

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25540130

研究課題名(和文) 微小動物脳画像4次元解析のためのレジストレーション

研究課題名(英文) 4D Registration of small animals to analyze brain function

研究代表者

橋本 浩一 (Hashimoto, Koichi)

東北大学・情報科学研究科・教授

研究者番号：80228410

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：ショウジョウバエの匂い記憶学習の解析は長い歴史を持つが、近年の蛍光プローブ作成技術の進歩によって神経回路1細胞レベルの解析が可能になりつつある。本研究の目的は、2光子励起顕微鏡により取得した蛍光画像を4次元解析するための画像処理手法を確立することにある。平成25年度はスライス像の位置合わせに取り組んだ。平成26年度は、位相限定相関法によるスライス画像の位置合わせに加えて、蛍光画像のスタックに取り組んだ。3次元スタックを精密にアライメントし、3次元像の時間変化を計測することに成功し、論文として発表した。

研究成果の概要(英文)：Memory analysis of fruit fly has long history. Recently developments of fluorescent probes have succeeded to analyze the neural circuit with one cell level. This research is to develop a image alignment technology to stack the fluorescent images obtained by two photon microscope. In 2013 FY we have developed an alignment program to precisely match two images. In 2014 FY we have successfully stack many images to make a 3D analysis and presented a paper in a journal.

研究分野：制御工学

キーワード：蛍光画像 画像処理 4次元解析

1. 研究開始当初の背景

ショウジョウバエの匂い記憶学習の解析は長い歴史を持つが、近年の蛍光プローブ作成技術の進歩によって神経回路 1 細胞レベルの解析が可能になりつつある。本研究の目的は、2 光子励起顕微鏡により取得した蛍光画像を 3 次元再構成し、3 次元情報の時間的変化を解析する「4 次元解析」の画像処理手法を確立することにある。

2. 研究の目的

ショウジョウバエの生きた個体 (図 1 にハエの頭部構造を示す) における匂い反応を時間的に記録したいのであるが、生きた個体を完全に固定することは困難である。そこで、機械的にはできるだけしっかりと固定するのであるが、それでも動く観察対象を画像処理により静止化する必要がある。また、蛍光プローブは明るさがダイナミックに (短時間で大きな明るさ振幅を持って) 変化するので、静止化する画像パターンもダイナミックに変化する。十分にフレームレートの高い撮像が可能であれば、時間にもなうパターンの変化は小さいので静止化は容易であるが、顕微鏡の原理からスキャン速度と解像度のトレードオフがある。

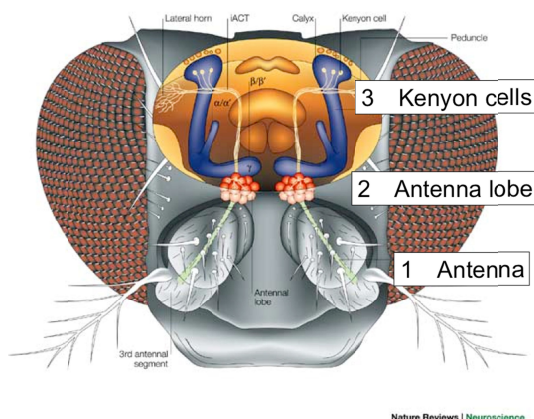


図 1. ハエの頭部構造

顕微鏡で得られる画像は、2 次元画像を、フォーカスを変えて (断面位置をずらして) 連続的に取得したスライス像である。これをスタックして 3 次元画像を構成する。目的は、神経繊維 (ハエの嗅覚構造を図 2 に示す) が同定できる程度に精密に 3 次元スタックをアライメントすること、生物の位置・姿勢変動を推定すること、時系列で神経活動をトレースすることにまとめられる。ダイナミックに明るさが変化する画像を精密にスタックし、時間変化を解析することはきわめて挑戦的である。つまり、本課題は、生物学が直面している「大量のデータは取得できるが処理できない」典型的な問題であり、成果の波及効果は大きい。

最も大きな課題は、生きた個体であるがためにサンプルが動くことにある。つまり、Z 面のスキャン像をアライメントして、神経細胞をトレースできる程度の高画質な 3 次元像を構築し、ひとつひとつの神経細胞を、時間を追って、活動解析することが目的である。

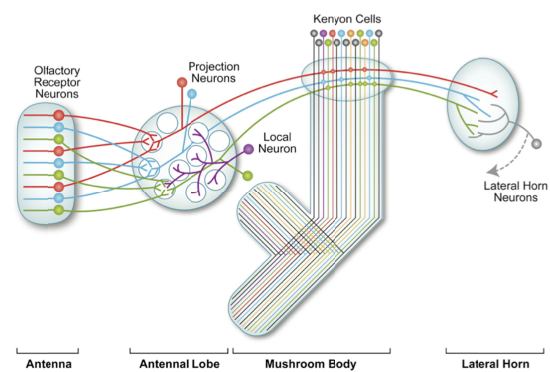


図 2. ハエの嗅覚構造
[Cachero, Nature, 2008]

3. 研究の方法

(1) 平成 25 年度の研究実施計画

GFP (Green Fluorescent Protein) に代表される蛍光タンパク質は、遺伝学手法により特定の細胞、細胞内小器官、生体分子に導入することができ、蛍光顕微

鏡により明瞭に観察できるので、医学、生物学では欠かせないツールとなっている。G-CaMPはCa²⁺（カルシウムイオン）が結合することでGFPの蛍光強度が上昇するように開発されたセンサーで、広く利用されている [Nakai, J Neurosci, 1999]。

顕微鏡下でショウジョウバエに匂いをかがせるときに同時に電気ショックを与えることで、「匂いと電気ショック」の連合学習記憶を形成することができる（図3にハエの匂い実験系を示す）。匂い記憶形成にともなって、ケニヨン細胞の匂いへの応答が変化することが期待できる。これをどのケニヨン細胞がどれくらいの時間応答で活性化するかをトレースすることができれば、細胞の持つ機能と連携を解析することができ、これによって記憶のメカニズムに迫ることが可能である。

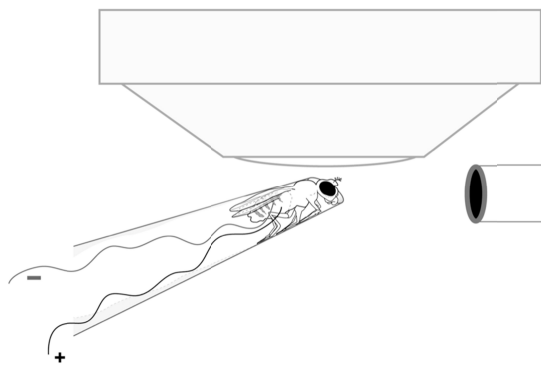


図3. ハエの匂い実験系

GCaMP を発現させた同じ個体に異なった匂いをかがせ、ケニヨン細胞体でのCa²⁺濃度を蛍光強度として可視化すると、数10個のケニヨン細胞でCa²⁺レベルが上昇することがわかる。一部は共通の細胞であるが、ほとんどは匂いによって異なった細胞がアクティベートされる。神経活動は時間に伴って変動するので、カルシウムイメージングではこのような蛍光

画像がダイナミックに明るさ変動する。これを時間軸方向に位置合わせするアルゴリズムを開発する。

一定の時間間隔で3次元構築を行う。観察対象が動くことと、各ケニヨン細胞の輝度がダイナミックに変化することにより、画像からケニヨン細胞ひとつひとつを判別することは難しい。したがって、Z方向にアライメントを行うことで信頼性高く活動のトレースができるよう、4次元像を作成する。既存のパターンマッチングでは困難であるので、時空間特性を利用した位相マッチング（画像を明度と位相にフーリエ変換し、明度情報を用いずに位相情報だけでパターンマッチングして、画像のズレを検出する。そしてズレを考慮して明度と位相の両方を逆フーリエ変換で現画像に戻す）などの手法を開発する。つまり、まずはほぼ10msの間に撮影された100枚の蛍光画像を精密にアライメントすることが目的である。

（2）平成26年度の研究実施計画

実験中のショウジョウバエの運動を相殺するために、また、アライメントによって得られた各ケニヨン細胞の位置を仮想的に固定するために、構築した3次元像の位置・姿勢（6自由度）を推定する。これはショウジョウバ

エの頭の微少な動きをケニヨン細胞群の移動・回転に変換し、時間軸に沿って位置・姿勢が変化したと仮定することで、最も矛盾が少ない位置・姿勢の変化を推定する非線形最適化問題として定式化できる。

各時刻におけるケニヨン細胞（および軸索）のひとつひとつをトレースすることで、その活動状態を解析する。これによって、ある刺激が与えられたときに細胞群全体が一様に反応するのか、特定の細胞だけが反応するのかを区別すること

ができる。また、トレースした細胞群と神経回路地図とのマッチングを行うことで、どの細胞が反応したかを同定する。

つまり、4次元解析が本年度の目的である。

4. 研究成果

平成 25 年度はスライス像の位置合わせに取り組んだ。テクスチャの豊富な剛体に対する位置合わせ手法はコンピュータビジョンの基礎的な技術であるが、ダイナミックに明度が変化する生体の蛍光画像に対しては有効ではない。本研究では、蛍光画像を対象として、位相限定法（フーリエ変換によりテクスチャ輝度をわざと捨てて位相情報のみを利用する方法）を応用し、輝度変化の大きい画像に対しても有効な位置合わせ手法を開発した。この結果を論文に投稿し、高い評価を得た[Hiroi, Hashimoto, Tabata et al., 2013]。

平成 26 年度は、「位相限定相関法（フーリエ変換によりテクスチャ輝度をわざと捨てて位相情報のみを利用する方法）」によるスライス画像の位置合わせに加えて、蛍光画像のスタックに取り組んだ。蛍光画像は明るさが確率的に変動するので、位相情報の利用はスタックにも有用である。この結果は連携研究者との大きな成果である。そして、精密にアライメントした 3 次元スタック（3 次元像）の時間変化を計測することに成功した。解析結果を取りまとめて論文として取りまとめているところである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1. Makoto Hiroi, Masamichi Ohkura, Junichi Nakai, Naoki Masuda, Koichi Hashimoto, Kiichi Inoue, Andre Fiala and Tetsuya Tabata,

Principal component analysis of odor coding at the level of third-order olfactory neurons in *Drosophila*, Genes to Cells vol.18, pp.1070-1081, 2013 (Journal)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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

橋本 浩一 (Koichi Hashimoto)
東北大学・大学院情報科学研究科・教授

研究者番号：

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

多羽田 哲也 (TESTUYA, TABATA)
東京大学・分子細胞生物学研究所・教授
研究者番号： 10183865

廣井 誠 (MAKOTO, HIROI)
東京大学・分子細胞生物学研究所・教授
研究者番号： 80597831

費 仙鳳 (FEI, XIANFENG)
東北文化学園大学・科学技術学部・准教授
研究者番号：20620470

荒井 翔吾 (SHOGO, ARAI)
東北大学・大学院情報科学研究科・助教
研究者番号：80587874