

平成28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 革新的先端研究開発支援事業
(英語) Advanced research and development programs for medical innovation

研究開発課題名： (日本語) 血管疾患発生機構の解明に向けた組織・細胞・核のメカノトランスダクションの統合解析技術の開発
(英語) Development of an analysis platform for mechanotransduction of tissue, cell, and nucleus toward elucidation of mechanisms of blood vessel diseases

研究開発担当者 (日本語) 国立大学法人名古屋大学 大学院工学研究科 教授 松本 健郎
所属 役職 氏名： (英語) Nagoya University, Professor, Takeo Matsumoto

実施期間： 平成28年 4月 1日 ～ 平成29年 3月31日

分担研究 (日本語) 組織の変形による細胞全体・細胞骨格・細胞核の変形量およびその内部力変化の計測
開発課題名： (英語) Measurement of deformation of cell, cytoskeleton, and nucleus in tissues due to tissue deformation

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人名古屋工業大学 大学院工学研究科 准教授 杉田 修啓
所属 役職 氏名： (英語) Nagoya Institute of Technology, Associate Professor, Shukei Sugita

II. 成果の概要（総括研究報告）

研究開発代表者：国立大学法人名古屋大学・大学院工学研究科・松本健郎総括研究報告を参照。

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0 件、国際誌 1 件）

1. Wang J, Ito M, Zhong W, Sugita S, Michiue T, Tsuboi T, Kitaguchi T, Matsumoto T. Observations of intracellular tension dynamics of MC3T3-E1 cells during substrate adhesion using a FRET-based actinin tension sensor. Journal of Biomechanical Science and Engineering. 2016, 11, 16-00504.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 胸大動脈組織由来平滑筋細胞の細胞核の形態解析，ポスター，杉田修啓，松本健郎，飛田航，宮崎直幸，村田和義，生体ボリュームイメージング研究部会&生理研研究会合同ワークショップ，岡崎，2016/11/16-17，国内
2. 胸大動脈内の細胞外マトリックスの引張負荷変形に関する研究，口頭，上間大輝，杉田修啓，日本機械学会東海支部第 47 回学生員卒業研究発表講演会，浜松，2017/3/13，国内
3. 血管平滑筋細胞の細胞外環境による細胞核形状の観察，口頭，飛田航，杉田修啓，日本機械学会東海支部第 47 回学生員卒業研究発表講演会，浜松，2017/3/13，国内
4. 飛田航，杉田修啓：周囲環境が血管平滑筋細胞の細胞核形状におよぼす影響 (Effects of extracellular environment on nuclear shape of vascular smooth muscle cells)，日本機械学会 2017 年度年次大会，埼玉大学，2017.9.3-6。（予定）

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

該当なし

(4) 特許出願

該当なし

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名：(日本語) 革新的先端研究開発支援事業 ユニットタイプ「メカノバイオロジー機の
解明による革新的医療機器及び医療技術の創出」研究開発領域
(英語) Advanced research and development programs for medical innovation

研究開発課題名：(日本語) 血管疾患発生機構の解明に向けた組織・細胞・核のメカノトランスダクショ
の統合解析技術の開発
(英語) Development of an analysis platform for mechanotransduction of tissue, cell, and
nucleus toward elucidation of mechanisms of blood vessel diseases

研究開発担当者 (日本語) 国立大学法人茨城大学 大学院理工学研究科 教授 長山和亮
所属 役職 氏名：(英語) Kazuaki Nagayama, PhD, Professor, Graduate school of Science and Engineering,
Ibaraki University

実施期間：平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語) 細胞内力学情報伝達経路の探索のための培養実験系の確立と
開発課題名：核のメカノトランスダクション解析
(英語) Development of a cell culture system for analysis of the nuclear
mechanotransduction mechanism

研究開発分担者 (日本語)
所属 役職 氏名：(英語)

II. 成果の概要（総括研究報告）

研究開発代表者： 国立大学法人名古屋大学・大学院工学研究科・松本健郎総括研究報告を参照。

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌2件、国際誌3件）

1. Wang J, Sugita S, Nagayama K, Matsumoto T, Dynamics of actin filaments of MC3T3-E1 cells during adhesion process to substrate, *Journal of Biomechanical Science and Engineering*, 2016, 11(1), 15-00637.
2. Nagasaka A, Shinoda T, Kawaue T, Suzuki M, Nagayama K, Matsumoto T, Ueno N, Kawaguchi A, Miyata T, Differences in the Mechanical Properties of the Developing Cerebral Cortical Proliferative Zone between Mice and Ferrets at both the Tissue and Single-Cell Levels. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2016, 4, Article139, 1-13.
3. 長山和亮, 福栄 智大, 繰返引張ひずみによる核の形態変化と細胞紫外線耐性向上の可能性, *生体医工学*, 2016, 54(4), 184-191.
4. 佐川 千秋, 長山 和亮, マイクロピラー基板を用いた核の力学的拘束が細胞の紫外線耐性に与える影響, 2017, 日本機械学会論文集, 83, 846, 16-00425.
5. Yaguchi T, Cong Y, Shimo K, Kurokawa T, Sugita S, Nagayama K, Masuda H, Matsumoto T, A Novel Apparatus for the Multifaceted Evaluation of Arterial Function Through Transmural Pressure Manipulation, *Annals of Biomedical Engineering*, 2017, 45(6), 1487-1495.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 微細加工基板を用いた細胞核の機械的変形・拘束が細胞機能に与える影響の検討, 口頭発表, 長山和亮, 佐川千秋, 第55回日本生体医工学会大会, 富山, 2016/04/26-28【国内】
2. A study for the effects of the mechanical trapping of the nucleus on cellular events using a micropillar substrate, Nagayama K, Oral presentation, The 2016 Summer Biomechanics, Bioengineering and Biotransport Conference (SB3C2016), Washington, DC, 2016/06/29-07/02【国外】
3. 微細加工基板を用いた細胞核内のDNA分布・凝集操作に関する研究(細胞の紫外線耐性向上の可能性), 口頭発表, 佐川千秋, 長山和亮, 日本機械学会関東支部第24回茨城講演会, 日立, 2016/08/26【国内】
4. 力学刺激が細胞組織の紫外線耐性に与える影響に関する研究, 口頭発表, 福栄智大, 長山和亮, 日本機械学会関東支部第24回茨城講演会, 日立, 2016/08/26【国内】
5. 血管力学環境を考慮した細胞培養系の確立と細胞内での力学刺激伝達メカニズムの考察, 口頭発表, 内田敬一, 長山和亮, 日本機械学会関東支部第24回茨城講演会, 日立, 2016/08/26【国内】.

6. 微細加工基質を利用した力学的側面からの細胞機能計測・制御技術の開発，ポスター発表，長山和亮，2016年度精密工学会秋季大会，水戸，2016/09/7【国内】。
7. 繰返ひずみ場における細胞組織の創傷治癒運動の解析，口頭発表，長山和亮，鈴木悠也，日本機械学会2016年度年次大会，福岡，2016/09/11-14【国内】。
8. 繰返引張ひずみによる細胞内の構造変化と細胞紫外線耐性向上の可能性，口頭発表，福栄智大，長山和亮，第27回日本機械学会バイオフィロントニア講演会，札幌，2016/10/22-23【国内】。
9. 核の力学的拘束・変形による核内DNAの分布・凝集の変化が細胞紫外線耐性に与える影響，口頭発表，佐川千秋，長山和亮，第27回日本機械学会バイオフィロントニア講演会，札幌，2016/10/22-23【国内】。
10. 血管壁内細胞配列を考慮したコラーゲン微細溝基質による平滑筋細胞培養系の確立，口頭発表，内田敬一，長山和亮，第27回日本機械学会バイオフィロントニア講演会，札幌，2016/10/22-23【国内】。
11. Control of vascular smooth muscle cell differentiation using a novel micro-grooved collagen substrate, Poster presentation, Nagayama K, Uchida K, 第54回日本生物物理学会大会，つくば，2016/11/25-27【国内】
12. The biomechanical effects of the deformation and trapping of the nucleus on cellular functions, Poster presentation, Nagayama K, Sagawa C, The 16th International Conference on Biomedical Engineering (ICBME2016), Singapore, 2016/12/9【国外】
13. 核の変形が細胞の生理機能に及ぼす影響，口頭発表，長山和亮，日本機械学会第29回バイオエンジニアリング講演会，名古屋，2017/01/20【国内】
14. 細胞内微細構造の力学特性計測を目指したマイクロ力学試験機の開発，口頭発表，大畠成暁，長山和亮，第26回ライフサポート学会フロンティア講演会，東京，2017/3/10-11【国内】
15. 血管壁内細胞配列を考慮したコラーゲン微細溝基質の開発とこれを用いた血管平滑筋細胞の分化制御の試み，口頭発表，内田敬一，長山和亮，第26回ライフサポート学会フロンティア講演会，東京，2017/3/10-11【国内】

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

該当なし

(4) 特許出願

該当なし

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

- 事業名： (日本語) 革新的先端研究開発支援事業ユニットタイプ
(英語) Advanced Research and Development Programs for Medical Innovation
- 研究開発課題名： (日本語) 血管疾患発生機構の解明に向けた組織・細胞・核のメカノトランスダクションの統合解析技術の開発
(英語) Development of an analysis platform for mechanotransduction of tissue, cell, and nucleus toward elucidation of mechanisms of blood vessel diseases
- 研究開発担当者 (日本語) 国立大学法人名古屋大学 大学院工学研究科 教授 松本 健郎
所属 役職 氏名： (英語) Nagoya Univ., Professor, Takeo MATSUMOTO
- 実施期間： 平成 28 年 4 月 1 日 ~ 平成 29 年 3 月 31 日
- 分担研究 (日本語) 高分解能広視野高輝度観察対応型 3 次元内部構造顕微鏡の開発と組織, 細胞の 3 次元観察
開発課題名： (英語) Development of three dimensional internal structural microscope supporting high resolution wide field of view and high sensitivity observation and three dimensional observation of tissue and cells
- 研究開発分担者 (日本語) 横田 秀夫
所属 役職 氏名： (英語) RIKEN Center for Advanced Photonics Image Processing Research Team, Team Leader, Hideo YOKOTA

II. 成果の概要（総括研究報告）

研究開発代表者：国立大学法人名古屋大学・大学院工学研究科・松本健郎総括研究報告を参照。

III. 成果の外部への発表

- (1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0 件、国際誌 0 件）
なし
- (2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表
なし
- (3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み
なし
- (4) 特許出願
なし

平成28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名：(日本語) 革新的先端研究開発支援事業 ユニットタイプ「メカノバイオロジー機構の解明による革新的医療機器及び医療技術の創出」研究開発領域
(英語) Advanced Research & Development Programs for Medical Innovation

研究開発課題名：(日本語) 血管疾患発生機構の解明に向けた組織・細胞・核のメカノトランスダクションの統合解析技術の開発
(英語) Development of an analysis platform for mechanotransduction of tissue, cell, and nucleus toward elucidation of mechanisms of blood vessel diseases

研究開発担当者 (日本語) 大学院工学研究科 准教授 田村篤敬

所属 役職 氏名：(英語) Graduate School of Engineering, Associate Prof. Atsutaka Tamura

実施期間：平成28年 4月 1日 ～ 平成29年 3月31日

分担研究 (日本語) 軟組織内部の3次元微細構造を考慮した有限要素モデルの開発と微視的応力分布の推定

開発課題名：(英語) Numerical FE model development of a biological soft tissue with 3D microstructure and estimation of microscopic stress distribution

研究開発分担者 (日本語)

所属 役職 氏名：(英語)

II. 成果の概要 (総括研究報告)

研究開発代表者：国立大学法人名古屋大学・大学院工学研究科・松本健郎総括研究報告を参照.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0件、国際誌 0件）
該当なし

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 詳細な血管壁モデルの開発に向けた基礎的検討，口頭，加藤優弥，田村篤敬，本宮潤一，小出隆夫，日本機械学会中国四国学生会 第47回学生員卒業研究発表講演会，2017/3/06，国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み
該当なし

(4) 特許出願
該当なし

平成28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 革新的先端研究開発支援事業
(英語) Advanced Research and Development Programs for Medical Innovation

研究開発課題名： (日本語) 血管疾患発生機構の解明に向けた組織・細胞・核のメカノトランスダクションの統合解析技術の開発
(英語) Development of an analysis platform for mechanotransduction of tissue, cell, and nucleus toward elucidation of mechanisms of blood vessel diseases

研究開発担当者 (日本語) 名古屋大学 教授 松本 健郎
所属 役職 氏名： (英語) Takeo Matsumoto, Professor, Nagoya University

実施期間： 平成28年4月1日 ～ 平成29年3月31日

分担研究 (日本語) 巨視的変形に伴う組織内微細構造変化の計測・解析・吟味
開発課題名： (英語) Measurement, analysis, and examination of change in microscopic tissue structure due to macroscopic deformation

研究開発分担者 (日本語) 名古屋大学 教授 松本 健郎
所属 役職 氏名： (英語) Takeo Matsumoto, Professor, Nagoya University

II. 成果の概要 (総括研究報告)

和文

正常家兎胸大動脈薄切組織の引張時の微視的変形を計測し、弾性板は蛇行が解消してから伸び始めること、様々な方向を向いていた平滑筋細胞核が回転して引張方向(円周方向)に揃ってくることなどを確認した。また、エラスチンとコラーゲンを共焦点顕微鏡下で同時に明瞭に観察することに成功した。核の急性力学負荷に伴うクロマチン変化の観察のため、単離細胞を微細流路に通した後の核内クロマチンの変化を調べた結果、クロマチン凝集塊の個数が減少することを見出した(名大・松本)。

顕微鏡下に設置できる引張試験装置を作製して組織変形時の細胞核変形量を計測し、コラーゲン線維ネットワークの変形量、および組織内細胞の細胞核の変形量が不均質であることを確認した。また、細胞周囲物質の有無による細胞核への影響を調べたところ、2次元的な培養ディッシュ上の細胞、3次元ゲル中の培養細胞、組織中の細胞の細胞核の体積がこの順に減少し、細胞核形状には3次元的な環境のみならず、他の影響因子があることが判明した（名工大・杉田）。

血管組織中に豊富に存在する Type I コラーゲンを使って、微細な溝を形成した基質を作成する独自の手法を編み出した。この基質上で脱分化した合成型の血管平滑筋細胞を培養すると細胞の配列・組織化し、細胞の重層化や増殖が顕著に抑制され、収縮型細胞へと再分化が促進されることを見出した。さらに原子間力顕微鏡を使用して、細胞の表面構造ならびに力学特性を調査した結果、平滑筋の分化・再分化の過程において、細胞骨格と核との結合状態が大きく変化している可能性が得られた（茨城大・長山）。

平成 27 年度に導入した、広範囲共焦点ユニットを組み込んだ 3 次元内部構造顕微鏡（3D-ISM）に対して、3 波長同時観察のための結像光学系の設計、高感度広範囲撮影を実現する超高感度 2 次元素子の導入と同時撮影機能の開発を進めた。また、松本らとの共同研究として、血管組織の広範囲高分解能観察に関する実験検討を行った（理研・横田）。

今年度は、弾性板層と平滑筋層から構成される単純化した血管中膜モデルを試作した。今回、このモデルの弾性板（シェル）に圧縮の予荷重（pre stress）を考慮すると、無負荷状態では弾性板が座屈し、血管周方向（モデル長手方向）に引張負荷を作用させると、弾性板の蛇行が徐々に消失していく過程を再現することができた（鳥取大・田村）。

英 文

We measured microscopic deformation of thin-sliced rabbit thoracic aortas during tensile test in the circumferential direction to confirm that the elastic lamina begin elongated after their waviness disappeared, and the smooth muscle nuclei that had aligned in various directions before stretch rotated and aligned in the circumferential direction during stretch. We successfully observed elastin and collagen fibers under the confocal laser scanning microscope. We also found that the number of condensed chromatin cluster in the nuclei decreased after isolated cells passed through micro channel (Matsumoto, Nagoya Univ).

A tensile tester was set under a microscope and confirmed that deformations of extracellular matrix and cell nuclei in tissue were heterogeneous during tissue deformation. In addition, to investigate the effect of presence of extracellular matrix on morphology of cell nuclei, volume of cell nuclei among cells incubated on 2D coverslip and within 3D collagen gels and cells in tissue were measured and found that volume decreased in this order, indicating that extracellular matrix and other factors affect morphology of cell nuclei in tissue (Sugita, Nagoya Inst Tech).

We developed a novel micro-grooved collagen substrate to control cell orientation similar to in vivo vascular tissue, and found that the contractile differentiation of vascular smooth muscle cells were significantly facilitated on this substrate. We also investigated the local surface structures and local mechanical properties of the vascular smooth muscle cells by using atomic force microscopy, and found that the nuclear-cytoskeletal interactions varied considerably during smooth muscle differentiation (Nagayama, Ibaraki Univ).

In this fiscal year, we designed three-wavelength compatible optical system of three-dimensional internal structural microscope. In addition, as collaborative research with Matsumoto et al., We conducted experiments on the observation of the wide range high resolution of vascular tissue (Yokota, RIKEN).

In this fiscal year, a simplified FE model representing a media layer of the aorta was created. This was a prototype model composed of the elastic lamina and the smooth muscle layer. When a compressive prestress was taken into account as a boundary condition in the elastic lamina, a buckling process of the elastic lamina, which is commonly observed in in vitro environment, was successfully replicated at no load condition. Further, by applying a uniaxial stretch along the circumferential direction (longitudinal direction of the FE model) of the aortic media, we also successfully replicated a physiological equilibrium state, in which a waviness of the elastic lamina was gradually eliminated as the applied stretch was increased (Tamura, Tottori Univ).

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0件、国際誌 6件）

1. Tamura A, Hayashi S, Matsumoto T: Effect of loading rate on viscoelastic properties and local mechanical heterogeneity of freshly isolated muscle fiber bundles subjected to uniaxial stretching, *Journal of Mechanics in Medicine and Biology*. 2016, 16-6, 1650086.
2. Wang JF, Sugita S, Nagayama K, Matsumoto T: Dynamics of actin filaments of MC3T3-E1 cells during adhesion process to substrate, *Journal of Biomechanical Science and Engineering*. 2016, 11-2, 15-00637.
3. Nagasaka A, Shinoda T, Kawaue T, Suzuki M, Nagayama K, Matsumoto T, Ueno N, Kawaguchi A, Miyata T: Differences in the mechanical properties of the developing cerebral cortical proliferative zone between mice and ferrets at both the tissue and single-cell levels, *Frontiers in Cell and Developmental Biology (section Cell Adhesion and Migration)*. 2016, 4, Article 139, 13 pages.
4. Wang J, Ito M, Zhong W, Sugita S, Michiue T, Tsuboi T, Kitaguchi T, Matsumoto T: Observations of intracellular tension dynamics of MC3T3-E1 cells during substrate adhesion using a FRET-based actinin tension sensor, *Journal of Biomechanical Science and Engineering*. 2016, 11-4, 16-00504.
5. Sugita S, Matsumoto T: Multiphoton microscopy observations of 3D elastin and collagen fiber microstructure changes during pressurization in aortic media, *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology*. In press.
6. Yaguchi T, Cong Y, Shimo K, Kurokawa T, Sugita S, Nagayama K, Masuda H, Matsumoto T: A novel apparatus for the multifaceted evaluation of arterial function through transmural pressure manipulation, *Ann Biomed Engng*. In press.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 胸大動脈の背腹差について：マルチスケール力学解析とマイクロレイ解析による検討，口頭，松本健郎，杉田修啓，城野貴洋，飯島慎太郎，長山和亮，松本明郎，第55回日本生体医工学会大会，2016/4/26-8，国内。
2. 血管の力学応答を利用した血管機能検査装置の開発，口頭，松本健郎，日本生体医工学会専門別研究会バイオメカニクス研究会第161回研究会，2016/8/3，国内。
3. 大動脈中膜内の応力状態とエラスチン線維走行方向との関連，口頭，山田麻加，杉田修啓，松本健郎，日本機械学会第27回バイオフィロンティア講演会，2016/10/22-3，国内。
4. Estimation of endothelial glycocalyx layer deformation in response to fluid shear stress，口頭，Matsumoto T，Takahashi Y，Owaki Y，Nagayama K，The 16th International Conference on Biomedical Engineering，2016/12/7-10，国外。
5. 収縮した動脈の強制拡張が平滑筋収縮能に与える影響，口頭，付云騰，杉田修啓，前田英次郎，松本健郎，日本機械学会第29回バイオエンジニアリング講演会，2017/1/19-20，国内。
6. 血管の筋原性収縮現象解明のための動物実験系の確立，口頭，河原純哉，杉田修啓，松本健郎，日本機械学会第29回バイオエンジニアリング講演会，2017/1/19-20，国内。
7. FRETに基づくアクチニン張力センサを用いた基板接着過程でのMC3T3-E1細胞内張力のダイナミクスの観察，口頭，王軍鋒，伊藤将大，鐘文浩，杉田修啓，道上達男，坪井貴司，北口哲也，松本健郎，日本機械学会第29回バイオエンジニアリング講演会，2017/1/19-20，国内。
8. 大動脈中膜内エラスチン・コラーゲン線維の加圧時の微細構造変化—弾性板層と平滑筋細胞層による差異—，口頭，杉田修啓，松本健郎，日本機械学会第29回バイオエンジニアリング講演会，2017/1/19-20，国内。
9. Relation between Direction of Elastin Fibers and Principal Stress in the Aortic Media，ポスター，Yamada A，Sugita S，Matsumoto T，The 1st ABiS Symposium Towards the Future of Advanced Bioimaging for Life Sciences，2017/2/19-20，国内。
10. Observation of elastin and collagen fibers in the thoracic aorta under multiphoton microscope during pressurization，招待，Sugita S，Matsumoto T，BIT's 5th Annual Congress of Analytix-2017，2017/3/22-24，国内。

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

該当なし

(4) 特許出願

該当なし