

令和 6 年 5 月 20 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19261

研究課題名（和文）ニューロンレベル脳・人工脳インターフェース

研究課題名（英文）Neuron-level brain-artificial brain interface

研究代表者

三上 秀治（Mikami, Hideharu）

北海道大学・電子科学研究所・教授

研究者番号：60754976

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：線虫の脳神経系を対象として、任意の光操作パターン刺激および神経活動記録を行うための基盤技術開発を行った。具体的には、独自開発の高速ライトシート顕微鏡右方による線虫頭部ニューロン群の検出、ホログラフィ技術を用いた特定のニューロン群を選択的に光操作するシステムの構築、高速3D撮像結果より各ニューロンの位置および神経活動をリアルタイムに計算するプログラムの開発を行った。これらにより、自由行動中の線虫に対し、1ニューロン単位での光操作および神経活動の記録が実行できる見込みを得た。開発技術により得られるデータを用いることで、従来よりも正確な神経系のモデル構築が可能となる見込みである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、脳神経系のはたらきを理解するという自然科学の一つの究極的な目標に対して、光操作と光観察を組み合わせた新たな方法論の開拓により迫るものであり、高い学術的意義を有する。実際、線虫の比較的単純な脳神経系に対してすら、神経活動の記録および操作技術が未熟であるがゆえに、神経ネットワークの動作原理は不明のままである。本研究において、観察及び操作にかかわる光学技術およびそれらに伴う画像処理などの情報技術を開拓することで、神経系の動作機序解明のための新たなアプローチとなりうるということがわかり、神経科学、光学、情報科学の分野をまたいだ学術的価値を創造したといえる。

研究成果の概要（英文）：We have developed basic technologies for arbitrary light manipulation pattern stimulation and neural activity recording in the *C. elegans* cranial nervous system. Specifically, we detected a group of neurons in the head of *C. elegans* using our original high-speed light-sheet microscope, constructed a system to selectively manipulate specific groups of neurons using holography technology, and developed a program to calculate the position and neural activity of each neuron in real time based on the results of high-speed 3D imaging. The results of these studies were used to develop a system to selectively manipulate specific groups of neurons using holographic technology. The system is expected to enable optical manipulation and recording of neuronal activity of a single neuron in freely behaving *C. elegans*. Using the data obtained by the developed technology, it is expected to be possible to construct a more accurate model of the nervous system than before.

研究分野：バイオフォトニクス

キーワード：光遺伝学 ホログラフィ 高速イメージング 3Dイメージング

## 1. 研究開始当初の背景

脳の働きを理解することは自然科学の究極的な目標のひとつであり、心理学、哲学などの人文科学にも直結する壮大なテーマである。特に線虫やゼブラフィッシュなどの比較的単純な神経ネットワークを持つモデル生物を用いた神経系の研究は、神経系を持つ生物に共通する脳神経の根源的な働きを理解するために欠かせない。しかしながら、これらの単純なモデル生物に対してすら、外部環境の刺激に対して神経ネットワークがどのように応答し、内在する記憶とともにどう行動に結びついているかという基本的な問いについていまだ不明な点が多い。その主たる理由は、神経系の活動を1ニューロンレベルで操作・測定する技術が未熟であること、外部刺激に対する神経ネットワークのふるまいが複雑過ぎて解析困難であること、の2点が挙げられる。このため、より高精度に神経系の記録および操作が可能な装置技術とともに、そのような装置から得られたデータをもとに神経系のネットワークの推定を行う新たな方法論の確立が求められている。

## 2. 研究の目的

比較的神経系が単純なモデル生物である線虫 (*Caenorhabditis elegans*) の神経系を対象として、任意のパターンで神経活動の操作と測定を同時に行い、入力(刺激)と出力(神経活動)の関係を解析する、新しい方法論を創出することを目的とする。特に、大規模かつ1ニューロンレベルで神経活動の操作および記録が可能な光学技術およびそれに伴う画像処理などの情報技術の開発を行うとともに、取得されるデータセットに基づく解析方法の検討を行うこととした。

## 3. 研究の方法

(1) 3次元蛍光撮像による神経活動記録: 高速に3次元蛍光撮像が可能な、独自開発の高速ライトシート顕微鏡を用いて線虫の頭部神経群を撮像し、神経細胞の検出及び神経活動の抽出を試みた。自由行動中の線虫に対して撮像することを想定し、適切な観察パラメータ(励起光の照射光量、撮像倍率、露光時間等)の調整を行うとともに、3D蛍光画像の時系列データから細胞群を検出、追跡する解析ソフトウェア3DeeCellTracker(引用文献①)を用いて神経細胞核の検出を行った。

(2) 光操作システムの開発: 線虫頭部神経の特定のニューロン群を選択的に光操作により刺激するための二光子励起光学システムを開発した。具体的には、空間光変調器を用いたデジタルホログラフィに基づく3次元集光パターンの生成を行うとともに、標的となる細胞の大きさに適合した集光ビームプロファイル形成のために時間集光の技術を取り入れ、これらを統合した光学システムを設計、構築した。

(3) リアルタイム画像処理プログラムの開発: 自由行動線虫に対して標的となるニューロンに光操作のための励起レーザー光を集光するため、リアルタイムに細胞位置を検出するアルゴリズムおよびプログラムの開発を行った。具体的には、上記の高速ライトシート顕微鏡から出力される生データに対して座標変換処理を施したのちに3D細胞位置を検出し、集光位置座標を決定する計算処理を100ミリ秒以内に行うことを目標としてアルゴリズム検討および実装を行った。

(4) 解析手法の検討: 光操作パターンと光観察パターンのデータセットに基づき、神経ネットワークの推定を行う手法の調査および検討を行った。

## 4. 研究成果

(1) 3次元蛍光撮像による神経活動記録: 撮像パラメータを適切に調整することにより、従来の報告よりおよそ1桁高速な、50Hzでの線虫頭部神経の撮像に成功した。さらに、この撮像データを3DeeCellTrackerで解析し、少なくとも140個のニューロンの検出および追跡が可能であることを確認した。

(2) 光操作システムの開発: デジタルホログラフィおよび時間集光を導入した光学システムを実際に構築し、フェムト秒レーザーパルスを集光した際の点像分布関数(二光子励起効率の空間プロファイル)を $0.5\mu\text{m}$ の蛍光ビーズ資料を用いて計測したところ、面内方向、深さ方向のいずれも半値全幅でおよそ $2\mu\text{m}$ 程度となり、おおむね設計通りの点像分布関数が得られた。これは線虫の神経細胞を選択的に励起するのに適切な大きさであり、1細胞分解能で任意の組み合わせのニューロンを光操作できる見込みを得た。デジタルホログラフィに使用した空間光変調器はおよそ400Hzで切り替え可能であり、移動するニューロン群を追跡しつつ、光操作パターンを変調するのに十分な速度である。

(3) リアルタイム画像処理プログラムの開発: 10個程度のニューロンを対象としてリアルタイムに細胞を検出・追跡するプログラムを実装した。実装の際には、計算リソースとしてCPUとGPUを想定し、計算時間の比較を行った。結果、CPUを用いて約60msで撮像から光操作までの動作を行う見込みが得られ、自由行動線虫に対して開発装置が適用できる見込みを得た。

(4) 解析手法の検討：ごく最近報告されたモデルである gKDR-GMM を用いることとした。本モデルは実際の線虫の神経活動データから構築された、神経活動の時系列変化のモデルである。本研究で開発したシステムでは新たに神経活動とそれに対応する光操作パターンのデータセットが得られる見込みであり、本モデルの検証・修正を行うことにより、正確に線虫の神経系を表現するモデルの構築につながることを期待される。(引用文献②)

<引用文献>

- ① Chenta Wen. et al., 3DeeCellTracker, a deep learning-based pipeline for segmenting and tracking cells in 3D time lapse images. *eLife* 10, e59187 (2021).
- ② Yu Toyoshima. et al., Ensemble dynamics and information flow deduction from whole-brain imaging data. *PLOS Computational Biology* 20 (3), e1011848 (2024).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 三上秀治	4. 巻 37
2. 論文標題 高速蛍光顕微鏡	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BIO Clinica	6. 最初と最後の頁 51-54
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 6件 / うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Hideharu Mikami
2. 発表標題 High-Speed Fluorescence Microscopy and Beyond
3. 学会等名 APPC15（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hideharu Mikami
2. 発表標題 High-speed fluorescence microscopy for future neuroscience
3. 学会等名 NEURO 2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hideharu Mikami
2. 発表標題 High-speed fluorescence microscopy for next-generation life science
3. 学会等名 The University of Melbourne and Hokkaido University Workshop on Therapeutic Nanomaterials（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 三上秀治
2. 発表標題 高速光シート顕微鏡の原理と応用
3. 学会等名 光シート顕微鏡ワークショップ（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 三上秀治
2. 発表標題 最先端光学顕微鏡で生体からビッグデータを取得する
3. 学会等名 文部科学省 学術変革領域研究 2022年度市民公開シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 三上秀治
2. 発表標題 形態解析技術とともに進化する高速蛍光顕微鏡
3. 学会等名 第4回 形態解析ワークショップ（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hideharu Mikami
2. 発表標題 High-Speed Light-Sheet Microscopy Using Scanned Multi-Plane Imaging
3. 学会等名 Focus on Microscopy 2023（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Hideharu Mikami
2. 発表標題 High-speed fluorescence microscopy for next-generation life science
3. 学会等名 Biomedical Imaging and Sensing Conference 2023 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 村山風輝
2. 発表標題 多段階深層学習ネットワークによる高速ライトシート顕微鏡画像の高解像度化
3. 学会等名 第32回バイオイメージング学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kazuki Mukumoto
2. 発表標題 The 24th RIES-HOKUDAI International Symposium
3. 学会等名 Whole-brain neural activity analysis of freely moving Caenorhabditis elegans by deep learning-based software (国際学会)
4. 発表年 2023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
研究協力者	冨菜 雄介  (Tomina Yusuke)		

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	石島 歩  (Ishijima Ayumu)		
研究協力者	飯野 雄一  (Iino Yuichi)		
研究協力者	豊島 有  (Toyoshima Yu)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関