

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659567

研究課題名(和文)アルツハイマー病早期診断と治療モニタリングのための高感度MR分子画像法の開発

研究課題名(英文)Development of highly sensitive MR molecular imaging method for early diagnosis and monitoring of Alzheimer disease

研究代表者

梅尾 理 (Togao, Osamu)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：10452749

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：近年アルツハイマー病の脳内で見られるアミロイドに対して活性化したミクログリアが認知障害に関連している可能性が示されている。本研究ではUltrasml Superparamagnetic Iron Oxide (USPIO)造影剤を用いて、MRIによってアルツハイマー病脳内のアミロイドプラークに集まるミクログリアを検出する手法を動物実験により確立した。この方法の臨床応用により、アルツハイマー病の早期診断やモニタリングが可能となると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Recent study suggested that impaired cognitive function observed in Alzheimer disease (AD) is related to microglia activations evoked by amyloid deposition in the brain. In this study, we have developed the novel MR molecular imaging method to detect microglia accumulation in the brain tissue by using Ultrasml super paramagnetic iron oxide (USPIO) contrast agent. We confirmed in the animal model of AD that this technique could sensitively detect the USPIO phagocytized by microglia in the brain. In the future, this method can be a useful and sensitive method for early diagnosis and monitoring of AD in the clinical settings.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・放射線科学

キーワード：磁気共鳴画像(MRI) アルツハイマー病 造影剤 早期診断 分子イメージング

1. 研究開始当初の背景

(1) 社会の高齢化が進み、アルツハイマー病 (AD) の患者数が急増している。AD の早期の診断方法、治療方法の確立が求められている。AD の病理学的変化はアミロイド タンパクの蓄積による脳内の神経細胞毒性に起因すると考えられている。近年、アミロイド をターゲットにした免疫療法 (AD ワクチン) が盛んに研究され、現在臨床治験を行うレベルに至っている。

(2) MRI は被曝の問題がなく、低侵襲で普及率も高い検査法である。動物実験では、高分解能画像でアミロイドプラークが検出できると報告されているが、ヒトでは 7T の超高磁場装置を用いても、検出は不可能である。MRI によるアミロイドプラーク検出の実用化には、何らかの方法で感度の大幅な向上が必須である。

(3) 近年、アミロイドに対し活性化したミクログリアやミクログリアが放出するフリーラジカルが神経障害に関与していることが明らかになってきた。ミクログリアは、AD の免疫療法でも大きな役割を果たすと考えられ、抗体が結合したアミロイドタンパクはミクログリアにより貪食、分解される。一方、ミクログリアの過剰な活性化は、脳炎など、重大副作用の原因となりうる。MRI を使ってミクログリアを検出する方法として、Ultrasmall Superparamagnetic Iron Oxide (USPIO) 造影剤を用いる方法が注目されている。活性化ミクログリアに貪食された USPIO 粒子による強力な磁化率効果を、高磁場の MRI により *in vivo* で検出することができる。最近、AD 動物モデルのアミロイドプラークに集まるミクログリアを検出できたとの報告がなされた。

2. 研究の目的

USPIO 造影剤を用いてアルツハイマー病脳内のアミロイドプラークに集まる貪食細胞 (ミ

クログリア) を検出し、アルツハイマー病の超早期診断を目指した MRI 画像法を開発すること

3. 研究の方法

(1) USPIO 造影剤の投与方法、撮影法の最適化: 少数のモデルマウスを用いて、USPIO 投与量、MR 撮影シーケンスの最適化を行う。

- ・モデルマウスは、Tg6799 (Jackson 研究所) を使用。アミロイドプラークが十分に形成される 12-15 月齢に撮影。

- ・USPIO 造影 MRI は、小動物用 9.4T MRI 装置 (九州大学コラボレーション棟、Avance, Bruker Biospin) を使用。

- ・USPIO の投与量をどの程度まで減らせるかを検討するため、先行研究の 1000 μ mol Fe/Kg に加え、500 および 200 μ mol Fe/Kg と 3 段階準備。

- ・撮像シーケンスは 2D Fast echo 法、2D gradient echo 法、3D Gradient echo 法を用い、最適な撮像パラメータを決定。

(2) AD モデルマウスによる USPIO 造影 MRI

- ・USPIO 投与直前と投与 24 時間後に MRI を撮影し、2 回の MR 画像所見を比較する。モデルマウスでは、造影前にアミロイドプラークが小さな T2*短縮スポットとして観察され、造影後ではミクログリアに貪食された USPIO により T2*短縮スポットの大きさや数が増加するかどうかを検証する。対照マウスの MR 画像所見と比較し、モデルマウスでのみ T2*域が観察されるかどうかを検証する。

(3) 行動学的評価

- ・モデルマウスの認知機能低下の程度を調べるために、放射状水迷路試験を行い、課題遂行機能を調べる。

(4) USPIO 造影 MRI 所見と組織学的所見の比較 1 で MRI を撮影したモデルマウスを MRI 撮影後に屠殺し、脳組織標本を作製する。

Ex-vivo の MR 画像と染色標本を比較して、USPIO 粒子とアミロイドブラークに集まるミクログリアの位置が一致することを確認する。

- ・ 屠殺後に脳を取り出し、灌流固定する。その後、組織標本と比較するための Ex-vivo MR 画像を撮影する。撮影には in-vivo の撮影に用いるのと同じ 9.4T MRI 装置を使用。
- ・ 組織標本を作製し、アミロイドブラーク、ミクログリア、USPIO 粒子を同定し、これらの位置関係を比較する。鉄 (USPIO 粒子) Pearl 染色、ミクログリア CD45、アミロイド Congo red

4. 研究成果

(1) USPIO 造影剤の投与法、撮影法の最適化: AD モデルマウスにて造影剤投与量を 200 μ mol Fe/kg, 500 μ mol Fe/kg, 1000 μ mol Fe/kg の3通り調整し、投与量と検出能の関係を評価した。1000 μ mol Fe/kg ではモデルマウス脳内の USPIO 沈着を検出することができたが、500 μ mol Fe/kg 以下では検出することができなかった。よって最適な投与量は 1000 μ mol Fe/kg と判断した。撮像パラメータは各シーケンスにて TE を数通り変化させて正常マウスの画質、コントラストを評価した。結果として Fast spin echo シークエンスでは TR 2500ms, TE33ms, ETL 8, FOV 20 x 20 mm, slice thickness = 1 mm, Matrix = 256 x 256, number of average 4, 撮像時間 5 分 20 秒が最適であった。2D gradient echo は頭蓋外の空気と組織との磁化率効果が強いいため、評価に適切な画像は得ることができなかった。3D gradient echo シークエンスでは TR 15 ms, TE 6 ms, flip angle 10, FOV 20 x 20 mm, slice thickness = 0.62 mm, Matrix = 256 x 192 x 32, number of average 20, 撮像時間 30 分 43 秒が最適であった。 =

(2) AD モデルマウスによる USPIO 造影 MRI

・ 15 ヶ月例のモデルマウス (AD モデルマウス 5 匹、コントロールマウス 5 匹を対象とした。USPIO 投与直前と投与 24 時間後に MRI を撮影し、2 回の MR 画像所見を比較した。USPIO 投与前には全ての AD モデルマウスおよびコントロールマウス (Wild type) とともにいずれのシーケンスでも信号低下 (T2*短縮) 部位は観察されなかった。USPIO 投与後 24 時間後の撮像では AD モデルマウス 5 匹のうち 4 例にて 3D gradient echo シークエンスにて信号低下部位が観察された (図 1)。一方コントロールマウスでは全てにおいて信号低下部位は観察されなかった。

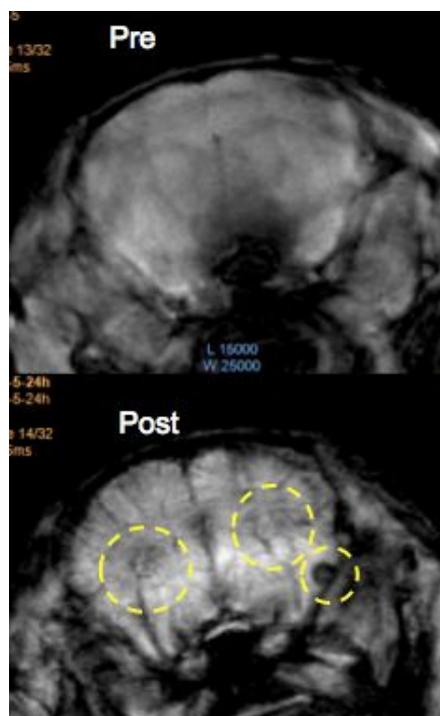


図 1 AD モデルマウス USPIO 投与前 (上段) および投与後 24 時間後

(3) 行動学的評価

モデルマウスの認知機能低下の程度を調べるための放射状水迷路試験の結果を図 3 に示す。4 回目、5 回目のトライアルともに AD モデルマウスの方がコントロールマウスに比べて有意にエラー数が多く、AD モデルマウスにおいて認知機能が低下していることが確認された。

	エラー数	
	4回目のトライアル	5回目のトライアル
ADモデルマウス	4.56±1.67**	5.17±1.35**
コントロールマウス	1.75±0.99	2.08±0.58

**： p<0.01, versus control group

図2 放射状水迷路試験におけるエラー数

(4) USPIO 投与後の ex-vivo イメージングと脳病理組織との対比

ADモデルマウスでは摘出した脳の ex-vivo イメージングにて全てのマウスにおいて信号低下部位が確認された。一方コントロールマウスでは明らかな信号低下は認められなかった。病理組織は現在解析中である。

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0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔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：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

梶尾 理 (Osamu Togao)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：10452749

(2)研究分担者

大和 真由美 (Mayumi Yamato)

九州大学・先端融合レドックスナビ研究拠点・准教授

研究者番号：30380695

樋渡 昭雄 (Akio Hiwatashi)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：30444855

吉浦 敬 (Takashi Yoshiura)

鹿児島大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：40322747

本田 浩 (Hiroshi Honda)

九州大学・医学研究院・教授

研究者番号：90145433

(3)連携研究者

市川 和洋 (Kazuhiro Ichikawa)

九州大学・先端融合レドックスナビ研究拠点・教授

研究者番号：10271115