

論文の内容の要旨

論文題目

心筋細胞の微細構造を考慮した電気生理・代謝・力学統合 マルチフィジックスシミュレーション

氏 名 波田野 明日可

【1章：序論】

心臓は生命を維持するための中心的臓器である。基礎代謝全体の約 10%を消費し、高いエネルギー消費密度と運動時の負荷上昇に耐える高度な代謝システムを備えている。心筋梗塞や狭心症は心臓のエネルギー代謝不全に起因し、日本で年間約 7 万人もの死者を出す。心臓のエネルギー代謝は個々の細胞内で独立に行われている。心筋細胞内では、その入り組んだ微細構造内において電気現象・力学現象がエネルギー代謝と密接な相互作用して収縮運動が実現される。この複雑な収縮システムにおいては各要素が系全体に及ぼす影響を演繹的に予測することが難しいことが最新の研究を医療に反映する障壁となっており、その打開のため多くの数値的統合による検討が行われてきた。しかし既存の研究は場を考慮しない一点での化学反応プールとしてのモデルである。細胞内の組織構造と生化学反応の分布、結果として発生する濃度勾配や力学的収縮等、空間的な現象の再現は細胞の機能を理解する上で不可欠である。また空間分布を考慮した解析も存在するが、Ca 動態または代謝物質輸送などの特定の物理現象に限ったモデル化であり、相互作用の評価はできない。最新の知見を数値的に統合し、空間分布を考慮し代謝を含めた応答を評価することは、医学的・薬学的に大きな意義を持つ。

本研究では心筋の主要な細胞内器官の微細構造を精緻に再現し、電気生理・エネルギー代謝・力学現象を連成させ、三相理論に基づく有限要素解析を実現することにより、細胞内の構造が細胞の代謝や電気生理現象を介して収縮に与える影響について、実験的な時間・空間解像度の限界を超えて現象を評価・考察することを目的とする。

2 章ではモデルの構築と評価を行い、3-5 章ではモデルを用いて細胞内構造の影響評価を行う。6 章では、影響が小さいとされてきた流体の移動と移流・電位勾配の影響を考慮できる三相理論を実装し、従来モデルの妥当性を裏付けるとともに、精緻なモデル化から知見を得た。

【2章：細胞モデルの構築】

心筋細胞は直径約 $10\mu\text{m}$ 、長さ約 $100\mu\text{m}$ の柱状であり、直径約 $1\mu\text{m}$ の筋原線維 50 本程が走行している。筋原線維は約 $2\mu\text{m}$ 筋節と呼ばれるの周期性構造 (Z 帯 - I 帯 - A 帯 - M 帯 - A 帯 - I 帯 - Z 帯) を持っており、A 帯部のアクチン-ミオシンの相互作用により収縮力を発揮する。収縮力は Ca イオンとエネルギー代謝物質である ATP, ADP, Pi によって制御されている。Ca は以下のように制御される。細胞膜とその Z 帯における陥没構造である T 管に存在する L 型 Ca チャネ

ルから脱分極をトリガとして Ca 放出が発生し、その Ca をトリガとして細胞内小器官である筋小胞体 (SR) の T 管に面した部位 (JSR) からの Ca 放出が起こる。細胞内全体に張り巡らされた SR (NSR) は Ca の汲み上げを担い、弛緩を促す。代謝物質に関しては、収縮に際し ATP を消費、ADP, Pi が発生するが、ATP は収縮を促進、ADP と Pi は阻害する。A 帯で消費されて出た ADP はミトコンドリアにおいて再び ATP へと合成される。ATP や ADP のエネルギー状態はクレアチンキナーゼ (CK) によって CP, Cr (クレアチンリン酸, クレアチン) のエネルギー状態へと変換され、豊富な存在量と比較的拡散係数が高い CP, Cr はエネルギーの輸送と貯蔵を担う [1]。

このプロセスを空間配置を考慮して再現するため、細胞内の筋原線維 (Z-I-A-M 帯), SR, 細胞膜, T 管, ミトコンドリアの配置を考慮した有限要素メッシュを構築し、各点でそれぞれ構築された細胞内小器官のモデルを埋め込んだ (図 1)。細胞内領域全体を Ca と代謝 5 物質 (ATP, ADP, Pi, CP, Cr) の反応拡散場とし、細胞内小器官による流出入を反応項、細胞内での輸送を拡散項により表現した。これにより膜の電気生理モデルの脱分極にトリガされた SR からの Ca 放出が拡散により A 帯に伝播し、収縮力発生を引き起こすプロセスが実現される。更にこの発生収縮力の分布を、境界条件として力学的平衡問題を解く。収縮変形は拡散距離や収縮力発生に影響する。反応拡散と力学平衡を短いタイムステップで交互に解き時間発展問題を解いた。

解析結果は膜のイオン電流と電位変化、各所 (細胞平均, 膜付近, SR 内) Ca 濃度変化, 収縮力と短縮動態, 代謝物質の濃度とフラックスについて、シミュレーションは実験データ [1-3] をよく再現し (図 2), 本モデルの妥当性を示した。

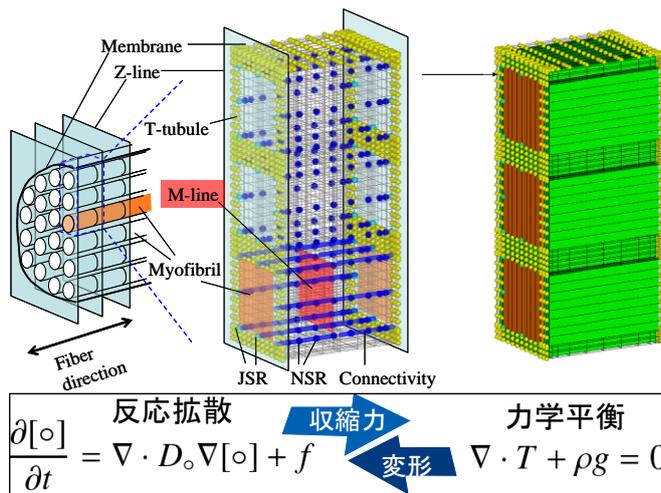


図 1 細胞モデル概要

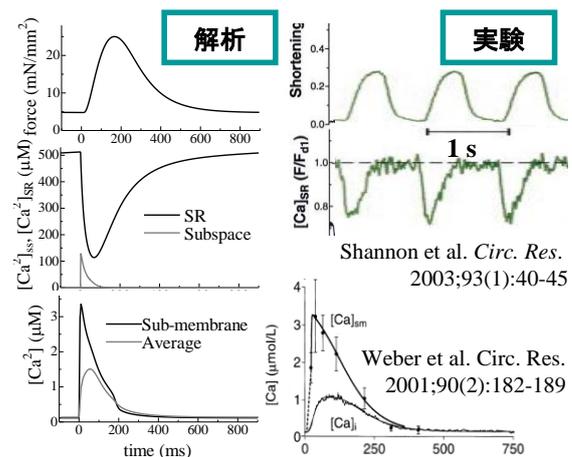


図 2 収縮力・Ca 濃度の実験結果との比較 [2, 3]

【3章：ミトコンドリア内 Ca²⁺と代謝応答】

ミトコンドリアの Ca は代謝を制御することが知られているが、その変化は相反する実験データの存在により解明されていない [4]。ミトコンドリアが Ca 放出口近くの高い濃度を参照する可能性が示唆されているが、実験の解像度は不十分であり、有効な数値解析も行われていない。

そこで 2 章で構築した心筋細胞統合シミュレータを用い、ミトコンドリアの Ca 出入の速度の異なる 2 つの 'fast' と 'slow' とを模擬した解析を行い、β 刺激、周波数変化に伴う細胞質 Ca の変化を実験 [5, 6] と比較した (図 3, 4. 黒が 'slow', 赤が 'fast', 青は 'slow' の局所濃度)。

周波数変化に関しては、'slow' の条件下でのミトコンドリア内 NADH の応答が、より実験と合致する結果となった。一方 β 刺激に関しては、ミトコンドリア内 Ca の平均値は 'fast' の条件下で実験を再現し、'slow' の条件では再現されなかった。しかし、ミトコンドリア内では Ca に大きな濃度勾配が観察され、'slow' の条件においても、ミトコンドリア内 Ca の局所的な濃度を参照すると実験結果と一致する結果が得られ、早い Ca の蛍光を示す実験結果が局所濃度を参照している可能性を示唆した。

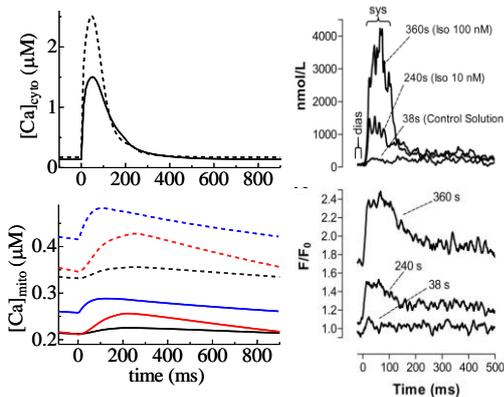


図3 β 刺激に対する応答, 実験[5]との比較

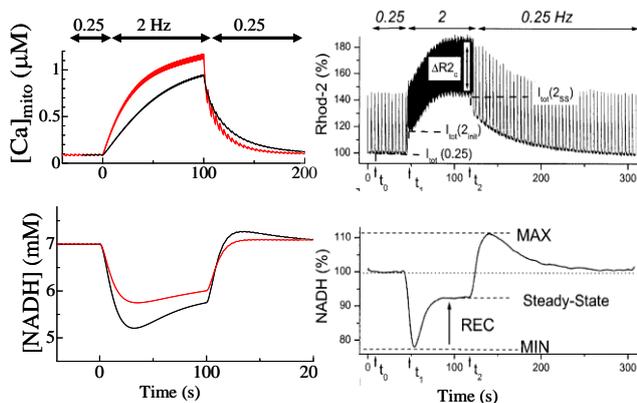


図4 周波数変化に対する応答, 実験[6]との比較

【4章：ミトコンドリアの形態変化と代謝応答】

正常な心筋細胞は筋原線維とミトコンドリアが $2\mu\text{m}$ の規則性をもって配置しているが、虚血状態や心筋症等の病態心筋細胞では内部構造が乱れることが知られている。Ca 放出口である JSR とミトコンドリアは約 50 nm の間隙で隣接しており、Ca のシグナルが直接ミトコンドリアへと伝えられることが重要なのではないかと示唆されている。2章で構築したシミュレータにおいてミトコンドリアとCa 放出口の間隙が 50 nm と 200 nm の形状モデルを作成し、 1 Hz の低頻度刺激と、 3 Hz の高頻度刺激を与え解析を行った。

低頻度刺激下では間隙の異なるモデル間での差異は小さかった (図5)。一方高頻度刺激下ではモデル間でエネルギー状態の差が顕著となり、間隙の大きいモデルでは収縮力が低下した。細胞内のCa の濃度分布を可視化した結果 (図6) より、高頻度刺激下ではCa 濃度勾配が増大し、間隙の差を強調した。ミトコンドリアとCa 放出口の隣接が細胞内のエネルギー代謝に重要であることを示唆すると考えられる。

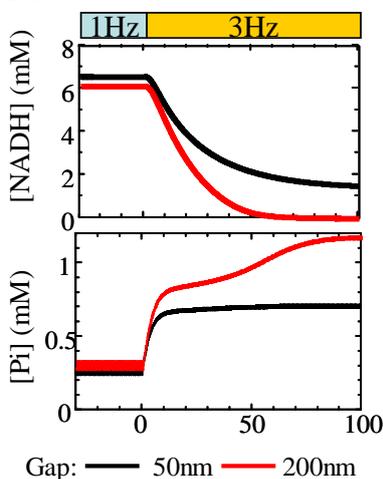


図5 リン酸, NADH の過渡応答

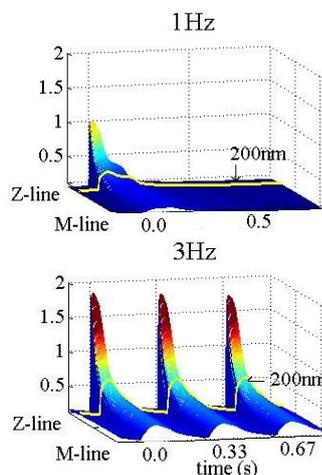


図6 細胞質 Ca の時空間分布

【5章：T管欠損の影響の評価】

細胞膜の陥没構造であるT管は膜の電氣的興奮を細胞内に伝達し、細胞全体のCa 興奮を同期させる役割がある。心不全の心筋細胞においてT管の消失が観察される。これが病的なCa 動態の原因と考えられているが、因果関係は確かめておらず、またT管欠損のみの影響を実験的に確かめることは難しい。

そこで2章で構築したシミュレータにおいてT管の有無のみ異なる2つのモデルを作成した。シミュレータの結果はT管の欠損による細胞内のCa の伝播、 β 刺激を与えた際の実験的応答[7]を定量的に

再現した (図 7). そのうえで β 刺激や力学的な条件の異なる解析の比較を行い, β 刺激による再同期には膜と SR の亢進両方の効果が必要であること, また収縮変形が伝播速度に影響することを示した. 更に部分的な T 管欠損の影響を評価するため, 12 筋節長のモデルを作成し, T 管欠損の大きさやパターンを変化させたシミュレーションを行った. 欠損部拡大に伴い Ca 伝播の遅れが増大し, 収縮力の立ち上がりのタイミングに大きく差が生じた. 解析結果の検討から, 非同期な収縮により部分的な短縮と伸長が生じ, 収縮のエネルギーを不要な弾性エネルギーとしてしまうことで収縮の効率を下げている事を示した. また, T 管の密度を同一とし, 均等な欠損分布と集中した欠損部を持ったモデルの比較においては, T 管の密度だけでなく, 個々の欠損の大きさが収縮に影響を与えることを示した (図 8).

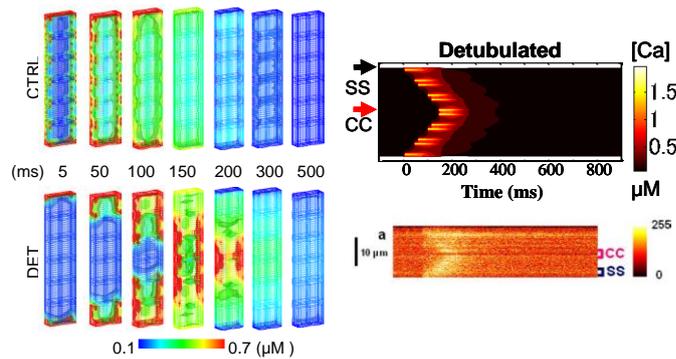


図 7 正常・T 管欠損細胞における Ca 伝播と T 管欠損細胞 Ca ラインスキャンの実験との比較 [7]

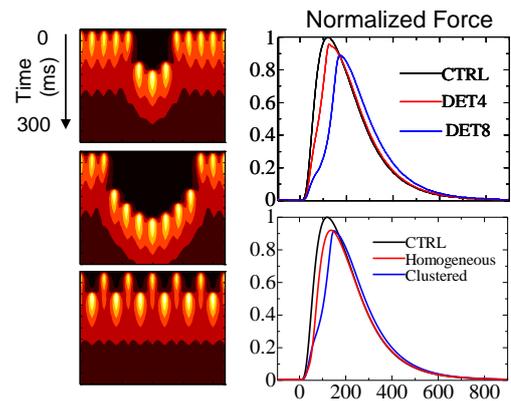


図 8 T 管 4 筋節欠損, 8 筋節欠損, 均一欠損の Ca ラインスキャンと発生収縮力の比較

【6 章：三相理論の適用】

従来電位勾配や流体の移動の影響は細胞内現象への影響が小さく, 計算コスト, モデル化・実装の困難さを著しく増大させるものであるため無視されてきた. しかし微小な領域での精緻なモデル化には必要であり, 三相理論を用いて統合を実現する.

三相理論の三相とは, 固体相, 流体相, イオン相を指す. 固体・流体・イオンそれぞれの平衡方程式と質量保存とを解くことで, 固体の変形, 圧力勾配・移流・浸透圧による流体の移動, 濃度勾配・電位勾配・移流によるイオンの運動を捉える事が出来る. 細胞モデルの反応拡散をイオン相として, 力学平衡を混合体としての平衡問題とすることで細胞モデルに三相理論を適用した. 解析結果を従来のモデル化による計算結果と比較し, 収縮や Ca 動態等は従来のモデル化で十分に再現できること, その妥当性を確認した. 更に収縮に際して T 管内圧力変動が T 管 Ca 動態に与える影響など実験での観測の限界を超えた知見を得た.

【文献】

1. Bers, D.M., *Ca source and sinks*. 2001, Kluwer academic publishers: Dordrecht.
2. Shannon, T.R., et al., *Circ Res*, 2003. **93**(1): p. 40-5.
3. Weber, C.R., et al., *Circ Res*, 2002. **90**(2): p. 182-189.
4. O'Rourke, B., et al., *J Mol Cell Cardiol*, 2009. **46**: p. 767-774.
5. Maack, C., et al., *Circ Res*, 2006. **99**: p. 172-182.
6. Brandes, R., et al., *Biophysical Journal*, 2002. **83**(2): p. 587-604.
7. Brette, F., et al., *J Mol Cell Cardiol*, 2004. **36**: p. 265-275.