

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：63905

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591261

研究課題名(和文) 多発性硬化症皮質病巣のMRI高感度検出法の開発と実験的モデル動物による病態解析

研究課題名(英文) MRI analysis of experimental multiple sclerosis animal models.

研究代表者

福永 雅喜 (FUKUNAGA, MASAKI)

生理学研究所・大脳皮質機能研究系・准教授

研究者番号：40330047

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：慢性期多発性硬化症に伴う高次脳機能障害の直接的な要因と考えられている皮質病巣の新規MRI高感度検出法の開発と動物モデルを用いた病態解析を目的とし、ミエリン密度を高度に反映する画像法の開発と炎症性細胞浸潤の動態解析を検討した。 Cuprizone誘発慢性期脱髄モデルにおける磁化率強調画像では、ミエリン密度を高度に反映していたが、皮質における信号変化は *in vivo* 条件では検出が困難であった。一方、マンガン造影MRIでは、ミクログリア集積およびミクログリアマーカーの発現の経時変化により類似したMRIコントラストの変化を示し、グリア細胞の活性や病態に特異的なコントラストを示す可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Multiple sclerosis (MS) is one of the most common autoimmune diseases of the central nervous system (CNS). Cuprizone is a mitochondrial toxin that induces demyelination in the CNS, and is used for animal model in MS. In this study, we investigated Manganese enhanced MRI (MEMRI) in cuprizone induced demyelinated mouse brain using 11.7T MRI, and analyzed with histology and glial marker expressions. Conventional T2 weighted images show hyperintense in corpus callosum, and its size was increased up to 5th week. In MEMRI, positive signal enhancement in corpus callosum was observed at 3rd week, but the signal strength had a tendency to peaking at 4th weeks and reducing to 5th weeks. In RT-PCR, GFAP expression was monotonically increased to 5th week, however Iba-1 expression showed peak at 3rd week and diminished at 5th week, that was similar as MEMRI enhancement. In conclusion, MEMRI may reflect phenomenon accompanying microglia activation on the cuprizone induced demyelination.

研究分野：磁気共鳴医学

キーワード：多発性硬化症 MRI 脱髄 マンガン造影

1. 研究開始当初の背景

多発性硬化症 (multiple sclerosis: MS) は、若年成人に発症する神経疾患では最も頻度の高い中枢性脱髄疾患で、脳や脊髄、視神経などの炎症により重篤な神経症状をきたす神経難病である。遺伝要因や環境要因の関与に加え、T細胞活性の異常が本態と考えられているもののその発症メカニズムには不明な点も多い。本邦でも近年は増加傾向にあり、その原因究明および早期診断・治療法の開発は急務とされる。

MSの診断には磁気共鳴画像法 (magnetic resonance imaging: MRI) による、病巣の時間的および空間的多発性の証明が必須である。近年のMRI技術の発展は目覚ましく、特に高磁場MRI装置の実用化による感度・空間分解能上昇の恩恵により、それまでは困難であった微小病巣の検出が可能となってきた。従来より神経病理学で注目されている皮質病巣への応用も期待されるが、その高感度検出法は確立していない。この皮質病変は、発症初期より進行し、高次脳機能障害の直接的な要因と考えられているにも拘わらず、その形成過程・病態に関する検討は多くない [Lancet Neurol, 2008]。また病理においては、全MS患者の70%に皮質病巣が見られるとされるが、現在のMRIでは、その多くが検出出来ておらず、高感度検出法の開発とこれを用いた病態解析が切望される。

2. 研究の目的

申請者らは、MRI複素信号から再構成した周波数情報を応用することで従来比約10倍の組織コントラスト比を有するMRI測定法を開発した [PNAS, 2007]。本法では、一般的なMRI画像では検出出来なかった白質内・皮質灰白質内に内在するコントラスト変化を高感度で描出することに成功し、その皮質内コントラストはミエリン密度と高い相関を示すことを報告した [PNAS, 2010]。また本法では、従来画一的なコントラストとして描出されていた白質内MS病巣においてもバリエーションが存在することを見出した。我々は、本法の改良により、MS皮質病巣の早期高感度検出が可能となり、本態、形成過程が依然不明である本病態の解析に応用しようと考え、新規計測法の開発とともに多発性硬化症モデル動物を用いた病態解析を行う本研究課題を着想した。

本研究の目的は、慢性期多発性硬化症に伴う高次脳機能障害の直接的な要因と考えられている皮質病巣の新規MRI高感度検出法の開発と実験的多発性硬化症モデルを用いた病態解析を目的とする。ミエリン密度を高度に反映する画像法の開発と炎症性細胞の動態解析を可能とするMRI法を導入し、多発性硬化症病巣の形成過程、進展について、多角的かつ継続的に追跡し病態に迫ることを目指す。

3. 研究の方法

(1)高感度ミエリン密度計測法の開発と実験的多発性硬化症モデルの計測

クプリゾン (シクロヘキシリデンヒドラジド) の経口投与は、大脳白質の脱髄を誘発し、投与の中止によりミエリンの再形成が生じることから、多発性硬化症に見られる脱髄モデルとして採用した。7週齢のC57BL/6マウスに0.2%クプリゾンの配合飼料を5週間連続投与し、脱髄病巣を作成した。MRIは、MRIは、11.7T MRI装置 (AvanceII 500WB, Bruker) および内径15mmのリニアボリウムコイル (m2m) を使用し、T2*強調 gradient echo (TR/TE/Flip angle = 650/7.5/60, matrix : 240x240, 50 slice, 15min) および T2 強調 RARE (TR/TE=5000/31.5, matrix:240x240, 50 slice, 24min) を、クプリゾン投与前、投与1週、2週、3週、4週、5週に撮像し検討を行った。

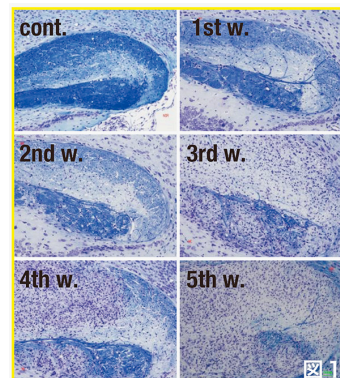
(2)高感度炎症動態画像法の開発と実験的多発性硬化症モデルの計測

実験的多発性硬化症モデルは、実験(1)と同様にクプリゾン誘発脱髄モデルを採用し、脱髄に伴う炎症細胞動態の観測を試みた。また本研究では、炎症細胞動態および脱髄病態の画像コントラスト強調を目的に、近年、中枢神経系炎症に伴うグリア細胞の活動を表すとする報告のあるマンガン造影MRI (MEMRI) を併用した。MnCl₂投与群は、クプリゾン投与開始7日前より0.1M MnCl₂を飲水に添加し自由に摂取させた。MRIは、11.7T MRI装置 (AvanceII 500WB, Bruker) および内径15mmのリニアボリウムコイル (m2m) を使用し、T2強調 RARE (TR/TE = 5000/31.5, matrix : 240x240, 50 slice, 24min) および T1 強調 RARE (TR/TE = 600/8.8, matrix : 240x240, 16 slice, 15min) を、クプリゾン投与前、投与1週、2週、3週、4週、5週に撮像した。MRI撮像後、各種染色、組織像およびグリア系細胞に関連する遺伝子発現解析を実施し観察した。

4. 研究成果

(1)高感度ミエリン密度計測法の開発と実験的多発性硬化症モデルの計測

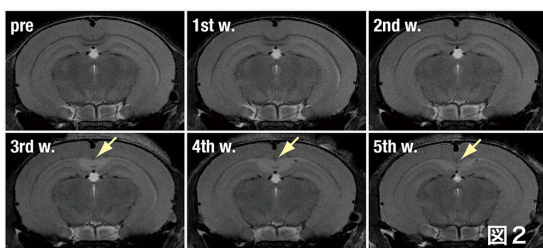
クプリゾン投与開始後3週より、髄鞘染色にて強い脱髄像が観察され (図1)、外包部では、白質体積の狭小化がみられた。T2*強調像およびT2強調像において



高信号領域が脳梁部に観察され、これら高信号は、5 週まで信号強度・サイズとも増強した。皮質のミエリン密度に相関が高いとされる周波数画像では、クプリゾン投与 5 週のフォルマリン固定脳にて脳梁部およびその直上の皮質にて数ヘルツの周波数シフトがみられた。一方、生体マウスの計測では、脳梁部における周波数シフトがみられたが、皮質におけるシフトはみられなかった。

(2)高感度炎症動態画像法の開発と実験的多発性硬化症モデルの計測

クプリゾン投与開始後 3 週より、T2 強調像高信号領域が脳梁部に観察され、5 週まで信号強度・サイズとも増強した。外包部では、白質体積の狭小化がみられた (図 2)。



MnCl2 投与群では、上記 T2 強調像における変化に加え、脳梁部・外包の一部に、T1 強調像にて高信号を呈する領域が投与開始後 3 週より観察されたが、その信号強度は 4 週をピークとし、5 週には低下する傾向が見られた (図 3、4)。

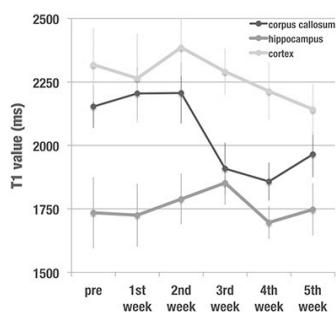
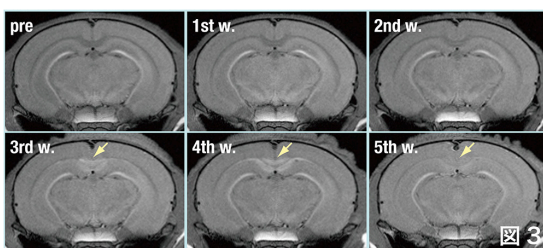


図 4

組織染色像では、クプリゾン投与 3 週より脱髄、アストロサイトの活性化が継続していた。一方、活性化ミクログリアの集積は投与開始 4 週ごろにピークを迎え、MEMRI 像の経時変化と類似していた。これら、アストロサイト、ミクログリアの集積は、RT-PCR による遺伝子発現解析と一致していた (図 5)。

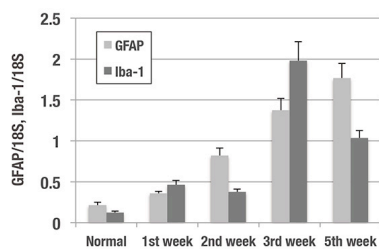


図 5

脱髄モデルに於いて、MEMRI が活性化ミクログリアの集積に伴う現象を反映しうることが示唆された。

本研究では、慢性期多発性硬化症に伴う高次脳機能障害の直接的な要因と考えられている皮質病巣の新規 MRI 高感度検出法の開発と動物モデルを用いた病態解析を目的とし、ミエリン密度を高度に反映する画像法の開発と炎症性細胞浸潤の動態解析を可能とする MRI 法の導入を進めた。磁化率効果に感度の高い gradient echo 法による強度および周波数画像は、ミエリン密度を反映していたが、in vivo 条件における皮質病変の検出は困難であった。慢性期脱髄モデルでは、一般的な T2 強調画像で得られるコントラストは髄鞘密度に一致していた。一方、マンガン造影 MRI では、アストログリアに比較しミクログリアの集積および遺伝子マーカーの発現の経時変化により類似した MRI コントラストの変化を示した。これらの結果より、マンガン造影 MRI の応用により、グリア細胞の活性や病態に特異的なコントラストを示す可能性が示唆されたが、皮質病巣の描出には、さらなる感度改善が必要と考えられた。

<引用文献>

- (1) Geurts JJ1, Barkhof F. Grey matter pathology in multiple sclerosis. *Lancet Neurol.* 2008 7:841-51.
- (2) Duyn JH, van Gelderen P, Li TQ, de Zwart JA, Koretsky AP, Fukunaga M. High-field MRI of brain cortical substructure based on signal phase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 104:11796-801.
- (3) Fukunaga M, Li TQ, van Gelderen P, de Zwart JA, Shmueli K, Yao B, Lee J, Maric D, Aronova MA, Zhang G, Leapman RD, Schenck JF, Merkle H, Duyn JH. Layer-specific variation of iron content in cerebral cortex as a source of MRI contrast. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 107:3834-9.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

- ① Mori Y, Chen T, Fujisawa T, Kobashi S, Ohno K, Yoshida S, Tago Y, Komai Y, Hata

- Y, Yoshioka Y. From cartoon to real time MRI: in vivo monitoring of phagocyte migration in mouse brain. *Sci Rep*, 査読有り、2014 4:6997. doi: 10.1038/srep06997.
- ② Mori Y, Murakami M, Arima Y, Zhu D, Terayama Y, Komai Y, Nakatsuji Y, Kamimura D, Yoshioka Y: Early pathological alterations of lower lumbar cords detected by ultra-high field MRI in a mouse multiple sclerosis model. *International Immunology*, 査読有り、2014 26:93-101. doi: 10.1093/intimm/dxt044.
- ③ Picchioni D, Pixa ML, Fukunaga M, Carr WS, Horovitz SG, Braun AR, Duyn JH. Decreased connectivity between the thalamus and the neocortex during human nonrapid eye movement sleep. *Sleep*, 査読有り、2014 37:387-97. doi: 10.5665/sleep.3422.
- ④ Ohi K, Hashimoto R, Ikeda M, Yamashita F, Fukunaga M, Nemoto K, Ohnishi T, Yamamori H, Yasuda Y, Fujimoto M, Umeda-Yano S, Watanabe Y, Iwata N, Weinberger DR, Takeda M. Genetic risk variants of schizophrenia associated with left superior temporal gyrus volume. *Cortex*, 査読有り、2014 58:23-6. doi: 10.1016/j.cortex.2014.05.011.
- ⑤ Watanabe Y, Tanaka H, Tsukabe A, Kunitomi Y, Nishizawa M, Hashimoto R, Yamamori H, Fujimoto M, Fukunaga M, Tomiyama N. Neuromelanin magnetic resonance imaging reveals increased dopaminergic neuron activity in the substantia nigra of patients with schizophrenia. *PLoS One*, 査読有り、2014 9:e104619. doi: 10.1371/journal.pone.0104619.
- ⑥ 森勇樹、陳挺、程振宇、大野工司、吉田慎一、多胡善幸、福永雅喜、吉岡芳親 磁性粒子を用いた末梢組織マクロファージの脳内浸潤の経時的観察 *日本磁気共鳴医学会雑誌*、査読有り、2014 34:14-7
- ⑦ 福永雅喜 fMRI/VBM INNERVISION、査読なし、2014 29:15-8
- [学会発表] (計 7 件)
- ① Fukunaga M, Masumura M, Kohda S, Nakamura R, Mori Y, Yoshioka Y. Histological Correlation of Manganese Enhanced MRI in the Demyelinating Disease Model Brain. Joint Annual Meeting International Society for Magnetic Resonance in Medicine - European Society for Magnetic Resonance in Medicine and Biology 2014, May 10-16, 2014, Milan, Italy
- ② Yoshioka Y, Chen T, Mori Y, Cheng Z, Kashiwagi Y, Fukunaga M, Kida I, Tago Y, Yoshida S, Ohno K. New Magnetic Nanoparticle for Kidney Function. Joint Annual Meeting International Society for Magnetic Resonance in Medicine - European Society for Magnetic Resonance in Medicine and Biology 2014, May 10-16, 2014, Milan, Italy
- ③ Mori Y, Chen T, Ohno K, Yoshida S, Tago Y, Fujisawa T, Kashiwagi Y, Fukunaga M, Komai Y, Hata Y, Yoshioka Y. Sequential and Time-Lapse MRI Monitoring of Peripheral Macrophage Recruitment and Migration in Mouse Brain. Joint Annual Meeting International Society for Magnetic Resonance in Medicine - European Society for Magnetic Resonance in Medicine and Biology 2014, May 10-16, 2014, Milan, Italy
- ④ 福永雅喜、升村誠、幸田修一、下永友和、森勇樹、吉岡芳親 マンガン造影 MRI によるクプリゾン誘発脱髄モデルの観察 第 41 回日本磁気共鳴医学会大会、2013 年 9 月 19-21 日、アスティ徳島、徳島、徳島市
- ⑤ 陳挺、程振宇、森勇樹、福永雅喜、黄田育宏、駒井豊、多胡善幸、吉田慎一、大野工司、吉岡芳親 新規酸化鉄造影剤とリゾビストのマウス体内分布の比較 第 41 回日本磁気共鳴医学会大会、2013 年 9 月 19-21 日、アスティ徳島、徳島、徳島市
- ⑥ 森勇樹、村上正晃、有馬康伸、朱大松、駒井豊、吉岡芳親 高感度 MRI 装置を用いた多発性硬化症モデルマウス腰髄における急性奇病対変化の評価 第 41 回日本磁気共鳴医学会大会、2013 年 9 月 19-21 日、アスティ徳島、徳島、徳島市
- ⑦ 森勇樹、陳挺、程振宇、大野工司、吉田慎一、多胡善幸、福永雅喜、吉岡芳親、磁性粒子を用いた末梢組織マクロファージの脳内浸潤の経時的観察 第 41 回日本磁気共鳴医学会大会、2013 年 9 月 19-21 日、アスティ徳島、徳島、徳島市

〔図書〕（計0件）
該当なし

〔産業財産権〕
○出願状況（計0件）
該当なし

○取得状況（計0件）
該当なし

〔その他〕
該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福永 雅喜 (FUKUNAGA, MASAKI)
生理学研究所・大脳皮質機能研究系・准教授
研究者番号：40330047

(2) 研究分担者

森 勇樹 (MORI, YUKI)
大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・生体機能イメージング・特任助教
研究者番号：10559355

(3) 研究分担者

森田 将史 (MORITA, MASASHI)
大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・生体機能イメージング・特任助教
研究者番号：30381594

(4) 連携研究者

吉岡 芳親 (YOSHIOKA, YOSHICHIKA)
大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・生体機能イメージング・特任教授
研究者番号：00174897