

令和 4 年 6 月 2 日現在

機関番号：13901
研究種目：基盤研究(A) (一般)
研究期間：2018～2020
課題番号：18H03752
研究課題名(和文)生物のかたちづくりを利用したものづくり：力学的適応現象を利用した最適構造構築

研究課題名(英文) Morphogenesis-based manufacturing: Construction of optimal structures utilizing mechanical adaptation phenomena

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) 35,100,000円

研究成果の概要(和文)：3テーマで研究を進めた：A. 組織に作用する力の分布を細胞レベルで明らかにする手法の開発では、FRET型張力センサ遺伝子の血管組織への導入を目指したが成功せず、センサを安定して発現する細胞をひずみゲージ細胞として組織に注入する方法を思いついた。B. 幼若骨組織の力学負荷下培養系の確立と最適構造の自発創生では、幼若鶏雛脛骨薄片を顕微鏡下で引張りながら培養し、石灰化は引張で促進、コラーゲン線維の配向方向に進行すること等が判明した。C. 珪藻の形態形成に及ぼす力学刺激の影響の検討では、アウラコセイラの成長時の伸長力の計測や培養液浸透圧と成長速度の関係から細胞内圧が200kPa以上であると見積もった。

研究成果の学術的意義や社会的意義
生物のかたちづくりには力が大きく関わっており、生体組織の多くが力学的最適性を保っている。そこで「生物のかたちづくりに力学はどのように影響しているのか、それを上手く制御して、ものづくりに結びつけることはできないか?」という考えで研究を進めた。組織内張力分布を細胞レベルで明らかにする系の確立には失敗したが、将来有望な方法を着想した。幼若骨を力学負荷下で培養し、最適構造を自発創生させる手法の確立に挑み、基礎データを蓄積した。同じく珪藻を力学負荷下で培養し、被殻形成過程の詳細や細胞内圧など、基礎データの蓄積を行った。

研究成果の概要(英文)：Three themes were studied: In A) Development of a method to clarify the stress distribution in a tissue at the cellular level, we aimed to introduce the FRET-type tension sensor gene into the vascular tissue, but was unsuccessful. We came up with a method to inject sensor cells with stable expression into a tissue as a strain gauge. For B) the establishment of a culture system under the mechanical load of the juvenile bone tissue and the spontaneous creation of the optimum structure, juvenile chick tibial thin sections were cultured while being pulled under a microscope. Calcification was promoted by tension, and moves toward the direction of collagen fibers. In C) the examination of the effect of mechanical stimuli on the morphogenesis of diatoms, it was clarified that the intracellular pressure may be >200 kPa from the measurement of the elongation force during growth of Aulacoseira and the relationship between the osmotic pressure of the culture medium and the growth rate.

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 力学的適応 ものづくり 骨 珪藻 形態形成

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生物のかたちづくりには力学が大きく関わっており、しかも、力学的な最適性を保っている場合の多いことが明らかとなってきた。例えば、骨は最小の材料で最大の強度を達成する最適構造を取っていることが、既に 19 世紀後半に Wolff により指摘されている[1]。また、血管壁は高血圧で肥厚するが、これは壁内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し[2]、血管壁のヤング率に相当する増分弾性係数も生理的血压における値が一定に保たれることが報告されている。一方、除荷は生体組織に壊滅的な影響を与える場合のあることが知られており、例えば、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 にまで低下してしまう[3]。

このような力学応答を解明することは、生物が形作りに力学をどのように活用しているのか知るといふ観点から材料力学的に興味深いだけでなく、医学分野のものづくり、例えば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、上で見たように膝蓋腱のような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。

力学応答の解明は、医学分野のものづくりだけでなく工業的なものづくりにも活用できる可能性もある。生体組織が力学的最適性を生み出す力学原理を明らかにして、それを設計に生かすことで最適構造物を作製するという考えはこれまでも提案されているが、生物のかたちづくりの機能をそのままものづくりに利用するという考え方もできる。例えば、幼若骨組織を適度な力学環境で培養することにより、その環境に最適な形状を自己組織的に作り出させることができる可能性がある。また、植物プランクトンの一種である珪藻は精妙な微細構造を水と空気と太陽光だけから作り出している。そして最近、我々はこの構造にも力学刺激が関与していることを見出した。従って、珪藻のかたちづくりのメカニズムとそこに与える力学刺激の影響を明らかにすることで、新たな 3 次元微細構造物の作製、いわばバイオマイクロマシニングとでも呼ぶべき分野を確立できる可能性がある。

2. 研究の目的

生物のかたちづくりには力学が大きく関わっており、しかも、生体組織の多くが力学的な最適性を保っていることが明らかとなってきた。そこで、「生物のかたちづくりに力学はどのように影響しているのか、また、それを上手く制御することで、ものづくりに結びつけることはできないか?」という考えの下、多角的に研究を進める: まず最近我々が開発した力により蛍光の変わるタンパク質を組織内の細胞に発現させる方法を確認し、組織内の力分布を細胞レベルで明らかにする手法を開発する。また、最近確立した鶏雛幼若骨の力学負荷培養系を用いて、幼若骨組織に力学負荷を加えることで最適構造を自発創生させる手法の確立に挑む。そして、同じく最近確立した珪藻の力学負荷下培養系を利用して、力学負荷による珪藻の被殻形状の人為的操作を試み、珪藻等の細胞に適切な力学刺激を加えることで所望の微細構造物を作らせるバイオマイクロマシニング技術の確立に挑戦する。

3. 研究の方法

A. 組織に作用する力の分布を細胞レベルで明らかにする手法の開発

我々が別途開発した FRET 型張力センサの遺伝子を電気パルスで培養細胞内に導入し、細胞内で発現させることで細胞内部の張力変化を見積もることができるようになってきている。しかし、現状では一般の生体組織に電気パルスを加えても内部細胞に遺伝子を導入することは殆どできていなかった。そこで、様々な方法を試し、導入効率の改善を試みた。

B. 幼若骨組織の力学負荷下培養系の確立と最適構造の自発創生

我々がこれまで用いてきた孵化直後の鶏雛の脛骨近位端(膝関節に面する部分)の幼若骨組織の薄切片(厚さ 1mm 程度)を使用した。これまでにこの薄切片に毎分 3-4 回の繰返圧縮負荷を加えながら培養することで、石灰化が促進し、組織の硬化も進むこと、これらは細胞を死滅させた試料では起こらないことなどを明らかにしている。しかし、石灰化の進行の様子は分かっていない。そこで今度は組織を顕微鏡下で見ながら力学負荷をかける系を工夫して、力と石灰化の進行の関係を明らかにした。またこの組織の石灰化や形態変化がどのように進むか調べた。

C. 珪藻の形態形成に及ぼす力学刺激の影響の検討

先行研究において、細長い筒状の被殻を有する珪藻である *Aulacoseira* に 3 点曲げを加えつつ培養する系を確立し、新たに形成される被殻において、曲げモーメントの値と被殻の厚みが良い相関にあること、剪断力と被殻の実質部の面積が良い相関にあることなどを見出している。そこで、この結果を確かめるため、4 点曲げ装置を試作して曲げモーメントだけが負荷される状況を作り出し、この中で *Aulacoseira* を培養することを目指した。この過程で珪藻に加わる軸方向力

が重要である可能性に思い至り、その駆動力のひとつと考えられる細胞内圧の推定を行った。さらに、曲げモーメント作用下で折れずに珪藻が伸展する秘密に迫るため、珪藻被殻の形成過程を詳細に観察した

4. 研究成果

A. 組織に作用する力の分布を細胞レベルで明らかにする手法の開発

我々が開発した FRET 型張力センサ[4]の遺伝子を電気パルスで一般の血管組織に導入することを目指し、1) 小型の組織を使用する、2) 組織に引張を加えた状態で導入する、3) 超音波を負荷した状態で導入する、等の方法を試したが、遺伝子を発現する細胞は1画面あたりせいぜい数ケ、しかも組織表面に限られており、現状では組織内の応力分布を調べる方法として使えるものにはならないことが判った。また、組織をコラゲナーゼやエラスターゼに浸漬して結合を弱めた状態で導入する方法を試したが、やはり満足な導入は得られなかった。そこで発想を転換し、FRET 型張力センサの遺伝子を電気パルスで導入した培養細胞を組織内に注入し、組織と癒合させ、これをセンサとして用いる方法を試みた。具体的にはラット胸大動脈から単離した細胞などに遺伝子を導入し、この細胞をラット胸大動脈壁に刺入した針から組織内に注入した。しかし、導入確率は30%程度、導入できた細胞も数日で FRET がみられなくなるという問題があり、残念ながら成績不良であった。現在、FRET 型張力センサ遺伝子をゲノムレベルで発現する遺伝子改変マウスを作製中であり、これが完成した暁にはこの動物の組織から単離した細胞を用いることが考えられる。

B. 幼若骨組織の力学負荷下培養系の確立と最適構造の自発創生

孵化直後の鶏雛の幼若脛骨組織の薄切片を顕微鏡下で見ながら力学負荷をかける系の試作に成功し、無負荷状態の試料が体内の正常組織と同様の速度で石灰化していくことを確認した。孵化直後の鶏雛の幼若脛骨組織の薄切片を顕微鏡下で引張りながら培養したところ、引張によって石灰化が促進されること、引張に伴うひずみが小さい領域では、ひずみの大きさと石灰化速度に正の相関が見られたが、ある値を超えると両者には負の相関が見られるようになり、最も効率よく石灰化を進行させるひずみの大きさがあることが判った。また、コラーゲン線維の配向と石灰化の関係を調べた。具体的には偏光顕微鏡でコラーゲン線維の走行を調べ、断面内の石灰化の進行のパターンとの関係を調べた。その結果、コラーゲン線維の配向方向に石灰化が進行することが判明した[5]。

C. 珪藻の形態形成に及ぼす力学刺激の影響の検討

これまでに細長い筒状の被殻を有する珪藻である *Aulacoseira* に3点曲げを加えつつ培養する系を確立したので、今度は4点曲げを加えられる PDMS 基板の試作を試みた。3点曲げ装置同様にフォトリソグラフィ法で作製しようとしたが、加工を依頼していた業者の担当者の退社に伴い、3点曲げ装置同様に支点の鋭角なものの作製が困難になった。このため、ワイヤ放電加工を利用して支点の角の丸い基板を作製したが、曲げモーメントの影響は有意ではなくなってしまった。この原因の一つとして、新しい系が *Aulacoseira* の軸方向の成長を拘束して可能性が考えられた。そこで、筒状の珪藻である *Aulacoseira* の成長(軸方向への伸長)に伴う、軸方向の伸長力を計測する系を確立した。伸長力は最低でも $15 \mu\text{N}$ 程度であり、これが珪藻内部の圧力で作られているとすると、内圧は 200kPa 以上になることが判った。また、珪藻を様々な浸透圧の液中で培養した所、浸透圧が 100kPa 程度になると伸長が大きく阻害されることが判った。これらより、珪藻は浸透圧を利用して伸長している可能性が有ることが判った。また、*Aulacoseira* が軸方向に伸張するには、被殻の一部を軟化させる必要があるはずで、外力が加わった状態でなぜその柔らかくなった部分が折れないのかという疑問を解明するため、被殻の成長に伴う被殻構造の変化を蛍光顕微鏡、SEM などを用いて調べた。その結果、被殻が2層になっており、これが滑り合うことで伸びることなどが判ってきた。

<引用文献>

1. Wolff J: The Law of Bone Remodelling, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg (1986)
2. Matsumoto T, Hayashi K, Journal of Biomechanical Engineering 116-3, 278-283 (1994)
3. Yamamoto N et al, Journal of Biomechanical Engineering 115-1, 23-8 (1993)
4. Wang J et al, Journal of Biomechanical Science and Engineering 11-4, 16-00504 (2016)
5. Maeda E et al, Bone Reports 6, 120-8 (2017)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Wang Junfeng, Sugita Shukei, Michiue Tatsuo, Tsuboi Takashi, Kitaguchi Tetsuya, Matsumoto Takeo	4. 巻 33
2. 論文標題 A novel FRET analysis method for tension dynamics in a single actin stress fiber: Application to MC3T3-E1 cells during movement on a substrate	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Biorheology	6. 最初と最後の頁 21 ~ 26
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.17106/jbr.33.21	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 Maeda Eijiro, Atsumi Yoshinori, Ishiguro Mai, Nagayama Kazuaki, Matsumoto Takeo	4. 巻 96
2. 論文標題 Shape-dependent regulation of differentiation lineages of bone marrow-derived cells under cyclic stretch	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Biomechanics	6. 最初と最後の頁 109371 ~ 109371
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbiomech.2019.109371	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 松本健郎	4. 巻 272-2
2. 論文標題 細胞核への力学刺激と核内クロマチン分布	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 医学のあゆみ 『ラミノパチーとはなにか』	6. 最初と最後の頁 147-151
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 Bansod Yogesh Deepak, Matsumoto Takeo, Nagayama Kazuaki, Bursa Jiri	4. 巻 140
2. 論文標題 A Finite Element Bendo-Tensegrity Model of Eukaryotic Cell	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Biomechanical Engineering	6. 最初と最後の頁 101001 ~ 101001
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1115/1.4040246	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 該当する

1. 著者名 Maeda Eijiro, Ichikawa Katsuhisa, Murase Kohei, Nagayama Kazuaki, Matsumoto Takeo	4. 巻 78
2. 論文標題 Ex-vivo observation of calcification process in chick tibia slice: Augmented calcification along collagen fiber orientation in specimens subjected to static stretch	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Biomechanics	6. 最初と最後の頁 94 ~ 101
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbiomech.2018.07.024	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 Nagayama Kazuaki, Inoue Takuya, Hamada Yasuhiro, Sugita Shukei, Matsumoto Takeo	4. 巻 20
2. 論文標題 Direct application of mechanical stimulation to cell adhesion sites using a novel magnetic-driven micropillar substrate	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biomedical Microdevices	6. 最初と最後の頁 85
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10544-018-0328-y	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 Sugita Shukei, Mizutani Eri, Hozaki Masatoshi, Nakamura Masanori, Matsumoto Takeo	4. 巻 9
2. 論文標題 Photoelasticity-based evaluation of cellular contractile force for phenotypic discrimination of vascular smooth muscle cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 3960
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-40578-7	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 Maeda Eijiro, Kuroyanagi Kaname, Matsumoto Takeo	4. 巻 123
2. 論文標題 Microscopic characterisation of local strain field in healing tissue in the central third defect of mouse patellar tendon at early-phase of healing	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials	6. 最初と最後の頁 104702 ~ 104702
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jmbbm.2021.104702	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15件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 松本健郎
2. 発表標題 動脈壁の力学応答解明を目指したマルチスケール・バイオメカニクス
3. 学会等名 日本機械学会中四国支部・特別講演会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 茅根義明, 前田英次郎, 松本健郎
2. 発表標題 鶏雛幼若骨組織薄切片の石灰化の力学応答観察：骨の力学的適応を用いた形態形成誘導法の確立を目指して
3. 学会等名 日本機械学会2019年度年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 茅根義明, 前田英次郎, 松本健郎
2. 発表標題 培養鶏雛幼若骨組織薄切片の石灰化プロセスに及ぼすコラーゲン線維配向とひずみ分布の影響
3. 学会等名 日本機械学会第32回バイオエンジニアリング講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 細川拓都, 前田英次郎, 松本健郎
2. 発表標題 珪藻の力学負荷下の被殻形成に関する基礎的研究
3. 学会等名 日本機械学会第32回バイオエンジニアリング講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 茅根義明, 前田英次郎, 松本健郎
2. 発表標題 鶏雛幼若骨組織の石灰化に及ぼすコラーゲン線維の影響の評価: 骨の力学的適応メカニズムの解明を目指して
3. 学会等名 第29回ライフサポート学会フロンティア講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Matsumoto T, Ito M, Maeda E, Wang JF, Matsui T, Deguchi S, Sugita S
2. 発表標題 Changes in FRET ratio distribution along single isolated stress fibers expressing FRET-based actinin tension sensor during stretch
3. 学会等名 2018 Biomedical Engineering Society Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 王 軍鋒, 杉田修啓, 道上達男, 坪井貴司, 北口哲也, 松本健郎
2. 発表標題 FRETイメージングを用いたMC3T3-E1細胞内張力のダイナミクスの計測
3. 学会等名 第41回日本バイオレオロジー学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 金森宗一郎, 前田英次郎, 村瀬晃平, 松本健郎
2. 発表標題 すり鉢様形状の培養基板面上で培養された細胞が示す応答
3. 学会等名 第57回日本生体医工学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 王 軍鋒, 伊藤将大, 松井 翼, 出口真次, 前田英次郎, 松本健郎
2. 発表標題 FRET張力センサを導入した単離ストレスファイバの引張試験
3. 学会等名 日本機械学会2018年度年次大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 金森宗一郎, 前田英次郎, 村瀬晃平, 松本健郎
2. 発表標題 微細溝構造に沿った細胞の配向現象に基板面の巨視的な曲率が与える影響
3. 学会等名 日本機械学会第31回バイオエンジニアリング講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 沼野翔太, 王軍鋒, 前田英次郎, 松本健郎
2. 発表標題 生体軟組織へのFRETセンサ導入法の開発：組織内微視的ひずみ分布の計測を目指して
3. 学会等名 日本機械学会第31回バイオフロンティア講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 王軍鋒, 辻村有紀, 北口哲也, 前田英次郎, 横田秀夫, 松本健郎
2. 発表標題 RET型張力センサを発現するトランスジェニックマウスの作製と評価
3. 学会等名 日本機械学会2021年度年次大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Wang JF, Tsujimura Y, Kitaguchi T, Maeda E, Yokota H, Matsumoto T
2. 発表標題 Generation and evaluation of transgenic mice expressing tension sensor based on FRET
3. 学会等名 The 11th Asian-Pacific Conference on Biomechanics (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 道家大悟, 沼野翔太, 王軍鋒, キム・ジョンヒョン, 前田英次郎, 松本健郎
2. 発表標題 血管壁に導入したFRET型張力センサ発現平滑筋細胞の形態変化観察
3. 学会等名 日本機械学会第32回バイオフィロントニア講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石黒恵奨, キム・ジョンヒョン, 前田英次郎, 松本健郎
2. 発表標題 加工痕のない微小摺鉢面作製方法の確立とこの面上の骨芽細胞様細胞の挙動観察
3. 学会等名 日本機械学会東海支部第53回学生会卒業研究発表講演会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Jean-Louis Martiel, Gerard Finet, Gerhard Holzapfel, Matthias Stuber, Takeo Matsumoto, Roderic I. Pettigrew, Jacques Ohayon	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Academic Press	5. 総ページ数 675
3. 書名 Biomechanics of Coronary Atherosclerotic Plaque: From Model to Patient	

〔産業財産権〕

〔その他〕

名古屋大学・バイオメカニクス研究室
<http://bio.mech.nagoya-u.ac.jp/>
 バイオメカニクス研究室
<http://bio.mech.nagoya-u.ac.jp/>

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	前田 英次郎 (Maeda Eijiro) (20581614)	名古屋大学・工学研究科・准教授 (13901)	
研究分担者	村瀬 晃平 (Murase Kohei) (80298934)	名古屋大学・工学研究科・准教授 (13901)	2018年度のみ

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		
チェコ	Brno University of Technology		