

令和 6 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2023

課題番号：19H04203

研究課題名（和文）ニューロピル時空間動態のモデリングと自動細胞検出器の性能向上

研究課題名（英文）Modeling of spatio-temporal dynamics of neuropil signals and its application to automatic cell detectors

研究代表者

青西 亨（Aonishi, Toru）

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・教授

研究者番号：00333352

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,100,000円

研究成果の概要（和文）：我々は、世界最大・最速の広視野2光子顕微鏡（FASHIO-2PM）を開発した（Ota et al. Neuron 2021）。この開発研究において青西は、FASHIO-2PMで取得される巨大イメージングデータから高速に細胞を自動検出する低計算コスト細胞検出アルゴリズムLCCDの開発を担当した。感覚野、運動野、高次野を含む15脳領域（3 x 3 mm²）から16000細胞の活動を、高精度で高速に自動検出することに成功した（Ito et al. Neurosci. Res. 2022）。細胞検出性能を向上させるため、ニューロピル信号に相当する蛍光信号を求め、これを元信号より削除している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々が開発した広視野2光子顕微鏡FASHIO-2PMにより、複数の脳領域をまたぐ数万の神経活動を観測することが可能となった。また、この顕微鏡と同時に開発した高速自動細胞検出アルゴリズムLCCDにより、膨大な細胞の正確な活動系列の自動抽出を実現し、これら活動系列の統計的解析が可能となった。本研究で開発したこれら計測技術により、これまででない脳領域をまたぐ広域の数万規模の神経活動の解析が可能となった。これにより、これまで観察されてこなかった脳領域をまたぐハブ細胞ネットワークという新しい生命現象を可視化することに成功している。したがって、我々が開発した技術は神経科学分野を大きく進展させるものである。

研究成果の概要（英文）：We developed the world's widest-field and fastest two-photon microscope (FASHIO-2PM) (Ota et al. Neuron 2021). In this research project, Aonishi was contributing in developing a low-computational-cost cell detection algorithm, LCCD, which automatically detects cells at high speed from the large-scale imaging data acquired by FASHIO-2PM. We succeeded in automatically detecting the activity of 16,000 cells from 15 brain regions (3mm x 3mm) including sensory, motor, and higher-level areas with high accuracy and high speed (Ito et al. Neurosci. Res. 2022). To improve cell detection performance, the fluorescent signal corresponding to the neuropil signal was detected and deleted from the original signal.

研究分野：データ駆動科学

キーワード：カルシウムイメージング 自動細胞検出 非負値行列因子分解 ニューロピル信号

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

神経科学の分野において、カルシウムイメージングは、神経活動を計測する重要な手法の一つである。カルシウムインジケータや計測装置の急激な進歩により、広視野から多細胞活動を計測することが可能となった。Stirman らは、広視野・二領域二光子システムを開発し、広視野の一領域や離れた二領域から同時に 1000 個の細胞を計測することに成功した¹⁾。Sofroniew らは、ランダムアクセスの手法により、直径 5mm 深さ 1mm の円筒状の 3 次元領域から数十万個の細胞を計測できるシステムを開発した²⁾。理化学研究所脳科学総合研究センターの村山正宜チームリーダーらは、Sofroniew らに比べて高い時間分解能で、3mm x 3mm の領域から数万個の細胞を計測できる超広視野二光子顕微鏡を開発している。このような超広視野多光子励起顕微鏡の出現により、脳皮質の広領域から数万細胞の活動が同時計測可能となった。

このような超広視野光学顕微鏡では、細胞活動と同時にニューロピル活動も計測される。ニューロピルは、神経やグリアの細胞体を取り囲む網状組織であり、樹状突起や軸索、終末部が密に存在し、莫大な数のシナプスで形成されている。ニューロピルの活動は大域的蛍光変化をもたらす、複雑な時空間動態を示す。細胞信号とニューロピル信号は相関しており、その相関は空間的に数百マイクロメートルにも渡る。しかし、現時点では解析が不十分であり、ニューロピル活動の動的特性や、細胞活動に対するニューロピル活動の機能的役割は不明確である。

従来のイメージングデータの解析では、単一細胞の活動に対応する蛍光変化がある領域を研究者が肉眼で見つけ、手動で関心領域 (region of interest, ROI) を設定してきた。前述の超広視野顕微鏡によって取得されるイメージングデータから、研究者が手動で ROI を設定するのは、もはや不可能である。このような背景から、複数の研究グループより、巨大なイメージングデータから細胞を自動検出するための機械学習法が提案されている³⁻⁶⁾。機械学習によりイメージングデータから細胞を自動検出する場合、ニューロピル活動はバックグラウンドの大域的蛍光変化をもたらす、細胞検出を妨げる主要因となる。加えて、細胞信号とニューロピル信号は相関しており、統計的独立性を利用してこれらを分離するのは困難である。近年、細胞検出器にニューロピル動態の簡単なモデルを組み込みこんだ Suite2P と呼ばれる手法が提案され³⁾、細胞検出性能の向上が報告されている⁸⁾。ニューロピル活動を考慮する重要性が、イメージング解析のコミュニティで認知されつつある。

2. 研究の目的

ニューロピル活動の大域的時空間動態を解析した研究報告は、その存在を申請者は知らない。本研究により皮質の大域的動態特性を明らかにし、この大域的活動と細胞活動との関連を明確にした研究は存在しない。また、ニューロピルを考慮した自動細胞検出器は、近年提案されたばかりである³⁾。この先行研究では、とても単純なモデルを検出器に用いており、その妥当性は不明確である。本研究でのニューロピル動態の詳細な解析により、より妥当なモデルを構成し、細胞検出器の性能を大幅に向上できる可能性がある。本研究の目的は、以下の3つである。(1) 大域的かつ複雑なニューロピル時空間動態を低自由度縮約してモデリングし、その動的特性を明らかにすること。(2) ニューロピル動態を低自由度縮約して、細胞活動との関係性を明確にすること。(3) (1)に基づくニューロピル動態モデルを自動細胞検出器に組み込み、その性能を向上させること。

3. 研究の方法

当初の研究計画を変更し、広視野2光子顕微鏡 FASHIO-2PM の開発と足並みを揃えるため、FASHIO-2PM で取得される巨大イメージングデータから高速に細胞を自動検出する低計算コスト細胞検出アルゴリズム LCCD の開発に注力する。細胞検出性能を向上させるため、ニューロピル信号に相当する蛍光時間変化を求め、これを元信号より削除する方法を試みる。

また、大域的かつ複雑なニューロピル時空間動態の動的特性を明らかにするため、細胞検出の目的で用いられてきた非負値行列因子分解をこの目的で活用する。神経細胞やニューロピルの活動を含むイメージングデータを、非負値行列因子分解により小さい階数の空間因子行列と時間因子行列の積に分解する。そして、このように低次元に圧縮してもニューロピル信号が再構成できるかを確認し、その動態の潜在空間を調べる。

4. 研究成果

(1) 広視野 2 光子顕微鏡 FASHIO-2PM : これまでの神経科学分野における顕微鏡の開発の目的は、高倍率・高開口数な対物レンズを基盤とした微細構造観察の実現にあった。しかし近年、2010 年の後半から様々な研究室から、中・長距離間にある脳領域の相互作用により、脳機能が発現することが見出されてきた。知覚や認知や意思決定などを担う大脳新皮質は、これまで、異なる情

報を個別に処理する局所回路の集合体と考えられてきたが、今、この概念の再構築が求められている。高次脳機能を解明するためには、超高解像度観察だけではなく、超広域観察も必須だと認識されるようになってきた。こうした背景を基に、当研究グループでは、世界最大・最速の広視野2光子顕微鏡 FASHIO-2PM の開発に着手し、これに成功している。この顕微鏡は従来の顕微鏡に比べ36倍の視野でありながら、単一神経細胞の解像度がある。また、7.5Hz のフレームレートで撮像が可能であるため、即時的な神経細胞の活動を捉えることが可能である。これまでの顕微鏡では、マウスのような小さい脳を用いたとしても、ある脳領域の一部分(0.5 x 0.5 mm²)しか観察できなかったが、FASHIO-2PM の顕微鏡を用いれば、様々な感覚野、運動野、高次野を含む15脳領域(3 x 3 mm²)から16000個の神経活動を同時に記録することが可能になった。この記録数と速度は世界最大・最速である。この研究において青西は、FASHIO-2PM で取得される巨大イメージングデータから高速に細胞を自動検出する低計算コスト細胞検出アルゴリズム LCCD の開発を担当し、図1に示す細胞ごとの ROI 検出を実現した。また、LCCD で ROI 検出した後に、ROI 周辺のピクセルを検出してニューロピル信号を抽出し、細胞信号からニューロピル信号を除去する補正を実現している。LCCD とニューロピル信号除去により、膨大な細胞の正確な活動系列の自動抽出を実現し、これら活動系列の統計的解析を実施して、広域な機能的ネットワークを可視化した。この研究成果の論文は国際学術論文誌 *Neuron* (DOI: 10.1016/j.neuron.2021.03.032) に掲載された。

(2) 低計算コスト細胞検出アルゴリズム(LCCD)の性能評価とプログラム公開:
 (1)の研究課題で開発した低計算コスト細胞検出アルゴリズム(LCCD)の詳細な性能評価を実施し、有効性を示した。カルシウムイメージングの実データによる LCCD とその他手法の性能の比較評価を実施すると同時に、人工データを用いた性能評価も実施した。この比較評価で用いる人工データは、東京大学大学院医学系研究科神経科学分野の太田助教と共に作成した。人工データの細胞の大きさ、蛍光時間変化の時定数や発火率は、実験データに沿った値を設定した。SN 比や細胞密度を変えた様々な条件のデータを作成し、提案手法の細胞検出の精度を評価した。LCCD は、先行手法である CNMF⁶⁾ や Suite2P³⁾ に匹敵する細胞検出性能を有しており、CNMF や Suite2P では処理できなかった大規模イメージングデータから実用的な時間で細胞検出できることを確認した。また、LCCD は時間分割 統合フレームワークであり、分割フレーム数に依存して細胞検出性能が変化する。広視野2光子顕微鏡 FASHIO-2PM の大規模データを用いて、分割フレーム数と細胞検出性能の関係を評価した。この時間分割に加えて、移動平均フィルターを用いてニューロピル信号に相当する蛍光時間変化を抽出し、これを元信号より削除することにより、細胞検出性能の大幅な向上を実現している。これらの成果を取りまとめて、国際学術論文誌 *Neuroscience Research* (DOI: 10.1016/j.neures.2022.02.008) に発表した。また、我々が開発した LCCD をカルシウムイメージングデータ解析ツール OptiNiSt に組み込み、Github (<https://github.com/oist/optinist>) で公開した。さらに、LCCD とその他一連の自動細胞検出法を比較し本手法の意義を議論した解説論文を、国際学術論文誌 *Neuroscience Research* (DOI: 10.1016/j.neures.2021.12.001) で発表した。

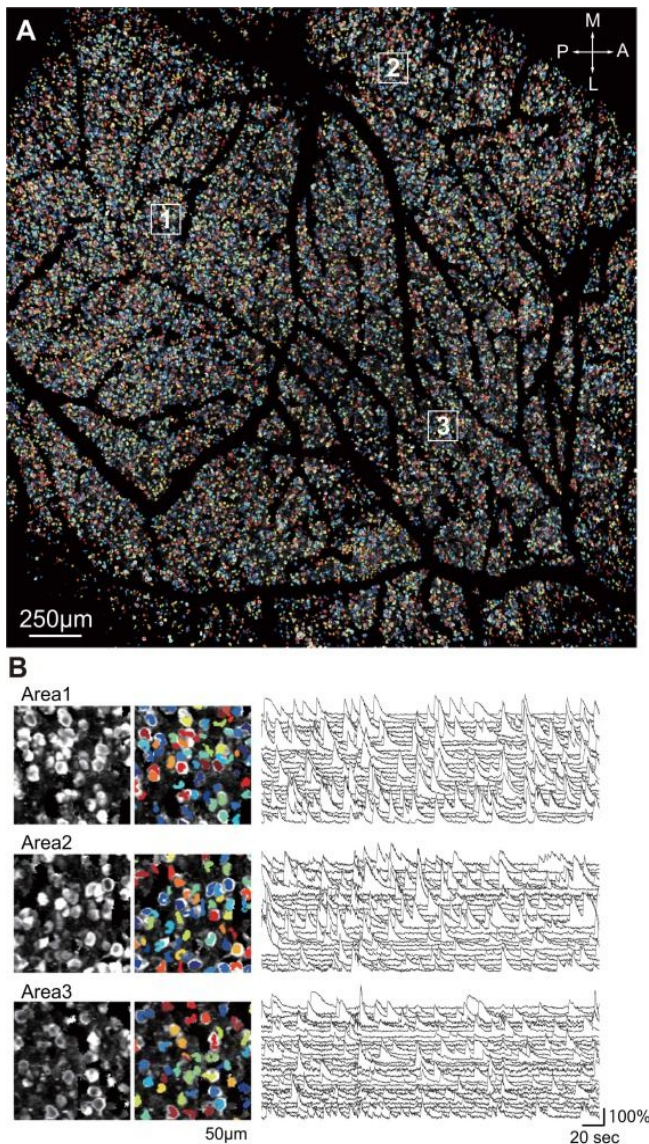
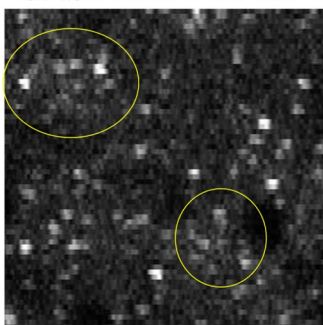


図 1: LCCD による自動細胞検出。(A) SNR ≥ 5 の ROI (2048 x 2048 ピクセル)。ROI の総数は 15,597。各ROI はランダムに色付け。(B) (A) で白いボックスで示された領域の拡大図。ROI なしと ROI あり(左)。血管は黒くマスク。各領域でランダムに選択されたニューロンの蛍光時系列(右)。

(3) イメージングデータ解析手法の他の研究領域への展開：ドーパミン (DA) がグルコース刺激によるインスリン分泌の負の調節因子として機能することが報告されている。ただし、その分子メカニズムは不明である。全反射照明蛍光顕微鏡により初代培養膵島細胞におけるインスリン顆粒エキソサイトーシスを計測し、我々のイメージングデータ解析手法で DA の影響を分析した。この成果は国際学術論文誌 *Diabetes* (DOI:10.2337/db21-0644) に発表した。

(4) 多重解像度非負値行列因子分解：多くの2光子顕微鏡はレーザー走査型であり、試料をレーザー焦点で2光子励起させながらスキャンしている。このスキャンの律速により、2光子顕微鏡は空間解像度と時間解像度を同時に上げることは困難である。このジレンマは他の一般的なオペランドイメージングの多くに共通する問題である。我々は、2光子顕微鏡の時空解像度のジレンマを解

原画像 64x256ピクセル 30Hz



超解像画像 256x256ピクセル 30Hz

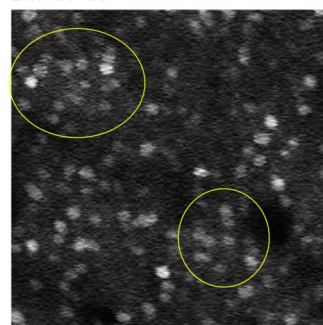


図2: 多重解像度NMFによる超解像の結果

消することを目指す。2光子顕微鏡は、「高空間解像度低フレームレート」と「低空間解像度高フレームレート」の異なるモードでの撮像が可能である。ただし、同一対象の同一活動を、これら解像度が異なるモードで同時に撮像することは不可能である。同一対象の異なる活動を別々に撮像しないと行けない。我々は、多重解像度に拡張した非負値行列因子分解を用いて、解像度が異なる同一対象の異なる活動のデータを融合することにより、「高空間解像度高フレームレート」への超解像を実現している。図2に示すように、256x256ピクセル7.5Hzフレームレートと64x256ピクセル30Hzフレームレートのデータより、256x256ピクセル30Hzフレームレートへ超解像した。黄色の丸で囲んだ部分に注目すると、原画像の低空間解像度データでは細胞の判別が困難であるが、超解像画像データでは細胞の判別が可能である。この規模のデータにおいて、各細胞の活動系列がほぼ全て復元できることも確認している。また、細胞周辺のニューロピル信号も再現できることを目視で確認している。この解析で明らかになったことは、神経細胞やニューロピルの活動を含むイメージングデータが、データサイズと比べて極めて小さい階数の空間因子行列と時間因子行列の積で、高精度に再構成できることである。すなわち、一見複雑に見える細胞ニューロピル動態であるが、その潜在空間は極めて低次元となっていることを示唆している。現在、更に大きなイメージングデータが解析できるように、前処理の工夫とアルゴリズムの改変や数値計算の高効率化に取り組んでいる。また、分解した因子行列の詳細を調査することにより、細胞信号とニューロピル信号の関連を明らかにし、これら動態の潜在空間を調べる。研究は進行中である。

(5) ショウジョウバエ幼虫の神経回路シミュレーション：プレパルス抑制(PPI)とは、先行して微弱な刺激を受けるとその後の刺激に対する驚愕反応が抑制される行動現象である。我々は、ショウジョウバエ幼虫における PPI の神経回路機序を数値シミュレーションによって調査を行った。既に同定されているハエ幼虫の神経回路モデル中の発見的に定められたパラメータを調整することで、同一のモデル、同一のパラメータにより PPI を含む複数の行動実験結果を再現できることを示した。そして、この神経回路モデルを用いて PPI 発生時の各神経細胞の活動度の時間変化を解析することで、先行するプレパルス刺激で誘発された特定の神経細胞の活性が PPI に強く関与している可能性を示唆し、その神経回路機序を示した。さらに、Centaurin gamma 1A 変異体における PPI 減弱の要因を推測し、その妥当性をシミュレーションにより示した。本研究の結果は、ショウジョウバエ幼虫における PPI の回路機序や精神疾患の PPI 障害について有用な知見を与え、今後の PPI 研究の指針の1つを与えるものである。本研究の成果を取りまとめて、この成果は *Scientific Reports* (DOI:10.1038/s41598-022-19210-8) に発表した。

参考文献

- 1) Stirman, J. N. et al. (2016). *Nat Biotechnol.* doi: 10.1038/nbt.3594
- 2) Sofroniew, N. J. et al. (2016). *Elife*, 5. doi: 10.7554/eLife.14472
- 3) Pachitariu, M. et al. (2016). *bioRxiv*. doi: 10.1101/061507
- 4) Mukamel, E. A. et al. (2009). *Neuron*, 63(6), 747-760. doi: 10.1016/j.neuron.2009.08.009
- 5) Maruyama, R. et al. (2014). *Neural Netw*, 55, 11-19. doi: 10.1016/j.neunet.2014.03.007
- 6) Pnevmatikakis, E. A. et al. (2016). *Neuron*. doi: 10.1016/j.neuron.2015.11.037
- 7) Brunton, B. W. et al. (2016). *J. Neurosci Meth*, 258 doi: 10.1016/j.jneumeth.2015.10.010

8) Neurofinder: <https://github.com/codeneuro/neurofinder>

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Uefune Fumiya, Aonishi Toru, Kitaguchi Tetsuya, Takahashi Harumi, Seino Susumu, Sakano Daisuke, Kume Shoen	4. 巻 71
2. 論文標題 Dopamine Negatively Regulates Insulin Secretion Through Activation of D1-D2 Receptor Heteromer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Diabetes	6. 最初と最後の頁 1946 ~ 1961
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2337/db21-0644	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Furuya Kotaro, Katsumata Yuki, Ishibashi Masayuki, Matsumoto Yutaro, Morimoto Takako, Aonishi Toru	4. 巻 12
2. 論文標題 Computational model predicts the neural mechanisms of prepulse inhibition in Drosophila larvae	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 15211
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-19210-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Ito Tsubasa, Ota Keisuke, Ueno Kanako, Oisi Yasuhiro, Matsubara Chie, Kobayashi Kenta, Ohkura Masamichi, Nakai Junichi, Murayama Masanori, Aonishi Toru	4. 巻 179
2. 論文標題 Low computational-cost cell detection method for calcium imaging data	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neuroscience Research	6. 最初と最後の頁 39 ~ 50
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neures.2022.02.008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Aonishi Toru, Maruyama Ryoichi, Ito Tsubasa, Miyakawa Hiroyoshi, Murayama Masanori, Ota Keisuke	4. 巻 179
2. 論文標題 Imaging data analysis using non-negative matrix factorization	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neuroscience Research	6. 最初と最後の頁 51 ~ 56
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neures.2021.12.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Ota K., Oisi Y., Suzuki T., Ikeda M., Ito Y., Ito T., Uwamori H., Kobayashi K., Kobayashi M., Odagawa M., Matsubara C., Kuroiwa Y., Horikoshi M., Matsushita J., Hioki H., Ohkura M., Nakai J., Oizumi M., Miyawaki A., Aonishi Toru, Ode T., Murayama M.	4. 巻 109
2. 論文標題 Fast, cell-resolution, contiguous-wide two-photon imaging to reveal functional network architectures across multi-modal cortical areas	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neuron	6. 最初と最後の頁 1810 ~ 1824.e9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuron.2021.03.032	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 青西亨
2. 発表標題 Low-computational cost cell detection algorithm (LCCD)
3. 学会等名 学術変革領域B ハブ決定剛軟因子 非公開シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 青西亨
2. 発表標題 Imaging data analysis using non-negative matrix factorization
3. 学会等名 文部科学省新学術領域研究「人工知能と脳科学の対照と融合」カルシウムイメージング ワークショップ (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 青西亨
2. 発表標題 情報科学を活用したXAFSイメージング解析
3. 学会等名 第33回日本放射光学会年会・放射光科学合同シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 青西亨
2. 発表標題 非負値行列因子分解によるイメージングデータ解析-システムの同型性にもとづく異分野データへの適用-
3. 学会等名 人工知能学会第3回計測インフォマティクス研究会(招待講演)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

青西亨 研究業績一覧 https://researchmap.jp/read0205366

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------