

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24240073

研究課題名(和文) 病的肺リモデリングメカニズムの解明に向けたマルチスケールメカニクス解析

研究課題名(英文) Multiscale mechanical modeling and analysis of the lung for better understanding of the pathological remodeling mechanism

研究代表者

和田 成生 (WADA, SHIGEO)

大阪大学・基礎工学研究科・教授

研究者番号：70240546

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 36,300,000円

研究成果の概要(和文)：高輝度放射光を用いたCT計測により肺の微細構造を明らかにするとともに、その不均一な構造を表現する数理モデル、細胞膜と細胞核および細胞骨格から構成される細胞力学モデル、細胞膜の分子動力学モデルを構築し、臓器レベルの変形から組織や細胞レベルの力の伝達、張力作用下での分子膜の力学特性に至る肺内部のマルチスケールな力学状態を明らかにした。これにより、呼吸によって大きく変形する肺組織の中で、肺を構成する細胞がどのような力学的環境下に置かれ、それに対して細胞や組織がどのような応答を示すのかを明らかにしていくための計算解析プラットフォームを確立した。

研究成果の概要(英文)：Multi-scale mechanical behaviors in the lung such as deformation of the organ, force transmission in the tissue and mechanical response to stretch of cell membrane have been elucidated by computational analyses using a mathematical model for inhomogeneous micro structure of the lung parenchyma, a mechanocell model consisting of cell membrane, nuclear and cytoskeletons, and a molecular dynamics model of cell membrane as well as experimental measurements of lung acinus cluster with a synchrotron micro CT. The developed computational modeling and analyses provide an innovative platform to investigate how the cell and tissue biologically respond to the mechanical environment in the lung that largely deforms by breathing.

研究分野：バイオメカニクス

キーワード：バイオメカニクス マルチスケール解析 肺細胞 形態計測 マイクロCT リモデリング 構造解析
呼吸音

1. 研究開始当初の背景

肺は呼吸運動により膨張収縮を繰り返し、ガス交換を行っている。これにともない肺組織や細胞には常に周期的な力学的負荷が作用している。肺を微視的に見れば、厚さ 10 μm 程度の薄い隔壁で区切られた直径 100 ~ 200 μm の肺胞で埋められている。肺胞は気道系の末梢に位置し、一本の呼吸細気管支につながる肺胞管、肺胞嚢および肺胞は肺細葉と呼ばれるガス交換ユニットを形成している。肺胞隔壁は、結合組織や毛細血管、肺胞上皮細胞などから構成されており、ガス交換や肺の弾性機能の役割を担うとともに、肺サーファクタントを分泌して肺胞や末梢気道の気液界面に作用する表面張力を低下させ、肺実質の力学的安定性を維持している。こうした複雑な構造をした肺内部の力学状態は十分に把握されておらず、呼吸運動によって大きく変形する肺組織の中で、肺を構成する細胞がどのような力学的環境下に置かれ、それに対して細胞や組織がどのような応答を示すのかについては明らかになっていない。

一般に細胞は力学的負荷に応答して、自身の構造や機能を変化させ、周辺組織のリモデリングを引き起こすことが知られており、肺を構成する細胞もその例外ではない。たとえば、呼吸機能の重要な役割を担っている肺胞上皮細胞には、ガス交換に関係する I 型細胞と肺サーファクタントを分泌する II 型細胞があるが、力学的負荷が作用しない静地培養下では II 型から I 型に形質転換することが知られている。また、過負荷により上皮細胞のアポトーシスが亢進することも報告されている。最近では、力学的負荷に対する肺胞 - 毛細血管系の複合組織の応答を調べるためのマイクロチップも開発され、肺内部の環境に近い状態で細胞や組織レベルの応答が明らかになりつつある。一方、臓器レベルでは、人工呼吸の圧力負荷により肺組織や細胞が徐々に損傷していくことや、肺組織の破壊や変性を伴う肺気腫や肺線維症などの肺疾患の進行には力学的負荷の作用が関与していることが報告されている。こうした病的な肺のリモデリングを引き起こされるメカニズムを解明するためには、肺内部の詳細な力学状態を把握し、それに対する細胞・組織レベルの応答を明らかにしていく必要がある。

2. 研究の目的

医用画像に基づく肺の実形状モデル、肺胞から構成される肺実質の微細構造を表す確率論的数理モデル、細胞膜と細胞核および細胞骨格から構成される細胞力学モデル、細胞膜の分子動力学モデルを構築し、肺の臓器レベルの変形から、組織や細胞レベルの変形、分子膜レベルの力学特性に至る肺のマルチスケールな力学現象を解析する。これにより、正常肺や医用画像に反映される様々な病態の病的肺に対して、肺内部の細胞や組織に作用する力学場と、それに対する組織・細胞・

分子レベルの応答を調べ、肺内部の異常な力学的負荷環境が引き起こす病的肺リモデリングメカニズムの解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) 肺細葉の形態計測

高輝度放射光 (SPring8) を利用して、生後 9 週のア/J マウス肺の 3 次元 CT 画像を取得した。末梢気道形態のマルチスケール性を利用した気道抽出アルゴリズムを開発し、半自動的に CT 画像から肺胞を含む末梢気道領域を抽出した。これにより、肺実質の微細構造モデルを構築するためのデータを収集した。

(2) 肺微細構造の数理モデルと力学解析

ポロノイ分割による空間幾何学手法を用いて、肺実質微細構造内を様々な形状を持つ肺胞で充填した。また、確率論的数理モデリングの一つである Simulated Annealing アルゴリズムを採用して、肺胞間をつなぐ空気の通路 (肺胞管) を表現した (図 1)。確率論的数理モデルリングにおいては、ガス交換能や構造的な安定性を最適化するようなエネルギー関数を提案し、パラメタを調整することにより、計測した実際の肺微細構造の計測データを再現できるようにした。構築した肺実質微細構造モデルを用いて、構造解析および物質輸送などの力学解析を行った。

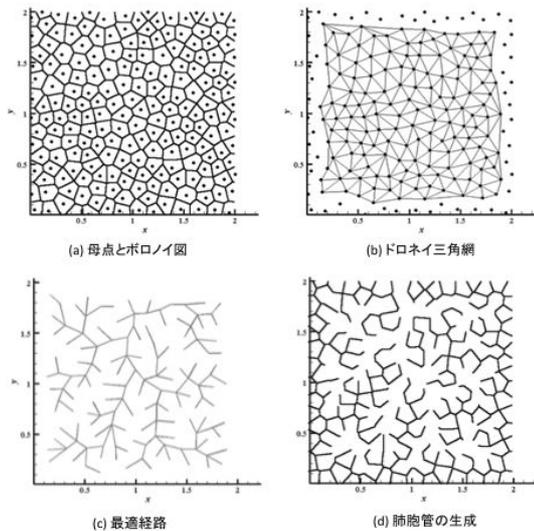


図 1 肺細葉の数理モデル (2次元の場合)

(3) 細胞力学モデルを用いた力学解析

エネルギー最小化原理に基づいて細胞膜、細胞核および細胞骨格から構成される細胞の力学モデルを用いて、変形する肺組織内の細胞の力学的負荷状態を解析した。肺組織内に細胞の力学モデルを配置し、細胞 - 組織モデルを作成した。これにより、組織に荷重が作用したときに細胞と細胞外マトリクスの力学的相互作用の中で、細胞に作用する力学場とそれが細胞内に伝達されて生じる細胞内の応力状態を調べた。

(4) 引張をうける細胞膜の分子動力学解析
 リン脂質とコレステロールから構成される細胞膜の分子動力学モデルを構築し、引張負荷が細胞膜の変形や物質透過性などの力学特性に及ぼす影響を調べた。

4. 研究成果

(1) マウス肺細葉の形態

高輝度放射光 CT で得られた CT 画像 (4000 × 4000 × 1343 ボクセル, 分解能 2.8 μm) から, 多数の肺胞で構成される肺細葉およびその集合体である小葉を, 1 本の終末細気管支から追跡して半自動的に抽出するアルゴリズムを開発した (主要論文 2)。開発したアルゴリズムを適用して得られた終末細気管支とそれにつながる 9 つの肺細葉の抽出画像を図 2 に示す。マウス肺の場合, 一本の終末細気管支に接続する複数の肺細葉が, 空間を充填するようにクラスタを形成していることが確認できた。また, 個々の肺細葉の大きさや外形は一様でないことがわかった。図 3 は, 3 匹のマウスから得られた 6 か所の肺細葉クラスタにおいて, 肺細葉の終末細気管支との接続位置と肺細葉の体積との関係を示したものである。ガス輸送面から考えると不利な条件となる終末細気管支の末梢側に, 体積の大きな肺細葉が接続されている傾向がみられ, 空間を充填する肺細葉の形や大きさには幾何学的制約が強く作用していることが示唆された (主要論文 9)。

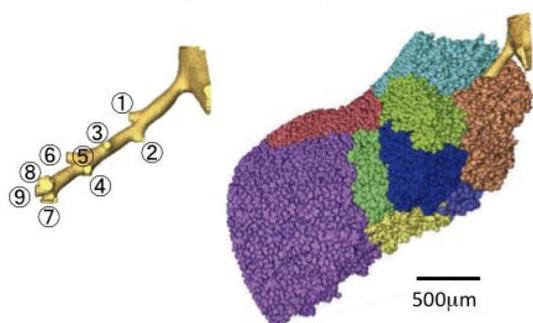


図 2 マウス肺細葉のクラスタ

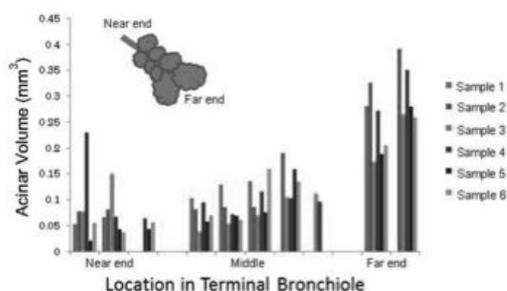


図 3 肺細葉の配置と体積との関係

また病的肺のモデルとして肺気腫肺に着目し, 肺気腫モデルマウスにエラストナーゼを気道内に投与することによって誘導し, SPring8 高分解能 CT を用いて撮影を行った。開発したマルチスケール画像抽出法を用いて肺実質の微細構造の形態計測を行った。そ

の結果, 肺気腫モデルでは肺胞壁の消失が確認され, 個々の肺胞が区別できなくなり含気区域が拡大していた。さらに動態解析を行ったところ, 健常モデルマウスと比較して呼吸に伴う肺細葉の変形率が小さいことが分かった。

(2) 肺細葉の数理モデルの構築

ポロノイ領域分割と最適経路探索法を組み合わせた数理モデリング手法により, 図 4 に示すような肺細葉の不均一な内部構造を再現し (主要論文 5), 肺細葉内部の酸素輸送動態 (図 5) や応力状態の評価を可能にした。

計測したマウス肺葉の実形状データに基づいて構築した 12 個のマウス肺細葉実形状モデルに対して, 巨視的に等方膨張させた場合の肺細葉内部の変形解析を行った結果を図 6 に示す。その結果, 肺細葉レベルでは, 肺胞壁に作用するひずみは均一ではなく, 肺胞口周辺で局所的に大きくなることが分かった。また, 内部構造を肺組織表面の主曲率を用いて種類が異なる肺胞上皮細胞が存在する位置を推定し, 変形解析で得られた応力場を参照することで, 細胞周囲の肺組織の力学場を明らかにする方法を開発した。これにより, 病的リモデリングとともに進行する肺細葉の構造変化が肺組織レベルの不均一な力学場を引き起こす可能性が示唆された。

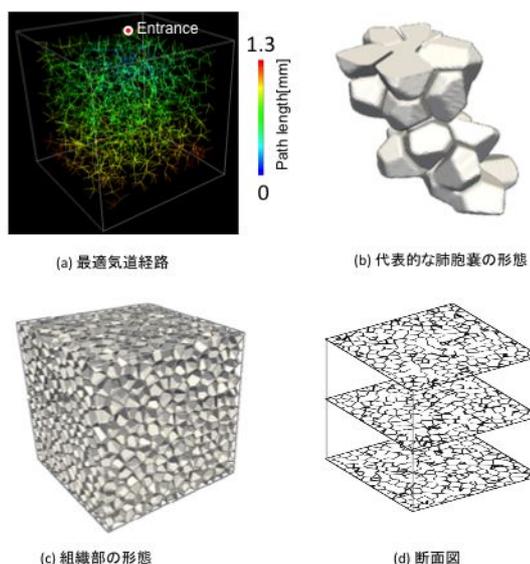


図 4 肺細葉の数理モデル

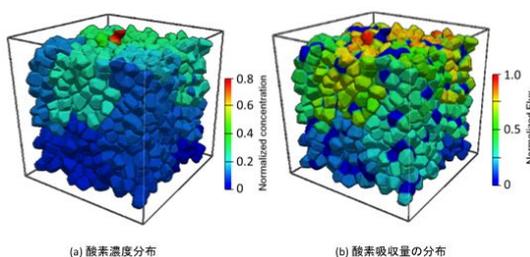


図 5 肺細葉モデル内の酸素輸送動態

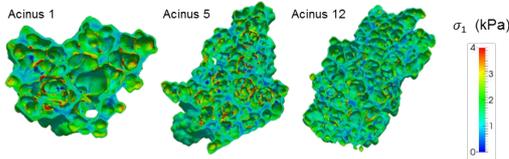


図6 計測データに基づいて得られた肺細胞レベルの応力分布

(3) 引張組織内の細胞の変形挙動

細胞を包埋する組織に単純引張、圧縮、およびせん断変形が作用したときの細胞および細胞骨格に生じるひずみを評価した。その結果、図7に示すように、組織の弾性特性および変形様式によって、引張ひずみや圧縮ひずみを受ける細胞骨格の度数分布が変化することが示された(主要論文 1, 4)。こうした結果は、細胞が変形様式の相違を検知して適応的に応答するメカニズムを探るうえで重要であると考えられる。また、肺組織の変形に伴う細胞の力学状態を推定する方法として、計測と計算力学シミュレーションのデータ同化手法を開発した。ここでは、基材に埋め込んだビーズの移動から接着細胞の牽引力を推定する逆問題解析を行い(図8)、適切に牽引力を推定するための測定条件を明らかにした。

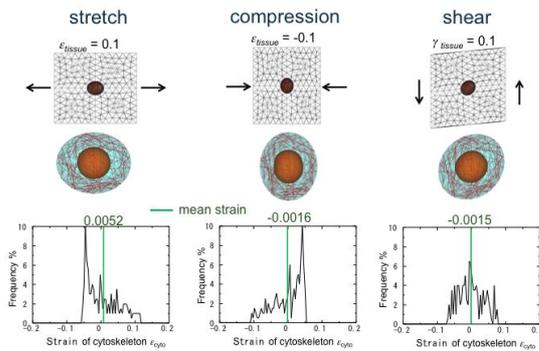


図7 組織内部の細胞の変形挙動

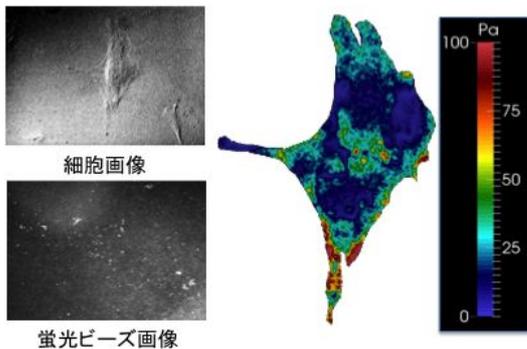


図8 接着細胞の内力推定

(4) 引張環境下における細胞膜の力学特性

コレステロールを含有したリン脂質二重膜に引張を与える分子動力学シミュレーションを行い、コレステロールが膜破断に与え

る影響を分子レベルで調べた(主要論文3, 7)。引張により膜面積を増加させ、膜の面積ひずみがある値を超えると、膜の内部に水分子が侵入し、それをきっかけとして膜に孔が形成された。孔が形成される臨界の面積ひずみはコレステロールを含有する膜の方が含有しない膜より大きかった。また、コレステロールを含有する膜は、一定値以上の面積ひずみを受けると、二重膜のそれぞれの層のリン脂質分子が互いに噛み合い、それらの分子配向が整った膜構造へ変化した。その構造は指組み構造ゲル相と呼ばれる相状態の膜構造と酷似していた。コレステロールを含有する膜の引張による指組み構造ゲル相への相転移の報告は本研究が初めてである。これらの結果から、引張による分子配向が整った膜構造への相転移が膜内部への水分子の侵入とその後の孔形成を抑制していると推測された。また、孔を含んだ膜の面積ひずみが一定値を下回ると、孔は自発的に閉じた。この孔が閉じる面積ひずみの値はコレステロールを含有する膜の方が含有しない膜より大きかった。この結果をもとに、孔の縁での単位長さあたりのエネルギー損失、線張力係数を見積ると、コレステロール含有率の増加に伴い、線張力係数が増加した。このことから、コレステロールの含有は孔の自発的な縮小を促進し、拡大を抑制することが分かった。

(5) 気道リモデリングと異常呼吸音との関係

異常呼吸音の再現およびそのメカニズム解明を目指し、狭窄を有する気管の理想形状モデルを用いた数値流体解析を行った。支配方程式に微圧縮性の仮定を用いる事で低マッハ数(<0.1)および中程度レイノルズ数(~5000)の流れ場における圧力変動を再現した。狭窄部有無の気管を想定した直管の片側から空気を流入し、それぞれ遠方場での圧力変動を測定した結果、管長および解析サイズに関連する共振周波数が見られ、狭窄部による流れの乱れが幅広い周波数帯の圧力擾乱を増加させることが定量的に確認できた。また、理想化された気道の分岐管モデルを用いて流体音計測も行い、狭窄部でのレイノルズ数が3000を超えると測定可能な流体音が発生することが分かった(論文6)。また、動物実験により、気管支喘息による気道リモデリングに伴う呼吸音の変化を動物実験で調べ、モデル実験および数値流体解析の結果と比較検討した。この他、肺音の発生および伝播解析では、空気層、粘膜層および気道壁の固体層からなる気道内の流れや音響伝播の数値シミュレーションを行った。また、動物実験および気道の単純分岐モデルや小児気道の実形状モデルを用いた実験により、気道内で発生する流体音の基本特性や音源を明らかにした。さらに、動物実験および気道音の伝播解析で得られた結果を統合することで、喘息の進行度合いとともに変化する呼吸音と気道壁の組織構造との変化を明らかにする

とともに、その病態変化を聴診で捉える肺音の物理的メカニズムについて考察した(主要論文 8)。

(6) 今後の展開

本研究では、肺細葉の形態解析と数理モデリング、およびそれをういた力学解析を行った。ここではマウスやラットの動物肺のデータに基づく解析結果を示したが、ヒト肺に対しても同様の手法を適用することができる。医用 CT 画像からは直接肺細葉の構造を取得することはできないが、X 線吸収度の分布から組織率を評価して肺胞密度が推定できれば、in vivo でのヒト肺細葉モデルの構築も可能である。本研究では、肺細葉レベルの力学解析と臓器レベルのイメージベーストシミュレーションやエネルギー最小化原理に基づいた細胞の力学モデルとを組み合わせることにより、図 9 に示すような肺のマルチスケール解析プラットフォームを構築した。最近では肺循環系の詳細な構造も明らかにされつつあり、今後は、肺呼吸と肺循環が連立したミクロとマクロの力学場を統合する本解析プラットフォームを活用して、呼吸機能の理解や病的肺リモデリングのメカニズムの解明がさらに進むものと考えられる。

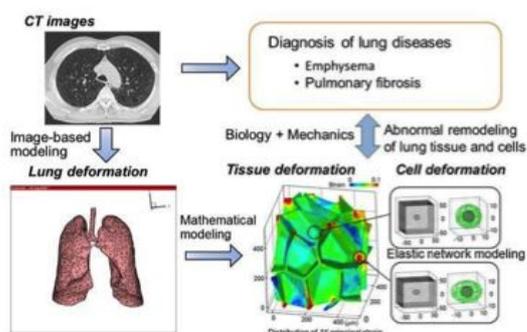


図 9 肺のマルチスケール構造解析プラットフォーム

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 9 件)

1. Yoshihiro Ujihara, Masanori Nakamura, Hiroshi Miyazaki, Shigeo Wada, Contribution of actin filaments to the global compressive properties of fibroblasts, *J. Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 査読有, vol. 14, 2012, 192-198, doi:10.1016/j.jmbbm. 2012.05.006
2. Luosha Xiao, Toshihiro Sera, Kenichiro Koshiyama, Shigeo Wada, A semiautomatic segmentation algorithm for extracting the complete structure of acini from synchrotron micro-CT images, *Computational & Mathematical Methods in Medicine*, 査読有, vol. 2013, 2013, 10 pages, Article ID 575086, http://dx.doi.org/10.1155/2013/575086
3. Taiki Shigematsu, Kenichiro Koshiyama, Shigeo Wada, Molecular dynamics

simulations of pore formation in stretched phospholipid/cholesterol bilayers, *Chemistry & Physics of Lipids*, 査読有, vol. 183, 2014, pp. 43-49, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2014.05.005

4. Yoshihiro Ujihara, Masanori Nakamura, Masatsugu Soga, Kenichiro Koshiyama, Hiroshi Miyazaki, Shigeo Wada, Computational studies on strain transmission from a collagen gel construct to a cell and its internal cytoskeletal filaments, *Computers in Biology & Medicine*, 査読有, vol. 56, 2015, pp.20-29, doi:10.1016/j.combiomed.2014.10.015
5. Kenichiro Koshiyama, Shigeo Wada, Mathematical model of a heterogeneous pulmonary acinus structure, *Computers in Biology & Medicine*, 査読有, vol. 62, 2015, pp.25-32, doi:10.1016/j.combiomed. 2015.03.032
6. Gabriel Pramudita Saputra, Kazunori Nozaki, Satoshi Ii, Shigeo Wada, Aeroacoustic sound alteration in airway bronchoconstriction, represented by a constricted T-branch model, *J Biomechanical Science & Engineering*, 査読有, vol. 10, 2015, p.14-00246, doi: 10.1299/jbse.14-00246
7. Taiki Shigematsu, Kenichiro Koshiyama, Shigeo Wada, Effects of stretching speed on mechanical rupture of phospholipid/cholesterol bilayers: Molecular dynamics simulation, *Scientific Reports*, 査読有, No. 5, 2015, ID:15369, doi: 10.1038/srep15369
8. Chizu Habukawa, Katsumi Murakami, Kazuya Sugitani, Tomohiro Ohtani, Gabriel Pramudita Saputra, Katsuki Koshiyama, Yukio Nagasaka, Shigeo Wada, Changes in lung sounds during asthma progression in a guinea pig model, *Allergology International*, 査読有, in press
9. Luosha Xiao, Toshihiro Sera, Kenichiro Koshiyama, Shigeo Wada, Morphological characterization of acinar cluster in mouse lung using a multiscale-based segmentation algorithm on synchrotron micro-CT images, *Anatomical Record*, 査読有, in press

[学会発表](計 16 件)

1. Shigeo Wada, Takayoshi Nishimura, Kenichiro Koshiyama, Yoshihiro Ujihara Masanori Nakamura, Deformation of a cell and its internal cytoskeletons caused by the mechanical force applied to a tissue, 10th World Congress on Comp Mech, July 8-13, 2012, São Paulo(Brazil)
2. LuoSha Xiao, Toshihiro Sera, Kenichiro Koshiyama, Shigeo Wada, A semi-automatic segmentation algorithm for extracting pulmonary microstructures from synchrotron micro-CT images, 生体医工学シンポジウ

- ム2012, 2012年9月7日,大阪大学(豊中).
3. 水野絢可, 越山顕一郎, 和田成生, 肺細葉不均質構造モデルを用いた酸素拡散解析, 第23回バイオフロンティア講演会, 2012年10月4日, 弘前文化センター(弘前)
 4. 和田成生, 医療とバイオメカニクスをつなぐフィジックスペーストシミュレーション, 第13回IPABシンポジウム, 2012年12月7日, NEC本社ビル(東京)
 5. 和田成生, 予測医学における生体力学シミュレーションの役割, 第25回バイオエンジニアリング講演会, 2013年1月8日, 産総研つくばセンター(つくば)
 6. Shigeo Wada, Kenichiro Koshiyama, Luosha Xiao, Toshihiro Sera, Modeling and measurements of pulmonary microstructure toward multiscale analysis of the lung mechanics, 35th Annual Intern Conf of the IEEE Eng in Med & Biol Soc, July 3-7, 2013, Osaka (Japan)
 7. Gabriel Pramudita Saputra, Kazunori Nozaki, Satoshi Ii, Shigeo Wada, Experimental flow-sound analyses in T-branch model for understanding constriction effect in lung sound generation mechanisms, Internoise 2013, Sep. 15-18, 2013, Innsbruck (Austria)
 8. Shigeo Wada, Flow-induced sounds in the oral cavity and the branching airway, ILSA 2013, Nov 14, 2013, Kyoto(Japan)
 9. Luosha Xiao, Toshihiro Sera, Kenichiro Koshiyama, Shigeo Wada, Morphological analysis of mouse pulmonay acini extracted from synchrotron micro-CT images with a multiscale-based segmentation algorithm, 15th Intern Conf on Biomed Eng, Dec 4-7, 2013, Singapore (Singapore)
 10. 水野絢可, 越山顕一郎, 和田成生, 肺細葉の不均質構造が肺胞における酸素の吸収量に及ぼす影響, 第26回バイオエンジニアリング講演会講演, 2014年1月11-12日, 東北大学(仙台)
 11. 長池香, 大谷智仁, 伊井仁志, 越山顕一郎, 和田成生, 気道による拘束を考慮した肺の変形シミュレーション, 第25回バイオフロンティア講演会, 2014年10月3-4日, とりぎん文化会館(鳥取)
 12. 三上太平, 越山顕一郎, 肖蘿莎, 和田成生, 不均質肺細葉構造の数値モデリング: 肺細葉の外形状が内部構造に及ぼす影響, 第25回バイオフロンティア講演会, 2014年10月3-4日, とりぎん文化会館(鳥取)
 13. 杉谷和哉, 伊井仁志, 土生川千珠, 和田成生, 気道壁を介した呼吸音の伝播特性の数値音響解析: 気道壁の物性変化が与える影響, 第90期日本機械学会関西支部講演会, 2015年3月16-17日, 京都大学(京都)
 14. 西川明日香, 越山顕一郎, 和田成生, 肺細葉における微小血管系不均質ネットワークモデルの構築, 第27回バイオエンジニアリング講演会, 2015年1月9-10日, 朱鷺メッセコンベンションセンター(新潟)
 15. Saputra Gabriel P, Nozaki K, Ii S, Habukawa C, Wada S, Acoustic source detection of respiratory sound in silicone lung airway model using microphone array system. SB3C 2015, Jun. 17-20, 2015, Snowbird(USA).
 16. Luosha Xiao, Toshihiro Sera, Kenichiro Koshiyama, Shigeo Wada, Micro-CT-based morphological measurement of mouse acinar cluster and the oxygen diffusion analysis, The 8th Asian-Pacific Conference on Biomechanics, Sep. 16-19, 2015, Sapporo(Japan).
- 〔その他〕
ホームページ
<https://sites.google.com/site/biomechwadalab/yan-jiu-shao-jie>
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
和田 成生 (WADA SHIGEO)
大阪大学・大学院基礎工学研究科・教授
研究者番号: 70240546
 - (2) 研究分担者
越山 顕一郎 (KOSHIYAMA KENICHIRO)
大阪大学・大学院基礎工学研究科・助教
研究者番号: 80467513
- 伊井 仁志 (II SATOSHI)
大阪大学・大学院基礎工学研究科・助教
研究者番号: 50513016
- 世良 俊博 (SERA TOSHIHIRO)
九州大学・工学研究院・准教授
研究者番号: 40373526
- 宮崎 浩 (MIYAZAKI HIROSHI)
藍野大学・医療保健学部・教授
研究者番号: 00263228