

Title	遺伝学的MRIレポーターを導入した脳神経回路の全容解明
Sub Title	Analyses of neuronal circuits using genetic MRI reporters
Author	吉田, 哲(Yoshida, Tetsu) 畑, 純一(Hata, Junichi)
Publisher	
Publication year	2025
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2024.)
JaLC DOI	
Abstract	現在、コネクトームとよばれる、神経系における全ての神経回路を理解しようとする研究が行われている。コネクトームの解析において、MRIをもちいて軸索内の水分子の動きをとらえ、軸索走行を擬似的に視覚化する「トラクトグラフィー」は欠くことのできない技術であるが、ニューロンの形態や走行そのものを観測しているわけではない。 今回、脳にAAVベクターを用いて陰イオントランスポーター遺伝子Slco1a1を発現させ、その後ガドリニウムを含む造影剤 (Gd-EOB-DTPA) 取り込ませることによりニューロンの可視化を試みたが、ニューロンに造影剤が十分取り込まれなかったためMRIによる検出はできなかった。 At present, neuroscientists are trying to map the entire neural network in the brain, a process known as ‘connectome’ study. In this field, MRI is one of the most important tools to detect neuronal morphology. However, the morphology is a faulse image based on the movement of water molecules in axons, called ‘tractography’, so it is not an image of the neuron itself. In this study, we tried to visualize neurons by inducing cells to express the anion transporter gene Slco1a1 in the brain using AAV vectors, followed by administration of an MRI contrast agent (Gd-EOB-DTPA) containing gadolinium. However, the contrast agent was not sufficiently taken up by the neurons using this system, so the neurons could not be detected by MRI.
Notes	研究種目：基盤研究 (C) (一般) 研究期間：2022～2024 課題番号：22K12787 研究分野：神経科学
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_22K12787seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 7 年 5 月 19 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2022～2024

課題番号：22K12787

研究課題名（和文）遺伝学的MRIレポーターを導入した脳神経回路の全容解明

研究課題名（英文）Analyses of neuronal circuits using genetic MRI reporters

研究代表者

吉田 哲（YOSHIDA, Tetsu）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・特任講師

研究者番号：00365438

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）：現在、コネクトームとよばれる、神経系における全ての神経回路を理解しようとする研究が行われている。コネクトームの解析において、MRIをもちいて軸索内の水分子の動きをとらえ、軸索走行を擬似的に視覚化する「トラクトグラフィー」は欠くことのできない技術であるが、ニューロンの形態や走行そのものを観測しているわけではない。

今回、脳にAAVベクターを用いて陰イオントランスポーター遺伝子Slco1a1を発現させ、その後ガドリニウムを含む造影剤（Gd-EOB-DTPA）を取り込ませることによりニューロンの可視化を試みたが、ニューロンに造影剤が十分取り込まれなかったためMRIによる検出はできなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

コネクトーム研究の最終目標は、ヒト脳神経回路の全容解明であるため、トラクトグラフィーによる解析の重要性は非常に大きい。しかし、トラクトグラフィーの正当性の検証は手付かずの状況が続いている。本研究でMRIによるニューロンの可視化が成功し、トラクトグラフィーとの比較が可能になることにより、その正当性の証明や問題点の指摘ができれば、当該分野の既存の研究成果に大幅な見直しを迫る可能性を持つとともに、トラクトグラフィーを用いたコネクトーム研究に強い根拠を与えることが期待された。

研究成果の概要（英文）：At present, neuroscientists are trying to map the entire neural network in the brain, a process known as ‘connectome’ study. In this field, MRI is one of the most important tools to detect neuronal morphology. However, the morphology is a false image based on the movement of water molecules in axons, called ‘tractography’, so it is not an image of the neuron itself. In this study, we tried to visualize neurons by inducing cells to express the anion transporter gene Slco1a1 in the brain using AAV vectors, followed by administration of an MRI contrast agent (Gd-EOB-DTPA) containing gadolinium. However, the contrast agent was not sufficiently taken up by the neurons using this system, so the neurons could not be detected by MRI.

研究分野：神経科学

キーワード：MRI コネクトーム ニューロン AAVベクター

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脳神経科学領域において、「コネクトーム」研究とよばれる、脳の神経回路をすべて明らか位にする研究が盛んに行われている。このコネクトーム解析は、組織科学的解析以外に MRI を用いて軸索内の水分子の動きを捉え、軸索走行を擬似的に視覚化する「トラクトグラフィー」とよばれる技術が用いられている。特にヒト・コネクトームの解析は、この方法が必然的に主な解析法となっている。

2. 研究の目的

トラクトグラフィーはあくまで水分子の動きであり、ニューロンの携帯や走行そのものを観測しているわけではない。よって、今回トラクトグラフィーの正当性を評価するために、MRI 増益剤を用いてニューロン自体の形態を観察する新技術の開発を試みた。

3. 研究の方法

MRI を用いてニューロンの形態を観察するために、ガドリニウムとよばれる MRI 造影剤を用いることにした。

(1) ヒト腎臓由来培養細胞 293 細胞株に Slco1a1 細胞をトランスフェクションし、培地にガドリニウムを含む MRI 造影剤 Gd-EOB-DTPA 添加し、回収した細胞を MRI で測定した。

(2) 陰イオントランスポーター遺伝子 Slco1a1 を発現誘導する AAV ベクターを作製、精製し、マウス脳に注入した。1 週間後、当該マウスにおいて頸動脈から 20% マンニトール 200 μ l を投与し、その後 MRI 造影剤 Gd-EOB-DTPA を 500 μ l 投与した。そのマウスの頭部を MRI を用いて観察した。

4. 研究成果

(1) Slco1a1 およびコントロールとして GFP をトランスフェクションした 293 細胞株に、培地にガドリニウムを添加し、回収した細胞を MRI で観察した (図 1)。GFP をトランスフェクションした細胞ではシグナルは認められなかったが (図 1 左)、Slco1a1 をトランスフェクションした細胞においては強いシグナルが認められた (図 1 右、矢頭)。

(2) Slco1a1 を発現誘導する AAV ベクターを大脳皮質にインジェクションしたマウスを用いて同様の実験を行った。マウス脳における Slco1a1 の発現は、同 AAV ベクターによって発現誘導した GFP (Slco1a1-T2A-GFP) の発現により確認した。

① ガドリニウム造影剤によるニューロン形態の検出

上記マウスの左頸動脈にカテーテルを挿入し、500 μ l Gd-EOB-DTPA を注入した。その後、MRI を用いて頭部の観察を行ったがシグナルは検出されなかった。

② マンニトールによる血液脳関門解除による脳への造影剤移動の促進

上記マウスの左頸動脈にカテーテルを挿入し、血液脳関門の機能を一時的に障害する薬剤 20 % マンニトールを 200 μ l 注入し、5 分後、500 μ l Gd-EOB-DTPA を注入した。その後、MRI を用いて頭部の観察を行ったが、ウイルスをインジェクションしたと思われる近傍に弱いシグナルが観察された (図 2、矢頭)。

図 1: ガドリニウムを添加した 293 細胞の MRI 観察 (T1 強調画像)

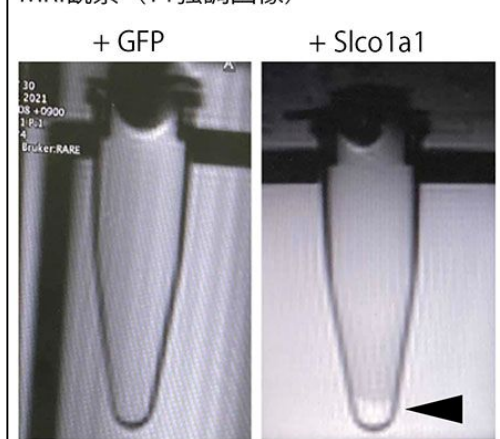
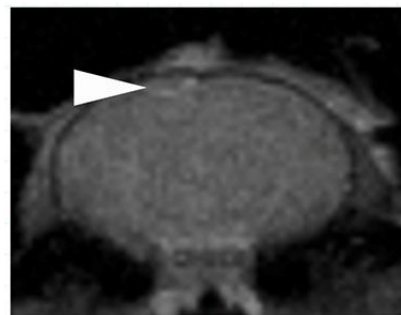


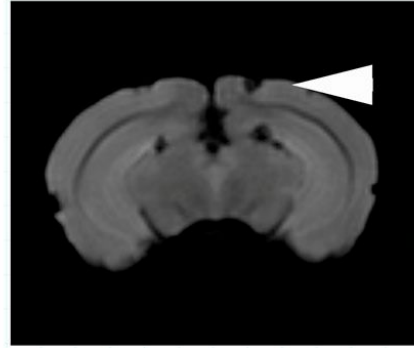
図 2: マンニトール投与後造影剤を投与したマウスの *in vivo* 画像 (T1 強調画像)



③ in vivo 観察でシグナルが観察された脳の ex vivo 観察

②の実験において、弱いシグナルが観察されたマウスの脳について、弱いシグナルでも感度よく検出できるよう、脳を取り出し長時間の観察を行った。しかし、シグナルは消失した。

図3：マウス脳のex vivo 観察（T1強調後像）



（3）293 細胞株においては、Slco1a1 の強制発現によりガドリニウム造影剤による MRI を用いた細胞の可視化が可能となった。

しかし、マウス脳においてはガドリニウム造影剤のシグナルを検出することはできなかった。血液脳関門の機能を一時的に解除させるマンニトールの注入により、非常に弱くではあったがシグナルが確認できたことから、ニューロンにおけるガドリニウムの取り込み量が少なかったためであると考えられた。

また、ガドリニウムのシグナルが検出された脳の ex vivo 観察においてシグナルが消失したのは、ガドリニウムが細胞内に長時間とどまることができなかったことが考えられる。

結論として、ガドリニウム造影剤による in vivo でニューロンを検出するためには、更なる技術の改善が求められる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hayashi Naoya, Hata Junichi, Yoshida Tetsu, Yoshimaru Daisuke, Haga Yawara, Oshiro Hinako, Oku Ayano, Kishi Noriyuki, Shirakawa Takako, Okano Hideyuki	4. 巻 19
2. 論文標題 Identification of the reporter gene combination that shows high contrast for cellular level MRI	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0297273
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0297273	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 —

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 吉田哲、井上謙一、兼子峰明、高田昌彦、岡野栄之
2. 発表標題 アデノ随伴ウイルスベクターを用いたマーマセット全脳への効率の良い遺伝子導入法の開発
3. 学会等名 第11回 日本マーマセット研究会大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

—

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	畑 純一 (HATA Junichi) (00568868)	東京都立大学・人間健康科学研究科・准教授 (22604)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------