

輝け次代の担い手たち

‘Cracking the Brain’s Code’ を加速する構造と機能の全脳イメージング

笠井 淳司

(大阪大学大学院薬学研究科神経薬理学分野)

はじめに

2013年に米国 BRAIN Initiative (Brain Research through Advancing Innovative Neurotechnologies Initiative)¹⁾が始動して以降、欧州 Human Brain Project²⁾や本邦 Brain/MINDS (革新的技術による脳機能ネットワークの全容解明プロジェクト)³⁾など世界各地で大型脳研究プロジェクトが発足し、脳研究が推進されている。これらは革新的な技術 (ニューロテクノロジーやコンピュータテクノロジー) を開発し、それにより、個々の細胞や複雑な神経回路がどのようにヒトの脳機能を制御しているのかを理解すること、さらに、脳機能の破綻として表出する脳神経疾患を治療・予防する新たな方法を見出すことを目指している。現在は、単一細胞レベルの全脳イメージング法、全ての脳細胞の単一細胞トランスクリプトーム/エピゲノム解析法、細胞種特異的なラベリング/トレーシングや神経活動の計測法、神経活動の操作法、コンピュータシミュレーションなどの脳研究の技術開発が盛んに行われている。これらの脳研究ツールは、従来までの脳領域ごとの断片的な解析では解明できない包括的な脳機能の理解を深めるためには必須の技術である。本稿では、筆者らが最近開発した高精細高速全脳イメージングシステム FAST⁴⁾を中心に、全脳から構造および機能的な情報を取得する光学顕微鏡を用いた全脳イメージング法について概要を紹介させていただく。

光学顕微鏡を用いた全脳イメージング

Paxinos らの The rat brain in stereotaxic coordinates⁵⁾など脳の形態学的、構造学的知見は、機能局在する脳を理解する上で極めて重要な役割を担ってきた。これまでは数十~百数十 μm ほどの脳切片の解析が主であったものの、米国 Allen 研究所のマウス脳アトラス⁶⁾に代表される新たな brain atlas やコネクトーム解析⁷⁾を実現させるために、シームレスかつ高精細な全脳イメージングが必要であると認識されてきた。そのため最近、全脳を精細にイメージングする光学顕微鏡技術が国内外から次々に開発されている。それらの方法は、1) 組織透明化技術と光シート顕微鏡を組み合わせた方法と 2) 光学顕微鏡と脳組織を物理的に切断するマイクロスライサーを組み合わせた順次断層撮影法に大別される。組織透明化法と光シート顕微鏡については、様々な総説^{8)~10)}に各方法の特徴が詳しくまとめられているため、本稿では割愛するが、特に霊長類などの大きな脳において、樹状突起スパインや軸索終末などの微細構造や神経線維を正確に全脳から検出するのは未だ困難であると筆者は認識している。

順次断層撮影法は、脳組織表面から高精細にイメージングし、光の散乱等で観察できない深部に到達すれば、脳組織表面をビブラトームなどで除去し、新たに露出した部位から再度イメージングするということを自動で繰り返し、脳組織全体を観察する方法である¹¹⁾¹²⁾。Ragan らにより 2012 年に開発された serial two-photon tomography

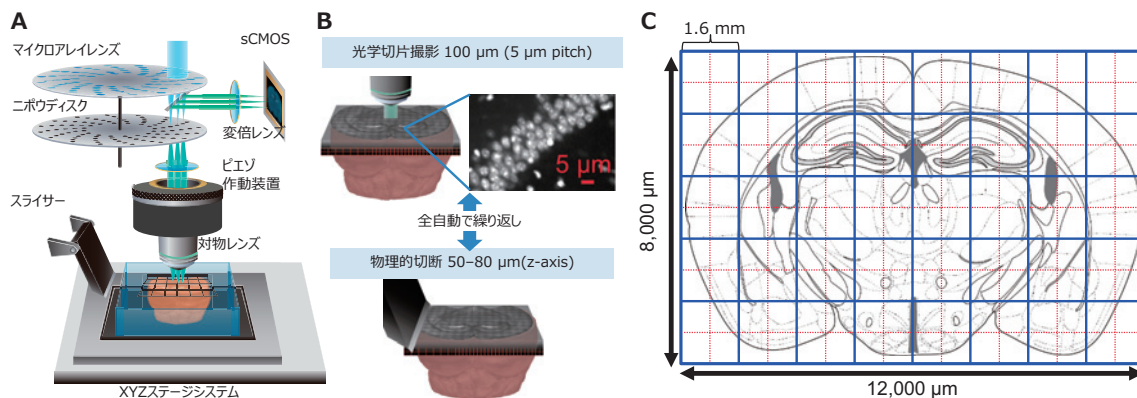


図1 順次断層撮影法を用いた高速高精細全脳イメージングシステム FAST

(A) ニポウディスク方式共焦点スキャナユニット、対物レンズのピエゾ作動装置、リニアスライサー、変倍レンズ、sCMOS および XYZ ステージシステムを組み合わせた FAST の模式図 (文献 4 から改変して転載)。(B) 順次切断法にて撮影。脳組織表面から 100 μm までを 5 μm 毎に光学切断画像を取得。その後、z 方向の overlap 領域を残し物理的にリニアスライサーにより切断・除去を行う。これを全自動で繰り返し脳全体をイメージングする。(C) 0.8 mm \times 0.8 mm の実視野 (FOV、青線と赤線) では 1 平面の脳画像を取得するには、160 FOVs の撮影が必要であったが、拡大した FOV (1.6 mm \times 1.6 mm、青線) では、40 FOVs で撮影できる。

(STPT)¹³⁾では、2光子励起顕微鏡を用いることにより 1光子顕微鏡では到達できない深部まで撮影する。しかし、この方法では、サブミクロンメートルの空間解像度を達成することが可能であるが、その空間解像度で全脳イメージングするには、マウスの脳でさえ、撮影時間が数日間も要するという現状であった¹⁴⁾。最も高解像度でかつ高速に全脳イメージングを達成しているものに wide-field large volume tomography があるが、これにおいても、マウスの全脳を 3 日間以上も要するとされていた¹⁵⁾。

高速・高精細な全脳イメージング法 FAST の開発

脳組織全体のイメージングでは、組織透明化の有無にかかわらず、空間解像度と撮影時間はトレードオフの関係にある。空間解像度を上げるために高倍率の対物レンズを用いると実視野が狭くなり、脳を撮影する総視野数が増え脳全体の撮影に時間がかかってしまうからである。この関係を両立するには、光学顕微鏡の撮影速度の高速化と合わせて、高い分解能のまま実視野を狭くしない

工夫が必要である。特に、撮影速度の高速化については、イメージセンサー技術の改良、励起検出系の並列化などが考えられていた。そこで筆者らは、これらの条件を精査・工夫することにより、高い空間解像度を保ちつつ高速性を高めた方法として block-face serial microscopy tomography、FAST を開発した (図 1)⁴⁾。

FAST の主な改良点は 2 つある。一つ目は、マルチピンホールを敷き詰めた円板とマイクロレンズアレイを高速に回転させるニポウディスク方式を用いたことである。励起検出系の並列化を達成したニポウディスク方式共焦点スキャナユニットでは、そのイメージ取得が最大 2,000fps にもなり、多光子励起顕微鏡や共焦点操作顕微鏡で汎用されていたレゾナントスキャナ方式に比べ、イメージング速度が飛躍的に向上した。このイメージング速度の向上を全脳イメージングに適用するには、検出器の感度 (量子効率) とフレームレートが課題であったが、最大量子効率 82% かつ全画素 (2,048 \times 2,048pixel) 読み出し時に 100fps を達成する最新の科学用 CMOS を導入することにより、高解像度イメージングの高速化を達成した。実際には、各動作の同期性・蛍光蛋白質の輝度など要因

により、67fps(露光時間 15ms)に設定してイメージングを行っている。

二つ目は、画素サイズをサブミクロンに保ちながら、実視野を拡大させたことである。成体マウスの脳は、概ね 8mm×12mm×12mm の直方体の中に納まる。そのため、脳組織を平たんに切断しやすい冠状面 8mm×12mm の実視野を、1,000 万画素の検出器と高開口数の対物レンズなどで一度に撮影すれば、画像連結をせずに脳の 2 次元画像を取得できる。しかしながら、その条件下で画素サイズをサブミクロンに保つことは現状ではほとんど不可能である。従って、脳組織を撮影するには、隣接する画像を連結する必要がある。そこで、科学用 CMOS のセンサーサイズ、ニポウディスク型共焦点スキャナユニットの有効視野数、結像・対物レンズの視野数を考慮し、変倍レンズなどの導入により、実視野を 1.6mm×1.6mm まで拡大させた。例えば、8mm×12mm の 2 次元脳画像は、0.8mm×0.8mm の実視野を用いて撮影すると 160 視野が必要であるが、1.6mm×1.6mm の実視野であると 40 視野で済む。この実視野拡大により全脳の撮影時間を 4 倍短縮することに成功した。

FAST では、上述の改良に加え、脳組織の切断面が極めて平たんになるリニアスライサーを組み合わせた。これにより、灌流固定した脳組織の表面付近を、平面分解能 1 μ m 以下、深さ方向 5 μ m 間隔で 80~100 μ m まで撮影したのち、その撮影済みの脳組織を振動刃のリニアスライサーで除去し、再び撮影することを自動で繰り返して脳全体を撮影した。結果として、成体マウス脳を 0.7 μ m×0.7 μ m×5 μ m の精細さで、2.4 時間で撮影することに成功した。

3 次元全脳画像の再構成とデータ解析

連続する z スタック画像からシームレスに 3 次元全脳画像を再構成するため、切断する脳組織の厚みを z 方向の撮影深度よりも短く設定することにより、連続する 2 つのスタック画像に共通する脳領域の画像を設けた。例えば、z 方向 100 μ m まで撮影し、80 μ m で切断することにより 20 μ m

分の共通する脳領域の画像が取得できる。筆者らも開発に関わった TRI/FCS-NUC64 (ラトックシステムエンジニアリング株式会社)を用いて、2 次元スタック画像の重なり除去、位置合わせを行い、ボクセルベースの 3 次元画像に再構築し全脳画像を取得した。

高精細のマウス全脳画像のデータ容量は、約 1 TB にもなる。現状の汎用 PC の性能を考えると、このデータ容量のままでは、病態モデル動物の脳内変化などグループ間の比較解析は非常に困難である。そこで TRI/FCS-NUC64 では、シグナルの形態を球体認識・粒子分離のアルゴリズムを用いて認識し、数密度、重心座標、関心領域 ROI の体積等を数値化することにより、データ容量の軽量化と共に、病態モデル脳と対照脳の比較解析を容易にした(図 2)。筆者らは、このシームレスな全脳 3 次元画像の粒子分離解析により、脳内の細胞分布情報を保持したまま全ての細胞を数え、マウスの脳(7 週齢)に約 1 億 5 千万個の細胞が存在することを示した。また、抽出した数値データを用いた群間比較の検出力を明らかにするため、海馬歯状回神経細胞特異的にアポトーシスを誘導する神経毒(トリメチル錫)を投与した脳において、歯状回特異的に細胞密度の低下や細胞数の減少を検出した。これらの障害モデルや野生型のマウス脳において、各 ROI の大きさや細胞数のバラツキは比較的少なく、各群 3 例の脳画像を元にした定量データを比較することにより差を検出できることを示した。

Post-hoc 解析、免疫組織化学的染色法

光学顕微鏡を用いた全脳イメージングには、Hoechst33258 などの低分子化合物による組織染色、Arc-dVenus マウスなどの蛍光蛋白質を発現する遺伝子改変動物やウイルス投与など、目的の細胞を蛍光標識する必要がある。これまでの全脳イメージングと同様、筆者らも蛍光蛋白質を発現する遺伝子改変マウスやウイルスベクターを用いた蛍光標識を示した⁴⁾。一方で、遺伝子導入の時間や労力・目的産物の異所性発現の可能性等を考慮

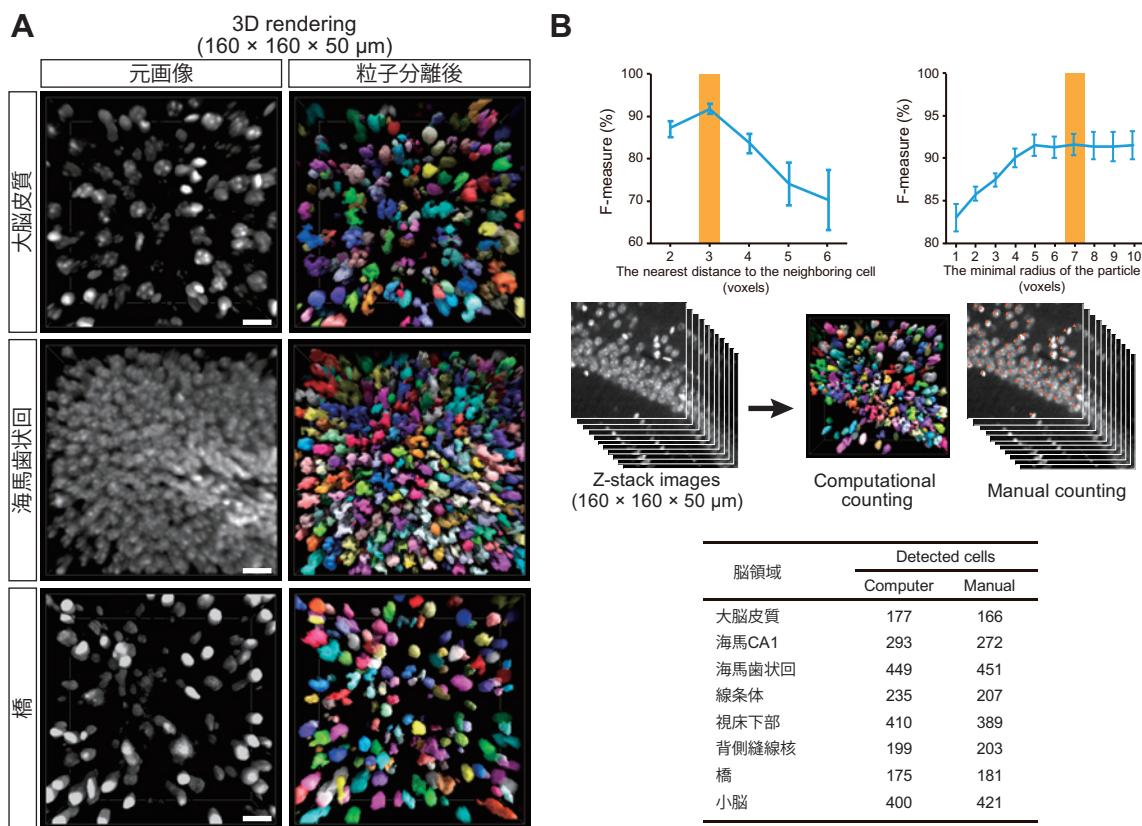


図2 FAST画像の3Dデータ解析

(A) 各種脳領域の3Dレンダリングした元画像 (hoechst33258による核染色) と TRI/FCS-NUC64による粒子分離画像。異なる細胞核と認識された粒子はランダムカラーで識別される。Scale bars, 20 μm。(B) 粒子分離の2つのパラメータ (the nearest distance to the neighboring cell, the minimal radius of the particle) の各設定値におけるF値 (precisionとrecallの調和平均) を図示する。それぞれを3 voxels, 7 voxelsに設定すると最もF値が高くなる (橙ハイライト)。これらのパラメータに設定し自動計測した細胞数と、マニュアルにより計測した値の比較を示す (文献4から改変して転載)。

すると、任意の遺伝子の蛋白質発現を簡便に可視化する免疫組織化学法を用いることができれば、詳細な構造、機能、病態解析が可能になる。そのため、抗体を深部まで浸透させて脳全体を染色する方法^{16)~18)}がいくつか開発されているものの、使用可能な抗体が少なく、抗体を脳深部まで浸透させる時間や透明化法の中には抗原性の保持が困難な試薬がある¹⁹⁾ことなど、全脳イメージングに適用するにはまだハードルが高いと考えられる。FASTやSTPTなどの順次断層撮影法では、全脳イメージング後の脳切片は撮影用水槽に溜まっていることから、全ての脳切片 (FASTの場合、80 μm厚の切片が150~200枚) を容易に回収するこ

とが出来ると。そのため、通常の免疫組織化学的染色に用いることができる抗体を入手すれば、従来のfree-floating法を用いて様々な蛋白質発現や細胞種の同定などの解析ができる。冠状切断する場合、尾側正中嗅内皮質や嗅球などの離散しやすい脳部位をfree-floating法により染色する場合には、脳組織と架橋を形成し形態を保持する酸化型アガロースゲル¹²⁾²⁰⁾を用いるなどの工夫は必要である。また、FASTによる撮影後に回収した切片の免疫染色画像に対応する元のFAST画像を自動的に見つけるため、筆者らは、OpenCVのcv::matchTemplateを用いたプログラムを作成した。これにより、全脳イメージングにより差を見出し

たのちに、同じ脳において詳細な蛋白質発現解析や細胞種の同定などが簡便に行えるようになった。

FASTの霊長類脳への適用

FASTによるイメージングでは、組織の透明化は不要であることから、対象とする脳組織の大きさに原理的な制限はない。従って、サブミクロンの高解像度のまま、大きな脳組織のイメージングが可能である。その拡張性を示す例として、成体マウス脳約17倍の重量を有する非ヒト霊長類マーモセットの全脳や、ヒト死後脳においても、筆者らが知る限りでは光学顕微鏡イメージングとして最大となる、マウス脳と同等の高精細3D画像の取得にも成功している⁴⁾。実際には、撮影用水槽や電動ステージの可動域、リニアスライサーに装着する刃の長さなどにより撮影可能な組織の大きさは制限されており、現在のところ成獣マーモセットの全脳イメージングにとどまっている。ヒトに近い実験動物として用いられてきたマカクなどの全脳イメージングにFASTを用いるためには、可動域の拡大などの改良が必要である。

おわりに

筆者らが開発したFASTを含む高精細な全脳イメージングに加え、神経活動の操作や標識法など次々に新たな脳研究ツールが開発されている。これらの研究ツールを組み合わせることにより、脳機能の仕組みや精神神経疾患の病態の詳細が明らかになることが期待される。このような脳研究ツールの開発は、従来のような特定の脳領域に着目した研究から、脳全体の中から仮説フリーで変化を見出す研究へ脳研究の手法のパラダイムシフトを加速させると予想する。2017年12月、オーストラリアキャンベラで開催された世界主要脳プロジェクト代表者会議において、International Brain Initiativeを設立することが宣言された。これまでに世界各地で推進されている大型脳研究プロジェクトだけでは脳を解読することは時間を要

するが、様々なリソースを世界レベルで協力・集結させることによって、‘cracking the brain's code’を加速することが出来る²¹⁾。日本のBrain/MINDS projectもInternational Brain Initiativeの初期メンバーとして参画する。本稿で紹介したFASTが、世界規模の脳研究を加速させる一助となることを期待する。

謝辞

FASTの開発にあたり、多くのご支援とご指導を頂きました大阪大学大学院薬学研究科 橋本均教授および研究室の皆様、共同研究者の先生方に感謝いたします。本稿で紹介した研究内容は、日本学術振興会、文部科学省、日本医療研究開発機構、武田科学振興財団、上原記念生命科学財団からの研究費により行われました。最後に、「輝け次代の担い手たち」の執筆の機会を与えていただきました澤本和延教授、日本神経化学会編集部の皆様にこの場を借りて御礼申し上げます。

文献

- 1) Insel TR, Landis SC, Collins FS. Research priorities. The NIH BRAIN Initiative. *Science*, 340, 687-688 (2013).
- 2) Amunts K, Ebell C, Muller J, Telefont M, Knoll A, Lippert T. The Human Brain Project: Creating a European Research Infrastructure to Decode the Human Brain. *Neuron*, 92, 574-581 (2016).
- 3) Okano H, Sasaki E, Yamamori T, Iriki A, Shimogori T, Yamaguchi Y, Kasai K, Miyawaki A. Brain/MINDS: A Japanese National Brain Project for Marmoset Neuroscience. *Neuron*, 92, 582-590 (2016).
- 4) Seiriki K, Kasai A, Hashimoto T, Schulze W, Niu M, Yamaguchi S, Nakazawa T, Inoue KI, Uezono S, Takada M, Naka Y, Igarashi H, Tanuma M, Waschek JA, Ago Y, Tanaka KF, Hayata-Takano A, Nagayasu K, Shintani N, Hashimoto R, Kunii

- Y, Hino M, Matsumoto J, Yabe H, Nagai T, Fujita K, Matsuda T, Takuma K, Baba A, Hashimoto H. High-Speed and Scalable Whole-Brain Imaging in Rodents and Primates. *Neuron*, 94, 1085-1100 (2017).
- 5) Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. San Diego: Academic Press, (1982).
 - 6) McCarthy M. Allen Brain Atlas maps 21,000 genes of the mouse brain. *Lancet Neurol*, 5, 907-908 (2006).
 - 7) Zingg B, Hintiryan H, Gou L, Song MY, Bay M, Bienkowski MS, Foster NN, Yamashita S, Bowman I, Toga AW, Dong HW. Neural networks of the mouse neocortex. *Cell*, 156, 1096-1111 (2014).
 - 8) Richardson DS, Lichtman JW. Clarifying Tissue Clearing. *Cell*, 162, 246-257 (2015).
 - 9) Susaki WA, Ueda HR. Whole-body and Whole-Organ Clearing and Imaging Techniques with Single-Cell Resolution: Toward Organism-Level Systems Biology in Mammals. *Cell Chem Biol*, 23, 137-157 (2016).
 - 10) Keller PJ, Ahrens MB. Visualizing whole-brain activity and development at the single-cell level using light-sheet microscopy. *Neuron*, 85, 462-483 (2015).
 - 11) Ewald AJ, McBride H, Reddington M, Fraser SE, Kerschmann R. Surface imaging microscopy, an automated method for visualizing whole embryo samples in three dimensions at high resolution. *Dev Dyn*, 225, 369-375 (2002).
 - 12) Li A, Gong H, Zhang B, Wang Q, Yan C, Wu J, Liu Q, Zeng S, Luo Q. Micro-optical sectioning tomography to obtain a high-resolution atlas of the mouse brain. *Science*, 330, 1404-1408 (2010).
 - 13) Ragan T, Kadiri LR, Venkataraju KU, Bahlmann K, Sutin J, Taranda J, Arganda-Carreras I, Kim Y, Seung HS, Osten P. Serial two-photon tomography for automated ex vivo mouse brain imaging. *Nat Methods*, 9, 255-258 (2012).
 - 14) Economo MN, Clack NG, Lavis LD, Gerfen CR, Svoboda K, Myers EW, Chandrashekar J. A platform for brain-wide imaging and reconstruction of individual neurons. *Elife*, 5, e10566 (2016).
 - 15) Gong H, Xu D, Yuan J, Li X, Guo C, Peng J, Li Y, Schwarz LA, Li A, Hu B, Xiong B, Sun Q, Zhang Y, Liu J, Zhong Q, Xu T, Zeng S, Luo Q. High-throughput dual-colour precision imaging for brain-wide connectome with cytoarchitectonic landmarks at the cellular level. *Nat Commun*, 7, 12142 (2016).
 - 16) Renier N, Wu Z, Simon DJ, Yang J, Ariel P, Tessier-Lavigne M. iDISCO: a simple, rapid method to immunolabel large tissue samples for volume imaging. *Cell*, 159, 896-910 (2014).
 - 17) Chung K, Wallace J, Kim SY, Kalyanasundaram S, Andalman AS, Davidson TJ, Mirzabekov JJ, Zalocusky KA, Mattis J, Denisin AK, Pak S, Bernstein H, Ramakrishnan C, Grosenick L, Gradinaru V, Deisseroth K. Structural and molecular interrogation of intact biological systems. *Nature*, 497, 332-337 (2013).
 - 18) Gleave JA, Lerch JP, Henkelman RM, Nieman BJ. A method for 3D immunostaining and optical imaging of the mouse brain demonstrated in neural progenitor cells. *PLoS One*, 8, e72039 (2013).
 - 19) Hama H, Hioki H, Namiki K, Hoshida T, Kurokawa H, Ishidate F, Kaneko T, Akagi T, Saito T, Saido T, Miyawaki A. ScaleS: an optical clearing palette for biological imaging. *Nat Neurosci*, 18, 1518-1529 (2015).
 - 20) Sallee CJ, Russell DF. Embedding of neural tissue in agarose or glyoxyl agarose for vibratome sectioning. *Biotech Histochem*, 68, 360-368 (1993).
 - 21) Yuste R, Bargmann C. Toward a Global BRAIN Initiative. *Cell*, 168, 956-959 (2017).