

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20300152

研究課題名(和文) 細胞内微小力学計測に基づくマルチスケール心筋細胞シミュレーションモデルの開発

研究課題名(英文) Multi-scale simulation model of cardiomyocyte based on the micromechanical measurement of subcellular structure

研究代表者

杉浦 清了(SUGIURA SEIRYO)

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・特任教授

研究者番号：10272551

研究成果の概要(和文)：

共焦点手頭微鏡と原子間力顕微鏡の組み合わせおよび新たに開発した光ピンセットを用いた心筋細胞の微小計測システムを用いて心筋細胞の微細構造を明らかにした。さらにこれらの情報を基に心筋の電気現象、力学現象、代謝現象を微細構造を再現した有限要素法モデルの中で再現するシミュレーションモデルを開発した。モデルは細胞内のイオン代謝産物について実験で得られる解像度を超えた詳細な情報を提供し病態生理の解明に有用であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：

In this study, first, we developed novel experimental techniques to evaluate the subcellular structures and properties of ventricular myocytes. Based on these findings, we, then, created a 3D finite element of myocyte in which cardiac electrophysiology, contraction, and metabolism are integrated with detailed subcellular structures. The model successfully reproduced and provided the distribution of ions and metabolites beyond the limit of current experimental observations thus proved to be a useful tool for the study of cardiac pathophysiology.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	7,400,000	2,220,000	9,620,000
2009年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2010年度	3,300,000	990,000	4,290,000
年度			
年度			
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

研究分野：生体シミュレーション

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：心筋細胞、微小計測、細胞シミュレーション

## 1. 研究開始当初の背景

ポストゲノム時代における重要な研究領域の一つであるフィジオームプロジェクトの中心に生体機能のシミュレーションがある。我々は分子の動態から血液の駆出までを同時に再現するマルチスケール・マルチフィジックス心臓シミュレータの開発を進めているが、その中で分子レベルと臓器レベルの現象をつなぐ位置にある心筋細胞モデルを改

良し分子生物学的知見と臨床での観察をつなぐ真に有用なツールとすることが必要であった。特に従来行われてきた細胞シミュレーションでは細胞内微細3次元構造およびその中におけるミクロレベルの力学現象の解明と再現という課題が実験、計算の両面において技術的な問題から研究が遅れていた。一方で我々の研究グループは心臓および心筋細胞のマルチスケールシミュレーション

で世界をリードしていると同時にカーボンファイバーを用いた細胞の力学計測 (Sugiura S et al. *Nature Protocol* 2006, Nishimura et al *Circ Res* 2006) および共焦点顕微鏡を用いた新しい live cell imaging 法 (Nishimura et al. *Diabetes* 2007) においても十分な経験と実績を有していた。

## 2. 研究の目的

新しい実験系の開発による心筋細胞内の3次元構造の観察および細胞内の力学情報伝達系の測定という実験研究とモデル化を同時に行い相互のフィードバックのもとにマルチスケール心筋細胞シミュレーションモデルを開発することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 心筋細胞の微小計測

4-6週令のWistarラットから麻酔下に心臓を摘出し心室筋細胞を酵素灌流にて単離した後以下の計測を行った。本実験は東京大学動物実験実施規則に従い研究科動物実験委員会の承認の下に実施した。

① 原子間力顕微鏡 (AFM) と共焦点顕微鏡 (CM) の重ね合わせによる細胞構造の観察：単一心筋細胞を固定し細胞膜、核、細胞骨格を色素で染色し共焦点顕微鏡によるt-管構造の観察とAFM (nanowizard, JPK) による表面構造の観察を同時に行った。さらに未固定の細胞に対して押し込み試験も実施した。一部の細胞については筋原線維を分離しAFMによる観察を行った。

### ② 光ピンセットによる微小力学測定

接着分子であるインテグリンと特異的に結合するRGDペプチドを微小ビーズにコートし光ピンセットで捕捉・走査することでインテグリンを介して局所に力学刺激を与える系を構築した。図1にシステムの概要と細胞表面に付着したビーズの像を示す。ビーズの像をトラッキングすることによって変位と力の同時計測を可能とした。

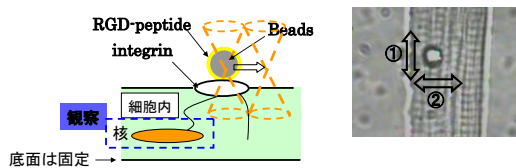


図1 微小刺激印加システム 細胞上のビーズ

細胞の応答は核の変位および細胞内カルシウム濃度の変化によって評価した。さらに少数の細胞についてはマイクロインジェクションによってビーズを細胞内に注入し細胞

内での操作を試みた。

### (2) 心筋細胞モデル

心筋細胞の微細構造の観察および微小力学計測の結果に基づいて電気現象、力学（収縮・弛緩）現象および代謝を構造に局在を再現しながら統合した有限要素法モデル (図2) を構築した。

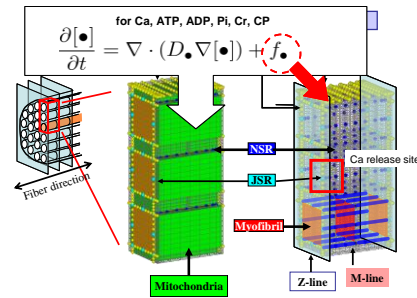


図2 有限要素法心筋細胞モデル

この枠組みの中でCaの放出、拡散、結合くみ上げ、収縮タンパク相互作用による力の発生と収縮、ミトコンドリアによるATP合成とクレアチンシャトルによるエネルギー輸送、ミオシンやイオンポンプによるATPの消費分解が互いの相互作用の基に計算された。

## 4. 研究成果

### (1) 心筋細胞の微小計測

① 原子間力顕微鏡 (AFM) と共焦点顕微鏡 (CM) の重ね合わせによる細胞構造の観察：図3に細胞膜および内部微細構造を示す。

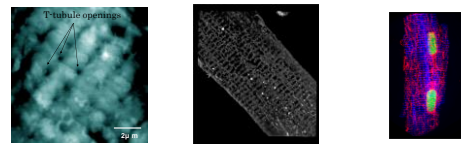


図3 細胞膜 t-管 核、骨格

図4に示すのは単一筋原線維のCMおよびAFM像である。Z帯のみならずA, I帯までもが観察された。

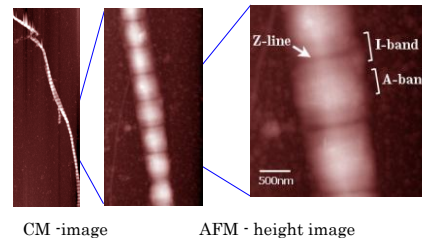


図4 筋原線維のCM およびAFM像

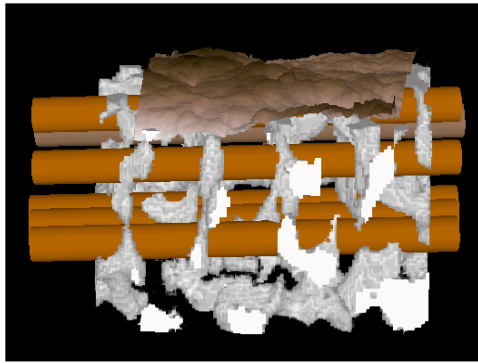


図5 細胞の立体構造

これらを基に図5に示すように細胞の3次元構造を再現した。このようなAFMとCMの重ね合わせによる心筋細胞内構造の再現はこれまでに報告がないものである。

②光ピンセットによる微小力学測定  
ビーズを細胞の長軸および短軸方向に動かしたところ核はいずれの場合も短軸方向に移動する傾向が認められた。変位量は核と刺激点間の距離には依存しなかったが薬剤による細胞骨格の修飾によって小さくなる傾向が認められた。この結果はインテグリンから核への細胞骨格を介した力学的な結合の存在を示している。細胞への力学的刺激が細胞内情報伝達系を通じて核に伝わり細胞のリモデリングを惹起することが知られているが今回の結果は力学的刺激が直接核に伝達される可能性を示唆するものであり心臓の適応現象にとって重要な知見である。一方細胞内カルシウムの応答についても刺激を加えた点から離れた場所でカルシウムスパイクが誘発されること、細胞骨格の修飾によって発生頻度が減少することが観察され細胞表面の接着分子からおそらく筋小胞体上のカルシウム放出チャンネルへの力学的なリンクが存在しているのではないかと考えられた。心筋細胞内での操作については抵抗が大きく反応は得られなかった。

## (2) 心筋細胞モデル

図6に計算により再現された収縮中のサルコメア内におけるカルシウム濃度、発生力、ADP濃度の分布の変化を示す。

z帯部分において筋小胞体から放出されたカルシウムがM帯に向かって拡散するにつれてアクチン・ミオシンの相互作用によって収縮力が発生しそれに伴ってATPの分解によるADP濃度の上昇が進行していくことが明らかにされている。

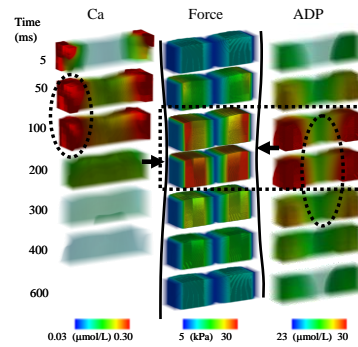


図6 サルコメア収縮シミュレーション

さらに図7にはこれらに加えてクレアチン、アデニンヌクレオチド輸送体の活性を示す。

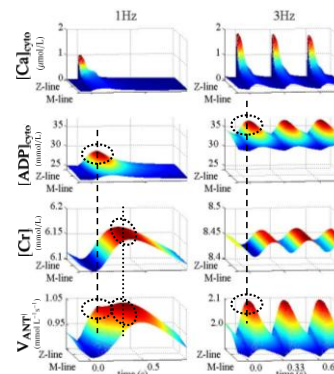


図7 収縮中の代謝の変化、左：1Hz 右 3Hz

これらの結果からミトコンドリアにおけるATP合成の調節に関わる代謝産物ADPと細胞内カルシウムの役割が明らかになった。このような心筋の電気現象、力学現象、代謝を統合したモデルは世界初であり心筋研究に大きな役割を果たすと期待される。

以本研究において実験とシミュレーションモデルを相補的に組み合わせる両者の限界を越えるという試みを行い一定の成功を収めたと考える。今後さらに詳細なモデル化を完成し病態モデルへも応用していくことを予定している。

## 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4件)

1) Hatano A, Okada J, Hisada T, Sugiura S Critical role of cardiac t-tubule system for the maintenance of contractile function revealed by a 3D integrated model of cardiomyocytes J Biomech 45:815-823 (2012) 査読有

2) 波田野明日可、岡田純一、鷺尾巧、久田俊明、杉浦清了 心筋細胞のエネルギー代謝におけるミトコンドリアと筋小胞体  $Ca^{2+}$  放出チャンネルの相対位置の重要性 生体 医工学 Vol. 49, No. 6(2011), p. 829-835 査読有

3) Hatano A, Okada J, Washio T, Hisada T, Sugiura S A 3-D simulation model of cardiomyocyte integrating excitation-contraction coupling and metabolism Biophys J 101: 2601-2610 (2011) 査読有

4) Seo K, Inagaki M, Nishimura S, Hidaka I, Sugimachi M, Hisada T, Sugiura S Structural heterogeneity in the ventricular wall plays a significant role in the initiation of stretch-induced arrhythmias in perfused rabbit right ventricular tissues and whole heart preparations Circ Res 106:176-184 (2010) 査読有

[学会発表] (計 11 件)

1) 波田野明日可、岡田純一、鷺尾巧、久田俊明、杉浦清了 「心筋細胞内 3 次元構造を再現した電気生理・エネルギー代謝・力学マルチフィジックスシミュレーション」 第 50 回日本生体医工学会大会 平成 23 年 4 月 30 日 東京電機大学

2) Hatano A, Okada J, Washio T, Hisada T, Sugiura S Juxtaposition of Mitochondria to the  $Ca^{2+}$  release site is crucial for the cardiac energy balance - A 3D simulation of cardiomyocyte 19<sup>th</sup> International Conference of the Cardiovascular System Dynamics Society Sept. 24 2010 Fukuoka

3) Seiryu Sugiura, Takumi Washio, Jun-ichi Okada, Hiroshi Watanabe, Toshiaki Hisada Ut Heart, a Multi-scale, Multi-physics Simulator 19<sup>th</sup> International Conference of the Cardiovascular System Dynamics Society Sept. 25 2010 Fukuoka

4) Seo K, Inagaki M, Hidaka I, Sugimachi M, Nishimura S, Okada J, Washio T, Watanabe H, Hisada T, Sugiura S Effect of stretch on ventricular arrhythmia 5th International Workshop Cardiac mechano-electrical coupling and arrhythmias Oxford England 1-4 September 2010

5) Masumoto S, Fukano H, Iwanami S, Yamashita H, Hisada T, Sugiura S Micromechanical measurement by laser optical tweezer revealed anisotropy in the stiffness of rat ventricular myocytes The 20<sup>th</sup> World Congress ISHR May 16, 2010 Kyoto

6) Masumoto S, Fukano H, Iwanami S, Yamashita H, Hisada T, Sugiura S Micromechanical measurement by laser

optical tweezer revealed anisotropy in the stiffness of rat ventricular myocytes The 26<sup>th</sup> Annual Meeting of International Society for Heart Research Japanese Section Dec 4, 2009 Sapporo

7) Fukano H, Masumoto S, Iwanami S, Yamashita H, Hisada T, Sugiura S Induction of  $Ca^{2+}$  spark by mechanical stress is dependent on the direction of applied stresses in the rat ventricular myocytes The 26<sup>th</sup> Annual Meeting of International Society for Heart Research Japanese Section Dec 4, 2009 Sapporo

8) Sugiura S, Hatano A, Washio T, Okada J, Watanabe H, Hisada T Multi-scale approach for the understanding of cardiac function Arrhythmia and muscle contraction (Irisawa Memorial Symposium) The 36th Congress of the International Union of Physiological Sciences July 30, 2009 Kyoto

9) K Seo, M Inagaki, S Sugiura Inhomogeneous structure of the ventricular wall is a substrate for fatal arrhythmias by modulating the global stretch to create heterogeneous cellular response 32nd Annual Meeting of the Japanese Working Group "Cardiac Structure and Metabolism" Osaka 2009. 7. 4

10) Fukano H, Seo K, Nishimura S, Yamashita H, Sugiura S Is the contractile dysfunction of detubulated cardiomyocytes caused only by the asynchrony of  $Ca^{2+}$  regulation? The 25<sup>th</sup> Annual Meeting of International Heart Research Japanese Section Dec 5 2008 Yokohama

11) Seo K, Inagaki M, Nishimura S, Sugimachi M, Hisada T, Sugiura S Contribution of structural heterogeneity to stretch-induced arrhythmias examined in ventricular tissue and isolated myocytes. The 25<sup>th</sup> Annual Meeting of International Heart Research Japanese Section Dec 5 2008 Yokohama

[その他]

ホームページ等

<http://www.sml.k.u-tokyo.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉浦 清了 (SUGIURA SEIRYO)

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・特任教授

研究者番号：10272551

(2)研究分担者

久田 俊明 (HISADA TOSHIAKI)

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・教授

研究者番号：40126149

渡邊 浩志 (WATANABE HIROSHI)

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・講師

研究者番号：10282500

山下 尋史 (YAMASHITA HIROSHI)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：50323572