

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5回 ヒト心室筋細胞 (HuVEC) モデルの刺激頻度依存性

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

心臓が時々刻々と変化する心拍リズムにあわせて適切なポンプ機能を発揮できるよう、心室筋細胞の細胞内イオンメカニズムには刺激頻度依存性が備わっている。通常生体内では、自律神経活動によって心拍リズムも収縮力も同時に制御されている。しかし、実験的に心室筋から単離した単一細胞レベルでも、電気刺激の頻度に応じて細胞内イオン濃度や活動電位波形、発生張力が変化することが知られている。その制御の細胞内メカニズムについては、これまで長い間議論が続けられてきた。メカニズムの検証には、数理モデルを用いたシミュレーションが非常に有効である。10数年前まではウサギ、イヌ、モルモットなどの実験動物の細胞を対象として構築された数理モデルがほとんどであったが、近年になって少しずつヒトを対象とした実験データが入手可能となり、ヒト心室筋細胞モデルとして新規にGPBモデル(2010年)[1], ORdモデル(2011年)[2], そしてHuVECモデル(2015年)[3]が発表された。数理モデルでメカニズムを議論する強みは、その明示性と定量性にある。モデルで使用されるすべてのパラメータは明確に定義されており、どの関係式が実験データに基づいていて、どの式が現象論的にフィッティングされた経験式であるかも、コーディングされた数式から明らかである。今回のe-Heart教材の解説シリーズ最終回では、現在ヒト心室筋細胞において数理モデルレベルで合意が

得られている刺激頻度依存性の細胞内イオンメカニズムについて、これまでのシリーズ第1~4回と同様にHuVECモデルの振る舞いを観察しながら説明していきたい。さらに今回は、シミュレーション結果を数値で確認できるよう、シミュレーションを実行して得られたデータをcsvファイルとして出力する方法についてAppendixで解説する。e-Heart教材にはファイルの入出力に便利なツールが準備されているので、ぜひご活用いただきたい。

*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/downloads/>)。

1. 活動電位持続時間 (action potential duration, APD)

細胞レベルで刺激頻度が変化した際にもたらされる最も重要な変化は、活動電位持続時間 (APD) である。刺激のリズムが速くなると、細胞はAPDを短縮させることによって素早く再分極し、次の刺激に備えて静止膜電位へ戻る。図1に刺激頻度を変化させた場合の活動電位波形を比較してある。HuVECモデルのシミュレーターでは、Form_General.vbのパネルAで活動電位波形を確認できる。図1Aでは刺激間隔 (Interval (ms)) テキストボックスの値をデフォルトの800 ms (1.25 Hz) のままに、Bでは500 ms (2 Hz) に設定して、ほ

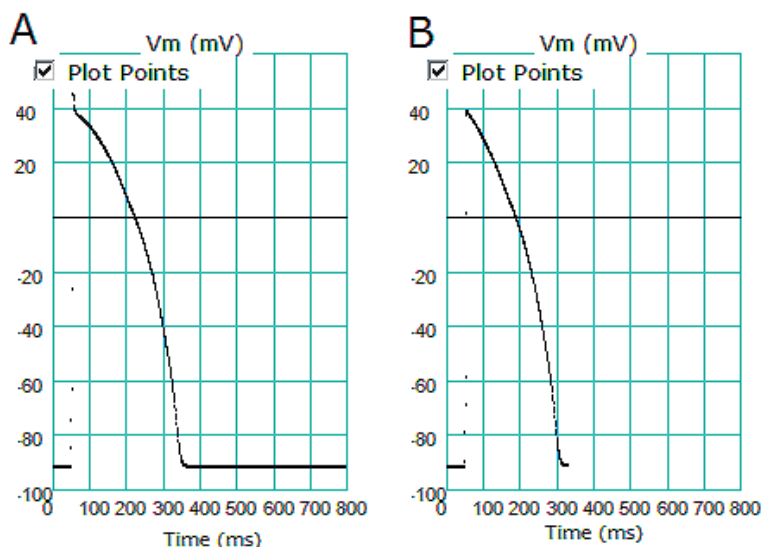


図1. 活動電位波形の刺激頻度依存性 A：刺激頻度 1.25 Hz, B：刺激頻度 3 Hz

ほぼ定常状態に達したところで記録した。刺激間隔が短くなる、つまり刺激頻度が高くなると、APD が短くなっているのがわかる。90%再分極時の APD (シミュレーション上では便宜上、膜電位 -78 mV を横切るタイミングで計測してある) は、1.25 Hz で 331 ms, 2 Hz で 267 ms であった。

2. 刺激頻度に応じて変化するパラメータ

刺激頻度が変わると、細胞内 Na^+ 濃度 ($[\text{Na}^+]_i$) と細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) が変化することが知られている。それらの値を、筋小胞体 (SR) 内 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{SRi}}$, $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{SRup}}$), 収縮力と共に、刺激頻度 (Hz) を横軸にとって関係性をプロットするクラス Form_Frequency.vb を準備した (図2)。このシミュレーションでは、横軸が時間でないという点で、これまでのシミュレーションとは異なっている。実際には、通常の実験と同様に、様々な実験条件を与えて時間軸に沿ってシミュレーションを実行し、シミュレーションを実行する度に定常状態に達した後、見たいパラメータの数値をプロットする、という一連の流れがプログラムによって自動的に行われている。

3. 細胞内および SR 内 Ca^{2+} 濃度

刺激頻度が上がると、正常な心筋では収縮力が増強する [4]。心拍数が上昇するような状況で、収縮力を強めることで、一回拍出量を増加させるしくみは、生理学的に理に適っている。一方で不全心では、 Ca^{2+} ハンドリングタンパクと呼ばれる $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の恒常性を保つためのチャンネルやトランスポーター、その制御タンパクの発現が正常に行われず、刺激頻度が上昇すると、逆に収縮力が低下してしまうことも知られている [4]。HuVEC モデルでは刺激頻度が上昇すると、刺激の度に活性化される L 型 Ca^{2+} チャンネルを介して流入する Ca^{2+} 電流 (I_{CaL}) によって、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が上昇する (図2E)。また、細胞内に取り込まれた $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は SR に蓄積し、収縮力の増強をもたらす (図2D, E)。一方、 I_{CaL} を介した Ca^{2+} フラックスは局所 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を一過性に非常に高濃度にするため、近傍にある $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換電流 (I_{NCX}) を駆動し、 I_{NCX} は Ca^{2+} を汲み出す代わりに Na^+ を細胞内に汲み入れることになる (図2B)。

4. 細胞内 Na^+ 濃度

なぜ APD が短縮するのか、という点について

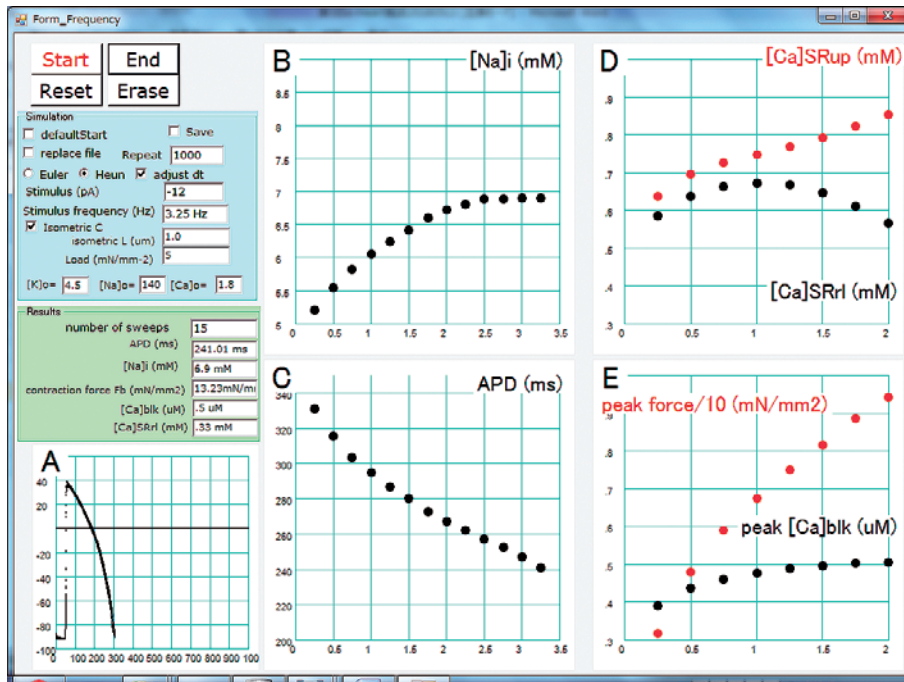


図2. 刺激頻度依存性 A: 活動電位, B: $[Na^+]_i$, C: APD, D: $[Ca^{2+}]_{SRup}$ と $[Ca^{2+}]_{SRrl}$, E: $[Ca^{2+}]_i$ と収縮力 (シミュレーションではピーク $[Ca^{2+}]_{blk}$ とピーク Fb)

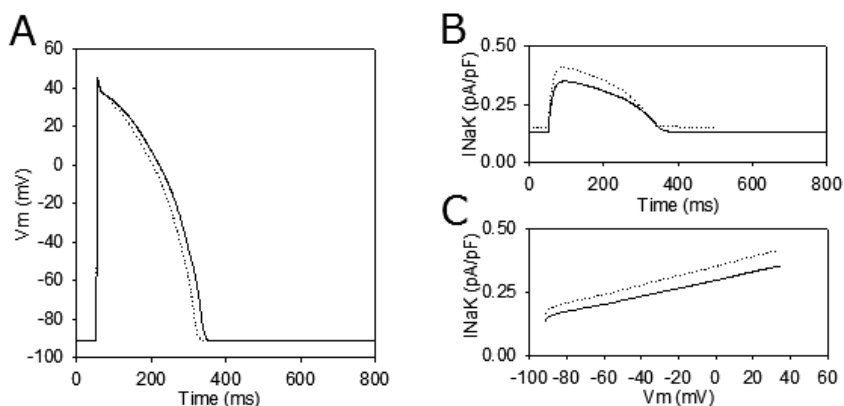


図3. 刺激頻度の活動電位波形 (A), I_{NaK} (B), 再分極過程の I_{NaK} の膜電位依存性 (C) への影響 実線が 1.25 Hz ($[Na^+]_i = 6.3$ mM), 点線が 2 Hz ($[Na^+]_i = 6.8$ mM) の刺激頻度を表す。

GPB モデル [1] ではその原因を, $[Na^+]_i$ の蓄積と二次的な Na/K ポンプ電流 (I_{NaK}) 活性化にあると結論づけている. 続いて発表された ORd モデル [2], HuVEC モデル [3] でも同様のメカニズム

で APD の短縮が再現されている. 実験的にも刺激頻度に依存して $[Na^+]_i$ が蓄積することは知られており [4], シミュレーションでは I_{NaK} が感受する $[Na^+]_i$ を一定の値に固定すると APD が変化

しなくなることが確認されている [1, 2]. 図3に示すのは, HuVEC モデルの活動電位波形 (A) と I_{NaK} (B), それに横軸に V_m , 縦軸に I_{NaK} をとりプロットした図 (C) である. 刺激頻度が 1.25 Hz から 2 Hz に上昇すると, APD が短縮すると同時に I_{NaK} が大きくなっている. I_{NaK} の膜電位依存性を見ても, 関係性を保ったまま依存性が活性化方向にシフトしており, この背景に $[Na^+]_i$ の上昇が関与していることがわかる.

5. I_{NaK} の膜電位依存性

活動電位のプラトー相で大きく流れる特徴をもつ I_{NaK} は, APD の主要な決定要因の一つである. この特徴的な波形は, Na/K ポンプ活性が膜電位依存性をもつことに起因する. HuVEC モデルのイオンチャネルでは, 定電場仮説に基づく式 (constant field equation) を用いて電流計算を行っているが, Na/K ポンプなどイオン輸送体では, 輸送されるイオンは輸送担体分子のイオン結合部位に取り込まれ (occlusion) 続いて膜の反対側に開放されると考えられている. このイオン結合部位が膜電場の影響を受ける深さ, つまり, イオン結合部位が膜電場の中 (“well (井戸)”) にある場合, 膜電位によって結合のしやすさが変化する [5]. Na/K ポンプモデルの結合のしやすさは, イオンと結合部位の反応を決定するいわば解離定数 (K_d) の膜電位依存性として表現されている. Oka et al.(2010) [7] は Smith & Crampin (2004) [6] のモデルを広く心筋で得られた実験データを満足できるまで, K_d の最適化を行って, 細胞内外の Na^+ , K^+ に対する K_d 値をそれぞれ次のように決定した.

$$K_{d,NaO} = K_{d,NaO}^0 \cdot \exp \frac{\delta_{NaO} F V_m}{RT}$$

$$K_{d,NaI} = K_{d,NaI}^0 \cdot \exp \frac{\delta_{NaI} F V_m}{RT}$$

$$K_{d,KO} = K_{d,KO}^0 \cdot \exp \frac{\delta_{KO} F V_m}{RT}$$

$$K_{d,KI} = K_{d,KI}^0 \cdot \exp \frac{\delta_{KI} F V_m}{RT}$$

これらの式で, δ が “well” の中におけるイオン

結合部位の深さを表す係数で, これらが膜を介する電位差 V_m にかかる. NaO , NaI , KO , KI についての δ は, それぞれ 0.44, -0.14, 0.23, -0.14 とされている [7, 8]. 符号は外側から内側へ向かう方向を正としている. これらの値を比較すると, NaO の膜電位依存性が最も強く, Na^+ が担体から外液に向かって放出されるステップに最も大きな膜電位依存性があることがわかる. 以上が K_d に膜電位依存性があるとした場合の考え方であるが, 先の “well” の考え方を拡張するとこれをイオン結合部位 (site) で感受する $[Na^+]$ が膜電位に依存して変化すると理解することができる. つまり “well” 内の外液から結合部位までの間には膜電位に依存して $[Na^+]$ に濃度勾配があると考えることができ, 結合部位で感受される $[Na^+]_{site}$ は Nernst 式より次のように表される.

$$[Na^+]_{site} = [Na^+]_o \cdot \exp \left(-\frac{\delta_{NaO} F V_m}{RT} \right)$$

この式より, $[Na^+]_{site}$ は静止膜電位付近の負電位では外液濃度 $[Na^+]_o$ よりもずっと高い濃度であり, 活動電位発生中に膜電位が正に傾くと濃度が低くなることで Na^+ が結合部位から解離しやすくなり, 効率よく Na^+ を細胞内から細胞外へと輸送することが可能となることがわかる. またこの式から, $[Na^+]_o$ に依存して Na/K ポンプの膜電位依存性が変化することも容易に理解できる.

以上の結果は生理学的に測定された I_{NaK} の記録に基づき, 熱力学法則とも整合するようモデル化されたものであるが, 分子生物学的な技術の発展により, 機能から予測されていた Na/K ポンプの “well” の実体も解明されつつある [9]. 今回解説した HuVEC モデルの Na/K ポンプについては入手可能な生理学的データと矛盾しないよう決定された値が採用されているが, 今後も次々と報告される新しい知見ともできるだけ整合するよう, HuVEC モデルの精緻化を着実に進めていきたい.

おわりに

“e-Heart” プロジェクトは, 立命館大学総合理工学研究機構バイオシミュレーション研究センターの設立と共に発足し, 来年春で10年の節目を

迎える。今年度末には、一昨年度に出版された“e-Heart”（基礎編）に引き続き、『心機能フィジオーム理解のための“e-Heart”（応用編）』の刊行が決定した。応用編では、心臓の細胞レベルの概念的な理解をもとに、循環を含めた心臓の機能としての働きを、詳細な細胞モデルを元に理解していくことを目指したい。

この度、第1回から第5回まで、ヒト心室筋細胞（HuVEC）モデルを用いたe-Heart教材の解説ということで、基本的な活動電位の振る舞いの観察から、専門的で詳細なCICRモデルの解説まで、実際にお手元でシミュレーターを動かしていただくことを想定しながら説明文を準備してきた。これをきっかけに、学部生、大学院生、若手研究者への生理学教育教材、あるいは先生方の研究資料として、広く皆様にご活用いただけるようになれば、本シリーズの目的が達成されたことになる。第3回、第4回の編集後記でもご指摘いただいたように、画面の見栄えや操作性などのユーザーインターフェイスには、まだまだ改良の余地がある。理想は先生方の各々の教育・研究の現場で使い勝手の良いよう、シミュレーターをカスタマイズすることであるが、なかなか現実には困難である。少なくとも、多くの人に受け入れられ易いシミュレーター画面の提示の仕方について、今後も検討を続けていきたい。なお、e-Heart教材はまだまだ発展段階にあり、皆様のご意見、感想、ご指摘等、お寄せいただけたら幸甚である（ml-e-heart-rits@ml.ritsumei.ac.jp）。

謝辞

日本生理学雑誌のLECTURESのシリーズとして掲載する機会を与えてくださった編集委員の先生方に、“e-Heart”プロジェクトメンバー一同、心より感謝を申し上げたい。また、Graph2014.vb、

CSVReadAndWrite.vbなどのシミュレーション用ツールの開発に携わり、また“e-Heart”プロジェクト全般に関わるプログラミングのテクニカルサポートや、ホームページの運営を担当してくださっている吉元英一氏（株式会社知能情報システム）にこの場を借りて、感謝の意を表したい。

文 献

- 1) Grandi E, Pasqualini FS, Bers DM: A novel computational model of the human ventricular action potential and Ca transient. *J Mol Cell Cardiol* **48**: 112–121, 2010
- 2) O'Hara T, Virág L, Varró A, Rudy Y: Simulation of the undiseased human cardiac ventricular action potential: model formulation and experimental validation. *PLoS Comput Biol* **7**: e1002061, 2011
- 3) 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
- 4) Pieske B, Maier LS, Piacentino V 3rd, Weissner J, Hasenfuss G, Houser S: Rate dependence of $[Na^+]_i$ and contractility in nonfailing and failing human myocardium. *Circulation* **106**: 447–453, 2002
- 5) Rakowski RF, Gadsby DC, De Weer P: Voltage dependence of the Na/K pump. *J Membr Biol* **155**: 105–112, 1997
- 6) Smith and Crampin: Development of models of active ion transport for whole-cell modelling: cardiac sodium-potassium pump as a case study. *PBMB* **85**: 387–405, 2004
- 7) Oka C, Cha CY, Noma A: Characterization of the cardiac Na^+/K^+ pump by development of a comprehensive and mechanistic model. *J Theor Biol* **265**: 68–77, 2010
- 8) Nakao M, Gadsby DC: Voltage dependence of Na translocation by the Na/K pump. *Nature* **323**: 628–630, 1986
- 9) Takeuchi A, Reyes N, Artigas P, Gadsby DC: The ion pathway through the opened $Na(+) , K(+)$ -ATPase pump. *Nature* **456**: 413–416, 2008.

Appendix

データの保存方法

シミュレーション結果を数値で確認したい場合、実験で計測データを出力するのと同じように csv ファイル出力ができると便利である。今回のプログラムでは、実行画面 [Form_General.vb] と [Form_Frequency.vb] の中に [Save] チェックボックスを作成してある。このチェックボックスにチェックを入れると、データを保存できるようになっている。データを取得する時には [Save] チェックボックスにチェックを入れ、[Repeat] テキストボックスに記録したい掃引回数(フレームの左から右への時間経過を 1 sweep として、何 sweep 分記録したいか) を記入したうえで [Start] ボタンを押す。データを常に保存するとプログラムの実行速度が遅くなるので、データを保存する必要がない時にはチェックボックスのチェックを外しておく。

CSV ファイルにデータを入出力するプログラム

e-Heart では、csv ファイルに数値を書き込んだり読み込んだりするための便利なクラス、CSVReadAndWrite.vb が準備されている。結果を出力するためには、CSV ファイルを新しく作成 (CreateNew) して、書き込み (Write) する、この二つのコマンドをプログラムコードの中に組み込んでやればよい。

下のコードは、[Form_General.vb] の [Start] ボタンを押した際に実行されるプログラムの一部である。“Do While…” からシミュレーションのオイラー法による時間発展計算が始まるが、その直前にもし (If) chkSave と名付けられたチェックボックスにチェックが入っていたら、そのときは (Then) 新しく CSV ファイルを作成 (CreateNew) しなさい、というコマンドがあり、ハイライトされている。新しく作成した CSV ファイルには、プログラムの中で CSCFileName2 に代入されたファイル名 (ResultsTC.csv) がつけられ、HuVEC モデルが定義されている HV クラスの中の保存したいパラメータ名 (* 保存するパラメータの指定の仕方は後ほど説明する) の見出しが最初の行に入力された状態で準備される。

```
graphTimeCourse6.DrawAxis(IntervalX6, IntervalY6, "", 8)
If chkSave.Checked Then CSVReadAndWrite.CreateNewCSV(CsvFileName2, HV, names2)
    numSweep = 0
    Do While numSweep < RepeatN
        Clear()
        DrawAxes()
        ResetMeasurements()
        sweepTime = 0
        Do While sweepTime < HV.SInterval
            My.Application.DoEvents()
```

新しく CSV ファイルが準備できたら、次はファイルの書き込みを行う。下のコードでハイライトされている部分では、もし (If) [Save] チェックボックスにチェックが入っていたら、CSVFileName2 で指定した名前 (ResultsTC.csv) をもつファイルに、HV クラスの中の names2 で指定したパラメータ (*) の値の書き込み (Write) を行いなさい、と命令されている。このコマンドが書かれている場所は、結果をグラフにプロットする部分である。時間発展計算の刻み幅 (dt = ~0.01 ms) ごとにデータを記録すると、時間がかかりすぎるうえにデータ量が膨大になってしまうため、グラフプロットの間隔 (maxTtoPlot = 1 ms) に合わせて数値を記録するようにしてある。

```

'*****plot results*****
If TtoPlot >= maxTtoPlot Then                                'time to plot
    PlotResultsA()
    If chkSave.Checked Then CsvReadAndWrite.WriteCSV(CsvFileName2, sweepTime, HV, 1, names2)
    TtoPlot = 0                                              'reset the timer
Else
    TtoPlot = TtoPlot + dt                                  'msec, interval of point plot
End If

sweepTime = sweepTime + dt                                  'msec, proceed with the experimental time within one
sweep
elapsedTime = elapsedTime + dt                              'msec, proceed with the experimental time
Loop                                                         '***** END of one Sweep *****

```

先に*で触れた、保存するパラメータの指定方法については、下記のコードを参照する。

```

'***** save data during simulation*****
Dim CsvFileName As String = "CsvHuVEC.csv"
Dim names1() As String = New String() {"Vm", "TnChCa", "CaMCA", "bufferSRCa", "Lb_jnc", "Lb_iz",
"Hb_jnc", "Hb_iz", "Nai", "Ki", "Catot_jnc", "Catot_iz", "Catot_blk", "Ca_SRup", "Catot_SRrl", "O_TM",
"I2_TM", "Is_TM", "O_LSM", "I1_LSM", "I2_LSM", "Is_LSM", "Yco_iz", "Yoc_iz", "Yoo_iz", "Yco_blk",
"Yoc_blk", "Yoo_blk", "Yooo", "Yooc", "Ycoo", "Ycoc", "Ycco", "Yoco", "Yocc", "y1_IKr", "y2_IKr", "y3_IKr",
"Ov_IKs", "C2IKs_iz", "OcIKs_iz", "C2IKs_blk", "OcIKs_blk", "a_IKto", "y1_IKto", "y2_IKto", "Pbspm",
"E1NCX_iz", "I1NCX_iz", "I2NCX_iz", "E1NCX_blk", "I1NCX_blk", "I2NCX_blk", "P1_6_NaK", "P7_NaK",
"P8_13_NaK", "halfSL", "Fb", "Fp", "TSCa3", "TSCa3W", "TSCa3S", "TSS", "TSW", "hw", "hp", "ATPt_cyt",
"ADPt_cyt", "Pi_cyt", "PCr_cyt", "ATPt_mit", "Pi_mit", "NADH_mit", "H_mit", "K_mit", "UQr_mit",
"ctCrd_mit", "dpsi", "dT"}
Dim CsvFileName2 As String = "ResultsTC.csv"
Dim names2() As String = New String() {"Vm", "Nai", "Catot_blk", "Catot_SRrl", "INaK"}

```

赤字で書かれている部分に、保存したいパラメータがすべてリストアップされている。このプログラムでは、[ResultsTC.csv] で5種類のパラメータ、“Vm”、“Nai”、“Catot_blk”、“Catot_SRrl”、“INaK”の時間経過を保存するよう指定されている。起動時にダブルクリックするソリューションファイル [HVCHS01.sln] のすぐ上に、[HVCHS01] という名前のフォルダがあり、ダブルクリックして開くと一番上に [bin] というフォルダがある。その中の [Release] フォルダを開くと、[ResultsTC.csv] が見つかる。その csv ファイルを開けば、一行目にパラメータ名、一列目に時間、二列目以降に指定した5種類のパラメータがファイルに保存されているのが確認できる。同じ [Release] フォルダの中に、[CsvHuVEC.csv] という名前のファイルが保存されているが、ここには実行をスタートする時に読み込む初期値が保存されている。条件を変更して実験を行う場合など、[replace file] チェックボックスにチェックを入れておいて、定常状態に達したところでいったん [Reset] ボタンを押してプログラムを止める。そうすると、プログラムの中の names1 で指定されたパラメータ（上のコードを参照）の値がすべて、実行の最後に [CsvHuVEC.csv] に保存される。[defaultStart] チェックボックスにチェックが入っていない場合には、その初期値からシミュレーションをスタートするので、いつも同じ状態からシミュレーション実験を始めることができ便利である。保存するパラメータは HuVECIII.vb のクラスで定義されたものでなければならないという点にだけ、注意が必要である。コードで指定した names1, names2 の中括弧 {} で囲まれたパラメータを変更することで、保存するパラメータを変更することができる。names1 にはオイラー法を開始するのに必要なオイラー法で数値積分する変数の初期値がすべて保存されている。必要なパラメータを消してしまうとシミュレーションの初期値がうまく入らずにエラーが起こってしまう場合があるので、誤って消してしまうないように気を付ける。