

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791303

研究課題名(和文) 脂質構成成分の磁気共鳴法による画像化法の確立と応用

研究課題名(英文) Development and application of multiple quantum coherence MRI for the analysis of lipid composition in vivo

研究代表者

杉原 文徳 (Sugihara, Fuminori)

大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・特任助教

研究者番号：50381645

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：脂肪組織にはエネルギー源の貯蔵や褐色脂肪組織の熱産生といった役割が知られているが、過剰な脂質が蓄積された肥満状態の脂肪組織は炎症状態にあり生活習慣病などの危険因子と考えられている。画像診断が肥満の判定に用いられるが、MRIでは脂質の構成成分を分離して測定することが可能である。本研究ではMRIの測定手法の一つである多重共鳴法を用い、主に脂肪組織から得られる脂質構成成分毎の信号を画像化し、モデル動物を用いて定常状態から肥満に至る過程での信号変化を様々な条件下で測定した。その結果、肥満の形成にともなって飽和・不飽和鎖の信号分布が変化することが分かった。

研究成果の概要(英文)：Adipose tissue is known as energy storage and also heat generator at the brown adipose tissue. Excess amount of energy intake such as sugar and fat lead obesity, in which the adipose tissue hold extra lipid and also secret inflammation cytokine. Imaging devices are used for diagnosis of obesity. MRI is one of the imaging tool and able to observe not only the area of adipose tissue but also used for analysis of lipid composition in detail.

In this study, multiple quantum coherence MRI method was used for imaging lipid composition in vivo using model animal under various conditions. As the results of time course observation with induced obesity, it was revealed that the lipid composition of saturated-unsaturated lipid was change at the adipose tissue.

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：MRI 多重共鳴 脂質 肥満

## 1. 研究開始当初の背景

画像診断方法には超音波、X線CT、PET、MRIなどが挙げられるが、MRIは非侵襲的に生体深部組織を可視化でき、その原理から様々なコントラストで画像構成ができるために、分子イメージングの一手法として注目されている。

MRIの撮像手法の一つである $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ 多重共鳴法を用いると、脂質の構成成分を生体中でそれぞれ測定できることができ、また脂質の成分は個体中での分布に偏りがあることが分かってきた。しかし、そのような偏りがどのような理由によるか、また生物学的な意味も不明である。

脂肪組織の脂質はエネルギー源として蓄積・利用されているが、過剰なエネルギー摂取は肥満状態をもたらす。蓄積される脂質は食餌からの脂質や糖質が基になり、腸管からの吸収、肝臓での脂質合成などを経て全身へと分布していくことから、脂質の質は全身で同じものと考えられる。しかし、多重共鳴法による結果からは質の違いがみられることから、なにかしらの作用が働いていることが考えられた。

過度の脂質が蓄積した肥満状態の脂肪組織は炎症性サイトカインを産生し、炎症時にみられる免疫細胞が定常状態よりも多くみられることから、炎症状態であると考えられている。また脂肪委縮症も免疫細胞の異常により引き起こされることから、恒常性を維持するうえで重要な免疫との関わりが注目されている。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は(1)脂質構成要素を画像することができる $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ 多重共鳴法であるHMQC法による画像取得方法の検証と高度化、(2)生体モデルであるマウスにおける脂質分布の基礎的データの収集を行い、脂質分布の偏在メカニズムを理解するための基礎データを収集するとともに、(3)肥満などの病態時における脂質分布の動態変化を追跡し、脂肪組織の質的变化を捉えることを目的とした。

(1)手法検討として、既知の脂質試料を用いて、その構成成分(CH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>-acyl, CH<sub>2</sub>-CO, グリセロール骨格 sn-1,3 / sn-2, 不飽和鎖)の信号毎の画像が取得できるようにし、さらに得られたマウスの脂質画像と他の脂質分析手法と比べ、その画像の妥当性を検証することを目的とした。

(2)生体マウスにおいて観察される脂質信号の分布の偏りはどのような状況でも観察されるものなのかをマウス種や週齢、性差などの基本的な条件を変えることで検証した。また、本手法で得られる基礎的なデータに限られていることから、病態モデルなどと比較するためにも定常状態での脂質構成分布を得

ることを検討した。

(3)肥満状態では脂質の過剰な蓄積がみられるが、その生化学的な質についての知見は限られている。本研究で用いる $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMQC法を用いて個体中での脂質動態を経過観察することで、病態への移行時に伴う脂質の変化がみられるかどうかを検討した。また、肥満の病態をモニターするために体重および血液による検査値を指標として検証した。

## 3. 研究の方法

(1)多重共鳴MRIには $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMQC法を用い、標準サンプル(オリーブ油、オレイン酸、グリセロール、多価不飽和脂肪酸)によって画像化手法の検討を行い、撮像方法の高速化などを検討した。また、麻酔下のマウスの撮像によるモーションアーチファクトの低減方法、各種パラメーターの最適化を信号強度ノイズ(S/N)比を指標にして行った。

また脂質画像の撮像後、マウス脂肪臓器を摘出して再度測定度し生体中での信号との比較をし、また臓器から脂質を抽出し、 $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMQC-MRIおよびMRS、TLC分析、MALDI-TOF-MS、GC-MS分析(依頼分析)を実施し、 $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMQC-MRIで得られた結果の妥当性を検証した。

(2) $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMQC-MRIによるマウスの測定に際して、基礎的なデータを取得するために、マウス系統(Balb/CA, C57BL/6, C3H)、性差、週齢(4週~)、食餌(カロリー値)を変え $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMQC-MRI測定を行い、どのような構成成分の信号変化がみられるかを検討した。

(3)脂質の動態変化が顕著である肥満モデルでは脂質構成成分の変化がみられるかを検証するため食餌誘導による肥満マウスを作製した。食餌負荷は飲水へのショ糖添加により行い、肥満の指標として体重変化、耐糖能(ipGTT)、解剖時血液検査(トリグリセライド、AST、ALT、HDL-C、LDL-C)をおこなった。

## 4. 研究成果

### (1)手法の検討

① $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMQC-MRIの手法の検討では、標準サンプルに由来する信号を区別して画像化することができた。手法の高度化として、高速化を検討したがS/N比の向上はみられなかった為、通常法での撮像を行った。またマルチスライス選択ができるように改良を加えたが、隣接スライスからの信号が混入することがあることが分かり、1スライス毎の撮像方法を選択した。呼吸や拍動、腸の蠕動によるモーションアーチファクトには位相選択のグラジエント強度を変えることで対処できることを見出した。

②標準試料の脂質では期待される  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMQC 画像が構成成分毎に得られたため、生体マウスの脂質信号とその成分解析を行った。

飽和脂肪鎖と不飽和脂肪鎖の信号の差が大きくみられた部位の内、5 週齢雄性マウスの精巣上体脂肪と臀部周辺脂肪を選択し、摘出後の HMQC-MRI においても信号の差がみられることを確認した。

構成成分を解析するために同週齢のマウスから摘出した脂肪組織について HMQC-MRIs 測定後、飽和-不飽和鎖の分析に有効なガスクロマトグラフィー質量 (GC-MS) 分析を行った (図. 1)。結果として、画像から期待された差は得られず、1%程度の差がみられた程度であった。MRI で観測される脂質信号は運動性を有する脂肪滴由来のものがほとんどであり、膜を形成するリン脂質などからの信号は得られにくい。今回の GC-MS 分析では、それぞれの脂肪組織のみを摘出し解析対象としたが、サンプル全体からの脂質抽出方法では膜成分などを含むために差が見えにくかったのかもしれない。 $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMQC-MRI で観測された脂質成分比を他の手法で検討するには、脂質成分の抽出方法の検討が必要であると考えられた。

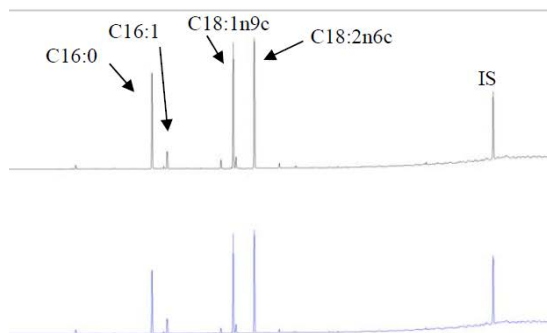


図.1 GC-MS による 5 週齢雄性マウス精巣上体脂肪組織 (上段) と臀部周辺脂肪組織 (下段) のスペクトル。内部標準 (IS) の信号を元に成分比を計算したがほとんど差は得られなかった。

## (2) HMQC-MRI による基礎データ測定

①生体マウスの HMQC スペクトロスコピーにおいて図. 2 に示す 8 つのピークが主に観測され、それぞれの画像を取得していった。

若齢時には高不飽和脂肪酸 (PUFA) 由来信号が臀部周辺から下腹部にかけて観測され、不飽和鎖由来の信号は内臓脂肪近傍に多く観測された。

週齢を重ね脂肪の蓄積がみられるようになると、HMQC 信号のみられる領域も広がっていくが、各脂質要素の偏在傾向は認められた。

性差についての検討では、雌雄ともに臀部周辺での PUFA の高信号、内臓脂肪部位での飽和鎖信号が認められた。

カロリー差のある固形飼料間では、高カロリー食では脂肪蓄積が初期に目だったが、低カロリーにおいても結果的には脂肪の蓄積もみられ、脂質要素の目立った変化は見られなかった。

以上の結果から、 $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMQC-MRI で観察される脂質要素の局在は週齢、雌雄、通常飼育環境に関わらず存在していることが考えられた。

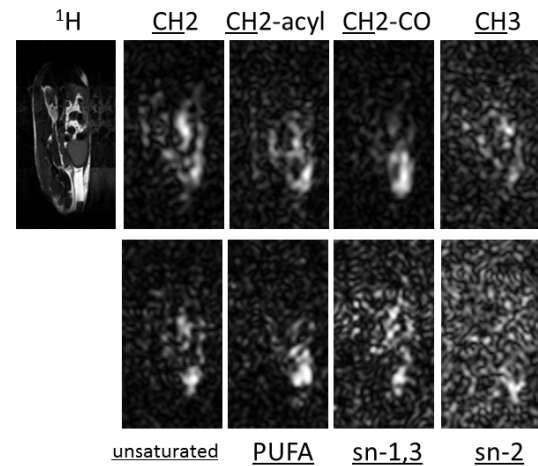


図. 2 雄性マウスの矢状断面画像と脂質構成要素毎の  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMQC 画像。

## (3) 肥満誘導時における脂質動態

肥満モデル作成のために飲水へのショ糖添加による食餌負荷を行い、図.3 のような体重変化を示し、2 か月後の解剖時脂肪組織の重量に優位な増加が認められた。また耐糖能の低下もみられ 2 型糖尿病の境界型に相当する状態のモデルが得られた。血液検査からは優位な差は得られなかった。

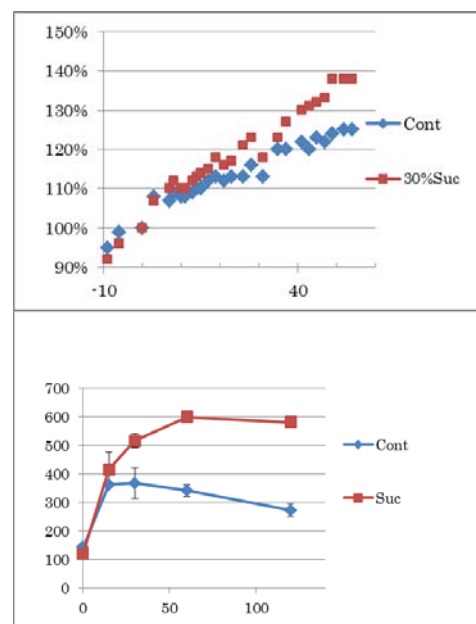


図. 3 ショ糖負荷による肥満誘導時における

る体重変化（上段、縦軸は食餌負荷時からの体重変化、横軸は食餌負荷開始時を基準とした経過日数）と食餌負荷開始2か月後の耐糖能(ipGTT)の変化（下段、縦軸は血中グルコース濃度[mg/dL]、横軸はグルコース注射後の経過時間[min]）。

このような食餌誘導モデルマウスの脂質動態をコントロールマウスと同時期に経過観察したところ、コントロールマウスでは成長に伴う脂肪の増加がみられても脂質構成要素の局在は比較的維持されていたものの、肥満マウスでは特徴的だった臀部近傍のPUFA信号が低下し、内臓脂肪や他の脂肪組織にもみられるようになった(図.4)。さらに飽和鎖由来のCH<sub>2</sub>とCH<sub>2</sub>-acylの信号もコントロールでは同局在しなかったが、肥満状態では重なる部位が多く見られた。

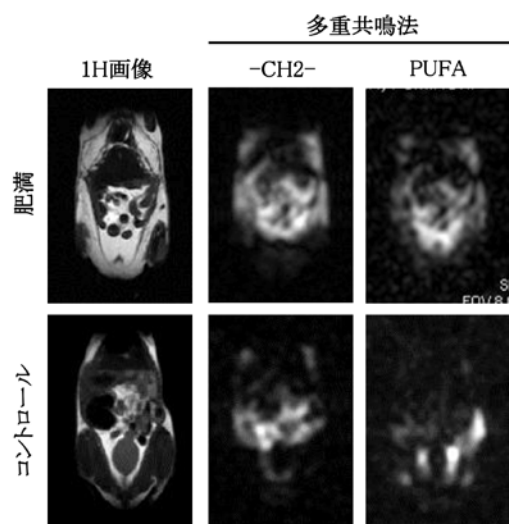


図.4 マウスの胸部から下部横断面を示す。上段は食餌による肥満誘導マウス、下段はコントロールマウス。脂肪鎖の構成により局在が異なり、肥満による構成要素の変化がみられた。

脂質要素によって信号の局在することが分かったが、その理由や生物学的な理由は不明なままである。脂質の輸送や蓄積能が脂肪組織によって異なるか、脂肪組織毎で脂質を変化させる（飽和から不飽和への変換）などの原因が予想されるが、その局在傾向が肥満誘導によって崩れたことから、肥満病態での脂肪組織による解析を通して、脂質の局在について知見が得られると考えられる。

また臨床における肥満診断では脂肪組織の面積比を指標にし、特に内臓脂肪の蓄積が生活習慣病へのリスク要因として考えられている。面積比だけでなく脂質の質についても非侵襲的に測定できるHMQC-MRI法を用いることで多元的な情報が得られ、リスク分析に用いることができるのではないかと考えられる。

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）

②学会発表（計2件）

1. 杉原文徳、野嶋考次、大石（久永）裕子、上田裕紀、”自然発症2型糖尿病モデルを用いた多重共鳴MRI画像法による内臓脂肪分布の検討”、日本糖尿病・肥満動物学会、2014年2月14日～15日、宮崎市民プラザ

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉原 文徳 (FUMINORI SUGIHARA)

大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・特任助教

研究者番号：50381645