

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23686031

研究課題名(和文)超音波ニューロモジュレーションの分子的機構の解明

研究課題名(英文)Molecular mechanisms about ultrasound neuromodulation

研究代表者

越山 顕一郎(KOSHIYAMA, KENICHIRO)

大阪大学・基礎工学研究科・助教

研究者番号：80467513

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,100,000円、(間接経費) 3,330,000円

研究成果の概要(和文)：超音波作用下で細胞膜に働く張力の周期的な変化を再現する分子動力学シミュレーションコードを開発し、チャンネルタンパク質、コレステロール、イオンを含む脂質膜分子モデルに応用した。これより、張力変動下での、脂質膜での孔構造の形成、チャンネルタンパク質の不感受性、イオンの孔構造透過パターンの変化、コレステロール・リン脂質膜の相変化を明らかにした。さらにin vitro超音波ニューロモジュレーション(NM)実験装置を開発し、装置における音場制御がNMが生じるより正確な超音波条件を見積もる上で重要であることを指摘した。

研究成果の概要(英文)：We developed a novel molecular dynamics simulation method representing cyclic stretching of cell membranes and applied the method to lipid bilayer systems including mechanosensitive channel protein, cholesterol, or ions. The results showed that, under cyclic stretching, pore structure penetrating the bilayer forms transiently, the mechanosensitive channel protein is insensitive as showing no opening states, the patterns of ionic transport thorough the pore structure have variations, and the phase of cholesterol/phospholipid bilayers changes to an interdigitated gel-like phase. In addition, we developed an in vitro ultrasound neuromodulation device and pointed out the importance of controlling the sound field for more precise estimation of the membrane permeability changes under the ultrasound exposure.

研究分野：流体工学

科研費の分科・細目：機械工学・流体工学

キーワード：細胞膜 分子動力学 超音波 ニューロモジュレーション 周期的張力変化 張力感受性膜タンパク質

1. 研究開始当初の背景

生物は神経細胞の一部で生じた細胞内外の電位差変化の情報を細胞全体そして周囲の神経細胞へ伝搬させることで、感覚・判断・運動制御を機能させる。この神経細胞の情報伝搬を神経細胞への物理的、化学的な刺激によって人為的に制御することで、様々な神経疾患の改善を図る新しい治療法—ニューロモジュレーション(以下、NM)—が盛んに研究されて始めている。これらの多くは電極を脳などの神経系に直接埋め込んで刺激する侵襲的な手法であるが、超音波を用い、非侵襲的に神経細胞を刺激して電位差変化を制御する超音波 NM が、アリゾナ州立大学の Tyler 博士らによって提案された。その一方で、「なぜ超音波の刺激により細胞内外の電位差が変化し伝搬するか?」という基本的なメカニズムについてはほとんどわかっていなかった。超音波 NM を医療応用する際にはその効率を向上させることや安全性を提示することが求められており、そのための基礎となるメカニズムを解明することが喫緊の課題となっていた。

細胞への超音波照射の影響として、細胞膜の透過性が変化し、細胞外分子が細胞内へと輸送されるソノポレーション(音響穿孔)がよく知られている。研究代表者は、過去、細胞膜の分子シミュレーションを行い、超音波下の気泡から発生する衝撃波が繰り返し膜に衝突することで膜に水分子が導入され、それをきっかけとして自発的に膜に孔構造が形成し、これが細胞外分子の輸送に寄与することを突き止めていた。従来のソノポレーションでは、比較的大きな分子(薬剤分子)に対する膜の透過性変化が注目されており、そのため、超音波と気泡が介在した急激な圧力上昇や高速な流れの衝突などによる大規模な膜構造変化が透過性変化には不可欠と考えられてきた。その一方、超音波 NM では電位差変化に関わる“イオンに対する膜の透過性変化”が重要であり、実際、気泡がほとんど存在しない条件下でも超音波の照射によって神経細胞で電位差変化が誘起され伝搬することも報告されていた。これより、超音波 NM では、従来のソノポレーションとは異なった膜透過性変化メカニズムも存在することが予想された。

2. 研究の目的

全ての細胞膜は脂質二重層(以下脂質膜)と呼ばれる疎水性の層を基本構造として持つため、通常ではイオンの膜透過は制限されている。しかし、必要に応じてイオンを透過させるため、細胞膜には、周囲の電場、圧力場、結合物質の存在に応じて分子レベルのチャンネル構造を開閉する様々なチャンネルタンパク質が存在している。超音波の液中への照射に伴う物理的作用として、圧力変動、音響流、気泡の発生と振動に伴う渦流・圧力波の発生等がある。これらの周期的な物理的作

用で、細胞膜を構成する脂質分子やチャンネルタンパク質の構造や、細胞膜周囲のイオン分布が分子レベルで変化すれば、それに伴いイオンの流出・入が生じて膜の一部で電位差変化が生ずると予測される。これら実験観察が難しい外部刺激による分子レベルでの膜構造変化とそれに伴うイオンの膜透過性変化を、より現実に近い神経細胞膜の分子モデルを用いて数値的に調べ、また実験的に過去の超音波 NM を検証することで超音波 NM のメカニズムを分子レベルで明らかにすることが本研究課題の目的である。

3. 研究の方法

本研究課題を遂行するために、以下の3—(1)ように分子動力学(MD)シミュレーションを用いて超音波下での周期的な張力変化を再現するコードと、イオンや膜タンパク質、コレステロールを含む脂質膜分子モデルとを組み合わせて数値解析を行うと共に、3—(2)のように *in vitro* 超音波 NM 実験装置を開発して、超音波 NM を実験的に検証する。

(1) MD シミュレーションを用いた数値解析

①周期的張力変化を再現する MD アルゴリズムを開発する。

①粗視化分子モデルを用いた脂質膜分子モデルを開発する。

③張力感受性膜タンパク質モデルを構築し①のアルゴリズムを応用する。

④擬似神経細胞膜としてのコレステロール/リン脂質膜分子モデルを構築し①のアルゴリズムを応用する。

(2) 超音波 NM 実験装置開発

in vitro 超音波 NM 実験装置として、従来使用されている超音波ソノポレーション装置を改良し、正立顕微鏡下での現象の観察が可能な小型円筒水槽間接超音波照射型の超音波 NM 装置を開発する。

4. 研究成果

(1) 周期的な張力変化における脂質膜構造の分子レベルの構造変化の解明

超音波照射下での細胞膜の構造変化を明らかにするため、超音波による分子レベルの膜張力変動を扱えるコードを開発した。直方体の基本セルの中央に、粗視化 DPPC 分子をその疎水鎖を向かい合わせて配置し、その両側をそれぞれ粗視化水分子で構成された水分子層で挟む。粗視化分子モデルとして、脂質膜の粗視化 MD で広く使われている MARTINI モデルを使用する。この系を用いて温度・圧力一定の MD 計算を実行することで安定した粗視化脂質膜分子モデルを得る(図 1)。次に、この脂質膜系に周期的な引張り負荷を与えるため、研究代表者が過去に開発した膜に一定速度で引張りを負荷する方法を改良し、まず基本セルの大きさ l を

$$l(t) = l_0 + a \left(1 + \cos \left(\frac{2\pi}{T} \left(t - \frac{T}{2} \right) \right) \right)$$

で周期的に変化させる. ここで t は時間, l_0 は初期の計算系の一辺の長さ, T は周期, a は振幅である. この操作に続き, MD 計算で得られる時間ステップ Δt ごとの粒子の位置に対し, 膜に平行な二方向には同じスケリングファクタ $l(t+\Delta t)/l(t)$ を, 膜に垂直な方向には通常の圧力スケリングファクタを用いて位置スケリングを行う.

図 2 に, 周波数 $T=1$ MHz, 振幅 $a=1, 4$ nm とした時の, 引張りによる面積ひずみ $l^2(t)/l_0^2 - 1$ の変化, およびビリアル定理より計算した計算系の側方方向の圧力 P_{lat} の経時変化を示す. なお, 時間は周期 T で $\bar{t}=t/T$ として無次元化している. $a=1$ nm の場合, サイン状の面積変化に応じて P_{lat} もサイン状に変化しており, これは膜の弾性的な応答を示している. 一方, $a=4$ nm の場合, 面積ひずみが 0.8 を超えると急激に P_{lat} が回復し, $\bar{t}=1$ までほぼ一定値となっている. この間, 脂質膜には膜を貫く孔構造(図 3)が存在することを確認している. また周波数が高くなると孔構造形成が抑制されることも明らかにした.

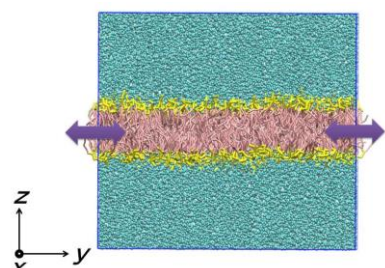


図 1 粗視化脂質膜分子モデルと引張方向

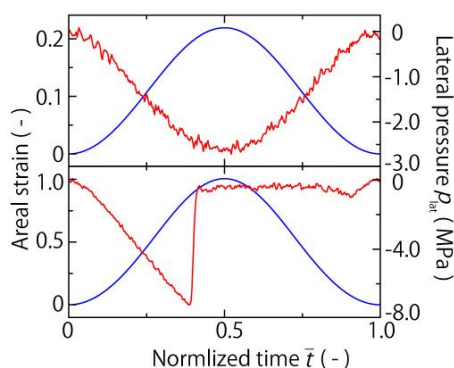


図 2 周期的な面積ひずみ(青)と側方方向圧力(赤); $a=1$ nm(上図), $a=4$ nm(下図)

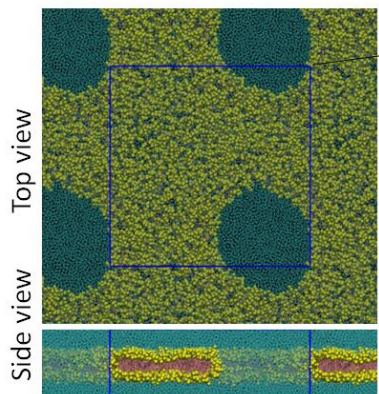


図 3 引張りにより生ずる孔構造

(2) 脂質膜に生じた穴を通過するイオンの自由エネルギー障壁の検証と周期的な圧力変動下のイオンの膜透過機構

① 張力変動下で脂質膜に形成する孔構造によりイオンの透過が生じるかを検討するため, イオンの膜透過のしやすさの指標となる孔構造の有無による自由エネルギー障壁を調べた. リン脂質分子をその炭化水素基を一点で表した UA モデル, 水分子を剛体回転モデルで表現した計算系を用いて温度, 圧力一定の MD 計算を実行することで脂質膜分子モデルを構築する. この脂質膜分子モデルを研究代表者が開発したコードで膜を引張ることにより孔構造を形成させ, 孔の大きさを制御するため面積一定の計算を行う. これにより, 直径 5 nm 程度の孔構造を含む脂質膜系を構築することができる. 脂質膜分子モデルにおいてカリウムイオン K^+ および塩素イオン Cl^- と水分子とをそれぞれ一個ずつ交換後, さらに平衡化 MD 計算を行い, イオンを含んだ安定な脂質膜系を得る. 次に, 脂質膜中央部から水分子層側へ約 3.5 nm の間での, K^+ の存在確率分布を Weight Histogram Analysis Method により求め, 脂質膜から十分離れた水分子層での確率を基準として K^+ の自由エネルギープロファイルを Potential of Mean Force (PMF) として算出する. 図 4 に孔構造の有無による自由エネルギー障壁の違いを示す. なお, 孔構造がある場合は, 孔構造内に K^+ を配置した時の結果となっている. 孔構造がない場合, 膜内部で PMF が上昇し中心部では約 130 kJ/mol 程度であり, これは過去の研究で報告されている結果と一致した. 一方で, 孔構造がある場合, 膜内部(孔構造内)と水分子層で PMF はほとんど変化がなく, 孔構造の中にイオンが存在しやすい環境となっていることがわかる. これらのことから, 超音波照射によって孔構造が形成すれば, イオンが膜を通過する際のポテンシャル障壁が孔構造を通過することで大幅に低くなり, 結果として分子やイオンの膜透過が促進されていることが示唆された.

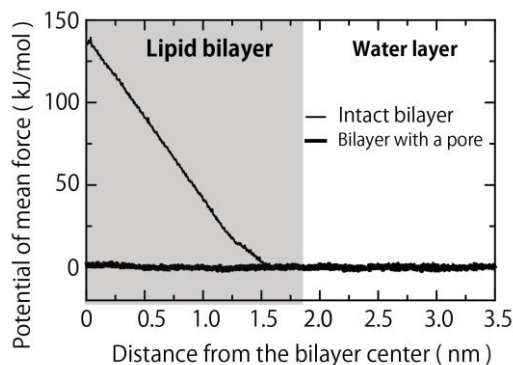


図 4 孔構造の有無によるカリウムイオンに対する脂質膜の自由エネルギー障壁

② 孔構造のサイズの大小や超音波による張力変化によって孔構造が周期的に変化している状態におけるイオンの膜透過現象を調べた。まず、4-(2)-①と同様の手法で引張りの大きさを制御することでサイズの異なる孔構造を有する脂質膜モデルを作製する。この膜モデルを完全な脂質膜モデルと接合し、水分子層に K⁺、CL⁻イオンを混ぜることで孔構造を有する二段脂質膜分子モデルを構築する(図 5)。次に、温度・圧力一定の MD 計算、および温度一定で 4-(1)で開発した周期的な張力変化下での MD 計算を行い、これらの計算中におけるイオンの孔通過イベントの頻度を解析した。直径 2 nm 程度の小さな孔構造に比べ、直径 5nm 程度の大きな孔構造では比較的頻繁にイオンの孔通過が観察され、これは 4-(1)-①での予測通りであった。さらに、大きな孔構造では張力を周期的に変化させることで K⁺イオンの孔構造通過イベントの頻度が上がる傾向が見られたが、一方で小さな孔構造ではその傾向は見られなかった。CL⁻イオンに関しては、張力を周期的に変化させることで、K⁺イオンとは逆に、大きな孔構造を用いた場合で、通過の頻度が下がる場合があることがわかった。以上より、細胞膜の基本構造である脂質膜構造に比較的大きな(約 5 nm 以上の)孔構造が空いている場合、超音波の影響を受けてイオンの通過パターンが様々に変化することが示唆された。

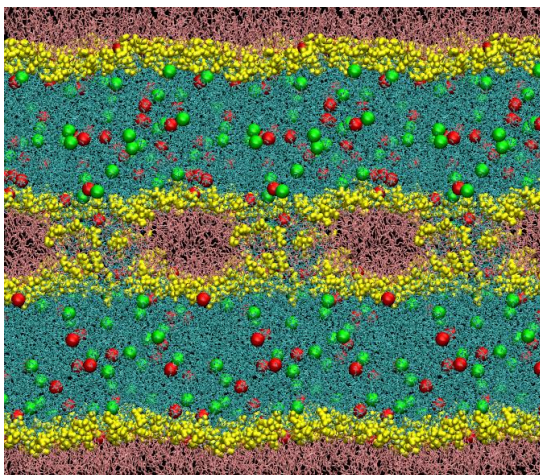


図 5 イオン含有二段脂質膜分子モデル

(3) 超音波作用下における張力感受性チャンネルタンパク質の分子レベルの構造変化の解明

超音波 NM におけるイオンの輸送経路の候補として予想される、張力変化に対するチャンネル膜タンパク質の構造変化を調べた。張力感受性のチャンネル膜タンパク質として構造が得られており、MD において分子モデルが提案されている *Mycobacterium tuberculosis* 由来のタンパク質(Tb-MscL)をバクテリアで豊富に見られるリン脂質分子で表現した脂質膜モデルに埋め込み、温度、圧

力一定の MD 計算を実行することで、チャンネルが閉じた状態で安定した膜構造を得る。次に 4-(1)-①で開発した周期的な張力変化を与えるコードを計算系に適応し、チャンネル構造の変化を解析した。計算機性能の制限から 1 GHz 程度周波数で数 nm の振幅の範囲で計算を実行したところ、本計算条件内ではチャンネル構造が開くなどの明確な構造変化やチャンネルを通過した水分子の輸送は観察されなかった。一方で、研究代表者が過去に開発した、非生理的な状況で膜へ高速な引張りを与えるコードを用いて非定常な膜引張り MD 計算を行ったところ、チャンネル構造が開くよりも先に、脂質膜部分に孔構造が形成されることがわかった(図 6)。超音波照射下では高速な張力変化が予想されることから、超音波照射下では、チャンネルタンパク質の構造が変化して細胞内外のイオン輸送が行われるよりも、脂質膜が構造変化して孔構造が形成し、イオン輸送が生じる可能性が示唆された。

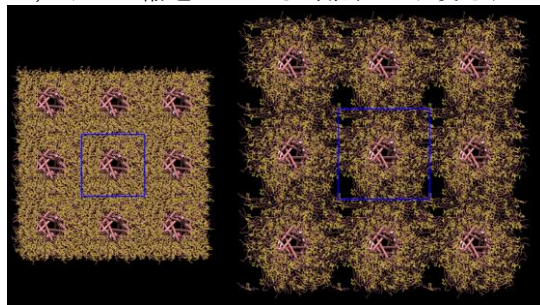


図 6 高速引張り前後の Tb-MscL 含有脂質膜構造(Top view).

(4) 超音波 NM 解明に向けた超音波実験装置の開発と音場の検証

in vitro 超音波 NM 装置として Well-on-Water-Surface(WWS)型ソノポレーション装置を参考に図 7 に示すような正立顕微鏡下円筒水槽型超音波照射装置を開発した。水槽内部は脱気水で満たされており、水槽底面に $\Phi 28$ mm の円形断面を持つ共振周波数 1.00 MHz の平面型振動子を、水槽上面に様々な細胞を培養した $\Phi 35$ mm ディッシュが設置できる。交流電圧波形をファンクションジェネレータで発生させ、バイポーラ電源により増幅させ振動子に入力する機構である。小型で正立顕微鏡下に設置・移動が可能で、ディッシュ上部から細胞にアクセスできるので、ガラス電極・ヘッドステージ・パッチクランプアンプを組み合わせる超音波照射下での電気生理的な計測への拡張ができ、また振動子とディッシュ底面との間を離すことで近接音場の影響をできるだけ少なくした機構となっている。

本装置を用いてディッシュ内培地高さを変化させることによる音場変化と細胞への影響を調べた。超音波照射前に正立顕微鏡に取り付けた CCD カメラを用いてディッシュ内を透過光で撮影した。そして、マイクロバ

ブルを加えたのち DMEM を加えることによりディッシュ内の培地高さを任意の値に調節して超音波を照射した. その後, ディッシュ内を PBS で数回洗浄し, 死細胞検出蛍光色素 PI を加え, 透過光観察および PI の蛍光観察を行った. 超音波照射前後の透過光画像, 照射後の蛍光画像の内, ディッシュの中心付近の 2 mm 四方の範囲の細胞数および PI を取り込んだ細胞数をカウントした. 生細胞残存率を S とし, $S = (N_{after} - N_{death}) / N_{before}$ と定義した. ここで, 照射前の細胞数, 照射後の細胞数, PI が導入された細胞数をそれぞれ N_{before} , N_{after} , N_{death} とした.

図 8 にそれぞれの培地高さに対して 3 回ずつ計測した生細胞残存率の平均値と標準偏差を示した. 培地高さの増加とともに生細胞残存率も増加していき 2.8 mm で最大をとりその後減少した. 今回得られた実験結果では, 生細胞残存率が最大・最小をとる培地高さの間隔は 0.5 mm 程度であり, この間隔で生細胞残存率が約 0.9 から 0.1 に減少した. 他のグループが行った WWS 型装置内の音場解析では, ディッシュ底面での最大圧力が培地高さに対して超音波の半波長単位で周期的に変化していた. これは, 振動子から照射された波とディッシュ内の気液界面で反射した波の干渉による定在波によるものだと考えられている. 図 8 に示すように本実験装置を用いた計測の範囲では, 生細胞残存率が最大・最小をとる培地高さの間隔は照射した超音波の半波長(約 0.75 mm)に近かった. 現在ディッシュ内の音場の計測まで行っていないが, 本実験装置でも培地高さの変化によってディッシュ底面での圧力変化が生じており, そのため生細胞残存率が変化したと考えられる. これらのことより, 数百 μm 単位での培地高さの制御が超音波 NM を *in vitro* で検証する上で重要であることが示唆された.

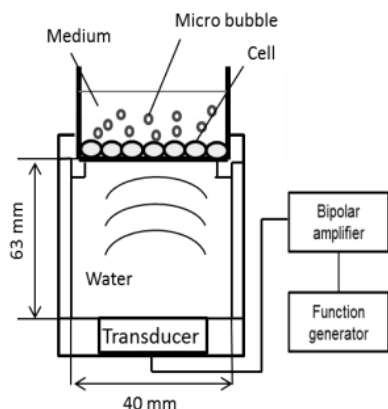


図 7 円筒水槽超音波間接照射型小型超音波 NM 装置

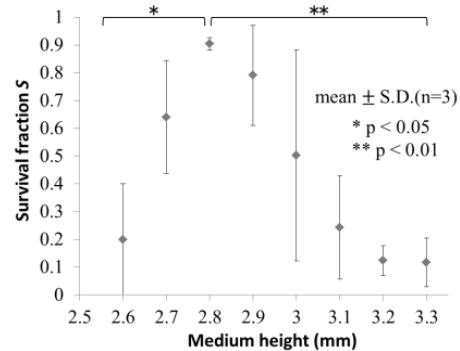


図 8 培地高さ と 生細胞残存率の 関係

(5) 超音波作用下の神経細胞膜モデルとしての張力変化した時のコレステロール含有脂質膜の分子レベルの構造変化の解明

神経細胞膜の特徴である様々な濃度でコレステロールを含有したリン脂質二重膜に対して, 引張を与えて孔を形成させる分子動力学シミュレーションを行い, コレステロール濃度の違いが孔の形成に与える影響を, 膜に孔が形成される臨界面積ひずみ, 孔形成の過程, そしてリン脂質分子の配向性の変化をもとに調べた. コレステロール濃度の増加に伴い, 臨界面積ひずみの値はいったん増加し, 40 mol% でピークをとり, その後減少した. この傾向は過去の実験結果とよく一致する. コレステロールを含む膜において, 膜が受けている面積ひずみが小さいうちは, 面積ひずみの増加に伴い, リン脂質分子の配向が乱れていくのに対して, 面積ひずみがある一定の値を超えたところからは, 配向が整っていくことが分かった. 特にコレステロールを 40 mol% で含む膜では, 受けている面積ひずみが大きい状態において, 二重膜のそれぞれの層が互いにかみ合った膜構造をとり, これにより分子の配向が整った状態になることが分かった. この膜構造は L β I 相の膜構造と類似している. ここで見られた分子の配向性の上昇が膜内への水分子の透過を妨げ, それにより孔の形成が引き起こされる臨界面積ひずみの増加につながったと予想される. 神経細胞膜はコレステロールが豊富に存在するため張力変化によって新たな相が出現することで膜内の音伝搬やイオンの膜透過性が変化し, これによって神経細胞内外の電位差が変化する機構が示唆された.

(6) 超音波ニューロモジュレーション実験に関する追跡調査

研究開始当初に Tyler 博士らによって報告された, 超音波 NM の可能性として示された動物・細胞実験結果は以下である. (i)動物実験: 麻酔で眠らせたマウスの脳に超音波を照射すると, 照射の度にマウスの尾や手が反応して動いた. (ii)細胞実験: 細胞ディッシュ底面に培養した細胞に超音波をディッシュ側面より照射すると, カルシウムイオンの伝搬が計測された. 動物実験に関しては, 追試を

行っていた他の研究グループより、マウスの麻酔の深度が浅い場合、超音波装置の作動音に反応して一時的に覚醒するということがあるということが報告された。また、細胞実験に関しては、我々が行った超音波実験より、細胞培養ディッシュ内の寸法や照射方向などが超音波による音場形成に与える影響が大きいことがわかり、これまで *in vitro* で超音波 NM が生じるとされてきた超音波照射条件の再検討も必要なが示唆されている。

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 8 件)

- (1) T. Shigematsu, K. Koshiyama, and S. Wada, Molecular dynamics simulations of pore formation in stretched phospholipid/cholesterol bilayers, *Chemistry and Physics of Lipids*, 2014, <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2014.05.005>, in Press, (査読有)
- (2) 越山 顕一朗, 和田 成生, 衝撃波による細胞膜構造変化: 分子動力学シミュレーション, 第 26 回バイオエンジニアリング講演会講演論文集, 13-69, 2014, P39. (査読無)
- (3) 重松 大輝, 越山 顕一朗, 和田 成生, 分子動力学シミュレーションを用いた細胞膜中での臨界可逆孔径の推定, 第 26 回バイオエンジニアリング講演会講演論文集, 13-69, 2014, P261-P262. (査読無)
- (4) 安藤 直也, 重松 大輝, 越山 顕一朗, 伊井 仁志, 宮崎 浩, 和田 成生, Well on water surface 型ソノレーションシステムの開発: ディッシュ内音場の変化が分子導入効率に及ぼす影響, 関西学生会平成 25 年度学生員卒業研究発表講演会前刷集, '14.3, 2014, P2-9. (査読無)
- (5) 越山 顕一朗, 細胞膜分子動力学シミュレーションと医工学技術開発の融合, 計算数理工学レビュー, No.2013-1, 2013, P27-P33. (査読無)
- (6) 越山 顕一朗, 超音波作用下での脂質膜構造変化: 分子動力学シミュレーション, 第 4 回マイクロ・ナノ工学シンポジウム講演論文集, in DVD, 2012, OS1-1-2, (査読無)
- (7) 越山 顕一朗, 超音波作用下におけるイオンの脂質膜透過の分子シミュレーション, 日本機械学会 2012 年度年次大会講演論文集, in DVD, 2012, J026016, (査読無)
- (8) 越山 顕一朗, 木下 学, 和田 成生, 超音波作用下での脂質膜の分子レベルの構造変化, 第 24 回バイオエンジニアリング講演会, in DVD, 2012, 7E32, (査読無)

[学会発表] (計 9 件)

- (1) 越山 顕一朗, 超音波刺激による細胞膜構造変化, 分子動力学シミュレーション, 日本機械学会部門協議会「高度物理刺激と生体応答に関する研究分科会」第 4 回分科会特

別講演会, 2014.01.31, 大阪府

- (2) 越山 顕一朗, 和田 成生, 衝撃波による細胞膜構造変化: 分子動力学シミュレーション, 第 26 回バイオエンジニアリング講演会, 2014.1.11-12, 宮城県
- (3) 越山 顕一朗, 細胞膜構造変化に関する非平衡分子動力学シミュレーション, 第 17 回オーガナイズド混相流フォーラム, 2013.12.05-06, 千葉県
- (4) 越山 顕一朗, 超音波医療技術開発における分子動力学シミュレーションの役割, 日本生体医工学会 分子デリバリー研究会, 2013.09.24, 東京都
- (5) 越山 顕一朗, 細胞膜分子動力学シミュレーションと医工学技術開発の融合, 第 24 回 計算数理工学フォーラム, 2013.03.29, 東京都
- (6) 越山 顕一朗, 超音波作用下での脂質膜構造変化: 分子動力学シミュレーション, 第 4 回マイクロ・ナノ工学シンポジウム, 2012.10.24-26, 福岡県
- (7) 越山 顕一朗, 超音波作用下におけるイオンの脂質膜透過の分子シミュレーション, 日本機械学会 2012 年度年次大会, 2012.09.09-12, 石川県
- (8) 越山 顕一朗, MD によるナノバイオフィジオロジー研究, 第 20 回バイオフィジオロジー研究会, 2012.02.24-25, 京都府
- (9) 越山 顕一朗, 木下 学, 和田 成生, 超音波作用下での脂質膜の分子レベルの構造変化, 第 24 回バイオエンジニアリング講演会, 2012.01.07-08

[図書] (計 1 件)

(分担)越山 顕一朗, 技術情報協会, ナノ・マイクロカプセル(状微粒子)の調整・評価・応用<<検討例集>>(仮題), (2014 発刊予定)

[その他]

ホームページ等

<https://sites.google.com/site/drkklab/>

<http://www.tylerlab.com/projects/ultrasound/bphys>

6. 研究組織

(1)研究代表者

越山 顕一朗 (KOSHIYAMA KENICHIRO)

大阪大学・基礎工学研究科・助教

研究者番号: 80467513