

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 23 日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K12143

研究課題名(和文) 分光学的手法とインフォマティクスを利用した網羅的神経解剖学の創成

研究課題名(英文) Comprehensive neuroanatomy by using non-staining imaging and informatics

研究代表者

岡 浩太郎 (Kotaro, Oka)

慶應義塾大学・理工学部(矢上)・教授

研究者番号：10276412

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：脳領域を客合理的に分類する新規手法を開発した。ラマン分光によるスペクトル計測を脳標本で行うことより、ピクセル毎にスペクトル情報を得る。このスペクトル情報を利用して、スペクトルが似た領域を抽出し、マッピングした。この結果、神経線維をラッピングしているミエリンや、セロトニン、ドーパミン、グルタミン酸含有細胞を非染色で検出することができた。また脳領域境界を合理的に決定する方法として、核位置を利用したボロノイ分割を試みた。その結果、鳥脳のコロナルセクション全体をボロノイユニットに分割することができた。この分割法と非染色イメージングを併用することにより、脳ドラフトマップを高速に作成することが可能となる。

研究成果の概要(英文)：We have developed a new method to classify brain regions rationally. We obtain Raman spectral information for each pixel on the brain slices of songbirds. Using this spectral information, regions with similar spectra were extracted and mapped. As a result, myelin wrapped nerve fibers and several neurons with neurotransmitters (serotonin, dopamine and glutamate) could be detected without staining. As a method to rationally determine the brain region boundary, we attempted Voronoi division using nuclear position. As a result, we succeeded to divide the entire coronal section of the bird's brain into Voronoi units. By using this division method together with unstained imaging, it is possible to construct a brain draft map at high speed.

研究分野：システム生物学・神経科学

キーワード：生体生命情報学 生物物理 神経科学 細胞・組織 可視化

1. 研究開始当初の背景

我々はキンカチョウさえずりとオス鳥・メス鳥間のコミュニケーションを調べるために、詳細な行動評価方法と電気生理学的手法を利用して調べてきた (Iwasaki et al. PloS One, 2013, 2014)。また最近では「キンカチョウのメス鳥はどのようにオス鳥のさえずりを評価しているのか？」について、鳥海馬領域を中心として、分子生物学的および電気生理学的手法を併用して調べている (Yamashita et al. 投稿準備中)。このような鳥脳の研究を進めるに際し、神経解剖学的な知見の重要性が明らかになってきた。オスキカチョウ脳に関しては詳細の脳地図が公開されており、脳部位の特定などに非常に役立っている。一方でメス鳥に関してはこのような詳細な地図は報告されていない。詳細な脳地図を作成するには、例えば神経細胞形態の詳細を調べるのは煩雑であり、また領野の分類は恣意的である。例えばハト脳海馬領域については現在までに4つの異なる分類が示されていて混乱がある。

最近になって我々はラマン分光法を利用してホヤ発生過程を非染色標本から系統だてて調べることに成功し (Nakamura et al. PloS One, 2014)。この細胞分類は、我々が以前作製した3次元細胞系譜図 (Nakamura et al. Dev. Biol. 2013) と良く対応していることを見いだした。このような先行研究から、細胞構築や脳地図が明らかにされていない脳標本について、非染色でかつ簡便さらに経験によらないで脳領域を特定する情報科学を援用した手法を開発する考えに至った。

2. 研究の目的

脳領域を客観的な基準で分類する新規手法を提案する。これは脳内のシナプス接続を網羅的に調べるコネクトーム研究と相補的な役割を持つ、新たな神経解剖学的手法となる。ラマン分光計測を脳標本で行うことにより、ピクセル毎にスペクトル情報を得る。得られたスペクトル情報を利用して、ケモインフォマティクス的手法を利用してスペクトルが似た領域を抽出し、マッピングする。これにより、簡便かつ客観的に脳の領域を抽出する。オスキカチョウ脳にこの手法を適用し、まず小脳での脳領域分けを例題として行い、最終的には脳地図が現在知られていない、メスキカチョウ脳の脳地図を作成する。分類された個々の領域について従来の神経解剖学的手法により詳細に調べる。最終的には脳地図を作成し、データベースとして公開する。

3. 研究の方法

- (1) ラマン分光法により明瞭かつシャープなスペクトルを取得する方法を確立する。
- (2) 脳領域を適切に分類するためのスペクトル分類法を確立する。
- (3) マルチカラーゴルジ法を利用することにより、上記手法で分類された脳領域の抽出が

適切であることを検証する。併せて脳領域間の神経接続についてデータを取得する。

(4) 神経活動を細胞レベルで可視化する catFISH 法を用いて、感覚情報処理に用いられている脳領域を探索し、得られている脳領域地図と重ねることにより、脳機能地図と神経機能とを関係づける。

(5) メス鳥の脳領域についてデータベースを作成し、これを広く公開する。

これらのうち、特に研究進捗が著しかった (1), (2), (5) の項目を中心に報告する。

4. 研究成果

(1) ミエリンおよび種々の神経伝達物質のラマンスペクトルによる非染色同定法の確立

まずキンカチョウ脳切片からラマンスペクトルを取得後、同一切片に対し、ミエリン染色およびセロトニン作動性神経、ドーパミン作動性神経、GABA 作動性神経検出のための蛍光免疫染色を行った。スペクトル解析では教師なしクラスタリング分析として主成分分析、独立成分分析、教師あり学習では、サポートベクターマシン、決定木、ニューラルネットワーク等を用いた。その後スペクトル情報から組織・細胞構築の調査が可能であるかを検討した。その結果、以下のような結論を得た。

ミエリン スペクトルを取得後、主成分分析を行い、PC1 と PC2 のスコアをプロットした。k means 法を用いて3群にクラスタリングし、それぞれのクラスターごとに色分けしたところ、ミエリン染色で染まる領域をスペクトル情報だけで抽出できた (図1)。

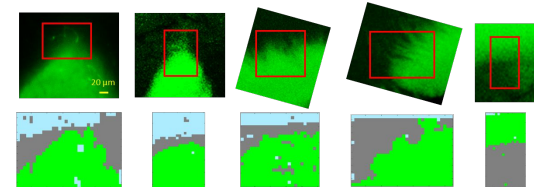


図1 ラマンスペクトルを用いたミエリンの可視化

緑色で示している領域はミエリンが存在する領域である。灰色で示している領域はミエリンが存在するかないか判別不能な領域、水色の領域はミエリンが存在しない領域もしくはノイズである。

異なる神経伝達物質を持つ3種類の神経細胞の自動識別 3種の神経細胞に対し、主成分分析を行った。蛍光輝度と主成分スコアで散布図を作成したところ、セロトニン作動性神経とドーパミン作動性神経は PC1、GABA 作動性神経は PC4 で相関は高かった。また、教師あり学習を行ったところ、セロトニン作動性神経とドーパミン作動性神経では 85%以上、GABA 作動性神経においては約 65%の精度で識別できた (図2)。GABA 作動性神経の精度が多種の神経細胞より精度が低い理由として GABA 濃度が低いことが考えられる。セロトニ

ンやドーパミンでは 100 μ M で検出することができのに対し、GABA のスペクトルは 0.5 M よりも高濃度でないと検出できないスペクトルのピークが存在した。このことが GABA の検出を困難にしているものと考えられる。

A			B			C		
5-HT	20	0	TH	163	19	GABA	34	0
positive	(100%)	(0%)	positive	(90%)	(10%)	positive	(100%)	(0%)
5-HT	4	17	TH	36	143	GABA	129	198
negative	(19%)	(81%)	negative	(20%)	(80%)	negative	(39%)	(61%)
5-HT	5-HT		TH	TH		GABA	GABA	
positive	negative		positive	negative		positive	negative	
予測のクラス			予測のクラス			予測のクラス		

図 2 教師あり学習を用いた種々神経細胞の識別

(A) セロトニン作動性神経はサポートベクターマシンを用いて識別した。学習データとしてスペクトル波形を利用した。(B)(C) ドーパミン作動性神経と GABA 作動性神経は決定木を用いて識別した。学習データとして主成分分析のスコアを利用した。

(2) データベース作成のための簡便な脳地図作成法の検討

脳には解剖学的に異なり、固有の機能を持つ多くの脳領域がある。脳領域を可視化した脳地図は、脳研究において重要な役割を担う。キンカチョウでは、メスでは脳地図はなく、またオス脳地図においては脳領域境界を決める客観的な指標はない。本研究では蛍光色素を用いた多重組織染色により、神経構築を可視化する。さらにポロノイ分割を適用することで脳画像を細分化し、脳領域を定量的に決める情報論的手法を開発し、合理的な脳地図作成法を提案する。

キンカチョウの全脳を 200 枚以上の脳切片にし、細胞核、髄鞘(ミエリン)、神経細胞の細胞体(ニッスル)を、3 種類の蛍光色素を用いて染色・観察した。さらに得られた画像から細胞核の座標を決定し、それらを母点としてポロノイ分割を行った。各ポロノイポリゴンにミエリン、ニッスルの輝度値を付与し、それに基づいて脳領域に分割した。

重心座標(母点)の配列を基にポロノイ分割を適用し、個々のポロノイポリゴンを構成するポロノイ点の座標を算出した。さらに得られたポロノイ点座標情報から切片画像上でポロノイポリゴンを形成しラベリングした。このとき元の切片の概形の外側にポロノイ点が存在するポリゴンは全て削除した。さらに、ポロノイポリゴンの領域とニッスル、ミエリン画像の重ね合わせを行うことで、各ポリゴン内の輝度値を抽出し対応付けた。また、形成されるポロノイポリゴンのピクセル数を算出し、同様に特徴付けた。切片全体にポロノイ分割を適用し、分けられた領域にランダムに色を割り当てた(図 3)。

ポロノイ分割をおこなった際は、最も外側に存在する母点から元の切片の概形から大きく逸脱したポリゴンが形成される。しかし、

本実験におけるポリゴンの用途には適さないため、本来切片が存在しない領域に頂点が存在するポリゴンは全て除いた。そのため、最も外側に位置する細胞核は領域を持たず実験結果に含まれないが、切片全体のポリゴン数は膨大であり、脳領域に属するポリゴンはほとんど含まれないため、大きな影響はないと考えた。

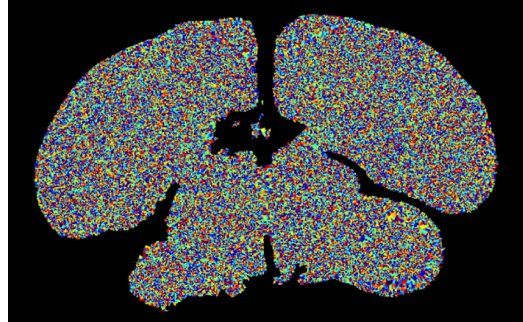


図 3 ポロノイ分割により 81,034 個のポリゴンに分割した切片画像

各ポリゴンの色はランダムに設定されている

キンカチョウ 7 個体(オス 3 羽,メス 4 羽)について、多重組織染色を行い、核を母点としてポロノイ分割を行い、切片を数万のポリゴンに細分化した(図 4)。さらに各ポリゴン内のミエリンとニッスル染色の蛍光平均輝度間の相関に近似直線による k 平均法を適用し、個別脳領域を抽出した(図 4)。また、線形判別法を用いて相関のクラスタリング結果を学習させ、連続脳切片において、同じ脳領域の安定した抽出を可能にした。

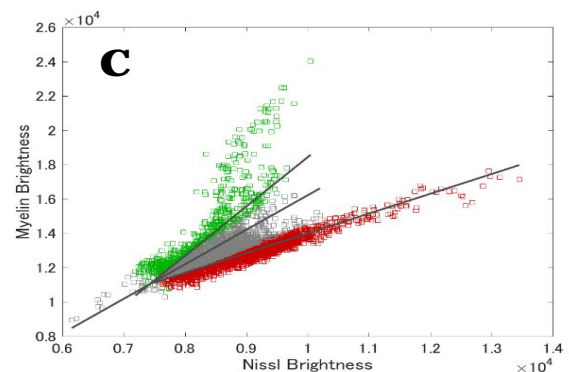
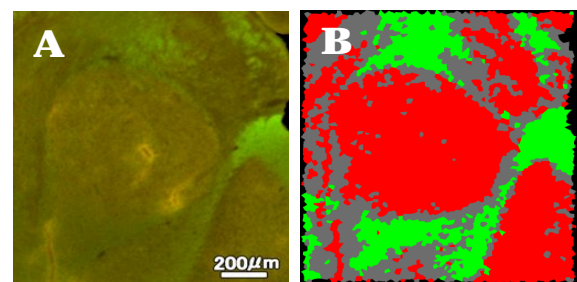


図 4 輝度値相関による脳領域抽出

A: ニッスル(赤)・ミエリン(緑)の蛍光画像

B: 自動抽出した脳領域

C: 輝度値相関とクラスタ

以上のことから、ポロノイ分割による脳切片の細分化手法を用いてキンカチョウ脳地図を作成することに成功した。また、細胞核間の垂直二等分線を境界とすることで、ポロノイ分割を行い、合理的な方法で再現性良く脳領域を見出す新規な手法の開発に成功した。これにより、従来困難であった、脳領域の分割を合理的に行うことができるようになった。この手法は普遍的に脳地図を作ることに利用できる。例えば個々のポロノイ分割されたユニットにそれぞれの面積の逆数（つまりこれは細胞密度に対応する）を当てはめることにより、細胞密度に応じた領域わけを行うことも可能になる。

ここで述べた方法は、合理的な脳地図作成を行うための要素技術となる。特に鳥に拘ることなく、無染色な脳標本において、まずは広範にラマンスペクトルを取得し、そのスペクトル情報から、例えば神経投射（ミエリンの可視化）や特定の神経伝達物質を有している神経細胞を含む領域を抗体染色することなく抽出することが可能となる。またラマンスペクトルを取得後、同じ標本に対して核染色を行い、脳をポロノイ分割する。個々のポロノイユニットにラマンスペクトルから得られた情報を加えることで、脳ドラフトマップを高速に作成することが可能となる。

また一方で、本研究で提示した方法は、ラマン分光法だけでなく、様々な分光法に対して利用することが可能となり、「何を見るか決めてまず染色してから調べる研究(Bio-imaging with targets)」から「何を見るかを決めないで、得られた空間パターンから探索的に行う研究(Bio-imaging without targets)」の提案となっている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 8 件)

岡浩太郎, ラマン分光等イメージング技術で紐解く生命現象と情報伝達過程, 第 54 回日本生物物理学会年会, 2016 年 11 月 26 日, つくば国際会議場(茨城県・つくば市)(招待講演)

Oka K, Bio-imaging without targets: an idea for making the draft map of the brain, NSF-AMED Workshop: Comparative Principles of Brain Architecture and Functions, November 17, 2016, San Diego (USA) (招待講演)

Tabata R, Inda M, Hotta K, Oka K, Relationship between song acoustic similarity and neural activity in female zebra finches, November 13, 2016, Neuroscience 2016, San Diego (USA)

Inda M, Tabat R, Hotta K, Oka K, Auditory

neural activity in zebra finch forebrain depends on acoustic structures of syllables, November 13, 2016, Neuroscience 2016, San Diego (USA)

Tabata R, Inda M, Hotta K, Oka K, Neural activity is increased during pair song over non-pair song in female zebra finch, 2016 年 7 月 22 日, 第 39 回日本神経科学大会, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

Inda M, Tabata R, Hotta K, Oka K, Analysis of Neural Activities to Synthetic Acoustic Stimuli in the Avian Higher-order Auditory Region, 2016 年 7 月 21 日, 第 39 回日本神経科学大会, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

Tabata R, Hotta K, Oka K, Song preference measured by behaviors depends on song similarity in female zebra finch, October 17, 2015, Neuroscience 2015, Chicago (USA)

Tabata R, Hotta K, Oka K, Relationship between directed song similarity and behavior in female zebra finches, 2015 年 7 月 28 日, 第 38 回日本神経科学大会, 神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡 浩太郎 (OKA, Kotaro)

慶應義塾大学・理工学部・教授

研究者番号: 10276412