

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K01284

研究課題名(和文) 脂質殻ナノ気泡の物理現象解明に基づく次世代超音波造影剤開発プラットフォーム

研究課題名(英文) Next-generation ultrasound contrast agent development platform based on elucidating the physical phenomenon of lipid coated nanobubbles

研究代表者

越山 顕一郎 (Koshiyama, Kenichiro)

大阪大学・基礎工学研究科・講師

研究者番号：80467513

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：脂質分子および水分子の粗視化モデルを用いて脂質殻ナノ気泡の分子モデルの構築し、脂質殻ナノ気泡の物理現象として脂質殻ナノ気泡の崩壊および気泡崩壊後のベシクル形成のメカニズムに関して非平衡分子動力学シミュレーションを用いて明らかにした。さらに、脂質組成の気泡崩壊やベシクル形成への影響、および周期的なひずみ負荷下における脂質殻ナノ気泡の構造変化による非線形な圧力応答も明らかにした。本研究に関連した一連の解析技術・結果により、脂質殻ナノ気泡の応用である次世代超音波造影剤の計算機を利用した開発援用技術のプラットフォームを構築した。

研究成果の概要(英文)：We developed a molecular model of lipid-coated nanobubbles using a coarse-grained model of lipid and water molecules. We clarified lipid molecular dynamics of collapsing nanobubbles and subsequent lipid vesicle formation using nonequilibrium molecular dynamics simulations. In addition, we developed methods for analyzing structural changes of nanobubbles and analyzed the effects of lipid compositions of nanobubbles on the collapse and lipid vesicle formation. The methods and algorithms developed in this study will be a basis of the computer-aided development of next-generation ultrasound contrast agents.

研究分野：生体膜分子動力学

キーワード：脂質殻 粗視化モデル 超音波造影剤 周波数応答 リポソーム 非平衡分子動力学

1. 研究開始当初の背景

超音波医療画像診断では、体内で音響インピーダンスの違いを強調させる“造影剤”としてマイクロサイズの殻付きガス気泡が一般的に利用されている。従来の造影剤では送達に難しかった細胞間のギャップを通して腫瘍組織へ造影剤を届かせるため、また薬剤分子のキャリアとして、細胞膜の主成分で生体適合性の高い脂質分子を殻としたナノサイズ(直径数 nm~数 100 nm)のガス気泡(脂質殻ナノ気泡)が、研究開始当初から注目され始めて来ている。しかしながら、以下の4つの問題に起因した現象理解の困難さがあり、その十分な設計・開発が行われていないのが現状であった：

- (1) ナノサイズの気泡の直接観察は容易ではない。(光の波長以下)
- (2) 過去の造影剤開発で利用されてきた、マイクロサイズの気泡に関する連続体理論のナノサイズの気泡への適用の可否が不明である。具体的には、脂質殻ナノ気泡では、脂質殻の厚み(数 nm)がバブル径に近く、殻を構成する分子数も数 100~数 10,000 個程度で、気泡の球形状の仮定や一様な材料定数とみる従来の連続体的な取り扱いが難しい。
- (3) 分子論に基づいた解析を行おうとしても、通常の全原子分子動力学(MD)シミュレーションで扱うには系が大きすぎて現実的な時間で計算が収束しない。
- (4) 超音波下での気泡のダイナミクスを扱う非平衡 MD が未発達である。

これらの問題点に対して、我々は、上記(1, 2)には連続体ではなく脂質分子系の MD シミュレーション、(3)には近年開発されている粗視化分子モデル、(4)には申請者が過去行ってきた、超音波照射下での脂質膜構造変化をシミュレーションし解析する手法を応用することで解決できると考えた。また、近年の創薬分野では効率的な薬剤開発のため、

実験を行う前に分子レベルのデータベースを利用した薬剤分子のスクリーニングが不可欠になっている現状を鑑み、ナノサイズ気泡に関わる分子レベルの物理現象を明らかにすると共に、脂質殻ナノ気泡の分子レベルの物理特性をデータベース化して実験条件や殻の組成などを検索できるようにすれば、次世代造影剤開発が効率的に行えると考え、本研究を着想するに至った。

2. 研究の目的

本研究は、ナノサイズの脂質殻ガス気泡(脂質殻ナノ気泡)の分子モデルを構築して平衡・非平衡分子動力学シミュレーションを行うことで、実験観察や連続体理論の適用が難しい脂質殻ナノ気泡のダイナミクス、物理特性(物理パラメータ、圧力変動下での構造変化、組織化過程、脂質殻組成の違いによる特性変化など)を明らかにすることを目的とした。さらに、それら分子シミュレーションから得られるダイナミクスや物理特性データをデータベース化し次世代超音波造影剤開発に繋げるための *in silico* プラットフォームを構築することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究課題を遂行するため、以下の4章に示すように、(1)脂質分子および水分子の粗視化(Coarse Grained, CG)モデルを用いた脂質殻ナノ気泡の分子モデルの構築、(2)非平衡 MD シミュレーションを利用した脂質殻ナノ気泡の崩壊および気泡崩壊後の脂質分子集合体の相変化の解析手法の開発と解析、(3)気泡崩壊後の脂質集合体の相変化、および物性への脂質殻組成の影響の解析、(4)周期的な圧力変化下における脂質殻ナノバブルの構造変化の解析手法の開発・解析を、実行した。

4. 研究成果

(1) 脂質殻ナノ気泡の分子モデル構築

本研究では、脂質分子の CG モデルとしてよく利用され、実績のある MARTINI 力場を

使用した。この力場は、分子構造を忠実に粗視化するのではなく、脂質分子の凝集に特に影響を及ぼす油/水分分配係数を再現できるように、粗視化した塊 (bead) のパラメータを最適化している。脂質殻ナノ気泡を構成する脂質分子として、実験・計算共によく扱われているジパルミトイルフォスファチジルコリン (DPPC) 分子を用いた。CG モデルでは、一つの DPPC 分子を合計 12 個の beads で、4 個の水分子で極性を持つ一つの bead 表現されている。

脂質殻気泡を実験室で作製する際、一般的に、脂質分子の水懸濁液に超音波を照射する。超音波の負圧により水中で発生した気泡の気液界面において、脂質分子はその界面活性特性により自発的にその界面を覆うことが予想される。本研究では、この状況を模擬し、事前に形成した気泡の周囲を脂質分子で覆った系を初期構造とした。このため、まず、全方位に周期境界条件を課した立方体の基本セルを水分子で満たし、温度・体積一定の平衡 MD 計算を行った。次に、平衡化した水系の中央から球領域をくり抜き、その界面を DPPC 分子が単層を形成するように覆った。この時、DPPC 分子は親水性部分を水分子層に、疎水性部分を気相に向けて配置した。次に、上記手順で作製した脂質殻ナノ気泡系を初期条件として温度・体積一定の MD 計算を行うことで、安定な脂質殻ナノ気泡系を構築することができた。さらに、位置スケールリング法、および系を任意の方向に複製して接合する手法を組み合わせることで、任意の脂質分子の表面密度、気泡直径を持つ脂質殻ナノ気泡系を作製するアルゴリズムを提案した。本研究で開発した脂質殻ナノ気泡の分子モデルを応用することで、今後、分子レベルからの脂質殻ナノ気泡のより詳細な物性値予測へとつながることが期待される。

(2) 脂質殻ナノ気泡の崩壊および気泡崩壊後の脂質分子集合体の相変化の解析

脂質殻ナノ気泡の特徴的なダイナミクスとして、負圧により生じた気泡の崩壊現象が挙げられる。この現象を明らかにするため、上記(1)で構築した様々な気泡直径を持つ脂質殻ナノ気泡系に対して、温度 323 K、圧力 0.1 MPa で一定の MD 計算を行った。温度制御法として *v-rescale* 法、圧力制御法として Berendsen の等方圧力制御法を用いた。また、本研究では、脂質殻ナノ気泡の崩壊という非平衡現象に関して、計算によって得られる脂質分子のトラジェクトリから各時刻における Gyration テンソルとその不変量を用いた構造変化を解析する新たな手法を提案した。今後、この解析手法を利用した脂質殻ナノ気泡の非平衡現象の定量的な理解が加速する可能性を秘めている。

非平衡 MD 計算により、脂質殻ナノ気泡の崩壊が、圧力負荷による、単層構造の脂質殻の球形状から長楕円体形状への変形、楕円体形状脂質殻の長軸端の一方における単層の脂質膜が会合した二重層構造である“折り畳み”の形成、“折り畳み”の急速な伸展と円板形状の脂質凝集体形成、によって進展することが明らかになった。さらに、脂質殻ナノ気泡を構成する脂質分子の数が多の場合、円板状の脂質凝集体はさらにカップ形状を経て、最終的に脂質二重層によるカプセル構造であるベシクル形状へと遷移することがわかった。特に、上記の崩壊過程において、直径の大きい脂質殻ナノ気泡では、“折り畳み”が脂質殻の様々な場所で同時に生じる“マルチ折り畳み”構造が形成する場合があり、これはその後、ベシクルが二つ以上つながったマルチベシクル構造の形成を促すなど、多様なベシクル形成に関わることが示唆された。以上の知見は、研究当初は予期していなかった発見であり、ベシクルを利用したドラッグデリバリーシステム技術開発への波及効果が期待できる。

(3) 気泡崩壊後の脂質集合体の相変化、お

よび物性への脂質組成の影響の解析

脂質分子の疎水鎖が飽和脂肪酸で構成されている DPPC に対して、不飽和脂肪酸を持つジリノレイルフォスファチジルコリン (DLPC) を用いて、気泡崩壊に関する脂質分子疎水鎖の組成の影響を調べた。DLPC を脂質殻とするナノ気泡の崩壊では、“マルチ折り畳み”構造が形成しやすく、それに伴い崩壊後に形成するベシクル構造はより複雑になることが明らかとなった。また、DPPC を脂質殻とするナノ気泡に比べ、少ない分子数でベシクル形成することもわかり、これは、DLPC 脂質殻の曲げ弾性が関わっていることが示唆された。また、脂質殻ナノ気泡を安定化させる手法として、ポリエチレングリコール (PEG) を添加する方法が提案されているが、PEG の影響により脂質膜の粘弾性特性が変化することも予想された。

(4) 脂質殻ナノ気泡の周波数特性解析

脂質殻ナノ気泡の周波数特性を明らかにするため、(1) で構築した脂質殻ナノ気泡の分子モデルを用い、様々な振幅のサイン波状の引張り負荷に対する系の応答を MD 計算によって調べた。特に、脂質殻ナノ気泡系の体積を振幅・周波数を固定してサイン波状で変化させ、これに対する系の圧力の時間応答を解析した。この時、系の周期的な体積変化による分子運動の MD 計算は、位置スケールングアルゴリズムを用いることで実装した。

直径約 60 nm の脂質殻ナノ気泡を含む計算系に対して、周波数一定で、様々な振幅の体積ひずみを周期的に負荷した。脂質殻ナノ気泡系の初期圧を基準とした圧力応答を解析したところ、振幅の増大と共に圧縮時に非線形な圧力応答が生じることがわかった。この時、脂質殻の一部で座屈が生じていることが観察された。非線形な圧力応答は、超音波造影を考えた場合重要な情報となりうる。以上より、本研究に関連した一連の解析技術・結果により、脂質殻ナノ

気泡の応用である次世代超音波造影剤の計算機を利用した開発援用技術のプラットフォームを構築した

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9件)

- (1) K. Koshiyama, Collapsing of a lipid-coated nanobubble: molecular dynamics simulations, Abstract of The 3rd International Workshops on Advances in Computational Mechanics (国際学会), in CD, 131, 2015. (査読無)
- (2) 越山顕一郎 和田成生, 脂質殻ナノ気泡の分子シミュレーション, 日本機械学会第93期流体工学部門講演会講演論文集, in USB, 313, 2015. (査読無)
- (3) K. Koshiyama, S. Wada, Collapse of a lipid-coated nanobubble and subsequent liposome formation, Scientific Reports, 6, 28164, 2016. (査読有)
DOI:10.1038/srep28164
- (4) 車谷亮太郎, 越山顕一郎, 和田成生, PEG 化脂質二重膜の粘弾性特性に関する粗視化分子動力学シミュレーション, 第64回レオロジー討論会講演要旨集, 204-205, 2016. (査読無)
- (5) 車谷亮太郎, 越山顕一郎, 和田成生, 高速な力学的負荷下での PEG 化リポソームの破断に関する分子動力学解析, 日本機械学会 2016 年度年次大会講演論文集, in DVD, 2016. (査読無)
- (6) 越山顕一郎, 医工学技術開発に関わる非平衡生体膜分子動力学研究, 粉体工学会第52回夏季シンポジウム講演要旨集, 23-24, 2016. (査読無)
- (7) 種子尾将希, 越山顕一郎, 重松大輝, 和田成生, 二成分脂質ナノリポソーム形成に関する分子動力学シミュレーション, 日本機械学会第30回バイオエンジニアリング講演会講演論文集, 158, 2017. (査読無)
- (8) 種子尾将希, 越山顕一郎, 重松大輝, 和田成生, ナノリポソーム形成過程における脂質分子組成の影響に関する分子動力学解析, 日本機械学会第28回バイオフロンティア講演会講演論文集, in USB, 2017. (査読無)
- (9) 越山顕一郎, 和田成生, 周期的な圧力変動下での脂質殻ナノバブルの構造変化の分子シミュレーション, 日本機械学会第30回バイオエンジニアリング講演会講演論文集, 155, 2017. (査読無)

[学会発表](計8件)

- (1) K. Koshiyama, Collapsing of a lipid-coated

nanobubble: molecular dynamics simulations , The 3rd International Workshops on Advances in Computational Mechanics (国際学会), 2015 .

- (2) 越山顕一郎, 和田成生, 脂質殻ナノ気泡の分子シミュレーション, 日本機械学会第93期流体工学部門講演会, 2015.
- (3) 車谷亮太郎, 越山顕一郎, 和田成生, PEG化脂質二重膜の粘弾性特性に関する粗視化分子動力学シミュレーション, 第64回レオロジー討論会, 2016 .
- (4) 車谷亮太郎, 越山顕一郎, 和田成生, 高速な力学的負荷下でのPEG化リポソームの破断に関する分子動力学解析, 日本機械学会2016年度年次大会, 2016.
- (5) 越山顕一郎, 医工学技術開発に関わる非平衡生体膜分子動力学研究, 粉体工学会第52回夏季シンポジウム(招待講演), 2016 .
- (6) 種子尾将希, 越山顕一郎, 重松大輝, 和田成生, 二成分脂質ナノリポソーム形成に関する分子動力学シミュレーション, 日本機械学会第30回バイオエンジニアリング講演会, 2017 .
- (7) 種子尾将希, 越山顕一郎, 重松大輝, 和田成生, ナノリポソーム形成過程における脂質分子組成の影響に関する分子動力学解析, 日本機械学会第28回バイオフロンティア講演会, 2017 .
- (8) 越山顕一郎, 和田成生, 周期的な圧力変動下での脂質殻ナノバブルの構造変化の分子シミュレーション, 日本機械学会第30回バイオエンジニアリング講演会, 2017.

〔図書〕(計1件)

- (1) 越山顕一郎 ほか, 羊土社, 分担執筆: 実験医学(増刊)生命科学で使える初めての数理モデルとシミュレーション(鈴木貴久保田浩行編), 139-144, 2017 .

〔その他〕

ホームページ等

<https://sites.google.com/site/biomechwadalab/gallery>

6. 研究組織

(1)研究代表者

越山 顕一郎 (KOSHIYAMA KENICHIRO)
大阪大学・基礎工学研究科・講師
研究者番号: 80467513

(2)研究分担者

和田 成生 (SHIGEO WADA)
大阪大学・基礎工学研究科・教授
研究者番号: 70240546

(3)連携研究者

重松 大輝 (DAIKI SHIGEMATSU)
大阪大学・国際医工情報センター・特任助

教(常勤)

研究者番号: 50775765

(4)研究協力者

車谷 亮太郎 (KURUMATANI RYOTARO)
大阪大学・基礎工学研究科・博士前期課程
種子尾 将希 (TANEO MASAKI)
大阪大学・基礎工学研究科・博士前期課程