

平成 27 年 5 月 31 日現在

機関番号：13903

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2010～2014

課題番号：22127008

研究課題名（和文）細胞・組織内の応力分布可視化手法の確立と形態形成原理の力学的理解

研究課題名（英文）Establishment of visualization of stress distribution in cells and tissues toward understanding of morphogenesis from biomechanical viewpoint

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） 122,900,000 円

研究成果の概要（和文）：発生過程における力学因子の影響を知るには胚内部の微視的応力分布計測法を確立する必要がある。胚を切断した際の断面の凹凸とその面の弾性率分布から断面近傍の胚内応力分布を求める方法を考案し、アフリカツメガエル胚を対象として実験系を構築した。ヤング率10Pa程度と極めて柔らかい胚をダメージ少なく切断し、その後30秒以内に断面の凹凸を計測すること、断面に散布した粒子の組織へのめり込み量から多点で弾性率分布を求めることに成功した。その結果、原腸胚期の胚内部には圧縮、胚表面には引張力が作用しており、張力は原口付近で高く、また、発生と共に変化することなどが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：In order to study the effects of mechanical force on the process of development, we need to establish a novel measurement method for stress distribution in an embryo at a micrometer scale. Such stress distribution can be estimated from topography and stiffness distribution of a cut surface of an embryo. In this study, we used *Xenopus laevis* embryo as the test model, and have succeeded in developing a method to cut very soft tissue with Young's modulus of ~10 Pa with minimal damage and to measure its surface topography within 30 s. Distribution of Young's modulus was obtained by spraying small beads on the cut surface to measure their indentation into the embryonic tissue. We have found in gastrula that the embryonic surface is in tension especially around the blastopore and embryonic core is in compression, and that the level of stresses changes during the process of development.

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 力学解析 細胞・組織 発生・形態形成 生物・生体工学

### 1. 研究開始当初の背景

力と細胞の関わりを知る上で発生段階の胚の力学挙動を探ることは極めて意義深いと言える。なぜなら、発生は一つの受精卵から成体を作り出す過程であるが、生物の複雑な構造を全て記述するには DNA に書かれた情報だけでは全く不十分であることが指摘されており、これを補うものとして、細胞同士の位置関係やその結果生じる細胞間の力学刺激などが関与していると考えられているからである。即ち、発生の時間軸に沿って、特定の位置に特定の大きさや方向を持った力学刺激が加わることで正常な発生が維持されていることは想像に難くない。しかし、原腸陥入に代表されるような発生に伴う胚内部の大きな変形がどのような力学因子により生じているのか、殆ど明らかでない。例えば Davidson ら (Development 121: 2005-18, 1995) はウニ胚の原腸陥入を生じさせる要因として提唱されている 5 つの力学因子に基づく変形をそれぞれ計算機シミュレーションし、個々の変形が生じるためには胚の内外層の力学特性がそれぞれ特定の組み合わせになる必要があることを見出しているが、陥入を誘導する力学因子の特定には至っていない。あるいは Benko ら (Ann Biomed Engng 35: 672-81, 2007) は胚内部に加わる力を実測するために胚表面を切開し、切開口の開き具合から胚に加わる張力を推測しているが、表面のみの大雑把な推定に留まっている。また、胚内部のひずみ分布を知るために、Blanchard ら (Nat Meth 6: 458-64, 2009) は胚表面の細胞境界の変形を詳細に計測、Nienhaus ら (Mech Dev 126: 942-9, 2009) は光弾性的手法を用いて組織の局所的変形を計測しているが、これらの手法で得られるのは細胞が受動的に変形したと仮定した場合のひずみ分布に過ぎず、個々の細胞が能動的に運動する胚内部の力の分布を知ることができない。即ち、胚内部の力学状態を個々の細胞レベルの分解能で計測する手段は未だ無いに等しい。

### 2. 研究の目的

我々は、血管壁内の微視的力学バランスを明らかにするため「切断法」を考案した。切断法とは、内部に残留応力が作用した物体を切断すると、切断面では、引張力が作用していた部分は陥凹、圧縮力が作用していた部分は突出することを利用したもので、物体を切断した後の断面の凹凸と断面の力学特性分布を計測し、この断面を平らに戻すために必要な力を計算することで、物体内部の断面近傍の応力分布を知る方法である。

そこで本研究では、本法を基に胚内部の力の微視的なバランスを明らかにする方法を確立し、発生に伴う胚内部の力学状態の変化を調べ、これと発生現象の関連を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

アフリカツメガエル *Xenopus Laevis* の胚を主な対象とし、5 年間に亘り、大きく分けて以下の 6 項目について検討した。

#### (1) 環境制御型 SEM 下の凍結切断法の確立

購入予定の冷却ステージ付環境制御型 SEM (湿潤試料の表面形状を低真空状態で観察可能な走査電顕) を用い凍結切断法を行う。即ち、凍結による試料内部の破壊を抑えるために、凍結保護剤を加えて凍結し、クライオトームで切断した試料を凍ったまま SEM ステージに取付け、溶解過程の断面形状変化を高解像度で調べる系を確立する。

#### (2) 形状測定レーザマイクロスコープによる新鮮未固定胚切断面の凹凸計測

(1) の代替案として、新鮮胚を切断し直後に断面の凹凸を計測する系を確立する。胚は傷を受けるとその傷を修復しようとして、能動的な変形を生じる。新鮮胚を水中で切断後、そのような変形が生じないうちに断面を素早く計測する条件・方法を探す。

#### (3) 胚断面の力学特性計測法の確立

切断した断面の力学特性を瞬時に多点で計測する方法として、胚の切断表面に粒子を散布、その粒子の沈み込み具合から表面の力学特性を計測する方法を確立する。

#### (4) レーザマイクロアブレーション法を用いた胚表面張力分布の計測

強力な紫外線レーザを胚表面に照射することで胚表面に小さな孔を空け、この孔周辺の細胞の移動から、胚内部に加わる力の方向と大きさを探る。

#### (5) 矩形孔の押込による胚表面の力学特性異方性の計測と計算機解析

胚表面に矩形孔の空いた板を押し付け、胚表面の矩形孔内への盛り上がりを実測することで胚表面の矩形孔短辺方向の弾性率を推定することができる可能性がある。この方法の実現可能性について計算機解析により確認すると共に、実際に装置を試作しデータを蓄積する。

#### (6) 胚内部 3 次元構造のイメージング

研究分担者の横田が所有する 3 次元内部構造顕微鏡で特にアクチンの 3 次元構造をイメージングする。これまでの研究から力学場の複雑さが判ってきている原口付近の 3 次元構造を集中的に調べる。

### 4. 研究成果

前項で述べた 6 項目について検討し、新たな知見を得るとともに、胚発生に対する力学的因子の影響の解明の基礎として、単離細胞の力学応答メカニズムの解明を進めた。特に

核-アクチンフィラメント-焦点接着斑系に作用する力と細胞応答の関係について調べた。また、本新学術領域の他の生物系メンバーの力学刺激負荷や力計測をサポートし、幾つかの実験を成功に導いた。

#### (1) 環境制御型 SEM 下の凍結切断法の確立

凍結胚の切断、解凍過程の ESEM 観察を行わない、凍結状態から解凍状態への連続観察には成功したものの、湿度の微妙な調整が難しく、試料表面に水の膜が張り凹凸が見えなくなる、一定状態に長期間保つことが難しく高さ計測に必要な視点の違う 2 枚の画像を同一条件で撮影することが難しいなどの問題が判明した。解凍時の湿度の保持方法や温度の上昇方法など様々な検討を進めたが、最終的に、本装置の湿度の制御系では、高さ計測に必要な 2 枚の画像を撮影する間、断面を一定に保つような微妙な湿度制御が困難であり、ESEM を用いた断面解凍過程の観察は難しいとの結論に至った。

そこで、通常の高真空 SEM 観察を行うこととし、グルタルアルデヒド固定した組織をオスミウム固定、タンニン酸固定し、その後、t ブタノールで凍結乾燥し、表面にオスミウムコートして観察する方法を試みた。この方法では明瞭な断面像が得られるものの、試料作製過程、特に凍結乾燥の際に試料表面の凹凸が大きく変化することが判明し、この点が問題となり、高真空中の観察も断念した。

#### (2) 形状測定レーザマイクロスコープによる新鮮未固定胚切断面の凹凸計測

(1)の結果を承け、形状測定レーザマイクロスコープを導入し、これに水浸レンズを取り付けることで、水中での新たな観察系を構築した。これにより、ホルマリン固定胚について細胞ひとつレベルの凹凸まで明瞭に観察できるようになり、何れのステージでも胚の表面が引張、内部が圧縮状態に有ることを示す結果が得られた。

また、平行して新鮮胚の切断直後の断面の凹凸計測を目指し、断面凹凸の計測時間の短縮ならびに断面切断法の改良を進めた。寒天に包埋した胚を電動ステージ上で移動させ、空間に固定した極細白金線（高周波電流通電）で切断し、直後に断面が顕微鏡視野中心に来るようにして新鮮胚切断面の凹凸の計測を 40 秒以内に測定することが可能となった。しかし、切断速度が 10 mm/s 程度と遅く、切断した胚同士が再癒着する可能性が考えられたため、電磁石とリニアガイドを用いた機構を作製し、切断速度を 200 mm/s 程度まで上昇させた。しかし、速度が速すぎ、切断中に寒天が剪断変形するなどして良好な断面は得られなかった。そこで、対象を原腸胚ではなく、より発生が進み内容物が硬化した尾芽胚とし、切断した。その結果、かなり再現性のある断面の凹凸を得ることができ、脊索部分が突出していることが明らかとなった。

#### (3) 胚断面の力学特性計測法の確立

当初、胚断面の押込試験により、断面の力学特性を計測する系を確立することを目指したが、胚断面形状が時々刻々変化するため、一度に 1 点の計測しか行えない押込試験法は不十分であることが判明した。そこで、胚断面に散布した粒子の断面へのめり込み量からヤング率を求める方法を考案した。直径 200  $\mu\text{m}$  のガラスビーズを用いて計測を行った結果、既報と同程度 20Pa 程度のヤング率が得られた。しかし、粒子が大きく、また互にくっつく場合の多いことが問題であった。そこで、粒子を直径 100  $\mu\text{m}$  の金粒子に変更することで、計測範囲を小さくすることができた。また、粒子を均等に散布できるように、厚さ 100  $\mu\text{m}$  の板に直径 150  $\mu\text{m}$  の穴が等間隔で空いたものを作製した。この穴に粒子を詰め、胚の上で散布することを試みた。その結果、粒子が固まって落ちることは抑制できたが、均等間隔に落とすことは困難であった。

#### (4) レーザマイクロアブレーション法を用いた胚表面張力分布の計測

胚表面に紫外線レーザビームを当てることで熱変性を起こさずに胚に孔を開け、その際の周辺組織の変形から胚表面の張力分布を推定する系を確立した。そしてステージ 10 の胚の表面を集中的に観察したところ、原口部分の開きが特に大きいことが判った。ところで、原口付近の細胞の位相速度を解析したところ、細胞は原口に近づくと共に速度を増すことが判明した。これらの結果に細胞粘弾性モデルを組合わせて考えると、細胞ひとつひとつが力を出していると言うよりも、原口部分で内部に引張っていると考えると説明できる変形であることが判った。

#### (5) 矩形孔の押込による胚表面の力学特性異方性の計測と計算機解析

胚表面に矩形孔を押し付けた際の矩形孔内への胚の盛り上がり量の方向差から異方性を見積もる方法を考え、有限要素解析から実際に胚表面の異方性が計測できることを確認し、弾性率の異方性の程度と矩形孔への組織の盛り上がりの異方性の程度の関係性を調べた。また、実際に押込試験をする実験系を確立、データを蓄積した。その結果、レーザアブレーションにより示される異方性と力学特性の異方性は対応しておらず、応力とひずみの異方性は必ずしも一致しないことが明らかとなった。

#### (6) 胚内部 3 次元構造のイメージング

アクチンを 488 ファロイジン、細胞核を SYTO82 で染色したステージ 10~11 のホルマリン固定胚について、3 次元内部構造顕微鏡を用いて、スライス厚 4  $\mu\text{m}$  で連続切断しつつ各断面の蛍光像を撮影した。その結果、原口部分にアクチンの強い集中が見られると

いう従来の観察結果が確認されたほか、アクチンはアニマルキャップには殆ど見られず主に胚の植物極側半分内部まで均質に存在していること、表面のアニマルキャップ以外の部分にも集中が見られる場合があることなどが明らかとなった。

## 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)

Miyasaka KY, Kida YS, Banjo T, Ueki Y, Nagayama K, Matsumoto T, Sato M, Ogura T: Heartbeat regulates cardiogenesis by suppressing retinoic acid signaling via expression of miR-143, *Mech Dev* 128-1-2, 18-28 (2011) DOI: 10.1016/j.mod.2010.09.002

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

Nagayama K, Adachi A, Matsumoto T: Dynamic Changes of Traction Force at

Focal Adhesions during Macroscopic Cell Stretching Using an Elastic Micropillar Substrate: Tensional homeostasis of aortic smooth muscle cells, *Journal of Biomechanical Science and Engineering* 7-2, 130-140 (2012) DOI: 10.1299/jbse.7.130

Banjo T, Grajcarek J, Yoshino D, Osada H, Miyasaka KY, Kida YS, Ueki Y, Nagayama K, Kawakami K, Matsumoto T, Sato M, Ogura T: Haemodynamically dependent valvulogenesis of zebrafish heart is mediated by flow-dependent expression of miR-21, *Nature Commun* 4, 1978 (2013) DOI: 10.1038/ncomms2978

Hara Y, Nagayama K, Yamamoto TS, Matsumoto T, Suzuki M, Ueno N: Directional migration of leading-edge mesoderm generates physical forces: Implication in *Xenopus* notochord formation during gastrulation, *Dev Biol* 382-2, 482-495 (2013) DOI: 10.1016/j.ydbio.2013.07.023

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)

北村啓樹, 伊藤健太郎, 原祐介, 長山和亮, 上野直人, 松本健郎: 多断面計測によるアフリカツメガエル胚内ひずみ分布の推定, 日本機械学会東海学生会第42回学生員卒業研究発表講演会 (2011/3/13, 豊橋)

Yusuke Hara, Kazuaki Nagayama, Takeo Matsumoto, Makoto Suzuki, Naoto Ueno: Analysis of mechanical force generated by leading edge mesoderm in *Xenopus* gastrulation, Joint Meeting of the German and Japanese Societies of Developmental Biologists (2011/3/23-6, Dresden, Germany)

原 祐介, 長山和亮, 松本健郎, 鈴木誠, 上野直人: 先行中胚葉の生み出す伸展刺激の脊索形成における役割, 第44回日本

発生生物学会 (2011/5/18-21, 沖縄)  
北村啓樹, 伊藤健太郎, 原佑介, 長山和亮, 上野直人, 松本健郎: 多方向断面計測によるアフリカツメガエル胚内応力分布の推定, 日本機械学会2011年度年次大会(2011/9/12-15, 東工大)  
北村啓樹, 小平亜侑, 原佑介, 長山和亮, 上野直人, 松本健郎: 環境制御走査型顕微鏡を用いたアフリカツメガエル胚内応力分布の推定, 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)  
内藤大地, 杉田修啓, 原佑介, 上野直人, 松本健郎, 長山和亮: レーザ切断によるアフリカツメガエル原腸胚表面の応力分布の推定に関する基礎研究, 日本機械学会東海支部第43回学生員卒業研究発表講演会 (2012/3/14, 名古屋)  
松本健郎: 生体組織内の応力分布の推定-血管壁・Xenopus 胚を例に-, 『多細胞動態研究のためのブレインストーミング・ワークショップ』多細胞動態の力学的制御とそのモデル化〜生化学場との総合的理解を目指して〜』(2012/6/26-7, 神戸)【招待講演】  
Asuka Miyagi, Kazuaki Nagayama, Takeo Matsumoto and Naoto Ueno: Functional analysis of G protein-coupled receptor 4 (GPR4)-related genes during early development in Xenopus laevis, The 14th International Xenopus Conference (2012/9/9-13, Giens Peninsula, France)  
内藤大地, 杉田修啓, 原佑介, 長山和亮, 上野直人, 松本健郎: レーザ切断法を用いたアフリカツメガエル原腸胚表面の応力分布の推定, 日本機械学会2012年度年次大会(2012/9/10-12, 金沢)  
北村啓樹, 小平亜侑, 原佑介, 長山和亮, 上野直人, 松本健郎: 切断面の高さや硬さの分布に基づくアフリカツメガエル胚内応力分布の推定, 日本機械学会第25回バイオエンジニアリング講演会(2013/1/9-11, 筑波)  
Takeo Matsumoto, Hiroki Kitamura, Kentaro Ito, Daichi Naito, Shukei Sugita, Yusuke Hara, Kazuaki Nagayama, Naoto Ueno: Engineering Approach for the Analysis of Stress and Strain in Xenopus Laevis Embryo, The 23rd CDB Meeting: Building multicellular systems from Cellular Cross-Talk (2013/1/22-23, Kobe, Japan)  
内藤大地, 田村篤敬, 原佑介, 長山和亮, 上野直人, 松本健郎: 矩形孔の押込による軟組織弾性率異方性計測法の確立とアフリカツメガエル原腸胚への応用, 日本機械学会第26回バイオエンジ

アリング講演会 (2014/1/11-12, 仙台)  
内藤大地, 杉田修啓, 田村篤敬, 原佑介, 長山和亮, 上野直人, 松本健郎: アフリカツメガエルXenopus laevis原腸胚表面の張力分布の推定(レーザアブレーションと矩形孔押込による異方性計測), 第23回ライフサポート学会フロンティア講演会 (2014/2/28, 東京)  
村上史哲, 小平亜侑, 原佑介, 上野直人, 松本健郎, 長山和亮, 杉田修啓: 内部応力分布推定のためのアフリカツメガエル新鮮胚の瞬時切断・高さ計測法の開発, 日本機械学会東海支部第45回学生員卒業研究発表講演会 (2014/3/17, 名古屋)  
村上史哲, 黒川翔太郎, 小平亜侑, 宮城明日香, 杉田修啓, 長山和亮, 上野直人, 松本健郎: アフリカツメガエル新鮮胚の断面高さ・かたさ分布の瞬時計測法の開発, 日本機械学会第25回バイオフロンティア講演会 (2014/10/3-4, 鳥取)  
Matsumoto T: Biomechanical analyses of Xenopus laevis embryo: Toward estimation of stress and strain distributions during morphogenesis, Morphologic International Symposium (the 62nd NIBB Conference "Force in Development") Morphologic & NIBB Symposium (2014/11/16-19, Okazaki, Japan) 【Invited speaker】  
Matsumoto T: Biomechanical analysis of Xenopus laevis embryo during gastrulation, International Scientific Meeting on Biomechanics (ISMB) 2014 (2014/11/21-23, Taipei, Taiwan) 【Invited lecture】  
Matsumoto T, Naito D, Sugita S, Tamura A, Hara Y, Nagayama K, Ueno N: Engineering Approaches toward Estimation of Stress and Strain Distributions in Xenopus Laevis Embryos, Morphologic & MBI@NUS symposium (2014/12/1-4, Singapore) 【Invited symposiast】  
山口 和宏, 小平亜侑, 杉田修啓, 田村篤敬, 松本健郎: 押込試験によるアフリカツメガエル胚力学特性計測を目指した有限要素解析, 日本機械学会東海支部第46回学生員卒業研究発表講演会 (2015/3/12, 春日井)  
村上史哲, 黒川翔太郎, 位田裕志, 小平亜侑, 杉田修啓, 宮城明日香, 上野直人, 松本健郎: 新鮮アフリカツメガエル胚断面の凹凸およびかたさ分布の瞬時計測法の開発, 第54回日本生体医工学会大会 (2015/5/7-9, 名古屋)

〔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://biomech.web.nitech.ac.jp/>

## 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

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

長山 和亮 (NAGAYAMA, Kazuaki)

茨城大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：10359763

（平成26年度）

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

（平成26年度）

横田 秀夫 (YOKOTA, Hideo)

理化学研究所・チームリーダー

研究者番号：00261206

（平成26年度）

### (3) 連携研究者

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

（平成25年度まで）