

新潟大学脳研究所
「病理リソースを活用した脳神経病態共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

MRI による拡散時間依存信号におけるアクアポリン機能動態の定量

研究代表者 畑 純一¹⁾
研究分担者 五十嵐 博中²⁾

1) 東京都立大学人間健康科学研究科 2) 新潟大学脳研究所統合脳機能研究センター

研究要旨

細胞膜には、アクアポリンという水分子を通過させる膜タンパク質が存在する。その一種である AQP4 は中枢神経系において主要な水チャネルであり、アルツハイマー病などの中枢神経疾患に関係していると言われている。非侵襲的なアプローチとして MRI を用いて捉えることができれば、より生体に安全なイメージングとなり得る。本研究では、アクアポリンによる細胞内外の水分子交換機能を time dependent diffusion MRI (td-dMRI) にて捉えることができるのか？MRI 信号にどれほど寄与するのか？を検討することを目的とする。具体的には、培養細胞を対象としその細胞の水代謝動態を計測しつつ、提案計測法の開発を進めていく。そこで動態をコントロールするために TGN-020 や TGN-073 による薬剤を用いることで水動態の観察を行う。MRI 計測は、細胞の入ったチューブをホルダーで固定し、細胞を培養液と共にチューブに移し沈殿させ、AQP4 阻害モデルには TGN-020 を促進モデルには TGN-073 を滴下し、コントロールには滴下せず比較検討する。

A. 研究目的

細胞膜には、アクアポリンという水分子を通過させる膜タンパク質が存在する。その一種である AQP4 は中枢神経系において主要な水チャネルであり、アルツハイマー病などの中枢神経疾患に関係していると言われている。AQP4 自体をイメージングする方法としては、 $[^{11}\text{C}]\text{TGN-020}$ を用いた PET 検査が提唱されているが、被ばくの問題がある。そこで、非侵襲的なアプローチとして MRI を用いて捉えることができれば、より生体に安全なイメージングとなり得る。本研究では、アクアポリンによる細胞内外の水分子交換機能を time dependent diffusion MRI (td-dMRI) にて捉えることができるのか、MRI 信号にどれほど寄与するのか、を検討することを目的とする。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

使用細胞は HEK-293T (AcceGen, USA) を用い、10%FBS 含有 DMEM 培地で培養した。AQP4 の定量化のために Western Blotting (WB) と RT-PCR を、AQP4 の水透過性の評価のために低浸透圧刺激実験を行った。次に、td-dMRI を用いた AQP4 機能の測定を行なった。細胞を PBS で洗浄後、RNA チューブに収集し、自重による細胞沈殿を待ってから MRI 撮像を行なった。この時、AQP4 阻害モデルでは TGN-020 (R&D Systems, Inc., USA) を溶解させた PBS を使用し、コントロールでは PBS を使用した。AQP4 阻害モデルでは、TGN-020 を DMSO に 100mM で溶解させたものを PBS に印加し、RNA チューブ内

での TGN-020 の濃度を $100\ \mu\text{M}$ とした。コントロールの PBS にも同量の DMSO を印加した。チューブは専用のホルダーで固定し、周囲をフッ素溶液で満たした。本実験では STE-DWI sequence を用い、Diffusion Time (DT) を 13~1024 ms の 16 段階で変化させて多軸 DTI を撮像した。計測には 9.4T-MRI(Bruker)およびソレノイドコイル(高島製作所)を使用した。

C. 研究結果

WB,RT-PCR により HEK-293T における AQP4 の発現が、低浸透圧刺激実験により TGN-020 の薬効が確認された。また、細胞の継代数による差は見られなかった。td-dMRI では、細胞層でコントロールと AQP4 阻害モデル間に拡散時間を延長した際、AQP4 阻害モデルでは拡散係数の上昇が抑制されるという有意な差が観測された。

D. 考察

AQP4 による水分子交換機能の差が、拡散固有値の拡散時間依存性に与える影響に関し、AQP4 の水分子交換機能が低いほど、短い拡散時間における拡散固有値の減少が抑えられることが結果より捉えることができた。水分子が拡散する際に AQP4 に遭遇する機会、および 1 つの AQP4 による水分子交換効率の違いによるものであると考えられる。具体的には、AQP4 過剰発現モデルでは、コントロールと比較して AQP4 タンパク質の発現量が増加しているため、水分子が AQP4 に遭遇する機会が増加する。一方、AQP4 促進モデルでは、AQP4(+)HEK-293T に促進剤を使用することで、水分子が AQP4 に遭遇する機会だけでなく、AQP4 の水分子交換機能そのものも高まる。これに対し、AQP4 阻害モデルでは AQP4(+)HEK-293T に阻害剤を用いているため、AQP4 の発現量自体は増加しているが、その機能が抑制される結果、水分子交換効率はコントロールよりも低下すると考えられる。これらの要因を踏まえると、AQP4 の水分子交換機能の程度は、促進モデル>過剰発現モデル>コントロール>阻害モデルの順となる。AQP4 の機能が低いほど、細胞膜を介した水分子の拡散の影響が顕著となり、水分子拡散の制限が軽減されるため、短い拡散時

間における拡散固有値の減少が抑制される。このため、拡散時間を延長するにつれて、水分子が細胞膜の AQP4 に到達する機会が増加し、AQP4 による水分子交換機能の違いがより顕著に反映されることで、モデル間における拡散固有値の差が観測されるようになった。これは、td-dMRI が細胞膜を介した水分子の拡散の程度を反映し、AQP4 の機能を評価できる可能性を示唆している。さらに、長い拡散時間では、AQP4 の水分子交換機能の大きいモデルほど拡散固有値が大きく計測された。水分子が十分に AQP4 に到達する機会が与えられ、AQP4 の水分子交換機能の差が拡散固有値の差となって観測されたためであるといえる。拡散時間の延長に伴い、細胞膜を介した水分子の拡散を反映し、AQP4 による水分子交換機能の差に起因する拡散係数の差を測定することが可能になったと予想される。細胞膜を介した水分子の拡散が正確に反映されると、拡散時間を延長するのに伴って拡散係数の差は次第に大きくなっていくと予想される。

E. 結論

新規水代謝技術開発にむけた実験環境、そして予備実験が完了し、本格的な生体計測へ向け、有効なデータが得られた。本技術である拡散時間依存水分子動態計測技術は、脳の水分子移動を計測ツールとして有効である可能性を示せた。

F. 研究発表 (上記課題名に関するもの)

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし