

令和 2 年 5 月 28 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K13033

研究課題名(和文) 機械的溶血の分子メカニズムの解明：微小孔形成と赤血球膜の相転移

研究課題名(英文) Molecular-scale Mechanism of Mechanical Hemolysis: Pore Formation and Phase Transition in Red Blood Cell Membrane

研究代表者

重松 大輝 (Shigematsu, Taiki)

大阪大学・基礎工学研究科・助教

研究者番号：50775765

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：赤血球膜を模したコレステロール含有リン脂質二重膜での、引張による相転移のメカニズムを分子動力学シミュレーションと自由エネルギーモデルを組み合わせることで明らかにした。これにより、細胞スケールで相転移を引き起こすための負荷の大きさを見積もり、赤血球膜の破れにくさとの関係について議論した。また、より細胞膜の組成に近い膜での孔形成の詳細を明らかにした。さらに、引張だけでなくせん断負荷での孔形成と膜破断に関しても、分子動力学シミュレーションと線形安定性解析を組み合わせることで、その詳細を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、引張負荷を受けた時に、もともと二層構造であったリン脂質二重膜が一層構造である指組構造相へと相転移するメカニズムが明らかになり、細胞膜等でも同様の相転移が起きる可能性が示唆された。二層から一層への変化は膜面積が大きく増加するため、赤血球などの変形に対して破れにくい細胞の膜では、この相転移により膜が破れずに変形できる量が増えているのではないかと考えられた。細胞膜破断の理解が深化は、人工心臓やソノポレーションといった医療機器や治療法が細胞へ与える負荷を見積もり、軽減する上で重要な知見となると期待される。

研究成果の概要(英文)：We clarify the mechanism of the stretch-induced phase transition of the phospholipid/cholesterol bilayer, which is a model of the red blood cell membrane, by a combination of molecular dynamics (MD) simulation and free energy model of the stretch bilayer. By using the model, we estimate the critical areal strain to induce the phase transition at the cell scale. Additionally, we investigated the details of the pore formation in the bilayers which are composed to various types of lipid molecules. Furthermore, we clarify the shear-flow-induced pore formation in the bilayer by a combination of MD simulation and linear stability analysis.

研究分野：生体工学

キーワード：リン脂質二重膜 分子動力学シミュレーション コレステロール 破断 不安定性

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

#### (1) 溶血の重要性

赤血球は高い変形能をもち、自身より小さな径の毛細血管内を容易に通過する。その一方で、補人工心臓などの循環デバイス内では、赤血球膜が非生理的な負荷にさらされることで損傷し、内部のヘモグロビン等が赤血球外に流出する場合がある[1]。この現象を溶血という。溶血は正常赤血球数の減少による酸素の運搬効率の低下を引き起こすだけでなく、流出したヘモグロビンは血栓の形成を誘発させる[2]。そのため、溶血の予測・制御は医療機器の開発において重要な課題である。

#### (2) 溶血と孔の形成、消滅、成長

溶血は赤血球膜に微小孔(直径数 nm)が形成されることから始まるとされている。この孔は不安定な存在で、孔の挙動は、孔径や膜にかかっている張力の大きさによって決まり、孔が自発的に閉じて消滅する場合と拡大していき膜の破断へと至る場合に分けられる[3]。後者が赤血球の崩壊につながる致命的な現象であるのはもちろんのことであるが、前者についても、内容物が流出するのに、十分な大きさの孔が十分な時間、孔が消滅するまでに存在した場合、赤血球はその外形を残したまま内容物を失い、赤血球としての機能を失う[4]。以上より、溶血、つまり赤血球からの内容物の流出を予測し制御するためには、孔の挙動、つまり孔の形成、消滅、成長、についての理解が不可欠となる。

#### (3) マイクロスケールからの孔の形成、消滅、成長および膜破断

孔の挙動や膜破断の詳細を明らかにするために、赤血球自体や細胞膜一般の基本構造であるリン脂質二重膜のベシクルをモデルとして用いた実験が数多く行われてきた。孔の挙動に関しては、通常では膜を透過できない蛍光分子やイオンなどが赤血球から漏れ出す様子を光学的・電氣的に観察することで、孔の数や大きさの間接的な推測が行われてきた[5,6]。しかし、これらの方法は蛍光分子・イオンなどが通過できない大きさの孔(直径 $\sim 1, 2$  nm)には適応できず、孔の形成自体を捉えることはできない。一方、膜の破断は直接観察が可能であるため、どのような条件で破断が起きるかが詳細に調べられてきた。例えば、赤血球膜・モデル膜ともに、1~5%程度の膜面積の増加で膜が破断することが報告されている[7,8]。しかし、近年行われた赤血球を非常に短い時間(数十  $\mu$ s)で変形させる実験から、一時的に膜面積が30%程度増加したとしても、膜が破断に至らないことが報告された[6]。この30%の膜面積の増加は実験観察としては前代未聞の大きさであったため、その時の膜の構造に関して盛んに議論が行われた[9,10]。しかし、非常に短い時間での現象なので、蛍光分子等の流入の測定は困難で、その時の膜構造や孔の有無などについては未だ明らかになっていない。以上のように、直径数 nm 以下の微小な孔の存在や動的な現象中での孔の挙動を実験観測で捉えることは現状困難である。

#### (4) ナノスケールからの孔の形成、消滅、成長および膜破断

実験観察が困難な微小な孔の詳細を明らかにするために、分子動力学(MD)シミュレーションによる研究が近年盛んに行われてきた。我々のグループは赤血球膜が他の細胞膜と比べ特にコレステロールを豊富に含んでいることを考慮し、コレステロールを含有した赤血球モデル膜のMDシミュレーションを行い、孔形成・消滅の過程での分子レベルでの膜構造変化の詳細を明らかにしてきた[11,12]。そして、引張前は二層構造をとっていた赤血球モデル膜が孔形成直前の引張を受けた状態において単層構造へと相転移することを明らかにした。また、この相転移が起こる場合の方が孔形成に必要な膜面積ひずみが大きいことを示した。MDシミュレーションでは、数百 ns の時間スケールで膜に引張を与えた。そして、二層構造から単層構造への相転移は膜面積の増加を引き起こす。これらから、前述の非常に速い引張下で30%の膜面積の増加に耐えた赤血球膜中では、単層構造膜への相転移が起こっているのではないかと推測した。しかし、この引張による相転移のメカニズム、および相転移が孔の形成、消滅、成長、そしてその後の膜破断に与える影響の詳細とそのメカニズムについては未だ明らかになっていない。以上より、引張による単層構造への相転移の詳細を明らかにすることが、赤血球膜での微小な孔の形成とその後の孔の成長・消滅、そして膜破断の理解につながると考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究では、分子動力学シミュレーションの結果をもとに相転移の分子レベルでのメカニズムと相転移が起こる膜での孔の形成の詳細を明らかにすることを目的とした。そして、孔の形成条件、成長速度や孔が自発的に消滅する条件などの溶血予測に深くかかわるパラメータの算出を目指した。

### 3. 研究の方法

本研究課題を遂行するために、第4章に示すように、(1)引張による相転移メカニズムの解明、(2)様々な組成の膜における引張による孔の形成条件と孔のダイナミクスに関わるパラメータの算出、(3)せん断負荷による孔の形成と膜破断の解析、を実行した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 引張による相転移メカニズムの解明

リン脂質二重膜に引張を準静的に与える分子動力学(MD)シミュレーションを行い、二層構造膜から単層構造膜への相転移の特徴を定量化するとともに、その相転移のメカニズムを明らかにするために、膜の自由エネルギーモデルを提案した。

MDシミュレーション中での相転移現象は系の大きさに影響されることが知られているので、これまで用いてきた当該分野で標準的な大きさである  $6\text{ nm} \times 6\text{ nm}$  程度の面積の膜(系 S)に加え、 $12\text{ nm} \times 12\text{ nm}$  (系 M)、 $18\text{ nm} \times 18\text{ nm}$  (系 L)の膜に準静的な引張を与える MDシミュレーションを行った。その結果、それぞれの系において、二層構造相から単層構造相への相転移の膜に与えた面積ひずみに対する相図が得られた。系 S の場合と比べて、系 M では、相転移が始まる面積ひずみの大きさが小さいことが分かった。また、系 M と L では大きな違いは見られなかった。

MDシミュレーション中での相転移のメカニズムを明らかにするために、引張を受けた膜がもつ自由エネルギーモデルを提案した。このモデルは、引張による変形に伴う弾性エネルギー、相の境界で発生する線張力エネルギー、そして平衡状態でのそれぞれの相がベースとして持つエネルギーの差を考慮した。このモデルは MDシミュレーションから得られた相図とよく一致した。また、このモデル中において、現実の細胞スケールと同等の系の大きさを想定すると、膜が破断する面積ひずみ以下でこの相転移が起こりうるが見積もられた(Fig. 1)。以上より、引張による指組構造相への相転移メカニズムが明らかになった。

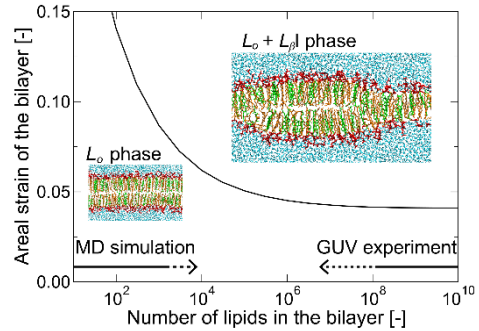


Fig. 1 系の大きさと指組構造相への相転移を起こすのに必要な面積ひずみとの関係

##### (2) 様々な組成の膜における孔形成

哺乳類の細胞膜一般および脳神経細胞膜を模した膜系を構築し、それらに引張を与える分子動力学シミュレーションを行うことによって、より実際の細胞膜の構成に近い膜での微小孔の形成と膜破断について調べた。これまで用いられてきた単一のリン脂質分子から成る膜より、細胞膜を模した膜の方が、孔の形成に必要な面積ひずみの値が小さいことが分かった(Fig. 2)。また、脳神経細胞膜を模した膜の方が細胞膜一般を模した膜よりも孔形成に必要な面積ひずみは大きい、その差は引張を与える速さが一定以上では、ほとんどなくなることが分かった。脳神経細胞膜および細胞膜一般を模した膜では、孔は多価不飽和脂肪酸が多い領域に形成しやすく、逆に *Lysophosphatidylcholine* が多い領域に形成しにくいことが分かった。

また、孔の成長等に深く関わっている物性値である線張力の推定も行った。ここでは、2種のリン脂質分子から成る混合リン脂質二重膜系を用いて線張力の推定を行った。その結果、膜の組成が変わったとしても、孔の形成・成長過程の膜構造変化に関しては大きな変化がないことが分かった。また、線張力の値は、膜全体の分子の組成ではなく、膜の縁部分の局所的な組成に影響されることが分かった。

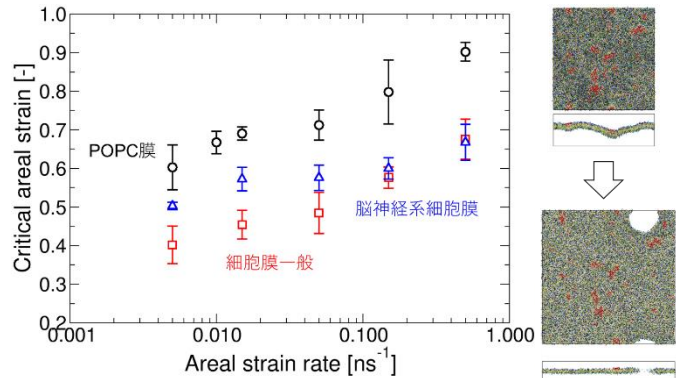


Fig. 2 多種混合リン脂質二重膜系における孔形成(右)。面積ひずみ速度と孔形成面積ひずみの関係(左)。

##### (3) せん断負荷による孔の形成と膜破断

溶血現象がせん断流れ場中で起こることが報告されていることから、これまでの引張負荷だけでなく、せん断流れ場中でのリン脂質二重膜の挙動に関して分子動力学シミュレーションを行った。このシミュレーションのために、局所的な温度をコントロールする計算コードの実装を行った。結果として、せん断流れ下では、流体力学的不安定現象により、膜に孔が形成されることが分かり(Fig. 3)、一定以上の大きさの膜ではマクロな線形安定性解析からその安定性が予想できることが分かった。

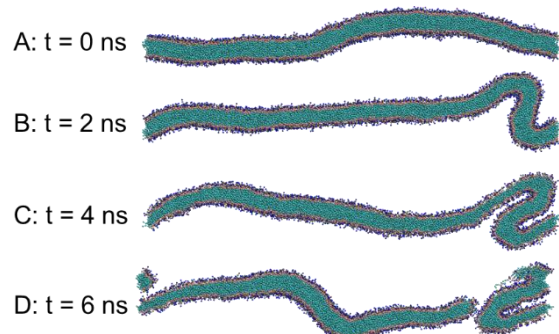


Fig. 3 せん断流れによる膜の不安定化。

#### 参考文献

- [1] Paul et al., *Artif. Organs*, 27:517-29, 2003. [2] Rother et al., *J. Am. Med. Assoc.* 293:1653-62, 2005. [3] Litster, *Phys. Lett. A* 53:193-4, 1975. [4] Hoffman, *Adv. Exp. Med. Biol.* 326:1-15, 1992. [5] Zhelev and Needham, *BBAMEM*, 1147:89-104, 1993. [6] Li et al., *Biophys. J.*, 105: 872-9, 2013. [7] Evans et al., *Biophys. J.*, 16: 585-95, 1976. [8] Needham and Nunn, *Biophys. J.*, 58: 997-1009, 1990. [9] Waugh, *Biophys. J.*, 106: 1834-5, 2014. [10] Li et al., *Biophys. J.*, 106: 1832-3, 2014. [11] Shigematsu et al., *Phys. Chem. Lipids* 13:43-9, 2014. [12] Shigematsu et al., *J. Biomech. Sci. Eng.*, 11: 15-00422, 2016. [13] Doshi et al., *PNAS*, 106: 21495-99, 2009. [14] Kodama et al., *J. Biomech. Sci. Eng.*, 4: 124-40, 2009. [15] Hamill and Martinac, *Physio. Rev.*, 81: 685-740, 2001

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2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 重松大輝, 越山顕一朗, 和田成生	4. 巻 71
2. 論文標題 コレステロールはいかにして細胞膜をやぶれにくくするか? ~生体膜分子動力学が明らかにする分子の世界~	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 生産と技術	6. 最初と最後の頁 67~69
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 Koshiyama Kenichiro, Taneo Masaki, Shigematsu Taiki, Wada Shigeo	4. 巻 123
2. 論文標題 Bicelle-to-Vesicle Transition of a Binary Phospholipid Mixture Guided by Controlled Local Lipid Compositions: A Molecular Dynamics Simulation Study	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Physical Chemistry B	6. 最初と最後の頁 3118~3123
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jpccb.8b10682	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 Shigematsu Taiki, Koshiyama Kenichiro, Wada Shigeo	4. 巻 122
2. 論文標題 Stretch-Induced Interdigitation of a Phospholipid/Cholesterol Bilayer	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Physical Chemistry B	6. 最初と最後の頁 2556~2563
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jpccb.7b10633	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13件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 重松大輝
2. 発表標題 せん断流れ下での生体膜の安定性: 分子動力学シミュレーション
3. 学会等名 2019年度統計数理研究所共同研究集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 重松大輝, 越山顕一郎, 清野健
2. 発表標題 脳神経細胞膜を模したリン脂質二重膜における 力学的負荷による微小孔形成：分子動力学シミュレーション
3. 学会等名 日本機械学会 第32回バイオエンジニアリング講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 重松 大輝, 越山 顕一郎, 清野 健
2. 発表標題 細胞膜を模した多種混合リン脂質二重膜の力学的負荷による破断に関する 分子動力学シミュレーション
3. 学会等名 日本機械学会 第32回計算力学講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 重松 大輝, 越山 顕一郎, 和田 成生
2. 発表標題 高せん断流れ場中におけるリン脂質二重膜の不安定性に関する 分子動力学シミュレーション： システムサイズ依存性
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 重松 大輝, 越山 顕一郎, 和田 成生
2. 発表標題 INSTABILITY OF PHOSPHOLIPID BILAYER UNDER SHEAR FLOW: MOLECULAR DYNAMICS SIMULATION
3. 学会等名 Summer Biomechanics, Bioengineering and Biotransport Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 重松大輝, 越山顕一朗, 和田成生
2. 発表標題 Mechanical Stress Induces Interdigitation in Phospholipid/Cholesterol Bilayer: A Molecular Dynamics Simulation Study
3. 学会等名 8th World Congress of Biomechanics
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 重松大輝
2. 発表標題 コレステロールが細胞膜の力学特性に与える影響の分子レベルでのメカニズム
3. 学会等名 第50回生物機械システム研究会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 重松大輝, 越山顕一朗, 和田成生
2. 発表標題 高せん断流れ場中でのリン脂質二重膜の破断: 分子動力学シミュレーション
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 重松大輝, 越山顕一朗, 和田成生
2. 発表標題 高せん断流れ場中でのリン脂質二重膜の挙動に関する 分子動力学シミュレーション
3. 学会等名 日本流体力学会 年会2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 重松大輝, 越山顕一朗, 和田成生
2. 発表標題 指組構造相のコレステロール含有リン脂質二重膜における水分子透過に関する分子動力学シミュレーション
3. 学会等名 日本機械学会 第31回計算力学講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 重松大輝, 越山顕一朗, 和田成生
2. 発表標題 混合脂質二重膜の線張力推定の分子動力学シミュレーション: 細胞膜中に形成した微小孔の拳動制御に向けて
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 Taiki Shigematsu, Kenichiro Koshiyama, Shigeo Wada
2. 発表標題 Molecular Dynamics Simulation of Stretch-Induced Phase Transition in Phospholipid/Cholesterol Bilayer: Toward Understanding Mechanical Rupture of Cell Membrane
3. 学会等名 The 9th Asian-Pacific Conference on Biomechanics (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 重松大輝, 越山顕一朗, 和田成生
2. 発表標題 力学的負荷によるコレステロール含有リン脂質二重膜中での指組み構造相形成に関する自由エネルギーモデル
3. 学会等名 第64回理論応用力学講演会
4. 発表年 2017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
--	---------------------------	-----------------------	----