

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：62603

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26280109

研究課題名(和文)呼吸中枢に自励的同期現象を生成するニューロン・アストロサイト間の機能的結合の解明

研究課題名(英文)Elucidation of functional connectivity between neurons and astrocytes that generate self-excited synchronization phenomenon in the respiratory center

研究代表者

三分一 史和 (Fumikazu, Miwakeichi)

統計数理研究所・モデリング研究系・准教授

研究者番号：30360647

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ニューロンやアストロサイトの活動を記録したカルシウムイメージングデータのブレ補正、時空間平滑化法、画像2値化法等に基づくニューロンやアストロサイトの位置の半自動検出法とニューロン種の自動識別法の開発を行った。そして、遅延相互相関解析により吸息性細胞の検出を行い、外変数型自己回帰モデルや多変量自己回帰モデルをベースとした手法により細胞間の因果性の推定を行った。モデルの適用に際しては適合度を検定する必要があるが、人為的に細胞間のネットワーク構造を改変する前後のデータと比較したところ、本研究で用いた因果性の定量化法には大きな矛盾は無く適切に因果性を指定していることを示せた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we have developed a preprocessing system for semiautomatic detection of active neurons and astrocytes position and automatic identification method of neural types based on a motion artifact correction technique of calcium imaging data that recorded the activity of neurons and astrocytes, a spatiotemporal smoothing method and an image binarization method. Then, we detected inspiratory cells among the active neurons and astrocytes using time-delayed cross correlation analysis and estimated the causality between cells using autoregressive model with exogenous input and a multivariate autoregressive model based approaches. Though it is necessary to evaluate the goodness of fit when applying these models, the estimated causality was found to be valid when comparing it with the data before and after artificially modifying the network structure among cells,.

研究分野：生体信号時空間解析

キーワード：生体イメージングデータ時空間解析 神経情報学 ニューロインフォマティクス

1. 研究開始当初の背景

最近の神経計測技術の進歩により脳神経活動に対する様々なモダリティによる計測法が開発されている。そのなかでもカルシウムイメージング法は数ミリ秒から数十秒の周期で生じる神経集団の同期現象や興奮の伝播を多細胞同時蛍光ライブイメージングとして計測することを可能とした。しかし、データは複雑な多次元の構造を持ち(2次元の計測面、時間軸、計測条件、繰り返し測定)、また、カルシウム感受性色素の退色や還流液による振動などに起因するによる強いドリフト成分やアーチファクトが重畳しており、大規模解析においては解決すべき多くの要素がある。

多くの研究事例や知見がある海馬の場合は、神経細胞の向きが揃っており明確な層構造をもち、また、発火頻度が数百Hzと高く信号強度も高いためニューロン、アストロサイトの分別は比較的容易に行える。しかし、脳幹の呼吸中枢部位では構造が明確ではなく、また、発火頻度は0.5~1.5Hz程度と低く、信号強度も低いので分別は難しい。最近の研究では、アストロサイトにはニューロンの吸息相に同期するもの、吸息相より早くに賦活するものと複数の種類があることが報告されているが(Okada et al. 2012)、実際の解析においてアストロサイトの同定は良好に計測されたデータで細胞の形状や大きさ、賦活の波形を手掛かりに経験的に行われている。

試料の切断面には細胞の一部しか現れていない場合が多くあり、一般的に、形状や大きさによる分別には困難を伴う。新奇の法則性を見出し、その信頼性をより高めるにはより多くのデータを用いた大規模解析が必要で、そのためには、ニューロン、アストロサイトを定量的かつ客観的に分別するアルゴリズムの開発が必要である。

また、呼吸に関与する細胞群において、「どの種類の細胞が」「ネットワーク内でどのように働いて」ネットワーク全体を機能させて自発的同期活動の生成・維持を引き起こすのか、そのメカニズムについてもほとんど解明されていないので、細胞同士の機能的結合性や賦活の因果性についても定量的な研究を行うことが求められている。

2. 研究の目的

ニューロンやアストロサイトの自発的同期現象は脳内の情報伝達において重要な脳機能であり、このメカニズムを探るための注目すべき同期現象の一つとして脳幹における周期的呼吸活動がある。最

近では、カルシウムイメージング法を用いた多細胞同時記録など先端的な測定技術が開発され、得られる知見は神経生理学のみならずニューロインフォマティクス分野でも重要な役割を担いつつあるが、イメージングデータにおいてニューロン、抑制性ニューロン、アストロサイトなどの客観的な検出方法は確立しおらず、細胞レベルでのネットワーク推定に関する研究例はほとんどなされていない。

この状況を踏まえ、本研究では呼吸活動に関与するニューロン、抑制性ニューロン、アストロサイトの定量的、かつ客観的な検出アルゴリズムの開発、ならびに相関、因果性の解析方法の開発を目指す。

3. 研究の方法

本研究は2段階で行う。まず、局所細胞外電位(LFP)で計測される呼吸活動とカルシウムイメージングデータの各ピクセルに対応する時系列との間で時間依存相互相関解析を行い、呼吸活動に関与するニューロン、アストロサイトを検出する。

次に、検出されたニューロンにおいて呼吸活動を予測する時系列モデルを構築し、抑制性ニューロンとアストロサイトからの寄与を考慮した外生変数型時系列モデルへと拡張させる。そして、赤池情報量規準(AIC)などの指標を用いて有意に動力学的な寄与を与えている抑制性ニューロンやアストロサイトを検出し、因果関係にあるニューロン、抑制性ニューロン、アストロサイトのネットワーク構造を推定する。

4. 研究成果

(1)カルシウムイメージングデータには画像のブレ、低周波のドリフト成分、輝度のムラなど様々なアーチファクトが重畳している。その中でも画像のブレは深刻なアーチファクトで補正をしなければピクセル値とニューロンからの信号が対応しなくなるので、解析結果が不正確なものになってしまう。本研究ではアフィン変換と空間平滑化を組み合わせたブレ補正方法を開発した。

(2)イメージングデータはピクセルを順に走査してデータを格納するのでピクセル間に時差が生じ、サンプリングレートが低ければ実時刻と神経活動の時刻との間に遅延が生じる。神経活動の頻度と適切なサンプリングレートの関係を定量化し、時差補正をするための線形、非線形補正方法を開発した。

(3)

カルシウム指示薬OGB-1を用いたイメージングデータで活動性のニューロンを検出し、GlyT2陽性グリシン抑制性ニューロンとGAD65陽性GABA抑制性ニューロンで特異的に発現させた蛍光タンパクのイメージ画像を組み合わせるにより活動性ニューロンをグリシン抑制性ニューロン、GABA抑制性ニューロン、両方の性質を持つ抑制性ニューロン、興奮性ニューロンを半自動的に区別する方法を開発した。これは、各々の2値画像の共通集合、差集合に分離して行うもので、2値化には画像の輝度ムラを補正しながらピクセル毎に閾値を変えるactive threshold法を適用した。この方法により引き続き行う相互相関解析や時系列解析は全ピクセルではなくニューロンの部位に相当するROI(Region Of Interest)のみ計算すればよいので、解析の大幅な効率化を行うことが可能となった。

(4)

(3)の事前処理で定義したOGB-1イメージングデータのROIに対応する時系列とOGB-1イメージングデータと同時計測されたLocal Field Potential(LFP)データとの相互相関解析により吸息性ニューロンの検出を行った。LFPデータにはニューロンの集団的同期現象により生じた呼吸性のバーストが周期的に記録されており、このバースト波形と似た波形を持つROIを検出することで吸息性ニューロンを検出できるがLFPに記録されている呼吸性バーストと異なるタイミングで活性化するニューロンもあるので、LFPの波形を時間軸に沿って前後に移動させながら相互相関解析を行う遅延相互相関解析を導入した。

(5)

(4)で検出した吸息性ニューロン間の因果解析を行った。ニューロンの時系列に自己回帰(AR)モデルと他のニューロンからの入力を仮定した外生変数型ARモデルを適用し、赤池情報量規準(AIC)を用いてモデルの比較を行い、ニューロン間の入出力関係を定量化した。また、多変量ARモデルによるノイズ寄与率、グレンジャー因果性を計算した。モデルの適合度検定をクリアするにはモデルの次数の調整や同時因果性の考慮などまだ改良が必要な部分はある。物理的にニューロン償却しネットワーク構造を変えたサンプルで計測したデータと比較したところ、一定

の条件下では多変量ARモデルが適用可能であることを示した。

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 6件)

1. M. Nishida, S. Kikuchi, F. Miwakeichi, S. Suda, Night duty and decreased brain activity of medical residents: a wearable optical topography study, Medical Education Online, 22, 2017, pp 1379345-1379345(査読有)
2. S. Kikuchi, Y. Kurosawa, N. Murooka, K. Shimoda, M. Nishida, F. Miwakeichi, F. Tozato, Development of cerebral activity examination that is simple and robust against repetition by using wearable NIRS, Clinical Neurophysiology, 128, 2017, pp e166-e167(査読有)
3. A. Lal, Y. Oku, H. i Someya, F. Miwakeichi, Y. Tamura, Emergent Network Topology within the Respiratory, Rhythm-Generating Kernel Evolved In Silico, PLoS One, 6;11(5), 2016, pp e0154049(査読有)
4. Y. Oku, J. Fresemann, F. Miwakeichi, S. Huelsmann, Respiratory calcium fluctuations in low-frequency oscillating astrocytes in the pre-Botzinger complex, Respiratory Physiology & Neurobiology, 226, 2016, pp11-17(査読有)
5. Y. Oke, D. Boiroux, F. Miwakeichi, Y. Oku, Stochastic activation among inspiratory cells in the pre-Botzinger complex of the rat medulla revealed by Ca²⁺ imaging, Neuroscience Letters, 595, 2015, pp12-17(査読有)
6. D. Boiroux, Y. Oke, F. Miwakeichi, Y. Oku, Pixel timing correction in time-lapsed calcium imaging using point scanning microscopy, Journal Neuroscience Methods, 30, 2017, pp60-68(査読有)

[学会発表](計 21件)

1. F. Miwakeich, Y. Oke, Y. Oku, S. Besser, J. Hirrlinger, S. Hulsman, Detection of irregularly firing inspiratory neurons in the pre-Botzinger complex based on spatiotemporal optical imaging data analysis, The 47th Annual Meeting of Society for Neuroscience,

- 2017
2. S. Kikuchi, N. Tsutui, Y. Kurosawa, N. Murooka, K. Shimoda, M. Nishida, F. Miwakeichi, F. T ozato,, Development of cerebral activity examination that is simple and robust against repetition by using wearable NIRS, WPA XVII World Congress of Psychiatry, 2017
 3. Y. Oke, F. Miwakeich, Y. Oku, S. Besser, J. Hirrlinger, S. Hullsmann, General pattern of activation sequence among excitatory/inhibitory inspiratory neurons during rhythmic burst in the pre-Botzinger complex of the mice medulla slice, Oxford Conference 2017, 2017
 4. F. Miwakeichi, Y.Oke, S. Hulsman, Estimation of spontaneous synchronous neuronal network based on spatio-temporal optical imaging data analysis, ISI-ISM-ISSAS Joint Conference TOKYO 2017, 2017
 5. Y. Oke, F. Miwakeichi, Y. Oku, S. Besser, J. Hirrlinger, S. Huelsmann, Neuronal type-dependent stochastic activation sequence among inspiratory neurons during rhythmic burst in the pre-Botzinger complex of the mice medulla slice, The 47th Annual Meeting of Society for Neuroscience, 2017
 6. 尾家慶彦, 三分一史和, 越久仁敬, S. Besser, J. Hirrlinger, S. Huelsmann,, マウス延髄スライス of 吸息性中枢内で吸息性細胞が自励同期活動を行う際の細胞種依存的な活性化順序パターン, 第110回近畿生理学談話会, 2017
 7. 三分一史和, 尾家慶彦, 越久仁敬, S. Besser, J. Hirrlinger, S. Huelsmann, Detection of irregularly firing inspiratory neurons in the pre-Botzinger complex based on spatio-temporal optical imaging data analysis, 平成 29 年度統計数理研究所共同研究集会 生体信号・イメージングデータ解析に基づくダイナミカルバイオフィオマティクスの展開, 2017
 8. Y. Oke, F. Miwakeich, Y. Oku, S.Besser, J Hirrlinger, S. Huelsmann, Rhythmic activation patterns of excitatory/inhibitory inspiratory neurons in the pre-Botzinger complex of the mice medulla sliceThe 94th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, 2016
 9. 三分一史和, 尾家慶彦, 生体イメージングデータの事前処理とイベント関連活動の検出, 平成 28 年度統計数理研究所共同研究集会「動的な生体情報論の現状と展望 2」, 2017
 10. F. Miwakeichi, Y. Oke, Y. Oku, A. Galka, S. Hullsmann, A Statistical Mapping Strategy to Identify Inspiratory Neurons among Active Cells in the Pre-Bozinger Complex, 37th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, 2015
 11. F. Miwakeichi, Y. Oke, Y. Oku, A. Galka, S. Hullsmann, Differentiation of neurons and astrocytes in brain stem by statistical image processing methods, The 38th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, 2015
 12. Y. Oke, D. Boiroux, F. Miwakeichi, Y. Oku, Stochastic activation of inspiratory cells in the pre-Botzinger complex with loose regularity during spontaneous inspiratory rhythmic bursts, The 38th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, 2015
 13. Y. Oke, F. Miwakeichi, Y. Oku, S. Besser, J. Hirrlinger, S. Hullsmann, Development of inhibitory inspiratory neurons in the pre-Botzinger complex of neonatal mice, The 93rd Annual Meeting of The Physiological Society of Japan, 2015
 14. 三分一史和, A statistical mapping strategy to identify inspiratory neurons among active cells in the pre-Botzinger Complex, データ科学シンポジウム 欠測データ解析とモデル選択: 生体情報データの統計モデル(招待講演), 2015
 15. 三分一史和, 脳幹におけるニューロン, アストロサイトの識別のための統計的画像解析, 平成27年度統計数理研究所共同研究集会 動的な生体情報論の現状と展望, 2015
 16. F. Miwakeichi, Y. Oke, Y. Oku, A. Galka, S. Hullsmann, A statistical strategy of optical imaging data analysis to differentiate neurons and astrocytes in the brain stem. Statistical Computing Asia, 2015
 17. 三分一史和, 尾家慶彦, 光学的イメージング法とニューロン, アストロサイトの識別(招待講演), 電子情報通信学会医用画像研究会”医用画像解析における統計数理的手法
 18. 三分一史和, 尾家慶彦, 統計値マップによるニューロン, アストロサイトの識別, 平成27年度統計数理研究所共同研究集会「ダイナミカルバイオフィオマティクスの展開III」, 2014
 19. Y. Oke, D. Boiroux, F. Miwakeichi, Y. Oku, Loose regulation of calcium bursting sequence among inspiratory cells in the pre-Botzinger complex

during rhythmic burst, 第92回日本生理学会大会・第120回日本解剖学会総会・全国学術集会合同大会

(4)研究協力者

()

20. Y. Oke, D. Bouiroux, F. Miwakeichi and Y. Oku, Flexible bursting sequence among inspiratory cells in the pre-Botzinger complex revealed by wide-field, Ca²⁺ imaging, The 13th Oxford Breathing Meeting Respiratory and Cardiovascula,2014
21. D. Bouiroux, Y. Oke, F. Miwakeichi, Y. Oku, Connectivity of the respiratory network by using Granger causality, The 13th Oxford Breathing Meeting Respiratory and Cardiovascular, 2014

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

三分一 史和 (MIWAKEICHI, Fumikazu)
統計数理研究所・モデリング研究系・准教授
研究者番号：30360647

(2)研究分担者

尾家 慶彦 (OKE, Yoshihiko)
兵庫医科大学・医学部・助教
研究者番号：50396470

(3)連携研究者

越久 仁敬 (OKU, Yoshitaka)
兵庫医科大学・医学部・教授
研究者番号：20252512