

令和元年6月17日現在

機関番号：34315

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18996

研究課題名(和文) 洞房結節ペースメーカー細胞におけるCa²⁺時空間動態のリズム形成への寄与研究課題名(英文) Contribution of spacio-temporal Ca²⁺ dynamics to the pacemaker rhythm in sinoatrial node cells

研究代表者

姫野 友紀子 (Himeno, Yukiko)

立命館大学・生命科学部・助教

研究者番号：10534365

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：心臓の拍動リズムを司る、洞房結節(SAN)ペースメーカー細胞の歩調取りメカニズムへの、細胞内Ca²⁺動態の寄与について評価するための、シミュレーションモデルを開発した。モデルには、代表者らの心室筋細胞モデルで開発された局所Ca²⁺濃度を計算する枠組みを導入した。その結果、SAN細胞は構造的に細胞膜と筋小胞体膜とのカップリングが弱く、心室筋細胞と比較してCa²⁺放出ユニットの数も少ないが、各ユニットの高濃度Ca²⁺を介したNaCa交換機転の活性化が果たす膜電位変化への寄与は、小さくないことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果は、細胞内Ca²⁺動態を、数理時空間上でこれまでよりも高い精度で再現し、実験で入手可能なデータと摺り合わせを行っていくためのプラットフォームを提案することができた。これにより、さらに現実的なモデルへと精緻化を進めていくためには、実験でどのようなデータを計測してどのパラメータへと反映させていくべきかというような方策も立てることができるようになった点は意義深い。特に、面積や体積を見積もるための細胞内部構造や拡散定数など、Ca²⁺濃度計算に関わる部分に関連する計測技術の発展により、精度は格段に向上するだろう。

研究成果の概要(英文)：To evaluate the contribution of intracellular Ca²⁺ dynamics to the pacing mechanism of the sinus node (SAN) pacemaker cells, an SAN simulation model was developed.

The model introduced a framework to calculate local Ca²⁺ concentration (Hinch model Biophys J, Hinch 2004), which was firstly introduced in a ventricular myocyte model (HuVEC model Biophys J, Himeno et al. 2015). As a result, it was suggested that contribution of NaCa exchanger activated by extremely high local Ca²⁺ concentration was not small despite the cell membrane and the sarcoplasmic reticulum membrane were more weakly coupled and the number of Ca²⁺ releasing units was smaller in SAN cells compared to ventricular myocytes.

研究分野：生理学

キーワード：洞房結節 細胞内Ca²⁺ 歩調取り コンピュータシミュレーション

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

2009年、従来の細胞膜にあるイオンチャネル駆動でリズムを刻むとする膜時計(M clock)説に対して、筋小胞体(SR)からの Ca^{2+} がリズム形成に重要であるとする Ca^{2+} 時計(C clock)説を唱えてきた Lakatta らのグループが、Kurata らのペースメーカー細胞モデル(Kurata モデル)²⁾ のパラメータを調整し、拡張期の緩徐な脱分極相で筋小胞体からの自発 Ca^{2+} 放出が $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換機転($I_{\text{NaCa}/\text{NCX}}$)を介して積極的にペースメーカー機転に關与する C clock モデル³⁾ を発表した。それに対し我々は、M clock 説に基づく Yanagihara らのモデル(後の Kyoto モデル⁴⁾)をベースとするモルモット洞房結節ペースメーカー細胞モデル(M clock モデル)(論文5)を用いたシミュレーション解析(図1参照)と細胞内 Ca^{2+} をキレートする生理学実験をおこない、細胞内 Ca^{2+} 濃度変化のリズム形成への寄与は小さいことを証明した(論文2, 3)。この仕事は、これまでの混沌とした議論に一石を投じた(論文2)。更に C clock モデルを発表した研究グループからの Letter を受け誌上でも議論を交わした(論文3)。しかし3年後の2014月、同グループから Ca^{2+} 誘発性 Ca^{2+} 放出(CICR)メカニズムを精緻化したモデルを用い、C clock 説を支持する結果が発表された⁵⁾。CICR とは、細胞膜表面にある L 型 Ca チャネル(LCC)を通して流入した Ca^{2+} によって、リアノジン受容体チャネル(RyR)が活性化され、細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇することである。局所に蓄積した Ca^{2+} は一部の $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換機転(NCX)を駆動する。我々の M clock モデルにも新しい CICR モデル(論文6)を適用し、結果を再考することとした。

2. 研究の目的

本研究の目的は、M clock モデルを用いて、 $[\text{Ca}^{2+}]$ 変化がリズム形成に及ぼす寄与の大きさを定量的に評価することである。

3. 研究の方法

- (1) CICR に關与するチャネルをアップデートし、解剖学的な視点から適切な Ca^{2+} 分画を決定し、各分画におけるチャネルの分布を文献より決定する⁶⁾。
- (2) ペースメーカー細胞モデルに CICR モデルを組み込む。
- (3) 完成した CICR を含む細胞モデルの挙動を数学解析(VL 解析、必要に応じて分岐解析等)

4. 研究成果

(1)(2) Ca^{2+} 分画とチャネル分布と CICR モデルのペースメーカー細胞モデルへの実装
細胞表面膜に存在する数個の L 型 Ca^{2+} チャネルと筋小胞体膜に存在するリアノジンチャネルの集団が nano meter(10^{-9} m)の隙間を挟んで相対し、一つの機能ユニットを構成している。この組み合わせを Ca^{2+} 放出単位(Ca^{2+} Releasing Unit, CaRU)と呼び、CaRU の数理モデルは Hinch(2014)⁷⁾ によって発表されている。ペースメーカー細胞モデルはヒト心室筋細胞モデルとは異なり、 Ca^{2+} の濃度分画として junction space は最小限で(細胞容積の 0.8%)、その他 iz-space = 3.5%, bulk-space = 65% の Ca^{2+} 分画を設定した。これに対して、それぞれの space に分布する L 型 Ca チャネルの割合は、細胞全体に存在するチャネルの junction space = 15%、iz-space = 45%、bulk-space = 40% とした。また、筋小胞体の占める割合は、心室筋細胞より低く、細胞容積の 1% に設定した。図1の細胞膜には心室筋細胞より多い17種類のイオンチャネルが存在し、各イオンフラックスを計算することで細胞内のイオン濃度を決定している。

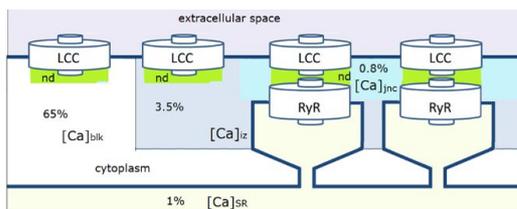


図1 CaRU の分布と Ca^{2+} - 分画の関係

細胞の表面膜に分布する CaRU の大部分は細胞質の 65% を占めるとした blk-space の細胞膜や 3.5% を占める intermediate zone (iz)-space の膜に存在する。残りの LCC は筋小胞体終末槽とのジャンクションに存在して(0.8% を占める細胞質の Ca 分画容積)、終

末槽膜に分布する RyR クラスターとカップルして、CaRU を形成している。LCC と RyR クラスターで挟まれる微小な空間を nano domain と呼んでいる。各 CaRU のナノドメインに放出された Ca^{2+} は次に jnc-space、iz-space、最後に blk-space に拡散する。

(3) CICR を含む細胞モデルのシミュレーション結果及び数学解析

図 2 に示すように、活動電位の振幅(A)は ~ 77 Mv(-62 ~ +15 Mv)、50% 持続時間 = ~ 150 ms である。発火頻度は、Results ボックスにあるように、99.7 / min で単離したウサギ SAN 細胞の平均的なデータにほぼ近い。Results ボックスには、maximum rate of rise、細胞内イオン濃度等が表示されている。

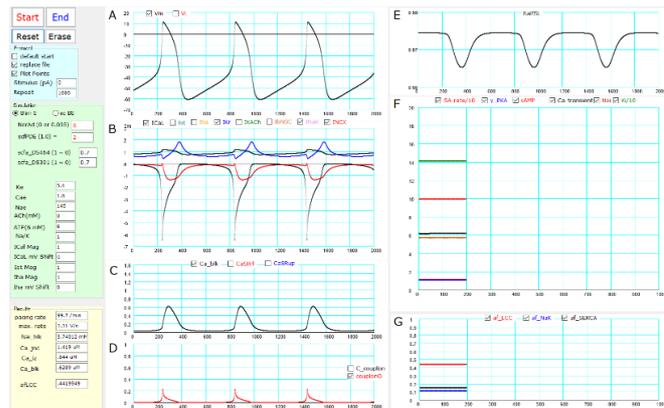


図 2 洞房結節細胞の活動

A: 活動電位、B: 膜電流、C: 細胞内 bulk-space の Ca^{2+} 濃度 (Mm)、D: 筋小胞体 Ca^{2+} 放出チャンネルクプロンの開口状態 (赤線) E: 半筋節長を 2 秒間の掃引で繰り返し観察できる。F: 各掃引毎に、チェックボックスで選択された測定値がプロットされる。緑線、 $[K^+]/10$ 、黄土色、 $[Na^+]$ (Mm)、赤線、自発活動電位発火頻度 / 10, 黒線 Ca^{2+} トランジェントのピーク (Mm)、青線、PKA catalytic subunit の活性化の割合、 $[cAMP]$ 濃度 (単位 ; 0.05 Mm)。G: リン酸化による活性化の割合、赤線 ; ICaL、青線 ; Na/K pump、黒線 ; SERCA。

この細胞の活動電位立ち上がり相は、 I_{CaL} の活性化によるもので、最大脱分極速度 (Results ボックス、max.rate = 3.31 V/s) は遅い。再分極相は I_{CaL} の不活性化と I_{Kr} の活性化が主な役割を担っていることが見て取れる。 I_{st} の振幅は拡張期緩徐脱分極中次第に増加していて、この分極に貢献している。 Na/Ca 交換電流は内向きで、比較的小さく、細胞内 $[Ca^{2+}]$ が時間と共に減少するにともなって拡張期には減少する。 I_{CaL} は拡張期脱分極の終わりにかけて指数関数的に増加し、この拡張期における脱分極速度を加速して行く。 Na/K ポンプ電流は持続的に外向き電流で、膜電位依存性は比較的小さい。内向き電流成分の内、背景非選択性陽イオン内向き電流 I_{Bnsc} (background nonselective cation current) は、拡張期における内向き電流の大部分を占めていて、この細胞の浅い膜電位形成に主な役割を担っている。 I_{ha} (I_f) はより深い負電位になれば活性化して大きな電流を発生することができるが、この細胞の活動電位範囲ではほとんど活性化することがなく緩徐脱分極への貢献は限定的であると言える。筋小胞体の $[Ca^{2+}]$ は心室筋と比べて、極端に低いことはないが、SR からの Ca^{2+} 放出は比較的小さく、一過性 Ca^{2+} トランジェントのピークでも $0.4 \mu M$ 程度で、発生張力は小さい。実際分離した細胞は律動的に収縮を繰り返すのが観察されるが、その収縮は弱い。ここで、パネル D に見られるクプロン (couplon, RyR 集団) の開口確率ピークはほぼ心室筋細胞と比べても遜色ないが、L 型 Ca チャネル (LCC) とカップルしている筋小胞体終末槽の容積密度が圧倒的に低いと細胞質全体で見ると Ca^{2+} トランジェントの振幅は小さい。

(3) CICR を含む細胞モデルの解析 [リードポテンシャル解析]

I_{Kr} について、パネル C、 V_L への寄与では、赤垂直線で示した最大拡張期電位付近で最も大きな負電位を与えていて、時間と共に減少している。さらに、拡張期脱分極速度 dV_L/dt への寄与

A: 活動電位、B: 膜電流、C: 細胞内 bulk-space の Ca^{2+} 濃度 (Mm)、D: 筋小胞体 Ca^{2+} 放出チャンネルクプロンの開口状態 (赤線) E: 半筋節長を 2 秒間の掃引で繰り返し観察できる。F: 各掃引毎に、チェックボックスで選択された測定値がプロットされる。緑線、 $[K^+]/10$ 、黄土色、 $[Na^+]$ (Mm)、赤線、自発活動電位発火頻度 / 10, 黒線 Ca^{2+} トランジェント

は、最大拡張期電位以前の再分極相に始まり、最大拡張期電位付近で最大値を示している。注意深く見ると、 I_{Kr} の脱活性化は膜の再分極が完成する以前にすでに始まっている。言い換えると I_{Kr} 脱活性化がきっかけになって脱分極がもたらされることを示していて、最大拡張期電位発生の最も先導者的な役割を示している。 dV_L/dt は続いて平坦な経過に移り緩徐脱分極の直線的な勾配がもたらされるが、ここでは、 I_{Kr} の寄与が次第に減少するのに対して、 I_{st} と I_{CaL} による dV_L/dt の増加がこれを補っている。一方、 I_{st} と I_{CaL} コンダクタンスの上昇は膜の脱分極による開口確率上昇によってもたらされて、脱分極速度を加速する働きがある。

活動電位立ち上がりの最初の指数関数的な上昇相(‘活動電位フット’)では、 V_L 変化(パネルC)で見ると I_{CaL} による寄与と I_{NaCa} による寄与が主体をなしている。 I_{CaL} の活性化は、膜電位依

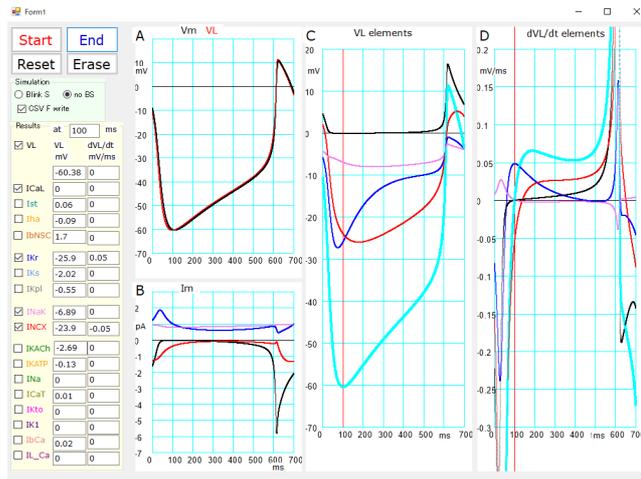


図3 詳細モデルにおけるリードポテンシャル解析結果

存性ゲートの開口遷移によるものであり、 I_{NaCa} の増大は筋小胞体からの自己再生的な Ca^{2+} 放出 (Ca^{2+} -induced Ca^{2+} -release)によってもたらされる。つまり、 I_{CaL} を介する Ca^{2+} 流入、それによる局所 Ca^{2+} 濃度の上昇がリアノジン受容体チャンネルを活性化した結果である。局所濃度の上昇は $NaCa$ 交換体(NCX)による Na/Ca 交換輸送を増大して、結果的に内向き電流を誘導して、細胞膜を脱分極させる方向に働く。パネルCに示された I_{NCX} の V_L への寄与は負の値を持っていて、拡張期 V_L へ直接寄与している。これは、パネルBで示されているわずかに内向き I_{NCX} (赤線)からすると一見矛盾しているように見えるかも知れない。これは、瞬時平衡電位である V_L への寄与はあくまでコンダクタンス (G_{NaCa}) x E_{NaCa} の積で決定されるのであり、 E_{NaCa} が負の値を持つことによる。 $(E_{NaCa} = 3E_{Na} - 2E_{Ca})$ パネルAには、約100ms近くの最大拡張期電位(-60mV)から550ms付近のオーバーシュートまでの緩徐脱分極の経過中の膜電位(黒線)とリードポテンシャル V_L (赤線)が示されている。パネルBには I_{Kr} (青線)、 I_{NaK} (ピンク)、 I_{CaL} (黒線)、 I_{NCX} (赤線)が示してある。パネルCは V_L (水色太線)、パネルDには dV_L/dt (水色太線)に加えて、それらの各成分が表示されている。

存性ゲートの開口遷移によるものであり、 I_{NaCa} の増大は筋小胞体からの自己再生的な Ca^{2+} 放出 (Ca^{2+} -induced Ca^{2+} -release)によってもたらされる。つまり、 I_{CaL} を介する Ca^{2+} 流入、それによる局所 Ca^{2+} 濃度の上昇がリアノジン受容体チャンネルを活性化した結果である。局所濃度の上昇は $NaCa$ 交換体(NCX)による Na/Ca 交換輸送を増大して、結果的に内向き電流を誘導して、細胞膜を脱分極さ

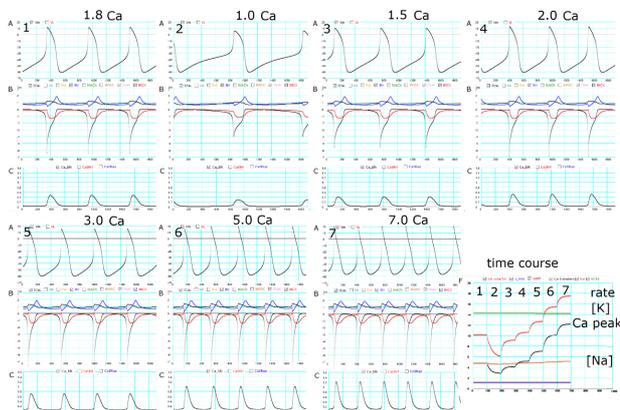


図4 自発活動に対する Ca^{2+} の影響

れた。濃度の上昇と共に活動電位発射頻度は右下パネルに見られるように上昇し(rate)、 Ca^{2+}

[細胞外 $[Ca^{2+}]_o$ 依存性解析]

外液の $[Ca^{2+}]_o$ を 1.8、1.0、1.5、2.0、3.0、5.0、7.0 mM と変化した際の時間経過を図4右下パネルFに示し、それぞれの試験液で得られた活動電位(A)、イオン電流(B)、 Ca^{2+} トランジェント(C)の記録を示している。1.0 mM 以下では自発活動電位は停止して、-30 mV 付近に静止電位が記録さ

トランジェントの振幅も上昇した。

(4)[研究成果のまとめ]

今回のシミュレーション研究の結果、2010年に「洞房結節ペースメーカー細胞において細胞内 Ca^{2+} 濃度の膜電位変化への寄与は小さい」と結論づけた当時の見積もりよりも、NCXは大きな寄与をもっていることがわかった。その理由として考えられるのは、今回新規に開発されたCICRモデルを細胞モデルに導入することで細胞内 Ca^{2+} 動態がより詳細に計算できるようになり、非常に高い数十～数百 μ Mに達する局所 Ca^{2+} 濃度が再現できるようになったことである。実際に、このCICRモデルを導入したことにより、細胞外 Ca^{2+} 濃度変化に対する細胞応答が現存する心筋細胞モデルで恐らく唯一再現できるモデルとなった。この高濃度の局所 Ca^{2+} がjnc-spaceに配置されたNCXを活性化するため、新たなCICRモデルを導入する前のモデルと比較してNCXの寄与が大きくなったと考えられる。しかし、モルモットの単離洞房結節ペースメーカー細胞を用いた実験の結果からは、「細胞内 Ca^{2+} 濃度の膜電位変化への寄与は小さい」ことが示されており、動物種や細胞のタイプによる差異も十分に考慮する必要があると言える。本研究を進める際、リズム形成メカニズムの解明ということで、同時並行でヒトiPS細胞由来心筋細胞、ラット肺静脈心筋細胞の開発も進めてきた。特にラット肺静脈心筋細胞におけるアドレナリン刺激時のリズム形成は実験的にもシミュレーション結果からも完全にC clock由来であり、洞房結節ペースメーカー細胞で得られた結果とは全く異なるものであり興味深いものであった。

本研究の成果は、「心筋細胞フィジオーム理解のための電子教科書“e-Heart”」,「心機能フィジオーム理解のための電子教科書“e-Heart”」の共著書2冊で発表されており、ラット肺静脈心筋細胞におけるアドレナリン刺激時のリズム形成についての論文はInternational Journal of Molecular Sciencesに投稿済みであり、現在査読中である。

<引用文献>

1) Wilders R. Med Biol Eng Comput 2007. 2) Kurata Y et al. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2002. 3) Maltsev VA, Lakatta EG. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2009. 4) Sarai N et al. Jpn J Physiol. 2003. 5) Stern et al. J Gen Physiol 2014. 6) Musa et al. J Histochem Cytochem. 2002. 7) Hinch et al. Biophys J 87:3723-3736, 2004. 8) Stern et al. J Gen Physiol 142:257-274, 2014.

<引用業績>

【論文1】Cha CY, Nakamura Y, Himeno Y, Wang J, Fujimoto S, Inagaki N, Earm YE, Noma A. 『J Gen Physiol』 Jul;138(1):21-37, 2011年7月(査読有)【論文2】Himeno Y et. al. 『Am J Physiol Heart Circ Physiol』 300(6):H2325-6, 2011年6月(査読有)【論文3】Himeno Y, Toyoda F, Satoh H, Amano A, Cha CY, Matsuura H, Noma A. 『Am J Physiol Heart Circ Physiol』 300(1):H251-61, 2010年10月(査読有)【論文4】Cha CY, Himeno Y, Shimayoshi T, Amano A, Noma A. 『Biophys J』 97(12): 3086-94, 2009年12月(査読有)【論文5】Himeno Y, Sarai N, Matsuoka S. Noma A. 『J Physiol Sci』 Vol.58(1): 53-65, 2008年2月(査読有)【論文6】Himeno Y, Asakura K, Cha CY, Memida H, Powell T, Amano A, Noma A. 『Biophys J』 109(2):415-27, 2015年7月(査読有)

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計6件)

姫野友紀子, 天野晃, 野間昭典 『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料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 日本生理学雑誌 2018 80(4)85-91 http://physiology.jp/wp-content/uploads/2018/10/Lectures_20181101_85-91.pdf 査読有

Kazato Oishi, Yukiko Himeno, Masafumi Miwa, Hiroki Anzai, Kaho Kitajima, Yudai Yasunaka, Hajime Kumagai, Seiji Ieiri, Hiroyuki Hirooka Correcting the Activity-specific Component of Heart Rate Variability Using Dynamic Body

Acceleration Under Free-moving Conditions. *Frontiers in Physiology* 2018 9,1063 doi: 10.3389/fphys.2018.01063 査読有

姫野友紀子, 天野晃, 野間昭典 『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料としての活用に向けて第4回 ヒト心室筋細胞(HuVEC)モデルのCa²⁺誘発Ca²⁺放出(CICR) 日本生理学雑誌 2018 80(3)58-70 http://physiology.jp/wp-content/uploads/2018/07/Lectures_20180801_58-70.pdf 査読有

姫野友紀子, 天野晃, 野間昭典 『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料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Ca²⁺動態と遅延後脱分極(DAD)の発生 日本生理学雑誌 2018 80(2)26-39

http://physiology.jp/wp-content/uploads/2018/04/Lectures_20180501_26-39.pdf 査読有

姫野友紀子, 天野晃, 野間昭典 『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料としての活用に向けて第2回 ヒト心室筋細胞(HuVEC)モデルを用いた早期後脱分極(EAD)の再現 日本生理学雑誌 2018 80(1)3-10

http://physiology.jp/wp-content/uploads/2018/01/Lectures_20180201_3-10.pdf 査読有

姫野友紀子, 天野晃, 野間昭典 『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料としての活用に向けて第1回 Visual Studioを用いた包括的ヒト心室筋細胞モデルの実行 日本生理学雑誌 2017 79(4)64-72 http://physiology.jp/wp-content/uploads/2017/11/Education_20171101_64-72.pdf 査読有

〔学会発表〕(計4件)

Himeno Y, Umehara S, Ono K, Noma A, Amano A Mathematical modeling of noradrenaline-induced automaticity in rat pulmonary vein cardiomyocyte. 第95回日本生理学会大会 2018

Himeno Y, Umehara S, Ono K, Noma A, Amano A Noradrenaline-induced automaticity in pulmonary vein cardiomyocyte. *Cardiac Physiome* 2017 2017

Himeno Y, Maeda A, Ikebuchi M, Amano A, Noma A Biosimulation for integrative understanding of physiological function of the body - a case study using capillary model. 第94回日本生理学会大会 2017

Himeno Y, Powell T, Amano A, Noma A A Human ventricular Excitation-Contraction Coupling Model. *Cardiac Physiome Workshop* 2016

〔図書〕(計2件)

姫野友紀子, 天野晃, 竹内綾子, 竹田有加里, 車采映, 松岡達, 野間昭典, 吉元英一, Trevor Powell 心筋細胞フィジオーム理解のための電子教科書 “e-Heart” 296ページ 丸善雄松堂 2017

姫野友紀子, 天野晃, 野間昭典, 松浦博, 柳(石原) 圭子, 株式会社知能情報システム, Trevor Powell 心機能フィジオーム理解のための電子教科書 “e-Heart” 253ページ 丸善雄松堂 2019

〔その他〕

ホームページ等

仮想的時空間に細胞の活動を実現する電子教材 “e-Heart” <http://www.eheartsim.com/>

6. 研究組織

(1) 研究協力者

研究協力者氏名: 野間 昭典、天野 晃

ローマ字氏名: Akinori Noma, Akira Amano

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。