

令和元年5月15日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07032

研究課題名(和文) マウス全脳に対応する脳領域名の総数を1から860まで可変な標準脳の構築

研究課題名(英文) Construction of a mouse template brain with variable annotation numbers from 1 to 860

研究代表者

高田 則雄 (Takata, Norio)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・特任講師

研究者番号：50415212

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト脳の磁気共鳴画像法(MRI)では脳座標へ脳領域名が対応した標準脳が存在する。しかしマウス脳には実用的なものが存在しない。関心領域(ROI)の設定が恣意的で、他の研究者のROIを再現できない。Allen研究所がマウス脳の3次元再構成データを2015年に公開した。本研究はこれをMRI解析で利用可能とすることを目的とした。その結果、柔軟なマウス標準脳を構築できた。研究目的に応じて脳領域総数を変更できる。Allen研究所が提供する遺伝子発現や神経投射データを利用して、新たなROIを構築できる。研究者間の共有が容易である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

MRIを用いた脳研究では標準脳の整備が重要である。被験者ごとに異なる形態を示す脳の活動を比較するために用いるからである。ヒト脳ではこれが整備されているが、マウス脳では存在しなかった。本研究は脳部位数を柔軟に変更できるマウス標準脳の作成方法を構築した。研究目的ごとに最適な脳部位数を備えるマウス標準脳が利用可能となった。

研究成果の概要(英文)：In magnetic resonance imaging (MRI) of the human brain, there is a standard brain in which brain region names correspond to brain coordinates. However, there is no practical one in the mouse brain. Region of interest (ROI) has been arbitrary and reproduction of other researchers' ROIs were difficult. Allen Institute released 3D-reconstruction data of the mouse brain in 2015. This study aimed to make it available for MRI analysis. As a result, we constructed a flexible template of the mouse brain. The total number of brain regions is variable according to the research purpose. New ROIs can be prepared using gene expression and neuro-projection data provided by the Allen Institute. Sharing among researchers is straightforward.

研究分野：神経科学

キーワード：標準脳 テンプレート Allen brain 関心領域 MRI fMRI mouse

## 1. 研究開始当初の背景

ヒト脳の MRI 研究では、標準脳 (Talairach や MNI) が整備されており、それらの標準脳へ規格化すれば個別の脳座標から脳領域名へ対応付け可能である (図 1)。ところがマウス脳には脳領域名と対応付けされた実用的な標準脳が存在しない。このため三次元の MRI 脳構造画像を、二次元の脳地図 [1] などと見比べて研究者ごとに領域名を決めている状況である。マウス標準脳を作成した報告はあるが、脳座標に対応する領域名数が少なすぎる。たとえば図 2 では両側の大脳皮質を一つの領域に区分けしている [2, 3]。大脳皮質を 76 に区分けして領域名と対応付けた標準脳が近年公表されたが [4]、視床や脳幹など他の脳部位の区分けがなされないまま 2 年が経過した。脳座標を脳領域名へ対応付けた実用的な標準脳が存在しないため、マウスには精神疾患などのモデル動物が豊富に存在するにもかかわらず、疾患患者の脳活動との直接の比較はほとんどなされていない。

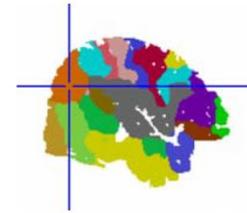


図 1: MNI 標準脳  
ブロードマン領域名ごとに大脳皮質を色分けしてある。

アレン脳科学研究所 (以下 Allen) が「ニッスル標準脳」を近年公開した (図 3 左)、ニッスル染色した脳切片 528 枚を 3 次元再構成し、

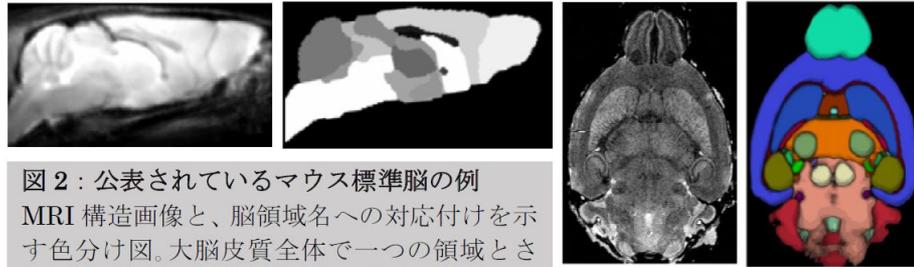


図 2: 公表されているマウス標準脳の例  
MRI 構造画像と、脳領域名への対応付けを示す色分け図。大脳皮質全体で一つの領域とされている。上画像は [2]、右画像は [3] より。

脳座標を 860 の領域名へ対応付けた (図 3 右)、ニッスル標準脳をマウス MRI 脳構造画像の解析へ適用した報告がごく最近なされた [5]。しかし標準化方法 (画像位置合わせなど) の記載はなかった。そのうえ、ニッスル染色脳の脳領域区分けは詳細すぎて、空間解像度の低いマウス脳の MRI 機能画像の解析には不適である。実際、ニッスル標準脳を MRI 機能画像へ適用した報告は存在しない。

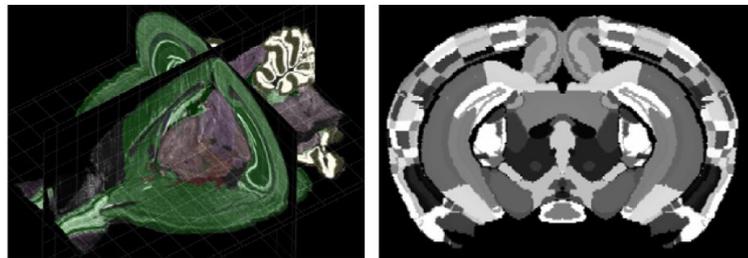


図 3: Allen の “ニッスル標準脳”

左: ニッスル染色脳切片から 3 次元再構築した。  
右: 脳領域名への対応付けを示す色分け図。大脳皮質が層ごとに命名されるなど、脳構造が詳細に分割されている。

参考文献: [1] Paxinos and Franklin 2012 The Mouse Brain [2] Ma et al. 2008 Front Neuroanat [3] Johnson et al. 2010 Neuroimage [4] Ullmann et al. 2013 Neuroimage [5] Calabrese et al. 2015 Cereb Cortex

## 2. 研究の目的

アレン脳科学研究所が公開した、ニッスル染色したマウス脳切片を 3 次元再構成した “ニッスル標準脳” を、MRI 解析で利用可能にすることを本研究の目的とする。そのために「ニッスル標準脳」と「MRI 脳構造画像」との画像位置合わせ方法を最適化する。脳領域の区分け総数 (860) を、研究目的に応じて解剖学的階層性を保ちつつ低下可能にし、MRI 機能画像解析でも利用可能とする。疾患モデルマウスと疾患患者の安静時脳活動を、脳領域名が確定した状態で全脳比較可能になる。具体的には以下に取り組む。

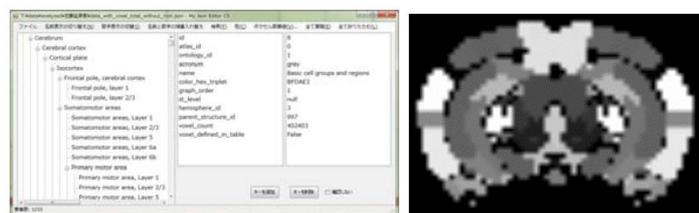


図 7: Allen ニッスル標準脳の領域名 (860 個) を階層表示する自作プログラム

左: 研究協力者佐藤延彦君作。 右: ニッスル標準脳の脳領域総数は MRI 機能画像の解析には多すぎるので、自作プログラムを用いて解剖学的階層性を保持したまま脳分割総数を低下させた。未発表データ

- Allen の「ニッスル標準脳へ、MRI 撮像して得た「マウス脳構造画像」を標準化する手法を確立し、Allen のニッスル標準脳を MRI 機能画像解析にも適用可能とする。解剖学的階層性を保ちながら脳領域の分割数を変更可能な柔軟な標準脳を初めて構築する (図 3 右

と図7右)。

- 野生型マウスおよび疾患モデルマウスの覚醒安静時脳活動を計測し、安静時脳ネットワークを形成する脳領域群の名称を初めて網羅できる。
- これをヒト健常者および疾患患者の安静時脳活動と比較する。マウスとヒトの安静時脳活動で、類似あるいは異なった脳活動を示す脳領域の名称を初めて列挙できる。

### 3. 研究の方法

本研究の目的は、脳座標に脳領域名が詳細に対応しているマウス標準脳を構築し、マウスとヒトの脳活動の比較を促進することである。そのために以下の3つに取り組む：「ニッスル標準脳」へ「マウス MRI 脳構造画像」を標準化する方法を最適化し、脳座標から脳領域名へ変換可能とする。この時に、研究目的に応じて脳分割総数を変更可能とすることで、ニッスル標準脳を MRI 機能画像へも適用可能にする。この標準脳を用いて、野生型マウスと疾患モデルマウスの覚醒安静時脳活動を MRI 撮像し、活動変容を示す脳部位の名称を列挙する、疾患モデルマウスと疾患患者の安静時脳活動を比較し、疾患モデルマウスの妥当性を脳活動の観点から評価する。

初年度には以下に取り組む。

計画1:「ニッスル標準脳」へ「マウス MRI 脳構造画像」を標準化する方法を最適化する

#### 【方法】

マウス MRI データ(構造画像・機能画像)の通常解析では、前処理として“マウス MRI 脳構造画像”を“テンプレート脳画像”へ標準化(標準座標系への位置合わせ+脳の変形)する。この場合には「標準化」に使用する画像の両方(構造画像とテンプレート画像)が MRI の T2 強調画像なので、MRI 画像解析ソフト[SPM([www.fil.ion.ucl.ac.uk/spm/](http://www.fil.ion.ucl.ac.uk/spm/))]に組み込まれている「標準化アルゴリズム」に適合する(例えば両画像間の結合エントロピーを最小化する、つまり座標移動に対して同じタイミングで両方の画像の輝度が変化するように変形させるなど)。

しかし本提案では、MRI で撮像した“脳構造画像”を“ニッスル標準脳”へ標準化する必要がある。質の異なるこれらの画像同士の場合、SPM では標準化に失敗する恐れがある。例えば灰白質は T2 構造画像だと輝度が一樣だが、ニッスル標準脳では神経細胞層部分が明るくなる(輝度変化の空間位置を揃えるアルゴリズムでは適切に標準化できない)。

申請者は予備的な試みとして SPM を用いて構造画像をニッスル標準脳へ標準化してみた(図6)。脳外周の境界線などは目視確認レベルでは良好な結果を得た。しかし脳の内部構造(例えば海馬や線条体など)で位置ズレしている恐れがある。そこで初年度には 3 次元画像表示専用ソフト(Amira, Visage Imaging, Inc.)を入手し、脳内部構造の位置ズレを検討する。標準化に失敗する脳部位が存在した場合には、標準化のパラメータを研究者が詳細に設定可能な専用ソフト[ANTs (Advanced Normalization Tools);([stnava.github.io/ANTs/](https://github.com/stnava.github.io/ANTs/))]を利用する。このソフトは例えば画像内部に目印を設定できるので、標準化困難な脳部位を特定し、両画像に目印をつけることで標準化の失敗を回避する。以上によって、マウス全脳に対して脳座標から脳領域名へ詳細な対応付けがなされた MRI 用の標準脳を構築する。ただし Allen のニッスル標準脳における脳領域総数 860 は詳細すぎて、空間解像度の粗いマウス MRI 機能画像の解析には適用困難である。そこで解剖学的階層性を維持しながら、脳領域数の総数を減少できるプログラムを自作した(図7左)。これによって、例えば同じ脳座標位置だとしても「体性感覚野第4層」だったり「体性感覚野」だったり、研究目的に応じて粗な脳分割(マスク画像)を構築できる。図7右はこのプログラムを用いて、脳分割総数を低下させた例である。図3右と比較すると、例えば大脳皮質の層ごとの分割が無くなっている。以上によって、ニッスル標準脳をマウス MRI 機能画像の解析でも利用可能になる。今後はこのプログラムに指定した脳領域名の入出力機能を持たせて、研究者間でのデータ共有を容易にする必要がある。

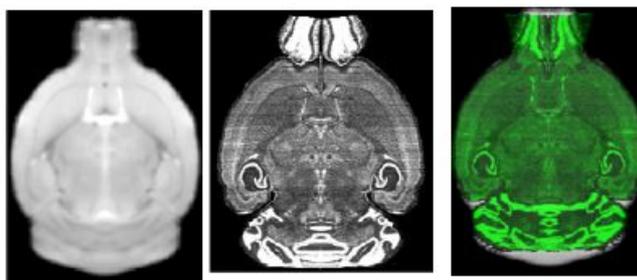


図6: MRI 構造画像をニッスル標準脳へ SPM で標準化した。左:申請者が撮像した T2 強調構造画像。中: Allen のニッスル標準脳、右:重ね合わせた図。脳外周の重なりは良好に見える。未発表データ

申請者は予備的な試みとして SPM を用いて構造画像をニッスル標準脳へ標準化してみた(図6)。脳外周の境界線などは目視確認レベルでは良好な結果を得た。しかし脳の内部構造(例えば海馬や線条体など)で位置ズレしている恐れがある。そこで初年度には 3 次元画像表示専用ソフト(Amira, Visage Imaging, Inc.)を入手し、脳内部構造の位置ズレを検討する。標準化に失敗する脳部位が存在した場合には、標準化のパラメータを研究者が詳細に設定可能な専用ソフト[ANTs (Advanced Normalization Tools);([stnava.github.io/ANTs/](https://github.com/stnava.github.io/ANTs/))]を利用する。このソフトは例えば画像内部に目印を設定できるので、標準化困難な脳部位を特定し、両画像に目印をつけることで標準化の失敗を回避する。以上によって、マウス全脳に対して脳座標から脳領域名へ詳細な対応付けがなされた MRI 用の標準脳を構築する。ただし Allen のニッスル標準脳における脳領域総数 860 は詳細すぎて、空間解像度の粗いマウス MRI 機能画像の解析には適用困難である。そこで解剖学的階層性を維持しながら、脳領域数の総数を減少できるプログラムを自作した(図7左)。これによって、例えば同じ脳座標位置だとしても「体性感覚野第4層」だったり「体性感覚野」だったり、研究目的に応じて粗な脳分割(マスク画像)を構築できる。図7右はこのプログラムを用いて、脳分割総数を低下させた例である。図3右と比較すると、例えば大脳皮質の層ごとの分割が無くなっている。以上によって、ニッスル標準脳をマウス MRI 機能画像の解析でも利用可能になる。今後はこのプログラムに指定した脳領域名の入出力機能を持たせて、研究者間でのデータ共有を容易にする必要がある。

次年度以降は以下に取り組む。

計画2:野生型マウスと疾患モデルマウスの覚醒安静時脳活動を MRI 撮像し、安静時脳ネットワーク群を構成する脳部位名を列挙する

【方法】野生型マウスと強迫性神経障害(OCD)モデルマウス(下記参照)それぞれ10匹から覚醒安静時の脳活動を MRI 撮像する。計測時間は1動物当たり10分間を2回繰り返す。fMRI 撮像には GRE-EPI 法を用いる。空間解像度は冠状断面内で  $0.2 \times 0.2 \text{ mm}^2$ 、吻側尾側方向に  $0.5 \text{ mm}$  を用いる。撮像間隔は  $1.5 \text{ 秒}$  とする。MRI データ解析ツールである gift や conn を利用して、独立成分分析や相関解析などを行い、安静時脳活動ネットワーク群を抽出する。初年度で構築した「脳分割総数を低下させた標準脳」を MRI 機能画像へ適用し、安静時脳ネットワーク

群にどの脳部位が含まれているのか、その脳領域名を列挙する。

計画 3: マウス (野生型・OCD モデルマウス) の安静時脳活動と、ヒト (健常者・OCD 疾患患者) のそれとを比較する

【方法】疾患モデルマウスの安静時脳活動を、疾患患者のそれと脳部位ごとに比較する。なお疾患モデルマウスに OCD モデルを用いる理由は、光遺伝学的に OCD モデルマウスを作成する手法が確立しており[6]、申請者が所属する研究室でこのモデルマウスが作出されているからである。その作出方法とは、線条体に光感受性陽イオンチャネル (ChR2) が発現している遺伝子改変マウスの線条体を光照射によって繰り返し活性化することである。覚醒 OCD モデルマウスの安静時脳活動の予備データは取得してある (図 9)。OCD 患者では健常者と比較して、機能的結合の亢進脳部位が複数特定されている (前頭皮質と腹側線条体など)。OCD モデルマウスの脳活動が、患者の脳活動をどの程度反映しているのか明らかとなる。参考文献: [6] Ahmari 2013 Science



図 9: OCD モデルマウスの覚醒安静時脳活動冠状断面図。GRE-EPI 法を用いた。未発表データ

#### 4. 研究成果

ヒト脳の磁気共鳴画像法 (MRI) では脳座標へ脳領域名が対応した標準脳が存在する。しかしマウス脳には実用的なものが存在しない。このために機能的 MRI (fMRI) データを解析するには、任意の位置を中心とする球形の関心領域 (ROI) をマウスの脳内に配置して用いることが一般的であった (例えば PLoS One 10:e0121417, 2015)。この結果、他の研究者が用いた ROI を再現できず、解析結果の再現性を得ることは困難だった。近年 (2015 年) アレン脳科学研究所がマウス脳を 3 次元再構成したデータを公開した (CCFv3; common coordinate framework version 3)。脳座標に 800 以上の領域名が対応する。さらに CCFv3 は、アレン脳科学研究所が提供する遺伝子発現や神経投射データと互換性を持つ。ただしこの CCFv3 を MRI データの解析にそのまま利用することはできない。脳部位の分割が詳細すぎて、fMRI データ解析に不適であることや、CCFv3 データは MRI 画像ではなく連続 2 光子断層撮影法を用いて撮像されたデータであるために、MRI 画像との位置合わせがそのままでは困難であるためである。そこで本研究ではアレン研究所の CCFv3 標準脳を MRI 解析で利用可能とすることを目的とした。「CCFv3 標準脳」と「MRI 脳構造画像」との画像位置合わせ方法を最適化しただけでなく、脳領域の区分け総数 (860) を、研究目的に応じて解剖学的階層性を保ちつつ自在に変更可能とした。さらに Allen 研究所が提供する遺伝子発現や神経投射データを用いた ROI 分割を実現した。本研究はマウス脳について、研究目的に応じた柔軟な ROI 作成を実現すると共に、研究間の ROI の一貫性と再現性の向上を可能とした。上記の成果を報告する論文を執筆中である。またこれを用いた論文を 2 報作成中である。またこれを活用した共同研究の問い合わせを受けている。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

1. Norio Takata\*, Kohei Kusayanagi, Hironori Maruyama, Kenji Eitai, Masaaki Abo, Fumihiko Akiyama, Ryo Tajima, Shinsuke Inaba, Kenji F. Tanaka, Masaru Mimura, Kaoru Sanaka\*, "Visualization of myelinated fiber bundles orientation during brain slice preparation by reflection polarized light microscopy" Microscopy Research and Technique, 81, 2018, 10.1002/jemt.23077, 査読あり
2. Norio Takata\*, Yuki Sugiura, Keitaro Yoshida, Miwako Koizumi, Hiroshi Nishida, Kurara Honda, Ryutaro Yano, Yuji Komaki, Ko Matsui, Makoto Suematsu, Masaru Mimura, Hideyuki Okano, Kenji F. Tanaka\*, "Optogenetic astrocyte activation evokes BOLD fMRI response with oxygen consumption without neuronal activity modulation" Glia, 66(9):2013-2023, 2018, 10.1002/glia.23454, 査読あり

〔学会発表〕(計 4 件)

1. 高田則雄、シンポジウム「全脳生理学: げっ歯類 fMRI と神経生理学とを融合した試み」、視床を抑制する視床網様核の新規振動活動は安静時の全脳活動を規定する、第 42 回日本神経科学会、2019 年 7 月 (予定)
2. 高田則雄、シンポジウム Unlocking the Brain from Engineering Approaches, Causal evidence of BOLD-fMRI signal generation by astrocytes without neuronal activation, The 2nd FRIS-TFC Joint Symposium, 2019 年 1 月
3. 高田則雄、夏堀晃世、三村将、田中謙二、視床を抑制する視床網様核の集合 Ca<sup>2+</sup>活動は新規発振現象を示す、第 41 回日本神経科学会 (ポスター発表)、2018 年 7 月

〔その他〕

1. 高田則雄、脳科学辞典「マイネルト基底核」10.14931/bsd.3497

6. 研究組織

(1)研究分担者  
無し

(2)研究協力者  
無し

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。