

Title	心室組織を構成する多種類の細胞モデルを活用したシミュレーションによる探求
Sub Title	A simulation study with mathematical models of various types of cells in ventricular tissue
Author	田中, 雄一郎(Tanaka, Yuichiro)
Publisher	慶應義塾大学湘南藤沢学会
Publication year	2015
Jtitle	生命と情報 No.22 (2015.) ,p.171- 234
JaLC DOI	
Abstract	心臓は全身へ血液を送り出すポンプとして働く。脳を初めとする全身の器官へ酸素を供給する重要な役割を果たすことから、一度もその動きを止めることなく常に働き続けることが求められる。ポンプ機能は、心臓を構成する心筋細胞の収縮により生み出され、個々の心筋細胞が生み出す収縮力が集まることで、全身へ血液を送り出すポンプとしての大きな力が生まれる。心筋細胞の細胞膜には、さまざまなイオンを電気化学的勾配に従い、選択的に透過させるイオンチャンネルや能動的に通過させる輸送体があり、それぞれのイオンチャンネルと輸送体がイオンを細胞膜の内外で移動させ、膜電位を形成している。心臓は、発生過程の進行とともにその形を変化させる一方で、常に興奮収縮連関機構を維持し続ける必要がある。本研究では、その発生過程から成体、老化状態において変化する心筋細胞が具体的にどのように収縮を行い、どのような影響を与えているのかをコンピュータシミュレーションを用いて網羅的に解析をした。
Notes	慶應義塾大学湘南藤沢キャンパス先端生命科学研究会 2015年度学生論文集 卒業論文ダイジェスト
Genre	Technical Report
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KO92001004-00000022-0171

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

2015年度 卒業論文

心室組織を構成する多種類の細胞モデルを活用した
シミュレーションによる探求

A simulation study with mathematical models of
various types of cells in ventricular tissue

慶應義塾大学 総合政策学部 4年

田中雄一郎

2015年度 卒業論文

心室組織を構成する多種類の細胞モデルを活用した
シミュレーションによる探求
A simulation study with mathematical models of
various types of cells in ventricular tissue

慶應義塾大学 総合政策学部 4年

田中雄一郎

心臓は全身へ血液を送り出すポンプとして働く。脳を初めとする全身の器官へ酸素を供給する重要な役割を果たすことから、一度もその動きを止めることなく常に働き続けることが求められる。ポンプ機能は、心臓を構成する心筋細胞の収縮により生み出され、個々の心筋細胞が生み出す収縮力が集まることで、全身へ血液を送り出すポンプとしての大きな力が生まれる。心筋細胞の細胞膜には、さまざまなイオンを電気化学的勾配に従い、選択的に透過させるイオンチャネルや能動的に通過させる輸送体があり、それぞれのイオンチャネルと輸送体がイオンを細胞膜の内外で移動させ、膜電位を形成している。心臓は、発生過程の進行とともにその形を変化させる一方で、常に興奮収縮連関機構を維持し続ける必要がある。本研究では、その発生過程から成体、老化状態において変化する心筋細胞が具体的にどのように収縮を行い、どのような影響を与えているのかをコンピュータシミュレーションを用いて網羅的に解析をした。

Key words : 心室筋細胞・心臓線維芽細胞・発生・老化・心疾患・E-Cell Simulation
Environment

目次

第1章 序論

- 1.1 研究背景
 - 1.1.1 はじめに
 - 1.1.2 心臓を構築する心筋細胞
 - 1.1.2.1 心筋細胞の活動電位
 - 1.1.2.2 心筋細胞の収縮
 - 1.1.2.3 心筋収縮低下因子
 - 1.1.3 種差による心臓の違い
 - 1.1.4 洞房結節細胞
 - 1.1.5 生命現象のコンピュータ・シミュレーション
 - 1.1.5.1 E-Cell Simulation Environment (SE)
- 1.2 研究目的

第2章 老化状態における心筋細胞の探求

- 2.1 研究背景
 - 2.1.1 老化状態
 - 2.1.2 心臓の老化
- 2.2 対象と手法
 - 2.2.1 イオンチャネルの活性量変化による加齢心筋細胞の再現
 - 2.2.2 洞房結節細胞(SAN)モデルのシミュレーション
 - 2.2.2.1 洞房結節細胞(SAN)モデルにおける活性量変化
 - 2.2.2.2 最大拡張期電位 (MDP) と基本周期長 (BCL)
 - 2.2.3 2種のイオンチャネルの活性量変化における再現
- 2.3 結果と議論
 - 2.3.1 イオンチャネルの活性量変化による加齢心筋細胞の再現結果
 - 2.3.1.1 L型Ca²⁺チャネル電流(I_{CaL})の活性量変化
 - 2.3.1.2 一過性外向き電流(I_{to})の活性量変化
 - 2.3.2 洞房結節細胞(SAN)モデルのシミュレーション結果
 - 2.3.2.1 それぞれのイオンチャネルの活性量変化の解析
 - 2.3.3 I_{CaL} と I_{Kr} の活性量変化のヒートマップ解析

第3章 老化状態で生じる可能性の高い心房細動のメカニズム 解明に向けたイオンチャネルの探求

- 3.1.1 研究背景
- 3.1.2 目的
- 3.2 対象と手法

- 3.2.1 対象
 - 3.2.1.1 シミュレーションモデル
 - 3.2.1.2 老化した心房筋細胞と洞房結節細胞の再現
 - 3.2.1 手法
 - 3.2.2.1 バーストに関わるイオンチャネル特定方法
 - 3.2.2.2 刺激導入後の挙動を検証
 - 3.3 結果と議論
 - 3.3.1 バーストに関わるイオンチャネル特定結果
 - 3.3.2 刺激導入後の挙動
- 付録

第4章 多彩な線維芽細胞が心筋細胞へ与える影響の探求

- 4.1.1 研究背景
 - 4.1.1.1 線維芽細胞の調査
- 4.1.2 目的
- 4.2 対象と手法
 - 4.2.1 対象
 - 4.2.1 手法
 - 4.2.2.1 線維芽細胞が与える影響のためのシミュレーション
 - 4.2.2.2 線維芽細胞の個数変化が与える影響のためのシミュレーション
 - 4.2.2.3 I_{K1} の活性量変化における心筋細胞のシミュレーション
- 4.3 結果と議論
 - 4.3.1 線維芽細胞の有無における心筋細胞のシミュレーション
 - 4.3.2 線維芽細胞の個数変化における心筋細胞のシミュレーション
 - 4.3.3 I_{K1} の活性量変化における心筋細胞のシミュレーション

第5章 結論

謝辞

参考文献

第1章序論

1.1 研究背景

1.1.1 はじめに

生体内のあらゆる組織はそれぞれ重要な役割を有しているが、なかでも心臓は古来より生命そのものと考えられ、最も重要な臓器であると考えられてきた。心臓は一生涯ポンプとして自律して収縮・拡張を繰り返し、全身に絶え間なく血流を送り続けるダイナミックな臓器であるが、一方、近年は内分泌器官としての役割も注目されている。ひとつの細胞が分裂していろいろな種類の細胞に分かれ、最終的にひとつの臓器を発生・分化という現象にある。そのなかでも心臓形成は、ポンプとしてほかの組織に血流を供給しながら、一本の原始心筒から並列循環へと形態変化がダイナミックであり、極めて象徴的である。さらに心筋細胞は分化後も分裂能を維持し、胎生期は活発に分裂増殖を続けるが出生と同時にその分裂能は喪失されると考えられ、以降の心臓の成長は個々の心筋細胞の大きさが増すことによるという特異的な性質をもっている。心臓の発生過程や分化過程、成長過程はきわめて複雑であるが、分裂増殖を続けながら常にポンプとしての機能を維持するメカニズムの全容は明らかにされていない。

心臓は、全身へ血液を供給するポンプとしての役割を果たす重要な器官であり、生まれてから一度もその動きを止めることなく常に働き続けることで、脳を初めとする全身の器官へ酸素を供給する重要な役割も果たしている。こうしたポンプ機能は、心臓を構成する心筋細胞の収縮により生み出され、個々の心筋細胞が生み出す収縮力が集まることで、ポンプとしての大きな力が生まれる。つまり心筋細胞の収縮機構に関連した機能、メカニズム解明が心臓の収縮機構の解明に繋がる。心臓のポンプ機能を生み出す心筋細胞の収縮は、刺激伝導系を構成するプルキンエ線維から伝わった電気刺激による細胞膜の電氣的活動によって引き起こされる。心臓を構成する心筋細胞の細胞膜には、さまざまなイオンを電気化学的勾配に従い、選択的に透過させるイオンチャネルや能動的に通過させる輸送体があり、それぞれのイオンチャネルと輸送体がイオンを細胞膜の内外で移動させ、膜電位を形成している。このような機能を持つ心臓は発生する過程において動きを止めずに働き続けながら、その形を変化、発達させることで、成体で全身に十分な血液を送り出すためのポンプ機能を備えるようになる。その後、心臓は成熟期以降に生体機能が次第に衰えていく老化状態に陥る。その発生過程から成体、老化状態において変化する心筋細胞が具体的にどのように収縮を行い、どのような影響を与えているのかを明らかにすることが心臓病、不整脈といった心疾患な

どの予防, 治療に結びつくのである.

1.1.2 心臓を構築する心筋細胞

心臓は種によってそれぞれの生活環境に適応した多様な構造を取っている. その中で, 我々ヒトの心臓構造は, マウスやモルモットなどの齧歯類の心臓の構造に共通する点が多いことが知られている. そのため, ヒトの心筋細胞のモデルとして齧歯類の心筋細胞を用い, 古くから多くの研究が成されてきた. さらに, 実験から得られたデータを元に, 1960年代頃からは, 心筋細胞をコンピュータ上で再現する数理モデルの構築が行われてきた (Noble, Garny *et al.* 2012). 数理モデルを用いた手法では, これまで実験では困難だった, 細胞の時系列変化の再現を可能にし, 特に発生に伴って大きな変化を遂げる心筋細胞の分野において, 非常に有用な研究手段の一つとして提案されている (Itoh, Naito *et al.* 2007).

1.1.2.1 心筋細胞の活動電位

心室筋細胞における静止膜電位は深く, -90mV 程度である. 心室筋細胞の脱分極相 (第0相) は Na^+ チャネルが流す速い電流 (I_{Na}) が細胞内に流れて活動電位が立ち上がる. つまり, 細胞内の電位が負から正になるのである. そして, 脱分極が起こると Na^+ チャネルが不活性化し, それ以上の Na^+ の流入はなくなる (第1相). 第2相では電位依存的な Ca^{2+} チャネルと K^+ チャネルが開く. Ca^{2+} は細胞内に流入し, K^+ は細胞外へ流出していく. Ca^{2+} の透過性が減少し, K^+ の透過性が上昇していくので, 細胞外へ流出する正電荷が多くなり, 少しずつ細胞内電位はゆるやかに下がっていくのである. これをプラトー相という. 第3相では, Ca^{2+} チャネルの透過性が減少したと上述したが, K^+ チャネルの透過性は高まり, これを不活性化させる機構はない. ゆえにそのまま K^+ が細胞外に流出し, 最終的に静止膜電位の元の状態に落ち着くのである. 以上が心室筋細胞に関する活動電位に関する説明である. また図 1.1 にて, それぞれの部位と活動電位波形について示した.

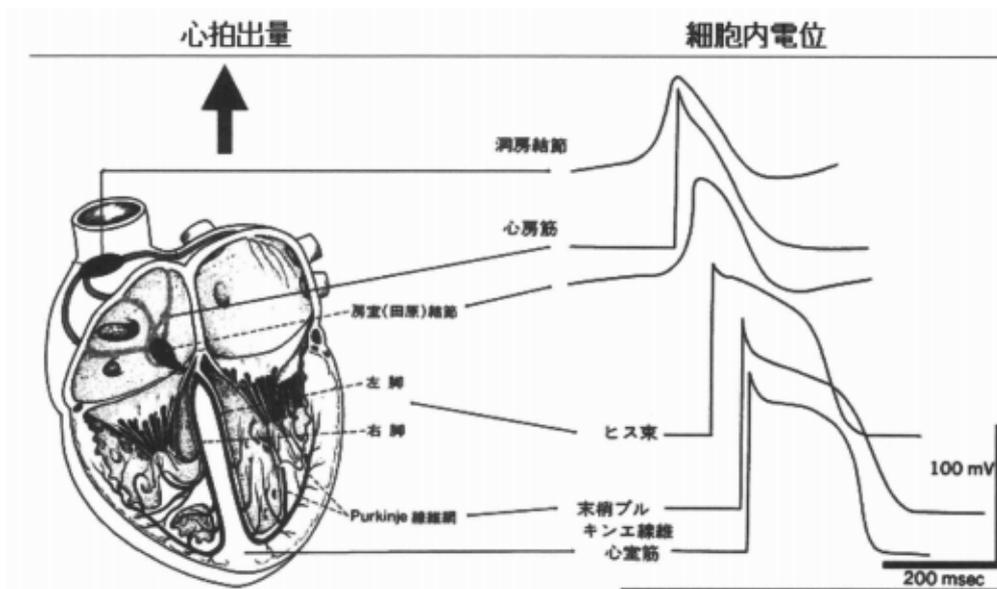


図 1.1 心臓の模式図とそれぞれの組織心筋細胞の活動電位
(Nomaguchi, *et al* : 日生誌. 67 : 203-215, 2005)

1.1.2.2 心筋細胞の収縮

心臓は一年に 4000 万回以上も収縮・弛緩を繰り返す、その間 200 万 ℓ もの血液を駆出することによりポンプとしての役割を果たしている。心筋の収縮は、骨格筋と ATP をエネルギー源とした収縮タンパクミオシン架橋 (クロスブリッジ) のアクチンフィラメントへの周期的結合・解離反応により引き起こされると考えられている (Huxley AF, *et al*, 1974)。その力学特性は、筋線維の走行が骨格筋と類似した乳頭筋あるいは肉柱を用いて、筋長と張力関係や張力と速度関係を求めることにより解析されてきた (Brady AJ, *et al*. 1979)。心筋の動態はこの 2 つの関係により記述されることが明らかになっている。この 2 つの座標軸は、心筋の異なる収縮力の評価指標と考えられており、その考えは臨床にも生かされている。心筋収縮性は、筋肉がどれくらい早く収縮できるか、どれくらい強く収縮できるかの 2 面で評価される。しかし、心機能も筋長と張力関係や張力と速度関係のみですべてが記述できるとは限らないことから、心筋収縮性を記述する新しい座標軸を見つけ出す必要があるといったような心筋収縮に関しても注目が集まってきた。心筋長が伸びるとアクチン-ミオシンの重なりが増加するため、心筋張力が増加する。アクチンとミオシンの架橋が 1 つの単位力

を発生する。この架橋形成は Ca^{2+} がトロポニン C に結合することにより促進される。つまり、心筋収縮弛緩は細胞内 Ca^{2+} が制御していることになる(図 1.2)(Chidsey CA, *et al*, 1974).

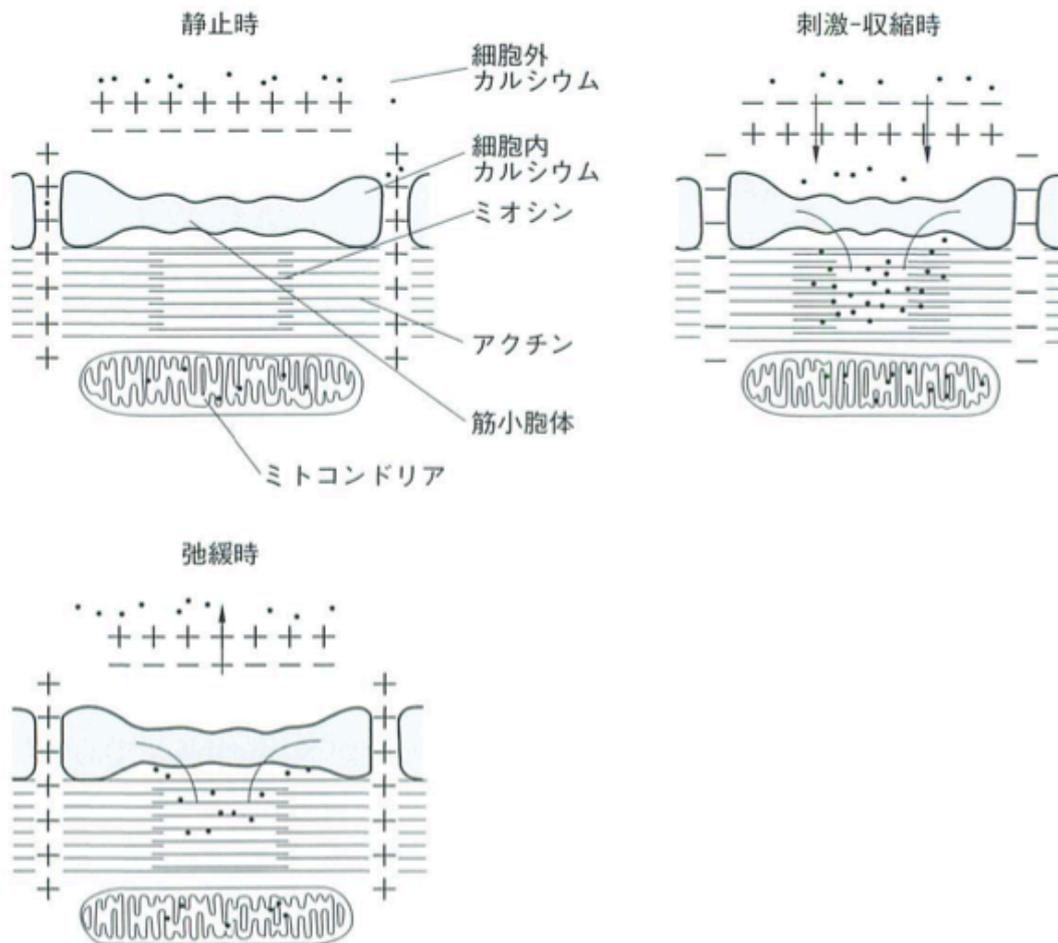


図1.2 心筋収縮-弛緩における細胞内 Ca^{2+} の役割

(Chidsey CA. : *in* Braunwald.E.(ed) : The Myocardium : Failure and Infarction. New York. HP Publishing Co., 1974)

そこで心筋収縮と細胞内Ca²⁺の関係性が注目される。通常、静止時には心筋細胞内は細胞外に比べて-90mV電位が低く保たれている。心筋細胞膜に対して電氣的興奮が生じるとNa⁺チャンネルを介して細胞内へとNa⁺流入が起こり、心筋細胞が脱分極した状態となる。この電氣的興奮は、通常的心臓では刺激伝導系を介して伝達される。そして筋原線維の折れ込みであるT管系に存在する膜電位依存性のL型Ca²⁺チャンネルを介して、細胞外から微量のCa²⁺が流入する(図1.3)。細胞内のCa²⁺濃度が上昇すると、細胞内小器官でCa²⁺の貯蔵庫である筋小胞体のリアノジン感受性Ca²⁺放出チャンネルが活性化されることにより、大量のCa²⁺が心筋細胞質中に放出される。この過程をカルシウム誘発カルシウム放出 (Ca²⁺-induced Ca²⁺ release) が主体であり、細胞膜の電氣的興奮が直接筋小胞体のCa²⁺放出を引き起こす。

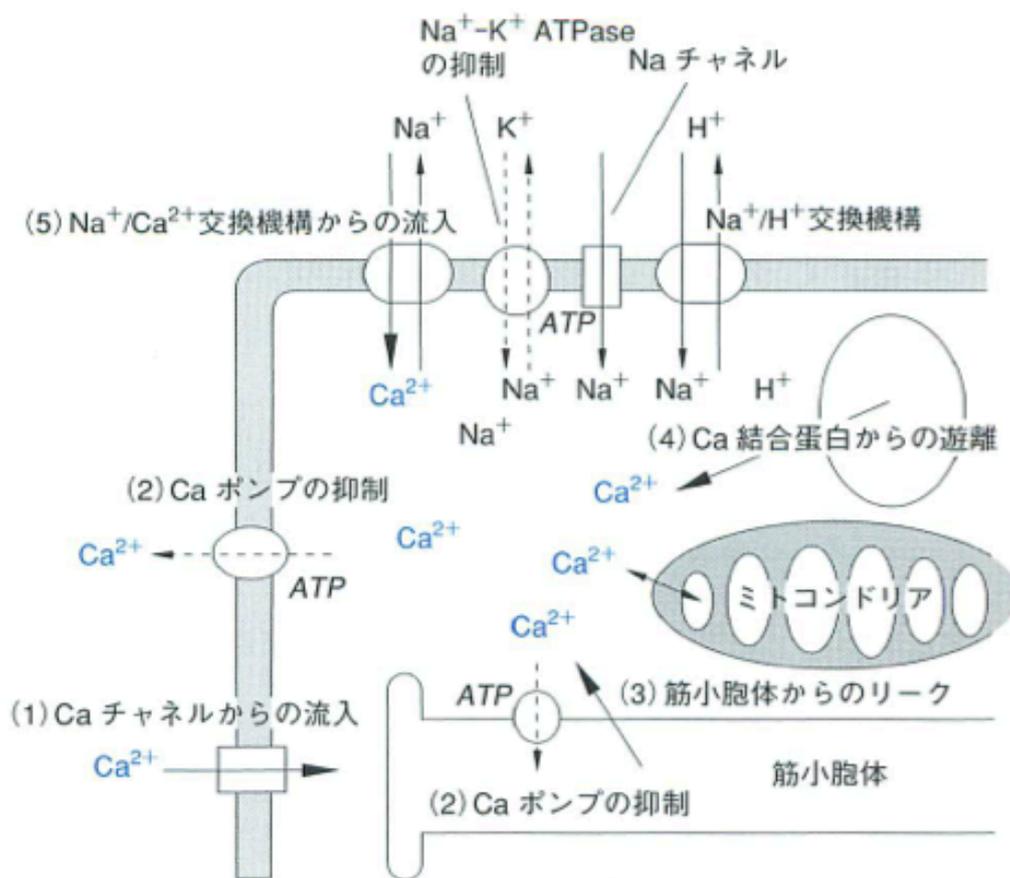


図1.3. 心筋細胞内Ca²⁺ハンドリング

(Chidsey CA. : in Braunwald.E.(ed) : The Myocardium : Failure and Infarction. New York. HP Publishing Co., 1974)

この筋小胞体から放出された大量の Ca^{2+} が細いフィラメントを構成するトロポニンCに結合することにより、トロポニンI、トロポニンTの偏位を生じる。そのため、抑制されていたミオシン頭部のATP水解酵素が活発化することから、アクチンフィラメントとミオシン頭部が連結して新規細胞が収縮する(図1.4)。

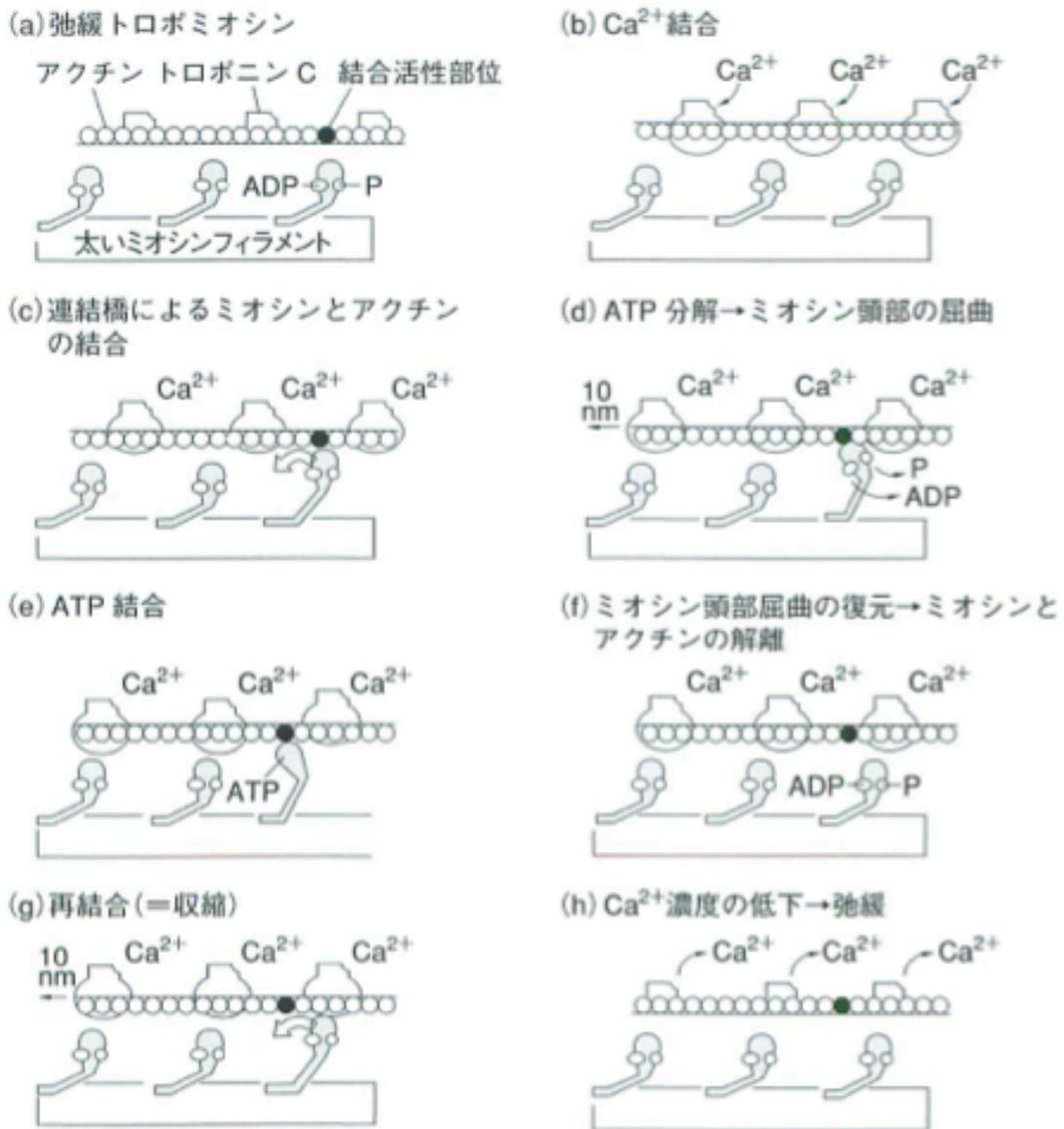


図1.4 心筋収縮モデル

(Chidsey CA. : *in* Braunwald.E.(ed) : The Myocardium : Failure and Infarction. New York. HP Publishing Co., 1974)

心筋の弛緩は Ca^{2+} がトロポニンCから解離して細胞室内に遊離することで起こる。筋小胞体に存在する Ca^{2+} -ATPaseにより、1分子のATPを消費することによって2分子の Ca^{2+} が能動的に取り込まれ、取り込まれた Ca^{2+} は筋小胞体のカルセケストリンに結合して貯蔵される。また、余分な Ca^{2+} は再分極時に $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換系や細胞膜の Ca^{2+} ポンプを通して細胞外に放出され、脱分極前と同じ平衡状態へと戻る。このように心筋の収縮に Ca^{2+} は中心的な役割を果たしている。たとえば、 β アドレナリン受容体刺激によって細胞内 Ca^{2+} レベルが増加すると、心筋収縮は増加するのである。 Ca^{2+} チャンネルは膜が脱分極のほうに向かうと開口して、細胞外の Ca^{2+} を細胞内に流入させるタンパク、 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換系は細胞内外の Ca^{2+} 流入を規定する交換係、リアノジンは筋小胞体からの Ca^{2+} 流出、SERACA2、干すほら版は細胞質から Ca^{2+} の取り組みに関与する。また、心筋長伸展に伴う発生張力の増加は細胞内 Ca^{2+} 濃度に依存することが明らかになってきた(図1.5)。つまり、 Ca^{2+} は心筋収縮の発火をもたらすだけでなく、収縮蛋白である蛋白トロポニンCの感受性を増大することにより、心筋収縮力増大への相乗的調節を行っているものと考えられる。

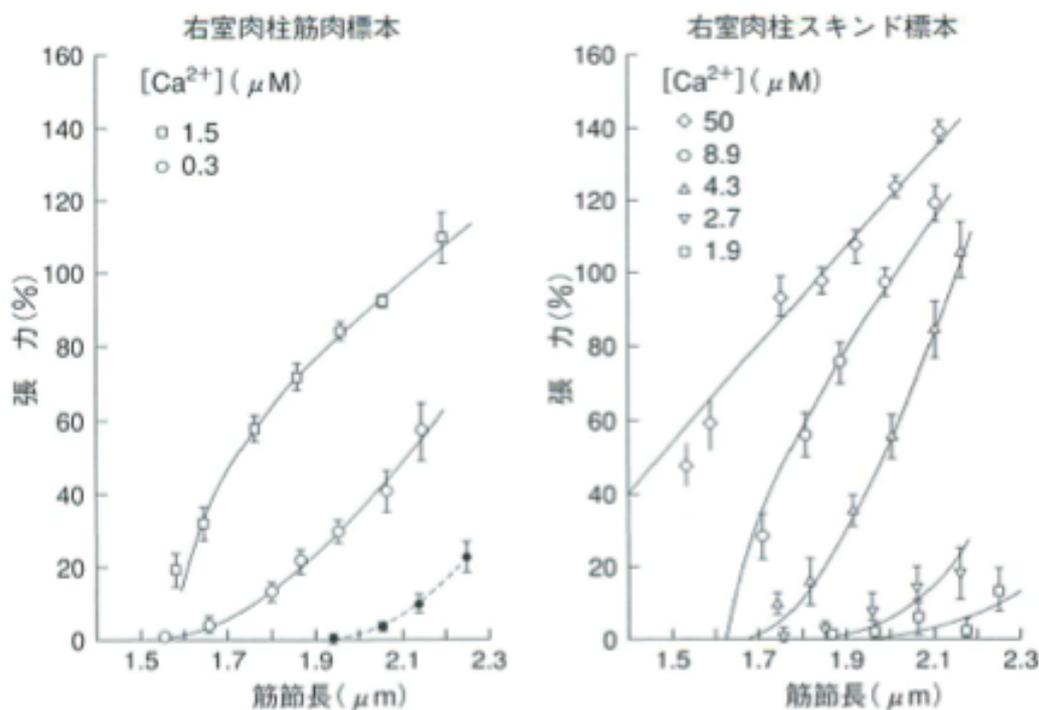


図1.5 ラット心筋における筋節長-張力に対する細胞内 Ca^{2+} の影響

(Kentish JC, *et al* : Circ Res. 58 : 755-768, 1986)

1.1.2.3 心筋収縮低下因子

心筋は虚血過負荷状態になると、乳酸蓄積などによりアシドーシスとなるが、このとき細胞膜の Na^+/H^+ 交換系の亢進によりアシドーシスが軽減され、その結果細胞内 Na^+ は増加する。この細胞内 Na^+ の増加は Na^+/H^+ 交換系を介し、細胞内への Ca^{2+} 流入を促進する。虚血によらない不全心筋でも同様の現象が認められる。この Na^+ 、 H^+ 、 Ca^{2+} などのイオンの変動は心筋細胞機能を考えるうえで重要であるが、細胞障害の因子になりうるのである。図1.6はフェレットのLangendorff心標本にて(Taegtmeier H, Roberts AFC, Raine AEG, *et al.* 1985) , Na NMRを用いて心筋虚血中の Na^+ 濃度の変化を経時的に検討したものである(Pike MM, Kitakaze M, Marban E, *et al.* 1988)。この実験では、心筋虚血後数分に細胞内 Na^+ レベルが増加を始め、その後虚血時間に応じた増加を示す。このとき、同時測定した H^+ レベルも上昇すること、またこの Na^+ の増加は Na^+/H^+ 交換系阻害薬によって抑制されることから、虚血中の Na^+ の増加は H^+ 増加に伴う Na^+/H^+ 交換系を介するものであると考えられる。

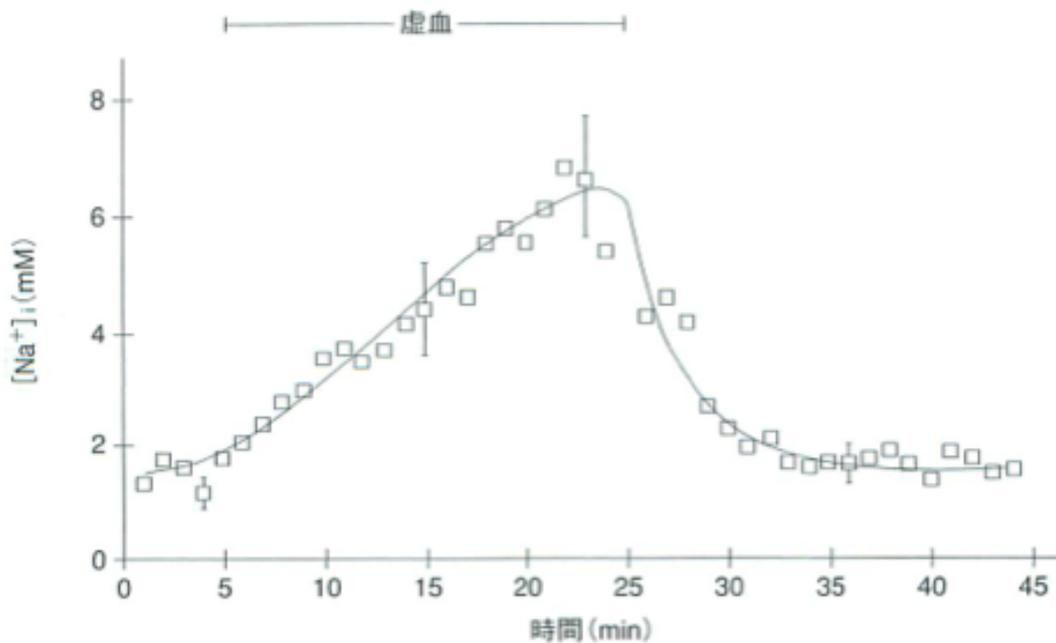


図1.6 フェレットのLangendorff心標本における虚血・再灌流中の細胞内 Na^+ の時間変化
細胞内 Na^+ 濃度はNa NMRを用いて求める

(Pike MM, Kitakaze M, Marban E, *et al.* : Circ Res 78 : II-151, 1988)

図 1.7 は心筋虚血中の細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化をフェレットの Langendorff 心標本を用いて検討したものである (Marban E, Kitakaze M, Koretsune Y, *et al.* 1990). この検討によると、細胞内 Ca^{2+} 濃度が増加し始めるのは心筋虚血後 10~15 分からであり、再灌流直後も細胞内 Ca^{2+} レベルは高値を示す. このような一過性の Ca^{2+} 過負荷が生じると、中性プロテアーゼが活性化され細胞膜上のイオンポンプやチャネルが障害を受けたり、細胞膜や細胞骨格も障害を受けることにより、心筋細胞の収縮性が低下する. さらに Ca^{2+} 過負荷は Ca^{2+} 依存性プロテインキナーゼ C を活性化するが、活性化されたプロテインキナーゼ C は、トロポニン I をリン酸化し (Kitakaze M, Weisman HF, Marban E, *et al.* 1988), 心筋収縮を低下させる.

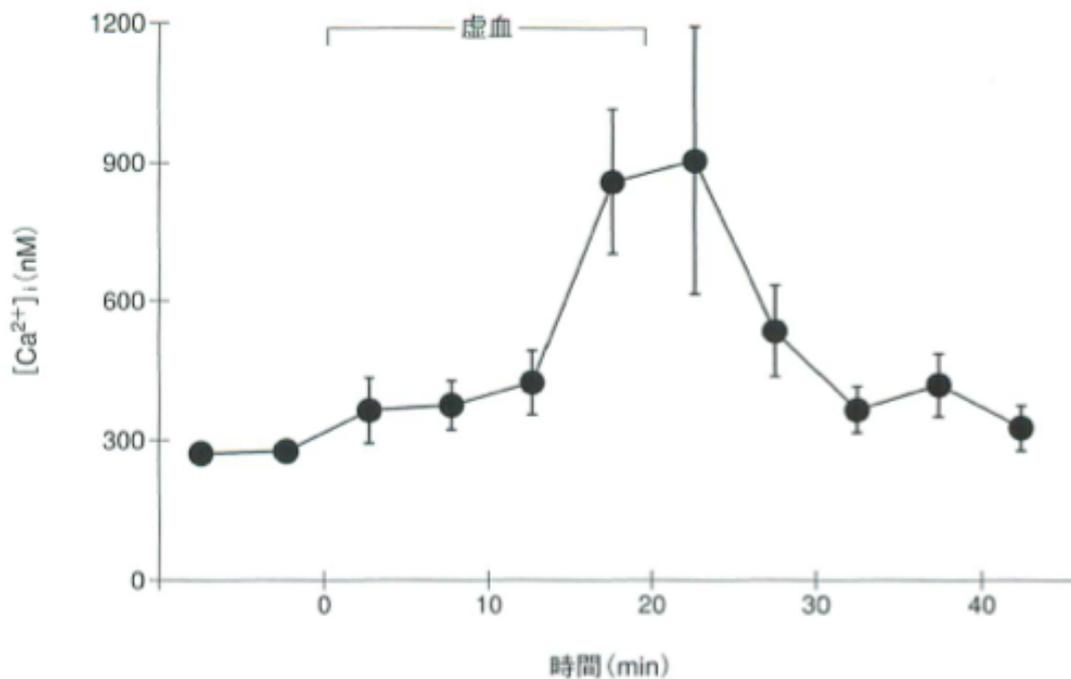


図1.7 フェレットのLangendorff心標本における虚血・再灌流中の細胞内 Ca^{2+} の時間変化
細胞外 Ca^{2+} 濃度を8mMに変化させても、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は心筋虚血・再灌流にて増加する.

(Marban E, Kitakaze M, *et al.* : Circ Res 66 : 1255-1267, 1990)

再灌流すると、心筋が急速に再酸素化されるため、フリーラジカルが生産される. 特に虚血・再灌流障害では水酸化ラジカル(OH[•]), 酸素ラジカル(O₂^{•-}) が重要な働きをする. この生産さ

れたフリーラジカルは心筋細胞膜を弱くするばかりではなく、細胞膜上のイオンチャネルやイオンポンプを障害する。Grossら (Gross GJ, *et al.* 1986) は、麻酔開胸イヌを用いた検討にて、15分間の冠閉塞-再灌流にて生じた心筋収縮不全がスーパーオキシドジスムターゼ(SOD)で有意に抑制されることから(図1.8)、心筋虚血-再灌流中に O_2^- の関与が重要であると報告した。さらに、Bolliら (Bolli R, *et al.* 1989) は、再灌流1分以内に大量のフリーラジカルが発生するが、これがmyocardial stunning 形成と密接な関係にあること、 O_2^- のみならずOHも重要であることを示した(図1.9)。また、キサンチンヒドロキシラーゼからキサンチンオキシターゼへの変換はプロテアーゼ活性化によるが、この酵素の活性化には前述した心筋内の Ca^{2+} 過負荷が関連しているものと考えられている。また逆に、フリーラジカル産生が Na^+/K^+ ポンプや Ca^{2+} チャネルの機能低下を介して Ca^{2+} 過負荷をまねくことも示唆されており、フリーラジカルの産生と Ca^{2+} 過負荷が再灌流を引き起こすものと思われる。

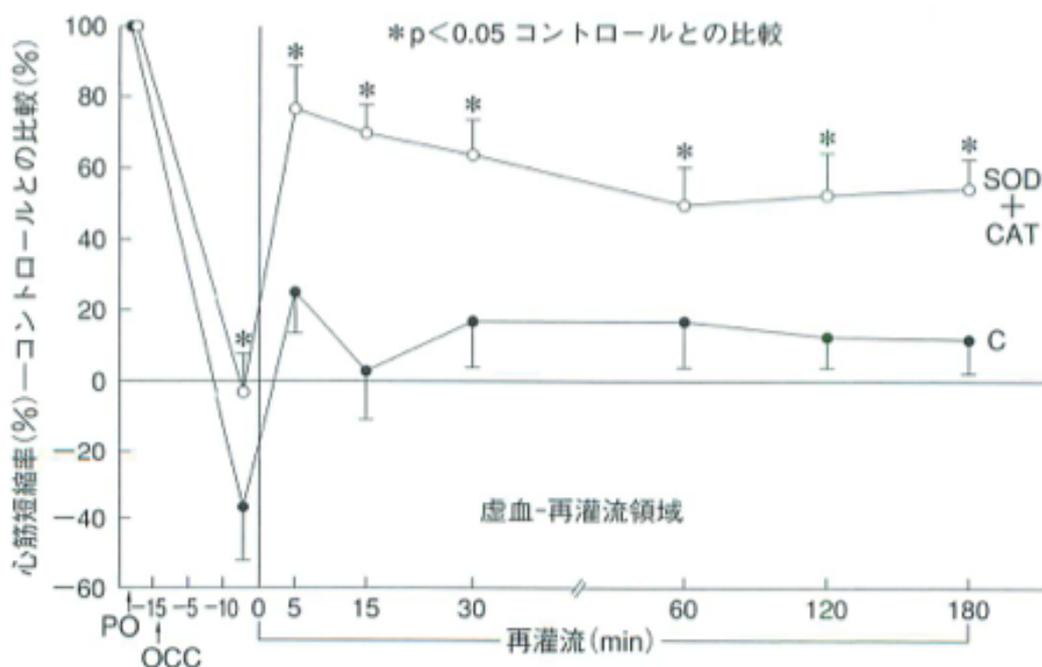


図1.8 麻酔開胸イヌにおける左前下行枝15分間完全結紫-3時間再灌流の局所心筋短縮率の変化

SODとCAT(カタラーゼ)投与群のほうが再灌流後の心機能改善が著明である。

(Gross GJ, *et al.* : Am J Physiol 250 : H372-H377, 1986)

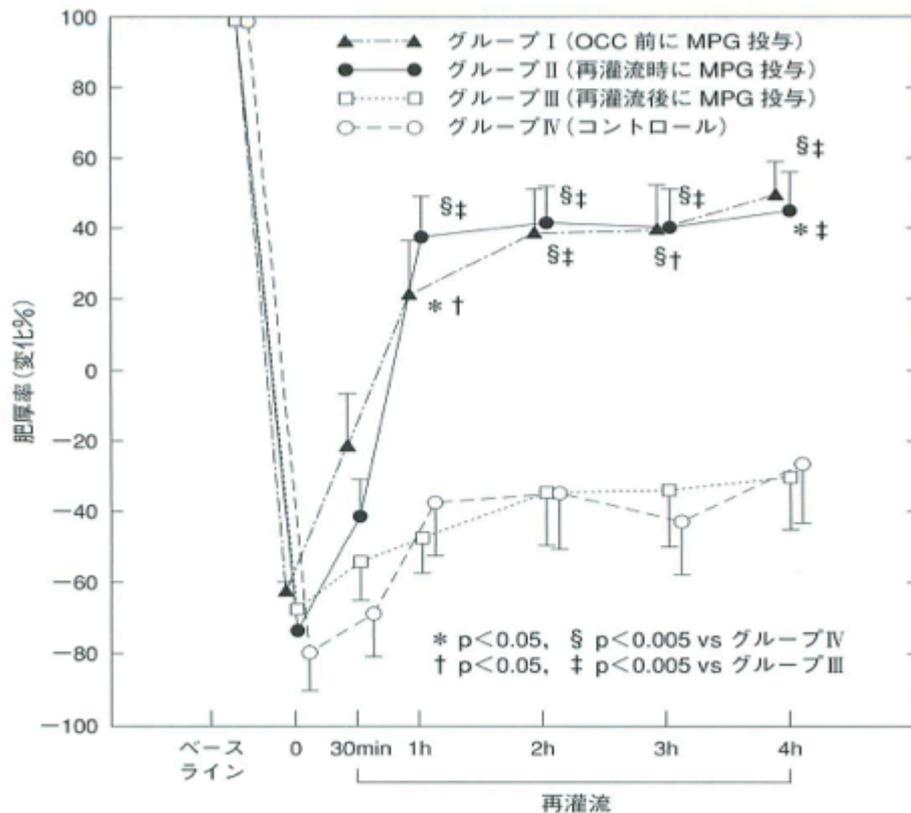


図1.9 麻酔開胸イヌにおける左前下行枝15分間完全結紮-4時間再灌流の局所壁圧の変化
 フリーラジカルスカベンジャーであるMPGの投与を虚血前(▲), 再灌流1分前(●)に行った
 ほうが, コントロールに比べて心機能の改善がない. (Bolli R, *et al* : *Circ Res* 65 : 607-622,
 1989)

1.1.3 種差による心臓の違い

成体の心臓の構造は生物種によって異なることも報告されており, ヒトなどの哺乳類の
 他, 鳥類やラット・モルモット等の齧歯類は二心房二心室の構造を取っているが, 魚類は
 一心房一心室の単純な構造を取っており, 両生類や爬虫類は二心房一心室の構造を取るな

ど、進化の過程において、それぞれの生活環境や身体の構造に沿った形で心臓が形成されている (Franco, Gallego *et al.* 2002; Koshiba-Takeuchi, Mori *et al.* 2009). 例えば、一般的に、二心房二心室の心臓構造では、身体循環と肺循環を完全に分離する事ができ、酸素を呼吸や循環の効率を向上させる事ができることなどが利点として挙げられる。なかでも、齧歯類の心臓は、ヒトと類似していることが知られており、ヒトに応用する目的で数多く実験に用いられ、多くの報告がなされている。心臓の拍動は、心臓を構成している個々の心筋細胞において、1細胞レベルで起こるチャンネル電流や膜電位などの現象の集合として制御されている。その仕組みは、電気的な興奮によって、刺激が伝搬されることで、膜上に多数存在するチャンネルを通じて電流が生じることによって起こりうることから、それらの電氣的挙動は、システム的に解明することが出来る。そのため、心臓全体の挙動を知るためには1細胞ごとに起こりうる事象を理解することが必須であり、心筋細胞の電氣的現象の解明に向けて数理モデルの構築が求められた。動物実験モデルが心臓機能をより深く探求するために有用である例は、ヒトの遺伝子に対する研究にも示されている。心臓の発生・分化に関わる遺伝子発現機構は、ハエからヒトに至るまで幅広く保存されているため、実験動物モデルを使用した研究から非常に多くの知見が得られたことも事実である。ショウジョウバエは1心室なので2心房2心室の形成機序を研究するには理想的ではないが理想的ではないが、多くの変異体が存在するため、心臓発生の原理を理解する上で有用である。Zebrafishは脊椎動物であり、ショウジョウバエより複雑な二腔の心臓をもち、胎児は水中で成長するため、心臓を簡単に観察できる利点などもある。これらのようにそれぞれの動物実験モデルは心臓をより探求するのに欠かせない存在なのである。

1.1.4 洞房結節細胞

心臓は規則的な収縮・弛緩運動を繰り返し、全身に血液を送るポンプの働きをもつ、この運動には電気刺激 (活動電位) の発生と細胞間の電気伝導が深く関わっている。電気刺激は

上大静脈と右心房の境界付近に存在する洞房結節（ペースメーカー）で自立的に発生し、心房筋、房室結節、ヒス束、左・右脚、プルキンエ線維、心室筋の順に伝導する。洞房結節の電気刺激発生の頻度は心臓収縮の頻度を定めることになるため、その周期が乱れると、頻脈などの深刻な不整脈が引き起こされる。図 1 にて洞房結節細胞の部位とその活動電位波形を示した。生体細胞では、細胞膜内外のイオン濃度が異なっているために電位差（膜電位）が生じる。静止状態において膜電位は負値に保たれており、静止膜電位とよばれる。細胞膜上にはイオンチャネルという開閉機構をもつタンパク質の穴がある。イオンチャネルが開閉すると、細胞膜内外に存在する種々のイオンが細胞膜を通過し、膜電位が変化する。膜電位が静止膜電位からプラス方向に変化し、その後元の静止膜電位へ戻る一連の膜電位変化が活動電位である。したがって活動電位の発生にはイオンチャネルの開閉機構が重要な役割を担っている。ゆえに、洞房結節細胞の活動電位はそれぞれのイオンチャネルのコンダクタンスの量によって左右される。

1.1.5 生命現象のコンピュータ・シミュレーション

生命科学と数理モデルの関わりは古く、メンデルの遺伝理論もその一例である。20世紀に入ると、タンパク質の機能を定量する酵素学が発展し、個々の研究成果はタンパク質の触媒機能を再現する微分方程式に集約された。その後、個々のタンパク質の機能を記述した酵素反応速度論モデルを連成した代謝反応ネットワークモデルが構築され、コンピュータシミュレーションが試みられた。生命科学の知識の統合と、細胞内の分子間相互作用ネットワーク全体を把握したいというような生命現象の理解の手段の一つとして、数理モデル化とコンピュータシミュレーションが注目されている。細胞内の事象を分子レベルで定式化した数理モデルのなかには部分的ではあるが高精度に細胞機能を再現できるものがある。これらのモデルを用いて、分子レベル、細胞レベルの微細な機能変化が生じたとき、細胞システム全体にどのような現象が生じるのかシミュレーションすることが可能である。シミュレーションによって実験だけでは明らかにできない知見を得ることができるのである。そこで、我々はシミュレーションツールとして、E-Cell Simulation Environment (E-Cell SE)を用いる (Tomita, Hashimoto *et al.* 1997; Takahashi, Arjunan *et al.* 2005)。E-Cell SE上で、数理モデルを計算させることで、擬似的な細胞をコンピュータ上で再現することが可能である。我々は対象を理解する際、必ず何らかのモデル化を行う。モデル化とは、対象に恣意的な抽象を施し、取り扱い可能な形式に再構成することを指す。数理モデルは、対象を数学による

数式で表現したものである。本研究では、シミュレーションモデルとして、心筋細胞モデルの1つである、包括的心筋細胞モデル (Kyoto model) (Kuzumoto *et al.* 2008) から、線維芽細胞モデル、ヒト心筋細胞モデルを扱った。

コンピュータ技術の浸透とともに、私たちの生活の中でシミュレーション技術が活用される場面が増加し、その需要は今後も高まっていくことが予想される。生物学以外の場面においても、ロケットの発射や、ロボットの組み立てなど、実際に試行することが困難な場面で、実際に起こりうる現象を数理モデルによって再現し、シミュレーションを行う手段が多く取られている。精巧な数理モデルの構築により、金銭や人員・実験環境の確保などの問題をクリアにし、再現性の取れたデータを得る事が可能となる。生物学の分野では、後にノーベル賞を受賞したHodgkinとHuxleyらによって、1952年に初めて神経細胞のモデルが報告された(Hodgkin and Huxley 1952)。彼らの細胞モデルがきっかけとなり、コンピュータの普及とともに数理モデルによる擬似的な生命動態の探求が段々と浸透していくことになった。数理モデルを用いることによって、今まで実験環境下では困難であった細胞の時系列による変化を、生きた細胞により近い形で再現することが新たに可能となり、細胞内で起こり得る現象を系統的に解明するための有用な手法として用いられている。特に、神経細胞と同じように、電氣的興奮によって細胞の挙動が制御されている心筋細胞では、初めて心筋細胞のモデル化に成功した Nobleらを初めとして (Noble 1960) , これまで数理モデルを用いた研究が数多く報告されている (Noble, Garny *et al.* 2012)[図1.10].

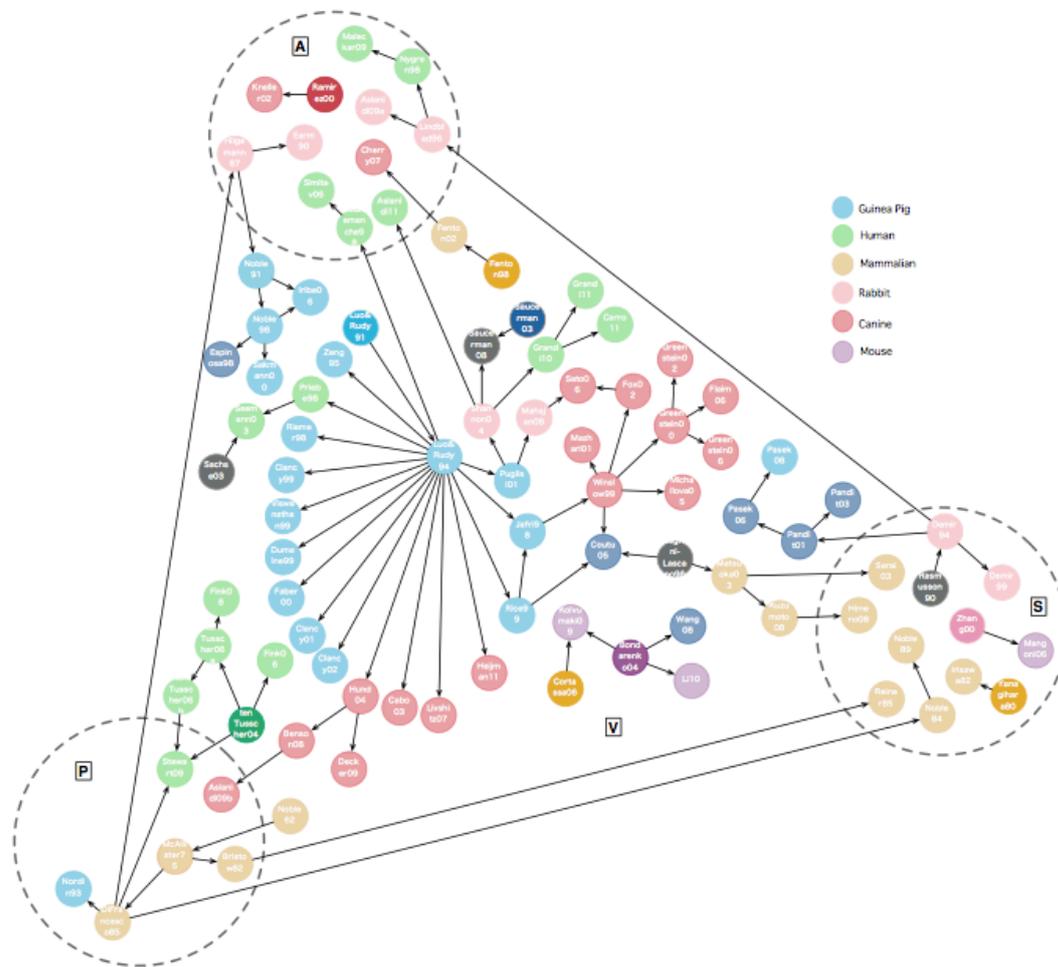


図1.10 発表されている心筋細胞モデルの相関図
 (Noble, Garny *et al* : *J Physiol*, 590(Pt 11) : 2613-2628, 2012)

発表されたモデルをもとに、さらに種差や部位などの違いの追加や改良が施され、現在も使われているモデルまで脈々と受け継がれていることが見て取れる(Noble, Garny *et al.* 2012). 図中のAは心房 (Atrium)・Pはプルキンエ繊維 (Purkinje)・Sは洞房結節(SAN)・Vは心室 (Ventricule)を示し、これまで圧倒的多数の心室筋モデルが報告されていることが確認出来る。

私たちは、このような数理モデルを用いて、心筋細胞の膜電位や個々のイオン電流の挙動、また収縮力やエネルギー量などを網羅的に、かつ時間経過に沿って観察することを可能にし、将来的には、より精密なモデルの作成とともに、生体内で連続的に変化する挙動を生きた細胞と同じように再現することを目標としている。それにより、実際の医療現場などに応用可能な新しい発見に繋がる知見が得られることを期待している。

1.1.5.1 E-Cell Simulation Environment (SE)

E-Cell SEは、1996年に慶應義塾大学の冨田らによって開発が開始された (Tomita, Hashimoto *et al.* 1997; Takahashi, Arjunan *et al.* 2005), 生物モデルのコンピュータシミュレーションツールの一つである。本システムは、細胞の全機能をコンピュータ上で再現する全細胞シミュレーションを目標に掲げており、本研究で使用しているシステムは、当時の初期段階から改良が加えられた第3版を用いている。E-Cell SEはメタアルゴリズム (meta-algorithm) と呼ばれるフレームワークを用いて、様々なシミュレーションアルゴリズムを一斉に実行することが可能である (Takahashi, Naito *et al.* 2010)。メタアルゴリズムでは、複数のデータ構造を規定しており、最も基本となるModelオブジェクトの上にVariableオブジェクトなどの、任意の実数を持つオブジェクト等が存在している。E-Cell SEはC++言語で記述されており、シミュレーションカーネルであるLibecsのもとに、基本となる4つのオブジェクトクラス (Variable, Process, Stepper, System) を基盤にして、メタアルゴリズムの反復処理及び、終了後のデータの獲得を可能にした。本システム上で、数理モデルを計算させることで、時間経過とともに変化する様子を、モデル内で規定されたVariable (変数) 及びProcess (反応速度) の網羅的なデータによって、観察することが出来る [図1.11]。

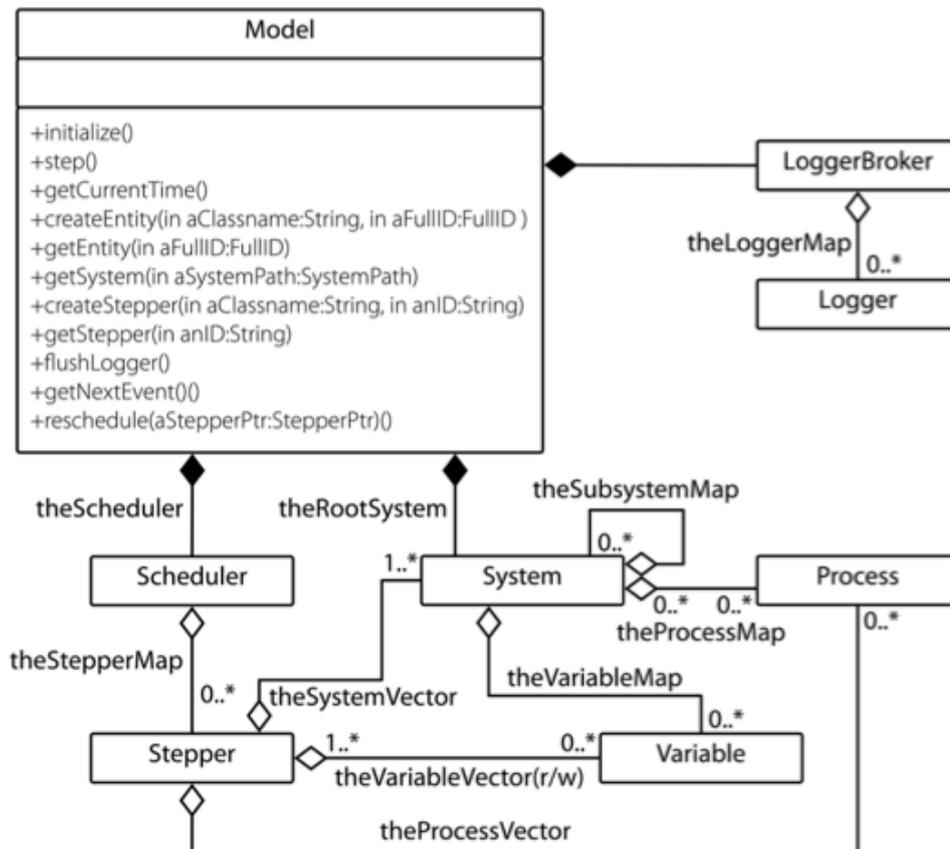


図1.11 E-Cell SEカーネルのクラス構造概要

Variable・Process・Stepper・Systemの代表的な4つのオブジェクトクラスとその他の複数のオブジェクトが基盤となるModelオブジェクトの元に存在している。

1.2 研究目的

近年になり、心筋細胞の老化が心不全の発症ともかかわっている可能性が示唆されるようになったとされている。心臓の加齢に伴うタンパクの発現や、機能の変化に関する検討や、心筋細胞の老化を起こすメカニズムについてのさらなる検討により、心臓の老化や心不全に関する新たな治療が期待される。本研究では、先行研究より明らかになっている実験数値をもとに、コンピューターシミュレーションE-Cell SE を用いて加齢心筋細胞の再現を試みる

ことで、心筋細胞の老化を起こすメカニズムを心筋細胞の収縮に着目して明らかにすることを一つの目的とした。また、心疾患の代表的な例である臨床的に最も頻度の高い頻脈性不整脈であるとされている心房細動についても本研究のテーマとして掲げた。心房細動そのものによって心房の電気生理学的特性が心房細動を持続しやすいように変化させていく現象である電気的リモデリングを予防することが必要とされ、その電気的リモデリングの予防が心房細動そのものを抑制すると示唆されている。そこで、本研究では電気的リモデリングに関与するイオンチャネルなどに着目し、心房細動のメカニズムの解明を本研究の目的としてシミュレーションを行うこととした。また同時に、老化した心臓と成人の心臓を比較すると、老化した状態の方が成人よりも心房細動の発生に関わるバーストが発生しやすいという仮説を立て、成体と老化状態の心臓を再現し、それぞれのシミュレーション結果を比較することで検証した。以上のように、本研究では心臓の収縮に寄与するイオンチャネルなどの要素特定を大きな目的としている。

第2章 老化状態における心筋細胞の探求

2.1 研究背景

心筋では加齢とともに老化現象が起こると知られている。そこで本研究では、先行研究より明らかになっている実験数値をもとに、コンピューターシミュレーションE-Cell SE を用いて加齢心筋細胞の再現を試みた。なかでも、既存のKyoto model を用いて再現したものや、既存に存在する洞房結節細胞 (SAN) モデルを用いて再現を行なった。

2.1.1 老化状態

老化とは、成熟期以降に生体機能が次第に衰えていく現象である。分裂性細胞では、老化は不可逆性の細胞増殖停止状態と定義されている。すなわち、体を構成する細胞は分裂の回数に限界があり、何回か分裂するとある時点から細胞分裂能が低下するため加齢とともに体の細胞数が減少し、ついには臓器や体を維持できなくなるという考え方である。しかし、心筋細胞や神経細胞などの非分裂性細胞は、出生後に分化するのみでほとんど分裂しないため、この定義が適用できない。そのため、心筋細胞の老化については分裂性細胞の老化とは異なったものとされている。従来では心筋細胞の加齢に伴う変化は、リポフスチンやアミロイドなどの蓄積が起こることや拡張能を主とした心機能低下が起こることであったが、近年になり、心筋細胞の老化が心不全の発症ともかかわっている可能性が示唆されるようになったとされている。

2.1.2 心臓の老化

分裂性細胞・非分裂性細胞に関わらず、複数の因子により細胞老化が誘導されていると考えられている。なかでも活性酸素による酸化ストレスは最も有力な老化誘導因子のひとつである。細胞内の活性酸素はおもにミトコンドリアの電子伝達系に伴って発生するが、時間が経過して活性酸素によるミトコンドリアDNAの損傷によるミトコンドリアの機能不全が起こると活性酸素の余剰量が増え、細胞全体に損傷を与える。また、細胞内にはスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) やカタラーゼなどの活性酸素を消去する抗酸化酵素が存在しており、酸化ストレスによる損傷を防いでいる。しかし加齢に伴ってこれらの酵素活性

が低下することも細胞老化を促進する機序と考えられている。心不全発症の重要なメカニズムのひとつである病的な心筋細胞の肥大も酸化ストレスによって誘導される。

加齢に伴って起きる現象はいくつかある。心筋収縮にはサルコメアの構成成分であるトロポニンI (TnI) のリン酸化が必要であるが、加齢ラットの心筋ではトロポニンI のリン酸化が低下することも明らかである。心房に関してでは、心房細動の頻度の増加や心房不応期の延長も取り上げられている。また心房の線維化、細胞肥大などを原因として心房内伝導速度の低下が起こるとされている。加齢に伴い心房筋の活動電位波形も変化する。加齢に伴いプラトー相、活動電位持続時間 (APD) の変化が報告されている。またチャネルの性質の変化が一過性外向き電流 (I_{to}) の増加について報告されている。また心房筋、心室筋間での差はほとんどないこともわかっている。

心臓の加齢に伴うタンパクの発現や、機能の変化に関するより検討や、心筋細胞の老化を起こすメカニズムについてさらなる検討により、心臓の老化や心不全に関する新たな治療が期待される。

2.2 対象と手法

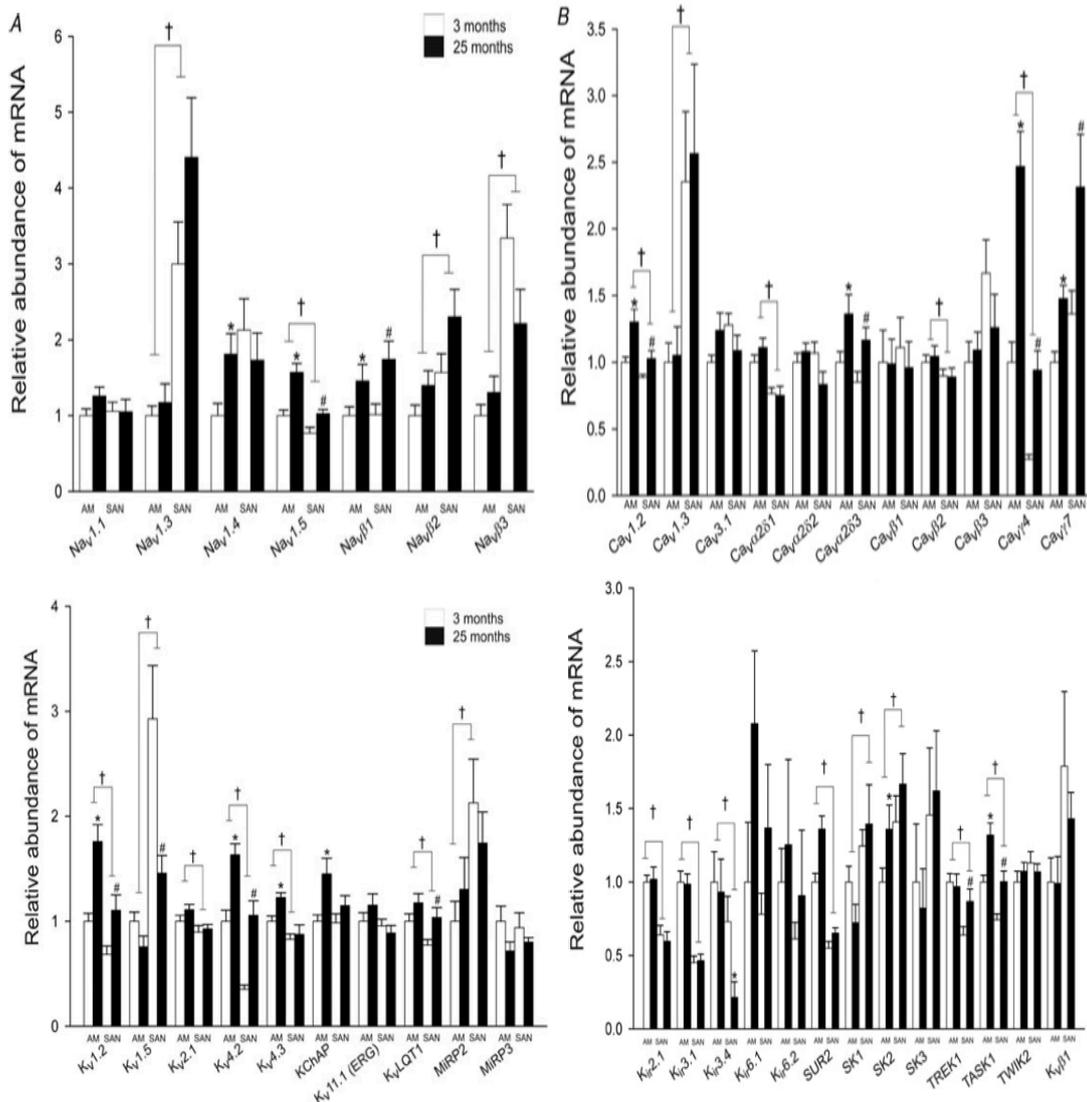
2.2.1 イオンチャネルの活性量変化による加齢心筋細胞の再現

包括的心室筋細胞モデル、Kyoto model (Kuzumoto *et al.*, 2008) を用いて先行研究より明らかになっている結果をもとに加齢心筋細胞の再現を行なう。1 つ目は加齢とともに L 型 Ca^{2+} チャネル電流 (I_{cal}) の活性量が減少することが明らかになっているので、 I_{cal} の活性量を 0.0~1.0 倍に変化させて、600 秒間刺激なしのシミュレーション後、刺激を入れて 600 秒間のシミュレーションを行なった。また、2 つ目は、一過性外向き電流 (I_{to}) の増加が先行研究より明らかなので、 I_{to} の活性量を 1.0~2.0 倍(0.1 ずつ)に変化させて、600 秒間刺激なしのシミュレーション後、刺激を入れて 600 秒間のシミュレーションを行なった。ただし、2 つ目のシミュレーション結果で、 I_{to} の活性量を 1.0~2.0 倍(0.1 ずつ)に変化させるだけでは結果に変化が生じなかったため、3 つ目として I_{to} の活性量を 1.0 倍、10 倍、100 倍に変化させて、600 秒間刺激なしのシミュレーション後、刺激を入れて 600 秒間のシミュレーションを行なった。

2.2.2 洞房結節細胞(SAN)モデルのシミュレーション

2.2.2.1 洞房結節細胞(SAN)モデルにおける活性化量変化

洞房結節細胞と心室筋細胞は異なる2種類の細胞ではあるが、包括的心室筋細胞モデル、Kyoto model (Kuzumoto *et al.*, 2008), と共通の数理モデルを用いて、先行研究より明らかになっている実験値をもとに老化の再現を試みる。現在、私たちが現在、私たちが研究で用いる包括的心室筋細胞モデル、Kyoto model (Kuzumoto *et al.*, 2008), を用いる利点として、収縮力(半サルコメア長)がパラメータとして存在するということが挙げられるが、共通の数理モデルで数理モデルの式を変えずに異なる発生過程と細胞種の活動電位を再現できるということも利点のひとつである。



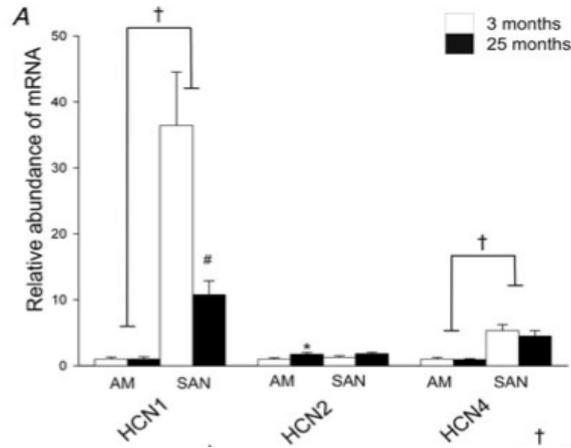


図 2.1 各々のイオンチャネルの mRNA の比較

(Tellez,J.O., Mczewski,M., *et al.* (2011) : *Exp.Physiol.*, 96, 1163-1178.)

図 2.1 で示したのは、先行研究 (Tellez,J.O., Mczewski,M *et al.*, 2008) より明らかになっている実験結果である。図の中の白の棒グラフが 3 ヶ月で、黒の棒グラフが 25 ヶ月(Aged)のものを示している。

先行研究ではそれぞれのイオンチャネルの活性量ではなく、mRNA の量を対象としている結果であるが、本研究では最初の取りかかりとしてこのような先行研究の結果をもとにそれぞれのイオンチャネルの活性量を変化させてシミュレーションを行なった。

活性量の変化については

1. I_{Na} の活性量を 1.0~2.0 倍(0.1 ずつ)に変化
2. I_{CaL} の活性量を 1.0~2.0 倍(0.1 ずつ)に変化
3. I_{Ks} の活性量を 1.0~2.0 倍(0.1 ずつ)に変化
4. I_{Kr} の活性量を 0.0~1.0 倍(0.1 ずつ)に変化
5. I_{ha} の活性量を 0.0~1.0 倍(0.1 ずつ)に変化
6. I_{to} の活性量を 1.0~2.0 倍(0.1 ずつ)に変化
7. I_{KATP} の活性量を 1.0~1.5 倍(0.1 ずつ)に変化
8. I_{KACh} の活性量を 0.5~1.0 倍(0.1 ずつ)に変化
9. I_{K1} の活性量を 0.5~1.0 倍(0.1 ずつ)に変化

これらのパターンを 600 秒間刺激なしでシミュレーションを行なった。

2.2.2.2 最大拡張期電位 (MDP) と基本周期長 (BCL)

最大拡張期電位 (Maximum Diastolic Potential: MDP) とは、脱分極して再分極する際のもっとも電位の低い部分のことである。基本周期長 (Basic Cycle Length: BCL) とは、最大拡張期電位から次の最大拡張期電位が起こるまでの長さを示す。洞房結節細胞では、上記長さを基準として活動電位波形の比較を行うことが一般的に知られている手法として存在するため、本研究でも上述した MDP 及び BCL を、結果を考察する上で一つの指標として用いた。

詳しい手法としては、600 間刺激なしでそれぞれ対象となるイオンチャンネルの活性量を変化させてシミュレーションを行なう。さらに続けて同様のシミュレーションを 1 秒間行なう。そこで MDP を起点として MDP の時刻を 0 にし、時系列を合わせる。この手法によって BCL の長さが明らかになり、それらを基準として活動電位波形の比較を行うのに適している。

2.2.3 2種のイオンチャンネルの活性量変化における再現

洞房結節細胞では拡張期に緩徐な脱分極が発生し、これによって自動的に活動電位が発生する。活動電位の立ち上がり相は電位依存性 Na^+ チャンネル (I_{Na}) によるのではなく、L 型 Ca^{2+} チャンネル電流 (I_{CaL}) の活性化によるものである。L 型 Ca^{2+} チャンネル電流 (I_{CaL}) の不活性化と遅延整流 K^+ 電流 (I_{Kr}) の活性化によって活動電位再分極相が形成される。最大拡張期電位の後、活動電位によって活性化した遅延整流 K^+ チャンネルが脱活性化すること、内向き電流が次第に増加することなどによって、拡張期緩徐脱分極 (slow diastolic depolarization: pACemaKer potential) が発生すると考えられている。以上のことから、洞房結節細胞では I_{CaL} と I_{Kr} のバランスによって保たれていることが予想できる。そこで本研究では、 I_{CaL} の活性量を 1.0~2.0 倍に変化させ、さらに I_{Kr} の活性量も 0.0~1.0 倍に変化させて、600 秒間のシミュレーションを行い、2 種類のイオンチャンネルの活性量変化における洞房結節細胞の挙動を俯瞰した。

2.3 結果と議論

2.3.1 イオンチャネルの活性量変化による加齢心筋細胞の再現結果

2.3.1.1 L型Ca²⁺チャネル電流(I_{CaL})の活性量変化

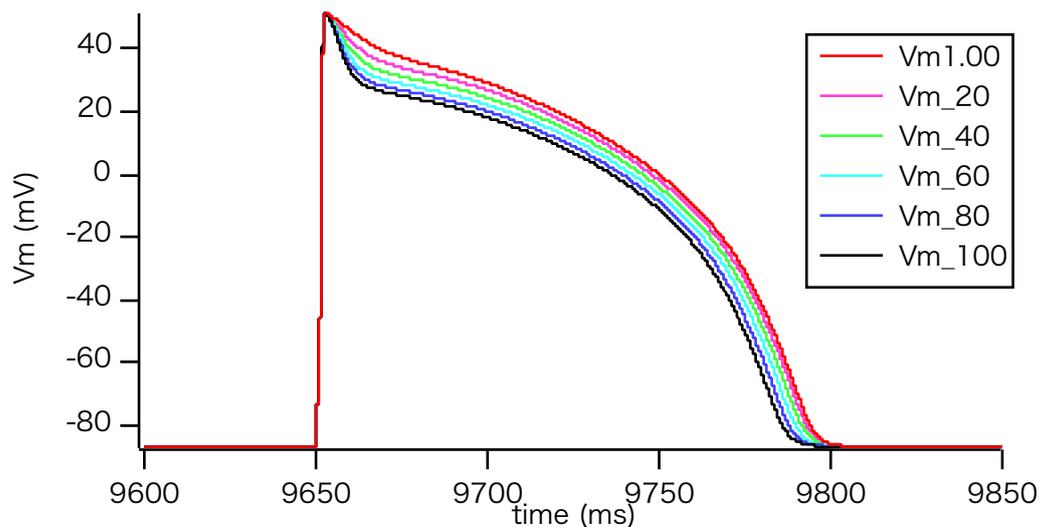


図 2.2-A. I_{CaL} の活性量を変化させたときの活動電位(Vm)

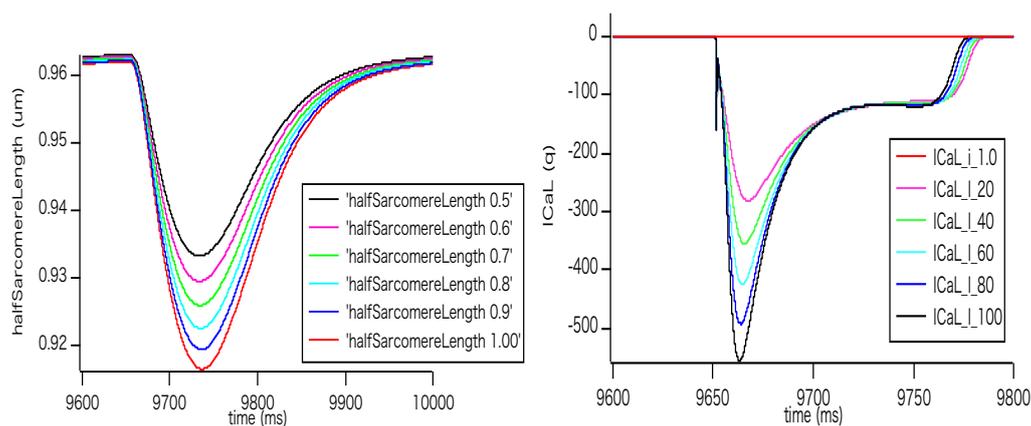


図 2.2-B. I_{CaL} の活性量を変化させたときの収縮力(半サルコメア長 : half sarcomere length) 図 2.2-C. I_{CaL} の活性量を変化させたときの I_{CaL} の電流量

図 2.2-A は L 型 Ca^{2+} チャンネル電流 (I_{CaL}) の活性化量を 0.0~1.0 倍 (0.2 ずつ) に変化させたときの活動電位 (Vm) のグラフである。このことから読み取れるのは、活動電位持続時間 (APD) の短縮が再現でき、またプラトー相が低くなることも再現できた。図 2.2-B は L 型 Ca^{2+} チャンネル電流 (I_{CaL}) の活性化量を 0.5~1.0 倍 (0.1 ずつ) に変化させたときの収縮力 (halfSarcomereLength) のグラフである。これより収縮力の低下が明らかに理解できる。図 2.2-C は L 型 Ca^{2+} チャンネル電流 (I_{CaL}) の活性化量を 0.0~1.0 倍に変化させたときの I_{CaL} の電流量である。

2.3.1.2 一過性外向き電流 (I_{to}) の活性化量変化

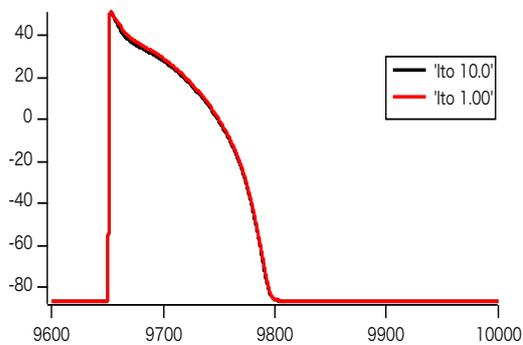


図 2.3-A. 活性化量 10 倍との活動電位の比較

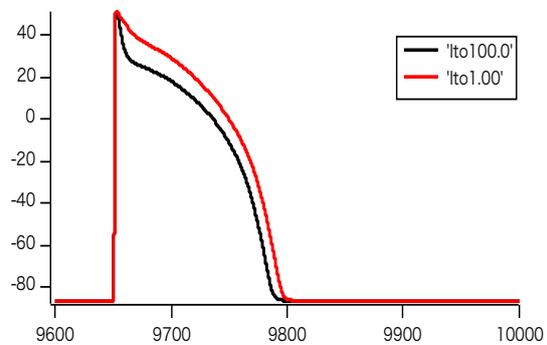


図 2.3-B. 活性化量 100 倍との活動電位の比較

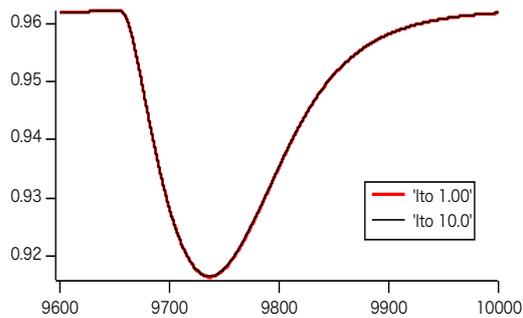


図 2.3-C. 活性化量 10 倍との収縮力の比較

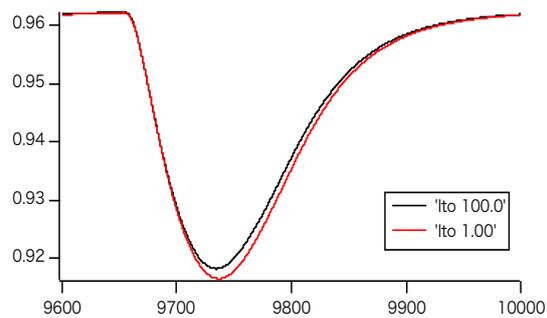


図 2.3-D. 活性化量 100 倍との収縮力の比較

一過性外向き電流 (I_{to}) の活性化量を 1.0~10 倍まで変化させてシミュレーション結果、あまり有意差がみられなかったため、活性化量を 100 倍に変化させてシミュレーションを行なった。結果として、活動電位持続時間 (APD) が短縮し、収縮力 (halfSarcomereLength) は低下することが明らかになった。またプラトー相の低下も再現できた。

2.3.2 洞房結節細胞(SAN)モデルのシミュレーション結果

2.3.2.1 それぞれのイオンチャネルの活性量変化の解析

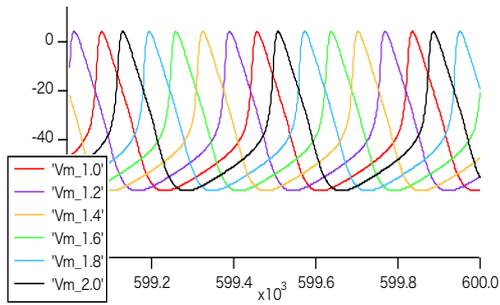


図 2.4-A I_{CaL} の活性量を変化させた時の活動電位 (Vm)

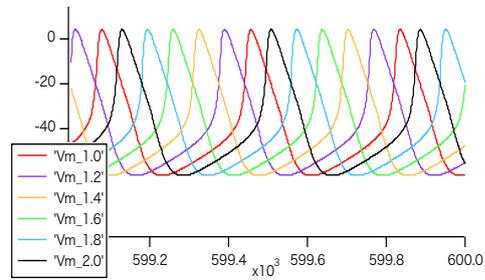


図 2.4-B I_{Na} の活性量を変化させた時の活動電位 (Vm)

図 2.4-A, 図 2.4-B はそれぞれ対象となるイオンチャネルの活性量を 1.0-2.0 倍と変化させて、活動電位 (Vm) の結果をグラフ化したものである。グラフから理解できるように活性量の違いにより活動電位波形のズレが生じていることが理解できる。このズレの原因を探索していく。ズレの原因として考えられるのは、1 点目として BCL の長さの変化はなく、シミュレーションの開始と同時にズレが生じていて、その後そのズレのまま時間が経過していくことが考えられる。2 点目としてシミュレーションの開始と同時にズレが生じるかの有無に関わらず、BCL の長さが活性量によって変化するためズレが生じることが考えられる。これらを考慮して、上述 2.2.2 洞房結節細胞(SAN)モデルにおける活性量変化で述べている 9 通りのシミュレーションを実行し、MDP と BCL の結果を以下にまとめた。

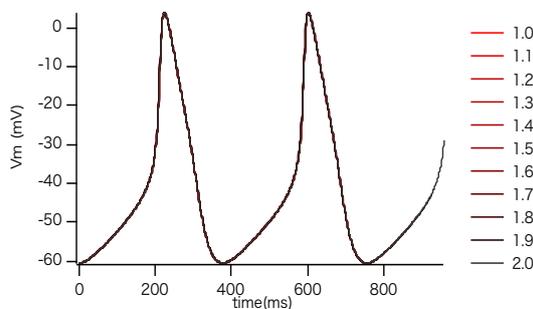


図 2.5-A. I_{Na}

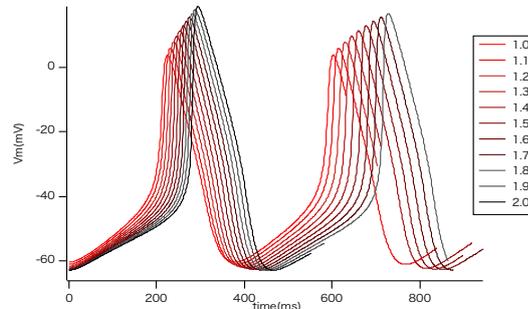


図 2.5-B. I_{CaL}

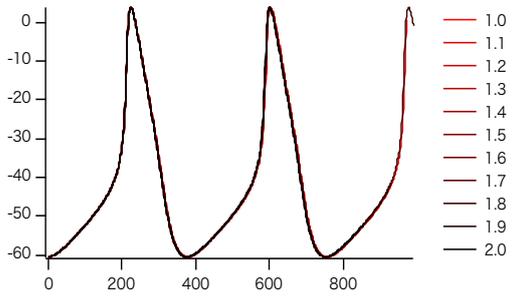


图 2.5-C. I_{Ks}

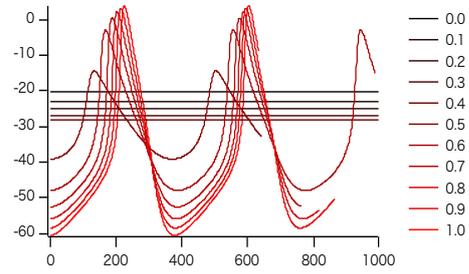


图 2.5-D. I_{Kr}

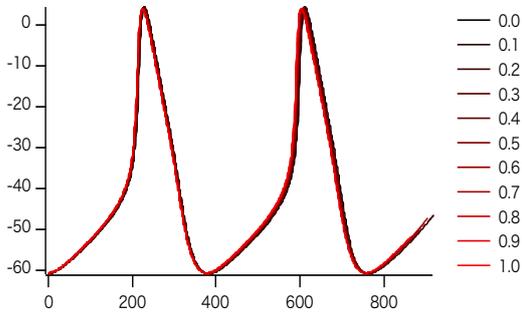


图 2.5-E. I_{ha}

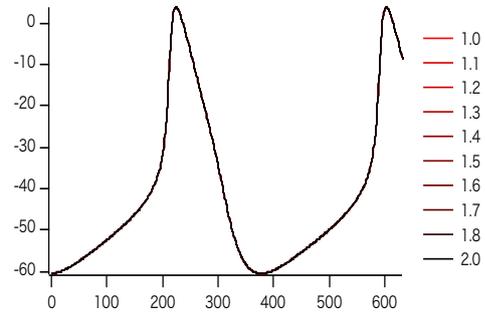


图 2.5-F. I_{to}

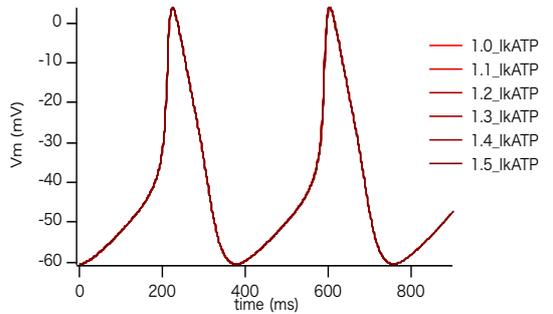


图 2.5-G. I_{KATP}

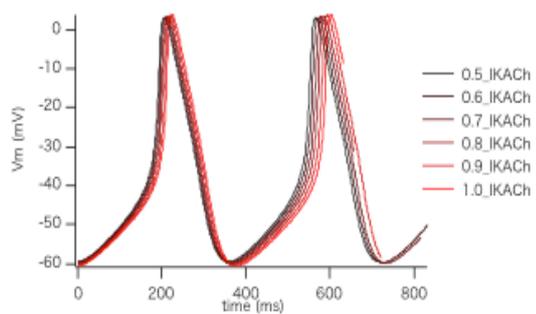


图 2.5-H. I_{KACH}

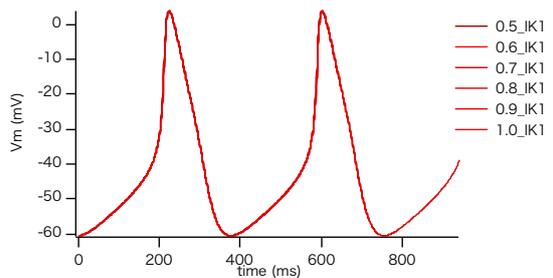


图 2.5-I. I_{K1}

図 2.5-B. I_{CaL} 図 2.5-D. I_{Kr} 図 2.5-H. I_{KACH} に関しては、活性量の違いによって BCL の長さが変化することが理解できる。つまり、 I_{CaL} 、 I_{Kr} 、 I_{KACH} の電流量の活性量を変化させることによって、BCL の長さも変化することもわかる。これにより、活性量の違いにより活動電位波形のズレが生じる原因として BCL の長さが変化することも挙げられる。またそれ以外のシミュレーション結果から、BCL の長さの変化はなく、自立拍動をするタイミングによってシミュレーションの開始と同時にズレが生じるということが理解できる。

2.3.3 I_{CaL} と I_{Kr} の活性量変化のヒートマップ解析

洞房結節細胞では I_{CaL} と I_{Kr} のバランスによって保たれていることから、 I_{CaL} の活性量を 1.0-2.0 倍に変化させ、さらに I_{Kr} の活性量も 0.0-1.0 倍に変化させて、600 秒間のシミュレーションを行い、上述の 2.2.3 MDP と BCL に関してと同様の手法を用いて 2 種類のイオンチャネルの活性量変化における MDP と BCL に関して考察した。以下がシミュレーション結果である。

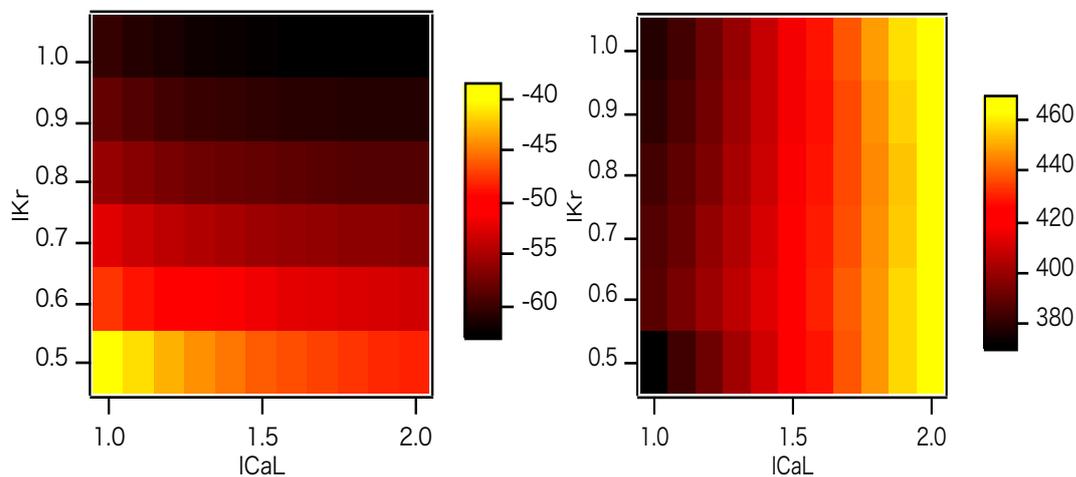


図 2.6-A. MDP

図 2.6-B. BCL

これらの結果より、MDP に関しては I_{Kr} と I_{CaL} の活性量が高いほど活動電位がより負電位になることがわかる。また I_{Kr} のほうが I_{CaL} よりも強く影響を与えることが明らかである。 I_{Kr} よりも影響は小さいが I_{CaL} の活性量が高いほうが影響力が強いことも理解で

きる。BCL に関しては I_{CaL} の活性量が大きいほど BCL の長さが長いことは明らかである。 I_{Kr} の活性量の変化はあまり影響力が小さいこともわかる。今後はこれらに関する原因の探索や議論をより深めていきたいと考える。

第3章 老化状態で生じる可能性の高い心房細動のメカニズ

ム説明に向けたイオンチャネルの探求

3.1.1 研究背景

左心房の心筋細胞は心房と肺静脈の接合部を超えて肺静脈壁内を肺門に向かって伸びていることが、ヒトを含めたさまざまなほ乳類や齧歯類で報告されている。心房に直接連結している胸腔内大静脈の近位部には心房から連続的に伸びた心筋組織があることによって、頻脈性不整脈である心房細動が発生するとされている。近年、心房細動の発生機序として心房の機能と構造の再構築(リモデリング)が注目され、その機序が明らかになってきた。心房細動の多くは、左心房と肺静脈の境界を起源とした異所性の高頻度の興奮によって始まるとされている。その原因として、先天的に心筋細胞が肺静脈に存在することが考えられる。心房細動のメカニズムは十分に解明されていない。先行研究で明らかにされている肺静脈付近に存在する心筋細胞の活動電位の波形を図3.1に示した。また、心房細動の治療法としてカテーターを用いて心房細動が生じないように心房筋に熱を与えて焼灼することで電気的結合を切断する方法が挙げられる。薬物療法における心房細動治療に、現在用いられている抗不整脈薬の有効性および安全性は必ずしも満足するものではない。心房細動の基盤となる心房筋細胞の電気生理学的異常の分子機序が明らかにされつつある現在、イオンチャネルを標的とした治療薬の開発が期待される。本研究ではシミュレーションを用いて、それに向けた電気生理学的なアプローチを試みた。

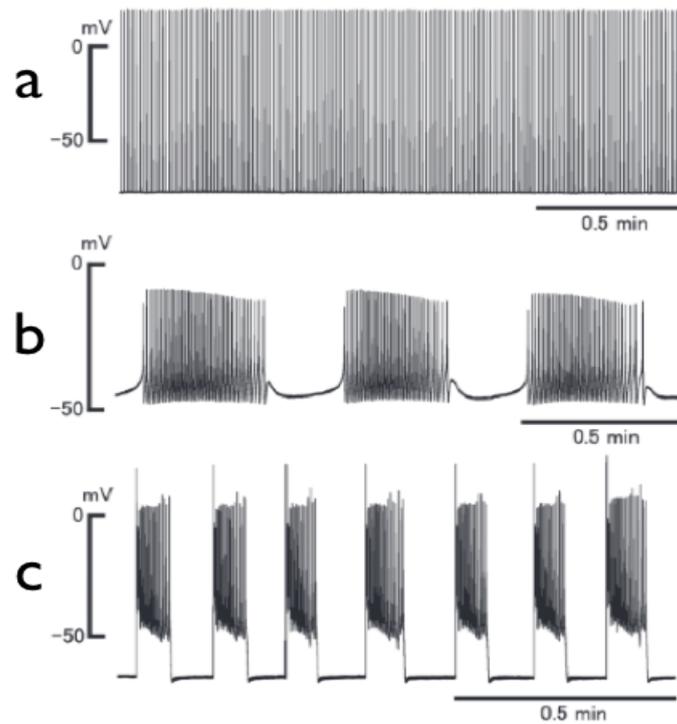


図3.1. 肺静脈付近に存在する心筋細胞の活動電位の波形

(a: 一定に自律拍動する b: バーストを生じている c: バーストの期間が長い)

(Tsuneoka, Y., Kobayashi, Y., *et al.* 2012 : *J.Pharmacol.Sci.*, 119, 287-292.)

3.1.2 目的

心房細動は、臨床的に最も頻度の高い頻脈性不整脈であるとされている。心房細動そのものによって、心房の電気生理学的特性が心房細動を持続しやすいように変化させていく現象である電気的リモデリングを予防することが必要とされている。電気的リモデリングの予防が心房細動そのものを抑制すると示唆されている。そこで、本研究では電気的リモデリングに関与するイオンチャネルなどに着目し、心房細動のメカニズムの解明を本研究の目的としてシミュレーションを行った。また同時に、老化した心臓と成人の心臓を比較すると、老化した状態の方が成人よりも心房細動の発生に関わるバーストが発生しやすいという仮説を立て、成体と老化状態の心臓を再現し、それぞれのシミュレーション結果を比較することで検証した。

3.2 対象と手法

3.2.1 対象

シミュレーションモデルとして、包括的心室筋細胞モデル(Kyoto model) (Kuzumoto, Takeuchi *et al.*, 2008)と、Kyoto modelをもとにして心室筋細胞と心房筋細胞で異なる電流密度を、該当電流のパラメータをそれぞれ量的に変化させることで再現された心房筋細胞モデル(Atrium model)を用いて、成体・老化した状態における心房細動の再現を試みた。また成体と老化した状態で異なる電流密度 (Tellez, J.O., Mczewski, M *et al.*, 2008) を、該当するイオンチャネルの電流量を量的にそれぞれ変化させることで再現し、成体と老化で異なる2つのモデルを構築した。心房細動の原因である心房と肺静脈の境界付近で生じる自発興奮を考慮し、心房筋と洞房結節はごく近い部分に存在すると理由からAtrium modelのある特定のイオンチャネルに関する電流密度を洞房結節細胞モデル(SAN model)のそれらに対応するイオンチャネルの電流密度とそれぞれ置き換えることで心房細動が発生するのかを検証した。

3.2.1.1 シミュレーションモデル

私たちは、シミュレーションを行う際の数理モデルとして、京都大学における細胞・生体機能シミュレーションプロジェクトによって、2003年に開発されたKyoto modelと呼ばれる包括的心室筋細胞モデルを用いた(Himeno, Sarai *et al.*, 2008; Kuzumoto, Takeuchi *et al.*, 2008)。そこで、本研究では心室筋細胞と心房筋細胞で異なる電流密度を、該当電流のパラメータを量的にそれぞれ変化させることで再現したAtrium modelを用いた。また同様に、心室筋細胞と洞房結節細胞で異なる心室筋細胞と心房筋細胞で異なる電流密度を、該当電流のパラメータを量的にそれぞれ変化させることで再現したSAN modelも心房細動の再現の参考として用いた。

3.2.1.2 老化した心房筋細胞と洞房結節細胞の再現

成体から老化した状態で異なる電流密度を, 先行研究 (Tellez, J.O., Mczewski, M *et al.*, 2008) で明らかにされているイオンチャネルのmRNA量をもとにそれぞれ異なる電流密度を示した[表1] .そこで本研究では, 電位依存性Na⁺チャネル電流(I_{Na}), L型Ca²⁺チャネル電流(I_{CaL}), 内向き整流K⁺電流(I_{K1}), アセチルコリン(ACh)感受性K⁺電流(I_{KACh}), 遅延整流K⁺電流(I_{Kr}), 一過性外向き電流(I_{to})の6つのイオンチャネル電流に着目して, それぞれ量的に変化させることで老化した心房筋細胞と洞房結節細胞の再現を行った.

表3.1. 成体と老化した状態におけるイオンチャネルのmRNA量の違い

(A: I_{Na} , B: I_{CaL} , C: I_{K1} , D: I_{KACh} , E: I_{Kr} , F: I_{to})

	Young Atrium	Old Atrium	Young SAN	Old SAN
A	1	1.7	1	0.02
B	1	1.3	1	0.86
C	1	1	1	0.003
D	1	1.9	1	1
E	1	0.8	1	0.5
F	1	1.6	1	0

3.2.2 手法

3.2.2.1 バーストに関わるイオンチャネル特定方法

成体の Atrium model と SAN model に関する, I_{Na} , I_{CaL} , I_{K1} , I_{KACh} , I_{Kr} , I_{to} の電流密度の違いをそれぞれ示した[図 3.2]. 本シミュレーションでは, Atrium model を用いて, 該当するイオンチャネルの電流密度を図 3.2 のように SAN model の電流密度の値にそれぞれ量的に変化させて, 刺激なしで 600 秒間のシミュレーションを 64 通り試みた. また同様に, 老化した状態の Atrium model と SAN model に関する I_{Na} , I_{CaL} , I_{K1} , I_{KACh} , I_{Kr} , I_{to} の電流密

度の違いをそれぞれ示した[図 3.2]. 図 3.2 をもとに再現した老化した Atrium model を用いて, 該当するイオンチャネルの電流密度を図 3.2 のように SAN model の電流密度の値にそれぞれ量的に変化させて, 刺激なしで 600 秒間のシミュレーションを 64 通り行った. そこで心房細動の発生に関わるバーストがどの場合で発生したのかを, 成体における結果と老化した状態における結果を用いてそれぞれ比較した.

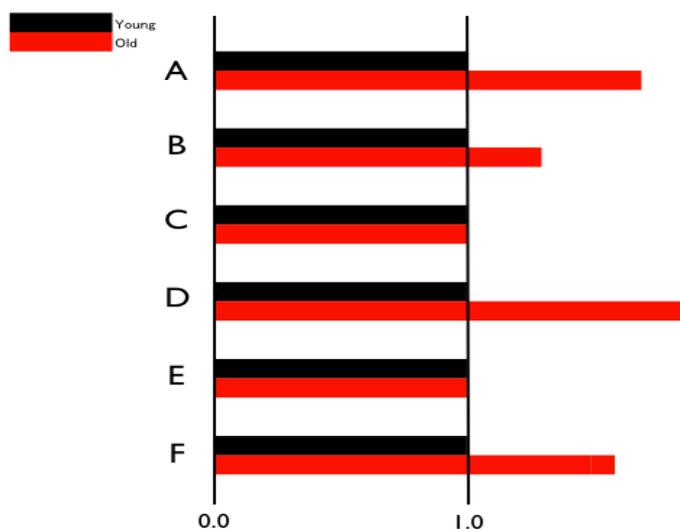


図 3.2 成体(黒色)・老化状態(赤色)における Atrium model と SAN model の電流密度

(A: I_{Na} , B: I_{CaL} , C: I_{K1} , D: I_{KACh} , E: I_{Kr} , F: I_{to})

3.2.2.2 刺激導入後の挙動を検証

上述の 3.2.2.1 バーストに関わるイオンチャネル特定のためのシミュレーションで行った刺激なしの 600 秒間のシミュレーション後, そのまま刺激を-2000pA 導入して 600 秒間シミュレーションを行った. 結果として最後の 1 秒間のシミュレーション結果を図示した.

3.3 結果と議論

本研究では、SAN model の電流密度の値を利用して、Atrium model を用いてシミュレーションし、イオンチャネルの電流密度をそれぞれ量的に変化させることで成体と老化状態を再現したことから、心房細動の原因となりうるバーストが発生することに関わるイオンチャネルを特定することができた。下述の 3.3.1.1 バーストに関わるイオンチャネルの特定の結果から成体ではバーストになるような活動電位波形は存在しなかったが、老化した状態ではバーストになるような活動電位波形は存在した。結果として、 I_{CaL} の電流密度は Atrium model の値をそのまま変化させず、その他の I_{Na} , I_{K1} , I_{KACh} , I_{Kr} の電流密度はそれぞれ SAN model の値にすることでバーストになるような活動電位波形が生じることを明らかにした。

3.3.1 バーストに関わるイオンチャネルの特定結果

Atrium model を用いて、成体に関して I_{Na} , I_{CaL} , I_{K1} , I_{KACh} , I_{Kr} , I_{to} の電流密度をそれぞれ量的に変化させて 600 秒間の刺激なし状態でのシミュレーションを行ったが、 I_{KACh} , I_{to} をそれぞれ量的に変化させても結果に影響しなかった(図 3.7)。そこで今回、 I_{Na} , I_{CaL} , I_{K1} , I_{Kr} をそれぞれ量的に変化させた結果を図 3.3 で示した。成体においては、バーストの可能性がありうるものは存在しなかった。また、 I_{K1} の電流密度だけを SAN model の値にすると自律拍動することが理解できる。さらに、 I_{Na} , I_{CaL} , I_{K1} , I_{Kr} の電流密度をすべて SAN model の値にすると活動電位は肺静脈中に存在する心筋細胞の活動電位の電位と同等の高さであることもわかる。

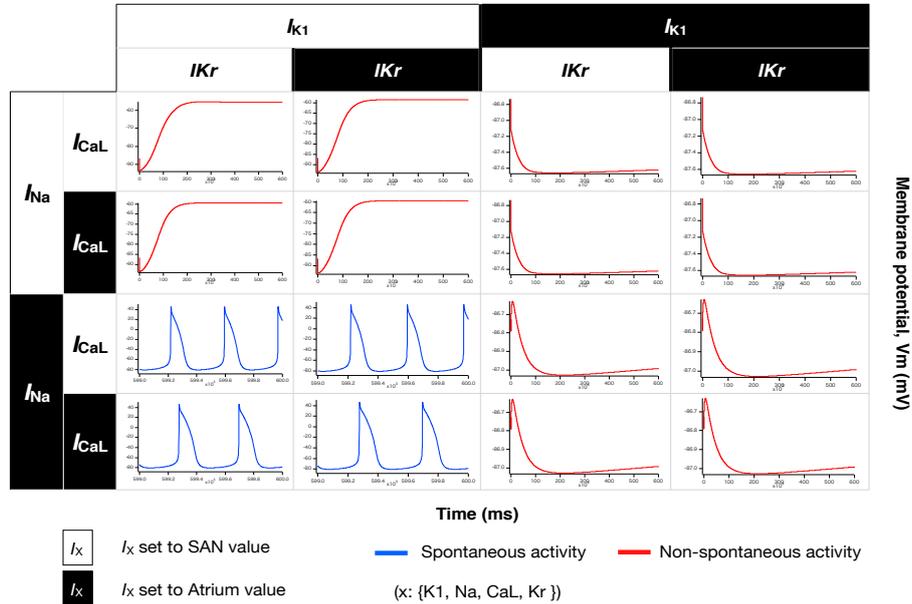


図 3.3 バーストに関わるイオンチャネル特定に関する成体における結果

また同様に、老化状態において I_{Na} , I_{CaL} , I_{K1} , I_{KACH} , I_{Kr} , I_{to} の電流密度をそれぞれ量的に変化させて 600 秒間の刺激なし状態でのシミュレーションを行ったが、 I_{to} を量的に変化させても結果に影響しなかった(図 3.6)。そこで今回、 I_{Na} , I_{CaL} , I_{K1} , I_{KACH} , I_{Kr} を量的にそれぞれ変化させた結果を図 3.4 で示した。これらの結果は、成体に関するものと同様で、 I_{K1} の電流密度だけを SAN model の値にすると自律拍動することが理解できる。さらに、 I_{Na} , I_{CaL} , I_{K1} , I_{Kr} の電流密度をすべて SAN model の値にすると活動電位は肺静脈中に存在する心筋細胞の活動電位の電位と同等の高さであることもわかる。だが、 I_{Na} , I_{K1} , I_{KACH} , I_{Kr} の電流密度をそれぞれ SAN model の値にすることでバーストの可能性がありうる活動電位波形が存在した。これら成体と老化状態における結果をバーストの可能性の有無で比較すると、老化状態においてのみ存在することが明らかになり、老化状態の方ではバーストになりうる可能性があることから、成体よりも心房細動が発生する可能性が高い可能性があることが明らかになった。

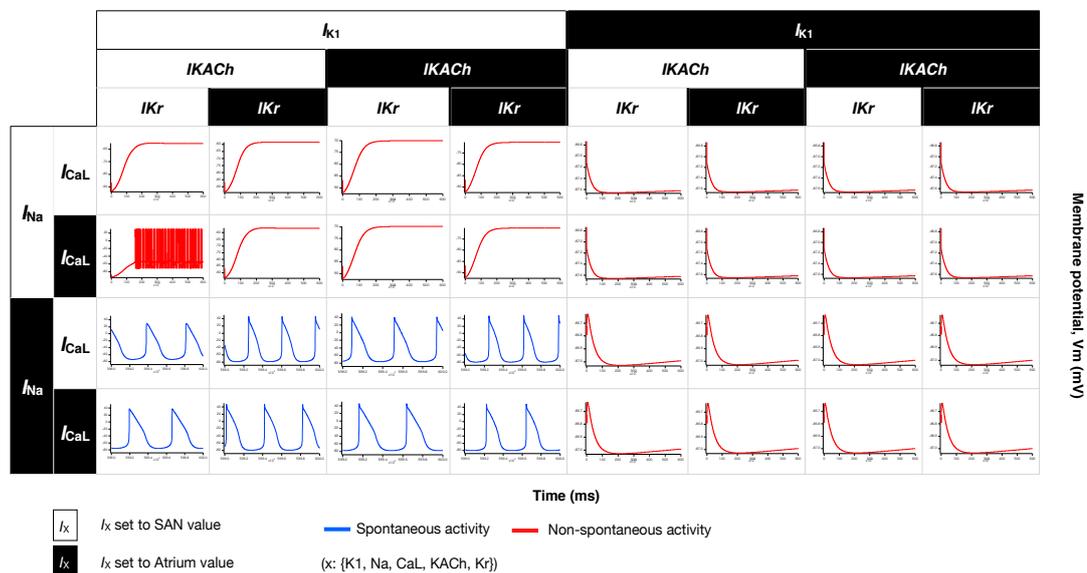


図 3.4 バーストに関わるイオンチャネル特定に関する老化状態における結果

3.3.2 刺激導入後の挙動

上述の 3.2.1.1 バーストに関わるイオンチャネル特定のためのシミュレーションにおいて Atrium model を用いて、成体に関して I_{Na} , I_{CaL} , I_{K1} , I_{KACH} , I_{Kr} , I_{to} の電流密度をそれぞれ量的に変化させて 600 秒間の刺激なし状態でのシミュレーションを行った。そこで、自律拍動していたものはさらに 1 秒間、刺激を 0 pA の状態でシミュレーションしたものを結果として図示した。また自律拍動していないものは、さらに刺激を -2000 pA 導入して 600 秒間シミュレーションを行った。そして 1 秒間、刺激なしの状態でのシミュレーションしたものを結果として図示した。成体に関して I_{Na} , I_{CaL} , I_{K1} , I_{KACH} , I_{Kr} , I_{to} の電流密度をそれぞれ量的に変化させてシミュレーションを行ったが、 I_{KACH} , I_{to} をそれぞれ量的に変化させても結果に影響しなかった(図 3.9)。そこで今回、 I_{Na} , I_{CaL} , I_{K1} , I_{Kr} をそれぞれ量的に変化させた結果を図 3.5 で示した。

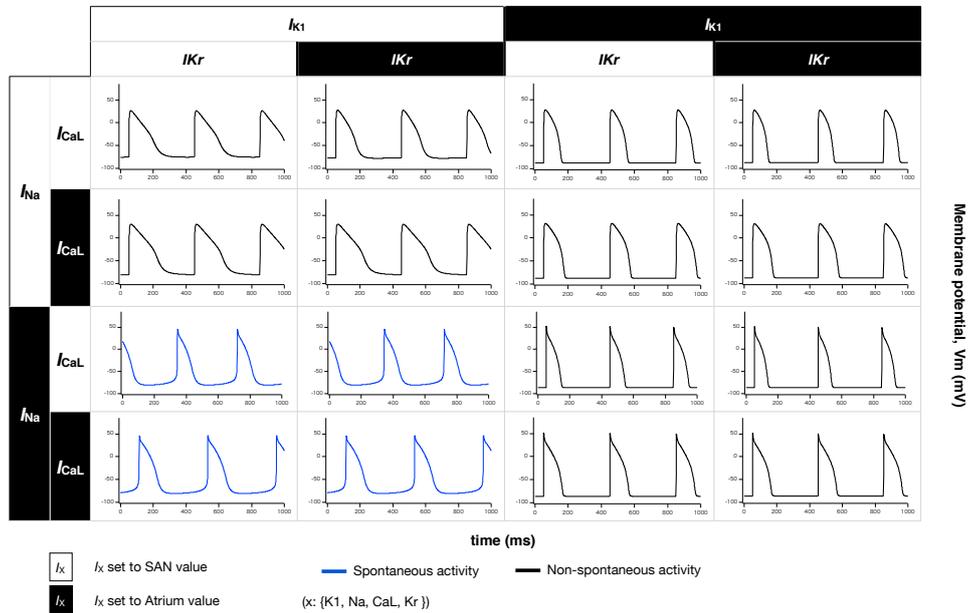


図 3.5 刺激導入後の挙動を検証における成体の結果

また成体と同様に、老化状態において I_{Na} , I_{CaL} , I_{K1} , I_{KACH} , I_{Kr} , I_{to} の電流密度をそれぞれ量的に変化させてシミュレーションを行った。結果として I_{to} を量的に変化させても結果に影響しなかった(図 3.10)。そこで今回、 I_{Na} , I_{CaL} , I_{K1} , I_{KACH} , I_{Kr} を量的にそれぞれ変化した結果を図 3.6 で示した。

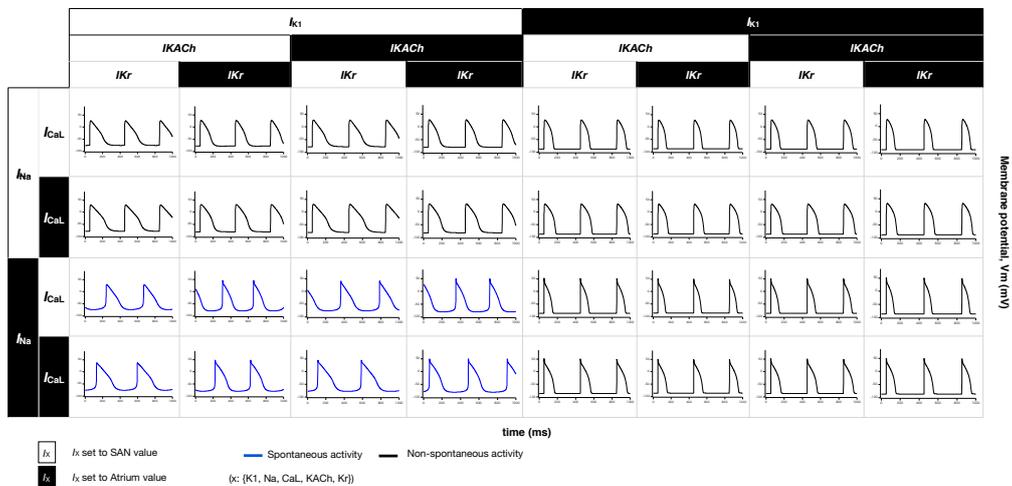


図 3.6 刺激導入後の挙動を検証における老化状態の結果

成体と老化状態における結果から、成体と老化状態ではともに I_{to} に関する影響力は小さいことが理解できるが、成体のみ I_{KACH} の影響力も小さいことが理解できる。また、600 秒間の刺激なしの状態でもシミュレーションしたとき、自律拍動していたものは洞房結節細胞の活動電位波形と類似していることが明らかである。それ以外の結果に関しては、 I_{K1} の電流密度が SAN model の値のとき Atrium model の値のときに比べ、活動電位持続時間 (APD) が延長した。また、 I_{CaL} の電流密度が SAN model の値のとき Atrium model の値のときに比べ、APD が短縮した。上述の 3.3.1.1 バーストに関わるイオンチャネル特定に関する老化した状態でのバーストの可能性がある結果に関して、さらに刺激を -2000 pA 導入して 600 秒間シミュレーションしたが、バーストの可能性がなかったものとあまり有意な差が生じることはなかった。

付録

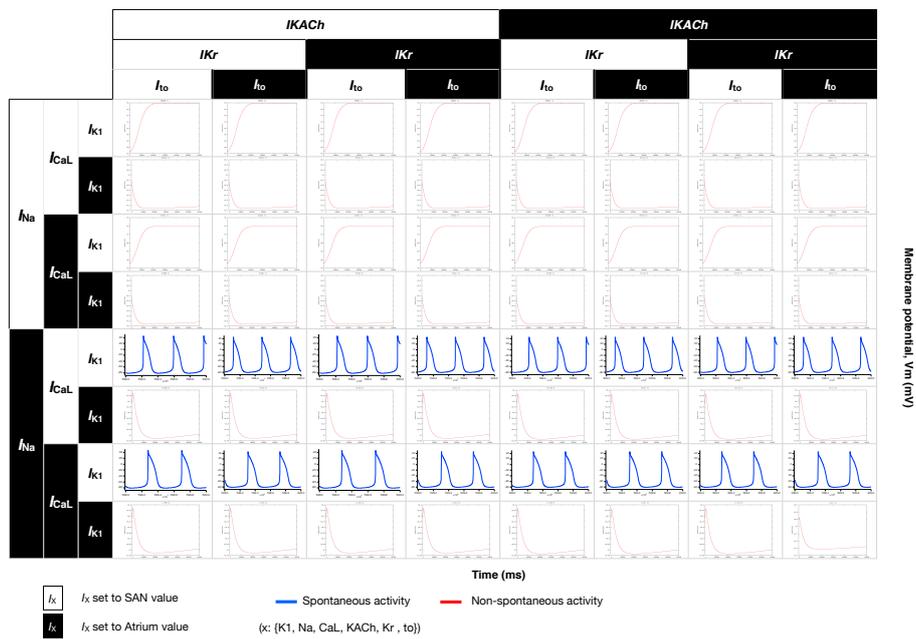


図 3.7 バーストに関わるイオンチャネル特定に関する成体の結果

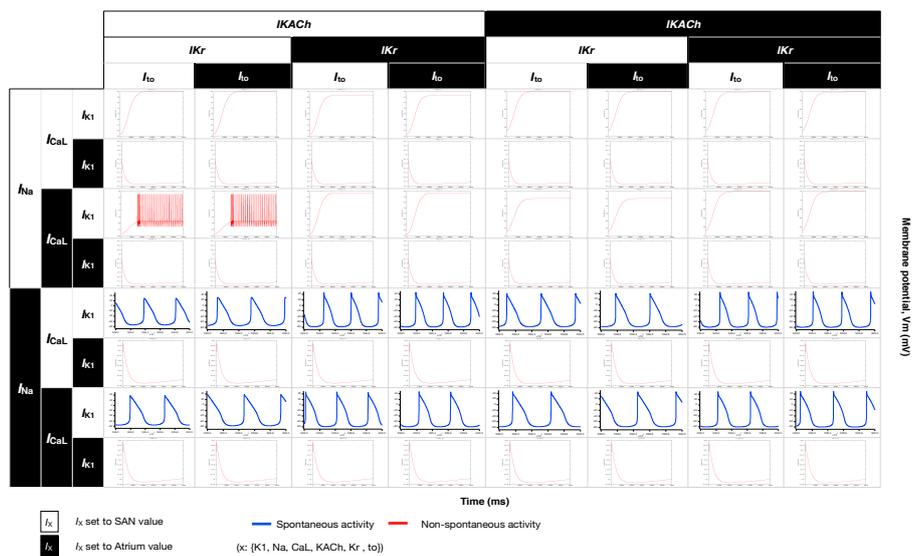


図 3.8 バーストに関わるイオンチャネル特定に関する老化状態の結果

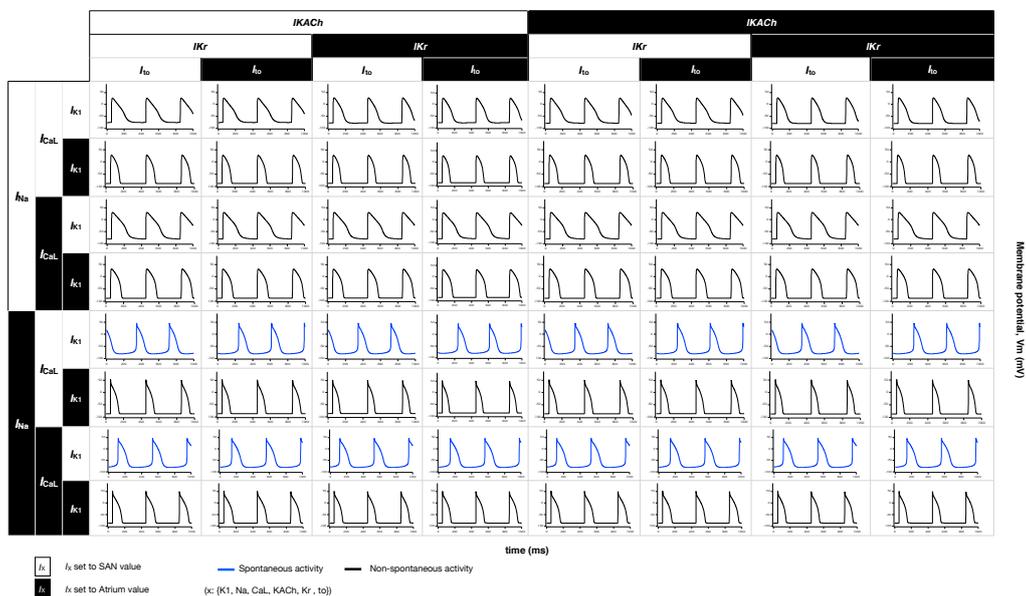


図 3.9 刺激導入後の挙動を検証における成体の結果

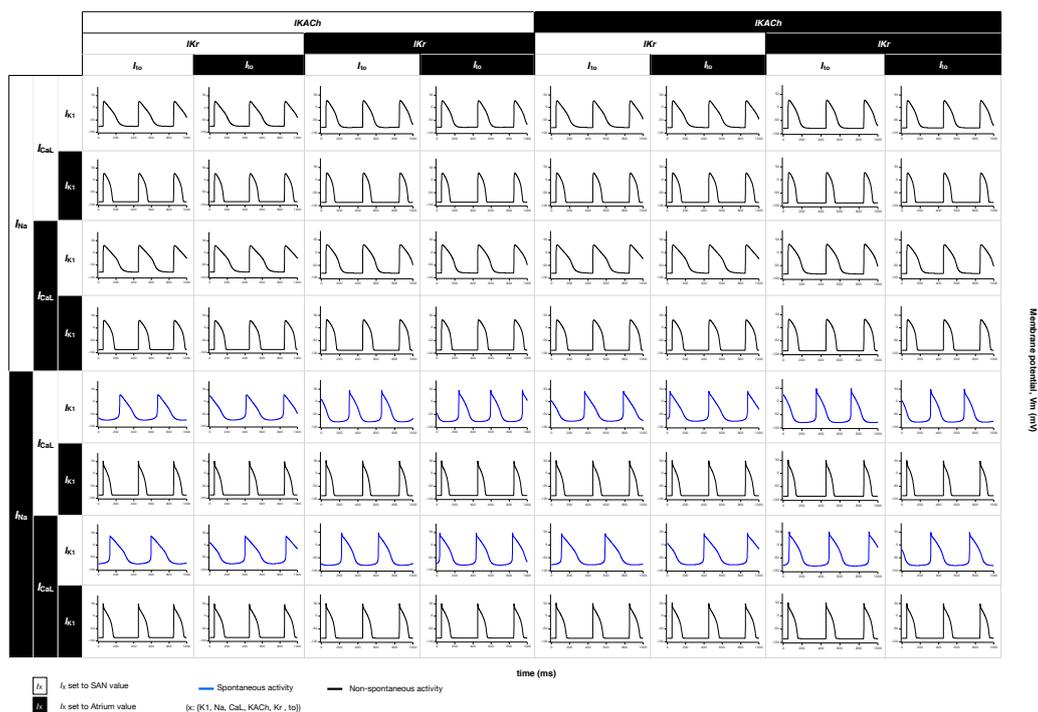


図 3.10 刺激導入後の挙動を検証における老化状態の結果

第4章 多彩な線維芽細胞が心筋細胞へ与える影響の探求

4.1.1 研究背景

心臓には心筋細胞以外に内皮細胞, 平滑筋細胞, 線維芽細胞など様々な種類の細胞が存在することが知られている。心筋細胞だけでなく線維芽細胞も心臓の電気生理の貢献などといった多彩な機能を担っているといわれている。例えば, 心筋では加齢とともに老化現象が起こると知られており, 加齢に伴って心不全や心筋梗塞などの心疾患が引き起こされる割合が高くなることが知られている。その原因として心筋細胞の線維化や電気生理学的変化が関わっているのではないかと示唆されている。加齢とともに心筋細胞の数は徐々に減少し, 代わりに増殖した線維芽細胞の線維化によって置き換えられることが知られている。近年, 再生医療は心臓の損傷に対する有効的な治療法として注目を浴びてきている。心筋細胞由来ES

細胞を用いた組織工学的アプローチにおいては、高純度の心筋細胞単独では心筋組織を作成できず、心臓線維芽細胞との共培養が必要であることが既知となっており、適切な細胞間ネットワークや細胞外マトリックスの重要性が示唆されている。つまり、線維芽細胞は再生心筋組織を構築する上で重要な働きをすることが示唆できる。再生心筋組織で求められる線維芽細胞の種類と機能の特定が必要とされていることから、本研究では線維芽細胞に注目した。コンピューターシミュレーションは、数理モデルでさまざまなパラメータの値を変化させることによって、実験では得ることができなかった新しい考察を提供するだけでなく、実験結果を確かめるためのアプローチでもある。現在そのシミュレーション研究では線維芽細胞を考慮せずに行うことが多いのである。シミュレーションを実行する際の線維芽細胞のモデルの数自体も少ない。また心臓で最も数の多い細胞は、心筋細胞であるというイメージが強いが、細胞1個の容積は心筋細胞が大きいので最も大きな容積を占めるのはやはり心筋細胞ではあるが、個数を比較基準にすると実際には線維芽細胞の方が心筋細胞に比べて個数が多いことが事実である。このことから線維芽細胞を含んだ組織レベルでの研究の必要性があることも明らかで、線維芽細胞が与える影響を考察しなければならないとされている。

4.1.1.1 線維芽細胞の調査

心臓線維芽細胞は、微小環境の変化を感知して臓器の機能を保持するために、組織骨格である細胞外マトリックス (extracellular matrix=ECM) の恒常性の維持、生理活性物質の産生、心臓の血管系の維持、心臓の電気生理への貢献など、多彩な機能を担っているといわれている(図4.1)。一方、心筋傷害や病的な負荷は心臓線維芽細胞を活性化して筋線維芽細胞へ分化させ、線維化を誘導するとされる。一般的に線維化は組織障害後の異常な修復反応であり、線維芽細胞の集簇、ECMの蓄積を特徴とし、その臓器の構造や機能に障害を及ぼす反応として知られている。このように心臓線維芽細胞は心臓の恒常性の維持や心臓障害に対する適応反応、心筋線維化に重要な役割を果たしていると考えられるが、心臓にかぎらず線維芽細胞は不均一な細胞集団である可能性が示唆されている。従来の研究では、心筋線維化は、心筋に常在する線維芽細胞が刺激によって分化・増殖し、活性化することによってもたらされると考えられてきた。これは組織から単離した線維芽細胞がさまざまな病的な刺激因子に

対して増殖反応を示すことにもとづいている。このような反応は心臓の傷害部位において線維産生細胞が置換性線維化を形成する際の急性の反応に合理的ともいえる。しかし反応性線維化を起こす心肥大において、増殖する線維芽細胞様細胞は血管周囲においてのみ観察され、慢性的な刺激による心筋線維化に関与する細胞は、常在する線維芽細胞というより、むしろ他の細胞に由来する線維芽細胞が心筋にリクルートされ増殖している可能性が示唆された。成体の心臓において線維化に関与する心臓線維芽細胞は常在する線維芽細胞の活性化以外に、血管、内皮細胞、心外膜、骨髄由来の前駆細胞、血流中のコラーゲン線維を産生する白血球系細胞 (fibrocyte) , 心臓の血管周囲に存在する周皮細胞 (pericyte) に由来する細胞が関与するということが先行研究より明らかになっている。この線維芽細胞の不均一な性質を含め、本研究では線維芽細胞に関するサーベイ調査に取り組んだ。

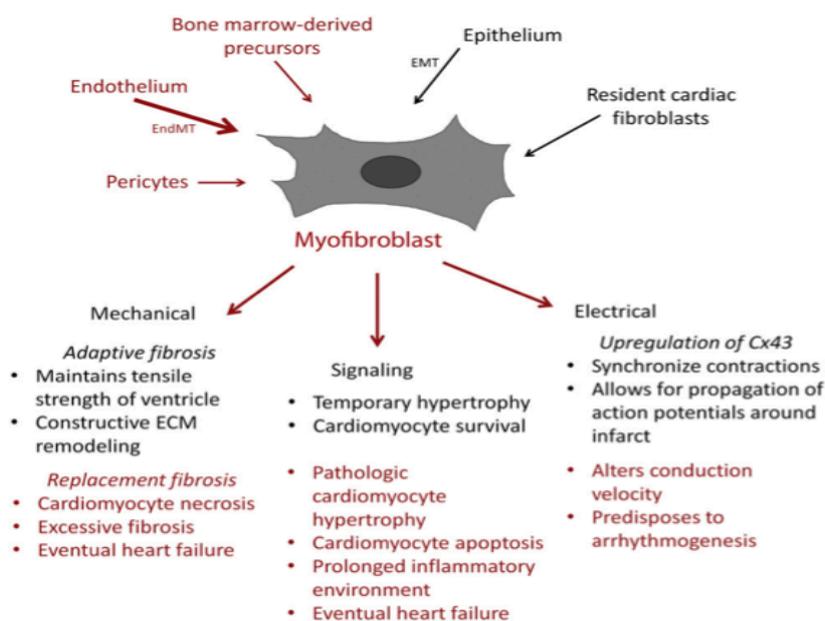


図4.1 心臓における多彩な心臓線維芽細胞の起源とその機能

(Krenning,G., Zeisberg,E.M., et al. (2010). *J.Cell.Physiol.*, 225, 631-637 : Winter,E.M. and Gittenberger-de Groot,A.C. (2007). *Cell Mol.Life Sci.*, 64, 692-703.)

4.1.2 目的

現段階のシミュレーション研究においても、心臓での線維芽細胞は軽視されており考慮されずに心筋細胞のみの単一細胞レベルでのシミュレーションが行われていることが多いのが事実である。線維芽細胞のモデルの数自体も少ない。また心臓で最も数の多い細胞は、心筋細胞であるというイメージが強い。細胞1個の容積は心筋細胞が大きいので、最も大きな容積を占めるのはやはり心筋細胞ではあるが、個数を比較基準にすると実際には線維芽細胞の方が心筋細胞に比べて個数が多いことが事実である。心臓に内在する線維芽細胞は、心臓のもつ力学的強度に不可欠である。そこに私は問題意識を持ち、線維芽細胞を考慮した組織レベルでのシミュレーション研究をしていきたいと考える。そこで本研究では、前述した目的を達成するための準備段階として、線維芽細胞が統合されたヒトES細胞由来の心筋細胞モデルを用いて、線維芽細胞の有無や個数が心筋細胞に与える影響の検証を行った。

4.2 対象と手法

4.2.1 対象

先行研究より明らかにされている線維芽細胞が統合されている心筋細胞モデルは、心筋細胞由来のヒトES細胞 (hESC-CMs)モデル (Paci *et al.*, 2012) とマウスにおける心筋細胞モデル (Saches *et al.*, 2001) が存在する。本研究では、シミュレーション環境MATLABでPaci *et al.*, 2012モデルを用いてシミュレーションを行った。このモデルには分化状態によって2つのStageに分けられたモデルである。Early Stageは分化15日-40日を示す。Late Stageは分化50日-110日を示す。

4.2.2 手法

4.2.2.1 線維芽細胞が与える影響のためのシミュレーション

既存の心筋細胞由来のヒトES細胞 (hESC-CMs)モデル (Paci *et al.*, 2012)を用いて、本シミュレーションでは線維芽細胞の有無における心筋細胞への影響を考察する。線維芽細胞が1個の場合、0個の場合に分けて350秒間のシミュレーションを行い、最後の5秒間だけをグラフ化した。また、Earlyタイプ[図4.2]とLateタイプ[図4.3]に分けてシミュレーションを行った。(A: V_m , B: I_{Na} , C: I_{CaL} , D: I_{K1})

4.2.2.2. 線維芽細胞の個数変化が与える影響のためのシミュレーション

既存の心筋細胞由来のヒト ES 細胞 (hESC-CMs)モデル (Paci *et al.*, 2012)を用いて, 本シミュレーションでは線維芽細胞の個数変化における心筋細胞への影響を考察する. Early タイプと Late タイプに分けてシミュレーションを行い, 350 秒間のシミュレーションを行い, 最後の 5 秒間だけをグラフ化した. Early タイプ[図 4.4]では, 線維芽細胞が 1 個の場合, 2 個の場合, 3 個の場合に分けて考察した. Late タイプ[図 4.5][図 4.6]では, 線維芽細胞が 1 個の場合, 2 個の場合, 3 個の場合, 5 個の場合, 10 個の場合, 15 個の場合, 20 個の場合に分けて考察した. (A: Vm, B: I_{Na} , C: I_{CaL} , D: I_{K1})

4.2.2.3 I_{K1} の活性化量変化における心筋細胞のシミュレーション

既存の心筋細胞由来のヒト ES 細胞 (hESC-CMs)モデル (Paci *et al.*, 2012)を用いて, 本シミュレーションでは内向き整流 K^+ 電流(I_{K1}) の活性化量変化における心筋細胞への影響を考察する. I_{K1} は重要な役割をすることが明らかであることから, I_{K1} の活性化量を変化させた. また, 本シミュレーションでは Early タイプと Late タイプに分けてシミュレーションを行った. 線維芽細胞を 1 個として, Early タイプでは I_{K1} の活性化量を 0.5 倍, 1.0 倍, 1.5 倍, 2.0 倍に変化させ[図 4.7][図 4.8], Late タイプでは I_{K1} の活性化量を 0.5 倍, 1.0 倍, 1.05 倍, 1.1 倍に変化させて[図 4.9][図 4.10] 350 秒間のシミュレーションを行い, 最後の 5 秒間だけをグラフ化した. (A: Vm, B: I_{Na} , C: I_{CaL} , D: I_{K1})

4.3 結果と議論

シミュレーション研究において, 線維芽細胞は軽視されていることから考慮せずに心筋細胞の単一細胞モデルでの検証がほとんどである. 本研究で, 線維芽細胞の有無によって Vm や I_{Na} , I_{CaL} , I_{K1} などに影響を与えることが明らかになった. また線維芽細胞の有無だけでなく心筋細胞と線維芽細胞の個数の割合によって, 線維化を引き起こし Vm などに影響を与えることも明らかである. 以上の結果から, 今後のシミュレーション研究において線維芽細胞を統合させた組織レベルでのシミュレーション研究の重要性が理解できた.

4.3.1 線維芽細胞の有無における心筋細胞のシミュレーション

線維芽細胞の個数を1個の場合と0個の場合に分けてシミュレーションを行い、それぞれ V_m (A), I_{Na} (B), I_{CaL} (C), I_{K1} (D) について比較した。その結果、図 4.2 より Early Stage では線維芽細胞が1個存在することで V_m に関して、BCLが短くなり、脱分極したときの最大値が低いことが理解できる。また、その他の電流についても活性化するタイミングが短くなっていることが理解できる。これらは、 V_m の BCL が短くなっていることが原因であると想定できる。図 4.3 より Late Stage においても同様のことがいえるのも明らかである。これらより、線維芽細胞の有無によって異なる結果となることが明らかになり、線維芽細胞を統合させた組織レベルにてシミュレーションを行うことは重要であると示唆された。

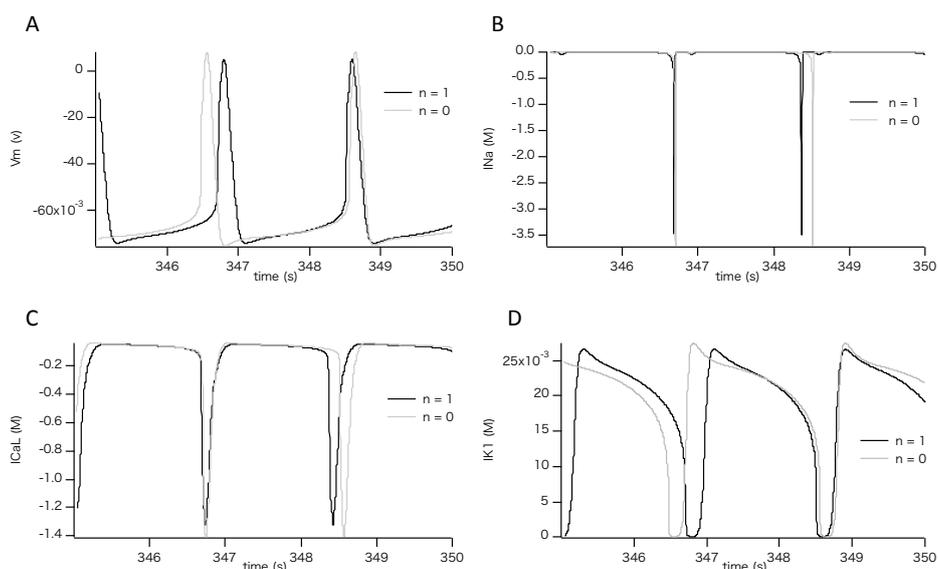


図 4.2 Early Stage における線維芽細胞の有無のシミュレーション結果

(A: V_m , B: I_{Na} , C: I_{CaL} , D: I_{K1})

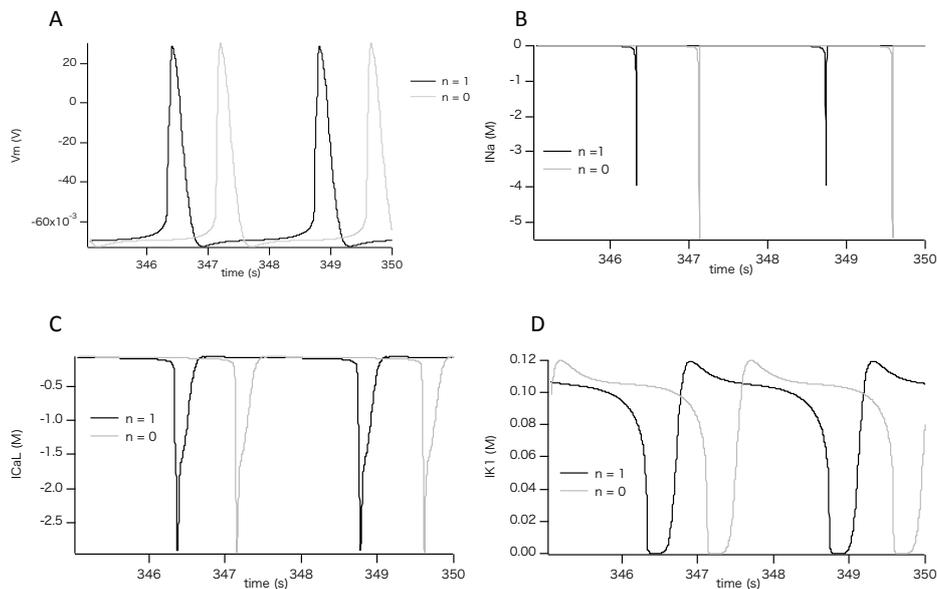


図 4.3. Late Stage における線維芽細胞の有無のシミュレーション結果
(A: V_m , B: I_{Na} , C: I_{CaL} , D: I_{K1})

4.3.2 線維芽細胞の個数変化における心筋細胞のシミュレーション

線維芽細胞の個数を段階的に増加させて心筋細胞への影響を考察するためのシミュレーションを行った。Early Stage と Late Stage に分けて、それぞれ V_m (A), I_{Na} (B), I_{CaL} (C), I_{K1} (D) について比較した。その結果、Early Stage では線維芽細胞の個数が 3 個以上存在すると、線維化して V_m が静止膜電位で安定することが理解できる。また個数を増やすことで BCL が短くなり、MDP が上昇することが理解できる。また、その他の電流に関しても I_{K1} のみ線維芽細胞が増加することで流れる電流値の最大値が低くなり、活性化するタイミングが短くなっていることが理解できる。これらは、 V_m の BCL が短くなっていることと、MDP が上昇していることが原因であると想定できる。図 4.5 より Late Stage においても線維芽細胞の個数が増加することで V_m の BCL が短くなり、 I_{K1} の活性化するタイミングが短くなり、電流値も小さくなっていることも明らかである。また Late Stage では Early Stage とは異なり、個数が 3 個の場合でも V_m は静止膜電位で安定状態ではなく、活動していた。

図 4.6 より線維芽細胞の個数を 20 個に変化させた場合、線維化して V_m が静止膜電位で安定することが理解できる。Late Stage においても線維芽細胞の個数が増加することで V_m の BCL が短くなり、MDP も上昇する。 I_{K1} の活性化するタイミングが短くなり、電流値も小さくなっていることも明らかである。これらより、線維芽細胞の存在によって心筋細胞に影響を与えることはもちろんのこと、心筋細胞と線維芽細胞の個数の割合は重要であり、最適な割合を導くことは重要であると示唆された。

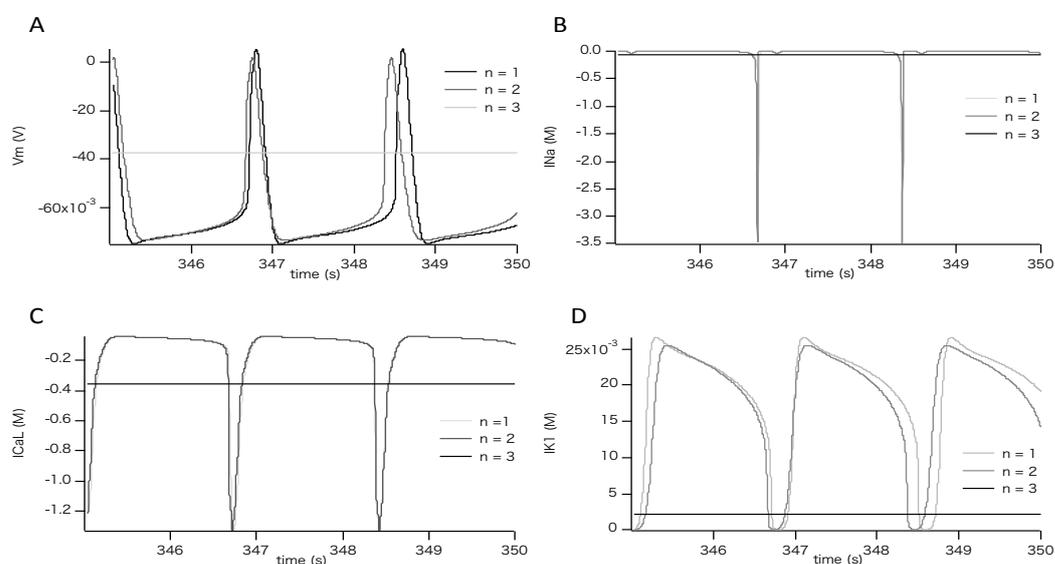


図 4.4. Early Stage における線維芽細胞の個数変化 ($n = 1, 2, 3$) のシミュレーション結果
(A: V_m , B: I_{Na} , C: I_{CaL} , D: I_{K1})

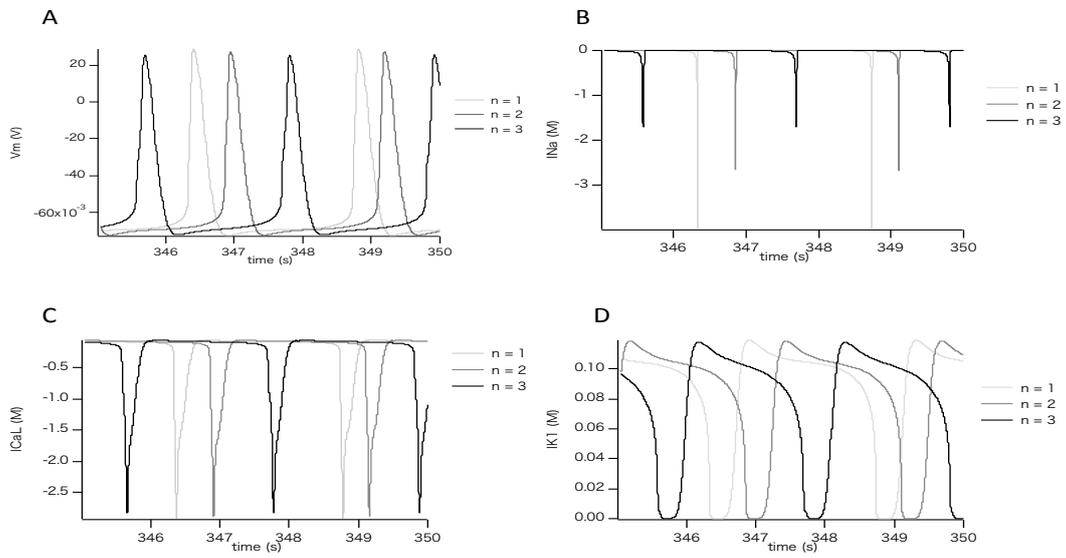


図 5. Late Stage における線維芽細胞の個数変化 ($n = 1, 2, 3$) のシミュレーション結果
(A: V_m , B: I_{Na} , C: I_{CaL} , D: I_{K1})

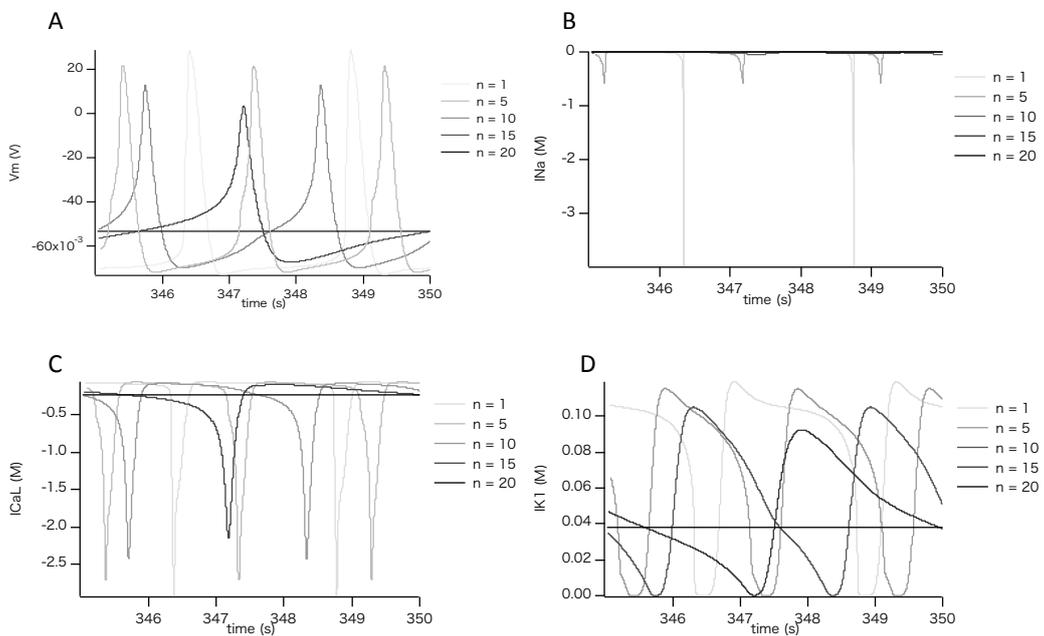


図 4.6. Late Stage における線維芽細胞の個数変化 ($n = 1, 5, 10, 15, 20$) のシミュレーション結果
(A: V_m , B: I_{Na} , C: I_{CaL} , D: I_{K1})

4.3.3 I_{K1} の活性化量変化における心筋細胞のシミュレーション

I_{K1} は重要な役割をすることが明らかであることから、線維芽細胞を統合させた組織レベルでも I_{K1} の活性化量を変化させることでどのような影響があるのかをシミュレーションによって検証した。Early Stage について活性化量が高いほど、 V_m の BCL が長くなることが理解できる。また Early Stage に関しては活性化量を 2.0 倍にしても V_m が静止状態になることはなかった。Late Stage についても活性化量が高いほど、 V_m の BCL が長くなることが理解できる。しかし活性化量を 1.1 倍以上にすると、 V_m が静止膜電位で静止してしまうことが明らかになった。線維芽細胞を含む状態(個数は 1 個)で Early Stage に比べて、Late Stage の方が I_{K1} の活性化量が高いほど V_m が静止膜電位で静止状態になりやすいことが示唆された。

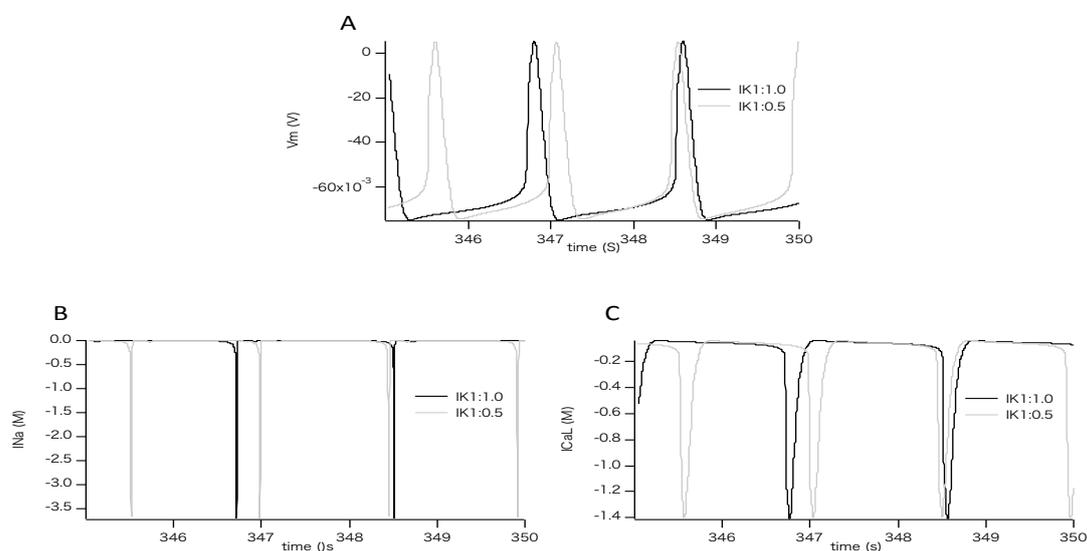


図 4.7 Early Stage における I_{K1} の活性化量を 0.5 倍に変化させて比較した結果

(A: V_m , B: I_{Na} , C: I_{CaL} , D: I_{K1})

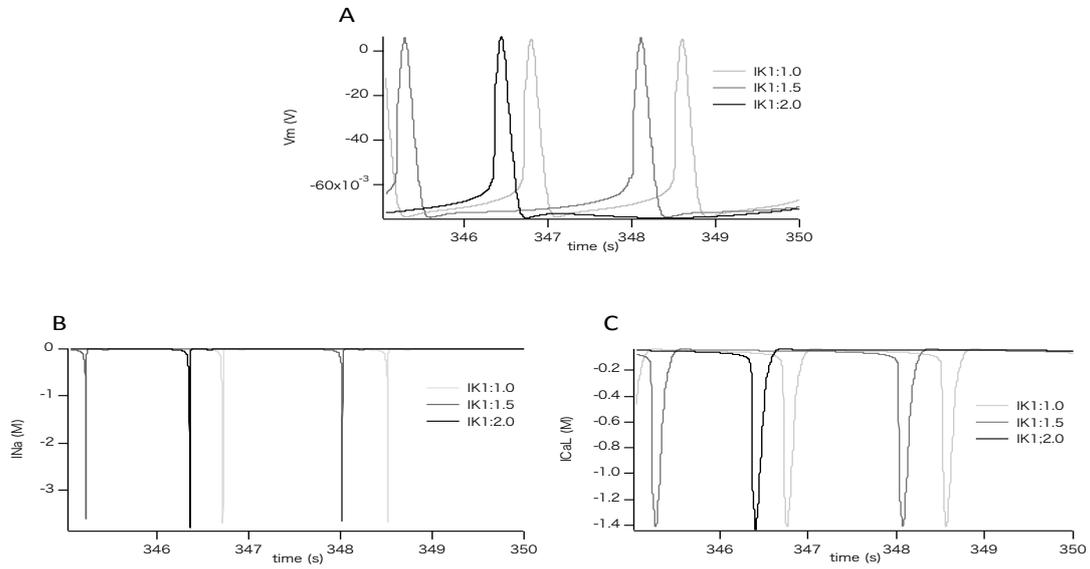


図 4.8 Early Stage における内向き整流 K^+ 電流 (I_{K1}) の活性量を 1.5 倍, 2.0 倍に変化させて比較した結果 (A: V_m , B: I_{Na} , C: I_{CaL} , D: I_{K1})

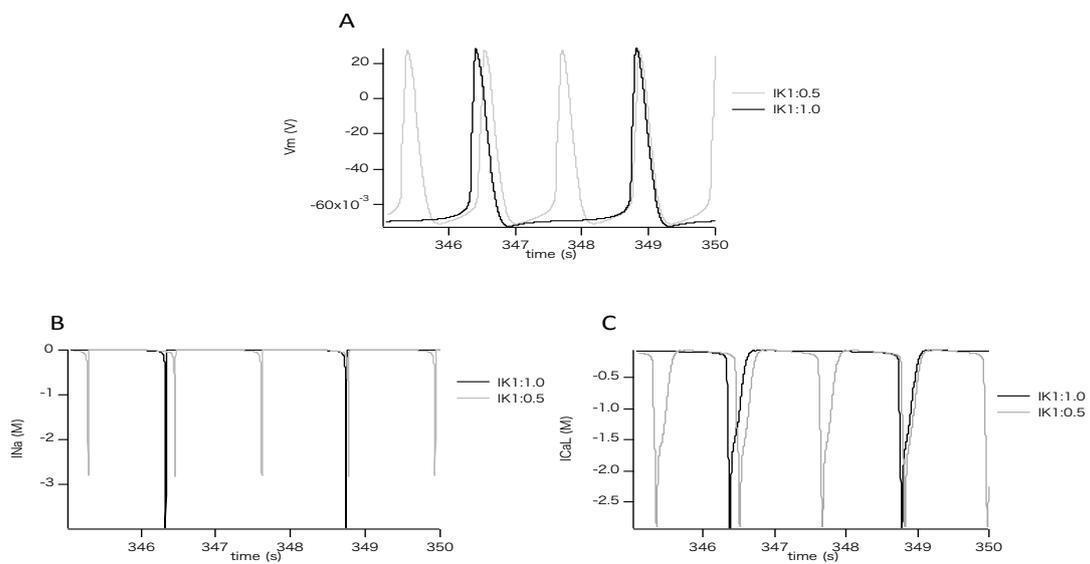


図 4.9. Late Stage における I_{K1} の活性量を 0.5 倍に変化させて比較した結果 (A: V_m , B: I_{Na} , C: I_{CaL} , D: I_{K1})

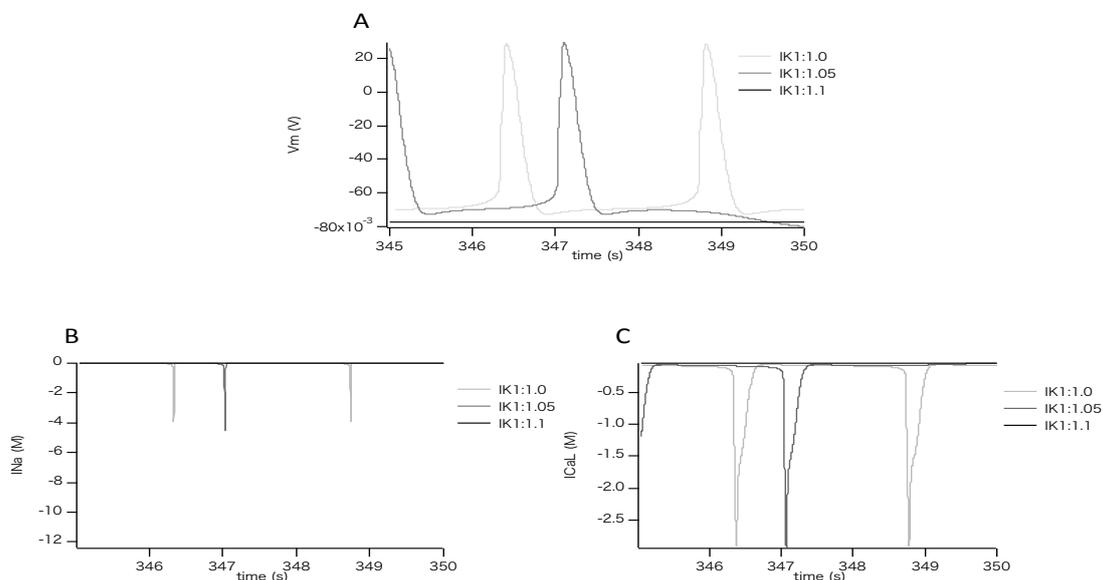


図 4.10 Early Stage における I_{K1} の活性量を 1.05 倍, 1.1 倍に変化させて比較した結果 (A: V_m , B: I_{Na} , C: I_{CaL} , D: I_{K1})

第 5 章 結論

本研究の第 2 章の加齢心筋細胞の再現の結果より, 老化状態の心筋細胞では APD の短縮, プラトー相が低下, 収縮力の低下が起こることが理解できた. また第 3 章におけるバーストに関わるイオンチャネルの特定に向けたシミュレーションの結果では, SAN model の電流密度の値を利用して, Atrium model を用いてシミュレーションし, イオンチャネルの電流密度をそれぞれ量的に変化させることで成体と老化状態を再現したことから, 心房細動の原因となりうるバーストが発生することに関わるイオンチャネルを特定することができた. この結果から成体ではバーストになるような活動電位波形は存在しなかったが, 老化した状態ではバーストになるような活動電位波形は存在した. 結果として, I_{CaL} の電流密度は Atrium model の値をそのまま変化させず, その他の I_{Na} , I_{K1} , I_{KACh} , I_{Kr} の電流密度はそれぞれ SAN model の値にすることでバーストになるような活動電位波形が生じることを明

らかにした。また第4章にて線維芽細胞が与える影響を探求した。シミュレーション研究において、線維芽細胞は軽視されていることから考慮せずに心筋細胞の単一細胞モデルでの検証がほとんどである。第4章の結果から、線維芽細胞の有無によって V_m や I_{Na} 、 I_{CaL} 、 I_{K1} などに影響を与えることが明らかになった。また線維芽細胞の有無だけでなく心筋細胞と線維芽細胞の個数の割合によって、線維化を引き起こし V_m などに影響を与えることも明らかである。以上の結果から、今後のシミュレーション研究において線維芽細胞を統合させた組織レベルでのシミュレーション研究の重要性が理解できた。

謝辞

私は4年間、アドバイザーを初めとした研究会メンバーだけでなく、多くの人々に支えられ、日々成長をすることができました。なかでも、本研究に関してお世話になった皆様にここで感謝を述べたいと思います。

まず初めに、卒業プロジェクトの指導教官を引き受けてくださった、環境情報学部専任講師佐野ひとみ博士には、学部3年時からアドバイザーを引き受けていただき、毎週のように本研究に関する助言、ご指導をしていただき大変感謝しております。研究というものを始め、間もない自分自身に熱心に指導していただき、私自身も楽しく研究に打ち込むことができました。もちろん研究だけではありません。私が就職活動をすることに決め、なかなか研究に打ち込めない時期が続いたときも温かく応援していただき、アドバイスも多々いただき、大変感謝しております。研究に行き詰まったり、研究の方向性に迷ったときなどに急遽ミーティングをお願いしたりして、多大なる迷惑をおかけしたこともありました。その度に的確なアドバイスをいただくことができたからこそ、4年間佐野氏のもとで研究を続けることができたと思っております。この卒業と同時に、本研究も終わりになってしまいますが、このような形で一つの論文を執筆できたこと、この経験がきっと今後の私自身の糧になるだろうと思っております。心から尊敬しております。最後に、本当にありがとうございました。

また、環境情報学部所属の内藤泰宏准教授にも、大変お世話になりました。E-Cellグループ内でのミーティングを始め、シミュレーションに関する多大なる助言、指導をいただきました。研究に対する姿勢といった研究内容以外の部分も学ばせていただき、大変感謝し

ております。

再生医療グループで指導されている岩宮氏にも、線維芽細胞にまつわる知見や助言を多々いただきました。心から感謝しております。

また、私が学部1,2年時にアドバイザーを引き受けてくださった、政策メディア研究科所属修士2年の土岐珠未氏にも多くのご指導をいただきました。研究に所属した当初から細かな助言、指導をいただきました。何もわからない状態の私にシミュレーション研究とは何か、心筋細胞とはどのようなものでどのような研究ができるといったような内容を1から丁寧に教えていただいたからこそ、シミュレーション研究に興味を持ち、最後まで本研究のモチベーションとなったきっかけを与えてくださったと思っております。本当にありがとうございました。E-Cellグループメンバーも同様です。アドバイザーになっていただいた松尾氏を始め、心筋グループで共に研究に励んだ瀧口氏、脇田氏、神野氏には大変お世話になりました。私自身の実力が足りないがために、なかなか貢献することができませんでしたが、4人の熱心に研究に打ち込む姿勢が私自身のモチベーションともなりました。大変感謝しております。グループ内同期の佐々木氏、森氏にも研究会に所属した時期も同じで共に4年間研究に打ち込めたこと、E-Cell Sprintなどの合宿でともに過ごし、高め合うことができました。大変感謝しております。

最後になりましたが、この恵まれた環境を提供してくださる富田教授に心から感謝申し上げます。

参考文献

- [1] Noble, D., A. Garny and P. J. Noble (2012). "How the Hodgkin-Huxley equations inspired the Cardiac Physiome Project." *J Physiol*, 590(Pt 11): 2613-2628.
- [2] Itoh, H., Y. Naito and M. Tomita (2007). "Simulation of developmental changes in action potentials with ventricular cell models." *Syst Synth Biol*, 1(1): 11-23.
- [3] Nomaguchi, A (2005). 心臓ペースメーカー, *日生誌*, 67(6), 203-215.
- [4] Chidsey CA : Calcium metabolism in the normal and failing heart. *in* Braunwald.E.(ed) : The Myocardium : Failure and Infarction. HP Publishing Co., New York,1974, p.37
- [5] Kentish JC, ter Keurs HEDJ, Ricciardi L, *et al* : Comparison between the sarcomere length-force relations of intact and skinned trabeculae from rat tight ventricle. *Circ Res*. 58 : 755-768, 1986
- [6] Huxley AF : Muscle contraction. *J Physiol* 243 : 1-43,1974
- [7] Brady AJ : Mechanical properties of cardiac fibers. *in* The Cardiovascular System (eds) : Handbook of Physiology. Berne RM, Sperelakis N, Geiger SR. American Physiological Society, Maryland, 1979, pp.461-474
- [8] Chidsey CA : Calcium metabolism in the normal and failing hearts. Effect of temporarily restoring arterial inflow and of coronary occlusion lasting one and two cardiac cycles. *Circ Res* 35 : 702-712, 1974
- [9] Taegtmeier H, Roberts AFC, Raine AEG : Energy metabolism in reperfused heart muscle : Metabolic correlates to return of function. *J Am Coll Cardiol* 6 : 864-870, 1985
- [10] Pike MM, Kitakaze M, Marban E : Increase in intracellular free sodium concentration during ischemia revealed by Na NMR in perfused ferret hearts. *Circulation* 78 : II- 151.1988
- [11] Marban E, Kitakaze M, Koretsune Y, *et al* : Quantification of $[Ca^{2+}]$ in perfused hearts-Critical evaluation of F-BAPTA and nuclear magnetic resonance method as applied to the study of ischemia and reperfusion. *Circ Res* 66 : 1255-1267, 1990
- [12] Katoh N, Wise BC, Kuo JF : Phosphorylation of cardiac troponin inhibitory subunit (troponin I) and tropomyosin-binding subunit (troponin T) by cardiac phospholipid-sensitive Ca^{2+} -dependent protein kinase. *Biochem J* 209 : 189-195, 1983

- [13] Kitakaze M, Weisman HF, Marban E : Contractile dysfunction and ATP depletion after transient calcium overload in perfused ferret hearts. *Circulation* 77 : 685-695, 1988
- [14] Gross GJ, Farber NE, Hazdman HF, *et al* : Beneficial actions of superoxide dismutase and catalase in stunned myocardium of dogs. *Am J Physiol* 250 : H372-H377, 1986
- [15] Bolli R, Jeroudi MO, Patel BS, *et al* : Marked reduction of free radical generation and contractile dysfunction by antioxidant therapy begun at the time of reperfusion. Evidence that myocardial "stunning" is a manifestation of reperfusion injury. *Circ Res* 65 : 607-622, 1989
- [16] Tomita, M., K. Hashimoto, K. Takahashi, T. Shimizu, Y. Matsuzaki, F. Miyoshi, K. Saito, S. Tanida, K. Yugi, J. C. Venter and C. A. Hutchison (1997). "E-CELL: Software Environment for Whole Cell Simulation." *Genome Inform Ser Workshop Genome Inform*, 8: 147-155.
- [17] Kuzumoto, M., A. Takeuchi, H. Nakai, C. Oka, A. Noma and S. Matsuoka (2008). "Simulation analysis of intracellular Na⁺ and Cl⁻ homeostasis during beta 1-adrenergic stimulation of cardiac myocyte." *Prog Biophys Mol Biol*, 96(1-3): 171-186.
- [18] Hodgkin, A. L. and A. F. Huxley (1952). "A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve." *J Physiol*, 117(4): 500-544.
- [19] Noble, D. (1960). "Cardiac action and pacemaker potentials based on the Hodgkin-Huxley equations." *Nature*, 188: 495-497.
- [20] Takahashi, K., Y. Naito and M. Koizumi (2010). E-Cell Fundamentals, 慶應義塾大学湘南藤沢学会.
- [21] Tellez, J.O., Mczewski, M., *et al.* (2011) Ageing-dependent remodelling of ion channel and Ca²⁺ clock genes underlying sino-atrial node pacemaking. *Exp. Physiol.*, 96, 1163-1178.
- [22] Anyukhovskiy, E.P., Sosunov, E.A., *et al.* (2002) Cellular electrophysiologic properties of old canine atria provide a substrate for arrhythmogenesis. *Cardiovasc. Res.*, 54, 462-469.
- [23] Lee, C.K., Allison, D.B., *et al.* (2002) Transcriptional profiles associated with aging and middle age-onset caloric restriction in mouse hearts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 99, 14988-14993.
- [24] Liew, R., Stagg, M.A., *et al.* (2004) Gender determines the acute actions of genistein on intracellular calcium regulation in the guinea-pig heart. *Cardiovasc. Res.*, 61, 66-76.
- [25] Mace, L.C., Palmer, B.M., *et al.* (2003) Influence of age and run training on cardiac Na⁺/Ca²⁺

exchange. *J.Appl.Physiol.*(1985), 95, 1994-2003.

[26] Walker,K.E., Lakatta,E.G., et al. (1993) Age associated changes in membrane currents in rat ventricular myocytes. *Cardiovasc.Res.*, 27, 1968-1977.

[27] Tsuneoka,Y., Kobayashi,Y., et al. (2012) Electrical activity of the mouse pulmonary vein myocardium. *J.Pharmacol.Sci.*, 119, 287-292.

[28] Wijffels,M.C., Kirchhof,C.J., et al. (1995) Atrial fibrillation begets atrial fibrillation. A study in awake chronically instrumented goats. *Circulation*, 92, 1954-1968.

[29] Andrade,J., Khairy,P., et al. (2014) The clinical profile and pathophysiology of atrial fibrillation: relationships among clinical features, epidemiology, and mechanisms. *Circ.Res.*, 114, 1453-1468

[30] Andrade,J., Khairy,P., et al. (2014) The clinical profile and pathophysiology of atrial fibrillation: relationships among clinical features, epidemiology, and mechanisms. *Circ.Res.*, 114, 1453-1468.

[31] Okubo,C., Sano,H.I., et al. (2013) Contribution of quantitative changes in individual ionic current systems to the embryonic development of ventricular myocytes: a simulation study.*J.Physiol.Sci.*, 63, 355-367.

[32] Takahara,A., Sugimoto,T., et al. (2011) Electrophysiological and pharmacological characteristics of triggered activity elicited in guinea-pig pulmonary vein myocardium. *J.Pharmacol.Sci.*, 115, 176-181.

[33] Takahara,A., Suzuki,S., et al. (2013) Electrophysiological effects of an anti-influenza drug oseltamivir on the guinea-pig atrium: comparison with those of pilsicainide. *Biol.Pharm.Bull.*, 36, 1650-1652.

[34] Nattel,S. (1995) Newer developments in the management of atrial fibrillation. *Am.Heart J.*, 130, 1094-1106.

[35] Nattel,S. and Li,D. (2000) Ionic remodeling in the heart: pathophysiological significance and new therapeutic opportunities for atrial fibrillation. *Circ.Res.*, 87, 440-447.

[36] Nattel,S., Khairy,P., et al. (2002) New approaches to atrial fibrillation management: a critical review of a rapidly evolving field. *Drugs*, 62, 2377-2397.

- [37] Ma,J., Guo,L., et al. (2011) High purity human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes: electrophysiological properties of action potentials and ionic currents. *Am.J.Physiol.Heart Circ.Physiol.*, 301, H2006-17.
- [38] Li,G.R., Lau,C.P., et al. (2002) Heterogeneity of sodium current in atrial vs epicardial ventricular myocytes of adult guinea pig hearts. *J.Mol.Cell.Cardiol.*, 34, 1185-1194.
- [39] Fries,K.M., Blieden,T., et al. (1994) Evidence of fibroblast heterogeneity and the role of fibroblast subpopulations in fibrosis. *Clin.Immunol.Immunopathol.*, 72, 283-292.
- [40] Ljungqvist,A. and Unge,G. (1973) The proliferative activity of the myocardial tissue in various forms of experimental cardiac hypertrophy. *Acta Pathol.Microbiol.Scand.A.*, 81, 233-240.
- [41] Mandache,E., Unge,G., et al. (1973) The proliferative activity of the heart tissues in various forms of experimental cardiac hypertrophy studied by electron microscope autoradiography. *Virchows Arch.B Cell Pathol.*, 12, 112-122.
- [42] Souders,C.A., Bowers,S.L., et al. (2009) Cardiac fibroblast: the renaissance cell. *Circ.Res.*, 105, 1164-1176.
- [43] Weber,K.T. (1989) Cardiac interstitium in health and disease: the fibrillar collagen network. *J.Am.Coll.Cardiol.*, 13, 1637-1652.
- [47] Camelliti,P., Borg,T.K., et al. (2005) Structural and functional characterisation of cardiac fibroblasts. *Cardiovasc.Res.*, 65, 40-51.
- [48] Camara,A.K., Begic,Z., et al. (2001) Differential modulation of the cardiac L- and T-type calcium channel currents by isoflurane. *Anesthesiology*, 95, 515-524.
- [49] Himeno, Y., N. Sarai, S. Matsuoka and A. Noma (2008). "Ionic mechanisms underlying the positive chronotropy induced by beta1-adrenergic stimulation in guinea pig sinoatrial node cells: a simulation study." *J Physiol Sci*, 58(1): 53-65.
- [50] Pandit,S.V., Clark,R.B., et al. (2001) A mathematical model of action potential heterogeneity in adult rat left ventricular myocytes. *Biophys.J.*, 81, 3029-3051.
- [51] Sachse,F.B., Moreno,A.P., et al. (2008) Electrophysiological modeling of fibroblasts and their interaction with myocytes. *Ann.Biomed.Eng.*, 36, 41-56.

- [52] Paci,M., Sartiani,L., et al. (2012) Mathematical modelling of the action potential of human embryonic stem cell derived cardiomyocytes. *Biomed.Eng. Online*, 11, 61-925X-11-61.
- [53] Paci,M., Hyttinen,J., et al. (2013) Computational models of ventricular- and atrial-like human induced pluripotent stem cell derived cardiomyocytes. *Ann.Biomed.Eng.*, 41, 2334-2348.
- [54] O'Hara,T., Virag,L., et al. (2011) Simulation of the undiseased human cardiac ventricular action potential: model formulation and experimental validation. *PLoS Comput.Biol.*, 7, e1002061.
- [55]Krenning,G., Zeisberg,E.M., et al. (2010) The origin of fibroblasts and mechanism of cardiac fibrosis. *J.Cell.Physiol.*, 225, 631-637.
- [56]Winter,E.M. and Gittenberger-de Groot,A.C. (2007) Epicardium-derived cells in cardiogenesis and cardiac regeneration. *Cell Mol.Life Sci.*, 64, 692-703.