

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23700535

研究課題名(和文)細胞力学場の定量化と3次元組織構築への応用

研究課題名(英文)Quantitative analysis of mechanical environment around cells and application for three-dimensional tissue construction

研究代表者

福島 修一郎 (FUKUSHIMA, Shuichiro)

大阪大学・基礎工学研究科・助教

研究者番号：40362644

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：生体の組織再構築において重要な役割を果たしている力学環境を組織および細胞スケールで定量化するための計測手法を開発し、血管新生過程の基質再構築を明らかにした。細胞スケールでは第2高調波発生顕微鏡で可視化したコラーゲン基質画像を基にした変形解析を行った、組織スケールではX線CT画像を基にした計算モデルを構築して、血管壁の変形を数値解析した。解析結果は組織・細胞スケールで不均一な分布を示しており、階層ごとに適したモデル構築の必要性を確認できた。また、本研究で開発した手法が階層を超えたマルチスケール解析の基礎技術としての有効性が示せた。

研究成果の概要(英文)：The measurement technique for quantifying mechanical environment, which fulfills the important role in biological tissue reconstruction, in tissue and cell scale was developed, and substrate reconstruction of the angiogenesis process was clarified. In the cell scale, the deformation analysis based on collagen substrate images, which was visualized by the second harmonic generation microscopy, was carried out. In the tissue scale, the deformation of the vessel wall was analyzed numerically by using computational models based on X-ray CT images. The analytical result showed the heterogeneous distribution both in tissue and cell scale, confirmed the necessity of the model construction suitable for the every hierarchy scale. Moreover, the effectiveness of the developed technique as a basic technology of multi-scale analysis was demonstrated.

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：生物・生体工学 計測工学 移植・再生医療 バイオメカニクス 非線形光学

### 1. 研究開始当初の背景

生体は外界からの様々な刺激にตอบสนองして恒常性を維持しており、生体内では環境変化に対応した組織の再構築が行われている。組織再構築の誘発には、化学的刺激のみではなく力学的刺激も重要な役割をはたしており、遺伝子の発現、タンパク質や生理活性物質の産生・分解、細胞形態変化、細胞増殖や分化などの様々な応答が細胞レベルで起こることが知られている。化学的刺激の場合は刺激物質の濃度などで細胞への刺激を定量化できるが、ベクトル量である力を細胞スケールで定量的に扱うことは現状では非常に困難である。細胞の力学的刺激受容機構に関しては未解明の部分が多いが、刺激が定量化できないことがその要因ともいえる。

再生医療を目的とした組織工学では、分化や増殖などの細胞機能の制御が主要な課題である。現状では、表皮、角膜、軟骨などの単純な構造の培養組織では臨床応用が始められつつあるが、複雑な構造を有する高機能の培養組織の実現には課題が多い。培養組織に所期の機能を発現させるためには細胞の空間分布を制御した3次元培養が有効であり、3次元の足場を利用した培養法やシート状の細胞を積層する培養法などが検討されている。また、酸素や栄養分の有効な拡散距離より大きい組織の場合は、血管網の誘導が必須となる。

培養組織中の細胞の空間配置を制御する上で力学的刺激が有効である可能性がある。細胞や基質を配向させて培養組織の材料特性を改善できることや、細胞分化に関与する遺伝子発現が力学的刺激によって調整されているとの報告もあり、生体内における発生や組織再構築を生体外で再現するためには、適切な力学的環境を再現することも重要であると考えられる。特に、実組織中の細胞の遊走過程では細胞と細胞外基質との間に顕著な力学的相互作用が働いていると考えられるが、その力学的環境の定量的な把握はできていない。

### 2. 研究の目的

培養細胞への力学的刺激として伸展を負荷して細胞機能を解明する研究は多いが、マクロな組織スケールで定義された刺激は、ミクロな細胞スケールで実際に細胞の負荷されている刺激とは異なることが想定される。細胞機能を力学的刺激で制御するという観点では、細胞機能に関与しているミクロスケールと刺激の制御が可能なマクロスケールを関連づける必要がある。そこで本研究では、細胞および組織スケールのそれぞれの力学環境を計測する手法を確立することを目的とする。さらに、確立した手法を血管系に適用し、心拍による血管壁の変形と培養細胞への周期的な伸展刺激の関係を検討した。また、培養系の血管新生過程を観測し、基質再構築の過程を明らかにした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 細胞スケール変形解析

デジタル画像相関法による局所的変位解析で細胞および細胞外基質の変形を定量化した。細胞画像の取得は、遺伝子導入 (CellLight talin-GFP, Invitrogen) によって細胞接着斑に緑色蛍光タンパク質を発現させた状態で行い、接着斑を変位解析のマーカーとした。細胞外基質画像は第2高調波発光 (SHG) 顕微鏡 (図1) を用いて取得した。培養基質としてコラーゲンゲルを用いているため、無染色でコラーゲン線維を可視化して変位マーカーとして利用することができる。本研究で用いた SHG 顕微鏡は、共焦点レーザー走査型顕微鏡の光源および検出器を改造したもので、SHG 画像と2光子励起蛍光画像を同時に取得できる。外力や細胞の牽引威力による変形前後の2画像の相関から変位場を算出した。

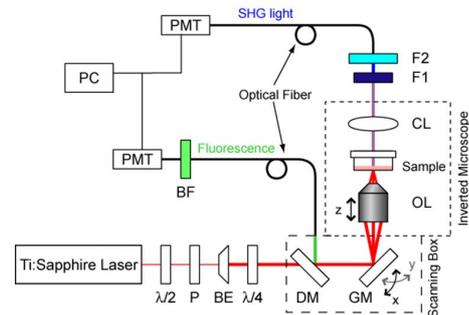


図1 SHG顕微鏡の光学系

#### (2) 組織スケールの力学解析

血管壁の形状や力学特性の不均一性を考慮した計算モデルを構築し、有限要素法を用いた構造-流体連成解析をおこなった。計算モデルはX線CT画像を基に構築した。CT値は、主に密度が影響するX線減衰率と相関する。また、血管壁の材料特性に大きく寄与するのは動脈硬化に伴う石灰化である。そこでまず、石灰化部位で顕著なミネラルの蓄積量を原子発光分析で測定して、CT値との相関を検討した。さらに、CT値を基にして材料特性を決定し、図2に示すような不均一な材料特性の計算モデルを構築する方法を確立した。

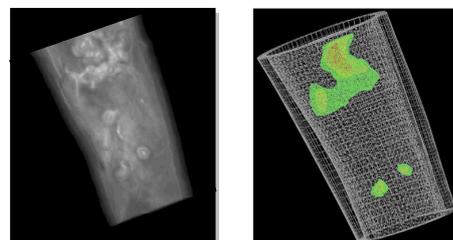


図2 血管壁のCT画像と計算モデル

#### (3) 培養組織の観測

血管新生の培養モデルとして、コラーゲンゲル基質上に培養した内皮細胞の侵入を微小流体デバイス内で観測した。本デバイスシリコン樹脂性で、中央にコラーゲンゲル

を封入した培養チャンバがあり、その両端に培養液および混合ガスを還流する流路がある。ゲル側面に細胞を播種することができるために、顕微鏡の焦点面で細胞のゲルへの侵入を観察することが可能で、血管新生過程の細胞追跡が容易になるという特長がある。また、灌流する培養液と混合ガスの組成や流量を調整することにより、増殖因子や酸素濃度などの化学的環境および圧力やせん断応力などの力学的因子を制御した培養が可能になる。

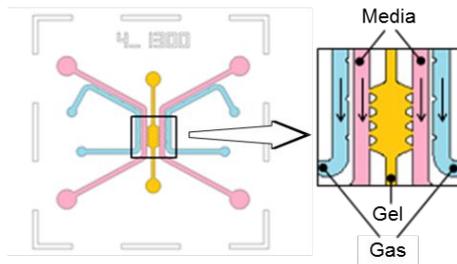


図3 微小流体デバイス

#### 4. 研究成果

##### (1) 細胞スケール変形解析

心拍による血管壁の変形を外力とする細胞の伸展を模擬した培養系を用いて細胞スケールの変形を定量化した。試料には伸展刺激用シリコンチャンバーに作成したコラーゲンゲル上に播種した内皮細胞を用い、単軸伸展装置 (STB-195, ストレックス) を用いて約 10% の伸展をシリコンチャンバーに負荷した。図 4 に細胞直下のコラーゲン基質の SHG 画像と、伸展前後で撮像した細胞接着斑の蛍光画像からデジタル画像相関法で算出した細胞のひずみ分布を示す。コラーゲン基質は細胞スケールでは不均一な構造をしており、細胞の変形も基質の構造に対応した不均一な分布を示した。従来は細胞に均一な伸展刺激が負荷されていると仮定した議論がされているが、実際に細胞負荷される刺激は均一ではなく、細胞の部位ごと異なる刺激が負荷されていることが実証できた。このような不均一性は、細胞ごとの応答の違いや、組織スケールでの空間制御の検討では無視することはできないので、細胞スケールでの力学環境の定量解析が必要となる。

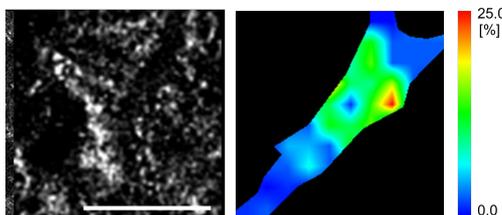


図4 伸展負荷時の細胞の変形

##### (2) 血管壁の変形解析

CT 値から血管壁の材料特性を推定して構築する血管モデルの妥当性を検証するために、CT 画像の撮影した摘出動脈のミネラル含有量を測定した (図 5)。血管壁内のミネラ

ルの主成分はカルシウムとリンであり、これらは石灰化部位での蓄積が顕著なリン酸カルシウム由来のものと考えられ、その含有量と CT 値に線形な相関があった。リン酸カルシウムが蓄積されるほど動脈が硬化すると仮定できるので、CT 値をヤング率に換算した力学モデルは妥当であるといえる。

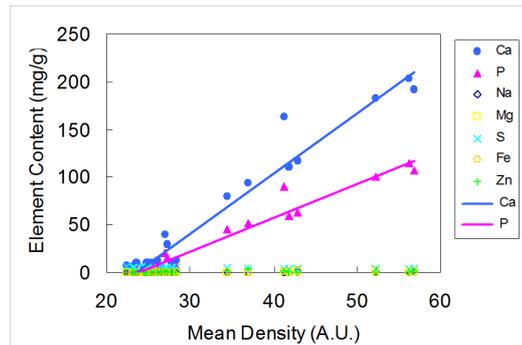


図5 CT 値とミネラル含有量の関係

CT 画像から抽出した石灰化部位で異なるヤング率を設定したモデルを用いて計算した血管壁の変形を図 6 に示す。均一なヤング率のモデル (左) と不均一な石灰化モデル (右) で異なる変形が定量化できており、CT 画像を基にした実形状・実材料特性モデルでの変形解析の実現可能性が確認できた。

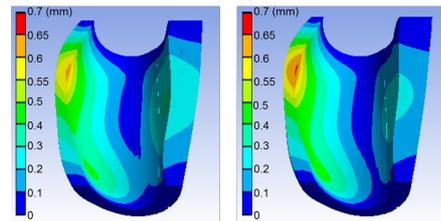


図6 血管壁の変形解析

##### (3) 血管新生過程の基質再構築の観察

血管の内腔表面に存在する内皮細胞は、低酸素環境などで産生される増殖因子などの刺激により細胞外基質に侵入して新たな血管を構築する。この血管新生の培養系モデルを用いて細胞侵入時の基質再構築を SHG 顕微鏡で観測した。図 7 に微小流体デバイス内で細胞がコラーゲン基質に侵入する過程の透過像を示す。細胞播種後 6 時間でコラーゲンゲル側面に接着した内皮細胞が 24 時間後にはゲル内に侵入していることが分かる。この進入の過程ではコラーゲンの分解・産生を伴う再構築がされていると考えられるので、その詳細を SHG 顕微鏡で観測した

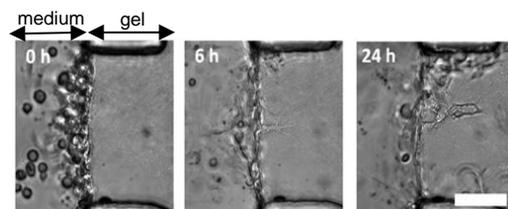


図7 血管新生モデルにおける細胞侵入

細胞が侵入する空間を確保するためには基質が分解されていると予想されるが、SHG画像(図8, 青-赤: コラーゲン, 緑: 細胞)では太い線維状の様子は消失せずに変形していた。また、細胞近傍でのSHG光強度は増加しており、単純な基質の分解がおこっている訳ではないことが分かる。このような再構築は、比較的細いコラーゲン線維が分解されて基質の変形性が増し、細胞の牽引力や基底膜形成によって局所的なコラーゲン密度が増加した結果であると推察される。

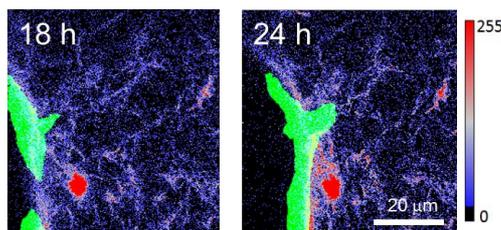


図8 血管新生過程の基質再構築

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

Maehara R, Fukushima S, et al.: Non-invasive detection of matrix-producing chondrocytes in tissue-engineered cartilage by second harmonic generation microscopy, *J Biomech Sci Eng*, 2014, Vol. 9, JBSE0007 (査読有).

DOI: 10.1299/jbse.2014jbse0007

福島修一郎, 橋本守, 荒木勉: SHGイメージングの組織診断への応用, *京府医大誌*, 2013, Vol. 122, 189-198 (査読無)

Yasui T, Fukushima S, et al.: In vivo observation of age-related structural changes of dermal collagen in human facial skin using collagen-sensitive second harmonic generation microscope equipped with 1250-nm mode-locked Cr:Forsterite laser, *J Biomed Opt*, 2013, Vol. 18, 31108 (査読有). DOI: 10.1117/1.JBO.18.3.031108

Matsumoto T, Fukushima S, et al.: Relationship between aortic mineral elements and osteodystrophy in mice with chronic kidney disease, *Biol Trace Elem Res*, 2012, Vol. 150, 278-284 (査読有)

DOI: 10.1007/s12011-012-9466-x

〔学会発表〕(計23件)

永菅大祐, 福島修一郎, 他: 微小流体デバイス内における血管新生過程の基質再構築, *日本機械学会 第26回バイオエンジニアリング講演会*, 2014年1月11日~2014年1月12日, 東北大学(仙台市).

Fukushima S, Maehara R, Funamoto K: Observation of hypoxia cellular

response by using microfluidic devices, *Tenth International Conference on Flow Dynamics*, 2013年11月25日~2013年11月27日, 仙台国際センター(仙台市).

Maehara R, Fukushima S, et al: Observation of collagen fibril formation by second harmonic generation microscopy, *平成25年度日本分光学会国際シンポジウム・年次講演会*, 2013年11月19日~2013年11月20日, 大阪大学(豊中市).

Yasui T, Fukushima S, et al: In vivo imaging of dermal collagen in skin burn by collagen-sensitive second-harmonic-generation microscopy, *BiOS 2013 (Photonics West 2013)*, 2013年2月2日~2013年2月7日, The Moscone Center (San Francisco, USA).

Hagino S, Fukushima S, et al: Assessment of arterial calcification by using x-ray computed tomography and application to computational modeling, *The 2nd International Anatomical Sciences and Cell Biology Conference*, 2012年12月6日~2012年12月8日, Chiang Mai Grandview Convention Center (Chiang Mai, Thailand)

Fukushima S, et al.: Observation of hypoxia cellular response by using microfluidic devices, *Ninth International Conference on Flow Dynamics*, 2012年9月19日~2012年9月21日, ホテルメトロポリタン仙台(仙台市)

Maehara R, Fukushima S, et al: Noninvasive monitoring methodology for maturation process of tissue-engineered cartilage, *3rd TERMIS World Congress 2012*, 2012年9月5日~2012年9月8日, Hofburg Congress Centre (Vienna, Austria).

斉藤徹也, 福島修一郎, 他: 細胞接着斑とコラーゲン基質の力学的関連性の解析, *日本機械学会 第24回バイオエンジニアリング講演会*, 2012年1月7日~2012年1月8日, 大阪大学(豊中市)

〔その他〕

ホームページ

<http://sml.me.es.osaka-u.ac.jp>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

福島 修一郎 (FUKUSHIMA, Shuichiro)  
大阪大学・大学院基礎工学研究科・助教  
研究者番号: 40362644