

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25560428

研究課題名(和文) 独自新規法を用いた遺伝子発現に基づくデジタル脳図譜作成とその解析

研究課題名(英文) Creating Gene Expression Based Digital Brain Atlas with Our New Mapping Technique and Map Analysis

研究代表者

於保 祐子 (Oho, Yuko)

独立行政法人理化学研究所・光量子工学研究領域・客員研究員

研究者番号：60381571

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：独自の3次元遺伝子発現分布地図作成法(トランスクリプトーム・トモグラフィー：TT法)を高精度化し、脳を俯瞰する形での網羅的発現情報を発達期マウスで経時的(生後3日、7日、3週、8週)に測定した。これを、共発現等のバイオインフォマティクス解析とMRI等の画像情報処理を融合したアトラスインフォマティクスという新手法で捉え、神経科学基盤となる遺伝子発現データベース(ViBrism DB)を構築した。

研究成果の概要(英文)：We fine-tuned our 3D gene expression mapping technique, Transcriptome Tomography, to create data sets of the mouse brain in developmental stages (3d, 7d 3w and 8w after birth) for overviewing comprehensive gene expression in the whole brain 3D anatomical context. We analyzed the data with atlas informatics, which is a new framework to integrate bioinformatics, such as co-expression analysis, and image processing of MRI or block-face images, and then, we have renewed the database, ViBrism DB, as a neuroscience open resource.

研究分野：複合領域

キーワード：遺伝子発現 3次元脳地図 バイオインフォマティクス データベース 画像処理 ネットワーク解析

1. 研究開始当初の背景

脳には全遺伝子の85%以上が発現し、遺伝型(ゲノム情報)と表現型(構造・機能)の間で「複雑なネットワーク構造」を作って、多様な機能を担っている。申請者は、3次元空間で遺伝子発現分布を測定する「TT法」を開発しマウス脳全体を俯瞰する形で網羅的に、1mm³精度で、全発現遺伝子情報を収集して36,558発現地図をデータベース化し、ハンチントン病遺伝子と神経栄養因子 *Bdnf* の共発現分布を解析して、病理所見との相関を示した(Okamura-Oho Y et al,2012 PLoS ONE 7:e45373)。更に、共発現を全遺伝子間で解析し、べき乗則に従う遺伝子共発現ネットワークを見出した。多くの複雑な生命現象がべき乗則に従う。遺伝子では、共発現ネットワーク構造が安定で、種間で保存され、恒常性を維持する機能単位を形成している(Stuart 2003 Science 302, 249)。このような発現データを大量処理する研究は、データベースから公開情報を収集して行われてきた。今回申請者は、独自データのみを使って、生物学的に意味のある遺伝子共発現を見出す事ができた。これは、従来の2次元での遺伝子発現解析に比べ、3次元的に遺伝子発現量を定量し、共発現情報が正確に得られ、かつ、測定に必要な時間・コストが格段に少ないTT法の利点によるところが大きい。こうした利点が認められ、申請者は米 Allen Brain Atlas,英 EMAP 等と共に INCF (国際ニューロインフォマティクス統合機構) デジタル脳図譜作成タスクフォースの一員として、ウェブ上の仮想3次元 *ex vivo* 脳図譜空間 (Waxholm Space, WHS) の国際標準化 (Hawrylycz, 2011 PLoS Comput Biol 7:e1001065)に参画している。

2. 研究の目的

本研究では、TT法を高精度化し、可塑性の高い発達期マウス脳で経時的な発現情報を詳細に測定・データベース化し、脳が恒常性を維持しながら形態を変え・機能を獲得する仕組みを、遺伝子共発現解析などのインフォマティクス手法と脳形態・組織情報を融合して解析するアトラス インフォマティクスという新手法で捉える。こうした研究により、神経科学の基盤となる、ウェブ上で双方向に利用可能な遺伝子発現脳図譜の構築をめざす。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子発現地図の高精度化: 「小さな対象」を扱えるよう、TT法の空間精度をあげる。そのために①試料分画数を増やして、測定の位置精度を上げた。②位置合わせ精度を上げるため、試料のMRI画像(T1、T2強調)をあらかじめ採取してこれに表面画像を合わせこんだ。

(2) 発現データベースの相互利用を可能にするシステム作成:非剛体レジストレーション

法(ANTS等)を用いて、発現地図情報の3次元空間をWHS標準脳空間と同一座標軸に合わせ、遺伝子発現分布情報全てを標準空間で比較できるものとした。

(3) 遺伝子共発現ネットワーク解析のための要素情報の取得: 全遺伝子vs全遺伝子について、試料分画間での発現強度の類似性を相関係数を用いて求めた。

(4) 新規の脳地図解析手法の開発

①遺伝子発現に基づく脳領域図譜の作成: 領域特異性の高い発現を示す遺伝子を、統計手法で選定し、遺伝子発現の組み合わせで解剖・機能領域図を示した。

②解剖学的位置を反映した共発現ネットワーク図の構築: (3)相関係数からネットワーク図を作成し、脳地図と合わせて解析する手法を開発する。

4. 研究成果

(1) 発現地図の高精度化の要素①試料分画は、マウス脳50ミクロン(MRI画像解像度と同等)でも測定に十分なRNA量が回収できた。②更に位置合わせ精度を上げるため、試料のMRI画像(T1、T2)を取得、その3D画像に非剛体レジストレーション法を用いて、TT画像を合わせこむ方法を用いた。このレジストレーション法は、分担研究者らのグループが14年度にCell誌に発表したものである(雑誌論文3)。

この高精度TT法を使って、C57BL/6Jマウスの発達期脳(生後3日、7日、3週令)で、網羅的遺伝子発現情報をマイクロアレイ法で取得した。測定コストの制限から、分画は3日令500um³、それ以外は1mm³で行い、全発現遺伝子情報をMRI画像空間に3次元マップ化した(図1)。

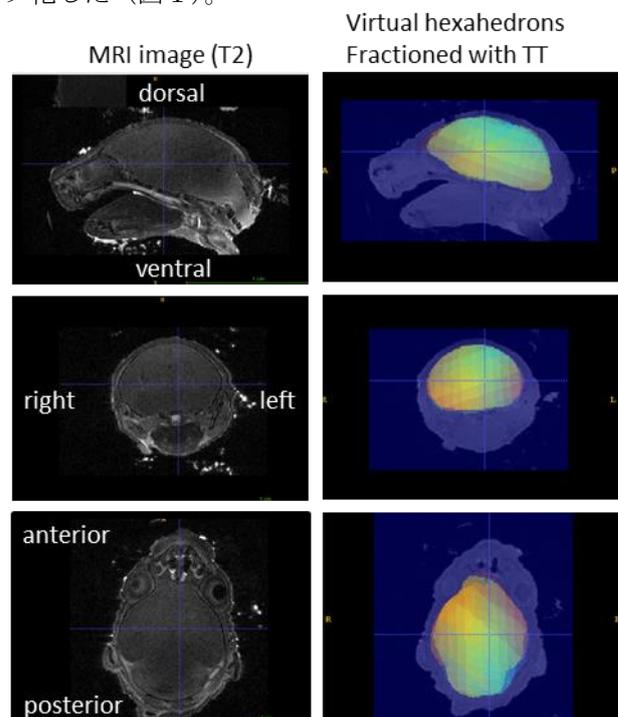


図1: 生後3日令マウス頭部MRI画像(カ)

ラム左)とTT法の試料分画(カラム右、分画ごとに色分けして表示)3つの試料について、直行3平面のいずれかの方向に連続切断し、試料を分画とする。分画のボクセル位置情報はTT画像情報として得られる。分画ごとに遺伝子発現の網羅測定を行う。測定結果をそれぞれの分画のボクセルに代入する。3つの試料かボクセル空間をMRI画像に位置合わせし、ボクセルごとの遺伝子発現の平均値を計算して、仮想的に立方体で分画して遺伝子発現測定したのに相当する結果を得る。例に示す3日令の分画数は15+8+11=34、位置合わせ後の仮想分画数は15x8x11=1,320

(2) 論文3に記載した手法を応用し、TT法で作成した3次元遺伝子発現データとMRI画像、脳解剖学領域地図を同一空間上に位置合わせする方法を確立し、相互に比較解析できるWEBシステムの構築した(図2)INCFのメンバーと協力を研究を行い、8週マウスについては国際標準脳空間WHSでの解析が可能となった。更に、発達期マウス脳については標準脳空間の整備がなされていないので、本研究で撮影した画像を標準空間として用いる事ができるシステムを作成した。これらの成果については、神経科学の基盤となるデジタル脳図譜として論文化し、同時に公開すべく準備中である。

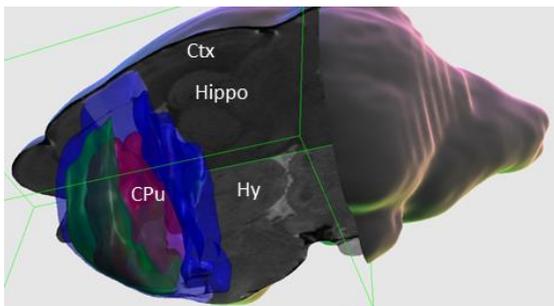


図2: 遺伝子発現3Dブラウザー MRI T1 3次元画像上に、線条体(CPu)に特異的に発現することが知られる Ppp1r1b(赤)、GABAニューロンの分化に働く Lhx6(緑)、カルシウムチャンネルを構成する Cacna2d3(青)を重ねてWEBブラウザー上に表示した例。線条体とそれを取り囲む大脳皮質領域で、これらは部分的に重なる位置で、発現している。この3D画像はマウス操作で自由に回転・移動することができ、発現部位表示の透明度も変更できるので、発現の重なり方やMRI上での位置をユーザーが自由に検討することができる。Ctx:大脳皮質、Hippo:海馬、CPu(線条体)、Hy:視床下部

(3) 領域特異性の高い発現を示す一群の遺伝子を、統計手法で選定した。生体マウスデータについてはFDR 5%以下を変動性の高い遺伝子発現パターンとしてデータベース上で

公開した。発達期マウスについてはCV値を公開予定である。こうして得られた領域特異性の高い遺伝子の発現パターンは、既存の脳解剖学領域の枠を超えて複雑で、従来法で記載する事が困難だという事が分かった。従って従来の所謂「脳領域」ごとに特異的発現をする遺伝子を選定し、それらの値を領域ごとに解析する研究方法は、脳遺伝子発現の記載法として不十分であるという結論に達した。そのため、解析法を変更して、共発現解析に基づくトポロジカルな遺伝子発現ネットワーク解析を行う方法論を採用する事となった。

(4) TT法で得られた分画での発現情報を用いた遺伝子間の共発現について、ピアソン相関係数を共発現の指標として解析を行った。その結果を遺伝子をノードとし、 $r > 0.85$ の関係にあるノードを線で結ぶネットワーク図として表示した。しかしこの方法では、ノード位置と実際の遺伝子発現位置との対応がつきにくいいため、脳神経科学の解析には不向きである。そこで、ノードの位置に遺伝子発現地図情報を示し、トポロジカルな情報と解剖学的位置情報を統合して解析できる枠組みを作った。共発現解析結果をこの枠組みで表示して、①共発現遺伝子の組み合わせは、種を超えて保存された生物機能に関わっている可能性が有意に高く、また胎生期に共発現する既知遺伝子群が、成体でも共発現する事を示す結果を得た。これらの解析手法と結果についてScientific Reportに論文を発表した(雑誌論文4、図3)。

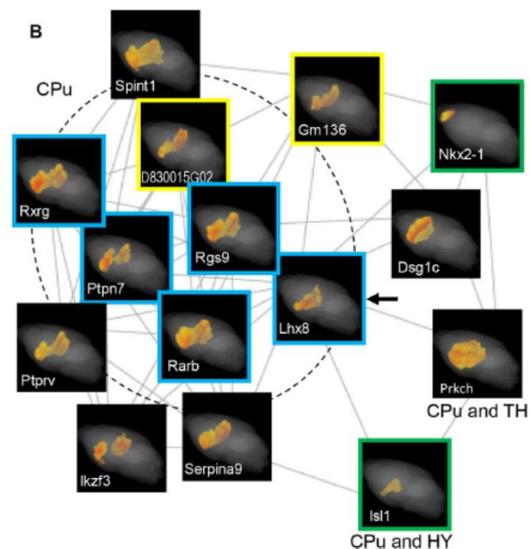


図3: 共発現ネットワーク図と発現地図の統合解析の枠組み 大脳基底核のコリン作動性神経の形成に働くことが知られている Lhx8 遺伝子(←)と共発現遺伝子の解析例。遺伝子ノードの上に発現地図を表示し、共発現遺伝子($r > 0.85$)を線で結ぶ。青枠は基底核 CPu での発現が既知の遺伝子。緑枠は Lhx8 と共に同神経の形成に働く転写因子。黄色枠は新規遺伝子(Y. Okamura-Oho, et al,

(5) 更に、遺伝子共発現ネットワーク構造の発達過程での遺伝子発現の安定性と、脳機能部位形成過程での変容を示す解析結果について、現在成果について論文を準備中である (図 4)。

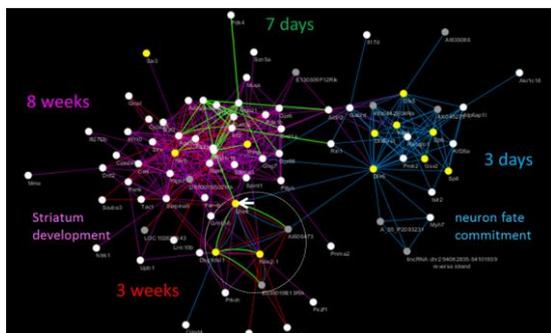


図 4 : 脳の発達段階での遺伝子共発現の変化
生後 3 日から 8 週までのマウス脳で遺伝子発現を網羅測定し、発現パターンの類似性の高い遺伝子 (共発現遺伝子) について、共発現を線で結ぶネットワーク図を作成して解析した。例として線条体形成に働く Lhx8 遺伝子 (←) と共発現する遺伝子ネットワークを示す。発達段階を通して、Lhx8/Is11/Nkx2-1 / unknown gene1 and 2 はネットワークを形成している (円内)。その外で、ネットワークは生後 3 日から 7 日の間に大きく変化して、線条体特異的の遺伝子を多く含むようになる (未発表データ)。

(6) 研究成果の公開を積極的に行った。即ち、論文発表と同時に、遺伝子発現地図データベース (ViBrism DB) を一般公開している。更にこの WEB サイトは、目的とする遺伝子を遺伝子名や ID で検索、更に共発現遺伝子も検索して、それら遺伝子の発現地図を 2D サムネール及び 3D 画像で確認し、更に、発現地図ファイルと、それをデスクトップで表示解析するソフトウェアをダウンロードする機能を備えたプラットフォームとして機能している。更に、TT 法についての説明や、発現解析例についてのビデオや画像も閲覧できる。更に、INCF を中心として国際連携研究を行い、また Neuroinformatics や SfN 等の国際学会で発表を行い、独自新規法である TT 法について、広く理解を求める活動を行った。次世代の網羅的で詳細な遺伝子発現解析法として、Nature Reviews Genetics 2015 年 1 月号に引用され、新規法として注目された N. Crosetto, et al, 2015 Nat. Rev. Genet. 16, 57-66)。

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 13 件)

1. Sergejeva, M, Papp, E. A., Bakker, R., Gaudnek, M. A., Okamura-Oho, Y., Boline, J., Bjaalie, J. G., Hess, A., "Anatomical landmarks for registration of experimental image data to volumetric rodent brain atlasing templates." *J. Neurosci. Methods* vol. 240, pp. 161-169 (2015) 査読有
DOI: 10.1016/j.jneumeth.2014.11.005
2. Okamura-Oho Y*, Shimokawa K, Nishimura M, Takemoto S, Sato A, Furuichi T, Yokota H. Broad Integration of Expression Maps and Co-Expression Networks Comprising Novel Gene Functions in the Brain. *Sci. Rep.* 4 : 6969 (2014) *: corresponding 査読有
DOI: 10.1038/srep06969
3. E. A. Susaki, K. Tainaka, D. Perrin, F. Kishino, T. Tawara, T. M. Watanabe, C. Yokoyama, H. Onoe, M. Eguchi, S. Yamaguchi, T. Abe, H. Kiyonari, Y. Shimizu, A. Miyawaki, H. Yokota, H. R. Ueda, "Whole-Brain Imaging with Single-Cell Resolution Using Chemical Cocktails and Computational Analysis", *Cell*, Vol. 157, pp. 726-739, (2014). 査読有
DOI:http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2014.03.042
4. M. Morita, T. Tawara, M. Nishimura, S. Yoshizawa, B. Chou, I. Kuroki, T. Ijiri, Y. Tsujimura, R. Himeno, and H. Yokota, "Communication Platform for Image Analysis and Sharing in Biology", *International Journal of Networking and Computing*, Vol. 4, pp. 369-391, (2014). 査読有
DOI:
http://doi.org/10.15803/ijnc.4.2_369
5. T. Ijiri, S. Yoshizawa, Y. Sato, M. Ito, and H. Yokota, "Bilateral Hermite Radial Basis Functions for Contour-based Volume Segmentation", *Computer Graphics Forum: The International Journal of Eurographics Association* (Proc. of EUROGRAPHICS), Vol. 32, pp. 123-132, (2013).
査読有 DOI: 10.1111/cgf.12032

[学会発表] (計 9 件)

1. 於保祐子「トランスクリプトーム トモグラフィ： 遺伝子発現を脳3次元空間にマップする」**RIKEN シンポジウム**、2015年2月6日 理化学研究所 仁科センターRIBF棟2階 大会議室(埼玉県和光市) 招待講演
2. Y. Okamura-Oho, K. Shimokawa, S. Nakamura, Y. Tsujimura, M. Nishimura, S. Takemoto, M. Morita, T. Ijiri, T. Tawara, H. Yokota “Transcriptome tomography: mapping genes onto 3D brain structures” in poster session of **Annual Meeting of Society of Neuroscience 2014**, 15 Nov. 2014, Washington DC (USA)
3. Y. Okamura-Oho, K. Shimokawa, M. Nishimura, S. Takemoto, M. Morita, H. Yokota: “Integrated Analysis of Expression Maps and Co-Expression Networks Using a Dataset of ViBrism DB” as oral presentation in **AINI2014**, 26 Sept. 2014, Wako (Japan)
4. Y. Okamura-Oho, K. Shimokawa, M. Nishimura, S. Takemoto, A. Sato, T. Furuichi, H. Yokota “Novel genes located in the co-expression networks detected with Transcriptome Tomography” in poster session of **Neuroinformatics 2014**, 25-27 August 2014, Leiden (Nederland)
5. 於保祐子「トランスクリプトーム・トモグラフィを用いた遺伝子発現に基づく全脳地図作成」科学技術振興機構主催 理化学研究所 **新技術説明会** 2014年6月12日 JST 東京本部別館ホール(東京 市ヶ谷) 招待講演
6. Y. Okamura-Oho, K. Shimokawa, S. Takemoto, H. Yokota “Developmentally conserved brain designs quantifiable with Transcriptome Tomography” in poster session of **Neuroinformatics 2013**, August 27-29, 2013, Stockholm (Sweden)

[図書] (計 1 件)

1. 森田正彦, 西村将臣, 横田秀夫, バイオ画像解析手取り足取りガイド, 第3章-5), 羊土社 2014, pp. 208-218

[その他]

ホームページ等

ViBrism DB

<http://vibrism.neuroinf.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

於保 祐子 (OHO, Yuko)

独立行政法人理化学研究所・光量子工学研究領域・客員研究員

研究者番号：60381571

(2) 研究分担者

横田 秀夫 (YOKOTA, Hideo)

独立行政法人理化学研究所・光量子工学研究領域・チームリーダー

研究者番号：00261206