

衝撃波による細胞膜の透過性変化および

分子導入の分子的機構

学位論文内容の要旨

衝撃波によって、細胞膜に一過性の透過性変化を誘起して、細胞内に分子を直接導入する手法がある。この手法の長所は、衝撃波の伝播により、非侵襲的に、機械的、化学的、熱的作用を、体内に誘起できる点にある。この利点を生かせば、任意のタイミングで、体内の細胞の膜透過性を変化させることが可能であり、体内深部の細胞への分子導入を、より安全で簡便に行うことができると期待される。

衝撃波による分子導入法の問題点として、その分子導入効率が悪いことが挙げられる。分子導入の効率は、究極的には、分子一個一個を、いかに確実に細胞膜を通過させて、細胞内へと導入させるかによって決まる。すなわち、衝撃波による細胞膜の透過性変化と分子導入の機構を、分子一個のレベルで明らかにすれば、その機構に基づいて手法を改善することで衝撃波による高効率な分子導入が可能となる。そこで、本研究では、衝撃波による膜透過性変化と分子導入の機構を分子レベルで詳細に解明することを目的とした。

衝撃波は水中を超音速で伝播し（約 1500m/s）、そのパルス幅は数 10 nm ～ 数 μm である。さらに、細胞膜の厚さは約 5 nm であり、導入分子のサイズが数 nm ～ 数 100 nm であることを考慮すると、衝撃波の作用で分子が細胞膜を通過する時間は μs 以下であると見積もられる。このようなナノレベルでの、極微でしかも高速な現象は、光学顕微鏡はもとより nm の空間解像度をもつ走査型プローブ顕微鏡であっても、リアルタイムな観察は極めて難しい。しかも、従来の連続体理論に基づいた、衝撃波による細胞周囲の流れ場や細胞の変形に関する理論解析では、分子間の相互作用が支配的な、ナノレベルの現象を記述できない。そこで、分子レベルでの現象解明には分子シミュレーションが極めて有効な研究手段となる。

生体系の分子シミュレーションの手法の一つに分子動力学 (MD) 法があり、この手法は系を構成している原子間の相互作用を仮定し、これに基づいて各原子に働く力を求め、全原子に対して運動方程式を連立させて、数値的に解く方法である。これにより、系の時間発展が各原子の軌跡として得られ、分子レベルの現象をオングストローム (10^{-10} m) の空間スケール、フェムト (10^{-15}) 秒の時間スケールで追求することができる。したがって、本研究では、分子レベルでの機構解明のために MD シミュレーションを用いた。

両親媒性の脂質分子で構成された二重の膜（脂質二重層膜）は、全ての細胞膜の基本構造として知られている。すなわち、全ての細胞膜の透過性変化を共通で理解するためには、脂質二重層膜（以下

脂質膜)を対象として、透過性変化を調べることが基本となる。そこで、本研究では、この脂質膜を細胞膜のモデルとし、衝撃波による膜透過性変化と分子導入の機構を調べた。

研究の手始めとして、まず、平衡状態における脂質膜の MD シミュレーションを行った。このシミュレーションから、他の計算結果や、実験結果と一致する結果が得られ、本研究で用いる脂質膜系の MD 計算の手法が確立した。

次に、得られた脂質膜系を使用し、衝撃波が膜を通過するピコ秒の時間スケールでの膜構造の変化を調べた。衝撃波を力積で表現する“衝撃波力積モデル”を新たに構築し、MD における衝撃波のシミュレーション技法として提案した。さらに、衝撃波に伴う非平衡・非定常状態における膜構造変化を分子レベルで解析するために、瞬間平均オーダーパラメータ、積算側方向変位を新たな解析手法として導入した。ここでは、衝撃波の作用による、脂質膜構造の一時的な崩壊と回復、脂質分子の側方向流動性の増加、そして膜疎水領域への水分子の定常的な導入を明らかにした。さらに、これらの構造変化および水分子の導入は、衝撃波の力積値に依存することがわかり、これは従来の衝撃波を用いた細胞への分子導入実験の結果と定性的に一致した。

続いて、衝撃波作用後のナノ秒の時間スケールでの膜構造変化を調べた。ここで、ピコ秒の時間スケールで膜疎水領域に水分子が導入された点に注目し、脂質膜の膜疎水領域に水分子を挿入した初期条件を用意して、MD 計算を行った。この計算から、膜疎水領域への水分子の挿入により、膜を貫く水の孔(水孔)が、ナノ秒の時間スケールで形成されることを明らかにした。この結果は、衝撃波の作用により、細胞膜表面に一次的に穴が形成されるという実験結果に一致した。挿入した水分子の数の増加に伴い、水孔の形成率や水孔の大きさは増加することがわかった。

最後に、脂質膜に挟まれた水分子層中での抗がん剤 5FU 分子の拡散運動を調べた。この計算から、脂質分子の影響によって、脂質膜近傍では 5FU 分子の拡散係数が減少することがわかった。この知見を基にして水孔中の 5FU 分子の拡散を解析した結果から、5FU 分子が水孔を通過するためには、半径 5 nm の水孔が、10 ns 間存在すればよいことがわかった。

以上の研究をまとめると以下ようになる。(1) 衝撃波が細胞膜に作用すると、ピコ秒のオーダーで膜構造が崩壊、回復し、一方で、膜の疎水領域に水分子が一定期間導入され続ける。(2) 膜疎水領域への水分子の導入は、ナノ秒オーダーでの自発的な水孔形成につながる。(3) 水孔が形成されると、その水孔内部を分子が拡散運動により通過する。これらの一連の現象が、衝撃波による細胞膜透過性変化と分子導入の分子的機構の一つであることを本研究によって明らかにした。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 藤 川 重 雄
副 査 教 授 大 島 伸 行
副 査 教 授 明 楽 浩 史
副 査 助教授 矢 野 猛

学 位 論 文 題 名

衝撃波による細胞膜の透過性変化および 分子導入の分子的機構

衝撃波によって、細胞膜に一過性の透過性変化を誘起して、細胞内に分子を直接導入する手法がある。この手法の長所は、衝撃波の伝播により、非侵襲的に、機械的、化学的、熱的作用を、体内に誘起できる点にある。この利点を生かせば、任意のタイミングで、体内の細胞の膜透過性を変化させることが可能となり、体内深部の細胞への分子導入を、より安全で簡便に行うことができると期待される。衝撃波による分子導入法の問題点として、その分子導入効率が悪いことが挙げられる。分子導入の効率は、究極的には、分子一個一個を、いかに確実に細胞膜を通過させて細胞内に導入させるかによって決まる。すなわち、衝撃波による細胞膜の透過性変化と分子導入機構を、分子一個一個のレベルで明らかにすれば、その機構に基づいて手法を改善することにより、衝撃波による高効率な分子導入が可能となる。

本研究は、分子動力学 (MD) シミュレーションにより、衝撃波による膜透過性変化と分子導入の機構を分子レベルで詳細に解明することを目的としてなされたものである。両親媒性の脂質分子で構成された二重の膜 (脂質二重層膜) は、すべての細胞膜の基本構造として知られている。すなわち、すべての細胞膜の透過性変化を共通に理解するためには、脂質二重層膜 (以下、脂質膜) を対象として、透過性変化を調べるのが基本となる。そこで、本研究では、この脂質膜を細胞膜のモデルとして衝撃波による膜透過性変化と分子導入の機構を調べた。得られた結果をまとめると以下のようになる。

- (1) 平衡状態での脂質膜物性に関する本 MD シミュレーションによる結果を、他の計算結果や実験結果と比較して、本手法の妥当性を確認した。
- (2) 衝撃波が膜を通過するピコ秒の時間スケールでの膜構造の変化を調べるため、衝撃波を力積で表現する「衝撃波力積モデル」を提案し、また衝撃波通過に伴う非定常・非平衡状態での膜構造変化を分子レベルで調べるため、「瞬間平均オーダーパラメータ」及び「積算側方向変位」を導入した。その結果、衝撃波の作用による脂質膜構造の一時的な崩壊と回復、脂質分子の側方向流動性の増加、膜疎水領域への水分子の一定期間の導入現象の存在を明らかにした。これらの構造変化及び水分子の導入は、衝撃波の力積値に依存するという従来の衝撃波を用いた細胞への分子導入実験結果と定性的に一致した。

(3) 衝撃波作用後のナノ秒の時間スケールでの膜構造の変化を調べるため、脂質膜の疎水領域に水分子を挿入した初期条件を用意してシミュレーションを行い、膜疎水領域への水分子の挿入により、膜を貫く水の孔 (水孔) がナノ秒の時間スケールで形成されることを明らかにした。この結果は、衝撃波の作用により一時的に孔が形成されるとする実験結果を支持するものである。また、挿入した水分子の数の増加に伴い、水孔の形成率や水孔の大きさが増加することがわかった。

(4) 脂質膜に挟まれた水分子層中での抗がん剤 5FU 分子の拡散運動を調べて、脂質分子の影響により、脂質膜近傍では 5FU 分子の拡散係数が減少することを明らかにした。この知見から、5FU 分子が水孔を通過するためには、半径 5nm の水孔が 10ns 間存在すればよいことがわかった。

これを要するに、著者は衝撃波による細胞膜の透過性変化と細胞膜内への抗がん物質の導入機構を MD シミュレーションに基づき分子レベルで調べることにより、(1) 衝撃波が細胞膜に作用すると、ピコ秒の時間スケールで膜構造が崩壊、回復し、一方で、膜の疎水領域に水分子が一定期間導入され続けること、(2) 膜疎水領域への水分子の導入は、ナノ秒スケールでの水孔構造の形成につながること、(3) 水孔が形成されると、その水孔内部を分子が拡散運動により通過すること、を明らかにした。この分子導入のメカニズムの提唱は、気泡によるがん細胞膜内への抗がん物質導入の効率化向上に示唆を与えたものであり、さらには分子流体力学の発展に貢献するところ大なるものがある。よって、著者は北海道大学博士 (工学) の学位を授与される資格があるものと認める。