

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 20 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791271

研究課題名(和文)パーキンソン病モデルラットの脳の形態学的MRI解析と栄養因子による回復治療の検討

研究課題名(英文)MRI-based morphological brain analysis in a rat model of Parkinson's disease and preclinical trials of neurotrophic factors

研究代表者

住吉 晃(SUMIYOSHI, AKIRA)

東北大学・加齢医学研究所・助教

研究者番号：80612530

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)：ラットの高分解像度T2強調画像から、灰白質分画、白質分画、脳脊髄液分画の組織別確立マップを作製し、ヒトで広く使用されているvoxel-based morphometryによる脳形態画像の統計解析法を、ラットの脳画像解析においても可能にした。また、同法をラットのパーキンソン病モデル、輪回し運動モデル、心肺蘇生モデル、心筋梗塞モデルに適用し、実用性・有用性を実証する事で、同法が、前臨床の動物実験においても有用な画像診断ツールであることを示した。

研究成果の概要(英文)：Using the high-resolution T2-weighted brain images in rats, our laboratory developed the tissue prior probability maps that include the segmentations of gray matter, white matter, and cerebrospinal fluid. These tissue probability maps enable us to perform voxel-based morphometry (VBM) that has been widely used in human studies. We applied the VBM method to the rat models of Parkinson's disease, wheel running exercise, cardiopulmonary resuscitation, and heart failure, exemplifying the utility of VBM method in the preclinical rodent studies.

研究分野：小動物MRI

キーワード：神経科学 ラット VBM 輪回し運動 パーキンソン病

## 1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病に代表される神経変性疾患では、早期の疾患の検出と、病態の進行を遅らせる新規の治療法の開発が重要である (DeKosky and Marek, 2003)。Braak らは、特発性パーキンソン病患者の  $\alpha$ -シヌクレイン免疫染色画像を用いて、脳内における連鎖的な 6 段階の病態進行仮説を提唱した (Braak et al., 2003)。彼らの仮説の中で最も重要な点は、古典的な Hoehn & Yahr による重症度分類の最初の段階、つまり一側性パーキンソン病が現れる 20 年以上も前に、延髄を中心とした脳幹領域に最初の病変が認められる事を示唆している点である (Hawkes et al., 2010)。MRI を用いた画像解析からも、初期の特発性パーキンソン病患者では、延髄と橋にまたがる領域に、健常群に比べて有意な体積減少が認められている (Jubault et al., 2009)。では、なぜパーキンソン病患者では、脳内の  $\alpha$ -シヌクレインの凝集体分布による萎縮の負の連鎖ドミノが引き起こされてしまうのだろうか？

現在のところ、脳内で病変が伝播していく詳細なメカニズムは明らかになっていないが、加齢とアルツハイマー病をモデルに提唱された“髄鞘化の破綻”が有力な危険因子であると考えている (Bartzokis, 2004)。パーキンソン病では、神経細胞に加えて、グリア細胞にも  $\alpha$ -シヌクレインの凝集体が形成されるため (Wakabayashi et al., 2000)、脳内の監視役を担うマイクログリアの食作用は亢進し、炎症性サイトカインの分泌が過剰になる (Zhang et al., 2007)。その結果、周辺の神経細胞の髄鞘化は障害され、最終的に神経細胞の変性に至るものと考えられている (Fellner et al., 2011)。上記の因果論に基づくと、種々の栄養因子による神経保護治療戦略が有効であると考えられる。しかし先行研究では、病態の発症前に着目した神経保護治療の検討は行われておらず、Braak らが提唱する初期の段階での栄養因子の薬効は未だ不明のままである。これらの課題に取り組むためには、前臨床段階での侵襲的な介入を可能にする適切な動物病態モデルと、in vivo での連続的なモニタリングを可能にする定量的な評価システムの構築が必要である。

## 2. 研究の目的

本研究では、①MRI による新規の脳形態画像解析法を用いて、パーキンソン病モデルラットの病態発症前の連続的な脳萎縮の過程を明らかにし、②神経栄養因子 (BDNF、CDNF、MANF) の全身性静脈注入、もしくは MRI により明らかになった部位への直接的な頭蓋内注入を施し、パーキンソン病による脳萎縮への治療効果の評価を行う。病態発症前の脳内萎縮メカニズムに基づいた薬物治療戦略を

提案する事で、現代のドパミン補充療法を中心とした対症療法に代わる、新たな根本治療への道を示唆する事をゴールとする。

ただし、ラットにおけるトランスレータブルな MRI 画像解析法が存在しないため、更に具体的な目的として、下記の 2 点に取り組む。すなわち、①ラットの高分解像度 T2 強調画像を用いて、アトラス MRI テンプレートを作製する。その際、大脳皮質の領域の分けと、脳組織別確立マップの作製にも取り組む。これにより、ヒトの脳画像研究で広く使用されている voxel-based morphometry (VBM) による脳形態画像の統計解析法が、ラットの脳画像解析においても可能になる。②VBM による脳形態画像解析法の実用性・有用性を実証するため、同法を、ラットのパーキンソン病モデル、輪回し運動モデル、心肺蘇生モデル、心筋梗塞モデルに適用する。

## 3. 研究の方法

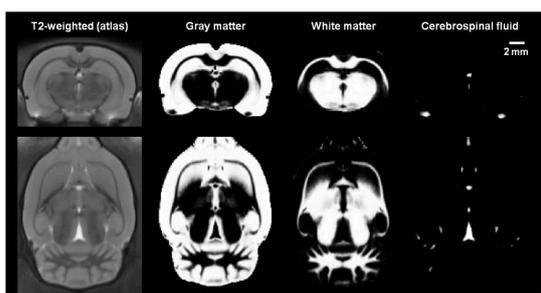
アトラス MRI テンプレートの作製においては、6 から 10 週齢のオスの Wistar ラットを用いて、イソフルレン麻酔下で、高分解像度の T2 強調画像を取得した (ボクセルサイズ: 125 x 125 x 300  $\mu\text{m}^3$ )。その他の VBM 研究においても、同様に成獣のオスの Wistar ラットの T2 強調画像を取得したが、撮像時間の短縮のため、やや低分解像度の T2 強調画像を取得した (ボクセルサイズ: 125 x 125 x 600  $\mu\text{m}^3$ )。

## 4. 研究成果

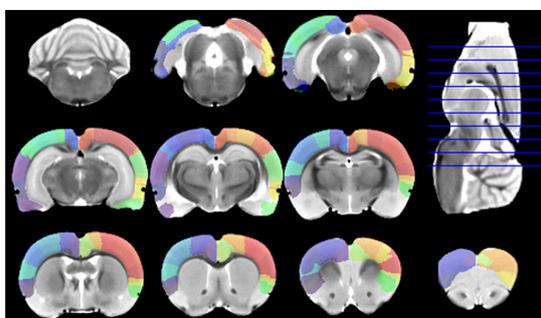
## (1) 脳組織別確立マップの作製

ラット 30 匹分の T2 強調画像を、非線形アルゴリズムを用いて重ね合わせを行い、その後、マニュアルで指定した脳画像部位 (ランドマーク) の情報を用いて、アトラス空間座標への重ね合わせを行った。得られたアトラス MRI テンプレート (T2 強調画像の平均画像) に対して、異方性の平滑化処理を施すことで、画像強度のヒストグラム上での強度ピークの分離に成功した。さらに、この T2 画像強度の分布から、ガウシアン関数を用いて灰白質・白質・脳脊髄液分画へのフィッティングを行い、各ボクセルでの組織分画の確立マップを算出した。これにより VBM を用いた解析に必須な組織確立マップのテンプレートが完成した (図 1)。このテンプレートを使用すれば、従来のラット T2 強調画像 (40 分程度で撮像) でも、ヒトの VBM 解析で用いられているアルゴリズム (SPM segmentation) を用いて、ほぼ自動で組織確立マップの作成が可能である (雑誌論文④)。また、Paxinos & Watson のアトラスをデジタル化する事で、大脳皮質領域のアトラス構造の分画化にも成功した (図 2)。こちらの分画化にも、同程度の T2 強調画像であれば、自動で分画化が可能である。なお、これらのテンプレートは、

東北大学加齢医学研究所のホームページにて公開されている。



(図1) ラット MRI テンプレートの画像。灰白質・白質・脳脊髄液の脳組織別確率マップが示されている。この基準画像を用いて、T2強調画像の各組織成分への自動帰属が可能となる。

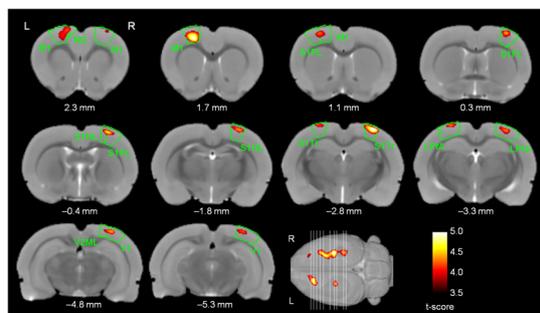


(図2) ラット大脳皮質におけるアトラス分画。Paxinos & Watson のアトラスに基づき48個の大脳皮質構造に分画が可能である。

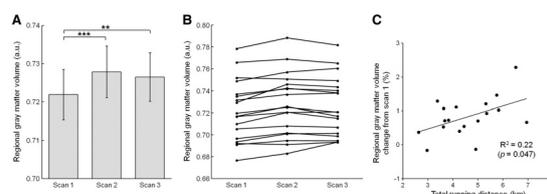
## (2) ラットにおける VBM 解析

アトラス MRI テンプレートを使用した応用研究の一例として、ラットにおける1週間の輪回し介入後の脳可塑性の研究(縦断的なVBM解析)に着手した。ヒトにおいては、2004年に縦断的なVBM解析を用いて、3か月間のジャグリングトレーニングを行うと、若年成人の視覚野において、局所灰白質体積が増加することが報告されている(Draganski et al., 2004)。しかし、小動物においては比較可能な縦断的なVBM解析の報告例は存在していなかった。そこで、若年成獣ラットに対して1週間の輪回し運動介入を施し、介入の前後と、介入1週間後にMRI測定を行い、縦断的なVBM解析を行った(雑誌論文②)。その結果、1週間の輪回し介入の前後で、運動野、体積感覚野、視覚野において、有意な局所灰白質体積の増加が認められた(図3)。これら変化した脳部位は、過去の組織学的解析の結果とも一致する。さらに上昇した部位のパーセント変化と、1週間の輪回し運動中の走行距離との間に有意な正の相関があること、介入1週間後でも局所灰白質体積変化は維持されていることも明らかになった(図4)。これらの結果から、ラットにおいても、縦断的なVBM解

析が脳の形態的可塑性を検出する有用な画像診断ツールであることが示唆された。さらに、ラットの心肺蘇生モデル(雑誌論文③)、ラットの心不全モデル(雑誌論文①)においても、ラットのVBM解析の実用性・有用性を示している。ラットにおける縦断的なVBM解析と、組織学的解析、行動検査、遺伝子操作技術などを組み合わせることで、今後新たな研究の潮流が期待できるものと思われる。



(図3) ラットにおける縦断的なVBM解析の解析例。1週間の輪回し介入後のラットにおいて、運動野、体積感覚野、視覚野において、統計学的に有意な脳局所灰白質体積の増加が観測された。



(図4) 介入群(18匹分)における脳局所灰白質体積の時間変化。(A)は群の平均、(B)は各個体の時間変化である。Scan 1とScan 2の間に1週間の輪回し運動介入を施し、Scan 2とScan 3の間は通常飼育を行っている。(C)脳局所灰白質体積の変化が、1週間の輪回し運動介入における走行距離と統計学的に有意な正相関を示した( $p < 0.05$ )。

## (3) パーキンソン病モデルへの適用

パーキンソン病のモデル動物を用いて、病態進行仮説であるBraak仮説を検証する事、また早期治療で重要となる病態発症以前の脳内萎縮メカニズムを明らかにする事、を目的とした。モデル動物には、ミトコンドリア阻害剤であるロテノン(1mg/kg)を腹腔内に投与するラットの動物モデルを用い、ロテノン投与前と投与開始後1週間のMRI画像を取得し、経時的な脳の形態変化を観測した。縦断的なVBM解析の結果、ロテノン投与後1週間のラットの脳では、延髄や橋といった白質分画では無く、皮質を中心とする広範囲の灰白質分画に、有意な局所体積の減少が確認された。特に、嗅結節、梨状皮質、島皮質、腹側海馬などに、顕著な灰白質体積の減少が確認され

た。つまり、ロテノンの投与モデルでは、Braak 仮説の初期で提唱されている延髄や橋ではなく、嗅覚に関わるとされる広範囲の皮質において、脳の萎縮が開始すると考えられる。パーキンソン病患者では、運動症状が出現する 4~6 年前に嗅覚障害が出現することから、ロテノンの投与モデルは、パーキンソン病患者の初期症状を研究するモデルとして有用であることを示唆している。従来の動物モデルでは、ドパミン選択的な神経毒である 6-OHDA を、脳の線条体に投与するモデルが広く使用されてきたが、ロテノン腹腔内投与モデルは、新たな視点での薬物治療開発に貢献できる可能性を示唆している。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① Suzuki H, Sumiyoshi A, Matsumoto Y, Duffy BA, Yoshikawa T, Lythgoe MF, Yanai K, Taki Y, Kawashima R, Shimokawa H. Structural abnormality of the hippocampus associated with depressive symptoms in heart failure rats, *NeuroImage*, 105, 84-92, 2015. (査読有り)
- ② Sumiyoshi A, Taki Y, Nonaka H, Takeuchi H, Kawashima R. Regional gray matter volume increases following 7 days of voluntary wheel running exercise: A longitudinal VBM study in rats, *NeuroImage*, 98, 82-90, 2014. (査読有り)
- ③ Suzuki H, Sumiyoshi A, Taki Y, Matsumoto Y, Fukumoto Y, Kawashima R, Shimokawa H. Voxel-based morphometry and histological analysis for evaluating hippocampal damage in a rat model of cardiopulmonary resuscitation, *NeuroImage*, 77, 215-221, 2013. (査読有り)
- ④ Valdés-Hernández PA, Sumiyoshi A, Nonaka H, Haga R, Aubert-Vásquez E, Ogawa T, Iturria-Medina Y, Riera JJ, Kawashima R. An in vivo MRI template set for morphometry, tissue segmentation and fMRI localization in rats. *Frontiers in Neuroinformatics*, 5:26, 2011. (査読有り)

[学会発表] (計 4 件)

- ① 住吉晃, 「ラット・マウスにおける VBM 解析」, 日本顕微鏡学会分子・細胞動態イメージング研究部会, 2015 年 3 月 11 日, 「東京大学医学部本郷キャンパス (東

京都・文京区)」。 (招待講演)

- ② 住吉晃, 「小動物における EEG と fMRI の計測, 標準脳 MRI テンプレートの利用」, 第 10 回インビボイメージング研究会, 2014 年 8 月 1 日, 「東北大学良陵会館 (宮城県・仙台市)」。 (招待講演)
- ③ Sumiyoshi A, Taki Y, Nonaka H, Takeuchi H, Kawashima R, Regional gray and white matter volume increases in adult rat brain following 7 days of voluntary wheel running, *ISCBFM 2013*, 2013 年 5 月 22 日, 「上海 (中国)」。 (ポスター発表, 査読有り)
- ④ 住吉晃, 「小動物用 7T-MRI を用いた脳機能イメージング技術の開発」, バイオジャパン 2012, 2012 年 10 月 10 日, 「パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)」。 (招待講演)

[その他]

ホームページ等

(ラット MRI テンプレートの公開ページ)

<http://www.idac.tohoku.ac.jp/bir/en/db/rb/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

住吉 晃 (AKIRA SUMIYOSHI)

東北大学・加齢医学研究所・助教

研究者番号 : 80612530