

様式（年次報告書）

令和3年 6月16日

令和2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	先端融合研究環・的場修
特許出願件数 1件,	論文発表件数 21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	先端融合研究環	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	先端融合研究環／名古屋大学大学院医学系研究科	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・生物学専攻	培養細胞系を用いた光学技術の評価
大森敏明	工学研究科・電気電子工学専攻	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, 機械学習を用いた脳機能細胞抽出に関する研究
塚本寿夫	理学研究科・生物学専攻	新規光応答性タンパク質の合成
高島遼一	都市安全研究センター	画像処理, 機械学習を用いた脳機能細胞抽出に関する研究
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
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
Manoj Kumar	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

Sudheesh K. Rajput	システム情報学研究科・システム科学専攻	3次元蛍光イメージング技術の構築
加藤 大輔	名古屋大学大学院医学系研究科	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

3. 研究成果の概要等について

マルチモーダルイメージングの開発（的場）

我々のグループでは光遺伝学を用いた細胞機能操作のための多点同時3次元光刺激としてのホログラフィック光刺激技術と、光操作により生じる細胞活動の3次元モニタリングのために高速3次元蛍光イメージング技術の開発を行っている。この光刺激と観察を同時に行うことのできる一体化ホログラフィック顕微鏡の構築を進めている。また、植物細胞の幹細胞化プロセスの解明に向けて、蛍光と位相の同時3次元イメージング可能なマルチモーダルイメージング技術を開発している。本年度は、マルチモーダルイメージングにおいて、デジタルホログラフィー及び強度輸送方程式を用いた2つのアプローチについて研究を行った。特にデジタルホログラフィーでは、3次元蛍光観察に適した同軸型新規配置を提案し、神戸大学特許として出願した。この技術を用いて、蛍光と位相の同時測定をヒメツリガネゴケを用いて行った。また、強度輸送方程式では、0.8 mm厚の蛍光ビーズを再構成することに成功し、超深度観察手法を確立した。

生きた3次元神経細胞の制御実験（和氣）

今年度はニコン正立型2光子顕微鏡ベースにホログラフィック操作・計測の光路を導入し、これによる刺激の最適化を図り、細胞数50-100個までの刺激を30Hzで行うことを可能にした。また刺激の形状を最適化することによって、刺激効率の向上を図った。さらに網羅的に画像内の神経細胞の組み合わせを自動で変更し、これを全てのパターンで刺激することが可能となった。開発したホログラフィック顕微鏡を用いて、神経細胞間の機能的結合の評価を行い、慢性疼痛モデルにおいて、神経細胞間の機能的結合が強化されていることによって、同期性及び活動強度が増加することがわかった。さらにこれらの神経細胞活動を操作することで痛みという感覚の人為的操作に成功した(Okada et al., Sci Adv, 2021)。さらに現在ニコンソリューションズとともに現行の2光子ホログラフィック顕微鏡を市販化するための改良に取り組むとともに、生物応用のアプリケーションを開発している。

培養細胞におけるホログラフィック光刺激応答（森田）

ホログラム光照射が光遺伝学において有用であることを実証するために、培養細胞にカルシウム蛍光タンパク質RCaMPと光活性化タンパク質ChR2またはopto-a1ARを発現させたものを用いて、光依存的な応答を検討した。初代培養神経細胞にRCaMPとChR2を発現させた場合、80 nmの1光子ホログラム刺激により、標的細胞特異的な応答が誘導されたが、800 nmの2光子ホログラム刺激による応答は見られなかった。これに対し、CHO細胞または培養アストロサイトにRCaMPとopto-a1ARを発現させた場合、上記の1光子と2光子ホログラム刺激に対する応答が見られ、2光子を利用することにより、細胞局所的な応答が誘導できることが明らかとなった。照射条件の影響を検討したところ、スポット径は1-10 μmの範囲で影響が見られなかったが、照射時間は50-200 msecの範囲で顕著に応答を増加させた。さらに、培養アストロサイトについては2光子

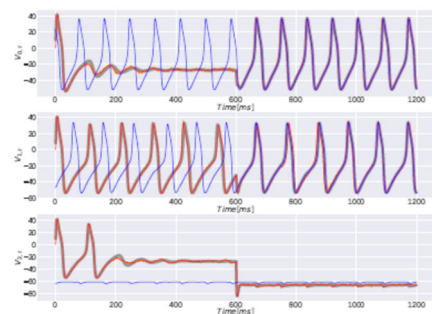
ホログラムによる細胞局所のカルシウム上昇が細胞内を伝搬する過程について詳細な検討を行い、単発刺激ではほとんど伝搬が見られないのに対し、連続刺激をした場合、ストア作動性カルシウム流入が誘導されることにより、カルシウム上昇が細胞内で伝搬する現象、いわゆるカルシウム波が発生することが明らかになった。

光遺伝学用光操作ツール開発（塚本）

現在、光受容タンパク質を神経細胞などに強制発現させて、光刺激によって細胞応答を操作する、光遺伝学解析が進展している。これまでの光遺伝学解析では、光によってイオンを透過する光感受性イオンチャネルのチャンネルロドプシンが光操作ツールとして最もよく用いられてきた。続いて、光感受性 G タンパク質共役受容体(GPCR)である、動物が持つオプシンが第 2 世代光操作ツールとして、細胞のイオン電流のみならず代謝応答も操作するために用いられ始めている。これまでに数千種類同定されているオプシンの中でも、ヒトなど哺乳類の視細胞で機能するオプシンがよく用いられているが、これらは光によってオン反応しか起こせないという欠点があった。この点に対して、無脊椎動物ではたらくオプシンを用いることで、特定の波長（色）の光でオン反応を起こすとともに、異なる波長の光によってオフ反応も引き起こせることを利用することで、第 3 世代の光操作ツールとして活用できるのではないかと提議した。これまでに光操作ツールとして有用な光応答を示すいくつかの無脊椎動物由来オプシンについて、その光応答特性を詳細に検討し、紫外領域から青領域の波長で細胞応答をオンし、緑領域から橙領域でオフできるような光操作ツール群を揃えることができています。

観測データに基づいた神経ダイナミクスの推定と動的制御（大森）

近年の光計測と光操作の進展により、神経応答を踏まえた神経制御の数理基盤の確立が求められている。本年度は、観測データに基づいた神経ダイナミクスの推定と動的制御を同時に実現するアルゴリズムの開発を行った。これまでに構築してきた単一神経細胞のダイナミクス推定・制御技術をさらに進展させ、複数神経細胞の非線形ダイナミクス推定と回路制御を実現するアルゴリズムの構築を行った。加えて、大脳皮質の層状構造を考慮した数理モデルに注目し、スパイク系列から、ネットワーク構造を推定するためのデータ駆動型手法を構築した。尤度の計算が困難な複雑システムの推論に有効である近似ベイズ計算と神経回路網モデルとを融合した数理・データサイエンス解析技術を構築した。得られた成果は、北米神経科学会や脳型人工知能に関する国際会議において公表するとともに、関連する研究会において依頼講演を受けた。

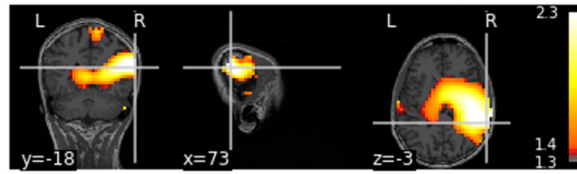


図：神経回路ダイナミクス推定とダイナミクス制御へのデータ駆動型アプローチ

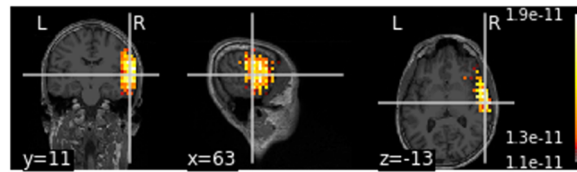
深層学習を用いた脳内電流源推定（滝口）

本研究では、頭の外側のセンサで非侵襲に測定したノイズを含む観測信号から、脳内の活動を予測する逆問題に対して、Deep Priorに基づく深層学習法を提案した。電流源（活動源）の推定は、人間の複雑な認知機能に関わる脳の領域の発見や、脳疾患や精神疾患によ

って変化した部分の発見に応用されることが期待される。一般的な深層学習では大量の学習データが必要とされるが、本研究では教師データ不要のニューラルネットワークを提案した。明示的に電流源の事前分布を与える必要のある従来手法と比較して、本提案手法では深層ニューラルネットワークを用いて複雑なデータの事前分布をモデル化することで、誤差が削減されることが示された。



従来法



Deep Prior

図. 推定電流源の空間分布

4. 論文・著書・特許出願リスト

論文名 : Digital Holographic Multimodal Cross-Sectional Fluorescence and Quantitative Phase Imaging System

著者名 : M. Kumar, X. Quan, Y. Awatsuji, Y. Tamada, O. Matoba

掲載誌 : Scientific Reports, Vol.10, 7580 (2020)

論文名 : Speckle Denoising Techniques in Imaging Systems (国際共著論文)

著者名 : M. Kumar, Y. Tounsi, K. Kaur, A. Nassim, F. Mendoza-Santoyo, O. Matoba

掲載誌 : Journal of Optics, Vol. 22, 063001 (2020)

論文名 : Single-shot common-path off-axis dualwavelength digital holographic microscopy

著者名 : M. Kumar, X. Quan, Y. Awatsuji, Y. Tamada, O. Matoba

掲載誌 : Applied Optics, Vol. 59, Issue 24, pp. 7144-7152 (2020)

論文名 : Interferenceless coded aperture correlation holography with synthetic point spread holograms (国際共著論文)

著者名 : M. Kumar, A. Vijayakumar, J. Rosen, O. Matoba

掲載誌 : Applied Optics, Vol. 59, Issue 24, pp. 7321-7329 (2020)

論文名 : Single-shot common-path off-axis digital holography: Applications in bio-imaging and optical metrology

著者名 : M. Kumar, O. Matoba, X. Quan, S. K. Rajput, Y. Awatsuji, Y. Tamada

掲載誌 : Applied Optics, 60, A195-A204 (2021)

論文名 : High-speed imaging of the sound field by parallel phase-shifting digital holography

著者名 : Y. Takase, K. Shimizu, S. Mochida, T. Inoue, K. Nishio, S. K. Rajput, O. Matoba, P. Zia, and Y. Awatsuji

掲載誌 : Applied Optics, 60, A179-A187 (2021)

論文名 : Multimodal microscopy: fast 3D acquisition of quantitative phase imaging and cross-sectional fluorescence imaging

著者名 : X. Quan, M. Kumar, S. K. Rajput, Y. Awatsuji, Y. Tamada, and O. Matoba

掲載誌 : IEEE J. Sel. Top. Quant. Elec. 27, 6800911 (2021)

論文名 : Sound wave detection by common-path digital holography

著者名 : S. K. Rajput, O. Matoba, M. Kumar, X. Quan, Y. Awatsuji

掲載誌 : Optics and Lasers in Engineering, Vol. 137, 106331 (2021)

論文名 : Dynamic phase measurement of a transparent object by parallel phase-shifting digital holography with dual polarization imaging cameras

著者名 : P. Xia, S. Ri, T. Inoue, Y. Awatsuji, O. Matoba

掲載誌 : Optics and Lasers in Engineering Vol. 141, 106583 (2021)

論文名 : Multi-physical parameter cross-sectional imaging of quantitative phase and fluorescence by integrated multimodal microscopy (国際共著論文)

著者名 : S.K. Rajput, O. Matoba, M. Kumar, X. Quan, Y. Awatsuji, Y. Tamada, and E. Tajahuerce

掲載誌 : Journal of Selected Topics in Quantum Electronics, 27, 6801809 (2021)

論文名 : Pain induces stable, active microcircuits in the somatosensory cortex that provide a therapeutic target (国際共著論文)

著者名 : T. Okada, D. Kato, Y. Nomura, N. Obata, X. Quan, A. Morinaga, H. Yano, Z. Guo, Y. Aoyama, Y.

Tachibana, A.J. Moorhouse, O. Matoba, T. Takiguchi, S. Mizobuchi, H. Wake

掲載誌 : Science Advances, Vol.7, eabd8261 (2021)

論文名 : Maternal immune activation induces sustained changes in fetal microglia motility (国際共著論文)

著者名 : Ozaki K, Kato D, Ikegami A, Hashimoto A, Sugio S, Guo Z, Shibushita M, Tatematsu T, Haruwaka K, Moorhouse AJ, Yamada H, Wake H.

掲載誌 : Scientific Reports, 10.1038/s41598-020-78294-2

論文名 : Negative feedback control of neuronal activity by microglia (国際共著論文)

著者名 : Badimon A, Strasburger HJ, Ayata P, Chen X, Nair A, Ikegami A, Hwang P, Chan AT, Graves SM, Uweru JO, Ledderose C, Kutlu MG, Wheeler MA, Kahan A, Ishikawa M, Wang YC, Loh YE, Jiang JX, Surmeier DJ, Robson SC, Junger WG, Sebra R, Calipari ES, Kenny PJ, Eyo UB, Colonna M, Quintana FJ, Wake H, Gradinaru V, Schaefer A.

掲載誌 : Nature 10.1038/s41586-020-2777-8

論文名 : Dual microglia effects on blood brain barrier permeability induced by systemic inflammation (国際共著論文)

著者名 : Haruwaka K, Ikegami A, Tachibana Y, Ohno N, Konishi H, Hashimoto A, Matsumoto M, Kato D, Ono R, Kiyama H, Moorhouse AJ, Nabekura J, Wake H.

掲載誌 : Nature Communications, 10.1038/s41467-019-13812-z

論文名 : Motor learning requires myelination to reduce asynchrony and spontaneity

in neural activity(国際共著論文)

著者名 : Kato D, Wake H, Lee PR, Tachibana Y, Ono R, Sugio S, Tsuji Y, Tanaka YH, Tanaka YR, Masamizu Y, Hira R, Moorhouse AJ, Tamamaki N, Ikenaka K, Matsukawa N, Fields RD, Nabekura J, Matsuzaki M.

掲載誌 : *Glia*, 10.1002/glia.23713

論文名 : The Diversity of Intermediate Filaments in Astrocytes (国際共著論文)

著者名 : Potokar, M., Morita, M., Wiche, G., Jorgačevski, J.

掲載誌, *Cells*. 9(7): 1604 (2020)

論文名 : Replica Exchange Particle Gibbs Method with Ancestor Sampling

著者名 : Hiroaki Inoue, Koji Hukushima, Toshiaki Omori

掲載誌 : *Journal of the Physical Society of Japan*, Vol. 89, No. 10, 104801:1-7, 2020年

論文名 : Online Bayesian Approach for Estimation and Control of Neural System

著者名 : Shuhei Fukami, Toshiaki Omori

掲載誌 : *Proceedings of IEEE 3rd Global Conference on Life Sciences and Technologies*, pp. 103-105, 2021

論文名 : Video Frame Rate Up-Conversion via Spatio-Temporal Generative Adversarial Networks

Naomichi Takada, Toshiaki Omori

Journal of Image and Graphics, pp. 1-9, 2021

論文名 : Multimodal fusion for indoor sound source localization(国際共著論文)

著者名 : Jinhui Chen, Ryoichi Takashima, Xingchen Guo, Zhihong Zhang, Xuexin Xud, Tetsuya Takiguchi, Edwin R. Hancock

掲載誌 : *Pattern Recognition*, Vol. 115, 2021

論文名 : Optogenetic Modulation of Ion Channels by Photoreceptive Proteins

著者名 : Tsukamoto H, and Furutani Y.

掲載誌 : *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1293, 73-88, 2021