

マルチスケールイメージングによる 脳機能発現メカニズムの解明



医療と技術

小山内 実*

Unraveling the brain function expression mechanisms
with multi-scale imaging

Key Words : biological measurement, brain, MRI, optical imaging, calcium

はじめに

世界的に高齢化が進んでいることにより、脳・神経疾患の罹患数が増加している。近年の脳・神経科学の進展により、アルツハイマー病のアミロイドβや、パーキンソン病のα-シヌクレインのように、神経変性への関与が考えられているタンパク質や遺伝子の同定は進んできているが、一部の細胞の神経変性がどのようなメカニズムで発症につながるのかはほとんど分かっていない。それは、脳の情報処理機構や機能発現メカニズムがほとんど解明されていないからである。

我々はこの脳機能発現メカニズムを解明することを目的として従来から研究を行ってきた。脳・神経系は、分子-神経細胞(ニューロン)-神経回路-脳-個体というようにマイクロからマクロに渡る階層構造を成しているため、単一スケールでの計測だけでは、木を見て森を見ず、あるいは、森だけ見て木が見えない、ということになりかねず、脳機能発現メカニズムの解明に際して誤謬を生む可能性がある。この問題を解決するために、マルチスケールイメージングによる脳機能計測系の立ち上げを進めている(図1)。具体的には、機能発現あるいは疾患により、個体の行動の変化を計測するための行動実験、その際に神経活動が変化する脳領域が「どこ」なのかを見るためのマクロスケール計測法としての定量的活

動依存性マンガン造影MRI[1-3]、その場所の神経活動が「どのように」変化しているのかを見るためのメゾスケール計測法としての極微細蛍光内視鏡イメージング[4, 5]、そこに含まれる神経細胞の活動が「なぜ」変化したのかを見るためのミクロスケール計測法としてのin vitro(あるいはex vivo)イメージング[6-8]、を行うことで、脳機能発現メカニズム及び脳・神経疾患の発症メカニズムを明らかにすることを目指している。本稿ではこれらの手法の中で、定量的活動依存性MRIと極微細蛍光内視鏡イメージングについて紹介する。in vitroイメージングについては、他誌に譲る[9, 10]。

Ca²⁺ イメージング

我々が行っているマルチスケールイメージングはCa²⁺イメージングを応用したものである。Ca²⁺イメージングがなぜ脳機能発現メカニズムの解明につながるのかを知って頂くために、まずは、このCa²⁺イメージングの原理について概説したい。

生体内のCa²⁺というと、多くの方が骨を思い浮かべると思うが、脳に限らず、生体内のほとんど全ての細胞では、細胞内Ca²⁺は重要な信号伝達分子として機能している[11]。他の細胞種と同様に、神経細胞においてCa²⁺は、細胞内タンパク質の制御という機能があり、シナプスにおける神経伝達物質の放出や、記憶・学習の基となるシナプス伝達の可塑性などに関与している。このような重要な信号伝達分子であるがゆえに、静止状態の細胞において、Ca²⁺は非常に低い濃度(50-100 nM程度)に抑えられている。一方細胞外のCa²⁺濃度は2-3 mM程度であり、細胞内外の濃度差は2万倍以上と、他の生体内イオンに比べて極めて大きな濃度差がある。そのため、細胞膜に存在するCa²⁺チャネルが開くと、大量のCa²⁺が細胞内に流入し、細胞内Ca²⁺濃度が



* Makoto OSANAI

1969年3月生まれ
名古屋大学大学院 理学研究科 物理学
専攻博士後期課程(1996年)
現在、大阪大学大学院 医学研究科 保健学専攻 生体物理学講座 生体機能
イメージング研究室 教授 博士(理学)
専門/神経生理学、医用工学
TEL: 06-6879-2571
FAX: 06-6879-2574
E-mail: osanai@sahs.med.osaka-u.ac.jp

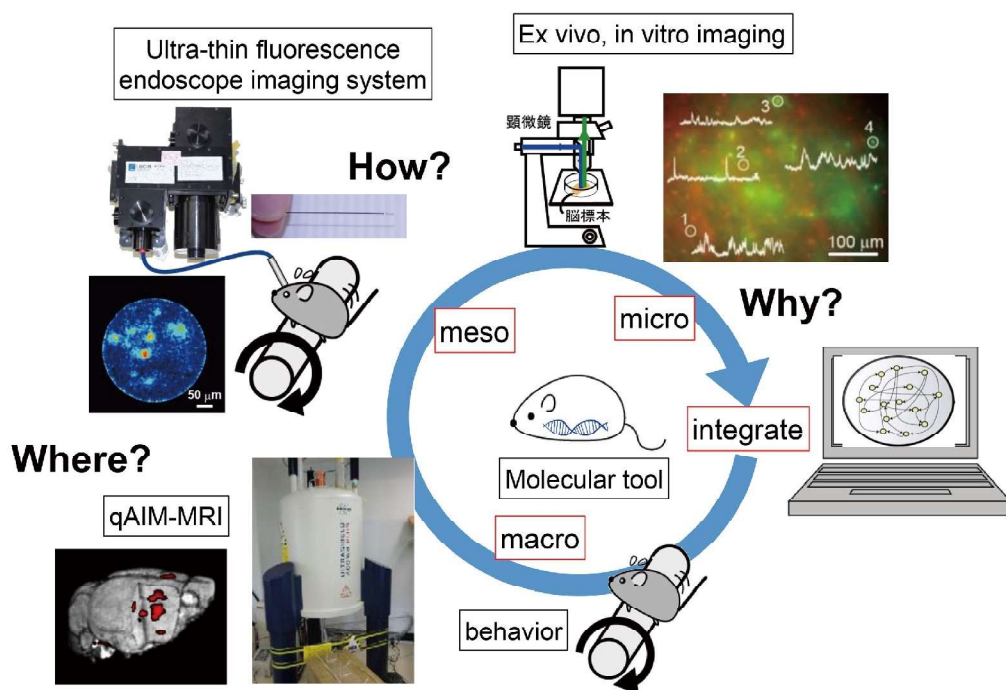


図1 マルチスケールイメージングによる脳機能解析。どこが、どのように、なぜを理解するためのマルチスケールイメージング技術。

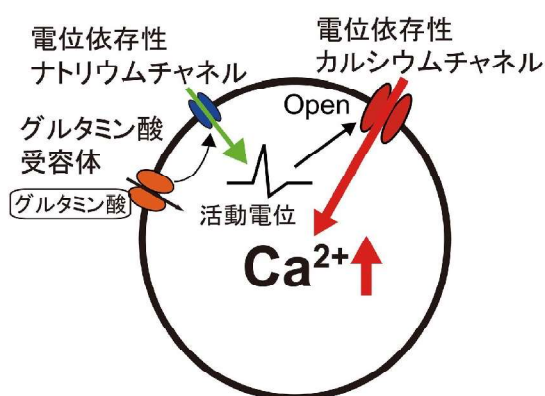


図2 Ca^{2+} イメージングの原理。グルタミン酸は興奮性神経伝達物質。

上昇する (図 2)。神経細胞の場合、興奮性のシナプス伝達が起こり細胞の膜電位がある程度まで上昇すると、電位依存性 Na^+ チャンネルが開き、活動電位が発生する。従来は、この活動電位やシナプス伝達による膜電位の上昇を電氣的に計測する電気生理学が、基本的な神経活動計測法であったが、この方法では一個ないしは数個の神経細胞の活動しか計測することはできない。前節で述べたように、脳・神経系は階層構造を成し、それぞれの階層内・階層間で相互作用することで情報を処理しているため、数個の細胞の活動の計測だけでは、脳の機能発現メ

カニズムを理解することはできない。つまり、脳機能発現メカニズムを理解するためには、できるだけ多くの細胞あるいは領域の活動を計測する必要がある。この問題を解決する方法として Ca^{2+} イメージングがある。前述のように、神経細胞は活動する際 (つまり信号を伝達する際) に活動電位を発するが、その際、細胞膜に存在する電位依存性 Ca^{2+} チャンネルが開く。その結果、前述のように細胞外から大量の Ca^{2+} が細胞内に流入し、 Ca^{2+} 濃度が上昇する。 Ca^{2+} は重要な信号伝達分子であるがゆえに、その濃度は短時間で静止状態の濃度に戻る。つまり、 Ca^{2+} 濃度を活動電位のプローブとして使うことができる。 Ca^{2+} 感受性蛍光色素を用いることで、 Ca^{2+} 濃度変化を蛍光強度の変化として計測することができるため、蛍光変化をイメージングすることで、多細胞の神経活動を同時に計測することが可能となる [9]。

定量的活動依存性マンガン造影 MRI

MRI は、MRI スキャナー内の強力な静磁場により、体内の H^+ のスピンの向きを揃え、この状況で高周波磁場 (共鳴周波数の磁場、RF パルス) を印加することによりスピンを倒し、そのスピンが静磁場方

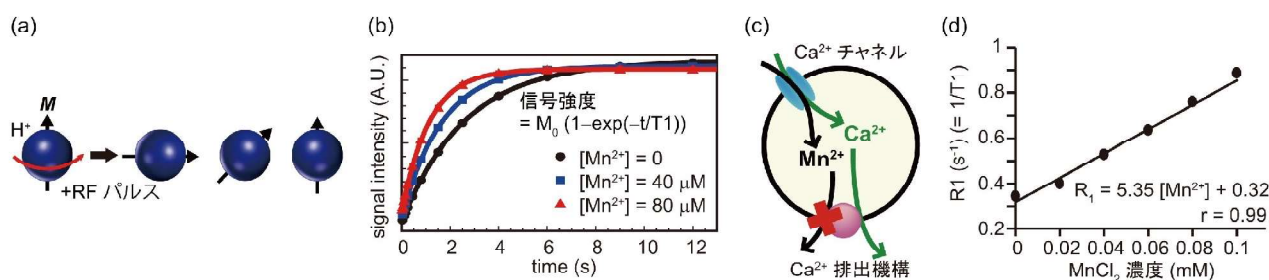


図3 定量的活動依存性マンガン造影MRIの原理。(a) MRIはスピンをRFパルスで倒してその戻る速さの違いを画像化する。 M は H^+ のスピンの発生する磁化ベクトル。(b) Mn^{2+} による縦緩和時間 ($T1$) の短縮。縦軸の信号強度はスピンによる磁化 M の縦方向成分に相当する。(c) Mn^{2+} は Ca^{2+} と同様に神経活動に応じて細胞内に流入するが、排出されにくい。(d) $T1$ の逆数 $R1$ は Mn^{2+} 濃度に比例する [1]。

向に戻る速さの違いを画像化している非侵襲撮像法である (図3 (a))。RFパルスによりスピンの倒れ、スピンの磁化 M の方向が静磁場方向に戻る時定数を縦緩和時間 ($T1$)、スピンの倒れることにより生じた横方向の磁化の減弱 (実際には多数の H^+ のスピンの歳差運動の位相のずれにより減弱する成分も含む) の時定数を横緩和時間 ($T2$) と呼ぶ。この $T1$ と $T2$ は H^+ の周囲の状態に応じて変化するため、臓器や組織などを構成する物質の違いによりコントラストが生じ、構造を画像化することができる (詳細はMRIの専門書を参考にして頂きたい)。 $T1$ は常磁性体により短縮されることが知られており (図3 (b))、 Gd^{3+} や Mn^{2+} はコントラストを増強する造影剤として臨床で利用されている。

一方、前述のように、神経細胞は活動電位が発生すると、 Ca^{2+} チャネルを通して神経細胞内に Ca^{2+} が流入する。 Mn^{2+} は Ca^{2+} チャネルを良く通るので、 $MnCl_2$ を投与し細胞外の Mn^{2+} を通常の細胞外液よりも多く存在させた場合、活動電位が生じると Ca^{2+} と同様に Mn^{2+} も細胞内に流入する。 Ca^{2+} は排出機構により、速やかに細胞外に排出されるのに対して、 Mn^{2+} は Ca^{2+} 排出機構で排出されにくいため、細胞内に蓄積する [1, 3] (図3 (c))。つまり、神経活動が盛んな細胞ほど多くの Mn^{2+} が蓄積する。 Mn^{2+} は前述のように $T1$ を短縮し、 $T1$ の逆数 $R1$ は Mn^{2+} 濃度に比例する (図3 (d))。つまり Mn^{2+} の蓄積量を $T1$ の短縮として計測することで、神経活動履歴を計測することができ、この手法を活動依存性マンガン造影MRI (Activation-Induced Manganese-enhanced MRI, AIM-MRI) と呼ぶ [1-3, 12]。AIM-MRIは Ca^{2+} の代わりに Mn^{2+} 濃度を計測する、擬似 Ca^{2+} イメージング法とも言える。我々は、 $T1$ を定量的に計

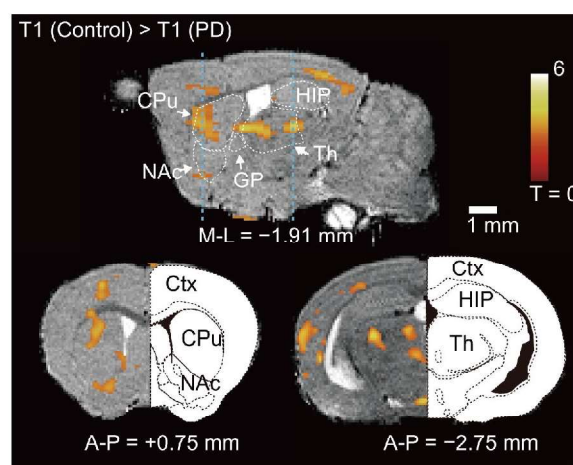


図4 qAIM-MRIの実施例。パーキンソン病モデル動物で健常動物と比べて神経活動が有意に高くなっていた領域に色付けして、マウス脳のMRI画像の上に重ねて表示している [1]。

測することで、実験条件間や動物間の比較を容易にした定量的活動依存性マンガン造影MRI (quantitative AIM-MRI, qAIM-MRI) を開発し、研究を進めてきた [1-3]。この qAIM-MRI は神経活動の履歴を計測するため時間情報を得ることはできないが、自由行動下の動物の神経活動を後からMRIで計測できるという利点がある。具体的には、qAIM-MRIで得られる $R1$ の変化は、 $MnCl_2$ の腹腔投与後 1-3 時間の神経活動を最も反映し、最適な撮像タイミングは $MnCl_2$ 投与 24-48 時間後であることを見出している [2]。我々は、この qAIM-MRI をモデル動物に適用し、自由行動下のパーキンソン病動物と健常動物の神経活動の違いを全脳で可視化すること、などに成功している [1] (図4)。最近では、通常のMRI計測では実施することができない、運動中の神経活動履歴計測を行い、運動に関与する脳領域の同定に成功しつつある。

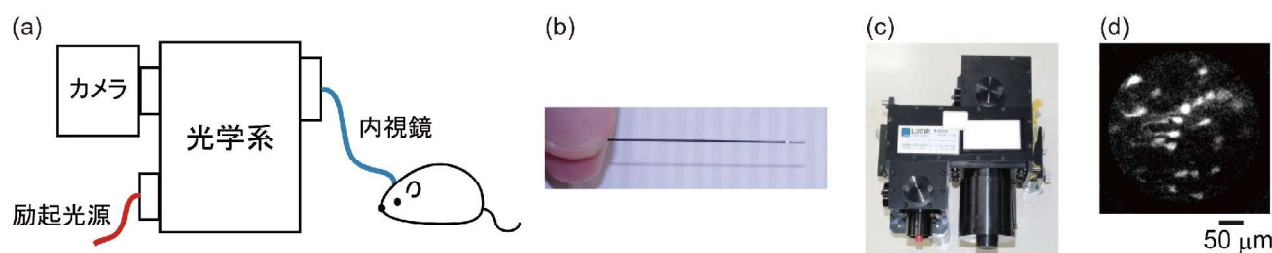


図5 U-FEIS。(a) 全体の構成、(b) 内視鏡先端部、(c) 光学系の写真、(d) 撮影された細胞の蛍光像。

qAIM-MRI は基礎研究として動物実験に利用されているが、 Mn^{2+} には毒性があるため、臨床的には神経活動計測法としては利用されていない (MR胆管膵管撮影のための $MnCl_2$ の経口投与薬は存在する)。しかし、 Mn^{2+} は生体にとっての必須元素であると共に、マウスを用いた動物実験の際に投与する $MnCl_2$ の量は、マウスが一日に食べる餌に含まれる Mn^{2+} 量に比べて少ない。つまり、qAIM-MRI で投与される $MnCl_2$ による毒性はそれほど高くはないと考えられる。この観点から、AIM-MRI の臨床的治験が行われ、臨床応用されることにより、脳・神経疾患の原因領域や、その発症メカニズムが同定され、治療に役立つことを期待する。

極微細蛍光内視鏡イメージング

qAIM-MRI は、脳の「どこ」が活動していたのかを同定することはできるが、その活動の違いがどんな種類の細胞のどのような活動の変化に起因しているのかを同定することはできない。そこで、細胞の活動を計測する *in vivo* イメージング法が必要になる。*in vivo* イメージング技術として、二光子励起顕微鏡があるが、この装置は非常に高価であることに加えて、計測できる深さは最大でも 1 mm 程度であること、自由行動下の動物には適用できないこと、などの問題点があった。そこで我々は、極微細蛍光内視鏡イメージングシステム (Ultra-thin Fluorescence Endoscope Imaging System, U-FEIS) を開発している (図5) [4, 5]。U-FEIS は、イメージファイバー (FIGH-10-350-S, フジクラ) と円筒型レンズである Gradient Index (GRIN) レンズ (GRINTECH) で構成される内視鏡部と (図5 (b))、専用の光学系 (図5 (c))、蛍光色素の励起光源、撮像デバイスで構成される。U-FEIS の特徴は、脳深部のイメージングができること、自由行動下の動物

に適用可能なことに加えて、装置が小型で可搬性が高いことが挙げられる。また、内視鏡で用いている円筒形の GRIN レンズは直径が 0.5 mm 程度であるため侵襲度が低いことに加えて、内視鏡が細いため、従来の *in vivo* イメージング法では困難であった、複数領域の同時イメージングも可能である。U-FEIS を細胞イメージングに供するためには、単一細胞を識別できる空間分解能を担保しつつ、神経活動を計測するための高速イメージングができるよう時間分解能を向上させる必要がある。そのために、励起光源、光学系内のレンズの組み合わせ、撮像デバイス (カメラ) を最適化し、*in vivo* 多細胞 Ca^{2+} イメージングに成功している (図5 (d))。

おわりに

本稿では、我々が開発し利用しているマルチスケール Ca^{2+} イメージング技術の一部を紹介した。脳の機能発現メカニズムの解明、あるいは脳・神経疾患の発症メカニズムを解明するためには、我々が開発しているマルチスケールイメージングに、行動実験、電気生理学実験、生化学実験等を組み合わせ、統合して解析を行う必要がある。また、これらの手法を同一個体で実施することで、それぞれの計測モダリティから得られる情報の因果関係を明らかにすることができる。現在我々は、同一個体でのマルチスケール・マルチモーダル計測を実施するための方法論及び、得られたデータの統合的解析を模索している段階であるが、近い将来にはこれを実現し、脳機能発現メカニズムの解明に貢献したい。

一方、我々がイメージングに用いている機器 (高磁場 MRI 装置や、光源 (レーザー)、カメラ、レンズなど) で国内製のものはほとんどない。基礎、臨床問わず、生体計測機器の我が国のシェアは非常に低く、「技術大国日本」とは到底言えない状況である。

特に小動物用高磁場MRI装置はドイツのBruker社製以外に選択肢がない。目先のことに追われるのではなく、長期的視点に立ち、産学官連携で医学、工学、理学が手を組むことで、最新の生体計測技術が我が国で開発され、容易に利用できる環境が整備されることが、医学・生物学の発展のためには必要であると考えます。

謝辞

本研究は、JSPS科研費 (JP16K08486, JP16H05460, JP16H06276 (AdAMS), JP17H05543, JP18H04931, JP21H03025, JP21H03135, JP22H04922 (AdAMS)), JST CREST, JST A-step 探索タイプ、JST マッチングプランナー プログラム「探索試験」、AMED Brain/MINDS (革新的技術による脳機能ネットワークの全容解明) (JP19dm0207051, JP20dm0207051, JP21dm0207115, JP22dm0207115, JP23dm0207115)、AMED 橋渡し研究プログラム シーズ A、積水化学「自然に学ぶものづくり」研究助成プログラム、の支援を受けて行われました。

参考文献

- 1) Kikuta S, Nakamura Y, Yamamura Y, Tamura A, Homma N, Yanagawa Y, Tamura H, Kasahara J, Osanai M. Quantitative activation-induced manganese-enhanced MRI reveals severity of Parkinson's disease in mice. *Scientific Reports* 5: 12800 (2015)
- 2) Tanihira H, Fujiwara T, Kikuta S, Homma N, Osanai M. Manganese Dynamics in Mouse Brain After Systemic MnCl₂ Administration for Activation-Induced Manganese-Enhanced MRI. *Frontiers in Neural Circuits* 15: 787692 (2021).
- 3) Osanai M, Hikishima K, Onoe H. Editorial: Manganese-Enhanced MRI: A New Avenue of Functional and Structural Imaging in Neuroscience. *Frontiers in Neural Circuits* 16: 918500 (2022)
- 4) Osanai M, Suzuki T, Tamura A, Yonemura T, Mori I, Yanagawa Y, Yawo H, Mushiaki H. Development of a micro-imaging probe for functional brain imaging. *Neuroscience Research* 75: 46-52 (2013)
- 5) Osanai M, Miwa H, Tamura A, Kikuta S, Iguchi Y, Yanagawa Y, Kobayashi K, Katayama N, Tanaka T, Mushiaki H. Multimodal Functional Analysis Platform: 1. Ultrathin Fluorescence Endoscope Imaging System Enables Flexible Functional Brain Imaging. In Yawo, H., Kandori, H., Koizumi, A., Kageyama, R. (eds) *Optogenetics. Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1293: 471-479, Springer, Singapore (2021)
- 6) Suzuki S, Osanai M, Murase M, Suzuki N, Ito K, Shirasaki T, Narita K, Ohnuma K, Kuba K, Kijima H. Ca²⁺ dynamics at the frog motor nerve terminal. *Pflügers Archiv* 440: 351-365 (2000)
- 7) Osanai M, Tanaka S, Takeno Y, Takimoto S, Yagi T. Spatiotemporal properties of the action potential propagation in the mouse visual cortical slice analyzed by calcium imaging. *PLoS ONE* 5: e13738 (2010)
- 8) Tamura A, Yamada N, Yaguchi Y, Machida Y, Mori I, Osanai M. Both neurons and astrocytes exhibited tetrodotoxin-resistant metabotropic glutamate receptor-dependent spontaneous slow Ca²⁺ oscillations in striatum. *PLoS ONE* 9:e85351 (2014)
- 9) Smetters D, Majewska A, Yuste R. Detecting action potentials in neuronal populations with calcium imaging. *Methods* 18: 215-221 (1999)
- 10) 小山内 実. マルチスケールカルシウムイメージング技術. *日本材料科学会誌 材料の科学と工学* 59(2): 38-41 (2022)
- 11) Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 1: 11-21 (2000)
- 12) Lin Y J, Koretsky AP. Manganese ion enhances T1-weighted MRI during brain activation: an approach to direct imaging of brain function. *Magnetic Resonance in Medicine* 38: 378-388 (1997)