

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 26 日現在

機関番号：13903

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2010～2013

課題番号：22240055

研究課題名(和文) 組織・細胞の力学応答機構の統一的理解のための組織内微視的力学・生化学場の統合解析

研究課題名(英文) Biomechanical and biochemical analyses of biological tissues in a microscopic level for unified understanding of mechanical adaptation mechanism of biological tissues

研究代表者

松本 健郎 (Matsumoto, Takeo)

名古屋工業大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：30209639

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 39,500,000円、(間接経費) 11,850,000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知り、個々の細胞が産生するタンパクとの相関を調べる必要がある。そこで、胸大動脈薄切片を顕微鏡下に引張試験して、内部の微細変形を調べた。その結果、無負荷状態で弾性板が蛇行しているところほど生理状態で作用する力が小さいことが示された。また、RNAマイクロアレイ解析で胸大動脈腹側と背側で発現の異なる遺伝子を見出し、その中から弾性板の蛇行度と有意な相関のあるタンパクを複数同定することに成功した。

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 stress and strain distributions at cellular level and compare it with proteins synthesized by each cell. We performed tensile test for thin-sliced specimens of the thoracic aortas under a microscope to observe microscopic deformation of cells and tissues during macroscopic stretch, and found that tension applied in the in vivo state is lower in the elastic lamina with large waviness under no load condition. We also performed RNA microarray analysis to find genes whose expression is different between the ventral and dorsal side of the thoracic aorta, and identified several proteins that have significant correlations with the waviness of the elastic lamina.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

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場合が多い。例えば血管壁は高血圧に曝されると壁厚が増加するが、これは壁の円周方向応力を一定に保つよう起こると言われている (Matsumoto et al, J Biomech Eng, 1994)。またウサギの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の詳細を解明することは、生理学的に興味深いだけでなく、再生医工学で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、強度の低い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。そして、適切な力学刺激の大きさ、モード、負荷時期などを明らかにすることが荷重支持組織再生のカギを握ると言える。

ところで、力学応答とは組織の受動的な変形ではなく、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倍～数100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年度の基盤研究等を通じて血管壁の不均質性を考慮した実験的解析法の確立に取り組み、生理状態の大動脈壁内部の平滑筋と弾性板について微視的応力分布の算出を可能にした。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な均質なものではなく、隣接する弾性板同士でも大きく異なる場合のあることに気付いた。このような不均質は血管壁のリモデリングと関係する可能性がある。即ち、リモデリング過程では一部分の要素がアポトーシスなどにより分解され、新たな要素に置き換わる。リモデリング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リモデリングに関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、そうすることにより、生体組織の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した検討が可能となる。

## 2. 研究の目的

そこで本研究では、生化学者の協力の下、細胞レベルの力学場と生化学場を突き合わ

せ、リモデリングの本質に迫るとともに、まだ不明であるコラーゲンに加わる力の算出方法を確立し、血管壁内の主要な3要素を全て考慮した応力分布の推定方法を確立することを目的とする。具体的には、申請者らがデータを多く有する大動脈壁を主な対象とし、まず、1)従来の研究で明らかとなっている大動脈壁の力学的に特異的な部位(弾性板の蛇行が極端に強い場所ならびに弱い場所)に特徴的に発現するタンパクやRNAを見出す。また、血管壁断面全体で特徴的なタンパクやRNAの発現部位を探し、その力学的特徴を調べる。また、2)組織内の微細なコラーゲン線維を可視化し、線維の配向を調べる系を確立する。次に、3)顕微鏡ステージ上に設置できる小型引張試験機を用い、顕微鏡下に薄切組織を引張りながら、コラーゲン線維や弾性板、平滑筋の微視的変形を観察し、既に定式化している方法により、平滑筋、弾性板、コラーゲンに生理状態で加わる力を算出する。そして、この結果を1)の結果と比較して、血管壁を構成するどの要素にどのような力が加わった場合に、どのような生化学的变化が生じるのか明らかにする。このような過程を通じ、マクロな組織の変形がどのように細胞の変形に変換され、それがどのように生化学的シグナルに変換されるのか、組織・細胞・生化学シグナルの3者の関係を統一的に解明するためのフレームワークを構築することを目的とする。

## 3. 研究の方法

試料には主に我々が力学特性データを多く蓄積するブタならびに家兎の胸大動脈を用い、大きく分けて以下の5項目について検討する。項目1～4を通じて、弾性板蛇行度が試料の部位で大きく異なる原因を探り、項目5の結果と対比することで、力学場と発現遺伝子の関係を明らかにする。

### (1) マイクロ引張試験機による弾性板の力学特性計測

ブタ胸大動脈を対象に、現有するマイクロ引張試験機で弾性板の力学特性を求める。この際、摘出前に弾性板の壁内位置や蛇行度を予め計測しておき、弾性率と蛇行度あるいは壁内位置との相関を調べる。

### (2) 薄切組織片引張に伴う変形計測

顕微鏡下引張試験装置で薄切片を引張り、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。弾性板の蛇行度と組織の変形の間どのような関係があるのか詳しく調べる。また、切断による影響を把握するために、十分に厚い組織で落射蛍光観察した際の変形とも比較する。

### (3) 弾性板内張力分布の不均質性の計測

試験片に生理的な変形を加えた状態で、現有するレーザマイクロダイセクタを用いて弾性板の各部に孔を空ける。この孔は部材にかかる張力が大きい場所では引張方向に大きく開くので、孔の開き方を試料内部で細か

く調べることで試料内部の弾性板の張力がどの程度、均一であるのか見積もる。予め薄切片の引張試験から夫々の弾性板に作用する張力を見積もり、この値と孔の開き方の関係を調べる。

#### (4) 弾性板ならびに平滑筋の血管壁内の3次元形態の計測

無負荷状態から生理状態まで、様々な変形状態で固定した家兎胸大動脈組織内部の弾性板蛇行形態と平滑筋細胞の走行状態の関係を調べ、血管の変形に応じて両者の3次元的位置関係どのように変化するのか、また、それらが弾性板の蛇行の局所的な違いに影響をもたらしているかどうか調べる。

#### (5) 生化学因子と組織像の関係の探索

家兎胸大動脈は腹側と比べて背側が硬く、また、腹側の方が平滑筋収縮能が高いという特徴を有する。このような力学特性の差が、発現する遺伝子の差をもたらしている可能性を考え、家兎胸大動脈の腹側と背側各々について、マクロアレイ解析を行う。即ち、摘出後速やかにRNA安定化試薬や液体窒素で処理した試料よりRNAを抽出しマイクロアレイ解析を行い、背腹で差のある遺伝子を探し出す。次にリアルタイムPCRで実際にその遺伝子が変化していることを確認する。その後、その遺伝子に対応するタンパクについて、組織の免疫抗体染色を行ない、弾性板蛇行と関係のあるタンパクを特定する。

## 4. 研究成果

### (1) 弾性板蛇行の部位による違いの検討

血管壁内の各部より弾性板を単離し、引張試験した。その結果、弾性板の力学特性には部位による差は見られず、弾性率と蛇行度あるいは壁内位置には特に相関が見られなかった。次に大動脈の薄切(厚さ10 $\mu$ m)組織片の引張に伴う変形を計測した。本研究の開始前に試作した顕微鏡下で薄切組織片の引張試験を行う装置で薄切片を引張り、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した。弾性板の局所変形や平滑筋の変形を詳細に観察することが可能となり、弾性板はまず長さが変わらずに蛇行が解消されて行き、真っ直ぐになった後に伸び始めること、平滑筋層には単純な引張だけでなく、細胞の回転や剪断など複雑な変形が生じていることが明らかとなった。また、同様の結果が厚い試料でも得られたこと、様々な厚みの試験片の引張試験で同等の力学特性が得られたことから、このような不均質な変形が試料の薄切によるアーチファクトでないことを確認した。

次に生理的な円周方向ひずみを加えた状態で弾性板をレーザ・マイクロダイセクタで切断し、切断点の孔の開き具合を調べた。その結果、孔の開き具合は無負荷時の蛇行度と負の相関があった。

以上より、部位による弾性板の蛇行の違いは、弾性板の不均質性ではなく、実際に加わ

る力が異なることにより生じているらしいことが明らかとなった。

### (2) 血管薄切片の変形の不均質性の計測

顕微鏡下でブタ胸大動脈の薄切組織片を引張り、その際の細胞レベルの変形がどのように進むのかを、平滑筋層と弾性板層の特徴点の移動を追うことで細かく解析した。その結果、同一の弾性板層、平滑筋層であっても伸び比は、部位により異なり、マクロな伸び比の0.5~2倍程度の範囲にばらついていることが判った。

コラーゲン線維については、偏光顕微鏡でリターダンス変化を計測する方式を進めた。血管壁の二軸引張試験を行い、引張に伴いコラーゲン線維の配向が揃ってくることで、部位により線維の配向やひずみが大きく異なることなどが明らかとなった。

### (3) 弾性板ならびに平滑筋の3次元形態観察

理研の3次元内部構造観察顕微鏡を用い、まず、家兎胸大動脈弾性板の3次元形態を観察した。結果、無負荷状態の血管壁において、弾性板が円周方向に蛇行しているだけでなく、この蛇行が軸方向に波打っていることを見出した。これは血管摘出に伴う血管の軸方向への収縮の可能性が考えられた。

次に家兎胸大動脈組織内部の弾性板蛇行形態と平滑筋細胞の走行状態の関係を調べた。平滑筋の可視化はある程度可能となったが、弾性板との同時観察は困難であり、弾性板の蛇行と平滑筋走行の関係は明らかにできなかった。しかし、無負荷状態の血管壁内では平滑筋細胞が比較的ランダムな方向を向いているのに対し、生理状態では配向が一樣に揃うこと、また、それは血管壁の均質な変形を仮定しては説明できないことなどが明らかとなった。

### (4) 生化学因子と組織像の関係の探索

ウサギ胸大動脈の腹側と背側の試料それぞれについてRNAマイクロアレイ解析を行い、両者で発現の異なる遺伝子を見つけた。また、RT-PCR法による解析を行い、ほぼ同様の結果を得た。次にRT-PCRによる確認が得られた遺伝子について、組織の免疫蛍光染色を行った。その結果、腹側、背側で夫々強く発現するタンパクが見つかった。また、弾性板の蛇行度と付近のタンパクの発現量についても検討し、弾性板の蛇行度と有意な相関のあるタンパクを複数同定することに成功した。

## 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14件、全て査読有り)

Nagayama K., Matsumoto T.: Estimation of Single Stress Fiber Stiffness in Cultured Aortic Smooth Muscle Cells under Relaxed and Contracted States: Its Relation to Dynamic Rearrangement of Stress Fibers, J Biomech 43-8, 1443-1449

(2010) DOI:  
10.1016/j.jbiomech.2010.02.007  
Matsumoto T, Yamamoto M, Seo S,  
Sato J, Kato Y, Sato M: Effects of  
hypertension on morphological,  
contractile and mechanical Properties  
of rat aortic smooth muscle cells, *Cell  
& Mol Bioeng* 4-3, 340-347 (2011) DOI:  
10.1007/s12195-011-0182-y  
Nagayama K, Matsumoto T: Dynamic  
Change in Morphology and Traction  
Forces at Focal Adhesions in Cultured  
Vascular Smooth Muscle Cells during  
Contraction, *Cell & Mol Bioeng* 4-3,  
348-357 (2011) DOI:  
10.1007/s12195-011-0166-y  
Nagayama K, Adachi A, Matsumoto T:  
Heterogeneous Response of Traction  
Force at Focal Adhesions of Vascular  
Smooth Muscle Cells Subjected to  
Macroscopic Stretch on a Micropillar  
Substrate, *J Biomech* 44-15,  
2699-2705 (2011) DOI:  
10.1016/j.jbiomech.2011.07.023  
Nagayama K, Yahiro Y, Matsumoto T:  
Stress fibers stabilize the position of  
intranuclear DNA through  
mechanical connection with the  
nucleus in vascular smooth muscle  
cells, *FEBS Letters* 585-24, 3992-3997  
(2011) DOI:  
10.1016/j.febslet.2011.11.006  
Matsumoto T, Nagayama K: Tensile  
properties of vascular smooth muscle  
cells: Bridging vascular and cellular  
biomechanics (Review), *J Biomech*  
45-5, 745-55 (2012) DOI:  
10.1016/j.jbiomech.2011.11.014  
Nagayama K, Kimura Y, Matsumoto  
T: Strain waveform dependence of  
stress fiber reorientation in cyclically  
stretched osteoblastic cells: Possible  
effects of viscoelastic compression of  
stress fibers during stretch cycle, *Am  
J Physiol Cell Physiol* 302, C1469-78  
(2012) DOI:  
10.1152/ajpcell.00155.2011  
杉田修啓, 松本健郎: 胸大動脈壁内コラ  
ーゲン線維の2軸等方引張負荷下リア  
ルタイム変形挙動観察, *日本生体医工学  
会誌* 50-6, 687-692 (2012) DOI:  
10.11239/jsmbe.50.687  
杉田修啓, 松本健郎, 増田弘毅, 佐藤正  
明: 動脈硬化病変を有するヒト冠動脈の  
血管周方向ひずみ分布計測, *日本機械学  
会誌A編* 79-798, 177-187 (2013) DOI:  
10.1299/kikaia.79.177  
Sugita S, Matsumoto T: Quantitative  
measurement of the distribution and  
alignment of collagen fibers in unfixed

aortic tissues, *J Biomechanics* 46-7,  
1403-7 (2013) DOI:  
10.1016/j.jbiomech.2013.02.003  
杉田修啓, 松本健郎, 佐藤正明: 動脈硬  
化病変を有する家兎胸大動脈の血管周  
方向ひずみ分布計測, *ライフサポート*  
25-2, 56-62 (2013) DOI:  
10.5136/lifesupport.25.56  
Sugita S, Matsumoto T: Heterogeneity  
of deformation of aortic wall at the  
microscopic level: Contribution of  
heterogeneous distribution of collagen  
fibers in the wall, *Bio-medical  
Materials and Engineering* 23-6,  
447-461 (2013) DOI:  
10.3233/BME-130771  
Nagayama K, Yahiro Y, Matsumoto T:  
Apical and basal stress fibers have  
different roles on mechanical  
regulation of the nucleus in vascular  
smooth muscle cells, *Cellular and  
Molecular Bioengineering* 6-4, 473-481  
(2013) DOI:  
10.1007/s12195-013-0294-7  
Nagayama K, Yamazaki S, Yahiro Y,  
Matsumoto T: Estimation of the  
mechanical connection between apical  
stress fibers and the nucleus in  
vascular smooth muscle cells cultured  
on a substrate, *J Biomechanics* 47-6,  
1422-1429 (2014) DOI:  
10.1016/j.jbiomech.2014.01.042

[学会発表](計20件)

Matsumoto T: Is the uniform stress  
hypothesis true? Heterogeneous mechanical  
environment in the aortic wall at a cellular  
level, the Sixth World Congress of  
Biomechanics (2010/8/1-6, Singapore)

【Keynote lecture】

宇野洋平, 長山和亮, 松本健郎: 円周方  
向引張負荷に伴うブタ胸大動脈壁内微  
視的変形挙動の観察, *日本機械学会2010  
年度年次大会*(2010/9/6-8, 名古屋)

松本健郎: 生命を探る新たな視点: バイ  
オメカニクス, *2010年度秋季日本歯科保  
存学会*(2010/10/28-29, 長良川国際会議  
場)【特別講演】

杉田修啓, 松本健郎: 偏光顕微鏡による  
血管組織内コラーゲン線維定量評価法,  
*第23回バイオエンジニアリング講演会*  
(2011/1/8-9, 熊本)

Matsumoto T: Multi-scale Mechanical  
Analysis of Aortic Tissues Toward  
Understanding of Their Mechanical  
Adaptation, *2011 Spring Conference of  
Bioengineering Division, Korea Society of  
Mechanical Engineers* (2011/4/28-30,  
Pohang, Korea)【招待講演】

杉田修啓, 松本健郎: 血管組織内コラーゲン量の計測方法の構築とその実例, 第50回日本生体医工学会大会 (2011/4/29-5/1, 東京)

Sugita S, Matsumoto T: Quantitative analysis of collagen distribution in the aorta using birefringence imaging, ASME 2011 Summer Bioengineering Conference (2011/6/22-25; Farnington, PA, USA)

宇野洋平, 長山和亮, 松本健郎: 局所的レーザ切断に伴うブタ胸大動脈壁内構成要素の変形挙動観察, 日本機械学会第22回バイオフロンティア講演会 (2011/10/7-8, 津)

Matsumoto T, Fukunaga A, Narita K, Uno Y, Nagayama K: Microscopic mechanical analysis of aortic wall: Heterogeneous mechanical environment in the aortic wall at the cellular level, The 5th Shanghai International Conference on Biophysics and Molecular Biology (2011/11/4-8, Shanghai-Hangzhou, China)

Matsumoto T, Yamamoto M, Seo S, Sato J, Kato Y, Sato M: Effects of Hypertension on Morphological, Contractile and Mechanical Properties of Rat Aortic Smooth Muscle Cells, The 5th Shanghai International Conference on Biophysics and Molecular Biology (2011/11/4-8, Shanghai-Hangzhou, China)

杉田修啓, 松本健郎: 生体軟組織内微細構造と局所ひずみ分布の関連: 解析方法の確立と大動脈壁への応用, 日本機械学会第24回バイオエンジニアリング講演会(2012/1/7-8, 豊中)

松本健郎: 生体組織の力学的適応反応解明を目指したマルチスケール力学解析, 第20回バイオフィジオロジー研究会 (2012/2/25, 京都) 【招待講演】

松本健郎: 血管壁のバイオメカニクス, 第2回豊橋ライブデモンストラーションコース (2012/5/24-6, 豊橋) 【招待講演】

Matsumoto T: Tensile Properties of Vascular Smooth Muscle Cells: Bridging Tissue and Cell Biomechanics, バイオフロンティアシンポジウム2012 (2012/10/5, 弘前) 【Keynote Lecture】

飯島慎太郎, 長山和亮, 中村佐紀子, 横田秀夫, 松本健郎: 3次元内部構造顕微鏡を用いた家兎胸大動脈壁内微細構造の観察, 日本機械学会第23回バイオフロンティア講演会 (2012/10/5-6, 弘前)

Matsumoto T, Uno Y, Nagayama K: Heterogeneity in Microscopic Deformation of Aortic Wall during Circumferential Stretch, BMES 2012 Annual Meeting (10/24-27/12, Atlanta, GA, USA)

Matsumoto T: Heterogeneity in

Microscopic Residual Stress in the Aortic Wall, 2013 SEM Annual Conference & Exposition on Experimental & Applied Mechanics (2013/6/3-6, Lombard, IL, USA) 【Invited symposium】

Matsumoto T: Effects of microscopic heterogeneity on the mechanical behavior of the elastic arteries, The 7th Asian Pacific Conference on Biomechanics (2013/8/29-31, Seoul, Korea) 【Invited lecture】

Matsumoto T, Uno Y, Nagayama K: Heterogeneity in the intramural mechanical environment of the aorta: Estimation of stress applied to elastic laminae in a physiological state, The 15th International Conference on Biomedical Engineering (ICBME 2013) (2013/12/4-7, Singapore)

Iijima S, Nakamura S, Yokota H, Nagayama K, Matsumoto T: Three-dimensional observation of microscopic structure of the aortas reveals their heterogeneous deformation, The 15th International Conference on Biomedical Engineering (2013/12/4-7, Singapore)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

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

### (2) 研究分担者

長山 和亮 (NAGAYAMA, Kazuaki)  
名古屋工業大学・大学院工学研究科・准教授  
研究者番号: 10359763

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

松本 明郎 (MATSUMOTO, Akio)  
千葉大学・大学院医学研究科・准教授  
研究者番号: 60437308