

THE REPORT OF STUDY RESULT BY SUBSIDY

第30回 磁気健康科学研究助成 研究成果報告書

公益財団法人

渡邊財団

THE WATANABE FOUNDATION
SINCE 1994

助 成 研 究 成 果 報 告 書

第30回

(研究期間：令和6年4月1日～令和7年3月31日)

30周年記念特別助成2021

(研究期間：令和4年4月1日～令和7年3月31日)

目 次

巻頭言	1	理事長 小谷 誠
I. 基礎研究		
I-1. 超低周波磁場による骨修復促進機構の解明	3	金沢大学 准教授 小林 功
I-2. 磁性ナノ粒子を用いた安全性に優れた細胞免疫療法の開発	6	慶應義塾大学医学部 専任講師 井上 聡
I-3. 定常状態誘発磁場による非侵襲的な言語機能マッピング	9	九州大学・人文科学研究院・言語学講座 助教 山田 絵美
I-4. 永久磁石と磁場モジュレーターを組み合わせた再生筋組織構築技術の開発	12	福井工業大学 教授 古澤 和也
I-5. 磁性ナノ粒子／生体物質凝集体の磁氣的性質の変化を利用したバイオ検出法の開発	16	東北大学 教授 藪上 信
II. 応用研究		
II-1. 筋層浸潤膀胱癌のナノ粒子を用いた膀胱温存療法の確立	21	名古屋市立大学大学院腎・泌尿器科学分野 臨床研究医 権田 将一
II-2. 反復末梢性磁気刺激の痙縮治療における機序の解明	24	慶應義塾大学医学部リハビリテーション医学教室 助教 紙本 貴之
II-3. トンネル磁気抵抗素子センサを用いたビデオ脳磁図モニタリングシステムの開発	27	東北大学大学院医学系研究科神経内科学分野、てんかん学分野 医員 此松 和俊
II-4. 磁性ナノ粒子を用いた神経障害性疼痛の遠隔治療法の開拓	30	東京理科大学先進工学部 准教授 上村 真生 ＜この研究は岡井治特別研究助成に選ばれました＞
III. テーマ指定研究		
III-1. 経頭蓋静磁場刺激が有する脳内ネットワーク調節作用の神経生理学的解明	33	新潟医療福祉大学 教授 芝田 純也
III-2. 生物の磁力応答機構の解明	36	東京大学 先端科学技術研究センター 特任研究員 小林 和弘
III-3. 脳脊髄同時磁気共鳴画像による随意運動能力の回復を支える脳脊髄連関の定量化法の確立	39	公益財団法人 東京都医学総合研究所 研究員 臼田 升
IV. 30周年記念特別助成2021		
IV-1. 治療抵抗性統合失調症に対する最新鋭ニューロモデュレーションの開発	42	慶應義塾大学医学部精神神経科学教室 専任講師 中島 振一郎

巻 頭 言

公益財団法人 渡邊財団

理事長 小 谷 誠

今から丁度50年前に私は米国のマサチューセッツ工科大学（MIT）に留学して、人間の身体から発生する微弱な磁気を計測して、病気の診断に役立てようとする研究を2年間行い、帰国後も生体磁気計測の研究を続けてきました。

人間の心臓や脳からは微弱な磁気が発生していることは以前から推定されていましたが、この微弱な磁気を計測できる磁束計がありませんでした。ところが、1970年代に超伝導技術を応用した超高感度のSQUID磁束計が米国立研究所とMITの共同研究で開発されました。

MITではこのSQUID磁束計を用いて、心臓から発生する磁気の計測に成功し、更に心臓磁気の千分の1程度の脳から発生する磁気計測に挑戦している頃、私はMITに留学しました。

私がMITに留学した頃、MITの研究所では大変なことが起っていました。それは、米国の著名な医師が、「MITのグループは心臓や脳の神経活動に伴って発生する磁気を計測していると言っているが、それは間違いである。彼らの計測している磁気は血液の中の鉄分が地磁気を乱している磁気を計測しているのにすぎない」と新聞で批判していました。その結果、MITの生体磁気計測の研究への米国の公的研究費は大幅に削減されていました。

私は、この医師の意見は理にかなっていると思って、10数名の健常者の血液を採取してSQUID磁束計で計測しましたが、血液は全く磁性がないことがわかりました。

鉄自体は常に磁性を持っていますが、鉄が酸素と結合する仕方によって強い磁性を持ったり、全く磁性を持たなくなったりします。血液中の鉄は全く磁性を持たないように酸素と結合しています。

人間の祖先がこの世に登場し、立って歩き、言葉を交わすようになったのは、今から200万年程前と云われています。この間に、地磁気の大きさと方向は10回ほど変わっています。このように地磁気の大きさや方向が大きく変わる環境の中で人間は進化してきましたので、地磁気の影響はあまり受けないように人体はできています。

ところが、人間が電気を使うようになったのは、僅か200年ほど前からです。そのため、人体は電気に対しては防衛能力が進化しておらず、大変敏感に反応します。例えば、心臓の表面に数ボルトの電圧を加えると心臓は正常に働かなくなります。ところが、外部から心臓に磁気を加えて心臓を止めることは大変困難です。

このような人体の特徴から電気治療器は即効性がありますが、取り扱いを間違えると大変危険です。それに対して、磁気治療器は危険性は少ないが、時間をかけてじっくり治療する必要があると思われます。

本財団は生体磁気現象を通して国民の医療と健康に貢献することを目的として、学術研究を助成し、講演会を開催するなど、社会に向けた活動をしています。しかし、磁気的作用は、基礎的現象から始まり、体内の複雑な相互作用への関与を通して生じるものであり、短期間の実験試行ではなく、長期間腰を落着けて追求して初めて明らかにされることが多いのです。

いっぽう昨今の学界においては、短期間に成果を挙げ、学位や業績に結びつけようとする雰囲気強く、原因結果の関係が明白な現象や、客観的に説明できる現象に関心が集中するよう見受けられます。これに対して本財団は、性急に成果を求めようとするよりも、長期間にわたる努力を覚悟して特定の問題に取り組む学究の徒を支援したいと考えています。

この報告書は、令和5年度に助成した研究の報告書を、原文のままにまとめたものです。基礎面から実際の応用にいたる広い範囲の研究が含まれていますが、いずれもこの領域に新しい道を拓くことを目指しています。この報告書が契機となり、志を同じくする研究者へ情報が伝わり、磁気健康科学の発展に貢献することを期待しています。

超低周波電磁場による骨修復促進機構の解明

Mechanisms of Bone Repair-enhancing Effects of Extremely Low-Frequency Electromagnetic Fields

小林功*, 柿川真紀子*, 山田外史**, 鈴木信雄**

Isao Kobayashi*, Makiko Kakikawa*, Sotoshi Yamada**, Nobuo Suzuki**

*金沢大学理工研究域生命理工学系, 〒920-1192 石川県金沢市角間町

**金沢大学環日本海域環境研究センター, 〒920-1192 石川県金沢市角間町

* Faculty of Biological Science and Technology, Institute of Science and Engineering, Kanazawa University, Kakuma-machi, Kanazawa, Ishikawa 920-1192 Japan

**Institute of Nature and Environmental Technology, Kanazawa University, Kakuma-machi, Kanazawa, Ishikawa, 920-1192 Japan

Abstract

Electromagnetic fields (EMFs) have received extensive attention for treatment of bone disorders; however, their effects on tissues/cells are vary, which has been a bottleneck in understanding the effects of EMFs on bone tissue. Utilizing zebrafish fractured scales, we found that exposure to 10 millitesla (mT) of extremely low-frequency EMFs (ELF-EMFs) at 60 Hz increased the number of osteoblasts and osteoclasts. This promotive effect of ELF-EMFs was attributed to the activation of the Wnt/ β -catenin signaling pathway. Inhibition of the Wnt/ β -catenin pathway reduced the effect of ELF-EMF exposure. Our data provide in vivo evidence that ELF-EMFs have a facilitative effect on fracture healing.

Keywords: osteoblast, osteoclast, extremely low-frequency electromagnetic fields, Wnt/ β -catenin signaling, zebrafish scale

1. 目的

超高齢化社会といわれる現代の日本では、高齢者も健康で自立した生活を送れる“健康寿命”を延ばすことが必要とされる。高齢者に多い疾患の一つに、骨の強度が低下し、骨折しやすくなってしまう骨粗しょう症が挙げられる。高齢者の骨折は、治療が長引くと、筋力低下を招き、寝たきりの原因ともなるため、骨折からの早期の復帰は、我が国の健康寿命を延ばす上で重要な課題といえる。

骨は破骨細胞と骨芽細胞という2種類の細胞によって常に代謝が行われる。破骨細胞は古くなった骨を溶かして吸収するのに対し、骨芽細胞は

細胞外マトリックス（組織の足場を構成するタンパク質）を石灰化して骨をつくるはたらきを持つ。この2種類の細胞のバランスによって、骨は常に一定の強度を保つことができる。電磁場には骨修復を促進する効果があると考えられており、非侵襲的で安全性の高い治療法として、古くから注目されていた。しかしながら、電磁場の骨修復促進に関するメカニズムについては未だ不明な点が多い。

魚類の鱗（うろこ）は、哺乳類の骨と相同な器官であり、破骨細胞と骨芽細胞による骨代謝が行われる。哺乳類の骨は内部の様子を観察することが難しいのに対し、魚類の鱗は体表に分布するた

め、破骨細胞および骨芽細胞の挙動を観察しやすいという特徴がある.¹⁾ そこで本研究では、ゼブラフィッシュの鱗モデルを用いて、骨修復過程で超低周波電磁場が骨組織において、どのような細胞に対し、どんな分子機構で骨修復を促進するのかについて明らかにすることを目的とした。

2. 方法

超低周波電磁場によって発現変動する遺伝子の特徴を明らかにするため、小型のハサミで鱗に切り込みを入れ、骨折状態を誘導したゼブラフィッシュを電磁場発生装置へ設置し、60 Hz、10 millitesla (mT)で4時間暴露した。骨折刺激から24時間後に鱗を摘出し、RNA-seqによる遺伝子発現解析を行った。

超低周波電磁場の暴露に伴って増加する Wnt シグナルが骨修復の促進に関与するか調べるため、骨折状態を誘導したゼブラフィッシュから鱗を摘出し、IWR-1-ebdo (Wnt 阻害剤) または DMSO を含む培地に入れ、10 mT で4時間暴露した。その後、骨折刺激から24時間後に鱗の破骨細胞 (*trap:GFP* 標識) および骨芽細胞 (*osterix:mCherry* 標識) の数をフローサイトメトリーによって調べた。

3. 結果

これまでの研究から、鱗に骨折刺激を加えたゼブラフィッシュを、60 Hz の超低周波電磁場で10 mT、4時間暴露すると、*trap:GFP* で標識される破骨細胞、および *osterix:mCherry* で標識される骨芽細胞の両方に増加が認められた。そこで、超低周波電磁場の暴露に伴って発現変動する遺伝子を探索するため、同様に10 mT の暴露を行ったゼブラフィッシュから鱗を採取し、RNA-seqによる遺伝子発現解析を行った。その結果、10 mT 暴露群では非暴露群に比べ、Wnt シグナルおよび Notch シグナルの標的遺伝子に有意な発現増加が認められた (図1)。実際に、10 mT 暴露群では *wnt10b* などの Wnt リガンド、および *jag1b* などの Notch リガンドの発現が増加しており、10 mT の暴露に伴って Wnt および Notch シグナルが活性化していることが示唆された。興味深いことに、Wnt シグナルによって安定化する β -catenin は10 mT 暴露に

よって、主に骨折部位近傍に分布する上皮細胞で増加しており、Wnt/ β -catenin シグナルを介して、骨修復が促進されている可能性が考えられた。

10 mT vs. Unexposed (24 h.p.fr.)

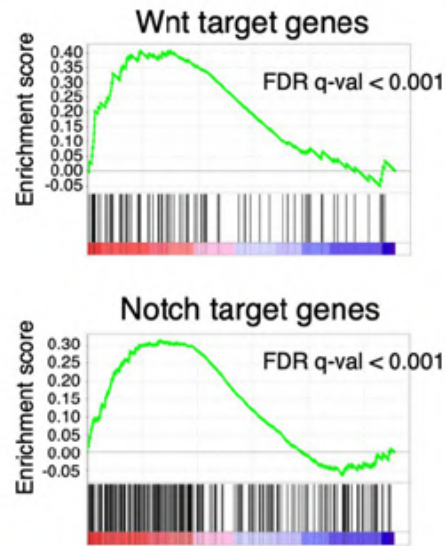


図1 Wnt および Notch 標的遺伝子における Gene set enrichment analysis (GSEA)

そこで次に、骨折刺激を加えたゼブラフィッシュの鱗を採取し、Wnt/ β -catenin シグナルの阻害剤である IWR-1-endo または DMSO を含む培地へ入れ、10 mT、4時間の暴露を行った後に、鱗における破骨細胞および骨芽細胞の数を比較した。その結果、DMSO 処理群では10 mT 暴露に伴って破骨細胞および骨芽細胞の両方が増加したのに対し、IWR-1-endo 処理群では、10 mT 暴露を行っても破骨細胞および骨芽細胞の増加が見られなかった (図2)。

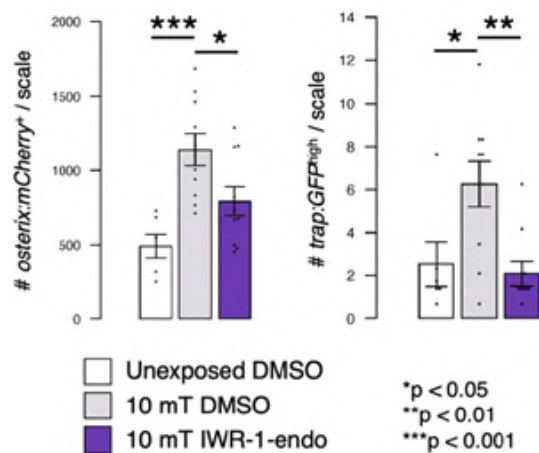


図2 Wnt 阻害の骨芽細胞と破骨細胞への影響

4. 考察

本研究では、超低周波電磁場による暴露によって、鱗における Wnt シグナルが高まり、主に骨折部位の上皮細胞がそのシグナルを受け取って骨芽細胞と破骨細胞の活性化を誘導している可能性が示唆された。

主に培養細胞を用いたこれまでの研究では、電磁場は骨芽細胞に対しては促進的にはたらくのに対し、破骨細胞への直接的な影響は抑制的であることが報告されている。²⁾⁴⁾ 本研究ではゼブラフィッシュ鱗を用いて電磁場の影響を骨芽細胞および破骨細胞の両方について検討したところ、10 mT, 4 時間の暴露では最終的に骨芽細胞および破骨細胞の両方に増加が認められた。このことは、電磁場が破骨細胞に対して抑制的に作用しても、骨芽細胞を活性化することで、新たに破骨細胞の分化が促進され、結果的に破骨細胞の活性も高める効果がもたらしているものと考えられる。

50-60 Hz は世界で最も普及している交流電源の周波数であることから、これらの周波数で発生す

る正弦波電磁場は医療機器として応用しやすいというメリットがある。そのため、本研究で使用した 60 Hz の正弦波電磁場が骨修復に対して促進的に作用するという点は、骨疾患に対する治療への応用にもつながる有用な知見といえる。

謝辞

この研究は公益財団法人渡邊財団の補助を受けて実施したものである。また、研究内容の一部は 2024 年 Biomedical Research (Tokyo) にて発表した (Suzuki et al., Biomed Res. 2024)。

参考文献

- 1) Kobayashi-Sun J et al: Commun Biol. 3 (1), 190 (2020)
- 2) Esposito M et al: Vivo 26 (2), 299–304 (2012)
- 3) Zhou J et al: Rheumatol Int. 33 (5), 1135–1141 (2013)
- 4) Di Bartolomeo M et al: Biol. (Basel) 11 (3), 402 (2022)

磁性ナノ粒子を用いた安全性に優れた細胞免疫療法の開発

Development of safe and effective immunotherapy

井上 聡

Satoshi Inoue*

*慶應義塾大学医学部, 〒160-8582 東京都千代田区東町 1-1

* Keio University School of Medicine

35 Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo 160-8582 Japan

Abstract

Chimeric Antigen Receptor (CAR) T-cell immunotherapy has rapidly gained attention due to its remarkable therapeutic effects against certain malignant tumors; however, it faces challenges such as side effects such as Cytokine Release Syndrome (CRS). The objective of this research is that achievement of a safer CAR-T cell therapy by incorporating substances into magnetic lipid nanoparticles that can absorb and break down the causative agents of CRS.

Keywords: CAR-T cell, Cytokine Release Syndrome, Immunotherapy, Magnetic nanoparticle

1. 目的

キメラ抗原受容体(chimeric antigen receptor, CAR) T細胞に代表されるように、特定のがん抗原を認識するT細胞を体外で準備して輸注する免疫細胞療法が難治がんに対する治療法として注目されている。抗がん剤などの化合物とは異なり、遺伝子改変技術による機能改変が可能であることから、輸注後の生体内で大量増殖(=大量生産)することから、“生きた薬”として脚光を浴びている。しかしCAR-T細胞治療法の問題点の一つとして、サイトカイン放出症候群(CRS)などの副作用といった課題を抱えている。CRSは腫瘍局所に存在する免疫細胞が産生する炎症性サイトカイン(IL-6やIL-1 β)が全身への過剰放出が主原因とされる。これは増殖したCAR-T細胞により体の中のマクロファージという免疫細胞が活性化され、炎

症に関わるサイトカインであるIL-6が血液中に放出されることにより起こると考えられている。CAR-T細胞療法の治療効果が高まると必然的に副作用も強くなってしまふことから、有効性と安全性を両立させる必要がある。副作用を軽減させる手段の一つとして、CAR-T細胞を腫瘍局所に集積させ、炎症性サイトカインを吸収可能な新規の治療モダリティの開発が求められている。そこで本研究では、遺伝子改変技術を活用し、炎症性サイトカインを吸収可能なCAR-T細胞を作出することで、より安全なCAR-T細胞治療法の開発基盤を構築することを目的とする。本研究で開発する炎症性サイトカイン吸収型CAR-T細胞の作出技術を基盤として、磁性ナノ粒子を用いて腫瘍局所にCAR-T細胞を集積させることでより安全性に優れた治療法を実現させることを研究目標と

する。

2. 方法

人工キメラサイトカイン受容体(G6/7R)を発現する CAR-T 細胞の作出

副作用の原因物質である IL-6 を捕捉・分解しつつ、CAR-T 細胞の増殖・持続性に必要となる自己活性型 IL-7 シグナルの恒常的活性化型 CAR-T 細胞を作出することにした。IL-6 受容体 α 鎖 (IL6RA) と共受容体 GP130 の細胞外ドメインを組み合わせ、細胞内には自己活性型変異を持つ IL-7 受容体 (IL-7R α) のドメインを融合させたキメラサイトカイン受容体をデザインし、これを G6/7R と命名した。この人工サイトカイン受容体が CAR-T 細胞の細胞表面には発現すれば、G6/7R は IL-6 を高親和性で捕捉し、同時に JAK-STAT 経路を介した IL-7 様シグナルを恒常的に活性化することが期待される。(図 1)

G6/7R CAR-T 細胞の機能解析

末梢血単核球由来の T 細胞に G6/7R と CAR 遺伝子を遺伝子導入することで、体外で G6/7R CAR-T 細胞を作出した。続いて、G6/7R CAR-T 細胞の抗腫瘍能及び IL-6 吸収・分解能を *in vitro* 及び *in vivo* で検証した。



図1 キメラサイトカイン受容体CAR-T細胞の構造

3. 結果

G6/7R CAR-T 細胞の *in vitro* 機能解析

申請者が所属する吉川聡明博士が中心となって実行した。G6/7R を導入した CAR-T 細胞は、IL-6 の存在下でも STAT5 及び STAT3 のリン酸化が促進され、JAK-STAT 経路が活性化された。RNAseq 解析を行ったところ、抗アポトーシス遺伝子 (BCL2、BCL3) やエフェクター機能関連遺伝子 (GZMB、FOSL1、FOSL2) の発現が上昇し、長期的な生存とエフェクター機能の向上が示唆さ

れた。G6/7R の細胞内ドメインに M452L 変異を導入した G6/7R-M452L は、STAT5 シグナルを維持しつつ、Akt 経路の活性化を抑制します。この変異により、CAR-T 細胞の分化阻害による未分化性 CAR-T 細胞の割合が増加した。以上の結果から、本研究で作成した G6/7R_CAR-T 細胞は、長期生存能やエフェクター機能といった生体内での抗腫瘍効果に必要とされる機能が向上されたか可能性が示唆された。

さらに、さらに、G6/7R CAR-T 細胞は、IL-6 を捕捉・分解できることを確認した(図 2)。

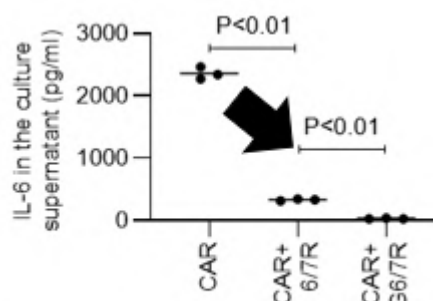
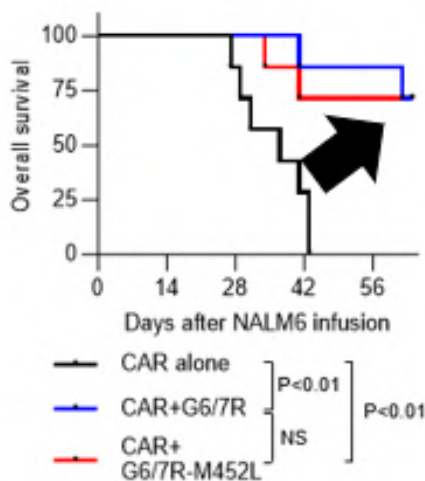


図2 炎症性サイトカイン吸収・分解能

in vivo での抗腫瘍効果と安全性

白血病及び膵臓がんマウスモデルにおいて、G6/7R 及び G6/7R-M452L を導入した CAR-T 細胞は、従来の CAR-T 細胞と比較して、優れた腫瘍抑制効果と生存率の向上を示した(図 3)。また、これらの CAR-T 細胞は、体内での持続性が高く、長期的な効果が確認された。CAR-T 細胞の副作用として知られている体重減少や神経症状は観察されなかったため、副作用を伴わない安全性も改善された可能性が示唆された。

以上の通り、本研究で作出した次世代型 CAR-T 細胞は、当初の期待通り、治療効果と安全性を両立可能な治療法の実現に向けた開発に向けた土台となるものと思われる。



**図3 腫瘍マウスモデルにおける
治療効果の改善**

4. 考察

本研究では、キメラ型サイトカイン受容体「G6/7R」及びその改良型「G6/7R-M452L」が、CAR-T 細胞の抗腫瘍効果と持続性を高めると同時に、IL-6 や IL-1 β に起因する副作用 (CRS や ICANS) を軽減する潜在能力を示した。G6/7R は IL-6 を捕捉・分解する能力を持ちつつ、自己活性型 IL-7 様シグナルを恒常的に活性化することで、T 細胞の生存・機能維持に寄与する。さらに M452L 変異を加えることで、T 細胞の過剰な分化を抑制し、未分化性 CAR-T 細胞の割合を高めるなど、長期的な効果が期待される。さらに IL-6 受容体に加えて、IL-1 β のデコイ受容体 (IL1R2) との併用により、副作用のさらなる抑制も可能であることが示された。本研究成果は、抗原依存性に制限されずにさまざまな CAR-T や TCR-T 療法への応用が期待されることから、今後の臨床応用に向けた研究が進められると考えられます。一方で、今回開発したキメラ型サイトカイン受容体 CAR-T 細胞は、腫瘍局所への効果的な集積能については機能改善が見込めないため、更なる対策を講じる必要がある。即ち、磁性ナノ粒子を活用することで、腫瘍局所への集積能を高めることで、より効果的な抗腫瘍能に加え、副作用の軽減を更に高めることが可能になると思われる。

謝辞

この研究は渡邊財団の補助を受けて実施したものである。今後、学会発表及び論文発表に向けて研究を展開する予定である。

参考文献

- 1) Morris EC., Neelapu SS, Giavridis T, Sadelain, M. Cytokine release syndrome and associated neurotoxicity in cancer immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 22, 85-96. 10.1038/s41577-021-00547-6. (2022).
- 2) Yoshikawa T, Ito Y, Wu Z, Kasuya H, Nakashima T, Okamoto S, Amaishi Y, Zhang H, Li Y, Matsukawa T, Inoue S, Kagoya Y. (2024) Development of a chimeric cytokine receptor that captures IL-6 and enhances the antitumor response of CAR-T cells. (2024) *Cell Rep Med* 5: 101526. (2024).

定常状態誘発磁場による非侵襲的な言語機能マッピング

Noninvasive Brain Mapping of Language Function Using Steady-State Induced Magnetic Fields

山田絵美

Emi Yamada

九州大学人文科学研究院, 〒819-0395 福岡県福岡市西区元岡 744

Faculty of Humanities, Kyushu University

744 Motooka, Nishi-ku, Fukuoka 819-0395 JAPAN

Abstract

In focal resection surgery for epilepsy, it is crucial to identify the localization of brain function and determine the resection area. The steady-state evoked potential (SS-EPs) method involves presenting stimuli at a constant frequency, allowing us to detect peaks at frequencies that correspond to the stimulus in specific brain regions. This study aims to investigate the feasibility of noninvasively mapping language-related brain functions using magnetoencephalography (MEG) with the steady-state evoked magnetic field (SS-EFs) method. Our results suggested that this method could be valuable for noninvasive brain mapping and understanding the differences in kanji and hiragana reading processes.

Keywords: magnetoencephalography, steady-state evoked magnetic field, language, brain mapping

1. 目的

抗てんかん薬が効かない難治性てんかん患者は、外科的手術によって発作を抑制する。この外科的手術では、脳機能の局在性（刺激に選択的に反応する領域）を同定して切除部位を決定することが重要であり、これを脳機能マッピングという。頭蓋内に電極を留置し言語機能の領域を特定する手法が言語機能マッピングとして有用だが非常に侵襲性が高いという問題点がある。

定常状態誘発電位（SS-EPs）は、刺激頻度が 3.5 Hz 以上の律動的な反復刺激で、各刺激に対する反応が重畳して一定の周波数をもつ正弦波様の波形となる。このため、時系列で得られた神経応答データを高速フーリエ変換（Fast Fourier Transform: FFT）し周波数領域表現に変換すると、刺激頻度に同期した整数倍周波数の反応が観察される。近年では、顔¹⁾や文字²⁾の認知、言語処理

³⁾などの高次脳機能において、刺激に選択的に反応する領域でのみ刺激の呈示頻度に反応することが示されている。以上から、単語を律動的に呈示することによって、言語機能マッピングが可能ではないかと考えられる。

脳磁図は時間と空間分解能に優れる非侵襲的な脳機能計測機器であり、皮質の活動を推定することができる。脳磁図で単語刺激による定常状態誘発磁場（Steady-State Evoked Field: SS-EFs）を記録することで、非侵襲的な言語機能マッピングが可能であるかを検討する。

2. 方法

実験には健常成人 26 名（男性 13 名、女性 13 名、平均年齢 21.8±1.63 歳）が参加した。参加者は日本語を第一言語とし、エディンバラの利き手テストで左利きであること、正常視力であることを事

前に確認した。九州大学病院の脳磁図 (Neuromag, MEGIN) を用いて、言語課題を遂行中の脳活動を記録した。

実験では、単語を 4 Hz (1 秒間に 4 単語) の頻度で 1 セッション 12 秒間 (計 48 単語) 呈示し、漢字と平仮名の条件をランダムに実施した。漢字条件では 3 単語目を平仮名とし (漢字・漢字・平仮名・漢字)、平仮名条件では 3 単語目を漢字とした (平仮名・平仮名・漢字・平仮名) (図 1)。このため、解析の応答周波数は 1.3 Hz (3 文字目に対する反応) と 4.0 Hz (視覚入力に対する反応) となる。つまり、1.3 Hz は単語認知に関連する反応 (漢字条件では平仮名、平仮名条件では漢字) であり、4.0 Hz は単語の視覚入力に対する反応となる。課題に用いた単語は現代日本語書き言葉均衡コーパスから、漢字、平仮名ともに 2 または 3 文字・音で表される名詞 (例: 天気, てんき) を使用した。

脳磁図データは MNE-Python ソフトウェアを用いて解析した。データは 0.1 ~ 84 Hz の帯域フィルターをかけた後、独立成分分析により眼球運動などのノイズ除去処理を行った。LCMV beamformer 法で電流源の推定を実施した。最初の単語が呈示された時を 0 秒とし、刺激呈示から 1 セッション (12 秒) のうち最初の 2 秒を除外した 10 秒間を解析区間とした。周波数データは FFT 後に振幅スペクトルを求め、応答周波数を中心として前後 0.5 Hz 分のデータ (計 11 bin) を応答周波数 (1f) とその 2 倍である周波数 (2f) から取得し、1f と 2f の合計した振幅スペクトルを Z スコアに変換し、Z スコアが 1.96 ($p < 0.05$) より大きい値を持つものを選定した。

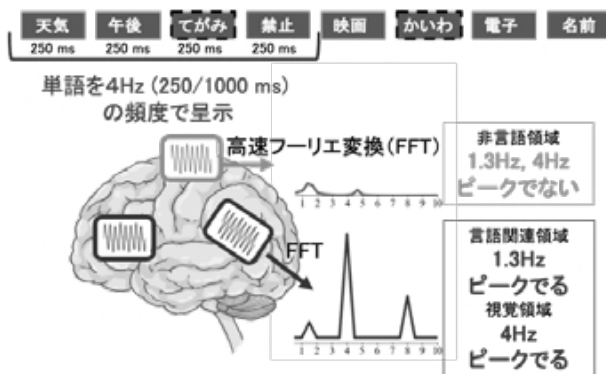


図 1 定常状態誘発反応と言語課題

3. 結果

単語の呈示頻度である 4 Hz では、早期の視覚処理システムである左半球腹側の外側後頭葉 (lateral occipital complex: LOC) と紡錘状回上の視覚性単語形状領域 (visual word form area: VWFA) が大きく活動した (図 1 下)。一方で、3 単語目に対する反応である 1.3 Hz では、左側頭葉の言語関連領域の活動が大きくなった (図 1 上)。

応答周波数が有意に大きい領域を Z スコアで決定した。漢字条件の 4.0 Hz では視覚野及び VWFA (図 2 下), 1.3 Hz の平仮名に対する反応では、ブローカ野を含む弓状束に沿って有意となる領域が確認された (図 2 上)。

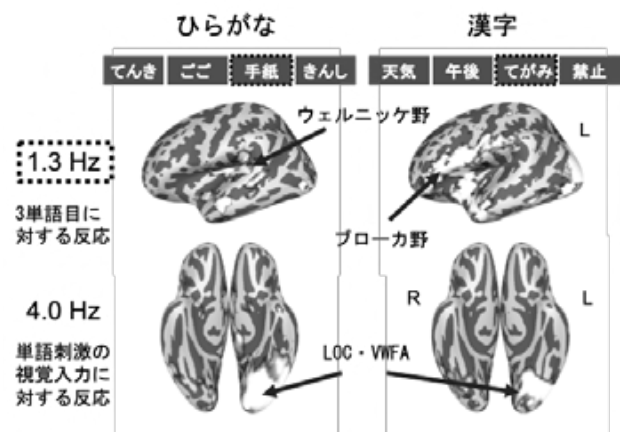


図 2 振幅スペクトルの応答周波数の活動

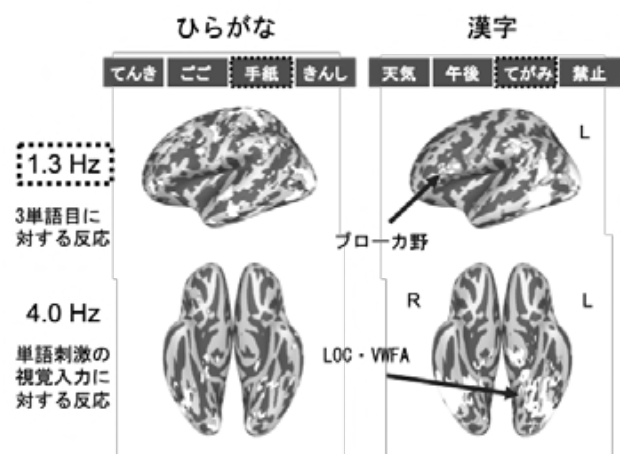


図 3 Z スコアによる応答周波数の有意な領域

4. 考察

振幅スペクトルの結果、漢字と平仮名条件の両方で、応答周波数が4.0 Hzでは視覚領域、1.3 Hzでは言語関連領域（ブローカ野とウェルニッケ野）の活動が確認された。1.3 Hzでは、漢字条件（ウェルニッケ野）と平仮名条件（ブローカ野）で活動領域に違いが見られた。これは、表意文字である漢字と表音文字である平仮名の処理経路に違いがあることを示唆している。

振幅スペクトルのZスコア（ $p < 0.05$ ）では、漢字条件の1.3 Hz（平仮名に対する反応）で、ブローカ野からブローカ野とウェルニッケ野をつなぐ弓状束の応答周波数が有意に大きいことが示された。しかし、平仮名条件（漢字に対する反応）では言語領域での活動は確認されなかった。平仮名は音韻処理と直結しているため、短い呈示時間では平仮名条件の方が素早く言語処理されると考えられる。

漢字条件の4.0 Hzでは視覚野および視覚性単語形状領域（VWFA）が有意な領域であった。さらに、顔や物体の認知処理を行うとされる右の紡錘状回も有意であった。漢字は左だけでなく右の初期視覚野も活動することが報告されており^{4), 5)}、漢字は平仮名とは異なる処理経路であると考えられている。本結果は、この結果を支持するものであった。

謝辞

この研究は公益財団法人渡邊財団による第30回磁気研究助成の補助を受けて実施したものである。本論文の内容は2025年11月に開催される『第55回日本臨床神経生理学会』で報告する予定である。

参考文献

- 1) Jacques et al. (2016) A face-selective ventral occipito-temporal map of the human brain with intracerebral potentials. PNAS.
- 2) Lochy et al. (2015) A robust index of lexical representation in the left occipito-temporal cortex as evidenced by EEG responses to fast periodic visual stimulation. Neuropsychologia.
- 3) Ding et al. (2016) Cortical tracking of hierarchical linguistic structures in connected

speech. Nat Neurosci.

- 4) Liu and Perfetti. (2003) The time course of brain activity in reading English and Chinese: an ERP study of Chinese bilinguals. Hum Brain Mapp.
- 5) Tan et al. (2000), Brain activation in the processing of Chinese characters and words: a functional MRI study. Hum Brain Mapp.

永久磁石と磁場モジュレーターを組み合わせた

再生筋組織構築技術の開発

Development of construction methods engineered muscle tissues combining permanent magnets and magnetic field modulators

古澤 和也*

Kazuya Furusawa*

*石川県立大学, 〒921-8836 石川県野々市市末松 1 丁目 308

*Faculty of Bioresources and Environmental Sciences, Ishikawa Prefectural University
1-308 Suematsu, Nonoichi City, Ishikawa Prefecture 921-8836, Japan

Abstract

We have developed a cell patterning method using a compact device consisted of permanent magnets and a magnetic field modulator to form grid-like magnetic gradients. The device enables long-term cultivation of cells in modulated magnetic fields inside a CO₂ incubator. By using the device, fiber-like cell aggregates (FCAs) consisted of mouse myoblasts (C2C12) or bovine vascular endothelial cells (HH) were constructed. The effects of magnetic field exposure time and concentration of EDTAMn(II)Na on FCA formation were investigated. Furthermore, we constructed a complex engineered tissue by seeding C2C12 on the FCAs prepared from HH.

Keywords: Cell Patterning, Cell Aggregates, Engineered Muscle Tissue

1. 目的

動物細胞を培養基盤上に格子状などの規則的な図形を描いて接着させる技術を細胞パターンニング技術とよぶ。この技術により、細胞の時空間的な動体の追跡や、生体組織の規則的な構造の一部を再現することができる。しかし、フォトリソグラフィ法などの従来の技術では、専用の設備やノウハウが必要という制限がある。

木村らは電磁石で生じる強磁場 (2 T) をアルミと鉄の板を交互に積層した磁場モジュレーターで変調して培養基盤上に格子状の磁場勾配を形成することで細胞を格子状にパターンニングする技術を開発している¹。この方法は従来法よりも容易かつ低コストで細胞をパターンニングすることが可能だが、磁場の発生のために大きな電磁石が必要という制限がある。

最近我々は、永久磁石と磁場モジュレーターを組み合わせて、木村らの方法と同様のパターンニング実験が可能であることを示した。この方法では、従来法の装置よりも大きさがコンパクトなので、CO₂ インキュベーター内で磁場を維持したまま細胞を長時間培養することができる。

本研究では、永久磁石と磁場モジュレーターを組み合わせた細胞パターンニング装置を用いて、変調した磁場を維持した状態で細胞を長時間培養し、制御された形態の細胞凝集塊 (Cell Aggregate: CA) をつくる技術を確認することを目的とする。

2. 方法

実験には、マウス由来筋芽細胞細胞株 (C2C12) とウシ冠動脈由来血管内皮細胞 (HH) を用いた。10%ウシ胎児血清、1%Penicillin-Streptomycin、1%

表 1. 細胞凝集塊構築実験に及ぼす T_M と C_E の濃度の影響

T_M (h)	C_E (mM)					
	25		30		50	
	形態	細胞生存率	形態	細胞生存率	形態	細胞生存率
2	格子状の パターン	良好	格子状パ ターン	良好	線維状細 胞凝集塊	良好
24	格子状の パターン	良好	格子状の パターン	良好	線維状細 胞凝集塊	死細胞が多い

非必須アミノ酸溶液, および 1% Glutamax を含む DMEM を増殖培地とした。常磁性分子として EDTAMn(II)Na を含む増殖培地 (磁性培地) を調整した。

厚さ 0.2 mm のアルミ板と SUS430 板を交互に積層して磁場モジュレーターを自作した。永久磁石として 30 mm×30 mm×30 mm のネオジム磁石を用いた (表面磁束密度 = 0.5 T)。永久磁石と磁場モジュレーターを組み合わせたものを磁場印加装置と呼ぶ。実験の効率化のため、磁場印加装置の固定治具を作った。この固定治具には磁場印加装置を 4 個並べて配置できる。内径 10 mm、外形 12 mm、高さ 10 mm のガラスリングの底に直径 12 mm の円形カバーガラスを張り付けて培養容器を作成した。培養容器のふたは 3D プリンターで作製した。磁場印加装置と、CA 構築実験の様子を図 1 に示した。

C2C12 の CA 構築実験では、培養容器の EDTAMn(II)Na の濃度 ($C_E = 25\text{mM}$, 30 mM, および 50 mM)、磁場印加時間 ($T_M = 2\text{ h}$ および 24 h)

を変えて実施した。細胞の播種密度は 6.4×10^5 cells/cm² とした。培養後の試料を 4% パラホルムアルデヒド液で固定化した。試料を PBS(-) で 4 回洗浄し、1% ウシ血清アルブミンと 0.5% triton-X100 を含むブロッキング溶液で一晩ブロッキング処

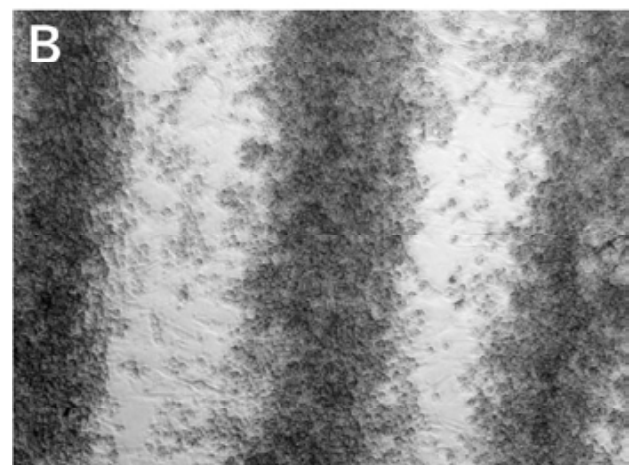
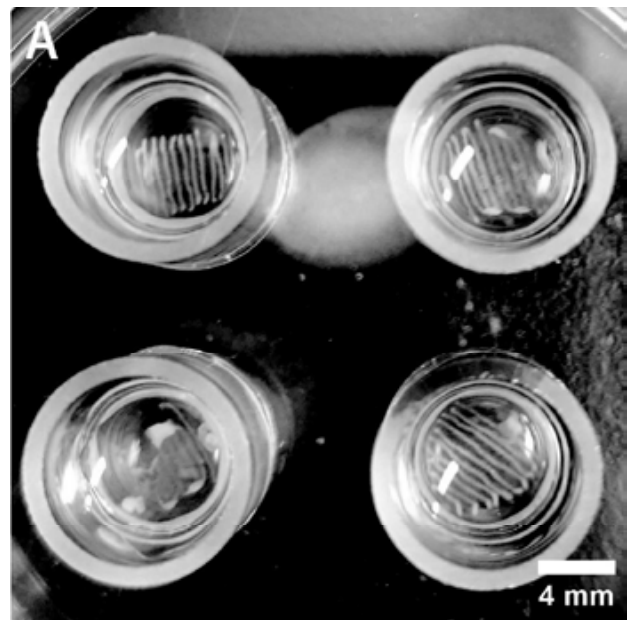


図 2. A: $C_E = 50\text{ mM}$, $T_P = 24\text{ h}$ で構築した細胞凝集塊. B: 同じ試料の位相差顕微鏡像.

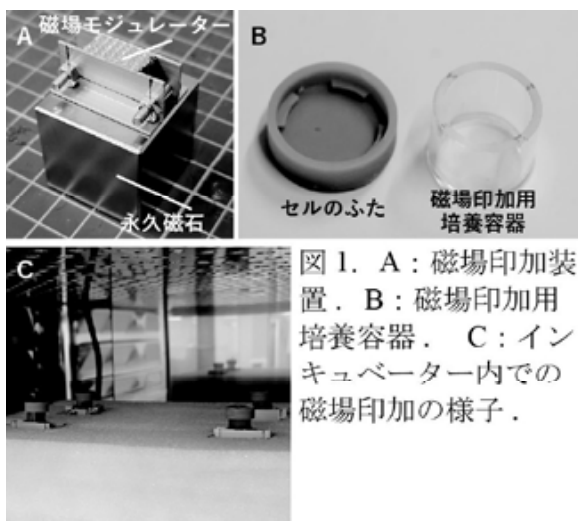


図 1. A: 磁場印加装置. B: 磁場印加用培養容器. C: インキュベーター内での磁場印加の様子.

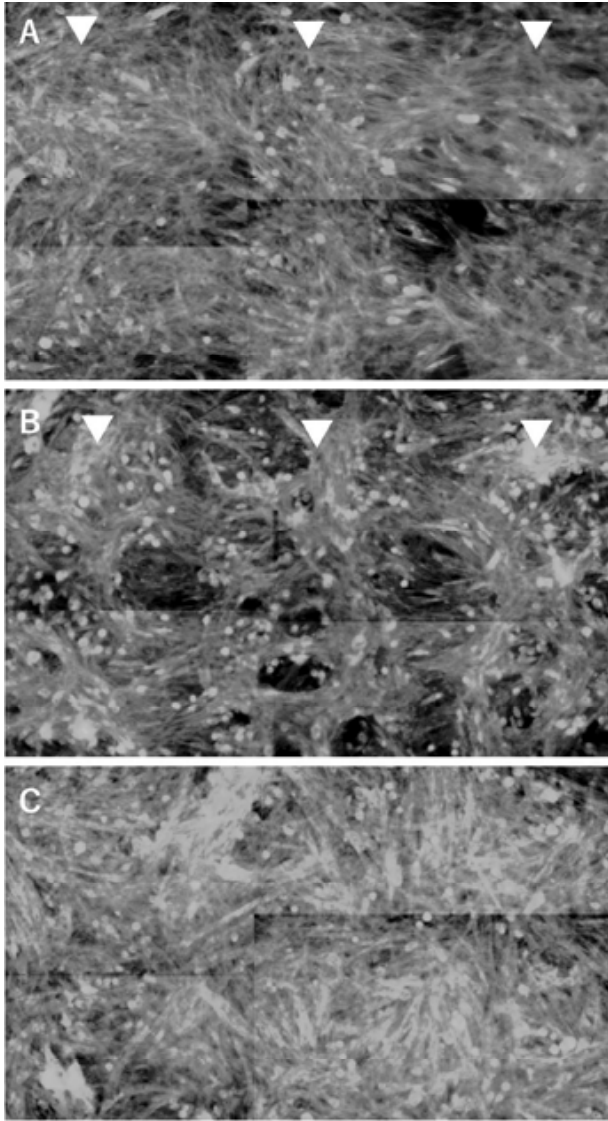


図 3. 培養 1 日目の細胞の形態。A: $C_E = 30$ mM, $T_M = 2$ h, 増殖培地で 1 日培養。B: $C_E = 50$ mM, $T_M = 2$ h, 増殖培地で 1 日培養。C: $C_E = 50$ mM, $T_M = 2$ h, 筋分化培地で 1 日培養。矢頭は細胞凝集塊の位置を示す。

理を行った。次に、Alexa488-Phalloidin を含む蛍光染色液を加えて F アクチンの蛍光染色を行った。蛍光染色後の試料を PBS(-) で 4 回洗浄し、封入を行った。封入後の試料の形態を蛍光顕微鏡で観察した。

0.25 mg/mL のウシ真皮由来アテロコラーゲンを含む磁性培地 ($C_E = 50$ mM) に HH を懸濁し、 3.4×10^5 cells/cm² の播種密度で前述の培養容器にいて CA 構築実験を 30 分間実施した。次に、培地を増殖培地に交換し、さらに 30 分インキュベートした。次に C2C12 を 2.4×10^5 cells/cm² の播種密度で HH の CA 上に播種し一晚培養した。

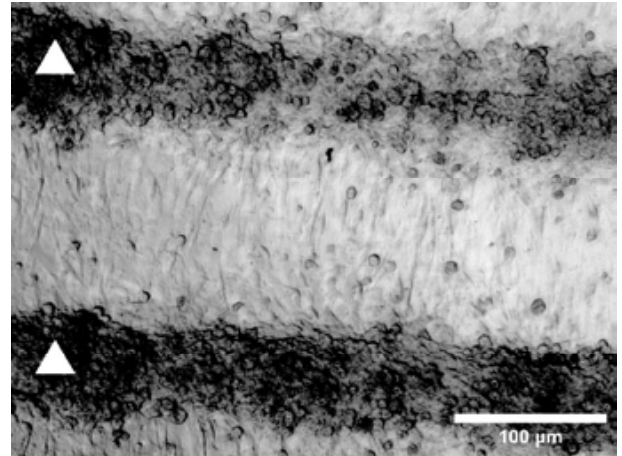


図 4. HH の FCA に C2C12 を播種した複合組織の位相差顕微鏡像。矢頭は HH の FCA を示す。

3.結果

C_E と T_M が CA 構築実験の結果に与える影響を表 1 にまとめた。 C_E が低く、 T_M が短い場合、磁場印加直後は想定した位置に CA が形成されたが、時間経過とともに CA がカバーガラスに接着して格子状のパターンになることが分かった。また、 $C_E = 25$ mM では、細胞へのダメージは少ないが、細胞凝集塊の形成失敗することも多かった。磁場印加時間を短縮することで細胞への損傷を抑えることができるが、 $C_E = 50$ mM かつ $T_M = 24$ h の条件ではより直径が太い線維状 CA (FCA) が形成された。図 2A にこの条件で構築した FCA の写真を示した。培養容器中に FCA が格子状に配列していることがわかる。一方で、位相差顕微鏡で観察すると、死細胞の数が多いことが分かった。

図 3 に培養 1 日後の試料の蛍光顕微鏡画像を示した。増殖培地で培養した試料では FCA が培養基盤上に接着し、そこから側方方向に細胞が進展している様子が分かった (図 3A-B)。一方で、磁場印加後すぐに筋分化培地中で 1 日培養すると、筋芽細胞から筋管細胞への分化が引き起こされるが、FCA の形態は不明瞭だった。

図 4 に血管内皮細胞からなる FCA 上に筋芽細胞を播種した試料の位相差顕微鏡像が示されている。格子状に配列した FCA を覆うように C2C12 が接着していた。

4. 考察

本研究により磁場印加装置上で筋芽細胞を長時間培養することで FCA が形成されることがわかった。一方で、 C_E が高い条件で長時間培養すると細胞の生存率が低下することもわかった。今後この課題を解決するために、磁場印加時間の最適化が必要である。本研究の方法で構築した FCA をさらに筋分化させることは可能だが、その間にパターンが不明瞭になる課題も見つかった。磁場モジュレーターを構成する金属板の厚さを変えるなどの方法で、よりパターンが長期間維持される条件を明らかにする必要がある。

血管内皮細胞の FCA 上に筋芽細胞シートを構

築することができた。この方法で作った複合組織をさらに積層することでより厚みのある筋組織の構築が可能となると期待できる。

謝辞

この研究は渡辺財団第 30 回磁気研究助成の補助を受けて実施したものである。

参考文献

1) Tsunehisa Kimura, Yukiko Sato, Fumiko Kimura, Masakazu Iwasaka, Shoogo Ueno, : *Langmuir*, 21(3), 830 - 832(2005).

磁性ナノ粒子／生体物質凝集体の磁氣的性質の変化を利用した バイオ検出法の開発

Development of bio detection methods using changes in magnetic properties of
magnetic nanoparticle/biological material aggregates

藪上信^{a),b)}, 村山徹^{a)}

Shin Yabukami^{a),b)} and Toru Murayama^{a)}

^{a)}東北大学大学院医工学研究科, 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉 6-6-05 (〒980-8579)

^{b)}東北大学大学院工学研究科, 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉 6-6-05 (〒980-8579)

^{a)} Graduate School of Biomedical Engineering, Tohoku Univ.,
6-6-05 Aramaki Aza Aoba, Aoba-ku, Sendai 980-8579, Japan

^{b)} Graduate School of Engineering, Tohoku Univ.,
6-6-05 Aramaki Aza Aoba, Aoba-ku, Sendai 980-8579, Japan

Abstract

This technology that allows magnetic properties (anisotropy, magnetic susceptibility, loss, damping constant, etc.) to be controlled and evaluated in the same way as solid-state devices by aggregating magnetic nanoparticles/biological materials in the liquid phase and increasing the bond between magnetic nanoparticles. and develop new antigen detection methods. This technology has great engineering significance as it improves the controllability of biosensors and increases signal and energy density. We demonstrate that magnetic nanoparticles can dramatically improve performance and solve problems with conventional technology in bio and medical applications.

Keywords: aggregating magnetic nanoparticles/biological materials, biosensor

1. 目的

本研究では、液相中の磁性ナノ粒子・生体物質を適切な濃度で凝集させることで粒子間相互作用を増大させ、磁気物性を固体物理学的に制御、評価する技術の創成とバイオセンサへの応用を目的とする。

2. 方法

磁性ナノ粒子は直径数nm程度まで極小化すると単独では超常磁性を示すが、凝集等により粒子間距離が変化すると強磁性と超常磁性間を相変化する。この磁気特性を決める要因は主として磁性ナノ粒子間の相互作用（交換エネルギー、静磁気エネルギー）である。磁性ナノ粒子を用いたバイオ、医療応用には光学的に遮蔽された対象へ磁界を媒体としてリモートで制御、計測、加熱可能な特長を有する。図1に示すように液相中における磁性ナノ粒子を抗原抗体反応により生体物質との凝集体を形成し、磁性ナノ粒子の凝集による磁氣的相互作用の増大を利用して抗原を検出する。対象とする液相中で通常磁性ナノ粒子は分散または凝集するが、隣接粒子との相互作用を増大または減少させて集合体として磁気物性を制御する。本研究ではこの技術を微生物、ウイルス、タンパク質等の迅速高感度

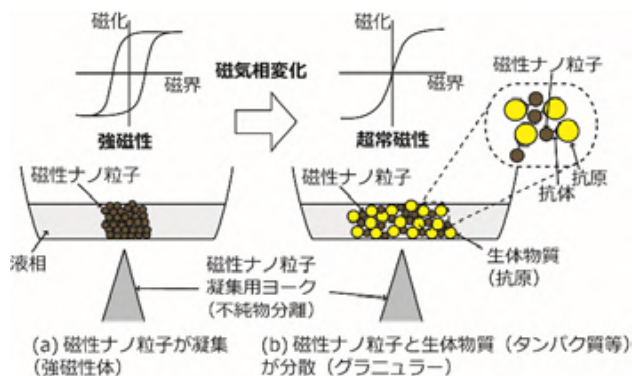


図1 磁性ナノ粒子抗原抗体反応凝集体における磁性ナノ粒子間が変化することによる磁性ナノ粒子間相互作用が変化して磁気物性が変化する現象を利用して、異方性制御、抗原評価をする。

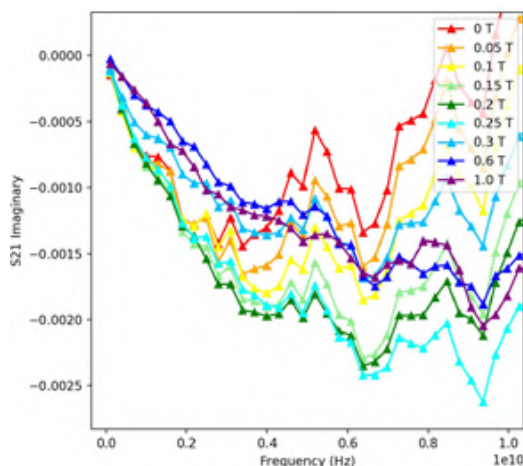


図2 直流磁界を変化させた場合の透過係数 (S_{21}) 虚数部の周波数依存性。 $H_{dc}=0.2$ T 付近で最も低下している。

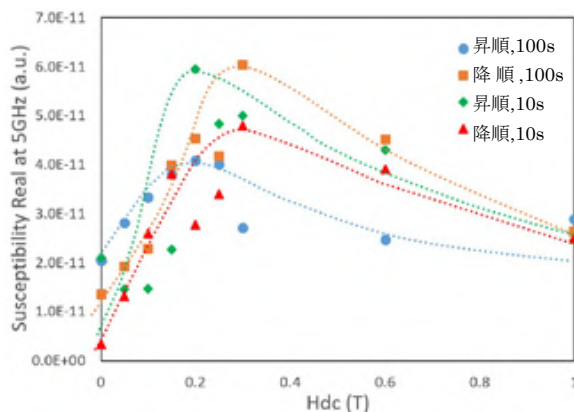


図3 直流磁界を変化させた場合の磁化率実数部の変化。磁界のスweep方向、待ち時間を4種類変えても0.2T 付近で磁化率は最大になった。液相磁性粒子を磁化率、異方性をリモートで制御できることを示した。

検出へ応用することを目指す。

3. 結果

3.1 磁性ナノ粒子の異方性制御

図2は、100 MHz から 10 GHz の周波数範囲における針状磁性粒子 (FeCrCo) 凝集体の透過係数 (S_{21}) の虚数部を示している。評価には直線マイクロストリップ線路プローブを用いた¹⁾。図2から、2 GHz～6 GHz の周波数範囲付近で磁性粒子凝集体の強磁性共鳴 (FMR) の明確なシフトが観測された。図3は、5 GHz における磁性粒子の磁化率の磁場依存性を示している。図3に示すように、 H_{dc} が約 0.2 T から 0.3 T のときに磁化率の実数部が最大になることが観察された。これは、この Fe-Cr-Co 針状磁性粒子の磁気異方性磁場 (約 0.2 T) と一致し、直流磁界によって磁性粒子凝集体の異方性が制御できたことが示された。

3.2 微生物検出

図4は微生物評価のための装置構成を示したものである²⁾。検出機の構成は直径 30mm, 60 ターンの励磁コイル、100 ターン、直径 10mm の差動検出コイル、100 ターンの磁界検出コイルから構成され、(1) 式を用いて、磁性ナノ粒子と微生物の抗原抗体反応凝集体の磁化率を評価した。

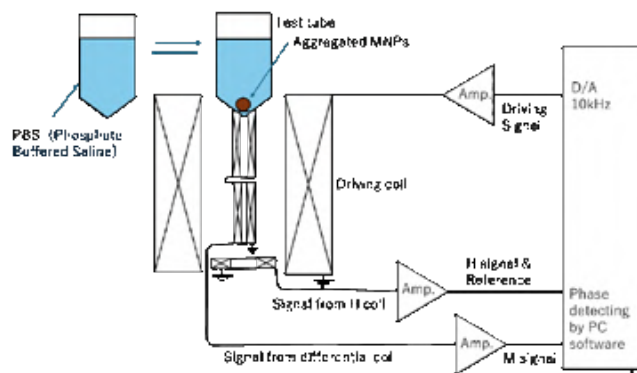


図4 微生物評価の検出器の構成。励磁コイルで交流磁界を発生させ、磁性ナノ粒子と抗原抗体反応凝集体の磁気信号を差動検出コイルで評価して、磁化率を求める。

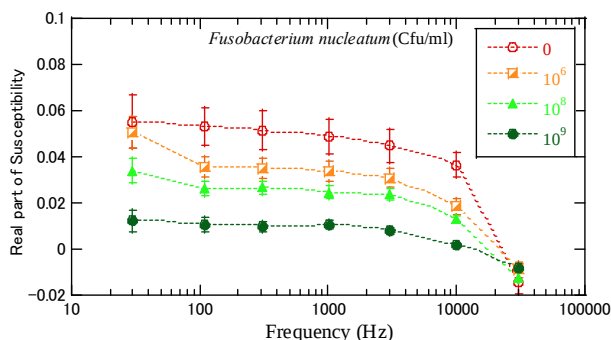


図5 培養した *Fusobacterium Nucleatum* の磁化率

Table 1 The list of specifications and volume of antigens, antibodies, magnetic nanoparticles (MNP)s).

How to prepare samples	An antigen-antibody reaction	Using Fe ₃ O ₄ conjugated with antibodies
Magnetic nanoparticles	Nanomag-D Size: 500 nm	Material & quantity Fe ₃ O ₄ , 0.5 μL/sample
Antibody	Anti- <i>Fusobacterium nucleatum</i>	Quantity: 0.33 μL
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	Obtained from human saliva	Quantity: 20 μL

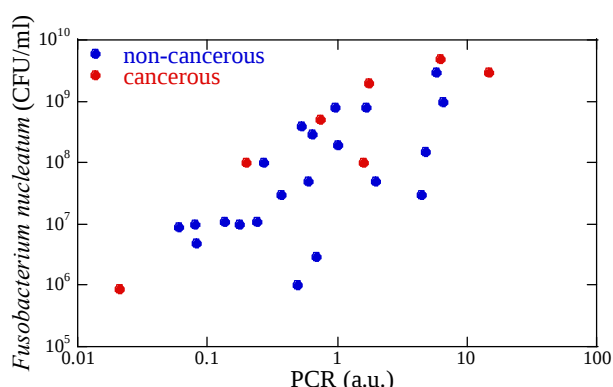


図6 28 人のヒト唾液中の *Fusobacterium Nucleatum* の評価結果と PCR との相関

$$\chi = \frac{M_0}{H_0} = \frac{n_1 \cdot S_1}{n_2 \cdot S_2} \cdot \frac{V_{b1} - V_{b2}}{V_h} \quad (1)$$

ただし、 V_h は磁界検出コイルの誘起電圧、 V_{b1} は磁性ナノ粒子凝集体有りの誘起電圧、 V_{b2} はレファレンス（生理食塩水）の誘起電圧を示している。 n_1 は差動検出コイルの巻数、 n_2 は磁界検出コイル、 S_1 は差動検出コイル断面積、 S_2 は磁界検出コイルの面積である。図5は *Fusobacterium nucleatum* の培養菌を磁性ナ

ノ粒子と抗原抗体反応させた後、凝集体としての磁化率実数部を評価したものである。使用した試薬は Table 1 の通りであり、磁性ナノ粒子は Nanomag-D（平均粒径 500nm φ、表面に Protein A 添加）に anti-*Fusobacterium Nucleatum* 抗体をあらかじめ反応させた後、*Fusobacterium Nucleatum* 培養菌濃度を 0, 10^6 , 10^8 , 10^9 (CFU/ml) と変化させて反応させた。*Fusobacterium Nucleatum* の濃度が高くなるほど、磁性ナノ粒子間の磁氣的相互作用が低下し、磁化率は低下した。図5から得られた校正曲線を用いてヒト唾液サンプルを評価した。

図6に28人のヒト唾液を用いた *Fusobacterium Nucleatum* の評価結果を示す。28人には7名の段患者が含まれており、赤丸で示した。横軸は PCR の評価結果（相対値）を示している。縦軸は図5の校正曲線を用いて *Fusobacterium Nucleatum* の濃度を換算した。抗原抗体反応後は後洗浄をおこなわずに、磁気力で凝集させるため、ポイントオブケア診断に適している。磁化率評価から得られた *Fusobacterium Nucleatum* の濃度と PCR の評価結果は約 69% ($P < 0.0001$) と良好な相関性を示した。

3.3 タンパク質検出

3.3.1 磁性ナノ粒子タンパク質凝集体の構造

図7はクライオ電子顕微鏡（CRYO

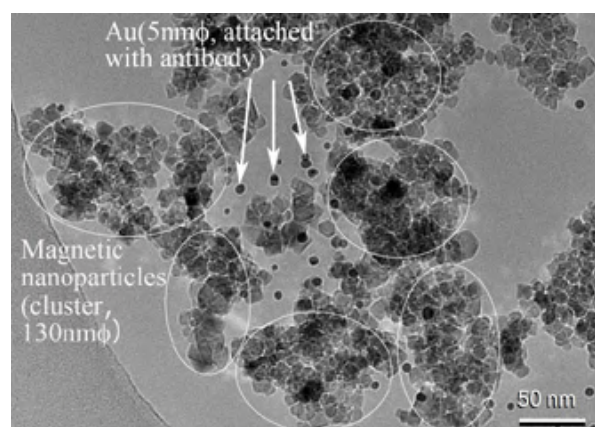


図7 クライオ電子顕微鏡による磁性ナノ粒子・タンパク質凝集体画像。金粒子（抗体に標識）が磁性ナノ粒子凝集体の中間に位置し、クロスブリッジを形成していると考えられる。

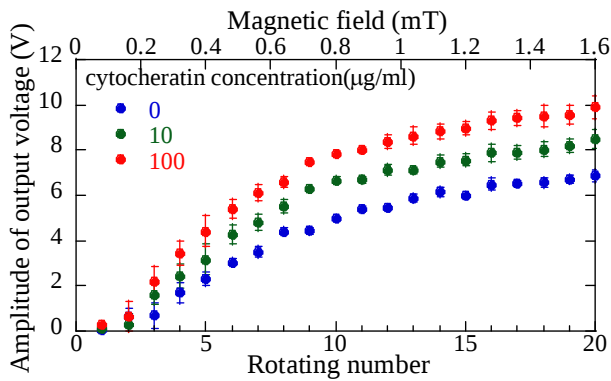


図 8 精製タンパク質 (cytokeratin) の濃度に対する磁気信号の変化。高濃度ほど磁性ナノ粒子の凝集が進んで粒子間磁氣的相互作用が強くなり、磁気信号が大きくなる。

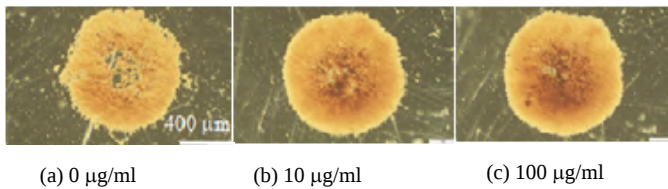


図 9 精製タンパク質 (cytokeratin) の凝集体写真 (光学顕微鏡)。高濃度ほど茶褐色の領域が増え、磁性ナノ粒子の凝集が進んでいることが了解される。

ARMTM300 II, 日本電子株式会社) で観察した磁性ナノ粒子とタンパク質凝集体の TEM 像である。このサンプルでは、タンパク質 A を添加した磁性ナノ粒子 (Nanomag-D, 平均粒子サイズ 130 nm ϕ) を一次抗体 (ヒト GDF15 抗体) と Au ナノ粒子 (NHS 活性化金ナノ粒子, 5 nm ϕ) に結合させた。Au ナノ粒子を抗体と反応させた。次に、抗原タンパク質 (GDF15, ヒト組換え<MIC-1>) との抗原抗体反応を行った。抗原と磁性ナノ粒子の間でクロスブリッジが生じ、凝集体のサイズが大きくなると考えられる。図 7 では、磁性ナノ粒子の平均粒子サイズは 130 nm ϕ で、クラスター構造を形成している。抗体と抗原は分子量が小さく、クライオ電子実験では観察が難しいため、画像では磁性ナノ粒子と金ナノ粒子のみが観測される。金ナノ粒子はクラスター磁性ナノ粒子の中間に観察された。これは、複数の磁性ナノ粒子が抗原と抗体を介してクロスブリッジ構造を形成していると考えられる。

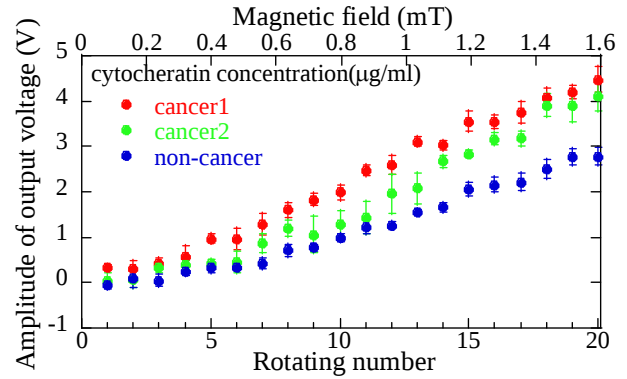


図 10 癌患者および非癌患者のリンパ節から抽出したサイトケラチンの評価結果

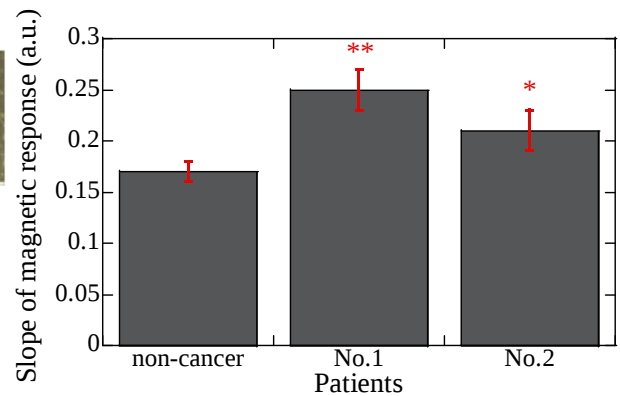


図 11 癌患者および非癌患者のリンパ節から抽出したサイトケラチンの評価結果

3.3.2 サイトケラチンの検出

磁性ナノ粒子 (nanobeads 130nm ϕ , ptoteinaA 添加) と antibody-cytockera-tin を結合させた上で、精製サイトケラチン (cytokeratin) を抗原抗体反応させてスイッチング磁界に対する応答性を評価した³⁾。図 8 は磁性ナノ粒子凝集体をスイッチング磁場に対する磁気応答性を評価したものである。回転するたびにスイッチ磁界を増大させて、磁氣的信号の増大を評価する。サイトケラチン濃度が 0, 10 μ g/ml, 100 μ g/ml と増大するに従い、磁気信号が有意に増大した。これは図 7 で明らかにしたようにタンパク質 (サイトケラチン) を介して磁性ナノ粒子間を凝集させるため、磁氣的信号が増加したと考えられる。同じ条件で調製した 4 サンプルは同様の傾向を示し、エラーバーは十分に小さいため、再現性がある。図 9 の写真に示すように、凝集体の茶色の領域は抗原 (サイトケラチン) の量が増えるにつれて拡大した。抗原がない場合、磁性ナノ粒子は弱く凝集し

ており，抗原の量が増えるにつれて，凝集体の中心付近の茶色がより暗くなった．タンパク質が磁性ナノ粒子間の磁気結合を増加させ，それによって図 8 に示すように磁気信号が増加すると考えられる．

東北大学病院で食道がん患者 2 名と非がん患者（食道炎）1 名からリンパ節を採取した．採取したリンパ節をバイオマッシャーで PRO-MEASURE タンパク質測定溶液中でホモジェナイズし，10 倍に希釈して上清を採取した．サンプルは図 8 と同じサイトケラチン抗体を含む磁性ナノ粒子と反応させた．図 10 はスイッチング磁場下で評価した 3 名の患者の磁気応答を示す．がん患者のリンパ節にはサイトケラチンが含まれており，これが磁性ナノ粒子の凝集を促進し，磁気信号を増加させる．図 11 は，3 人のがん患者と非がん患者の磁化の比較を示している．一部のがん患者と非がん患者の間では統計的に有意な差が評価でき，術中迅速診断の可能性を示唆している．

4 文献

- 1) S. Yabukami, C. Iwasaki, K. Nozawa, S. Takahashi, K. Okita, K. Chatani, “Simultaneous Evaluation of Permeability and Permittivity using a Flexible Microstrip Line-Type Probe up to 67 GHz”, IEEE Transactions on Magnetics, Vol. 58, No. 2, p. 1-5 (2022).
- 2) K. Okita, Y. Pu, L. Tonthat, S. Yabukami, Y. Ozawa, S. Asamitsu, H. Okamoto, T. Kamei, “Novel Method to Measure Bacterium using Magnetic Nanoparticles”, IEEE Magnetics Letters, vol. 14, 3100504 (2023).
- 3) Shin Yabukami, Toru Murayama, Koki Kaneko, Amane Ban, Loi TonThat, Yohei Ozawa, Hiroshi Okamoto, Takashi Kamei, Miyuki Tanaka, Yoshikazu Tanaka, Takaaki Abe, “Evaluation of cytokeratin in lymph node metastasis using magnetic nanoparticles and protein aggregates”, IEEE Transactions on Magnetics, 1-1 (2025).

筋層浸潤膀胱癌のナノ粒子を用いた膀胱温存療法の確立

Establishment of Bladder-Preserving Therapy for Muscle-Invasive Bladder Cancer Using Nanoparticles

権田 将一* 河合 憲康*

Masakazu Gonda* Noriyasu Kawai*

*名古屋市立大学大学院医学研究科腎・泌尿器科学分野,
〒467-0001 愛知県名古屋市瑞穂区瑞穂町川澄 1 番地

* Department of Nephro-urology, Nagoya City University, Graduate School of Medical Sciences
1 Kawasumi, Mizuho-cho, Mizuho-ku, Nagoya, Japan

Abstract

Bladder cancer frequently recurs, with non-muscle invasive bladder cancer (NMIBC) often progressing to muscle-invasive bladder cancer (MIBC), which requires invasive cystectomy. Enfortumab vedotin (EV) was recently approved for metastatic bladder cancer in Japan but causes side effects when administered systemically. We developed EV-conjugated nanoparticles (MNPS-PMPC-EV) for intravesical thermotherapy and evaluated their in vitro effects on bladder cancer cells. MNPS-PMPC-EV showed no inhibitory effect on cell proliferation. Additionally, stable creation of an MIBC model mouse was challenging under the protocol of this study.

Keywords: bladder cancer, muscle-invasive bladder cancer, nanoparticles, thermotherapy, enfortumab vedotin,

1. 目的

膀胱癌は約半数が再発をきたす。¹⁾膀胱粘膜内にとどまっていた非筋層浸潤性膀胱癌(Non-muscle invasive bladder cancer: NMIBC)は、再発を繰り返す過程で筋層へ浸潤する筋層浸潤性膀胱癌(Muscle invasive bladder cancer: MIBC)となる。NMIBC の標準治療は経尿道的手術であるが、MIBC へ進展すると膀胱全摘術が標準治療となる。膀胱全摘術は侵襲が大きいだけでなく、術後の生活の質を著しく低下させることが問題となっている。そのため、MIBC に対し膀胱を温存するような様々な治療法の開発が試みられてきたが、いずれも標準治療とは至らなかった。

最近本邦ではエンホルツマブベドチン(Enfortumab vedotin: EV)という新たな薬が転

移のある膀胱癌に対して保険適応となった。尿路上皮癌に過剰発現しているネクチン 4 に対するモノクローナル抗体(単一の抗体産生細胞をクローニングして作られた抗体)に微小管破壊剤(Monomethyl auristatin E: MMAE)を結合させた抗体薬物複合体(Antibody-drug conjugate: ADC)である。²⁾しかしながらネクチン 4 は皮膚にも正常発現しているため、血中投与では副作用が半数以上に出現する。そこで我々は EV を結合させたナノ粒子(MNPS-PMPC-EV)を経尿道的に膀胱へ注入し温熱療法を行うことで、副作用を減少させ膀胱を温存できないかと考えた。

今回、MNPS-PMPC-EV を作成し、マウスの膀胱癌細胞株における in vitro での細胞増殖抑制能を検討したため報告する。また、今後の in

vivo 研究のため筋層浸潤性膀胱癌モデルマウスの作成を試みたのでこちらについても併せて報告する。

2. 方法

I. MNPS-PMPC-EV の作成

名古屋大学との共同研究で作成を行なった。酸化鉄ナノ粒子を中心としてその周囲に多数の 2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン(MPC)を結合させ、MNPS-PMPC を作成した。そこへ EV を結合させて MNPS-PMPC-EV を作成した。

また、その後 in vitro における MNPS-PMPC-EV の膀胱癌細胞への影響を調べた。マウス膀胱癌細胞株である MB49 に対して、濃度を 1pg/cell, 10pg/cell, 100 pg/cell, 1000 pg/cell に分けて MNPS-PMPC-EV と MNPS-PMPC を投与した。24 時間後に Cell-Counting kit8 を使用した吸光度分析によって細胞の生存率を測定した。

II. MIBC モデルマウスの作成

8 週齢の雌の C57BL/6J マウスを 12 匹用意し、それぞれの膀胱へ 0.125%のトリプシンを経尿道的に 50 μ L ずつ注入した。20 分, 30 分, 40 分後にそれぞれ 4 匹ずつトリプシンを回収し、50 μ L の MB49 を 6.0×10^4 cells 膀胱内へ注入した。50 分経過したところで MB49 を回収し、9 日後に sacrifice をして筋層浸潤性膀胱癌の有無を評価した。

3. 結果

I. MNPS-PMPC-EV の作成

名古屋大学との共同研究で作成を行なった。酸化鉄ナノ粒子表面へ MPC を修飾し、MPC の先端に N3 を付加した。その後ジベンゾシクロオクチンを結合させた EV をクリック反応を利用して MPC の先端に固定し、MNPS-PMPC-EV の作成に成功した。

MNPS-PMPC-EV と MNPS-PMPC における、MB49 に対する細胞増殖抑制能評価では、ともに投与濃度の上昇に伴う生存

率の有意な低下は見られず、細胞増殖能の抑制は認められなかった (図 1A, B)。

II. MIBC モデルマウスの作成

トリプシンを膀胱内に留置しておく時間を変更して筋層浸潤性膀胱癌のモデル作成を試みた。トリプシンを 40 分注入した群で 1 匹のみ MIBC が作成できた可能性があった(図 2A, B)が、その他では明らかに NMIBC であった。

4. 考察

本実験では EV を結合させたナノ粒子である MNPS-PMPC-EV を作成し、細胞増殖能抑制効果の検証を行なった。また、トリプシンを併用した膀胱癌細胞株の膀胱内注入による MIBC の作成を試みた。

MNPS-PMPC-EV に細胞増殖能の抑制効果は認められなかった。これは EV の総量が少なかった可能性や、ナノ粒子と結合させたことによる EV の細胞内部への取り込み量の低下に起因する可能性がある。今後は細胞内への取り込み量について透過型電子顕微鏡を用いて、直接細胞内に取り込まれた粒子量を評価する。

MIBC モデルマウスの作成については、安定した作成は困難であった。今後はトリプシンの濃度を高く変更し再度作成を試みる。しかし、トリプシンを用いた膀胱癌モデルマウスは作成期間が短いという利点があるが、あくまで物理的な処置による膀胱癌細胞の移植であり臨床に近い発生ではないという欠点がある。一方で、N-ブチル-N-4-ヒドロキシブチルニトロサミン(BBN)誘発による MIBC モデルマウスは臨床での膀胱癌に近い性質を持つことがわかっている。³⁾BBN 誘発 MIBC モデルマウスを利用して温熱療法を行うことで、より臨床に近い形で治療効果を検討することができる。そのため、並行して BBN 誘発 MIBC モデルマウスも作成し、in vivo での温熱治療効果を確認していく予定である。

謝辞

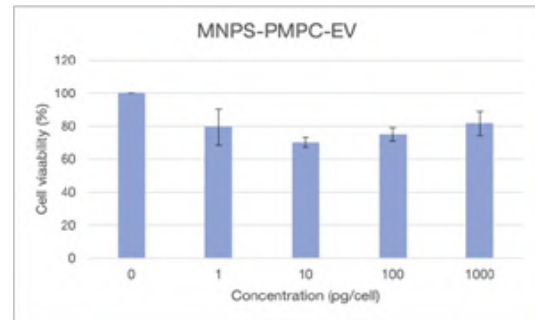
この研究は磁気健康科学研究振興財団(令和 4 年)の補助を受けて実施したものである。また、名古屋市立大学実験動物センターの機器を使用した。

参考文献

1. Tanaka N, Kikuchi E, Matsumoto K, Miyajima A, Nakagawa K, Oya M. Frequency of tumor recurrence: a strong predictor of stage progression in initially diagnosed nonmuscle invasive bladder cancer. J Urol. 2011 Feb;185(2):450–5.
2. Kamat AM, Lotan Y, Roupret M, Steinberg GD, Inman BA, Powles T, et al. A first-in-human trial of intravesical enfortumab vedotin (EV), an antibody-drug conjugate (ADC), in patients with non-muscle invasive bladder cancer (NMIBC): Interim results of a phase 1 study (EV-104). J Clin Oncol. 2023 Jun 1;41(16_suppl):4596–4596.
3. Fantini D, Glaser AP, Rimar KJ, Wang Y, Schipma M, Varghese N, et al. A Carcinogen-induced mouse model recapitulates the molecular alterations of human muscle invasive bladder cancer. Oncogene. 2018 Apr;37(14):1911–25.

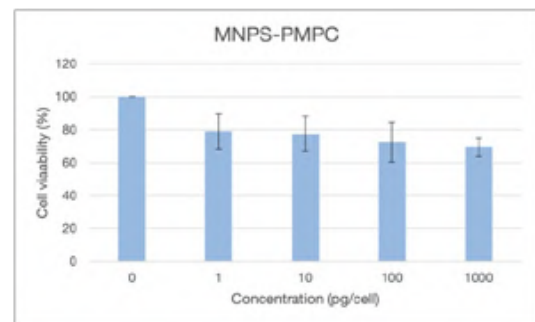
(図 1A)

MB49 に対する MNPS-PMPC-EV の細胞生存率



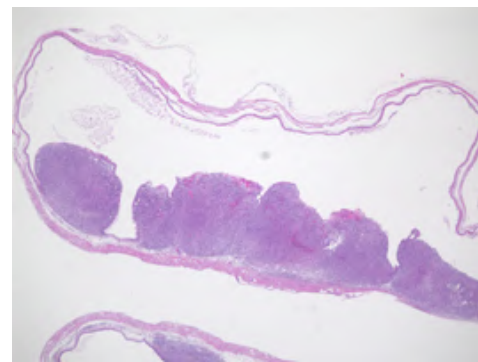
(図 1B)

MB49 に対する MNPS-PMPC の細胞生存率



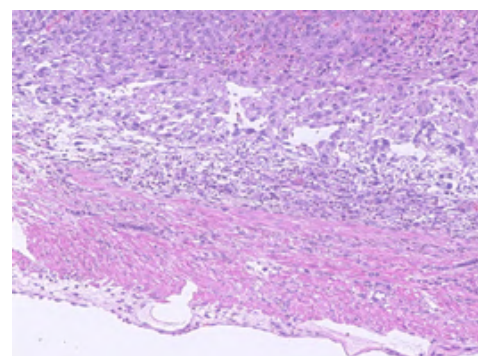
(図 2A)

作成したマウス膀胱内の腫瘍



(図 2B)

筋層に浸潤している可能性はあるが、明らかな浸潤は認めない



反復末梢性磁気刺激の痙縮治療における機序の解明

Mechanisms of spasticity treatment by peripheral magnetic stimulation

紙本 貴之
Takayuki Kamimoto

慶應義塾大学医学部 リハビリテーション医学教室, 〒160-8582 東京都新宿区信濃町 35
Department of Rehabilitation Medicine, Keio University School of Medicine
35, Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo, Japan, 160-8582

Abstract

Peripheral magnetic stimulation has been suggested as an effective new treatment for spasticity. Peripheral magnetic stimulation is characterized by its ability to stimulate the affected area without pain, but the mechanism of the spinal reflex pathway, which is important in the pathophysiology of spasticity, has not yet been elucidated. In this study, we will perform peripheral magnetic stimulation of the tibialis anterior muscle in chronic stroke patients to elucidate brain plasticity and spinal reflex circuits using spinal cord reciprocal inhibition before and after the intervention.

Keywords: Spasticity, Peripheral Magnetic Stimulation, NMES, Stroke, Reciprocal Inhibition

1. はじめに

脳卒中は患者数が350万人と推計され国民の健康福祉及び医療経済への影響が大きい。半数から2/3の患者は脳卒中発症後に中枢性運動麻痺の後遺症を呈することが知られており、これらに対する治療方法の確立が強く求められている。痙縮は、脳卒中発症後1年間の脳卒中発症後1年間の27～36%に存在するといわれている。¹⁾手を洗う、着替える、ものを持つ、歩くなど幅広いActivity of Daily Living(ADL)に支障をきたすだけでなく、家族を含めた介護者のQuality Of Life(QOL)も低下する。脳卒中患者において、痙縮治療はADL/QOL改善のためには非常に重要である。

痙縮は、腱反射の亢進と速度依存性の伸長に対する抵抗の増加が特徴である。痙縮の病態生理の解釈そのものは未だ議論の余地があるが、その一つの関与として相反性抑制と考えられている。主導筋に対するIa求心性ニューロンへの刺激が入ることによって、脊髄でIa抑制性介在ニューロンなどによる抑

制により、拮抗筋の α 運動ニューロンの興奮性を下げる、これを相反性抑制という。相反性抑制はH波の振幅を計測することで、定量的に評価する方法が過去に多く行われている。²⁾

痙縮の治療法は、リハビリテーション、内服治療、神経ブロック治療、ボツリヌス療法、髄腔内バクロフェン療法 (intrathecal baclofen(ITB)療法)、神経筋電気刺激療法などが知られている。ただし、上記の治療は費用が高額にかかることや、内服は眠気やふらつきの副作用による転倒リスク増大、注射や手術、電気刺激療法は疼痛を伴うことが多いので、副作用や疼痛の少ない治療法の創出が望まれていた。

そこで、我々は末梢磁気刺激 (peripheral magnetic stimulation : PMS) に着目した。PMSでは刺激コイルを刺激対象部位に置き、短時間のパルス磁場を発生させることから神経筋電気刺激療法と比較し皮膚表面を刺激せずに患部を刺激できることから痛みを伴わずに患部を刺激できるのが特徴である。そのため、比較的大きな筋肉、関節に対して

の臨床応用が期待される手法である。

痙縮に対する PMS を用いたアプローチは散見される。効果の判定は徒手的に評価をする Modified Ashworth Scale や Modified Tardieu Scale(MTS)、表面筋電図によるヒラメ筋の clonus、脳波などを用いた評価が実施され、効果があることが示唆されているが、脊髄神経回路による神経生理学的メカニズムは明らかになっていない。³⁴⁾ PMS は Ia や Ib、II などの求心性ニューロンへの入力が増大が見られるとされている。⁵⁾ そのため、随意運動に合わせて PMS 刺激を行うことで主動筋の Ia 求心性ニューロンからの単シナプスを介して同名筋の運動ニューロンに到達した信号と同時に、皮質から下降してくる神経信号が同一の運動ニューロンに到達することで、一方のみでは興奮し得なかった運動ニューロンも含めてより多くの運動ニューロンの賦活化されと考えられる。またそれだけでなく、抑制性ニューロンを介した拮抗筋に対する相反性抑制が見込まれる可能性が考えられた。そこで、本研究では、末梢磁気刺激の痙縮への作用メカニズムについて神経生理学的手法を用いて検討することとした。

2. 方法

当院にリハビリテーション治療目的で入院する脳卒中患者を対象に行った。参加基準は、1)18 歳以上かつ 80 歳以下、2)一側病変による中枢性運動麻痺、3)全身状態が安定している、4)認知機能低下や重篤な失語症状を認めず研究の理解が可能、5)本研究について十分な説明を受けた後、本人の自由意思に基づく文書同意が得られている、とした。除外基準は、ペースメーカーや心臓内留置カテーテル、体内にクリップなど金属の埋め込みがある、てんかんの既往がある、下肢に痙縮を有しない場合とした。文書にて同意を得て研究を実施した。(慶應義塾大学医学部倫理審査委員会 No.20231035、2023 年 6 月 7 日承認)

・クロスオーバー試験

痙縮を有する中枢性運動麻痺患者を対象とし、PMS および NMES での刺激前、刺激直後、刺激終了から 15 分後と 30 分後の H 波の振幅の高さに変化があるか、すなわち、rPMS と NMES による刺激前後での相反性抑制の変化を比較した。PMS

による刺激と NMES による刺激の wash out 期間は最低 24 時間以上とした。

介入方法は足関節背屈の随意運動に合わせて、PMS および NMES で前脛骨筋に刺激を与えた。2 秒 on-2 秒 off で、100 回実施した。PMS の設定は 30Hz で合計 6000 発の刺激を与えた。NMES も同様に、強度は関節運動が発生する運動閾値の 110%と設定した。

痙縮の評価方法として、脊髄相反性抑制の評価方法として、条件刺激法を用いた。記録電極は前脛骨筋とヒラメ筋に貼付し、筋電計（日本光電、ニューロパック X1）のサンプリング周波数は 10kHz、バンドパスフィルターは 10Hz から 1kHz とした。筋電図を用いて条件(Control)刺激（総腓骨神経）を前脛骨筋の M 波閾値の刺激強度(100 μ V が記録できる強度)で刺激し、試験(Test)刺激（脛骨神経）を Mmax 振幅値の 15-25% の刺激強度で刺激した。条件刺激を行わずに試験刺激のみを 10 試行刺激し、条件-試験刺激 (C-T) 間隔で 2ms、20ms でそれぞれ 10 試行刺激した。C-T 間隔 2ms は Ia 抑制、20ms は D1 抑制（シナプス前抑制）を評価している。

対象者の基本情報として、年齢、性別、病型、発症後期間、痙縮 (MTS)、運動麻痺 (Fugl-Meyer Assessment Lower Extremity(FMA-LE)、感覚障害 (Stroke Impairment Assessment Set(SIAS)感覚項目)を評価した。

統計解析は、下腿三頭筋で記録した H 波の振幅の peak-to-peak 値を算出し、Reciprocal Inhibition(RI)(条件刺激ありの H 波振幅平均値/試験刺激のみの H 波振幅平均値)を算出した。反復測定の実験配置分散分析を行い、事後検定として Bonferroni 検定を行った。平均値±標準偏差で表示した。有意水準は $p<0.05$ とした。

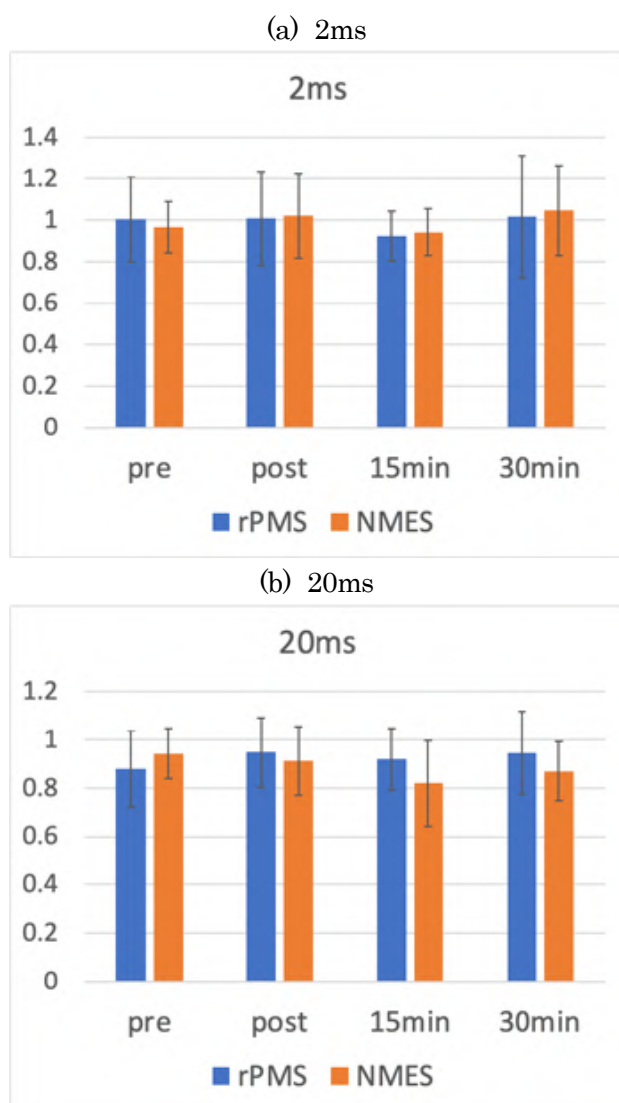
3.結果

参加基準に該当する 11 名の脳卒中患者が対象として研究に参加した。平均年齢：54.45±7.45 歳、男性：8 名、女性：3 名、病型：脳梗塞 3 名、脳出血 8 名、発症後期間：2023±1551 日、足関節の MTS は[QMR]2.55±0.66、[R1-R2]11.73±6.59 度、FMA-LE：24.00±3.16 点、SIAS 感覚項目[表在覚]2.45±0.50、[位置覚]2.82±0.39 だった。

まず Ia 抑制である、C-T 時間 2ms の RI は図 2a に示す。二元配置分散分析の結果、 $F(3, 30)=0.261$ 、 $p=0.853$ で交互作用はなかった。Bonferroni 検定の結果、NMES、PMS 群ともに有意差がなかった。

次に、D1 抑制である C-T 時間 20ms の RI は図 2b に示す。二元配置分散分析の結果、 $F(3, 30)=2.197$ 、 $p=0.109$ で交互作用はなかった。

図 2 C-T 時間 2ms と 20ms の Reciprocal Inhibition の推移 (平均値±標準偏差)



4. 考察

本研究は、PMS の神経生理学的メカニズムの解明を目的として実施した。今回の研究では、PMS では Ia 抑制および D1 抑制に対して有意に変化を与えているとは言えない結果であった。

PMS は Ia や Ib、II などの求心性ニューロン

への入力が増大が見られるとされており、随意運動に合わせて PMS を実施することで、抑制性ニューロンを介した拮抗筋に対する相反性抑制が見込まれる可能性が考えられたが、本研究ではその傾向は見られなかった。

今までの先行研究は、PMS による痙縮の改善について臨床評価や表面筋電図を用いた評価はあったものの、脳卒中患者において、痙縮の定量的な評価手法である H 波の条件刺激法を用いた Reciprocal Inhibition を測定した研究はないため、その新規性は高いと考える。本研究の限界として、同日に PMS と NMES を実施できないため、厳密に介入前の H 波の振幅を揃えることは難しいことが挙げられる。

5. 謝辞

この研究は磁気健康科学研究振興財団の補助を受けて実施したものである。

参考文献

- Morita H, Crone C, Christenhuis D, Petersen NT, Nielsen JB. Modulation of presynaptic inhibition and disynaptic reciprocal Ia inhibition during voluntary movement in spasticity. *Brain*. 2001 Apr;124(Pt 4):826-37.
- Beaulieu LD, Massé-Alarie H, Brouwer B, Schneider C. Noninvasive neurostimulation in chronic stroke: a double-blind randomized sham-controlled testing of clinical and corticomotor effects. *Top Stroke Rehabil*. 2015 Feb;22(1):8-17.
- Chen ZJ, Li YA, Xia N, Gu MH, Xu J, Huang XL. Effects of repetitive peripheral magnetic stimulation for the upper limb after stroke: Meta-analysis of randomized controlled trials. *Heliyon*. 2023 Apr 22;9(5):e15767.
- Struppler A, Angerer B, Gündisch C, Havel P. Modulatory effect of repetitive peripheral magnetic stimulation on skeletal muscle tone in healthy subjects: stabilization of the elbow joint. *Exp Brain Res*. 2004 Jul;157(1):59-66.

トンネル磁気抵抗素子センサを用いた ビデオ脳磁図モニタリングシステムの開発

Development of video magnetoencephalography monitoring system
with tunnel magneto-resistive sensors

此松和俊, 石田誠, 神一敬, 中里信和

Kazutoshi Konomatsu, Makoto Ishida, Kazutaka Jin, Nobukazu Nakasato

東北大学医学部, 〒980-8575 宮城県仙台市青葉区星陵町 2-1

Tohoku University Graduate School of Medicine

2-1 Seiryomachi, Aoba-ku, Sendai Miyagi 980-8575 Japan

Abstract

To clarify whether the density spectral array (DSA) of ictal EEG can differentiate epileptic seizures from non-epileptic events using deep learning techniques. We reviewed patients with mesial temporal lobe epilepsy (mTLE) and psychogenic non-epileptic seizures (PNES), and analyzed seizures/events recorded by long-term video EEG monitoring. Time of clinical onset was defined as zero, and the EEG recordings were clipped from -3 to +3 minutes. Frequency analysis of Cz as well as the means of C3-C4, Fp1-Fp2, and O1-O2 was performed to generate DSA. ResNet34, a convolutional neural network (CNN) model, was trained and tested on datasets. CNN architecture was created from 40 patients with mTLE and 40 with PNES as train data; and 8 patients with mTLE and 11 with PNES were evaluated using the model as test data. EEG recordings of Cz electrode from -1 to +1 minutes showed the best performance, with area under the curve of 0.959, accuracy of 0.879, sensitivity of 0.800, and specificity of 0.944. DSA of single-channel EEG (Cz) successfully differentiated between epileptic seizures and nonepileptic events with deep learning techniques.

Keywords: density spectral array, single-channel EEG, convolutional neural network

1. 目的

脳磁図は脳神経細胞の興奮を磁場の側面で捉える検査機器である。従来の脳磁図では超伝導量子干渉素子 (SQUID) が使用されているが, 巨大なシールドルームや冷却のための液体ヘリウムが必要など, 高いランニングコストが課題である。近年, 我々が開発に取り組んできたトンネル磁気抵抗 (TMR) 素子は, 広いダイナミックレンジと常温稼働を特徴とするため, コスト面の課題解決が期待できる^{1), 2)}。本研究では, TMR 素子を用い

たビデオ脳磁図モニタリングシステムを開発し,

最終的に在宅利用することを目的としている。在宅利用時のコスト削減のため, より少ないセンサー数でてんかん発作を検出することが望ましい。そのため, 本センサーの臨床応用を見据えて, てんかん症候群の1つである内側側頭葉てんかん (mTLE) のてんかん発作と非てんかんである心因性非てんかん発作 (PNES) の非てんかん性イベントを長時間ビデオ脳波モニタリング

(LTVEEM) の記録データを用いて、少ない電極数で鑑別する方法を検討した。

2. 方法

2014 年 1 月から 2022 年 12 月に東北大学病院で包括的入院精査された mTLE および PNES 患者を後方視的に調査した。頭皮上脳波記録はビデオ脳波モニタリングシステム (Neuro Fax EEG-1200, Nihon Kohden, Tokyo, Japan) を使用した国際 10-20 法を使用し、サンプリングレート 500Hz で実行された。全ての脳波データは臨床検査技師および医師により判読された。両耳朶連結を基準として、Cz, C3 と C4 の平均, Fp1 と Fp2 の平均, O1 と O2 の平均の時間周波数解析を行なった。モンタージュ処理した脳波を 100Hz にダウンサンプリングし、5.12 秒のデータを用いて高速フーリエ変換 (FFT) を行い、その区間の周波数成分を算出した。以降、2.56 秒毎にずらして 5.12 秒のデータを用いて FFT を行い、各区間での周波数成分を算出した。DSA は x 軸を時間、y 軸を周波数、パワースペクトルを色とする 3 軸で表示した。日本てんかん学会専門医が発作時ビデオを検証し、臨床的起始を決定した。臨床的起始を 0 分として、-3 分から +3 分を抽出し、異なる時間窓 (Full: -3 分～+3 分; Early 1/3: -3 分～-1 分; Middle 1/3: -1 分～+1 分; Late 1/3: +1 分～+3 分) で DSA を生成した (図 1)。畳み込みニューラルネットワーク (CNN) モデルである ResNet34³⁾ を異なる年のデータセットで訓練、テストし比較した。統計的性能は、曲線下面積 (AUC)、精度、感度、特異度により評価した。

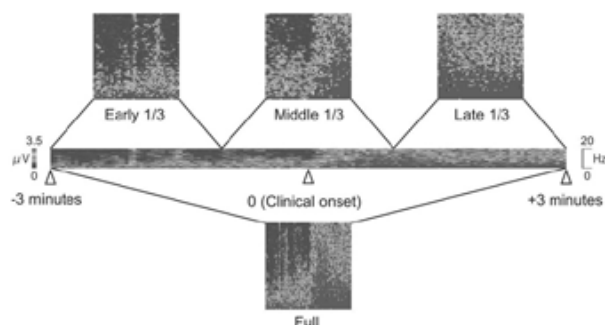


図 1. 時間窓の設定

臨床的起始を 0 とし、-3 分から +3 分までの脳波記録を切り出した (Full)。脳波記録を 3 分割し、-3 分から -1 分までを Early 1/3、-1 分から +1 分までを

Middle 1/3、+1 分から +3 分までを Late 1/3 と設定した。

3. 結果

mTLE 48 例 (106 発作) と PNES 51 例 (100 イベント) を対象とした。2014 年から 2020 年の mTLE 40 例 (91 発作) と PNES 40 例 (82 イベント) を教師用データとして CNN アーキテクチャを作成し、2021 年から 2022 年の mTLE 8 例 (15 発作) と PNES 11 例 (18 イベント) をテスト用データとして、モデルを用いて評価した。各時間窓、各電極で評価した結果、Cz 電極を用いて Middle 1/3 (臨床的起始より -1 分から +1 分) の時間窓での脳波記録による DSA が最も良好な結果を示した。CNN は ResNet34 モデルで AUC 0.959、精度 0.879、感度 0.800、特異度 0.944 を達成した。(表 1, 図 2, 図 3)

表 1. 各電極と時間窓での周波数分析における統計的性能

	時間窓	Cz	C3-C4	Fp1-Fp2	O1-O2
AUC	Early 1/3	0.533	0.589	0.893	0.500
	Middle 1/3	0.959	0.874	0.778	0.704
	Late 1/3	0.700	0.767	0.644	0.533
	Full	0.756	0.826	0.689	0.685
精度	Early 1/3	0.515	0.485	0.818	0.515
	Middle 1/3	0.879	0.758	0.727	0.636
	Late 1/3	0.667	0.667	0.636	0.515
	Full	0.576	0.667	0.667	0.636
感度	Early 1/3	0.533	0.600	0.867	0.533
	Middle 1/3	0.800	0.867	0.733	0.733
	Late 1/3	0.600	0.667	0.600	0.533
	Full	0.400	0.467	0.733	0.667
特異度	Early 1/3	0.500	0.389	0.778	0.500
	Middle 1/3	0.944	0.667	0.722	0.556
	Late 1/3	0.722	0.667	0.667	0.500
	Full	0.722	0.833	0.611	0.611

AUC = area under the curve.

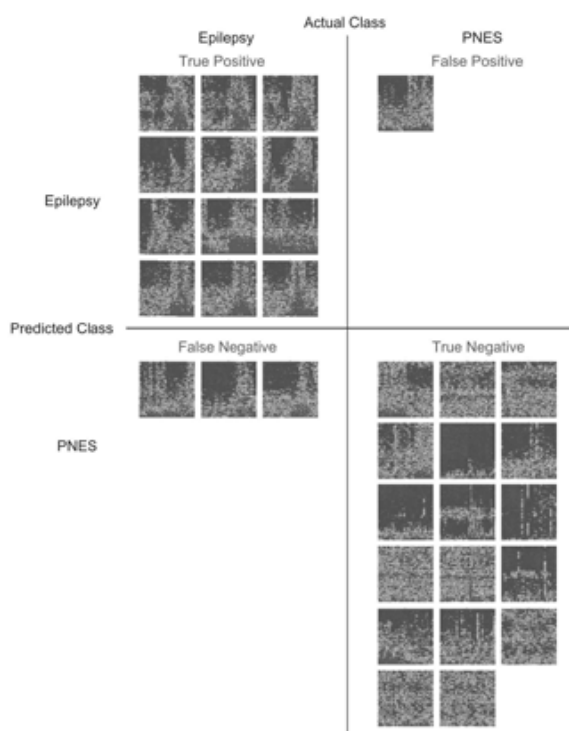


図 2. 畳み込みニューラルネットワークモデルによる分類テストの結果

PNES = 心因性非てんかん発作 (psychogenic nonepileptic seizures)

4. 考察

Cz 電極での記録が最も成績が良かった理由として、眼球運動のアーチファクトや側頭筋収縮による筋原性アーチファクトが入りにくいこと、中心部に位置するため広範囲の脳波を検出できること、Cz が両耳朶電極と最も距離が大きく、パワースペクトルが大きいことが考えられる⁴⁾。Middle 1/3 の時間窓での記録が最も成績が良かった理由として、記録時間における発作時脳波変化の占める割合が最も大きく、体動などのアーチファクトが混入しにくくなるためだと考えられる。深層学習を用いて、Cz 電極で記録した発作・イベント時脳波の DSA で、mTLE のてんかん発作と PNES イベントを鑑別することに成功した。この技術は将来的に在宅で使用可能な TMR 素子を用いたビデオ脳磁図モニタリングシステムにおける検査精度向上および自動化技術開発につながる可能性がある。

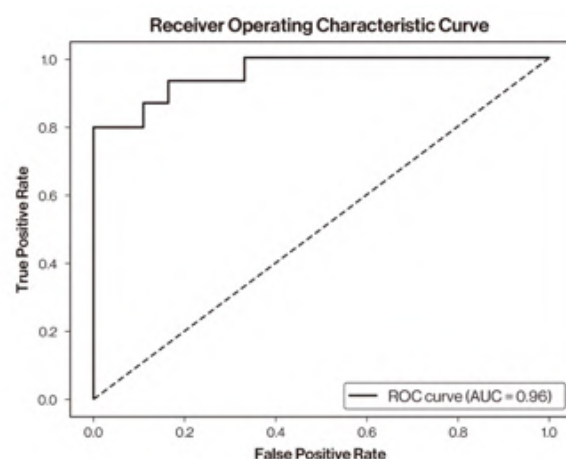


図 3. 耳朶連結を基準とし Cz 電極で-1 分～+1 分まで記録した脳波による density spectral array の receiver operating characteristic curve

謝辞

この研究は公益財団法人渡邊財団の補助を受けて実施したものである。

参考文献

- 1) Fujiwara K, et al. Magnetocardiography and magnetoencephalography measurements at room temperature using tunnel magneto-resistance sensors. Appl Physics Exp (2018).
- 2) Kanno A, et al. Scalp attached tangential magnetoencephalography using tunnel magneto-resistive sensors. Sci Rep (2022).
- 3) He K, et al. Deep residual learning for image recognition. arXiv (2015).
- 4) Yao D, et al. Which reference should we use for EEG and ERP practice? Brain Topogr (2019).

磁性ナノ粒子を用いた神経障害性疼痛の遠隔治療法の開拓

Development of remote treatment method for neuropathic pain using magnetic nanoparticles

上村 真生*

Masao Kamimura *

*東京理科大学 先進工学部, 〒125-8585 東京都葛飾区新宿 6-3-1

* Faculty of Advanced Engineering, Tokyo University of Science
6-3-1 Niijuku, Katsushika-ku, Tokyo 125-8585 Japan

Abstract

Neuropathic pain is an intractable chronic disease caused by various factors including cancer. It is believed that the mechanism of its onset is the abnormal excitation of nerve cells due to the activation of ion channels on the cell membrane when nerve cells are damaged. Our research group has developed a technique for manipulating localized cells, including TRP channels, using stimuli-responsive nanoparticles that are harmless to cells. In this study, we aimed to obtain basic knowledge for creating a technique to treat neuropathic pain safely and effectively by using magnetic nanoparticles as a "remote control agonist" that selectively manipulates TRP channels in nerve cells. When magnetic nanoparticles were added to TRPV2(+) T24 cells and a magnetic field was applied, Ca^{2+} inflow into the cells in response to the magnetic field was observed. Based on these results, it is expected that the method developed in this study can be applied to a new treatment for neuropathic pain.

Keywords: Neuropathic pain, TRP Channel, Magnetic nanoparticle

1. 目的

神経障害性疼痛は、がんなどのさまざまな要因で生じる難治性の慢性疾患であり、全世界で推定15億人以上の患者が存在する深刻な疾患である。たとえば、がん患者は腫瘍の増大による痛みだけでなく、がんが神経に浸潤した際の痛みや、抗がん剤が神経系に与える副作用による痛みなどが生じるために、がん治療と並行して疼痛の緩和ケアが必要となる。このような神経障害性疼痛の発症メカニズムは、神経細胞に障害が発生すると、細胞膜上でイオンチャネルが活性化することで神経細胞が異常に興奮し、「痛みの症状」が生じると考えられている。

このようなイオンチャネルの代表例として

Transient receptor potential (TRP) チャネル (52°C以上の高温または力学刺激によって陽イオンを通過させる) がよく知られており、2021年にはノーベル生理学・医学賞の受賞対象にもなった¹⁾。これらのTRPチャネルは末梢感覚神経終末や皮膚角質細胞に局在して疼痛受容の開始点に深く関与しており、TRPチャネルを制御することで疼痛の発生を遮断できると考えられている。実際に、TRPチャネルを活性化させる低分子薬物 (=アゴニスト) でチャネル機能を脱感化させる治療法が臨床応用されはじめているが (Qutenza (アステラ社), Zuacta (Winston Laboratories 社) など)、強い副作用が問題となっている。

さらに、社会的な要請として、がんをはじめと

するさまざまな疾患に関連する神経障害性疼痛は、全世界に多くの患者がいる深刻な疾患であり、有効な治療技術の開発が世界的に強く望まれている。現在は、患者の体に大きく負担がかかる鎮痛剤や医療用麻薬を用いた治療法や、TRP チャンネルを低分子のアゴニスト薬物で脱感化させる治療法などが利用されているが、これらの既往の疼痛治療法はいずれも安全性の問題と低い治療効果が大きな課題となっている。

この一方でわれわれの研究グループでは、細胞に無害な刺激応答性ナノ粒子を用いた TRP チャンネルを含む細胞局所の操作技術を開発している³⁾。そこで本研究では、本研究の目的は、磁性ナノ粒子を神経細胞の TRP チャンネルを選択的に操作する「遠隔制御型アゴニスト」として利用し、神経障害性疼痛を安全かつ効果的に治療する技術の創出に向けた基礎的知見を得ることを目的とした。

2. 方法

均一沈殿法により Fe_3O_4 ナノ粒子 (Bare-NPs) を合成し、粒子表面にドーパミンを導入した (DOPA-NPs)。つづいて、代表的な生体適合性ポリマーである poly(ethylene glycol) (PEG) の片末端にポリアニオンのブロック構造を有するポリマー (PEG-*b*-polyanion) を、アミド結合を介してナノ粒子表面に固定することで、PEG 化 Fe_3O_4 ナノ粒子 (PEG-NPs) を作製した。得られたナノ粒子の粒径を動的光散乱法により評価し、表面電荷をゼータ電位測定により測定した。さらに、PEG-*b*-polyanion と抗 TRPV2 抗体をナノ粒子表面に同時に導入することで、PEG/抗体共固定 Fe_3O_4 ナノ粒子 (PEG/anti-NPs) を作製した。得られた粒子の粒径分布を動的光散乱測定で測定し、抗体導入を micro BCA 法により評価した。その後、力学刺激応答性 TRPV2 チャンネルを発現しているモデル細胞として、ヒト膀胱がん由来 T24 細胞に PEG/anti-NPs を添加し、磁場印可時の Ca^{2+} 流入を蛍光顕微鏡で観察した。

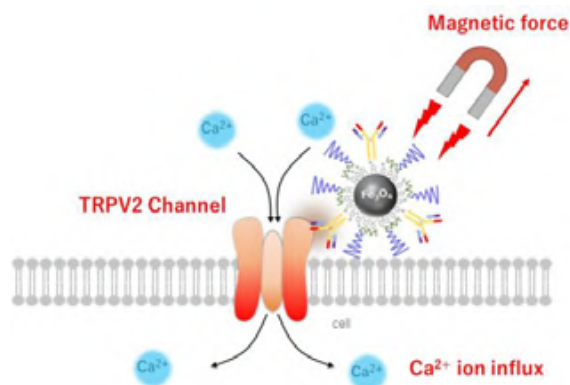


図 1. 表面機能化磁性ナノ粒子による力学刺激応答性イオンチャンネルの操作の概念図。

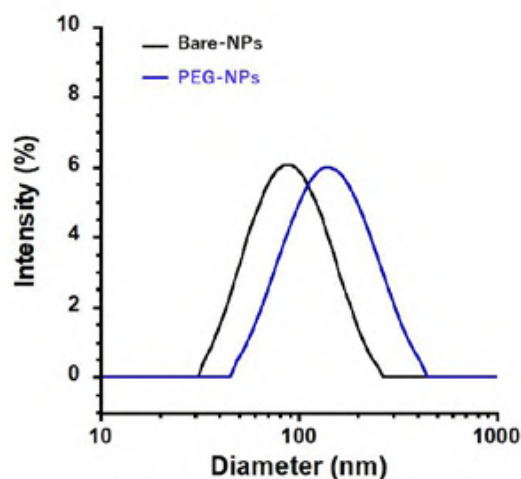


図 2. ナノ粒子の粒径分布。

3. 結果

均一沈殿法を用いて磁性ナノ粒子を合成した結果、粒径約 90 nm の bare-NPs が得られた。つぎに、この bare-NPs に PEG-*b*-polyanion を導入したところ、粒径が約 140 nm となった。この PEG-NPs のゼータ電位を測定した結果、pH を変化した際のゼータ電位の測定値の変化が bare-NPs に比べて小さくなる様子がわかった。つぎに、この PEG/anti-NPs を T24 細胞に添加し、磁場を印加 (30 sec) した後に、細胞内の Ca^{2+} の様子を、 Ca^{2+} 指示蛍光試薬である Fluo-8®を用いて観察した。この結果、磁場を印加していない場合と比較して、磁場を印加した場合には Fluo-8®の蛍光が増大する様子が観察された。

4. 考察

Bare-NPs を PEG 化した結果、粒径が増大する様子が明らかとなった。これは、PEG 化の過程において、複数個のナノ粒子が凝集体として PEG 化されることによって PEG-NPs が得られていることと示唆される。また、ゼータ電位測定の結果より、PEG-NPs は pH によるゼータ電位の値の変化が bare-NPs に比べて小さくなっていることから、ナノ粒子表面にノニオン性の PEG 層が形成されていると考えられる。

さらに、この PEG/anti-NPs を T24 細胞に添加し、磁場を印加すると、磁場印加に応答して細胞内に Ca^{2+} が流入する様子が観察されたことから、細胞膜上の力学刺激応答性 TRPV2 チャネルを活性化できていることが示唆された。

謝辞

この研究は公益財団法人渡邊財団の補助を受けて実施したものである。

参考文献

- 1) M. J. Caterina et al., *Nature*, 389 (1997) 816.
- 2) Ari-Pekka Koivisto et al., *Nat. Rev. Drug Discov.*, 21 (2022) 41.
- 3) W. Chen et al., *Nanoscale* 14 (2022) 2210.

経頭蓋静磁場刺激が有する脳内ネットワーク調節作用の神経生理学的解明

Investigation of the neuromodulatory effects of transcranial static magnetic field stimulation (tSMS) on brain network dynamics

芝田 純也
Sumiya Shibata

新潟医療福祉大学理学療法学科, 〒950-3198 新潟市北区島見町 1398 番地
Department of Physical Therapy, Niigata University of Health and Welfare
1398 Shimami-cho, Kita-ku, Niigata-shi, Niigata 950-3198 Japan

Abstract

Transcranial static magnetic field stimulation (tSMS) is the latest biomagnetism technique which can non-invasively stimulate the human brain. The aim of this study was to investigate the neurophysiological mechanisms of the neuromodulation of tSMS using transcranial magnetic stimulation with electroencephalography (TMS-EEG), which is a novel method for exploring excitability and connectivity of the brain network. tSMS was applied over the left primary motor cortex (M1) for 20 min in 15 healthy subjects. tSMS altered TMS-evoked potentials (TEPs), which are the EEG responses time-locked to the TMS pulse, both at the stimulated M1 and at the contralateral M1.

Keywords: transcranial static magnetic field stimulation (tSMS), TMS-EEG, TMS-evoked potential (TEP), interhemispheric inhibition

1. 目的

経頭蓋静磁場刺激 (tSMS) は、永久磁石を頭表に留置し、その直下の脳皮質の興奮性を抑制する新しい非侵襲的脳刺激法である。近年、tSMS は磁石から離れた部位にも神経調節作用を及ぼすことが報告され、脳内ネットワークの可塑的变化を誘導することが見出された¹⁾。本研究は、経頭蓋磁気刺激-脳波同時記録法 (TMS-EEG 法) を用いて神経活動の伝播を可視化し、tSMS が誘導する脳内ネットワークの可塑的变化を解明することを目的とした。

TMS-EEG 法は、多チャンネル脳波記録を持続的に行いながら脳に外的刺激を加え、誘発される脳電場変化、つまり神経活動の応答を全脳で記録解析する手法である。神経活動の刺激応答の時間

的空間的広がり記録できる TMS-EEG 法を用いることで、脳内ネットワークを可視化できる。

2. 方法

健常被験者 15 名 (男性 9 名, 平均年齢 22.3 歳) を対象とし、左 M1 に対する tSMS (N-50 型, ネオマグ, 日本。表面磁束密度 5340 G, 吸着力 88 kgf), あるいは tSMS で用いる磁石と同一の外見・重量をもつ非磁性鋼を左 M1 直上に留置するシャム刺激をランダムな順序で 3 日以上の間隔を空けて実施した。介入時間は 20 分間で、それぞれの介入前, 介入直後, 介入終了 20 分後に、TMS-EEG 法にて左 M1 に刺激を加えた際の全脳における刺激応答を記録した (図 1)。

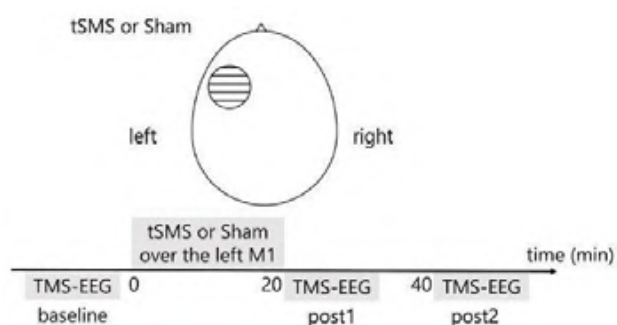


図1 実験プロトコル

文献6 Figure 4 より引用

CC BY-NC-ND 4.0

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

TMS (Magstim Co., UK) は安静時運動閾値と同じ強度で120回単発刺激を行った。脳波記録は、64チャンネル脳波計 (Brain Products, Germany) を用いサンプリング周波数5 kHzで行った。

得られた脳波データをTESA (TMS-EEG signal analyzer) ²⁾で前処理した後、加算平均し各電極のTEPを算出した。その後、FC1, FC3, FC5, C1, C3, C5, CP1, CP3, CP5のTEPを平均して左一次感覚運動野 (SM1) のTEP, FC2, FC4, FC6, C2, C4, C6, CP2, CP4, CP6のTEPを平均して右SM1のTEPとした。TMSによるアーチファクトを考慮して、TMS後26~100 msを解析対象区間とした。

TEPの時間的変化を調べるため、実刺激・シャム刺激ともに、post1とpost2のTEP波形をnon-parametric cluster-based permutation test ³⁾により介入前のTEP波形と比較した (有意基準5%未満)。

3. 結果

左SM1 (刺激側) のTEPにてP30, N45, P55, N100のピークを認めた。このうちP30の振幅が実刺激のときにpost1で有意に減少した (図2a)。

右SM1 (刺激対側) のTEPにてN60のピークを認めた。N60の振幅は実刺激のときにpost2で有意に増大した (図2b)。

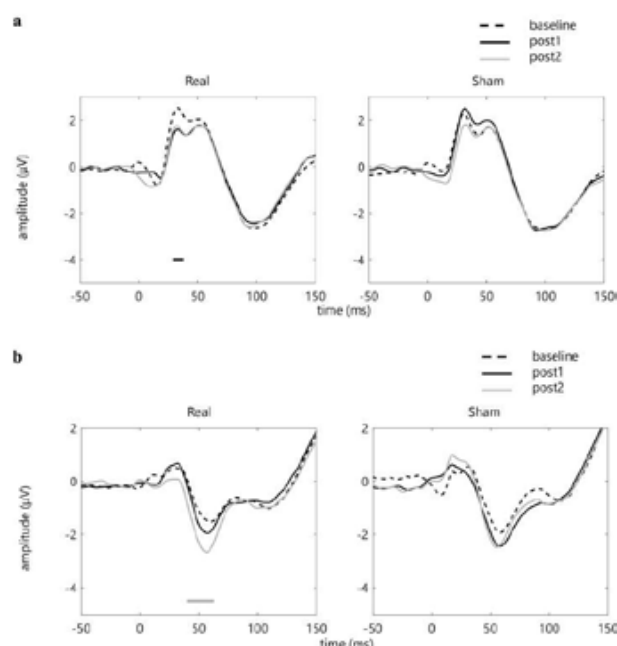


図2 TEP 波形

文献6 Figure 1 より引用

CC BY-NC-ND 4.0

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

4. 考察

tSMSは磁石直下の脳皮質の興奮性を抑制する。TMS-EEGにおけるP30は皮質脊髄路の興奮性を反映するとされており⁴⁾、tSMSによる脳機能抑制によりP30の振幅が減少したと考えられる。

両側の一次運動野は互いに抑制しあっている (大脳半球間抑制, interhemispheric inhibition)。一方のM1が抑制されると、対側M1への大脳半球間抑制が減弱し対側のM1の興奮性が増加する⁵⁾。本研究で認めた刺激対側のN60の振幅増大は、tSMSにより左M1が抑制され、左M1から右M1への大脳半球間抑制が減弱し、その結果、右M1の興奮性が増大したことを反映すると考えられる。

謝辞

本研究は公益財団法人渡邊財団の第4回岡井治特別研究助成の補助を受けて実施したものである。厚く御礼申し上げる。また、本研究はJSPS科研費19H01091, 21K17671, 22H04788, 23H00459, 23K18440, 23K24712, 24K02787と、新潟医療福祉大学・研究奨励金の助成も受けた。

本研究の内容は、国際誌 Scientific Reports ⁶⁾に掲載された。

参考文献

- 1) Sumiya Shibata et al.: Sci. Rep. 11, 1-7 (2021).
- 2) Nigel Rogasch et al.: Neuroimage, 147, 934-951 (2017).
- 3) Maris Eric et al.: J. Neurosci. Methods 164, 177-190 (2007)
- 4) Hanna Mäki et al.; Neurosci. lett. 478, 24-28 (2010)
- 5) Yasuyuki Takamatsu, et al.; Sci. Rep. 11, 5370 (2021).
- 6) Sumiya Shibata et al.: Sci. Rep. 14, 22394 (2024).

生物の磁力応答機構の解明

小林 和弘

東京大学 先端科学技術研究センター, 〒153-8904 東京都目黒区駒場 4-6-1

Abstract

Magnetobacteria sense geomagnetism with the「magnetosome」, comprising a magnetite. Magnetosomes are aligned on the mamK mediated by the mamJ, and this system works as a magnetic compass. Then, this unique system gathers broad interest to understand magnetoreception in bio-organism. However, there is no-magnetoreception mechanisms due to toughness in purification this system. Here, I present a high-resolution cryo-electron microscopy (cryo-EM) structure of mamJ bound mamK filaments at 2.5 global resolution through the purification of functional mamJ and mamK. This structure provides the entire architecture of mamK and partial mamJ structure at the mamK dimer interface. Further image analysis will highlight the entire comprehensive mamJ structure and will reveal a molecular basis of magnetoreception in bio-organisms.

Keywords: Magnetoreception, cryo-electron microscopy, structural biology

1. 目的

磁性細菌は磁鉄鉱を内包した細胞内小胞により磁力を受け取っており、この磁鉄鉱により感知した磁力を mamJ と呼ばれるタンパク質を介して mamK と呼ばれるアクチン様フィラメント骨格に伝え、磁力を自身の運動に変換する機能を持っている¹⁾。本研究では磁性細菌に着目し、mamK 及び mamJ のタンパク質精製系を確立、クライオ電子顕微鏡を用いた単粒子構造解析によりその分子基盤の解明を目指す。

2. 方法

mamJ 及び mamK の遺伝子をクローニングし、大腸菌発現用ベクターに構築する。これらのタンパク質について、affinity 精製、イオン交換クロマトグラフィー、タンパク質離フォールディングなどの多様な方法を検討し、機能的な状態の mamJ 及び mamK の精製を行う。得られた精製タンパク質を用いてクライオ電子顕微鏡による単粒子構造解析を行い、mamJ-mamK 複合体の立体構造を明らかにする。これにより mamJ-mamK の結合様式を解明し、mamJ が磁力による力を mamK に伝えるメカニズムを解明する。

3. 結果

磁性細菌を培養し、mamK 遺伝子のクローニングを行った。得られた増幅産物を大腸菌タンパク質発現用ベクターに挿入し、mamK 発現用ベクターを構築した。ここで、先行研究の mamK 精製論文を参考に²⁾、mamK の C 末端領域に affinity 精製用の histidine tag を融合した mamK-histidine tag の融合タンパク質の形で大腸菌に発現させた。目的タンパク質を発現した大腸菌を回収し破碎したところ、大部分の mamK タンパク質は inclusion body に局在しており、わずかな mamK のみが上清中に抽出された。この上清中のタンパク質を Ni-NTA resin による affinity 精製にて濃縮し、高純度の mamK タンパク質の取得に成功した。これらのタンパク質に 5 mM Mg²⁺ 及び 5 mM ATP を加えることでフィラメントの再構成を行い、遠心分離にて上清中に未反応の mamK 単体を沈殿にフィラメントを形成した mamK を分離した。これらの画分を SDS-PAGE により分離したところ、どちらの画分にも mamK が局在しており、機能的な mamK の精製に成功した。しかし、フィラメント化している mamK は一部であり、融合した histidine tag が mamK のポリマー化を阻害していることが示唆された。そこで、もう一方の mamK の精製論文を参

考に³⁾、histidine tag を削除し、タンパク質リフォールディングにより mamK を精製した(図 1a)。この手法により精製したタンパク質を用いて上記の条件にてフィラメント形成実験を行ったところ、加えた mamK のほぼ全量がフィラメント化することが明らかになった。そのため、大腸菌で発現した mamK をタンパク質リフォールディングにより抽出することで機能的な mamK を発現・精製できることが明らかになった。次に、mamJ を発現するために大腸菌発現用ベクターに mamJ 遺伝子を histidine tag との融合タンパク質にてクローニングし、大腸菌内に発現させた。mamJ についてもその大半が inclusion body に発現したため、タンパク質リフォールディングを用いた精製、histidine tag を用いた affinity chromatography 精製の 2 段階の精製を行った。これにより、世界で初めて高純度の mamJ の精製に成功した(図 1b)。次に、精製 mamK、精製 mamJ を混合し、Mg²⁺及び ATP の有無による mamJ-mamK 複合体の再構成実験を行った。その結果、mamJ は mamK 単体とは結合せず、mamJ はフィラメントを形成した mamK とのみ結合することが明らかになった(図 1c)。そこでこの再構成タンパク質を用いてクライオ電子顕微鏡観察試料(grid)を作製し、クライオ電子顕微鏡を用いて観察を行った。その結果、明瞭な mamK のフィラメントが観察された一方で、mamJ の結合割合は低く、grid 上には巨大なタンパク質の凝集体が見られた。この結果から、mamJ はその安定性の低さから grid 作製時に mamK から解離し、その大半が凝集してしまうことが示唆された。そこで、mamJ を小型化することにより熱安定性を向上させることを目指し、幾つかの mamJ 部分的欠損タンパク質を設計し、大腸菌を用いて発現・タンパク質リフォールディングにより精製を行った。これらのタンパク質を用いて mamK との結合実験を行ったところ、mamJ の N 末端及び C 末端領域が mamK との結合に重要であることが明らかになった。そこで、mamJ の N 末端及び C 末端をリンカー配列で繋いだ新規小型化 mamJ を作製し、大腸菌を用いて発現・精製を行った。この小型化 mamJ を用いて mamK との結合実験を行ったところ、小型化 mamJ はフィラメント化した mamK のみと結合し、溶液中に存在する mamJ の

ほとんどが mamK と結合することが明らかになった(図 1d)。そこで、この再構成タンパク質を用いて grid を作製し、クライオ電子顕微鏡を用いた単粒子構造解析を行った結果、平均分解能 2.5 Å という高分解能にて mamK フィラメントの三次元構造取得に成功した(図 2)。得られたマップを詳細に観察したところ、mamK タンパク質の繋ぎ目部分に mamJ と思われる密度マップが観測され、mamJ は 2 つの mamK の繋ぎ目に結合していることが示唆された(図 2)。現在この mamJ の結合領域について局所的画像分類を行っており、mamJ の結合様式を可視化する解析を行っている。

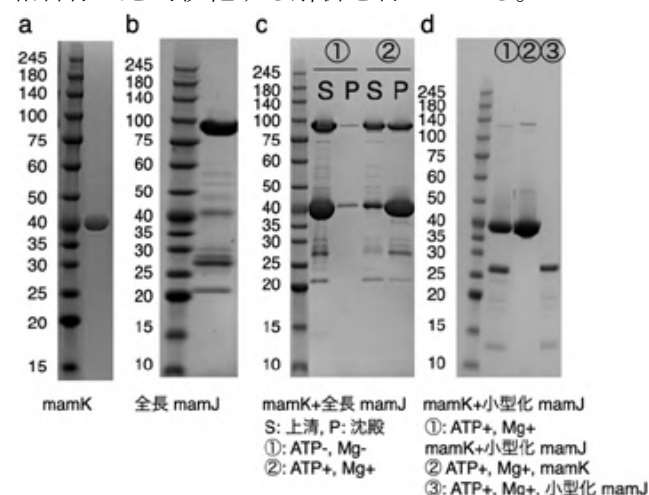


図 1. mamK 及び mamJ の精製

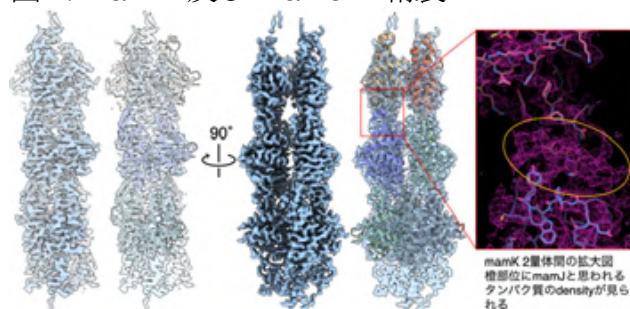


図 2. mamK+mamJ タンパク質の高分解能三次元立体構造

4. 考察

得られた密度マップからは mamJ が mamK 単量体の繋ぎ目部分に結合していることが示唆されており、mamJ 1 分子の結合には mamK 2 分子が必要であることを示している。この事実は mamK 単体には mamJ が結合せず、フィラメント形成した mamK とのみ結合するという本研究の結果とも一致しており、mamJ は mamK の三次元的構造を認識して結合することが示唆される。

5. 謝辞

この研究は公益財団法人渡邊財団による第 30 回磁気研究助成の補助を受けて実施したものであり、貴財団に厚く御礼申し上げます。

6. 参考文献

1) René Uebe & Dirk Schüler : Magnetosome biogenesis in magnetotactic bacteria. *Nat Rev Microbiol* 14, 621–637 (2016).

2) Jan Löwe, Shaoda He, Sjors H W Scheres, Christos G Savva : *Proc Natl Acad Sci USA*. 22;113(47):13396-13401, (2016)

3) Julien RC Bergeron, Rachel Hutto, Ertan Ozyamak, Nancy Hom, Jesse Hansen, Olga Draper, Meghan E Byrne, Sepehr Keyhani, Arash Komeili, Justin M Kollman : Structure of the magnetosome - associated actin - like MamK filament at subnanometer resolution, *Protein Sci.* Jan;26(1):93-102, (2017)

脳脊髄同時磁気共鳴画像による随意運動能力の回復を支える

脳脊髄連関の定量化法の確立

臼田 升

Noboru Usuda

公益財団法人 東京都医学総合研究所 臨床医科学研究分野

脳機能再建プロジェクト,

〒156-8506 東京都世田谷区上北沢 2-1-6

Neural Prosthetics Project, Department of Clinical Medical Sciences

Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science

Kamikitazawa 2-1-6, Setagaya-ku, Tokyo 156-8506, Japan

Abstract

Stroke damages the corticospinal tract (CST), causing motor paralysis. Accurate prognosis biomarkers are needed to plan effective rehabilitation. This study aims to visualize brain-spinal connections supporting voluntary movement using simultaneous brain-spinal functional MRI and diffusion MRI. We examined nine stroke patients to assess structural and functional changes. Results showed CST damage and altered brain and spinal cord activity during hand movement. These methods may help predict recovery and develop better rehab strategies.

Keywords: Stroke, Corticospinal tract (CST), Motor recovery, Functional MRI (fMRI), Diffusion MRI (dMRI), Prognostic biomarker, Voluntary movement, Brain-spinal connectivity, Rehabilitation, Tractography

1. はじめに

脳内の血管が破れたり詰まったりすることで脳に障害を与える脳卒中は、本邦で毎年 100 万人が罹患する疾患である。患者の多くは、健常時に随意運動を支えている反対側の皮質と脊髄を繋ぐ神経路である皮質脊髄路 (CST) の損傷による運動麻痺に苦しんでいる。機能回復を目指した効率的なリハビリプランの策定のためには、個々人の機能回復の見通しを立てることが重要である。そのために予後予測のバイオマーカーの発見が重要となる。

これまで脳を対象とした磁気共鳴画像 (MRI) によって、機能回復する患者としない患者では、CST の構造 (Stinear et al., 2007)、麻痺側の運動時の皮

質の活動が異なるといった報告がされている (Grefkes and Ward., 2014)。こうした事実は、脳 MRI による調査が、随意運動機能回復を予測するバイオマーカーの発見につながる可能性を示している。しかし現状では、脳 MRI 単独では十分な予後を予測することが難しく、脳と脊髄の活動を評価できる電気生理学的指標と組み合わせないと予後を十分に評価することができないという問題がある (Stinear et al., 2007)。

医療現場においては、より簡便で短時間で評価できる指標が求められている。故に複数の評価が必要な現状を打破し、脳だけでなく脊髄も含めた正確な評価方法を確立することが必要である。こうした評価方法の実現は、脳卒中患者の予後をよ

り簡便かつ正確に診断するバイオマーカーの発見につながる可能性を秘めている。

本研究提案の目的は、脳卒中後の正確な予後予測のバイオマーカーを発見するために、「随意運動制御を支える脳脊髄連関の可視化法を確立し、回復を支える脳脊髄神経経路・機能連関再編成の解明」することである。その達成のために、脳と脊髄を撮像範囲とした脳脊髄同時 MRI 撮像法を確立し、この確立した手法を用いて脳脊髄神経経路・機能連関再編成の可視・定量化を目指す。

2. 方法

脳卒中患者 9 名を（女性 3 人、年齢： 57.56 ± 14.43 、身長： 1.65 ± 0.1 m、体重： 63.71 ± 18.31 kg（平均 $\pm$ 標準偏差））を対象に実験を行った。研究はヘルシンキ宣言に従って実施された。参加者は全員、参加前に書面によるインフォームド・コンセントを行った。本研究プロトコルは、東京都医学総合研究所の倫理委員会及び千葉リハビリテーションセンターの倫理委員会によって承認されている。

MRI データは、3T MAGNETOM Skyra（Siemens Healthcare GmbH, Erlangen, Germany）にて、20 チャンネルヘッドコイルで取得した。

構造画像として T1 強調画像、T2 強調画像を取得した、損傷部位を特定するために FLAIR 画像を取得した。

残存下行路の定量評価を行うために、拡散強調画像（DWI）を撮像した。頸髄（C）1 のレベルの外側側索背側部から、反対側の橋、中脳大脳脚を通過し、一次運動野（M1）に至る神経線維 Streamlines を、健側並びに患側それぞれに描出した。

運動に関連する活動を Multiband GE-EPI 法（Moeller et al., 2009）を用いた fMRI により全脳から第 7 頸椎まで入る撮像範囲 1.6 秒間隔で計測した。撮像開始前に仰臥位で被験者の両手の最大握力を測定し、撮影中は指示された側の手を握る 16 秒間のタスクブロックと 16 秒間の休憩ブロックを交互に実施した。タスクブロックでは画面上の提示に従って、被験者は 0.625Hz の周期で最大握力の 50%となる握力を発揮した。

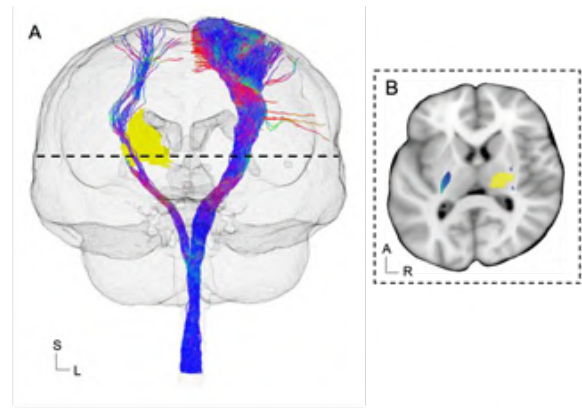


図1 交差性皮質脊髄路（CST）のstreamlines 右半球に損傷がある患者の左右のそれぞれの一次運動野からの反対側背外側側索を繋ぐCSTのstreamlinesを三次元で示している（A）。Aの図の内包の位置の横断面を右手に示している。黄色の関心体積は損傷領域を示している。Aはanterior、LはLeft、RはRight、SはSuperior、VはVentralを意味している。

3. 結果

図1は一人の代表的結果を示したものである。右半球の内包後脚領域で損傷が確認された（図1）。

DWI 画像に基づいた神経線維トラクトグラフィの結果により、健側、損傷側のそれぞれの M1 から発出する CST を描出した（図1A）。健側では 4134 本の Streamlines が描出されたのに対し、患側では 29 本の Streamlines が描出された。損傷部における通過域を確認すると、損傷を免れた内包後脚の一部を Streamline が通過していることを確認できた（図1B）。

fMRI 画像を基に、右手と左手を握った時の活動を解析した。非麻痺側である右手を握った際には、健側側の M1 や運動前野（PM）、一次体性感覚野（S1）で有意な活動が確認された。脊髄では、C6 のレベルで有意な活動が確認できた。一方で、麻痺側である左手を握った際には、反対側の右半球のみならず、左半球の M1、PM、S1 で有意な活動が確認された。一方で脊髄では活動を確認することはできなかった。

4. 考察

ヒトの随意運動は皮質と反対側の脊髄を繋ぐ下行路である CST によって支配されている。健側の M1 からの Streamlines の本数に比べて、患側の M1 からの Streamlines の本数は 100 分の 1 未満である事実は、患側からの運動指令を脊髄まで到達させる経路の大部分が損傷されていることを示

唆する（図1）。

健常側の手を握る際に反対側の皮質と脊髄に有意な活動が見られた一方で、麻痺側の手を握る際には、両側皮質で活動が確認され、脊髄では活動が確認できなかった（図2）。

以上の構造と機能の解析の結果は、CST の損傷によって反対側の脊髄へ運動指令が送ることができず、この結果が運動麻痺を引き起こしていることを意味している。

脳脊髄MRIによって、脳卒中患者の随意運動制御を支える残存神経とその活動を定量的に評価する方法を確立した。今後は患者とそのコントロールとしての健常者のデータを測定していく予定である。この研究によって予後の予測や、新たなリハビリプランの策定への寄与を目指す。

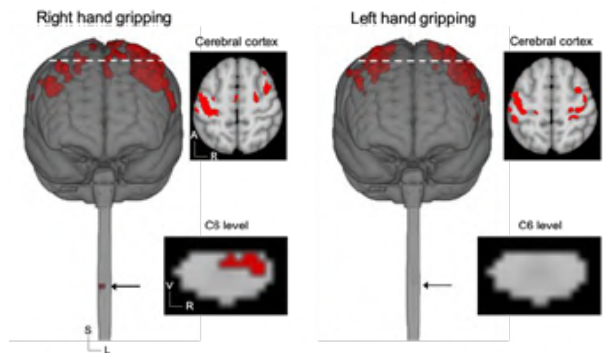


図2 左右手のタスク実行時の皮質と脊髄の活動 右半球に損傷がある患者の左右の手それぞれで動的な等尺性収縮を行った際の皮質(cluster-level $p_{FWE} < 0.05$ with a height threshold $p_{uncorr.} < 0.001$)と脊髄の活動 (cluster-level $p_{FWE} < 0.05$ with a height threshold $p_{uncorr.} < 0.005$)。赤の関心体積は統計的に優位な活動を示している。Aはanterior、LはLeft、RはRight、SはSuperior、VはVentralを意味している。

5. 謝辞

この研究は公益財団法人渡邊財団による第30回磁気研究助成のご支援を受けて実施したものです。財団の関係者の皆様に厚く御礼を申し上げます。

6. 参考文献

- (1) Stinear, C.M., Barber, P.A., Smale, P.R., Coxon, J.P., Fleming, M.K., Byblow, W.D., 2007. Functional potential in chronic stroke patients depends on corticospinal tract integrity. *Brain* 130, 170–180.
- (2) Grefkes, C., Ward, N.S., 2014. Cortical reorganization after stroke: how much and how functional? *Neuroscientist* 20, 56–70.
- (3) Moeller, S., Yacoub, E., Olman, C.A., Auerbach, E., Strupp, J., Harel, N., Ugurbil, K., 2010. Multiband multislice GE-EPI at 7 tesla, with 16-fold acceleration using partial parallel imaging with application to high spatial and temporal whole-brain fMRI. *Magn. Reson. Med.* 63, 1144–1153.

治療抵抗性統合失調症に対する最新 鋭ニューロモデレーションの開発

中島 振一郎（慶應義塾大学医学部 精神・神経科 専任講師）

〒160-8582 東京都新宿区信濃町 35 慶應義塾大学医学部 精神・神経科

【抄録】本研究では、治療抵抗性統合失調症のニューロモデレーション開発のために、2 研究を行った。構造 MRI データにデータ駆動型ベイズモデルを適用し、治療抵抗性統合失調症の病型分類と病態進行パターンの同定を行った。TRS 患者は進行度の高い脳構造変化を示し、進行型の病態である可能性が示唆された。また、精神病のリスク状態と統合失調症における皮質構造共変動を解析した結果、精神病発症や治療反応と皮質厚の共変動が関連していた。皮質構造共変動のハブとなる部位がニューロモデレーションの刺激部位の候補となる可能性が高く、統合失調症の発症予測や治療反応促進のためのニューロモデレーションの開発の基盤となることが期待される。

Keywords: Schizophrenia, MRI, Machine Learning, Structural Covariance, Psychosis Risk, Treatment Response

1. 目的（PURPOSE）

研究 1：統合失調症における治療抵抗性（Treatment-Resistant Schizophrenia: TRS）は、患者の生活の質や社会的機能を著しく損なうとともに、医療資源を圧迫する重大な課題である。TRS は一般的な抗精神病薬に反応を示さないため、治療反応において異なる病態基盤の存在が示唆されてきた。本研究の目的は、TRS 患者における脳形態の変化パターンを、MRI データを用いたデータ駆動型の手法で明らかにし、病態進行の脳内マーカーを探索することである。

研究 2：精神病の発症リスクが高い状態（At-Risk Mental State : ARMS）にある

個人の発症率は 2 割である。本研究の目的は、発症と抗精神病薬治療反応と関わる皮質共変動ネットワークを発見することである。

2. 方法（METHOD）

研究 1：本研究では、カナダと日本の複数施設から収集された 191 名の統合失調症患者と 191 名の健常対照者の脳 MRI データを使用した。統合失調症患者は TRS (n=66) と非 TRS (n=125) に分類された。脳形態データに対して、欧州発の多施設コンソーシアムで開発された「Sustain (Subtype and Stage Inference)」と呼ばれるベイズ推定モデルを適用し、病態進行の潜在的パターン

ン（病態軌道）を同定した。解析には FreeSurfer で処理された皮質厚・表面積・皮質下体積の 68 指標を用いた。

研究 2：本研究では、日本の多施設共同プロジェクトで収集された健常者（HC）、ARMS 個体、統合失調症患者（SZ）からなる合計 300 名以上の構造 MRI データを対象とした。FreeSurfer を用いて各被験者の皮質厚と表面積を 68 領域に分割・抽出し、それらの間の構造共変動（correlation）をグループごとに算出した。同様の手法を研究 1 のデータにも適応した。

3. 結果（RESULTS）

研究 1：Sustain 解析により、統合失調症には 3 つの異なる脳形態進行パターンが存在することが明らかとなった。第 1 のパターンは前頭-側頭皮質の萎縮を中心とする「皮質優位型」、第 2 のパターンは基底核を含む皮質下構造の体積減少を示す「皮質下優位型」、第 3 は広範な大脳皮質の表面積の減少を含む「全体拡散型」である。TRS 患者では、これらのパターンのいずれかにおいて、病態進行のステージ（stage）が有意に進んでいる傾向が認められ、特に皮質下優位型と全体拡散型で顕著であった。

研究 2：ARMS 群では、健常群および統合失調症群と比較して、広範な脳領域間において皮質厚の構造共変動が増大していた。特に前頭・側頭葉におけるネットワークの結合度が顕著であり、ネットワーク密度およびモジュール性も健常者に比して有意に高かった。さらに、フォローアップ調査により、後に精神病へと移行した ARMS 個体において、より強い

構造共変動が認められた。一方、responders 群では皮質間の共変動の強さが高く、より緊密なネットワーク構造を呈していた。一方、nonresponders 群では、前頭葉や頭頂葉を中心としたネットワークの結合性が著しく低下しており、ネットワーク密度や効率も低下していた。また、皮質厚の SCN スコアは臨床的な改善度と正の相関を示した。

4. 考察（DISCUSSION）

研究 1：本研究は、TRS が統合失調症の中でもより高度に進行した病態である可能性を支持し、脳構造変化の進行パターンを通じてその生物学的異質性を明確にした点に意義がある。Sustain モデルを活用することで、従来の診断分類を超えた精密医療的アプローチが可能となる。本結果は、将来的に MRI を用いた病態分類や治療予測マーカーの開発につながる可能性を示唆する。また、TRS への早期介入の必要性や、非 TRS との違いに基づく治療開発の方向性に重要な示唆を与えるものである。

研究 2：本研究は、ARMS 個体における皮質構造のネットワーク的な異常、特に皮質厚の構造共変動の増強が、精神病発症リスクの生物学的マーカーとなる可能性を示唆し、早期診断および予防的介入のターゲットとして有用性が高い。また、統合失調症における構造的共変動ネットワークが、抗精神病薬の治療反応性と関連することを示した初の試みの一つであり、治療予後の個別予測に資する新たな神経マーカーの可能性を提供する。

本研究計画では、治療抵抗性統合失調症 (TRS) に対する新規 rTMS プロトコール、特に QPS (Quadripulse Stimulation) の有効性と安全性を検証することを目的とし、特定臨床研究として正式に申請・承認を受けた。しかし、刺激部位やパラメータ設計が TRS 特有の病態生理を十分に反映していないという課題があった。このため、本研究の遂行に先立ち、申請者らはあえて一歩立ち止まり、臨床試験開始前に TMS 刺激部位の科学的妥当性を検証するための一連の構造脳画像研究を実施した。これらの結果から、共通して関与が認められた前帯状皮質、前頭極、島皮質などのネットワークハブ部位が刺激候補として抽出された。今後はこれらの部位を対象に、東京大学工学部関野研究室が開発する深部刺激コイルを用いた治療開発を行っていく予定である。本研究は、病態生理に根ざした rTMS 治療の設計とその臨床応用を目指す、世界初の枠組みとしての意義を有しており、精神疾患治療におけるニューロモデレーション戦略の転換点となる可能性がある。

【文献】

- 1) Sone D, Young A, Shinagawa S, et al. Disease Progression Patterns of Brain Morphology in Schizophrenia: More Progressed Stages in Treatment Resistance. Schizophr Bull. 2023; sbad164.
- 2) Sasabayashi D, Tsugawa S, Nakajima S, et al. Increased structural covariance of cortical measures in individuals with an at-risk mental state. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 2025.
- 3) Tsugawa S, Honda S, Noda Y, et al. Associations Between Structural

Covariance Network and Antipsychotic Treatment Response in Schizophrenia. Schizophr Bull. 2023.

令和6年度 研究助成テーマ

令和6年度は、以下のように、第31回 16名(基礎4名・応用5名・テーマ指定7名)の研究に対し助成が決定いたしました。

I.基礎研究

I-1. 拡散強調画像による脂肪細胞微細構造の可視化

東京科学大学リベラルアーツ研究教育院、東京科学大学大学院環境・社会理工学院、社会・人間科学系 准教授／小川 まどか

I-2. 経鼻投与と磁気を利用した脳部位選択的薬物デリバリーによる脳腫瘍治療システムの構築

名古屋市立大学 大学院薬学研究科 講師／小川 昂輝

I-3. 行動停止のモニタ・調節を行う神経回路の解明：TMSとfMRIを用いたマルチモーダル研究

順天堂大学 准教授／長田 貴宏

I-4. 交流コットン＝ムートン効果による磁性リボソームのキャラクタリゼーション法の開発

大阪大学 助教／諏訪 雅頼

II.応用研究

II-1. 超偏極¹³C-ピルビン酸を用いた磁気共鳴分光法による脳内エネルギー代謝の空間的可視化と応用

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構 研究員／小野 麻衣子

II-2. 経頭蓋磁気刺激による神経調節と脳磁図による脳活動計測の融合

東京大学医学部附属病院 講師／代田 悠一郎

II-3. 磁性化間葉系幹細胞を利用した新規がん磁気温熱化学療法の開発

神戸薬科大学 薬剤学研究室 准教授／河野 裕允

II-4. ディスク状ナノ粒子を利用した¹⁹F MRI造影剤の開発

大阪大学大学院工学研究科附属フューチャーイノベーションセンター 助教／山本 智也

II-5. 磁気による診断および治療のための人工遺伝子の開発

北海道大学大学院医学研究院 准教授／小野寺 康仁

III.テーマ指定研究

III-1. 蝸牛内シスプラチンを磁気誘導技術により体外回収する革新的難聴治療

北里大学 医学部 耳鼻咽喉科・頭頸部外科 講師／栗岡 隆臣

III-2. 拡散テンソル磁気共鳴画像を用いた統合失調症の病態研究

帝京大学 薬学部 臨床薬学講座 薬効解析学研究室 教授／大澤 匡弘

III-3. 交番磁界による慢性疼痛緩和の機序解明

帝京大学 薬学部 臨床薬学講座 薬効解析学研究室 教授／大澤 匡弘

III-4. 経頭蓋静磁場刺激が脳卒中後半側空間無視症状に及ぼす影響

広島大学大学院医系科学研究科 育成助教／松本 杏美莉

III-5. 皮質網様体脊髄路における可塑性の包括的理解を目指すマルチモーダル研究

東京大学総合文化研究科 博士課程1年／石川 慶一

III-6. 末梢磁気刺激による運動機能改善と効果機序の解明

山形県立保健医療大学 教授／仁藤 充洋

III-7. 聴覚-運動連関の神経可塑的变化を誘導する聴覚刺激と磁気刺激の非侵襲的脳刺激法の開発

慶應義塾大学大学院 政策・メディア研究科 後期博士課程2年(大学院生)／佐田 静香

なお、所属は研究助成決定当時のものです。

THE REPORT OF STUDY RESULT BY SUBSIDY

30TH

(STUDY DURATION : April 1, 2024 – March 31, 2025)

Special Research Grant 2021

(STUDY DURATION : April 1, 2022 – March 31, 2025)

CONTENTS

Preface	1
Director Makoto Kotani	
I. Basic Research	
I-1. Mechanisms of Bone Repair-enhancing Effects of Extremely Low-Frequency Electromagnetic Fields	2
Kanazawa University Associate Professor Isao Kobayashi	
I-2. Development of safe and effective immunotherapy	5
Keio University full-time lecturer Satoshi Inoue	
I-3. Noninvasive Brain Mapping of Language Function Using Steady-State Induced Magnetic Fields	8
Department Linguistic, Faculty of Humanities, Kyushu University Assistant professor Emi Yamada	
I-4. Development of construction methods engineered muscle tissues combining permanent magnets and magnetic field modulators	11
Fukui University of Technology Professor Kazuya Furusawa	
I-5. Development of bio detection methods using changes in magnetic properties of magnetic nanoparticle/biological material aggregates	15
Tohoku University Professor Shin Yabukami	
II. Application Research	
II-1. Establishment of Bladder-Preserving Therapy for Muscle-Invasive Bladder Cancer Using Nanoparticles	20
Department of Nephro-urology, Graduate School of Medical Sciences, Nagoya City University Senior resident Masakazu Gonda	
II-2. Mechanisms of spasticity treatment by peripheral magnetic stimulation	23
Department of Rehabilitation Medicine, Keio University School of Medicine Assistant professor Takayuki Kamimoto	
II-3. Development of video magnetoencephalography monitoring system with tunnel magneto-resistant sensors	27
Department of Neurology and Epileptology Tohoku University School of medicine Medical staff Kazutoshi Konomatsu	
II-4. Development of remote treatment method for neuropathic pain using magnetic nanoparticles ...	30
Faculty of Advanced Engineering, Tokyo University of Science Associate Professor Masao Kamimura <This study was selected for OKAI Special Grant>	
III. Specific Research	
III-1. Investigation of the neuromodulatory effects of transcranial static magnetic field stimulation (tSMS) on brain network dynamics	33
Niigata University of Health and Welfare Professor Sumiya Shibata	
III-2. Mechanisms of the magnetic response in the organism	36
RCAST, The University of Tokyo Postdoctoral researcher Kazuhiro Kobayashi	
III-3. Establishment of a method for quantification of brain-spinal cord connectivity supporting recovery of voluntary motor control ability by simultaneous brain-spinal cord magnetic resonance imaging ...	38
Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science Junior Investigator Noboru Usuda	
IV. Special Research Grant2021	
IV-1. Development of Advanced Neuromodulation for Treatment-Resistant Schizophrenia	41
Department. of Neuropsychiatry, School of Medicine, Keio University Assistant professor Shinichiro Nakajima	

Preface

Our foundation intends to contribute to the health and medical care of the nation, by subsidizing scientific research and appealing to the society through seminars. It should be noted, that the effect of the magnetic field is generated from some basic phenomena interacting with the complex mechanism of the body. The effect can only be clarified by a long-term persistent effort, not by short-sighted research.

It is a regrettable tendency in the present scientific sector that researchers are mostly interested in achieving successful results for acquiring a degree or achievement in a short period, focusing on obvious cause-effect relationship or phenomenon which invites quantitative descriptions. In view of such a tendency, our foundation prefers to support researchers who persistently attack a particular problem expecting long-term results rather than those who rush into short-term results.

This report is the summary of research which our foundation supported in the fiscal year 2022. It includes a wide range of topics from basic aspects to practical applications, intending to pave new ways in this area. It is our hope that the report will motivate researchers with similar interests to start communication and contribute to the development of magnetic health science.

Director Makoto Kotani
The Watanabe Foundation

Mechanisms of Bone Repair-enhancing Effects of Extremely Low-Frequency Electromagnetic Fields

Isao Kobayashi*, Makiko Kakikawa*, Sotoshi Yamada**, Nobuo Suzuki**

* Faculty of Biological Science and Technology, Institute of Science and Engineering, Kanazawa University, Kakuma-machi, Kanazawa, Ishikawa 920-1192 Japan

**Institute of Nature and Environmental Technology, Kanazawa University, Kakuma-machi, Kanazawa, Ishikawa, 920-1192 Japan

Abstract

Electromagnetic fields (EMFs) have received extensive attention for treatment of bone disorders; however, their effects on tissues/cells are vary, which has been a bottleneck in understanding the effects of EMFs on bone tissue. Utilizing zebrafish fractured scales, we found that exposure to 10 millitesla (mT) of extremely low-frequency EMFs (ELF-EMFs) at 60 Hz increased the number of osteoblasts and osteoclasts. This promotive effect of ELF-EMFs was attributed to the activation of the Wnt/ β -catenin signaling pathway. Inhibition of the Wnt/ β -catenin pathway reduced the effect of ELF-EMF exposure. Our data provide in vivo evidence that ELF-EMFs have a facilitative effect on fracture healing.

Keywords: osteoblast, osteoclast, extremely low-frequency electromagnetic fields, Wnt/ β -catenin signaling, zebrafish scale

1. Purpose

In the recent super-aging society, it is necessary to extend the healthy life expectancy of the elderly so that they can lead healthy and independent lives. One of the most common diseases among the elderly is osteoporosis, a condition in which bone strength declines and fractures easily. Prolonged treatment of fractures in the elderly can lead to muscle weakness and bedridden patients, highlighting the importance of early recovery from fractures.

Bone is constantly metabolized by two types of cells: osteoclasts and osteoblasts. Osteoclasts dissolve and absorb old bone, while osteoblasts calcify extracellular matrix (a protein that constitutes tissue scaffolds) to form bone. The balance between these two types of cells allows bone to maintain a certain level of strength. Electromagnetic fields (EMFs) are thought to promote bone repair and have long attracted

attention as a noninvasive and safe treatment method. However, the mechanisms by which EMFs promote bone repair remain unclear.

Fish scales are homologous to mammalian bones and are metabolized by osteoclasts and osteoblasts. While it is difficult to visualize cells in mammalian bones, fish scales distributed on the body surface allow us to visualize the behavior of osteoclasts and osteoblasts¹⁾. In the present study, we utilized a zebrafish scale model to clarify the cellular and molecular mechanisms by which exposure to extremely low-frequency EMFs (ELF-EMFs) promote bone repair.

2. Methods

To identify genes that are up- or down-regulated in response to exposure to ELF-EMFs, zebrafish induced fracture stimulation by cutting the scales with small

scissors were placed in an ELF-EMF generator and exposed to 10 millitesla (mT) at 60 Hz for 4 h. Scales were then removed 24 hours after fracture stimulation, and gene expression analysis was performed by RNA-seq.

To investigate whether Wnt signaling is involved in enhancement of bone repair, scales with fracture stimulation were removed from zebrafish, placed in medium containing IWR-1-ebdo (Wnt/ β -catenin signaling inhibitor) or DMSO, and exposed to ELF-EMFs at 10 mT for 4 h. Then, the number of osteoclasts (*trap:GFP*⁺) and osteoblasts (*osterix:mCherry*⁺) in the scale was examined by flow cytometry at 24 hours after fracture stimulation.

3. Results

Our previous studies showed that exposure of zebrafish to ELF-EMFs at 10 mT for 4 h increased both *trap:GFP*⁺ osteoclasts and *osterix:mCherry*⁺ osteoblasts in the fractured scale. To identify genes whose expression changes with exposure to ELF-EMFs, RNA-seq analysis was performed in fractured scales from zebrafish exposed to 10 mT. We observed significant increase in expression of Wnt and Notch target genes in the 10 mT-exposed group

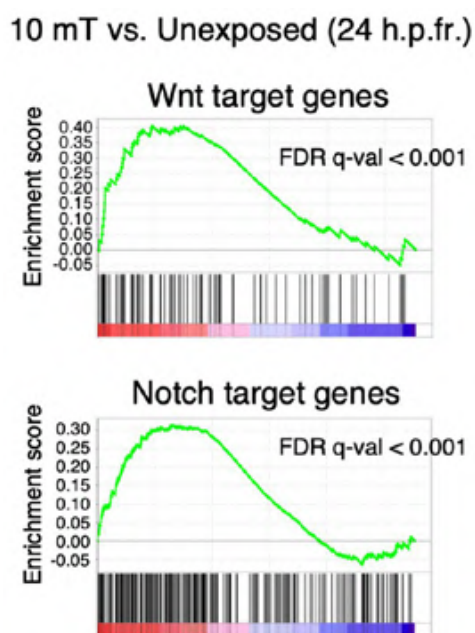


Figure 1. Gene set enrichment analysis (GSEA) of Wnt and Notch target genes

compared to the unexposed group (**Figure 1**). Indeed, expression of Wnt ligand genes such as *wnt10b* and Notch ligand genes such as *jag1b* were up-regulated in the 10 mT-exposed fractured scale, suggesting that Wnt and Notch signaling are activated upon 10 mT exposure. Interestingly, β -catenin, which is stabilized by Wnt signaling, is strongly expressed in epithelial cells distributed mainly near the fracture site, suggesting that Wnt/ β -catenin signaling promotes bone repair in the scale.

Next, zebrafish scales with fracture stimulation were collected and placed in medium containing IWR-1-endo or DMSO, an inhibitor of Wnt/ β -catenin signaling, and exposed to 10 mT for 4 h, followed by counting the numbers of osteoclasts and osteoblasts in the scale. Our data revealed that both osteoclasts and osteoblasts increased with exposure to 10 mT in the DMSO-treated group, whereas neither of them increased in the IWR-1-endo-treated group (**Figure 2**).

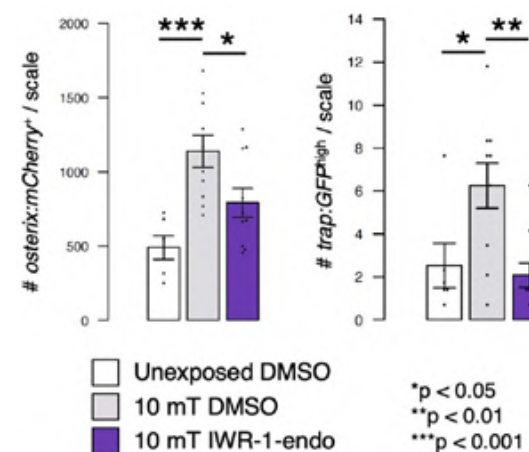


Figure 2. Effects of the Wnt/ β -catenin signaling inhibitor on osteoblasts and osteoclasts

4. Discussion

The present study suggests that exposure to ELF-EMFs enhances Wnt signaling in the fractured scale, and that epithelial cells, mainly at the fracture site, receive the signals and induce osteoblast and osteoclast activation.

Previous studies in cultured cells reported that EMFs have promotive effects on osteoblasts, whereas they have inhibitory effects on osteoclasts⁽²⁻⁴⁾. In the present study, both osteoblasts and osteoclasts

increased in the zebrafish fractured scale upon exposure to ELF-EMFs at 10 mT for 4 h. This suggests that even if ELF-EMFs directly have an inhibitory effect on osteoclasts, the activation of osteoblasts promotes differentiation of osteoclasts, resulting in the increased activity of osteoclasts.

Since 50-60 Hz is the most widespread AC power frequency in the world, sinusoidal EMFs generated at these frequencies have the advantage of being easily applied as medical equipment. Therefore, the fact that sinusoidal EMFs at 60 Hz have a promotive effect on bone repair is a useful finding that can be applied to the treatment of bone diseases.

Acknowledgements

This research was supported by the Watanabe Foundation. The part of data was published in Biomedical Research (Tokyo) 2024 (Suzuki et al., Biomed Res. 2024).

References

- 1) Kobayashi-Sun J et al: Commun Biol. 3 (1), 190 (2020)
- 2) Esposito M et al: Vivo 26 (2), 299–304 (2012)
- 3) Zhou J et al: Rheumatol Int. 33 (5), 1135–1141 (2013)
- 4) Di Bartolomeo M et al: Biol. (Basel) 11 (3), 402 (2022)

Development of safe and effective immunotherapy

Satoshi Inoue*

* Keio University School of Medicine
35 Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo 160-8582 Japan

Abstract

Chimeric Antigen Receptor (CAR) T-cell immunotherapy has rapidly gained attention due to its remarkable therapeutic effects against certain malignant tumors; however, it faces challenges such as side effects such as Cytokine Release Syndrome (CRS). The objective of this research is that achievement of a safer CAR-T cell therapy by incorporating substances into magnetic lipid nanoparticles that can absorb and break down the causative agents of CRS.

Keywords: CAR-T cell, Cytokine Release Syndrome, Immunotherapy, Magnetic nanoparticle

1. Purpose

As exemplified by chimeric antigen receptor (CAR) T cells, immunotherapy involving the *ex vivo* preparation and infusion of T cells that recognize specific cancer antigens is attracting attention as a promising treatment for refractory cancers. Unlike chemotherapeutic compounds, these therapies can be functionally modified through genetic engineering, and because the infused T cells can proliferate extensively within the body (i.e., mass production *in vivo*), they are being spotlighted as “living drugs.” However, one of the major issues with CAR-T cell therapy is the occurrence of side effects such as cytokine release syndrome (CRS). CRS is primarily caused by the excessive systemic release of inflammatory cytokines (such as IL-6 and IL-1 β) produced by immune cells present in the tumor microenvironment. It is believed that this syndrome occurs when macrophages—immune cells in the body—are activated by the proliferating CAR-T cells, resulting in the release of IL-6, an inflammatory cytokine, into the bloodstream. Because the enhancement of the therapeutic efficacy of CAR-T cells inevitably

increases the severity of side effects, it is crucial to balance efficacy with safety.

One strategy to mitigate side effects is to localize CAR-T cells to the tumor site and to develop novel therapeutic modalities capable of absorbing inflammatory cytokines. Therefore, the aim of this study is to establish a foundation for safer CAR-T cell therapy by creating CAR-T cells that can absorb inflammatory cytokines through genetic engineering. Building upon the technology developed in this study to produce inflammatory cytokine-absorbing CAR-T cells, the research goal is to realize safer therapy by using magnetic nanoparticles to accumulate CAR-T cells at the tumor site.

2. Method

Generation of CAR-T Cells Expressing an Artificial Chimeric Cytokine Receptor (G6/7R)

To create CAR-T cells that can both capture and degrade IL-6—a key mediator of side effects—and simultaneously exhibit sustained proliferation and persistence through constitutive activation of self-stimulatory IL-7 signaling, we designed a novel

chimeric cytokine receptor. This artificial receptor combines the extracellular domains of the IL-6 receptor alpha chain (IL6RA) and the co-receptor GP130, fused to the intracellular domain of a constitutively active mutant of the IL-7 receptor alpha chain (IL-7R α). This synthetic cytokine receptor was named G6/7R. When expressed on the surface of CAR-T cells, G6/7R is expected to bind IL-6 with high affinity and simultaneously activate IL-7-like signaling constitutively through the JAK-STAT pathway (Figure 1).

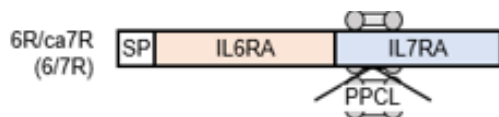


Fig 1 Structure of chimeric cytokine receptor CAR

Functional Analysis of G6/7R CAR-T Cells

CAR-T cells expressing G6/7R were generated ex vivo by introducing genes encoding G6/7R and CAR into T cells derived from peripheral blood mononuclear cells. Subsequently, we evaluated the antitumor activity and IL-6 capturing/degrading capacity of G6/7R CAR-T cells both *in vitro* and *in vivo*.

3.Results

In Vitro Functional Analysis of G6/7R CAR-T Cells

This analysis was primarily conducted by Dr. Toshiaki Yoshikawa, a colleague of the applicant. CAR-T cells engineered with G6/7R showed enhanced phosphorylation of STAT5 and STAT3 in the presence of IL-6, indicating activation of the JAK-STAT signaling pathway. RNA sequencing analysis revealed upregulated expression of anti-apoptotic genes (such as *BCL2* and *BCL3*) and effector function-related genes (*GZMB*, *FOSL1*, *FOSL2*), suggesting improved long-term survival and enhanced effector function.

A variant receptor, G6/7R-M452L, was also created by introducing the M452L mutation into the intracellular domain of G6/7R. This mutation maintained STAT5 signaling while suppressing activation of the Akt pathway. As a result, the proportion of undifferentiated CAR-T cells increased due to inhibition of differentiation, suggesting enhanced stem-like

properties. These findings indicate that the G6/7R CAR-T cells developed in this study may possess enhanced functionality critical for antitumor efficacy *in vivo*, including prolonged survival and improved effector activity.

Moreover, it was confirmed that G6/7R CAR-T cells can capture and degrade IL-6 (Figure 2).

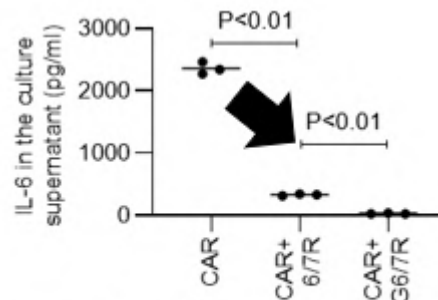


Fig 2 Capture and degradation of IL-6 by G6/7R CAR-T cells

In Vivo Antitumor Efficacy and Safety

In mouse models of leukemia and pancreatic cancer, CAR-T cells expressing either G6/7R or G6/7R-M452L exhibited superior tumor suppression and improved survival compared to conventional CAR-T cells (Figure 3). These modified CAR-T cells also demonstrated high persistence *in vivo* and maintained long-term therapeutic effects. Notably, no common CAR-T cell-associated side effects such as weight loss or neurological symptoms were observed, suggesting improved safety with minimal adverse effects.

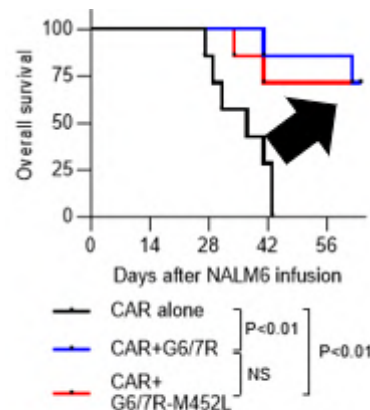


Fig 3 Anti-tumor effect of G6/7R CAR-T cells

These results suggest that the next-generation CAR-T cells developed in this study serve as a strong

foundation for realizing a therapeutic approach that achieves both enhanced efficacy and improved safety, fulfilling the original expectations of the research.

4. Discussion

In this study, the chimeric cytokine receptor “G6/7R” and its improved version “G6/7R-M452L” demonstrated the potential to enhance the antitumor efficacy and persistence of CAR-T cells while simultaneously reducing side effects such as cytokine release syndrome (CRS) and immune effector cell-associated neurotoxicity syndrome (ICANS), which are caused by IL-6 and IL-1 β . G6/7R possesses the ability to capture and degrade IL-6, while constitutively activating an autologous IL-7-like signaling pathway, thereby supporting T cell survival and sustained function. Furthermore, the addition of the M452L mutation helps suppress excessive T cell differentiation and increases the proportion of undifferentiated CAR-T cells, which is expected to enhance long-term therapeutic effects.

In addition, it was shown that combining G6/7R with a decoy receptor for IL-1 β (IL1R2) could further suppress treatment-related side effects. These findings suggest that the approach is not limited by antigen specificity and could be applied to various CAR-T and TCR-T therapies. Thus, this research is expected to facilitate further studies toward clinical application.

However, the CAR-T cells engineered with the chimeric cytokine receptor developed in this study may have limited ability to effectively accumulate at tumor sites. Therefore, additional strategies are required. Specifically, by utilizing magnetic nanoparticles to enhance targeted accumulation at tumor lesions, it may be possible to further improve both antitumor efficacy and the mitigation of adverse effects.

Acknowledgement

This study was conducted with the support of the Watanabe Foundation. We plan to further develop this research for presentation at academic conferences and for publication in scientific journals.

References

- 1) Morris EC., Neelapu SS, Giavridis T, Sadelain, M. Cytokine release syndrome and associated neurotoxicity in cancer immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 22, 85-96. 10.1038/s41577-021-00547-6. (2022).
- 2) Yoshikawa T, Ito Y, Wu Z, Kasuya H, Nakashima T, Okamoto S, Amaishi Y, Zhang H, Li Y, Matsukawa T, Inoue S, Kagoya Y. (2024) Development of a chimeric cytokine receptor that captures IL-6 and enhances the antitumor response of CAR-T cells. (2024) *Cell Rep Med* 5: 101526. (2024).

Noninvasive Brain Mapping of Language Function Using Steady-State Induced Magnetic Fields

Emi Yamada

Faculty of Humanities, Kyushu University
744 Motooka, Nishi-ku, Fukuoka 819-0395 JAPAN

Abstract

In focal resection surgery for epilepsy, it is crucial to identify the localization of brain function and determine the resection area. The steady-state evoked potential (SS-EPs) method involves presenting stimuli at a constant frequency, allowing us to detect peaks at frequencies that correspond to the stimulus in specific brain regions. This study aims to investigate the feasibility of noninvasive brain mapping of language functions using magnetoencephalography (MEG) with the steady-state evoked magnetic field (SS-EFs) method. Our results suggested that this method could be valuable for noninvasive brain mapping and understanding the differences in kanji and hiragana reading processes.

Keywords: magnetoencephalography, steady-state evoked magnetic field, language, brain mapping

1. PURPOSE

Some patients with epilepsy who do not respond to antiepileptic drugs undergo surgical treatment to control seizures. It is crucial to identify the localization of brain functions—areas that selectively respond to stimuli—and determine the region of resection. While placing electrodes in the cortical is a useful method for brain mapping, it is highly invasive.

Steady-state evoked potentials (SS-EPs) are sinusoidal waveforms with a constant frequency, where responses to each stimulus are superimposed when the stimulus frequency is 3.5 Hz or higher. Consequently, when neural response data from time series are transformed into frequency domain representation using Fast Fourier Transform (FFT), responses with integer multiple frequencies synchronized with the stimulus frequency are observed. Recent studies have shown that only regions selectively responding to stimuli react to the frequency of stimulus presentation in higher brain

functions, such as face¹⁾ and word²⁾ recognition, and language processing³⁾. Based on this, it seems possible to map language functions by presenting words in a rhythmic manner.

Magnetoencephalography (MEG) is a non-invasive brain function measurement device that has both temporal and spatial high resolution, allowing for the source estimate. By recording Steady-State Evoked Fields (SS-EFs) induced by word stimuli using MEG, we investigate whether non-invasive language function mapping is possible.

2. METHOD

26 healthy adults (13 males, 13 females, average age 21.8 ± 1.63 years) participated. Their first language was Japanese, and it was confirmed that they were left-handed according to the Edinburgh Handedness Test and had normal vision. Brain activity during language tasks was recorded using magnetoencephalography

(Neuromag, MEGIN) at Kyushu University Hospital.

Word stimuli were presented at a frequency of 4 Hz (4 words per second) for 12 seconds per session (total of 48 words), with conditions of kanji and hiragana being randomly implemented. In the kanji condition, the third word was hiragana (kanji-kanji-hiragana-kanji), and in the hiragana condition, the third word was kanji (hiragana-hiragana-kanji-hiragana) (Fi. 1). Therefore, the response frequencies were 1.3 Hz (response to the third word) and 4.0 Hz (response to visual input). In other words, 1.3 Hz is the response related to word recognition (hiragana in the kanji condition, kanji in the hiragana condition), and 4.0 Hz is the visual response to the words. The word stimuli were nouns represented by 2 or 3 characters/moras in both kanji and hiragana (e.g., 天気, てんき) from the Written Japanese corpus.

MEG data were analyzed using MNE-Python software. After applying a band-pass filter of 0.1 to 84 Hz, noise removal processing such as eye movement was performed using ICA. Current source estimation was conducted using the LCMV beamformer. The timing of the first word presented was set to 0 seconds, and the analysis interval was the 10 seconds excluding the first 2 seconds of the 12-second session from stimulus presentation. Spectrum amplitude of FFT was obtained after FFT. Then, Frequency data were obtained by calculating the amplitude spectrum after FFT, and data within ± 0.5 Hz around the response frequency (total 11 bins) were acquired from the response frequency (1f) and its second frequency (2f). The summed amplitude spectrum of 1f and 2f was converted to Z-scores, and those with Z-scores greater than 1.96 ($p < 0.05$) were selected.

3. RESULTS

At the presentation frequency of 4 Hz, the early visual processing system, including the left ventral lateral occipital complex (LOC) and the visual word form area (VWFA) on the fusiform gyrus, showed significant activity (Fi.1, bottom). On the other hand, at 1.3 Hz, which is the response to the third word, there was significant activity in the language-related areas of the left temporal lobe (Fig.1, top).

The regions with significantly high response frequencies were determined using Z-scores. At 4.0 Hz in the kanji condition, significant areas were observed in the visual cortex and VWFA (Fig.2, bottom). At 1.3 Hz, which is the response to hiragana, significant areas were observed along the arcuate fasciculus, including Broca's area (Fig.2, top).

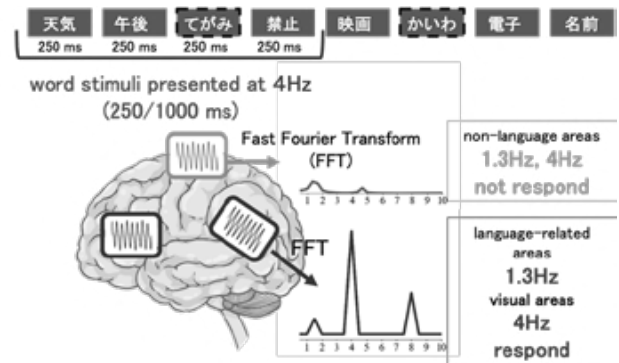


Fig. 1 Steady-State Evoked Responses and Language Tasks

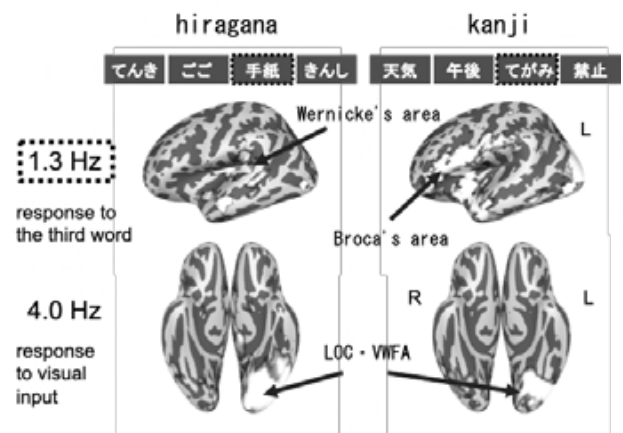


Fig. 2 The Activity of the Amplitude Spectrum

4. DISCUSSION

The visual areas at 4.0 Hz and in the language-related areas (Broca's area and Wernicke's area) at 1.3 Hz for both kanji and hiragana conditions. The activity at 1.3 Hz, the difference of regions were observed between the kanji condition (Wernicke's area) and the hiragana condition (Broca's area). This suggests that there are different processing pathways for kanji, which are logographic letters, and hiragana, which are

phonetic letters.

The Z-scores of the amplitude spectrum ($p < 0.05$) showed that at 1.3 Hz in the kanji condition (response to hiragana), the response frequency from Broca's area to the arcuate fasciculus connecting Broca's area and Wernicke's area was significantly high. However, in the hiragana condition (response to kanji), no activity was observed in the language areas. Since hiragana is directly linked to phonological processing, it is considered that language processing in the hiragana condition occurs more quickly during the short presentation time.

At 4.0 Hz in the kanji condition, significant areas were observed in the visual cortex and VWFA. Additionally, the right fusiform gyrus, which is involved in the recognition of faces and objects, was also significant. It has been reported that kanji activates not only the left but also the right early visual cortex^{4) 5)}, suggesting that kanji is processed by different pathway from hiragana. Our results support this finding.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by the 30th Magnetic Research Grant from the Watanabe Foundation.

REFERENCES

- 1) Jacques et al. (2016) A face-selective ventral occipito-temporal map of the human brain with intracerebral potentials. PNAS.
- 2) Lochy et al. (2015) A robust index of lexical representation in the left occipito-temporal cortex as evidenced by EEG responses to fast periodic visual stimulation. Neuropsychologia.
- 3) Ding et al. (2016) Cortical tracking of hierarchical linguistic structures in connected speech. Nat Neurosci.
- 4) Liu and Perfetti. (2003) The time course of brain activity in reading English and Chinese: an ERP study of Chinese bilinguals. Hum Brain Mapp.
- 5) Tan et al. (2000), Brain activation in the processing of Chinese characters and words: a functional MRI study. Hum Brain Mapp.

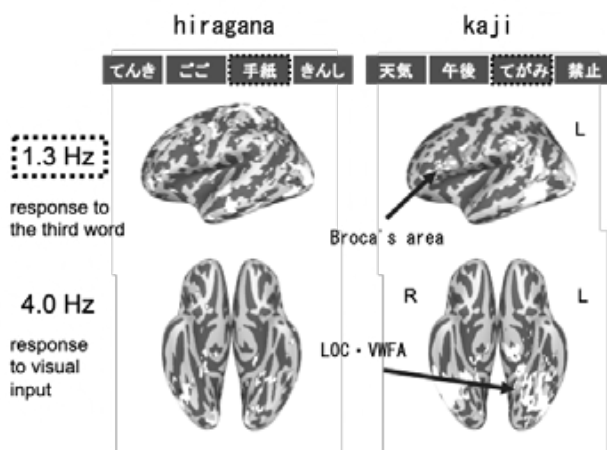


Fig. 3 The significant regions determined by Z-Scores

Development of construction methods engineered muscle tissues combining permanent magnets and magnetic field modulators

Kazuya Furusawa*

*Faculty of Bioresources and Environmental Sciences, Ishikawa Prefectural University
1-308 Suematsu, Nonoichi City, Ishikawa Prefecture 921-8836, Japan

Abstract

We have developed a cell patterning method using a compact device consisted of permanent magnets and a magnetic field modulator to form grid-like magnetic gradients. The device enables long-term cultivation of cells in modulated magnetic fields inside a CO₂ incubator. By using the device, fiber-like cell aggregates (FCAs) consisted of mouse myoblasts (C2C12) or bovine vascular endothelial cells (HH) were constructed. The effects of magnetic field exposure time and concentration of EDTAMn(II)Na on FCA formation were investigated. Furthermore, we constructed a complex engineered tissue by seeding C2C12 on the FCAs prepared from HH.

Keywords: Cell Patterning, Cell Aggregates, Engineered Muscle Tissue

1. Purpose

The technology for patterning animal cells to a cell culture substrate with ordered patterns, such as grid-like patterns, is useful for investigating locomotion behaviors of cells during morphogenetic processes of organs and tissues. However, conventional technologies, such as photolithography, require specialized equipment and expertise.

Kimura *et al.* have developed a technique to pattern cells into a grid-like pattern by modulating a strong

magnetic field using a magnetic field modulator consisted of alternately stacked aluminum and iron plates. The method is simpler and more cost-effective manner than conventional methods; however, it requires a large electromagnet to generate the strong magnetic field.

Recently, we have demonstrated that the method for cell patterning experiments by combining permanent magnets and a magnetic field modulator. Because the device for the patterning experiments is more compact than that of the conventional method, the method allows us to culture cells for extended periods under the modulated magnetic field in a CO₂ incubator.

An aim of this study is to establish a technique for creating cell aggregates (CAs) with controlled morphology by culturing cells for an extended period under the modulated magnetic fields using a cell patterning device.

2. Methods

Mouse-derived myoblast cell line (C2C12) and bovine artery-derived vascular endothelial cells (HH) were used in the experiments. DMEM supplemented

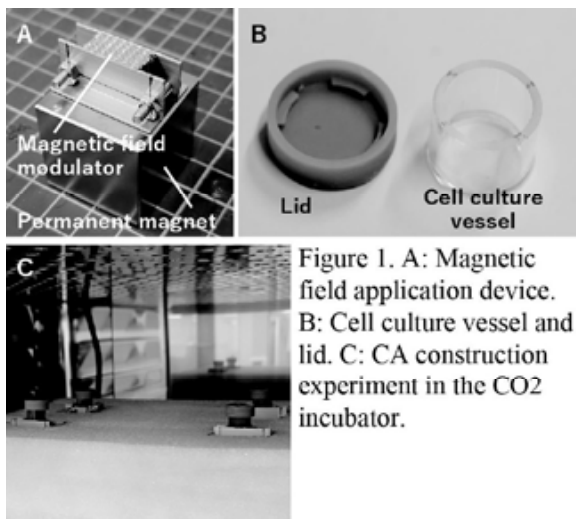


Figure 1. A: Magnetic field application device. B: Cell culture vessel and lid. C: CA construction experiment in the CO₂ incubator.

Table 1. Effects of T_M and C_E on the results of CA construction experiments

T_M (h)	C_E (mM)					
	25		30		50	
	Morphology	Cell Viability	Morphology	Cell Viability	Morphology	Cell Viability
2	Grid-like pattern	Good	Grid-like pattern	Good	FCA	Good
24	Grid-like pattern	Good	Grid-like pattern	Good	FCA	A lot of dead cells observed

with 10% bovine foetal serum, 1% penicillin-streptomycin (PS), 1% non-essential amino acids (NEAA) and 1% Glutamax was used as the growth medium. A growth medium containing Mn(II)EDTA as the paramagnetic molecule was used as a magnetic medium. DMEM supplemented with 2% horse serum, 1% PS, 1% NEAA, and 10 mg/mL of human recombinant insulin was used as a differentiation medium.

A magnetic field modulator was prepared by alternately stacking aluminum plates and SUS430 plates. The thicknesses of metals plates were 0.2 mm. The permanent magnet (neodymium magnets with a surface magnetic flux density of 0.5 T (30 mm $\times$ 30 mm $\times$ 30 mm)) was used as permanent magnet. The combination of the permanent magnets and the magnetic field modulator is referred to as a magnetic field application device (MFAD). A cell culture vessel was created by attaching a circular cover glass with a diameter of 12 mm to the bottom of a glass ring with an inner diameter of 10 mm, an outer diameter of 12 mm, and a height of 10 mm. The lid of the culture container was fabricated using a 3D printer. Figure 1 shows the magnetic field application device and the CA construction experiment.

For the CA construction experiment of C2C12, the concentrations of Mn(II)EDTA (C_E) were 25 mM, 30 mM, and 50 mM. The magnetic field application times (T_M) were 2 h and 24 h. The cell seeding density was 6.4×10^5 cells/cm². After CA construction experiments, the samples were fixed with 4% paraformaldehyde solution. The samples were washed four times with PBS(-) and blocked overnight with a blocking solution containing 1% bovine serum

albumin and 0.5% Triton-X100 in PBS(-). Next, a fluorescent staining solution containing Alexa488-Phalloidin was added, and fluorescent staining was performed overnight. The stained samples were washed four times with PBS(-) and sealed. The

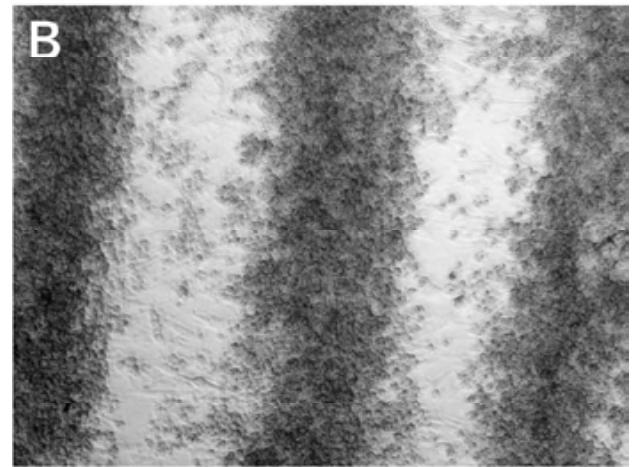
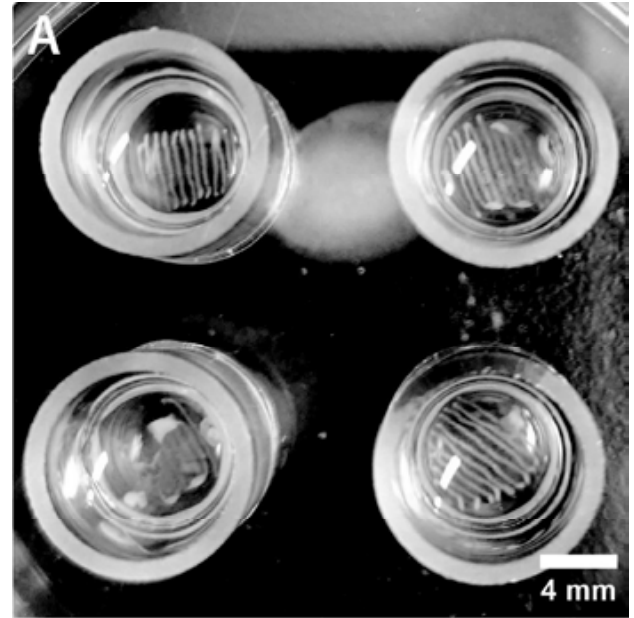


Figure 2. A: A photograph for the CA constructed at $C_E = 50$ mM and $T_M = 24$ h. B: Phase contrast microscopic image for the CA.

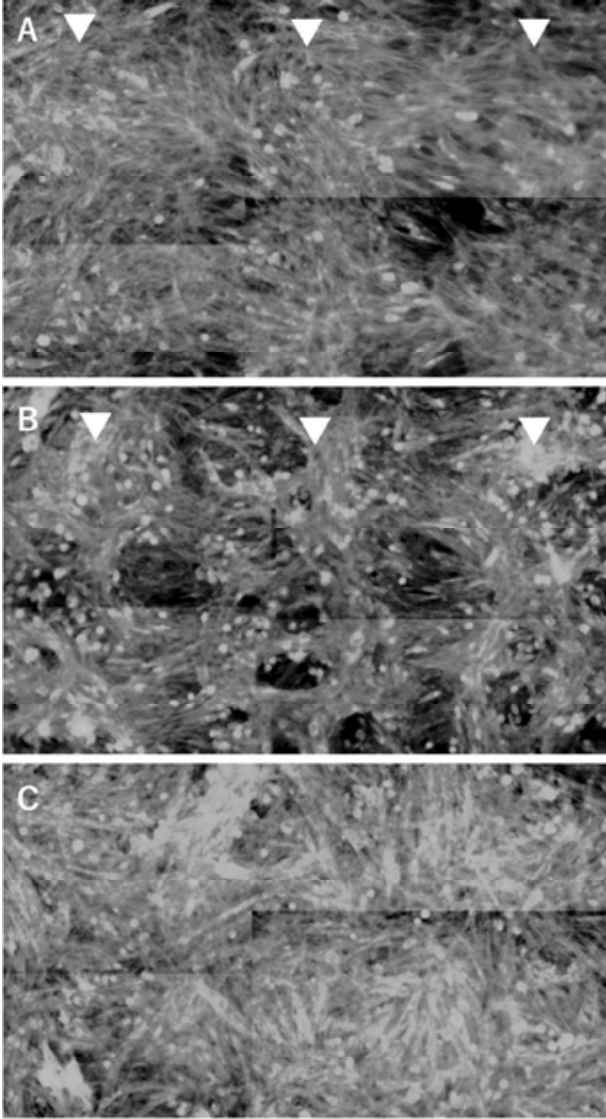


Figure 3. Fluorescent images for the samples cultured in the growth medium (A-B) and in the differentiation medium (C) at day 1. A: $C_E = 30$ mM, $T_M = 2$ h. B: $C_E = 50$ mM, $T_M = 2$ h. C: $C_E = 50$ mM, $T_M = 2$ h. Arrow heads indicate the position of the CA.

morphologies of the samples were observed under a fluorescent microscope.

For the CA construction experiment of HH, HH were suspended in magnetic medium ($C_E = 50$ mM) containing 0.25 mg/mL bovine dermal-derived atelocollagen and seeded at a density of 3.4×10^5 cells/cm² in the cell culture vessel. T_M was 30 minutes. Next, the medium was replaced with growth medium and incubated for an additional 30 minutes. Next, C2C12 cells were seeded onto the CA of HH at a seeding density of 2.4×10^5 cells/cm² and cultured for

overnight.

3. Results

The effects of C_E and T_M on the results of the CA construction experiment are summarized in Table 1. When C_E was low and T_M was short, CA formed at the expected position immediately after magnetic field application, but over time, the CA adhered to the cover glass and formed a lattice-like pattern. At $C_E = 25$ mM, although cell damage was minimal, CA formation often failed. At $C_E = 50$ mM and $T_M = 24$ h, thicker fibrous CA (FCA) formed. Figure 2A shows a photograph of the FCA constructed under these conditions. FCA were aligned in a grid-like pattern in the culture container. By contrast, a high number of dead cells was observed in a phase contrast microscope image (Figure 2B).

Figure 3 shows fluorescence microscopy images of the samples at day 1. FCA adhered to the culture substrate, and cells moved and stretched in a lateral direction of the CA (Figure 3A-B). By contrast, for the fluorescent image of samples cultured in the differentiation medium, myotubes were observed, but the grid-like pattern almost disappeared.

Figure 4 shows phase-contrast microscope images of samples where myoblasts were seeded on FCA composed of vascular endothelial cells. C2C12 cells were adhering to the grid-like FCA.

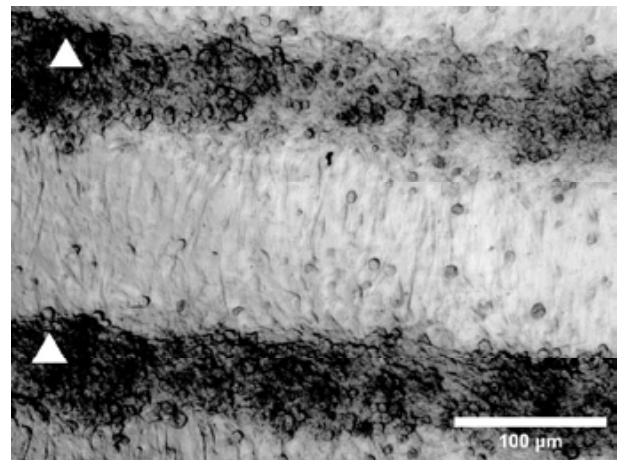


Figure 4. Phase contrast microscope image for the engineered muscle tissue consisted of the CA constructed from HH and the C2C12 cell sheet. Arrow heads indicate the CA of HH.

4. Discussion

We have demonstrated that FCA can be formed by long-term culture of myoblasts on MFAD. However, it was also found that prolonged culture under conditions with high C_E leads to a decrease in cell viability. To address this issue, optimization of the magnetic field application time is necessary. While myo-differentiation of the myoblasts in the FCA is possible, the morphologies of FCA were not maintained during the culture period. Therefore, for maintaining the morphology of FCA during longer periods, further investigations modifying the thickness of the metal plates constituting the magnetic field modulator are required.

We have also showed that a myoblast sheet with FCA consisted of HH is constructed by using our method. The result indicates that layering the composite tissue could construct thicker muscle tissues.

Acknowledgment

This research was conducted with the support of the 30th Magnetic Research Grant from the Watanabe Foundation.

Reference

- 1) Tsunehisa Kimura, Yukiko Sato, Fumiko Kimura, Masakazu Iwasaka, Shoogo Ueno, : *Langmuir*, 21(3), 830 - 832(2005).

磁性ナノ粒子／生体物質凝集体の磁気的性質の変化を利用した バイオ検出法の開発

Development of bio detection methods using changes in magnetic properties of
magnetic nanoparticle/biological material aggregates

藪上信^{a),b)}, 村山徹^{a)}

Shin Yabukami^{a),b)} and Toru Murayama^{a)}

^{a)}東北大学大学院医工学研究科, 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉 6-6-05 (〒980-8579)

^{b)}東北大学大学院工学研究科, 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉 6-6-05 (〒980-8579)

^{a)} Graduate School of Biomedical Engineering, Tohoku Univ.,
6-6-05 Aramaki Aza Aoba, Aoba-ku, Sendai 980-8579, Japan

^{b)} Graduate School of Engineering, Tohoku Univ.,
6-6-05 Aramaki Aza Aoba, Aoba-ku, Sendai 980-8579, Japan

Abstract

This technology allows magnetic properties (anisotropy, magnetic susceptibility, loss, damping constant, etc.) to be controlled and evaluated in the same way as solid-state devices by aggregating magnetic nanoparticles/biological materials in the liquid phase and increasing the bond between magnetic nanoparticles, and develop new antigen detection methods. This technology has great engineering significance as it improves the controllability of biosensors and increases signal and energy density. We demonstrate that magnetic nanoparticles can dramatically improve performance and solve problems with conventional technology in bio and medical applications.

Keywords: aggregating magnetic nanoparticles/biological materials, biosensor

1. PURPOSE

The purpose of this study is to increase the interactions between particles by aggregating magnetic nanoparticles and biological materials in a liquid phase at an appropriate concentration, and to control and evaluate the magnetic properties using solid-state physics, and to apply this to biosensors.

2. METHOD

When magnetic nanoparticle is miniaturized to a diameter of about several nm, it exhibits superparamagnetism, but when the interparticle

distance changes due to aggregation, they undergo a phase change between ferromagnetism and superparamagnetism. The main factor that determines the magnetic properties is the interaction between magnetic nanoparticles (exchange energy, magnetostatic energy). Magnetic nanoparticles have the advantage that they can be remotely controlled, measured, and heated using a magnetic field for biological and medical applications. As shown in Fig. 1, magnetic nanoparticles in a liquid phase form aggregates with biological materials through an antigen-antibody reaction, and antigens are

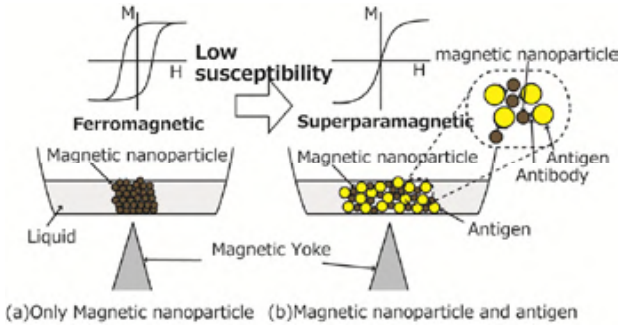


Fig. 1 The magnetic nanoparticle aggregates show ferromagnetic properties. The magnetic nanoparticle antigen-antibody reaction aggregate changes the interactions between magnetic nanoparticles and shows superparamagnetic properties.

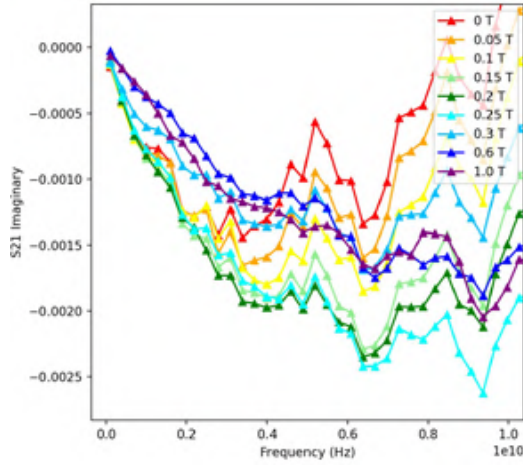


Fig. 2 Frequency dependence of the imaginary part of the transmission coefficient (S_{21}) when a DC magnetic field is changed. The lowest value is observed near $H_{dc}=0.2$ T.

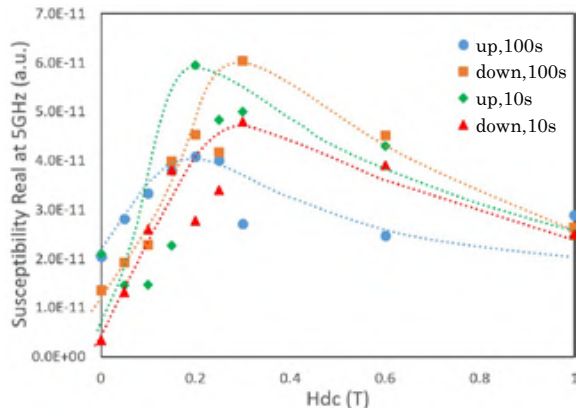


Fig. 3 Change in the real part of magnetic susceptibility when the DC magnetic field is changed. Even when the magnetic field sweep direction and waiting time were changed in four different ways, the magnetic susceptibility was maximized at around 0.2 T. This demonstrates that the magnetic susceptibility and anisotropy of liquid-phase magnetic particles can be remotely controlled.

detected by utilizing the increased magnetic interaction caused by the aggregation of magnetic nanoparticles. Magnetic nanoparticles usually disperse or aggregate in the target liquid phase, but the magnetic properties can be controlled by the interaction with adjacent particles. In this research, we aim to apply to the rapid and highly sensitive detection of microorganisms, viruses, proteins, etc.

3. RESULTS

3.1 Controlling the anisotropy of magnetic nanoparticles

Fig. 2 shows the imaginary part of the transmission coefficient (S_{21}) of the needle-shaped magnetic particle (FeCrCo) aggregate in the frequency range from 100 MHz to 10 GHz. A straight microstrip line probe was used for the evaluation¹⁾. From Fig. 2, a clear shift in the ferromagnetic resonance (FMR) of the magnetic particle aggregate was observed around the frequency range of 2 GHz to 6 GHz. Fig. 3 shows the magnetic field dependence of the magnetic susceptibility of the magnetic particles at 5 GHz. As shown in Fig. 3, it was observed that the real part of the magnetic susceptibility was maximized when H_{dc} was about 0.2 T to 0.3 T. This coincided with the magnetic anisotropy field of the FeCrCo magnetic particles (approximately 0.2 T), indicating that the anisotropy of the magnetic particle aggregates could be controlled by a DC magnetic field.

3.2 Microbial Detection

Fig. 4 shows the configuration of the device used to evaluate microorganisms²⁾. The detector is composed of an excitation coil with a diameter of 30 mm and 60 turns, a differential detection coil with a diameter of 10 mm and 100 turns, and a magnetic field detection coil with 100 turns. The

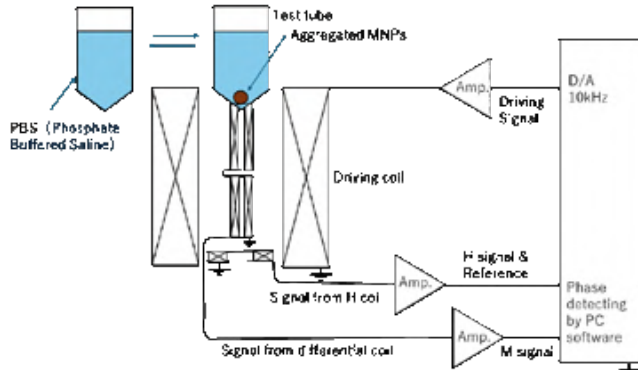


Fig. 4 Configuration of the detector for evaluating microorganisms. An AC magnetic field is generated by an excitation coil, and the magnetic signals from the magnetic nanoparticles and antigen-antibody reaction aggregates are evaluated by a differential detection coil to determine the magnetic susceptibility.

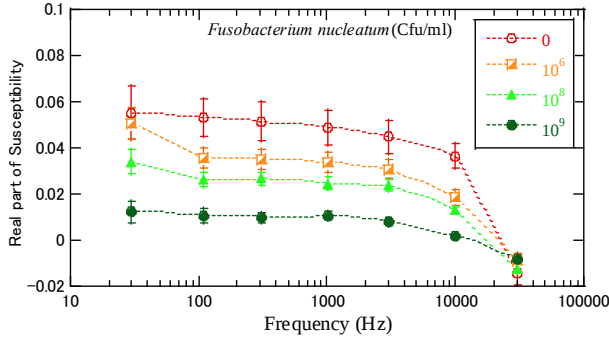


Fig. 5 Magnetic susceptibility of cultured *Fusobacterium nucleatum*.

magnetic susceptibility of the antigen-antibody reaction aggregates was evaluated using equation (1).

$$\chi = \frac{M_0}{H_0} = \frac{n_1 \cdot S_1}{n_2 \cdot S_2} \cdot \frac{V_{b1} - V_{b2}}{V_h} \quad (1)$$

where V_h is the induced voltage of the magnetic field detection coil, V_{b1} is the induced voltage with magnetic nanoparticle aggregates, and V_{b2} is the induced voltage of the reference (physiological saline). n_1 is the number of turns of the differential detection coil, n_2 is the magnetic field detection coil, S_1 is the cross-sectional area of the differential detection coil, and S_2 is the area of the magnetic field detection coil. Fig. 5 shows the evaluation of the real part of the magnetic susceptibility as an aggregate after the cultured bacteria of *Fusobacterium Nucleatum* was reacted with magnetic nanoparticles and an antigen-antibody.

Table 1 The list of specifications and volume of antigens, antibodies, magnetic nanoparticles.

How to prepare samples	An antigen-antibody reaction	Using Fe_3O_4 conjugated with antibodies
Magnetic nanoparticles	Nanomag-D Size: 500 nm	Material & quantity Fe_3O_4 , 0.5 μL /sample
Antibody	Anti- <i>Fusobacterium nucleatum</i>	Quantity: 0.33 μL
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	Obtained from human saliva	Quantity: 20 μL

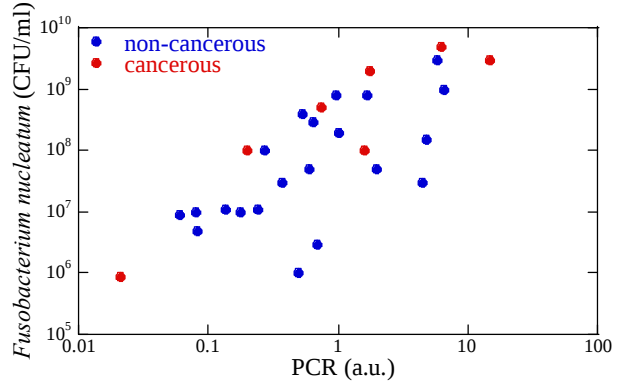


Fig. 6 Evaluation results of *Fusobacterium nucleatum* in human saliva from 28 individuals and correlation with PCR.

The reagents used are as shown in Table 1. The magnetic nanoparticles were reacted with Nanomag-D (average particle size 500 nm ϕ , Protein A added to the surface) with anti-*Fusobacterium Nucleatum* antibodies in advance and then reacted with the cultured bacteria of *Fusobacterium Nucleatum* at different concentrations of 0, 10^6 , 10^8 , and 10^9 (CFU/ml). The higher the concentration of *Fusobacterium Nucleatum*, the lower the magnetic interaction between the magnetic nanoparticles and the lower the magnetic susceptibility. The calibration curve obtained from Fig. 5 was used to evaluate human saliva samples.

Fig. 6 shows the evaluation results of *Fusobacterium Nucleatum* using human saliva from 28 people. The 28 people include 7 patients, which are indicated by red circles. The horizontal axis shows the PCR evaluation results (relative values). The vertical axis shows the concentration of *Fusobacterium Nucleatum* converted using the calibration curve in Fig. 5. Since the antigen-antibody reaction is followed by agglutination using magnetic force without post-washing, it is

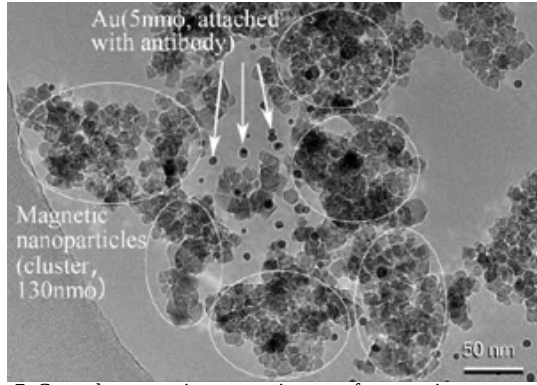


Fig. 7 Cryo-electron microscopy image of magnetic nanoparticle-protein aggregates. Gold particles (labeled with antibodies) are located in the middle of the magnetic nanoparticle aggregates, presumably forming cross-bridges.

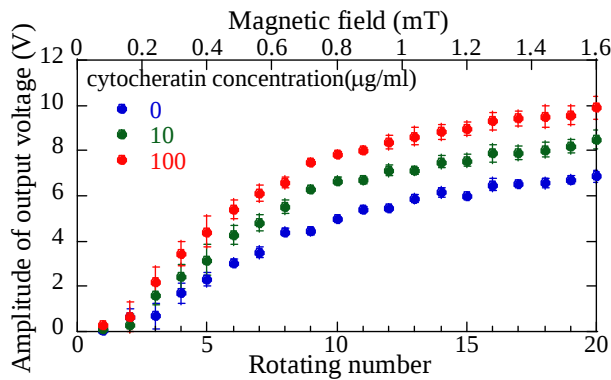


Fig. 8 Changes in magnetic signal versus concentration of purified protein (cytokeratin). As the concentration increases, magnetic nanoparticles aggregate more, the magnetic interaction between particles becomes stronger, and the magnetic signal becomes larger.

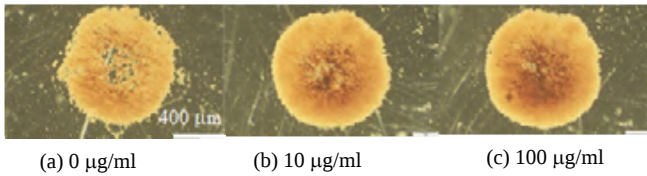


Fig. 9 Photo of purified protein (cytokeratin) aggregates (optical microscope). The higher the concentration, the more brownish areas appear, indicating the progression of aggregation of magnetic nanoparticles.

suitable for point-of-care diagnosis. The concentration of *Fusobacterium Nucleatum* obtained from the magnetic susceptibility evaluation and the PCR evaluation results showed a good correlation of approximately 69% ($P < 0.0001$).

3.3 Protein detection

3.3.1 Structure of magnetic nanoparticle protein aggregates

Fig. 7 shows a TEM image of magnetic

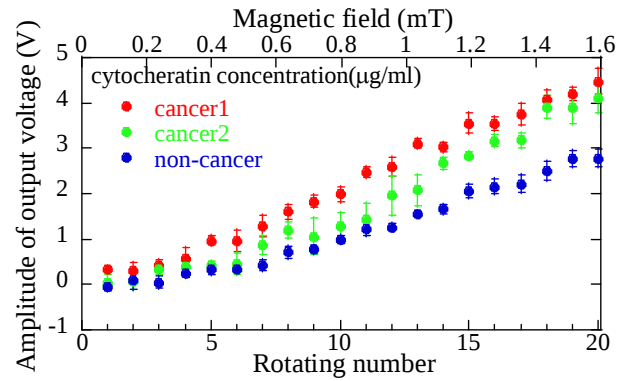


Fig. 10 Evaluation results of cytokeratin extracted from lymph nodes of cancer and non-cancer patients.

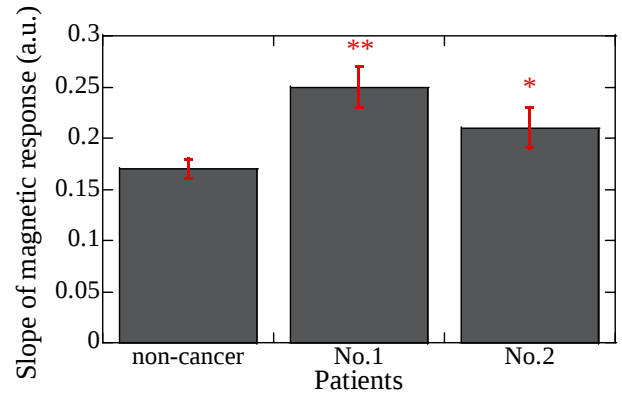


Fig. 11 Evaluation results of cytokeratin extracted from lymph nodes of cancer and non-cancer patients.

nanoparticles and protein aggregates observed with a cryo-electron microscope (CRYO ARMTM300II, JEOL Ltd.). In this sample, protein A-added magnetic nanoparticles (Nanomag-D, average particle size 130 nm ϕ) were bound to a primary antibody (human GDF15 antibody) and Au nanoparticles (NHS-activated gold nanoparticles, 5 nm ϕ). The Au nanoparticles were reacted with the antibody. Next, an antigen-antibody reaction with an antigen protein (GDF15, human recombinant <MIC-1>) was performed. It is believed that cross-bridges occur between the antigen and magnetic nanoparticles, which increases the size of the aggregates. In Fig. 7, the average particle size of the magnetic nanoparticles is 130 nm ϕ , and they form a cluster structure. Because the antibody and antigen have small molecular weights and are difficult to observe in a cryo-electron experiment, only the magnetic nanoparticles and gold nanoparticles are observed in the image. The gold

nanoparticles were observed in the middle of the cluster magnetic nanoparticles. This is thought to be because multiple magnetic nanoparticles form a cross-bridge structure via the antigen and antibody.

3.3.2 Cytokeratin detection

Magnetic nanoparticles (nanobeads 130 nm ϕ , with protein A) were bound to antibody-cytokeratin, and purified cytokeratin was subjected to an antigen-antibody reaction to evaluate the response to the switching magnetic field³⁾. Fig. 8 shows the magnetic response of magnetic nanoparticle aggregates to the switching magnetic field. The switching magnetic field was increased with each rotation to evaluate the increase in magnetic signal. As the cytokeratin concentration increased from 0, 10 μ g/ml, to 100 μ g/ml, the magnetic signal increased significantly. This is thought to be due to the magnetic nanoparticles being aggregated via the protein (cytokeratin) as shown in Fig. 7, which increased the magnetic signal. Four samples prepared under the same conditions showed similar trends, and the error bars were small enough to be reproducible. As shown in the photograph in Fig. 9, the brown area of the aggregate expanded as the amount of antigen (cytokeratin) increased. In the absence of antigen, the magnetic nanoparticles were weakly aggregated, and as the amount of antigen increased, the brown color near the center of the aggregate became darker. The protein increases the magnetic coupling between the magnetic nanoparticles, thereby increasing the magnetic signal, as shown in Fig. 8.

Lymph nodes were collected from two esophageal cancer patients and one non-cancer patient (esophagitis) at Tohoku University Hospital. The collected lymph nodes were homogenized in PRO-MEASURE protein measurement solution

with a BioMasher, diluted 10-fold, and the supernatant was collected. The samples were reacted with magnetic nanoparticles containing the same cytokeratin antibody as in Fig. 8. Fig. 10 shows the magnetic response of three patients evaluated under a switching magnetic field. Lymph nodes of cancer patients contain cytokeratin, which promotes the aggregation of magnetic nanoparticles and increases the magnetic signal. Fig. 11 shows a comparison of magnetization between three cancer patients and a non-cancer patient. Statistically significant differences could be evaluated between some cancer patients and non-cancer patients, suggesting the possibility of rapid intraoperative diagnosis.

4 REFERENCES

- 1) S. Yabukami, C. Iwasaki, K. Nozawa, S. Takahashi, K. Okita, K. Chatani, "Simultaneous Evaluation of Permeability and Permittivity using a Flexible Microstrip Line-Type Probe up to 67 GHz", IEEE Transactions on Magnetics, Vol. 58, No. 2, p. 1-5 (2022).
- 2) K. Okita, Y. Pu, L. Tonthat, S. Yabukami, Y. Ozawa, S. Asamitsu, H. Okamoto, T. Kamei, "Novel Method to Measure Bacterium using Magnetic Nanoparticles", IEEE Magnetics Letters, vol. 14, 3100504 (2023).
- 3) Shin Yabukami, Toru Murayama, Koki Kaneko, Amane Ban, Loi TonThat, Yohei Ozawa, Hiroshi Okamoto, Takashi Kamei, Miyuki Tanaka, Yoshikazu Tanaka, Takaaki Abe, "Evaluation of cytokeratin in lymph node metastasis using magnetic nanoparticles and protein aggregates", IEEE Transactions on Magnetics, 1-1 (2025).

Establishment of Bladder-Preserving Therapy for Muscle-Invasive Bladder Cancer Using Nanoparticles

Masakazu Gonda* Noriyasu Kawai*

* Department of Nephro-urology, Nagoya City University, Graduate School of Medical Sciences
1 Kawasumi, Mizuho-cho, Mizuho-ku, Nagoya, Japan

Abstract

Bladder cancer frequently recurs, with non-muscle invasive bladder cancer (NMIBC) often progressing to muscle-invasive bladder cancer (MIBC), which requires invasive cystectomy. Enfortumab vedotin (EV) was recently approved for metastatic bladder cancer in Japan but causes side effects when administered systemically. We developed EV-conjugated nanoparticles (MNPS-PMPC-EV) for intravesical thermotherapy and evaluated their in vitro effects on bladder cancer cells. MNPS-PMPC-EV showed no inhibitory effect on cell proliferation. Additionally, stable creation of an MIBC model mouse was challenging under the protocol of this study.

Keywords: bladder cancer, muscle-invasive bladder cancer, nanoparticles, thermotherapy, enfortumab vedotin,

1. PURPOSE

Bladder cancer recurs in approximately half of cases.⁽¹⁾ Non-muscle invasive bladder cancer (NMIBC), which initially remains within the bladder mucosa, often progresses to muscle-invasive bladder cancer (MIBC) through repeated recurrences. The standard treatment for NMIBC is transurethral surgery, but for MIBC, cystectomy is the standard approach. Cystectomy is not only highly invasive but also significantly reduces the patient's quality of life post-surgery. Therefore, various bladder-preserving treatments have been developed for MIBC, but none have become the standard treatment.

Recently, enfortumab vedotin (EV), a new drug, has been approved in Japan for metastatic bladder cancer. This antibody-drug conjugate (ADC) consists of a monoclonal antibody targeting nectin-4, which is overexpressed in urothelial carcinoma, linked to a microtubule-disrupting agent (monomethyl auristatin E: MMAE).²⁾ However, since nectin-4 is also normally expressed in the skin, systemic

administration of EV causes side effects in more than half of patients. To address this, we hypothesized that intravesical administration of EV-conjugated nanoparticles (MNPS-PMPC-EV) combined with thermotherapy could reduce side effects and allow bladder preservation.

In this study, we synthesized MNPS-PMPC-EV and evaluated its in vitro ability to inhibit cell proliferation in a murine bladder cancer cell line. We also attempted to establish a muscle-invasive bladder cancer mouse model for future in vivo studies, which we report here as well.

2. METHOD

I. Synthesis of MNPS-PMPC-EV

MNPS-PMPC-EV was synthesized in collaboration with Nagoya University. Iron oxide nanoparticles were used as the core, around which numerous 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) molecules were conjugated to create MNPS-PMPC. EV was then conjugated to

MNPS-PMPC to form MNPS-PMPC-EV.

The in vitro effects of MNPS-PMPC-EV on bladder cancer cells were subsequently assessed. MNPS-PMPC and MNPS-PMPC-EV were administered to the murine bladder cancer cell line MB49 at concentrations of 1 pg/cell, 10 pg/cell, 100 pg/cell, and 1000 pg/cell. After 24 hours, cell viability was measured using absorbance analysis with Cell-Counting Kit-8.

II. Establishment of the MIBC Mouse Model

Twelve 8-week-old female C57BL/6J mice were prepared, and each bladder was intravesically injected with 0.125% trypsin (50 μ L) transurethrally. Trypsin was retrieved from groups of four mice after 20, 30, and 40 minutes, followed by the instillation of 6.0×10^4 MB49 cells in 50 μ L into each bladder. After 50 minutes, MB49 was retrieved, and muscle-invasive bladder cancer presence was evaluated 9 days post-inoculation.

3. RESULTS

I. Synthesis of MNPS-PMPC-EV

MNPS-PMPC-EV was successfully synthesized in collaboration with Nagoya University. MPC was conjugated to the surface of iron oxide nanoparticles, with N3 added to the end of the MPC chain. EV, with conjugated dibenzocyclooctyne, was then attached to the MPC end using a click reaction.

In the cell growth inhibition assessment, neither MNPS-PMPC-EV nor MNPS-PMPC showed a significant decrease in viability in MB49 cells with increasing concentration (Figure 1A, B).

II. Establishment of the MIBC Mouse Model

Attempts were made to develop a muscle-invasive bladder cancer model by varying the intravesical trypsin exposure time. Only one MIBC case was potentially

established in the group with 40-minute trypsin exposure (Figure 2A, B), while the other cases clearly indicated NMIBC.

4. DISCUSSION

In this study, MNPS-PMPC-EV, an EV-conjugated nanoparticle, was synthesized, and its cell growth inhibition effect was examined. Additionally, attempts were made to establish MIBC in mice through intravesical injection of a bladder cancer cell line with trypsin treatment.

MNPS-PMPC-EV did not demonstrate any inhibitory effect on cell growth. This may be due to the low overall quantity of EV or reduced cellular uptake caused by conjugation to nanoparticles. Future studies will use transmission electron microscopy to assess the quantity of particles taken up by cells directly.

The creation of a stable MIBC mouse model was challenging. Future attempts will increase the concentration of trypsin to enhance model establishment. While the trypsin-induced bladder cancer model has the advantage of a short preparation time, it is limited by being a physical implantation rather than a clinically analogous model. In contrast, the N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)-nitrosamine (BBN)-induced MIBC model more closely resembles clinical bladder cancer.³⁾ Using the BBN-induced MIBC model for thermotherapy will allow us to assess treatment effects in a manner closer to clinical reality. Therefore, we plan to simultaneously develop a BBN-induced MIBC model and verify the in vivo effects of thermotherapy.

ACKNOWLEDGEMENT

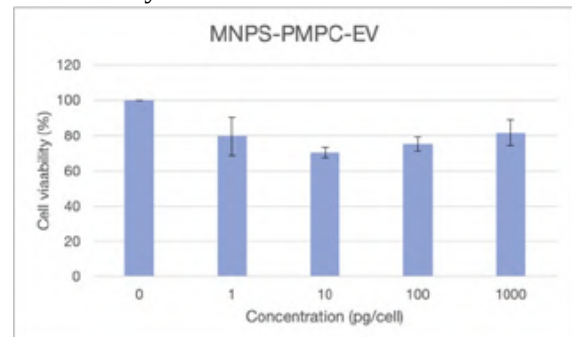
This study was supported by the Grant-in-Aid of Watanabe Foundation (2023). The equipment of the Laboratory Animal Center of Nagoya City University was used.

REFERENCES

1. Tanaka N, Kikuchi E, Matsumoto K, Miyajima A, Nakagawa K, Oya M. Frequency of tumor recurrence: a strong predictor of stage progression in initially diagnosed nonmuscle invasive bladder cancer. *J Urol*. 2011 Feb;185(2):450–5.
2. Kamat AM, Lotan Y, Roupret M, Steinberg GD, Inman BA, Powles T, et al. A first-in-human trial of intravesical enfortumab vedotin (EV), an antibody-drug conjugate (ADC), in patients with non-muscle invasive bladder cancer (NMIBC): Interim results of a phase 1 study (EV-104). *J Clin Oncol*. 2023 Jun 1;41(16_suppl):4596–4596.
3. Fantini D, Glaser AP, Rimar KJ, Wang Y, Schipma M, Varghese N, et al. A Carcinogen-induced mouse model recapitulates the molecular alterations of human muscle invasive bladder cancer. *Oncogene*. 2018 Apr;37(14):1911–25.

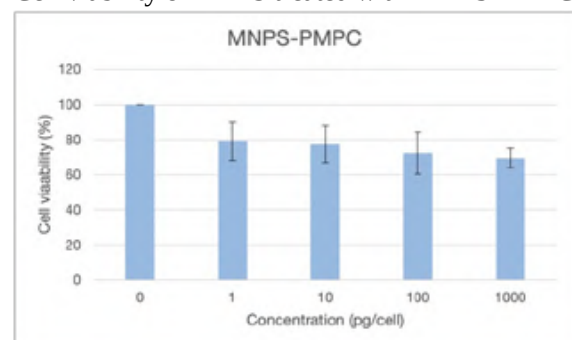
(Figure 1A)

Cell viability of MB49 treated with MNPS-PMPC-EV



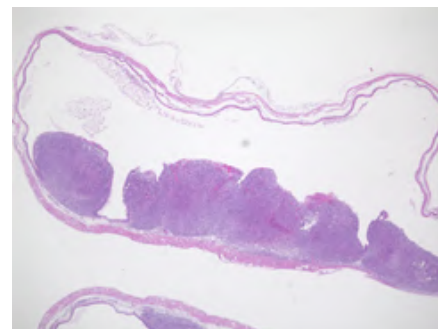
(Figure 1B)

Cell viability of MB49 treated with MNPS-PMPC



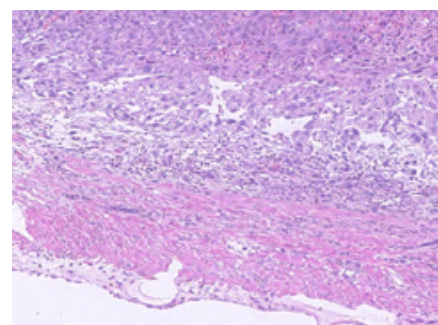
(Figure 2A)

Tumor within the bladder of the created mouse



(Figure 2B)

Possible invasion into the muscle layer, but no clear invasion observed



Mechanisms of spasticity treatment by peripheral magnetic stimulation

Takayuki Kamimoto

Department of Rehabilitation Medicine, Keio University School of Medicine
35, Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo, Japan, 160-8582

Abstract

Peripheral magnetic stimulation has been suggested as an effective new treatment for spasticity. Peripheral magnetic stimulation is characterized by its ability to stimulate the affected area without pain, but the mechanism of the spinal reflex pathway, which is important in the pathophysiology of spasticity, has not yet been elucidated. In this study, we will perform peripheral magnetic stimulation of the tibialis anterior muscle in chronic stroke patients to elucidate brain plasticity and spinal reflex circuits using spinal cord reciprocal inhibition before and after the intervention.

Keywords: Spasticity, Peripheral Magnetic Stimulation, NMES, Stroke, Reciprocal Inhibition

1. PURPOSE

It is estimated that 3.5 million people suffer from stroke, which has a significant impact on the health and welfare of the nation as well as on the medical economy. It is known that half to 2/3 of patients present with sequelae of central motor paralysis after stroke onset, and the establishment of treatment methods for these is strongly needed. Spasticity is said to be present in 27-36% of patients during the first year after stroke onset.¹⁾ Not only does it interfere with a wide range of Activities of Daily Living (ADL) such as washing hands, changing clothes, holding things, and walking, it also affects the quality of life (QOL) of caregivers, including family members. (QOL) of caregivers, including family members, is also reduced. In stroke patients, treatment of spasticity is very important to improve ADL/QOL.

Spasticity is characterized by increased tendon reflexes and increased resistance to velocity-dependent extension. Although the interpretation of the pathophysiology of spasticity

itself remains controversial, one implication is thought to be reciprocal inhibition. Stimulation of Ia afferent neurons in the striated muscle reduces the excitability of alpha motor neurons in the antagonist muscle through inhibition by Ia inhibitory interneurons in the spinal cord, which is called reciprocal inhibition. In the past, many methods have been used to quantitatively evaluate reciprocal inhibition by measuring the amplitude of the H wave.²⁾

Known treatments for spasticity include rehabilitation, medical therapy, nerve block therapy, botulinum therapy, intrathecal baclofen (ITB) therapy, and neuromuscular electrical stimulation therapy. However, the above therapies are expensive, and oral medication increases the risk of falling due to side effects such as drowsiness and lightheadedness, while injections, surgery, and electrical stimulation therapy are often accompanied by pain.

Therefore, we focused on peripheral magnetic stimulation (PMS), which can stimulate the affected area without stimulating the skin

surface compared to neuromuscular electrical stimulation therapy because a stimulation coil is placed at the target site of stimulation and a short pulse magnetic field is generated. This is a feature of PMS that allows stimulation of the affected area without pain. Therefore, this technique is expected to be clinically applicable to relatively large muscles and joints.

There are a number of PMS approaches for spasticity. The effectiveness of PMS has been evaluated manually using the Modified Ashworth Scale, the Modified Tardieu Scale (MTS), the clonus of the soleus muscle using surface electromyography, and electroencephalography (EEG), suggesting that PMS is effective, but the neurophysiological mechanism of the spinal nerve circuit has not yet been clarified. 3) The neurophysiological mechanism has not been clarified. 4) PMS is believed to increase the input to afferent neurons such as Ia, Ib, and II. 5) Therefore, PMS stimulation in conjunction with voluntary movements can increase the number of motor neurons in the homonymous muscle via monosynapses from Ia afferent neurons in the main motor muscle. The PMS stimulation in conjunction with the voluntary exercise is thought to activate more motoneurons, including those that could not be excited by only one of the two stimuli, because the signals from the Ia afferents in the main motor muscle reach the same motoneurons at the same time as the nerve signals descending from the cortex. In addition, it is possible that the antagonistic inhibition of the antagonist muscle via inhibitory neurons could be expected. Therefore, in this study, we decided to investigate the mechanism of action of peripheral magnetic stimulation on spasticity using neurophysiological techniques.

2. Method

Stroke patients admitted to our hospital for rehabilitation treatment were included in the study. Participation criteria were as follows: 1) age over 18

years and under 80 years, 2) central motor paralysis due to unilateral lesion, 3) stable general condition, 4) no cognitive decline or serious aphasia symptoms, and 5) free and voluntary written consent after being fully informed about the study. Exclusion criteria were pacemakers, indwelling catheters in the heart, metal implants such as clips in the body, history of epilepsy, and no spasticity in the lower limbs. Consent was obtained in writing to conduct the study. (Keio University School of Medicine Ethics Review Committee No. 20231035, approved June 7, 2023)

*CROSSOVER STUDY

The change in the height of the H wave amplitude before, immediately after, and 15 and 30 minutes after the end of stimulation with PMS and NMES, i.e., the change in reciprocal inhibition before and after stimulation with rPMS and NMES, was compared in patients with central motor paralysis with spasticity. The washout period was at least 24 hours.

The PMS and NMES were applied to the tibialis anterior muscle in conjunction with voluntary dorsiflexion of the ankle joint. 2 sec on - 2 sec off, 100 cycles were performed. 30 Hz was used for the PMS, for a total of 6000 rounds, and the same for the NMES, with the intensity set at 110% of the motor threshold at which joint motion occurs.

The conditioned stimulation method was used to evaluate spasticity and spinal reciprocal inhibition. Recording electrodes were affixed to the tibialis anterior and soleus muscles, and the sampling frequency of the electromyograph (Nihon Kohden, Neuropac X1) was 10 kHz with a bandpass filter from 10 Hz to 1 kHz. Using electromyography, conditioned (Control) stimulation (common peroneal nerve) was performed at the stimulation intensity of the M-wave threshold of the anterior tibialis muscle (intensity at which 100 μ V could be recorded), and test (Test) stimulation (tibial nerve) was performed at the stimulation intensity of 15-25% of the Mmax amplitude value. Test stimuli alone were stimulated for 10 trials without conditioned stimulation, and 10 trials were stimulated at 2 ms and 20 ms for the

Condition-Test (C-T) interval, respectively. 2 ms for the C-T interval evaluated Ia inhibition, and 20 ms evaluated D1 inhibition (presynaptic inhibition).

Basic information on the subjects included age, gender, disease type, post-onset duration, spasticity (MTS), motor paralysis (Fugl-Meyer Assessment Lower Extremity (FMA-LE)), and sensory impairment (Stroke Impairment Assessment Set (SIAS) sensory items). sensory items of the Stroke Impairment Assessment Set (SIAS)).

For statistical analysis, peak-to-peak values of H-wave amplitude recorded in the triceps femoris muscle were calculated and Reciprocal Inhibition (RI) (mean H-wave amplitude with conditioned stimulus/mean H-wave amplitude with test stimulus only) was calculated. Two-way analysis of variance of repeated measures was performed, and Bonferroni test was performed as a post-test. The results are presented as mean $\pm$ standard deviation. The significance level was set at $p < 0.05$.

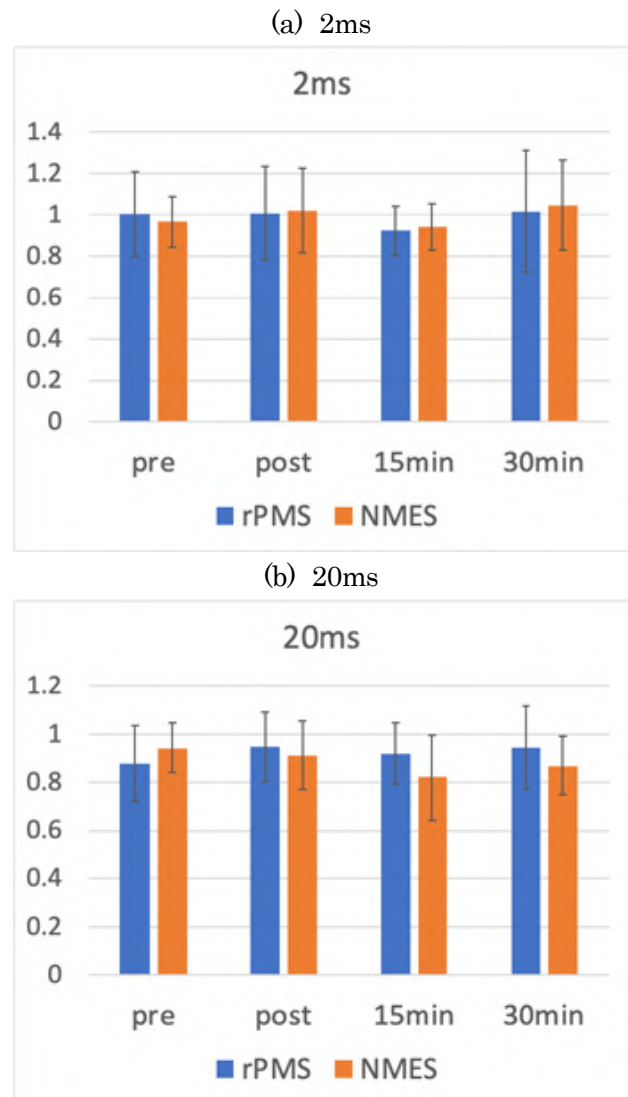
3. RESULTS

11 stroke patients who met the inclusion criteria were included in the study. Mean age: 54.45 ± 7.45 years; male: 8, female: 13; type of stroke: 3 cerebral infarction, 8 cerebral hemorrhage; time since onset: 2023 ± 1151 days; ankle MTS: [QMR] 2.55 ± 0.66 , [R1-R2] 11.73 ± 6.59 degrees; FMA-LE: 23.20 ± 3.70 points; SIAS sensory items; [Light touch] 2.45 ± 0.50 , [position] 2.82 ± 0.39 .

First, the Ia suppression, RI with a C-T time of 2 ms, is shown in Figure 1a. A two-way analysis of variance revealed no interaction with $F(3, 28) = 0.405$, $p = 0.7511$. A Bonferroni test showed no significant difference between the NMES and PMS groups.

Next, the RI for D1 suppression, C-T time 20 ms, is shown in Figure 1b. A two-way analysis of variance revealed no interaction with $F(3, 30) = 2.197$, $p = 0.109$.

Figure1 Changes in Reciprocal Inhibition at 2 ms and 20 ms C-T time (mean $\pm$ SD)



4. DISCUSSION

The purpose of this study was to elucidate the neurophysiological mechanisms of PMS. The results of the current study showed that PMS did not significantly alter Ia and D1 inhibition.

PMS is reported to increase input to afferent neurons such as Ia, Ib, and II, and it was thought that PMS in conjunction with voluntary movements might be expected to produce conflicting inhibition to antagonistic muscles via inhibitory neurons, but this was not the case in the present study.

Although previous studies have evaluated the improvement of PMS-induced spasticity using clinical evaluation and surface electromyography, no

study has measured Reciprocal Inhibition using the H-wave conditioned stimulation method, a quantitative evaluation method for spasticity, and we believe that this is highly novel. One limitation of this study is that it is difficult to strictly align the amplitude of the H wave before intervention because PMS and NMES cannot be performed on the same day.

5. ACKNOWLEDGEMENT

T.K. deeply acknowledges Watanabe Foundation to perform this research

REFERENCE

- 1) Watkins CL, Leathley MJ, Gregson JM, Moore AP, Smith TL, Sharma AK. Prevalence of spasticity post stroke. *Clin Rehabil.* 2002 Aug;16(5):515-22.
- 2) Morita H, Crone C, Christenhuis D, Petersen NT, Nielsen JB. Modulation of presynaptic inhibition and disynaptic reciprocal Ia inhibition during voluntary movement in spasticity. *Brain.* 2001 Apr;124(Pt 4):826-37.
- 3) Beaulieu LD, Massé-Alarie H, Brouwer B, Schneider C. Noninvasive neurostimulation in chronic stroke: a double-blind randomized sham-controlled testing of clinical and corticomotor effects. *Top Stroke Rehabil.* 2015 Feb;22(1):8-17.
- 4) Chen ZJ, Li YA, Xia N, Gu MH, Xu J, Huang XL. Effects of repetitive peripheral magnetic stimulation for the upper limb after stroke: Meta-analysis of randomized controlled trials. *Heliyon.* 2023 Apr 22;9(5):e15767.
- 5) Struppler A, Angerer B, Gündisch C, Havel P. Modulatory effect of repetitive peripheral magnetic stimulation on skeletal muscle tone in healthy subjects: stabilization of the elbow joint. *Exp Brain Res.* 2004 Jul;157(1):59-66.

Development of video magnetoencephalography monitoring system with tunnel magneto-resistive sensors

Kazutoshi Konomatsu, Makoto Ishida, Kazutaka Jin, Nobukazu Nakasato

Tohoku University Graduate School of Medicine
2-1 Seiryō-machi, Aoba-ku, Sendai Miyagi 980-8575 Japan

Abstract

To clarify whether the density spectral array (DSA) of ictal EEG can differentiate epileptic seizures from non-epileptic events using deep learning techniques. We reviewed patients with mesial temporal lobe epilepsy (mTLE) and psychogenic non-epileptic seizures (PNES), and analyzed seizures/events recorded by long-term video EEG monitoring. Time of clinical onset was defined as zero, and the EEG recordings were clipped from -3 to +3 minutes. Frequency analysis of Cz as well as the means of C3-C4, Fp1-Fp2, and O1-O2 was performed to generate DSA. ResNet34, a convolutional neural network (CNN) model, was trained and tested on datasets. CNN architecture was created from 40 patients with mTLE and 40 with PNES as train data; and 8 patients with mTLE and 11 with PNES were evaluated using the model as test data. EEG recordings of Cz electrode from -1 to +1 minutes showed the best performance, with area under the curve of 0.959, accuracy of 0.879, sensitivity of 0.800, and specificity of 0.944. DSA of single-channel EEG (Cz) successfully differentiated between epileptic seizures and nonepileptic events with deep learning techniques.

Keywords: density spectral array, single-channel EEG, convolutional neural network

1. PURPOSE

Magnetoencephalography (MEG) is a device that detects neuronal excitations in the brain by measuring the magnetic fields they produce. Conventional MEG uses superconducting quantum interference devices (SQUIDs), which require a large shielded room and liquid helium for cooling, resulting in high running costs. Recently, tunnel magneto-resistive (TMR) sensors, which we have been developing, have shown promise in addressing cost issues due to their wide dynamic range and room temperature operation.^{1,2)} In this study, we aimed to develop a video MEG monitoring system using TMR sensors with the ultimate goal of enabling ambulatory MEG. To reduce costs for home applications, it is desirable to detect

epileptic seizures using fewer sensors. Therefore, we examined methods for differentiating between epileptic seizures associated with mTLE and non-epileptic events associated with PNES using data from long-term video EEG monitoring (LTVEM) with fewer electrodes.

2. METHODS

We retrospectively investigated mTLE and PNES patients who underwent comprehensive inpatient evaluation at Tohoku University Hospital between January 2014 and December 2022. Scalp EEG recordings were performed using the Neuro Fax EEG-1200 system (Nihon Kohden, Tokyo, Japan) based on the international 10-20 system at a 500 Hz

sampling rate. All EEG data were interpreted by clinical technologists and physicians. Frequency analysis was conducted using Cz, the mean of C3 and C4, the mean of Fp1 and Fp2, and the mean of O1 and O2 referenced to linked earlobes. EEG signals were downsampled to 100 Hz, and fast Fourier transform (FFT) was performed using 5.12-second segments, calculated every 2.56 seconds. DSA was plotted with time on the x-axis, frequency on the y-axis, and power represented by color. The clinical onset was determined by board-certified epileptologists based on seizure video review, and EEG recordings were clipped from -3 minutes to +3 minutes around the onset. DSA was generated for different time windows (Full: -3 to +3 min; Early 1/3: -3 to -1 min; Middle 1/3: -1 to +1 min; Late 1/3: +1 to +3 min) (Figure 1). The ResNet34 CNN model was trained and tested on datasets from different years, and performance was evaluated using AUC, accuracy, sensitivity, and specificity.

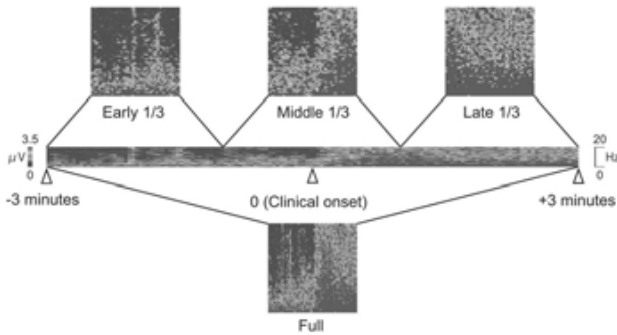


Figure 1.

Typical example of density spectral array of a patient with mesial temporal lobe epilepsy. The time of clinical onset was defined as zero, and the EEG recordings were clipped from -3 to +3 minutes (full). The data was divided into three parts: from -3 to -1 minutes (early 1/3), from -1 to +1 minutes (middle 1/3), and from +1 to +3 minutes (late 1/3)

3. RESULTS

A total of 48 mTLE cases (106 seizures) and 51 PNES cases (100 events) were analyzed. CNN architecture was developed using 40 mTLE (91 seizures) and 40 PNES (82 events) patients from 2014 to 2020 as training data, and tested with 8 mTLE (15 seizures) and 11 PNES (18 events) patients from 2021 to 2022. Evaluation across different time windows and electrodes showed that EEG recordings from the Cz electrode during the Middle 1/3 window (-1 to +1 min from clinical onset) produced the best results. Using the ResNet34 model, we achieved an AUC of 0.959, accuracy of 0.879, sensitivity of 0.800, and specificity of 0.944 (Table 1, Figures 2 and 3).

Table 1. Performance of the frequency analyses in different time windows at each electrode.

	Time window	Cz	C3-C4	Fp1-Fp2	O1-O2
AUC	Early 1/3	0.533	0.589	0.893	0.500
	Middle 1/3	0.959	0.874	0.778	0.704
	Late 1/3	0.700	0.767	0.644	0.533
	Full	0.756	0.826	0.689	0.685
Accuracy	Early 1/3	0.515	0.485	0.818	0.515
	Middle 1/3	0.879	0.758	0.727	0.636
	Late 1/3	0.667	0.667	0.636	0.515
	Full	0.576	0.667	0.667	0.636
Sensitivity	Early 1/3	0.533	0.600	0.867	0.533
	Middle 1/3	0.800	0.867	0.733	0.733
	Late 1/3	0.600	0.667	0.600	0.533
	Full	0.400	0.467	0.733	0.667
Specificity	Early 1/3	0.500	0.389	0.778	0.500
	Middle 1/3	0.944	0.667	0.722	0.556
	Late 1/3	0.722	0.667	0.667	0.500
	Full	0.722	0.833	0.611	0.611

AUC = area under the curve.

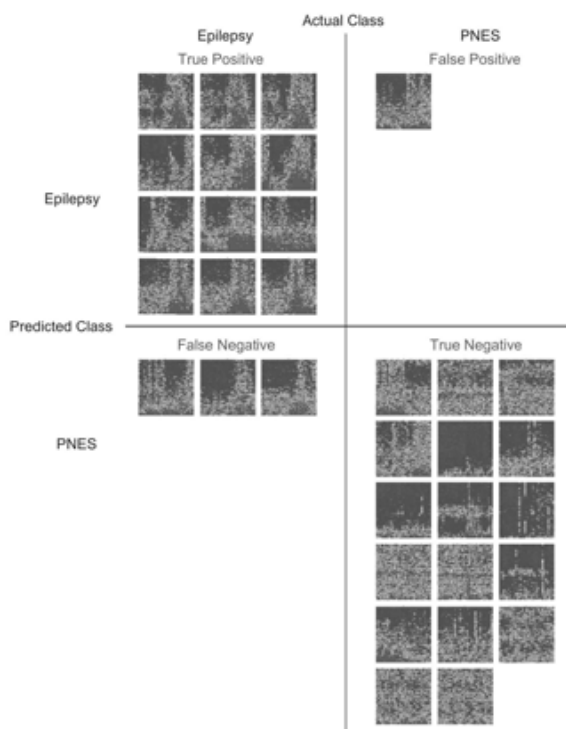


Figure 2.

Results of the test data classified by the convolutional neural network (CNN) model. Density spectral arrays were generated by EEG recordings of clinical onset from -1 to +1 minute (middle 1/3) and frequency analyses of Cz electrode with linked ear reference. Actual Class means true epilepsy and psychogenic nonepileptic seizures (PNES), and Predicted Class means the results classified by CNN. The CNN model correctly classified 12 (80.0%) of 15 epileptic seizures and 17 (94.4%) of 18 non-epileptic events. PNES = psychogenic nonepileptic seizures

4. DISCUSSION

The reason why Cz recordings produced the best performance may include fewer artifacts from eye movements and temporalis muscle contractions, broader brainwave detection due to its central location, and higher power spectral values because of its distance from the earlobe electrodes. The Middle 1/3 window was most effective because seizure-related EEG changes occupied the largest proportion of the recording during this period, minimizing contamination by motion artifacts. Using deep

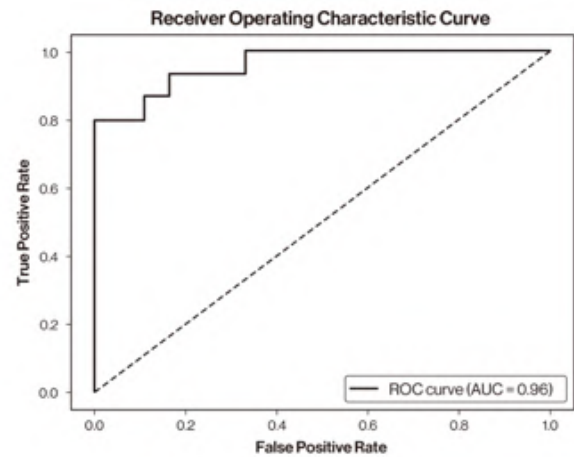


Figure 3.

Receiver operating characteristic curve of the density spectral array generated by EEG recordings with Cz electrode and linked ear reference. Analysis interval from -1 to +1 minute showed the best performance with area under the curve (AUC) of 0.959.

learning, we successfully differentiated between epileptic seizures and non-epileptic events (PNES) using DSA from single-channel EEG (Cz). This technology could enhance diagnostic accuracy and contribute to the development of automated systems for a home-use video MEG monitoring system using TMR sensors.

ACKNOWLEDGMENT

This research was supported by the 30th Magnetic Research Grand from the Watanabe Foundation.

REFERENCES

- 1) Fujiwara K, et al. Magnetocardiography and magnetoencephalography measurements at room temperature using tunnel magneto-resistance sensors. *Appl Physics Exp* (2018).
- 2) Kanno A, et al. Scalp attached tangential magnetoencephalography using tunnel magneto-resistive sensors. *Sci Rep* (2022).
- 3) He K, et al. Deep residual learning for image recognition. *arXiv* (2015).
- 4) Yao D, et al. Which reference should we use for EEG and ERP practice? *Brain Topogr* (2019).

磁性ナノ粒子を用いた神経障害性疼痛の遠隔治療法の開拓

Development of remote treatment method for neuropathic pain using magnetic nanoparticles

上村 真生*

Masao Kamimura *

*東京理科大学 先進工学部, 〒125-8585 東京都葛飾区新宿 6-3-1

* Faculty of Advanced Engineering, Tokyo University of Science
6-3-1 Niijuku, Katsushika-ku, Tokyo 125-8585 Japan

Abstract

Neuropathic pain is an intractable chronic disease caused by various factors including cancer. It is believed that the mechanism of its onset is the abnormal excitation of nerve cells due to the activation of ion channels on the cell membrane when nerve cells are damaged. Our research group has developed a technique for manipulating localized cells, including TRP channels, using stimuli-responsive nanoparticles that are harmless to cells. In this study, we aimed to obtain basic knowledge for creating a technique to treat neuropathic pain safely and effectively by using magnetic nanoparticles as a "remote control agonist" that selectively manipulates TRP channels in nerve cells. When magnetic nanoparticles were added to TRPV2(+) T24 cells and a magnetic field was applied, Ca^{2+} inflow into the cells in response to the magnetic field was observed. Based on these results, it is expected that the method developed in this study can be applied to a new treatment for neuropathic pain.

Keywords: Neuropathic pain, TRP Channel, Magnetic nanoparticle

1. PURPOSE

Neuropathic pain is a chronic, intractable disease caused by various factors, including cancer, and is a serious disease with an estimated 1.5 billion patients worldwide. For example, cancer patients not only experience pain due to tumor growth, but also pain when cancer invades the nerves and pain due to side effects of anticancer drugs on the nervous system, so pain palliative care is required in parallel with cancer treatment. The mechanism of onset of such neuropathic pain is thought to be that when nerve cells are damaged, ion channels are activated on the cell membrane, causing the nerve cells to become abnormally excited and resulting in "pain symptoms."

A well-known example of such an ion channel is the transient receptor potential (TRP) channel (which allows cations to pass when exposed to high temperatures of 52°C or higher or mechanical stimulation), and was the subject of the Nobel Prize in Physiology or Medicine in 2021^{1,2}). These TRP channels are localized in peripheral sensory nerve endings and skin keratinocytes and are deeply involved in the starting point of pain reception, and it is believed that pain generation can be blocked by controlling the TRP channel. In fact, treatments that desensitize channel function using small molecule drugs (= agonists) that activate TRP channels have begun to be applied clinically (Qutenza (Astellas),

Zuacta (Winston Laboratories), etc.), but strong side effects are a problem.

Furthermore, as a social demand, neuropathic pain associated with various diseases including cancer is a serious disease that affects many people around the world, and there is a strong global demand for the development of effective treatment techniques. Currently, treatments that use analgesics and medical narcotics, which are very burdensome on the patient's body, and treatments that desensitize TRP channels with small molecule agonist drugs are used, but all of these existing pain treatments have major issues with safety issues and low therapeutic efficacy.

On the other hand, our research group is developing a technique for manipulating localized cells, including TRP channels, using stimuli-responsive nanoparticles that are harmless to cells³). Therefore, the objective of this study was to obtain basic knowledge for creating a technology to safely and effectively treat neuropathic pain by using magnetic nanoparticles as a "remote-controlled agonist" that selectively manipulates TRP channels in nerve cells.

2. METHOD

Fe₃O₄ nanoparticles (Bare-NPs) were synthesized by homogeneous precipitation, and dopamine was introduced to the particle surface (DOPA-NPs). Then, poly(ethylene glycol) (PEG) possessing a polyanion block structure at one end was immobilized on the nanoparticle surface via an amide bond to prepare PEGylated Fe₃O₄ nanoparticles (PEG-NPs). The particle size of the obtained nanoparticles was evaluated by dynamic light scattering, and the surface charge was measured by zeta potential measurement. Furthermore, PEG/antibody-co-immobilized Fe₃O₄ nanoparticles (PEG/anti-NPs) were also prepared by simultaneously introducing PEG-b-polyanion and anti-TRPV2 antibody onto the nanoparticle surface. The particle size distribution of the obtained particles was measured by dynamic light scattering, and the antibody introduction was evaluated by the micro BCA method. Then, PEG/anti-NPs were added to human bladder cancer-derived T24 cells as a model cell

expressing mechanical stimulus-responsive TRPV2 channels, and Ca²⁺ influx upon application of a magnetic field was observed using a fluorescence microscope.

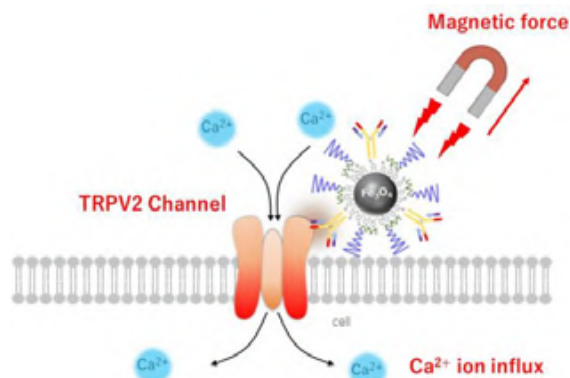


Figure 1. Schematic illustration of mechanical stimulation of TRPV2 channel using surface modified magnetic nanoparticles.

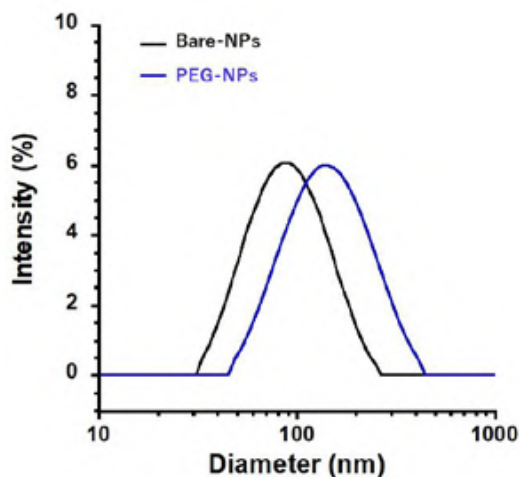


Figure 2. Particle size distribution in aqueous environment.

3. RESULTS

Magnetic nanoparticles were synthesized using the homogeneous precipitation method, resulting in bare-NPs with a particle size of approximately 90 nm. Next, PEG-b-polyanion was introduced into the bare-NPs, resulting in a particle size of approximately 140 nm. The zeta potential of the PEG-NPs was measured, and it was found that the change in the measured zeta potential when the pH was changed was

smaller than that of bare-NPs. Next, the PEG/anti-NPs were added to T24 cells, and after applying a magnetic field (30 sec), the state of Ca^{2+} in the cells was observed using Fluo-8®, a Ca^{2+} indicator fluorescent reagent. As a result, it was observed that the fluorescence of Fluo-8® increased when a magnetic field was applied compared to when a magnetic field was not applied.

4. DISCUSSION

As a result of PEGylation of bare-NPs, it was found that the particle size increased. This suggests that PEG-NPs are obtained by PEGylation of multiple nanoparticles as aggregates during the PEGylation process. In addition, the results of zeta potential measurement showed that the change in zeta potential value due to pH was smaller for PEG-NPs than for bare-NPs, suggesting that a nonionic PEG layer was formed on the nanoparticle surface.

Furthermore, when this PEG/anti-NPs was added to T24 cells and a magnetic field was applied, it was observed that Ca^{2+} flowed into the cells in response to the magnetic field application, suggesting that the mechanical stimulus-responsive TRPV2 channel on the cell membrane was activated.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by the Watanabe Foundation.

REFERENCES

- 1) M. J. Caterina et al., *Nature*, 389 (1997) 816.
- 2) Ari-Pekka Koivisto et al., *Nat. Rev. Drug Discov.*, 21 (2022) 41.
- 3) W. Chen et al., *Nanoscale* 14 (2022) 2210.

Investigation of the neuromodulatory effects of transcranial static magnetic field stimulation (tSMS) on brain network dynamics

Sumiya Shibata

Department of Physical Therapy, Niigata University of Health and Welfare
1398 Shimami-cho, Kita-ku, Niigata-shi, Niigata 950-3198 Japan

Abstract

Transcranial static magnetic field stimulation (tSMS) is the latest biomagnetism technique which can non-invasively stimulate the human brain. The aim of this study was to investigate the neurophysiological mechanisms of the neuromodulation of tSMS using transcranial magnetic stimulation with electroencephalography (TMS-EEG), which is a novel method for exploring excitability and connectivity of the brain network. tSMS was applied over the left primary motor cortex (M1) for 20 min in 15 healthy subjects. tSMS altered TMS-evoked potentials (TEPs), which are the EEG responses time-locked to the TMS pulse, both at the stimulated M1 and at the contralateral M1.

Keywords: transcranial static magnetic field stimulation (tSMS), TMS-EEG, TMS-evoked potential (TEP), interhemispheric inhibition

1. PURPOSE

tSMS can non-invasively modulate the brain function with a small and strong permanent magnet. It not only inhibits the function of the cortex below the magnet but also changes that of the cortex remote from the magnet by modulating the brain network¹⁾. The purpose of this study is to investigate its neuromodulatory effects on the brain network using TMS-EEG.

In TMS-EEG, TMS pulses are applied to stimulate a specific area of the brain while EEG is recording electrical activities from the whole brain. This allows us to analyze the electrical responses of the brain to the external stimuli and to visualize the temporal and spatial spread of the brain responses reflecting the brain network.

2. METHOD

Fifteen healthy volunteers (nine men, 21–25 years of age) participated in this study. All of them were right-handed. Each experimental session involved the

measurement of EEG responses to TMS applied to the left M1 before (baseline), immediately after (post1), and 20 min after (post2) real or sham tSMS over the left M1 for 20 min. For real tSMS, a cylindrical NdFeB magnet with a 50 mm diameter and 30 mm thickness (Model N-50; NeoMag, Japan) was used. The surface magnetic flux density was approximately 5340 G. A non-magnetic stainless-steel cylinder of similar size and appearance to the real magnet was used for the sham stimulation (Fig. 1).

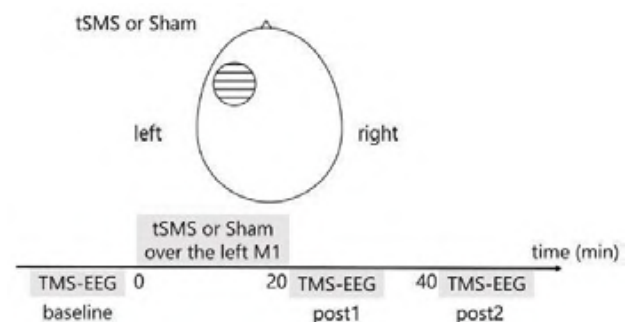


Figure 1 Experimental protocol

Adapted from Figure 4 in ref.6).

CC BY-NC-ND 4.0

In a single session of TMS-EEG recording, TMS pulses were applied at an intensity of 100% resting motor threshold (rMT) 120 times using Magstim 200² magnetic stimulator (Magstim Co., UK). EEG signals were recorded with 64 channel TMS-compatible electrodes and an EEG amplifier (Brain Products, Germany), at a sampling rate of 5 k Hz and a 1350 Hz anti-aliasing filter.

EEG data were pre-processed using TESA (TMS-EEG signal analyzer) toolboxes². TMS-evoked potentials (TEPs) were calculated by averaging the pre-processed data. For TEP in the left primary sensorimotor area (SM1), TEPs were averaged across FC1, FC3, FC5, C1, C3, C5, CP1, CP3, and CP5. For TEP in the right SM1, TEPs were averaged across FC2, FC4, FC6, C2, C4, C6, CP2, CP4, and CP6. Early responses (between 26 and 100 ms after TMS) were investigated.

A non-parametric cluster-based permutation test³ was conducted for comparing the changes of the TEPs between the timepoints (baseline vs post1, and baseline vs post2. $p < 0.05$).

3. RESULTS

The four peaks were identified in the TEPs in the left SM1, which was a tSMS target: P30, N45, P55, and N100 (Fig. 2a). The amplitude around the P30 of the TEPs significantly decreased at post1.

The negative peak (N60) was identified in the TEPs in the right SM1, which was contralateral to the stimulation site (Fig. 2b). The amplitude around the N60 of the TEPs significantly increased at post2.

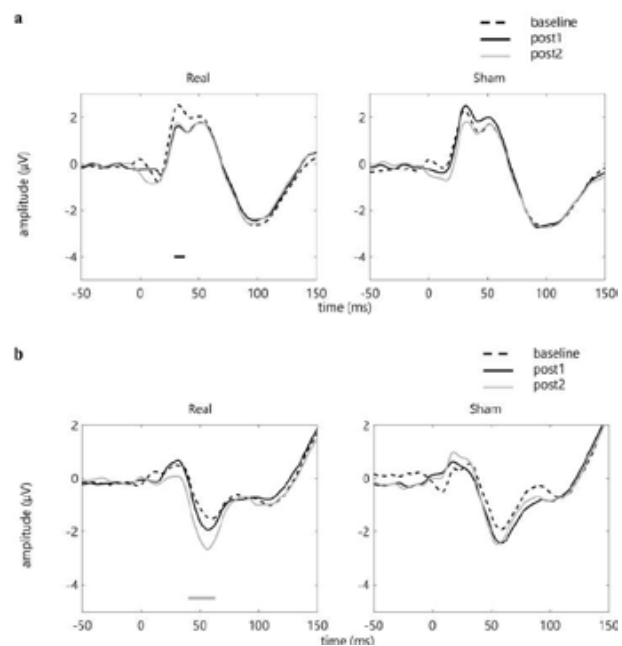


Figure 2 The grand average of TEPs in the left SM1 (a) and the right SM1 (b)

Adapted from Figure 1 in ref.6).

CC BY-NC-ND 4.0

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

4. DISCUSSION

tSMS inhibits the cortical excitability below the magnet. The inhibition by tSMS decreased the amplitude of P30 in the left SM1, reflecting the excitability of the corticospinal tract⁴.

tSMS facilitates the cortical excitability on the contralateral side through the attenuation of interhemispheric inhibition from the hemisphere on the stimulated side to that on the contralateral side⁵. The increase of the amplitude of N60 in the right SM1 may reflect the facilitation of the right SM1 by tSMS to the left SM1.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was partly supported by Grants-in-Aid for Scientific Research (KAKENHI) [grant number 19H01091 (TM), 21K17671 (SS), 22H04788 (TM), 23H00459 (TM), 23K18440 (TM), 23K24712 (SS and TM), and 24K02787 (SS)] from the Japan Society for the Promotion of Science, by a Grant-in-Aid for Research Expansion from the Niigata University of

Health and Welfare, 2022, and by the 4th Osamu Okai Special Research Grant [grant number 290304 (SS)] from the Watanabe Foundation.

This study was published in Scientific Reports ⁶⁾.

REFERENCES

- 1) Sumiya Shibata et al.: Sci. Rep. 11, 1-7 (2021).
- 2) Nigel Rogasch et al.: Neuroimage, 147, 934-951 (2017).
- 3) Maris Eric et al.: J. Neurosci. Methods 164, 177-190 (2007)
- 4) Hanna Mäki et al.; Neurosci. lett. 478, 24-28 (2010)
- 5) Yasuyuki Takamatsu, et al.; Sci. Rep. 11, 5370 (2021).
- 6) Sumiya Shibata et al.: Sci. Rep. 14, 22394 (2024).

Mechanisms of the magnetic response in the organism.

Kazuhiro Kobayashi

Research Center for Advanced Science and Technology, The University of Tokyo, Meguro, Tokyo, Japan

Abstract

Magnetobacteria sense geomagnetism with the 「magnetosome」, comprising a magnetite. Magnetosomes are aligned on the mamK mediated by the mamJ, and this system works as a magnetic compass. Then, this unique system gathers broad interest to understand magnetoreception in bio-organism. However, there is no-magnetoreception mechanisms due to toughness in purification this system. Here, I present a high-resolution cryo-electron microscopy (cryo-EM) structure of mamJ bound mamK filaments at 2.5 global resolution through the purification of functional mamJ and mamK. This structure provides the entire architecture of mamK and partial mamJ structure at the mamK dimer interface. Further image analysis will highlight the entire comprehensive mamJ structure and will reveal a molecular basis of magnetoreception in bio-organisms.

Keywords: Magnetoreception, cryo-electron microscopy, structural biology

1. Purpose

Magnetotactic bacteria sense the magnetic force with a 「magnetosome」 comprising magnetite and transmit the magnetic-induced movement to the actin-like filament skeleton called mamK via a mamJ¹⁾. In this study, we focus on magnetic bacteria, establish a protein purification system for mamK and mamJ, and aim to elucidate their molecular basis by single-particle structural analysis using cryo-EM.

2. Method

mamJ and mamK genes were constructed on *E.coli* expressing vector and these proteins were expressed on *E.coli*. These proteins were purified with wide range of procedures and purified proteins were loaded on the cryo-EM grid and observed with cryo-EM.

3. Result

Magnetic bacteria were cultured, and the mamK gene was cloned on *E.coli* expressing vector. Then, mamK was expressed on *E.coli* as a fusion protein of histidine tag and purified with Ni-NTA resin, similar to the previous study²⁾. The purified protein formed filament structure in the presence of 5 mM Mg²⁺ and 5 mM ATP. Nevertheless, The filamented mamK was partial,

suggesting that the fused histidine tag inhibited mamK polymerization. Thus, I hired protein a refolding method for functional mamK purification, referring to another study³⁾ (Fig. 1a). The purified protein showed an entire filamentation with 5 mM Mg²⁺ and 5 mM ATP. These results indicate protein refolding provides intact mamK protein, suitable for structural study of the mamJ+mamK complex.

Next, mamJ gene was cloned on *E.coli* expressing vector and expressed on *E.coli* as a fusion protein of histidine tag. This protein was purified through protein refolding and affinity chromatography with Ni-NTA resin (Fig. 1b). Subsequently, the purified mamJ was mixed with mamK protein, and the mamJ-mamK complex was reconstructed in the presence or absence of 5 mM Mg²⁺ and 5 mM ATP. The result showed mamJ formed a complex with filamentous mamK but not with monomerized mamK (Fig. 1c). This complex was loaded on a cryo-EM grid and observed with cryo-EM. Cryo-EM showed an obvious mamK filamentous structure, but unexpectedly, mamJ was partially bound to mamK. Consistent with the observation, some aggregated proteins were observed on the grid, which

seems to be aggregated mamJ protein. These results indicated the full-length mamJ protein dissociated from mamK in grid processing due to its instability and made a large aggregation. Then, I truncated the mamJ protein and made dozens of truncated constructs to generate stabilized protein with binding capacity for mamK. These truncated constructs were expressed on *E.coli* and purified through protein refolding. I performed complex formation with these proteins and mamK in the presence of 5 mM Mg^{2+} and ATP, which elucidated N and C terminus of mamJ are critical for mamK binding. Then, I made a new construct comprising N-terminus and C-terminus mamJ, expressed on *E.coli*, and purified with protein refolding. This truncated protein retained binding capacity for mamK (Fig. 1d), and then, these proteins were loaded on a cryo-EM grid. This grid was observed with cryo-EM and captured images were analyzed using image analysis software. This analysis provides a high-resolution 3-dimensional density map of mamK at global resolution 2.5 Å (Fig. 2). This map showed partial density of mamJ at the dimer interface of mamK, suggesting mamJ binds mamK dimer not monomer (Fig. 2). I have further analyzed this images at this position to visualize entire binding mode of mamJ.

4. Discussion

The density map suggests mamJ binds to the joints of the mamK monomer, indicating that two molecules of mamK are required for the binding of one molecule of mamJ at least. This result is consistent with our biochemical experiment, in which mamJ does not bind to mamK alone, but only to filament-forming mamK. These results suggest mamJ recognizes the three-dimensional structure of mamK and binds to it.

5. Acknowledgement

I would like to thank the Watanabe Foundation for supporting this research with the 30th Magnetic Research Grant.

6. Reference

1) René Uebe & Dirk Schüler : Magnetosome biogenesis in magnetotactic bacteria. *Nat Rev Microbiol* 14, 621–637 (2016).

2) Jan Löwe, Shaoda He, Sijors H W Scheres, Christos G Savva : *Proc Natl Acad Sci USA*. 22;113(47):13396-13401, (2016)

3) Julien RC Bergeron, Rachel Hutto, Ertan Ozyamak, Nancy Hom, Jesse Hansen, Olga Draper, Meghan E Byrne, Sepehr Keyhani, Arash Komeili, Justin M Kollman : Structure of the magnetosome - associated actin - like MamK filament at subnanometer resolution, *Protein Sci.* Jan;26(1):93-102, (2017)

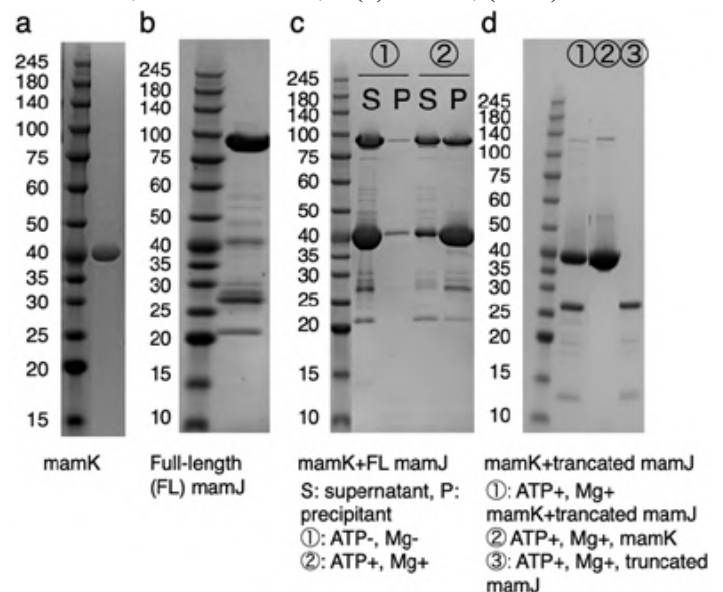


Fig1. Purification of mamK and mamJ

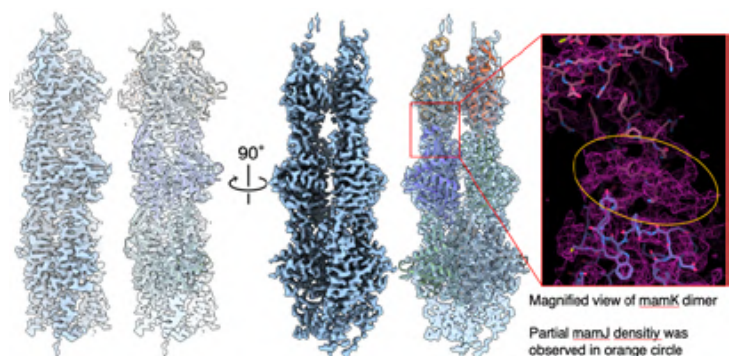


Fig 2. High-resolution 3-dimensional structure of mamK+mamJ complex

Establishment of a method for quantification of brain-spinal cord connectivity supporting recovery of voluntary motor control ability by simultaneous brain-spinal cord magnetic resonance imaging

Noboru Usuda

Neural Prosthetics Project, Department of Clinical Medical Sciences
Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science
Kamikitazawa 2-1-6, Setagaya-ku, Tokyo 156-8506, Japan

Abstract

Stroke damages the corticospinal tract (CST), causing motor paralysis. Accurate prognosis biomarkers are needed to plan effective rehabilitation. This study aims to quantify brain-spinal connections supporting voluntary movement using simultaneous brain-spinal fMRI and diffusion MRI. We examined nine stroke patients to assess structural and functional changes. Results showed CST damage and altered brain and spinal cord activity during hand movement. These methods may help predict recovery and develop better rehab strategies.

Keywords: Stroke, Corticospinal tract (CST), Motor recovery, Functional MRI (fMRI), Diffusion MRI (dMRI), Prognostic biomarker, Voluntary movement, Brain-spinal connectivity, Rehabilitation, Tractography

Introduction

Stroke, caused by either rupture or occlusion of cerebral blood vessels, affects approximately one million people annually in Japan. Many stroke survivors suffer from motor paralysis due to damage to the corticospinal tract (CST), a major descending pathway connecting the motor and somatosensory related areas to the spinal cord. Accurate prognosis of motor function recovery is essential for planning effective rehabilitation. While studies using brain magnetic resonance imaging (MRI) have revealed structural (Stinear et al. 2007) and functional (Grefkes and Ward 2014) differences in CST between patients who recover and those who do not, MRI alone is insufficient for precise prognosis. The combination of brain and spinal assessments based on

electrophysiological measures, has been used to improve predictive accuracy. However, there remains a need for fast and practical biomarkers that can be used in clinical settings. Therefore, establishing an imaging method that includes both brain and spinal cord evaluation may provide more accurate and accessible prognostic indicators.

This study aims to develop and validate imaging techniques to visualize and quantify the brain-spinal connections that support voluntary motor recovery after stroke. Specifically, we sought to identify brain-spinal pathways and functional reorganization using simultaneous brain-spinal MRI.

Methods

Experiments were conducted on nine stroke patients

(3 females; age: 57.56 ± 14.43 years; height: 1.65 ± 0.1 m; weight: 63.71 ± 18.31 kg; mean $\pm$ standard deviation). The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and written informed consent was obtained from all participants prior to enrollment. The study protocol was approved by the ethics committees of the Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science and Chiba Rehabilitation Center.

MRI data were acquired using a 3T MAGNETOM Skyra scanner (Siemens Healthcare GmbH, Erlangen, Germany) with a 20-channel head coil. Structural T1-weighted and T2-weighted images were obtained, along with FLAIR images to identify lesion locations.

To quantitatively assess residual descending pathways, diffusion-weighted images (DWI) were acquired. Streamlines representing crossed corticospinal tracts (CSTs) were reconstructed bilaterally from the dorsolateral funiculus at the C1 level to the contralateral primary motor cortex (M1) passing through pons and cerebral peduncles.

Task-related brain activity was recorded using whole-brain-to-C7 functional MRI (fMRI) with multiband GE-EPI acquisition (Moeller et al., 2009) at 1.6-second intervals. Before scanning, maximum grip strength of both hands was measured in the supine position. During scanning, participants performed handgrip tasks using the instructed hand in alternating 16-second task and rest blocks. During task blocks, participants generated grip force at 50% of their maximum, paced at 0.625 Hz according to on-screen cues.

Results

Figure 1 presents a representative case. A lesion was identified in the posterior limb of the internal capsule in the right hemisphere (Figure 1).

Diffusion MRI tractography visualized CST streamlines originating from M1 in both hemispheres (Figure 1A). While 4,134 streamlines were detected on the intact side, only 29 were found on the lesioned side. Some streamlines passed through intact portions of the posterior limb of the internal capsule (Figure 1B).

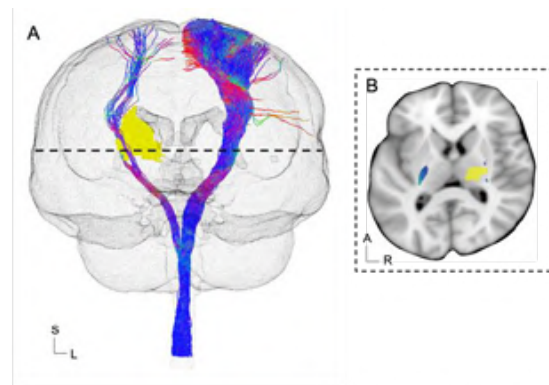


Figure 1. Streamlines of the crossed corticospinal tract (CST) from healthy and injured hemisphere. The streamlines of the CST connecting the contralateral dorsolateral funiculus from the primary motor cortex of the Healthy (left) and injured (right) hemisphere in a stroke patient were shown in three dimensions (A). The transverse section at the level of the internal capsule (black dot line) was shown on the right side. The yellow volume means injured area. A stands for anterior, L for Left, R for Right, S for Superior.

fMRI analysis during handgrip revealed significant activation in M1, premotor cortex (PM), and primary somatosensory cortex (S1) on the intact side when the non-paretic right hand was used (Figure 2). At the spinal level, significant activation was observed around the C6 segment. In contrast, when the paretic left hand was used, significant activation appeared in both the contralateral (right) and ipsilateral (left) M1, PM, and S1. No spinal activation was detected during this condition (Figure 2).

Discussion

Voluntary motor control in humans is governed by the corticospinal tract (CST), which projects from the cortex to the contralateral spinal cord. The number of streamlines from the lesioned M1 was less than 1% of that from the intact side, suggesting that most motor pathways from the affected hemisphere to the spinal cord were disrupted (Figure 1).

Significant activation in both the contralateral cortex and spinal cord was observed during movement of the non-paretic hand, while movement of the paretic hand activated both hemispheres cortically but did not elicit significant spinal activity (Figure 2).

These structural and functional results indicate that CST damage impairs the transmission of motor commands to the spinal cord, leading to motor paralysis.

This study established a method for quantitatively assessing residual neural pathways and activity

supporting voluntary motor control in stroke patients using structural and functional MRI. Future work will include acquiring data from additional patients and healthy controls, aiming to support prognosis prediction and the development of new rehabilitation strategies.

Acknowledgements

This study was supported by the 30th Magnetic Research Grant from the Watanabe Foundation. We express our sincere gratitude for their support.

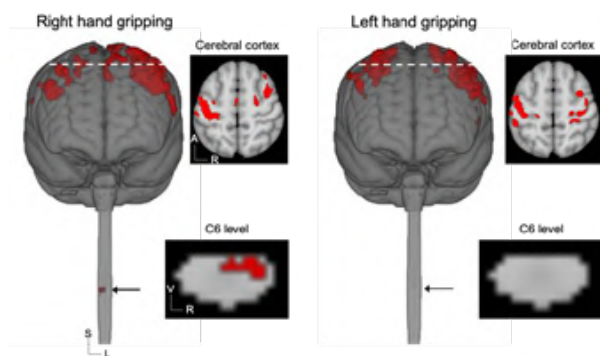


Figure 2: Cortical and spinal cord activity during task performance in the left and right hands. Cortical (cluster-level $p_{FWE} < 0.05$ with a height threshold $p_{uncorr.} < 0.001$) and spinal cord activity (cluster-level $p_{FWE} < 0.05$ with a height threshold $p_{uncorr.} < 0.005$). Statistically significant active areas were shown in red colored. A stands for anterior, L for Left, R for Right, S for Superior, and V for Ventral.

Reference

- (1) Stinear, C.M., Barber, P.A., Smale, P.R., Coxon, J.P., Fleming, M.K., Byblow, W.D., 2007. Functional potential in chronic stroke patients depends on corticospinal tract integrity. *Brain* 130, 170–180.
- (2) Grefkes, C., Ward, N.S., 2014. Cortical reorganization after stroke: how much and how functional? *Neuroscientist* 20, 56–70.
- (3) Moeller, S., Yacoub, E., Olman, C.A., Auerbach, E., Strupp, J., Harel, N., Uğurbil, K., 2010. Multiband multislice GE-EPI at 7 tesla, with 16-fold acceleration using partial parallel imaging with application to high spatial and temporal whole-brain fMRI. *Magn. Reson. Med.* 63, 1144–1153.

Development of Advanced Neuromodulation for Treatment-Resistant Schizophrenia

Shinichiro Nakajima, M.D., Ph.D.

Department of Neuropsychiatry, Keio University, School of Medicine

35 Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo 160-8582, Japan

Abstract

This study aimed to develop neuromodulation for treatment-resistant schizophrenia (TRS) by conducting two foundational studies. A data-driven Bayesian model was applied to structural MRI data to classify subtypes and identify disease progression patterns. TRS patients exhibited more advanced morphological changes, suggesting a progressive subtype. Moreover, analysis of cortical structural covariance in psychosis risk and schizophrenia revealed associations between cortical thickness covariance and both psychosis onset and treatment response. Identified hub regions in cortical covariance networks may serve as candidates for stimulation targets in neuromodulation to aid prediction and therapeutic intervention.

Keywords

Schizophrenia, MRI, Machine Learning, Structural Covariance, Psychosis Risk, Treatment Response

1. Purpose

Study 1: Treatment-resistant schizophrenia (TRS) severely impairs patients' quality of life and social functioning, imposing a significant burden on healthcare systems. Given TRS's poor response to standard antipsychotics, distinct pathophysiological mechanisms are suspected. This study aimed to uncover brain morphological progression patterns using data-driven MRI analysis, identifying potential neurobiological

markers.

Study 2: Approximately 20% of individuals with an At-Risk Mental State (ARMS) develop psychosis. This study aimed to identify cortical structural covariance networks associated with psychosis onset and treatment response.

2. Method

Study 1: We used MRI data from 191 patients with schizophrenia (66 TRS, 125 non-TRS) and 191 healthy controls,

collected across multiple sites in Canada and Japan. A Bayesian inference model, Sustain (Subtype and Stage Inference), was applied to cortical thickness, surface area, and subcortical volume data processed via FreeSurfer.

Study 2: Structural MRI data from over 300 participants (HC, ARMS, and SZ) were analyzed using FreeSurfer to extract cortical metrics from 68 regions. Structural covariance matrices were computed for each group, and similar analyses were performed on Study 1 data.

3. Results

Study 1: Sustain analysis revealed three distinct progression patterns in schizophrenia: a cortex-dominant type (frontotemporal atrophy), a subcortical-dominant type (basal ganglia atrophy), and a diffuse type (widespread cortical surface area reduction). TRS patients showed significantly more advanced progression stages, especially in the subcortical and diffuse types.

Study 2: ARMS subjects showed increased cortical thickness covariance across widespread regions compared to both HC and SZ groups. Network connectivity was especially elevated in frontal and temporal lobes. Individuals who later transitioned to psychosis showed stronger covariance. Treatment responders displayed more integrated and efficient networks, while non-responders showed decreased connectivity and network efficiency. SCN scores were positively correlated with clinical improvement.

4. Discussion

Study 1: Our findings support that TRS represents a more advanced and biologically distinct subtype of schizophrenia. Sustain enabled precise classification beyond traditional diagnostics, potentially aiding future MRI-based stratification and intervention planning.

Study 2: Elevated structural covariance in ARMS may serve as a biomarker for early psychosis risk and intervention. This is among the first studies to link SCNs with antipsychotic treatment response, suggesting a novel predictive marker.

This project, officially approved as a specified clinical trial, was initially planned to test a QPS-based rTMS protocol for TRS. However, prior to clinical implementation, the team conducted a series of structural imaging studies to verify the validity of stimulation targets. These analyses highlighted hub regions such as the anterior cingulate cortex (ACC), frontopolar cortex (FP), and insula. Future clinical application will involve deep stimulation using coils developed by the Sekino Laboratory at the University of Tokyo. This represents a pioneering effort toward neuromodulation grounded in pathophysiology, potentially transforming intervention strategies for psychiatric disorders.

References

Sone D, Young A, Shinagawa S, et al. Disease Progression Patterns of Brain Morphology in Schizophrenia: More Progressed Stages in Treatment Resistance. *Schizophr Bull.* 2023; sbad164.

The Subjects for the 2024 Research Grants

Here are the subjects (4 Basic Researches, 5 Application Researches, 7 Specific Researches) that the 2024 Research Grants are subsidized.

I. Basic Research

- I -1. Diffusion-weighted imaging of adipocyte microstructure
Institute of Science Tokyo Associate Professor/Madoka Ogawa
- I -2. Development of a Brain Tumor Treatment System Using Intranasal Administration and Magnetic Drug Delivery for Selective Drug Delivery to Brain Areas
Nagoya-City University Lecturer/Koki Ogawa
- I -3. Elucidation of neural circuits for monitoring and regulation of response inhibition: A multimodal study using TMS and fMRI
Juntendo University Associate Professor/Takahiro Osada
- I -4. Development of a method for characterizing magneto-liposome via the AC Cotton-Mouton effect
Osaka University Assistant Professor/Masayori Suwa

II. Application Research

- II -1. Spatial visualization of brain energy metabolism using hyperpolarized ^{13}C -pyruvate magnetic resonance spectroscopy and its preclinical applications
National Institutes for Quantum Science and Technology Researcher/Maiko Ono
- II -2. Integration of transcranial magnetic stimulation and magnetoencephalography
The University of Tokyo Hospital Lecturer/Yuichiro Shirota
- II -3. Development of novel cancer magnetic thermochemotherapy using magnetized mesenchymal stem cells
Laboratory of Pharmaceutics, Kobe Pharmaceutical University Associate Professor/Yusuke Kono
- II -4. Disk-shaped nanoparticles as ^{19}F MRI contrast agent
Center for Future Innovation, Graduate School of Engineering, Osaka University Assistant Professor/Tomoya Yamamoto
- II -5. Development of Artificial Genes for Magnetic Diagnosis and Therapy
Faculty of Medicine, Hokkaido University Associate Professor/Yasuhito Onodera

III. Specific Research

- III -1. Innovative treatment for cisplatin-induced hearing loss using magnetic guidance technology
Otolaryngology-Head and Neck surgery, Kitasato University Associate Professor/Takaomi Kurioka
- III -2. Diffusion Tensor Imaging Research on Schizophrenia
Department of Neuropsychiatry, the University of Tokyo Hospital Assistant Professor/Daisuke Koshiyama
- III -3. Investigation of the mechanism of chronic pain relief by alternating magnetic fields.
Laboratory of Systems Pharmacology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Teikyo University
Professor/Masahiro Ohsawa
- III -4. Effects of transcranial static magnetic stimulation on unilateral spatial neglect after stroke
Graduate School of Biomedical and Health Sciences, Hiroshima University Assistant Professor/
Amiri Matsumoto
- III -5. A multimodal study for a comprehensive understanding of plasticity in the corticoreticular tract
Graduate School of Arts and Sciences, Department of Life Sciences, The University of Tokyo Ph.D student/Keiichi Ishikawa
- III -6. Elucidation of the effects of repetitive peripheral magnetic stimulation on the central nervous system and its underlying mechanisms
Yamagata Prefectural University of Health Sciences Professor/Mitsuhiro Nito
- III -7. Development of a non-invasive brain stimulation method combining auditory and magnetic stimulation to induce neuroplastic changes in auditory-motor coupling.
Graduate School of Media and Governance, Keio University Second-year doctoral student (Ph.D. program)/Shizuka Sata

Note: Affiliations above are at the time of the grants were subsidized.

THE REPORT OF STUDY RESULT BY SUBSIDY
助 成 研 究 成 果 報 告 書
第30回

発 行 日	令和7年10月1日
発 行 所	公益財団法人 渡邊財団 福岡県福岡市中央区天神1-13-17 TEL 092-724-3605 FAX 092-724-3690
印 刷	三栄印刷株式会社

より明瞭なカラーデータの図表をご希望の方はサイト(<https://watanabe-zaidan.or.jp/>)に掲載しておりますのでご覧下さい。



この印刷物は、環境に配慮した
ベジタブルインクを使用しています。