

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：63801

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19281

研究課題名（和文）誕生日タグづけ法による大規模データを利用した神経細胞群と行動表現型との因果推論

研究課題名（英文）Inference between neuron subsets and their resulting physiological phenotypes using the data obtained by neurogenic tagging

研究代表者

平田 たつみ（Hirata, Tatsumi）

国立遺伝学研究所・遺伝形質研究系・教授

研究者番号：80260587

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：代表者が開発した「誕生日タグづけ法」を用いて取得したデータを情報科学的に解析した。この手法により分類できるマウス神経細胞群の顕微鏡画像データベースNeuroGTを公開している。このデータから3次元脳を構築する方法を考案した。また代表者が作成した教師データを用いて分担者が深層学習を行い、脳の8大領域を特定する画像認識システムを開発した。さらに、NeuroGTに登録された神経細胞群の神経活動を人為的に操作した際に、マウス個体に現れる行動表現型のデータセットを収集し、神経細胞群サブセットとそのアウトプットとしての身体機能との因果関係を推定した。その結果予想された因果関係について現在検証中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

人工知能を用いた大規模データの情報解析は、世界の研究のあり方を大きく変えてしまった。本研究はまさしくその流れに沿ったものであり、多量の独自研究データを情報学的に解析することで、実験的に検証可能な仮説を得たところである。最終的にこの仮説を実験的に検証できれば、学術的のみならず医学的にも意義深い情報に昇華できるのはもちろん、この流れの研究の有効性を示すモデルケースを提示できると考えている。

研究成果の概要（英文）：The data acquired using the “neurogenic tagging method” were analyzed informatically. The NeuroGT database has been open to public to showcase microscopic images of neurons that are classified by the “neurogenic tagging method”. Using the datasets, we devised a method to construct a 3D brain. We also developed a segmentation system that identifies the eight major regions of the mouse brain through deep learning using the teaching data created by the. Furthermore, using the collected data sets of behavioral phenotypes that appear in individual mice when the neural activities of neurogenic tagged neurons are chemogenetically manipulated, we inferred relationships between neuronal subsets and their outputs in terms of physical functions. A relationship hypothesized informatically is currently being verified.

研究分野：神経科学

キーワード：誕生日タグづけ 大規模データ 情報処理 因果推論 脳機能 マウス

1. 研究開始当初の背景

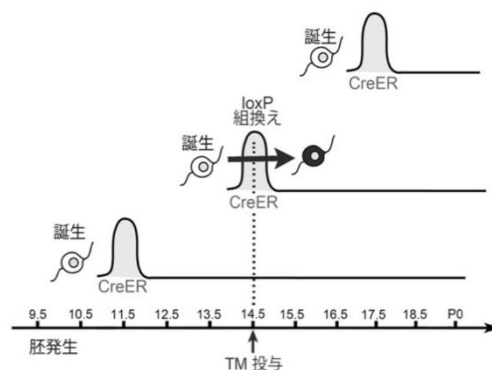
神経科学における重要課題は、脳のどこの領域の神経細胞がどんな生理機能を司るかを知ることである。これまでに多くの神経科学者が試行錯誤的に仮説を立てては検証してきた。本研究では、代表者が開発した神経細胞の分類操作技術「誕生日タグづけ法」を用いて取得した2つの大規模データセットを用いて、情報科学的アプローチにより神経科学の課題に取り組む。いずれも実験動物マウスを用いた侵襲的実験系から得られたもので、世界的に類似のものは存在しないユニークなデータセットである。人間の手による試行錯誤ではなく、情報処理手法を駆使することで、このデータセットから何を引き出せるかに挑戦した。

(1) 誕生日タグづけ法

神経細胞は発生するタイミング、すなわち「誕生日」によって異なる個性をもつことが知られている。代表者が開発した「誕生日タグづけ法」は、マウス個体内で誕生したばかりの神経細胞に遺伝子組換えタグを誘導し、分類した神経細胞に実験操作を加えることを可能にする新規技術である(Hirata *et al.* 2019, 2021)。図1上で説明するように、神経細胞誕生直後に「一過的」にタモキシフェン(TM)依存型 Cre 組換え酵素 (CreER) を発現させる誕生日タグづけマウス系統を作出した。これまでに4系統のマウス系統を樹立しており、それぞれ脳の異なる領域の神経細胞を組換えタグづけできる(図1下)。

これらのマウスに対して、異なる胎生ステージで誕生日タグづけすると、明らかに異なる神経細胞の

集団が標識される(図2)。これはまさしく神経誕生の空間的な波を表しているが、脳機能の局



系統名	使用したエンハンサー	特徴的な組換え領域
G2A	Neurogenin2	新皮質 神経系全般
G1C	Neurogenin1	中脳 後脳 延髄
D1B	NeuroD1	新皮質の一部 辺縁系
D4A	NeuroD4	延髄 末梢神経系

図1 誕生日タグづけの原理と作成したタグづけマウス系統

(上) 神経分化に働く遺伝子の中には、神経細胞誕生直後に「一過的」に発現するものが知られている。そのような遺伝子のエンハンサーを利用して、タモキシフェン(TM)依存型 Cre 組換え酵素 CreER の発現を駆動する遺伝子組換えマウスを作出した。これらのマウスにTMを投与すると、ちょうどその数時間前に最終分裂を終えたばかりの神経細胞でのみ Cre-loxP 組換えが起きる。

(下) これまでに作出した誕生日タグづけマウス4系統

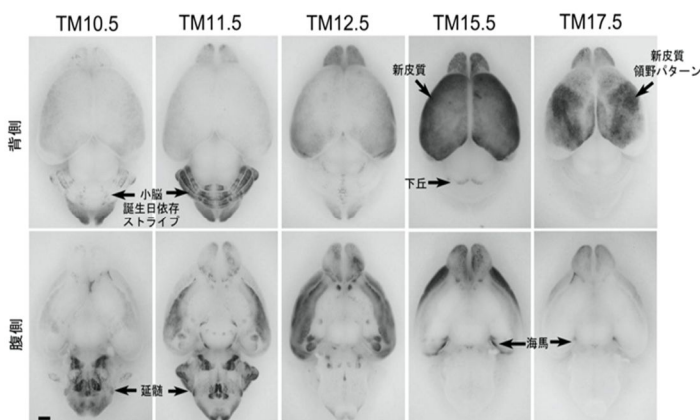


図2 誕生日タグづけされたP7脳のホールマウント画像 (Neurog2-G2A系統)

上に示した胎生ステージ(TM)に誕生日タグづけすると、特徴的な脳領域の神経細胞が標識される。

NeuroGT データベースより改変 (<https://ssbd.riken.jp/neurogt/>)

在を考えると大変興味深い。というのも、特定のステージにタグづけされた神経細胞群の活動を人為的に操作すれば、特定の異なる神経症状が引き起こされることが容易に想像できるからである。

本研究では「誕生日タグづけ法」を用いて収集した以下の2種類のデータセットを用いた。

(2) 誕生日タグづけ神経細胞群の顕微鏡画像データベース NeuroGT

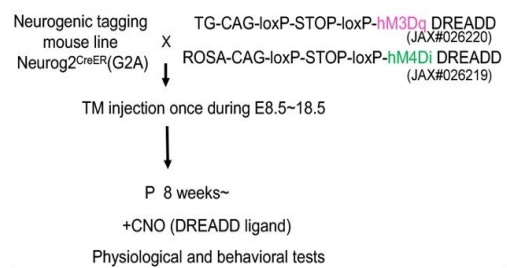
(<https://ssbd.riken.jp/neurogt/> 2021年公開)

「タグづけマウス系統」と「タグづけステージ」ごとに、タグづけされた神経細胞の顕微鏡画像約16,000点を、神経系を網羅するカタログ的画像として収録している。

(3) 誕生日タグづけ神経細胞群の活動を操作した際に現れる身体症状表現型データ

タグづけされた神経細胞群の神経活動を化学遺伝学的に操作した時に、マウス個体に引き起こされる身体症状表現型のデータを2020年度から収集している。具体的な実験方法は図3に示すが、NeuroGTの各分類条件を用いてタグづけされた神経細胞群特異的に活性化型(hM3Dq)あるいは抑制型(hM4Di)のデザイナ受容体(DREADD)を発現させる。マウスが成長した後に、DREADDの人工リガンドCNOを投与して神経活動を一過的に操作し、マウス個体に現れる身体症状の表現型を、約50種の行動テストにより数値化データとする。現在タグづけマウス NeuroG2-G2A 系統を用いた合計約200匹のマウス個体のデータが使用できる状況である(未発表)。

実験の流れ



表現型テスト項目

Body temperature	Open field test	Pinna reflex
Respiration rate	Rotor rod test	Corneal reflex
Heart rate	Fear conditioning	Righting reflex
Defecation	Hotplate test	Contact righting reflex
Urination	Foot print test	Toe pinch
Pupil diameter	Tail suspension test	Auditory response
Serum corticosterone	Startle response	Visual placing
Food intake	Aggression	Whisker Twitch
Water intake	Vocalization	Touch escape
Salivation	Tameness	Pelvic elevation
Lacrimation	Limb grasping	Abdominal tone
Body length	Wire maneuver	Limb tone
Body weight	Provoked biting	Locomotor activity
Body position	Time before move	Tail elevation
Death	Transfer arousal	Trunk curl

図3 誕生日タグづけマウスを使った身体症状表現型データ収集方法

2. 研究の目的

上記2つのデータから情報処理手法を駆使することで何を引き出せるかに挑戦する。

3. 研究の方法

上記2つのデータについて情報科学的に解析を行なった。詳細は成果の項を参照。

4. 研究成果

(1) タグづけ神経細胞を含むマウス脳の3D構築法の開発

NeuroGTに収録された画像データは、凍結したマウス脳を手動で冠状に薄切(20um)し、得られた切片を免疫抗体により茶褐色にDAB染色したものである。切片の大きさはまちまちであり、ずれや歪み、破損なども目立つ。ブラウザ上で脳の前後軸に沿って並べてはあるもの

の、タグづけされた細胞の3次元空間における分布を把握するのは容易ではなく、神経解剖学者の慣れた目が必要である。そこで、切片画像中のタグづけされた神経細胞を自動的に認識し、切片画像からマウス脳の外観を3次元構築する方法を開発した。切片の歪み等を画像処理によって除去し、最終的に個体別の脳を可視化することで、正確に構築できることが確かめられた。

(2) 脳の領域を特定するシステムの開発

NeuroGT に収録された画像データを用いて、脳の8大領域(嗅脳、大脳皮質、海馬、大脳基底核、間脳、中脳、小脳、延髄)を特定するシステムを構築した。教師データの作成は代表者平田が行い、分担者遠里がその情報を使って convolutional neural network(CNN)を用いた深層学習を行った。当初は他の群の画像データの当てはまりが悪かったが(mIoU=53%)、切片の位置情報を加味した unsupervised domain adaptation (UDA) とよばれる CNN のパラメータの転移学習法を提案することで、高い正確度を達成することができた(mIoU=78%)。

(3) 神経細胞群と身体症状表現型の因果構造の分析

誕生日タグづけ神経細胞群の顕微鏡画像データベース NeuroGT とそれらの活動を操作した際に現れる身体症状表現型データとを突き合わせ、因果推論を試みた。現在のところ最も広範囲に脳をタグづけする Neurog2-G2A 系統を用いた身体症状表現型データしか解析に使えないため、予測性能を高めることは難しかったが、この点については、別のタグづけマウス系統を用いた身体症状データが得られてから再検討することにした。現在のデータのみから検証可能な仮説が得られたので、これについて現在実験的に検証中である。

人工知能を用いた大規模データの情報解析は、現代の世界の研究の潮流であり、期待も大きい。本研究はまさしくその流れに沿ったものであり、最終的に導かれた仮説を実験的に検証できれば、この流れの研究の有効性を示すモデルケースになると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Masuda Aki, Nishida Kazuhiko, Ajima Rieko, Saga Yumiko, Bakhtan Marah, Klar Avihu, Hirata Tatsumi, Zhu Yan	4. 巻 10
2. 論文標題 A global gene regulatory program and its region-specific regulator partition neurons into commissural and ipsilateral projection types	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eadk2149
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/sciadv.adk2149	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

1. 著者名 Hirata Tatsumi	4. 巻 18
2. 論文標題 Olfactory information processing viewed through mitral and tufted cell-specific channels	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Frontiers in Neural Circuits	6. 最初と最後の頁 1382626
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fncir.2024.1382626	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 Shimojo Yuki, Suehara Kazuki, Hirata Tatsumi, Tohsato Yukako	4. 巻 17
2. 論文標題 Segmentation of Mouse Brain Slices with Unsupervised Domain Adaptation Considering Cross-sectional Locations	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 IPSJ Transactions on Bioinformatics	6. 最初と最後の頁 33 ~ 39
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2197/ipsjtbio.17.33	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 Kawabata Hiroto, Shimojo Yuki, Hirata Tatsumi, Tohsato Yukako	4. 巻
2. 論文標題 Large-scale Image Processing and Three-Dimensional Reconstruction of Mouse Brains with Neurogenic-Tagged Neurons	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Proceedings of the 13th International Conference on Biomedical Engineering and Technology	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1145/3620679.3620680	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 Hirata Tatsumi, Tohsato Yukako, Itoga Hiroya, Shioi Go, Kiyonari Hiroshi, Oka Sanae, Fujimori Toshihiko, Onami Shuichi	4. 巻 1
2. 論文標題 NeuroGT: A brain atlas of neurogenic tagging CreER drivers for birthdate-based classification and manipulation of mouse neurons	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Reports Methods	6. 最初と最後の頁 100012
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.crmeth.2021.100012	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 -

〔学会発表〕 計11件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 平田たつみ
2. 発表標題 神経細胞の誕生日タグづけ法を用いた神経細胞と身体生理表現型との体系的関連づけ
3. 学会等名 第46回 日本分子生物学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 平田たつみ
2. 発表標題 神経発生の原理を利用した神経科学研究
3. 学会等名 第46回 日本神経科学大会 教育公演 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Tatsumi Hirata
2. 発表標題 Consequences of neural development explored by neurogenic tagging
3. 学会等名 International Symposium on Neural Development and Diseases (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 川端 宏知 下條 優貴 平田たつみ 遠里 由佳子
2. 発表標題 大規模なマウスの脳切片画像の画像処理と三次元再構築
3. 学会等名 第25回 画像の認識・理解シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 下條 優季 平田 たつみ 遠里 由佳子
2. 発表標題 高解像度なマウス脳画像の領域検出にむけた画像の前後処理法の提案
3. 学会等名 第25回 画像の認識・理解シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 下條優季、平田 たつみ、遠里 由佳子
2. 発表標題 深層学習による高解像度なマウス脳切片画像の領域検出に向けた画像処理法の提案
3. 学会等名 第11回生命医薬情報学連合大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 川端 宏知、下條 優貴、平田 たつみ、遠里 由佳子
2. 発表標題 NeuroGTのマウス全脳画像の三次元再構築
3. 学会等名 第11回生命医薬情報学連合大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tatsumi Hirata, Yukako Tohsato, Hiroya Itoga, Go Shioi, Hiroshi Kiyonari, Sanae Oka, Toshihiko Fujimori and Shuichi Onami
2. 発表標題 NeuroGT: A brain atlas of neurogenic tagging CreER drivers for birthdate-based classification and manipulation of mouse neurons
3. 学会等名 第54回日本発牛学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tatsumi Hirata, Yukako Tohsato, Hiroya Itoga, Go Shioi, Hiroshi Kiyonari, Sanae Oka, Toshihiko Fujimori and Shuichi Onami
2. 発表標題 NeuroGT: 神経細胞の誕生日タグづけ用CreERドライバーマウスの脳アトラス
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tatsumi Hirata, Yukako Tohsato, Hiroya Itoga, Go Shioi, Hiroshi Kiyonari, Sanae Oka, Toshihiko Fujimori and Shuichi Onami
2. 発表標題 Launching NeuroGT: a brain atlas of neurogenic tagging CreER drivers for birthdate-based classification and manipulation of mouse neurons
3. 学会等名 北米神経科学学会2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平田たつみ、遠里由佳子、糸賀裕弥、塩井剛、清成寛、岡早苗、藤森俊彦、大浪修一
2. 発表標題 NeuroGT: 神経細胞の誕生日タグづけ用CreERドライバーマウスの脳アトラス
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会、ワークショップ (招待講演)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

NeuroGT database
<https://ssbd.riken.jp/neurogt/>
誕生日タグづけ”マウスの脳画像データベース「NeuroGT」を公開
https://www.nig.ac.jp/nig/ja/2021/05/research-highlights_ja/pr20210525.html

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	遠里 由佳子 (Tohsato Yukako) (80346171)	立命館大学・情報理工学部・教授 (34315)	統計的解析/方法論の構築

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
---------	---------