全脳画像統計解析と関心領域ベースの解析によって ALS 群 vs 健常群を比較した。

### (3) 前処理が拡散 MRI 定量値に与える影響

上記(1),(2)の解析過程の副産物として、画像前処理の違いによって DTI,DKI の定量値が大きく影響されることが分かった。(1),(2)においては被検者間で統一された前処理を行っているため結論への影響はないが、多施設共同研究やメタ解析ではバイアスをもたらす可能性が高い。前処理が与える影響を評価するため、広く用いられている各前処理のそれぞれに関して有り/無しで計 24 通りの異なる前処理パイプラインでデータを処理し、DTI,DKI の定量値を比較した。

### (4) 軸索内/外のコンパートメントの分離

下記に示すように、本課題の範囲では (1)の拡散時間依存性において、仮説を立てていたような ALS での変化は観察することが叶わなかった。原因の一つとして、今回の方法では軸索内と軸索外の拡散を分離しておらず、複数コンパートメントの  $t$ -依存性が混在した状態を見ている可能性がある。また(2)の DKI や他研究で見られるように、 $t$ を固定したデータからも ALS 病理の顕微鏡的特徴には迫ることが可能で、パラメータ推定の安定性、疾患による変化の大きさ、あるいはその両方の理由から現状では(1)のアプローチよりも有利な可能性がある。以上の経験と結果を踏まえて、まずは単一の拡散時間  $t$ で軸索内/外の  $D_{\parallel}$ や  $D_{\perp}$ を分離するために、生体物理モデル[11]を導入した。これには b-tensor を変化させた撮影が有用である。自施設においては double diffusion encoding (DDE)を使用した新たな撮影プロトコルを策定し、ファントム実験とテスト撮影を経て、2023 年度から新プロトコルでの症例の集積を開始した。

## 4. 研究成果

### (1) 拡散時間依存性

今回の解析範囲では、仮説を立てていたような変化は確認できなかった。つまり、 $D_{\parallel}$ と  $D_{\perp}$ ともに、 $D_{\infty}$ は ALS 群 vs 健常群で有意差を認められたが、係数  $c$ には有意差は見られなかった(図 2)。 $D_{\infty}$ に差を認めることは従来の  $t$ を固定した DTI での多数の報告から予想されており、本課題では特に  $c$ の変化を捉えることを期待していた(図 1C)が叶わなかった。原因として、ALS による  $c$ への効果量が小さい、今回の手法では軸索内と軸索外を分離できていないためそれら複数コンパートメントの  $t$ -依存性が混在している、などの可能性が考えられる。また、 $D_{\parallel}$ と beading の間の関係について最新の報告[12]では、 $D_{\infty}$ は beading の強さと、 $c$ は beading の強さと間隔の双方と連動するとされており、我々が当初注目していた beading/ミトコンドリアの間隔を  $c$ から単離するのは現状ではまだ困難な可能性がある。一方で、観察された ALS での  $D_{\infty}$ の増加は、顕微鏡で指摘されている軸索内のミトコンドリアの細分化や減少[4,5]といった知見と合致する。ただし、今回調べた拡散時間の範囲では ALS と健常群の  $D_{\parallel}$ の差はほぼ一定であった(図 2)ことから、実用的なバイオマーカーの候補としては単一の拡散時間  $t$ での拡散係数  $D$ に追加する価値を見出すことは難しかった。

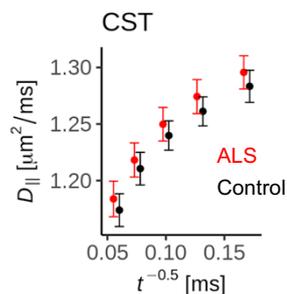


図 2 皮質脊髄路の  $D_{\parallel}(t)$

### (2) 拡散尖度イメージング(DKI)

単一の拡散時間  $t$ での DKI の解析においては、ALS 群で運動野を中心に皮質および皮質下白質の kurtosis の低下を認め、特に球症状発症の ALS(bulbar-ALS)において肢症状発症の ALS(limb-ALS)よりも強い変化を認めた(図 3)。更に、臨床的重症度スコア(ALSFRS-R)のうち、特に球症状のサブスコアと運動野の kurtosis の間に相関を認めた(図 4)。一般に球症状発症はより進行が早く予後不良で、剖検例でもより強い病理学的変化を運動野の皮質及び皮質下に認めるとされる[13]。今回の結果は ALS 脳の病理学的変化に対する拡散 MRI の良好な感度を示し、更に臨床病型あるいは進行速度との相関を示唆している。以上の内容について学会発表(第 53 回日本神経放射線学会)と論文の形式で公表した [14]。

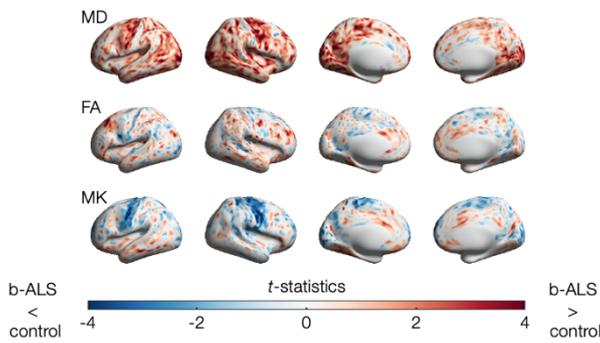


図3 皮質のDKI: bulbar-ALS vs 健常群

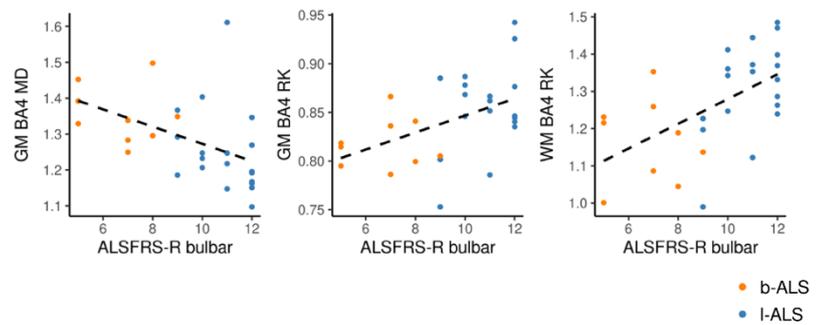


図4 DKI と重症度の相関: ALSFRS-R bulbar スコア

(3) 前処理が拡散MRI 定量値に与える影響

画像前処理の違いによる DTI,DKI 定量値の変化は大きく、特にノイズ除去[6]、Rician bias 補正 [15]、Gibbs アーチファクト補正[7]が数値に与える影響はしばしば ALS 群 vs 健常群の差よりも大きいものであった (図4)。ALS 群 vs 健常群の差自体はいずれの前処理パイプラインにおいても一貫して観察された。本研究のように症例間で同一の処理を行う際には影響はないが、既に画像処理済の公開データを使用する研究やメタ解析においては拡散MRI 前処理の違いに留意し何らかの方法で補正することが必要と考えられる。以上の結果について、国際磁気共鳴医学会 (ISMRM 2023 トロント) で報告した。

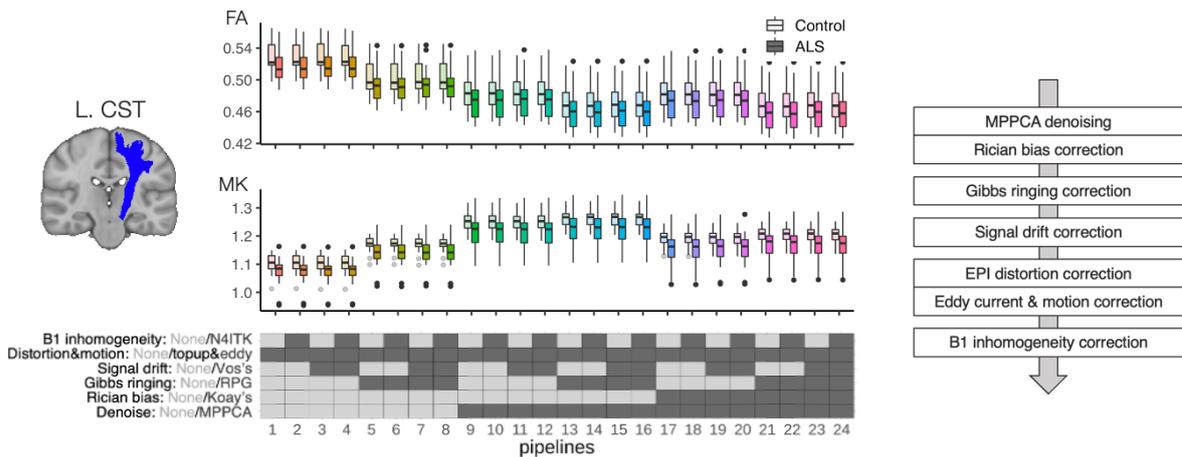


図5 前処理パイプラインの影響

(4) 軸索内/外のコンパートメントの分離

DDE を用いた新プロトコルによる各コンパートメントの拡散係数  $D$  のマップの例を図6に示す。パラメータ推定は安定しており、既報告と比較して遜色のない数値を示している。本課題期間中には十分な数の疾患/健常群のデータ取得まで至らなかったが、症例を追加し、またALS 以外の神経変性疾患との比較も含めて次期の課題としたい。

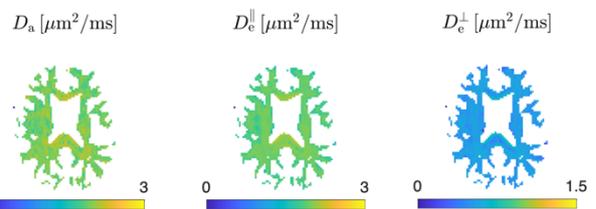


図6 軸索内/外の拡散係数  $D$

<引用文献>

1. Novikov DS, Jensen JH, Helpert JA, Fieremans E. Revealing mesoscopic structural universality with diffusion. Proc Natl Acad Sci U S A. 2014;111(14):5088-5093.
2. Burcaw LM, Fieremans E, Novikov DS. Mesoscopic structure of neuronal tracts from time-dependent diffusion. Neuroimage. 2015;114:18-37. doi:10.1016/j.neuroimage.2015.03.061.
3. Lee HH, Yaros K, Veraart J, et al. Along-axon diameter variation and axonal orientation dispersion revealed with 3D electron microscopy: implications for quantifying brain white matter

- microstructure with histology and diffusion MRI. *Brain Struct Funct.* 2019;224(4):1469-1488.
4. De Vos KJ, Hafezparast M. Neurobiology of axonal transport defects in motor neuron diseases: Opportunities for translational research?. *Neurobiol Dis.* 2017;105:283-299.
  5. Magrané J, Manfredi G. Mitochondrial function, morphology, and axonal transport in amyotrophic lateral sclerosis. *Antioxid Redox Signal.* 2009;11(7):1615-1626.
  6. Veraart J, Novikov DS, Christiaens D, Ades-Aron B, Sijbers J, Fieremans E. Denoising of diffusion MRI using random matrix theory. *Neuroimage.* 2016;142:394-406.
  7. Lee HH, Novikov DS, Fieremans E. Removal of partial Fourier-induced Gibbs (RPG) ringing artifacts in MRI. *Magn Reson Med.* 2021;86(5):2733-2750.
  8. Andersson JLR, Sotiropoulos SN. An integrated approach to correction for off-resonance effects and subject movement in diffusion MR imaging. *Neuroimage.* 2016;125:1063-1078.
  9. Koike S, Tanaka SC, Okada T, et al. Brain/MINDS beyond human brain MRI project: A protocol for multi-level harmonization across brain disorders throughout the lifespan. *Neuroimage Clin.* 2021;30:102600.
  10. Glasser MF, Sotiropoulos SN, Wilson JA, et al. The minimal preprocessing pipelines for the Human Connectome Project. *Neuroimage.* 2013;80:105-124.
  11. Coelho S, Baete SH, Lemberskiy G, et al. Reproducibility of the Standard Model of diffusion in white matter on clinical MRI systems. *Neuroimage.* 2022;257:119290.
  12. Abdollahzadeh A, Coronado-Leija R, Lee HH, et al. Quantifying changes of axonal shape in traumatic brain injury with time-dependent diffusion. *Proc. ISMRM 2024* p0304.
  13. Shellikeri S, Keith J, Black SE, Zinman L, Yunusova Y. Neuropathology of Speech Network Distinguishes Bulbar From Nonbulbar Amyotrophic Lateral Sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2020;79(3):284-295.
  14. Kamiya K, Hanashiro S, Kano O, et al. Surface-based Analyses of Diffusional Kurtosis Imaging in Amyotrophic Lateral Sclerosis: Relationship with Onset Subtypes. *Magn Reson Med Sci.* in print, 2024. doi:10.2463/mrms.mp.2023-0138
  15. Koay CG, Basser PJ. Analytically exact correction scheme for signal extraction from noisy magnitude MR signals. *J Magn Reson.* 2006;179(2):317-322.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kamiya Kouhei, Hanashiro Sayori, Kano Osamu, Uchida Wataru, Kamagata Koji, Aoki Shigeki, Hori Masaaki	4. 巻 .
2. 論文標題 Surface-based Analyses of Diffusional Kurtosis Imaging in Amyotrophic Lateral Sclerosis: Relationship with Onset Subtypes	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Magnetic Resonance in Medical Sciences	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） 10.2463/mrms.mp.2023-0138	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Kouhei Kamiya, Sayori Hanashiro, Osamu Kano, Koji Kamagata, Masaaki Hori, Shigeki Aoki
2. 発表標題 The effects of brain diffusion MRI preprocessing pipelines in a clinical study of neurodegenerative disease.
3. 学会等名 Annual meeting of International Society of Magnetic Resonance for Medicine 2023（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 神谷昂平、花城里依、狩野修、内田航、鎌形康司、青木茂樹、堀正明.
2. 発表標題 筋萎縮性側索硬化症におけるsurface-based DKI analysis
3. 学会等名 第53回日本神経放射線学会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Kouhei Kamiya, Issei Fukunaga, Syo Murata, Tomoko Maekawa, Shimpei Kato, Katsutoshi Murata, Thorsten Feiweier, Koji Kamagata, Masaaki Hori, Shigeki Aoki
2. 発表標題 MPPCA denoising before GRAPPA reconstruction improves the precision of microscopic anisotropy in the gray matter
3. 学会等名 Joint Annual Meeting ISMRM-ESMRMB & ISMRT 31st Annual Meeting 07-12 May 2022   London, England, UK（国際学会）
4. 発表年 2022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
研究 分担 者	花城 里依  (Hanashiro Sayori)  (10866693)	東邦大学・医学部・助教   (32661)	

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