

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：62603

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24500365

研究課題名(和文)大規模ニューロン・グリアネットワークの遺伝的アルゴリズム解析による脳動作原理解明

研究課題名(英文)Elucidation of the Brain Operating Principles by Analyzing Large Scale Neuron-Astrocyte Networks with Genetic Algorithm

研究代表者

田村 義保 (Tamura, Yoshiyasu)

統計数理研究所・モデリング研究系・教授

研究者番号：60150033

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：脳幹部呼吸中枢におけるニューロンとグリア細胞の活動をカルシウムイメージング法により解析し、吸気神経活動に先行して活動を開始するグリア細胞集団を見出した。カルシウムイメージングデータと呼吸神経出力の時系列解析ならびに数理モデルを用いたシミュレーションにより、ともにそれぞれが自発的にリズムな活動を呈しうるニューロンとグリア細胞とが弱く結合し、相互に作用しあうことにより呼吸リズムが形成されていることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：By calcium imaging, we recorded activities of neurons and astrocytes in the brainstem respiratory center of the rat and mouse, and found a subset of astrocytes of which activities preceded inspiratory neural output. By time series analysis of the imaging data and neural respiratory output and by computer simulation of the rhythm generating neuron-astrocyte networks, we concluded that respiratory rhythm is generated by loosely coupled intrinsically oscillating neurons and astrocytes.

研究分野：計算統計学

キーワード：カルシウムイメージング アストロサイト

### 1. 研究開始当初の背景

(1)脳内には極めて多数の神経細胞(ニューロン)とグリア細胞が存在している。従来、脳機能は、シナプスで結合した多数のニューロンよりなるニューロンネットワークの活動により決定されると考えられていた。

(2)しかし、細胞内カルシウム濃度を可視化するカルシウムイメージング法により、グリア細胞なかでもアストロサイトは、ニューロンと協調して神経情報処理に積極的に関与していることが明らかにされてきた。

(3)ニューロン同士は機能的に結合してニューロンネットワークを形成し、また、アストロサイト同士も機能的に結合してアストロサイトネットワークを形成し、脳機能は、機能的に相関したニューロンとアストロサイトのネットワーク活動が相互に作用した結果として発現すると考えた。

### 2. 研究の目的

(1)本研究では、ニューロンネットワークとアストロサイトネットワークの機能的相関の解析から脳の動作原理の解明を目指した。

(2)多数の細胞活動の同時計測が可能なニポウ板型共焦点レーザー蛍光観察システムにより大規模なニューロンネットワークとアストロサイトネットワークの機能的相関を解析し、その *in silico* 再構築によりその状態遷移過程を再現し、大規模なニューロン・アストロサイトネットワークの相互作用に基づくと考えられる脳の動作原理を解明するという着想に至った。本研究では、特に以下の2点の実現を目的とした。各数十~数百個のニューロンとアストロサイトの活動を同時に計測し、それらの機能的集団間の状態遷移過程における相互連関を明らかにする。大規模ネットワークを *in silico* で再構築し、その状態遷移機構を解明する。

(3)従来のニューロン中心主義から脱却し、全く新しい視点から脳の動作原理を明らかにし、人間の精神・心とは何かという問いに答えるための、また、うつ病、統合失調症、認知症など多くの精神神経疾患の病態を解明し、アストロサイトネットワークを標的としたそれら疾患に対する新規薬物療法を開発することに資する基礎的知見を提供する。

### 3. 研究の方法

(1)大規模なニューロンとアストロサイトのネットワーク活動とそれらの相関を解析する。ラット、マウスの脳幹部から作成した *in vitro* 標本を用い、呼吸調節に重要な延髄の preBotzinger complex 領域から、高空間解像度イメージング(膜電位イメージング、カルシウムイメージング)により多数(各数百個)のニューロンとアストロサイトよりなる脳活動を計測する。

(2)カルシウムイメージングで計測された細胞をニューロンとアストロサイトに分類するアルゴリズムを開発し、分類されたニューロンとアストロサイトについて、個々の細胞

の蛍光強度変化すなわち活動の時系列データを、コンピュータ上で解析し、ニューロンおよびアストロサイトの各ネットワーク内部に存在する機能的アセンブリを同定する。各アセンブリの間の機能的連関を解析し、モデル化することにより、大規模ニューロン・アストロサイトネットワークの相互作用に基づく脳の動作原理を明らかにする。

### 4. 研究成果

(1)平成24年度は、脳スライス標本を用いて、まず、膜電位イメージング法により、延髄内の吸気神経活動の伝搬過程を可視化し、呼吸リズム形成の神経機構を解析した(図1)。

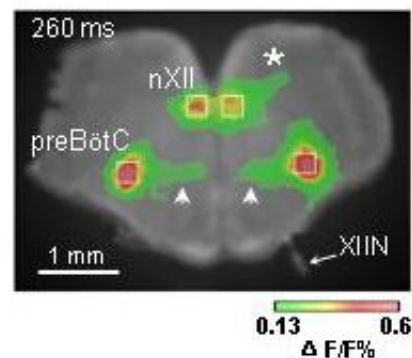


図1. 延髄断面の preBotzinger complex 領域 (preBotC) で形成された吸気神経活動が伝搬していく過程の膜電位イメージング像。

この膜電位イメージングで得られた preBotzinger complex における吸気神経活動データの詳細な数理的解析にて吸気神経活動の形成にカオス性が示され、そのカオス性は、アストロサイトの活動性が有するカオス性に由来するものかもしれないと考察した。

次いで、カルシウムイメージング法により preBotzinger complex における比較的少数(数十個)のニューロンとアストロサイトの活動(細胞の活動に伴う細胞内カルシウム濃度変化)を計測し、計測された個々の細胞をニューロンとアストロサイトとに分類するアルゴリズムの開発を行った。この解析において、吸気神経活動に先行して活動を開始する前吸気性アストロサイト (preinspiratory astrocytes) の集団を見出した(図2)。

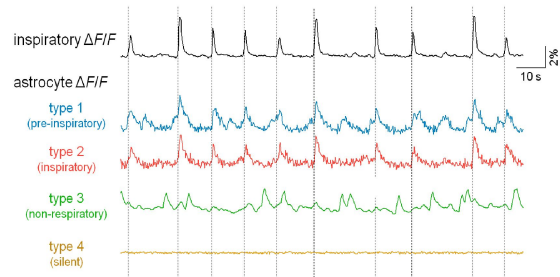


図2. アストロサイトには、吸気神経出力 (inspiratory  $\Delta F/F$ ) に先行して活動を開始する type 1、同時に活動を開始する type 2、呼吸と無関係に活動する type 3、自発活動を呈さない type 4 の4種類が見いだされた。

また、低酸素換気応答におけるニューロンとアストロサイトの機能的連関も解析した。低酸素は頸動脈小体の興奮を介して呼吸出力を増強させるが、一旦増強した呼吸出力は、低酸素刺激がなくなった後も数分間以上持続し、その現象は、短期呼吸増強 (short term potentiation) と呼ばれるが、その機序は不明であった。低酸素後短期呼吸増強はアストロサイトによるとの仮説を立て、その妥当性を検証するため、各種刺激に対するアストロサイトの活性化を抑える薬剤 arundic acid (ONO-2506) の効果を解析し、ONO-2506 の前投与は、マウスにおいて、低酸素後短期呼吸増強を抑えることを確認した。

さらに、遺伝的アルゴリズムによる解析技術の基礎的調査を行い、実応用問題領域への適用技術などの知見を得た。MAPLE 等のソフトウェアを用いたシミュレーション、解析の方法について検討を行った。

(2)平成 25 年度は、通常のラットより作成した脳幹脊髄標本の延髄断面にカルシウムイメージング法を応用し、多数のニューロンとアストロサイトの活動を同時に計測し、アストロサイトが呼吸に同期した活動を呈することの確認・証明を試みた。ニューロンとアストロサイトとを区別するため、計測された個々の細胞のカルシウム信号パターンの解析とともに、細胞の大きさ、形、さらに計測後に固定した標本の解剖学的解析を試みた。

また、計測・撮影したカルシウムイメージの動画解析を実施し、ニューロンとアストロサイトの判別技術を改善させるべく検討を行った。まず、静止画像の各ピクセルに対する特徴量解析を行い、クラスタリング技術を適用することでニューロンおよびアストロサイトを抽出し、細胞の大きさに基づく自動判別の実現可能性を検証した。

さらに、GFP 蛍光によりニューロンとアストロサイトとを区別できる GFAP-GFP マウスを用い、延髄スライス標本でカルシウムイメージング法により多数のニューロンとアストロサイトの活動を同時に計測し、個々の細胞をニューロンとアストロサイトとに分類するアルゴリズムの開発を行った。

(3)平成 26 年度は、前年度までに実施した摘出脳幹標本でのカルシウムイメージング法による実験を継続した。特に、計測された細胞の細胞内カルシウム濃度変化のパターンから得られた細胞をニューロンとアストロサイトに区別する方法の妥当性について、計測後の標本中の細胞をニューロンに特異的な抗 NeuN 抗体とアストロサイトに特異的な抗 S100b 抗体で染め、細胞内カルシウム濃度変化のパターンによる細胞弁別法の妥当性を検討した。そして、それらの実験で得られた延髄呼吸中枢のニューロンとアストロサイトの活動パターンと呼吸神経出力の相関関係を解析することにより、呼吸リズムは延髄 preBotzinger complex 領域のニューロン同士、および、アストロサイト同士、さらに、

ニューロンとアストロサイトとが、それぞれ興奮性に結合し、全体として吸息を開始させるペースメーカーとして働いているとのモデルを構築した。

また、低酸素刺激による短期呼吸増強の機序について、前年度までに実施していた実験を継続し、アストロサイトの活性化を介するものであるということを確認を示した。その知見に基づき、短期呼吸増強は、少なくとも低酸素刺激による場合は、延髄孤束核でニューロンと持続的な活性化を呈するアストロサイトとの相互作用によるとの細胞ネットワークモデルを構築した。

また、アストロサイトは様々な脳領域においてカルシウム依存性機構によって神経活動を修飾していると考えられているが、呼吸リズム生成機構の中核を担う preBotzinger complex のアストロサイトが呼吸性のカルシウム変動をしているかどうかについては、議論的になってきた。そこで我々は、GFAP プロモータ制御下に、アストロサイト特異的に EGFP を発現させたトランスジェニックマウスを用い、呼吸性リズム活動を維持した脳スライス標本における preBotzinger complex のカルシウムイメージングデータを解析した。結果、EGFP 陽性のアストロサイトの多くは、同期して低周波 (<0.03Hz) のカルシウム振動を示しており、そのうちの 10%では、その低周波信号をフィルタで除去した後に、不規則に吸息に先行するカルシウム活動が認められた。数理モデルを用いた検討では、Hodgkin-Huxley 型の周期性バースト発火する呼吸ニューロンと低周波振動する Rossler アトラクタ型のアストロサイトが相互に影響しあうモデルを用いたシミュレーションで、吸息に先行するカルシウム活動が再現できた。

カルシウムイメージング動画の解析では、ニューロンあるいはグリア細胞と考えられる可能性の高い動画領域の抽出を試みた。まず、撮影動画を静止画フレームに分解し、各静止画像に対して、グレー画像化、平滑化 (ノイズ除去)、トレンド除去などの前処理を行った。次に、輝度に基づいたクラスタリングにより、ニューロンあるいはグリア細胞の抽出を試みた。クラスタリングでは、密度の情報を活用したクラスタリング手法を開発した。次に、ニューロンとグリア細胞の自動判別技術の構築を狙いとした時系列解析を実施し、輝度の変動に注目した特徴量を抽出し解析した。

以上の結果から preBotzinger complex におけるニューロン・グリアネットワークは、弱く結合した振動子 (loosely coupled oscillators) で表現されるとの新しい概念を提唱するに至った。なお、動画解析では、カメラのブレに起因すると考えられる輝度変動が合わせて抽出され、自動判別の妨げとなった。カメラブレの補正技術の高度化は今後の課題である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 11 件)

Boiroux D, Oke Y, Miwakeichi F, Oku Y, Pixel timing correction in time-lapsed calcium imaging using point scanning microscopy, *Journal of Neuroscience Methods*, 査読有, Vol.237, 2014, 60-68

doi:10.1016/j.jneumeth.2014.08.008

Koshiya N, Oku Y, Yokota S, Oyamada Y, Yasui Y, Okada Y. Anatomical and functional pathways of rhythmogenic inspiratory premotor information flow originating in the pre-Botzinger complex in the rat medulla. *Neuroscience*, 査読有, Vol.268, 2014, 194-211  
doi:10.1016/j.neuroscience.2014.03.002

Pokorski M, Takeda K, Sato Y, Okada Y. The hypoxic ventilatory response and TRPA1 antagonism in conscious mice, *Acta Physiologica / Acta Physiol. (Oxf)*, 査読有, Vol.210, No.4, 2014, 928-938

Someya H, Striking a Mean- and Parent-centric Balance in Real-valued Crossover Operators, *IEEE Transactions on Evolutionary Computation*, 査読有, Vol.17, No.6, 2013, 737-754

岡田 泰昌、梅田 啓、各種病態における呼吸困難感の出現・知覚機序とその対策。呼吸と循環、査読無、61 巻、5 号、2013、444-454

三分一 史和、越久 仁敬、

岡田 泰昌、川合 成治、田村 義保、石黒 真木夫、単一試行生体イメージングデータ解析のための AR 型モデルに基づく時空間フィルタリング法、統計数理、査読有、

60 巻、1 号、2012、149-157

Okada Y, Sasaki T, Oku Y, Takahashi N, Seki M, Ujita S, Tanaka KF, Matsuki, N, Ikegaya Y., Preinspiratory calcium rise in putative pre-Botzinger complex astrocytes. *Journal of Physiology*, 査読有, Vol.590, No.19, 2012, 4933-4944.

[学会発表](計 32 件)

Okada Y, Takeda K, Someya H, Oku Y, Miwakeichi F, Ishiguro M, Tamura Y, Pokorski M. Astrocytes mediate short-term plasticity of breathing. *Experimental Biology 2015*, Boston Convention and Exhibition Center, Boston, USA Mar.28-Apr.1, 2015

福士 勇人、武田 湖太郎、長谷部 洋平、堀内 城、岡田 泰昌。アストロサイト活性化阻害は高度低酸素による換気と脳波信号の抑制を増強する、第 120 回日本解剖学会総会・全国学術集会 第 92 回日本生理学会大会 合同大会、神戸、2015 年 3 月 21 日 - 23 日

Okada Y, Oku Y, Yokota S, Oyamada Y, Yasui Y, Koshiya N. Connectomics of the inspiratory center: Anatomical tract and propagation dynamics from the preBotzinger complex, *Society for Neuroscience Meeting 2014*, Washington DC, USA, Nov 15-19, 2014.

Koshiya N, Oku Y, Okada Y, Smith JC, From chaotic recruitment of the pre-Botzinger complex (pre-BotC) to functional connectomics of inter-pre-BotC tract and pan-network premotor pathways, *The XIIIth Oxford Breathing Meeting, Respiratory and Cardiovascular*, Sydney, Australia. Oct 26-31, 2014

Oku Y, Lal A, Oke Y,

Boiroux D, Network Connectivity of the Respiratory Rhythm-generating Kernel, 日本神経回路学会第24回全国大会、函館、2014年8月27日 - 29日

Okada Y, Fukushi I, Takeda K, Oyamada Y, Oku Y, Miwakeichi F, Someya H, Ishiguro M, Tamura Y, Pokorski M. Post-hypoxic potentiation of breathing is induced by sustained activation of astrocytes, 第54回日本呼吸器学会学術講演会、大阪、2014年4月26日

Takeda K, Pokorski M, Sato Y, Oyamada Y, Okada Y, Effects of TRPA1 channel antagonism on hypoxic and hypercapnic ventilatory responses. The 43rd annual meeting of the Society for Neuroscience (Neuroscience2013), San Diego, USA, November 9-13, 2013

Okada Y, Takeda K, Oyamada Y, Oku Y, Miwakeichi F, Someya H, Ishiguro M, Tamura Y, Mieczyslaw. P, Post-hypoxic potentiation of breathing is mediated by astrocytes, XI European Meeting on Glial Cells in Health and Disease, Berlin, Germany, Jun.03, 2013  
Okada Y, Yokota S, Oku Y, Anatomical identification of intrinsically chemosensitive astrocytes and neurons in the ventral medulla, FENS Forum, Barcelona, Spain, Jul. 14-18, 2012

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

田村 義保 (Tamura Yoshiyasu)  
統計数理研究所・モデリング研究系・教授  
研究者番号: 60150033

### (2) 研究分担者

染谷 博司 (Someya Hiroshi)  
東海大学・情報理工学部・講師

研究者番号: 00333518

越久 仁敬 (Oku Yoshitaka)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号: 20252512

岡田 泰昌 (Okada Yasumasa)

独立行政法人国立病院機構村山医療センター (臨床研究センター)・電気生理学研究室・室長

研究者番号: 80160688

### (3) 連携研究者

無し