

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590266

研究課題名(和文) ヒト心筋細胞の世界標準モデル構築：分岐解析並びに比較生理学的手法によるアプローチ

研究課題名(英文) Development of novel mathematical models for human cardiac myocytes based on bifurcation analysis and comparative study

研究代表者

倉田 康孝 (KURATA, Yasutaka)

金沢医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00267725

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、実験データ再現性と数学的解析に適した新たなヒト心筋細胞モデルを構築することであった。ヒト及び動物の心筋細胞モデルを収集して各イオン輸送系のモデル構造・イオン電流動態を比較するためのデータベースを作成し、比較データベースを基に、新たなヒト心室・心房筋細胞モデルを構築した。さらに心臓部位別イオンチャネル遺伝子発現量データを基に、内向き整流カリウムチャネル電流の抑制と過分極活性化陽イオンチャネル電流の導入における固有心筋モデル細胞の分岐構造を解析し、自動能をもつプルキンエ線維・洞結節細胞モデルを構築した。これらの新しいモデルは、ヒト心臓モデル開発のためのモジュールとして有用である。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to develop novel mathematical models for human cardiac myocytes which can well reproduce experimental data and are suitable for mathematical analyses. We first constructed the database of previous mathematical models of human and animal cardiac myocytes for model development. Based on the database, we have developed novel purkinje and sinoatrial node cell models which are improved versions of previous models. To develop purkinje and sinoatrial node cell models, we further compared the experimental data on expression of ion channels in individual cell types. Novel Purkinje and sinoatrial node cell models have been developed by parameter adjustment according to the expression data and by analyzing bifurcation structures during inhibition of the inward-rectifier potassium channel current and incorporation of the hyperpolarization-activated cation channel current. These novel model cells are useful as modules for development of human heart models.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：システム生理 フィジオーム ヒト心筋モデル 分岐解析

1. 研究開始当初の背景

近年、心筋細胞・心臓システムのモデル化・シミュレーションに関する関心が高まり、より完全な心筋細胞モデルの構築や仮想心臓シミュレーション・プロジェクトなどが進められている。これらの研究の最終的なゴールは、ヒト心筋細胞モデルをモジュールとするヒト心臓モデルを構築し、不整脈発生機序やその治療法の解明（創薬や治療効果の解析）に用いることである。しかしながら従来のヒト心筋細胞モデルはいずれも完成度が低く、ヒト洞結節細胞などの特殊心筋細胞のモデルは未だ試験的なものしか作成されていない。このような現状は、正常ヒト単離心筋（特に特殊心筋）細胞の電気生理学の実験データが極めて少ないこと、チャンネル蛋白発現系でのイオンチャンネル動態は心筋細胞における動態と異なることに起因しており、実験データに頼る従来の方法論では、完成度の高いモデルを構築することは不可能である。より完成度の高いヒト心筋細胞の標準モデルを構築するには、発生生物学・再生医療分野で広く用いられるようになったヒト ES・iPS 細胞由来心筋細胞の電気生理学的特性に関する実験データの収集・解析・利用、動物心筋モデルを用いた比較生理学的手法（種差・心臓内部位差の分析）、ヒト心筋細胞モデルの非線形力学的特性（分岐構造）を解析・制御するための数学的手法（分岐解析）の3つを駆使する必要がある。

心筋細胞における自動能の発現・停止は、非線形システムに生じる分岐現象（パラメータに依存した安定性とダイナミクスの質的变化）の一つと考えられる。このような観点から我々は、洞結節の生理的自動能や固有心筋における異常自動能の発生機序を非線形力学的解析手法により研究してきた。例えば、新たに作成したウサギ洞結節細胞モデルを用い、モデル細胞の分岐構造（自動能発現・停止過程における安定性とダイナミクス）を解析することにより、生理的自動能の発生機序を解明した（Kurata et al, *Am J Physiol* 285: H2804-H2819, 2003）。また、ヒト心室筋細胞モデルを作成し、異常自動能の発生機序並びにバイオペースメーカーシステム設計に関する分岐構造解析も行った（Kurata et al, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292: H701-H718, 2007）。本解析手法は、モデルシステムにおける自動能発現・停止の自由な制御を可能にするものであり、固有心筋細胞モデルを基にした特殊心筋細胞モデルの構築において極めて有用であると考えられる（Kurata et al, *Biophys J* 95: 951-977, 2008; *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 298: H1748-H1760, 2010）。このような現状の把握・分析と新しい方法論

の実現可能性の考察から、本研究課題“ヒト心筋細胞の世界標準モデル構築：分岐解析並びに比較生理学的手法によるアプローチ”を着想するに至った。本研究は、ヒト心臓モデル構築へ向けての重要なステップとして位置づけられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ヒト固有心筋（心室・心房筋）及び特殊心筋（プルキンエ線維・洞結節）細胞の電気生理学的特性を記述する新たな標準モデルシステムを構築し、それらをモジュールとするヒト心臓モデル構築のための基盤を確立することである。従来のヒト心筋細胞モデルはいずれも完成度が低く、世界標準モデルといえるものは存在しない。不整脈の発生機序や治療法の体系的解明には、新たなヒト心筋細胞の標準モデルに基づいたヒト心臓モデルの構築が必要不可欠である。

本研究では、以前に作成されたヒト心室・心房筋細胞モデルをベースモデルとし、ヒト ES・iPS 細胞由来心筋細胞から得られた最新の電気生理学の実験データと比較生理学的数据の分析を行い、より完成度の高いヒト固有心筋（心室筋・心房筋）細胞の新たな標準モデルを作成する。さらに、これらの新しいヒト固有心筋細胞モデルに非線形力学的解析（分岐解析）手法を適用し、モデルパラメータの変化並びにペースメーカー電流の導入におけるモデル細胞の非線形力学的特性（分岐構造（パラメータに依存した安定性とダイナミクスの変化）と自動能発現条件を解析することにより、ヒト特殊心筋（プルキンエ線維・洞結節）細胞の標準モデルを構築する。

3. 研究の方法

まず、ヒト固有心筋細胞及び ES・iPS 細胞由来心室筋型・心房筋型細胞からの電気生理学の実験データを収集して従来のヒト心筋データとの相違点・整合性を比較分析する。また、これまでに作成されたヒト及び動物心筋細胞のモデルとその根拠となる実験データを収集し、心筋細胞の電気生理学的特性における種差を明らかにするとともに、各イオンチャンネル・トランスポーター及び細胞内 Ca^{2+} 動態のモデル化と数学的定式化の方法を比較解析して、標準モデル作成のための各イオン輸送系の最適モデル構造（状態モデルと数学的定式化の方法）を決定する。これらの比較分析データに基づき、既成のヒト心室・心房筋細胞モデルをベースモデルとして、各イオン輸送系及び細胞内 Ca^{2+} 動態の再定式化とパラメータ値の調整を行い、ヒト心室筋・心房筋細胞の標準モデルを構築する。

さらに、電気生理学的特性の部位差（心室 vs. プルキンエ線維；心房 vs. 洞結節）に関

する比較データとヒト ES・iPS 細胞由来洞結節型細胞からの実験データを基に、先に作成したヒト心室筋・心房筋細胞モデルにペースメーカー電流を導入し、その際のパラメータ依存性分岐構造（自動能発現条件）を解析することにより、ヒトプルキンエ線維・洞結節細胞モデルを構築する。

（1）心筋細胞のモデル・実験データ収集とデータベース作成

モデルデータベース（cellML）を利用して1994年以降に作成されたヒト及び動物（ウサギ・イヌ・モルモット・ラット・マウス）の心筋細胞モデルを収集し、各イオン輸送系のモデル構造（状態モデルと数学的定式化の方法）とイオン電流動態を比較するためのデータベースを作成する。同一種における心室固有筋とプルキンエ線維、心房固有筋と洞結節のモデル及びその根拠となった実験データを収集・分析し、心室固有筋とプルキンエ線維、固有心房筋と洞結節の電気生理学的特性を比較するためのデータベースを作成する。さらに、ヒト ES・iPS 細胞由来心室筋型・心房筋型・洞結節型細胞から得られた電気生理学的実験データを収集し、従来のヒト心筋のデータとの相違点・整合性を比較分析する。

（2）ヒト心室筋・心房筋細胞の標準モデル作成とシミュレーションによる検証

動物心筋を含めた各モデルにおけるイオンチャネル・トランスポーター及び細胞内 Ca^{2+} 動態のモデル化と数学的定式化の方法を比較分析し、標準モデルとしての最適モデル構造を決定する。ヒト ES・iPS 細胞由来心室筋型・心房筋型細胞からの電気生理学的データを参照して各イオン輸送系の再定式化或いはパラメータ値の調整を行う。我々が作成したヒト心室筋細胞モデル（Kurata et al, *Biophys J* 83: 2074-2101, 2005）並びに最近公開・発表されたヒト心室筋モデル（Carro et al, *Phil Trans R Soc A* 369:4205-4232, 2011; O'Hara et al, *PLoS Comput Biol* 7:1-29, 2011）をベースモデルとし、上記の比較解析データを基に、モデルの改良に必要な各イオン輸送系の最適モデル構造（状態モデルと数学的定式化の方法）を決定し、各イオン輸送系及び細胞内 Ca^{2+} 動態のモデル構造の改良・再定式化とパラメータ調整を行い、新たなヒト心室筋細胞の標準モデルを構築する。さらに、このヒト心室筋モデルと従来のヒト心房筋モデル（Grandi-Bers, *Circ Res* 109:1055-1066, 2010）をベースモデルとし、心房筋と心室筋の電気生理学的特性における相違点の比較解析データを基にパラメータを調整し、新たなヒト心房筋細胞の標準モデルを構築する。

ワークステーション（Hewlett-Packard Z800）及び数値計算用ソフトウェア MATLAB 7（Math Works Inc., USA）を用い、活動電

位の再構成及び活動電位パラメータの計算、活動電位波形のパラメータ依存性変化の計算・プロットを行うための解析システムを構築し、実験データ再現性を検証する。

（3）ヒトプルキンエ線維・洞結節細胞モデルの作成とシミュレーションによる検証

ヒト及び動物心臓（プルキンエ線維・心室筋細胞）のモデルと実験データの比較解析により、心室固有筋とプルキンエ線維の電気生理学的特性における相違点（注目すべきパラメータ）を明らかにする。また、ヒト ES・iPS 細胞由来洞結節型心筋細胞からの電気生理学的データ及び動物心臓（心房筋・洞結節細胞）のモデルと実験データの比較解析により、心房固有筋と洞結節細胞の電気生理学的特性における相違点を明らかにする。収集したデータの比較解析から得られた電気生理学的特性の心臓内部位差（プルキンエ線維 vs. 固有心室筋；洞結節 vs. 固有心房筋）に基づき、分岐解析のためのパラメータ（内向き整流 K^+ チャネル電流・過分極活性化陽イオンチャネル電流の最大コンダクタンスなど）を決定する。先に作成したヒト心室筋・心房筋細胞モデルをベースモデルとし、MATLAB 7 及び分岐追跡用ソフトウェア（MATCONT）を用い、モデルシステムの平衡点（定常状態）と周期軌道（活動電位）及びその安定性のパラメータ依存性変化を表す“分岐図”を作成するための解析システムを構築する。この分岐構造解析システムを用い、データ比較の結果に従って各パラメータ値をプルキンエ線維・洞結節細胞に適した値に設定した後、決定された分岐パラメータの変化（内向き整流 K^+ チャネル電流の抑制・過分極活性化陽イオンチャネル電流の導入）を想定して分岐パラメータに関する分岐図を作成することにより、モデル細胞のパラメータに依存した分岐構造（自動能発現条件（平衡点の不安定化と周期軌道の出現をもたらすパラメータ領域））を決定する。分岐図による解析結果に基づいて各イオン電流系のパラメータ値を再調整することにより、電気生理学的実験データを再現できる（自動能をもつ）ヒトプルキンエ線維・洞結節細胞モデルを構築する。

4. 研究成果

(1)心筋細胞モデル・実験データベースの構築

モデルデータベース（cellML）を利用して1994年以降に作成されたヒト及び動物の心筋細胞モデルを収集し、各イオン輸送系のモデル構造とイオン電流動態、心筋細胞の電気生理学的特性の部位差を比較分析するためのデータベースを構築した。さらに、ヒト ES 細胞由来心筋細胞から得られた電気生理学的実験データを収集し、従来のヒト心筋のデータとの相違点・整合性を比較分析するためのデー

データベースを作成した。

(2) ヒト心室・心房筋細胞の標準モデル作成

上記のモデル構築・比較解析用データベース（ヒト及び動物心筋から得られた電気生理学の実験データ・モデルデータ）を基に、まず新たなヒト心室筋細胞モデルを構築した。この新しいモデルは、2011年に発表されたCarroらのモデル（*Phil Trans R Soc A* 369: 4205-4232, 2011）をベースモデルとし、我々が2005年に発表したモデル（Kurata et al, *Biophys J* 89, 2865-2887）と近年作成された他のモデル（O'Hara et al, *PLoS Comp Biol* 7, 1-29, 2011 など）及び各イオン輸送系の最新モデルを利用し、上記データベースの分析結果に基づいて形質膜及び筋小胞体における各イオンチャンネル・輸送体の動態を再定式化（改良）したものであり、実験データ再現性と分岐解析への適用性に優れた（ヒト心室筋の主な電気生理学的特性を再現できる）最新のヒト心室筋細胞モデルである。主な改良点と作成（改良）手順は以下の通りである。

Ca²⁺/Na⁺ buffering の近似変換（Rapid buffering approximation）

筋小胞体 Ca²⁺ポンプ（SERCA）動態の再定式化（Tran et al 2009 モデルに変更）

Na⁺チャンネル電流動態の再定式化

L型 Ca²⁺チャンネルの Ca²⁺依存性不活性化・イオン透過機構の再定式化

遅延整流 K⁺チャンネル電流動態の再定式化（Kurata et al 2005 モデルから採用）

内向き整流 K⁺チャンネル電流動態の再定式化（Fink et al 2008 モデルから採用）

Na⁺-K⁺ポンプ電流の再定式化（Terkiltsen et al 2007 モデルに変更）

Na⁺/Ca²⁺交換電流の再定式化（O'Hara et al 2011 モデルから採用）

さらに、心臓部位別イオンチャンネル遺伝子（mRNA）発現量データから明らかとなった心室固有筋と心房固有筋細胞における電気生理学的特性（イオンチャンネル密度等）の相違点に基づいて作成された Grandi らのヒト心房筋モデル（*Circ Res* 109:1055-1066, 2010）を参照し、先に作成したヒト心室筋細胞モデルのパラメータを調整して、新たなヒト心房筋細胞モデルを構築した。

(3) プルキンエ線維・洞結節モデルの作成

収集した比較解析データ及び新たな心臓部位別イオンチャンネル遺伝子（mRNA）発現量データから、「心室固有筋とプルキンエ線維」、「心房固有筋と洞結節」における電気生理学的特性（イオンチャンネル密度等）の相違点が明らかとなり、内向き整流 K⁺チャンネル電流の抑制とヒト心筋細胞の実験データを基に定式化した過分極活性化陽イオンチャンネル電流の導入における心室・心房筋モデル細胞の分岐構造を解析することにより、過分極活性化陽

イオンチャンネル電流依存性の自動能をもつプルキンエ線維モデルと洞結節細胞モデルを構築することができた。自動能は内向き整流 K⁺チャンネル電流の抑制のみで誘発されたが、過分極活性化陽イオンチャンネル電流の導入により内向き整流 K⁺チャンネル電流抑制におけるサドル ノード（鞍状 結節点）分岐の発現が促進され、過分極活性化陽イオン電流依存性の自動能が生じるパラメータ領域が明らかとなった。

このように、本研究では、ヒト及び動物から得られた主な電気生理学の実験データとモデルデータを収集した比較解析用データベースを作成し、新たなヒト心筋細胞モデル（及びその分岐構造解析システム）を構築することができた。本研究の最大の特色と成果は、非線形システムの分岐理論に基づいたヒト心室・心房筋モデル細胞の数学的構造解析（分岐解析）を行い、従来の方法論では困難であったヒトプルキンエ線維・洞結節細胞のモデルを構築したことである。これらモデル細胞（及び分岐構造解析システム）の完成は、ヒト心臓モデル開発につながるものであり、不整脈発生機序の体系的解明、不整脈制御（薬物効果の予測）理論の確立、バイオペースメーカーシステム設計等の応用研究を促進させるものと期待される。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計2件）

1. Kurata Y, Hisatome I, Tanida M, Shibamoto T. Effect of hyperpolarization-activated current I_f on robustness of sinoatrial node pacemaking: theoretical study on influence of intracellular Na⁺ concentration. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 304: H1337-H1351, 2013. 査読有
2. Kurata Y, Hisatome I, Shibamoto T. Roles of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ cycling and Na⁺/Ca²⁺ exchanger in sinoatrial node pacemaking: insights from bifurcation analysis of mathematical models. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 302: H2285-H2300, 2012. 査読有

〔学会発表〕（計6件）

1. Kurata Y, Hisatome I, Tanida M, Shibamoto T. Dynamical mechanisms of early afterdepolarizations in long QT syndromes: insights from bifurcation

- analysis of mathematical models for human ventricular myocytes. The 91st Annual Meeting of The Physiological Society of Japan (Kagoshima, 2014), *J Physiol Sci* 64 (Suppl 1): S180, 2014.
2. Kurata Y, Hisatome I, Shibamoto T. Effect of hyperpolarization-activated current I_h on robustness of sinoatrial node pacemaking: theoretical study in connection with intracellular Na^+ concentration changes. The 90th Annual Meeting of The Physiological Society of Japan (Tokyo, 2013), *J Physiol Sci* 63 (Suppl 1): S178, 2013.
 3. 倉田康孝、久留一郎、谷田 守、芝本利重. QT 延長症候群における早期後脱分極発現の力学的機序：ヒト心室筋細胞モデルの分岐構造解析による検証. 第30回日本心電学会学術集会（青森，2013），日本心電学会誌・心電図，33(Suppl 4): S-4-147, 2013.
 4. Kurata Y, Hisatome I, Shibamoto T. Roles of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} clock and $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger in sinoatrial node pacemaking: Insights from bifurcation analysis of mathematical models (Intracellular Ca clock and cell excitation). The 89th Annual Meeting of The Physiological Society of Japan (Matsumoto, 2012), 62(Suppl 1): S18, 2012.
 5. 倉田康孝、久留一郎、芝本利重. 過分極活性化陽イオンチャネル電流の洞結節細胞口バスト性への影響：モデル細胞の分岐構造解析による理論的検証. 第29回日本心電学会学術集会（千葉，2012），日本心電学会誌・心電図，32(Suppl 5): S-5-172, 2012.
 6. 倉田康孝、久留一郎、芝本利重. 洞結節自動能の発現における Na/Ca 交換体および筋小胞体 Ca クロックの役割：モデルシステムの分岐構造解析による検証. 第28回日本心電学会学術集会（福岡，2011），日本心電学会誌・心電図，31(Suppl 4): 298, 2011.

6. 研究組織

(1)研究代表者

倉田 康孝 (KURATA, Yasutaka)
金沢医科大学・医学部・准教授
研究者番号：00267725

(2)研究分担者

芝本 利重 (SHIBAMOTO, Toshishige)
金沢医科大学・医学部・教授
研究者番号：90178921

(3)連携研究者

なし