

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 4 月 18 日現在

機関番号：32644

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25610126

研究課題名(和文)脳神経回路の自動解析法の開拓

研究課題名(英文)Computerized model building of brain neuronal network

研究代表者

水谷 隆太(Mizutani, Ryuta)

東海大学・工学部・教授

研究者番号：70272482

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：脳の神経回路は、多数のニューロンがネットワークを形成して成り立っている。脳神経回路の解析を進めるためには、複雑な神経ネットワークの構造をトレースして、三次元モデルを構築する必要がある。そこで本研究では、専用のアルゴリズムを用いて三次元像を機械解釈させ、コンピュータによるモデル構築を目的として測定・解析を進めてきた。解析では、ネットワークを構成する線状の構造を検知する方法として、二次元画像で知られている様々な方法を検討し、自動的なトレースを実現した。本研究の一部は米国顕微鏡学会誌Microscopy Today 2015年9月号のFeature Articleとして公表されている。

研究成果の概要(英文)：Brain is composed of a huge number of neurons, which constitute neuronal circuits. The first step to analyzing such brain circuits is to trace neuronal networks to build three-dimensional models of their complicated structures. In this study, we have developed methods for building three-dimensional models by tracing neuronal networks. We evaluated a number of algorithms reported for tracing wire-form structures in two-dimensional images. Some of those methods were proven to be effective in the computerized building of neuronal network model. A part of this study has been published as a feature article of the September 2015 issue of Microscopy Today, the official publication of the Microscopy Society of America.

研究分野：構造生物学

キーワード：神経回路 マイクロCT

### 1. 研究開始当初の背景

脳の神経回路は、多数のニューロンがネットワークを形成して成り立っている。脳神経回路の解析を行うためには、(1) 脳組織の微細構造を三次元的に可視化し、(2) 得られる三次元像を解釈してネットワークモデルを構築し、(3) これを神経回路に変換する、という3ステップを経なくてはならない。

ニューロンレベルでの神経回路の研究は世界的にも端緒についたところであり、ステップ2のモデル構築も手作業で行われるのが現状である。このため、解析に多大な時間と労力を要し、ネットワーク構造を構築した報告は少数に限られる。神経回路の解析を広く行っていくためには、モデル構築の自動化が必須である。

そのような自動化を困難にしている原因としては、対象となる脳組織が、ニューロン・グリア・血管など多数の構造要素からなる複雑な三次元構造を有している点が多い。このため、得られる構造は一目見ただけでは理解することが容易でなく、これが解釈を難しくしている。何らかのアルゴリズムによって神経ネットワークの構造の特徴を抽出できれば、人の手によらずに機械解釈が可能になる。

データ量という点から見ても、三次元像の解釈は困難を伴う。測定結果が二次元的な画像でなく三次元的であることで、画像の情報量は飛躍的にふくれあがる。標準的な三次元像の1回の測定でも10GBを超えるデータが得られ、疾患例と健常例を比較しようとするれば、測定を検体ごとに何回も繰り返す上に、複数の症例を複数の検体にわたって解析することが求められる。このような作業を人の手で行うことは現実的でない。

以上のような理由から、脳組織の三次元像の解釈では、コンピュータを用いた機械解釈を行うことが適当と考えられる。しかし、得られる三次元像には像の乱れや試薬の沈着など、実験的なノイズも含まれる。これらは、人間が観察する場合には、検討の対象とならないが、コンピュータによる解析にあたっては、解釈の対象とならないように除外するプロセスも必要となる。

これらポイントの他にも、得られる結果を検討しやすい形で(たとえば数値ファイルの出力としてでなく、三次元構造そのものの表示として)提示する機能も必要である。以上のような自動解析で求められる技術的な要求を実現できれば、脳神経回路の自動解析に大きく近づく。

### 2. 研究の目的

そこで本研究では、様々なアルゴリズムを用いて三次元像を機械解釈させ、コンピュータにより神経ネットワークのモデルを構築させることを目的とした。各種の機械解釈の方法を考案したり、他分野で用いられているアルゴリズムを取り入れて、その有効性を検

討した。同時に、方法のロバスト性を高めるために、解析の対象となるヒト脳組織の三次元像の測定を行い、実際の組織像を対象として解析法の検証を行った。

### 3. 研究の方法

脳組織の構造を自動解析するために、各種のアルゴリズムを考案してソフトウェアに実装することや、それを実際の脳組織像に適用する研究を進めた。解析対象となる組織像を得る際には、組織検体を重元素で標識し、放射光施設 SPring-8 において測定実験を行った。以下ではそれら各項について簡単に述べる。

神経ネットワークの構造は、ニューロンの細胞体の粒状構造と、そこから伸びる軸索・樹状突起の線状構造が主要な構成要素である。特に三次元的なネットワークを構成する線状の構造を検出する方法と、それをトレースする段階が、三次元像の機械解釈の上ではポイントとなる。そこで、報告されている様々な方法や、専用のアルゴリズムを検討する等して、神経ネットワークの三次元像の解析へ応用する場合の有効性を検討した。また、当初計画には含まれていなかったが、最近のディープラーニング(深層学習)の技術の進展を取り入れるため、同法を三次元像に適用するための検討等も一部行った。

実際の解析像では、毛細血管の構造や、試薬の沈着等による実験的なノイズが含まれる。神経ネットワークを解析する本研究の目的からは、対象とならない構造部分を除外することも必要になる。そこで、三次元的な構造部分の体積や形状等を迅速に求めるアルゴリズムを検討して、プロトコルに組み込んだ。これら各種の解析法の検討では、物品や謝金の支出を充当した。

解析で用いるヒト脳組織の三次元像は、医療用CTスキャンの原理を用いたX線マイクロトモグラフィ法により行った。一般の臨床で用いられるCTスキャナは、空間分解能がミリメートル単位であるが、マイクロトモグラフィ法ではナノ~マイクロメートル単位の解析が可能である。そのような測定のために、放射光施設 SPring-8 において測定課題を申請・取得し、施設に赴いて測定実験を実施した。ナノメートル単位の構造解析では、X線光学素子を用いた高度な測定が必要となる。このため、放射光施設の研究者と協力して、方法論の開発や分解能の評価方法の検討等も併せて行った。これらのために、旅費と施設利用の際の消耗品実費負担の支出を行った。

自動解析では、得られたデータを逐次参照して解析することになる。そのために、テラバイト単位の三次元像を処理していくことが必要であり、物品費によりハードディスクアレイとRAIDインターフェースを整備して研究に供した。

ヒト脳組織の検体を本研究で用いることに関しては、東海大学医学部臨床研究審査委

員会において平成 19 年度にヒアリングおよび書面審査を受け、その後も各種変更申請や更新の申請を行って、実施が認められてきている。また、平成 23 年度からは、東海大学「人を対象とする研究」に関する倫理委員会においても年度毎の審査を受け、継続して実施が認可されてきている。本研究はこれら倫理に関する審査において認められた条件の下で実施している。

#### 4. 研究成果

本研究に関連する成果は方法論の開発から応用した結果まで多岐にわたるが、ここではヒト脳組織の三次元像の自動解析に焦点を絞って紹介する。脳組織像を解析するプロセスでは、目的構造を識別する方法と、ネットワーク構造をトレースする段階が最も重要なポイントとなる。

解析の最初に行うべきステップは、機械解釈の対象とならない領域をマスクすることである。そのような領域としては、毛細血管を含む血管構造や、測定検体を準備する段階で用いる試薬の沈着による不定形の構造等がある。いずれも大きな体積を有する複雑な構造をもつことから、画像中で幾何学的に接続している構造の体積や形状パラメータを指標にして、マスクすべき部分を識別するアルゴリズムを実装した。従来は、毛細血管を神経ネットワークと誤認して、トレースしてしまう事例が見られたが、このマスク法を適用することで、そのような誤認識をほぼなくすることが可能になった。

次に重要となるステップは、線状の構造を抽出するフィルター手法である。ネットワーク構造の自動解釈では、トレースの開始点を定めるステップと、ある点からつぎの点にトレースを進めるステップが必要であり、それぞれで最適な方法を検討した。線状の構造を検知する方法では二次元画像に適用できる方法として様々なものが知られているが、中でも Sobel フィルター法と gradient vector flow 法がヒト脳組織の三次元像においても有効であった。各種の測定例に適用した結果、gradient vector flow 法でトレース開始点を定め、Sobel フィルターでトレースを継続する方法が最も良好な結果を与えた。

本研究に関連して、研究期間後半には米国顕微鏡学会から研究全般について学会誌上で紹介するよう依頼があり、本研究の一部を含めた成果が同学会誌 *Microscopy Today* 2015 年 9 月号の Feature Article として公表されている [雑誌論文 4]。そこで掲載したヒト脳の神経ネットワーク構造の解析例を右図 1 に示す。その他詳細な研究成果は、英文査読誌に原著論文等として発表している。

YouTube においては、誰にでもわかる形で研究成果を還元することを目指して、得られた三次元構造を動画で公開している [下記その他 YouTube チャンルの項]。また、和文での研究解説として、日本放射光学会や日本顕

微鏡学会の各学会誌からの依頼に基づき、解説論文 [8,13] も発表している。

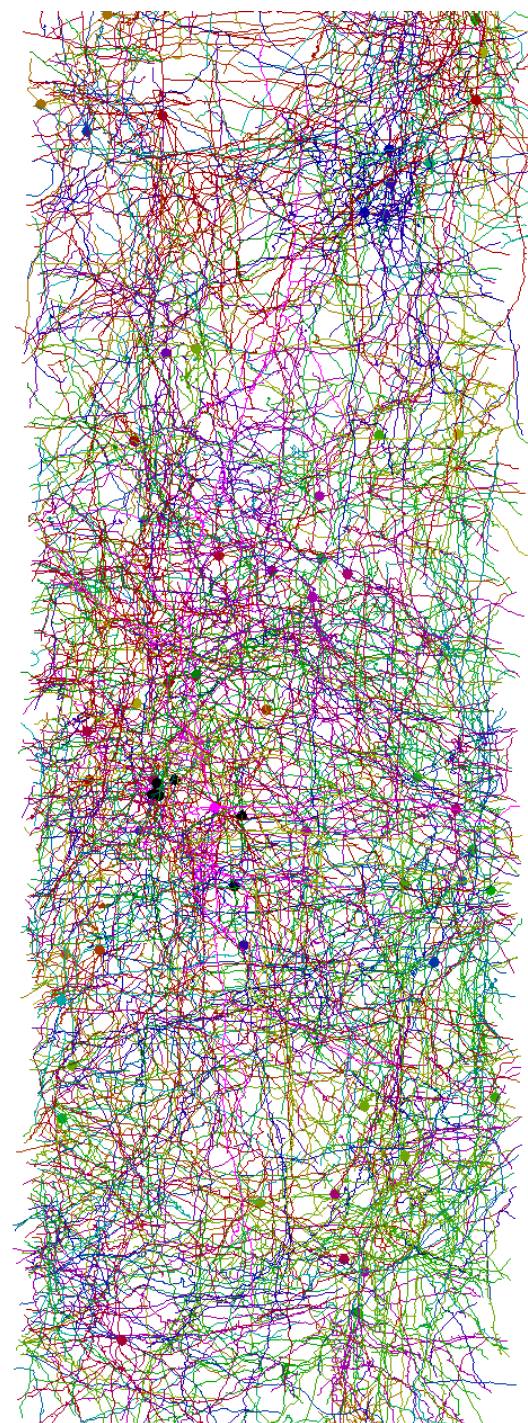


図 1 . ヒト脳の神経ネットワーク構造の解析例。ニューロン毎に色分けし、丸で細胞体の位置を示している。Reprinted from ref. 4 with permission.

#### 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 16 件)

\*Corresponding author

1. \*Ryuta Mizutani, Rino Saiga, Susumu Takekoshi, Chie Inomoto, Naoya Nakamura,

- Masanari Itokawa, Makoto Arai, Kenichi Oshima, Akihisa Takeuchi, Kentaro Uesugi, Yasuko Terada, and Yoshio Suzuki (2016). A method for estimating spatial resolution of real image in the Fourier domain. *J. Microsc.* **261(1)**, 57-66. 査読有 DOI: 10.1111/jmi.12315
2. Rino Saiga, \*Ryuta Mizutani, Chie Inomoto, Susumu Takekoshi, Naoya Nakamura, Akio Tsuboi, Motoki Osawa, Makoto Arai, Kenichi Oshima, Masanari Itokawa, Kentaro Uesugi, Akihisa Takeuchi, Yasuko Terada, and Yoshio Suzuki (2016). Three-dimensional structure of brain tissue at submicrometer resolution. *AIP Conf. Proc.* **1696**, 020004. 査読有 DOI: 10.1063/1.4937498
  3. \*Yoshio Suzuki, Akihisa Takeuchi, Yasuko Terada, Kentaro Uesugi, and Ryuta Mizutani (2016). Recent progress of hard x-ray imaging microscopy and microtomography at BL37XU of SPring-8. *AIP Conf. Proc.* **1696**, 020013. 査読有 DOI: 10.1063/1.4937507
  4. \*Ryuta Mizutani, Rino Saiga, Susumu Takekoshi, Makoto Arai, Akihisa Takeuchi, and Yoshio Suzuki (2015). Scanning Brain Networks with Micro-CT. *Microscopy Today* **23(5)**, 12-17. 査読有 DOI: 10.1017/S1551929515000784 【invited, feature article】
  5. \*Ryuta Mizutani, Rino Saiga, Kentaro Uesugi, Akihisa Takeuchi, Yasuko Terada, and Yoshio Suzuki (2015). X-ray tomographic microscopy of Drosophila brain network and skeletonized model building in the three-dimensional image. *Microsc. Microanal.* **21(S3)**, 917-918 (2015). 査読有 DOI: 10.1017/S1431927615005383
  6. Rino Saiga, Susumu Takekoshi, Chie Inomoto, Naoya Nakamura, Akio Tsuboi, Motoki Osawa, Makoto Arai, Kenichi Oshima, Masanari Itokawa, Kentaro Uesugi, Akihisa Takeuchi, Yasuko Terada, Yoshio Suzuki, and \*Ryuta Mizutani (2015). Three-dimensional neuronal structure of human cerebral cortex determined by synchrotron-radiation microtomography. *Microsc. Microanal.* **21(S3)**, 919-920 (2015). 査読有 DOI: 10.1017/S1431927615005395
  7. \*Masato Ohtsuka, Hiromi Miura, Keiji Mochida, Michiko Hirose, Ayumi Hasegawa, Atsuo Ogura, Ryuta Mizutani, Minoru Kimura, Ayako Isotani, Masahito Ikawa, Masahiro Sato and Channabasavaiah B Gurumurthy (2015). One-step generation of multiple transgenic mouse lines using an improved Pronuclear Injection-based Targeted Transgenesis (i-PITT). *BMC Genomics* **16(1)**, 274. 査読有 DOI: 10.1186/s12864-015-1432-5
  8. \*水谷隆太, 雑賀里乃, 竹内晃久, 上杉健太郎, 寺田靖子, 鈴木芳生 (2014). SPring-8 放射光による神経回路ネットワークの解析. *顕微鏡* **49(3)**, 222-225. 査読有 [http://www.microscopy.or.jp/magazine/49\\_3/49\\_3j13rm.html](http://www.microscopy.or.jp/magazine/49_3/49_3j13rm.html) 【依頼による】
  9. \*Hideshi Yokoyama and Ryuta Mizutani (2014). Structural biology of DNA (6-4) photoproducts formed by ultraviolet radiation and interactions with their binding proteins. *Int. J. Mol. Sci.* **15**, 20321-20338. 査読有 DOI: 10.3390/ijms151120321 【invited】
  10. \*Ryuta Mizutani, Rino Saiga, Akihisa Takeuchi, Kentaro Uesugi and Yoshio Suzuki (2014). Three-dimensional analysis of neuronal circuits of the human brain by X-ray microtomography. *SPring-8 Information* **19(3)**, 225-229. <https://user.spring8.or.jp/sp8info/?p=31574> 【依頼による】
  11. \*Ryuta Mizutani, Yusuke Shimizu, Rino Saiga, Go Ueno, Yuki Nakamura, Akihisa Takeuchi, Kentaro Uesugi, and Yoshio Suzuki (2014). Spatiotemporal development of soaked protein crystal. *Scientific Reports* **4**, 5731. 査読有 DOI: 10.1038/srep05731
  12. \*Ryuta Mizutani, Rino Saiga, Akihisa Takeuchi, Kentaro Uesugi and Yoshio Suzuki (2013). Three-dimensional network of Drosophila brain hemisphere. *J. Struct. Biol.* **184(2)**, 271-279. 査読有 DOI: 10.1016/j.jsb.2013.08.012
  13. \*水谷隆太, 雑賀里乃 (2013). Determination of neuronal circuit of human cerebral cortex by using X-ray microtomography. X線マイクロトモグラフィ法によるヒト大脳神経回路の決定. *J. Jpn. Soc. Synchrotron Radiat. Res. 放射光* **26(5)**, 268-275. 査読有 <http://www.jssrr.jp/journal/26-5.html> 【依頼による】
  14. \*Ryuta Mizutani, Keisuke Taguchi, Masato Ohtsuka, Minoru Kimura, Akihisa Takeuchi, Kentaro Uesugi, and Yoshio Suzuki (2013). X-ray microtomographic visualization of *Escherichia coli* by metalloprotein

- overexpression. *J. Synchrotron Radiation* **20(4)**, 581-586. 査読有 DOI: 10.1107/S0909049513008467
15. \*Hideshi Yokoyama, Ryuta Mizutani, and Yoshinori Satow (2013). Structure of a double-stranded DNA (6-4) photoproduct in complex with the 64M-5 antibody Fab. *Acta Crystallographica* **D69**, 504-512. 査読有 DOI: 10.1107/S0907444912050007
  16. \*Yosuke Masuda, Yasushi Nitani, Ryuta Mizutani and Shuji Noguchi (2013). Crystal structure of 6-guanidinohexanoyl trypsin near the optimum pH reveals the acyl-enzyme intermediate to be deacylated. *Proteins* **81(3)**, 526-530. 査読有 DOI: 10.1107/S0907444912000327
- [学会発表](計16件)
- \*Corresponding author
1. 藤巻知央, 菊池亜弥, 蓮見真子, 竹腰進, 井野元智恵, 中村直哉, 坪井秋男, 大澤資樹, 新井誠, 大島健一, 糸川昌成, 上杉健太郎, 竹内晃久, 寺田靖子, 鈴木芳生, 雑賀里乃, \*水谷隆太 (2015.12.1). ヒト大脳皮質の神経回路の三次元解析. 第88回日本生化学会大会, 神戸国際会議場 (兵庫県神戸市).
  2. Rino Saiga, Susumu Takekoshi, Chie Inomoto, Naoya Nakamura, Akio Tsuboi, Motoki Osawa, Makoto Arai, Kenichi Oshima, Masanari Itokawa, Kentaro Uesugi, Akihisa Takeuchi, Yasuko Terada, Yoshio Suzuki, \*Ryuta Mizutani (2015.8.4). Three-Dimensional Neuronal Structure of Human Cerebral Cortex Determined by Synchrotron-Radiation Microtomography. Microscopy & Microanalysis 2015 Meeting, Oregon Convention Center (Portland, USA).
  3. \*Ryuta Mizutani, Rino Saiga, Kentaro Uesugi, Akihisa Takeuchi, Yasuko Terada, Yoshio Suzuki (2015.8.4). X-ray Tomographic Microscopy of Drosophila Brain Network and Skeletonized Model Building in the Three-Dimensional Image. Microscopy & Microanalysis 2015 Meeting, Oregon Convention Center (Portland, USA)
  4. \*Yoshio Suzuki, Akihisa Takeuchi, Yasuko Terada, Kentaro Uesugi, Ryuta Mizutani (2014.10). Recent progress of imaging microscopy and microtomography at BL37XU of SPring-8. The 12th International Conference on X-Ray Microscopy 2014, Melbourne Convention and Exhibition Centre (Melbourne, Australia).
  5. Rino Saiga, \*Ryuta Mizutani, Akihisa Takeuchi, Kentaro Uesugi, Yoshio Suzuki (2014.10). Three-dimensional structure of the fruit-fly brain network. The 12th International Conference on X-Ray Microscopy 2014, Melbourne Convention and Exhibition Centre (Melbourne, Australia).
  6. \*Ryuta Mizutani, Akihisa Takeuchi, Kentaro Uesugi, Yoshio Suzuki (2014.10). X-ray microtomographic visualization of microorganisms by metalloprotein overexpression. The 12th International Conference on X-Ray Microscopy 2014, Melbourne Convention and Exhibition Centre (Melbourne, Australia).
  7. \*水谷隆太, 清水優輔, 吉田翔大, 雑賀里乃, 上野剛, 仲村勇樹, 竹内晃久, 上杉健太郎, 鈴木芳生 (2014.10). ソーキング過程にある蛋白質結晶の時分割解析. 第87回日本生化学会大会, 国立京都国際会館 (京都府京都市)
  8. 雑賀里乃, \*水谷隆太, 竹内晃久, 上杉健太郎, 寺田靖子, 鈴木芳生 (2014.9). X線マイクロトモグラフィ法によるショウジョウバエ脳の神経ネットワークの構造解析. 第75回応用物理学会秋季学術講演会, 北海道大学札幌キャンパス (北海道札幌市)
  9. \*水谷隆太, 雑賀里乃, 竹腰進, 井野元智恵, 中村直哉, 大澤資樹, 新井誠, 大島健一, 糸川昌成, 竹内晃久, 上杉健太郎, 鈴木芳生 (2014.9.14). X線マイクロトモグラフィ法によるヒト大脳皮質の三次元構造解析. SPring-8 シンポジウム 2014, 東京大学弥生講堂(東京都文京区) 【依頼による】
  10. Rino Saiga, Susumu Takekoshi, Naoya Nakamura, Akihisa Takeuchi, Kentaro Uesugi, Yoshio Suzuki, \*Ryuta Mizutani (2014.8). Building human brain network in electron density map determined by X-ray microtomography. 23rd Congress and General Assembly of the International Union of Crystallography, Palais des congrès de Montréal (Montreal, Canada).
  11. \*Ryuta Mizutani, Yusuke Shimizu, Rino Saiga, Go Ueno, Yuki Nakamura, Akihisa Takeuchi, Kentaro Uesugi, Yoshio Suzuki (2014.8). Visualizing soaking process of protein crystal. 23rd Congress and General Assembly of the International Union of Crystallography, Palais des congrès de Montréal (Montreal, Canada).
  12. \*水谷隆太 (2014.2.1). X線マイクロト

モグラフィ法によるヒト大脳神経回路の解析 .SPRUC 拡大研究会・SPring-8 利用ワークショップ,高輝度光科学研究センター-SACLA 大会議室(兵庫県佐用町)【依頼による】

13. \*鈴木芳生, 寺田靖子, 竹内晃久, 上杉健太郎, 田村繁治, 水谷隆太 (2014.1). 広視野高分解能硬X線結像顕微鏡によるマイクロCT. 第27回日本放射光学学会年会, 広島国際会議場(広島県広島市)
14. 雑賀里乃, \*水谷隆太, 竹腰進, 井野元智恵, 中村直哉, 大澤資樹, 新井誠, 大島健一, 糸川昌成, 竹内晃久, 上杉健太郎, 鈴木芳生 (2013.9). X線マイクロトモグラフィ法によるヒト脳組織の三次元構造解析. 第74回応用物理学学会秋季学術講演会, 同志社大学京田辺キャンパス(京都府京田辺市)
15. \*鈴木芳生, 寺田靖子, 竹内晃久, 上杉健太郎, 水谷隆太 (2013.9.25). BL37XUにおけるX線顕微鏡の開発について. SPRing-8 ユーザー協同体 X線マイクロ・ナノトモグラフィー研究会, キャンパスプラザ京都(京都府京都市)【依頼による】
16. \*水谷隆太, 雑賀里乃, 竹腰進, 井野元智恵, 中村直哉, 大澤資樹, 新井誠, 大島健一, 糸川昌成, 竹内晃久, 上杉健太郎, 鈴木芳生 (2013.9.8). X線マイクロトモグラフィ法によるヒト大脳皮質の三次元構造解析. SPRing-8 シンポジウム2013, 京都大学宇治おうばくプラザ(京都府宇治市)【依頼による】

[その他]

ホームページ

<http://www.el.u-tokai.ac.jp/ryuta/>

YouTube チャンネル

<https://www.youtube.com/user/mizutaniLab>

構造データベース登録

1. \*Ryuta Mizutani, Rino Saiga (2014). SPATIOTEMPORAL DEVELOPMENT of SOAKED PROTEIN CRYSTAL; NATIVE. Protein Data Bank 3WPJ. DOI: 10.2210/pdb3wpj/pdb
2. \*Ryuta Mizutani, Rino Saiga (2014). SPATIOTEMPORAL DEVELOPMENT of SOAKED PROTEIN CRYSTAL; 750 SEC. Protein Data Bank 3WPK. DOI: 10.2210/pdb3wpk/pdb
3. \*Ryuta Mizutani, Rino Saiga (2014). SPATIOTEMPORAL DEVELOPMENT of SOAKED PROTEIN CRYSTAL; 2510 SEC. Protein Data Bank 3WPL. DOI:

10.2210/pdb3wpl/pdb

4. \*Ryuta Mizutani, Rino Saiga (2014). Spatiotemporal development of soaked protein crystal; derivative 250 sec. Protein Data Bank 3WU7. DOI: 10.2210/pdb3wu7/pdb
5. \*Ryuta Mizutani, Rino Saiga (2014). Spatiotemporal development of soaked protein crystal; derivative 1080 sec. Protein Data Bank 3WU8. DOI: 10.2210/pdb3wu8/pdb
6. \*Ryuta Mizutani, Rino Saiga (2014). Spatiotemporal development of soaked protein crystal; derivative 1580 sec. Protein Data Bank 3WU9. DOI: 10.2210/pdb3wu9/pdb
7. \*Ryuta Mizutani, Rino Saiga (2014). Spatiotemporal development of soaked protein crystal; derivative 3610 sec. Protein Data Bank 3WUA. DOI: 10.2210/pdb3wua/pdb

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

水谷 隆太 (MIZUTANI, Ryuta)

東海大学・工学部・教授

研究者番号: 70272482

##### (2)連携研究者

竹腰 進 (TAKEKOSHI, Susumu)

東海大学・医学部・教授

研究者番号: 70216878