

修士論文

心筋細胞の力学電気生理計算モデルの構築と

MLPKO マウスの小器官形状が

Ca 動態と収縮に与える影響の解明

令和5年2月6日

指導教員 波田野 明日可 講師 

37-216277 望月 優

心筋細胞の力学電気生理計算モデルの構築と MLPKO マウスの小器官形状がCa動態と収縮に与える影響の解明

37-216277 望月 優 指導教員：波田野 明日可 講師

Keywords: biomedical simulation, cardiac myocytes, excitation-contraction coupling, realistic geometry, Finite element method

1. 緒言

心臓は生命活動に重大な役割を担うため、心疾患になると人の生活に影響を及ぼす。心疾患患者数は社会の少子高齢化に伴って増加していることもあり、心疾患のメカニズムの解明や治療・予防法の開発に大きな関心が寄せられている。これらに対するアプローチとして、心筋の細胞小器官に着目した研究が数多くなされている。心筋細胞小器官は、複雑な形状や配置をとっており、これらは心疾患の際に形状が変化するということがわかっている。また、心疾患の種類によって生じる細胞構造変化も異なる。これらのことから、細胞構造自体が正常な心機能に何らかの役割を持っていると考えられるが、心機能低下と形態変化の因果関係は未解明である。この因果関係の解明が、治療法の開発といった医療の発展に繋がる可能性がある。

生きた細胞の内部での現象を直接観察することは困難であり、シミュレーションによる挙動の再現がその代わりとして用いられている。そのため、細胞小器官形状・配置と心機能の因果関係解明にも、解析によるアプローチが有用であると考えられる。

三次元構造での再現を行った先行研究[1]では、周期性と対称性を仮定した簡易化モデルを使用しているため、実際の構造や生じる形態異常の反映に制約がある。そこで本研究では、実形状を基としたモデルを用いた解析によって、病理状態と正常状態の細胞内挙動を再現する。走査性電子顕微鏡画像から小器官形状を取り出してモデルを作成し、波田野モデル[1]をベースとして構築した計算モデルでこれを解析する。得られた結果から正常と病理の比較を行うことによって、細胞構造がCa動態や収縮に与える影響を明らかにする。

2. 計算モデルの構築

心筋細胞では、細胞内物質の移動や膜電位といった電気生理現象と、収縮の力学現象が相関して起こっているため、これを考慮したモデルが必要となる。本研究では波田野モデル[1]をベースとし、マウス心筋細胞の力学電気生理計算モデルを構築した。電気生理現象は、拡散方程式に各小器官の吸収・放出の働きを示した反応項を加えたもので再現され、力学現象は、各細胞小器官の特性を歪みポテンシャルの定義により物質特有の応力歪特性を与えることで再現し（構成則）、歪ポテンシャルから力学的平衡方程式を与えたもので再現された。これら2つの問題を交互に解くことで連成解析とした。

波田野モデルとの主な変更点は、構成している電気生理モデルである。細胞挙動のうち特に膜電位とCa²⁺については動物ごとにとる挙動が大きく異なることがわかっている。実形状モデルの元となる走査性電子顕微鏡画像はマウス心筋細胞であった一方、ベースとした波田野モデル[1]はモルモットの計算モデルを使用しているため、変更を行った。反応項について、小器官のうち膜と横行小管（T管, Transverse tubules）、および筋小胞体（SR, Sarcoplasmic Reticulum）をマウス心筋細胞計算モデルであるBondarenko[2]及びEdwards[3]のものに組み替え、フィッティングを行った。

3. Control モデルの構築と解析

3.1 メッシュの作成

正常状態マウスとして、Control マウスの心筋細胞の走査線電子顕微鏡画像を使用しメッシュの作成を行った。細胞小器官の中で、大きい筋原線維とミトコンドリアは四面体要素により三次元形状とした。より微細な構造をもつT管は、三次元化するとメッシュの大きさの極度なばらつきを生じさせるため、位置を画像から持ってきたのち、その場所にある節点に仮想体積を与えることにより表現した。SRについては、画像から識別することができなかった。そのため、NSR (Network SR) は筋原線維を網目状に取り囲むように存在することから、筋原線維の表面全体を一様にNSRと定義した。JSR (Junctional SR) はT管に向かい合うように存在することから、T管の位置に近いNSRの節点を二重節点としてJSRとした。

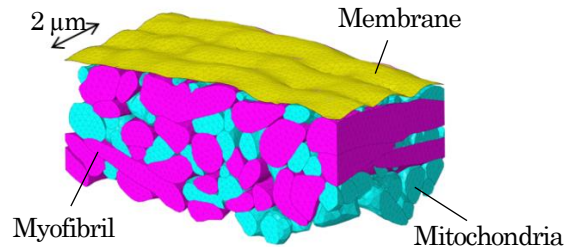


Fig. 1 Model of mouse cardiac myocyte.

3.2 Ca挙動と膜電位解析結果

作成したメッシュに対して電気生理力学連成解析を行った。膜電位は1.8 msで44 mVのピーク値をとり、急激な減衰を示した。細胞全体における平均Ca²⁺濃度変化は27 msで1.16 μMのピークを示し、200 msで0.30 μMまで減衰した。これらの結果について正常状態マウスモデル[3]の再現ができたといえる。またNSRとJSR間で0.22 mMの濃度勾配が確認され、SR内の時間空間分布を定性的に再現できた。

Ca²⁺局所的濃度については、細胞のどの場所でも同様の挙動を示した。また、Ca²⁺放出後に拡散されても収縮方向に濃度勾配が生じ、主に筋原線維内を伝わっていくことが確認された。加えて、ミトコンドリアにCa²⁺が行き渡るためには、ミトコンドリアと筋原線維が接していることが必要であることがわかった。

3.3 収縮解析結果

発生した内部収縮力は136 msでピーク値の4.2 kPaをとった。Ca²⁺の立ち上がりで見られた著しい勾配が緩和されたが、収縮方向に対する勾配は生じていた。筋線維はI帯とA帯の間に作用することで収縮力が発生するため、この勾配は妥当であると考えられる。変形は、力学的境界条件を筋原線維軸断面の片方を固定端とし、もう片方を自由端としたとき、軸方向におよそ10%の収縮が確認された。細胞は拍動の際10%~20%縮むため、力学現象を再現できたといえる。

4. MLPKO モデルの構築と解析

4.1 MLPKO マウスの特徴

本研究では、病理状態としてMLPKO (Muscle Lim Protein Knock Out) マウスの画像を使用した。MLPKO マウスは心筋

細胞構造異常を発生させ、拡張型心筋症を引き起こすことが知られている。ヒト拡張型心筋症と同じ症状を示すため、研究によく用いられる。先行研究では、ミトコンドリア配列の乱れやサイズのばらつき、筋原線維の乱れが確認されている[4]。

Control モデルと同様の手順で形状モデルの作成を行った (Fig. 2)。画像から取れないNSR や、節点に仮想体積を与えているJSR やT管については、Control とMLPKOで体積比率を同じとした。使用した走査性電子顕微鏡画像では、先行研究で示された形態異常が見られた。作成した形状モデルは、ミトコンドリアの凝集や小さなサイズの増加、筋原線維の軸方向乱れが確認され、細胞構造異常が反映されていると言える。また、発生した形状異常は、MLP不在を原因とする一時的な発生であると考えられる。

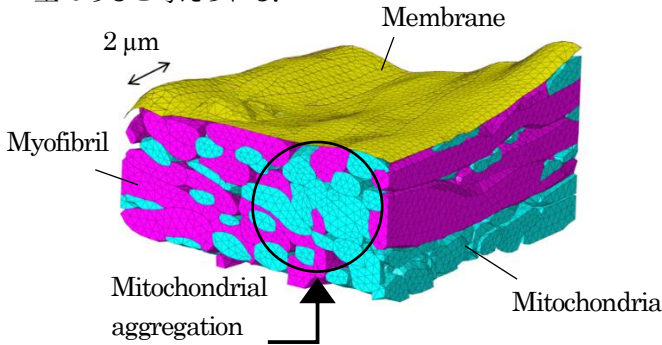


Fig. 2 Model of MLPKO mouse.

4.2 Ca 挙動解析結果

作成した MLPKO 形状モデルを使用し、力学電気生理連成解析を行った。細胞全体の平均 Ca^{2+} 濃度の変化は、ピーク値が29 msで1.15 μM をとり、その後素早く減少しており、Controlと同様の結果を示した (Fig. 3)。これにより MLPKO においても、JSRからの Ca^{2+} 流入が細胞全体として正常に行われたことがわかった。

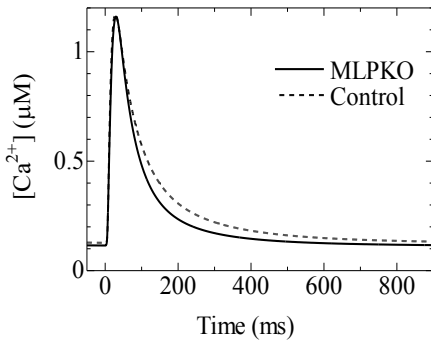


Fig. 3 Control and MLPKO intracellular Ca^{2+} transients.

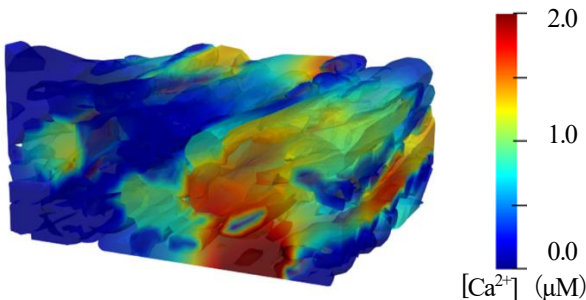


Fig. 4 Spatio-temporal Ca^{2+} dynamics in the cytoplasm.

一方で、局所的 Ca^{2+} 濃度には違いが見られた。Fig.4 は電気刺激後 50 ms 後の細胞質における Ca^{2+} 濃度勾配分布を表して

いる。図の左部分が右部分よりも Ca^{2+} 濃度が低くなっており、左部分はミトコンドリアの凝集部分に近い場所にあたる。この大きな濃度勾配は、ミトコンドリア凝集による拡散阻害によるものと考えられ、T管やJSRから細胞質へ移動する Ca^{2+} 経路の実質的な距離が、ミトコンドリア凝集箇所の存在によって長くなっていると考えられる。

4.3 収縮解析結果

力学境界条件を片面自由端とした解析では、MLPKO は収縮変形だけでなく、曲げ変形も生じていた。これは内部発生した収縮力が、筋原線維の一部に偏ることにより、強い収縮に周りが引っ張られることにより生じたものであると考えられる。

また、筋原線維軸断面を両方固定端とした境界条件における解析も行った。筋線維は連続して繋がっており、固定面に生じる軸方向の力は周りを引っ張る力である。Fig.5 に軸方向の張力のコンター図を示す。この張力は、Control ではどの筋原線維でも力を発揮したが、MLPKO は筋原線維によって大きな偏りが生じており、図右下に集まっている。Control では0~1 nNの力しか持たない筋原線維の面積が20%を超えなかったのに対し、MLPKOでは50%以上を占めていた。面全体にかかる張力はControlでは4.1 kPa、MLPKOでは3.5 kPaとなり、15%程小さくなっていった。以上のことから、筋原線維が正常な収縮能力を有していても、 Ca^{2+} の偏りによって収縮力を発揮せず、一部の筋原線維に偏ることが明らかになった。

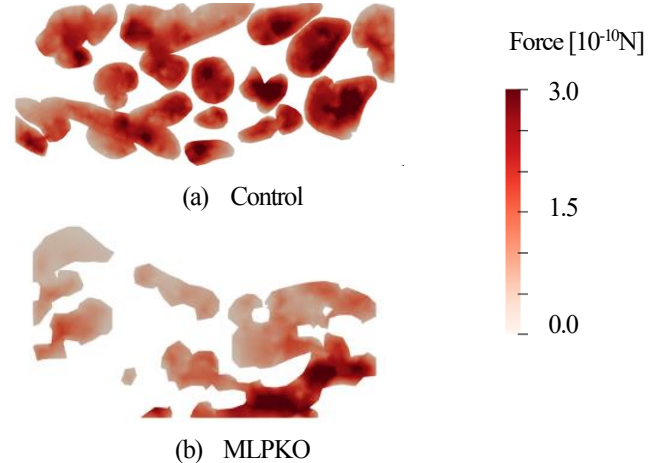


Fig. 5 Contour diagram of contractile force of myofibrils in Control and MLPKO.

5. 結言

Control と MLPKO 両方について、マウス心筋細胞の実形状を反映したモデルにおける力学電気生理解析を行い、膜電位やCa動態といった電気生理現象や、収縮現象の再現、比較を行った。今回使用した画像において、MLPKO マウスはControlと比べて筋原線維とミトコンドリアの配列の乱れを生じさせていた。その結果、大きなミトコンドリア柱の存在により拡散現象が阻害され、 Ca^{2+} 濃度空間勾配がControlよりも大きくなること became 明らかになった。さらに、このようにして生じた大きな濃度勾配により、収縮力の分布についても偏りが生じ、働かない筋原線維が発生することがわかった。

参考文献

- [1]A. Hatano, et al. *Biophys. J.*, vol. 101, no. 11, 2011
- [2]V. E. Bonkdarenko, et al. *Am. J. Physiol.*, vol. 287, pp.454-469, 2010.
- [3]E. G. Edwards, et al. *Circ. Arrhythmia Electrophysiol.*, vol. 7, no. 6, pp. 1205-1213, 2014.
- [4]S. Arber, et al. *Cell*, vol. 88, no. 3, pp. 393-403, 1997.

目次

図目次	4
表目次	6
第1章 序論	7
1.1 研究背景	7
1.2 先行研究	8
1.2.1 マウス心筋細胞における数理モデルの先行研究	8
1.2.2 心筋細胞における電気生理力学連成解析に関する先行研究	8
1.2.3 細胞小器官の形状の影響に関する先行研究	9
1.3 研究の目的および手法	10
1.4 本論文の構成	11
第2章 心筋細胞と力学電気生理数理モデル	12
2.1 心筋細胞	12
2.1.1 心筋細胞の微細構造	12
2.1.2 一拍の挙動について	14
2.2 力学電気生理数理モデルの作成	14
2.2.1 電気生理モデル	14
2.2.2 力学モデル	22

第3章 Control マウスにおける解析	24
3.1 緒言	24
3.2 実形状有限要素モデルの作成	24
3.3 解析条件	27
3.3.1 境界条件	27
3.3.2 計算条件	27
3.4 解析結果	29
3.4.1 膜電位解析結果	29
3.4.2 Ca^{2+} 拡散解析結果	30
3.4.3 片面固定条件下の収縮挙動	35
3.5 結言	37
第4章 MLPKO マウスにおける解析	38
4.1 緒言	38
4.2 画像における形状評価	39
4.3 解析モデル	40
4.3.1 メッシュ作成方法	40
4.3.2 作成したモデルの形状評価	43
4.4 解析条件	46
4.4.1 境界条件	46
4.4.2 計算条件	46
4.5 解析結果	46
4.5.1 膜電位解析結果	47
4.5.2 Ca^{2+} 拡散解析結果	47
4.5.3 Ca^{2+} 濃度勾配分布	50
4.5.4 片面固定条件下の収縮挙動	53
4.5.5 両端固定条件下の軸方向張力	56
4.6 結言	58

目次

第 5 章 結論	60
5.1 結論	60
5.2 今後の課題	60
5.2.1 実形状メッシュ作成における課題.....	60
5.2.2 計算モデルにおける課題.....	61
5.2.3 今後の展望.....	61
付録 A 数理モデルの詳細	62
A.1 細胞膜と T 管	62
A.2 筋小胞体.....	71
謝辞	75

図目次

図 1.1	波田野[10]のメッシュモデル	9
図 2.1	心筋細胞模式図[15]	12
図 2.2	筋原線維模式図	13
図 2.3	筋原線維部分拡大画像	13
図 2.4	筋小胞体での Ca^{2+} 輸送イメージ図	20
図 3.1	Dyad (左) と T 管 (右) の形状	25
図 3.2	JSR (黒点) と Dyad (赤) の位置関係の例	25
図 3.3	Control マウス有限要素モデル全体図	26
図 3.4	筋原線維形状	26
図 3.5	ミトコンドリア形状	26
図 3.6	SR 形状	26
図 3.7	膜形状	26
図 3.8	力学的境界条件	27
図 3.9	計算フロー	28
図 3.10	膜電位変化	29
図 3.11	各電流変化	30
図 3.12	細胞全体における Ca^{2+} 平均濃度変化	31
図 3.13	SR における平均 Ca^{2+} 濃度変化	31
図 3.14	断面位置(a)と断面における小器官の配置(b)	32
図 3.15	5 ms における Ca^{2+} 濃度勾配分布断面図と Z 帯の位置	32
図 3.16	断面における Ca^{2+} 濃度勾配分布の変化	33
図 3.17	50 ms での他断面図における Ca^{2+} 濃度勾配	34
図 3.18	収縮率変化	35
図 3.19	筋原線維に発生する収縮力の空間分布	36
図 4.1	Control マウス	39
図 4.2	MLPKO マウス筋原線維乱れ部分	39
図 4.3	MLPKO マウスミトコンドリア凝集部分	39
図 4.4	細胞膜による分割	40
図 4.5	有限要素モデル作成手順	41
図 4.6	MLPKO マウス有限要素モデル全体図	42
図 4.7	筋原線維形状	42
図 4.8	ミトコンドリア形状	42
図 4.9	SR 形状	42
図 4.10	膜形状	42

図目次

図 4.11	Control (左) と MLPKO (右) のミトコンドリア形状.....	44
図 4.12	ミトコンドリア体積分布.....	44
図 4.13	JSR の Z 帯からの距離.....	45
図 4.14	手書き抽出による Z 帯評価.....	45
図 4.15	力学的境界条件.....	46
図 4.16	膜電位変化.....	47
図 4.17	平均 Ca^{2+} 濃度の変化.....	48
図 4.18	断面位置 (a) と断面における筋原線維とミトコンドリア分布 (b)	48
図 4.19	断面における Ca^{2+} 濃度分布の変化.....	49
図 4.20	Ca^{2+} 濃度分布.....	50
図 4.21	Ca^{2+} ピーク値の分布.....	51
図 4.22	ミトコンドリア Ca^{2+} 濃度分布.....	51
図 4.23	ミトコンドリア外縁 Ca^{2+} 濃度変化.....	52
図 4.24	モデル内全節点の JSR 最短距離の相対度数分布.....	52
図 4.25	モデル内全節点の最大 Ca^{2+} の相対度数分布.....	52
図 4.26	内部発生した収縮力の変化.....	53
図 4.27	MLPKO 筋原線維に発生した収縮力の空間分布変化.....	54
図 4.28	筋原線維断面図における収縮力空間分布.....	55
図 4.29	y 軸方向変位.....	55
図 4.30	y 軸方向変位コンター図.....	55
図 4.31	内部発生収縮力と壁面張力の変化.....	56
図 4.32	固定面の筋原線維に発生する張力コンター図.....	57
図 4.33	張力ごとの面積比.....	58

表目次

表 2.1	細胞 Ca^{2+} 内の拡散係数	15
表 3.1	有限要素モデル解析規模	27
表 3.2	APD の比較	30
表 4.1	有限要素モデル解析規模	43
表 4.2	各小器官の体積比率	43

第1章 序論

1.1 研究背景

心臓は生命維持のため重要な役割を担う器官であり、心疾患になると人の生活に大きな影響を及ぼす。日本における心疾患を原因とする死亡者数は死亡者総数の15%程度を占めており、令和3年には21万人を超えている[1]。日本社会の高齢化に伴って心疾患患者数とそれを原因とする死亡者数は今後も増加していくと考えられる。世界的にも高齢化社会は進んでおり、心疾患患者の増加が日本同様に予測されることから、心疾患メカニズムや予防・治療法に大きな関心が寄せられている。

心疾患メカニズムの解明や治療法の開発に対するアプローチとして、拍動を担う心筋の細胞小器官に着目した研究が多くなされている。心筋細胞の細胞小器官は複雑な形状・配置をもっており、その中でも、配列や大きさに一定の規則性をもって配置されている。また、心疾患の際には、その小器官の形状や配置が変化することがあることがわかっている。マウスを人為的に心疾患にし、心筋細胞小器官構造を観察した研究において、心筋梗塞後心不全ではミトコンドリアのサイズ低下や内膜密度の低下[2]、虚血性心疾患ではミトコンドリア配列の乱れ[3]やT管の消失[4]、拡張型心筋症ではミトコンドリアの凝集やZ帯の肥大化[5]、といった形状異常が報告されている。患っている心疾患の種類が異なる場合、生じる小器官形状異常も異なっている。心疾患によって細胞構造が保たれず、また起こる構造異常も同一でないとすると、この細胞構造自体が正常な心機能に重要な役割を果たしている可能性があると考えられる。しかし、心疾患における心機能低下と構造変化の因果関係はまだはっきりとはわかっていない。生きたままの動物における心筋細胞内挙動を実際に観察するのが困難であることから、シミュレーションによるアプローチが、この因果関係の解明しいては心疾患治療・予防法の開発を含む今後の心臓医療の発展へとつながると考えられている。

1.2 先行研究

1.2.1 マウス心筋細胞における数理モデルの先行研究

心筋細胞の数理モデルとは、小器官ごとにその役割を反応方程式として定式化し、それらを組み合わせて細胞内小器官の濃度変化や、膜電位を再現するものである。実験に使用したものに合わせてフィッティングされる。数理モデルは様々なものが存在し、観察される活動電位などが異なることから、動物ごとに研究されている。また、正常モデルのみでなく、遺伝子組み換えされた細胞などに対してもモデルを作成し解析することで、メカニズムを解明しようとする研究も多くなされている。

Bondarenko らはパッチクランプ法で得られたデータから、活動電位と Ca^{2+} 動態を再現する数理モデルを開発した[6]。このモデルは、多様な電流を導入することにより、遺伝子欠損マウス心筋細胞における実験結果に関する予測を可能とした。また心筋細胞は心臓の部位によって異なる活動電位と Ca^{2+} 動態を持っており、Bondarenko らはこのモデルを使用して、心内膜と心外膜における活動電位と Ca^{2+} の再現を行い、不均一構造を観察した[7]。Li らは Bondarenko モデルの一部を変更し、心疾患の研究で最もよく使用される遺伝子組み換えマウスの左心室筋細胞の実験データに適合する、 Ca^{2+} 動態再現モデルを提示した[8]。この計算モデルを使用して、心筋の $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換体を過剰に発現させると、細胞からの Ca^{2+} が大きく減少するという結果が得られた。Edwards らは不整脈と心不全を発生させる遺伝子組み換えマウスの心筋細胞について実験と計算モデルの構築を行い、 Na^+ チャンネルの非平衡である再活性化によって、不整脈を引き起こす活動電位の早期脱分極 (Na^+ の早い流入) が始まることを示した[9]。

1.2.2 心筋細胞における電気生理力学連成解析に関する先行研究

心筋細胞における、力学的収縮現象と、電気生理現象、代謝現象の連成解析によって細胞内の挙動を再現する研究が波田野[10]によってなされた。この研究において、筋節は周期性と対称性が仮定され、筋節と、細胞小器官である筋原線維・ミトコンドリアを直方体の図形で表現した有限要素モデルで解析が行われた。力学・電気生理・代謝現象連成解析により、心筋細胞の収縮現象、 Ca^{2+} やその他の物質についての細胞内における濃度変化や空間分布、膜電流の変化が確認され、それらの解析結果は実験値との一致が見られた。この研究では、筋節の収縮から細胞内物質の拡散まで、心筋細胞の挙動について細かく分析がなされており、力学・電気生理・代謝の3つの現象を3次元解析で行うことを実現した。

一方で、先行研究のように簡易化されたモデルでは、実際の心筋細胞の構造を十分に模擬しているとは言い切れず、また小器官構造異常の再現に制限がある。各細胞小器官の形状や、その配置における意義を見落としている可能性がある。

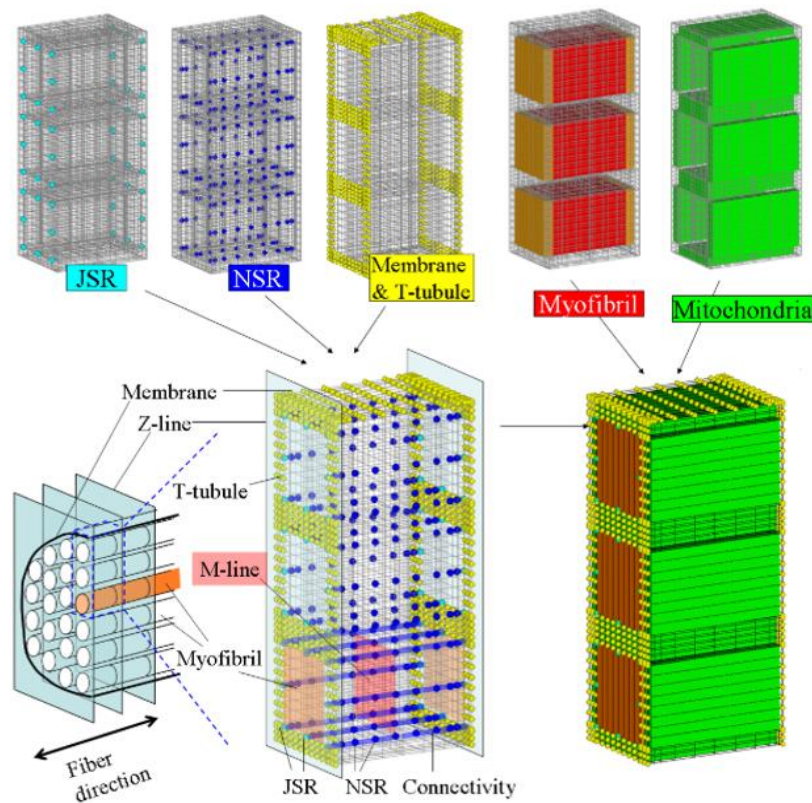


図 1.1 波田野[10]のメッシュモデル

1.2.3 細胞小器官の形状の影響に関する先行研究

実形状モデルを利用した、心筋細胞における電気生理現象の再現に関する研究は、これまでに数多くなされている。Ghosh らは、実形状のミトコンドリアの不均一な配置、不均等な形状による電気生理現象への影響を評価した[11]。彼らは、EM トモグラフィを用いて1つの心筋細胞に対して3か所取り出し、それぞれミトコンドリアについての二次元の実形状モデルを作成し、ADP や ATP 濃度などの解析を行った。その結果、正常に酸素が供給されれば細胞内のどの位置でも ADP や ATP 濃度は均一になるが、低酸素下では不均一になることが確認された。ミトコンドリアによる ATP の継続的、均一的な供給は安定した心機能に不可欠である。十分な酸素下ではミトコンドリアは正常に機能するが、低酸素下ではうまく機能しないことが解明され、この研究によって病理状態における心筋細胞の実形状モデル解析の有用性が示されていると考えられる。

Rajagopal らは1心筋細胞の半筋節分の三次元実形状モデルを作成し、 Ca^{2+} の反応拡散の解析を行った[12]。この研究では、EM トモグラフィよりミトコンドリアと筋原線維の形状を取り出したメッシュが作成され、微細な小器官である筋小胞体 (SR) と T 管の形状に関しては、統計的に得られたミトコンドリアや筋原線維との距離関係より仮想的に与えることで表現された。解析結果は実験値と一致しており、正常な細胞の再現に成功している。

第1章 序論

しかし、筋小胞体における T 管との位置関係が Ca^{2+} 放出に大きく影響を与えるとされているため、上記のような統計的な近似は、正常細胞の再現は可能であっても、病態細胞の再現には多くの仮定が必要となり難しいと考えられる。

微小な細胞小器官の形状の再現に関する研究としては、Colman らの研究が挙げられる。彼らは、羊の心筋細胞の筋小胞体及び T 管の三次元構造を再現し、細胞内・NSR 内の Ca^{2+} 反応拡散のシミュレーションを行った[13]。SBF-SEM 画像を使用して筋小胞体と T 管の完全な三次元形状をとらえ、それらを一次元ネットワークの三次元構造に落とし込んだモデルを作成することで、これらの小器官を表現した。解析によって正常状態の Ca^{2+} 反応拡散を再現し、加えて計算モデルのパラメータを変化させることで不整脈を誘発するダイナミクスを再現した。また細胞内の理想化された簡易モデルと、 Ca^{2+} の空間的濃度勾配の解析結果を比較し、より高い濃度勾配ができていることを確認し、構造の機能的影響を評価した。

T 管の形状についてさらに踏み込んだ研究もなされている。Uchida らは、T 管内部からの拡散速度の測定の実験と、形状に関しての簡易的なシミュレーションを用いて、T 管の電気生理的特性の評価を行った[14]。マウスなど、げっ歯類の心筋細胞の T 管は、多くの部分が直径 200nm 程度であるが、細い部分（狭窄部）と太い部分（膨張部）も存在する。一般部（200nm）だけで構築したネットワーク構造、膨張部を含む構造、狭窄部を含む構造、両方を含む構造を用いたシミュレーションを行った。その結果、膨張部・狭窄部両方を含む構造が T 管の拡散的・電気的特性を再現できると結論付けており、形状の評価の重要性が示されている。

これら細胞小器官形状の影響に関する先行研究は、小器官形状が Ca^{2+} や ATP の分布に影響することを示している。しかし、細胞の正常な形状が正常な現象を再現することを示すにとどまっており、形態異常が生理学的に持つ意味について答えるに至っていない。また、モデル化の範囲が Ca^{2+} や ATP のみとなっており、その先にある収縮力発生と変形によるアクチン・ミオシンとしての心機能を評価できていない。ゆえにこれらを考慮したモデルにおいて挙動の再現を行うことが必要だと考える。

1.3 研究の目的および手法

本研究では、正常状態マウスと病理状態マウスの心筋細胞内現象の再現を行い、両者の比較を行うことで細胞内小器官形状やその配置が Ca^{2+} 動態や収縮現象に及ぼす影響を評価することを目的とする。細胞構造の変化が心機能の低下にどのように影響を与えるかを明らかににすることができれば、心疾患治療・予防法の開発に貢献できると考えられる。

過去の研究では、簡易的な形状で心筋細胞をモデル化し、それを利用した力学・電気生理・代謝現象についての双方向の連成解析や、細胞内のある小器官に着目し、その実形状を用いたモデルによる、心筋細胞内の電気生理現象のカギとなる物質の拡散や濃度変化、

第1章 序論

電位変化などの解析が行われてきた。しかし、簡易化されたモデルでは小器官形状の重大な特徴を見落としている可能性があり、また、細胞内では、力学的収縮現象や各小器官での電気生理・代謝現象が複雑に絡みあっており、それらを切り離さずに考慮したモデルでの解析が必要となる。そこで本研究では、実形状データに基づいた3次元有限要素モデルでの力学・電気生理・代謝現象の連成解析を行う。マウスにおいて連成解析を行う数理モデルは開発されていないため、本研究では当研究室の波田野らが作成したモルモットにおける力学・電気生理・代謝解析プログラムをベースとして作成し、また簡易形状でなく実形状モデルに対しても使用できるようにする。また得られた数理モデルを用いて、走査性電子顕微鏡画像をもとに作成された正常状態と病理状態の心筋細胞有限要素モデルで解析を行い、細胞内での物質濃度変化や勾配、収縮現象について再現、比較することによって、細胞構造の違いが細胞の働きに及ぼす影響について論じる。

1.4 本論文の構成

以下に本論文の構成を述べる。

第1章では、本研究の背景と目的について述べた。

第2章では、心筋細胞の微細構造及び各小器官の役割について述べたのち、力学電気生理連成計算モデルについて説明する。

第3章では、正常状態のマウス心筋細胞において作成した有限要素モデルについて述べたのち、解析結果とその考察を述べる。

第4章では、MLPKOマウスの心筋細胞画像から小器官構造の特徴を述べ、のち同画像から作成した有限要素モデルとその解析結果、考察について述べる。

第5章では、本研究の結論と今後の課題について述べる。

第2章 心筋細胞と力学電気生理数理モデル

2.1 心筋細胞

2.1.1 心筋細胞の微細構造

まず心筋細胞について説明する．電氣的刺激によって収縮・弛緩し，これが心臓の拍動を引き起こす．図 2.1 は心筋細胞模式図である．心筋細胞は直径十数 μm の円筒状の形をしている．筋原線維，ミトコンドリア，細胞膜，細胞質，横行小管，筋小胞体と呼ばれる細胞小器官で構成される．

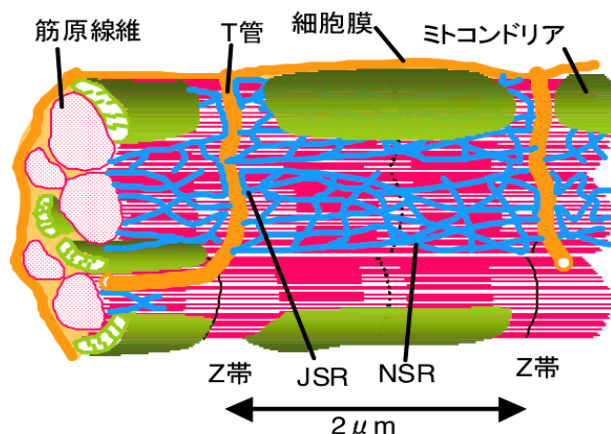


図 2.1 心筋細胞模式図[15]

次に各細胞小器官の役割について説明する．

細胞質は細胞内部を満たす液体のことである．細胞内小器官による物質のやり取りは全て細胞質における拡散を通して行われている．

細胞膜は細胞内外を隔てる生体膜である．脳からの電氣刺激によって膜電位が変化し，この膜電位の変化を発端として収縮現象が生じる． Ca^{2+} や Na^+ , K^+ の流入，流出を行うイオンチャンネルを持ち，内外の濃度勾配に逆らった輸送を行う役割を担っている．

横行小管 (T 管) は細胞膜が内部に陥入することにより出来る管状の膜構造のことである．細胞膜への電氣刺激は T 管にも同様に伝わるため，電氣刺激を細胞内部にまで素早く伝達する役割をもつ．表面には細胞膜と同様にイオンチャンネルを持つ．電氣刺激により T 管と細胞膜にあるイオンチャンネルはほぼ同時に開くため，心筋細胞において膜の近い部分と遠い部分が同時に収縮できる．

筋原線維は収縮現象を主に担う小器官である．円筒状に存在しており，心筋細胞のうち

5 から 6 割を占める。図 2.2 は筋原線維模式図、図 2.3 は心筋細胞画像を筋原線維付近で拡大したものである。筋節（サルコメア）と呼ばれる繰り返し単位を持ち、これは約 $2\mu\text{m}$ の大きさをもつ。それぞれアクチンとミオシンと呼ばれるタンパク質からなる 2 種類のフィラメントで構成されている。アクチンフィラメントは細く、ミオシンフィラメントは太い。両方のフィラメントで構成される A 帯と、アクチンフィラメントのみで構成される I 帯が存在する。アクチンとミオシンの相互作用によって、収縮が行われる。筋節と筋節の間に存在し、アクチンフィラメントをつないでいる部分を Z 帯と呼ぶ。電子顕微鏡画像では筋原線維のうち A 帯は暗く、I 帯は明るい灰色で識別でき、明るい I 帯の真ん中に走る暗い灰色の線で示されているが Z 帯である。Z 帯付近に T 管は主に存在している。

ミトコンドリアはエネルギー生産を役割としている。心筋細胞のうちおよそ 3 から 4 割を占める。二重膜構造をしており、内側の膜はマトリクスと呼ばれる。ミトコンドリア自体も Ca^{2+} を吸収・排出を担うイオンチャネルを持ち、ミトコンドリア内部における Ca^{2+} 濃度によって ATP 生産の調節を行う。また、細胞内の Ca^{2+} 濃度の調節も行う。

筋小胞体 (SR, Sarcoplasmic reticulum) は筋原線維を囲むように細胞内に配置されている網目状の小胞体で、細胞全体に広く分布している。SR の働きは細胞内 Ca^{2+} の貯蔵と放出である。SR のうち T 管と接している部分を Junctional SR (JSR) と呼び、それ以外を Network SR (NSR) と呼ぶ。NSR には Ca^{2+} ポンプが存在し、細胞内 Ca^{2+} を汲み上げる役割を担う。JSR と JSR に向き合う T 管の部分には Ca^{2+} 放出口 (CaRU, Calcium Release Unit) が形成されている。これは T 管に存在する Ca^{2+} 放出チャネル (LCC, L-type calcium channel) と JSR のリアノジンレセプタ (RyR, Ryanodine Receptor) からなる。LCC は膜電位変化によって開く Ca^{2+} チャネルで、RyR は Ca^{2+} 濃度変化により開く Ca^{2+} チャネルである。LCC と RyR それぞれから細胞全体に放出される Ca^{2+} 割合は膜電位に依存するため動物の種類ごとに異なり、マウス心筋細胞において RyR から放出される Ca^{2+} は全体に放出される Ca^{2+} の 9 割以上を占めるとされている[16]。また、T 管と JSR 間の隙間のことを Dyad と呼ぶ。

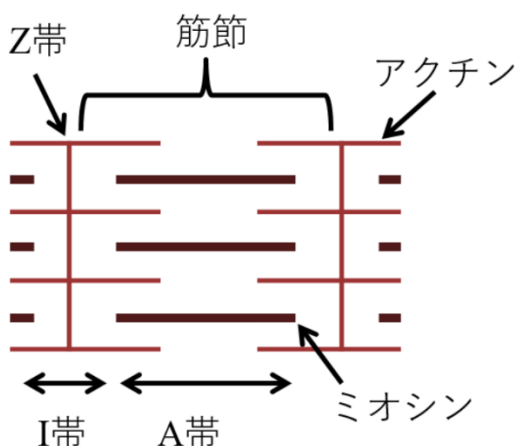


図 2.2 筋原線維模式図

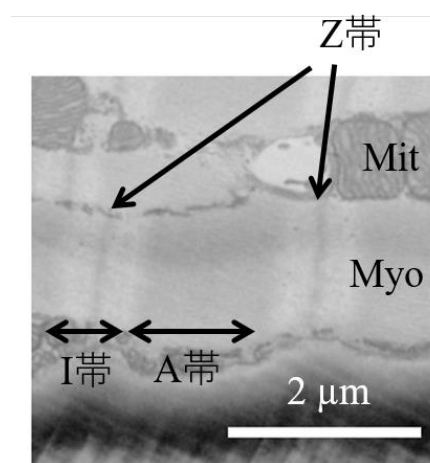


図 2.3 筋原線維部分拡大画像

2.1.2 一拍の挙動について

拍動の一拍で心筋細胞とその細胞内物質がどのような挙動をとるのか、 Ca^{2+} に焦点を絞って簡易的に説明する。

細胞膜に活動電位が生じると、T管にも同様に電気刺激が伝わり、膜とT管に存在する、LCCを含めたイオンチャンネルが開き、細胞外から Ca^{2+} が流入する。LCC付近の Ca^{2+} 濃度が上昇することによりRyRが開き、SR内部に貯蔵されていた Ca^{2+} が細胞内に放出される。放出された Ca^{2+} は細胞全体に拡散されていく。これにより細胞内の Ca^{2+} 濃度が急激に上昇する。 Ca^{2+} 濃度が上昇すると、 Ca^{2+} が筋原線維のアクチンフィラメントに作用して収縮力が発生し、細胞全体が収縮していく。またNSRの働きにより、細胞全体に拡がった Ca^{2+} がNSR内に吸収されていき、細胞内 Ca^{2+} 濃度が低下する。 Ca^{2+} 濃度の低下に伴って発生する収縮力が小さくなっていき、細胞全体が弛緩する。

2.2 力学電気生理数理モデルの作成

本研究で作成した力学電気生理連成解析について説明する。心筋細胞では、前述のとおり、細胞内小器官の働きによって、最終的に力が発生することで収縮する。つまり電気生理現象と力学現象が相互に関係しあっている。ここでいう電気生理現象は、細胞内物質の移動、消費、生産に伴う濃度変化と膜電位の変化であり。力学現象は、拍動（収縮現象）のことを指している。

ゆえに心筋細胞内での現象再現をするには、これら電気生理現象と力学現象を相関させて解析することが必要となる。本研究では、波田野のモデル[10]をベースとした。これは、まず電氣生理解析によって、細胞内に発生した収縮力を得る。これを力学解析に渡して変位を得る。そして得られた変位を電氣生理解析に渡す、という一連の計算を繰り返すことで相関を実現させている。

本節で電氣生理モデルと力学モデルについてそれぞれ説明する。

2.2.1 電氣生理モデル

ベースとした波田野の解析モデル[10]は、細胞に対して細胞内物資が伝搬していく様子を解析するための拡散方程式と、細胞内物質や電位に対する各小器官の働きを記述した反応項によってなり、これを本研究では拡散反応方程式と呼ぶ。

拡散反応方程式は、 Ca^{2+} 、ATP、ADP、CP、Cr、Piの6つの細胞内物質について解いている。式は、 Ca^{2+} のみについて示す。以下の様になっている。

$$\frac{\partial[\text{Ca}^{2+}]_i}{\partial t} = \nabla \cdot (D_i^{\text{Ca}^{2+}} \nabla[\text{Ca}^{2+}]_i) + f_i^{\text{Ca}^{2+}} \quad (2-1)$$

第2章 本研究で用いる計算手法

i は節点, D は拡散係数を格納した対角マトリクス, $[A]_i$ は節点 i における物質 A の濃度である. 右辺第一項が拡散項, 右辺第二項の f は反応項で, この反応項はその節点における細胞小器官による物質の取り込み・放出を意味する.

拡散係数は細胞内の位置, どの小器官であるかによって異なると仮定された. 解析に用いた拡散係数を表 2.1 に示す. 筋原線維, ミトコンドリア, 細胞質の各小器官での拡散係数は, 波田野のモデル[10]と同様にした. また, NSR は二次元の平面要素に仮想的な厚みを持たせて三次元とし, NSR 内での拡散を解くこととした. NSR 内の拡散係数については, Colman の先行研究[13]をもとに, 筋原線維内の拡散係数と同様とした.

表 2.1 細胞 Ca^{2+} 内の拡散係数

基質	axial D	transverse D
Ca^{2+}	0.300	0.1880

次に反応項について述べる. 後述する, 本研究で使用した心筋細胞画像はマウスのものである. 細胞内挙動のうち特に活動電位は動物によって異なることがわかっており[17], 加えて Ca^{2+} は電位に影響を受ける. そのため, 膜, 筋小胞体, 細胞質における計算モデルを, マウス心筋細胞計算モデルを開発した Bondarenko[6][7]と Edwards[9]のものとした. これに, ミトコンドリアの入ったモルモットの計算モデルである Cortassa[18]モデルと, 筋原線維収縮力発生モデルの Negroni のもの[19]を組み合わせた.

本研究では Bondarenko と Edwards モデルの一次元再現解析を行った後に, 実形状三次元有限要素モデルでの解析を行えるように数理モデルの作成を行った.

波田野モデル, Bondarenko モデル及び Edwards モデルは, CaRU 直下の細胞質を subspace (ss) と呼び, 他の箇所の細胞質と差別化してモデリングしているが, ここでは計算負荷軽減と, CaRU 直下の細胞質は有限要素モデルの節点として存在しているため, 本解析ではモデル化を行わなかった.

膜電位は素早く伝搬するゆえに細胞膜で一様と仮定しているため, T 管にも素早く伝搬するとし, T 管でも一様であるとした. そのため, T 管は点で存在するとし T 管同士の繋がりを仮定しなかった. NSR は線ではなく, 面で定義することとした. JSR は点で存在するとし, NSR との繋がりを定義した. どのように形状の定義を行ったかは次章で詳しく説明する.

以下には波田野モデルと変更した箇所と, Ca^{2+} , 収縮力に関する反応方程式を記述していく. 以下 vol は節点に与えられている細胞小器官ごとの体積である. また, 添え字の cyt は細胞質, mbr は細胞膜, mit はミトコンドリア, myo は筋原線維, o は細胞外領域を表す.

(a) 細胞膜と T 管

細胞膜と T 管は、前述のとおり、モデル全体で一様であると仮定した。また、 K^+ と Na^+ 濃度は細胞内で大きな勾配を生じないため、細胞内で一様とした。Bondarenko[6][7]のものをベースとし、 I_{Na} と I_{NaCa} は Edwards[9]のものを使用した。

膜電位変化は以下ようになる。

$$-C_m \frac{dV}{dt} = I_{CaL} + I_{p(Ca)} + I_{NaCa} + I_{Cab} + I_{Na} + I_{Nab} + I_{NaK} + I_{Kto,f} + I_{Kto,s} + I_{K1} + I_{Ks} + I_{Kur} + I_{Kss} + I_{Kr} + I_{Cl,Ca} + I_{stim} \quad (2-2)$$

I_{stim} は実験的に細胞を興奮させる際、膜に強制的に輸入される電流である。本研究では 0.5 ms の間、80 pA/pF の電流を入力している。 I_{stim} のみが外部入力であり、この後は自動的にシミュレーションされる。

Ca^{2+} 電流による反応項は以下の様になる。LCC によって流入する Ca^{2+} は、ss の代わりに膜直下の細胞質に流入するとした。

$$f_{mbr}^{Ca^{2+}} = (I_{Cab} - 2I_{NaCa} + I_{p(Ca)} + I_{CaL}) \frac{A_{cap} C_m}{2vol_{cyt} F} \quad (2-3)$$

各 Ca^{2+} 電流についての式を記す。

(i) L型 Ca^{2+} チャネル電流

LCC は T 管と細胞膜それぞれ均等に存在すると仮定した。また、ゲート変数に ss の濃度を参照する箇所があるが、代わりに膜直下の細胞質を参照することとした。 O はチャネルのオープン確率、 G_{CaL} は全体での細胞伝導率、 $E_{Ca,L}$ は LCC 逆転電位である。

$$I_{CaL} = G_{CaL} O (V - E_{Ca,L}) \quad (2-4)$$

(ii) Ca^{2+} ポンプ電流

$$I_{p(Ca)} = I_{p(Ca)}^{max} \frac{[Ca^{2+}]_{cyt}^2}{K_{m,p(Ca)}^2 + [Ca^{2+}]_{cyt}^2} \quad (2-5)$$

(iii) Na^+/Ca^{2+} 交換チャネル電流

Edwards モデルでは ss と細胞質両方について ΔE_i の計算を行い、割合をかけて足していたが、本研究のモデルでは ss がないため、Edwards が参考としている Li[8]のものとし、以下の式とした。

$$I_{NaCa} = V_{NCX} \Delta E_i \quad (2-6)$$

$$\Delta E_i = \frac{\left([\text{Na}^+]_{\text{cyt}}^3 [\text{Ca}^{2+}]_o e^{\frac{\eta VF}{RT}} - [\text{Na}^+]_o^3 [\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}} e^{\frac{(\eta-1)VF}{RT}} \right)}{\left(K_{mCa_o} [\text{Na}^+]_{\text{cyt}}^3 + K_{mNa_o}^3 [\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}} + K_{mNa_i}^3 [\text{Ca}^{2+}]_o \left(1 + \frac{[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}}{K_{mCa_i}} \right) \right) \left(1 + k_{sat} e^{\frac{(\eta-1)VF}{RT}} \right) + K_{mCa_i} [\text{Na}^+]_o^3 \left(1 + \frac{[\text{Na}^+]_{\text{cyt}}^3}{K_{mNa_i}^3} \right) + [\text{Na}^+]_{\text{cyt}}^3 [\text{Ca}^{2+}]_o + [\text{Na}^+]_o^3 [\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}}$$
(2-7)

(iv) Ca^{2+} 漏洩電流

$$I_{\text{Cab}} = G_{\text{Cab}}(V - E_{\text{CaN}}) \quad (2-8)$$

$$E_{\text{CaN}} = \frac{RT}{2F} \ln \left(\frac{[\text{Ca}^{2+}]_o}{[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}} \right) \quad (2-9)$$

Na^+ 電流による Na^+ 濃度変化は以下の様になる。

$$\frac{d[\text{Na}^+]_{\text{cyt}}}{dt} = -(I_{\text{Na}} + I_{\text{Nab}} + 3I_{\text{NaCa}} + 3I_{\text{NaK}}) \frac{A_{\text{cap}} C_m}{\text{vol}_{\text{cyt}} F} \quad (2-10)$$

各 Na^+ 電流についての式を記す。

(i) 速い内向き Na^+ 電流

$$I_{\text{Na}} = G_{\text{Na}} O_{\text{Na}}(V - E_{\text{Na}}) \quad (2-11)$$

$$E_{\text{Na}} = \frac{RT}{F} \ln \left(\frac{0.9[\text{Na}^+]_o + 0.1[\text{K}^+]_o}{0.9[\text{Na}^+]_{\text{cyt}} + 0.1[\text{K}^+]_{\text{cyt}}} \right) \quad (2-12)$$

(ii) Na^+ 漏洩電流

$$I_{\text{Nab}} = G_{\text{Nab}}(V - E_{\text{Na}}) \quad (2-13)$$

(iii) Na^+/K^+ ポンプ電流

$$I_{\text{NaK}} = I_{\text{NaK}}^{\text{max}} f_{\text{NaK}} \frac{1}{1 + \left(\frac{K_{m,\text{Nai}}}{[\text{Na}^+]_{\text{cyt}}} \right)^2} \frac{[\text{K}^+]_o}{\frac{3}{2} [\text{K}^+]_o + K_{m,\text{Ko}}} \quad (2-14)$$

$$f_{\text{NaK}} = \frac{1}{1 + 0.1245 e^{-\frac{0.1VF}{RT}} + 0.0365 \sigma e^{-\frac{VF}{RT}}} \quad (2-15)$$

$$\sigma = \frac{1}{7} \left(e^{\frac{[\text{Na}^+]_o}{67,300}} - 1 \right) \quad (2-16)$$

K⁺電流による K⁺濃度変化は以下の様になる.

$$\frac{d[K^+]_{\text{cyt}}}{dt} = -(I_{\text{Kto},f} + I_{\text{Kto},s} + I_{\text{K1}} + I_{\text{Ks}} + I_{\text{Kss}} + I_{\text{Kur}} + I_{\text{Kr}} - 2I_{\text{NaK}}) \frac{A_{\text{cap}} C_{\text{m}}}{\text{vol}_{\text{cyt}} F} \quad (2-17)$$

各 K⁺電流についての式を記す.

(i) 急速性一過性外向き K⁺電流

$$I_{\text{Kto},f} = G_{\text{Kto},f} a_{\text{to},f}^3 i_{\text{to},f} (V - E_{\text{K}}) \quad (2-18)$$

$$E_{\text{K}} = \frac{RT}{F} \ln \left(\frac{[K^+]_{\text{o}}}{[K^+]_{\text{cyt}}} \right) \quad (2-19)$$

E_{K} は K 逆転電位である. a_* , i_* はそれぞれ I_* に対する活性化, 不活性化のゲート変数を表す.

(ii) 遅効性一過性外向き K⁺電流

$$I_{\text{Kto},s} = G_{\text{Kto},s} a_{\text{to},s} i_{\text{to},s} (V - E_{\text{K}}) \quad (2-20)$$

(iii) 時間独立性内向き整流性 K⁺電流

$$I_{\text{K1}} = 0.2938 \left(\frac{[K^+]_{\text{o}}}{[K^+]_{\text{o}} + 210.0} \right) \left[\frac{V - E_{\text{K}}}{1 + e^{0.0896(V - E_{\text{K}})}} \right] \quad (2-21)$$

(iv) 遅延整流性 K⁺電流 (遅い成分)

$$I_{\text{Ks}} = G_{\text{Ks}} n_{\text{Ks}}^2 (V - E_{\text{K}}) \quad (2-22)$$

(v) 超高速活性化遅延整流 K⁺電流

$$I_{\text{Kur}} = G_{\text{Kur}} a_{\text{ur}} i_{\text{ur}} (V - E_{\text{K}}) \quad (2-23)$$

(vi) 非活性型定常性 K^+ 電流

$$I_{Kss} = G_{Kss} a_{Kss} i_{Kss} (V - E_K) \quad (2-24)$$

(vii) 遅延整流性 K 電流 (速い成分)

$$I_{Kr} = O_K \cdot G_{Kr} \cdot \left[V - \frac{RT}{F} \ln \left(\frac{0.98 [K^+]_o + 0.02 [Na^+]_o}{0.98 [K^+]_{cyt} + 0.02 [Na^+]_{cyt}} \right) \right] \quad (2-25)$$

また, Ca^{2+} 活性化 Cl^- 電流は以下の様に表される.

$$I_{Cl,Ca} = G_{Cl,Ca} O_{Cl,Ca} \frac{[Ca^{2+}]_{cyt}}{[Ca^{2+}]_{cyt} + K_{m,Cl}} (V - E_{Cl}) \quad (2-26)$$

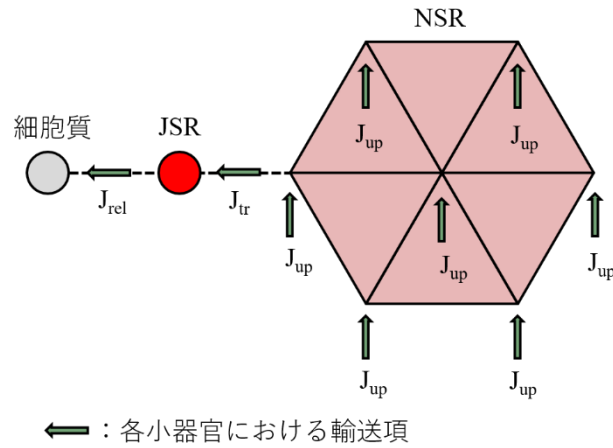
$$O_{Cl,Ca} = \frac{0.2}{1 + \exp \left[-\frac{V - 46.7}{7.8} \right]} \quad (2-27)$$

(b) 筋小胞体 (SR)

筋小胞体の計算モデルについては Bondarenko モデル, Edwards モデルについて NSR による Ca^{2+} 汲み上げを表す SERCA ポンプの項 (J_{up}) 以外は同一であった. J_{up} は Edwards のものに, Cortassa の ATP と ADP 濃度によって J_{up} を調節する項である f_{SERCA}^{ATP} をかけて表現した. Bondarenko モデルに存在する NSR から漏洩する Ca^{2+} 量を示す J_{leak} は, f_{SERCA}^{ATP} をかけた J_{up} によって表現されるため, 削除した.

また, 本モデルでは ss が存在しないため, JSR からの Ca^{2+} 放出は ss ではなく CaRU 直下 (T 管と JSR の直下) の細胞質に行われることとした. また, RyR の表現として, 本研究では活動電位が生じた際に, ある Ca^{2+} 濃度を越えた際に開くとした.

SR による Ca の出入りのイメージ図を図 2.4 に示す. NSR は三角要素の平面としている. 図の緑の矢印で示されている Ca^{2+} 輸送項とは, 反応項で代替されるものであり, NSR においては J_{up} がこれにあたる. NSR 同士の節点間におけるそれ以外の輸送は拡散によって表現されている. JSR と NSR, JSR と細胞質の繋がりをそれぞれ定義し, J_{tr} , J_{rel} を節点間での輸送としている.

図 2.4 筋小胞体での Ca^{2+} 輸送イメージ図

JSR 節点における Ca^{2+} 反応項 f_{JSR} と NSR 節点における Ca^{2+} 反応項 f_{NSR} はそれぞれ

$$f_{\text{JSR}}^{\text{Ca}^{2+}} = J_{\text{rel}} \frac{\text{vol}_{\text{JSR}}}{\text{vol}_{\text{cyt}}} \quad (2-28)$$

$$f_{\text{NSR}}^{\text{Ca}^{2+}} = -J_{\text{up}} \quad (2-29)$$

となる。また、NSR 内拡散反応方程式における反応項 $f_{\text{NSR, NSR}}^{\text{Ca}^{2+}}$ は

$$f_{\text{NSR, NSR}}^{\text{Ca}^{2+}} = J_{\text{up}} \frac{\text{vol}_{\text{JSR}}}{\text{vol}_{\text{cyt}}} - J_{\text{tr}} \frac{\text{vol}_{\text{JSR}}}{\text{vol}_{\text{NSR}}} \quad (2-30)$$

となり、JSR 内の Ca^{2+} 濃度変化は以下の様になる。

$$\frac{d[\text{Ca}^{2+}]_{\text{JSR}}}{dt} = J_{\text{tr}} - J_{\text{rel}} \quad (2-31)$$

JSR から細胞質への Ca^{2+} 放出 J_{rel} は

$$J_{\text{rel}} = v_1 \cdot \text{RyRopen} \cdot ([\text{Ca}^{2+}]_{\text{JSR}} - [\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}) \quad (2-32)$$

$$\text{RyRopen} = v_{\text{max}} e^{-0.14(t-t_0)} (1 - e^{-0.07(t-t_0)}) \quad (2-33)$$

となる。NSR から JSR への輸送 J_{tr} は

$$J_{tr} = \frac{[Ca^{2+}]_{NSR} - [Ca^{2+}]_{JSR}}{\tau_{tr}} \quad (2-34)$$

と表される。NSR のポンプによる Ca^{2+} の吸い上げの SERCA ポンプを表す J_{up} は

$$J_{up} = \frac{V_f^{max} f_b - V_r^{max} r_b}{1 + f_b + r_b} f_{SERCA}^{ATP} \quad (2-35)$$

$$f_b = \left(\frac{[Ca^{2+}]_{cyt}}{K_{fb}} \right)^{N_{fb}} \quad (2-36)$$

$$r_b = \left(\frac{[Ca^{2+}]_{NSR}}{K_{rb}} \right)^{N_{rb}} \quad (2-37)$$

$$f_{SERCA}^{ATP} = \left\{ \frac{K_{m,up}^{ATP}}{[ATP]_{cyt}} \left(1 + \frac{[ADP]_{cyt}}{K_{i,up}} \right) + \left(1 + \frac{[ADP]_{cyt}}{K'_{i,up}} \right) \right\}^{-1} \quad (2-38)$$

である。

(c) 筋原線維

筋原線維は、 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 、 $[ATP]_{cyt}$ 、 $[Pi]$ に応じて収縮力を生じさせ、力学的収縮現象と、代謝・電気生理現象をつなぐ重要な役割を担う。Negroni[19]の筋原線維収縮力発生モデルを Matsuoka[20]らが ATP 依存性を持たせて拡張したモデルを使用した。本研究では、筋原線維モデルは I 帯と A 帯の区別がないため、筋原線維の A 帯の反応項については、筋原線維のすべての節点で計算した。筋原線維の反応項と収縮力発生について記す。

筋原線維での反応項 f_{myo} は以下の様に表される。

$$f_{myo}^{Ca^{2+}} = -J_{TRPN} \frac{vol_{myo}}{vol_{cyt}} \quad (2-39)$$

収縮力発生モデルは波田野の A 帯の収縮力発生モデルを利用した。筋原線維に 4 状態 (TCa, TCa*, T, T*) を定義している。T はトロポニン、TCa は Ca^{2+} と T が結合した状態、* は収縮力発生を起こしている状態を示す。 Ca^{2+} 濃度と筋の収縮状態に応じ変化する。

トロポニンの働きによって吸収される Ca^{2+} 量 J_{TRPN} は

$$J_{TRPN} = (Q_1 - Q_3 - Q_5) \cdot [TRPN] \quad (2-40)$$

であり、筋原線維に発生する収縮力 $Force$ は

$$Force = \zeta [TRPN] \cdot [TCa^*] \cdot [T^*] \cdot (SL - X) \quad (2-41)$$

となる。

(d) ミトコンドリア

前述の通り、Cortassa モデルを使用した。ミトコンドリア節点での反応項は以下のようになる

$$f_{mit}^{Ca^{2+}} = -(V_{uni} - V_{ANT}) \frac{vol_{mit}}{vol_{cyt}} \quad (2-42)$$

V_o はタンパク質の反応速度である。 V_{ANT} はアデニンヌクレオチド交換体、 V_{uni} はミトコンドリアの Ca^{2+} 単輸送の速度となる。

2.2.2 力学モデル

筋原線維によって発生し、細胞形状内に分布した収縮力を用いて変形を解析するために、有限要素法で力学的平衡問題を解く。

筋肉は超弾性体と仮定した。超弾性体は歪から応力状態が一意に求まる材料である。歪みポテンシャル W の定義により物質特有の応力歪特性を与える（構成則）。

本研究で解かれている力学平衡方程式は、以下の通りである。

$$\int_V \left(2 \frac{\partial W}{\partial \mathbf{C}} + \lambda \mathbf{J} \mathbf{C}^{-1} \right) : \delta \mathbf{E} dV + \int_{S_t} \bar{\mathbf{t}}_b \cdot \delta \mathbf{u} dS = 0 \quad (2-43)$$

$$\int_V \delta \lambda \left\{ \mathbf{J} - 1 \right\} - \frac{2\lambda}{\kappa} \left\{ \mathbf{J} - 1 \right\} dV = 0 \quad (2-44)$$

V は解析領域、 \mathbf{u} は仮想変位、 $\delta \mathbf{E}$ は \mathbf{u} に由来する仮想歪、 λ はラグランジュ未定乗数、 κ は体積弾性率、 $\bar{\mathbf{t}}_b$ は応力境界条件、 S_t は応力境界条件の定義される面である。これらの非線形方程式を、有限要素方程式で解く。

筋原線維の構成則として、Watanabe らは passive な剛性と active な剛性を興奮度の関数として組み合わせたことで筋の特性を表現しており [21]、波田野モデル同様に本研究でもこれを使用した。

ミトコンドリアと細胞質についても、波田野モデルと同様に、一般的な生体材料の特性を示す 3 次の Mooney-Rivlin 体の構成則を用いることとし、係数は 5 倍とした。これは波田

第2章 本研究で用いる計算手法

野モデルに比べ、細胞質領域が存在しており、ミトコンドリア領域が増えたことを考慮したことに加え、筋原線維の間に入り込むように存在する小さな細胞質の要素が潰れてしまわないように、計算の安定化のために固くした。

第3章 Control マウスにおける解析

3.1 緒言

本章では正常状態マウス (Control マウス) 心筋細胞の実形状に基づいたモデリング方法について述べたのち、このモデルを使用した力学電気生理解析の結果について、妥当性の評価、結果の考察を行う。

3.2 実形状有限要素モデルの作成.

Control マウスのモデルとして、本研究室の田中[22]が作成した有限要素モデルから切り出して作成することとした。田中が作成したメッシュは、正常状態マウス心筋細胞の走査性電子顕微鏡画像を小器官ごとにマークし、その形状を取り出したのち、三角要素でそのサーフェスを作ったものである。そこから、大きさ $5.5 \mu\text{m} \times 12.6 \mu\text{m} \times 6.7 \mu\text{m}$ で箱状に切り出した。心筋細胞の直径がおよそ十数 μm であることから、4分の1程度の大きさとなる。ゆえに、対称な境界条件を仮定することは妥当であるといえる。また1筋節が $2 \mu\text{m}$ であるため、収縮方向におよそ3筋節分の大きさである。

田中のメッシュでは、筋原線維、ミトコンドリア、細胞膜、T管、Dyadが三次元形状としてモデル化されていた。T管とDyadはミトコンドリアや筋原線維と比べて微細な小器官であり、橋本の先行研究によるとこれをそのまま使用した場合、拡散反応方程式を陽解法で解いているため、計算負荷が大きくなってしまっている[23]。そこで本研究では、まずこれらの形状が存在するところを細胞質で埋め、その上でT管とJSRを節点に仮想的に体積を与えて表現することとした。前述のとおり、膜とT管の電位も同様としているため、T管同士に繋がりをもたせなくても表現できる。JSRはNSR節点と二重節点となり、NSRとの繋がりをもてるため節点でも表現できる。

T管とDyadの位置は田中のメッシュからわかるため、これらの小器官に近い位置にある節点を探索し、それぞれT管、JSRとした。位置を調べるのに用いたDyadとT管の形状は図3.1に示す。T管は膨張部と狭窄部を持ち、ゆえにDyadも広い部分と細い部分をもっていることがわかる。DyadとJSRの例を図3.2に示す。膨張部は節点の数が多く、狭窄部の部分は節点の数が少なくなっており、節点によってもとの形状をよく再現できているといえる。

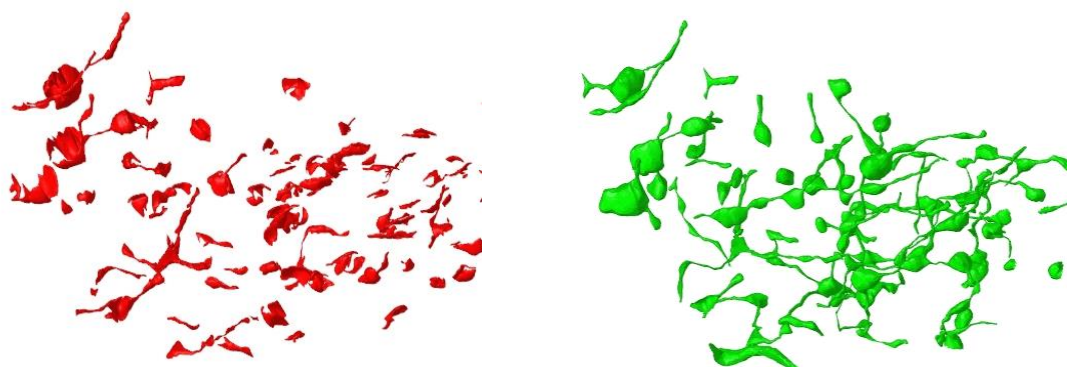


図 3.1 Dyad (左) と T 管 (右) の形状

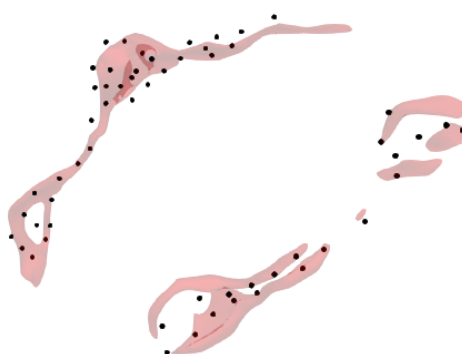


図 3.2 JSR (黒点) と Dyad (赤) の位置関係の例

また、NSR は今回使用した画像から識別することが非常に難しいため、筋原線維を囲むように存在していることを利用し、筋原線維の周りの三角要素の平面要素とした。

本研究で使用したメッシュ形状の全体図を図 3.3 に示す。赤が筋原線維 (図 3.4)、青がミトコンドリア (図 3.5)、黄色が細胞膜 (図 3.7) を表す。細胞膜は三角要素、筋原線維とミトコンドリアは四面体要素である。解析規模を表 3.1 に示す。以下、本章で作成したモデルを Control モデルと呼ぶ。

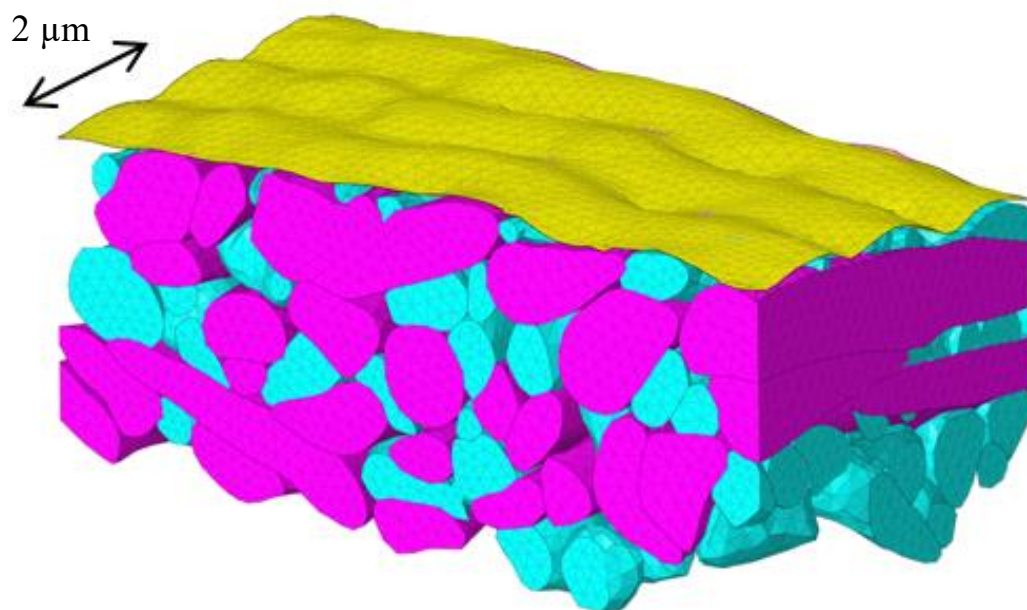


図 3.3 Control マウス有限要素モデル全体図

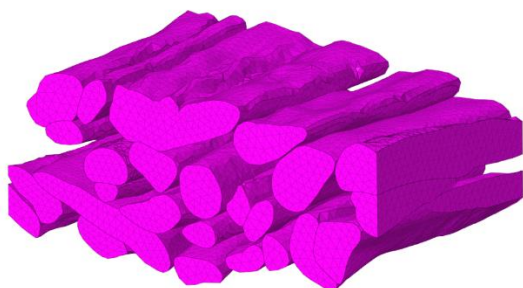


図 3.4 筋原線維形状

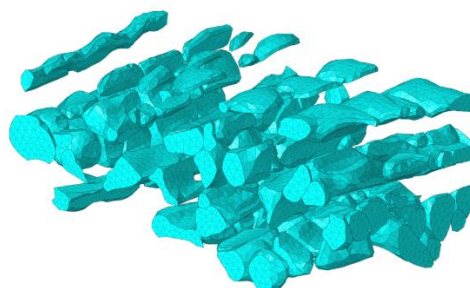


図 3.5 ミトコンドリア形状

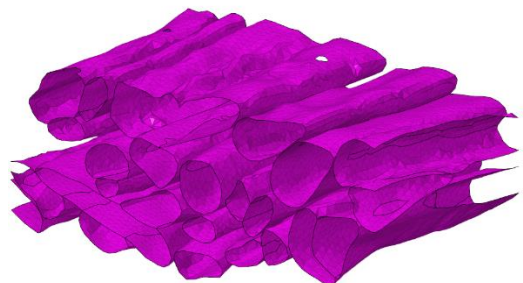


図 3.6 SR形状

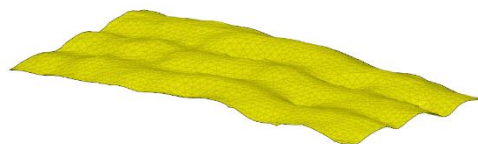


図 3.7 膜形状

表 3.1 有限要素モデル解析規模

Nodes	554822
Elements	480292

3.3 解析条件

3.3.1 境界条件

電気生理モデル，すなわち拡散反応方程式の境界条件として，モデルの表面全てにおいて，細胞膜のイオンチャンネルを介するイオンの出入りを除き，流入 0 のノイマン境界条件を用いた．力学の境界条件については，二通り解析を行った．一つは筋原線維軸方向に片面は変位固定，もう一面は自由端とする境界条件，もう一つは両端固定を用いた．変位固定と自由端の面の位置は図 3.8 に示す．

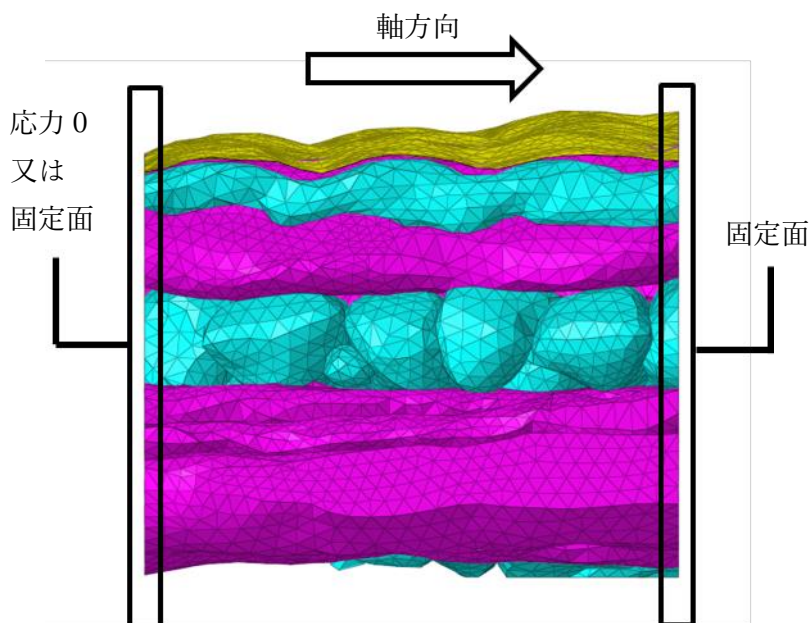


図 3.8 力学的境界条件

3.3.2 計算条件

拡散解析には陽解法を用いた．電気生理モデルの特性上， Ca^{2+} の放出のタイミングで急激に濃度が上昇する箇所が多いため，解が収束するためには非常に細かいタイムステップを必要とする．そこで，最大のタイムステップを 1.0×10^{-1} ms，最小のタイムステップを

第3章 マウス心筋細胞モデルの構築と検証

1.0×10^{-5} ms として、濃度変化が急な時、つまり Ca^{2+} 放出のタイミングでは最小のタイムステップとなるようにした。また、拍動の周期を 1 Hz とした。

力学解析には陰解法を用いた。内力と合成マトリクスの計算を行い、変位増分修正量を導出し、力学的平衡の解が収束するまで反復を行う。力学解析は、拡散解析ほど細かくタイムステップを取る必要がないため、本解析では変形するタイムステップとして 5 ms を用い、その間は形状の修正を行わずに反応拡散のみを解いた。

計算のアルゴリズムを図 3.9 に示す。終了判断は経過した時間が 2 拍分に当たる 2000 ms を超えたかどうかとした。

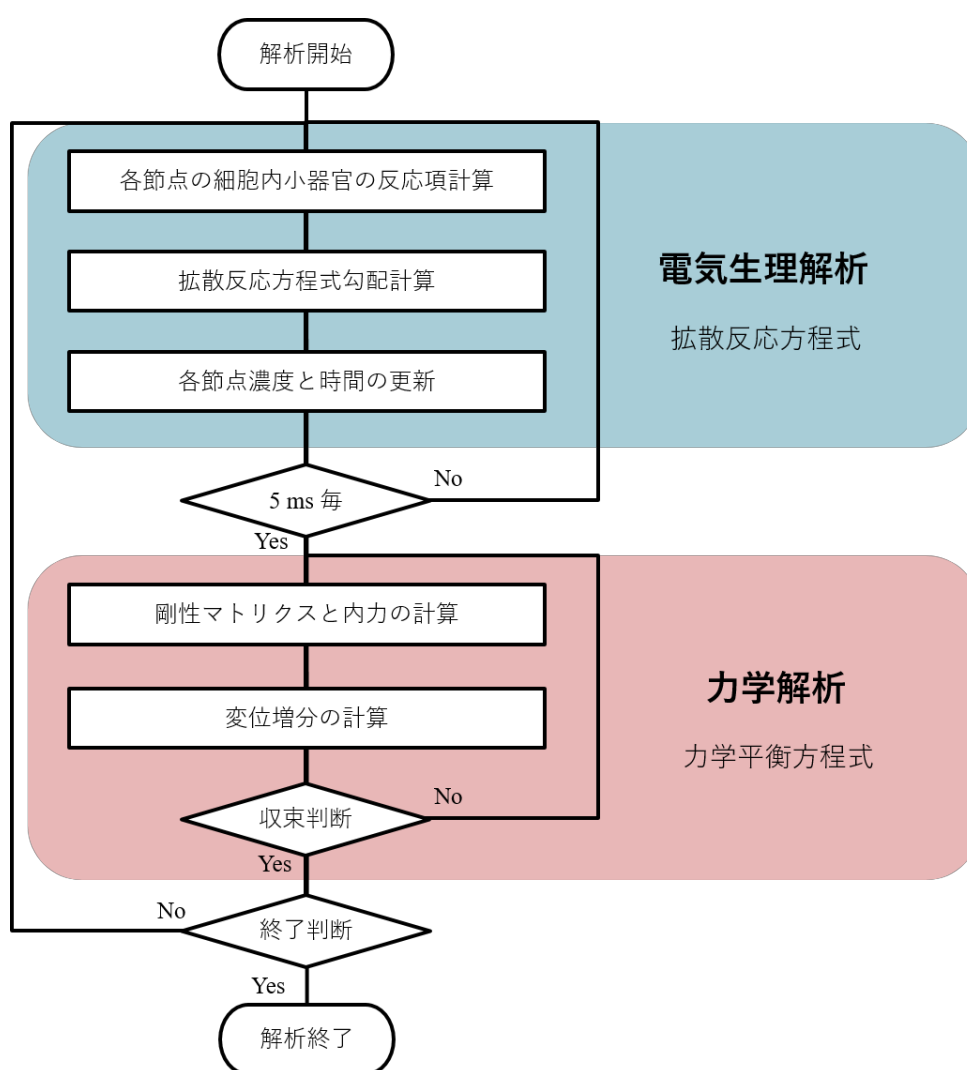


図 3.9 計算フロー

3.4 解析結果

以下に示す結果は二拍目 (1000 ms ~ 2000 ms) を扱うこととする。脱分極のための電気刺激を与えたタイミングを 0 ms とする。一拍の挙動について、膜電位、 Ca^{2+} 濃度分布の可視化及び発生した収縮力の可視化を行う。Intel® Xeon® Sliver 4110 プロセッサ-8 コアを使用して解析時間は1拍15時間だった。

3.4.1 膜電位解析結果

まず膜電位の挙動について説明する。膜電位は静止膜電位で定常状態をとっており、その値は負をとる (分極)。刺激電流を与えると電位が正方向に変化し (脱分極)、その後減衰することで分極状態に戻る (再分極)。本研究で解析された膜電位の変化を図 3.10 に示す。分極時は -85 mV をとっており、電気刺激をうけ脱分極を起こして 1.8 ms で 44 mV をとる。他の体の大きい哺乳類と比べて、マウスの膜電位は脱分極後高い値に止まることなく減少に転じることが知られており、本研究でも実験値や他の解析を再現した。

膜電位変化の減衰については、活動電位持続時間 (APD, Action Potential Duration) という指標がよく用いられる。APD は、脱分極から再分極が終了するまでにかかる時間のことを指す。Edwards の研究における実験値及びモデルの値と、Bondarenko のモデル値、および本研究の結果を比較したものを表 3.2 に乗せる。APD₅₀、APD₉₀ は、脱分極から活動電位振幅の 50%、90% のレベルまで達するのに要した時間である。おおむね一致していることから、膜電位の再現ができたと考えられる。

膜電位を構成する、 K^+ 、 Na^+ 、 Ca^{2+} に関する各電流について図 3.11 に示す。マウスの膜電位の素早い減衰は K^+ 電流によるものであることが確認できた。

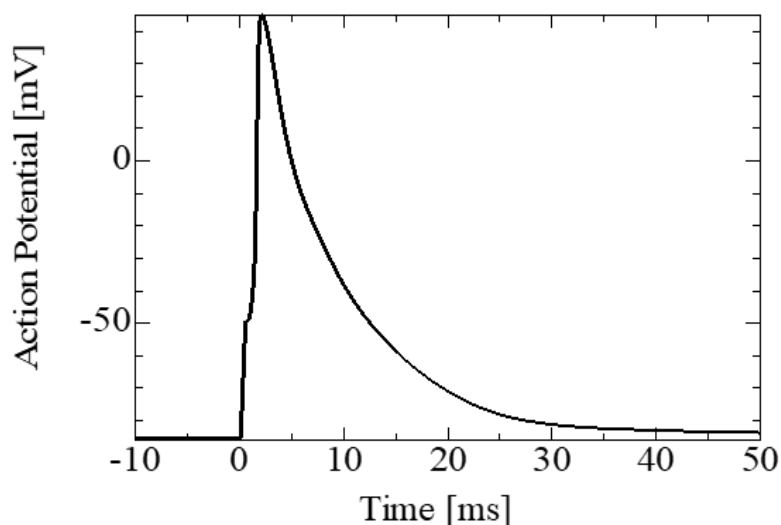


図 3.10 膜電位変化

表 3.2 APD の比較

	This study	Edwards[9](Sim.)	Edwards[9](Exp.)	Bondarenko[7](Sim.)
APD ₅₀	7.6	3.5	3.2	5.4
APD ₉₀	24	22	31	22

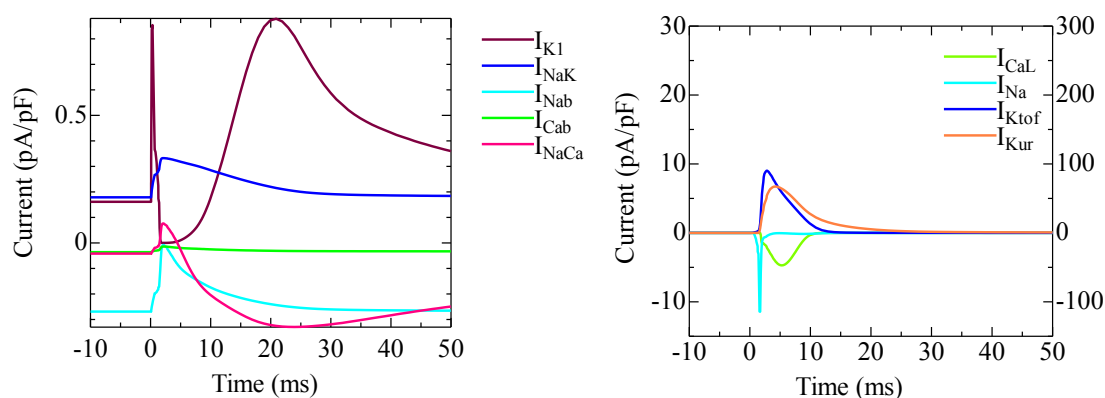
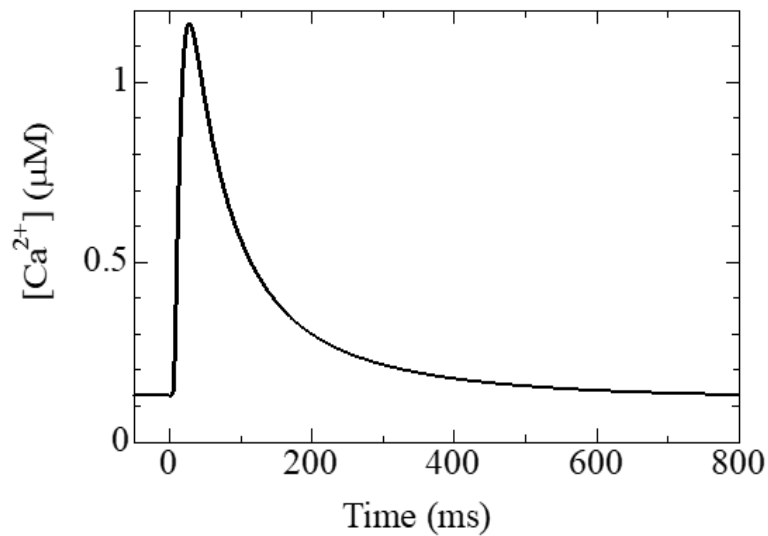
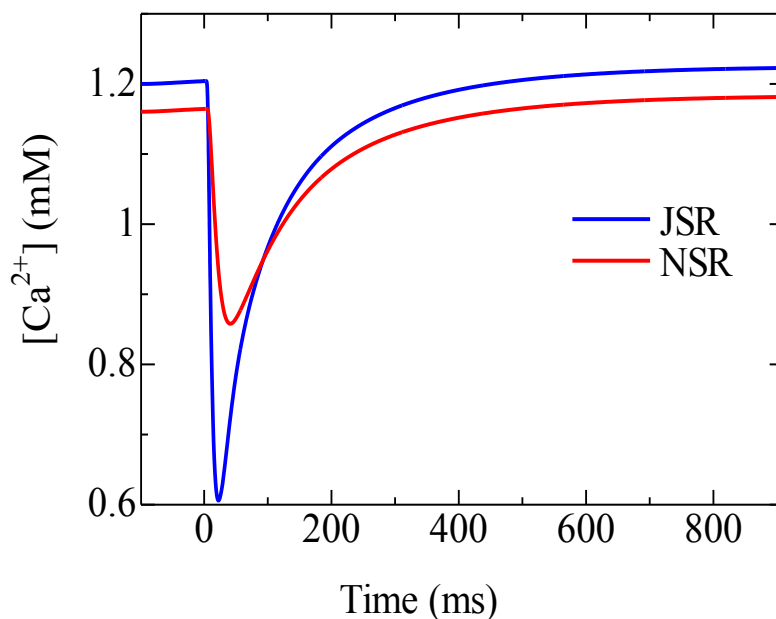


図 3.11 各電流変化

3.4.2 Ca²⁺拡散解析結果

細胞内における平均 Ca²⁺濃度変化を図 3.12 に示す。電気刺激後に Ca²⁺が放出されることによって急激に濃度が上昇し、ピークを迎えたのち NSR によって徐々に吸収され、濃度が低下していくことがわかる。細胞内平均 Ca²⁺濃度は 27 ms で 1.16 μM のピークを示しており、その後は徐々に減少、脱分極から 200 ms で 0.30 μM まで減衰、最終的には 0.12 μM に収束した。これは正常な細胞における細胞全体の Ca²⁺濃度平均を再現できたと考えられる。

NSR と JSR における平均 Ca²⁺濃度変化を図 3.13 に示す。電気刺激後に JSR から細胞質に Ca²⁺が放出され平均濃度が下がり、その後、NSR による吸い込みにより Ca²⁺が貯蔵されるため、平均濃度が上昇していく。JSR の底値は 22 ms で 0.67 mM、NSR は 41 mM で 0.89 mM となっている。JSR から Ca²⁺が放出されるため Ca²⁺減少量は NSR よりも多くなり、底値をとる時間も遅くなっている。ウサギにおいては JSR と NSR での最低値に勾配が生じ、JSR の方が低いということがわかっており[24]、マウスにおいても同様に勾配は生じると考えられ、SR 内 Ca²⁺の時間空間分布を定性的に再現ができているということがわかる。

図 3.12 細胞全体における Ca^{2+} 平均濃度変化図 3.13 SR における平均 Ca^{2+} 濃度変化

次に局所的な Ca^{2+} 濃度の変化や勾配についての結果を示す。図 3.14 (a) は断面の位置、図 3.14 (b) は断面におけるミトコンドリアと筋原線維の構成図を示したものである。便宜上この断面を xz 断面とし、収縮方向を z 軸と定める。図 3.15 は 5 ms での Ca^{2+} 濃度勾配分布と筋原線維における Z 帯の位置を、図 3.16 は 5 ms ~ 200 ms までの断面図における Ca^{2+} 濃度勾配分布を表す。Control マウスはどの筋原線維でも、 Z 帯の z 座標が同じ位置にあり、筋原線維にたいして垂直な xy 平面で近似できる。ゆえに図では灰色の点線で示している。電気刺激直後、LCC によって Ca^{2+} が膜外から流入し、それによって JSR の RyR から Ca^{2+} が

第3章 マウス心筋細胞モデルの構築と検証

放出されるため、JSRの周りの Ca^{2+} 濃度が局所的に急激に上昇している。JSRはZ帯付近に多く存在するため、Z帯の線上を中心として Ca^{2+} の放出が始まっていることがわかる。その後、JSRから流入してきた多くの Ca^{2+} は主に筋原線維軸方向を伝って拡散していく様子が見られた。しかし、筋原線維内 Ca^{2+} が一様になるほどの拡散はされなかった。50 msの時点でも筋原線維内の勾配は生じている。SRの形状再現を行った Colmanの研究[13]や、Previsらの実験[25]でも、細胞質内の Ca^{2+} 空間不均一性は生じており、この結果と定性的に合致する。50 ms以降は Ca^{2+} の拡散の動きよりも吸い込みの動きの方が強くなり、200 msの時点で、NSRの、濃度の高いところからは多く、低いところからは少なく吸い込むという働きにより、筋原線維内の勾配は緩和され、濃度はおよそ $0.3 \mu\text{M}$ となっている。また、ミトコンドリア外縁に位置する細胞質濃度は Ca^{2+} 放出の影響を受けて高くなるが、内部の濃度は低いままである。これは、ミトコンドリアによって Ca^{2+} が吸われてしまうことが理由である。ゆえに、ミトコンドリアに Ca^{2+} が伝搬されるには、筋原線維に接している部分があることが必要だということが考えられる。

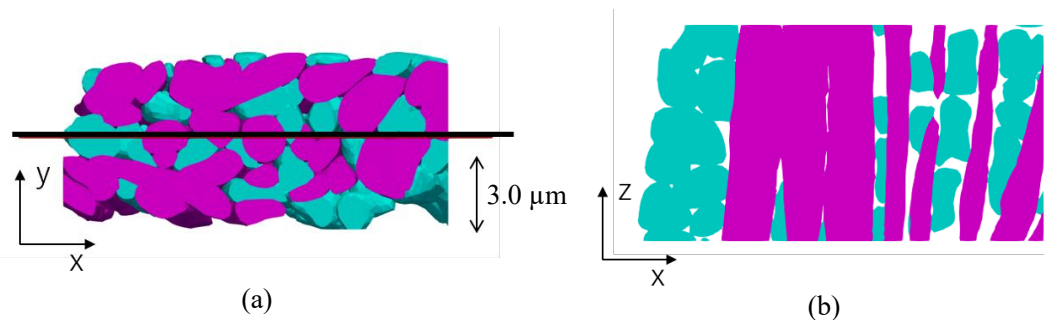


図 3.14 断面位置(a)と断面における小器官の配置(b)
(赤：筋原線維，青：ミトコンドリア)

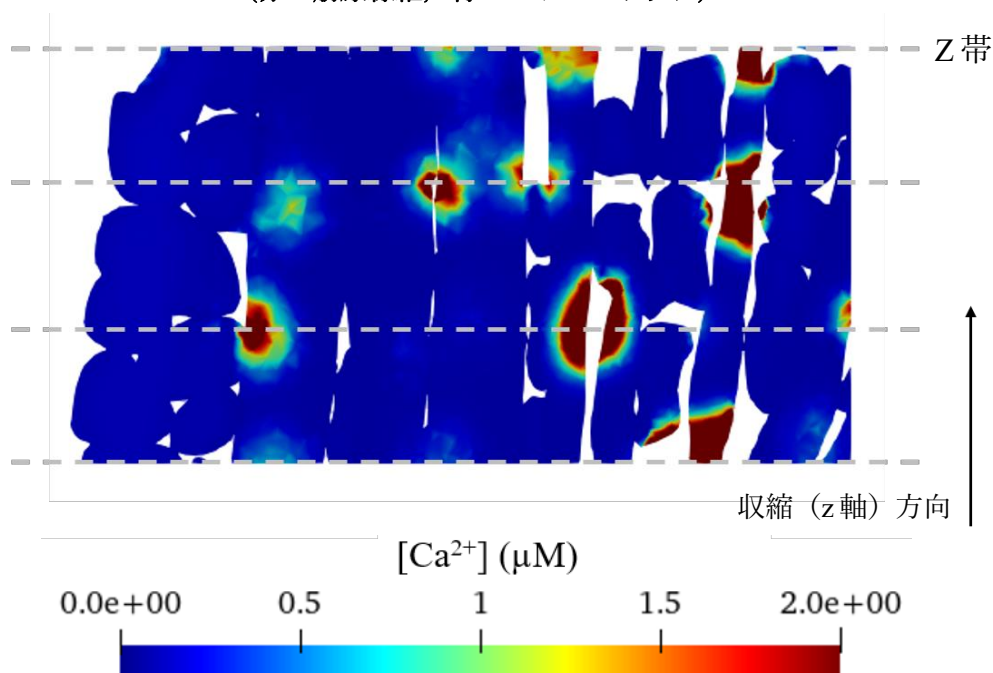
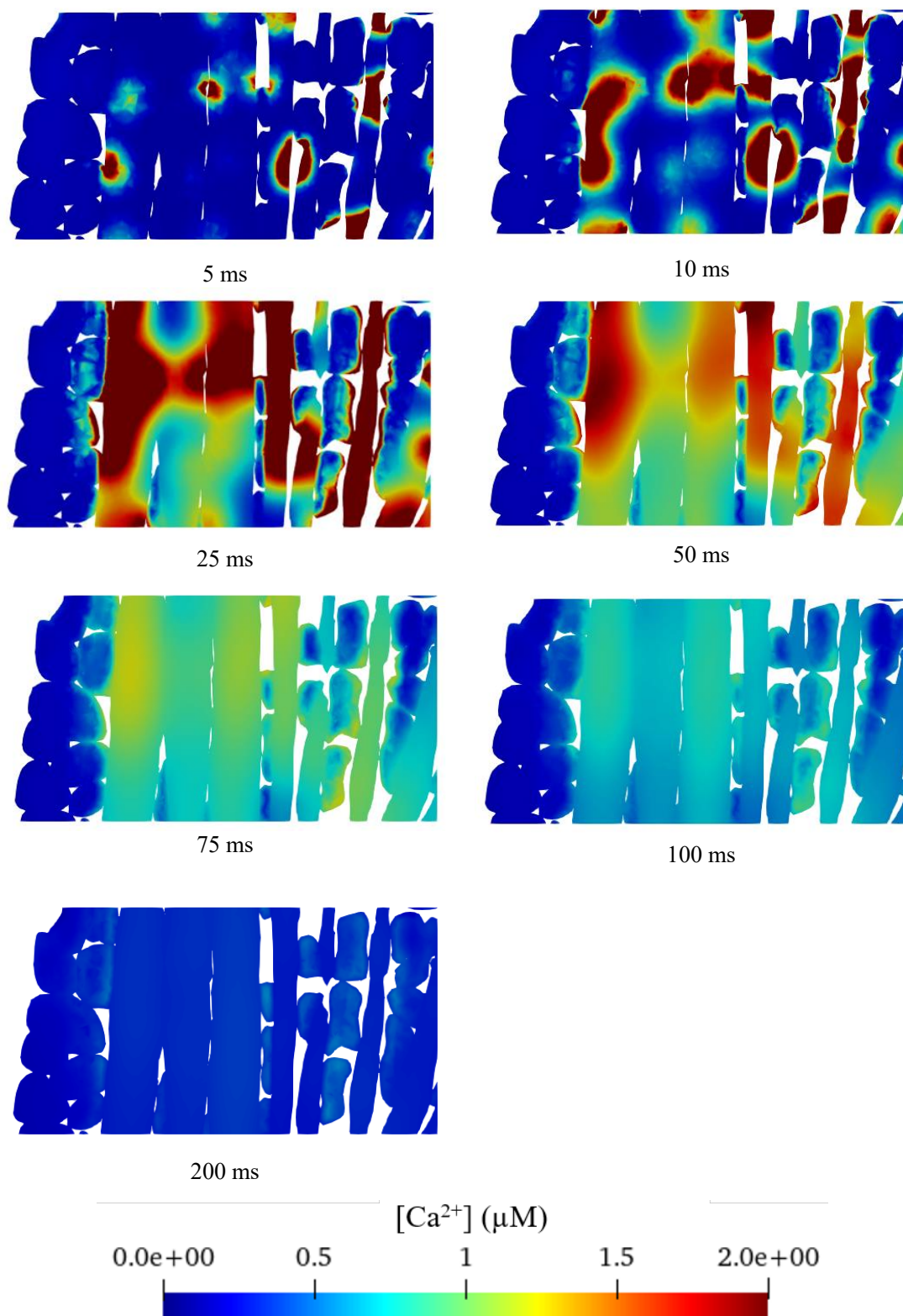


図 3.15 5 ms における Ca^{2+} 濃度勾配分布断面図と Z 帯の位置

第3章 マウス心筋細胞モデルの構築と検証

図 3.16 断面における Ca^{2+} 濃度勾配分布の変化

第3章 マウス心筋細胞モデルの構築と検証

50 ms での他の断面位置の Ca^{2+} 濃度勾配を図 3.17 に示す。断面形状について、筋原線維が軸方向に通っていることが確認された。 Ca^{2+} 濃度については、(a), (b) どちらの断面においても、先述した、筋原線維軸方向への拡散や隣接されたミトコンドリアに対する供給といった、同様の傾向がみられた。Control は細胞全体として同じような挙動を示すということがわかった。

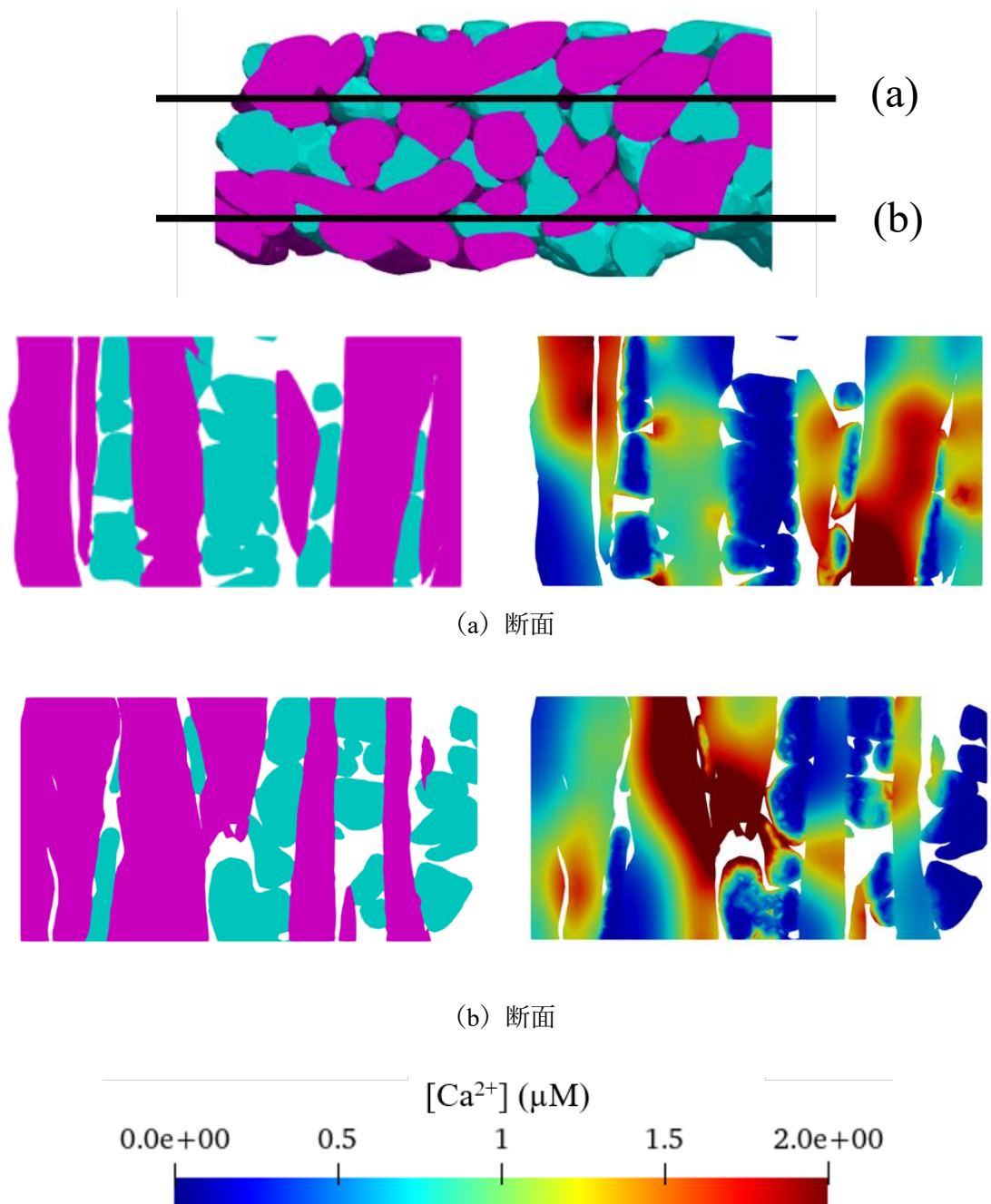


図 3.17 50 ms での他断面図における Ca^{2+} 濃度勾配

3.4.3 片面固定条件下の収縮挙動

片面自由の境界条件での収縮率の変化を図 3.18 に示す。Ca²⁺のピーク（27 ms）よりも遅れてピークを迎え、136 ms で最大で 9.9 %の収縮がされている。心筋細胞における収縮は主に 10%~20%ほどであることが知られているため、これは収縮現象を再現できていると言える。また収縮の立ち上がりは脱分極の 0 ms から 16 ms 後で、立ち上がりからピーク値までおよそ 120 ms を要している。ピークと迎えた後は立ち上がりと比べて緩やかに戻っていき、定常状態に戻る。

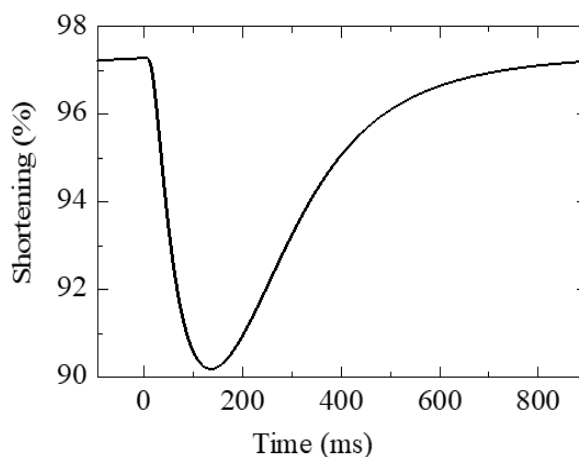


図 3.18 収縮率変化

次に収縮力の空間分布について述べる。図 3.19 は筋原線維断面における収縮力の空間分布を、25 ms ~ 500 ms について表した図である。断面の位置は図 3.14 (a) と同じである。収縮率が最大になる時刻に近い 150 ms では、最大値は 5.8 kPa、最小値は 2.8 kPa となっている。5 ms における Ca²⁺でみられていた、立ち上がりの際の急な勾配は緩和されていることがわかるが、一様に収縮力が発生しているわけではない。この勾配は、z 軸方向に Z 帯に近い場所と遠い場所で起こっている箇所が多い。300 ms では Ca²⁺の低下に伴い収縮力も低下している。このとき断面における収縮力の最大値は 3.2 kPa、最小値は 2.1 kPa となっており、収縮力の空間分布は 150 ms と比べて緩和されていることがわかる。z 軸方向に収縮力の勾配が存在しても、収縮は正常に行われるということがわかった。

第3章 マウス心筋細胞モデルの構築と検証

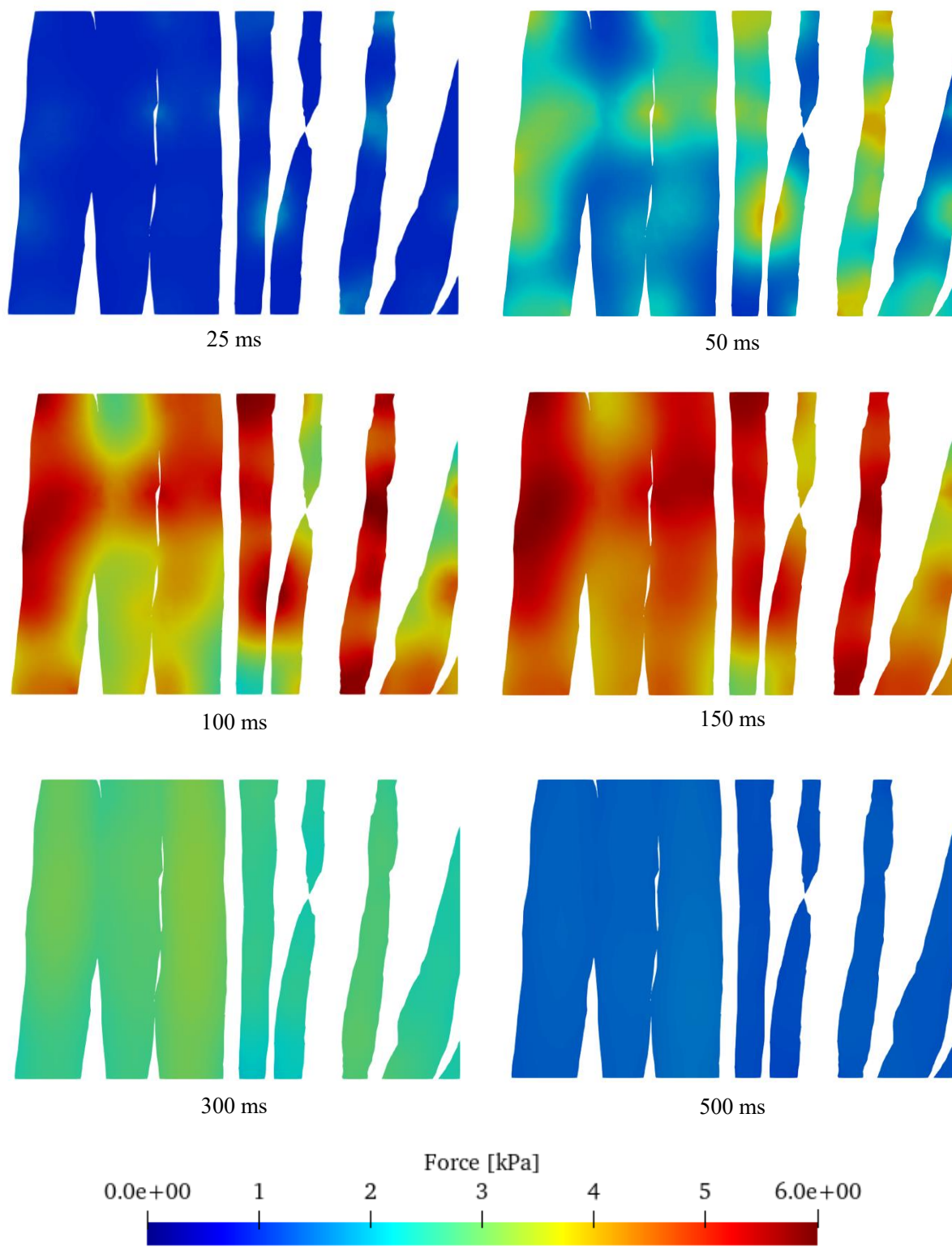


図 3.19 筋原線維に発生する収縮力の空間分布

3.5 結言

本章では Control マウスにおける実形状を反映した有限要素モデルを作成した。大きな小器官である筋原線維とミトコンドリアを三次元の四面体要素で、微小な細胞小器官である T 管と JSR を節点で、NSR を面で表現した。前章で構築した力学電気生理連成解析を行い、膜電位、平均 Ca^{2+} 濃度、及び収縮率においておおむねマウスの結果を再現することができ、モデルの妥当性が確認された。また、局所的 Ca^{2+} 濃度の断面における可視化により、筋原線維により主に Ca^{2+} は拡散され、ミトコンドリア同士では伝達は行わず、筋原線維に接することによりミトコンドリアに Ca^{2+} が供給されることがわかった。この傾向はどの断面においても見られた。内部発生する収縮力は、z 軸方向に勾配を持つことがわかったが、正常に収縮することが確認された。

第4章 MLPKO マウスにおける解析

4.1 緒言

本研究では、心疾患状態の心筋細胞として MLPKO マウス (Muscle lim protein knock out mouse) の細胞を扱うこととした。MLPKO マウスは Muscle lim protein (MLP) というたんぱく質を生成する遺伝子を除去したマウスのことである。MLPKO マウスは肥大と心不全を伴う拡張型心筋症を引き起こすことがわかっている[26]。拡張型心筋症は、ヒトにも見られる心疾患である。これらを患うと心臓の筋肉に形状異常をきたし、心臓のポンプ機能が低下し血液を適切に全身に送ることができなくなる。MLPKO マウスはヒトの拡張型心筋症や心不全の形態的・臨床的特徴を再現する[26][27]ため、ヒトの心疾患メカニズム解明や治療法の開発の足掛かりとなると考えられ、広く研究に利用されている。

心筋細胞は主に筋原線維とミトコンドリアの平行な配列によって構成されており、MLPKO マウス心筋細胞は、この細胞小器官構造に異常が生じることがわかっている。小器官の構造異常が拡張型心筋症の発症に関与している可能性があることが明らかになりつつあり、MLPKO マウスの形状・配置の変化やそれに伴う細胞機能への影響を評価する研究がなされている。

Bosch らの研究では、画像による細胞小器官の形状評価を行い、ミトコンドリアの配置が乱れることと、ミトコンドリアが細胞内で部分的に欠如する部分があるということを観察した[27]。一方で Bennet らの研究では細胞画像から暗いピクセルの割合を求めることによりミトコンドリアの体積比率の推定を行い、ミトコンドリアの個々の大きさは Control に比べてばらつきが大きくみえるものの、細胞全体での体積比率には有意差が出なかったと報告している[28]。Widing らは細胞内においてミトコンドリア数が減少する箇所と、反対に凝集する箇所の両方を観察した[29]。Knoll らは MLPKO マウスの筋原線維の Z 帯密度が小さくなり、乱れていることを確認し、この乱れが筋原線維の収縮力の低下を引き起こしているとしている[5]。Arber らの研究[26]でも同様に筋原線維に着目し、筋原線維構造が乱れていることを報告している。

本研究ではまず今回使用した MLPKO マウス心筋細胞画像及び作成したメッシュ形状から、生じている細胞小器官構造異常を評価する。その後 Control マウスと MLPKO マウスの解析結果を比較することで、構造異常がもたらす機能異常を考察していく。

4.2 画像における形状評価

走査性電子顕微鏡画像を使用した。画像は 4096×4096 ピクセルの正方形で、1 ピクセル $3.5 \times 10^{-3} \mu\text{m}$ の大きさとなっている。連続画像となっており、その間隔は 20 ピクセルである。図 4.1～図 4.4 は本研究で使用した連続画像のうちの数枚である。白が細胞外または T 管、薄い灰色が筋原線維、濃い灰色がミトコンドリアである。筋原線維を区切るように走っている線は Z 帯、細胞外に沿うように走っている二重線は細胞膜である。

画像から視認できる細胞構造について説明する。Control マウスでは Z 帯が同方向にまっすぐ存在し、Z 帯同士が同じ間隔の約 $2 \mu\text{m}$ で配置されており、異なる筋原線維において Z 帯の場所は軸に対して同じである様子が観察できる (図 4.1)。一方で MLPKO マウスでは、一本の筋原線維に対して間隔は同じものが多いが、Z 帯の角度が周りのものと比べて傾いている箇所があり、筋原線維が乱れていることが確認できる (図 4.2)。これにより異なる筋原線維同士での Z 帯の位置も軸方向に対してずれている。また、MLPKO マウスには Control では見られない、ミトコンドリアが凝集している箇所があった (図 4.3)。加えて同スケールの Control マウス画像と比べるとサイズの小さいミトコンドリアが多く確認できる。

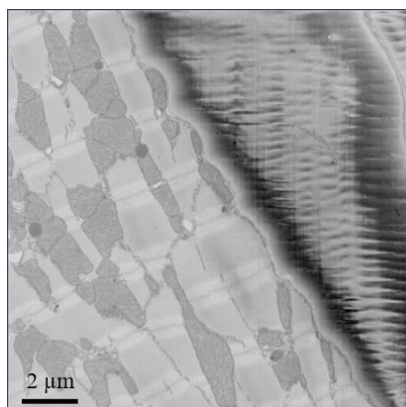


図 4.1 Control マウス

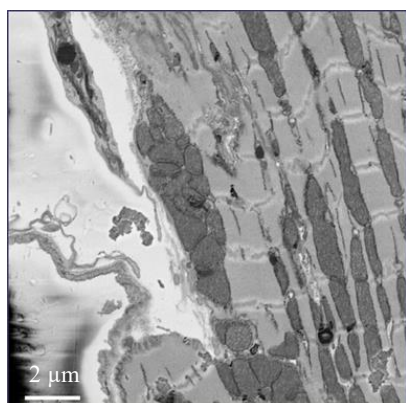


図 4.2 MLPKO マウス筋原線維乱れ部分

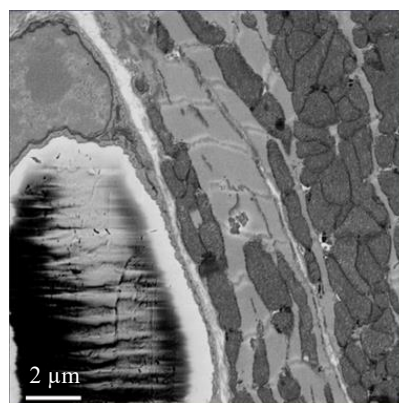


図 4.3 MLPKO マウスミトコンドリア凝集部分

4.3 解析モデル

4.3.1 メッシュ作成方法

細胞膜（介在板）の様子から、使用した画像は複数の細胞から構成されていることがわかった。図 4.4 は細胞膜により分割したものを表しており、この画像では黒の点線と赤線の実線で囲まれた主に 3 つの細胞に分けられる。本研究では、この画像において他の 2 つよりも大きい領域を占めている、赤線で囲まれた一番右の細胞の一部を使用し、メッシュを作成することとした。画像の様子から、凝集しているミトコンドリアが多いことと、軸の乱れが顕著であることが確認でき、メッシュの作成手順を考慮するとモデルに反映しやすいと考え決定した。

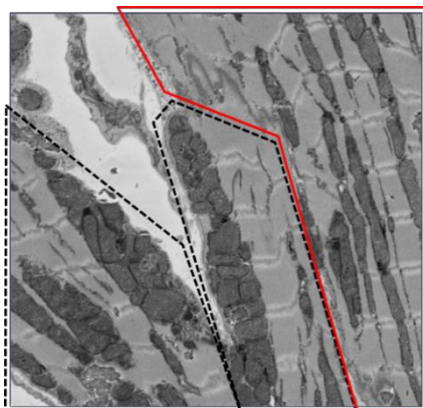


図 4.4 細胞膜による分割

作成手順について説明する。作成のフローを図 4.5 に示す。Control マウスで本研究室の田中が行った手順と同様に行った。まず、画像に見える細胞小器官を 1 つ 1 つ輪郭に対してマークすることで二次元形状を抽出する。3dmod を使用して、ミトコンドリア、細胞膜、筋原線維、T 管について手書きによって二次元形状を抽出した。その後、抽出した二次元形状をメッシングソフトである Hypermesh に取り込み、連続した二次元形状から輪郭の表面形状を作成し、そこからミトコンドリア、筋原線維について三次元メッシュ、細胞膜について二次元メッシュを切り出した。形状抽出からメッシングする際に、箱状に切り出した。T 管は別のファイルにおいて平面で切り出してメッシングし、その形状と位置がわかるようにした。本研究で使用するプログラムでは、解析中にリメッシングが行われないため、テトラ要素のアスペクト比が悪いものが存在しないように作成した。

第4章 MLPKO マウスにおける解析

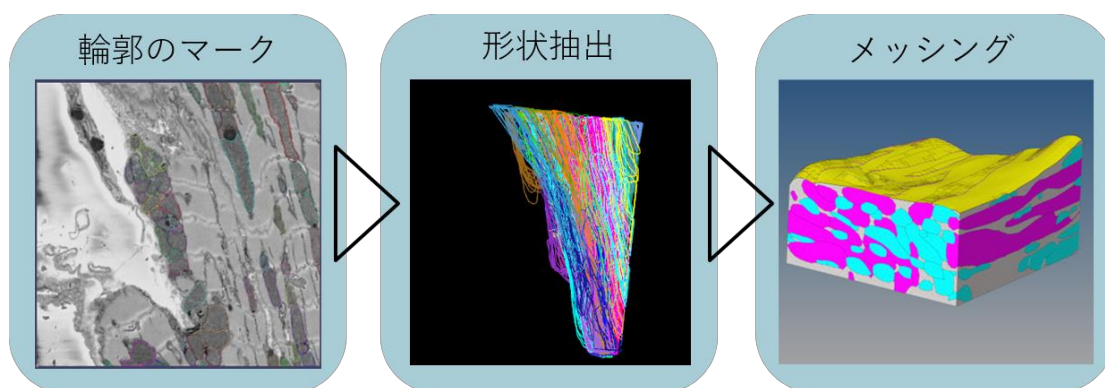


図 4.5 有限要素モデル作成手順

T 管, NSR, JSR の扱いは Control モデルと同様とした。ただし, MLPKO 画像については Dyad を識別することが難しく, 位置や形状を取り出すことができなかった。Control の Dyad と T 管の形状をみると Dyad が T 管をぴったり囲むように存在すること (図 3.1) と, Dyad の定義が T 管と JSR の間の空間のことであることを考慮して, JSR は T 管から近くかつ NSR の節点であることを満たす節点とした。NSR に関しては, 画像から形状を取り出しておらず, 筋原線維を囲うように存在すると仮定しているので, MLPKO マウスと Control マウス で細胞全体に対して同一の体積比率を占めることとした。T 管と JSR は, 今回使用した MLPKO マウスと Control マウスの両心筋細胞画像における T 管体積比率と, メッシュにおける体積比率が同様になるように設定した。Control マウスでは 0.8%, MLPKO マウスでも 0.8% が細胞全体に対して T 管が占める割合であった。

また, 箱状に切り出して作成したメッシュは, $4.1 \mu\text{m} \times 8.7 \mu\text{m} \times 8.2 \mu\text{m}$ の大きさであった。これは Control と比べて筋原線維軸方向断面積が小さくなっているが, MLPKO マウスは Control マウスよりも細胞自体が細長くなるため, 細胞断面の 4 分の 1 となっているとし, 境界の対称性を妥当であるとした。図 4.6 に作成したメッシュ形状の全体図を示す。赤が筋原線維 (図 4.7), 青はミトコンドリア (図 4.8), 黄色は細胞膜 (図 3.7) を表す。表 4.1 に解析規模を示す。本章で作成した有限要素モデルを, 以下 MLPKO モデルと呼ぶ。

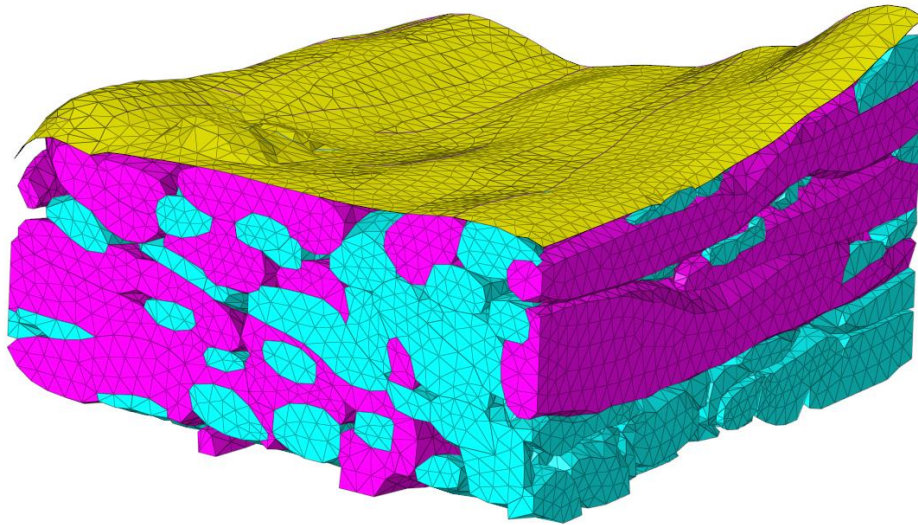


図 4.6 MLPKO マウス有限要素モデル全体図

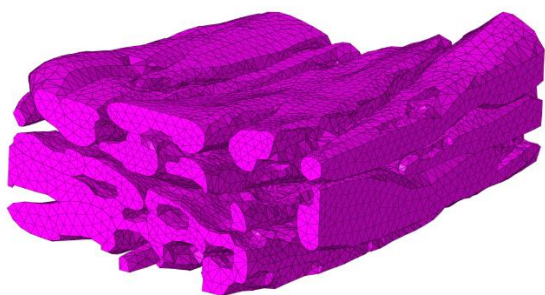


図 4.7 筋原線維形状

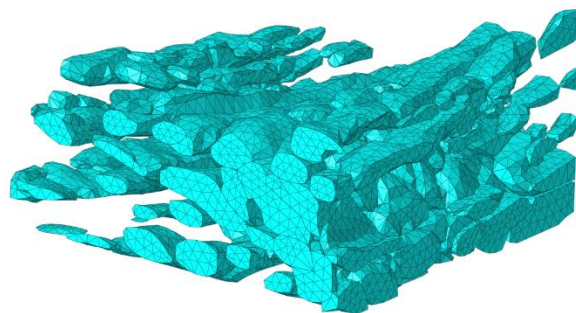


図 4.8 ミトコンドリア形状

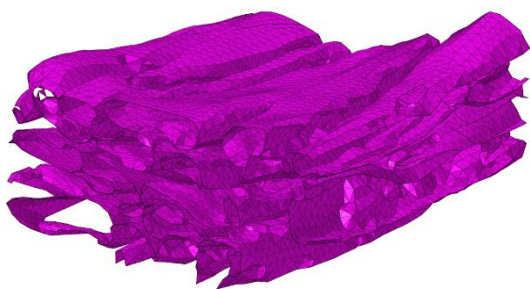


図 4.9 SR形状

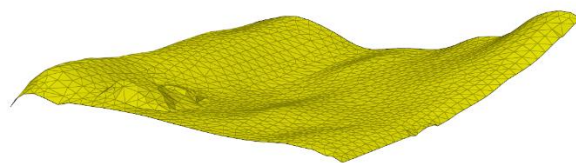


図 4.10 膜形状

表 4.1 有限要素モデル解析規模

Nodes	386034
Elements	334115

4.3.2 作成したモデルの形状評価

作成したメッシュについての形状について述べる。表 4.2 は作成したモデル内の筋原線維, ミトコンドリアが占める体積の割合を Control モデルと MLPKO モデルで比較したものである。筋原線維の割合は, Control と MLPKO どちらも同様で, 50% 程度となっている。一方でミトコンドリアは MLPKO の方が割合は多くなっているものの, どちらも正常な体積割合であると言える。NSR と JSR は前述の通り, 体積比率を Control と MLPKO で揃えた。

表 4.2 各小器官の体積比率

	Control model [nL]	MLPKO model [nL]
Cytsolic	4.64×10^{-4} (100%)	2.64×10^{-4} (100%)
Myofibril	0.956×10^{-4} (20.6%)	1.01×10^{-4} (38.2%)
Mitochondria	2.58×10^{-4} (55.6%)	1.34×10^{-4} (50.7%)
NSR	1.16×10^{-5} (2.5%)	6.64×10^{-6} (2.5%)
JSR	3.98×10^{-7} (0.85%)	2.11×10^{-7} (0.80%)

図 4.11 は Control と MLPKO の有限要素モデルについてそれぞれミトコンドリアのみを表示し, 倍率が同じかつ軸方向が奥行き方向となるように表示したものである。ミトコンドリアは軸方向に連なって存在していることが多く, これをミトコンドリア柱と呼ぶ。Control は軸方向にミトコンドリアが整列し, またミトコンドリア柱同士が接している体積部分が少ないことがわかる。一方で, MLPKO は, ミトコンドリア柱は Control 同様に存在しているものの, 図の中では右の部分におおきなミトコンドリア柱が存在している。これは走査線電子顕微鏡画像でみられた, ミトコンドリアの凝集箇所該当すると考えられる。

図 4.12 は個々のミトコンドリア体積が大きさによってどのように分布しているかを表したものである。Control と比べて MLPKO の方が体積の小さいミトコンドリアが多く存在していることがわかる。また, Control にみられない非常に大きなミトコンドリアが存在している。これは走査成電子顕微鏡画像でみられたミトコンドリアサイズと同じ傾向である。

第4章 MLPKO マウスにおける解析

これら二つの観点から、MLPKO マウスにおけるミトコンドリア形状異常を、切り出した部分のメッシュに反映できていることがわかる。ミトコンドリア柱に偏りが生じるのは、MLP が細胞構造の骨組みを担うタンパク質であり、この不在のまま細胞が成長することによって生じてしまうという理由が考えられている[26]。ミトコンドリアは分裂と融合を繰り返すことで形態の制御を行う[30]ため、小さいミトコンドリア割合が大きいのは分裂の方に割合が偏ってしまっており、これは骨組みの不在が理由で制御ができていないと考えられる。この二つの形状異常は、MLP 不在を原因とする一次的な発生であると考えられる。

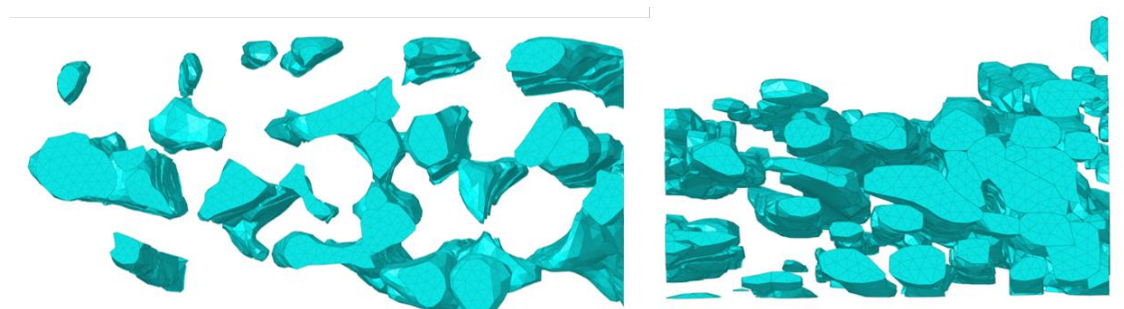


図4.11 Control (左) と MLPKO (右) のミトコンドリア形状

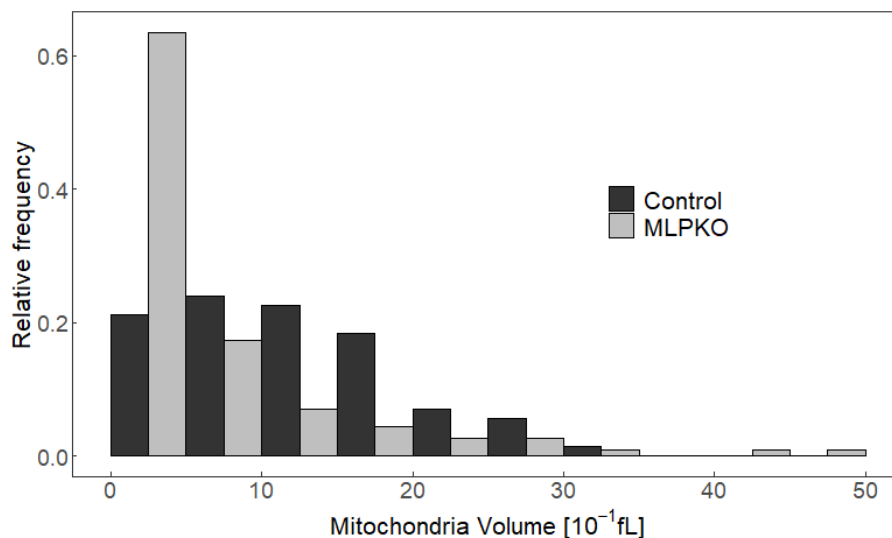


図4.12 ミトコンドリア体積分布

図4.13はControlモデルとMLPKOモデルにおけるJSRのZ帯からの距離を表したものである。T管はMLPKOとControlどちらも同様にZ管に近いところは多く、遠いところは少なくなっている。Z帯からの距離ごとの存在割合が大きくは変わっていないため、T管と筋原線維自体の位置関係は乱れていないということがわかる。

図4.14の(a)と(b)はZ帯についてControlとMLPKOそれぞれについて画像に対して手動で線を引き、3dmodによって可視化したものである。黄色の線がZ帯をなぞった線を表し、z軸が横軸になるように表示している。ControlとMLPKOで縦方向に表示されてい

第4章 MLPKO マウスにおける解析

る Z 帯の範囲、幅が異なり、MLPKO の方が小さくなっている理由は、使用したそれぞれの画像に写っている細胞の大きさによる制約である。Control は Z 帯の角度が綺麗に揃っている様子が確認でき、また z 軸に対して垂直である。一方で MLPKO は、角度が垂直でない z 帯が多くみられ、その法線方向も Z 帯によって異なっている。収縮方向に対する角度について調べたところ、図 4.14 (c) のようになった。エラーバーは標準誤差を示す。Control は平均で 6.2° 、MLPKO は 25.6° であった。特に MLPKO は、可視化画像からわかる通り Z 帯ごとに角度が異なりばらついている上に角度の平均が 4 倍近く大きくなっている。Filamin C と呼ばれる、構造系タンパク質の欠損マウスについて調べた研究において、Z 帯角度が Control に比べて傾いているという結果もでており[31]、構造系のタンパク質が存在することによって、Z 帯の角度が収縮方向に垂直に保たれていると考えられている。

これらの結果から、MLP が欠損すると、Z 帯と T 管の位置関係には影響を及ぼさないが、Z 帯の角度を収縮方向に垂直に保つことができない、すなわち筋原線維の軸方向が同一方向に向かなくなるため、細胞全体の構造において Z 帯の近くに存在する T 管の位置や JSR の位置が Control に比べて z 軸に対してばらつきが生まれるのではないかと考えられる。

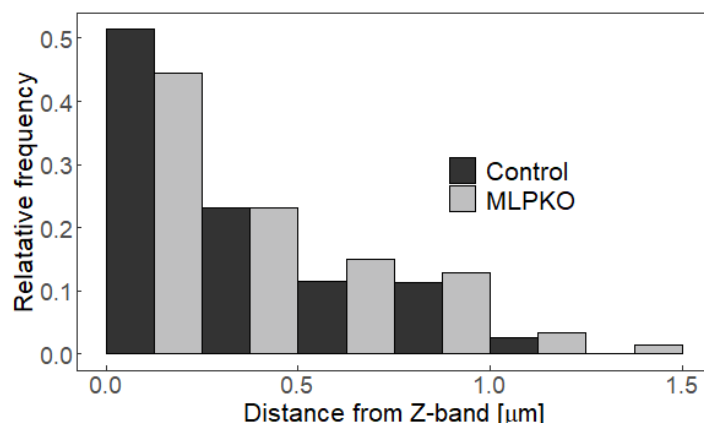


図 4.13 JSR の Z 帯からの距離

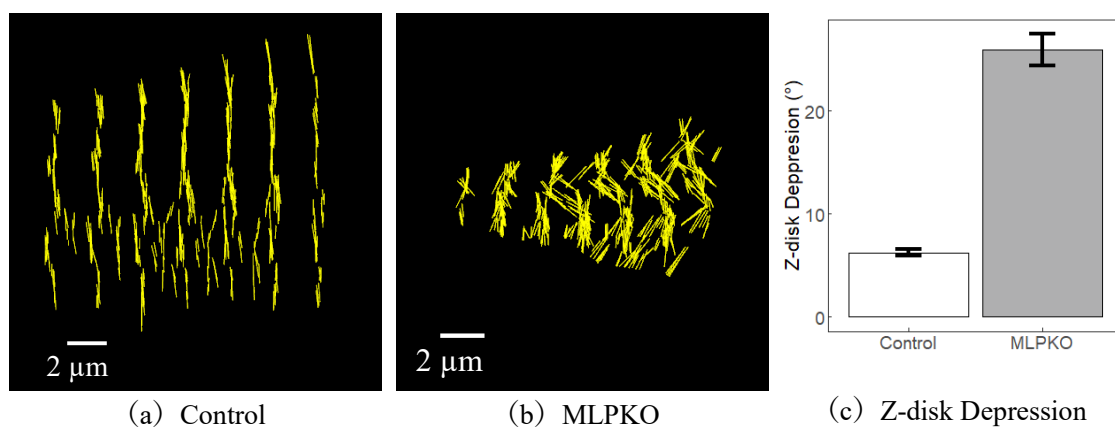


図 4.14 手書き抽出による Z 帯評価

4.4 解析条件

前章で構築した心筋細胞の三次元計算モデルを用いて，MLPKO マウス心筋細胞の有限要素モデルで解析を行う。

4.4.1 境界条件

拡散反応方程式の境界条件は Control モデルと同様に，膜以外での流入 0 のノイマン条件とした。力学の境界条件も同様に片面無負荷と両面固定で行った。固定面は図 4.15 にのせる。

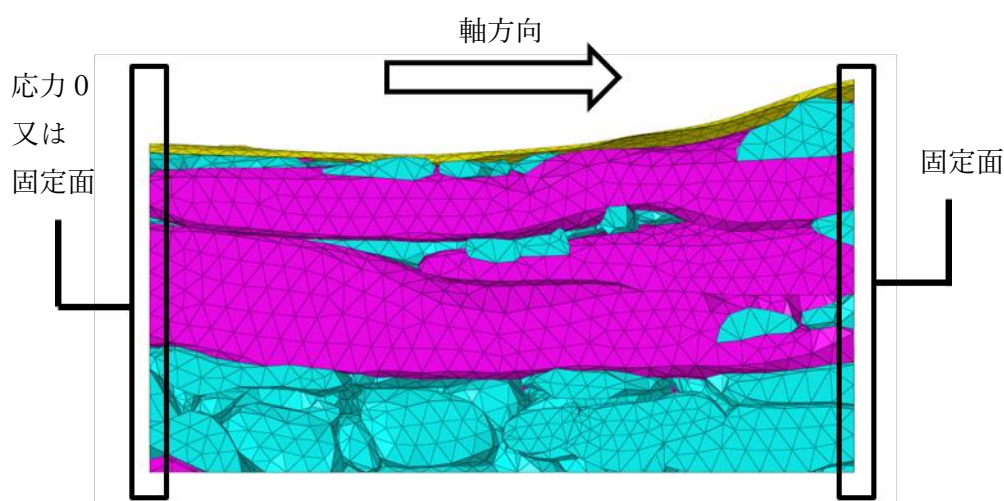


図 4.15 力学的境界条件

4.4.2 計算条件

計算条件は形状の変化に依存しないため，Control モデルと同様とし，2000 ms の解析を行った。

4.5 解析結果

Control モデルと同様に，2 拍目（1000 ms ~ 2000 ms）を扱い，電位刺激の時点をも 0 ms とした。一拍の挙動について，片面無負荷条件での膜電位， Ca^{2+} 濃度分布の可視化及び発生した収縮力の可視化を行い，MLPKO と Control の比較を行う。また両端固定条件での面にかかる反力についての評価を行う。Intel® Xeon® Sliver 4110 プロセッサー 8 コアを使用して解析時間は 1 拍 33 時間だった。Control よりも計算時間がかかっているのは，MLPKO の方がモデル作成の際細かいメッシュが生じており，これが計算を発散させないためのタイムステップ制御に引っかかるからだと考えられる。

4.5.1 膜電位解析結果

図 4.16 に膜電位の変化を表す。ピークは電気刺激後 1.8 ms で 45 mV をとった。脱分極後の急激な減衰を含め、Control と同様の挙動を示しており大きな違いは見られなかった。膜電位を構成する電流のうち、局所的濃度に関係するのは Ca^{2+} に関する電流のみである。これらに変化しなかったため、膜周りと T 管周りの Ca^{2+} 挙動は Control と MLPKO で大きな違いが生じなかったということがわかる。本研究で使用した画像に見られた MLPKO の構造異常は、活動電位には大きな影響を与えないと考えられる。

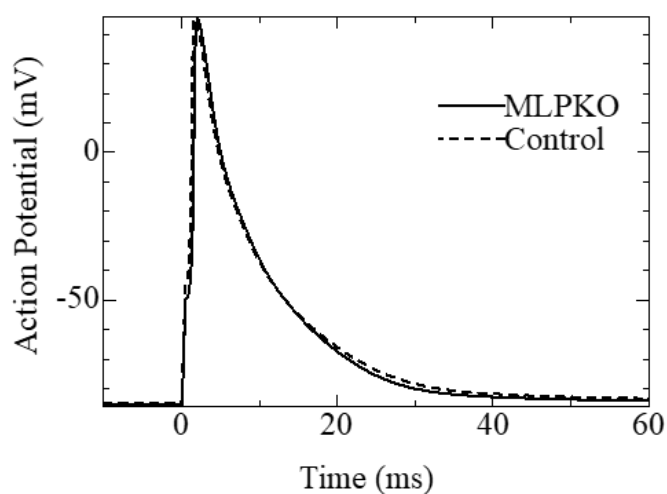


図 4.16 膜電位変化

4.5.2 Ca^{2+} 拡散解析結果

細胞全体における平均 Ca^{2+} 濃度変化を図 4.17 に示す。電気刺激から 29 ms のときにピーク値である $1.15 \mu\text{M}$ をとり、200 ms のときは $0.23 \mu\text{M}$ をとる。Control と MLPKO ではピーク値、減衰のカーブどちらにおいても、MLPKO の方が 200 ms 時点での吸い込みが少し多いものの、大きな違いは見られなかった。JSR から細胞質への Ca^{2+} 放出は MLPKO でも正常に行われたと考えられる。

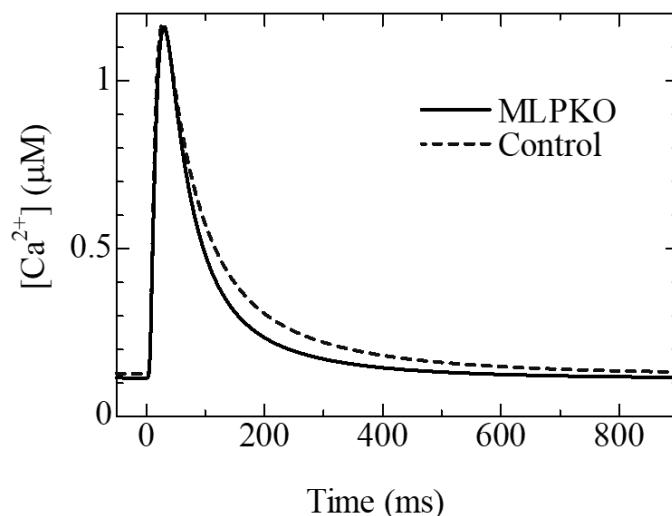


図 4.17 平均 Ca^{2+} 濃度の変化

次に収縮方向における濃度分布を示す。図 4.18 は解析モデルの切断箇所と断面図における筋原線維とミトコンドリアの配置を表し、図 4.19 は 5 ms ~100 ms の時間経過した濃度分布図である。前述の通り、MLPKO は Z 帯の位置が Control と異なり筋原線維で揃っておらず、T 管及び JSR の位置も揃っていない。そのため Ca^{2+} 濃度が立ち上がる 5 ms において、収縮方向に対してバラバラの位置に Ca^{2+} 濃度が上昇している箇所があることがわかる。10 ~ 50 ms を見ると、筋原線維部分においては、収縮方向についてバラバラな場所から Ca^{2+} が流入し拡散されている。しかし、 Ca^{2+} 流入位置が z 方向に比較的揃っている Control と比べても、濃度勾配は緩和されていないことがわかる。細胞全体としてみると、断面部分にミトコンドリアが多くを面積を占めるため、 Ca^{2+} 濃度が低い領域が大きいことがわかる。また小さいミトコンドリアが大きなミトコンドリアクラスタ内に存在し、外側が筋原線維に接していないため、濃度が一様に低い様子が見られる。

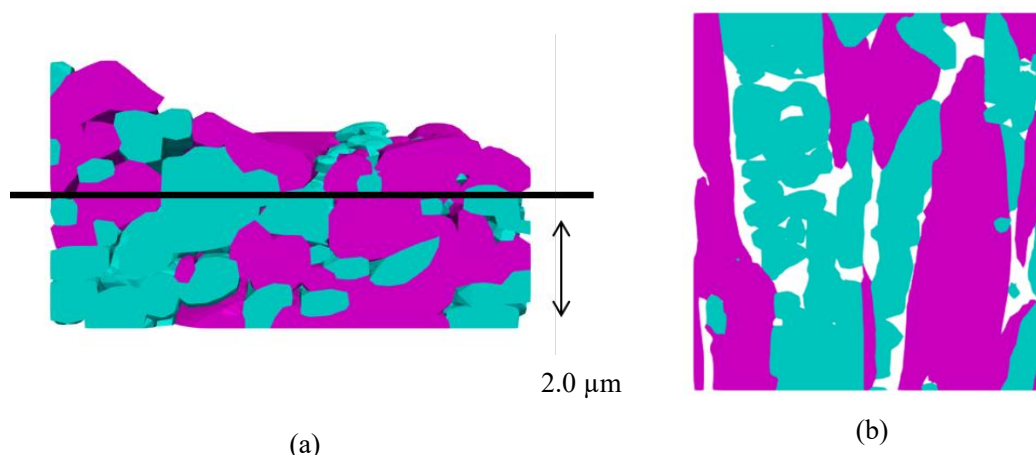
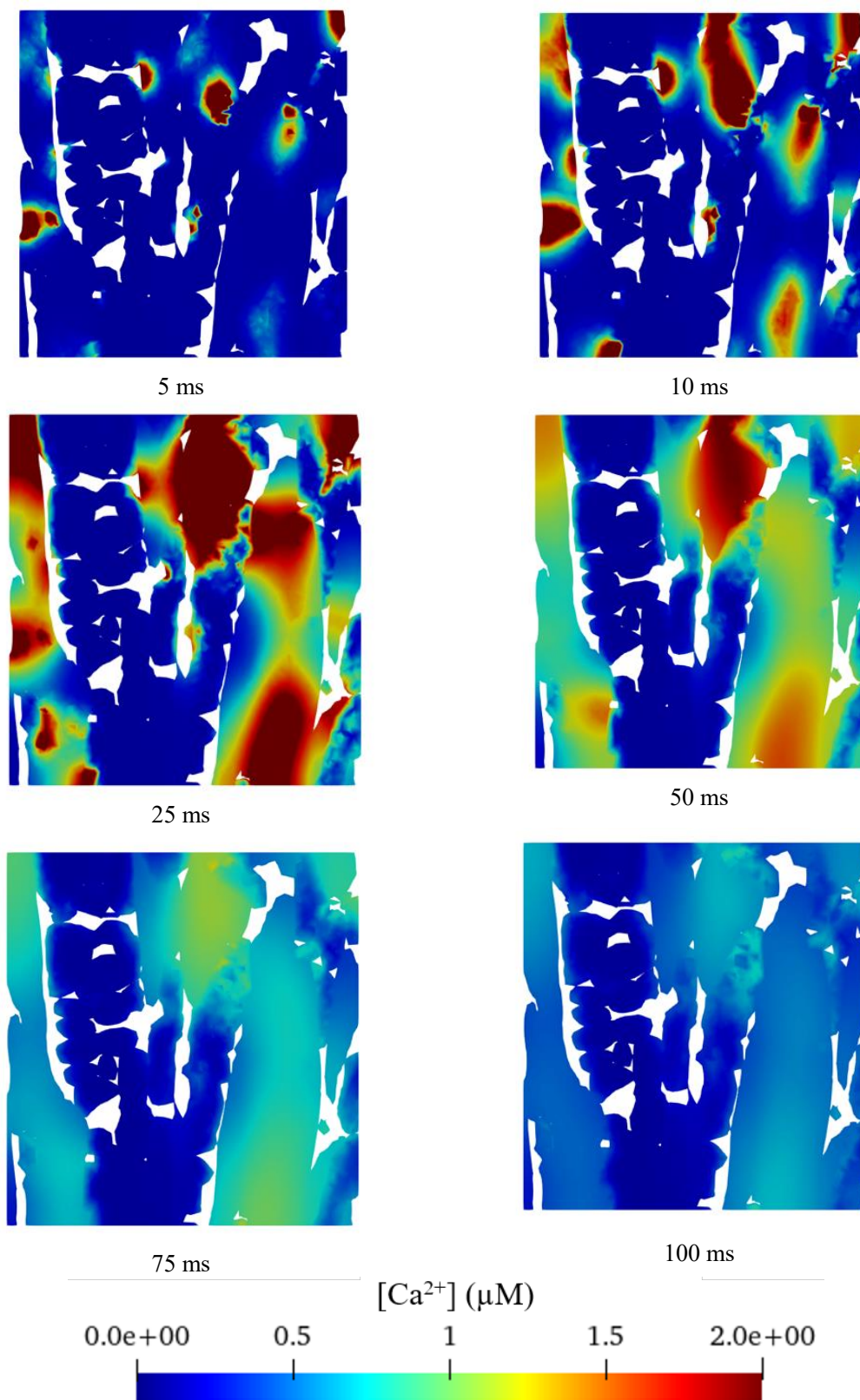


図 4.18 断面位置 (a) と断面における筋原線維とミトコンドリア分布 (b)
(赤：筋原線維，青：ミトコンドリア)

第4章 MLPKO マウスにおける解析

図 4.19 断面における Ca^{2+} 濃度分布の変化

MLPKO モデル全体を斜めから見た時の 50 ms における Ca^{2+} 濃度勾配の様子を図 4.20 に示す。三次元で見ても、ミトコンドリアの多い左側領域において Ca^{2+} 濃度が低いことがわかる。この大きな勾配付近についての評価を行う。

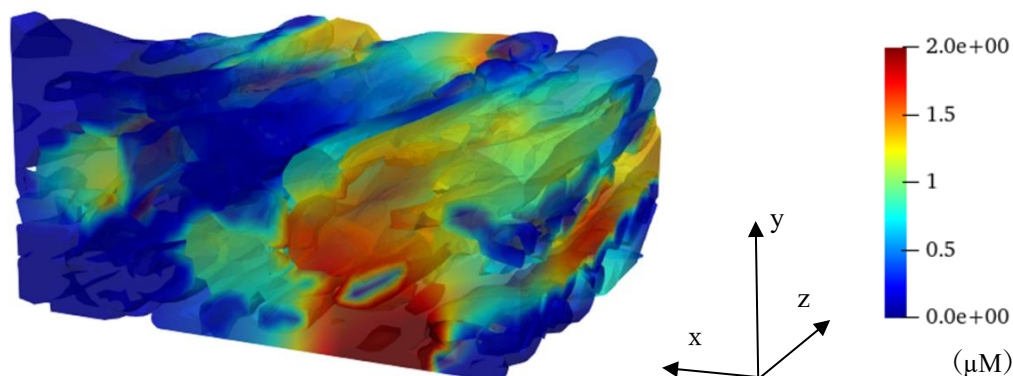


図 4.20 Ca^{2+} 濃度分布

4.5.3 Ca^{2+} 濃度勾配分布

領域における Ca^{2+} 濃度の分布の違いを調べるため、それぞれのモデルを一辺 $2\ \mu\text{m}$ の立方体に切り分け、各領域における Ca^{2+} 濃度の平均値をとり、その領域内でのピーク値を調べることとした。 $2\ \mu\text{m}$ は筋節ひとつ分にあたる。図 4.21 は x 軸方向に対して領域のピーク値をプロットしたものである。x=1 におけるプロットは x の値が 0 から $2\ \mu\text{m}$ の立方体における結果であり、Control は x 軸方向に $12.6\ \mu\text{m}$ 、MLPKO は $8.2\ \mu\text{m}$ の大きさであるため、それぞれ x = 13, x = 7 までの結果となっている。コンター図からも分かるように、ミトコンドリア内は濃度が低いため、Control でも MLPKO でも低いピーク値を持つものが存在する。x 軸に対して平均値を調べたところ、Control は一番端 (x = 1) 以外では平均値はおよそ $1.1\ \mu\text{M}$ を取り、全体での平均 Ca^{2+} 濃度と同じになっている。MLPKO では、ミトコンドリアの多い領域 (x = 1, 3) については平均値は $1.4\ \mu\text{M}$ となり高く、一方多くはない領域 (x = 5, 7) では平均値も $1.0\ \mu\text{M}$ を下回っている。

このデータに対して、t 検定を行ったところ、二つのモデルの分散・平均に有意差はみられなかった ($p = 0.45$)。つまり、細胞全体としての Ca^{2+} 濃度分散や平均は同じである。一方で、分散分析で F 分布によって有意水準 1 % で検定を行ったところ、Control では Ca^{2+} 濃度の最大値は x, y, z 座標に関係なく分布していたが、MLPKO では x 座標に依存して有意な違いがあることがわかった。

x 座標における明らかな違いは、大きなミトコンドリアクラスタが存在するかどうかである。細胞全体における平均濃度のピーク値が Control と MLPKO でほぼ同じ値を取り、細胞全体での分散や平均値に有意差がでなかったことを考慮すると、 Ca^{2+} 放出されたあとの拡散挙動の違いによって x 軸方向への Ca^{2+} 濃度の違いが生じたと考えられる。

第4章 MLPKO マウスにおける解析

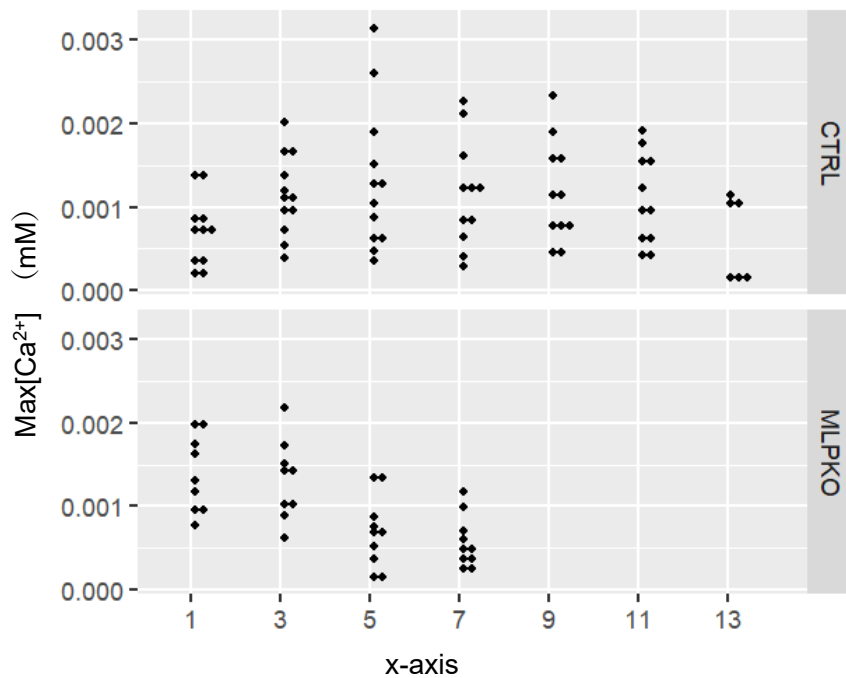
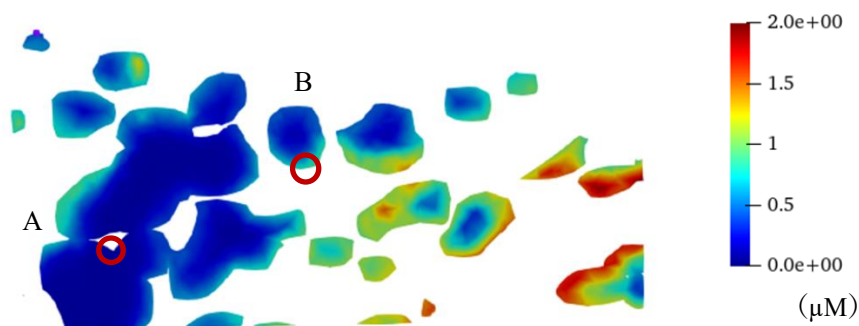
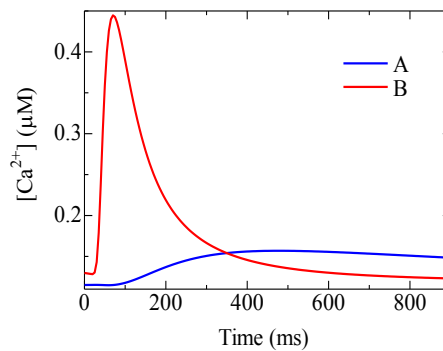
図 4.21 Ca^{2+} ピーク値の分布

図 4.22 は 100 ms 時点でのミトコンドリアにおける Ca^{2+} 濃度分布勾配であり、図 4.23 は図 4.22 の A, B における Ca^{2+} 濃度変化である。 Ca^{2+} は小器官のうち主に筋原線維内で拡散されやすい。そのため、ミトコンドリアは筋原線維の間を埋めるように配置されることで、外膜に高い Ca^{2+} 濃度を感知できる。MLPKO は小さいミトコンドリアが多いことと、図で言う左の領域にミトコンドリアが凝集しているため、脱分極に伴う細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇の影響を受けないミトコンドリアがあることがわかる。JSR に隣接せず、筋原線維に隣接しているミトコンドリアは、70 ms に $0.43 \mu\text{M}$ のピーク値をとる (B) が、ミトコンドリアにのみ隣接するミトコンドリアは、NSR も JSR も近くに存在しないため、 Ca^{2+} を少し貯めこんだ後、ほぼ一定の濃度を取り変化しない (A)。

図 4.22 ミトコンドリア Ca^{2+} 濃度分布

第4章 MLPKO マウスにおける解析

図 4.23 ミトコンドリア外縁 Ca^{2+} 濃度変化

Ca^{2+} 放出口である JSR と各節点の距離についてモデルによって差が生じているかを調べた。両モデルにおける、モデル内に存在する全節点から JSR 節点への直線最短距離を表した相対度数分布を図 4.24 に示す。この図より、全体として Control の方が最短距離が長いことがわかる。最短距離が $1\ \mu\text{m}$ 以上の節点は Control では全体の 40%，MLPKO では 23% であり、 $2\ \mu\text{m}$ 以上の節点が Control では 7%，MLPKO では 0.4% となった。

図 4.25 は、各節点が 1 拍の挙動の中でとる最大 Ca^{2+} 濃度の相対度数分布表である。節点をとる最大 Ca^{2+} 濃度を比較すると、MLPKO の方が最大 Ca^{2+} 濃度の低い節点が多く存在することがわかった。つまり、Control と MLPKO で同じ直線最短距離をとっても、MLPKO の方が 1 拍の間に低い Ca^{2+} ピーク値をとる箇所があるということである。

この結果となったのは、距離を直線最短距離としており、拡散障壁の存在や長軸短軸方向の違いを考慮しておらず、実質の距離ではないからだと考えられる。今回の MLPKO モデルでは、ミトコンドリアの巨大クラスターの存在により短軸方向拡散の遮断が行われており、T 管は十分に密であるにも関わらず CaRU への実際の距離が長い場所が多いことが濃度勾配へと繋がっている。

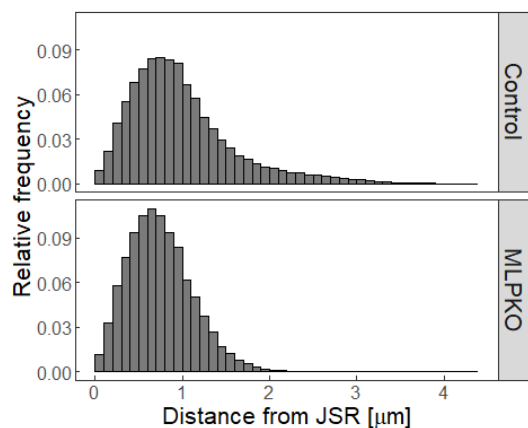
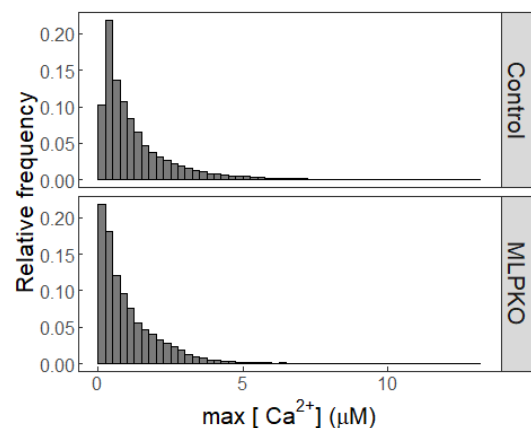


図 4.24 モデル内全節点の JSR 最短距離の相対度数分布

図 4.25 モデル内全節点の最大 Ca^{2+} の相対度数分布

4.5.4 片面固定条件下の収縮挙動

図 4.26 は筋原線維に内部発生した平均収縮力の時間変化である。ピーク値における値は、Control モデルで 4.2 kPa, MLPKO モデルで 3.8 kPa となり、Control と比べて、MLPKO の方が最大収縮力は小さくなっている。

図 4.27 は図 4.18 と同じ断面における MLPKO 筋原線維に発生した収縮力の空間分布である。Control と同様に、 Ca^{2+} よりゆっくりと立ち上がり、勾配を持ったまま収縮力が大きくなり、その後 Ca 濃度の低下とともに小さくなり、勾配も小さくなっている。150 ms における最大収縮力は 5.7 kPa, 最小値は 1.1 kPa である。最大収縮力は Control とほぼ同じ値をとるが、最小値は Control よりも小さくなっている。この断面において収縮力が小さくなっているのは図下部の真ん中にある筋原線維である。断面位置の関係上、小さく示されているため、この筋原線維の収縮力が見えるようにきった断面における、150 ms のコンター図を図 4.28 に示す。この図を見ると、同時刻である 150 ms での Control における収縮力分布や、図 4.27 の断面における MLPKO 収縮力分布よりも勾配に差があることがわかる。MLPKO の収縮力勾配は、Control 同様の勾配を示す箇所と、全体的に発生する収縮力が小さい箇所があることがわかった。

平均 Ca^{2+} 濃度の値はほぼ同様であったのに対して平均内部発生収縮力が小さくなったのは、 Ca^{2+} の乱れによって発生した収縮力の発揮される箇所が偏り、局所的により小さい力しか持たない筋原線維の存在によって差が大きくなったためと考えられる。

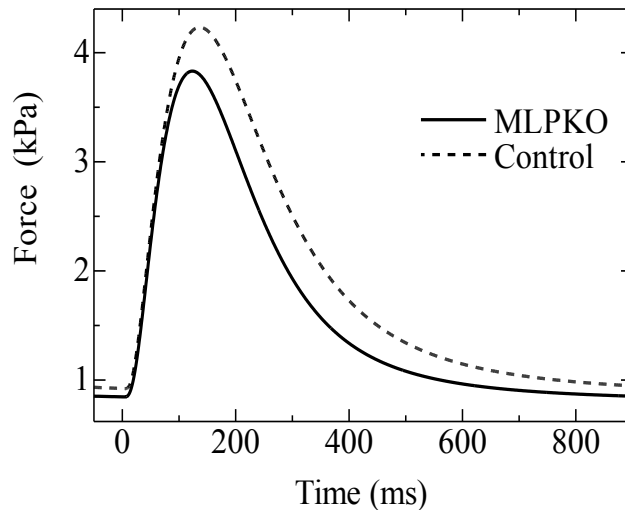


図 4.26 内部発生した収縮力の変化

第4章 MLPKO マウスにおける解析

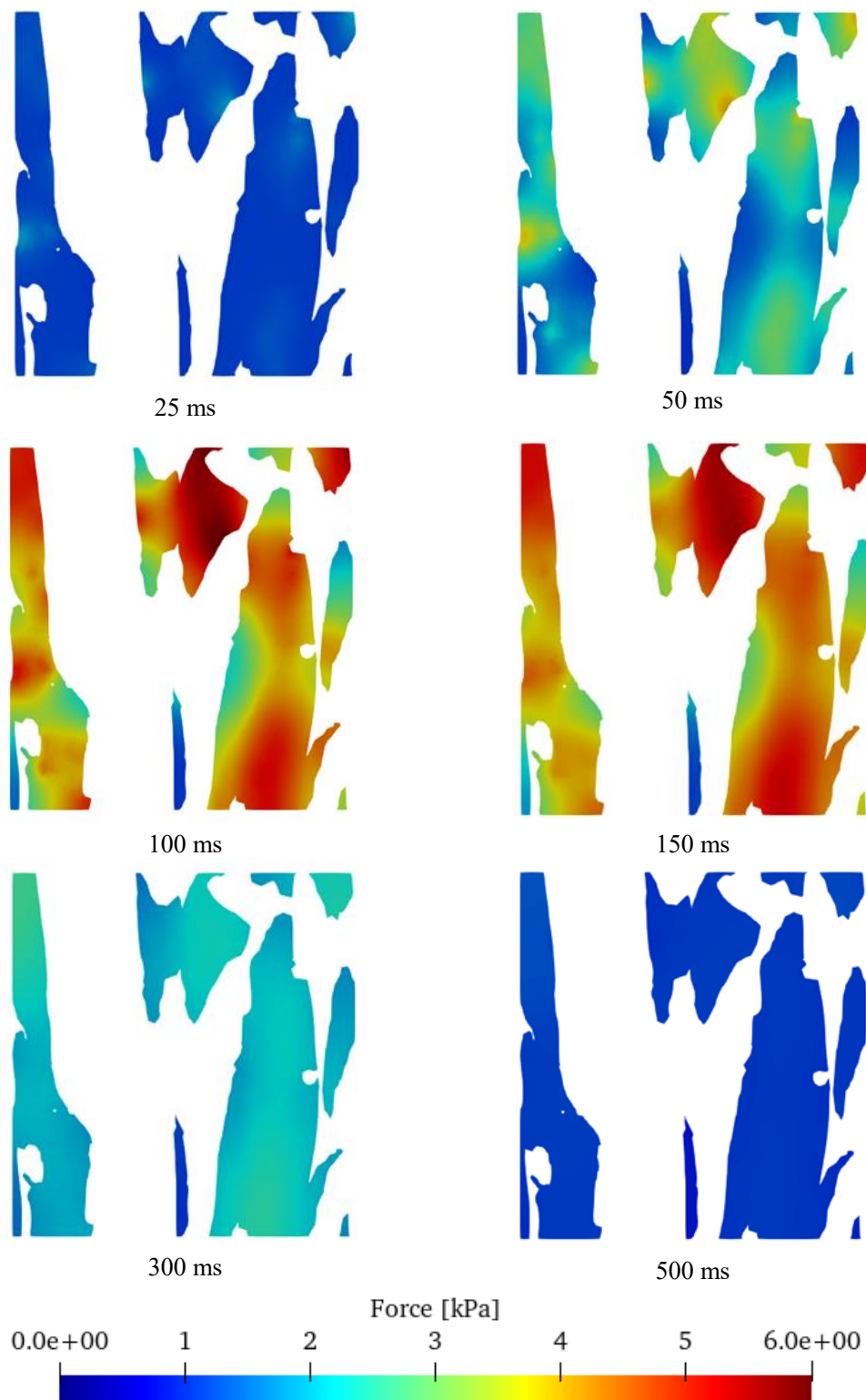


図 4.27 MLPKO 筋原線維に発生した収縮力の空間分布変化

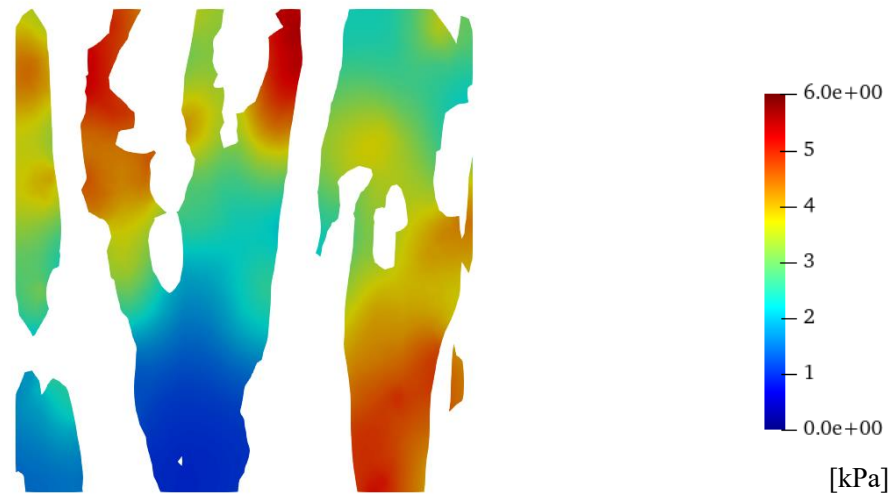


図 4.28 筋原線維断面図における収縮力空間分布

変形について述べる。自由端断面における y 軸方向変位を図 4.29 に示す。 y 軸方向変位は、モデル下部の筋原線維のものである。元の y 軸方向の大きさが $4 \mu\text{m}$ であるため、約 4 % の変位が起こっている。 x 軸方向だけでなく、 y 軸方向への変形にも発生した内部収縮力が使われていることがわかる。図 4.30 は変位のコンター図であり、白が変形前、コンターが変形後の形を示している。MLPKO は、縮みながら全体として y 軸負方向に変位を持っていることがわかり、曲げ変形が起こっていることがわかった。

曲げ変形が起こった理由は、収縮力空間分布の偏りが原因であると考えられる。収縮力分布は z 軸方向だけでなく y 軸方向への分布も見られた。このモデルにおいて、 y 軸方向下部の筋原線維に発生した収縮力が偏ることで、その筋原線維の強い収縮に他の筋原線維が全体的に引っ張られることにより生じていると考えられる。

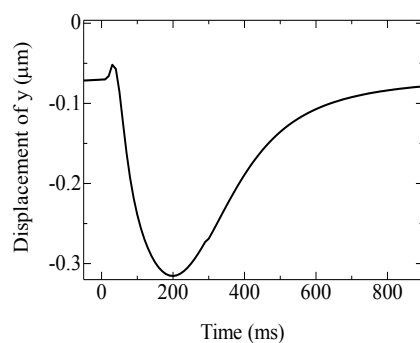


図 4.29 y 軸方向変位

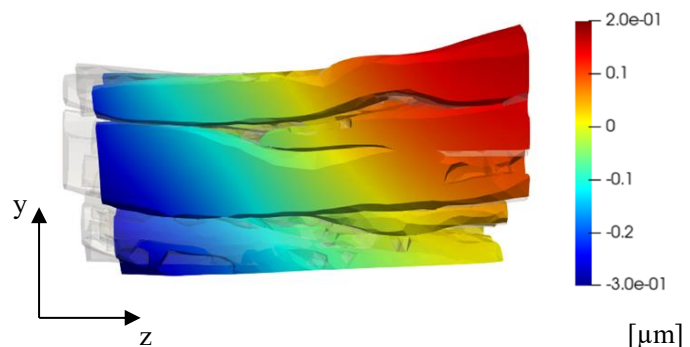


図 4.30 y 軸方向変位コンター図

4.5.5 両端固定条件下の軸方向張力

次に力学境界条件を両端固定にしたときの両端にかかる反力について述べる。心筋細胞において筋節は収縮方向に連なっているため、両面固定した際に端の面にかかる反力は、周りの筋節及び細胞を引っ張る力を表す。筋原線維に発生する収縮力と区別するため、以降張力と呼ぶ。

図4.31は内部発生した収縮力と、張力をそれぞれControlとMLPKOで比較したものである。破線は内部発生した収縮力、実線は張力を表している。Controlでは最大値が収縮力、壁面張力それぞれ4.3 kPa, 4.1kPaとなっているのに対して、MLPKOでは4.0 kPa, 3.5 kPaとなり、筋原線維で発生した収縮力に対してControlの方が効率よく張力になっていることがわかる。これはMLPKOが自由面の解析条件の際に曲げ変形していたことからわかるように、収縮力の分布が偏ることにより、収縮方向でない方向に力がかかっているため、より張力が小さくなってしまったと考えられる。

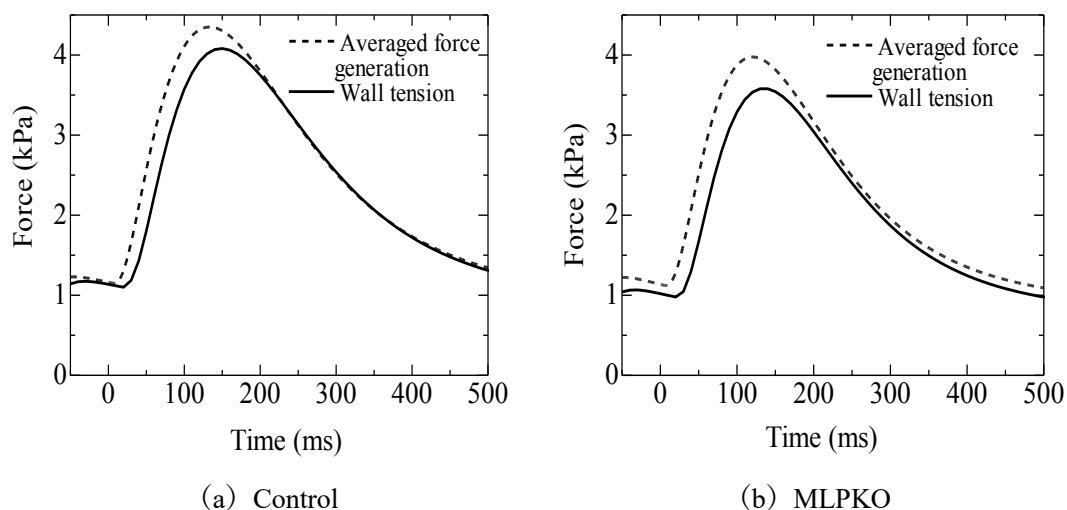


図 4.31 内部発生収縮力と壁面張力の変化

図4.32は固定面のうち片方の筋原線維についての150 ms時点における張力のコンター図であり、xy断面に該当する。Controlの方がモデルが大きいためサイズのスケールは異なる。Controlモデルは、筋原線維1本1本の中に強く張力が発生し、中側と比べると外側が小さくなっている。どの筋原線維も同じ傾向を示すため、筋原線維同士の差は大きくなり、全体としてx, y軸方向に偏りは生じていない。一方でMLPKOモデルにおいては、全体として右下の筋原線維は張力が発生しているものの、他の筋原線維は右下に比べると張力が小さくなっている。全体としてx軸方向, y軸方向の両方に力の偏りが生じてしまっている。

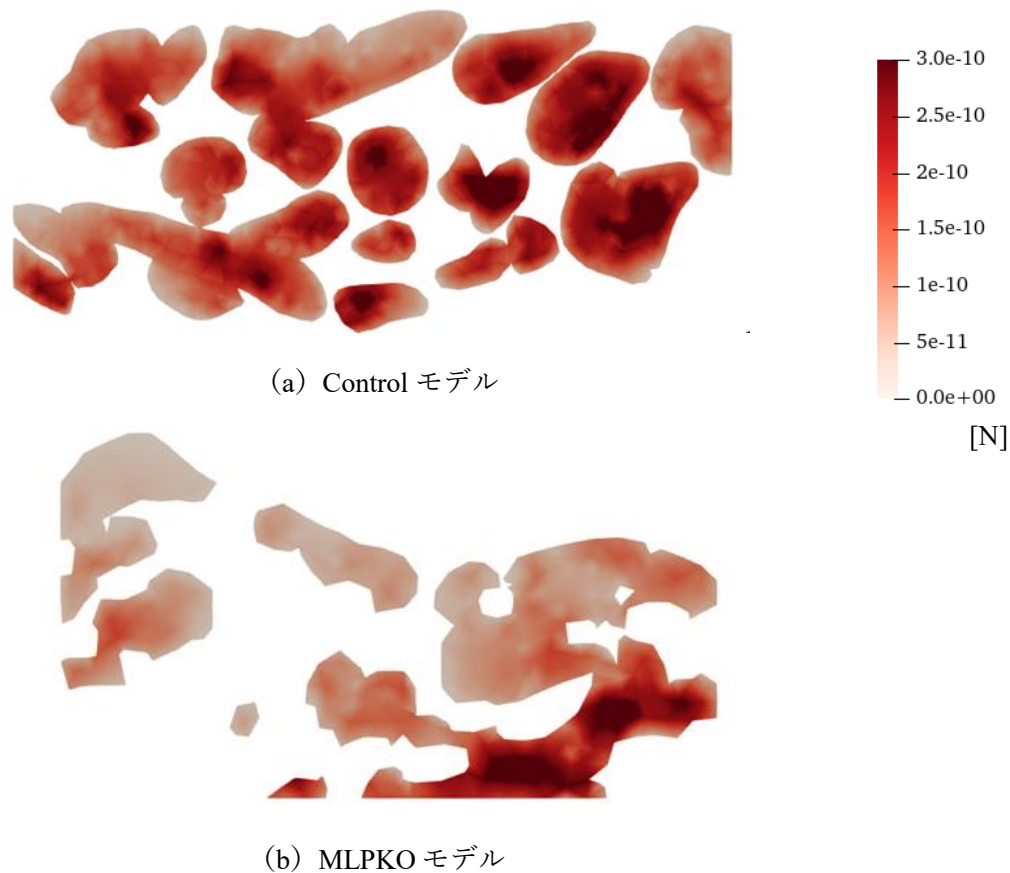
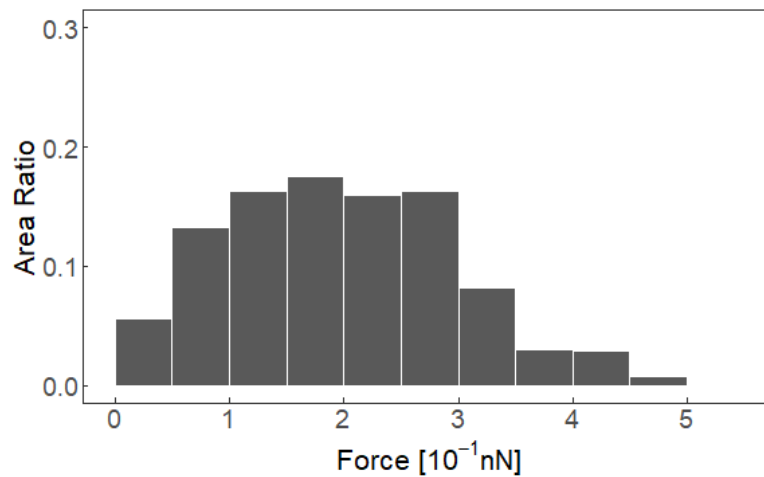


図 4.32 固定面の筋原線維に発生する張力コンター図

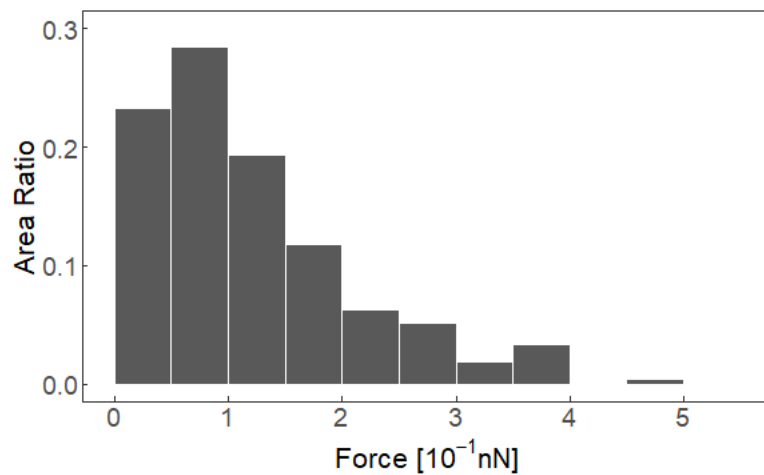
図 4.33 は 150 ms においてかかる張力の大きさごとに面積比率を調べたものである。Control モデルではばらつきはあるものの、 $1.0 \sim 3.0 \times 10^{-1} \text{ nN}$ までそれぞれ 15% 以上の面積を占め、その合計はおよそ 65% であった。一方で MLPKO モデルでは、 $0 \sim 1.5 \times 10^{-1} \text{ nN}$ まで面積の 70% を占めており、大きな力を発している面積の比率が Control よりも小さくなっている。以上のことから、MLPKO では発生する張力に大きな偏りが生じており、働いている筋原線維と働いていない筋原線維が存在していることがわかる。

MLP は心筋細胞の構造を形成、維持するために必要な構成要素であり、非 MLP 下では筋原線維構造が再編成されないという研究結果が出ている[26]。また、ミトコンドリアには収縮後の Ca^{2+} の恒常性を保つ役割があるが、収縮時の高い Ca^{2+} 濃度の調節は知られていない。つまり、MLPKO マウスはこの構造を正常に戻す機能を有していないため、一部にのみ力学的負荷がかかる状態のまま拍動を繰り返すこととなると考えられる。ゆえにこの結果は、細胞全体としての収縮能力の低下を意味する。細胞構造が乱れると、個々の筋原線維の能力自体が低下していなくても、収縮能力が低下する可能性があるということを示唆している。

第4章 MLPKO マウスにおける解析



(a) Control モデル



(b) MLPKO モデル

図 4.33 張力ごとの面積比

4.6 結言

本章では、MLPKO マウス心筋細胞の三次元モデルを作成した。MLPKO マウス細胞構造について、走査性電子顕微鏡画像からミトコンドリアや筋原線維の配列の乱れが確認された。画像から形状抽出することにより作成されたモデルはその構造の特徴を反映した。

作成した MLPKO モデルについて、二章で作成した力学電気生理解析を行い、Ca²⁺動態や収縮現象について Control モデルとの違いを調べた。Ca²⁺について、細胞全体で平均 Ca²⁺濃度は Control と比べ大きな差は見られなかったが、Ca²⁺の空間濃度分布に大きな偏りが生じた。発生した収縮力に対しても同様に偏りがみられ、働かない筋原線維が生じていた。

第4章 MLPKO マウスにおける解析

また細胞全体として曲げの方向への変形が見られた。この原因として、Control では見られなかったミトコンドリア配列における大きな塊が Ca^{2+} の拡散を阻害しているからだと考えられる。この Ca^{2+} 濃度勾配が大きいことが、発生した収縮力の偏りにつながり、収縮現象への影響がでたと考えられる。

第5章 結論

5.1 結論

本研究では、心筋細胞の力学電気生理計算モデルの開発と実形状に基づいたモデルの作成を行った。計算モデルについては、細胞膜や筋小胞体のモデルをマウスの反応式に変更してフィッティングを行った。実形状モデルは、画像から形状を取り出し、微細な小器官は節点で位置を再現することによって作成した。このモデルを使った解析によって、マウスに特徴的な膜電位や Ca^{2+} 動態、また収縮現象についてよく再現した。

同様のモデリング手法を用いて MLPKO マウスの有限要素モデルを作成した。筋原線維とミトコンドリアといった比較的大きな細胞小器官における形状・配置の乱れが画像から確認でき、それらを形状モデルに反映した。このモデルを用いた力学電気生理解析によって、筋原線維軸みだれによる JSR の配置の偏りと大きなミトコンドリア柱による拡散障害が、 Ca^{2+} 濃度勾配分布に広範囲での偏りを与えることがわかった。また、この偏りによって内部発生した収縮力空間分布にも偏りが生じ、正常な機能を有していても働かない筋原線維ができることがわかった。

5.2 今後の課題

5.2.1 実形状メッシュ作成における課題

画像から形状を持ってくる際の問題として、一つ一つの輪郭をマークするため、非常に時間がかかるという点が挙げられる。ミトコンドリアや筋原線維は、機械学習によって識別し精度の良い輪郭のマークができるという先行研究[32], [31]があるが、SR や微細な小器官である T 管ではまだ難しい。手動での輪郭抽出は、病理状態のモデルは構造が乱れているため、より形を取るのが難しくなっていた。

また、画像からとった形状を元にメッシュを作成する際にも時間がかかるという問題点がある。本研究では、形状を持ってきた後、ソフトに入れてメッシュを切るということをしている。細胞小器官の形状は、小器官自体が柔らかいものが多く、お互い隙間を埋めるように存在しているため、その多くが曲線となる。現状では、曲線の不得意なメッシュソフトで行っているため、今後行う際にはソフトの検討が必要になる。

5.2.2 計算モデルにおける課題

本研究では、力学電気生理解析を有限要素法にて行っており、拡散方程式のためのマトリクスと、力学平衡方程式のためのマトリクスをプログラム内で生成する。ゆえに、変形を解く際のリメッシュができないため、もとのモデルのメッシュ形状のアスペクト比が悪かったり、また唐突な変形が起きてしまったりすると、解析が不安定になってしまう。今回は変形において筋収縮の再現を目的としており、細胞が壊れてしまうほどの大きな変形を想定していないため、最初のモデルのメッシュをきれいにすることで解析を安定状態にして行うことができたが、大きな変形を解くことができないのは一つの課題として挙げられる。リメッシングをプログラムで行うとすると、リメッシングしてはいけない箇所である各小器官の境界部分として良い箇所である境界ではない部分の区別も必要となり、またリメッシング前に節点に与えられていた物質濃度のリメッシング後の振り分けなど、解決すべき問題を多く抱えている。

また、フィッティングの観点として、反応項に要素体積比率をかけている。これが濃度に大きな影響を与えるため、色々なメッシュ形状で行うには違う細胞小器官同士での流入、流出に関してそれらを一つ一つの要素の大きさをモデルごとに合わせて変更しなければならないのが、大量のモデルについて解析を行う際の問題点である。できるだけ同じ要素の大きさを持つモデルを作ることによってフィッティングへの負荷が小さくなると考えられる。

5.2.3 今後の展望

今回は二つのモデルについて比較を行った。メカニズムの解明には、もっとたくさんの細胞での比較が必要になる。そのために、計算の安定化、計算量の低減と、フィッティングの時間や形状モデル作成の時間の軽減が求められている。心機能に重大な影響を与える特徴量が何にあたるのかを見つけ、その特徴量に着目したモデル作成方法の開発が今後の展望となっていくと考えられる。

付録 A 数理モデルの詳細

第二章で記載した電気生理モデルについて、各細胞小器官についての計算式とパラメータ、Referenceを示す。

A.1 細胞膜と T 管

第二章で記載しなかったオープン確率の詳細な計算式と各パラメータも含めて記載する。

Table A-1 Membrane potential parameters

Parameter	Value	Unit
C_{mbr}	1.0	$\mu\text{F}/\text{cm}^2$
$[\text{Na}^+]_o$	1.4	mM
$[\text{K}^+]_o$	5.4	mM
$[\text{Ca}^{2+}]_o$	1.8	mM

L-type calcium current

$$I_{CaL} = G_{CaL}O(V - E_{Ca,L})$$

$$\frac{dO}{dt} = \alpha C_4 - 4\beta O + K_{pcb}I_1 - \gamma O + 0.001(\alpha I_2 - K_{pcf}O)$$

$$C_1 = 1 - (O + C_2 + C_3 + C_4 + I_1 + I_2 + I_3)$$

$$\frac{dC_2}{dt} = 4\alpha C_1 - \beta C_2 + 2\beta C_3 - 3\alpha C_2$$

$$\frac{dC_3}{dt} = 3\alpha C_2 - 2\beta C_3 + 3\beta C_4 - 2\alpha C_3$$

$$\begin{aligned} \frac{dC_4}{dt} = & 2\alpha C_3 - 3\beta C_4 + 4\beta O - \alpha C_4 + 0.01(4K_{pcb}\beta I_1 - \alpha\gamma C_4) \\ & + 0.002(4\beta I_2 - K_{pcf}C_4) + 4\beta K_{pcb}I_3 - \gamma K_{pcf}C_4 \end{aligned}$$

$$\frac{dI_1}{dt} = \gamma O - K_{pcb}I_1 + 0.001(\alpha I_3 - K_{pcf}I_1) + 0.01(\alpha\gamma C_4 - 4\beta K_{pcb}I_1)$$

$$\frac{dI_2}{dt} = 0.001(K_{pcf}O - \alpha I_2) + K_{pcb}I_3 - \gamma I_2 + 0.002(K_{pcf}C_4 - 4\beta I_2)$$

付録 A 数理モデルの詳細

$$\frac{dI_3}{dt} = 0.001(K_{pct}I_1 - \alpha I_3) + \gamma I_2 - K_{pcb}I_3 + \gamma K_{pcf}C_4 - 4\beta K_{pcb}I_3$$

$$\alpha = 0.4e^{\frac{V+15.0}{15.0}}$$

$$\beta = 0.13e^{-\frac{V+15.0}{18.0}}$$

$$\gamma = \frac{K_{pc,m} [Ca^{2+}]_i}{K_{pc, half} + [Ca^{2+}]_i}$$

Calcium pump current

$$I_{p(Ca)} = I_{p(Ca)}^{\max} \frac{[Ca^{2+}]_i^2}{K_{m,p(Ca)}^2 + [Ca^{2+}]_i^2}$$

Background Ca current

$$I_{Cab} = G_{Cab}(V - E_{CaN})$$

$$E_{CaN} = \frac{RT}{2F} \ln \left(\frac{[Ca^{2+}]_o}{[Ca^{2+}]_i} \right)$$

Na⁺/Ca²⁺ exchange current

$$I_{NaCa} = V_{NCX} \Delta E_i$$

$$\Delta E_i = \frac{([Na^+]_{cyt}^3 [Ca^{2+}]_o e^{\frac{\eta VF}{RT}} - [Na^+]_o^3 [Ca^{2+}]_{cyt} e^{\frac{(\eta-1)VF}{RT}})}{\left(K_{mCa_o} [Na^+]_{cyt}^3 + K_{mNa_o}^3 [Ca^{2+}]_{cyt} + K_{mNa_i}^3 [Ca^{2+}]_o \left(1 + \frac{[Ca^{2+}]_{cyt}}{K_{mCa_i}} \right) \right) \left(1 + k_{sat} e^{\frac{(\eta-1)VF}{RT}} \right) + K_{mCa_i} [Na^+]_o^3 \left(1 + \frac{[Na^+]_{cyt}^3}{K_{mNa_i}^3} \right) + [Na^+]_{cyt}^3 [Ca^{2+}]_o + [Na^+]_o^3 [Ca^{2+}]_{cyt}}$$

Table A-2 Ca²⁺ current parameters

Parameter	Value	Unit
G_{CaL}	0.1729	mS/ μ F
$K_{pc,max}$	0.11662	ms ⁻¹
$K_{pc,half}$	0.01	mM
K_{pcb}	5.0×10^{-4}	ms ⁻¹
K_{pcf}	2.5	ms ⁻¹
$I_{p(Ca)}^{max}$	0.17	pA/pF
$K_{m,p(Ca)}$	0.5×10^{-3}	μ M
G_{Cab}	1.65×10^{-4}	mS / μ F
V_{NCX}	1.65	pA/pF
η	0.35	
K_{mNa_o}	87.5	mM
K_{mNa_i}	16.65	mM
K_{mCa_o}	1.3	mM
K_{mCa_i}	3.6×10^{-3}	mM
k_{sat}	0.27	

Fast Na⁺current

$$I_{Na} = G_{Na} O_{Na} (V - E_{Na})$$

$$E_{Na} = \frac{RT}{F} \ln \left(\frac{0.9[Na^+]_o + 0.1[K^+]_o}{0.9[Na^+]_i + 0.1[K^+]_i} \right)$$

$$C_{Na3} = 1 - (O_{Na} + C_{Na2} + C_{Na1} + IC_{Na3} + IC_{Na2} + IF_{Na} + IM_{Na1} + IM_{Na2} + LC_{Na3} + LC_{Na2} + LC_{Na1} + LO_{Na})$$

$$\frac{dC_{Na2}}{dt} = -(b_5 + b_1 + a_2 + a_8)C_{Na2} + a_5 IC_{Na2} + a_1 C_{Na3} + b_2 C_{Na1} + b_8 LC_{Na2}$$

$$\frac{dC_{Na1}}{dt} = -(b_5 + b_1 + a_2 + a_8)C_{Na1} + a_5 IF_{Na} + a_2 C_{Na2} + b_3 O_{Na} + b_8 LC_{Na1}$$

$$\frac{dIC_{Na3}}{dt} = (a_1 + a_5)IC_{Na3} + b_1 IC_{Na2} + b_5 C_{Na3} + b_8 LC_{Na2}$$

付録 A 数理モデルの詳細

$$\frac{dIC_{Na2}}{dt} = -(b_1 + a_5 + a_2)IC_{Na2} + a_1IC_{Na3} + b_2IF_{Na} + b_5C_{Na2}$$

$$\frac{dIF_{Na}}{dt} = -(b_2 + b_4 + a_6 + a_5)IF_{Na} + a_2IC_{Na2} + b_6IM_{Na1} + b_5C_{Na1} + a_4O_{Na}$$

$$\frac{dIM_{Na1}}{dt} = -(b_6 + a_7)IM_{Na1} + a_6IF_{Na} + b_7IM_{Na3}$$

$$\frac{dIM_{Na2}}{dt} = -b_7IM_{Na3} + a_7IM_{Na1}$$

$$\frac{dO_{Na}}{dt} = -(a_4 + b_3 + a_8)O_{Na} + b_4IF_{Na} + a_3C_{Na1} + b_8LO_{Na}$$

$$\frac{dLC_{Na3}}{dt} = -(b_8 + a_1)LC_{Na3} + a_8C_{Na3} + b_1LC_{Na2}$$

$$\frac{dLC_{Na3}}{dt} = -(b_8 + a_1)LC_{Na3} + a_8C_{Na3} + b_1LC_{Na2}$$

$$\frac{dLC_{Na2}}{dt} = -(b_8 + b_1 + a_2)LC_{Na2} + a_8C_{Na2} + a_1LC_{Na3} + b_2LC_{Na1}$$

$$\frac{dLC_{Na1}}{dt} = -(b_8 + b_2 + a_3)LC_{Na1} + a_8C_{Na1} + a_2LC_{Na2} + b_3LO_{Na}$$

$$\frac{dLO_{Na}}{dt} = -(b_8 + b_3)LO_{Na} + a_8O_{Na} + a_3LC_{Na1}$$

Background Na⁺ current.

$$I_{Nab} = G_{Nab}(V - E_{Na})$$

Table A-3 Transition rates expression of I_{Na} [33]

Transition rates (ms^{-1})
$a_1 = \left(P_{1a1} / (P_{2a1} \exp(-(V + 2.5)/17) + 0.20 \exp(-(V + 2.5)/150)) \right)$
$a_2 = \left(P_{1a1} / (P_{2a1} \exp(-(V + 2.5)/15) + 0.23 \exp(-(V + 2.5)/150)) \right)$
$a_3 = \left(P_{1a1} / (P_{2a1} \exp(-(V + 2.5)/12) + 0.25 \exp(-(V + 2.5)/150)) \right)$
$b_1 = P_{1b1} \exp(-V/P_{2b1})$
$b_2 = P_{1b2} \exp(-(V - P_{2b2})/P_{2b1})$
$b_3 = \left(P_{1b3} \exp(-(V - P_{2b3})/P_{2b1}) \right)$
$a_5 = P_{1a5} \exp(-(-V + 7)/P_{2a5})$
$b_5 = (P_{1b5} + P_{2b5}(V + 7))$
$a_4 = 1 / (P_{1a4} \exp(-(V + 7)/P_{2a4}) + P_{3a4})$
$b_4 = (a_3 a_4 a_5) / (b_3 b_5)$
$a_6 = a_4 / P_{1a6}$
$b_6 = P_{1b6} \exp(-V/P_{2b6})$
$a_7 = (P_{1a7} \exp(V/P_{2a7}))$
$b_7 = P_{1b7} \exp(-V/P_{2b7})$
$a_8 = P_{1a8}$
$b_8 = P_{1b8}$

Table A-4 Na⁺ channel model Parameters for WT[33]

Parameter	Value
P _{1a1}	3.802
P _{2a1}	0.1027
P _{1a4}	0.188495
P _{2a4}	16.6
P _{3a4}	0.393956
P _{1a5}	7×10^{-7}
P _{2a5}	7.2
P _{1b1}	0.1917
P _{2b1}	20.3
P _{1b2}	0.2
P _{2b2}	2.5
P _{1b3}	0.22
P _{2b3}	7.5
P _{1b5}	0.0044
P _{2b5}	2×10^{-5}
P _{1a6}	100
P _{1b6}	8.9554×10^{-7}
P _{2b6}	11.3944
P _{1a7}	$0.487e^{-4}$
P _{2a7}	23.2696
P _{1b7}	0.2868×10^{-3}
P _{2b7}	35.9898
P _{1a8}	0.1×10^{-7}
P _{1b8}	9.8×10^{-3}

K^+ current $I_{Kto,f}$

$$I_{Kto,f} = G_{Kto,f} a_{to,f}^3 i_{to,f} (V - E_K)$$

$$E_K = \frac{RT}{F} \ln \left(\frac{[K^+]_o}{[K^+]_i} \right)$$

$$\frac{da_{to,f}}{dt} = \alpha_a (1 - a_{to,f}) - \beta_a a_{to,f}$$

$$\frac{di_{to,f}}{dt} = \alpha_i (1 - i_{to,f}) - \beta_i i_{to,f}$$

$$\alpha_a = 0.18064 e^{0.03577(V+30.0)}$$

$$\beta_a = 0.3956 e^{-0.06237(V+30.0)}$$

$$\alpha_i = \frac{0.000152 e^{-(V+13.5)/7.0}}{0.067083 e^{-(V+33.5)/7.0} + 1}$$

$$\beta_i = \frac{0.00095 e^{(V+33.5)/7.0}}{0.051335 e^{(V+33.5)/7.0} + 1}$$

K^+ current $I_{Kto,s}$

$$I_{Kto,s} = G_{Kto,s} a_{to,s} i_{to,s} (V - E_K)$$

$$\frac{da_{to,s}}{dt} = \frac{a_{ss} - a_{to,s}}{\tau_{ta,s}}$$

$$\frac{di_{to,s}}{dt} = \frac{i_{ss} - i_{to,s}}{\tau_{ti,s}}$$

$$a_{ss} = 1 / [1 + e^{-(V+22.5)/7.7}]$$

$$i_{ss} = 1 / [1 + e^{(V+45.2)/5.7}]$$

$$\tau_{ta,s} = 0.493 e^{-0.0629V} + 2.058$$

$$\tau_{ti,s} = 270.0 + \frac{1,050.0}{1 + e^{\frac{V+45.2}{5.7}}}$$

Time-independent K^+ current.

$$I_{K1} = 0.2938 \left(\frac{[K^+]_o}{[K^+]_o + 210.0} \right) \left[\frac{V - E_K}{1 + e^{0.0896(V-E_K)}} \right]$$

Slow delayed rectifier K^+ current.

$$I_{Ks} = G_{Ks} n_{Ks}^2 (V - E_K)$$

$$\frac{dn_{Ks}}{dt} = \alpha_n (1 - n_{Ks}) - \beta_n n_{Ks}$$

$$\alpha_n = \frac{0.00000481333(V + 26.5)}{1 - e^{-0.128(V+26.5)}}$$

付録 A 数理モデルの詳細

$$\beta_n = 0.0000953333e^{-0.038(V+26.5)}$$

Ultrarapidly activating delayed rectifier K⁺ current.

$$I_{Kur} = G_{Kur} a_{ur} i_{ur} (V - E_K)$$

$$\frac{da_{ur}}{dt} = \frac{a_{ss} - a_{ur}}{\tau_{aur}}$$

$$\frac{di_{ur}}{dt} = \frac{i_{ss} - i_{ur}}{\tau_{iur}}$$

$$\tau_{aur} = 0.493e^{-0.0629V} + 2.058$$

$$\tau_{iur} = 1,200.0 - \frac{170.0}{1 + e^{(V+45.2)/5.7}}$$

Noninactivating steady-state K⁺ current.

$$I_{Kss} = G_{Kss} a_{Kss} i_{Kss} (V - E_K)$$

$$\frac{da_{Kss}}{dt} = \frac{a_{ss} - a_{Kss}}{\tau_{Kss}}$$

$$\tau_{Kss} = 39.3e^{-0.0862V} + 13.17$$

Rapid delayed rectifier K⁺ current (mERG).

$$I_{Kr} = O_K \cdot G_{Kr} \cdot \left[V - \frac{RT}{F} \ln \left(\frac{0.98[K^+]_o + 0.02[Na^+]_o}{0.98[K^+]_i + 0.02[Na^+]_i} \right) \right]$$

$$C_{K0} = 1 - (C_{K1} + C_{K2} + O_K + I_K)$$

$$\frac{dC_{K1}}{dt} = \alpha_{a0} C_{K0} - \beta_{a0} C_{K1} + k_b C_{K2} - k_f C_{K1}$$

$$\frac{dC_{K2}}{dt} = k_f C_{K1} - k_b C_{K2} + \beta_{a1} O_K - \alpha_{a1} C_{K2}$$

$$\frac{dO_K}{dt} = \alpha_{a1} C_{K2} - \beta_{a1} O_K + \beta_i I_K - \alpha_i O_K$$

$$\frac{dI_K}{dt} = \alpha_i O_K - \beta_i I_K$$

$$\alpha_{a0} = 0.022348e^{0.01176V}$$

$$\beta_{a0} = 0.047002e^{-0.0631V}$$

$$\alpha_{a1} = 0.013733e^{0.038198V}$$

$$\beta_{a1} = 0.0000689e^{-0.04178V}$$

付録 A 数理モデルの詳細

$$\alpha_i = 0.090821e^{0.023391(V+5.0)}$$

$$\beta_i = 0.006497e^{-0.03268(V+5.0)}$$

Na⁺/K⁺Pump Current

$$I_{\text{NaK}} = I_{\text{NaK}}^{\text{max}} f_{\text{NaK}} \frac{1}{1 + (K_{\text{m,NaI}}/[Na^+]_i)^{3/2}} \frac{[K^+]_o}{[K^+]_o + K_{\text{m,Ko}}}$$

$$f_{\text{NaK}} = \frac{1}{1 + 0.1245e^{-0.1VF/RT} + 0.0365\sigma e^{-VF/RT}}$$

$$\sigma = \frac{1}{7}(e^{[Na^+]_o/67,300} - 1)$$

Ca²⁺-Activated Cl⁻Current

$$I_{\text{Cl,Ca}} = G_{\text{Cl,Ca}} O_{\text{Cl,Ca}} \frac{[Ca^{2+}]_i}{[Ca^{2+}]_i + K_{\text{m,Cl}}} (V - E_{\text{Cl}})$$

$$O_{\text{Cl,Ca}} = \frac{0.2}{1 + \exp[-(V - 46.7)/7.8]}$$

Table A-5 K⁺ current parameters

Parameter	Value	Unit
$G_{\text{Kto,f}}$	0.0798	mS/ μ F
$G_{\text{Kto,s}}$	0.0	mS/ μ F
G_{Ks}	5.75×10^{-3}	mS/ μ F
G_{Kur}	9.75×10^{-2}	mS/ μ F
G_{Kss}	0.0324	mS/ μ F
G_{Kr}	7.8×10^{-7}	mS/ μ F
$I_{\text{NaK}}^{\text{max}}$	1.0	pA/pF
$G_{\text{Cl,Ca}}$	10.0	mS/ μ F
$K_{\text{m,Cl}}$	0.01	mM
E_{Cl}	-40.0	mV

A.2 筋小胞体

筋小胞体の計算式で使用したパラメータを記載する。

Table A-6 SR parameters

Parameter	Value	Unit
v_1	4.0	ms^{-1}
τ_{tr}	0.574713	ms
n_{fb}	1.787	mS / μF
n_{rb}	1.787	mS / μF
K_{SR}	2.6	
$V_{\max f}$	0.0002	$\mu\text{M/L cyt/ms}$
$V_{\max r}$	0.0002	$\mu\text{M/L cyt/ms}$
K_{fb}	6.0×10^{-4}	$\mu\text{M/L cyt}$
K_{rb}	6.0	$\mu\text{M/L SR}$
$K_{m,up}^{ATP}$	0.01	mM
$K_{i,up}$	0.14	mM
$K'_{i,up}$	5.1	mM

参考文献

- [1] 厚生労働省, “令和1~3年 人口動態統計(確定数)の概況, 死因簡単分類別にみた性別死亡数・死亡率(人口10万対)・構成割合,” 2022.
- [2] G. Santulli, W. Xie, S. R. Reiken, and A. R. Marks, “Mitochondrial calcium overload is a key determinant in heart failure,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 112, no. 36, 2015.
- [3] A. Maloyan *et al.*, “Mitochondrial dysfunction and apoptosis underlie the pathogenic process in α -B-crystallin desmin-related cardiomyopathy,” *Circulation*, vol. 112, no. 22, 2005.
- [4] F. R. Heinzel *et al.*, “Remodeling of T-tubules and reduced synchrony of Ca^{2+} release in myocytes from chronically ischemic myocardium,” *Circ. Res.*, vol. 102, no. 3, 2008.
- [5] R. Knöll *et al.*, “The cardiac mechanical stretch sensor machinery involves a Z disc complex that is defective in a subset of human dilated cardiomyopathy,” *Cell*, vol. 111, no. 7, pp. 943–955, 2002.
- [6] V. E. Bondarenko, G. P. Szigeti, G. C. L. Bett, S. J. Kim, and R. L. Rasmusson, “Computer model of action potential of mouse ventricular myocytes,” *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.*, vol. 287, no. 3 56-3, 2004.
- [7] V. E. Bondarenko and R. L. Rasmusson, “Transmural heterogeneity of repolarization and Ca^{2+} handling in a model of mouse ventricular tissue,” *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.*, vol. 299, no. 2, pp. H454–H469, Aug. 2010.
- [8] L. Li *et al.*, “A mathematical model of the murine ventricular myocyte: A data-driven biophysically based approach applied to mice overexpressing the canine NCX isoform,” *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.*, vol. 299, no. 4, 2010.
- [9] A. G. Edwards *et al.*, “Nonequilibrium Reactivation of Na^{+} Current Drives Early Afterdepolarizations in Mouse Ventricle,” *Circ. Arrhythmia Electrophysiol.*, vol. 7, no. 6, pp. 1205–1213, Dec. 2014.
- [10] A. Hatano, J. I. Okada, T. Washio, T. Hisada, and S. Sugiura, “A three-dimensional simulation model of cardiomyocyte integrating excitation-contraction coupling and metabolism,” *Biophys. J.*, vol. 101, no. 11, 2011.
- [11] S. Ghosh *et al.*, “Insights on the impact of mitochondrial organisation on bioenergetics in high-resolution computational models of cardiac cell architecture,” *PLoS Comput. Biol.*, vol. 14, no. 12, 2018.
- [12] V. Rajagopal *et al.*, “Creating a structurally realistic finite element geometric model of a cardiomyocyte to study the role of cellular architecture in cardiomyocyte systems biology,” *J. Vis. Exp.*, vol. 2018, no. 134, 2018.
- [13] M. A. Colman, C. Pinali, A. W. Trafford, H. Zhang, and A. Kitmitto, “A computational model of spatio-temporal cardiac intracellular calcium handling with realistic structure and spatial flux distribution from sarcoplasmic reticulum and t-tubule reconstructions,” *PLoS Comput. Biol.*, vol. 13, no. 8, 2017.

参考文献

- [14] K. Uchida and A. N. Lopatin, “Diffusional and Electrical Properties of T-Tubules Are Governed by Their Constrictions and Dilations,” *Biophys. J.*, vol. 114, no. 2, 2018.
- [15] 波田野明日可, “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,” vol. 4, no. 1, pp. 64–75, 2012.
- [16] A. G. Edwards *et al.*, “Sarcoplasmic Reticulum Calcium Release Is Required for Arrhythmogenesis in the Mouse,” *Front. Physiol.*, vol. 12, 2021.
- [17] H. Sutanto and J. Heijman, “Integrative Computational Modeling of Cardiomyocyte Calcium Handling and Cardiac Arrhythmias: Current Status and Future Challenges,” *Cells*, vol. 11, no. 7, 2022.
- [18] S. Cortassa *et al.*, “A computational model integrating electrophysiology, contraction, and mitochondrial bioenergetics in the ventricular myocyte,” *Biophys. J.*, vol. 91, no. 4, 2006.
- [19] J. A. Negroni and H. C. Lascano, “A cardiac muscle model relating sarcomere dynamics to calcium kinetics,” *J. Mol. Cell. Cardiol.*, vol. 28, no. 5, 1996.
- [20] S. Matsuoka, N. Sarai, H. Jo, and A. Noma, “Simulation of ATP metabolism in cardiac excitation-contraction coupling,” in *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 2004, vol. 85, no. 2–3.
- [21] H. Watanabe, S. Sugiura, H. Kafuku, and T. Hisada, “Multiphysics simulation of left ventricular filling dynamics using fluid-structure interaction finite element method,” *Biophys. J.*, vol. 87, no. 3, 2004.
- [22] 田中宏明, “心筋細胞画像からの実形状モデル自動作成手法の開発,” 東京大学, 2019.
- [23] 橋本瑞樹, “心筋細胞内微細構造の実形状を用いた電気生理現象の解明,” 東京大学, 2018.
- [24] E. Picht, A. V. Zima, T. R. Shannon, A. M. Duncan, L. A. Blatter, and D. M. Bers, “Dynamic calcium movement inside cardiac sarcoplasmic reticulum during release,” *Circ. Res.*, vol. 108, no. 7, 2011.
- [25] M. J. Previs *et al.*, “Myosin-binding protein C corrects an intrinsic inhomogeneity in cardiac excitation-contraction coupling,” *Sci. Adv.*, vol. 1, no. 1, 2015.
- [26] S. Arber *et al.*, “MLP-deficient mice exhibit a disruption of cardiac cytoarchitectural organization, dilated cardiomyopathy, and heart failure,” *Cell*, vol. 88, no. 3, pp. 393–403, 1997.
- [27] B. J. C. Van Den Bosch *et al.*, “Regional absence of mitochondria causing energy depletion in the myocardium of muscle LIM protein knockout mice,” *Cardiovasc. Res.*, vol. 65, no. 2, pp. 411–418, 2005.
- [28] P. M. Bennett, E. Ehler, and A. J. Wilson, “Sarcoplasmic reticulum is an intermediary of mitochondrial and myofibrillar growth at the intercalated disc,” *J. Muscle Res. Cell Motil.*, vol. 37, no. 3, pp. 55–69, 2016.
- [29] J. R. Wilding *et al.*, “Altered energy transfer from mitochondria to sarcoplasmic reticulum after cytoarchitectural perturbations in mice hearts,” *J. Physiol.*, vol. 575, no. 1, 2006.

参考文献

- [30] M. S. Iqbal, B. Luo, R. Mehmood, M. A. Alrige, and R. Alharbey, "Mitochondrial organelle movement classification (fission and fusion) via convolutional neural network approach," *IEEE Access*, vol. 7, 2019.
- [31] J. D. Powers *et al.*, "Subcellular Remodeling in Filamin C Deficient Mouse Hearts Impairs Myocyte Tension Development during Progression of Dilated Cardiomyopathy," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 23, no. 2, 2022.
- [32] 染谷誠, "深層学習を用いた心筋細胞モデルの作成と力学電気生理連成解析," 東京大学, 2021.
- [33] S. Wagner *et al.*, "Ca/calmodulin kinase II differentially modulates potassium currents," *Circ. Arrhythmia Electrophysiol.*, vol. 2, no. 3, 2009.

謝辞

謝辞

本研究を進めるにあたり、多くの方々からご指導およびご支援をいただきました。

波田野講師には、学部4年の時からたくさんのことを学ばせて頂きました。特に修士に上がってからはお忙しい中、研究の相談やミーティングを通じてたくさんのご指導頂きました。始めた当初は知見の乏しかった研究に、3年間前向きに向き合ってこられたのは、先生のおかげかと思います。研究に留まらず様々なお話もさせていただき、誠にありがとうございました。泉教授には研究会や発表練習などの際に多くのご助言をいただき、研究に取り組む上で課題を見つめなおす貴重な時間になりました。発表練習における先生のご指導により、わかりやすい伝え方について勉強させていただきました。榎間助教には、発表練習などで多くのご助言をいただいた他、研究会の際、度々気にかけてくださり、ありがとうございました。

また、研究室の秘書の皆様や先輩・同期・後輩のおかげで、楽しい研究生活を送ることができました。特に同期の皆様には3年間、非常にお世話になりました。

最後に、本研究および研究生活に関わっていただいた皆様に深く感謝を申し上げ、以上を私からの謝辞とさせていただきます。

以上

P. 1~P. 75 完

修士論文

37-216277 望月 優

指導教員 波田野 明日可 講師