

令和 2 年 6 月 26 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C)（特設分野研究）

研究期間：2016～2019

課題番号：16KT0134

研究課題名（和文）質量顕微鏡データによる脳内環境の解読に向けた数理基盤の構築

研究課題名（英文）A mathematical approach to decoding biological environment inside the brain using imaging mass spectrometry

研究代表者

末谷 大道（SUETANI, Hiromichi）

大分大学・理工学部・教授

研究者番号：40507167

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、様々な生体試料から計測されるIMSイメージングデータに対して、多変量解析法に基づく次元縮約などの統計的機械学習手法を適用することにより、神経変性疾患に關与する分子種の発見を目指した。IMSイメージングデータからの特徴抽出としてパーシステントダイアグラムに着目し、多様体学習によって遺伝子ノックアウトマウスと正常脳マウスの脳構造の差異を調査した結果、灰白質・白質・切片試料に塗布するマトリクスに關与する物質と大きく3分類され、さらに、その中で複数の特徴的なクラスター成分に分かれることがわかった。また、野生型とノックアウト型にも有意な差が現れる物質も存在することがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果を發展させることで、遺伝子改変に伴う脳内環境の変化を検出するためのデータ解析法を提案し、多数のサンプルを用いた大規模な解析を通じて、パーキンソン病やレビー小体型認知症などの神経変性疾患に關与するバイオ・マーカーの候補の発見に繋がる。

研究成果の概要（英文）：Recently, the methodologies of imaging mass spectrometry (IMS) are receiving attention in the various fields of science and technology. The data in association with IMS is composed of a huge number of mass spectra according to spatial observation points, which brings difficulty in applications of conventional statistical analysis. In this study, we proposed an approach based on manifold learning for analyzing the IMS data of mice brains. To this end, we introduced a distance measure based on Fisher metric between two persistent diagrams (PDs) associated with mass spectra. Then, we applied the proposed approach to slices of the mice brains and showed that our proposed approach is useful for visualizing a set of the mass spectra as well-separated islands of points in the low-dimensional space, where each island reflects a specific character of chemical species in the brain. We also considered how our results can be interpreted in terms of neurophysiology.

研究分野：複雑系科学

キーワード：質量分析イメージング 多様体学習 計算トポロジー 機械学習 神経変性疾患 バイオマーカー

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、物質的構造としての脳を探索する技術として質量顕微鏡法(Imaging Mass Spectrometry; IMS)が注目を集めている。IMSでは、試料切片にレーザーを照射してイオン化し、質量分析計で質量を計測することで各分子が試料切片のどの部位にどれだけの量が存在するかについて切片上の2次元画像(マススペクトル)として表示される。また、解像度の高いIMSでは 10^4 オーダーのスポット数があり、計測される分子の種類も 10^4 オーダーで存在することから、一つの試料に対する測定で(数万スポット) \times (数万分子種)という膨大なデータ量となり、それをどのように解析するかが課題となっている。

IMS技術の主要な対象の一つとして、パーキンソン病やレビー小体型認知症などの神経変性疾患に関わる脳がある。正常な動物と遺伝子改変した動物に対してIMSで網羅的に取得した全脳ビッグデータから、脳部位や分子種等に関する先見的知識を用いることなしに、脳のどの部位のどの分子種(「脳内環境」)に違いがあるかをデータからボトムアップ的に明らかにすることが出来れば、将来の疾患の発現の予測や治療などへの発展に繋がる。しかしながら、一般に切片試料は生体の個体毎にその形態的特徴は異なり、切片を採る際にも標本固定の仕方や切り出しの過程で脳部位の歪みが生じる。更に、異なる動物で脳部位間の対応関係をとる困難さ等から、異なる脳間のIMSスペクトルをそのままの形で比較することは出来ない。各脳切片のIMSスペクトルに対して特徴量を抽出して類似性や相違性を定量化する数理解析方法が求められている。

2. 研究の目的

本課題では、遺伝子改変に伴う脳内環境の変化を検出するためのデータ解析法を提案し、多数のサンプルを用いた大規模な解析を通じて、パーキンソン病やレビー小体型認知症などの神経変性疾患に関与するバイオ・マーカーの候補の発見に応用するための数理基盤を構築する。IMSデータ独自の特徴であるスペクトル強度関数の非ガウス性や2次元画像としての空間相関に対処するためのデータ解析手法を提案することで、神経変性疾患に関与する分子種の発見を目指す。

3. 研究の方法

脳標本は、研究分担者らが作製した、神経伝達に異常のあることが分かっている遺伝子ノックアウト(KO)マウスを用いる。質量顕微鏡法は、研究分担者らが確立した方法で行い、必要に応じて条件を検討する。

上述の生体サンプル由来データに対する解析結果の生物学的・医学的評価を行い、代表者が中心となってIMSスペクトルデータに一般の正準相関分析(Canonical Correlation Analysis: CCA)を適用した際に生じる問題点を洗い出す。手法としての検討と同時に複数の生体標本に対する解析結果から、IMSスペクトルの特性を捉えたCCAの拡張について検討する。そして、新たな手法を適用した結果が医学・生物学的に適切であるか評価を行う。評価結果のフィードバックにより新たな条件で再解析を行うなど検討を繰り返す。最終的に、汎用的な解析システムを構築する。

4. 研究成果

まず、野生(WT)型とノックアウト(KO)型について各一個体につき2検体ずつ脳切片試料を準備し、その質量顕微鏡イメージングデータを取得した。基本的な統計的性質を調べ、空間平均したスペクトルデータに関してはWT型、KO型双方に大きな違いは見られないことを確認した。また、その確率分布を見ると-1乗のべきに従うという、いわゆるジップ則が見られることが分かった。これらを確認した上で以下の解析を行った。

・主成分分析および多様体学習

スペクトルデータが強い非ガウス性を持つため、事前にデータを平行移動+対数変換した上で主成分分析(PCA)を行った。その結果、第1軸によって大脳前頭部、第2軸によって白質、第3軸によって脳切片外の脳内物質とは関係のないマトリクス由来の物質が分類できることが分かった。さらに、非線形構造を見るためにISOMAPなどの多様体学習を適用した。その結果、通常のPCAでは見られない微細な構造が確認された。

・正準相関分析およびその拡張

正準相関分析(CCA)では相手となる多変量データが変わると変換も変化する。そこで、全てのデータをまとめて相関係数の重みつき和を最適化する一般化CCAを用いることを考え、さらに「WT同士あるいはKO同士は相関を高く、WTとKOの間の相関は低く」という付加情報を反映させた拡張手法を提案した。その結果、生物・医学的解釈はできていないものの、WTとKOで傾向の異なる物質の候補を探索することでできた。しかし、その生物学的解釈をすることまでは至らなかった。

以上の解析結果をまとめて国際会議(北米神経科学学会年会)でポスター発表を行なった。具体的には、まず、野生型マウスおよび遺伝子改変を行なったノックアウトマウスから採取した4つの脳標本スライスに対して質量顕微鏡イメージングによって質量スペクトルを得た。次に、一標本あたり1.5万枚となる質量スペクトル画像列に対して、適当な前処理を施して数千枚程度まで減らした上で、PCAとISOMAPや局所線形埋め込み(LLE)、t-分布確率近傍埋め込み(t-SNE)などの非線形の低次元可視化手法である多様体学習を適用した結果を比較した。t-SNEにおいて画像間の距離をコサイン距離にとった場合、主成分分析の結果に比べて物質特性の違いを反映し

てより詳細なクラスタ構造を得ることができた。しかし、この方法では野生型とノックアウト型の間で分布構造に明確な違いは現れなかった。以上の結果を発表した。また、これまでに行なってきた CCA を一般化した方法(「WT 同士あるいは KO 同士は相関を高く、WT と KO の間の相関は低く」という付加情報を重み係数に反映させた手法)によって野生型とノックアウト型を直接比較する方法を引き続き試みたが、明確な差を抽出することはできなかった。

さらに、IMS イメージングデータからの特徴抽出として計算トポロジーの一手法であるパーシステントダイアグラムに着目し(図1)、t-SNE や ISOMAP などの多様体学習を適用して遺伝子ノックアウトマウスと正常脳マウスの脳構造の差異を調査した(図2)。複数個体のマウスの脳切片の t-SNE マップを比較したところ、まず灰白質・白質・切片試料に塗布するマトリクスに参与する物質と大きく3分類され、さらに、その中で複数の特徴的なクラスタ成分に分かれることがわかった。また、WT 型と KO 型にも有意な差が現れる物質も存在することがわかったため、以上の結果を日本神経科学大会で発表した。しかし、個体数を増やして継続調査したところ、コンシステントな結果(個体の違いは出るが WT と KO に分れない)が得られなかったため、今後の継続研究として、さらに別の個体の脳切片資料に対して新たに解析を行うことにした。また、脳構造の経年変化(老化)を調べるため、若年・成体・老年マウスの脳切片資料から計測したイメージングデータを新たに採取した。以上の研究を継続し、論文執筆などを今後も進める。

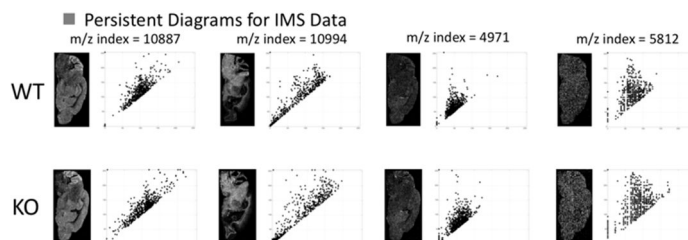


図1: IMS データのパーシステントダイアグラム

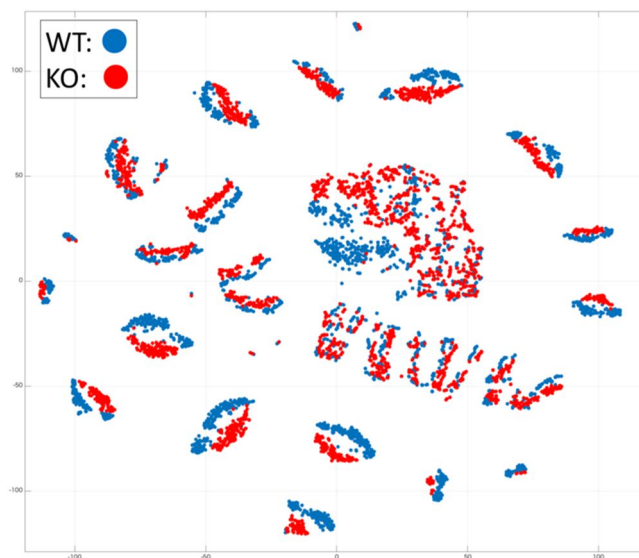


図2: パーシステントダイアグラム間に Fisher 計量に基づく距離を導入し、t-SNE を適用した結果

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Hirahara Y, Wakabayashi T, Mori T, Koike T, Yao I, Tsuda M, Honke K, Gotoh H, Ono K, Yamada H.	4. 巻 140
2. 論文標題 Sulfatide species with various fatty acid chains in oligodendrocytes at different developmental stages determined by imaging mass spectrometry	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J. Neurochem.	6. 最初と最後の頁 435-450
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jnc.13897	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 Shimma S, Kumada H-O, Taniguchi H, Konno A, Yao I, Furuta K, Matsuda T, Ito S	4. 巻 408
2. 論文標題 Microscopic visualization of testosterone in mouse testis by use of imaging mass spectrometry	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Anal Bioanal Chem	6. 最初と最後の頁 7607-7615
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00216-016-9594-9	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 Matsuda T, Suzuki Y, Fujisawa T, Suga Y, Saito N, Suda T, Yao I.	4. 巻 -
2. 論文標題 Imaging mass spectrometry to visualise increased acetylcholine in lungs of asthma model mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Anal Bioanal Chem.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00216-020-02670-0	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 Eto F, Sato S, Setou M, Yao I.	4. 巻 10
2. 論文標題 Region-specific effects of Scrapper on the abundance of glutamate and gamma-aminobutyric acid in the mouse brain	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 7435(10 pages)
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-64277-w	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 Aizawa F, Sato S, Yamazaki F, Yao I, Yamashita T, Nakamoto K, Kasuya F, Setou M, Tokuyama S.	4. 巻 1714
2. 論文標題 N-3 fatty acids modulate repeated stress-evoked pain chronicity	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Brain Res.	6. 最初と最後の頁 218-226
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.brainres.2019.03.001	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 Mihara Y, Horikawa M, Sato S, Eto F, Hanada M, Banno T, Arima H, Ushirozako H, Yamada T, Xu D, Okamoto A, Yamazaki F, Takei S, Omura T, Yao I, Matsuyama Y, Setou M.	4. 巻 698
2. 論文標題 Lysophosphatidic acid precursor levels decrease and an arachidonic acid-containing phosphatidylcholine level increases in the dorsal root ganglion of mice after peripheral nerve injury	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neurosci Lett.	6. 最初と最後の頁 69-75
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neulet.2018.12.035	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5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Hiromichi Suetani, Fumihito Eto, Ikuko Yao
2. 発表標題 A manifold learning approach to imaging mass spectrometry analysis in the mice brains
3. 学会等名 48th Annual Meeting of the Society for Neuroscience 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 末谷大道
2. 発表標題 高次元空間に散らばる対象の隠れた構造を求めて
3. 学会等名 研究会「第5回非線形現象の捉え方」
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ikuko Yao
2. 発表標題 Mass spectrometry imaging for transitional condition of a drug to the mouse brain
3. 学会等名 第1回国際マスイメージングセンターミーティング (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 矢尾育子
2. 発表標題 超解像イメージングによるシナプス伝達制御機構の解析
3. 学会等名 第94回日本生理学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 末谷 大道、衛藤 史博、矢尾 育子
2. 発表標題 多様体学習によるマウス脳質量顕微鏡イメージングデータの解析
3. 学会等名 第42回日本神経科学大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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	矢尾 育子 (YAO Ikuko) (60399681)	関西学院大学・理工学部・教授 (34504)	