

平成30年度

神戸大学先端融合研究環
極みプロジェクト
実績報告書

神戸大学先端融合研究環

様式（年次報告書）

平成 31 年 4 月 26 日

平成 30 年度極みプロジェクト年次報告書

1. プロジェクト概要

プロジェクトの名称	ホログラフィック技術による生命現象の 4 次元計測・操作の実現とその臨床応用		
研究代表者 部局・専攻・氏名	システム情報学研究科・システム科学専攻・的場修		
外部資金 獲得実績	科学研究費補助金	40,894 千円,	受託研究経費 99,645 千円 奨学寄附金 3,000 千円, 共同研究経費 5,200 千円
特許出願件数	1 件,	論文発表件数	23 件, 著書数 0 件

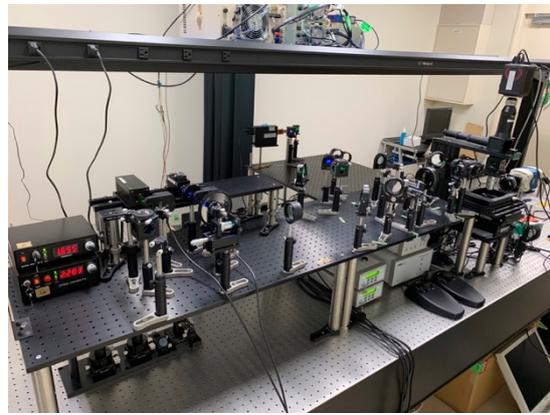
2. 構成員とその役割分担

氏名	部局・専攻	役割分担
的場修	システム情報学研究科・システム科学専攻	ホログラフィック技術による 4 次元計測・操作システムの構築
和氣弘明	医学研究科	ホログラフィック技術に基づく高次脳機能解明・臨床利用
森田光洋	理学研究科	ホログラフィック技術を用いた細胞研究
大森敏明	工学研究科	数理データサイエンス解析
滝口哲也	都市安全研究センター	画像処理, 機械学習に関する研究
中村誠	医学研究科	眼科領域におけるホログラフィック技術の実用化
青井貴之	医学・科学技術イノベーション研究科	ips 細胞領域におけるホログラフィック技術の実用化
杉尾翔太	医学研究科	ホログラフィック技術を用いた細胞・脳機能研究
全香玉	システム情報学研究科・システム科学専攻	ホログラフィック技術による 4 次元計測・操作システムの構築

3. 研究成果の概要等について

ホログラフィック技術による4次元計測・操作システムの構築（的場・全）

細胞の4次元操作に向けて、(1)ホログラフィック3次元光刺激システムの開発、(2)ホログラフィック3次元蛍光・位相イメージング技術の開発、(3)光刺激と観察の2つの技術を同時に組み合わせた新規ホログラフィック顕微鏡の開発の3つのテーマで研究を進めている。(1)のホログラフィック3次元光刺激システムの開発では図1に示す光学系を構築し、可変焦点レンズを用いた奥行き観察系を合わせることで3次元光刺激が可能であることを確認した。(2)の3次元蛍光・位相イメージング技術では、細胞核に蛍光タンパク質を遺伝子導入したヒメツリガネゴケを用いて蛍光による細胞核の観察と位相による細胞構造の同時計測実験を行なった。(3)の新規ホログラフィック顕微鏡では、選択的に細胞を刺激し、それによるカルシウムイオンの変化を蛍光で観察可能な一体型システムを構築した。この研究成果をアメリカ光学会の論文誌 *Optics Letters*, Vol. 43, p. 5447, 2018年に発表するとともに、プレスリリースし、日刊工業新聞と下野新聞に掲載された。



ホログラフィック技術に基づく高次脳機能解明・臨床利用（和氣・杉尾）

高次脳機能の解明や臨床利用を目的とした研究には、モデル動物として生きたマウスを用いた研究が不可欠である。現在、生きたマウスの細胞活動を光で制御可能な光感受性機能分子(ChR2やC1V1など)が数多く開発され、生体機能を人為的に制御する研究が広く行われるようになってきている。生きたマウスにホログラフィック刺激光を導入するには、800-1200nmの波長帯の光を用いた2光子励起が必須となる。そこで、的場研究室で構築されたホログラフィック光刺激系を2光子顕微鏡に組み込んだ2光子励起ホログラフィック顕微鏡を新たに構築した(図1)。この顕微鏡を用いて、①2光子励起によるホログラフィック光刺激が可能か、並びに②生体マウスへの応用可能性について検討した。

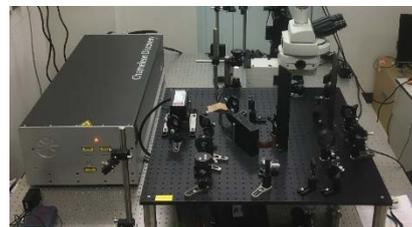


図1) 2光子励起ホログラフィック顕微鏡

まず、2光子励起ホログラフィック光刺激が可能かを検討するために、波長1040nmの光をホログラフィックで位相変調し、蛍光ビーズ(ビーズの直径は細

胞 1/2 個分に相当)に対して多点照射を行った。その結果、細胞 1 個分の解像度で一度に最大 50 点の多光子励起が確認され、2 光子励起ホログラフィック光刺激が可能であることが実証された(図 2)。

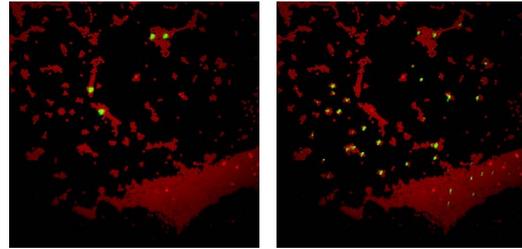


図 2) 2 光子ホログラフィック光照射。
緑：2 光子励起。赤：1 光子励起の参照画像。

続いて、生体マウスへの応用可能性を検討するために、光によって細胞機能の制御が可能な機能分子(C1V1)と蛍光カルシウムインディケータ(GCaMP)を発現したマウスから急性脳スライス標本を作成し、2 光子励起ホログラフィック刺激を行った(図 3)。

2 光子ホログラフィック光刺激(刺激点 5-10 点)を脳細胞に連続照射すると C1V1 の活性化と細胞内カルシウム濃度上昇が観察され、光感受性機能分子と 2 光子励起ホログラフィック光刺激によって脳細胞活動が制御可能であることが示された。

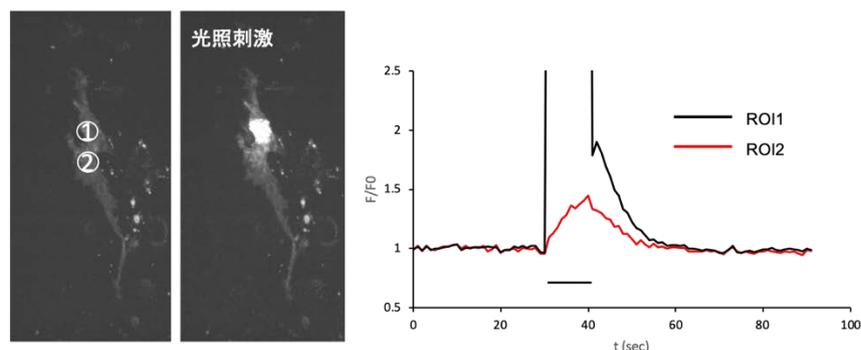


図 3) 左：2 光子励起ホログラフィック照射パターン。中央：カルシウムイメージング(疑似カラー)、刺激前。右：ホログラフィック光刺激の最中のカルシウム上昇。矢印：急性脳スライス標本中の一部の細胞を例示。

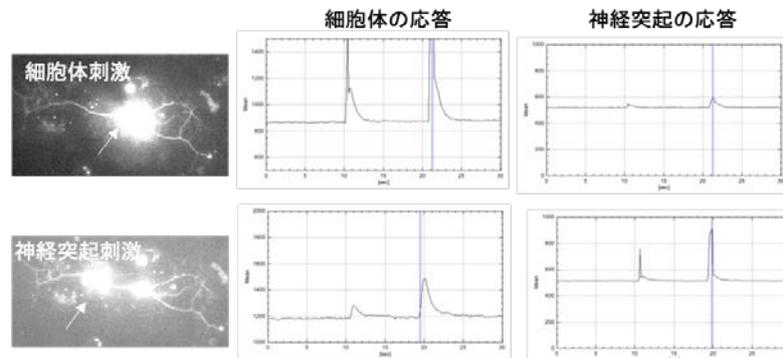
ホログラフィック技術を用いた細胞研究(森田)

ホログラム光刺激の実用性を培養細胞系において検討した。具体的には初代培養アストロサイトおよび神経細胞に、光感受性タンパク質(ChR2-EYFP)とカルシウム蛍光タンパク質(RCaMP)を発現させ、光刺激に伴う細胞内カルシウム上昇を測定した。

(1)アストロサイトの応答；下図に示すように、アストロサイトの①(ROI1)で示した部位にホログラム光刺激を行ったところ、ROI1のみならず、その近傍である②(ROI2)においてもカルシウム上昇を反映するRCaMPの蛍光上昇が見られた。アストロサイトは、膜電位上昇に伴うカルシウム輸送体の逆回転により細胞内カルシウムが上昇するため、ホログラム光照射がChR2-EYFPを活性化し、アストロサイトの脱分極を引き起こすことが実証された。



(2) 神経細胞；神経細胞の細胞体または神経突起をホログラム光刺激したところ，刺激部位でカルシウム上昇が見られるだけでなく，神経突起刺激に対する細胞体の応答など，神経活動に依存する応答が見られた．このことから，ホログラム光刺激が，神経細胞の電気活動の誘導に有用であることが実証された．



数理データサイエンス解析（大森）

近年の計測技術の発展に伴い，計測データの背後にある神経活動ダイナミクスをデータ駆動型のアプローチで抽出する方法の確立が求められている．本年度は，まず，神経細胞の非線形ダイナミクスをデータ駆動で抽出するアルゴリズムの構築を行った．多数のイオン電流の候補が存在する状況を想定し，スパースモデリングとコンダクタンスベース型の非線形神経細胞モデルとを融合することで，真のシステムが持つべき非線形ダイナミクスのみをデータ駆動で抽出する方法を構成した．本研究の成果は，*Neural Networks* 誌(Otsuka and Omori, 2019)に掲載されるとともに，システム制御情報学会より学会賞（奨励賞）を受賞した．本年度は，さらに，多点計測データから神経ネットワークの構造を推定するための統計的アルゴリズムの開発(Masahiro and Omori, 2018)に着手し，部分観測からのネットワーク結合推定のための機械学習アルゴリズムを考案するとともに，計測される動画データからより精緻な動画画像を得ることを目的として，時空間構造を考慮した深層学習アルゴリズムの考案(Tanaka and Omori, 2019)を行った．

画像処理，機械学習に関する研究（滝口）

電子顕微鏡で撮影された 3 次元の神経細胞画像の領域セグメンテーションを機械学習に基づき自動で高精度に行うことを目的とし，今年度は *Affinity graph* を用いた手法を検討した．具体的には，ネットワークの多層化によるメモリ使用量の増加問題に対処するため，メモリサイズに依存せず多層化を図れるインスタンスセグメンテーションモデルを提案した．



図． 機械学習を用いた神経細胞画像のセグメンテーション結果

4. 論文・著書・特許出願リスト

[論文]

論文名 : Review of three-dimensional imaging of dynamic objects by parallel phase-shifting digital holography

著者名 : T. Fukuda, Y. Awatsuji, P. Xia, T. Kakue, K. Nishio, and O. Matoba

掲載誌, 巻, ページ : Opt. Eng. Vol.57, pp.061613-1-11, 2018 年

論文名 : Three-dimensional/two-dimensional convertible display based on computer-generated holograms and an amplitude-modulated spatial light modulator

著者名 : O. Matoba, W.-K. Lin, F.-L. Hsiao, C.-Y. Huang, B.-S. Lin, W.-C. Su (国際共著)

掲載誌, 巻, ページ : Opt. Eng., Vol. 57, No.6, 061614-1-6, 2018 年

論文名 : Astigmatism and deformation correction for a holographic head-mounted display with wedged-shaped holographic waveguide

著者名 : W.-C. Su, O. Matoba, W.-K. Lin, B.-S. Lin (国際共著)

掲載誌, 巻, ページ : Appl. Opt., Vol. 57, No. 25, pp. 7094-7101, 2018 年

論文名 : Characteristics of vibration frequency measurement based on sound field imaging by digital holography

著者名 : S. K. Rajput, O. Matoba, Y. Awatsuji

掲載誌, 巻, ページ : OSA Continuum, Vol. 1, No. 1, pp. 200-212, 2018 年

論文名 : Three-dimensional stimulation and imaging-based functional optical microscopy of biological cells

著者名 : X. Quan, M. Kumar, O. Matoba, Y. Awatsuji, Y. Hayasaki, S. Hasegawa, H. Wake

掲載誌, 巻, ページ : Opt. Lett., Vol. 43, No. 21, pp. 5447-5450, 2018 年

論文名 : Holographic multi-parameter imaging of dynamic phenomena with visual and audio features

著者名 : S. K. Rajput, O. Matoba, Y. Awatsuji

掲載誌, 巻, ページ : Opt. Lett., Vol. 44, No. 4, pp. 995-998, 2019 年

論文名 : Regulation of myelin structure and conduction velocity by perinodal astrocytes.

著者名 : Dutta DJ, Woo DH, Lee PR, Pajevic S, Bukalo O, Huffman WC, Wake H, Bassar PJ, SheikhBahaei S, Lazarevic V, Smith JC, Fields RD.

掲載誌, 巻, ページ : Proc Natl Acad Sci U S A, 115 (46), pp. 11832 - 11837, 2018.

論文名 : Microglia mediate non-cell-autonomous cell death of retinal ganglion cells.

著者名 : Takeda A, Shinozaki Y, Kashiwagi K, Ohno N, Eto K, Wake H, Nabekura J, Koizumi S.

掲載誌, 巻, ページ : *Glia*, 66 (11), pp. 2366 - 2384, 2018.

論文名 : Microglia enhance synapse activity to promote local network synchronization.

著者名 : Akiyoshi R, Wake H, Kato D, Horiuchi H, Ono R, Ikegami A, Haruwaka K, Omori T, Tachibana Y, Moorhouse AJ, Nabekura J.

掲載誌, 巻, ページ : *eNeuro*, 5 (5), pii: ENEURO.0088-18, 2018.

論文名 : Cortical astrocytes prime the induction of spine plasticity and mirror image pain.

著者名 : Ishikawa T, Eto K, Kim SK, Wake H, Takeda I, Horiuchi H, Moorhouse AJ, Ishibashi H, Nabekura J.

掲載誌, 巻, ページ : *Pain*, 159 (8), pp. 1592 - 1606, 2018.

論文名 : Activity-dependent functions of non-electrical glial cells.

著者名 : Kato D, Eto K, Nabekura J, Wake H.

掲載誌, 巻, ページ : *J Biochem*, 163 (6), pp. 457 - 464, 2018.

論文名 : The dynamics of revascularization after white matter infarction monitored in *Flt1-tdsRed* and *Flk1-GFP* mice.

著者名 : Shimauchi-Ohtaki H, Kurachi M, Naruse M, Shibasaki K, Sugio S, Matsumoto K, Ema M, Yoshimoto Y, Ishizaki Y.

掲載誌, 巻, ページ : *Neurosci Lett*, 692, pp. 70 – 76, 2019.

論文名 : Retinal Detachment-Induced Müller Glial Cell Swelling Activates TRPV4 Ion Channels and Triggers Photoreceptor Death at Body Temperature.

著者名 : Matsumoto H, Sugio S, Seghers F, Krizaj D, Akiyama H, Ishizaki Y, Gailly P, Shibasaki K.

掲載誌, 巻, ページ : *J. Neurosci*, 38 (41), pp. 8745 – 8758, 2018.

論文名 : Ectopic positioning of Bergmann glia and impaired cerebellar wiring in *Mlc1*-over-expressing mice.

著者名 : Kikuchihara S, Sugio S, Tanaka KF, Watanabe T, Kano M, Yamazaki Y, Watanabe M, Ikenaka K

掲載誌, 巻, ページ : *J. Neurochem*, 147 (3), pp. 344 – 360, 2018.

論文名 : Inhibitory effect of several sphingolipid metabolites on calcineurin

著者名 : Maruyama, Y., , Ueno, S., Morita, M., Hayashi, F., and Maekawa, S.

掲載誌, 巻, ページ : *Neurosci Lett*, 673, p132-135 (2018) doi: 10.1016/j.neulet.2018.03.010

論文名 : Interaction of dynamin I with NAP-22, a neuronal protein enriched in the presynaptic region

著者名 : Ueno, S., Miyoshi, H., Maruyama, Y., Morita, M. and Maekawa, S.
掲載誌, 巻, ページ : Neurosci Lett, 675, p59-63 (2018) doi: 10.1016/j.neulet.2018.03.061

論文名 : Remyelination in the medulla oblongata of adult mouse brain during experimental autoimmune encephalomyelitis

著者名 : Hiratsuka, D., Furubea, E., Taguchi, K., Tanaka, M, Morita, M. and Miyata, S.
掲載誌, 巻, ページ : J. Neuroimmunol, 319, p41-54 (2018) doi: 10.1016/j.jneuroim.2018.03.014

論文名 : Metabolic Plasticity of Astrocytes and Aging of the Brain

著者名 : Morita, M., Ikeshima-Kataoka, H., Kreft, M., Vardjan, N., Zorec, R., Noda, M.
掲載誌, 巻, ページ : . Int. J. Mol. Sci. 2019, 20.

論文名 : Estimation of Neuronal Dynamics Based on Sparse Modeling

著者名 : Shinya Otsuka and Toshiaki Omori
掲載誌, 巻, ページ : Neural Networks, Vol.109, PP. 137-146, 2019 年
【システム制御情報学会学会賞 (奨励賞) を受賞】

論文名 : Estimation of Neuronal Network Dynamics Based on Sparse Modeling

著者名 : Ren Masahiro and Toshiaki Omori
掲載誌, 巻, ページ : Proceedings of the SICE Annual Conference,
PP. 1520-1523, 2018 年

論文名 : Spatio-Temporal Convolutional Neural Network for Frame Rate
Up-Conversion

著者名 : Yusuke Tanaka and Toshiaki Omori
掲載誌, 巻, ページ : ACM International Conference Proceeding Series,
PP. 1-8, 2019 年
【Best Paper Presentation Award, International Conference on Intelligent
Systems, Metaheuristics and Swarm Intelligence を受賞】

論文名 : Polar Transformation on Image Features for Orientation-Invariant Representations

※

著者名 : Jinhui Chen, Zhaojie Luo, Zhihong Zhang, Faliang Huang, Zhiling Ye, Tetsuya Takiguchi, Edwin R. Hancock
IEEE Transactions on Multimedia, Vol. 21, Issue 2, pp. 300-313, 2018 年

論文名 : Entropy policy for supervoxel agglomeration of neurite segmentation

著者名 : Tristan Hascoet, Baptiste Metge, Tetsuya Takiguchi, Yasuo Ariki
International Workshop on Frontiers of Computer Vision, 6 pages, 2019 年

【特許】

ホログラフィック 3次元マルチスポット光刺激装置及び方法, 特願 2018-130309