

糖鎖層を持つ血管内皮細胞間隙を 透過するリポソームの運動

浅山 景子 (Keiko ASAYAMA)^a
牧野 真人 (Masato MAKINO)^{a,c}
伊藤 聡 (Satoshi ITOH)^{b,c}
佐野 理 (Osamu SANNO)^{a,c}

^a 東京農工大学・工学府

Department of Applied Physics, Tokyo University of Agriculture and Technology

^b 東芝・研究開発センター

Corporate Research & Development Center, Toshiba Corporation

^c JST-CREST

I. はじめに

白血球は通常血液中を循環しているが、血管外組織における感染・外傷が生じた場合には免疫反応を行うために血中から血管外へ浸潤、患部へ集積する（白血球遊走 leukocyte migration）。毛細血管内腔を構成する個々の内皮細胞は、糖衣 glycocalyx と呼ばれる林立した糖鎖分子群によってその表面が恒常的に覆われている。特に炎症時に患部近傍の細胞間隙に発現する糖鎖は白血球と特異的な結合をすることで患部への集積を助けることがよく知られている¹⁻⁴。この白血球の機構を模して設計されたリポソーム（薬剤ナノ粒子）には、血液循環によって患部へ搬送される過程で、毛細血管内皮細胞間隙を経由して血管外へ浸潤し標的部位へ到達することが期待されている。

リポソームが細胞間隙に接近し透過する際には糖鎖層を持つ内皮細胞との間で流体力学的相互作用が重要になる。この作用を考慮してリポソームの運動を予測するシミュレーションプログラムを開発し、投与するために最適なりポソームの寸法・形状・表面上での糖鎖の修飾密度・血中濃度といった条件を製薬設計部門へフィードバックすることが本研究の最終的な目標である。しかしながら、現状では医学・製薬分野と物理分野の隔たりは大きく、糖鎖層の基礎的な物理的特性についてさえ未解明な点が多い。

そこで本研究では、力学的特性を既知と仮定して物理学的に矛盾のない糖鎖変形モデルを構築し、医学的・解剖学的見地からの検証が可能なデータを提供することを目指す。本稿の目的は計算上必要十分な要素数を確認すること、および糖鎖の柔らかさ、変形し易さ (flexibility) に対するリポソームの並進運動の依存性を評価することである。本稿では、糖鎖が内皮細胞と連結した下端の部分で回転すること (pivoting) を許した。

II. 基礎方程式と数値シミュレーションの方法

ビーズモデルは、問題としている対象物体を剛体球の集合によって粗視化し、流体力学的相互作用を計算するモデルとして知られている。本研究ではビーズモデルを採用し、リポソーム、血管内皮細胞、および細胞上の糖鎖層をビーズで表した。ビーズの半径の比率は解剖学によって知られる文献値と同程度となるよう定めた。Fig.1 (左) はビーズの配置図である。3次元空間に静止流体を満たし、右手系直角座標系 xyz の xy 平面上に内皮細胞を配置して固定する。内皮細胞ビーズ上には糖鎖を配置する。内皮細胞ビーズの半径 n_E 、リポソームの半径 n_L 、糖鎖を構成するビーズの半径 n_G は、各々 $n_E = n_L = 5$ 、 $n_G = 0.50$ とした。また細胞間隙幅の半値 W は $W = 5$ である。

リポソームの位置 z_L (内皮細胞ビーズを配置した平面からの距離) は、初期 $t = 0$ で $z_L = 30$ とした。リポソームには時間ステップ毎に z 方向負の向きに一定駆動力を付与する。リポソームの運動によってリポソーム周りに速度場が誘起され、周囲の糖鎖層を持つ内皮細胞との間に流体力学的相互作用が生じる。リポソームが細胞間隙に対して十分遠方にあるときにはリポソームの並進速度は与えられた駆動力と単一球に働く抵抗との釣り合いによって決定される。なお、本稿では問題を簡単にするために回転運動は考えない。

リポソームの運動に伴う流れのレイノルズ数は十分小さいので、リポソームの運動は Stokes 近似によって支配される⁵。二つのビーズの間の流体力学的相互作用は次の modified Oseen interaction tensor⁶⁻⁸ によって計算される。

$$\mathbf{T}_{ij} = \frac{1}{8\pi\mu} \left[\left\{ \frac{1}{R_{ij}} + \frac{a_i^2 + a_j^2}{3R_{ij}^3} \right\} \mathbf{I} + \left\{ \frac{1}{R_{ij}^3} - \frac{a_i^2 + a_j^2}{R_{ij}^5} \right\} \mathbf{R}_{ij} \mathbf{R}_{ij} \right] \quad (1)$$

但し、 a_i, a_j は各々 i 番目、 j 番目のビーズの半径、 \mathbf{R}_{ij} は2球間の相対位置ベクトルで、 $R_{ij} = |\mathbf{R}_{ij}|$ である。

i 番目のビーズが速度 \mathbf{U}_i で静止流体中を運動しているとする、このビーズにはたらく力 \mathbf{F}_i は次式で表される。⁸

$$\mathbf{F}_i = -6\pi\mu a_i (\mathbf{U}_i - \sum_{j \neq i}^N \mathbf{T}_{ij} \cdot \mathbf{F}_j) \quad (2)$$

Fig.1 (右) は糖鎖が下端の部分で回転すること (pivoting) を許した場合に、糖鎖一本あたりに働く力のモーメントの算出方法を示している。回転中心は図中 $j = 1$ に対応する下端の糖鎖ビーズにある。このビーズから j 番目のビーズまでの相対位置ベクトルをモーメントを計算する腕の長さにとれば、 j 番目のビーズにはたらく流体力 \mathbf{F}_j より j 番目のビーズに働くモーメント \mathbf{M}_j は次式で表される：

$$\mathbf{M}_j = (\mathbf{r}_j - \mathbf{r}_1) \times \mathbf{F}_j. \quad (3)$$

したがって、糖鎖一本あたりのモーメントはその糖鎖を構成する全てのビーズのモーメント \mathbf{M}_j の和によって与えられる。

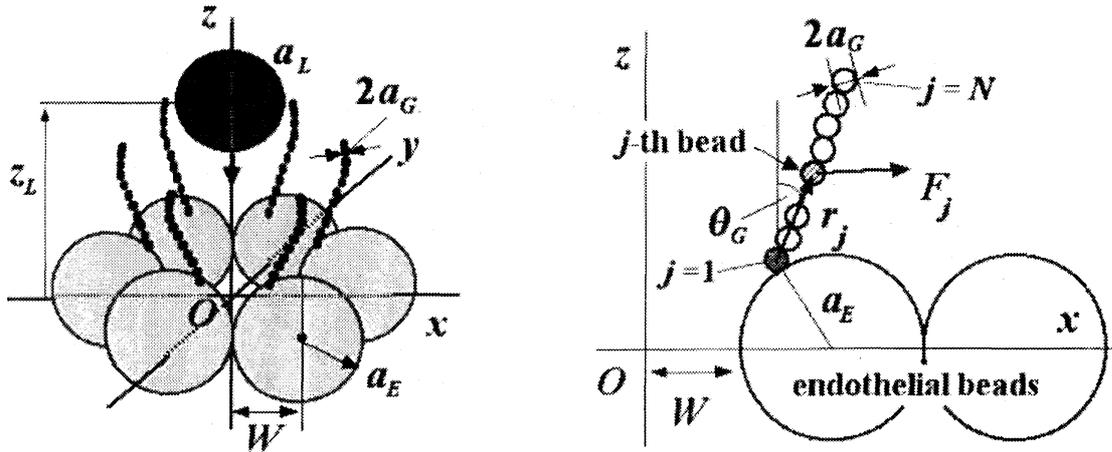


Fig. 1: (left) Definition sketch of a liposome and glycolyx chains connected to endothelial cells.; (right) Tilt of a glycolyx chain.

III. 数値シミュレーションの実行結果

間隙近傍を占める内皮細胞ビーズの個数依存性

糖鎖層を持つ内皮細胞とリポソームとの間にはたらく流体力学的相互作用を計算するにあたり、計算に必要十分な内皮細胞ビーズの個数を確認する計算を実行した。間隙近傍を構成する内皮細胞ビーズの個数 n_E をパラメータにとり、 n_E の値に対するリポソームの並進運動速度の依存性を計算した。

上述の依存性を Fig.2 に示す。パラメータ n_E は $n_E = 6, 12, 18$ をとった。いずれも平面における最密充填構造を満たすよう配置した。それら形状については Fig.2 中の挿入図を参照されたい。図の横軸は細胞間隙の存在する平面からのリポソームの距離 z_L を、縦軸は無遠での速度 v_∞ によって規格化されたリポソームの並進速度を表している。後者はリポソームと細胞間隙との間の距離が内皮細胞ビーズの半径 $a_E = 5$ (これは細胞間隙幅の半値 W と同値である) に達する直前に最小値を持つことが本図より読み取れる。この傾向は孔のある平板に向かって球体が垂直に近づいていく場合の孔周りの流れの解析解と類似している。⁹⁻¹⁵。細胞間隙から十分遠い $z_L \sim 4a_E$ 付近においては、 n_E が小さい程 v_∞ からの減速も小さく、粘性散逸の一般原理と一致した結果となっている。また三者の減速の大きさも細胞間隙近傍に比較して小さく、これは Oseen tensor の成分から予想する傾向と一致している。一方、リポソームが細胞間隙近傍に到るとパラメータ n_E による並進速度に対する減速の差は比較的小さくなる。この傾向は $z_L \sim 2a_E$ 近傍において最も顕著である。本結果より、細胞間隙の近くではリポソームの並進運動に対する間隙近傍を構成する内皮細胞ビーズの個数 n_E 依存性は小さいものと考えられる。

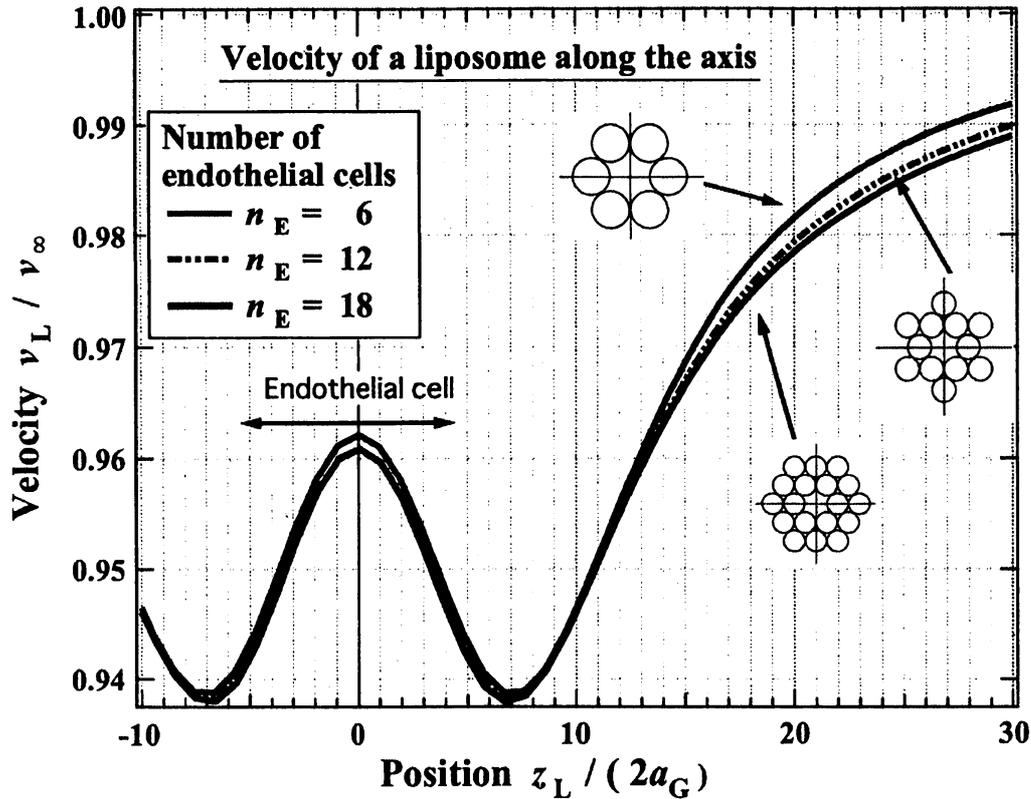


Fig. 2: Dependence of the passage of a liposome on the number of beads describing the endothelial cells.

下端を固定された糖鎖層の与える影響

前節における計算結果から、筆者らは糖鎖層を持つ内皮細胞とリポソームとの間の流体力学的相互作用を計算するに足る必要十分な内皮細胞ビーズの個数は $n_E = 6$ と結論し、本節以降ではこの値を用いて計算と議論を進めることにする。ここでは、まず糖鎖層の厚みおよび z 軸からの傾角依存性を調べる。糖鎖一本あたりを構成するビーズの個数 N_{Gc} (添字 Gc は glycoalyx chain に由来する)、糖鎖の z 軸からの傾角 θ_G をパラメータとして定めた。

糖鎖ビーズの位置は次に示す式 (4) により与える。

$$x_j = \left(W + a_E - (a_E + a_G) \cos \frac{\pi}{3} + (j-1)d_G \sin(\theta_G) \right) \times \cos \frac{(i-1)\pi}{3}, \quad (4a)$$

$$y_j = \left(W + a_E - (a_E + a_G) \cos \frac{\pi}{3} + (j-1)d_G \sin(\theta_G) \right) \times \sin \frac{(i-1)\pi}{3}, \quad (4b)$$

$$z_j = (a_E + a_G) \sin \frac{\pi}{3} + (j-1)d_G \cos(\theta_G), \quad (4c)$$

但し、 $d_G = 2a_G$ である。また、 $j = 1, \dots, N_{Gc}$ は糖鎖一本あたりの糖鎖ビーズの通し番号を、 $i = 1, \dots, n_E$ は内皮細胞ビーズの通し番号を表している。

N_{Gc} をパラメータとして $N_{Gc} = 0, 6, 12, 18$ と定義した場合と $N_{Gc} = 12$ を固定した条件下で θ_G をパラメータとして $\theta_G = 0^\circ, 15^\circ, 30^\circ$ と定義した場合の、リポソーム並進速度のそれぞれのパラメータに対する依存性を Fig.3 に示す。

本図においても前節同様、横軸は細胞間隙の存在する平面からのリポソームの距離 z_L を、縦軸は無限遠での速度 v_∞ によって規格化されたリポソームの並進速度を表している。リポソームの並進速度 v_L の z_L に対する依存性は、糖鎖がない場合と同様の変化の傾向を持っていることが読み取れる。即ち、内皮細胞を配置した xy 平面に近づくと、リポソームの並進速度 v_L は減少する一方で、リポソームの位置 z_L が内皮細胞の存在する平面と細胞間隙幅程度 $z_L \sim 2W$ に達すると、並進速度 v_L は細胞間隙を透過するまで増加していくことがわかる。

2種類のパラメータ依存性について次に説明する。まず糖鎖一本あたりを構成するビーズの個数 N_{Gc} をパラメータとした場合、 N_{Gc} が大きくなるにつれて、即ち糖鎖層の厚みが増すにつれて、リポソームの並進速度は細胞間隙遠方から間隙近傍までの全域にわたり減少することがわかる。この結果は、前出の散逸関数の増加にかかわる一般原理と一致している。また、糖鎖の z 軸からの傾角 θ_G をパラメータとした場合については、 θ_G が大きくなるにつれてリポソームの並進速度の減速率は小さくなることが読み取れる。特に細胞間隙遠方、即ち $z_L \sim 4a_E$ 付近においては $N_{Gc} = 6$ (これは $\theta_G = 0^\circ$ を満たす) を満たす場合の並進速度の減速率は $N_{Gc} = 12$ を満たす三者いずれの場合のそれよりも小さな値をとるが、しかしリポソームが細胞間隙へ近づくと $N_{Gc} = 12$ を満たす三者のうち傾角 $\theta_G > 0^\circ$ を満たす二者の方がその減速率が小さくなることがわかる。これは二者の傾角により、細胞間隙近傍においてリポソームと糖鎖層を構成するビーズとの距離が大きくなったために両者間の流体力学的相互作用も小さくなったことに起因すると考えられる。

動径方向に配置する糖鎖層列の個数依存性

本節では xy 平面上動径方向に配置する糖鎖層列の個数依存性について述べる。前節までは一つの内皮細胞ビーズ上には一本の糖鎖を配置していたが、本節で扱う計算においてはこれまでの配置に更にもう一本の糖鎖を各内皮細胞ビーズ上に配置する。細胞間隙周りのリポソームと糖鎖層をもつ内皮細胞との間の流体力学的相互作用を計算するために必要十分な糖鎖層列の個数を確認することが目的である。新しい糖鎖の位置は次に示す式により与える。

$$x_j = \left(W + a_E + (a_E + a_G) \cos \frac{\pi}{3} + (j-1)d_G \sin(\theta_G) \right) \times \cos \frac{(i-1)\pi}{3}, \quad (5a)$$

$$y_j = \left(W + a_E + (a_E + a_G) \cos \frac{\pi}{3} + (j-1)d_G \sin(\theta_G) \right) \times \sin \frac{(i-1)\pi}{3}, \quad (5b)$$

$$z_j = (a_E + a_G) \sin \frac{\pi}{3} + (j-1)d_G \cos(\theta_G), \quad (5c)$$

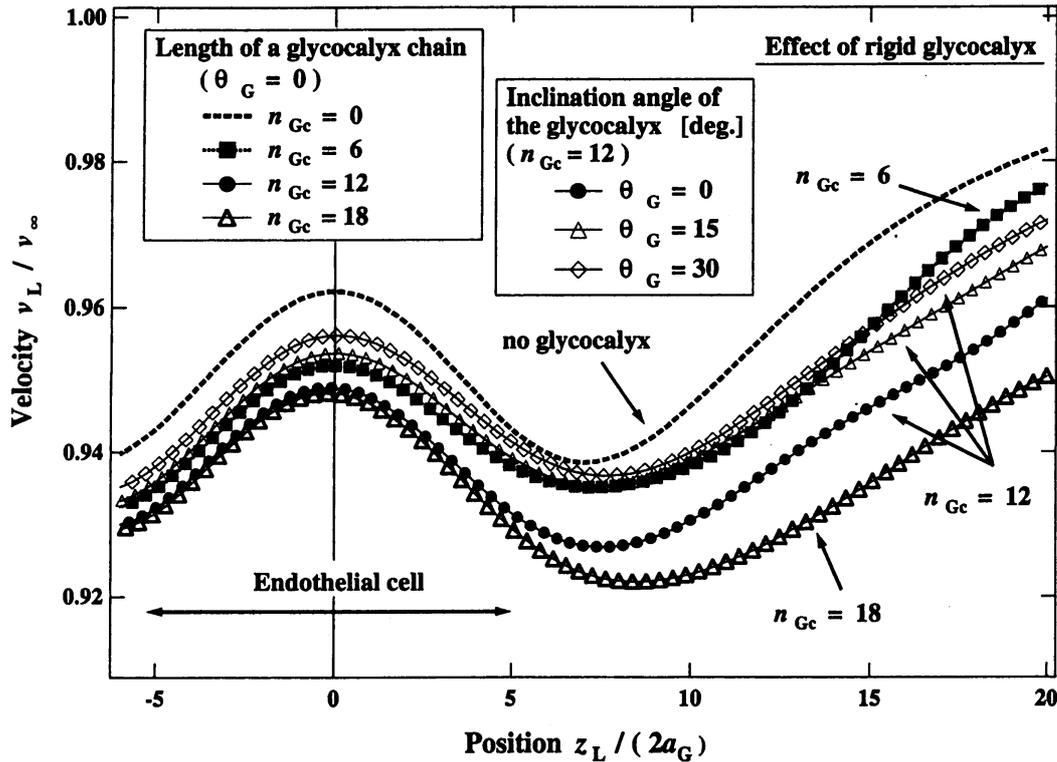


Fig. 3: Dependence of the passage of a liposome on the length and orientation of rigid glycolyx chains.

ここで i, j および θ_G は前節中の式 (4) における定義と同じである。即ち、新しい糖鎖は、これまで考えてきた糖鎖の位置を a_E だけ動径方向正の向きに移動させた座標上にある。

リポソームの並進速度の糖鎖層列の個数に対する依存性を Fig.4 に示す。前節までの計算結果と同様に、横軸が細胞間隙の存在する平面からのリポソームの距離 z_L を、縦軸が無遠での速度 v_∞ によって規格化されたリポソームの並進速度を表す。リポソームがおよそ $n_E < z_L < 4n_E$ の定義域内にある間は、糖鎖層列が少ない方が並進速度の減速率が小さいことが見て取れる。この結果もまた、散逸関数の増加に関わる一般原理と一致している。他方、およそ $|z_L| < n_E$ を満たす定義域内においては両者の減速率の差は比較的小さい。よって細胞間隙近傍ではリポソームの並進速度の動径方向に配置する糖鎖層列の個数に対する依存性は小さいものとする。

Fig.5 は糖鎖層を二列配置した時の、リポソームの並進運動によって誘起されたリポソーム周りの速度場をプロットした図である。リポソームの前方の大部分の流体は細胞間隙へ流れ込んでいるが、いくらかの流体は二列の糖鎖の間で逆流している様子が見て取れる。この流れは蝶番でつないだ二枚の平板を挟みつけたときに挟み出す流れに似ている。ここでは細胞間隙に向かうリポソームと間隙を囲む内皮細胞ビーズとが、ちょうど二枚の平板の役割を果たしたものと解釈することもでき

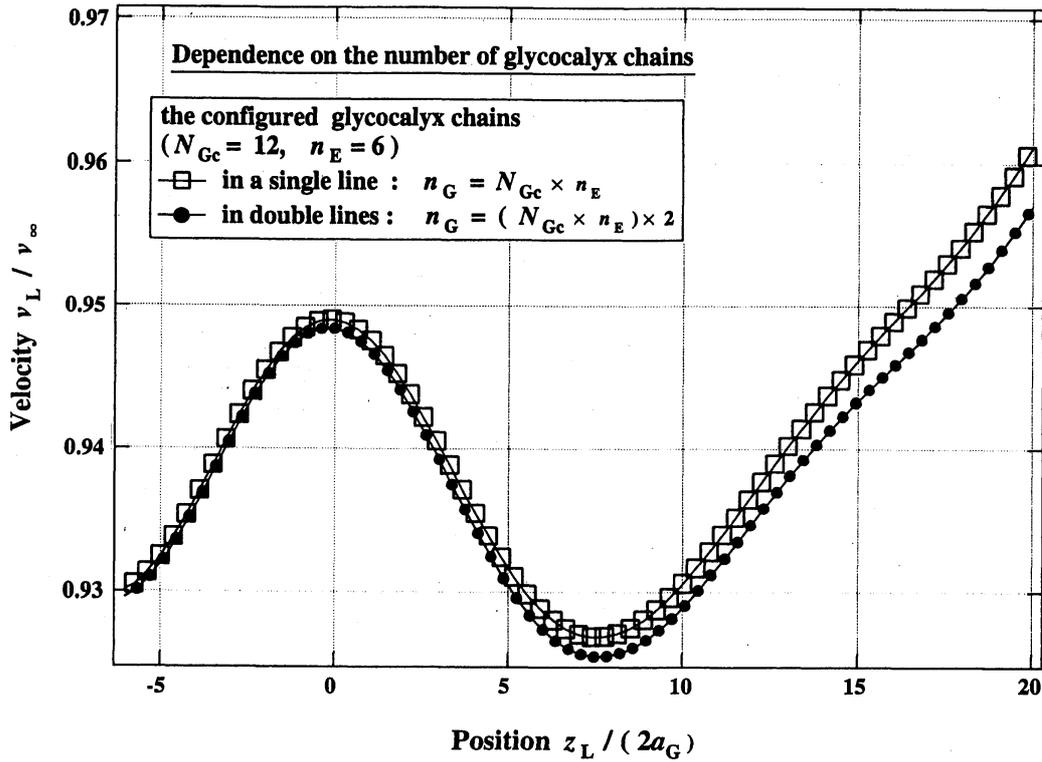


Fig. 4: Dependence of the passage of a liposome on the number of the rows of rigid glycolyx chains.

る。但し、複数の糖鎖層列を持つ場合の計算については、傾角を持つ糖鎖層を扱う場合や、変形を許した糖鎖層を扱う場合等、複雑な条件下にある糖鎖を扱う場合には本節と異なる結論が導かれる余地がある。それについては今後の課題としたい。

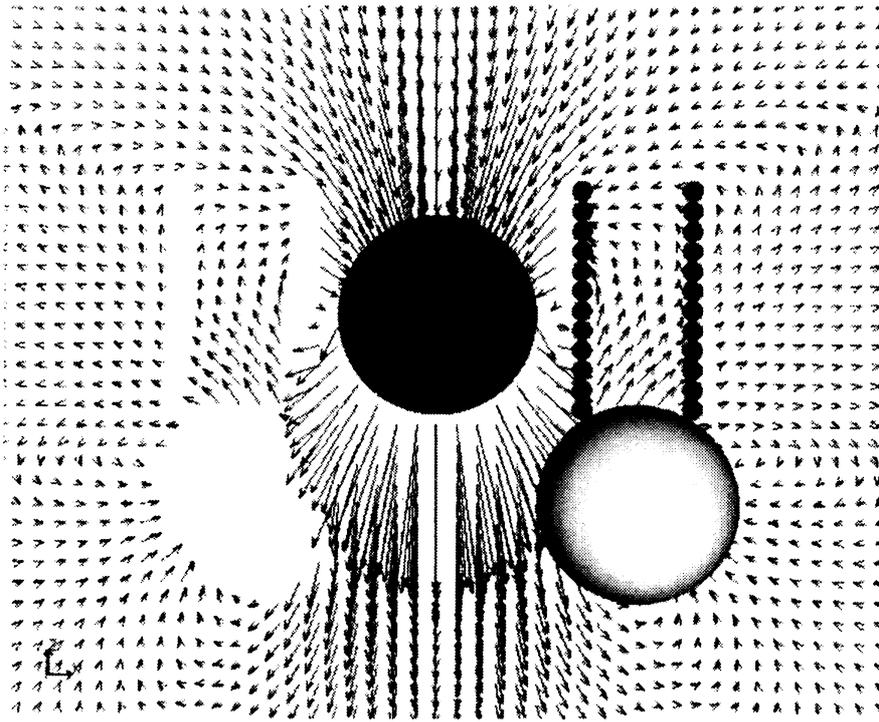


Fig.5: Velocity field in the zx plane due to the translational motion of a liposome.

糖鎖の変形し易さ (flexibility) 依存性

本節では糖鎖の z 軸からの傾角 θ_G を糖鎖一本あたりに働くモーメントの関数として扱う。一例として, θ_G と M に次の関係を仮定する。

$$\theta_G = b_1 \cdot M \exp\left(-\frac{M^2}{b_2}\right) \quad (6)$$

ここで M は糖鎖一本あたりに働くモーメントの大きさである。 b_1 と b_2 が糖鎖の変形し易さを決定するパラメーターである。糖鎖の変形が大きくなり過ぎて内皮細胞ビーズに重なることを防ぐため $-30^\circ \leq \theta_G \leq 30^\circ$ という条件を付与すれば, 関数形により b_2 は一意的に決定される。よって実効的なパラメーターは b_1 のみと見なすことができる。

Fig.6 はリポソームの並進速度の糖鎖の変形し易さ (flexibility) 依存性を示している。横軸は細胞間隙の存在する平面からのリポソームの距離 z_L を, 縦軸は無有限遠での速度 v_∞ によって規格化されたリポソームの並進速度を表す。式 (6) より, パラメーター b_1 の値が大きいほど糖鎖は変形し易い。図中で b_1 の最大値として $b_1 = 3.9 \times 10^{-3}$ をとっているが, プログラムの条件分岐より, $b_1 = 4.0 \times 10^{-3}$ の場合には糖鎖と内皮細胞ビーズが重なり合うことが確認されている。

本図より、まず変形可能な糖鎖層が存在する場合と糖鎖層が存在しない場合とでは、糖鎖層が存在しない場合の方が減速率が小さいことが見て取れる。この結果は散逸関数の増加にかかわる一般原理によって説明できる。

次にパラメター b_1 に対する依存性について述べる。リポソームが細胞間隙に対し比較的遠方に位置する間は、 b_1 が大きいほど、即ち、より変形し易い糖鎖であるほど減速率は小さいことが本図より見て取れる。しかしこの関係は $z_L \sim 11.0$ 近傍において逆転し、リポソームがそれより間隙近くに位置する間は、 b_1 が大きいほど減速率も大きくなっている。 $z_L \sim 11.0$ 近傍は糖鎖を構成するビーズの中央付近に位置するビーズの初期座標 z 成分の値に相当する。

このことから、リポソームが間隙遠方にあるうちはより変形し易い糖鎖ほどリポソーム前方の流れに押されて間隙に対して外側に傾きリポソームの進行を容易にするが、リポソームが糖鎖の半分の高さ程度まで間隙に近づいてくると、リポソーム後方の流れに引かれてより変形し易い糖鎖ほど内側に傾き、今度はリポソームの運動を阻害すると考えられる。

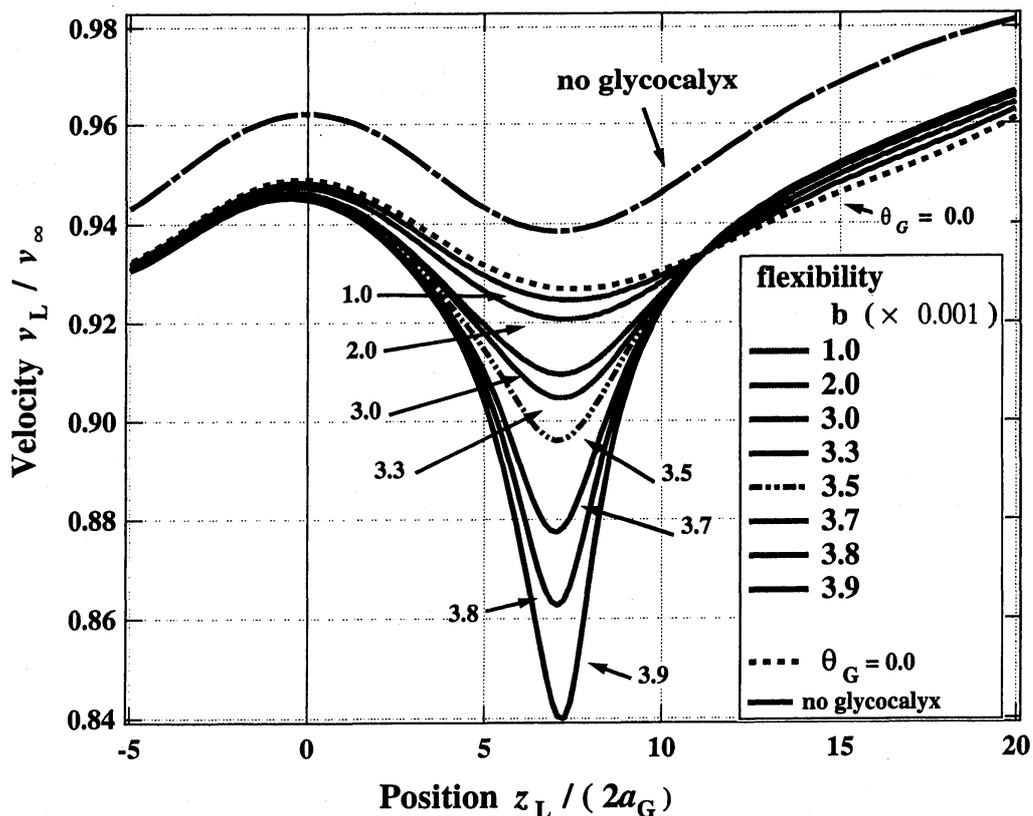


Fig.6 Dependence of the passage of a liposome on the flexibility b_1 of the glycocalyx chains.

リポソーム半径依存性

Fig.7 は並進速度のリポソーム半径依存性を示している。図中のそれぞれの曲線に示した数値は、各々の計算におけるリポソーム半径を表している。このとき全ての計算結果においてリポソーム半径が小さいほど減速率も小さくなる。これは Oseen tensor の成分から予想しうる傾向と一致している。

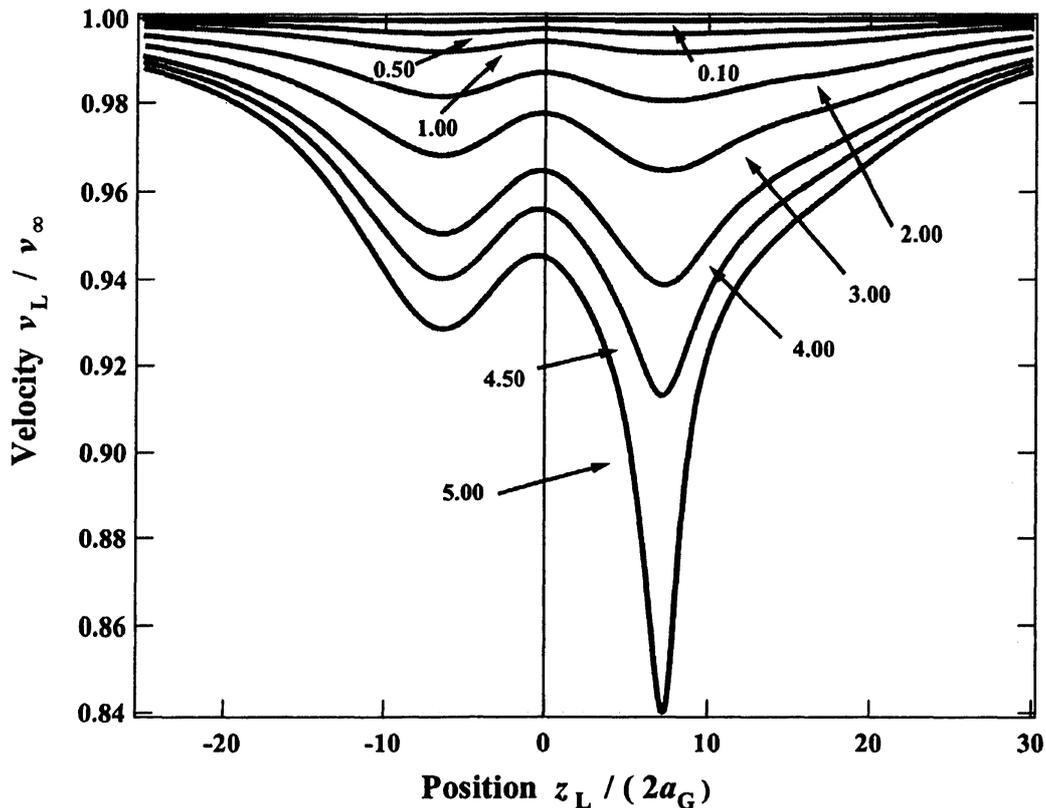


Fig.7 Dependence of the passage of a liposome on the size of it.

IV. まとめ

本稿で扱った計算結果より、計算上必要十分な要素数を確認することができた。また現行モデルにおいては、糖鎖が変形し易いほどリポソームの運動を阻害する傾向があることが明らかとなった。今後の課題としては、より複雑な条件下における多糖鎖層列を持つ内皮細胞を扱う計算や、物理学的に可能な糖鎖モデルの構築を進めていく。

V. 謝辞

本研究は JST-CREST (科学技術振興機構・戦略的創造研究推進事業) の助成によるものである。

参考文献

- [1] J.M. Squire, M. Chew, G. Nnenji, C. Neal, J. Barry, and C. Michel: *J. Structure Biol.* **136**, 239 (2001).
- [2] S. Reitsma, D.W. Slaaf, H. Vink, M.A.M.J. van Zandvoort, and M.G.A. oude Egbrink: *Eur. J. Physiol.* **454**, 345 (2007).
- [3] M. Nieuwdorp, M.C. Meuwese, H. Vink, J.B.L.Hoekstra, J.J.P.Kastelein, and E.S.G. Stroes: *Current Opinion in Lipidology* **16**, 507 (2005).
- [4] M. Gouverneur, B. van den Berg, M. Nieuwdorp, E. Stroes, and H. Vink: *J. Internal Medicine* **259**, 393 (2006).
- [5] J. Happel and H. Brenner : *Low Reynolds Number Hydrodynamics* (Prentice-Hall, 1965).
- [6] J. Rotne and S. Prager : *J. Chem. Phys.* **50**, 4831 (1969).
- [7] H. Yamakawa : *J. Chem. Phys.* **53**, 436 (1970).
- [8] O. Sano and H. Takano-Ohmuro : *J. Phys. Soc. Jpn.* **62**, 2306 (1993).
- [9] H.Hasimoto: *J. Phys. Soc. Jpn.* **50**, 4068 (1981).
- [10] A.M.J. Davis, M.E. O'Neill, and H. Brenner: *J. Fluid Mech.* **103** ,183 (1981);
Corrigendum *J. Fluid Mech.* **111**, 499 (1981).
- [11] Z. Dagan, S. Weinbaum, and R. Pfeffer: *J. Fluid Mech.* **117**, 143 (1982).
- [12] T. Miyazaki and H. Hasimoto: *J. Fluid Mech.* **145** , 201 (1984).
- [13] Z.-Y. Yan, S. Weinbaum, and R. Pfeffer: *J. Fluid Mech.* **162** , 415 (1986).
- [14] R. Shail and I.M. Warrilow: *J. Eng. Math.* **22** , 355 (1988).
- [15] Y.Oguro, M.Makino, and O.Sano: *J. Phys. Soc. Jpn.* **79**, (2010) 084402.