

第 39 回先端技術大賞応募論文

マウス全脳神経活動の単一細胞解像度解析基盤の確立と  
概日神経活動アトラスの構築

大阪大学大学院 医学系研究科 医学専攻  
博士課程 3 年

山下 勝成

## 1. 緒言

脳は、多数の解剖学的領域が相互に連携しながら、多様な生理機能や行動を支える高度に統合された器官である。こうした機能は、脳内の空間的なつながりに加え、時間的にも精緻に制御されることで成り立っている。なかでも概日リズムは、睡眠・覚醒、代謝、内分泌、認知機能などを調節する基本的な時間制御機構であり、脳という動的システムの動作原理を理解するうえで不可欠な要素である。実際、概日時計の破綻は、代謝疾患、循環器疾患、神経疾患をはじめとするさまざまな病態と関連することが知られている[1]。

これまで、哺乳類における中枢時計として視交叉上核 (SCN) が重要な役割を担うことは広く示されてきた[2]。しかし、脳機能は SCN 単独で完結するものではなく、睡眠・覚醒、記憶、感覚処理といった高次機能は、多数の脳領域の相互作用によって支えられている。したがって、概日リズムの理解を包括的な脳機能の理解へとつなげるためには、個別領域の観察にとどまらず、脳全体を同一の時空間スケールで捉える解析手法が必要である。しかし、脳全域において自発的な神経活動の概日リズムがどのような時空間パターンを形成しているかについては、計測技術の限界から、単一細胞解像度かつ脳全域という広視野を両立した定量評価が極めて困難であった。

そこで本研究では、組織透明化技術 CUBIC (clear, unobstructed brain/body imaging cocktails and computational analysis) [3]と全脳 3 次元 c-Fos 免疫染色を中核とし、化学・光学・情報科学を融合させることで、マウス全脳の概日神経活動を単一細胞解像度で一元的に捉える解析基盤を構築した。一定暗条件下で 4 時間ごとに 2 日間にわたり脳を採取する大規模な時系列サンプリングと、独自開発の高速リズム検出アルゴリズムを含む高度な定量解析パイプラインを適用することにより、脳全域にわたる概日神経活動の全容を解明し、時間軸を備えた全脳神経活動アトラスを構築することを目的とした。

## 2. 全脳の概日神経活動を捉えるための課題

脳における神経活動の概日リズムを観察するために、これまで電気生理学的記録、*in situ* hybridization、概日時計遺伝子レポーター、カルシウムイメージング、即時早期遺伝子ラベリングなど、さまざまな手法が用いられてきた。これらの手法はいずれも有用である一方、観察領域が限られやすく、脳全体を同一の条件・同一の空間スケールで網羅的に比較することは困難であった。

そこで、組織透明化技術が有力な手法として考えられた[4]。全脳を透明化し、3 次元免疫染色を行う技術は、すでに研究室から報告されていたが[5]、薬理的刺激などによらない自発的な神経活動の微細な変動を、全脳にわたって定量的に捉えることは容易ではなかった。こうした微小な変化を全脳で比較するためには、まず環境条件を厳密に統制した時系列サンプリング系、多数のサンプルに対する均一な免疫染色法、高解像度の 3 次元画像の

取得、細胞を網羅的かつ高感度に検出する画像解析アルゴリズムを統合的に整備することが必要であった。

さらに、リズム解析においては、解剖学的に定義された単一の脳領域の内部にも、局所的な構造や細胞構成の違いに由来する概日リズムの多様性が存在しうると考えられた。したがって、そのような局所的な概日リズムを埋もれさせることなく可視化するには、領域単位の解析に加えて、より細かな空間スケールでの解析が必要であった。しかし、多数のサンプルに対し、現実的な時間でボクセルスケールでの全脳リズム解析を実行するためには、高効率なリズム検出手法の実装が求められた。

### 3. 概日神経活動の解析基盤の構築

これらの課題を克服するため、本研究では、組織透明化、3次元免疫染色、ライトシート顕微鏡による撮像、デコンボリューションを含む画像処理、細胞自動検出、標準脳アトラスへのマッピング、および高速リズム解析法を統合した「全脳時空間解析パイプライン」を構築した（図1）。

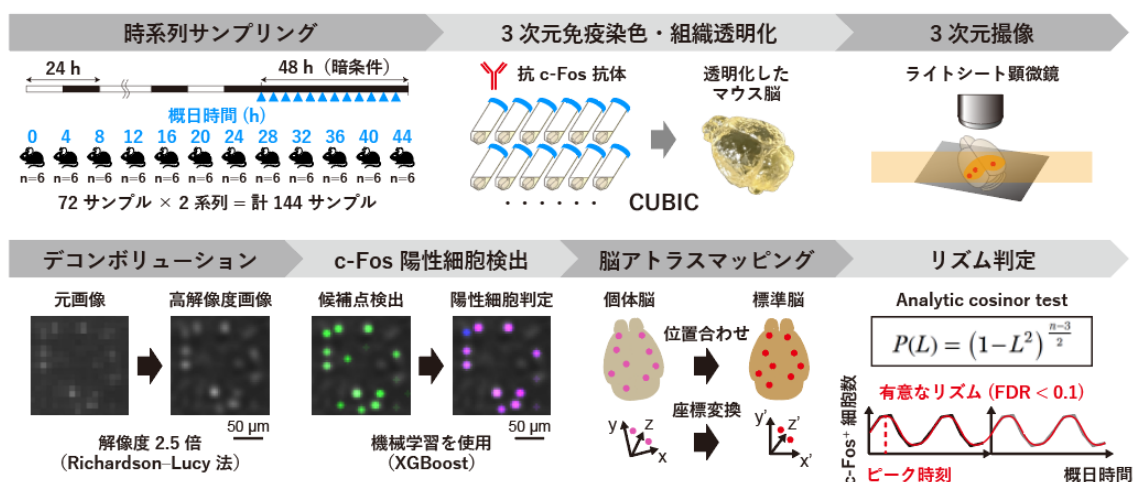


図1. マウス全脳神経活動の単一細胞解像度解析基盤の概要

一定暗条件下で4時間ごとに6個体、2日間（計12時点）サンプリングしたマウス脳（2系列で計144サンプル）に対し、3次元 c-Fos 免疫染色および組織透明化（CUBIC）、ライトシート顕微鏡による3次元撮像を行った。取得画像に対してデコンボリューション（Richardson-Lucy 法）による高解像度化を行い、機械学習（XGBoost）を用いて c-Fos 陽性細胞を全脳にわたり自動検出した。検出した細胞は標準脳アトラスに位置合わせおよび座標変換によりマッピングし、領域およびボクセル単位での定量解析を可能とした。Analytic cosinor test により概日リズムの有無を評価し、ピーク時刻を同定した。

対象には成体オス C57BL/6N マウスを用い、一定暗条件下で 4 時間ごとに 2 日間、計 12 時点で脳を採取した。各時点につき 6 個体を用い、この実験を独立に 2 系列実施することで、総計 144 脳の大規模時系列サンプルセットを得た。自発的な神経活動に対する外的刺激の影響を最小限に抑えるため、サンプリング時には後続の個体に刺激が伝わらないよう実験環境を整え、6 個体を個別ケージ内で同時に麻酔導入する系を構築した。さらに、刺激に伴う c-Fos 誘導が検出可能となる前に固定を完了させるため、ラック扉の開放から 6 個体すべての灌流固定終了までを 20 分以内に完遂するプロトコルを確立した。

採取した脳は、CUBIC 法を用いて、c-Fos に対する 3 次元免疫染色を施したのち透明化を行い、ライトシート顕微鏡で撮像した。c-Fos は脳内で広範かつ迅速に誘導される即時早期遺伝子であり、神経活動を脳全体で可視化するのに適したマーカーである[6]。本研究では、多数の全脳サンプルに対して同一条件下で 3 次元免疫染色を実施できる系を整え、サンプル間で比較可能な c-Fos シグナルを安定して取得できるようにした。3 次元画像は 0.63 倍対物レンズで効率よく撮像したのち、計算科学的アプローチであるデコンボリューションによって復元された高解像度画像を得た。これに対し、局所の輝度情報と点広がり関数 (PSF) に基づく理想的な細胞モデルの輝度分布との比較から算出される複数の特徴量を用いた機械学習アルゴリズム (XGBoost) を適用することで、c-Fos 陽性細胞を全脳にわたり単一細胞解像度で自動検出することが可能となった。その後、各脳を標準脳アトラスにマッピングすることで、全 642 解剖学的領域ごとの定量解析を行った。このアトラスには、CUBIC 処理脳に最適化された Neuron Atlas [7] を用いて精度よく位置合わせすることで、大脳皮質の各層など正確なレジストレーションが求められる脳領域についても評価を可能にした。

このマッピングに基づく領域単位での c-Fos 陽性細胞数のリズム解析に加え、20  $\mu\text{m}$  ボクセルスケールでの全脳リズム解析も行った。これにより、単一の脳領域内部に存在する位相差や、空間的に連続する位相変化を評価することができた。ここでは、一億ボクセルを超える膨大な計算負荷を解消するため、幾何学的原理に基づき P 値を解析的に導出する独自のリズム検出法「analytic cosinor test [8]」を適用した。これにより、従来の検定法では困難であった、大規模時系列データに対する全脳規模の統一的なリズム性評価を可能となった。

さらに、局所的な c-Fos 陽性細胞数の変化だけでなく、全脳の総活動量に対する各領域の占有率を評価指標として導入することで、脳全体の活動パターンから個体の「脳時刻」を推定する、オミクス解析手法を応用した情報統計的枠組みも構築した。

#### 4. 脳に広く存在する概日神経活動リズムとその位相

まず、全脳 3 次元免疫染色によって得られた c-Fos シグナルの妥当性を検証するため、既知の中核時計である SCN [9,10]に着目し、その時系列画像を比較した。その結果、SCN

における c-Fos シグナルは、2 系列の実験を通じて再現よく明瞭な 24 時間周期の変動を示した（図 2）。そのうえで全脳に対して本研究で構築した解析パイプラインを適用したところ、1 脳あたり約 40 万～300 万個の c-Fos 陽性細胞が検出され、その総数にも時刻に応じた変動が認められた。

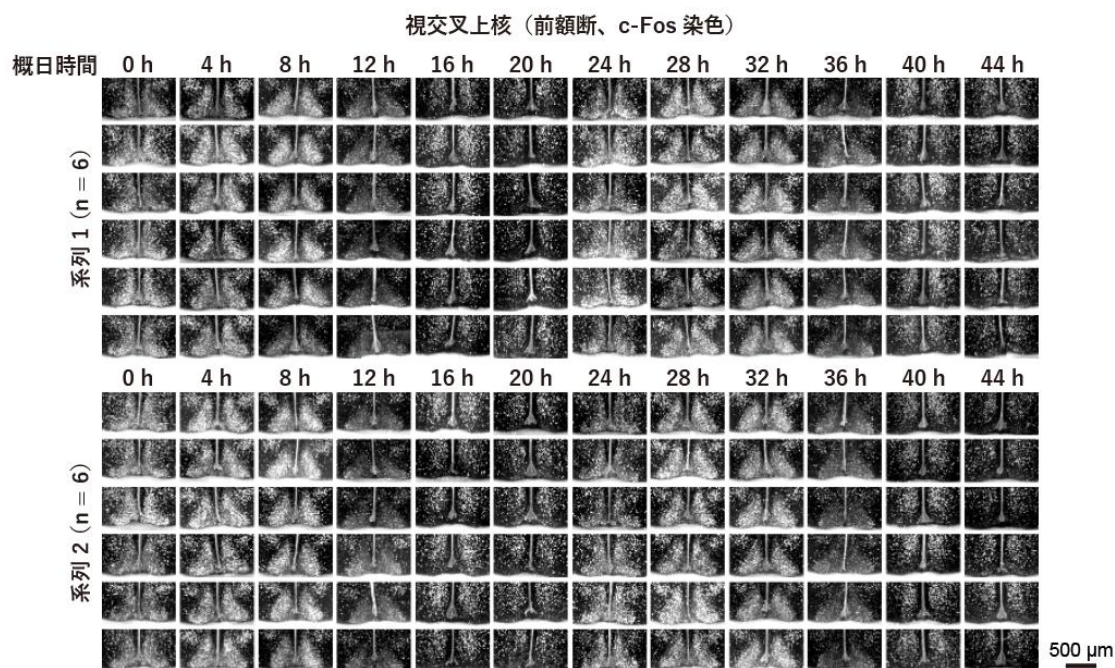


図 2. 視交叉上核（SCN）における c-Fos シグナルの時系列変化

一定暗条件下で 4 時間ごとに採取したマウス脳に対し、c-Fos 免疫染色を行い、取得した全脳 3 次元画像から SCN の前額断像を再構成した。各時点 6 個体を用いた 2 系列の独立実験で、SCN の c-Fos シグナルは再現性高く周期的な変化を示した。スケールバー：500  $\mu$ m。

全 642 解剖学的領域を対象とした時系列解析の結果、508 領域（79%）が有意な概日リズムを示した（図 3）。これは、神経活動の概日リズムが SCN のような限られた領域にとどまらず、脳に広く存在することを示している。さらに、各領域のピーク時刻は一樣ではなく、夜行性であるマウスの活動期後半すなわち主観的夜の後半にピークを示す領域が多数を占める一方で、非活動期である主観的昼にピークを持つ領域も確認された。

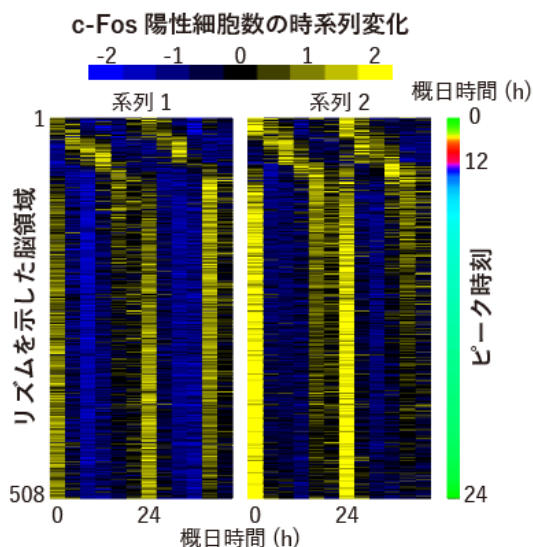


図 3. 概日リズムを示した脳領域における c-Fos 陽性細胞数の時系列変化  
有意なリズムを示した 508 領域について、c-Fos 陽性細胞数の時系列データを正規化し、ピーク時刻に基づいて並べ替えてヒートマップとして表示した。色は各領域における相対的な細胞数変化 (Z スコア) を示し、右のカラーバーはピーク時刻 (概日時間) を示す。

このようなピーク時刻の空間分布を詳しくみると、生理学的機能系ごとに特徴的な時間構造を示すことが明らかになった (図 4)。感覚処理系においては、視覚関連領域が主観的昼にピークを示す傾向がある一方、聴覚関連領域は主観的夜にピークを示す傾向があり、両者は逆位相の関係を示した。また、睡眠・覚醒調節系においても、覚醒促進領域の多くが活動期である主観的夜の後半にピークを示したのに対し、腹外側視索前野 (VLPO) などの NREM 睡眠促進領域は主観的昼にピークを示した。

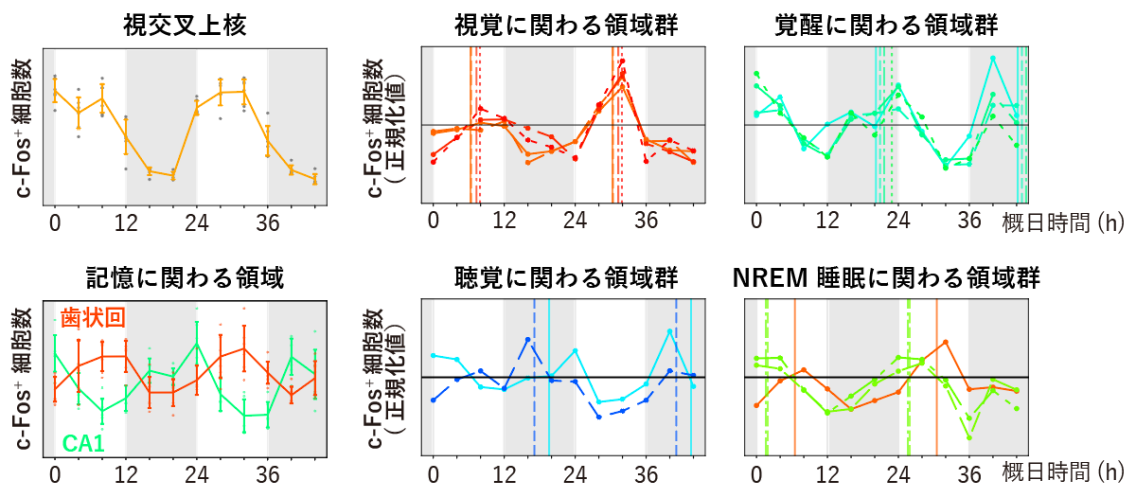


図 4. 生理学的機能に関連する脳領域における c-Fos 陽性細胞数の時系列変化

SCN および記憶、視覚・聴覚、覚醒・NREM 睡眠に関わる代表的な脳領域について、c-Fos 陽性細胞数 (またはその正規化値) の時系列変化を示した。各曲線は系列 1 の結果を示し、縦線は各領域のピーク時刻 (概日時間) を示す。灰色の領域は主観的夜を示す。

さらに、記憶関連領域では海馬内部に顕著な位相差が認められた。CA1 および CA3 は

主観的夜にピークを示したのに対し、歯状回（DG）は非活動期である主観的昼にピークを示し、ほぼ逆位相であった。これは、海馬における記憶処理過程が、一日のうちで時間的に分業化されている可能性を示唆している。また、小脳においては、検出された c-Fos 陽性細胞数は比較的少なかったものの、リズムを示す領域は一貫して非活動期である主観的昼の後半にピークを示した。これらの結果は、本研究が確立した解析基盤によって初めて、全脳にわたる機能系ごとの時空間構造を俯瞰的に捉えることが可能になったことを示している。

## 5. ボクセル単位解析が明らかにした領域内の位相差

領域単位の解析に加え、20  $\mu\text{m}$  ボクセル解像度での解析を適用することで、解剖学的な領域の定義に縛られない、より微細な概日神経活動の評価を行った。その結果、SCN や視床下部背内側核（DMH）、海馬 CA1、嗅内皮質などにおいて、同一領域の内部に異なるピーク時刻を示す部位が混在し、時間的な多様性が存在することが明らかになった。

特に SCN では、前方背内側から腹外側にかけて緩やかに推移する連続的な位相勾配を3次元的に可視化することに成功した（図5）。また CA1 においても、遺伝子発現や細胞種分布の違いが知られる背腹軸に沿って[11,12]、連続的な活動ピーク時刻の変化が認められ、神経活動の時間的な違いも存在することが示された。こうした知見は、観察領域が限定される従来手法では捉えることが容易ではなく、本解析基盤の高い空間解像度と高速処理アルゴリズムによって全脳規模での定量的可視化をはじめて実現した成果である。

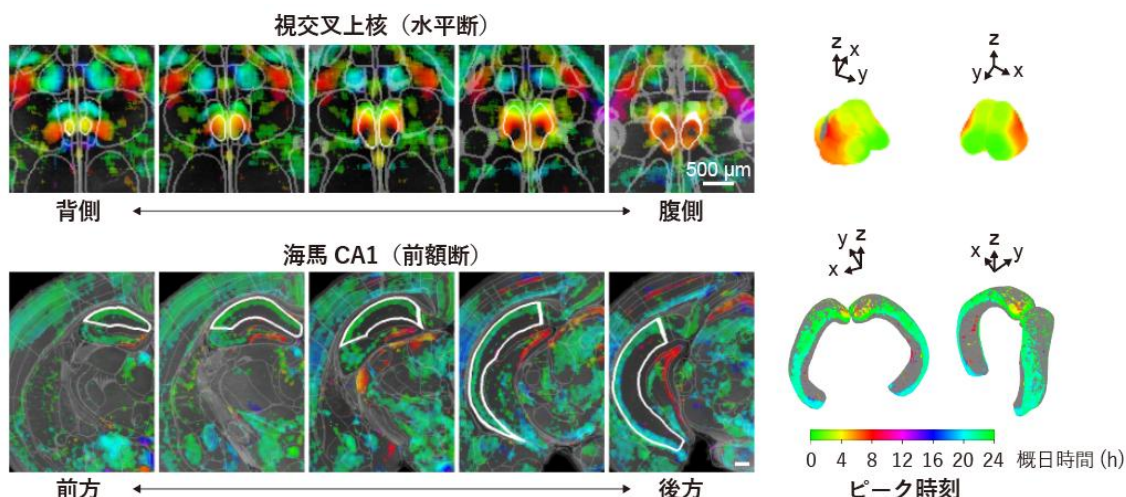


図5. ボクセル単位解析により可視化された領域内の位相分布

SCN および海馬 CA1 における c-Fos 陽性細胞数のボクセル単位解析結果を示す。各ボクセルのピーク時刻（概日時間）を色で表示した。SCN では前方背内側から腹外側にかけて、CA1 では背腹軸に沿ってピーク時刻の変化が観察された。スケールバー：500  $\mu\text{m}$ 。

## 6. 相対位相を用いた脳時刻推定

次に、脳全体の活動パターンから脳時刻を推定する情報統計的な枠組みを構築した。解析にあたり、全脳の c-Fos 陽性細胞数自体の日内変動を踏まえ、各領域の c-Fos 陽性細胞数をその時点における全脳の総 c-Fos 陽性細胞数で割った cell count ratio を指標として導入した。

各領域についてこの指標に基づくリズム解析を行ったところ、その相対位相は一日を通じて幅広い時間帯に分布することがわかった。そこで、相対位相が均等に分散するように領域群を抽出し、脳の概日タイムテーブル[13]を作成し、交差検証 (leave-one-out cross-validation) により個別サンプルの採取時刻を推定したところ、平均絶対誤差は約 1.44 時間という高い精度が得られた (図 6)。

これらの結果は、脳全体の c-Fos パターンが、単なる局所活動の総和ではなく、個体の時刻情報を高度に反映していることを示唆している。すなわち本研究は、概日神経活動を脳内の局所現象としてだけでなく、個体の内部状態 (脳時刻) を読み出すためのシステム情報として活用する新たな枠組みを提示した。この枠組みは、たとえば概日リズムの減衰や位相のずれが生じる疾患モデルにおいて、個体内部の時計を定量的に評価することを可能にし、より正確な病態解析に寄与すると期待される。

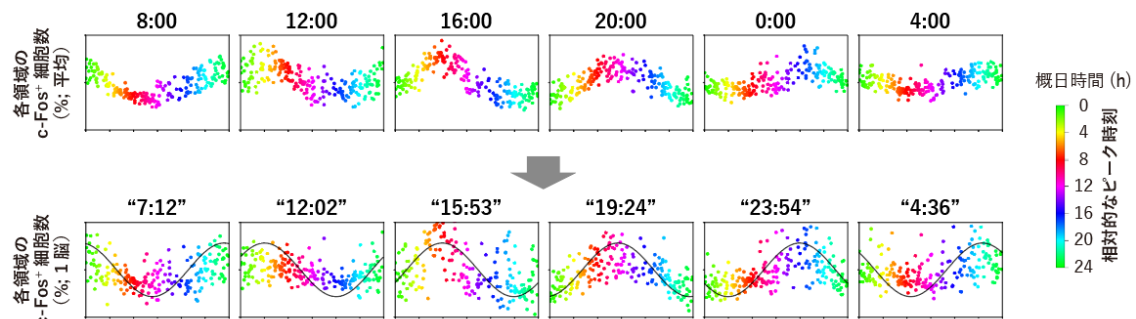


図 6. 相対位相を指標にした脳活動パターンに基づく脳時刻推定

各時点における脳領域ごとの c-Fos 陽性細胞数の相対値を示す。各点は脳領域を表し、色はその脳領域の相対的なピーク時刻 (概日時間) を表す。上段は実際の採取時刻における分布、下段は各サンプルについて推定された採取時刻を示す。

さらに、本研究で得られた結果をオープンアクセスのデータベース (<https://circadian.cfosdb.systems-based-medicine.org/database>) として公開し、領域およびボクセル単位で概日リズムを探索・比較できる情報資源を提示した。このリソースは、単に本研究の結果を閲覧するためのものではなく、遺伝子発現、神経回路、細胞種情報など他の脳科学リソースとの統合により、新たな仮説を生み出すためのプラットフォームとなり

うる。

## 7. 結 言

本研究により、マウス全脳神経活動を単一細胞解像度で一元的に定量化する解析基盤が確立された。これにより、従来は限られた領域ごとにしか捉えられなかった脳の概日神経活動を、同一条件下かつ全脳スケールで俯瞰し、機能系ごとの時間構造を明らかにすることが可能となった。

今後、この解析基盤は時間生物学にとどまらず、広く脳機能研究に展開できると期待される。たとえば、睡眠、記憶、感覚処理、運動、情動といった多様な機能を支える神経活動を、全脳規模かつ単一細胞解像度で比較することで、脳機能の時空間的な構成原理をより深く理解することが可能となる。また、薬理学的研究においては、薬剤投与によって生じる神経活動の変化を全脳にわたって定量化し、その作用部位や作用時刻、さらには予期しない影響の広がりまで評価することが可能になる。さらに、疾患モデルに応用することで、異常がいつ、どこで現れるかという時空間的な観点から病態を捉え直すことも可能である。

すなわち本研究は、概日神経活動の全脳アトラスを提示しただけでなく、マウス全脳神経活動を単一細胞解像度で定量するための共通基盤を示したものである。この基盤により、今後、多様な脳科学研究や薬理学的研究が新たな水準へと押し広げられることが期待される。

## 8. 謝 辞

本研究の遂行にあたり、ご指導・ご支援をいただいた東京大学大学院医学系研究科 上田泰己教授、木下福章特任助教、東京大学医学部附属病院病理部 吉田将太特任助教、株式会社 CUBICStars CTO 松本桂彦氏、久留米大学個性システム生物学 山田陸裕准教授、順天堂大学大学院医学研究科 洲崎悦生教授に深く感謝申し上げます。

また、本研究内容の一部は下記雑誌に報告しております。

Yamashita K, Kinoshita FL, Yoshida SY, Matsumoto K, Mitani TT, et al. A whole-brain single-cell atlas of circadian neural activity in mice. *Science* 2026;19;391:eaea3381.

## 9. 参考文献

- [1] Evans JA, Davidson AJ. Health consequences of circadian disruption in humans and animal models. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2013;119:283–323.
- [2] Abrahamson EE, Moore RY. Suprachiasmatic nucleus in the mouse: retinal innervation, intrinsic organization and efferent projections. *Brain Res* 2001;916:172–91.
- [3] Susaki EA, Tainaka K, Perrin D, Kishino F, Tawara T, Watanabe TM, et al. Whole-brain

imaging with single-cell resolution using chemical cocktails and computational analysis. *Cell* 2014;157:726–39.

- [4] Ueda HR, Ertürk A, Chung K, Gradinaru V, Chédotal A, Tomancak P, et al. Tissue clearing and its applications in neuroscience. *Nat Rev Neurosci* 2020;21:61–79.
- [5] Susaki EA, Shimizu C, Kuno A, Tainaka K, Li X, Nishi K, et al. Versatile whole-organ/body staining and imaging based on electrolyte-gel properties of biological tissues. *Nat Commun* 2020;11:1982.
- [6] Sagar SM, Sharp FR, Curran T. Expression of c-fos protein in brain: metabolic mapping at the cellular level. *Science* 1988;240:1328–31.
- [7] Ueda H, Mitani T, Yamaura K, Yamada R, Matsumoto K, Susaki E, et al. Whole-brain single-neuron atlas reveals microglial security hole accelerating neuronal vulnerability. *Research Square* 2025. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-5827312/v1>.
- [8] ygriku. OrganismalSystemsBiology/analytic\_cosinor: Analytic cosinor test. *Zenodo*; 2025. <https://doi.org/10.5281/ZENODO.17418382>.
- [9] Sumová A, Trávníčková Z, Mikkelsen JD, Illnerová H. Spontaneous rhythm in c-Fos immunoreactivity in the dorsomedial part of the rat suprachiasmatic nucleus. *Brain Res* 1998;801:254–8.
- [10] Miller JP, McAuley JD, Pang KCH. Spontaneous fos expression in the suprachiasmatic nucleus of young and old mice. *Neurobiol Aging* 2005;26:1107–15.
- [11] Cembrowski MS, Bachman JL, Wang L, Sugino K, Shields BC, Spruston N. Spatial gene-expression gradients underlie prominent heterogeneity of CA1 pyramidal neurons. *Neuron* 2016;89:351–68.
- [12] Yao Z, van Velthoven CTJ, Nguyen TN, Goldy J, Seden-Cortes AE, Baftizadeh F, et al. A taxonomy of transcriptomic cell types across the isocortex and hippocampal formation. *Cell* 2021;184:3222–3241.e26.
- [13] Ueda HR, Chen W, Minami Y, Honma S, Honma K, Iino M, et al. Molecular-timetable methods for detection of body time and rhythm disorders from single-time-point genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:11227–32.
- [14] Anafi RC, Francey LJ, Hogenesch JB, Kim J. CYCLOPS reveals human transcriptional rhythms in health and disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2017;114:5312–7.