

機関番号：33303

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20590220

研究課題名（和文）マウス ES 細胞由来心筋細胞の分化成熟過程における分岐構造の非線形力学的解析

研究課題名（英文）Dynamical properties of mouse ES-cell derived cardiomyocytes during differentiation: insights from bifurcation analysis based on nonlinear dynamical system theory

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

研究成果の概要（和文）：

本研究の目的は、マウス胚性幹 (ES) 細胞由来心筋細胞の分化成熟過程における分岐構造を解析することにより発生過程における心筋自動能発現制御の力学的メカニズムを解明することであった。本研究では、まず電気生理学の実験データを基にマウス ES 細胞由来心筋細胞の非線形力学系モデル(洞結節型・心房筋型・心室筋型)を作成した。これらモデル細胞システムの分岐構造(自動能発現・停止過程での安定性とダイナミクス)を理論的に解析することにより、ES 細胞由来心筋細胞の分化成熟過程における自動能発現・消失は非線形システムに生じる分岐現象であること、分岐の出現には形質膜イオンチャネル電流と細胞内 Ca^{2+} 動態が関与していることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

The aim of this study was to elucidate the dynamical mechanisms of generation and regulation of pacemaker activity during differentiation of mouse ES-cell derived cardiomyocytes. We have constructed nonlinear dynamical systems (nonlinear ordinary differential equations) of the ES-cell derived cardiomyocytes (sinoatrial node-type, atrial-type, and ventricular-type) on the basis of electrophysiological data. Analyzing the bifurcation structures (ways of generating or abolishing pacemaker activity) of these model systems, we have clarified that the emergence and abolition of pacemaker activity during differentiation of the cardiomyocytes are bifurcation phenomena, and that both sarcolemmal ionic channel currents and intracellular Ca^{2+} dynamics are involved in occurrence of the bifurcations.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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（システム生理学・フィジオーム）

キーワード：非線形力学、生物・生体工学、生物物理、生理学、再生医学

1. 研究開始当初の背景

近年、自己複製能と多分化能を合わせ持つ胚性幹(ES)細胞が発生生物学分野で広く用いられるようになり、1998年にヒトES細胞が樹立されてからは、ES細胞の再生医療への応用が期待されている。臨床応用の一つとして、循環器分野ではES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。一方、発生生物学・生理学的観点からみれば、ES細胞からの心筋分化過程は胎生期(発生過程)での心筋分化過程と本質的に同じであり、ES細胞は発生過程での心筋自動能発現機構(及び固有心筋への分化過程における自動能消失機構)の解明における格好の実験系でもある。即ち、ES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(及びその制御機構)の解明という重要な発生生物学・生理学的意義をもっている。しかしながら、ES細胞由来心筋細胞の自動能に関する研究報告は極めて少ない。

心筋自動能発現機構の解析は、一般的には電気生理学の実験のみに依存してきた。しかしながら、心筋細胞における自動能の発現は、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変化)の一つと考えられ、従来の方法論(実験の積み重ね)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、我々は以前より、洞結節の生理的自動能及び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いる。最近では、ウサギ洞結節細胞の新しい非線形力学系モデルを作成し、モデルシステムの分岐構造(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(各イオンチャネル電流系の役割)を解明した。また、新たにヒト心室筋モデルを作成し、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。これらの成果は、非線形力学系の分岐理論に基づく新たな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。ES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。しかしながら、このような非線形システム論的アプローチによる研究を行っている研究室は我々の研究室のみであり、従来通りの実験的解析のみに終始しているのが現状である。これではES細胞由来心筋細胞における自動能の発生機序解明あるいはその最適バイオペースメーカーシステム構築への応用は不可能であり、分岐

理論に基づく新しいアプローチが必要不可欠と考えられる。このような背景と経緯から、本研究課題“マウスES細胞由来心筋細胞の分化成熟過程における分岐構造の非線形力学的解析”に取り組むこととした。

2. 研究の目的

本研究は、「非線形システムである心筋細胞の分岐構造を理論的実験的に解析し、心筋自動能の発生機序を非線形力学的観点から統一的・体系的に理解し記述する」ことを目的とする一連の研究の一つであり、その主目的は「マウス胚性幹(ES)細胞由来心筋細胞の分化成熟過程における分岐構造を解析することにより、発生過程における心筋自動能発現制御の力学的メカニズムを解明する」ことである。

本研究では、心筋自動能発生機序の研究に用いてきたモデリング技術と非線形力学的解析手法により、①マウスES細胞由来心筋細胞(分化早期)の非線形力学系モデル(洞結節型・心房筋型・心室筋型)を作成し、②モデルシステムの分岐構造(自動能発現・停止過程における定常状態の安定性と周期軌道のダイナミクス)を理論的に解析することにより、ES細胞由来心筋細胞の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(特に形質膜イオンチャネル電流と細胞内Ca²⁺動態の役割)を明らかにする。

先に述べたように、ES細胞由来心筋細胞における自動能の発現制御機構を解明することは、最適バイオペースメーカーシステム設計のための理論的基盤を構築する上で必要不可欠である。ヒトES細胞由来心筋細胞に対する自動能発現機構と分岐構造の解析が可能となれば、イオンチャネル遺伝子発現調節手法に基づく理想的なバイオペースメーカーシステム設計のための理論的基盤を構築することができるはずである。本研究では、分岐理論を基盤とした新しいアプローチにより、発生過程での心筋細胞における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へ向けた理論的基盤の確立を目指す。

3. 研究の方法

本研究では、①これまでのマウスES細胞由来心筋細胞を用いた実験および文献より得られたデータの収集(データベース作成)と分化成熟過程における電気生理学的变化の分析、②マウスES細胞由来心筋細胞(分化早期)の非線形力学系モデルの作成、③モデル細胞の分岐構造(平衡点の安定性とダイナミクスのパラメータ依存性変化)と自動能発現条件の解析により、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検証

した。

(1) ES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分析

心筋細胞の分化成熟にともなって各イオンチャンネルの密度・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ンネル電流密度・動態の変化)を文献検索と追加実験により解析し、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できるように設定する。

分化早期～後期の心筋細胞について、これまでの実験では十分なデータが得られていないイオンチャンネル電流について、パッチクランプ法を用いた追加実験により、その動態を解析する。培養 Nkx2.5-GFP knock in マウス ES 細胞から形成された自動収縮を示す胚様体(EB)より心筋細胞を分離・培養し、ホールセル・パッチクランプ法により膜電位(活動電位)と各イオンチャンネル電流および準定常状態での電流-電圧関係を測定する。電流固定モードでの膜電位(活動電位)波形により、洞結節型・心房筋型・心室筋型細胞を同定する。さらに電位固定モードにて、イオンチャンネル電流(特に L 型 Ca^{2+} チャンネル・ Na^+ チャンネル電流・過分極活性化陽イオンチャンネル・遅延整流 K^+ チャンネル・内向き整流 K^+ チャンネル電流)の動態を解析する。これらの実験結果と文献収集により、分化早期(4~6日)・中期(7~11日)・後期(12~18日)の洞結節型・心房筋型・心室筋型細胞における各形質膜イオンチャンネル電流系と細胞内 Ca^{2+} 動態の変化を分析し、モデル構築のためのデータベースを作成する。

(2) ES細胞由来心筋細胞モデルの作成とシミュレーションによる検証

既に作成したウサギ洞結節細胞モデルと既存のマウス心室筋モデルをベースモデルとし、分岐解析に適したマウスES細胞由来心筋細胞の非線形力学系モデルを作成する。ES細胞由来心筋細胞には、a)洞結節型、b)心房筋型、c)心室筋型の3つの型がある。モデリングに必要なイオンチャンネル動態に関する実験データを収集しつつ、まず心筋分化早期の洞結節型モデルを作成する。さらにこの洞結節型モデルをベースモデルとして、分化早期の心房筋型・心室筋型モデルを構築する。

ウサギ洞結節細胞モデルにおけるイオンチャンネル電流の動態と、ES細胞由来洞結節型細胞(分化早期4~6日)から得られたイオンチャンネル電流の動態を比較解析し、各チャンネル電流系に関する分化早期洞結節型バージョンを作成する。これらの数式を基に、活動

電位を再構成するための分化早期洞結節型細胞モデルを構築し、活動電位の再構成及びそのダイナミクス(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・プロットのための解析システム

(MATLAB プログラム群)を作成する。自発性活動電位波形とその各種イオンチャンネル抑制時における変化をシミュレートし、実験データと比較検証する。さらに、この分化早期洞結節型細胞モデル(第1版)をベースとし、追加実験と文献により得られたデータを基に各イオン電流系の動態を再定式化し、改良型モデル(完成版)を構築する。再度、自発性活動電位波形とその各種イオンチャンネル電流抑制時における変化をシミュレートし、実験データと比較検証する。

分化早期洞結節型細胞モデルおよびマウス心室筋細胞モデルにおけるイオンチャンネル電流の動態と、ES細胞由来心房筋・心室筋型細胞(分化早期4~6日)から得られたイオンチャンネル電流の動態を比較解析し、各イオン電流系のキネティクスを数学的に再定式化(分化早期心房筋型・心室筋型バージョンを作成)する。これらの数式を用い、活動電位再構成の可能な「分化早期心房筋型・心室筋型モデル」を構築する。洞結節型モデルと同様に、活動電位及びそのパラメータ依存性変化を計算・図式化するための解析システム(MATLAB プログラム群)を作成する。活動電位波形とその各イオンチャンネル電流抑制時における変化をシミュレートし、実験データと比較検証する。

(3) 分岐解析システムの構築とES細胞由来心筋細胞の分化成熟過程における分岐構造の解析

各細胞型の分化成熟過程における電気生理学的変化をモデルパラメータの変化に置き換え、分化早期の洞結節型・心房筋型・心室筋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。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するために、数値計算用ソフトウェア(MATLAB 7)及び分岐追跡用ソフトウェア(MATCONT)を用いて、①システムの平衡点とその安定性、②活動電位のパラメータ依存性変化(分岐パターン)を計算・図式化する(分岐図を作成)ための解析システム(MATLAB プログラム群)を構築する。

作成した分岐解析システムを用い、マウスES細胞由来心筋細胞の分化成熟過程における各イオン電流・細胞内 Ca^{2+} 動態の変化を分岐パラメータの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」を作成する。得られた分岐図を基に、非線形

力学系の分岐理論に従って各モデルシステム（洞結節型・心房筋型・心室筋型）の分岐構造（自動能発現・停止過程におけるシステムの平衡点とその安定性、活動電位のパラメータ依存性変化など）を比較解析することにより、ES細胞由来心筋細胞の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（各イオンチャネル電流系・細胞内 Ca^{2+} 動態の役割）を明らかにする。

4. 研究成果

(1) ES細胞由来心筋細胞の電気生理学的特性のモデル化と分岐解析システムの構築

マウス・ウサギ成体洞結節細胞及びマウス ES細胞由来洞結節細胞から得られたイオンチャネル電流の動態を比較解析した結果、①各イオンチャネル電流系の膜電位依存性キネティクスに本質的な違いはないが、各々のコンダクタンスは分化成熟に伴って経時的に変化し、その過程はイオンチャネルの種類によって異なること、さらに②成体の洞結節細胞に比べて Na^+ チャネル電流密度が相対的に高いことが明らかとなった。これらの実験結果を基に、成体洞結節細胞モデルにおける各イオンチャネルの最大コンダクタンス値を調整し、マウス ES細胞由来心筋ペースメーカー（分化早期洞結節型）細胞の電気生理学的特性を再現する力学系モデル（連立非線形常微分方程式）を構築した。活動電位の再構成及びそのダイナミクス（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・プロットのための解析システム（プログラム群）を作成し、自発性活動電位波形とその各イオンチャネル電流抑制時における変化をコンピュータ・シミュレーションにより解析して、本モデルが実験データを再現できることを確認した。さらに、本モデル細胞の分岐構造（過分極負荷による自動能の変化など）を解析するための MATLAB プログラムを完成させた。

また、洞結節型（及びマウス心室筋）細胞モデルにおけるイオンチャネル電流の動態と、ES細胞由来心房筋型・心室筋型細胞から得られたイオンチャネル電流の動態を比較解析することにより、心房筋型・心室筋型細胞モデル（非線形力学系モデル）を作成した。科学技術計算ソフトウェア (MATLAB 7) を用いて、活動電位波形のパラメータ依存性変化の計算・プロットのための解析プログラムを作成し、これらのモデル細胞が実験データ（自発性活動電位波形とその各イオンチャネル電流抑制時における変化）を十分に再現できることをコンピュータ・シミュレーションにより確認した。さらに、洞結節型モデルと同様に、新たに作成したモデル細胞のパラメータ依存性分岐構造（システムの平衡点とその

安定性、活動電位のパラメータ依存性変化）を解析するためのシステム (MATLAB プログラム群) を完成させた。

(2) ES細胞由来心筋細胞における自動能発現の力学的機序

作成した分岐解析システムを用い、心筋ペースメーカー（洞結節型）細胞モデルのパラメータに依存した分岐構造を解析し、心筋細胞の分化成熟過程における自動能出現の非線形力学的メカニズムを検証した。実験で得られた心筋細胞の分化成熟過程における各イオン電流・細胞内 Ca^{2+} 動態の変化を分岐パラメータの変化としてシミュレートし、モデルシステムのパラメータ依存性分岐パターンを分岐図により比較解析した結果、各イオンチャネル電流系・細胞内 Ca^{2+} 動態の役割に関する以下の結論を得た。

- ① L型 Ca^{2+} チャネル電流は平衡点不安定化作用をもち、心筋自動能（自発性活動電位）の発現に寄与し得る（胎生期における自動能の初発に中心的役割を演じている可能性がある）。
- ② Na^+ チャネル電流は過分極活性化陽イオンチャネル電流 (I_T) との協同作用により、平衡点不安定化・自動能誘発作用を示すとともに、心房筋からの過分極負荷に対するロバスト性を強化する。ES細胞由来心筋細胞の Na^+ チャネル電流密度は比較的大きく、自動能の発現・維持に寄与している。
- ③ 過分極活性化陽イオンチャネル電流 (I_T) は Na^+ チャネル電流をもつ ES細胞由来心筋細胞の平衡点を不安定化（または安定平衡点を消去）することにより自動能発現に寄与するとともに、過分極負荷に対するロバスト性を強化する。
- ④ Na^+/Ca^{2+} 交換電流 (I_{NCX}) は細胞内 Ca^{2+} 動態を安定化するが、自動能発現には比較的大きい I_{NCX} 電流が必要である。 I_{NCX} 電流が小さい場合、筋小胞体 Ca^{2+} クロックによる自発性細胞内 Ca^{2+} 振動が自動能発現に寄与する可能性がある。
- ⑤ L型 Ca^{2+} チャネルが比較的小さい分化初期の心筋細胞では、筋小胞体 Ca^{2+} クロックによる細胞内 Ca^{2+} 動態の不安化（自発性 Ca^{2+} 振動）に依存した自動能が生じ得る。

これらの結果は、発生過程での心筋自動能発現機構を明示するものであり、徐脈性不整脈の新たな治療法であるバイオペースメーカーシステムの設計においても極めて有用な理論的基盤となるものである。

(3) 心房筋・心室筋型細胞における自動能消失の力学的機序

心房筋・心室筋型細胞は分化成熟過程においてその自動能を失う。分岐解析システムを用いて心房筋・心室筋型細胞モデルのパラメータに依存した分岐構造を解析し、固有心筋細胞の分化成熟過程における自動能停止の非線形力学的メカニズムを解析した結果、以下の結論を得た。

- ① 内向き整流 K^+ チャネル電流の増加によって生じるサドル・ノード分岐 (安定平衡点の出現) が自動能停止の主なメカニズムである。
- ② 過分極活性化陽イオンチャネル電流 (I_f) の減少は自動能停止を促進するが、 I_f 電流の減少は(理論的には)自動能停止の必要条件でも十分条件でもない。
- ③ 筋小胞体 Ca^{2+} クロック(細胞内 Ca^{2+} 動態)の変化には依存しない。

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1件)

- ① Kurata Y, Matsuda H, Hisatome I, Shibamoto T. Roles of hyperpolarization-activated current I_h in sinoatrial node pacemaking: insights from bifurcation analysis of mathematical models. Am J Physiol Heart Circ Physiol 298: H1748-H1760, 2010. 査読有

[学会発表] (計4件)

- ① 張偉、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筋小胞体 Ca^{2+} クロックおよび Na/Ca 交換機構の役割:モデルシステムの分岐構造解析による検証。第88回日本生理学会大会、2011年3月29日、横浜。
- ② 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細胞内 Ca^{2+} 動態の役割:洞結節細胞モデルの分岐構造解析による理論的検証。第27回日本心電学会学術集会、2010年10月8日、大分 (iichiko 総合文化センター)。
- ③ Kurata Y, Matsuda H, Hisatome I, Shibamoto T. Roles of hyperpolarization-activated current I_h in sinoatrial node pacemaking: insights from bifurcation analysis of mathematical models. 36th International congress of physiological sciences (IUPS2009)、2009年7月28日、京都 (国立京都国際会館)。
- ④ 倉田康孝、松田裕之、久留一郎、芝本利重。洞結節自動能の発現維持における過分極活性化陽イオンチャネル電流の役割:洞結節細胞モデルの分岐構造解析によ

る検証。第25回日本心電学会学術集会、2008年11月1日、新潟(朱鷺メッセ)。

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