

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 11 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25882010

研究課題名(和文) 心筋細胞実形状を用いた統合解析による微細構造や機能分子が収縮に与える影響の解明

研究課題名(英文) A study on the effect of cardiomyocyte intracellular ultrastructure and functional molecules by integrated simulation with realistic cardiomyocyte mesh

研究代表者

波田野 明日可 (Hatano, Asuka)

東京大学・工学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：20707202

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)：共同研究先の協力により得られた細胞の詳細な形状データを基に、心筋細胞より半筋節長・1/4断面のモデルを作成し、生化学現象・電気現象・力学現象を統合したマルチフィジックス解析を実現した。形状には横行小管の形状のばらつき、ミトコンドリアの配置のばらつきを考慮し、その位置が筋収縮へ与える影響について考察を行った。また、三相理論による電位分布や流体現象の解析により、横行小管内の脱分極時の電位分布や収縮に伴う横行小管内の流体運動について検討した。

研究成果の概要(英文)：We realized multiphysics simulation integrating biophysiological, electrical and mechanical phenomena of cardiomyocyte using the mesh constructed based on the electron micrograph taken and segmented by our collaborator. The mesh contain the segment of half sarcomere length and spans one quarter of the cardiomyocyte cross-section, containing 12 myofibrils. We included randomness in the t-tubule morphology and in the mitochondrial location, and discussed the effect of the randomness on the contraction of cardiomyocyte. We evaluated distribution of electrical potential along t-tubule at the onset of depolarization and fluid exchange between t-tubule and extracellular space during contraction.

研究分野：生体シミュレーション

キーワード：心筋細胞 収縮 マルチフィジックスシミュレーション 三相理論 ミトコンドリア

### 1. 研究開始当初の背景

心筋細胞における収縮のシグナルは細胞膜の電気現象をきっかけとした細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の変化であり、力学現象である変形はミオシン分子とアクチン分子間の相互作用に由来する。すなわち心筋細胞の収縮は、一連の生化学現象を根源とし、電気現象、力学現象の相互作用により生じる。現在、各現象を担う機能分子や微細構造に関する膨大な知見が蓄積されている一方、それらの相互作用を考慮した収縮メカニズムの統合的理解はいまだ不十分であるため、心筋細胞の統合シミュレーションの重要性が高まっている。しかし、細胞内の空間構造を考慮し、生化学・電気・力学の全てを統合したモデルは確立されているとはいえない状況にある。これまでに申請者らは細胞内微細構造までを再現した詳細モデルの構築に取り組んできた。収縮の最小ユニットである  $2\mu\text{m}$  の筋節を模擬したメッシュを作成し、変形、流速、移流、拡散、電位変化などを統合的に解析、正常な心筋細胞の拍動の平均的・局所的  $\text{Ca}^{2+}$  濃度、膜電位変化、収縮変形などを再現した<sup>1-3</sup>。しかし、これまで発表したモデルはデータの不足から微細構造を単純化したものにとどまり、空間解像度が低いため、局所的な値の評価に限界があること、一部の細胞内小器官のモデルは細胞内の平均値を参照していたため特性値の調整が必要なこと、などの問題点があった。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、申請者らが開発した心筋細胞モデル<sup>1-3</sup>をさらに高度化することである。具体的には、心筋細胞の実形状からモデル作成を行い、実験では計測が非常に困難である細胞内の濃度場・電位場・応力場を高い空間解像度で表現する。そして、その詳細解析によって、細胞内形態や機能分子の分布／特性の変化が心筋細胞の収縮機能に与える定量的な影響を明らかにする。

### 3. 研究の方法

(1) 三相理論に基づく有限要素法を用いた3次元構造を考慮した心筋細胞の電気・生理・力学統合シミュレータを構築、改良を行う。まず、3筋原線維のみを含んだメッシュを用いて横行小管内の拡散係数に関するバリデーションを行った。続いて細胞内の電子顕微鏡観察により3次元構築した情報を共同研究先より提供を受け、実形状を反映したメッシュを作成し解析を行った。メッシュは心筋細胞の半筋節長・1/4断面を取り出した部分をモデル化し、横行小管の形状のばらつきや、ミトコンドリアの位置のばらつきを与え、その影響について検討した。

(2) 心筋細胞内のミトコンドリアは、細胞

内の位置により機能や形状、病態への応答が異なる特性を示すことが報告されている<sup>4,6</sup>。この場所による違いの原因については、役割の違いや酸素濃度の勾配などが挙げられているが、実験的観察の限界から未だ明らかになっていない。本研究では、微細構造を考慮した電気生理・力学モデルを用い、筋原線維間ミトコンドリアと膜直下ミトコンドリアが均一な特性を持つとき・異なる特性を持つときの解析を行い、生じる違いについて、検討を行った。

### 4. 研究成果

(1) Swiftらは細胞外溶液の  $\text{K}^+$  濃度を瞬時に  $0.54\text{ mM}$  から  $1.8\text{ mM}$  に変化させた時の膜電流の計測を行い、T管内の溶液交換の遅れに伴う膜電流の遅れを計測した<sup>7</sup>。本件急では3筋原線維のメッシュを用いて、様々なT管内拡散係数を適用し、Swiftらの行った実験の再現シミュレーションを行い、T管内拡散シミュレーションの妥当性確認を行った。細胞外溶液変化後の新たな定常状態の膜電流の50%、90%、95%の値を比較し、細胞内拡散係数の0.08倍の拡散係数が最も良く一致することが分かった。この値はSwiftらが1次元解析からエスティメートした値ともほぼ一致した結果となり、以降のシミュレーションではこの拡散係数の値を用いた。

(2) Shepherdらは、細胞外の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を  $0.45$  から  $1.8\text{ mM}$  に変化させたあと、25、65、85、185、485 ms の delay 後に電氣的刺激を与えて生じた  $\text{I}_{\text{Ca}}$  電流を計測し、T管内の  $\text{Ca}^{2+}$  拡散制約による  $\text{I}_{\text{Ca}}$  電流の遅れを計測する実験を行っている<sup>8</sup>。先に得られた拡散係数を用いてShepherdらの実験を模擬するシミュレーションを行った。実験結果とよく一致した傾向を示し、細胞質の拡散係数の0.08倍が妥当であることを示した。

(3) 横行小管の形状のばらつきや、ミトコンドリアの位置のばらつきが  $\text{Ca}^{2+}$  動態や収縮に及ぼす影響について検討を行った。興奮に伴う  $\text{Ca}^{2+}$  伝播の様子を観察すると、横行小管に接している  $\text{Ca}^{2+}$  放出口である Junctional Sarcoplasmic Reticulum (JSR) からの放出が先ず生じて、その後拡散した  $\text{Ca}^{2+}$  による  $\text{Ca}^{2+}$  induced  $\text{Ca}^{2+}$  release (CICR) が起こり細胞内全体に  $\text{Ca}^{2+}$  が広がる様子が見られた。横行小管・ミトコンドリア共に存在していない領域では、横行小管や膜からの距離に比例して  $\text{Ca}^{2+}$  放出が遅くなる傾向が見られた。ミトコンドリアが存在することがJSRの  $\text{Ca}^{2+}$  放出タイミングに影響する結果となった。また、膜直下にミトコンドリアが無い部分の筋原線維では、それ以外の領域の筋原線維よりも高い  $\text{Ca}^{2+}$  濃度が観察された。それらの筋原線維では収縮力も周辺より15%程度高くなる傾向

が見られ、膜直下のミトコンドリアが膜からの Ca 流入による細胞内の Ca 濃度・収縮力のばらつきを抑えている可能性を示唆した。

これら(1)-(3)の研究成果については現在論文にまとめ、投稿中である。

(4) 筋原線維間ミトコンドリアと膜直下ミトコンドリアが均一な酵素活性を持つとき、また実験から報告されている様に筋原線維間ミトコンドリアが高い活性を持つときの刺激頻度応答解析を行った。均一な場合は膜直下ミトコンドリアが Ca<sup>2+</sup>, NADH 濃度が共に低い結果となった。膜はイオンの制御を担いイオンの取り込みと排出を行うため、その直下の Ca<sup>2+</sup>濃度は流入時には周辺より高く、排出時には周辺より低くなる。ここで、Ca<sup>2+</sup>取り込みを担う Ca ユニポーターは最大速度が限られているうえ、半飽和濃度が高いため、Ca<sup>2+</sup>の取り込みができる高い濃度に接する割には取り込み限らること、加えて興奮後は周辺より低い Ca<sup>2+</sup>濃度により継続的に Ca<sup>2+</sup>を取り除かれることが原因と考えられる。筋原線維間ミトコンドリアでは、相対的に高い Ca 濃度により NADH が上昇し、酸化的リン酸化が活性化することが観察された。これは実験的報告と一致するものである。

(5) 筋原線維間ミトコンドリアと膜直下ミトコンドリアが均一な酵素活性を持つ条件下で、虚血の状態を再現したシミュレーションを行うと、膜直下ミトコンドリアと筋原線維間ミトコンドリアの間には大きな違いが生じた。膜直下ミトコンドリアは比較的豊富に酸素を受け取る一方で、筋原線維間ミトコンドリアには必要最低限の酸素が到達せず ATP を生産できなくなるので、細胞全体として ATP が減少する。その結果、需要増大による膜直下ミトコンドリアが大きく活性化し、細胞全体の ATP 生産を膜直下ミトコンドリアで担う状態になる。虚血にさらされた場合、細胞膜の電気生理現象は筋収縮よりも長く維持できることが分かっており、膜直下ミトコンドリアの ATP 生産がこの膜の電気生理活動の維持に貢献している可能性がある。

(6) 酵素活性が筋原線維間ミトコンドリアの方が高い場合で、正常な酸素濃度下の解析結果では、筋原線維間ミトコンドリアで NADH がより高くなり、その結果ミトコンドリア膜電位が高くなり、ATP 生産量も増大した。ただし、正常な酸素濃度下では細胞全体としての ATP 生産量や効率については変化がなかった。一方虚血状態を調べると、均一モデルに比して膜直下ミトコンドリアの酸素消費が減少するため、筋原線維間ミトコンドリアに供給される酸素が増大し、その結果内部の筋原線維により長く ATP を供給できる可能性が示唆された。

(4)-(6)の結果に関しては、主な発表論文④

にまとめ、Biophysical Journal への掲載が決定している。

#### <引用文献>

1. Hatano, A., Okada, J., Washio, T., Hisada, T., and Sugiura, S. A Three-Dimensional Simulation Model of Cardiomyocyte Integrating Excitation-Contraction Coupling and Metabolism. *Biophysical Journal* 101, 2601-2610, 2011
2. Hatano, A., Okada, J., Hisada, T., and Sugiura, S. Critical role of cardiac t-tubule system for the maintenance of contractile function revealed by a 3D integrated model of cardiomyocytes. *Journal of Biomechanics* 45, 815-823, 2012
3. Hatano, A., Okada, J., Washio, T., Hisada, T., and Sugiura, S. Mitochondrial Colocalization with Ca<sup>2+</sup> Release Sites is Crucial to Cardiac Metabolism. *Biophysical Journal* 104, 496-504, 2012
4. Palmer, J. W., B. Tandler, and C. L. Hoppel. Biochemical properties of subsarcolemmal and interfibrillar mitochondria isolated from rat cardiac muscle. *Journal of Biological Chemistry*, 252(23), 8731-8739, 1977.
5. Palmer, J. W., B. Tandler, and C. L. Hoppel. Biochemical differences between subsarcolemmal and interfibrillar mitochondria from rat cardiac muscle: Effects of procedural manipulations. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 236(2), 691-702, 1985.
6. Schwarzer, M., A. Schrepper, P. A. Amorim, M. Osterholt, and T. Doenst. Pressure overload differentially affects respiratory capacity in interfibrillar and subsarcolemmal mitochondria. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 304(4), 529-537, 2013.
7. Swift, F., Stromme, T.A., Amundsen, B., Sejersted, O.M., and Sjaastad, I. Slow diffusion of K<sup>+</sup> in the T tubules of rat cardiomyocytes. *Journal of Applied Physiology* 101, 1170-1176, 2006
8. Shepherd, N., and McDonough, H.B. Ionic diffusion in transverse tubules of cardiac ventricular myocytes. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 275, H852-H860, 1998.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 4件）

- ① 波田野 明日可, 岡田 純一, 鷺尾 巧, 杉浦 清了, 久田 俊明, 三相理論を用いた心筋細胞の電気化学・力学連成シミュレーションの大規模化に関する検討, 日本機械学会論文集 (A 編) 79 巻 803 号, 934-949, 2013
- ② 波田野 明日可, 心筋細胞内現象の数理モデル, 応用数理 24 巻 1 号, 2-9, 2014
- ③ Asuka Hatano and Sander Schutte, Transversely Isotropic Constitutive Model for Extraocular Muscle Considering the Force-Length-Activation Relationship and Weaving Tendon, Advanced Biomedical Engineering, In press, 2015
- ④ Asuka Hatano, Jun-ichi okada, Takumi Washio, Toshiaki Hisada and Seiryu Sugiura, Distinct Functional Roles of Cardiac Mitochondrial Subpopulations Revealed by 3D Simulation Model, Biophysical Journal, In press, 2015

〔学会発表〕（計 3件）

- ① 波田野 明日可, 岡田 純一, 久田 俊明, 杉浦 清了, 心筋細胞の統合解析による細胞内空間分布がミトコンドリアの不均一性に与える影響に関する検討, 生体医工学シンポジウム 2013, 2013 年 9 月, 福岡
- ② 波田野 明日可, 岡田 純一, 鷺尾 巧, 久田 俊明, 杉浦 清了, 三相理論を用いた心筋細胞内現象のマルチフィジックス解析, M&M2013 材料力学カンファレンス, 2013 年 10 月, 岐阜
- ③ Asuka Hatano, Jun-ichi okada, Takumi Washio, Toshiaki Hisada and Seiryu Sugiura, Integrated 3D Simulation of Cardiomyocyte Revealed the Distinct Functional Characteristics between Subsarcolemmal and Interfibrillar Mitochondria, Biophysical Society Annual Meeting 2014, Feb. 2014, San Francisco, USA.

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

波田野 明日可 (HATANO, Asuka)

東京大学・大学院工学系研究科・助教

研究者番号：20707202