

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25790097

研究課題名(和文) 血球膜のマルチスケールモデリングと接着現象の解明

研究課題名(英文) Multi-scale modeling of blood cell membrane and clarification of adhesion phenomenon

研究代表者

伊井 仁志 (Ii, Satoshi)

大阪大学・基礎工学研究科・助教

研究者番号：50513016

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)：本研究では、血球の接着挙動および高せん断場での挙動を明らかにするために、1)脂質二重層とスペクトリン層の滑りを考慮した二層膜モデルの構築、2)膜の半透性を考慮した浸透圧による膨張・収縮の定式化の提案、3)実験的な接着力評価のための逆問題推定手法の提案を行った。これにより、高せん断場において、血球膜面で局所的に滑り速度が発生し、また膜応力の局所的な違いが浸透挙動に影響を与えることを明らかにした。さらに、三次元的な変形場を考慮した接着力逆推定の可能性を示すことができた。

研究成果の概要(英文)：In this study, in order to reveal dynamic behaviors of blood cell in adhesion and high shear flow, we have proposed: 1) two-layer membrane model including slipping between lipid bilayer and spectrin network phase; 2) formulation for osmotic swelling and shrinking of a capsule with a semi-permeable membrane; 3) inverse analysis model for evaluation of adhesion force in an experiment. We have uncovered that, in high shear flow, slipping velocity apparently and locally appears on the membrane, and local difference of the membrane force affects the osmotic behavior of the blood cell. Moreover, we have showed a feasibility of the inverse analysis of adhesion force evaluation in experiments that includes a three deformation field.

研究分野：計算力学，バイオメカニクス，数値流体力学

キーワード：血球 マルチフィジックス 連成解析 二層膜 半透膜 浸透圧 接着力推定

1. 研究開始当初の背景

生体において血球は酸素輸送・細菌抵抗・止血など重要な役割を果たしている。血球を構成する生体膜は、両親媒性を有するリン脂質分子からなる脂質二重層と膜貫通タンパクを介して裏打ちされたスペクトリン網から構成され、膜の力学特性は主にそれらにより決定される。脂質二重層は流動性に富み流体的な振る舞いを示すため粘性・面積保存性・曲げ剛性を、またスペクトリン網は弾性体的な振る舞いを示すため粘弾性の性質をそれぞれ考慮し、これらの力学特性を単層膜に集約させ構成関係を導出することで、マクロスケールにおける膜の力学挙動が表現される。しかし実際は、スペクトリン網の頂点に繋がった膜貫通タンパクが脂質二重層に埋まっており、局所的に大きな力が作用した場合、膜貫通タンパクが脂質二重層中を移動する可能性が指摘されており、高せん断流れにおける現象や膜接着因子により血球の一部が他の血球あるいは血管壁に接着する現象など局所的に力が強く作用する現象に関しては、スペクトリン網の局在化あるいは接着因子の局在化が起きる可能性があり、従来の膜力学モデルでは正確な解析が不可能となる。

生体の恒常性維持のために欠かせない存在である血球であるが、熱帯熱マラリアに感染した赤血球は、その変形能が著しく低下するとともに他の血球や血管内皮に対する接着能が発揮され、最終的に血管塞栓を誘発する。また、出血が起きた際に血管壁の損傷部位に直ちに接着・堆積する事で一時的な止血を行う血小板接着に関しても、ある要因により同様のプロセスが病的血管で起き血栓症を引き起こしてしまうことがある。これらの現象のキーワードは血球の接着であり、その力学現象のみに注目した場合でも、分子スケールにおける膜接着因子の運動と連続体スケールにおける血流と血球変形が相互作用を起こす複雑なマルチスケール・フィジックス現象となり、階層的な問題設定が望まれる。

そこで、分子スケール群の現象を統計的に織り込んだ膜力学モデルの構築を行うことにより、上述した過渡的状況における血球挙動解析を達成できると考えられる。

<引用文献>

Knowles et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1997;94;12969

2. 研究の目的

(1)脂質二重層とスペクトリン網の滑りを考慮した膜力学モデルの構築
脂質二重層に埋め込まれたスペクトリン分子群の粗視化学挙動を考慮した血球膜モデルの提案を行いマクロな流体場とのカップリング手法を新たに構築する。これにより、生

体膜を有する血球に対して、膜を構成する分子群スケールでの力学現象(膜に裏打ちされた分子群のクラスタリングや接着因子の局在化)と血球個体スケールでの力学現象(血流による血球変形)を包括的に扱い、血球の大域的挙動と膜の局所状態の関係を明らかにするとともに、血球と血管壁との接着現象の解明を目的とする。

(2)血球膜の半浸透性を有する力学モデルの構築

半透過膜を有するリポソームの接着現象において、周囲溶液の溶質濃度由来の浸透圧変化により接着面積が大きく変わることが知られている。血球を構成する生体膜は同様に半透過膜であるため、周囲溶液の溶質濃度の局所的な変化が接着挙動のみならず流動挙動にも強く影響すると考えられる。そこで、溶質濃度に由来する血球の膨張・収縮を周囲流体の運動と併せて解析することを目指し、平均化手法に基づくアプローチにより血球膜の半透性を考慮した力学・計算モデルの提案を行う。

(3)接着力の逆問題推定手法の構築

血球が接着する際、膜面上に存在するたんぱく質と壁面上に存在するたんぱく質の相互作用により、いわゆるリガンド・レセプタ型の接着が局所的に行われる。接着因子の種類は異なるが、細胞に関しても焦点接着斑を介して局所的に接着が行われる足場が形成される。この際、接着により発生する力を実験的に評価することができれば、シミュレーションモデルの改善、パラメータの同定さらには妥当性検証に繋がっていく。現在、細胞の牽引力の評価として用いられている、牽引力顕微鏡(TFM)では、基板ゲル内に粒子を混入し追跡することで細胞接着により誘起される基板ゲルの変位場を計測し、微小弾性論に基づいた逆問題を解くことで細胞の牽引力場を推定している。従来のTFMでは、問題の簡略化のため、二次元の物理モデルを用いているが、実験的な制約からゲル高さを十分にとれない場合、下面の拘束による三次元的な変形を無視できない可能性がある。そこで、血球の接着力を実験的に取り扱うための予備的検討として、三次元的な変形場を考慮した新たな接着力推定手法の確立を目指す。

<引用文献>

J. J. Foo, V. Chan, and K. K. Liu, Contact deformation of liposome in the presence of osmosis, Ann. Biomed. Eng., vol. 31, pp. 1279-1286, 2003.

Dembo, M., Wang, Y. L., Stresses at the cell-to-substrate interface during locomotion of fibroblasts, Biophys. J., 76 (1999) 2307-2316.

3. 研究の方法

(1) 脂質二重層とスペクトリン網の滑りを考慮した膜力学モデルの構築

Immersed Boundary 法 に膜間の滑りを考慮した拡張を行う。膜の内部流体と外部流体の密度、粘性を同じと仮定し、方程式の平均化を行うと、応力テンソルに界面における速度ジャンプ(滑り速度)の影響が陽に現れる。接線方向の力の釣り合いとして、流体力、膜力および膜貫通タンパクの抵抗力を考えると、その可動に伴う抵抗力は、統計力学的な知見より、膜同士との相対速度(滑り速度)と膜での自己拡散係数より評価されるため、滑り速度は膜面で満たされる速度連続条件および力の釣り合い条件から評価できる。ここで、抵抗係数を用いると可動に伴う抵抗力と滑り速度は線形関係でモデル化される。抵抗係数は、膜の構成成分の違いにより正確な値を見積もるのは困難であることから、本研究では二種類の値を考慮する。膜の構成方程式として、脂質二重層はその力学特性より面積抵抗、またスペクトリン網層は平面変形抵抗を考慮する。ここで、膜面を表す物質点はスペクトリン層を表現し、脂質二重層における面積変化をスペクトリン層にのった座標系でオイラー的に評価し、移流方程式を膜面上で解くことで、面積変化率を輸送させ、各相の滑りを再現する。

(2) 血球膜の半浸透性を有する力学モデルの構築

解析領域を半透膜の内部領域と外部領域および膜領域に分け、各バルク領域における溶質濃度の非定常移流拡散方程式を考える。半透膜においては、各領域で溶質量は保存するため界面条件として流束の釣り合いを導入する。すなわち、拡散流束と膜透過速度と溶質濃度の積が等しくなる。ここで、膜透過速度のモデリングとして、二成分希薄溶液中で与えられる Kedem-Katchalsky 方程式を採用する。本モデルでは、溶媒の膜透過速度が、機械的圧力差と浸透圧差のバランスにより決定される。上記モデルには透水係数と呼ばれる比例定数が含まれており、これは各圧力差のバランスと透過速度を関係させ、通常、実験的に求められる。上記の関係式を界面近傍で空間的に滑らかに分布する指標関数を導入し平均化させることにより、場で平均化された物理量に関する支配方程式を導き出す。これにより、直交固定格子において界面条件を陽に用いることなく定式化が可能となる。また、膜界面と流体の力学的相互作用には Immersed boundary 法 を適用する。流体速度場を Navier-Stokes 方程式を解き求め、膜界面付近における浸透速度を圧力差と溶質濃度差から評価し、流体速度場および浸透速度によって膜面を構成する物質点を移動させる。

(3) 接着力の逆問題推定手法の構築

基板ゲルの変形は微小ひずみ・微小変形を仮定した以下の静的弾性則(定常 Navier の式)に従うとする。本解析系では、細胞が接する面を xy 平面、深さ方向を z 軸とし、基板厚みを一様と仮定する。基板底部は固着され、基板上部において細胞が接着しているとし細胞牽引力による応力境界条件を与える。 z 方向(深さ方向)に Legendre 多項式、 xy 平面上で有限要素における区分関数をそれぞれ重み関数に用い、重み付き残差法により離散化を行う。また、変位ベクトルに対しても Legendre 多項式により展開することで、 xy 面内で有限要素頂点と z 方向の多項式展開自由度の未知数に関する連立方程式が得られる。この離散系における連立方程式を拘束条件として変分問題に適用することで、支配方程式を満足した牽引力推定を行う。仮想的に得られたピーズ変位ベクトルと数値解析による変位ベクトルの二乗誤差を評価関数とし変分問題を構築する。ここで、自由度の不整合により解の不定性を回避するため、Tikhonov の正則化を行う。正則化項としては牽引力の二乗量を持ちいる。この際、パラメータが必要となるため、数値テストによりその影響を調べる。

< 引用文献 >

S. Ii, S. Wada, A Two-Layer Model for Biological Membrane, International Computational Mechanics Symposium 2012 (JSME-CMD ICMS2012), 2013, extended abstract (2 pages).

C.S. Peskin, Acta Numerica, 11 (2002) 479-517.

Z. Peng, R.J. Asaro, Q. Zhu, Multiscale modeling of erythrocytes in Stokes flow, J. Fluid Mech., 686 (2011) 299-337.

O. Kedem, A. Katchalsky, Biochimica et Biophysica Acta, 27 (1958) 229-246.

4. 研究成果

(1) 脂質二重層とスペクトリン網の滑りを考慮した膜力学モデルの構築

単純せん断場中に biconcave 形状を持つ二重膜を配置し、変形形状が準定常状態になるまで解析を行う。図 1 に脂質二重層、スペクトリン網層の局所面積変化(面積ヤコビアン)の分布を示す。結果より、面積抵抗を考慮した脂質二重層においては、抵抗係数によらず面積変化が制限されていることが分かる(面積ヤコビアンが 1 に近い)。一方、スペクトリン網層に関しては、抵抗係数が小さい場合、膜間の滑りが周囲流体により誘発され局所的な面積変化が起きている。せん断率を変化させて際のある抵抗係数における膜上でのエネルギー散逸を図 2 に示す。滑り速度が生じることにより膜面でのエネルギー散逸量が非線形的に増加している様子が確認できる。

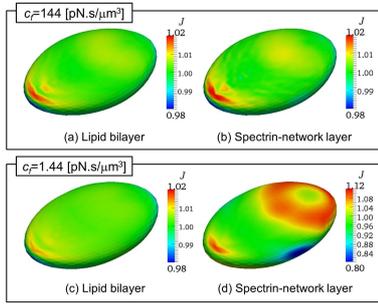


図1 異なる抵抗係数を用いたせん断場中の二層膜を有するカプセル変形の様子。カラーは面積変化率を示し、脂質層およびスペクトリン層で異なる結果を示している。

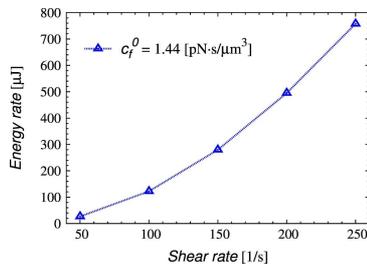


図2 せん断率と膜面でのエネルギー散逸の関係。

次に、狭窄内を通過する血球膜の滑り速度に関するシミュレーション結果を図3に示す。これより、狭窄内を通過する際、血球膜上の滑り速度が局所的に高くなることが分かる。

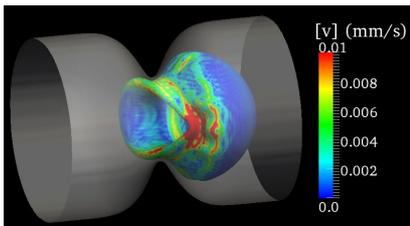


図3 狭窄内を通過する血球膜の様子と滑り速度分布。

提案した血球膜の脂質二重層とその直下に裏打ちされたスペクトリン層間の滑りを考慮したモデルを用いて、せん断速度場における脂質層とスペクトリン層の面積変化がどの程度異なるか調査した。その結果、脂質層は強い面積抵抗を持つため、せん断速度にほぼ依存せずに膜面積の変化が生じない一方、スペクトリン層は脂質内の膜貫通タンパクをアンカーとして適度な抵抗を持ち面積変化が可能となるため、せん断速度に依存して面積変化が生じた。また、せん断速度に依存して、層間の滑りによるエネルギー散逸が非線形的に増加した。これらより、高せん断場における膜間の滑りを考慮した血球運動のモデル化の重要性を示した。また、狭い流路内を通過する血球膜にどのような滑り速度が

働くか調査した。流路内を通過する際に付近の膜面に速い滑り速度が発生し、特に血球後端部が通過する際に非常に速い滑り速度が観察され、血球後端部に大きなシワができ不安定な形状となった。これらより、狭い流路内を通過するような一部高せん断場が形成されるような場合、膜間で滑りが誘起され膜面ひいては血球動態に影響を与えることを示唆した。

(2) 血球膜の半浸透性を有する力学モデルの構築

解析の妥当性を検証するために、半透膜を有する二次元円筒カプセルの浸透挙動を再現する。ここで、カプセル内外に異なる溶質濃度を与えることで浸透現象を駆動し、カプセルの変形挙動および収束挙動を検討する。図4に初期濃度比を0.6とした時の解析結果を示す。時間が進行するにつれ、溶質濃度が拡散・透過し、カプセルが円形状を保ったまま膨潤している様子が確認できる。t=20msにおいては内部濃度と外部濃度が界面を挟んで不連続な状態ではほぼ定常に達している。しかし、外部領域で濃度分布を伴う状態で定常状態に達しており、これは流体・弾性膜の力学カップリングの数値誤差に起因する流体速度場により、移流項とジャンプを含む拡散項が疑似的にバランスしているためであると考えられる。定常状態では、膜の膨潤による伸張力と内外圧力差すなわちラプラス圧が釣り合い、これが浸透圧と釣り合っている事が期待される。そこで t=20msにおける中心y軸における圧力および浸透分圧の分布を図5に示す。なお、界面でのジャンプ量を明確にするため、グラフの両端でゼロとなるようにスカラー値分シフトして表示している。図2より圧力と浸透圧の界面での差は良好な一致を示し、これらがバランスしている事が読み取れる。本解析で用いた条件において、カプセルは円形状を保ったまま膨張あるいは収縮をしており、定常状態におけるカプセルサイズを理論的に求める事ができる。そこで、初期濃度比を0.2から2.0まで0.2刻みで変化させた際の定常状態における面積変化率(A/A0)に関して、数値解と解析解を比較する(図6)。図6より、本解析による数値解と解析解は良好な一致を示している事が確認できる。

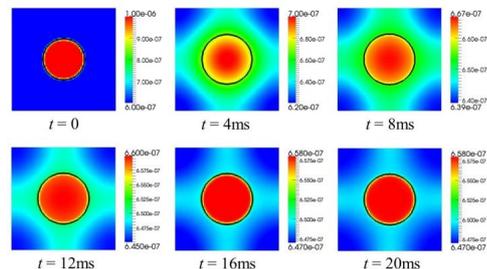


図4 浸透圧による円筒カプセルの膨張・収縮シミュレーション結果。カラーは溶質濃度。

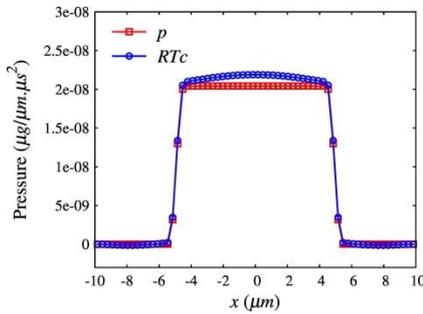


図5 中心y軸における圧力および浸透分圧の分布．初期濃度比は0.6．

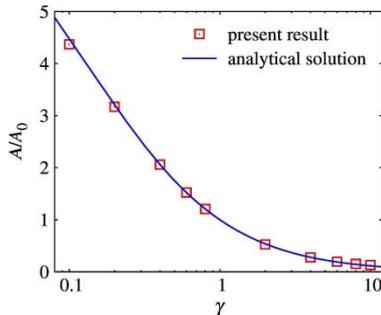


図6 初期濃度比と定常状態における面積比（初期面積との比）に関する関係．実線が理論解．点線がシミュレーション結果．

次にヒト赤血球のパラメータを用い，Galeyによる実験結果とシミュレーション結果を比較する．図7に体積変化率（初期体積との比）の時間変化の様子を示す．結果より，シミュレーションと実験は非常に良く一致している．

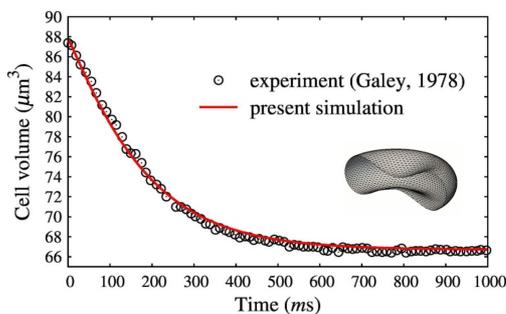


図7 ヒト赤血球の浸透圧による収縮の様子．体積変化率の時間変化．

これらの結果より，半透性を持つ血球に対して，浸透圧による膨張・収縮現象を取り扱うことが可能となった．濃度および張力由来で浸透の状況が変わることから，せん断流中の血球では，膜張力の状況により法線方向の浸透速度が変わることが予想でき，これにより脂質二重層とスペクトリン網間の滑りの状況が変わることが本結果により示唆された．

(3) 接着力の逆問題推定手法の構築

本モデルの妥当性を検証するために，牽引力を既知として与え順問題を解く．この際，z方向の展開に用いた Legendre 多項式の展開次数が結果に与える影響を調べる．図8に結果を示す．なお，参考解として三次元有限差分法により解いた結果(3D FD solution)を示している．図8より，展開次数を上げるにつれ参考解とより一致していく様子が確認でき，本問題では，次数2で参考解に十分匹敵する結果が得られている．これは，z方向に自由度を3つ持たせたことに相当し，Legendre 多項式による高次展開により，この程度の自由度で現象を十分に再現できることを示している．

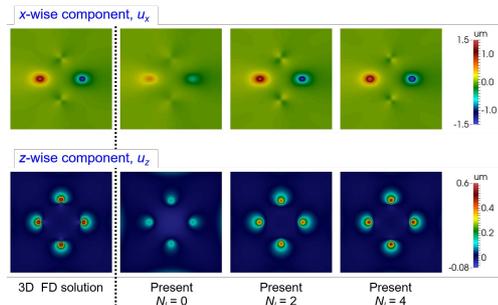


図8 順問題による多項式展開次数の影響の検証結果．ゲル上面におけるx方向変位(上)とz方向変位(下)．

次に提案モデルによる逆問題解析を行う．参考となるビーズ変位は順問題による結果からランダムに抽出し決定する．すなわち，逆問題推定による牽引力場が順問題で境界条件として与えた上面での応力ベクトル分布と一致することが望まれる．図9に推定された牽引力結果を示す．なお，順問題で用いた応力ベクトル境界条件を参考解(Reference)として載せている．結果より，Tikhonovパラメータに依存して，推定結果が変化しており，適当なパラメータを選ぶことで，参考解を非常に良く逆推定できることが確認できる．

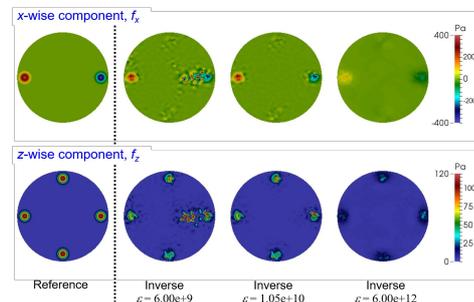


図9 Tikhonovパラメータを変えた際の牽引力推定結果の変化の様子．ゲル上面におけるx方向応力(上)とz方向応力(下)．

基質を模擬したPAAゲルの深さ方向に任意次数の多項式展開により自由度を確保するこ

とで、高精度かつ低コストの解析モデルを提案した。さらに、本モデルを変分問題に基づく逆問題定式化に適用し、接着力の推定を行った結果、低次の展開次数で接着力の空間分布と強度をある程度の精度で推定できることが示された。提案手法より、細胞牽引力顕微鏡(TFM)実験より接着力の空間的分布と強度を得ることが可能となり、提案モデルとの検証・比較を行うことが可能となった。以上より、シミュレーションモデルと実験結果による比較検討のための基礎的技術の確立を行うことができた。

<引用文献>

W.R. Galey, Determination of human erythrocyte membrane hydraulic conductivity, J. Mem. Sci., 4 (1978) 41-49.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計5件)

伊井仁志, 和田成生, 滑り境界を有する二層膜と流体の連成解析, 日本機械学会第25回バイオエンジニアリング講演会講演論文集 (ISSN 1348-2920), 査読無, No. 12-48, 2013, 305 (1頁).

S. Li, S. Wada, A Two-Layer Model for Biological Membrane, International Computational Mechanics Symposium 2012 (JSME-CMD ICMS2012), extended abstract, 査読無, 2013, (2 pages).

伊井仁志, 和田成生, 透過性を有する弾性膜カプセルの変形と濃度輸送の連成解析手法の提案, 日本機械学会第26回計算力学講演会(CD-ROM), 査読無, No.13-3, 2013, 2501(2頁).

S. Li, S. Wada, An immersed boundary method for simulating the osmotic swelling and shrinking of a liquid-filled capsule with semi-permeable membrane, COMPSAFE2014 extended abstract, 査読無, 2014, (3 pages).

伊井仁志, 坂元尚哉, 和田成生, 深さ展開モデルを用いた細胞牽引力の逆解析, 日本機械学会第28回バイオエンジニアリング講演会講演論文集, 査読無, No. 15-69, 2016, 1E21 (2頁).

[学会発表](計7件)

伊井仁志, 和田成生, 滑り境界を有する二層膜と流体の連成解析, 日本機械学会第25回バイオエンジニアリング講演会, 2013年1月9-11日, 産業技術総合研究所つくばセンター(茨城県, つくば市).

S. Li, S. Wada, A Two-Layer Model for Biological Membrane, International Computational Mechanics Symposium 2012, Oct. 9-11, 2012, Campus Hall,

Kobe Univ. and FIBER, Konan Univ (Hyogo, Kobe)

伊井仁志, 和田成生, 透過性を有する弾性膜カプセルの変形と濃度輸送の連成解析手法の提案, 日本機械学会第26回計算力学講演会, 2013年11月2-4日, 佐賀大学大学院工学系研究科(佐賀県, 佐賀市).

S. Li, S. Wada, An immersed boundary method for simulating the osmotic swelling and shrinking of a liquid-filled capsule with semi-permeable membrane, COMPSAFE2014, April 13-16, 2014, Sendai International Center (Miyagi, Sendai).

S. Li, S. Wada, A numerical simulation of an osmotically-swollen/shrunk red blood cell, 7th World Congress of Biomechanics, July 6-11, 2014, Boston (USA).

伊井仁志, 固定格子を用いた連成解析手法の提案と生体力学問題への適用, 第4回計算力学シンポジウム, 2014年12月1日, 日本学術会議講堂(東京都, 港区).

伊井仁志, 坂元尚哉, 和田成生, 深さ展開モデルを用いた細胞牽引力の逆解析, 日本機械学会第28回バイオエンジニアリング講演会, 2016年1月9-10日, 東京工業大学大岡山キャンパス(東京都, 目黒区).

[図書](計1件)

Satoshi Li, Kazuyasu Sugiyama, Shu Takagi and Yoichiro Matsumoto, A Full-Eulerian Approach for the Fluid-Structure Interaction Problem, Lima, R., Imai, Y., Ishikawa, T., Oliveira, M.S.N. (Eds.), Visualization and Simulation of Complex Flows in Biomedical Engineering, Lecture Notes in Computational Vision and Biomechanics, Volume 12, 2014, 47-74.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊井仁志 (II, Satoshi)
大阪大学・大学院基礎工学研究科・助教
研究者番号: 50513016