

LECTURES

『心筋細胞フィジオーム理解のための電子教科書“e-Heart”』の 生理学教育教材および研究資材としての活用に向けて 第2回 ヒト心室筋細胞 (HuVEC) モデルを用いた 早期後脱分極 (EAD) の再現

立命館大学生命科学部生命情報学科, バイオシミュレーション研究センター

姫野友紀子, 天野 晃, 野間 昭典

はじめに

第1回では, “e-Heart” の概論で紹介されているヒト心室筋細胞 (HuVEC) モデル [1] のシミュレーターの実行手順を説明した. 各電流系の電流振幅や細胞内イオン濃度, 収縮力など, HuVEC モデルの基本的な振る舞いを確認することができた. 今回は, 同じ HuVEC モデルプログラムの中に含まれている, 第1回で紹介したものとは異なる実行画面を実行して延長した活動電位の再分極相で異常自動能が発生する早期後脱分極 (early afterdepolarization; EAD) の発生機序について, 解説を加えながらシミュレーターの説明を行う. EAD の発生には, 再分極相に内向きに流れて再分極を妨げる Na^+ 電流の増加や, 外向きに流れて再分極を促す K^+ 電流の減少などの関与が示唆されている. HuVEC モデルには, 1982 年に Carmeliet & Saikawa [2] によってヒツジのプルキンエ線維を使った実験で報告され, 1998 年に Maltsev ら [3] によってヒト心室筋細胞を使った実験で確認され, さらに 2006 年に Maltsev & Undrovinas [4] によってモデル化された遅延性 Na^+ 電流 (late Na^+ current, I_{NaL}) が組み込まれている. この I_{NaL} 電流の単一チャネルシミュレーターを使って, 単一チャネルレベルでの I_{NaL} の振る舞いを観察し, 時々刻々と状態が遷移する単一チャネル電流が多数加算されることで細胞全体のチャネル電流が計算されることを確認する. また HuVEC モデルを用い

た細胞レベルでのシミュレーションでは, この I_{NaL} の不活性化遅延が EAD の発生に重要な役割を果たす. Na^+ 電流の脱分極作用に拮抗する再分極作用をもつ K^+ 電流の影響についても, 様々な実験条件を与えてシミュレーションを行い, システムとしての細胞内イオンメカニズムの理解を深める.

*使用するプログラムに関しては, “e-Heart” プロジェクトのホームページにアクセスの上, ダウンロードページよりご入手いただきたい (http://www.eheartsim.com/?page_id=30).

1. 一過性および遅延性 Na^+ 電流 (I_{NaT} , I_{NaL}) のモデル化

HuVEC モデルに先行して, 2004 年に野間らのグループにより発表されたモルモット心室筋細胞モデル (Kyoto model [5]) では, Na^+ 電流は 1 種類 (I_{Na}) のみであり, その I_{Na} は活動電位の発生に伴って膜電位が急峻に脱分極すると, 急速に殆ど完全に不活性化すると仮定されていた. 後に Asakura ら [5] によって, Maltsev & Undrovinas [4] の単一チャネル電流記録で同定され, 新たにモデル化された 2 種類の Na^+ 電流 (I_{NaT} と I_{NaL}) が HuVEC モデルに組み込まれた. その結果, 活動電位発生とほぼ同時に瞬間的に不活性化する Transient mode の電流成分に加えて, 遅延性に散発的に開口遷移する Late scattered mode の電流成分を再現できるようになった. I_{NaT} と I_{NaL} は同一

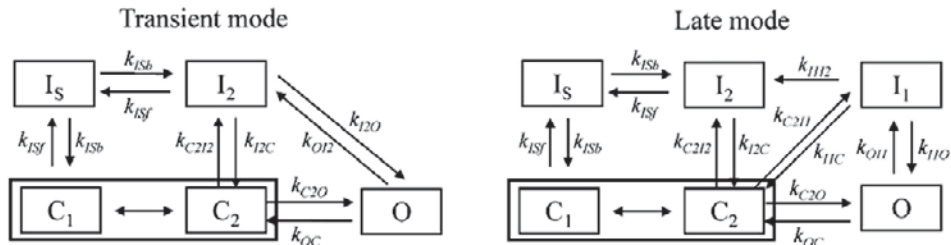


図1. I_{NaT} (左) と I_{NaL} (右) の状態遷移図 C_1, C_2 は閉状態, O は開状態, I_1, I_2, I_s は不活性化状態を表す. 速度定数 k_{xy} は, 状態 x から状態 y への遷移の速度定数である. 太い四角で囲った C_1 と C_2 は, 合わせて複合状態 C とした. k_{Isf}, k_{Isb} は, $C-I_s$ 間もしくは I_2-I_s 間に共通の前向き (forward) と後向き (backward) の遅い不活性化の速度定数を表す.

のチャンネルのモードシフトと考えられていて, モードの違いは, 図1右上の不活性化状態 (I_1) の有無である. HuVEC モデルの I_{Na} は, I_{NaT} と I_{NaL} がそれぞれ 87% と 13% の比率で現れるとして計算されている.

2. 単一 Na チャンネルモデルでチャンネルの振る舞いを観察する (プログラム: SingleNachannel, 実行画面: Form_INaT, Form_INaL)

“e-Heart” 教材には, 仮想的な簡略化された単一 K チャンネルと単一 Ca チャンネルのシミュレーターが含まれており, ランダム関数を用いてチャンネルの確率論的な振る舞いがどのように計算されているかが詳しく解説されている. 今回紹介する単一 Na チャンネルのシミュレーターは, HuVEC モデルに実装されている 5 あるいは 6 状態の複雑な状態遷移式から成る I_{NaT} と I_{NaL} のモデル式がそのまま使われている.

速度定数で定義される方向に状態遷移が起こるかどうかは, ランダム関数を使って判定する. ランダム関数で出た値 (0~1 に分布する) が, 速度定数に dt をかけた値, すなわち微小時間における状態遷移確率と比較してそれよりも大きければ状態が遷移し, 小さければ同じ状態に留まる, という計算を繰り返すことで, 単一チャンネルの開状態 O , 閉状態 C , 不活性化状態 I のうちのどの状態にあるかを決定する. 図2A は I_{NaT} についての結果で, 膜電位を固定するプロトコルで, 図2B には状態

(C : 橙色, I_2 : 水色, I_s : 青, O : 赤) を表す. 赤の縦線は, そのタイミングで 1ms にも満たないほんの短い持続時間でこの単一チャンネルが開いていたことを示す. 橙色, 水色, 青のバーはそれぞれ, C, I_2, I_s の状態にあったということを意味する. C のパネルには, 単一チャンネル電流 (i_{Na}) が開いた時に流れると仮定して, チャンネルが開いた数だけ積算するように描画させたものである. 時間軸が引き延ばされていることに注意する. 500 回分の単一チャンネル記録であるが, これは見方を変えると 1 つの細胞に 500 個のチャンネルがあった場合の細胞全体の 40 ミリ秒間の振る舞いであるとも解釈できる. D のパネルには, 理論的に計算される各状態 (C, I_2, I_s, O) の存在確率の時間経過が示されており, すべての存在確率の値を足し合わせると常に 1 となる. 試行回数が十分大きければ, 理論的に計算された D のパネルの赤で示す開口状態の時間経過が, シミュレーションで計算された C のパネルの単一チャンネル電流記録の積算の時間経過と同じになることが確認できる.

同様に, 図3には I_{NaL} の単一チャンネルの振る舞いを示す. 同じ SingleNachannel のモデルプログラムで, スタートアップフォームを Form_INaT.vb から Form_INaL.vb へと変更する必要がある. 第1回で HuVEC モデルを用いて, デバッグモードのスタートアップフォームの変更の仕方を詳しく説明してあるので, ご参照いただきたい. それぞれのパネルに示されているものは図2の実行画面

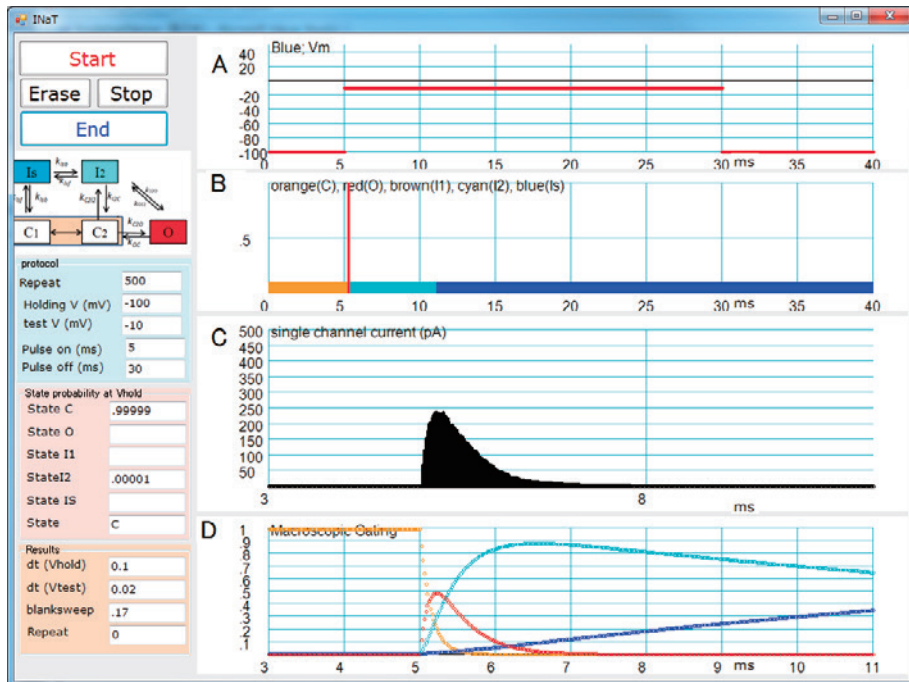


図2. 単一 I_{NaT} チャンネルの振る舞い (実行画面: Form_INaT.vb)

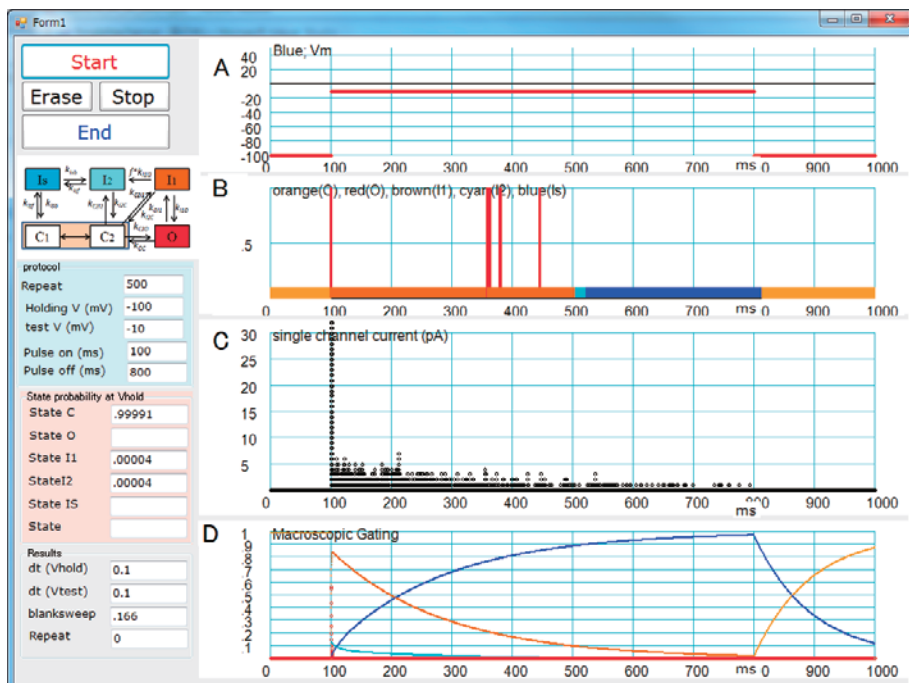


図3. 単一 I_{NaL} チャンネルの振る舞い (実行画面: Form_INaL.vb)

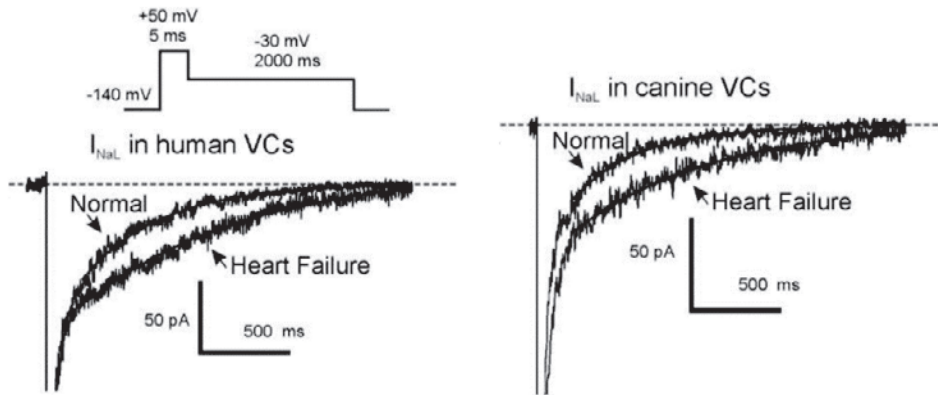


図4. 心不全を起こしたイヌとヒトの心室筋細胞を用いた実験で得られた I_{NaL} [6]

* この実験結果は 24℃ で計測されたデータであり、図2, 3で確認した 37℃ を想定した I_{Na} のシミュレーション結果と比較すると、時間経過が遅いことに注意する必要がある。

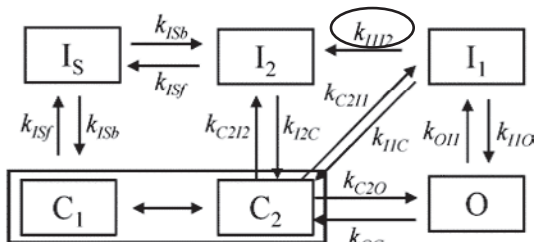


図5. I_{NaL} の状態遷移図

楕円で囲ってある k_{I1I2} が I_1 から I_2 への速度定数であり、不活性化の時間経過を決定する主要因となる。

と同じである。しかし、 I_{NaL} 不活性化の時間経過が遅いので、CとDのパネルの時間軸はA、Bのパネルと同じに揃えてある。実行画面のボタンの下に示す状態遷移図を見ると、不活性化状態の I_1 (茶色) が追加されているのがわかる。その結果、 I_1 (不活性化状態) と O (開状態) との間の行き来が続いて (パネルB)、いつまでも散発的にチャネルが開くことで電流が流れている様子が見て取れる (パネルC)。 I_{NaT} で見たように、 I_{NaL} でもパネルCの時間経過は、パネルDの赤で示す理論的に計算された開状態の時間経過と一致しているのだが、実際には -100mV の保持電位から -10mV に脱分極させた直後のスパイク以降は非常に小さな値なので、ほぼ0付近で状態が遷移していて、拡大

して表示させなければ目視では確認できない。しかし、 I_{NaT} と比較しても非常にゆっくりとした I_1 (不活性化状態) の減少であることから、 O (開状態) の確率が上昇しているであろうことは予測できる。

3. HuVEC モデルで EAD をシミュレーションする (プログラム: HuVECIll, 実行画面: Form_EADDAD.vb)

I_{NaL} を同定し、モデル化した Maltsev & Undrovinas のグループは、さらに慢性心不全を起こしたヒトやイヌで、 I_{NaL} の不活性化が遅延しており (図4)、その原因が Nav1.5 のゲーティングの変化によるものであると結論づけている [6]。

そこで我々は、 I_{NaL} の状態遷移図 (図5) で示される不活性化状態 I_1 から I_2 への一方方向の遷移速度 k_{I1I2} の大きさを減少させることで、この不活性化の遅延をモデルで表現することにした。

第1回では、HuVEC モデルの実行画面 Form_General.vb を用いてモデルの振る舞いを観察したが、今回は特に EAD や遅延後脱分極 (delayed afterdepolarization: DAD) を観察しやすいようにデザインされた実行画面 Form_EADDAD.vb を用いる。この実行画面では、この k_{I1I2} のスケーリングファクターの値をテキストボックスから自

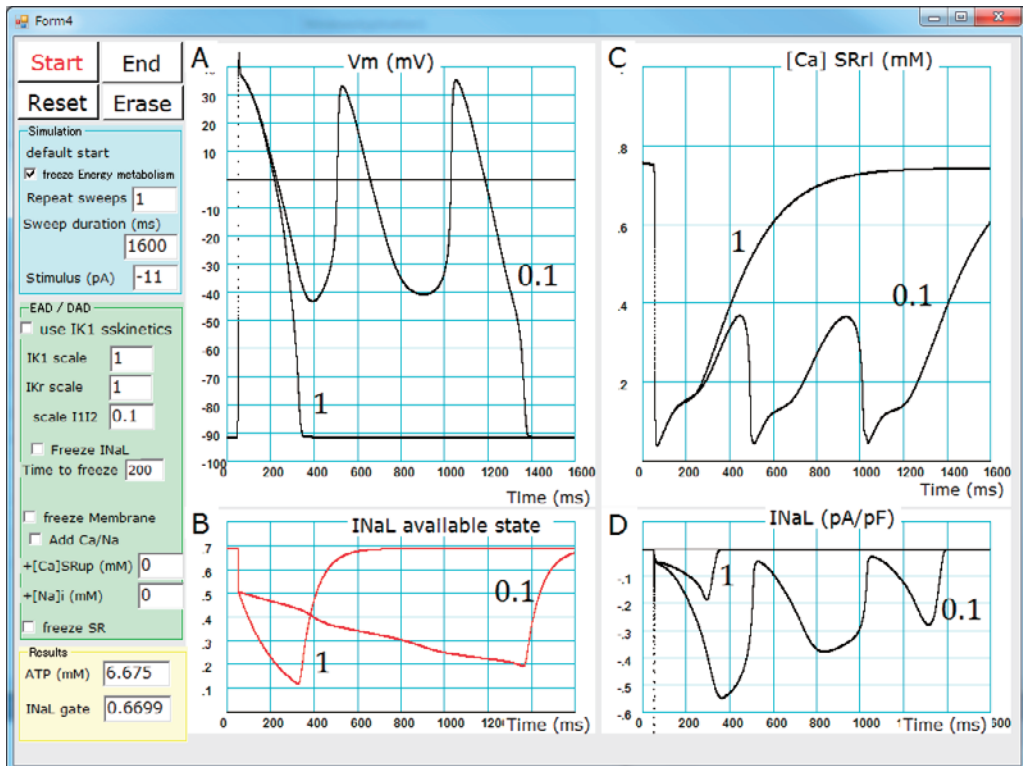


図6. I_{NaL} の不活性化を抑制して起こった EAD (k_{II2} のスケールリングファクターの値が1の時と0.1の時を重ねて表示) A: 膜電位, B: I_{NaL} の開状態へと遷移しうする状態確率, C: SR Ca^{2+} 放出部位の Ca^{2+} 濃度, D: I_{NaL} の振幅.

由に変更できるようになっている。横に「scale III2」と書かれたテキストボックスの値を1から0.1に変更すると、 I_{NaL} の不活性化状態 I_1 から I_2 への遷移が起こりにくくなり、 I_1 に留まりやすくなる結果、開状態である O の状態にある確率が高くなる。これによって、再分極相で Na^+ の駆動力が時間依存性に増加するとき、 I_{NaL} の振幅が増大し、再分極を減速し、遂には I_{CaL} の活性化を誘導し、膜は再び脱分極する。これが EAD である (図6)。パネル C は I_{CaL} の活性化は SR からの Ca^{2+} 放出を誘発する事を示している。図6では、EAD は2発連続しているが、この間、 I_{NaL} の不活性化は脱分極電位に依って時間と共に進行し、電流振幅はパネル D に見られるように次第に減少し、遂には再分極 K 電流とのバランスによって、静止電位へ向けての再分極を許す。

4. EAD に対する I_{Kr} , I_{Kl} の影響

I_{Kr} , I_{Kl} 等の外向き電流は活動電位の再分極を駆動するのであり、EAD の発生に対して抑制的に働く。実際の心臓では、 I_{NaL} の不活性化速度が図6のシミュレーションで見たように0.1まで減少することは実験結果から想定できない。不整脈の発生には何らかの複合的なメカニズムが必要である。そこで、以下のシミュレーションでは、K 電流の電流振幅の変化が EAD 発生にどのように影響するか調べた (図7)。

最初の条件は左右どちらの実行画面においても共通で、trace 1 では、すべてのスケールリングファクターを1のままにして control のトレースを得、次に EAD が起こりやすい条件にするために I_{NaL} の不活性化速度 k_{II2} を0.5倍にして trace 2 を記録した。活動電位の持続時間が正常に比べて僅かに

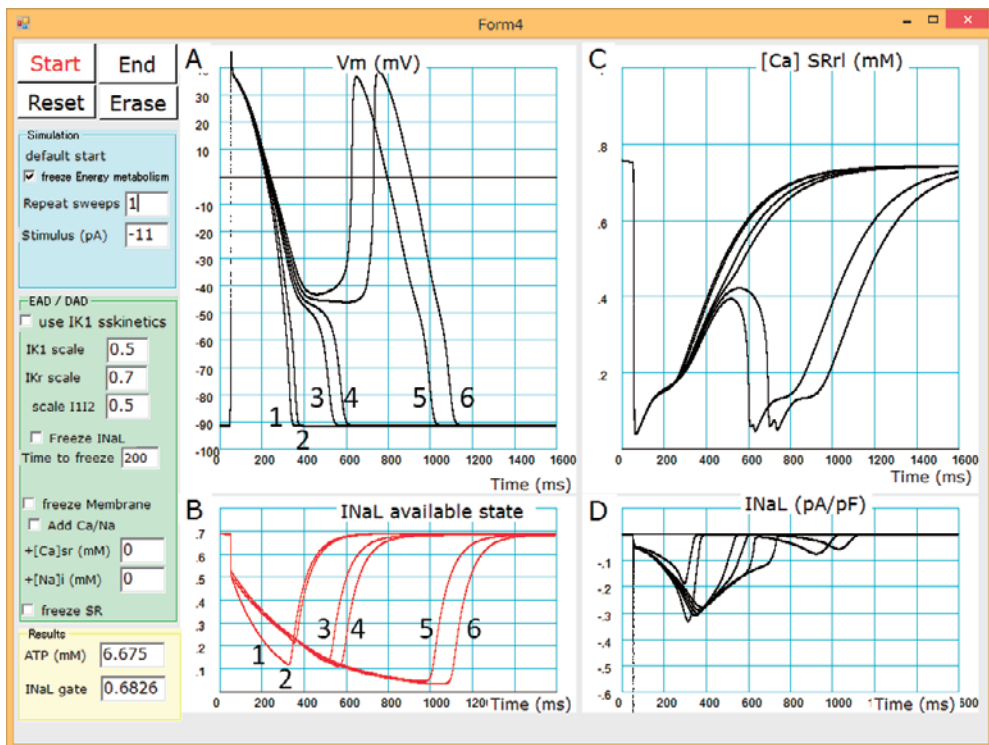
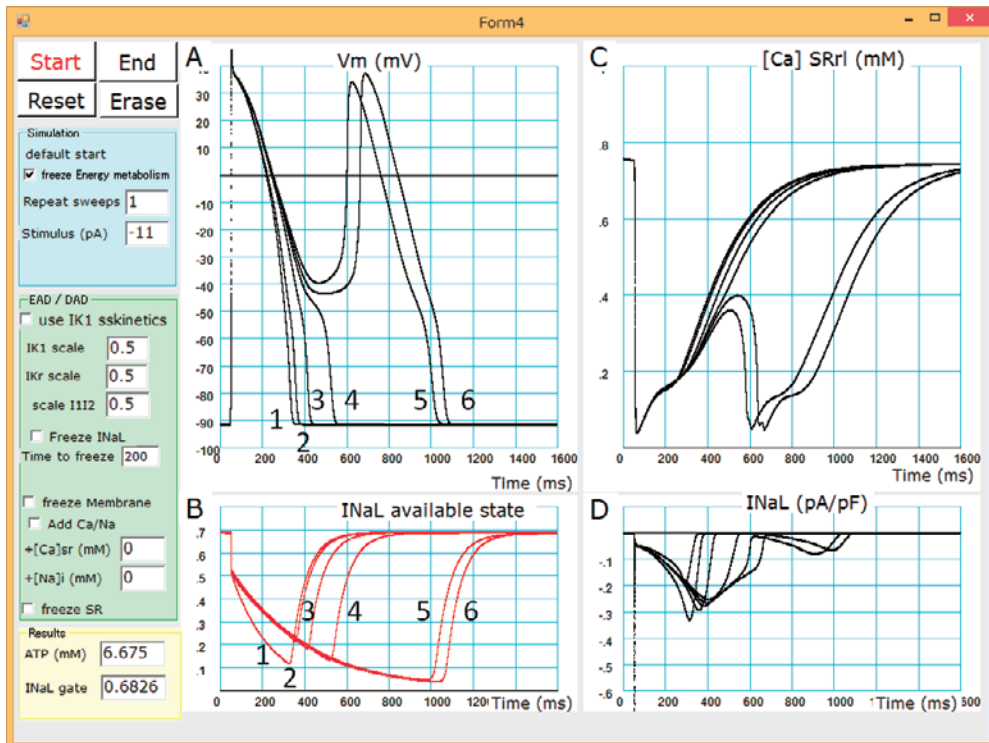


図7. シミュレーション条件を変更して重ね合わせたトレース
 パネル A ~ D は図6の説明と同じ。各トレースに与えたシミュレーション条件は表1に示す。

表1. 図7の各トレースを得るために与えたシミュレーション条件

I_{Kr} の影響 (図7 上段)				I_{K1} の影響 (図7 下段)			
	k_{112}	I_{Kr}	I_{K1}		k_{112}	I_{Kr}	I_{K1}
trace 1	1	1	1	trace 1	1	1	1
trace 2	0.5	1	1	trace 2	0.5	1	1
trace 3	0.5	0.5	1	trace 3	0.5	1	0.5
trace 4	0.5	0.5	0.7	trace 4	0.5	0.9	0.5
trace 5	0.5	0.5	0.6	trace 5	0.5	0.8	0.5
trace 6	0.5	0.5	0.5	trace 6	0.5	0.7	0.5

延長している (APD_{90} 285ms $\Rightarrow$ 330ms) が, EAD の発生を見ることはなかった. この条件を保持したまま, I_{Kr} , I_{K1} の EAD 発生への寄与を調べた.

左の実行画面では, I_{Kr} のスケールリングファクターを 0.5 にすると, さらに活動電位は延長したが (trace 3) EAD は見られなかった. 次に, I_{K1} のスケールリングファクターを, 0.7 (trace 4), 0.6 (trace 5), 0.5 (trace 6) と小さくしていくと, 0.7 で活動電位再分極相に停滞が現れ, 続いて 0.6, 0.5 では EAD が発生した.

次に右の実行画面で I_{K1} のスケールリングファクターを 0.5 にすると, それは単独で再分極相の停滞を誘発し (trace 3), さらに I_{Kr} のスケールリングファクターを 0.9 (trace 4), 0.8 (trace 5), 0.7 (trace 6) と徐々に小さくしていくと, 早くも 0.9 で再分極相の停滞が見られ, 0.8 以下では EAD が誘発された.

以上, I_{Kr} あるいは I_{K1} を抑制した場合, どちらの場合でも EAD を発生するか, 静止電位へ向けて再分極するかを決定する“閾値”は $-40 \sim -45$ mV 付近にあったことが図 6, 7 のパネル A の膜電位記録から示された. この電位は, Na チャネルの活性化の電位依存性が急峻な範囲にあり, 再分極と脱活性化が正帰還サイクルを容易に開始する範囲にある. また, L 型 Ca チャネルの活性化の閾値でもある. 一方, I_{Kr} と I_{K1} は共に再分極に依ってそれらの開口確率が上昇する. I_{Kr} では不活性化ゲートが, I_{K1} では細胞内 Mg によるブロックが負電位になるほど強く解除されるためである. それぞれの電位依存性に差があるが, シミュレーションで

それぞれの開口確率の推移をプロットして比較すると, 最終再分極相は, I_{K1} が主役を演じるのが分かる.

おわりに

不整脈を引き起こす原因について, タンパク分子・遺伝子レベルでの詳細な研究が行われるようになり, 電気生理学実験データとの対応関係を検証することが可能となってきた. また一方で, 昨今の心筋における様々な分子生物学的な理解や計測技術の向上と, 電気生理学実験データの蓄積とが相俟って, 心筋数理モデルも精緻化が進んできた. 今回は EAD の原因となる I_{NaL} の, 実験では決して見ることができない単一チャネルレベルでの ms オーダーでの振る舞いを状態遷移という形で観察することができた. また HuVEC モデルの中の I_{NaL} チャネルに変異を組み込むことで EAD が起こりやすい状態にある細胞をモデル化することができ, 同時に他の要因 (今回の例であれば I_{Kr} , I_{K1} の減少) を複合的に組み込むことで EAD が引き起こされる様子を再現することができた. これは, 実験から想定できる EAD の発生機序の一例を定量的に示せたことになる. 次の第 3 回では, EAD と並んで不整脈の原因として注目されている DAD の発生機序について, 解説をおこなう. HuVEC モデルは, 細胞内 Ca^{2+} 動態が特に詳細にモデル化されているので, そのしくみについても詳しく説明したい.

文 献

- 1) Himeno Y, Asakura K, Cha CY, Memida H, Powell T, Amano A, Noma A: A human ventricular myocyte model with a refined representation of excitation-contraction coupling. *Biophys J* 109: 415-427, 2015
- 2) Carmeliet E, Saikawa T: Shortening of the action potential and reduction of pacemaker activity by lidocaine, quinidine, and procainamide in sheep cardiac purkinje fibers. An effect on Na or K currents? *Circ Res* 50: 257-272, 1982
- 3) Maltsev VA, Sabbah HN, Higgins RS, Silverman N, Lesch M, Undrovinas AI: Novel, ultraslow inactivating sodium current in human ventricular cardiomyocytes. *Circulation* 98: 2545-2552, 1998
- 4) Maltsev VA, Undrovinas AI: A multi-modal composition of the late Na⁺ current in human ventricular cardiomyocytes. *Cardiovasc Res* 69: 116-127, 2006
- 5) Asakura K, Cha CY, Yamaoka H, Horikawa Y, Memida H, Powell T, Amano A, Noma A: EAD and DAD mechanisms analyzed by developing a new human ventricular cell model. *Prog Biophys Mol Biol* 116: 11-24, 2014
- 6) Maltsev VA, Silverman N, Sabbah HN, Undrovinas AI: Chronic heart failure slows late sodium current in human and canine ventricular myocytes: implications for repolarization variability. *Eur J Heart Fail* 9: 219-227, 2007