

令和 5 年 5 月 29 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K20169

研究課題名（和文）外傷性脳損傷の初生：分子スケールでの細胞損傷の予測

研究課題名（英文）Initiation of Traumatic Brain Injury: Predicting Cellular Damage at the Molecular Scale

研究代表者

重松 大輝 (Shigematsu, Taiki)

大阪大学・大学院基礎工学研究科・助教

研究者番号：50775765

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：頭部に衝撃が加わった際に脳実質内の間質液に非生理的な流れが生じる。この流れが細胞膜に与える影響を分子レベルで明らかにするために、せん断流れ下でのリン脂質二重膜の分子動力学シミュレーションを行った。その結果、一定以上のせん断速度の下では、膜の構造が不安定になり、膜破断に至ることが分かった。この分子レベルでの不安定現象を引き起こす臨界のせん断速度の大きさは線形安定性解析から予想できることを示した。また、一定以下のせん断速度の下では、膜に負の張力が発生し、膜が圧縮されることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、せん断流れがリン脂質二重膜に与える分子レベルでの影響を構造・力学的な面から明らかにし、理論モデルと比較することで理論的な予想の限界を示し、補間を行った点で学術的な意義がある。これらの成果は力学的負荷による生体膜の損傷というモデル化が難しかった部分について基礎的な知見を与えるもので、今後の膜損傷予測モデルの基盤になると期待される。また、近年の細胞工学技術の発展により、細胞単体や細胞組織を工学的に操作する必要性が増している。本研究で明らかにした力学的負荷と膜の関係は、外傷性脳損傷だけでなく、細胞操作時に細胞に与えられる負荷の許容範囲を力学的根拠に基づいて定める助けになりうる。

研究成果の概要（英文）：When an impact is applied to the head, non-physiological flow occurs within the interstitial fluid of the cerebral parenchyma. To investigate the effect of this flow on the cell membrane at the molecular level, molecular dynamics simulations of phospholipid bilayers under shear flow were conducted. The results revealed that the membrane structure becomes unstable and eventually ruptures when the applied shear rate exceeds a critical value. The critical shear rate could be predicted through linear stability analysis. Additionally, it was observed that the membrane experiences negative tension and undergoes compression below the critical shear rate.

研究分野：生体工学

キーワード：分子動力学シミュレーション 生体膜 せん断流れ 不安定性

1. 研究開始当初の背景

外傷性脳損傷(Traumatic Brain Injury, TBI)は、頭部に機械的な衝撃が加わることによって起こる障害で、頭部外傷での死亡原因の約 30%を占め、一命をとりとめた場合でも意識障害・脳神経麻痺・四肢の運動麻痺などの様々な症状を引き起こす。頭部への衝撃の原因は、転倒、転落、暴行、スポーツや交通事故など日常的なものが多く、一年で 5,000 万人以上が TBI に罹り、それによる経済損失も一年で 4,000 億ドルに及ぶと見積もられており、TBI の予防・診断・治療手法の確立は世界的急務となっている(Lumba-Brown A. et al., JAMA Pediatrics, 172: e182853, 2018; Alves J.L. et al., World Neurosurg., 130:115-121, 2019)。

脳はマルチスケールな構造体である。脳の本体である脳実質は、主に神経細胞とグリア細胞、そしてその周囲の脳間質液からなる。神経細胞は神経活動を行うために、軸索で他の神経細胞と接している。グリア細胞は、神経細胞間や血管を構成する細胞群との間を埋め、それらを機械的に支持する役割を担っている。脳の血管は、他の部位の血管とは異なり、血管内皮細胞同士がタイトジャンクション(TJ)と呼ばれる密な接続関係を持っており、血管系から脳間質液へ受動的に物質が漏れるのを防いでいる(血液脳関門)。

臨床研究から、TBI では脳内の広範囲にわたって神経細胞の軸索や血液脳関門が損傷すること、受傷時には一見外傷・症状がない場合でも、数時間から数週間後に症状が現れる場合も多いことなどが明らかになっている。これらのことから、頭部に機械的な衝撃がかかることによる一次的な脳損傷が脳内環境の恒常性を崩し、それによる二次的な脳損傷が時間的・空間的に伝播し、それら複合的な要因から TBI は発症するのではと考えられている。人や動物モデルを対象とした *in vivo* 実験は頭部への侵襲性が極めて高いため、実験デザインが難しく、そのメカニズムを直接とらえることは困難である。近年、*in vivo* 実験を代替または補間するという観点から、数値計算アプローチが注目され、頭部の筋骨格系や脳実質系の全脳マルチスケールモデルの構築と解析などが行われてきた。これらの研究では、脳実質を連続体とみなし、脳実質に生じる応力分布から細胞にかかる力学的負荷の大きさの見積もりが行われてきた(e.g., Cloots R., et al., Biomech. Model. Mechanobio., 12:137-150, 2013)。しかし、個々の細胞に損傷が起こるかや TJ が崩れるかなどは、分子スケールの現象であるため、連続体ベースの数値シミュレーションから直接予想することは難しい。培養細胞を用いた *in vitro* 実験から、力学的負荷による細胞損傷・TJ 崩壊の一部は明らかになっているが、TBI で想定される、短時間に強い力が生じる衝撃負荷において、局所的な力学的負荷をコントロールしつつ、これらの現象を直接観察することは未だ難しい。TBI の初生である力学的負荷による細胞自体の損傷や細胞間接続の崩壊はどのようなメカニズムで起こり、それらが起こる臨界値となる力学的負荷の大きさはどの程度であるのか。これらは、TBI の機序解明とそれによる予測・治療方法の開発のために明らかにしなければならないが、その詳細は未だ明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究では、分子動力学(MD)シミュレーションを用いて、力学的負荷下での細胞損傷の詳細を明らかにする。ここでは細胞の損傷を細胞膜での微小孔の形成や膜破断としてモデル化し、力学的負荷下での膜損傷の詳細を明らかにする。

3. 研究の方法

本研究課題を遂行するために、第 4 章で示すように、(1)様々な組成の膜に衝撃的な速さの引張りが負荷されたときの孔の形成条件と孔のダイナミクスの詳細の解明、(2)膜がせん断流れにさらされた際の膜破断と膜の力学状態の解析、を実行した。

4. 研究成果

(1)様々な組成のリン脂質二重膜における孔形成

単一のリン脂質分子から成る膜(POPC 系)と哺乳類の細胞膜一般を模した膜系(PM 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. 1F)。また、引張速さの増加に伴い、両系において、孔形成に必要な面積ひずみは増加し、どの速さにおいても細胞膜一般を模した膜の方が孔が形成しやすかった。孔はリン脂質分子の疎水性尾部に 5~6 個の二重結合を含む多価不飽和脂肪酸が多い領域に形成しやすく、反対に Lysophosphatidylcholine が多い領域に形成しにくいことが分かった。

(2)せん断流れ下での膜の破断と力学状態の変化

膜の破断について

頭部が打撃を受けた際には、脳実質の変形し、脳間質液の流動が起こると考えられる。その流

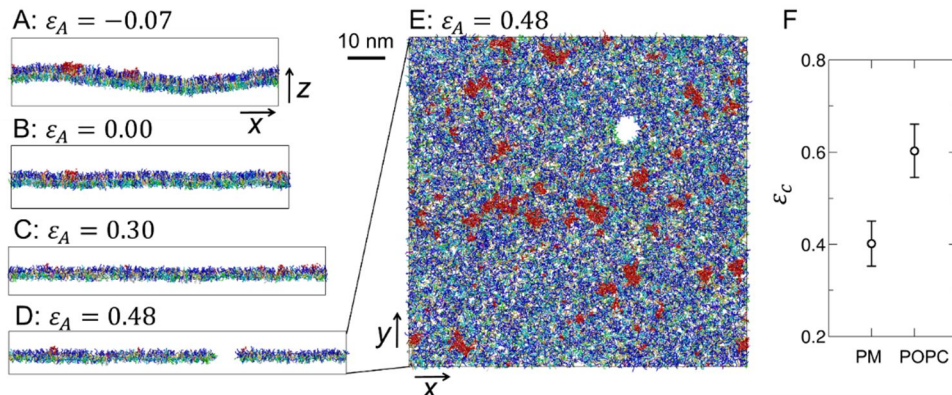


Figure 1 (A-E) 引張下の細胞膜一般モデル膜系. (F) 準静的な引張での孔形成に必要な膜面積ひずみの大きさ.

れが細胞膜に与える影響を明らかにするために、せん断流れ下のリン脂質二重膜の分子動力学シミュレーションを行った。せん断速度が一定値を超えると、膜のうねりの振幅が局所的に大きくなり、膜の破断が起こった。その破断過程が Kelvin-Helmholtz 不安定現象でみられる流体界面の変形挙動に類似していた(Fig. 2A)。そこで、線形安定性解析を行い、系の大きさと膜が不安定化するせん断速度の関係を導出した。理論的な予想は分子動力学シミュレーションの結果とよく一致した。また、導出した理論に基づくと細胞1つのスケールでは、せん断速度が $10^6 \sim 10^8 \text{ s}^{-1}$ 程度の場合に、膜が Fig. 2A に示した過程で膜破断が起こることが予想された。

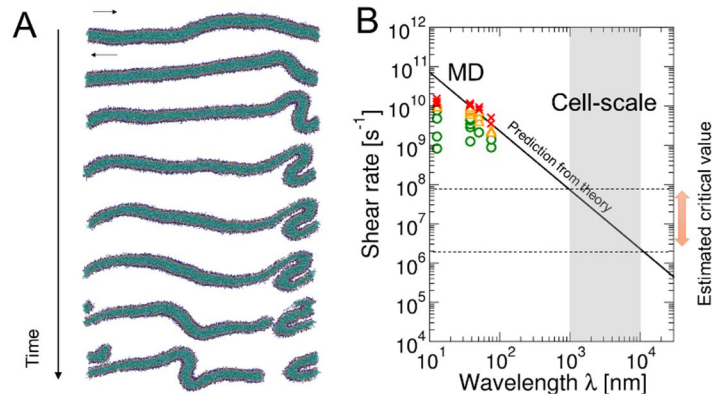


Figure 2 (A) せん断流れ下での膜の破断過程. (B) 系の大きさと破断せん断速度の関係.

膜に生じる張力について

一定以上のせん断速度では上述のような膜の一部が引張られた形状になり、膜が破断する。その一方で、破断が起きないようなせん断速度では、熱揺らぎによる膜のうねりがせん断流れによって抑制され、膜が圧縮されることが理論的に予想されている。ここでは、膜に生じている張力を (i) 膜のうねりのスペクトルと理論、(ii) 膜内の局所的な応力分布、(iii) 膜面積の変化と面積弾性率、の3つの方法で推定した。すべての方法で推定した張力は同程度の値となり、せん断速度の増加に伴い減少した。そして、せん断流れ下では張力は負になり、膜が圧縮されていることが分かった(Fig. 3A)。また、膜内の応力分布の元となっている原子間に働く力の詳細から、負の張力はリン脂質分子の疎水性尾部のファンデルワールス力が主な成分となっており、流れ方向への変化が大きいことが分かった(Fig. 3B)。

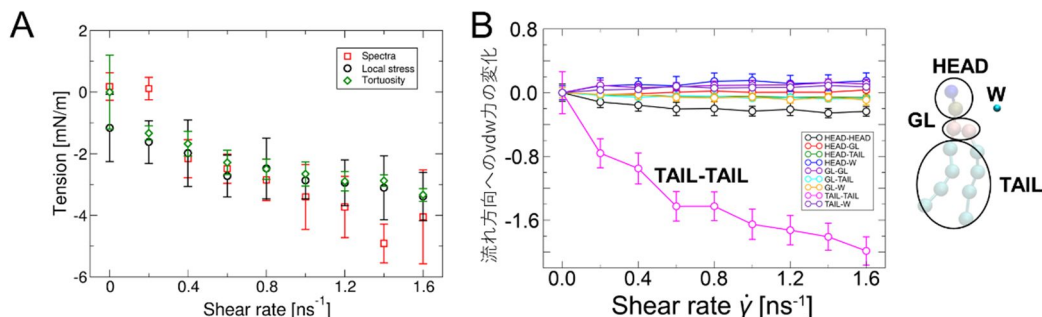


Figure 3 (A) せん断速度と膜に生じる張力の関係. (B) せん断速度と流れ方向のファンデルワールス力の変化の関係.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Shigematsu Taiki, Koshiyama Kenichiro, Wada Shigeo	4. 巻 102
2. 論文標題 Kelvin-Helmholtz-like instability of phospholipid bilayers under shear flow: System-size dependence	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Physical Review E	6. 最初と最後の頁 22408
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1103/physreve.102.022408	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6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 重松大輝, 越山顕一朗
2. 発表標題 せん断流れにより誘起されるリン脂質二重膜の張力：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2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 重松大輝, 越山顕一朗
2. 発表標題 せん断流れ下におけるリン脂質二重膜のうねりに関する分子動力学シミュレーション：超音波医療デバイスによる細胞膜損傷の解明に向けて
3. 学会等名 日本機械学会 2021年度年次大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 重松大輝, 清野健
2. 発表標題 せん断流れ下でのリン脂質二重膜の不安定性：分子動力学解析
3. 学会等名 日本機械学会 第33回バイオエンジニアリング講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 重松大輝, 越山顕一朗
2. 発表標題 せん断流れが脂質二重膜のうねりの特性に与える影響：分子動力学シミュレーション
3. 学会等名 第34 回数値流体力学シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 重松大輝, 越山顕一朗
2. 発表標題 せん断流れ下での脂質二重膜のダイナミクス：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2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 重松大輝, 清野健
2. 発表標題 リン脂質二重膜中における微小孔形成の分子動力学とエネルギー論：細胞膜透過化の理解に向けて
3. 学会等名 日本機械学会 2020年度年次大会
4. 発表年 2020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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------