

止血血栓シミュレーターの開発を目指しての数理応用

東海大学医学部内科学系循環器内科

七澤洋平 (Yohei Nanazawa)

田村典子 (Noriko Tamura)

後藤信哉 (Shinya Goto)

School of Medicine, Tokai University

1. はじめに

現在, 次世代生命体統合シミュレーションでは, 分子スケールから臓器全身スケールまでのマルチスケールでの止血血栓シミュレーターの研究開発が行われている. 本稿では, その研究開発における血小板の細胞スケールでのシミュレーションモデルについて報告する. 1 件目は血小板細胞内での代謝拡散反応に関して理研細胞シミュレーション統合プラットフォーム (RICS) を用いた構築について, 2 件目は PGE1 により glycoprotein (GP) 2b3a を未活性状態に固定した場合に生じる形状変化 (偽足) の血小板楕円体モデルを用いた解析についてである. 前者については細胞外から ADP により血小板細胞膜の ADP 受容体を刺激させた場合に, 血小板細胞内オルガネラである濃染顆粒 (DG) からの ADP, ATP, セロトニンなどの内包物質放出を各種生化学反応の積み重ねにより表現することができた. また, シミュレーター内において, 放出された ADP が再び細胞膜の ADP 受容体を刺激するフィードバックを確認した. 後者では血小板の von Willebrand Factor (VWF) への接着時に生じる偽足に着目しシミュレーションにより検証することで, GPIIb α の局在箇所の数, 底面方向の流速が偽足長の分布に影響を与えることが判った.

2. 血小板細胞の構造と反応に特化したモデル化

血小板のシミュレーションモデルについては, 先行研究として血小板濃度分布 (Fogelson et al., 2004) や血小板を粒子として扱う (AlMomeni et al., 2008) 計算モデルは多く存在する. 本稿の 2 件目に挙げる研究もその後者の 1 つに含まれる. しかし, 細胞内部の代謝反応/シグナル拡散に着目し, 細胞内の物質/オルガネラの位置情報を考慮した血小板細胞内での代謝拡散反応シミュレーションについては未だ少ない. 創薬において薬剤応答や生理的反応のシミュレーションには, 細胞内の物質/オルガネラの位置情報の考慮が重要となり得るため, 本節ではそのシミュレーションモデルの構築について述べる.

モデル化のため, 次世代生命体統合シミュレーション細胞スケールチームにて開発中である理研細胞シミュレーション統合プラットフォーム (RICS) を用いて血小板反応拡散モデルの構築を行う. RICS とは, 細胞を複数のボクセルに区画し, そこに実測データより得られた細胞内の物質/移動量などの情報を取り込み, 細胞内の現象を表現可能とする細胞シミュレーション統合プラットフォームである. 血小板については, 細胞質/細胞膜/GPIIb α /オルガネラを配置し (図 1), それぞれのボクセルにおいての代謝反応については E-Cell

にて計算する。

血小板細胞膜に存在するトロンビンレセプターやADPレセプターはそれぞれの物質で刺激されることで、血小板細胞内オルガネラである濃染顆粒 (DG) から内包物質が放出される (図 2)。これは刺激されたレセプターによって内部での各種生化学反応が引き起こされた活性化の結果として生じる。しかし、放出された物質は更に膜上のレセプターを刺激し活性化を促す (図 3)。

RICSにてこの反応系を表現する (図 4)。放出された物質によるフィードバック反応を確認するため、DGからの放出の有無を比較する (図 5)。図 5 の左図では DG からの放出を止めており、右図に比べ部分において GPIIbIIIa の活性化が見られない箇所が確認できた。

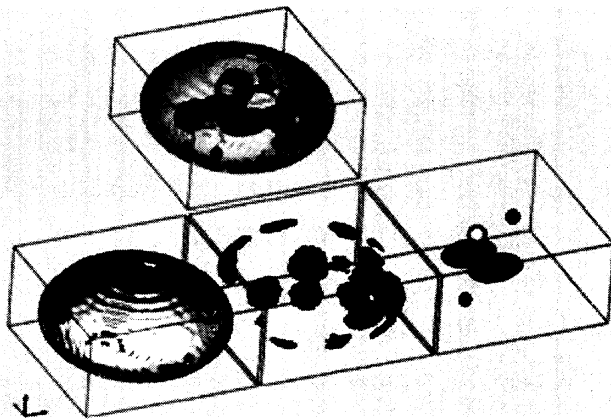


Fig 1. RICS 内での血小板細胞モデルの構築

| Virtual Platelet Cell |
cell membrane | GPIIbIIIa | organelles

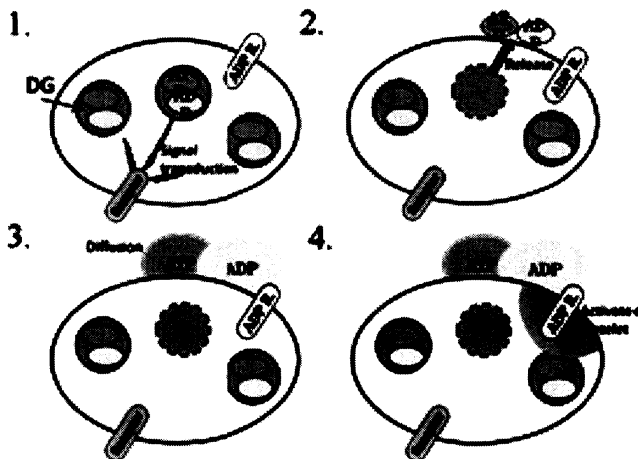


Fig 3. DG からの顆粒内物質の放出による血小板の活性化プロセス

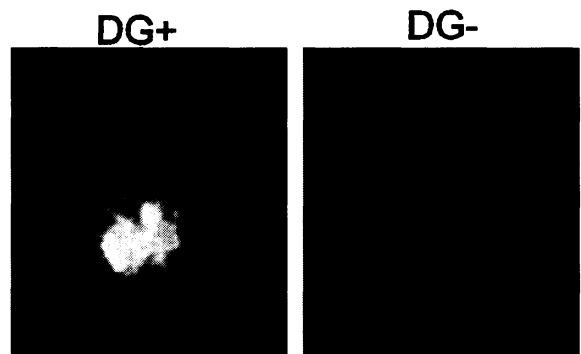


Fig 2. DG からの放出前と放出後の実験結果 (トロンビンレセプターを刺激時について)

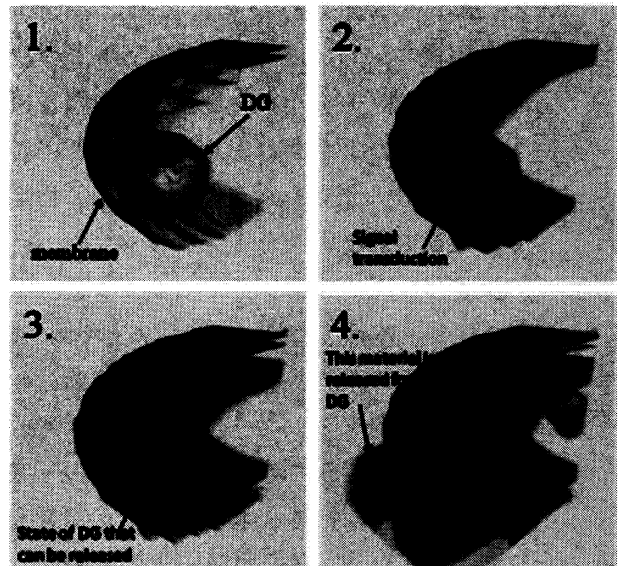


Fig 4. 1.~4.は DG からの内包物質の放出について、RICS でのシミュレーション結果

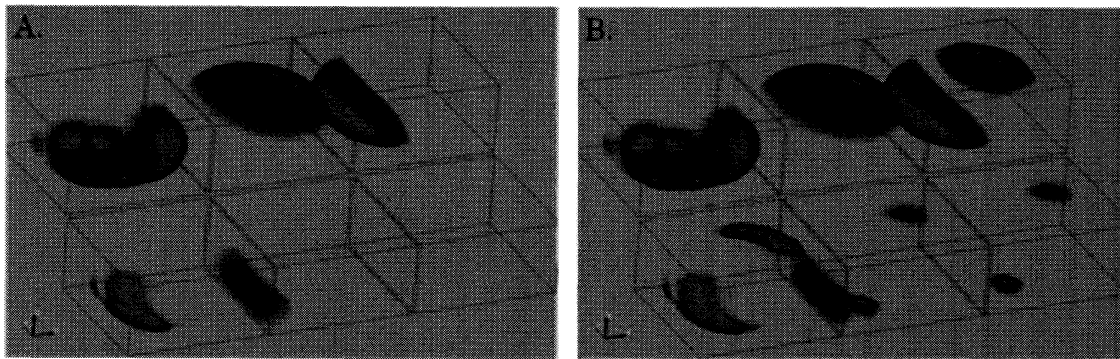


Fig 5. Case A : DG からの放出機能無し、 Case B : DG からの放出有り

Sig1 | Sig2 | Sig3

Activated GPIIb/IIIa | ext. ADP | ext. ATP

3. GPIb α -VWF 接着時に生じる偽足長の分布に着目しての血小板流動モデルの検討

血小板は、細胞膜上の複数種の糖蛋白が血漿内や血管損傷部位の von Willebrand Factor (VWF) などの粘着蛋白を介して架橋反応することにより、損傷部位へ接着/凝集する。本節では、損傷部位への最初の粘着を起こす膜糖蛋白 glycoprotein (GP) Iba-VWF 接着時に生じる形状変化した糸状の存在 (偽足) について検討を行う (図 6)。なお、ここで対象とする偽足は血小板が活性化時に作り出す偽足とは異なる。

この偽足については flow chamber での流動接着実験の結果から、次の特徴が観察された。

- ◆ 血小板細胞の能動的活性化変化を完全に阻害した場合であっても、高ずり応力下の接着時に血小板形態変化が起こる (偽足様形態変化)
- ◆ 形成される偽足は高流速下においてより長い傾向がある
- ◆ 複数の偽足により血小板細胞が固定され接着が起こる

この偽足について、前年度までに開発した血小板楕円体モデル(Nanazawa et al., 2009)を用いての計算機シミュレーションを行う。この血小板楕円体モデルによるシミュレーションでは、①血小板が VWF 面に少ない量しか接着していない状況、②単一血小板について流体中における体積分率が低いこと、の 2 点から血小板から流体への影響は非常に小さいものと仮定し、血小板が流体から抗力を受ける一方向のモデルである。

偽足については計算機上における VWF 存在箇所に接着時にバネマスモデルを用いてその機能性を表現する(図 7)。具体的には、接着時血小板重心位置における流速毎(3000, 6000, 9000 [um/s])で血小板流動実験における接着した血小板の偽足長を計測する。その最頻偽足長の合うようにバネマスモデルの係数を決定する(表 1)。

このバネマスモデルの係数を決めるだけでは、最頻偽足長に近づけることは可能であるが、偽足長の分布を同じものにするにはできない。この場合、VWF 面への速度成分や GPIIb/IIIa の局在箇所の数を変えることが偽足長分布に影響を与える (表 2,3)。また、偽足の性質を測定値から割り出した値から変えることで、血小板の GPIIb/IIIa が VWF と接着する割合が変わり、血小板の活性化にも影響を及ぼすことが予想される。

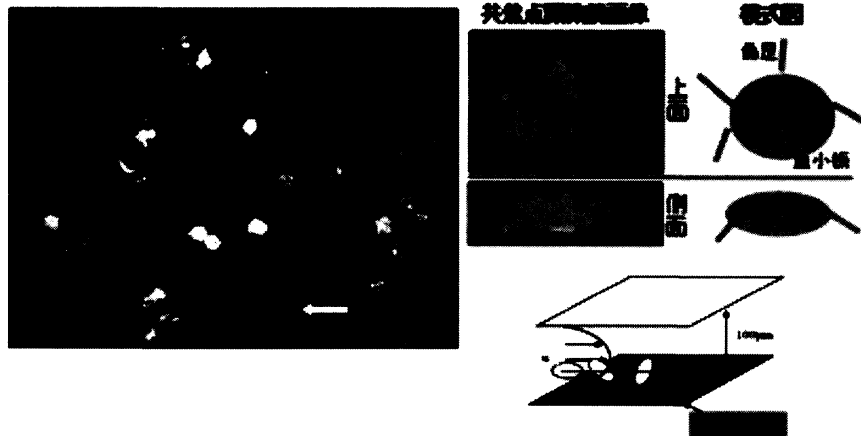


Fig. 6. flow chamber での血小板接着/流動実験

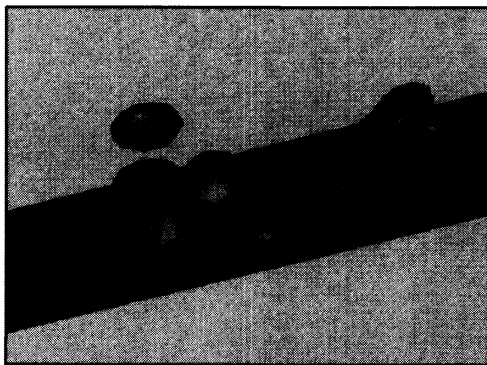


Fig 7. 血小板楕円体モデルにおける偽足

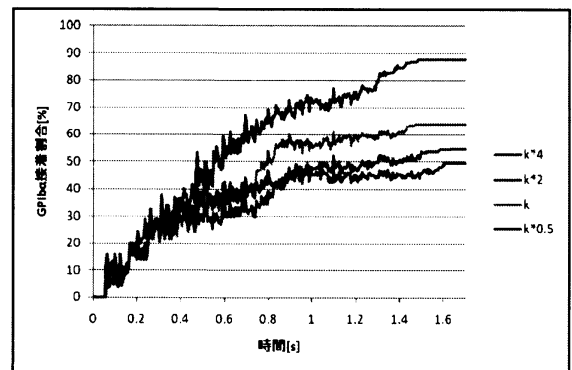


Fig 8. 偽足の性質となるバネ定数を変えた場合の GPIIb/IIIa-VWF 接着割合

	実測値	計算値
3000µm/s	1.2	1.45
6000µm/s	2	2.5
9000µm/s	4	3.55

Table 1. 流速に応じた、偽足長の最頻長さを再現[um]

GPIb α 局在箇所	少ない	↔	多い
偽足長分布	ピークに集中		分散化

Table 2. GPIb α の局在箇所数を変える
ことで偽足長の分布に変化

底面方向への流速比率	小さい	↔	大きい
偽足長分布の傾向	狭い		広い
長い偽足の発生率	低い		高い

Table 3. 底面方向への流速を変えるこ
とで長い偽足の生じる頻度が上昇

偽足の性質	伸びやすい	↔	伸びにくい
GPIb α -VWF接着割合	高い		低い

Table 4. 偽足の性質となるバネ定数を変
えた場合の GPIb α -VWF 接着割合の傾向

4. 最後に

未活性状態に固定した血小板の接着時の形状変化と血小板細胞内における代謝拡散活性化モデルについて、その概要を報告した。前者については、未活性状態に固定していない血小板においても、偽足長に着目することが何か意味を持たないか検討する。後者については、反応経路の細密化なども重要であるが、現状の血小板細胞モデルを多数同時に存在させた場合のシミュレーションを計画している。それぞれのモデルの深化だけでなく、他スケール間との連携への組み込み、または得られた成果を元に他スケールの精緻化へ繋がられるよう目指す。

謝辞

本研究は理化学研究所「次世代生命体統合シミュレーションソフトウェアの研究開発」プロジェクトによるものである。

References

RIKEN Integrated Cell Simulation System (RICS) <http://cellsim.riken.jp/index.html>

- Nanazawa, Y., Tamura, N., Goto, S., Tajima, S. and Kawahara, H., (2009). Development of basic model of thrombosis considering intracellular metabolism and signal transduction with platelet, *Proceeding of the Conference on Computational Engineering and Science*, 14, 43-46.**
- AlMomani, T., Udaykumar, H. S., Marshall, J. S. and Chandran, K. B. (2008). Micro-scale Dynamic Simulation of Erythrocyte–Platelet Interaction in Blood Flow, *Annals of Biomedical Engineering*, 36, 905–920.**
- Fogelson, A.L. and Guy, R.D. (2004). Platelet–wall interactions in continuum models of platelet thrombosis: formulation and numerical solution., *Mathematical Medicine and Biology*, 21, 293–334.**