

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：17102  
研究種目：基盤研究(B)（一般）  
研究期間：2019～2022  
課題番号：19H04444  
研究課題名（和文）肺リモデリングメカニズムの解明に向けた気道末梢部位の力学環境と細胞力学応答解析  
  
研究課題名（英文）Evaluation of mechanical environment and cell response at alveolar region for lung remodeling  
  
研究代表者  
世良 俊博（SERA, Toshihiro）  
  
九州大学・工学研究院・准教授  
  
研究者番号：40373526  
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、（1）肺実質のin situ微細構造計測、（2）肺胞上皮細胞機能評価の検討、（3）肺胞スケールの流体解析、（4）肺胞スケールの構造解析を実施することにより、肺リモデリング時の微視的スケールにおける力学環境と肺胞上皮細胞の力学応答メカニズムを検討した。特に、（2）においては肺サーファクタント分泌に対する力学刺激の影響とin vitro肺胞デバイスの開発を行った。また、（3）では流体実験だけでなく微細構造計測で得られた動態解析を再現することを試み、（4）では微細構造計測で得られた実形状だけでなく数理モデルを用いることにより肺細葉の力学場を明らかにした。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

従来肺サーファクタント分泌と力学刺激との関係が示唆されていたが、本研究により力学刺激による細胞骨格のリモデリングに伴う細胞質流動性の変化が影響していることが示唆された。また、本研究で開発した血管内皮細胞と肺胞上皮細胞の共培養デバイスは力学刺激負荷も可能であり、in vitro肺胞モデルとして社会的意義が高い。また、高分解能CT画像を用いた流体解析は、肺細葉の動態解析を再現することにより粒子輸送の高精度予測などに貢献できる。一方で、実形状モデルだけでなく数理モデルを用いた構造解析の研究により、実際の力学場だけでなく肺細葉の発生・構造メカニズムを理解することもでき学術的意義は高い。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated the mechanical environment and cell response at alveolar region for lung remodeling. To achieve this objective, we conducted (1) In situ microscopic structure measurement, (2) Evaluation of the lung epithelial cells functions, (3) Analysis of fluid structure in acinar region, and (4) Numerical analysis of alveolar wall strain. Specially, we examined the effect of mechanical stress on lung surfactant secretion and developed in vitro alveolar device in (2). Additionally, we tried the experimental fluid analysis and the numerical simulation based on acinar kinematics using high-resolution images in (3), and clarified the mechanical environment of pulmonary acinus using real model based on high-resolution images and mathematical model.

研究分野：生体医工学

キーワード：肺胞 リモデリング 力学環境 細胞応答 流体解析

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

肺の大部分は厚さ  $10\ \mu\text{m}$  程度の薄い隔壁で区切られた直径約  $300\ \mu\text{m}$  の肺胞で埋められている。肺は呼吸運動により膨張収縮を繰り返し、これに伴い肺胞内に流れが発生し、肺胞壁には常に周期的な伸展負荷が作用している。肺胞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、肺組織の弾性機能の役割を担うとともに、肺胞上皮細胞から分泌される肺サーファクタントは肺胞や末梢気道の気液界面の表面張力を低下させ、多孔質構造の肺の力学的安定性を維持している。そのため、呼吸に伴う肺胞の変形は、周りの構造や表面張力に大きく影響され、単純な相似変形でないことが予想される。実際、研究代表者は SPring8 放射光 CT を用いて気道末梢部位の動態解析に成功し、その不均一変形を報告している。一方、一般に細胞は力学負荷に応答して、自身の機能や構造を変化させリモデリングを引き起こすことが知られており、肺胞上皮細胞も例外でない。

つまり、肺リモデリング時では微細構造自体が変化するだけでなく肺サーファクタント量や肺胞壁の力学特性の変化により、呼吸に伴う気道末梢部位の動態は健常肺と大きく異なることが考えられる。さらに、動態変化は肺胞内の流れ場や肺胞壁の力学状態の変化だけでなく肺上皮細胞の機能変化も引き起こすことが予測されるが十分に把握されていない。

### 2. 研究の目的

高輝度放射光 CT を用いて肺リモデリング時の気道末梢気道系の微細構造および動態解析を行い、その結果に基づいた肺胞内の流れ場および肺胞壁の力学状態を把握する。さらに細胞培養実験により肺胞上皮細胞機能に関するシグナル伝達を調べることで、肺リモデリング時の微視的スケールにおける力学環境と肺胞上皮細胞の力学応答メカニズムを明らかにする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 肺実質の in situ 微細構造計測 (世良・国際共同研究)

肺疾患モデルとして急性呼吸不全 (Acute Respiratory Distress Syndrome, ARDS) を想定し、健常マウスと肺洗浄マウスに対して大型放射光施設 SPring8 にて動態イメージングを行った。胸部から摘出すると大気圧によって肺胞はつぶれてしまうので、in situ の状態で実験した。具体的には、ステップ的に肺圧力を調整し、高速胸部 CT 撮影を行った (図 1、2)。

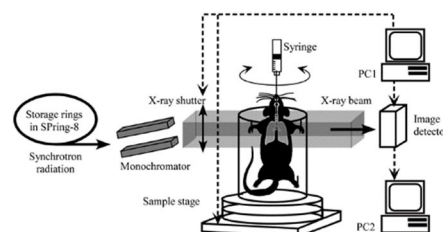


図1 SPring8 の in situ CT イメージング装置の概略図

#### (2) 肺胞上皮細胞機能評価の検討 (工藤・世良)

伸展負荷に対するサーファクタント輸送の変化  
本実験では、PDMS 製のチャンバーにヒト肺胞基底上皮腺癌細胞 (A549) を培養し、F-アクチンを SiR-Actin、小胞をキナクリン二塩酸二水和物により同時染色を行った。染色した細胞に対して、 $0.25\text{Hz}$ 、ひずみ  $0\sim 20\%$  ( $0\sim 2$  時間) の 1 軸力学刺激を負荷し、F-アクチンと小胞分布を共焦点顕微鏡により観察した。

#### 伸展負荷に対する細胞質流動性の変化

本実験でも 同様に PDMS 製のチャンバーにヒト肺胞基底上皮腺癌細胞 (A549) を培養し、1 軸力学刺激負荷後の細胞流動性を評価した。細胞流動性の評価のために、細胞内に粒径  $100\text{nm}$  のカルボキシル基修飾蛍光ポリスチレン粒子を導入し、粒子をトラッキングして平均二乗変位を求めた。

#### in vitro 肺胞モデルの構築と物質透過計測

本実験では、伸展負荷に対する肺胞上皮細胞 - 血管内皮細胞間の粒子透過性の変化を計測するために、in vitro 肺胞モデルを構築した。基底膜として多孔質 PDMS 膜もしくはコラーゲンビトリゲル膜を用い、両面に肺胞上皮細胞としてヒト肺胞上皮腺癌細胞 (A549) を用い、血管内皮細胞としてウシ大動脈由来内皮細胞 (BAEC) を共培養した。さらにチャンバー内の圧力をコントロールすることにより基底膜に伸展し、細胞に力学刺激を負荷した。

#### (3) 肺胞スケールの流体解析 (田中・世良)

##### 数値解析

従来の数値計算による肺胞内の流体解析は肺胞が相似変形することが前提であった。それに対し、本研究では大型放射光施設 SPring-8 で撮影した呼吸周期中 6 時点 (図 2、A-F) でのマウスの胸部 CT 画像を使用し、実際の変形を再現し流体解析を試みた。そのために、6 点以外の形状データは前後の形状からモーフィングによって 3 次元形状補間を行うことにより作成した。そ

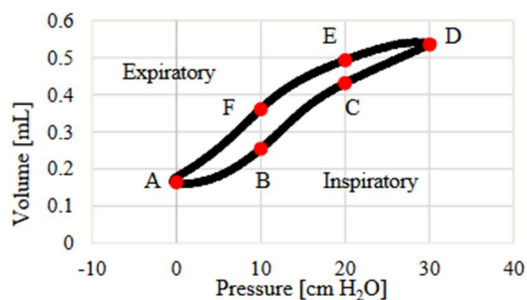


図2 マウス肺の P-V 曲線 (A-F 時に CT 撮影を実施)

これから壁面移動速度を求め、移動境界問題として流体解析を行った。

#### 実験的解析

大型放射光施設 SPring-8 で撮影したマウス肺胞画像をもとに実形状肺胞管モデルを用いて、拡張収縮変形を伴う肺胞管内流れを可視化した。モデル作成には、まず CT 画像から肺細葉部分のみを抽出し、輪郭を積層することで肺細葉の STL モデルを作製した。その後、分岐が無く気道壁が肺胞に覆われた部分を抽出し、流入出部を延長させ、肺胞管の STL モデルを作製した。肺胞管モデルは 100 倍にスケールアップした肺胞管モデルを水溶性の石膏で 3 次元造形し、透明なシリコンを塗布・硬化後に石膏部を水で洗い流すことで、拡張収縮変形が可能な透明シリコン製の実形状肺胞管モデルを作製した。実験装置概略図を図 3 に示す。作動流体にはシリコン製肺胞管モデルと屈折率の等しいグリセリン水溶液を使用し、2 つのシリンジを制御することによりモデルの変形と流量を調整した。連続光 YAG レーザーとハイスピードカメラを用いてトレーサ粒子を撮影し PIV 計測を行った。流量条件は、周波数パラメータを 0.035、レイノルズ数は 0.03 と 0.2 とした。またモデルの変形は体積変化率として 0-80% に調節した。

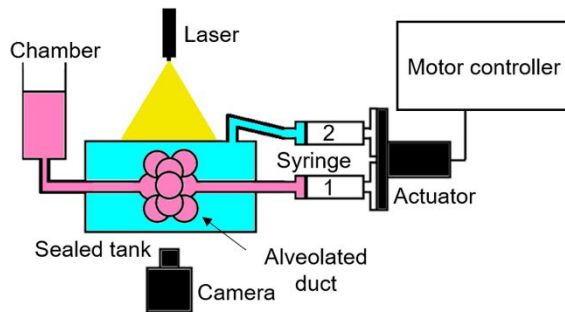


図 3 実験装置概略図

#### (4) 肺胞スケールの構造解析 (越山)

##### 実形状モデルを用いた構造解析

本実験では、大型放射光施設 SPring-8 で撮影したマウス肺胞画像をもとに肺細葉実形状モデルを作成した。肺組織部を超弾性体とみなし、有限要素法を用いて肺細葉の変形シミュレーションを行った。特に肺細葉の内側表面積の大きさに応じた表面張力を考慮することにより、表面張力が変形や力学場に与える影響を調査した。

##### 数値モデルを用いた構造解析

実際の肺細葉は肺細葉同士が空間を充填しあっており多様な形状や内部構造を持つことが分かっている。しかし、この形状不均一性が肺細葉の力学場に与える影響は報告されていない。そこで、本研究では、様々な外形状をパラメトリックに表現することができる肺細葉構造モデルを開発し、その外形状の違いによる肺細葉内部の力学場の違いを調査した。外形状として、立方体形状・円錐形状・逆円錐形状の 3 つを準備し、全空域体積と平均肺胞体積が同じになるように肺細葉数値モデルを生成し、変形シミュレーションを行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) 肺実質の in situ 微細構造計測

図 4 に得られた代表的な動態イメージング画像を示す。撮影時は気道圧力を一定に保っているが、重力や肺サーファクタントの分布変化の影響によりモーションアーチファクトが発生する可能性がある。本研究では撮影時間を 30 秒に短縮することに成功し、その結果モーションアーチファクトを最小限にすることに成功した。このような連続データを用いて画像相関法による肺実質組織のひずみを求めることを試みているが、図 2 のようなステップ的な気道圧制御では肺実質組織の変形量が大きく局所のひずみを求めるのが困難であった。本撮影手法のような気道圧力を一定中にサンプルを回転させ投影像を撮影する Perspective 法はモーションアーチファクトの低減は容易であるが、ひずみ場の計算に必要な連続的に肺組織が変形するデータの取得が難しい。今後は、スキャン中も人工呼吸により呼吸を繰り返し、高速度カメラで投影像の連続撮影を行い、撮影後に気道圧と流量をもとに連続投影画像を呼吸位相に離散化して CT 再構成する Retrospective 法による撮影を検討する必要がある。

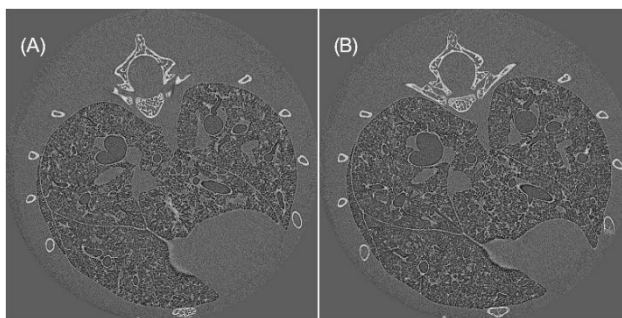


図 4 動態イメージング画像例  
(A: 0 cmH<sub>2</sub>O, B: 10 cmH<sub>2</sub>O)

##### (2) 肺胞上皮細胞機能評価の検討

###### 伸展負荷に対するサーファクタント輸送の変化

本手法に同一細胞のアクチンと小胞の動態観察に成功し、1 時間後から細胞底部の細胞骨格繊維の構造が変化しており、伸展方向に垂直な方向に再配向されていることが確認された。細胞内のアクチンと小胞量を調べると、細胞に刺激を荷せず静置している場合は、時間経過とともにアクチンが全体的に減少し小胞も徐々に減少したが、20%周期伸展刺激を荷すると、時間経過とともにアクチンが全体的に増え、また小胞の減少が少なく、細胞外への輸送が抑制されているこ

とが分かった(図5)。また10%周期伸展の場合は、静置状態に比べて細胞内の小胞が減少していた。これらの結果から10%伸展刺激のような通常の周期伸展では、小胞輸送が促進され肺サーファクタントの分泌を促進しているが、20%伸展刺激のような細胞に過剰な周期伸展を負荷すると細胞骨格が増加し小胞輸送による排出が減少することが分かった。

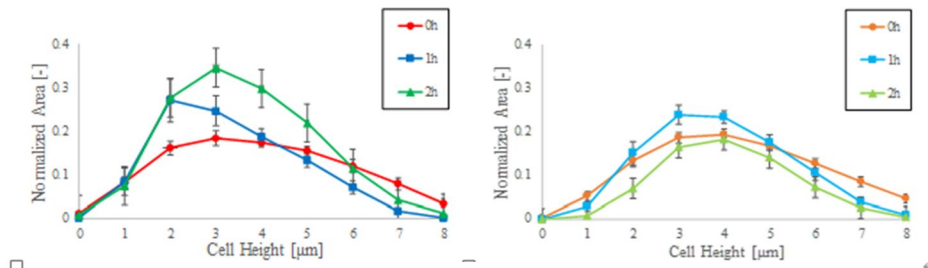


図5 20%周期伸展によるアクチンと小胞の変化  
(左:アクチン、右:小胞)

#### 伸展負荷に対する細胞質流動性の変化

の結果より伸展負荷の大きさが小胞輸送に影響を与えることが分かった。そこで、本実験では伸展負荷に対する細胞質流動性の変化を調査した。細胞質に導入した蛍光ビーズの平均二乗変位を求め、平均二乗変位と時間間隔の関係をべき乗モデルへ変換した。そのときの対数勾配は細胞質の流動特性を表すことが知られており、0.1以下が静止状態、0.1-0.9がSub diffusion、0.9-1.1がブラウン運動、1.1以上が能動運動を表すSuper diffusionである。10%伸展負荷の場合は、Controlと比較して、1時間では有意差が見られなかったが2時間では有意差に上昇した。粒子の運動状態に注目すると、Controlと1時間伸展に対して、2時間伸展では45%以上の粒子がSuper diffusionの拡散運動をしていた(図6左)。このことから10%伸展すると粒子の流動性が向上することが分かった。一方で、20%伸展負荷の場合は、Controlと比較して、1時間でも有意差が見られなかったが、2時間では有意差に減少していた。特に、Controlと1時間伸展に対して、2時間伸展では全体の20%の粒子が静止状態だった(図6右)。このことから20%伸展すると粒子の流動性が減少することが分かった。

人工呼吸の連続的高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(人工呼吸器誘発肺傷害)が知られていたが、とに結果から過剰な伸展刺激が負荷されると細胞骨格のリモデリングにより細胞質の流動性が低下することによりサーファクタントの分泌が抑制されることが示唆された。

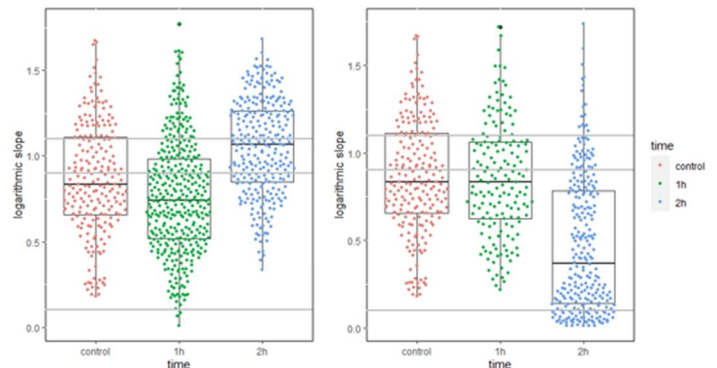


図6 伸展負荷による細胞質流動性の変化  
(左:10%伸展、右:20%伸展)

#### in vitro 肺胞モデルの構築と物質透過計測

課題遂行当初は基底膜としてPDMS膜に10ミクロン程度の穴を無数に開けた多孔質膜を考えていたが加工が困難であったため、コラーゲンビトリゲル膜を基底膜と採用した。コラーゲンビトリゲル膜は元々コラーゲン繊維からできた多孔質膜であり、本実験では肺上皮細胞と血管内皮細胞を両面に共培養することに成功した。さらに、チャンバー内の圧力を制御することにより基底膜に約7%のひずみを負荷できるデバイスを作成した。本デバイスを用いてデキストランの透過測定を行ったところ、共培養による透過率は膜のみや共培養ではない状態に比べて減少した。この結果は共培養によるバリア機能の上昇を示している。また、2時間伸展することにより透過率が減少しバリア機能が上昇していることが分かった。一方で、コラーゲンビトリゲル膜の厚さのばらつきが大きく、また伸展負荷による細胞接着の変化が評価できおらず、今後の課題である。

#### (3) 肺胞スケールの流体解析

##### 数値解析

数値計算で用いた形状を図7に示す。これからの形状からモーフィングによって壁面変形速度を求めたところ、吸気開始時では入口からの距離に比例して大きかったが、それ以外では不均一であったことから、非線形・非等方的な変形であった。従来の肺胞内の流れに関する数値

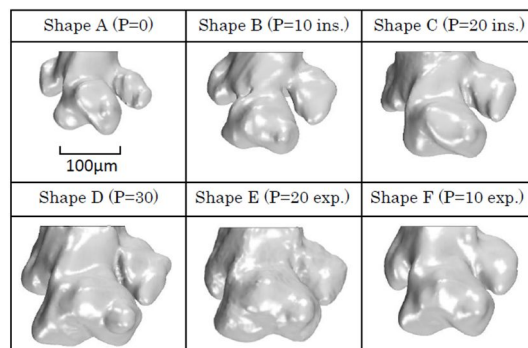


図7 肺胞の変形  
(A-Fは図2に対応)

シミュレーションは単純な相似変形による膨張収縮をとして壁面に数式で与えていた。それに対し、本研究ではモーフィングを流体解析に適用することにより、実際の変形を再現した流体解析手法を構築した(図8)。

#### 実験的解析

図9に流体実験で得られた代表的な肺胞の変形を示す。肺胞壁の変形方向や変化率は肺胞により異なっていた。また、流れ場はレイノルズ数が $10^{-2}$ オーダーの領域では、体積変化率の増加に伴う流れパターンの変化が観察され、流吸気位相においては再循環流から放射状流れへ変化し、呼気位相においては放射状流れから再循環流へ変化する傾向を示した。特に、吸気・呼気位相における流れパターンの差異には、肺胞管と肺胞入口がなす角度が影響を与えていた。一方で、レイノルズ数が $10^{-1}$ オーダーの領域では、体積変化率にかかわらず、吸気・呼気いずれの位相においても再循環流が形成される傾向を示した。

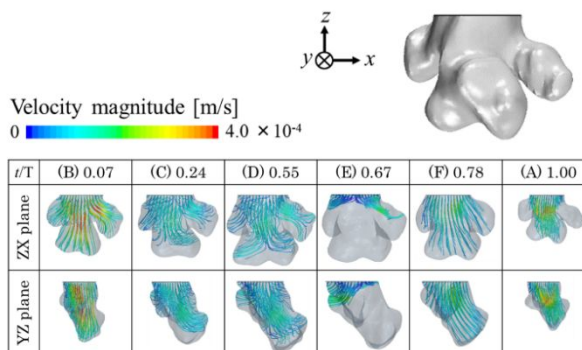


図8 モーフィングによる流体解析  
(A-Fは図2に対応)

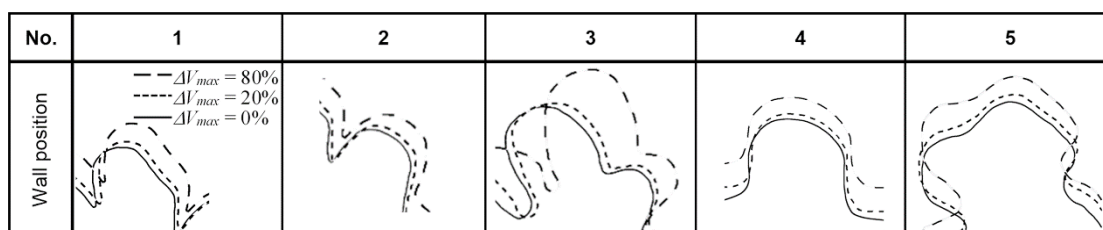


図9 実験で得られた代表的な肺胞の変形

従来肺胞内の流体解析は数値シミュレーションが多く、その多くが肺胞は相似変形すると仮定している。また、実験的解析は微細加工による実スケールや本課題で実施したようなスケールアップしたモデルを用いているが、数少ない。実際の肺胞は単純な相似変形でなく、我々のグループでは実際の変形を考慮した数値流体シミュレーションに取り組んでおり、本課題ではさらに吸気・呼気中の非線形・非等方的な変形も再現した流体解析に取り組んだ。

#### (4) 肺胞スケールの構造解析

##### 実形状モデルを用いた構造解析

肺細葉の内外圧差を与えて変形シミュレーションを行ったところ、表面張力を考慮することにより肺細葉表面積が減少しており、膨張を抑制する表面張力の作用を確認できた。また、最大主ひずみは肺胞開口部で大きくなる傾向があり、表面張力を考慮するすると最大主ひずみの分布幅が広がり肺細葉全体で不均一な力が作用していることが分かった。

##### 数理モデルを用いた構造解析

立方体形状・円錐形状・逆円錐形状の外形状に対して肺細葉数理モデルを生成し変形シミュレーションを行ったところ、外形状によって力学部が異なることが分かった。具体的には、立方体形状で大きいひずみが多く、また円錐形状同士の比較では円錐の底面や頂点でひずみ分布が異なることが分かった。外形状によって内部形状が異なることが原因であるが、特に円錐形状では肺胞が多いのに対し、逆円錐形状では肺胞管が多かった。本数理モデルは、ガス輸送効率だけを最適にするように肺細葉をモデル化しているが、実際の肺細葉はガス輸送に加えて力学場も最適化されているのかもしれない。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sera Toshihiro, Kamiya Naoki, Fukushima Taichi, Tanaka Gaku	4. 巻 143
2. 論文標題 Visualizing the Flow Patterns in an Expanding and Contracting Pulmonary Alveolated Duct Based on Microcomputed Tomography Images	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Biomechanical Engineering	6. 最初と最後の頁 074501-1-8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1115/1.4050285	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11件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 井上滋智、佐々木沙織、世良俊博、工藤奨
2. 発表標題 伸展負荷による 型肺胞上皮細胞内のアクチン骨格と細胞質流動性の変化
3. 学会等名 第30回バイオフィジオロジー研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 高谷 遼太 福島 大智 田中 学 世良 俊博
2. 発表標題 肺胞の動態解析に基づく変形と流れのシミュレーション
3. 学会等名 第33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 越山 顕一朗
2. 発表標題 小児肺細葉メカニクス構築に向けた不均質肺微小構造数理モデリング
3. 学会等名 日本機械学会第33回バイオエンジニアリング講演会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 長尾淳平
2. 発表標題 伸展負荷時におけるII型肺胞細胞内の細胞骨格と細胞質
3. 学会等名 日本機械学会第32回バイオフィロンティア講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 草野真
2. 発表標題 肺胞隔壁の発達に伴う肺胞内力学場変化の理解に向けた有限要素解析
3. 学会等名 日本機械学会第32回バイオフィロンティア講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉岡慧一郎
2. 発表標題 閉塞性睡眠時無呼吸症候群の上気道におけるCFDシミュレーション
3. 学会等名 日本機械学会第32回バイオフィロンティア講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤田芳孝, 佐々木沙織, 世良俊博, 工藤奨
2. 発表標題 コラーゲン薄膜を用いた共培養システムの検討
3. 学会等名 日本機械学会九州支部第52回学生員卒業研究発表講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 福島大智, 神谷直樹, 田中学, 世良俊博
2. 発表標題 肺胞の動態解析に基づく変形と流れのモデリング
3. 学会等名 日本機械学会 第31回バイオフィロントニア講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 川本紘平、yunus La Ode Ichlas Syahrullah、井上祐輔、佐々木沙織、世良俊博、工藤奨
2. 発表標題 伸展負荷時の肺胞II型細胞内細胞骨格と小胞の動態観察
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 越山顕一朗、和田成生、伊井仁志、世良俊博
2. 発表標題 肺細葉数理モデルを用いた吸気時の力学解析：小児肺細葉メカニクス理解に向けて
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 神谷直樹、福島大智、田中学、世良俊博
2. 発表標題 拡張収縮変形を伴う実形状肺胞管内流れの可視化
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



〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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	田中 学 (Tanaka Gaku)  (20292667)	千葉大学・大学院工学研究院・教授  (12501)	
研究分担者	工藤 奨 (Kudo Susumu)  (70306926)	九州大学・工学研究院・教授  (17102)	
研究分担者	越山 顕一郎 (Koshiyama Kenichiro)  (80467513)	徳島大学・大学院社会産業理工学研究部(理工学域)・准教授  (16101)	

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		
英国	Swansea University	Imperial College London	