

令和 3 年 6 月 20 日現在

機関番号：82406

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K04188

研究課題名（和文）光生体イメージングによる生体モデリングを用いたオプトジェネティクス制御の高精度化

研究課題名（英文）Improvement in optgenetics with optical biomedical tomography

研究代表者

大川 晋平（Shinpei, Okawa）

防衛医科大学校（医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究施設、病院並びに防衛・医用工学・助教

研究者番号：20432049

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：光を照射することによって細胞の機能を操作するオプトジェネティクス等の光を用いた治療技術において、光を吸収するたんぱく質や薬剤等の光吸収体にどれくらいの光が吸収されるかをイメージングすることで高度な制御が可能になる。光照射に伴って生じる超音波（光音響波）を測定し、光吸収体の濃度分布イメージングする光音響イメージングに関して生体内の光伝播シミュレーションとスパースモデリングを応用した画像再構成技術を開発し、計算機シミュレーションや生体模擬試料を用いた実験、動物実験によってその効果を実証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって生体内で光を吸収して効果を発揮する薬剤やたんぱく質の濃度分布のイメージング計測について一定の知見とノウハウを得ることができた。この技術を応用することによって、オプトジェネティクスや光線力学療法、光免疫療法、低出力レーザー治療等の光を用いた治療技術において、治療のターゲットとなる薬剤やたんぱく質等がどれくらいの濃度で存在するかをイメージングして治療精度の向上が図れるようになる。将来的には生体深部にまで到達する近赤外光によって効果を発揮する薬剤等の開発など、薬剤の開発等を含む周辺研究分野との協力によって患者と医師の負担を軽減する高い精度の光治療技術に発展していくことが期待される。

研究成果の概要（英文）：In some novel medical treatment technologies, such as optogenetics which controls the functions of the cells by irradiation of light, imaging of the light absorption by the photon absorbers including specific proteins and drugs will improve the precision of the treatment. For photoacoustic tomography to image the absorption of light in the biological tissue, the quantitative image reconstruction method employing numerical simulation of light propagation and sparse modeling was developed, and it was demonstrated that the developed image reconstruction method improved the spatial resolution and the quantification capability of the photoacoustic tomography by the numerical, phantom, and animal experiments.

研究分野：計測工学

キーワード：生体光イメージング 計測工学

## 1. 研究開始当初の背景

オプトジェネティクスによって様々な細胞の光を用いた制御が可能になりつつある。オプトジェネティクスは光によって活性化されるたんぱく質(チャネルロドプシン2: ChR2)を遺伝子導入によって細胞に発現させた後に、光を照射して細胞にカルシウムイオンなどの陽イオンを細胞に取り込ませることで細胞の機能を操作する技術である。マウスなどの小動物の脳の神経細胞等をオプトジェネティクスによって操作する研究が多数報告されている。オプトジェネティクスによるマウスの膵細胞からのインスリン放出に成功している例もあり、この成果を応用することで糖尿病疾患のオプトジェネティクスによる治療も期待される。光を用いた治療にはオプトジェネティクス以外にも、光を吸収して効果を発揮する薬剤を使用する光線力学療法や光免疫療法等があり、注目されている。

一方で、光音響トモグラフィーや拡散光トモグラフィー等の光を用いた *in vivo* 生体イメージングの研究が行われている。これらの研究では、生体内光伝播モデルによるシミュレーションを用いて生体内を伝播した光や光音響の測定データから画像再構成を行い、可視光・近赤外光領域における生体内の光の散乱と吸収を特徴付けるパラメータである散乱係数・吸収係数(光学特性値)の分布を非侵襲でイメージングできる可能性がある。この非侵襲光生体イメージング技術を応用することによって、細胞の周辺組織の光学特性値の計測や、細胞に到達する光量の予測に応用することができ、オプトジェネティクス等の光を用いた治療・細胞機能の制御を高精度化できる可能性がある。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、光を用いた治療・細胞制御技術の高度な制御に向けて、生体内光伝播シミュレーションと光音響計測を組み合わせた非侵襲生体イメージングを用いて、治療に用いる薬剤や生体内分子、血液等の光吸収体濃度分布を定量的に画像化することによって、生体内の光学特性値を間接計測しながら、生体内の細胞に到達する光量を予測して、光を用いた治療の高精度化につなげることである。

## 3. 研究の方法

(1) オプトジェネティクスでは光照射によって細胞に発現させた光感受性たんぱく質 ChR2 の状態が変化してカルシウムイオンの流入が起こり、細胞機能を制御することができる。ChR2 が光を吸収した後の3つの状態(Open・Close・Recovery)はその状態間の遷移確率と光強度によって連立微分方程式として記述される。生体組織中で光が散乱と吸収を受けて減衰することによって ChR2 を発現した細胞に達する光量が変化する。光量によって変化するカルシウムイオンの流入をシミュレーションした。

(2) また、光を用いた治療では、治療に用いる薬剤や ChR2 等のたんぱく質等の光吸収体の場所や濃度を特定し、そこに到達する光量を生体内の光伝播コンピュータシミュレーションによって予測することで、治療効果の予測とそれを用いた制御が可能になる。本研究では、ナノ秒パルスレーザー光等を生体に照射した際に、生体内の光吸収体の温度の上昇に伴う熱膨張によって発生・伝播する光音響波を測定し、光吸収体の分布を画像化する光音響トモグラフィーにおいて、生体内光伝播シミュレーションを導入し、生体内の光の散乱と吸収による減衰を考量することによって、光吸収体の濃度分布を定量的に画像化する画像再構成アルゴリズムを構築した。また、この画像再構成アルゴリズムの空間分解能の改善のために、再構成画像の  $p$ -ノルム( $0 < p < 1$ )を最小にするスパース正則化を導入した。この画像再構成アルゴリズムの有効性を計算機シミュレーション実験、ファントム実験、および動物実験によって確認した。

## 4. 研究成果

(1) 図1は ChR2 に青色光を照射した際の3つの状態(Open・Close・Recovery)間の遷移確率と光強度の関係を記述する連立微分方程式を、コンピュータを用いて差分法によって計算したシミュレーション結果の例である。光の照射が始まった直後にカルシウムイオンが急激に流入し、照射している間はある一定の流入量が維持されて、光照射終了と同時に流入量が減少し始めて、その後流入が終わっていることが見て取れる。計算の結果は実際にマウスの膵細胞を用いた実験でパッチクランプ法によって測定した結果と同様の傾向を示している。赤い線で示した光強度に伴って流入量が変化していることがわかり、より大きい流入量を得るためには、ChR2 に到達する光が大きくなる必要がある。シミュレーションの結果から、オプトジェネティクスで例えばインスリンを分泌させるなど、細胞機能を制御して治療に応用するためには、ある一定以上の、十分な光量が ChR2 を発現した細胞に到達する必要があることがわかった。

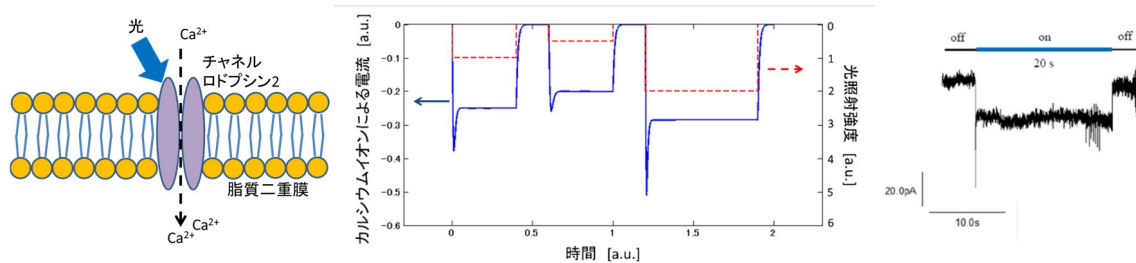


図1 チャンネルロドプシン2に光を照射すると細胞にカルシウムイオンが流入する様子を示した概念図（左）と、カルシウムイオン流入のシミュレーション結果（中央）、およびパッチクランプ法で測定した電流のデータである（右）。

図2に示したのは、波長約500 nmと700 nmの波長の光を、皮膚、脂肪、筋肉の3層からなる光伝播媒体に照射した場合の、モンテカルロ法光伝播シミュレーションの結果である。青色光などの波長の短い光は、ヘモグロビンに強く吸収されるため、生体深部に到達しにくく、一方で、赤色光や近赤外光はヘモグロビンの吸収が弱く、生体深部にまで到達しやすいことが示されている。上述のChR2に光を照射した際の数値シミュレーションと合わせて考えると、オプトジェネティクスを用いて深部臓器を対象として治療を行うことは容易ではない。生体深部の臓器や組織に対して光を照射して、オプトジェネティクス等の治療の効果を効率的に得るためには、近赤外光を使用するか、あるいは光照射デバイスを埋め込む等の工夫が必要になる。オプトジェネティクスでは近赤外光を吸収した後に広帯域の光を発生させるナノ粒子などが開発されており、その使用が有効である可能性がある。

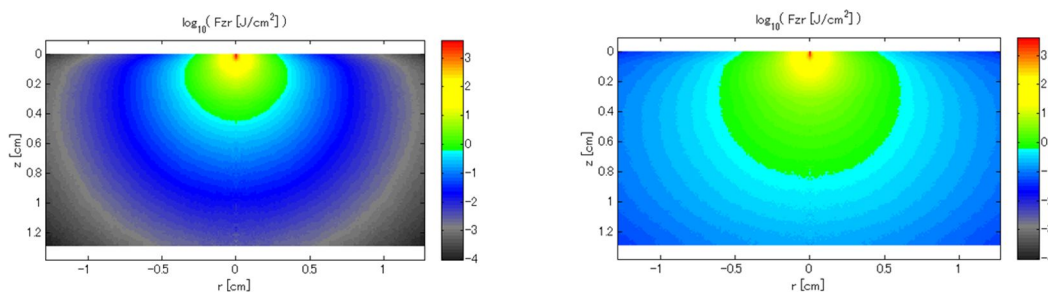


図2 3層（皮膚、脂肪、筋肉）モデルを用いて、波長約500 nm（左）と約700 nm（右）を想定して行ったモンテカルロ法光伝播シミュレーション結果の例（常用対数表示、縦軸が照射位置からの深さを示している）。

(2) 図3は光音響トモグラフィー画像再構成において、モンテカルロ法による生体内光伝播シミュレーションとスパースモデリングを導入した場合の計算機シミュレーション実験の結果を示している。生体の光散乱と音響特性を模擬した光・音響伝播媒体中に、光音響波を測定する面からの深さ5 mmのところには血管があることとして、ヘモグロビンを光吸収体として3次元画像化する計算機シミュレーション実験を行った。媒体表面において、光ファイバと焦点型トランスデューサを合わせた光音響プローブを2次元的にスキャンして光音響波を測定し、測定された光音響波と、光・音響波伝播シミュレーションによって予測される光音響波との二乗誤差と同時に、再構成される画像のp-ノルム ( $0 < p \leq 1$ ) を最小化することによって、スパースな画像を再構成した。

pの値を1から、0.5、0.25と小さくしていくに従って画像のぼやけは軽減し、空間分解能が改善していることがわかる。同様の結果が、生体を模擬したファントムを用いた実験、およびウサギを用いた実験でも得られており、散乱による光減衰の影響を光伝播シミュレーションを用いて補正する効果によって光音響波の測定面からの深さが異なる血管中のヘモグロビンのような光吸収体が存在する場合でも、光吸収体の濃度に比例する光吸収係数の分布を3次的に再構成できることが明らかとなった。

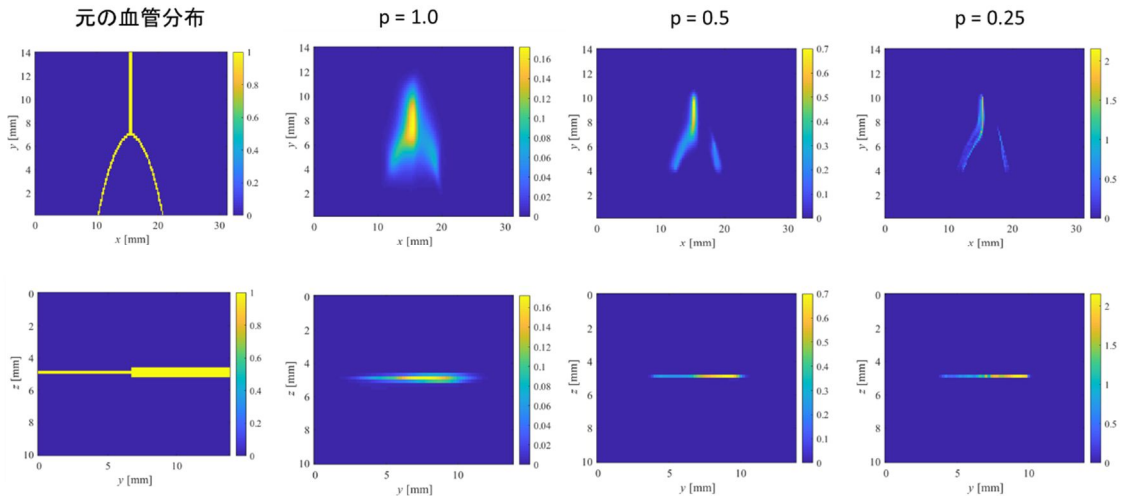


図3 光音響トモグラフィー画像再構成に光伝播シミュレーションとスパースモデリング ( $p$ -ノルム最小正則化 ( $0 < p \leq 1$ )) を導入した際の計算機シミュレーション実験結果。仮定した元の血管分布 (一列目) に対して  $p=1.0$  (2列目),  $0.5$  (3列目),  $0.25$  (4列目) とした場合の3次元再構成画像の  $x$ - $y$  平面 (上) 及び  $y$ - $z$  平面への最大値投影画像を示している。

本研究で開発した光音響トモグラフィー画像再構成法を用いれば、生体内の深部に存在する治療のための薬剤やたんぱく質などの光吸収体の濃度分布を3次元的にイメージできるようになる。このイメージングの結果から、生体内光伝播シミュレーションを行うことによって、薬剤やたんぱく質にどれくらいの光が到達し、どのような効果が得られるかを予測できるようになり、治療計画の策定や光照射法の最適化が可能になり、治療の高精度な制御が可能になるものと考えられる。

将来的には高感度な光・超音波測定用のセンサの開発や、画像再構成アルゴリズムの高度化などの、生体計測に関する研究分野と、生体深部にまで侵達する近赤外光によって効果を発揮する薬剤等の開発など、薬剤の開発等を含む周辺研究分野との協力によって患者と医師の負担を軽減する高い精度の光治療技術に発展していくことが期待される。

#### < 引用文献 >

櫛引俊宏、平沢 壮、大川晋平、石原美弥、オプトジェネティクスの医療応用、日本レーザー医学会誌、第36巻、4号、2016、482-488

大川晋平、平沢 壮、辻田和宏、櫛引俊宏、石原美弥、光音響的作用数値計算とその画像診断・治療支援へのお用の可能性日本レーザー医学会誌、第40巻、4号、2020、348-358

大川晋平、石原美弥、西村吾朗、星 詳子、近赤外光を用いた次世代生体イメージング：拡散光・蛍光・光音響トモグラフィー、計測と制御、第56巻、第11号、863-868

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 大川 晋平, 平沢 壮, 辻田 和宏, 櫛引 俊宏, 石原 美弥	4. 巻 40
2. 論文標題 光音響的作用の数値計算とその画像診断・治療支援への応用の可能性	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本レーザー医学会誌	6. 最初と最後の頁 348 ~ 358
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2530/jslsm.jslsm-40_0033	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Okawa Shinpei, Hirasawa Takeshi, Kushibiki Toshihiro, Fujita Masanori, Ishihara Miya	4. 巻 11240
2. 論文標題 Photoacoustic tomography reconstructing absorption coefficient and effect of regularization minimizing p-norm	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Proceedings of SPIE	6. 最初と最後の頁 112403N
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1117/12.2551478	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Okawa Shinpei, Hirasawa Takeshi, Tsujita Kazuhiro, Kushbiki Toshihiro, Fujita Masanori, Ishihara Miya	4. 巻 10878
2. 論文標題 Validation study of a quantitative photoacoustic image reconstruction using Monte Carlo method and linearization	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proceedings of SPIE	6. 最初と最後の頁 1087855
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1117/12.2511836	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大川晋平, 平沢 壮, 櫛引俊宏, 藤田真敬, 石原美弥
2. 発表標題 光音響計測による吸収係数分布の3次元画像再構成
3. 学会等名 レーザー学会学術講演会第40回年次大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大川晋平, 平沢 壮, 櫛引俊宏, 藤田真敬, 石原美弥
2. 発表標題 光音響技術による光吸収係数分布のイメージングとその診断・治療支援への応用可能性
3. 学会等名 第40回日本レーザー医学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大川晋平, 平沢 壮, 辻田和宏, 櫛引俊宏, 石原美弥
2. 発表標題 光音響トモグラフィーと定量的画像再構成
3. 学会等名 第37回日本医用画像工学会大会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Okawa Shinpei
2. 発表標題 Quantitative photoacoustic image reconstruction with linearization and l1-norm minimization
3. 学会等名 Inverse problems and medical imaging
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大川晋平, 平沢 壮, 辻田和宏, 櫛引俊宏, 石原美弥
2. 発表標題 光音響イメージングと定量的トモグラフィー画像再構成
3. 学会等名 第25回医用近赤外線分光法研究会 Medical Optics & Spectroscopy 2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大川晋平, 平沢 壮, 辻田和宏, 櫛引俊宏, 齋藤大蔵, 浦野泰照, 石原美弥
2. 発表標題 生体内分子濃度分布の定量的光音響トモグラフィ
3. 学会等名 第13回日本分子イメージング学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	櫛引 俊宏 (Kushibiki Toshihiro)  (30403158)	防衛医科大学校 (医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究施設、病院並びに防衛・医用工学・准教授)  (82406)	
研究分担者	平沢 壮 (Hirasawa Takeshi)  (60583086)	防衛医科大学校 (医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究施設、病院並びに防衛・医用工学・助教)  (82406)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------