

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3回 ヒト心室筋細胞 (HuVEC) モデルの Ca^{2+} 動態と 遅延後脱分極 (DAD) の発生

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

e-Heart は, いつでも, どこでも, 誰でも, 手元のパソコンを使って心臓の動きを観察し, 様々なプロトコルで実験ができる, という学習環境の提供を目指した生理学教材である. シリーズ第1回では, シミュレーターの基本的な操作方法の説明と簡単なシミュレーション実験プロトコルの実行, 第2回では不整脈を誘発しうる心筋細胞レベルでの異常興奮メカニズムについて, 詳細なヒト心室筋細胞モデル (HuVEC, [1]) を用いた解説を行った. 続く第3回では, 第2回で扱った EAD (early afterdepolarization: 早期後脱分極) に加えて, DAD (delayed afterdepolarization: 遅延後脱分極) について説明する. DAD は, 活動電位の再分極が終了し, 静止膜電位に戻った後, 小さな一過性脱分極をきたすもので, 細胞質内の Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]$) の一過性上昇が原因の一つであると考えられている. 梗塞心, 肥大大心, 心不全などの病態では細胞内 Ca^{2+} 量が正常範囲を超えて高い状態 (Ca^{2+} 過負荷) になることが一般的に知られている. この状態では, 細胞内で Ca^{2+} を蓄えておく筋小胞体 (SR) 内の $[\text{Ca}^{2+}]$ が高く, 常に SR から Ca^{2+} が漏れ出している状況にある. この漏洩する Ca^{2+} (Ca^{2+} リーク) が SR 周囲の $[\text{Ca}^{2+}]$ を高くし, 遂に SR 内の Ca^{2+} を放出するリアノジン受容体 (RyR) チャネル, あるいはその機能的集合体 (couplon) を活性化すると, 一過性の Ca^{2+}

放出が誘発される. この一過性の細胞内 $[\text{Ca}^{2+}]$ 上昇が, $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換体 (INaCa) を活性化し, 1 個の Ca^{2+} 流出に対する 3 個の Na^+ 流入が運ぶ正味の電荷が細胞膜の小さな一過性脱分極を惹起すると理解される. 本稿ではまず, 一般に入手可能な心室筋細胞モデルのなかで, 現在最も詳細な細胞内 Ca^{2+} 動態を再現するモデルの一つである HuVEC モデルを用いて DAD のシミュレーションを行う. その結果を観察しながら DAD の発生機序を説明し, モデルの成り立ちを踏まえてメカニズムを理解していきたい.

*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. 遅延後脱分極 (DAD) の発生

単離心筋細胞を用いて実験的に細胞内 Ca^{2+} 過負荷によって DAD を引き起こす方法に, ウアバイン下での高頻度刺激と細胞質内への Ca^{2+} の直接注入がある (図 1) [2].

強心配糖体とも呼ばれるウアバイン作用下での高頻度刺激は, 交感神経活動が優位な状態で薬物による強心作用を受けている時の心臓の状態を想定したプロトコルであり, NaK ポンプ電流 (INaK) を抑制することによって, 結果として細胞内 $[\text{Na}^+]$ と $[\text{Ca}^{2+}]$ を上昇させる. 一方の細胞

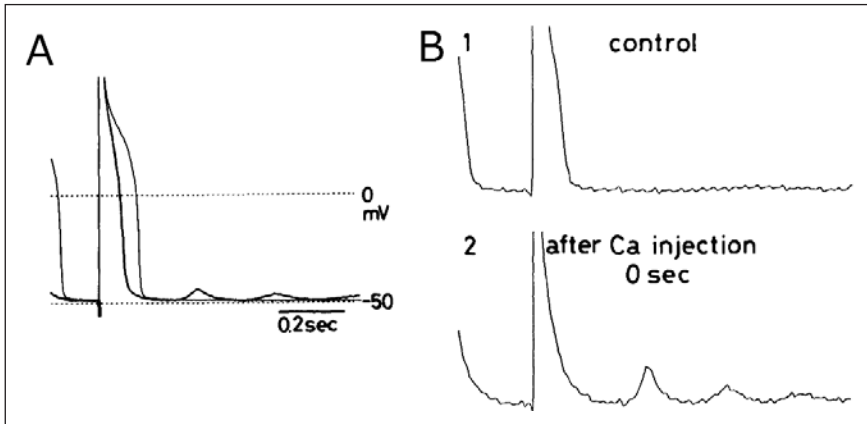


図1. モルモット心室筋細胞におけるウアバイン下 (A) と細胞内 Ca^{2+} 注入後 (B) の 4Hz 高頻度刺激によって実験的に誘発された活動電位と DAD [2]
 A : 5 μM のウアバインの 5 分間灌流前後の活動電位の重ね合わせと灌流後に誘発された DAD. B : コントロールの活動電位 (1) と, 0.5mM Ca^{2+} を細胞内注入した後の活動電位と続いて誘発された DAD (2).

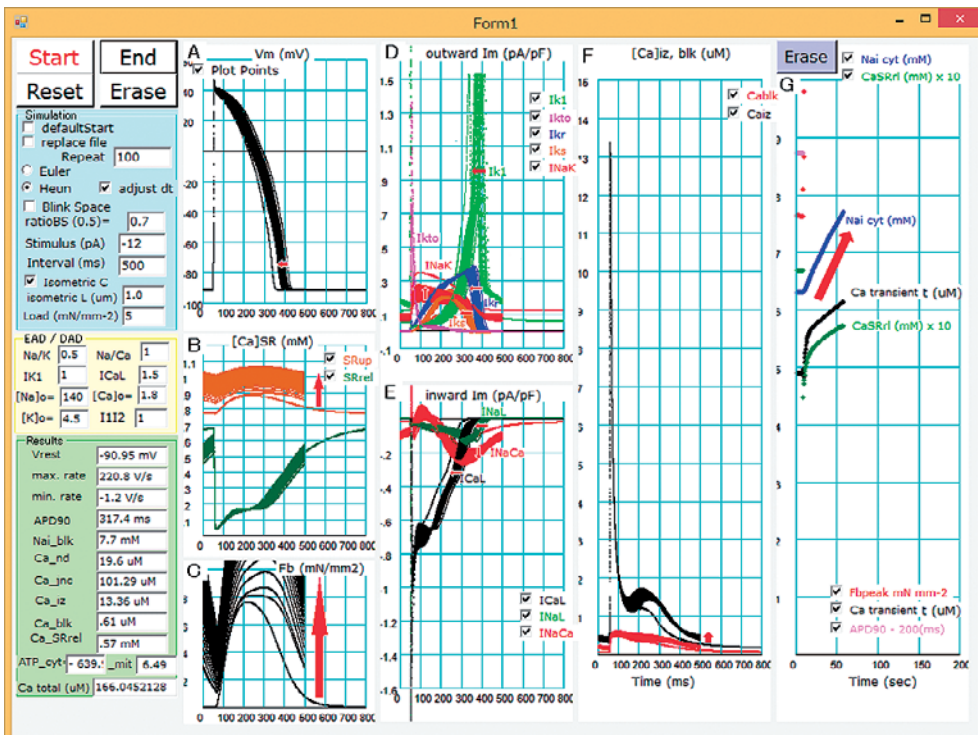


図2. Ca^{2+} 過負荷状態のシミュレーション

内への Ca^{2+} 注入は, より直接的に細胞内 $[\text{Ca}^{2+}]$ を上昇させるプロトコルである. 今回のシミュ

レーションでは Ca^{2+} 注入による細胞内 $[\text{Ca}^{2+}]$ 上昇については細胞質内にある Ca^{2+} バッファーの

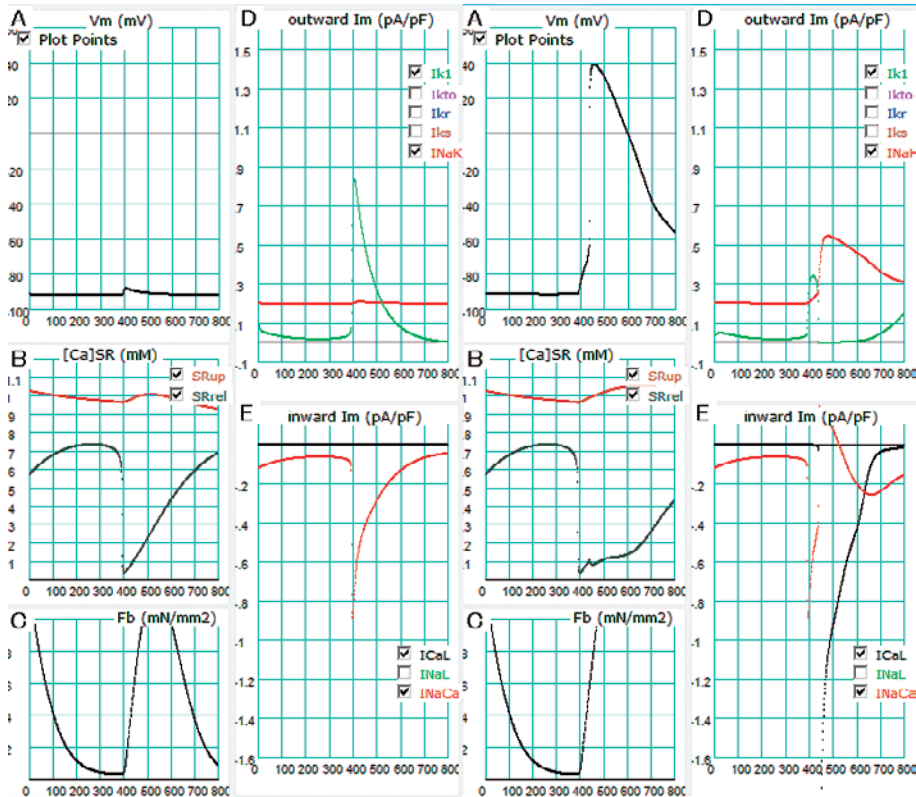


図3. Ca^{2+} 過負荷条件 (2Hzでの頻回刺激直後と $\text{INaK}=0.5$, $\text{ICaL}=1.5$) からコントロール状態 (刺激なし $\text{INaK}=1$, $\text{ICaL}=1$) に戻した直後にみられるDADのシミュレーション (左: IK1 のスケールは1倍のまま, 右: IK1 のスケールを0.2倍に変更)

計算が複雑なため、便宜上、SRの Ca^{2+} 取り込み区画 (SRup)の $[\text{Ca}^{2+}]$ を増加させることで再現する。以下に高頻度刺激と Ca^{2+} 注入のシミュレーション手順と結果を示す。

1.1. 高頻度刺激の効果

第3回用HuVECプログラムをe-Heartホームページよりダウンロードし、HuVECmodelIIIの[ソリューションエクスプローラー]にある[My Project]をクリックして[スタートアップフォーム]より[Form_General.vb]を選択し、起動(デバッグを開始)する。(第2回バージョンのHuVECから改編した箇所については、Appendixに記載してある。)

シミュレーションでは、交感神経優位の状態を再現するために刺激頻度をcontrolの1.25Hz

(Interval=800ms)から2Hz(Interval=500ms)に増し、L型Ca電流(ICaL)を1.5倍にする。且つウアバインの作用として INaK を0.5倍に減らす。初めにRepeat回数を10程度に設定してcontrol状態でシミュレーションを行った後、上記の条件を設定してrepeat回数を100程度にしてシミュレーションをStartすると、 ICaL の増大によって一旦は活動電位のプラトー電位が大きくなり、持続時間が延長する(図2パネルA)。しかし頻回刺激を続けるうちに、 SRup 内 $[\text{Ca}^{2+}]$ (パネルB)と細胞内 $[\text{Ca}^{2+}]$ (パネルF)の上昇が生じて収縮力(パネルC)が増強すると共に、活動電位の持続時間は徐々に短縮する(パネルA)。活動電位の短縮は、細胞内 $[\text{Na}^+]$ (パネルG)がcontrolの6.3mMから大きく上昇したために、

INaK が活性化されて大きな外向き電流を流し始めることによる。

また、頻回刺激後に刺激を止めて、wet 実験であれば溶液条件を normal tyrode 液に戻す、生体内であれば薬物投与や β 刺激のないコントロールの状態に戻すことを想定し、膜電位変化をシミュレーションすると (Stimulus=0, INaK=1, ICaL=1, Repeat=1 に設定して Start する), 膜電位に一過性の小さな脱分極が見られる (図3左パネル A). パネル B をみると SR の Ca^{2+} 放出区画 (SRrl) 内の $[\text{Ca}^{2+}]$ に一過性の低下がみられ、細胞質への Ca^{2+} 放出が生じているのが分かる。これに伴って Na/Ca 交換体の運ぶ電流 (INaCa) が大きな内向き電流を流して (パネル E), 脱分極が生じているのである。この内向き電流を打ち消すように、心室筋の静止電位を維持する内向き整流性 K 電流 (IK1) が大きな外向き電流を流している (パネル D). つまり、IK1 は INaCa によって生じた膜の脱分極を抑え込む役割を果たしていることが分かる。さらに IK1 の役割を確かめるため、頻回刺激後に同様に溶液条件を元に戻してコントロール状態にした後 IK1 を小さく設定 (0.2 倍) して膜電位変化をみると、自発的な活動電位の発生がみられる (図3右パネル A). 小さくなった IK1 は INaCa が一過性に増大するタイミングで十分に大きな外向き電流を提供できなくなったために膜は大きく脱分極し、その結果、電位依存性 Na 電流 (INa) や ICaL が膜電位依存性に活性化されて、活動電位が発生したのである。

1.2. Ca 注入の効果

次に、細胞内に直接 Ca^{2+} を注入する場合のシミュレーションの手順を説明する。このシミュレーションでは、[スタートアップフォーム] より [Form_EADDAD.vb] を選択し起動する。([Form_EADDAD.vb] は第2回でも使用したが、今回のシミュレーションのために、パネル C の Y 軸のスケールとペンの太さを変更した。修正の方法は、Appendix に追記してある。)

Start をクリックすると 50ms の時点で刺激電流 (3ms, -5pA/pF) が細胞内に注入されて活動電位が発生する。デフォルトでは、SRup 内の $[\text{Ca}^{2+}]$

は初期値 (約 0.8mM) に固定されており、図 4A の①で示すように正常な活動電位波形が発生する。 Ca^{2+} 過負荷を起こすためには Add Ca/Na にチェックを入れ、+ [Ca] SRup (mM) と書かれたテキストボックス内に上昇後に到達させる値を記入する。値を 1.2mM に設定すると、SRup 内の $[\text{Ca}^{2+}]$ は 100ms の時点で瞬時に 1.2mM に上昇し (図 4C 細線の SRup), 活動電位発生後、静止膜電位まで再分極した後 (約 800ms の時点), 一過性の脱分極が見られるようになる (図 4A の②)。これは、パネル C 太線の SRrl の $[\text{Ca}^{2+}]$ 変化から明らかのように、SR からの自発的な Ca^{2+} 放出が起点となって細胞内 $[\text{Ca}^{2+}]$ の増加が内向きの INaCa を誘発して引き起こされた一過性脱分極 (DAD) である。さらに SRup 内の $[\text{Ca}^{2+}]$ を 1.5mM に上昇させると、活動電位の再分極途中 (約 400ms の時点) に一過性脱分極 (EAD) が生じる (図 4A の③)。しかし、これは第 2 回で紹介した遅延性 Na^+ 電流 (INaL) の不活性化遅延によって起きる EAD とはメカニズムが異なり、SR からの自発的な Ca^{2+} 放出が誘発したものである (INaL の不活性化遅延に起因する EAD については、第 2 回の図 7, あるいは同じスタートアップフォーム [Form_EAD-DAD.vb] の IK1 scale, IKr scale, scale III2 を例えばすべて 0.5 に減少させたシミュレーション結果をご参照いただきたい)。INaL の不活性化の時間経過を図 4 パネル B で確認すると、SRup 内の $[\text{Ca}^{2+}]$ を上昇させた②, ③においても、①と同様の時間経過で、再分極に伴う不活性化からの解除が起こるまでは不活性化が順調に進行している。従って、パネル D に示す INaL は、EAD を引き起こすだけの大きな内向き電流成分を供給できていない。一方、パネル C に太線で示す SRrl 内の $[\text{Ca}^{2+}]$ を見ると、SRup 内の $[\text{Ca}^{2+}]$ を上昇させた②, ③では、膜電位の一過性脱分極と一致するタイミングで大きく低下している、つまり大きな Ca^{2+} 放出を起こしていることが確認される。これらの結果は、EAD のメカニズムを現象の観察のみから推測することが困難であることを示している。

なお、図 4 のシミュレーションで A のパネルを

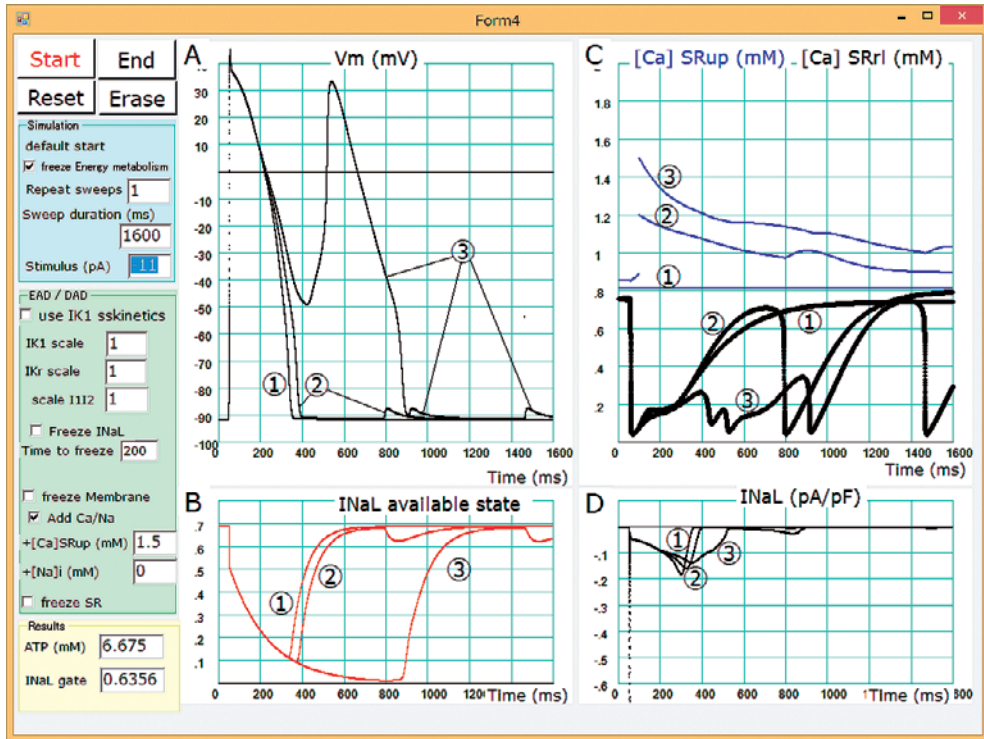


図4. *SRup* の $[Ca^{2+}]$ を瞬時に増加した際の変化
 ① *SRup* 内 $[Ca^{2+}]$ を 0.8mM に固定, ②, ③ 100ms の時点で瞬時に *SRup* 内 $[Ca^{2+}]$ をそれぞれ 1.2, 1.5mM まで上昇させた。

見ると, *SRup* 内 $[Ca^{2+}]$ の上昇に伴って, 活動電位持続時間が延長している。これは, 細胞内 $[Ca^{2+}]$ が高くなり, 内向き電流である *INaCa* が大きくなったためだと推測される。しかし, 図 1B に示した実験では Ca^{2+} 注入後に活動電位持続時間は短縮している。この違いは, Ca^{2+} 注入シミュレーションでは実験で行った頻回刺激を行わずに単発刺激で Ca^{2+} 過負荷の影響をみているため, 細胞内 $[Na^+]$ が低い状態に留まっていることに起因すると思われる。これらのメカニズムをシミュレーションで確認するには, まずプログラムで *INaCa* を表示させて活動電位持続時間の延長の原因であることを確かめる。さらに細胞内に Na^+ 注入を行って活動電位持続時間が短縮することが確認できればよい。実際の実験では細胞内 Ca^{2+} 過負荷状態にある心筋細胞では, しばしば活動電位持続時間が短縮する傾向が見られるが, これは *INaCa* 活

性化を経て細胞内 $[Na^+]$ の上昇による *INaK* の活性化が寄与していると考えられることがモデルから示されたことになる。コードの変更方法については, Appendix を参照されたい。

2. Ca 放出ユニット (*CaRU*, Hinch (2004) モデル)

SR からの自発的な Ca^{2+} 放出を担うのは SR 膜にある *RyR* である。 *RyR* は *SRrl* の膜上に数個~数十個寄り集まった *couplon* として存在し, T 管膜上にある L 型 Ca^{2+} チャネル (*LCC*) と向かい合う形で Ca 放出ユニット (*CaRU*) を形成している (図 5)。なお, これ以降, *ICaL* を Hinch モデルにおける *CaRU* の表記法に従って *LCC* とすることを申し添えておきたい。従来, 細胞内で共通の $[Ca^{2+}]$ を参照する集中定数系モデル (*lumped parameter model*, *common pool* モデルとも言わ

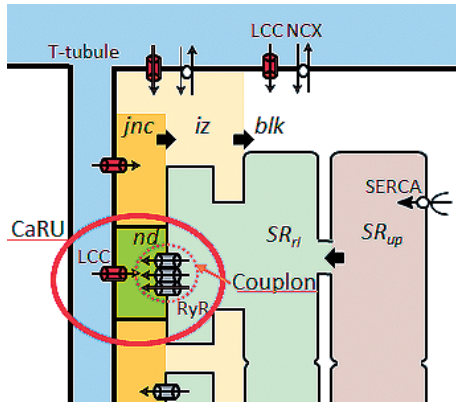


図5. CaRUと細胞内Ca²⁺分画
略語は本文参照.

れる)では, CaRUの振る舞いがAll or none的になってしまふことから, 実験で見られるような膜電位に依存したgraded Ca²⁺ releaseと呼ばれる現象が再現されないというような問題が指摘されてきた. その後, 局所制御説(local control theory) [3, 4] が提唱されて以来, 個々のCaRUはそれぞれが感受する[Ca²⁺]によって制御されるという理解が現在の主流となっている. 細胞内に数万個存在すると言われているCaRUの振る舞いを細胞レベルのモデルで再現するためには, それぞれ独立に各々の局所(nanodomain, *nd*)の[Ca²⁺]を計算し, その濃度を感受して各CaRUの振る舞いが決定されるという非常に計算コストのかかる完全確率シミュレーションを行う必要があった[5]. しかし, 2004年にHinchらがCaRUの確率論的な振る舞いをLCCとcouplonの状態遷移を一体のものとして扱い, 決定論的な式で記述することに成功した[6, 7]後, 精緻なCaRUの振る舞いを, 計算コストを上げることなく細胞モデルに組み込むことが可能となった. 我々のHuVECモデルには, このHinchらの原理的なモデルのLCCとRyRを, 具体的な実験データに合うよう調整したモデルで置き換えたCaRUモデルが組み込まれている. また, *nd*周りの時空間的Ca²⁺蓄積を再現するために, Hinchらのモデルでは1つだけであった細胞内[Ca²⁺]を計算するスペースを

junction space (*jnc*), intermediate zone (*iz*), bulk space (*blk*)の3つに分画化した. この3つの分画の[Ca²⁺]は常微分方程式でオイラー法を使った時間発展計算を行う. 一方の*nd*は, 非常に微小な空間(容積は近似的に0)であるため, [Ca²⁺]はLCCとRyRの開閉状態に対応して瞬時に決定されると仮定し, 瞬時平衡式を用いて計算することとしている. 次の章では, *nd*での[Ca²⁺]の瞬時平衡式の成り立ちを説明する.

3. Ca nanodomainの計算

CaRUを構成するLCCとRyRは, どちらもCa²⁺による活性調節を受けている. [Ca²⁺]が不均一な細胞内において, それらのチャンネルが感受する局所Ca²⁺ (*nd*の[Ca²⁺])の計算が精密に行われていなければ, 正しいCaRUの振る舞いを再現できない. HuVECモデルの*nd*の[Ca²⁺]は, 図6に示す瞬時平衡の計算式で与えられる.

式の形から明らかのように, 関与しうる[Ca²⁺]は, *jnc*, T管内あるいは細胞外(o), *SRri*の3種類である. *nd*から*jnc*へは, 常にCa²⁺が拡散しており, *jnc*からも*iz*, そして*blk*へと拡散し, やがてその一部は筋小胞体カルシウムATPアーゼ(SERCA)によって再び*SRup*へと取り込まれる. *nd*から*jnc*への拡散によるCa²⁺フラックスの大きさは拡散係数 $g_D (=0.065\mu\text{m}^2/\text{ms})$ で規定されている. LCCとRyRのチャンネルを介したCa²⁺フラックスの大きさも, 同様にコンダクタンス $J_L (=0.000913\mu\text{m}^3/\text{ms})$ あるいは $J_R (=0.02\mu\text{m}^3/\text{ms})$ で規定されるのだが, LCCは膜電位と細胞外[Ca²⁺]に応じて, RyRは*SRri*の[Ca²⁺]に応じてその大きさが変化し, どちらも g_D の大きさ次第で*nd*の[Ca²⁺]への寄与の大きさが変わる. また, どちらもチャンネルが閉じているときのフラックスは0になることに注意が必要である. この瞬時平衡式を俯瞰してみると, *nd*を取り囲んで連絡する3つの空間における[Ca²⁺]の加重平均のような形で*nd*の[Ca²⁺]が決定されていることがわかる.

4. 興奮-収縮連関

通常, 心室筋細胞は刺激伝導系を通じて伝わっ

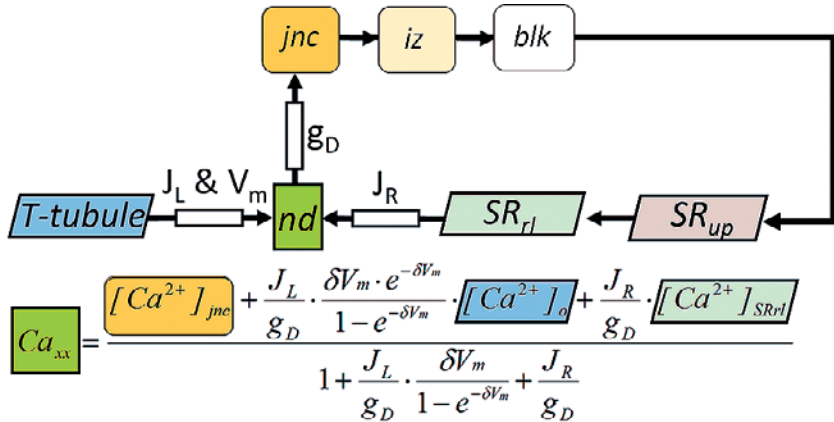


図6. nd の $[Ca^{2+}]$ (Ca_{xx}) の計算方法

てきた電氣的な刺激を受けて活動電位を発生し、活動電位発生に伴う細胞内 $[Ca^{2+}]$ の一過性上昇によって心筋収縮が起こる。この一連の機能を興奮-収縮連関と呼び、収縮を引き起こすのに重要な役割を果たすのが $CaRU$ である。HuVEC モデルでの $CaRU$ は、LCC の電位 (V_m) 依存性ゲートと Ca^{2+} 依存性ゲート、それに RyR の集合体としての couplon ゲートの3種類のゲートから成る、LCC-RyR 共役モデルである (図7)。開状態 (O) と閉状態 (C) の2状態のみからなるゲートが3種類組み合わせられているので、2の3乗で8状態の遷移モデルとなる。矢印付近にある Ca_{xx} は図6の式に出てくる左辺と同じものであり、 xx の部分の左には LCC が開いていれば L で閉じていれば 0、右には couplon が開いていれば R で閉じていれば 0 が入る。左上の挿入に \overline{COO} と例が挙げられているが、これは左から LCC の V_m ゲートが閉状態 (C) であり、LCC の Ca^{2+} ゲートと couplon のゲートは開状態 (O) にあるということを意味する。図7の couplon ゲートの閉状態 (C) から開状態 (O) へ向かう途中に t という文字が出てくるが、これは transient の略で、RyR が couplon の中で1つだけ開いている状態を表す。上の挿入図で示すように、couplon の中で RyR が1つでも開くと、その近傍の $[Ca^{2+}]$ が上昇し、同じ couplon 内の RyR が感受する $[Ca^{2+}]$ が高くなるというこ

とを想定した。そして、RyR が1つも開いていない couplon 内の $[Ca^{2+}]$ (LCC が開いていたら Ca_{L0} 、閉じていたら Ca_{00}) を使って RyR が1つだけ開く確率を瞬時平衡式から求め、2つ目以降の RyR は SR からの Ca^{2+} 放出を受けた後の $[Ca^{2+}]$ (LCC が開いていたら Ca_{LR} 、閉じていたら Ca_{0R}) を感受して活性化されるという式に従って、couplon ゲートの開閉を計算する。

さて、活動電位が発生して膜が脱分極すると、電位依存性に LCC が活性化され、細胞内に Ca^{2+} が流入する。LCC が開く前の nd 内 $[Ca^{2+}]$ は Ca_{00} であるが、LCC が開いた後の nd 内 $[Ca^{2+}]$ は LCC を介した Ca^{2+} 流入を受けて、 Ca_{L0} となる。そうすると、その開いた LCC と向かい合う RyR が感受する nd の $[Ca^{2+}]$ が上昇し、RyR の開口確率が上昇する。couplon 内の1個の RyR が開く確率は Ca_{L0} と RyR の速度定数を使った瞬時平衡式で与えられ、2つ目以降の RyR が感受する $[Ca^{2+}]$ は Ca_{LR} となり、さらに開いた RyR チャンネルの近傍にある複数のチャンネルが同時に活性化を受けると仮定してあるため、加速的に couplon の開口確率が上昇する。同時に、LCC からの Ca^{2+} 流入と RyR からの Ca^{2+} 放出により jnc の $[Ca^{2+}]$ が時間依存性に上昇し、図6の計算式からも明らかなように nd の $[Ca^{2+}]$ が底上げされる形で上昇するため、再生的な活性化が進行し、SR が枯渇するまで放出

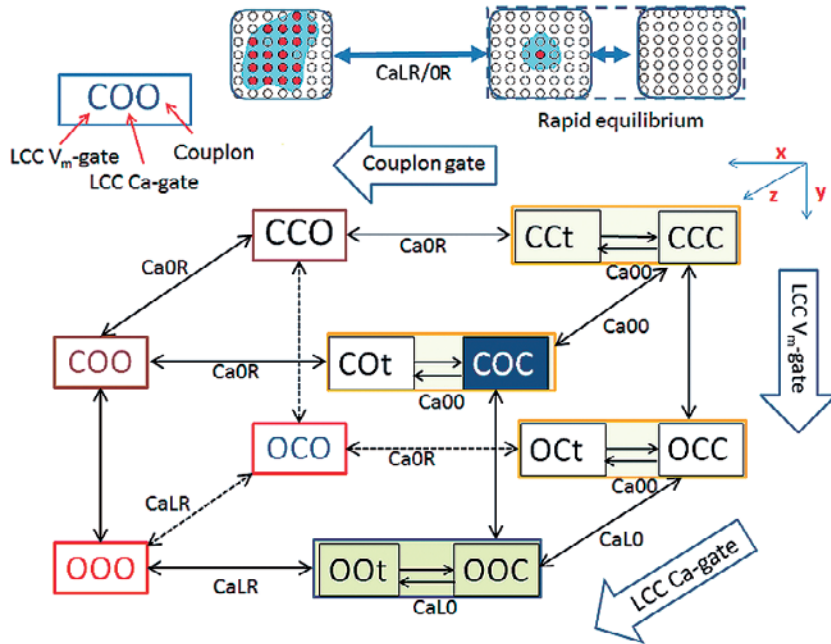


図7. CaRUの状態遷移図

が続き、 $[Ca^{2+}]$ の一過性上昇はピークを迎える。この細胞内 $[Ca^{2+}]$ の上昇を受け、細胞質内に存在する筋収縮線維におけるアクチンとミオシン間のクロスブリッジ形成が進行し、力を発生することで筋収縮が起こる。

今回、図3, 4のシミュレーションでも再現したような Ca^{2+} 過負荷状態にある細胞では、SR内 $[Ca^{2+}]$ が非常に高くなっている。このような細胞で見られる、 Ca^{2+} リークに起因する一過性 Ca^{2+} 放出では、脱分極によるLCCの V_m ゲートの活性化が起こらないため、LCCは閉じたままである。つまり、RyRあるいはcouplonの開閉のみに着目すればよい。 nd での $[Ca^{2+}]$ が取りうる値は、RyRが開いていなければ Ca_{00} 、開いていれば Ca_{0R} である。図6の計算式からわかるように、 Ca_{00} では jnc の $[Ca^{2+}]$ がそのまま反映されるが、 Ca_{0R} ではSR内 $[Ca^{2+}]$ が計算式に含まれてくるので、 Ca^{2+} 過負荷状態では大きな値をとることになり、再生的な活性化はより加速する。加えて、モデルではRyRは常にある割合 (0.0075%) で活性化されていると定義されているため、 Ca^{2+} 過負荷状態では

RyRを介した Ca^{2+} リークの jnc への蓄積も無視できない。次の章では、通常の活動電位によって一過性 $[Ca^{2+}]$ 変化が誘発された場合と、図3や図4の②で見たようなDADの場合でのCaRUの状態遷移について解説する。なお、今回説明をしたCaRUを構成するチャンネルの数学的な記述については第4回で改めて紹介する。

5. CaRUの状態遷移

図7に示したCaRUの8状態遷移モデルの振る舞いをダイナミックに表示させるシミュレーターのプログラムHinchDynamicsが準備されているので、ぜひお手元で実行していただきたい。HinchDynamicsの[ソリューションエクスプローラー]にある[My Project]より[Hinchdynamics.vb]を選択し、デバッグを開始する。シミュレーターの実行画面を図8に示しているが、左のパネルの長方形が存在確率に応じて青から赤までのグラデーションのカラーコードで表示されるようになっており、その時間経過が中央と右に示すパネルのB, Dに数値としてプロットされている。A

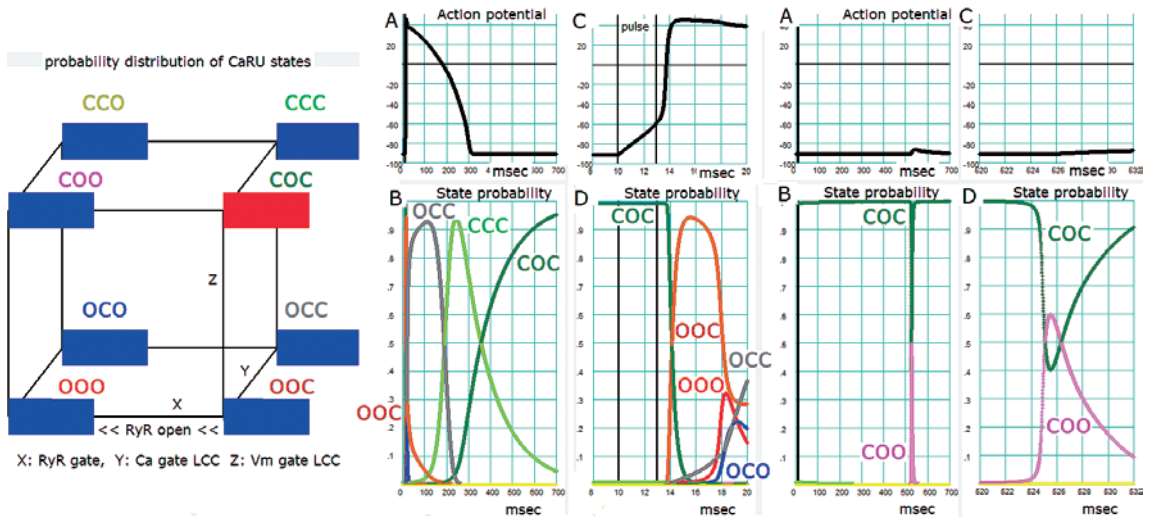


図8. 活動電位発生時（中央 A-D）と *SRup* 内 Ca^{2+} 注入によって誘発された DAD 発生時（右 A-D）の CaRU 状態遷移

は膜電位、BはCaRUの状態遷移を示しており、それぞれC、DはそれぞれA、Bの一部（中央は8~20ms、右は520~532msの12ms間）を拡大して表示したものである。中央のパネルは通常の活動電位が発生しているとき、右のパネルは *SRup* に Ca^{2+} を1.4mM注入してDADを発生させたときの膜電位とCaRUの状態遷移を示している。（右パネルのシミュレーションを行うためのコード変更についても、Appendixに記しておく。）何れの場合も、静止膜電位では左パネルに示すようにほとんどがCOC状態、つまりLCCの Ca^{2+} ゲートだけが開いて、 V_m ゲートとRyRからなるcouplonゲートは閉じた状態にある。中央パネルAに示すように電気刺激（10msの時点）によって活動電位が誘発されると、パネルB、Dに示すように8つの状態の中で目まぐるしい状態遷移が起こる。刺激パルスが入った直後の状態確率を拡大して表示したパネルDをみながら順を追って説明すると、まずLCCが電位依存性に活性化して V_m ゲートが開状態となり、 Ca^{2+} ゲートは既にかいていたので、couplonだけが閉状態にあるOOC状態が大きな一過性の山をつくる。続いて、LCCを介して流入してくる Ca^{2+} によってRyRが次々と活性化

し、couplonゲートを含む3つすべてのゲートが開くOOC状態が続いて小さなピークをつくり、ここで Ca^{2+} の最大放出が起こる。一方で、RyRを介するSRからの大きな Ca^{2+} 放出による $[Ca^{2+}]$ の上昇を受けてLCCは Ca^{2+} 依存性の不活性化が起こり、OCO状態へと状態が遷移する。そうすると、LCCが閉じて細胞外からの Ca^{2+} 流入がなくなるので、couplonゲートも次第に閉じてOCC状態となる。そして、中央パネルのAに示す膜電位の再分極のタイミングに一致して、OCC状態からLCCが膜電位依存性に脱活性化して V_m ゲートが閉じたCCC状態へと移行し、さらに細胞内 $[Ca^{2+}]$ の一過性上昇が終息してまた静止状態へと戻っていくタイミングでLCCの Ca^{2+} ゲートが開いてゆき、最初のCOC状態へと戻っていく。一方、図8右右パネルに示すDAD発生時のような活動電位発生を伴わないCaRUの活性化の場合、Aに示すように膜電位はほとんど静止膜電位付近にあるためLCCの V_m ゲートは常に閉状態であり、しかも細胞内 $[Ca^{2+}]$ も静止状態のままなので Ca^{2+} ゲートは開きっ放しである。すなわち、CaRUは8状態のうちCOCとCOOの2状態の間だけで遷移が起こる（図8右のパネルB、D）。このCaRUの一過

性の小さな活性化を受けて、一時的に細胞内 $[Ca^{2+}]$ が上昇するため、その Ca^{2+} を組み出す INaCa を介して内向き電流が発生し、膜電位は少し遅れをもって一過性の小さな脱分極をみる (図 8 右パネル C)。以上、CaRU の振る舞いを視覚的に再現することで、 Ca^{2+} 過負荷状態にある細胞で発生する DAD のメカニズムを理論的に説明できた。今後 CaRU に関する新たな知見が得られたり、詳細なメカニズムが明らかになったりした場合には、ゲーティングシステムをアップデートしていくことになるであろう。3つのゲートから成る、8状態の CaRU の一見複雑に見える状態遷移も、図 8 左パネルに示すようなスキームでカラーグラデーションを用いて表示させればその動きは一目瞭然である。このシミュレーションの醍醐味を、ぜひとも皆様のお手元で実行しながら体感していただけたら本望である。

おわりに

今回は、HuVEC モデルの CaRU がどのようにモデル化されていて、どのように振る舞うのかを順を追って説明し、SR からの自発的 Ca^{2+} 放出によって引き起こされる DAD のメカニズムの理解を進めてきた。複雑に見える生体现象も、いったん数学的に把握できたら、それをシミュレーションでダイナミックに再現することで直観的な理解を得ることができる。そんな生体シミュレーターを、研究・教育に幅広く活用できる形で提供する

ことで、できるだけ多くの方々に生理学の醍醐味を体感してほしい、それが e-Heart 教材の目指すところである。次回は、本稿で紹介した CaRU モデルがどのようなプロセスで数式化されてきたか、根拠となる実験データ、シミュレーションデータ等を参照しながら解説を行いたい。

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) Matsuda H, Noma A, Kurachi Y, Irisawa H: Transient depolarization and spontaneous voltage fluctuations in isolated single cells from guinea pig ventricles. Calcium-mediated membrane potential fluctuations. *Circ Res* **51**: 142-151, 1982
- 3) Wier WG, Egan TM, Balke CW: Local control of excitation-contraction coupling in rat heart cells. *J Physiol*; **474**: 463-471, 1994
- 4) Stern MD: Theory of excitation-contraction coupling in cardiac muscle. *Biophys J* **63**: 497-517, 1992.
- 5) Greenstein JL, Winslow RL: An integrative model of the cardiac ventricular myocyte incorporating local control of Ca^{2+} release. *Biophys J* **83**: 2918-2945, 2002
- 6) Hinch R: A mathematical analysis of the generation and termination of calcium sparks. *Biophys J* **86**: 1293-1307, 2004
- 7) Hinch R, Greenstein JL, Winslow RL: A simplified local control model of calcium-induced calcium release in cardiac ventricular myocytes. *Biophys J* **87**: 3723-3736, 2004

Appendix

[Form_General.vb] の変更

第2回に使用した [Form_General.vb] を、今回の高頻度刺激のシミュレーションに合うように改編する方法を紹介する。今回使用している HuVEECIII は、エネルギー状態が変わるような条件での代謝物質濃度についてまだ調整ができていないので、高頻度刺激を行う際には代謝物質濃度をすべて固定してからシミュレーションを行う。細胞内の代謝物質の濃度を計算しているのは、次に示す `cytSubstrateConcentrations` と名付けられたサブメソッド部分である。

```
Public Sub cytSubstrateConcentrations()
    ***** fixed *****
    Pifree_cyt = 0.50872066859173026
    AMP_cyt = 0.00033459021041526427
    AMP_cyt = 0.00033459021041526427
    ADPfr_cyt = 0.0022536111580301241
    MgADP_cyt = 0.025978226605534577
    ATPfr_cyt = 0.039789862258604494
    MgATP_cyt = 6.631643709767415
    Cr_cyt = 12.6772372798697

    ***** Pi, AMP, ADP free, MgADP, ATP free, MgATP, Cr, *****
    'pH_cyt = -Log10(H_cyt / 1000)
    'HBuf_cyt = 25 / 2.3 / H_cyt

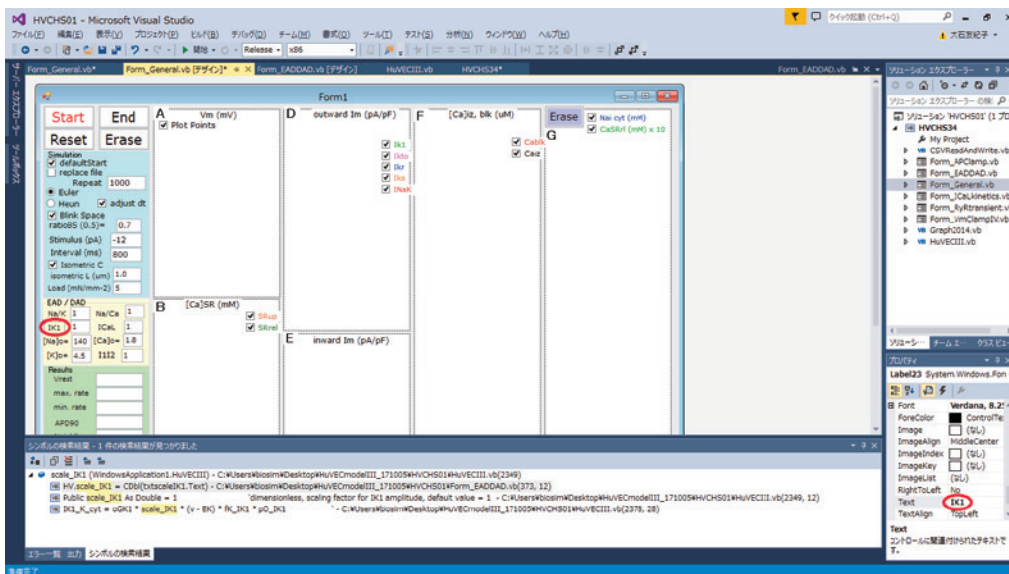
    'Pifree_cyt = Pi_cyt / (1 + Math.Pow(10, (pH_cyt - pKa_Pi)))
    'AMP_cyt = AXPSUM_cyt - (ATPl_cyt + ADPtl_cyt)
    'ADPfr_cyt = ADPtl_cyt / (1 + Mg_cyt / KdADP_cyt)
    'MgADP_cyt = ADPtl_cyt - ADPfr_cyt
    'ATPfr_cyt = ATPl_cyt / (1 + Mg_cyt / KdATP_cyt)
    'MgATP_cyt = ATPl_cyt - ATPfr_cyt
    'Cr_cyt = CrSUM_cyt - PCr_cyt

    'mM, AMP concentration total
    'mM, Instantaneous equilibrium for Mg + ADP binding
    'mM, Instantaneous equilibrium for Mg + ATP binding
    'mM, creatine concentration

End Sub
```

通常は `cytSubstrateConcentrations` のサブメソッドの中の下半分の式で代謝物質の計算が行われている。これらの数式をコメントアウトする（行の先頭にシングルクォーテーション “'” を挿入する）ことで、プログラムが実行される際には読み飛ばすように指定することになる。代謝物質濃度を固定するためには、濃度を計算する部分をコメントアウトするだけでなく、固定する値を与えてやる必要がある。上半分のコメントアウトを解除する（行の先頭のシングルクォーテーション “'” を削除する）。そうすると、上のコードのようにコードの色が緑色から黒に変わって実際にプログラムで読まれるコードとなり、一定の代謝物質の濃度が与えられるようになる。

次に、DAD のシミュレーションで IK1 の大きさをスケールするプロトコルを行う。そこで、IKr のスケールを決めるテキストボックスを、IK1 のスケールを決めるテキストボックスへと変更する方法について説明する。まず、[Form_General.vb [デザイン]] 画面で、左の丸で囲ったテキストボックスのラベルを選択し、右下のプロパティボックスの Text の部分を IKr から IK1 へと変更する。そして、その右横の 1 という値が入っているテキストボックスを選択すると、その名前 Name が `txtscaleIKr` となっているので、`txtscaleIK1` へと変更する。



次に、プログラムコードの方で、ReadForm () というサブメソッドの中に

```
HV.scale $IK_1$  = CDB(txtscale $IK_1$ .Text)
```

と書かれた箇所があるので、そこを

```
HV.scale $IK_1$  = CDB(txtscale $IK_1$ .Text)
```

と書き換える。これは、テキストボックスに書かれたテキストとしての数値を、ダブル型の変数として scale_IK1 に代入するという意味のコードである。scale_IK1 というパラメータは既に [EADDAD.vb] で使われるための HuVECHIII クラスに準備されていたので、それを用いる。

モデルを変更した後にシミュレーション実験を行う際には、[replace file] にチェックを入れてスタートし、安定したところでシミュレーションを終了して初期値を設定し直しておく。そうすると、次からは [defaultStart] のチェックを外した状態からスタートすることで、control 状態からシミュレーションを開始することができる。

[Form_EADDAD.vb] の変更

[Form_EADDAD.vb [デザイン]] 画面でパネル C の上にカーソルを持って行き、左クリックで選択すると、右下の [プロパティ] ボックスの最上段にそのパネルの名前 pbConcentrationa が表示される。この pbConcentrationa と名づけられたピクチャーボックス (pb) には、グラフを定義するサブメソッドである DefineGraph () の下記のコードの中に示されているように graphSRCa という名前で定義されるグラフが描画され、軸のスケールは MinX1, MaxX1, MinY3, MaxY3 で指定されている (上記コードのハイライト)。

```
PrivateSubDefineGraph()
    graphVm1 = NewGraph2014(pbVm, MinX1, MaxX1, MinY1, MaxY1)
    graphINaLgate = NewGraph2014(PB7, MinX1, MaxX1, MinY7, MaxY7)
    graphIm2 = NewGraph2014(pbCurrent, MinX1, MaxX1, MinY2, MaxY2)
    graphSRCa = NewGraph2014(pbConcentrationa, MinX1, MaxX1, MinY3, MaxY3)
EndSub
```

まず、Y 軸のスケールを変更するためには、プログラムコードの上方にまとめて定義されている軸のスケール

ルパラメータのうちの MinY3, MaxY3 を変更することになる。今回は Y 軸の最大値を 1 から 2 に変更したため、下記コードの青のハイライトの宣言文の最後の数値を 1 から 2 に書き換える。

```
Dim MinY3 AsDouble = 0
Dim MaxY3 AsDouble = 2
Dim IntervalY3 AsDouble = 0.2
```

次に、graphSRCa に何をプロットさせるかを指定する PlotResults () のサブメソッドの内容を見てみる。

```
PrivateSubPlotResults()
    graphVm1.PlotPoint(sweepTime, HV.Vm, BlackPen)
    graphINaLgate.PlotPoint(sweepTime, 1 - (HV.I2_LSM + HV.Is_LSM), RedPen)
    graphSRCa.PlotPoint(sweepTime, HV.Cafree_SRrl, BlackPen2)
    graphSRCa.PlotPoint(sweepTime, HV.Ca_SRup, BluePen)
    graphIm2.PlotPoint(sweepTime, HV.INaL, BlackPen)
EndSub
```

上記コードから読み取られるように、graphSRCa には HuVEECIII (HV) のなかの SRrl と SRup の $[Ca^{2+}]$ をそれぞれ黒と青のペンで描画するよう命令されている (上記コードの青のハイライト)。今回は SRrl の $[Ca^{2+}]$ のプロットの線の太さを 2 倍にし、SRup の $[Ca^{2+}]$ を同時に青い線でプロットするよう変更を加えてある。太さが 2 倍の黒ペンを BlackPen2 とするという定義は、プログラムコードの最初に書かれている。このように、グラフを描画するのに必要なツール (軸, ペン, プロットの点, 色の指定など) はすべて、ソリューションエクスプローラーの [Graph2014.vb] の中で準備されている。

次に、細胞内 Na^+ 注入を実行できるようにするために、次のハイライトで示すようにコードを追加し、実行画面 [Add Ca/Na] のところの + [Na] i のテキストボックスの数値を読み取るようにする。

```
If IsAddCaNa Then                                'Ca injection for a duration of 2 ms (= 102 - 100 ms)
    If chartTime >= 100 And chartTime < 102 Then
        HV.Ca_SRup = CDb(txtCaplus.Text) 'keep [Ca] in the SR_up
        HV.Nai = CDb(txtNaplus.Text)
    End If
Else
    HV.Ca_SRup = 0.81532115796704774           'default value      copy of the default value set
    HV.Nai = 6.3
End If
```

さらに、INaL がプロットされているグラフ [graphIm2] に、同時に INaCa を赤色でプロットさせるようにコードを追加する。

```
Private Sub PlotResults()

    graphVm1.PlotPoint(sweepTime, HV.Vm, BlackPen)
    graphINaLgate.PlotPoint(sweepTime, 1 - (HV.I2_LSM + HV.Is_LSM), RedPen)
    graphSRCa.PlotPoint(sweepTime, HV.Cafree_SRrl, BlackPen2)
    graphSRCa.PlotPoint(sweepTime, HV.Ca_SRup, BluePen)
    graphIm2.PlotPoint(sweepTime, HV.INaL, BlackPen)
    graphIm2.PlotPoint(sweepTime, HV.INCX, RedPen)

End Sub
```

同様に、INaK をプロットさせることもできるが、そのままグラフ [graphIm2] にプロットしようとすると符号が逆になって設定されているグラフ範囲を超えてしまうので、軸の範囲を変更する、符号を反転させてプロットさせる、もしくは新しいグラフを作成するなど、何らかの工夫が必要である。

[Hinchdynamics.vb] の変更

刺激に応じて活動電位を発生させるプログラムに、瞬時に SR 内 $[Ca^{2+}]$ を高い濃度 (1.4mM) に固定するプロトコルを適用するコードを挿入する。具体的には、挿引時間が 100 ~ 120ms の間だけ SR のうちの取り込みサイト (SRup) の $[Ca^{2+}]$ を 1.4mM に固定するという次のコマンド行を入れる。

```
If sweepTime >= 100 And sweepTime < 102 Then HV.Ca_SRup = 1.4 'keep [Ca] in the SR_up 'Ca injection for a duration of 2 ms (= 102 - 100 ms)
```

プログラム内ではコメントアウトされた形（緑色）でコードが書かれている。コメントアウトを解除する（文の最初にある“'”を消去する）と、コードが有効になり、プログラムが実行される際に実際に読まれるコードとなる。コメントアウトを解除した後も緑色のままの後半部分は、式を簡単に説明している文章である。このように、プログラムコードの中に説明文を入れておくことで、初めてコードを見る人でも内容がある程度推測できる。e-Heart教材を開発するにあたって、プログラムコードの中に説明を加え、できる限りプログラミングの初修者にもわかりやすいコードを書くように心がけているので、注意して見ていただきたい。

次に、Aのパネルに拡大して見たい箇所をうまく表示できるよう、X軸の範囲を設定し直す。先の説明でY軸の範囲を変更するというコード変更を行ったので、同様の変更を次のように行う。

```
Dim MinX1 As Double = 482 '8 'msec, Abscissa of the graph  
Dim MaxX1 As Double = 494 '20  
Dim IntervalX1 As Double = 2
```

変更前の値がわからなくなならないように、コメントアウトして変更前の値を残しておく、という方法も、プログラムの修正を加える場合には有効である。プログラムをフォルダごとバックアップしておくという方法も、いつでも修正前のプログラムに戻ることができるという点で非常に重要である。その場合はプログラムフォルダを丸ごとコピー、ペーストしてフォルダの名前を変更する。フォルダの中身をバラバラに保存してしまわないよう、ご注意ください。最後にプログラムを実行する際、[Start]ボタンでデバッグ開始する前に実行画面上のテキストボックスでStimulus (pA/pF)の値を0に設定することで、電気刺激をしないシミュレーションとなる。