

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 10 日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460303

研究課題名(和文) ヒト幹細胞由来心筋細胞における自動能機序の解明とバイオペースメーカーシステム設計

研究課題名(英文) Insights into pacemaker mechanisms for human stem cell-derived cardiomyocytes with application to biological pacemaker engineering

研究代表者

倉田 康孝 (KURATA, Yasutaka)

金沢医科大学・医学部・教授

研究者番号：00267725

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト幹細胞由来心筋細胞の電気生理学的特性を分析し、洞結節型および固有心筋型細胞の数理モデルを作成した。モデル細胞のパラメータ依存性分岐構造を解析して分化成熟過程での自動能発現・消失の非線形力学的機序を検証した結果、洞結節型細胞における自動能発現はL型Caチャネル電流による平衡点の不安定化に起因すること、固有心筋型細胞での自動能消失は内向き整流Kチャネル電流増加による安定平衡点の出現によることが明らかとなった。また、洞結節型細胞と固有心筋型細胞を連結した多細胞モデルでの解析から、ペースメーカー細胞のバイオペースメーカーとしての機能の強化には持続性内向き電流の導入が最も効果的であることも判明した。

研究成果の概要(英文)：We have developed mathematical models for ES/iPS cell-derived cardiomyocytes as modified versions of the human ventricular and atrial myocyte models. By bifurcation analyses for the model cells, we have found that automaticity of sinoatrial node cell-like pacemaker cells is attributable to the destabilization of the equilibrium point (EP) via L-type Ca channel currents, whereas cessation of pacemaker activity of atrial or ventricular cell-like cardiomyocytes is due to the emergence of a stable EP via increase of inward-rectifier K channel currents. We further developed a multi-cellular model composed of pacemaker cells and atrial/ventricular cells, and examined functions of the pacemaker cell as a biological pacemaker. Incorporating pacemaker currents into the pacemaker cell altered functions of the biological pacemaker in the multicellular model. Incorporation of the sustained inward current was found to be most effective in the enhancement of biological pacemaker functions.

研究分野：システム生理学

キーワード：cardiac pacemaker mathematical model bifurcation analysis computer simulation

1. 研究開始当初の背景

1998年にヒト胚性幹(ES)細胞、2007年にヒトiPS細胞が樹立されてから、幹細胞由来心筋細胞の遺伝性心疾患解析(病態生理解明)・薬効評価・再生医療などへの応用が期待されている。発生生物学的・生理学的観点からみれば、幹細胞からの心筋分化成熟過程は胎生期の心筋分化成熟過程と本質的に同じであり、幹細胞は発生過程での心筋自動能発現機構(および固有心筋への分化過程における自動能消失機構)の解明における恰好の実験系でもある。即ち、幹細胞由来心筋細胞における自動能の発現・消失機構を解析することは、胎生期における心臓拍動初発機構(およびその制御機構)の解明という重要な生理学的意義をもっている。一方、臨床応用の一つとして、幹細胞由来心筋細胞を用いたバイオペースメーカーの開発(cell therapy)が進められており、人工ペースメーカーに代わる徐脈性不整脈の新たな治療へ向けた細胞ソースとして注目される(Poon et al, Mol Pharmaceutics 8:1495-1504, 2011; Blank et al, Cur Stem Cell Res Ther 4: 23-33, 2009)。幹細胞由来心筋細胞の電気生理学的特性に関する実験的解析は近年急激に進展しているが、心臓拍動初発機構の解明やバイオペースメーカー開発を目指した研究は極めて少ない。従来の方法論では心臓拍動初発機構の解明やバイオペースメーカーシステムの設計は不可能であり、以下の3つの手法を駆使した理論的解析が必要不可欠である。

- (1) 幹細胞由来心筋細胞の分化成熟過程における電気生理学的特性の数値モデル化
- (2) ペースメーカー細胞 - 固有心筋細胞連結・組織モデルによるバイオペースメーカー機能評価
- (3) 数学的手法(分岐解析)によるモデルシステムの非線形力学的特性の解析

我々には、ヒト心筋細胞モデル・マウスES細胞由来心筋細胞モデルの構築(Kurata et al, Biophys J 89: 2865-2887, 2005)や多細胞モデルでの解析(Kurata et al, Am J Physiol 292: H701-H718, 2007)の実績があり、これらをベースモデルとすることにより、効率的なモデル化とバイオペースメーカー機能評価が可能である。また、分岐解析手法は、心臓拍動初発機構の解明とバイオペースメーカーシステム設計に必要な不可欠な方法論である。

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システムの安定性とダイナミクスの質的变化)の一つであり、従来の方法論(実験とシミュレーションの積み重ね)でその本質的メカニズムを解明することは不可能である。このような観点から我々は、モデル心筋細胞の分岐構造(自動能発現・停止過程におけるシステムの安定性とダイナミクス)を解析することにより、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、心室筋由来バイオペースメーカー細胞作成・機能強化の手法などを研究し、多くの成果を挙げた(Kurata et al, Biophys J 95: 951-977, 2008; Kurata et al, Am J Physiol 285: H2804-H2819, 2003など)。これらの成果は、心筋自動能発生機序の解明とバイオペースメーカーシステム設計において、非線形力学系の分岐理論に基づく理論的アプローチが極めて有用かつ不可欠な方法論であることを明確に示している。幹細胞由来心筋細胞を対象とする自動能発生機序の解析やバイオペースメーカーシステム設計においても、本細胞の分化成熟過程における分岐構造を明らかにする必要がある。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“ヒト幹細胞由来心筋細胞における自動能機序の解明とバイオペースメーカーシステム設計”を着想するに至った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ヒト幹細胞由来心筋細胞の分化成熟過程における電気生理学的特性を数値モデル化し、その分岐構造を解析することにより、「ヒトの発生過程における心臓自動能の発現制御機構(心臓拍動の初発機構)」を解明すると共に、「バイオペースメーカー細胞としての有用性とその機能強化方法」を検証することである。

本研究では、成人ヒト心筋細胞モデル(本年度完成予定)をベースモデルとし、ヒトES/iPS細胞を用いた実験および文献より得られたデータを基に、幹細胞由来心筋細胞(分化早期)の非線形力学系モデルを作成する。分化成熟過程における電気生理学的特性の変化を分析し、モデル細胞のパラメータ依存性分岐構造を解析して、分化成熟過程における自動能発現・消失の非線形力学的機序を明らかにする。さらに、洞結節型ペースメーカー細胞と固有心筋細胞を連結した多細胞・組織モデルを構築してペースメーカー細胞の自動能のロバスト性と固有心筋ドライブ機能を解析し、バイオペースメーカー機能強化手法を提案する。分岐理論を基盤とした新しいアプローチにより、ヒトの発生過程における心筋細胞自動能の発現制御機構(心臓拍動の初発機構)を明らかにするとともに、バイオペースメーカー開発のための理論的基盤を確立する。到達目標の詳細は以下の通りである。

(1) ヒト幹細胞由来心筋細胞モデルの作成

成人ヒト心筋(心室筋・Purkinje・心房筋・洞結節)細胞モデルをベースモデルとする。分化早期のヒト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参照(従来の成人ヒト心筋データと比較)して各イオン輸送系のパラメ

ータ値を修正し、分岐解析に適した分化早期ヒト幹細胞由来心筋細胞（心室筋型・心房筋型・洞結節型）の非線形力学系モデルを構築する。

(2) 心筋細胞の分化成熟過程における電気生理学的変化と分岐構造の解析

心筋細胞の分化成熟に伴って各イオンチャネルの密度・性質が変化し、分化の各ステージ（早期・中期・後期）における自動能の発現・消失や活動電位波形の変化が生じると考えられる。各細胞型の分化成熟過程における電気生理学的変化（自動能とイオンチャネル電流密度・動態の変化）を最新の実験データおよび文献データにより分析する。各細胞型の各分化ステージにおける電気生理学的変化をモデルパラメータの変化としてシミュレートし、分化早期の心室筋型・心房筋型・洞結節型モデルのパラメータ依存性分岐構造を解析して、分化成熟過程における自動能発現・消失（分岐現象）の非線形力学的機構を明らかにする。

(3) 多細胞・組織モデルの構築とバイオペースメーカー機能強化方法の解析

洞結節型細胞（バイオペースメーカー細胞）と固有心筋細胞をギャップ結合で連結した2次元心房・心室組織モデルを構築し、バイオペースメーカーの自動能の電気緊張性負荷に対するロバスタ性と固有心筋ドライブ機能を解析し、バイオペースメーカー機能発現条件（ペースメーカー細胞数、ギャップ結合コンダクタンスなど）を明らかにする。さらに、自動能調節電流導入・修飾によるバイオペースメーカー機能の変化を組織レベルで解析し、実用的バイオペースメーカー開発のためのバイオペースメーカー機能強化方法（イオンチャネル発現制御処方）を究明する。

3. 研究の方法

まず、ヒト ES/iPS 細胞由来心筋細胞からの電気生理学的実験データを収集し、従来の成人ヒト心筋データとの相違点・整合性ならびに分化成熟過程での電気生理学的特性の変化を解析する。成人ヒト心筋細胞モデルをベースモデルとし、各イオンチャネル・トランスポーターおよび細胞内 Ca^{2+} 動態の比較解析結果を基にパラメータ値を調整し、分化早期の幹細胞由来心筋細胞モデルを構築する。次に、分化成熟過程での電気生理学的特性の変化を基にモデル細胞のパラメータ依存性分岐構造を解析し、自動能発現・消失機序を解明する。さらに、洞結節型細胞と固有心筋細胞を連結した2次元心房・心室組織モデルを構築し、バイオペースメーカーの自動能の電気緊張性負荷に対するロバスタ性と固有心筋ドライブ機能を解析し、バイオペースメーカー機能発現条件、自動能調節電流導入・

修飾によるバイオペースメーカー機能の変化を解析する。

平成 26 年度は、ヒト ES/iPS 細胞由来心筋細胞からの電気生理学的実験データを収集してデータベースを作成し、従来の成人ヒト心筋データとの相違点・整合性並びに分化成熟過程での電気生理学的特性の変化を解析する。また、解析データを基に、成人ヒト心筋細胞モデルをベースモデルとしてヒト幹細胞由来心筋細胞（分化早期）の非線形力学系モデルを構築し、HP ワークステーション Z820 および数値計算・シミュレーション用ソフトウェア MATLAB を用いて、モデル細胞の電気生理学的特性と分岐構造を解析するためのプログラムを作成する。

平成 27～28 年度には、平成 26 年度に作成した電気生理学的実験データベースをさらに拡充するとともに、分化成熟過程での電気生理学的特性の変化を分析する。分化早期モデルをベースとし、データ解析結果に基づいてパラメータ（イオンチャネルコンダクタンス等）の経時変化を決定し、モデル細胞の分化成熟過程におけるパラメータ依存性分岐構造（自動能発現・停止過程におけるシステムの安定性とダイナミクスの変化）を解析して、分化成熟過程における自動能出現・停止の非線形力学的メカニズムを究明する。また、洞結節型細胞と固有心筋細胞をギャップ結合で連結した2次元心房・心室組織モデルを構築し、自動能（バイオペースメーカー活性）が停止する臨界ギャップ結合コンダクタンス値と心房・心室ドライブが可能なパラメータ領域を指標として、バイオペースメーカー機能（自動能の電気緊張性負荷に対するロバスタ性・固有心筋ドライブ機能）の発現条件と強化方法（自動能調節電流導入・修飾によるバイオペースメーカー機能の変化）を解析する。

4. 研究成果

初年度の目標は、(1) 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を収集してデータベースを作成し、分化成熟過程での電気生理学的特性の変化を分析すること、(2) ヒト幹細胞由来心筋細胞（分化早期）の数理モデルを構築することであった。鳥取大学大学院医学系研究科・再生医療学講座との共同研究により、ヒト ES 細胞由来心筋細胞からセルソーターによって分離同定した HCN4（ペースメーカーチャネル蛋白）陽性細胞の電気生理学的特性（活動電位と形質膜イオンチャネル電流動態）をパッチクランプ実験によって分析した。ヒト ES 細胞由来 HCN4 陽性心筋細胞は成人の洞結節細胞と同様の自発性活動電位を呈し、その形質膜イオンチャネル電流は成人心筋細胞のイオンチャネル電流と本質的に同じ特性を示した。これらの実験データと以前に作成した心筋細胞モデルを基に、ヒト ES 細胞由来

HCN4 陽性心筋細胞の電気生理学的特性を数式化し、自動能をもつヒト ES 細胞由来心筋ペースメーカー細胞（分化開始1ヵ月後）の非線形力学系モデルを作成することができた。また、次年度の目標である「モデル細胞を用いて心筋の分化成熟過程における分岐構造（自動能発現機構）を解明する」ための解析システム（MATLAB プログラム群）を構築することができた。

平成27~28年度の目標は、(1)ヒトES/iPS細胞由来心筋細胞の電気生理学的特性を経時的に解析して分化成熟過程での変化を数式化すること、(2)幹細胞由来心筋洞結節型ペースメーカー細胞および固有心筋細胞モデルのパラメータ依存性分岐構造を解析して分化成熟過程における自動能発現・消失の非線形力学系機構を明らかにすること、(3)ペースメーカー細胞と固有心筋細胞を連結した多細胞・組織モデルを構築してペースメーカー細胞のバイオペースメーカーとしての機能を検証することであった。

(1) ヒト幹細胞由来心筋細胞モデルの構築

成人ヒト心筋細胞モデル（Kurata 2005, Grandi 2010, O'Hara 2011, Nygren 1998, Courtemanche 1998 モデル）をベースモデルとし、電気生理学的解析データを基に各ヒト心筋細胞モデルにおけるイオン輸送系のパラメータを調整して、自動能を示す洞結節型ペースメーカー細胞モデル（連立非線形常微分方程式）の作成を試みた。Kurata 2005 モデルでは内向き整流 K^+ チャンネル電流 (I_{K1}) の抑制のみで自発性活動電位が発現し、自動能を示す「ヒト幹細胞由来固有心筋型細胞」の非線形力学系モデルを構築することができた。さらに、過分極活性化陽イオンチャンネル電流 (I_f) を組み込むことにより「ヒト幹細胞由来洞結節型ペースメーカー細胞」の活動電位を再現するモデルも作製することができた（他のモデルでは I_{K1} 抑制と I_f 導入のみで自動能を再現することはできなかった）。ヒト幹細胞由来ペースメーカー細胞および固有心筋細胞モデルの開発により、これらの心筋細胞における自動能発現・消失の機序（電気生理学的特性の分岐構造）の解析、さらには組織モデル構築とバイオペースメーカーシステム設計が可能となった。

(2) 自動能発現・消失機序の解明

洞結節型および固有心筋型細胞の分化成熟過程における各イオン電流の変化を各モデル細胞のパラメータ変化としてシミュレートし、モデル細胞の定常状態・周期軌道と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した。得られた分岐図からモデル細胞のパラメータ依存性分岐パターンを解析した結果、洞結節型細胞の分化成熟過程における自動能発現は主に「L型 Ca^{2+} チャンネル電流による平衡点の不安定化（ホップ分岐）」に起因しており、 I_f 電流や筋小胞体 Ca^{2+}

遊離は必須ではないと結論された。また、固有心筋型細胞における自動能の消失は内向き整流 K^+ チャンネル電流 (I_{K1}) の増加に伴う安定平衡点の出現（サドルノード分岐）に起因することも明らかとなった。

(3) バイオペースメーカー機能強化法の検証

洞結節型ペースメーカー細胞と固有心筋細胞をギャップ結合で連結して、洞結節型細胞のバイオペースメーカーとしての機能（自動能の電気緊張性負荷に対するロバスト性と固有心筋ドライブ機能）を評価するための多細胞・組織モデルシステムを構築し、自動能が消失する臨界ギャップ結合コンダクタンス値および固有心筋ドライブの可能なパラメータ領域を指標としてバイオペースメーカー機能を検証した。ペースメーカー細胞への自動能調節イオン電流系 I_f 、持続性内向き電流 (I_{st})、T型 Ca^{2+} チャンネル電流、クラスD-L型 Ca^{2+} チャンネル電流 修飾・導入の影響を解析した結果、カップル細胞モデルでの解析結果と同じく、 I_{st} 導入が最も効果的であることが明らかとなった。このように、本研究により、実用的バイオペースメーカーシステムの設計・開発（イオンチャンネル発現制御によるバイオペースメーカー機能強化）を進める上での極めて重要な理論的基盤が得られた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2件)

Kurata Y, Tsumoto K, Hayashi K, Hisatome I, Tanida M, Kuda Y, Shibamoto T. Dynamical mechanisms of phase-2 early afterdepolarizations in human ventricular myocytes: Insights from bifurcation analyses of two mathematical models. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* (査読有) 312: H106-H127, 2017.
doi:10.1152/ajpheart.00115.2016

Sogo T, Morikawa K, Kurata Y, Li P, Ichinose T, Yuasa S, Nozaki D, Miake J, Ninomiya H, Shimizu W, Fukuda K, Yamamoto K, Shirayoshi Y, Hisatome I. Electrophysiological properties of iPS cell-derived cardiomyocytes from a patient with long QT syndrome type 1 harboring the novel mutation M437V of KCNQ1. *Regenerative Therapy* (査読有) 4: 9-17, 2016.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.reth.2015.12.001>

〔学会発表〕(計 8件)

Kurata Y, Tsumoto K, Hisatome I, Tanida M, Kuda Y, Shibamoto T. Distinct dynamical mechanisms underlie the

development of phase 2 early after-depolarizations in human ventricular myocyte models for long QT syndromes. 第 94 回日本生理学会大会、2017.3.28-30、アクトシティ浜松(静岡県浜松市). *J Physiol Sci* 67 (Suppl 1): S155, 2017.

Kurata Y, Hisatome I, Shibamoto T. Mechanisms of sinoatrial node pacemaking: novel insights into roles of the pacemaker current I_f from bifurcation analysis of mathematical models. 2016 International Symposium on Nonlinear Theory and Its Applications (NOLTA2016)、2016.11.27-30、ニューウェルシティ湯河原(神奈川県足柄下郡湯河原町).

Kurata Y, Hisatome I. Distinct mechanisms underlie phase 2 early afterdepolarizations in human ventricular myocyte models of long QT syndromes. 第 63 回日本不整脈心電学会学術大会、2016.7.14-17、札幌コンベンションセンター(北海道札幌市).

Kurata Y, Tanida M, Kuda Y, Hisatome I Shibamoto T. Dynamical mechanisms of phase 2 early afterdepolarizations in human ventricular myocyte models. 第 93 回日本生理学会大会、2016.3.22-24、札幌コンベンションセンター(北海道札幌市). *J Physiol Sci* 66 (Suppl 1): S112, 2016.

Kurata Y, Li P, Morikawa K, Miake J, Yamamoto K, Shirayoshi Y, Hisatome I. Electrophysiological properties of iPS cell-derived cardiomyocytes from a patient with long QT syndrome type 1 harboring a novel mutation of KCNQ1. 第 30 回日本不整脈学会学術大会・第 32 回日本心電学会学術集合同学術大会、2015.7.28-31、国立京都国際会館(京都府京都市).

Kurata Y, Hisatome I. Dynamical mechanisms of phase 2 early after-depolarizations in long QT syndromes: Insights from slow-fast decomposition analysis of mathematical models for human ventricular myocytes. 第 30 回日本不整脈学会学術大会・第 32 回日本心電学会学術集合同学術大会、2015.7.28-31、国立京都国際会館(京都府京都市).

津元国親, **倉田康孝**, 倉智嘉久. 心筋細胞における早期後脱分極生成機序解明のための数理解析手法の提案. 第 54 回日本生体医工学会大会、2015.5.7-9、名古屋国

際会議場(愛知県名古屋市).

Kurata Y, Tanida M, Kuda Y, Hisatome I Shibamoto T. Dynamical mechanisms of phase 2 early afterdepolarizations in long QT syndromes: Insights from slow-fast decomposition analysis of mathematical models for human ventricular myocytes. 第 92 回日本生理学会大会、2015.3.21-23、神戸国際会議場(兵庫県神戸市). *J Physiol Sci* 65 (Suppl 1): S206, 2015.

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・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

(4) 研究協力者

なし