

心筋細胞電気生理学モデルの構築

E-CELL System への膜電位の実装

政策・メディア研究科	米田 元洋	moto
総合政策学部	宮本 章子	s99869sm
環境情報学部	石鍋 沙耶花	t99068si
環境情報学部	瀧側 太郎	t98839tf

Abstract

これまで E-CELL では表現していなかった膜電位という概念を導入した。そして膜電位は負の値をとることが一般的であるが、この膜電位を E-CELL に実装した。また心筋細胞のモデリングにあたり、頻繁に使うことになる複雑な式については汎用 reactor としていつでも簡単に使えるようにすることを目的に仕様を心筋のメンバーで決定した。今期は膜電位は神経シナプスでも必要ということもあり、膜電位の実装は E-Neuron プロジェクトの瀧側君と共同で研究を行った。実際に行ったこととしては E-CELL のシステムに膜電位を格納することができるクラスを膜クラスを継承する形で付け加え、膜電位のデータのやりとりを行うための reactor を作成した。

1 はじめに

心筋細胞の活動電位や細胞機能を再構成する試みが 1952 年ごろから始まった。これまでの心筋モデルは、実験式が仮定的なものが多く不完全であった。しかしパッチクランプ法の導入によりモデルの完成度が飛躍的に伸びている。

心筋の筋原線維レベルでのメカニズムは、骨格筋に共通点が多いが、心筋の膜興奮と収縮の関係はより密接で、膜興奮性の変化はすぐに収縮の変化につながる。例えば、細胞内の ATP レベル変化に応じて開閉する特殊な K^+ チャネルが存在し、細胞内代謝の変化は活動電位の変化を介して、収縮強度を調節する。このように、膜興奮から収縮に至る細胞の機能を総合的に理解する上で、心筋は良いモデルである。

そこでまず始めに京都大学・野間昭典教授のグループによりすでに構築されている心筋興奮-収縮モデル (以下、野間モデル) を E-CELL に移植することとした。

2 野間モデル

パッチクランプ法による各イオンチャネルの電気生理学的データから活動電位の生成を再現するモデルを構築する。そして実験とシミュレーションを基に、実心臓の生理的メカニズムを解明することが目的である。

現在のモデルには主要な細胞膜イオンチャネル・トランスポータ、筋小胞体、クロスブリッジが組み込まれていて、活動電位、細胞内 Ca^{2+} トランジエント、収縮が再構築されている。さらにはコンピュータ上での仮想膜電位固定実験も可能である。心筋細胞においては、イオンチャネルやトランスポータ、収縮機構などの基本的メカニズムは共通と考えられている。そこで個々の要素の記述には共通の数式を用いて、細胞ごとに電流振幅パラメータを調節する方法を用いている。図 1 は野間モデルに含まれる要素を示すスキームである。

Ion channels

Na channel, Ca,L channel, Ca,T channel, Ist channel, If channel

IK1 channel, IKr channel, IKs channel, Ito channel, IK,ACh , IK,ATP

Ib,Ca, Ib,NSCC, Ib,NSCC(Ca), Iplateau

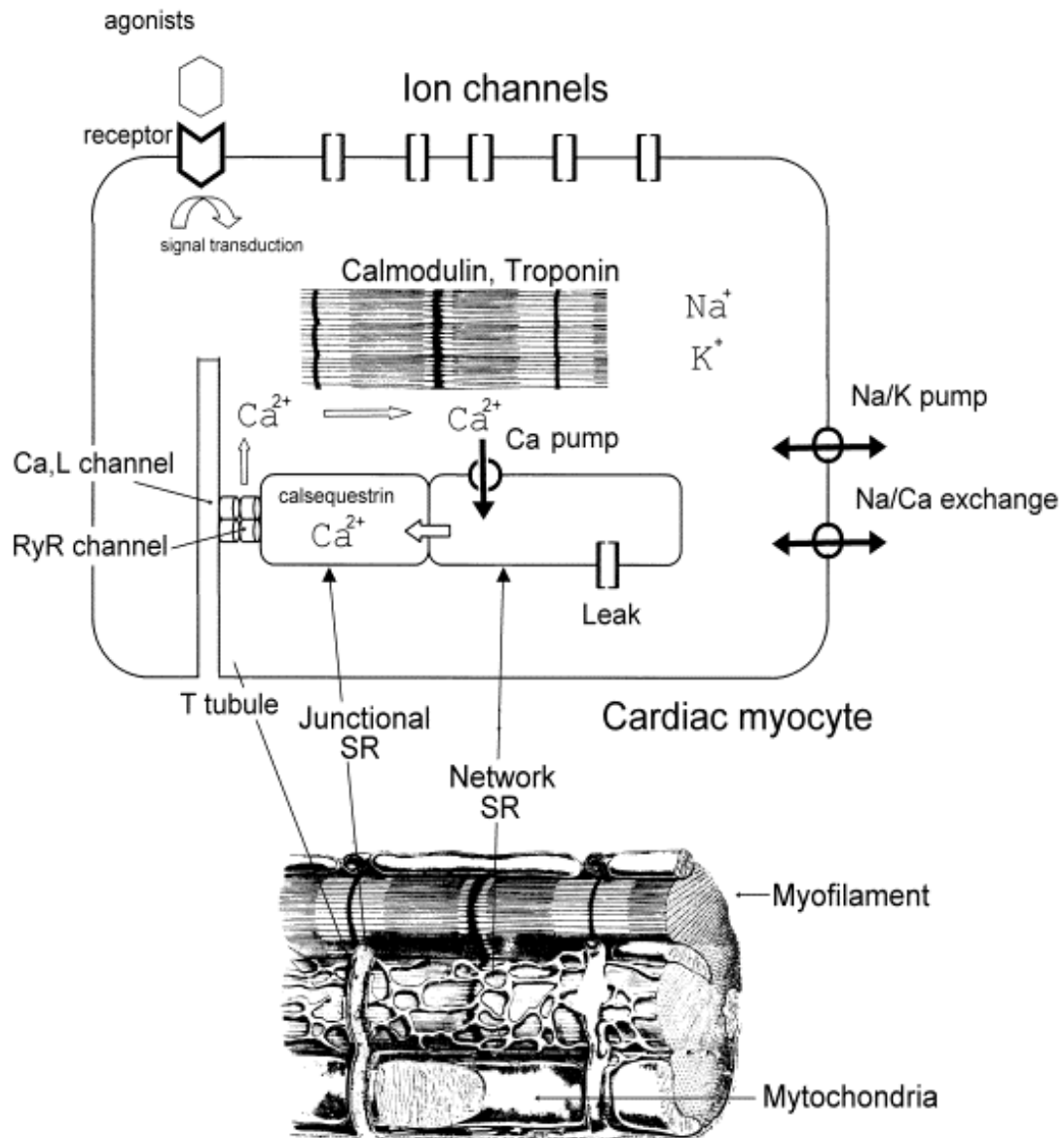


図 1: 心筋細胞モデルに含まれる要素を示すスキーム [1]

3 膜電位

3.1 心筋細胞内のイオン濃度

細胞内外を比べると、細胞外液では $[Na^+]$ 、 $[Ca^{2+}]$ 、 $[Cl^-]$ が高く、細胞内液では $[K^+]$ が高い。細胞内には筋小胞体があり、膜で囲まれて周囲から独立している。細胞内液の $[Ca^{2+}]$ は極めて低いですが、この筋小胞体では高くなっている。これが筋肉収縮の引金になっている。

細胞膜の内外にイオン濃度の不均一があり、濃度勾配が生じるのは、能動輸送のためである。能動輸送を果たす主なものは Na^+-K^+ ポンプである。イオン濃度の勾配により細胞膜電位差が生じるのである。細胞膜にあるイオンチャンネルが開くと、受動的にイオン電流が流れる。心筋の受動的なイオン輸送機構にはチャンネルと交換系がある。これらが Na^+ と Ca^{2+} を外にくみ出すので、心筋の活動電位に伴って Na^+ と Ca^{2+} が細胞内に流入しても、細胞内の $[Na^+]$ および $[Ca^{2+}]$ を低く保っている。

3.2 心筋細胞の静止電位

膜電位とは、細胞外の電位を基準としたときの細胞内外の電位差をいう。通常、細胞内の電位は細胞外液に対して負の電位である。これを静止膜電位といい、心筋細胞の静止電位はおよそ $-70 \sim -100$ mV である。これは細胞内 $[K^+]$ が細胞外に比べて高いうえに、静止期には心筋細胞膜の K^+ に対する透過性が高いためである。細胞膜の Na^+-K^+ ポンプが細胞内外の K^+ と Na^+ 濃度の差をつくる。また、静止電位のレベルでは、 K^+ の内向き整流チャンネルが開いているので、静止期では、 K^+ の透過性が高い。一方、洞房結節や房室結節の細胞では静止電位は $-40 \sim -60$ mV と浅い。これは静止期に K^+ に対する透過性が低く、 Na^+ に対する透過性が高いためである。

4 E-CELL でのモデリング

4.1 E-CELL における膜電位

E-CELL System ではこれまで物質の分子数の量の変化をシミュレーションすることが中心であった。そこで電気生理学的な概念はほとんど表現されていなかった。心筋細胞をシミュレーションするにあたり、膜電位というこれまで E-CELL では表現されていなかった概念について、避けて通ることができない存在である。

この膜電位の問題点として負の値を持つことがあげられる。E-CELL では”Substance-Reactor モデル”という細胞モデリング手法によってシミュレーションを行なっている。Substance-Reactor モデルは、系の静態を物質の量の集合として表現し、系の動態の様式を、「Substance」と「Reactor」のネットワークのトポロジーとして表現するものである。「Substance」では物質の量を表現、つまり負の値を持つことができず、膜電位を「Substance」として表現することが不可能である。そこで E-CELL の”Substance-Reactor モデル”という理念からはずれないで、膜電位を表現するためにはどのようにすればよいかを考慮した結果、膜電位は reactor の activity として表現することとした。その過程で今回 E-CELL のコアの部分に機能を付け加えた。それを以下に挙げる。

- 膜電位機能を付け加えたファイル名：ecscore/CellComponents.C(.h)

– Membrane クラスを継承する膜電位専用のクラス EPGMembrane を新たに付け加えた。

- EPGMembrane 内には K イオン、Na イオン、Ca イオン、Cl イオン、膜電位を参照できる変数を格納した。

また reactor 内での膜電位の呼び出しについては次のようにすればよい。

- ルールファイルを書くときに用いる時のように system path を引数として「systempath()」という関数に渡してあげる。
- RootSystem にある findSystem() 関数に system path を渡し、そのポインタを生成する。
- dynamic_cast<型>() 関数に渡し、EPGMembrane システムを指すポインタを生成する。

例えば、以下のような形で膜電位を呼び出し、膜電位をその reactor 内での計算の過程で使用することができる。

```
SystemPath systempath("/CELL/MEMBRANE");
System* system = theRootSystem->findSystem(systempath);
EPGMembrane* epgmembrane = dynamic_cast<EPGMembrane*>(system);

poten = epgmembrane->potential();
```

またある reactor 内の activity を別の reactor で参照するには次のように書く。

```
SystemPath systempath("/CELL/MEMBRANE");
System* system = theRootSystem->findSystem(systempath);
RSystem* rsystem = dynamic_cast<RSystem*>(system);

_activation_index = rsystem->getReactor("reactorID");
```

4.1.1 第一段階

まずはじめに計算式を全て E-CELL のコアに組み込む。コアの部分に組み込み、その挙動を見ることにより EPGMembrane というクラスがきちんと組み込まれているかを検証できる。このときに用いたのが、Goldman-Hodgkin-Katz の式である。これは静止電位を求めるときに使用する式であり、以下の形をしている。

$$E_m = \frac{RT}{F} \cdot \log \frac{P_{Na}[Na^+]_o + P_K[K^+]_o + P_{Cl}[Cl^-]_i}{P_{Na}[Na^+]_i + P_K[K^+]_i + P_{Cl}[Cl^-]_o} \quad (1)$$

E_m : 膜電位 R: 気体定数 T: 温度 F: Faraday 定数 P: 透過係数 $[]_i$: 膜内のイオン濃度 $[]_o$: 膜外のイオン濃度

静止膜電位は細胞内外の K^+ の濃度差に大きく左右される。そしてこの Goldman-Hodgkin-Katz の式は K^+ だけでなく、透過性の低い Na^+ と Cl^- をも考慮した場合の膜電位を表現する一般式である。

第一段階の問題点として透過係数を変数として持たすことができず、また式の形を変更したいといった場合、困難である。

4.1.2 第二段階

そこで第二段階では、この Goldman-Hodgkin-Katz の式を容易に変更可能な状態にするため reactor で計算を行い、システムにその計算結果だけを返すという方式に変更した。

ここで上記した reactor での膜電位の参照の仕方などによって第一段階と同様の結果を得ることができた。

4.1.3 第三段階

次に第二段階までは Goldman-Hodgkin-Katz の式を使用していたが、心筋細胞モデルでは Ca^{2+} という要素も膜電位を導く過程に含まれている。そのため Goldman-Hodgkin-Katz の式を用いることができなくなった。ここで用いる膜電位導出方法は電流から導き出す方法である。

1. 各イオンチャネルから発生する電流を導く。
2. 各々から導き出した電流から最終的な内向き電流の総和を求める。
3. 内向き電流の総和から膜電位を求める。
内向き電流の総和 (I_{tot}) を用いて膜電位 (E) の変化を表す。

$$I_{tot} = -C_m \cdot \frac{dE}{dt}$$

$$\therefore \frac{dE}{dt} = -\frac{I_{tot}}{C_m}$$

C_m : 膜容量

以上、三段階に分けて計算を行う。

そして実際に E-CELL に実装してシミュレーションした結果を以下に示す。

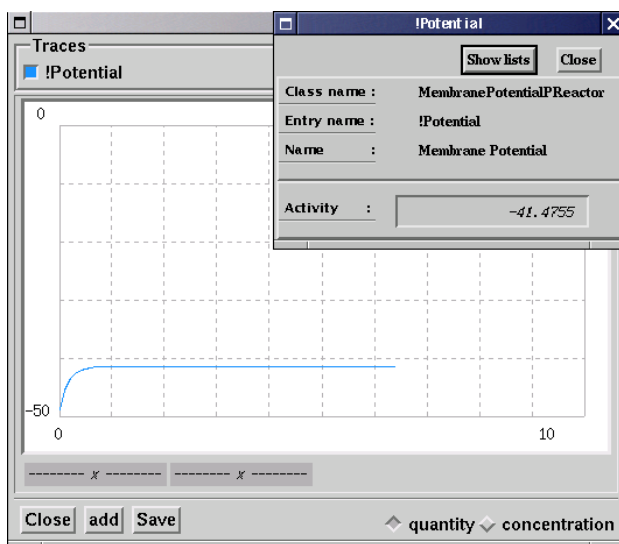


図 2: 静止電位

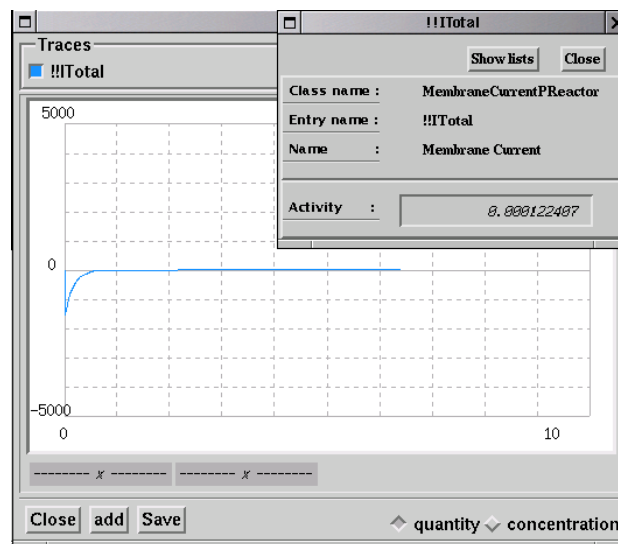


図 3: total 電流

ただし、今期、私自身は膜電位の実装を担当したため、心筋細胞で使用するチャンネルのモデリングについては行ってない。そこでおもちゃのチャンネルを作成し、シミュレーションを行うこととした。図3は total 電流 (チャンネルが1つなので電流も1つしかない) を表し、図2はそのときの電位の変化である。おもちゃのチャンネルは静止電位だけを表現させることを目的として作成した。図2を見ると期待通りの動きを示していることが分かる。

4.2 system への定数の組み込みと汎用 Reactor の作成

モデリングの労力を省き、また見た目も見やすくすることが目的である。

4.2.1 system への定数の組み込み

心筋細胞シミュレーションで頻繁に使われている定数を格納する。はじめは reactor ファイルに格納する予定であったが、これらの定数は心筋細胞シミュレーション以外でも使うと予想されるものばかりであり、かつ E-CELL core に組み込むことが容易であったため、組み込むこととした。変更したファイルは Serizawa/include/Defs.h である。

定数	値	単位	説明
R	8.3143	J/mol · K	気体定数
F	9.64867x10 ⁴	C/M	Faraday 定数 (野間モデルでは 9.64867 C/mM)
T	310.15	K	温度
ZK	1		K の電荷
ZNa	1		Na の電荷
ZCa	2		Ca の電荷
ZCl	-1		Cl の電荷

表 1 : E-CELL コアに格納した定数

4.2.2 汎用 Reactor の作成

IonFluxBaseReactor.rd

IonFluxBaseReactor.rd はイオンフラックス計算のモデリングを省力化するための reactor である。

$$\left(\frac{dN_j}{dt}\right)_{CF} = \frac{1}{RT} \cdot \frac{E - 50}{1 - \exp\left(-\frac{z_j F (E - 50)}{RT}\right)} \cdot \left(\frac{N_{jin}}{V_{in}} \cdot \exp\left(\frac{z_j F \cdot 50}{RT}\right) - \frac{N_{jex}}{V_{ex}} \cdot \exp\left(-\frac{z_j F (E - 50)}{RT}\right)\right) \quad (2)$$

i : channel の種類 j : ion の種類 z : 電荷 F : Faraday 定数 V_{in} : 膜内の体積 V_{ex} : 膜外の体積

この式を拡散式として実装する。

- 利用できる関数
イオンの拡散式: $CF(E, Z_j, N_{jin}, N_{jex}, V_{in}, V_{ex})$
- 各イオンチャンネルの reactor の引数
- Parameter: モデル式中の定数

- Substance : 膜外のイオン数
- Catalyst : イオンフラックス
- Product : 膜内のイオン数
- Effector : イオンフラックスに影響する要素

GateOpenProbabilityBaseReactor.rd

GateOpenProbabilityBaseReactor.rd はチャンネルのゲート開確率 (Gate Open Probability) のモデリングを単純化するため reactor である。ゲートの開確率は以下の形式の式によって表現されることが多い。そのためこの式を利用できるようにした。

$$\text{速度定数 (Rate)} = \sum_n \left(k_2 + k_3 \cdot \exp\left(\frac{E + k_4}{k_5}\right) \right)^{k_1} \quad (3)$$

- 利用できる関数
 - 速度定数項 $\left(k_2 + k_3 \cdot \exp\left(\frac{E + k_4}{k_5}\right) \right)^{k_1}$: *rateTerm*(k_1, k_2, k_3, k_4, k_5)
- 各ゲートの reactor の引数
 - Parameter : rateTerm に渡す定数。モデル式中の定数
 - Substance :
 - Catalyst : イオン開確率
 - Product :
 - Effector : 開確率に影響する要素

5 考察

電気生理学的表現である膜電位を E-CELL に実装するために、reactor を工夫した。また汎用 reactor も作成した。これにより今後のモデリングの省力化、高速化が見込まれる。

膜電位を実装できたことにより、イオンチャンネルのモデルが完成すれば随時、心筋細胞モデルに組み込むことでシミュレーションを行うことが可能となった。

膜電位を計算するための reactor は PReactor とした。これは通常の reactor で計算した結果をその同じステップ時に使用することができるかもしれないと考えたからである。また電流も負の値をとる可能性があり、電流も reactor の activity で表現し、膜電位の計算でも activity の参照が必要となる。このように reactor の activity を 2 段階経てようやく膜電位に到達するわけである。

また E-CELL が activity のアップデートを PReactor の後にまとめて行っているとすると膜電位の反応が 2 ステップ遅れることとなる。これについてはこれから検証してみて 2 ステップ遅れることが確実であるとするならば、膜電位までの計算方法の再設計を行う必要があるかもしれない。

6 今後の展望

膜電位を実装したので次に、筋小胞体について考えていきたい。Ca イオンはこの Ca buffer があり、これが筋小胞体に存在しているため、他のイオンにくらべて非常に複雑である。また筋小胞体は細胞内にある細胞であり、心筋細胞のシステム構造を考えなくてはならない。

● 心筋細胞のシステム構造案

- /PLASMA 細胞外液
- /CELL/CYTOPLASM 細胞質
- /CELL/MEMBRANE 細胞膜
- /CELL/CYTOPLASM/SRrel 筋小胞体 (放出部位)
- /CELL/CYTOPLASM/SRup 筋小胞体 (取り込み部位)
- /CELL/CYTOPLASM/SR 筋小胞体膜

心筋細胞については世界中でその多くが研究されている。そのため今まで以上にモデル構築のスピードを要求されると思われる。今学期の研究でイオンチャネルを作成するための知識とサンプルを得ることができた。これをもとに来学期以降、モデルの完成に向けて研究を続けていく必要がある。

電気生理学的表現を E-CELL に実装するために、今後さらに Reactor を工夫し、必要ならば E-CELL システムに改変を加えていく予定である。

精密な心筋細胞モデルを構築し、将来的には、イオンチャネル疾患の治療法の開発に役立てたい。

7 謝辞

本研究の進行にあたり、有益な指示、アドバイス、暖かい激励を下さった内藤泰宏氏、橋本健太、松崎由理、京都大学の野間研究室の方々、E-CELL Project のの方々、このような研究の機会を与えてくださった富田勝教授に感謝の意を表したい。

参考文献

- [1] 京都大学医学研究科・生体制御医学講座・細胞機能制御学 <http://www.card.med.kyoto-u.ac.jp/>
(京都大学・野間昭典教授のグループのホームページ)
- [2] 東田 陽博、『イオンチャネル・1』、グロービュー社、1993
- [3] 東田 陽博、『イオンチャネル・2』、グロービュー社、1993
- [4] 渡辺 昭、山岸 俊一、『新生理科学大系・1』、医学書院、1986
- [5] 富田 忠雄、杉 晴夫、『新生理科学大系・4』、医学書院、1986
- [6] 真島 英信、『生理学』、文光堂、1990

- [7] Bruce Alberts, Dennis Bray, Alexander Johnson, Mortin Raff, Keith Roberts, Peter Walter, 「中村桂子、藤山秋佐夫、松原謙一 共訳」、『Essential 分子生物学』、南光堂、2000
- [8] Wilders R, Jongasma HJ, van Ginneken AC, 『Chapter 2: Pacemaker activity of the rabbit sinoatrial node. A comparison of mathematical models.』『Comparison of Sinoatrial Node Models』、1991
- [9] 小幡 邦彦、外山 敬介、高田 明和、熊田 衛、『新生理学』、文光堂、2000
- [10] 貴邑 富久子、根来 英雄、『シンプル生理学』、南光堂、1999
- [11] Willam F. Ganong, 「星 猛、岡田 泰伸、河原 克雅、菅野 富夫、熊田 衛、黒澤 美枝子、佐久間 康夫、佐藤 俊英、鈴木祐一、多久和 陽、中村 嘉男、福田 康一郎 共訳」、『医科生理学展望』、丸善株式会社、2000
- [12] 村越 隆之、栗原 崇、三枝 弘尚、田辺 勉、『イオンチャネルの分子生物学』、1998