

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H02209

研究課題名(和文) 力学的適応機構解明のための生体組織内微視的力学場の3次元解析と生化学場の対比

研究課題名(英文) Three-dimensional analysis of microscopic stress and strain fields in biological tissues to elucidate mechanical adaptation mechanism and its comparison with biochemical field

研究代表者

松本 健郎 (Matsumoto, Takeo)

名古屋大学・工学研究科・教授

研究者番号：30209639

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 34,700,000円

研究成果の概要(和文)：生体組織は受ける力に応じて能動的に自らを作り変える。このメカニズムを明らかにするには組織内に作用する力の大きさを細胞レベルで3次元的に知り、個々の細胞が産生するタンパクとの関係を調べる必要がある。家兎胸大動脈を対象に、内部微細構造の3次元変形の様子を詳しく調べた。その結果、1) 弾性板は軸方向引張で軸方向の蛇行が解消され、加圧により円周方向の蛇行も解消され円筒管になること、2) 引張に伴うコラーゲンの蛇行度の減少は弾性板層よりも平滑筋層で大きいことなどが判明した。また、弾性板の蛇行が大きい領域ほどアクチンフィラメントが少ない傾向にあることが判った。

研究成果の概要(英文)：Biological tissues change themselves actively in response to force applied to them. To elucidate this mechanism, we need to know 3D stress and strain distributions at cellular level and compare it with proteins produced by each cell. We studied 3D deformation of intramural microscopic structure in the rabbit thoracic aortas, and found that 1) the longitudinal waviness of the elastic lamina diminishes in response to longitudinal stretch and the circumferential waviness decreases in response to pressurization; and 2) decrease in the waviness of collagen fibers in response to stretch is larger in the smooth muscle layer than in the elastic lamina. We also found that actin filaments are less abundant in the cells reside in the area with high waviness of the elastic lamina.

研究分野：生体軟組織・細胞の実験バイオメカニクス

キーワード：バイオメカニクス 力学解析 細胞・組織 循環器・高血圧 生物・生体工学

1. 研究開始当初の背景

生体組織は自らに加わる力学刺激に応答し、適応的に形態や力学特性を変化させる。例えば血管壁は高血圧で肥厚するが、これは壁内円周方向応力を一定に保つよう起こる(図1)。またウサギ膝蓋腱に荷重が全くかからない状態にすると引張強度は1週間で1/2、3週間で1/10にまで低下する(Yamamoto et al, J Biomech Eng, 1993)。このような力学応答を解明することは、生物が材料特性をどのように維持しているのか知るといった観点から材料力学的に興味深いだけでなく、血管や靭帯など荷重支持組織の再生を実現する上で重要である。なぜなら、膝蓋腱で見たように、荷重支持組織が力学特性を維持するには適度な力学負荷が不可欠であり、初期再生組織に十分な機械特性を与えるには力学刺激が必須だからである。

力学応答とは組織の受動変形ではなく細胞の能動的な応答であるから、力学応答の詳細を明らかにするには、組織内の細胞が置かれた力学環境を知る必要がある。しかし、従来の生体組織の応力解析は組織を均質と仮定したものが殆どであり、用をなさない。なぜなら、生体組織は弾性係数が互いに数10倍～数万倍異なる構成要素(血管ならば平滑筋細胞・エラスチン・コラーゲン)が複雑に入り組んだ構造をしており、これを考慮した解析をしない限り、細胞に加わる力は判らないからである。

このような観点から、申請者らは平成19～21年度基盤研究B、平成22～25年度基盤研究Aなどを通じて血管壁の不均質性を考慮した解析に取り組み、無負荷状態の大動脈壁内の弾性板の蛇行が、血管壁構成要素間の力学特性の差により生じることを明らかにし、生理状態における血管壁内の2次元応力分布の算出を可能にした。そしてこの過程で、生理状態の血管壁内の力学環境が従来考えられていたように均質ではなく隣接する層間でも大きく異なる場合があることに気付いた。我々はこの不均質性が血管壁の作り替えと関係すると予想している。即ち、生体組織は自らを常に作り替えることで組織の劣化を防ぎ、恒常性を維持しているが、この作り替えの過程では一部分の要素が分解され、新たな要素に置き換わる。作り替え中の要素は力を負担することができないと予想されるため、力学場に局所的な不均質が生じる筈である。この仮説を検証するには壁内の応力分布とモデリングに關与する各種生化学因子の分布を対比して論ずる必要がある。また、それにより力学的適応現象の背後にある力学刺激と生化学的応答の関係を初めて直接的に対比することが可能となる。

ところで我々は研究分担者の横田が開発した3次元内部構造顕微鏡を用いて血管壁弾性板の走行の3次元観察を行った。その結果、無負荷状態の弾性板は円周方向に蛇行しているだけでなく、軸方向にも蛇行している

ことを見出した。このことは、無負荷状態の血管壁が生理状態にまで変形する時に、軸方向にも単に伸長するだけでなく、剪断などの複雑な変形をすることを意味する。つまり、血管壁内の応力分布の算出においては、断面内の2次元変形のみを考慮した2次元応力分布ではなく、壁の3次元変形を考慮した3次元応力分布を求めることが必要であることが明らかとなった。

2. 研究の目的

そこで本研究では、胸大動脈を主な対象とし、まず、3次元内部構造顕微鏡などを用いて無負荷状態から、生理状態に至るまでの血管壁内の3次元構造変化を明らかにする。それと平行して、血管薄切試料を共焦点顕微鏡下に円周方向に引張り、得られた変形を更に分解能良く調べる。また、薄切片を引張った状態で張力を計測しつつレーザーアブレーションにより組織を少しずつ切断して、張力の低下から切断部位の組織が負担していた力を推定する手法を確立する。更に

の血管壁3次元変形の観察結果より、血管壁が無負荷状態に置かれた際に弾性板間に位置する平滑筋細胞が破断するような大きな変形が加わっている可能性が考えられたため、除荷等に伴う血管変形が血管平滑筋収縮能に与える影響を調べる。以上の項目を通じて、血管壁の局所的な3次元変形が血管壁の力学や応答にどのような影響を与えるのか具体的に調べることを目的とした。

3. 研究の方法

生体組織の力学応答メカニズム解明のため、主に我々が力学特性データを多く蓄積する家兎胸大動脈を対象とし、大きく分けて以下の4項目について検討する。

(1) 軸方向伸長・加圧に伴う血管壁内微細構造の3次元変形計測

無負荷状態(血管が摘出され、軸方向にも円周方向にも縮んだ状態)から、生理状態に至るまでの血管壁内の3次元構造変化を明らかにする。このため、研究分担者・横田の3次元内部構造顕微鏡を用いて、様々な変形状態で凍結包埋した血管組織の連続切片像を撮影し、3次元再構築する。また、研究分担者・杉田の所有する2光子顕微鏡のステージ上で血管を加圧しつつ、壁内部の微細孔像を観察できる実験系を構築し、加圧に伴う血管壁内の微細孔像の3次元変形を観察する。

(2) 血管薄切試料の単軸引張試験による血管壁微細構造の変形の観察

前項で得られた変形の様子を更に分解能良く調べるため、現有する共焦点レーザー顕微鏡のステージ上で薄切組織片を引張試験するシステムを構築する。そして、血管軸方向に垂直に切出した厚み数10 μ m程度の血管薄切組織を円周方向に引張り、その際の組織内の細胞レベルの変形がどのように進むのか細かく観察する。

(3) レーザアブレーションによる薄切片試料内部の張力不均質性の計測

現有するレーザアブレーション用顕微鏡のステージ上で、前項と同様に血管薄切試験片を引張りつつ張力を計測できる引張試験機を構築する。そして、試験片に生理的な変形を加え、張力を計測した状態で、レーザアブレーションにより組織を少しずつ切断して、張力の低下から切断部位の組織が負担していた力を推定する手法を確立する。

(4) 血管の3次元変形が内部の平滑筋の収縮能に与える影響の検討

(1)項の血管壁3次元変形の観察結果より、血管壁が無負荷状態に置かれた際に弾性板間に位置する平滑筋細胞が破断するような大きな変形が加わっている可能性が考えられた。即ち、除荷に伴う血管の変形で、血管組織内の平滑筋細胞が破断している可能性がある。そこで、除荷等に伴う血管変形が血管平滑筋収縮能に与える影響を調べることにした。このため、血管の軸方向長が変わらないように血管を摘出し、内圧負荷試験装置に取付け、ノルアドレナリン投与時の血管径変化を調べる系を立ち上げる。そして、血管軸方向長を変化させずに摘出した血管と軸方向に自由に短縮させた血管で、ノルアドレナリンに対する収縮がどのように異なるのか、調べる。

4. 研究成果

(1) 軸方向伸長・加圧に伴う血管壁内微細構造の3次元変形計測

弾性板は無負荷状態では円周方向と軸方向に蛇行しているが、軸方向伸長により軸方向の蛇行が解消され、加圧により円周方向の蛇行も解消され円筒管になることが判った。この過程で隣接する2枚の弾性板の軸方向の蛇行が大きく異なる場合のあることを見出した。このような2枚の弾性板を繋ぐ平滑筋細胞は血管の軸方向短縮により破断する可能性がある。この点について、(4)項で詳しく調査することにした。

コラーゲン線維については、2光子顕微鏡を用いた観察から、弾性板層中にも平滑筋層同様にコラーゲン線維がかなり豊富に存在すること、引張に伴うコラーゲンの蛇行度の減少は弾性板層よりも平滑筋層において大きいことが判明した。

なお、3次元内部構造顕微鏡で血管変形に伴う平滑筋、エラスチン、コラーゲンの変形を詳細に明らかにする予定であったが、CCD素子の出荷が遅れ顕微鏡の高解像度化が間に合わず、本格的なデータを取るに至らなかった。このため血管壁内微視的構造を考慮したモデル構築も完成には至らなかった。

(2) 血管薄切試料の単軸引張試験による血管壁微細構造の変形の観察

弾性板については、引張に伴いまず蛇行が解消し、その後、弾性板が伸長する傾向があることがわかった。核は弾性板の蛇行の解消

に伴って回転することが判った。

コラーゲン線維についても染色条件が定まり、焦点顕微鏡下で血管薄切片のコラーゲンとエラスチンを可視化することが漸く可能になってきた。

平滑筋細胞核をマーカーにして変形を計測し、部位により変形が異なること、組織にせん断変形が生じていることなどが明らかとなった。また、細胞核の変形は組織の変形より有意に小さく、半分程度であることが明らかとなった。

免疫蛍光染色から、弾性板の蛇行が大きい領域ほどアクチンフィラメントが少ない傾向にあることが判った。

(3) レーザアブレーションによる薄切片試料内部の張力不均質性の計測

血管壁を引張った状態でレーザ切断し、その際の張力変化を計測する系を確立した。カンチレバーの力学特性と感度からELとSMLを10層以下程度にすると、1層毎の切断による力の変化を計測できそうだと言うことが判ったため、ラット胸大動脈を対象とし、薄切組織を引張りつつ弾性板層・平滑筋層を徐々にレーザアブレーションした際の張力変化を計測することで各層が負担する張力を求めることを目指した。レーザ照射時の気泡発生、弾性板の退色の低減、切断後に一旦、組織の長さを基準状態に戻すことによる切断距離の計測の精度向上などの工夫により、各層が負担する張力を推定する系の確立にはほぼ目処が立った。

(4) 血管の3次元変形が内部の平滑筋の収縮能に与える影響の検討

(1)項で述べたように、隣接する2枚の弾性板の軸方向の蛇行が大きく異なる場合のあることが判った。このことは除荷に伴う血管の軸方向の短縮により、弾性板同士を繋ぐ平滑筋に、通常では考えられないような大きな引張が加わり破断する可能性があることを意味する。この引張により平滑筋細胞が破断すると収縮力が低下する筈である。即ち、摘出時に軸方向に短縮した血管試料と軸方向短縮を抑えた血管試料では、再度生理的変形状態に置いて、平滑筋を収縮させた際に、血管径変化が違う可能性がある。このため、血管軸方向長を変化させずに摘出した血管と軸方向に自由に短縮させた血管で、ノルアドレナリンに対する収縮量の違いを調べたが、驚くべきことに両者に違いはなかった。このことは、隣接する2枚の弾性板の軸方向蛇行が異なる場所には、両者を繋ぐ平滑筋細胞が少ない(すなわち、隣接する2枚の弾性板の接合が弱い部分に弾性板の蛇行の食い違いが生じる)ことを意味するのかもしれない。あるいは、血管平滑筋は弛緩した状態で大きく伸ばされても収縮装置が破壊されることがないのかも知れない。

そこで次にノルアドレナリンで収縮した円筒状血管の内圧を強引に上昇させることで強制拡張してみた。するとその後、収縮が

見られなくなることが判った。Live & Dead stain から細胞は生きていることは確認できた。一方、強制拡張した血管ではアクチンフィラメントの量が減っており、強制拡張により収縮装置が破壊される可能性を示唆する結果が得られた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(雑誌論文)(計11件、全て査読有り)

Sugita S, Matsumoto T: Local distribution of collagen fibers determines crack initiation site and its propagation direction during aortic rupture, *Biomech Model Mechanobiol* 17-2, 577-587 (2018) DOI: 10.1007/s10237-017-0979-2

Sugita S, Matsumoto T: Multiphoton microscopy observations of 3D elastin and collagen fiber microstructure changes during pressurization in aortic media, *Biomech Model Mechanobiol* 16-3, 763-773 (2017) DOI: 10.1007/s10237-016-0851-9

Nagayama K, Inoue T, Hamada Y, Matsumoto T: A novel patterned magnetic micropillar array substrate for analysis of cellular mechanical responses, *J Biomechanics* 65, 194-202 (2017) DOI: 10.1016/j.jbiomech.2017.10.017

Wang J, Ito M, Zhong W, Sugita S, Michiue T, Tsuboi T, Kitaguchi T, Matsumoto T: Observations of intracellular tension dynamics of MC3T3-E1 cells during substrate adhesion using a FRET-based actinin tension sensor, *Journal of Biomechanical Science and Engineering* 11-4, 16-00504 (2016) DOI: 10.1299/jbse.16-00504 【Graphics of the Year 2016受賞】

Wang JF, Sugita S, Nagayama K, Matsumoto T: Dynamics of actin filaments of MC3T3-E1 cells during adhesion process to substrate, *Journal of Biomechanical Science and Engineering* 11-2, 15-00637 (2016) DOI: 10.1299/jbse.15-00637 【Papers of the Year & Graphics of the Year 2016受賞】

Nagayama K, Hamaji Y, Sato Y, Matsumoto T: Mechanical trapping of the nucleus on micropillared surfaces inhibits the proliferation of vascular smooth muscle cells but not cervical cancer HeLa cells, *J Biomechanics* 48-10, 1796-1803 (2015) DOI: 10.1016/j.jbiomech.2015.05.004

Nagayama K, Saito S, Matsumoto T: Multiphasic Stress Relaxation Response of Freshly Isolated and Cultured Vascular Smooth Muscle Cells Measured by Quasi-In Situ Tensile Test, *Bio-Medical Materials and Engineering* 25-3, 299-312 (2015) DOI: 10.3233/BME-151276.

ほか4件

(学会発表)(計27件)

Sugita S, Katoh M, Nakamura M, Matsumoto T: Microscopic deformation of the aorta during pressurization based on SHG and two-photon microscopy, The 8th World Congress of Biomechanics (2018/7/8-12, Dublin, Ireland) 【予定】

松本健郎: 高血圧に伴う肥厚メカニズムの解明に向けた動脈壁変形のマルチスケール計測, 第57回日本生体医工学会大会 (2018/6/19-21, 札幌) 【予定】

杉田修啓, 加藤雅也, 中村匡徳: 内圧負荷における大動脈組織のミクロスケール3次元変形解析, 第57回日本生体医工学会大会 (2018/6/19-21, 札幌) 【予定】

範勇, 王軍峰, 前田英次郎, 村瀬晃平, 松本健郎: Measurement of microscopic deformation of smooth muscle cells in the rabbit thoracic aorta during tensile test, 日本機械学会東海支部第67期総会・講演会 (2018/3/13, 名古屋)

加藤優弥, 田村篤敬: 生理的状态における血管弾性板の挙動シミュレーション, 日本機械学会中国四国支部第56期総会・講演会 (2018/3/7, 徳島)

加藤優弥, 田村篤敬: 有限要素モデルを用いた弾性板座屈の再現, 日本機械学会第28回バイオフロンティア講演会 (2017/10/28-29, 徳島)

Sugita S, Matsumoto T: Deformation of elastin and collagen fibers in the aortic media due to changes in pressure, XXVI Congress of the International Society of Biomechanics (2017/7/23-27, Brisbane, Australia)

Sugita S, Matsumoto T: Observation of elastin and collagen fibers in the thoracic aorta under multiphoton microscope during pressurization, BIT 's 5th Annual Congress of AnalysisX-2017 (2017/3/22-24, Fukuoka, Japan) 【Invited】

上間大輝, 杉田修啓: 胸大動脈内の細胞外マトリックスの引張負荷変形に関する研究, 日本機械学会東海支部第47回学生員卒業研究発表講演会 (2017/3/13, 浜松)

加藤優弥, 田村篤敬, 本宮潤一, 小出隆夫: 詳細な血管壁モデルの開発に向けた基礎的検討, 日本機械学会中国四国学生会第47回学生員卒業研究発表講演会 (2017/3/6, 広島)

付云騰, 杉田修啓, 前田英次郎, 松本健郎: 収縮した動脈の強制拡張が平滑筋収縮能に与える影響, 日本機械学会第29回バイオエンジニアリング講演会 (2017/1/19-20, 名古屋)

杉田修啓, 松本健郎: 大動脈中膜内エラスチン・コラーゲン線維の加圧時の微細構造変化 -弾性板層と平滑筋細胞層による差

異-, 日本機械学会第29回バイオエンジニアリング講演会(2017/1/19-20, 名古屋)

山田麻加, 杉田修啓, 松本健郎: 大動脈中膜内の応力状態とエラスチン線維走行方向との関連, 日本機械学会第27回バイオフロンティア講演会 (2016/10/22-3, 札幌)

松本健郎, 杉田修啓, 城野貴洋, 飯島慎太郎, 長山和亮, 松本明郎: 胸大動脈の背腹差について: マルチスケール力学解析とマイクロアレイ解析による検討, 第55回日本生体医工学会大会 (2016/4/26-8, 富山)

【Invited symposiast】

岡田成右, 杉田修啓, 松本健郎: 引張負荷時の大動脈中膜内エラスチン・コラーゲン線維の多光子顕微鏡による観察, 日本機械学会東海支部第47回学生員卒業研究発表講演会 (2016/3/16, 名古屋)

山田麻加, 杉田修啓, 松本健郎: 多光子顕微鏡によるエラスチン線維の血管中膜内走行方向の基礎的解析, 日本機械学会東海支部第47回学生員卒業研究発表講演会 (2016/3/16, 名古屋)

Matsumoto T, Uno Y, Sugita S, Nagayama K: Heterogeneity in the mechanical environment of elastic laminae in porcine thoracic aortas, International Conference on Advanced Technology in Experimental Mechanics (2015/10/4-8, Toyohashi, Japan)

Matsumoto T, Sugita S, Shirono T, Iijima S, Nagayama K, Matsumoto A: Dorsal-ventral difference in biomechanical and biochemical properties in the rabbit thoracic aortas, 25th Congress of the International Society of Biomechanics (2015/7/12-16, Glasgow, UK)

Matsumoto T, Uno Y, Iijima S, Moriyama Y, Sugita S, Nagayama K, Matsumoto A: Microscopic heterogeneity in the aortic wall: Correlation between mechanical environment and protein expression, Summer Biomechanics, Bioengineering and Biotransport Conference (2015/6/17-20, Snowbird, UT, USA)

Matsumoto T: Mechanical heterogeneity in the aortic wall: from macroscopic to microscopic viewpoint, Joint meeting of 15th International Congress of Biorheology and 8th International Conference on Clinical Hemorheology (2015/5/24-28, Seoul, Korea)

【Plenary Lecture】

ほか7件

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://bio.mech.nagoya-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松本 健郎 (MATSUMOTO, Takeo)
名古屋大学・大学院工学研究科・教授
研究者番号: 30209639

(2) 研究分担者

杉田 修啓 (SUGITA, Shukei)
名古屋工業大学・大学院工学研究科・准教授
研究者番号: 20532104

田村 篤敬 (TAMURA, Atsutaka)
鳥取大学・大学院工学研究科・准教授
研究者番号: 30394836

横田 秀夫 (YOKOTA, Hideo)
理化学研究所・量子工学研究センター・
チームリーダー
研究者番号: 00261206