

EDUCATION

『心筋細胞フィジオーム理解のための電子教科書“e-Heart”』の 生理学教育教材および研究資材としての活用に向けて 第1回 Visual Studio を用いた包括的ヒト心室筋細胞モデルの 実行

立命館大学生命科学部生命情報学科, バイオシミュレーション研究センター
姫野友紀子, 天野 晃, 野間 昭典

はじめに

国際生理科学連合 IUPS によってフィジオーム (“physio” (生命) + “ome” (総体)) の概念が提唱されてから、四半世紀が過ぎようとしている。フィジオームという用語そのものは生理学会においても定着してきた感があるが、フィジオーム研究という視点で俯瞰してみるとまだまだ体系的と言うにはほど遠く、学問としては未だ発展途上にあると言える。そのような中、我々の研究グループ(立命館大学総合科学技術研究機構・バイオシミュレーション研究センター, センター長: 天野 晃教授)では2009年より野間昭典教授(京都大学名誉教授, 立命館大学首席研究員)を中心として、生理学分野で最も研究の歴史が古く研究成果の蓄積も多い臓器の一つである、心臓におけるフィジオームの標準的な教育材料となりうる電子教科書の開発を目指してきた。そして今年の春、立命館大学学術図書出版推進プログラムの援助のもと(代表: 姫野友紀子助教)【DVD版】『心筋細胞フィジオーム理解のための電子教科書“e-Heart”』(株式会社丸善雄松堂)を世に送り出すことができた(図1)。出版された電子教科書“e-Heart”を多くの方々にお手元で活用していただけるよう、内容を分割したうえで使い方を分かりやすく説明していきたい。シリーズ第1回の本稿では、まず“e-Heart”の趣旨と概要を説明し、第1回実習課題である概論で扱う包括的ヒト心室筋

細胞モデル(HuVECモデル[1])プログラム(e-Heartホームページhttp://www.eheartsim.com/?page_id=30からもダウンロード可)を実行する手順を解説する。そして、生体機能シミュレーターを生理学教育における教育材料、あるいは研究の基本的なツールの一つとして活用する可能性を探りたい。

1. 電子教科書 e-Heart とは

今回出版された電子教科書 e-Heart は、立命館大学生命科学部生命情報学科の『生命情報学実験』という実習科目のために作成された教材を元に纏められたものである(図1)。本教材では、全20回分の実習課題を通して学習することで、最終的に包括的心筋細胞モデルを原理レベルで理解できるようになることを目指す(次頁の目次を参照)。まず第1回概論では、到達目標の包括的心筋細胞モデルとしてヒト心室筋細胞モデルと洞房結節ペースメーカー細胞モデルを紹介する。第2回では Visual Basic (VB) を使ったグラフの描画の簡単な方法などを学習する。第3-5回は、細胞膜興奮の原理を理解するために電気的等価回路を用いて説明するが、第3回ではその直観的理解を手助けするために水柱モデルを使ったシミュレーションを行う。第6, 7回は簡略化したイオンチャンネルモデルの基本的な振る舞いを観察する。第8回では電気生理学で用いられる Voltage Clamp 実験



図1. 【DVD版】『心筋細胞フィジオーム理解のための電子教科書“e-Heart”』の表紙

著者一覧：

野間 昭典（立命館大学バイオシミュレーション研究センター）
 天野 晃（立命館大学生命科学部生命情報学科）
 竹内 綾子（福井大学医学部医学科）
 竹田 有加里（立命館大学生命科学部生命情報学科）
 車 采映（立命館大学バイオシミュレーション研究センター）
 姫野 友紀子（立命館大学生命科学部生命情報学科）
 松岡 達（福井大学医学部医学科）
 吉元 英一（株式会社知能情報システム）
 Trevor Powell (Department of Pharmacology, University of Oxford)

をバーチャルに行う。第9、10回で用いるのは細胞モデルを連結して興奮伝播を計算させるモデルである。第11、12回ではイオントランスポーター(Na/K pump, Na/Ca exchanger)モデルの振る舞いを観察し、第13回以降は細胞内の各機能要素を切り出したモデルで、機能の背景にあるメカニズムを理解する。【付録】にはVBを使って生体機能シミュレーションをスムーズに行えるよう準備されているツールについて、説明してある。

■実習課題セット目次

- 第1回 概論
- 第2回 VBグラフィックス
- 第3-5回 細胞膜興奮の解説 瞬時平衡電位
- 第3回 電気回路と水柱モデル
- 第4回 電気回路コンダクタンス自動制御
- 第5回 電気回路イオンチャンネル
- 第6回 単一Kチャンネル
- 第7回 単一Caチャンネル
- 第8回 全細胞膜電位固定実験
- 第9回 ケーブルモデル
- 第10回 Re-entry 不整脈
- 第11回 NaKポンプ
- 第12回 NaCa交換
- 第13回 細胞内イオン濃度調節

- 第14回 細胞容積調節
- 第15回 筋収縮
- 第16回 筋収縮ステップ実験
- 第17回 酵素反応
- 第18回 酵素反応生涯
- 第19回 ミトコンドリアと細胞エネルギー代謝
- 第20回 TCAサイクル
- 【付録】VBによる数値計算の基礎

2. HuVEC モデルプログラムを実行する

Visual Basic (VB) のインストール

e-Heart 教材の中のモデルプログラムを実行し、また実際にプログラムにアクセスしてコードを改編するには、オペレーティングシステム Windows 7/8/8.1/10、開発環境 Microsoft Visual Studio 2010, 2012, 2013, 2015 上でVBが動作していることが必須要件である(Microsoft Visual Studio はマイクロソフトから無償でダウンロードできる)。なお、Mac 環境では作動しないため、ご注意ください。

Visual Studio で HuVEC モデルプログラムを実行する

今回の解説で使用するモデルは、電子教科書 e-Heart の「第1回概論」に収められている HuVEC

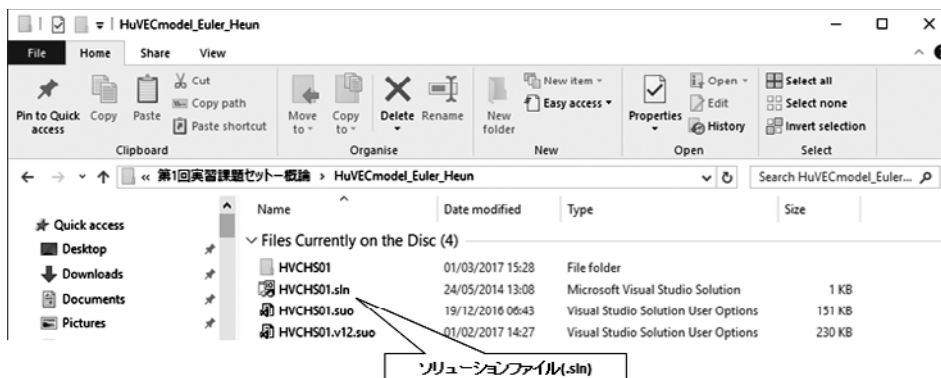


図 2. プログラムフォルダの中のソリューションファイル

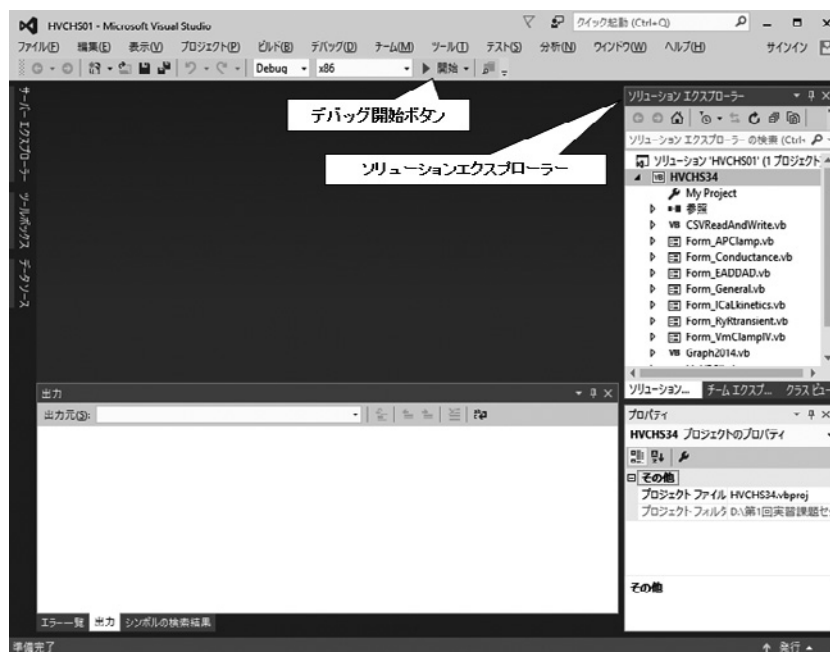


図 3. HuVEC モデルのソリューションファイルをダブルクリックで開き、Visual Studio を起動した時の画面

モデルである。第 1 回概論のフォルダの中の [HuVECMODEL_Euler_Heun] プログラムフォルダをダブルクリックで開くと、エクスプローラーで図 2 のようなファイルの一覧が表示される。

DVD 版の電子教科書 e-Heart を手元にお持ちでない場合には、e-Heart ホームページのダウンロードサイトより最新版の HuVEC のプログラム

を入手されたい (http://www.eheartsim.com/?page_id=30)。ホームページよりダウンロードしたファイルは、圧縮された zip ファイルの状態ではダウンロードフォルダに保存される。プログラムを実行する前に右クリック→[すべて展開]で、展開したファイルの保存先を選択し、保存しておく。展開したファイルをダブルクリックで開

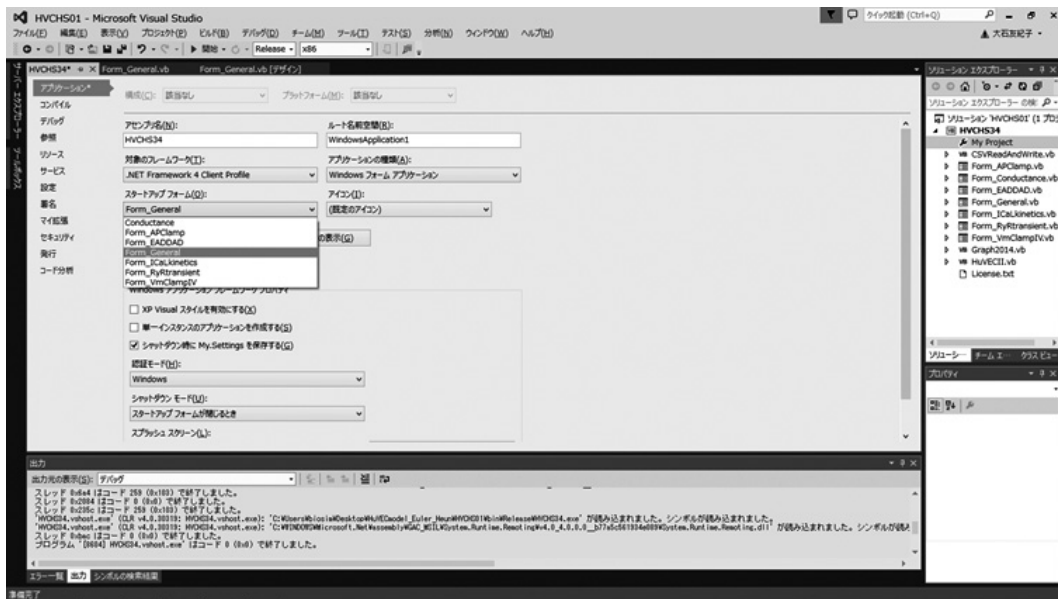


図4. My Project のアプリケーションの中でスタートアップフォームを選択する

くと、DVD 版の HuVEC モデルと同様に図 2 のようなファイルの一覧が表示される。一覧の中にソリューションファイル（ファイル名拡張子は、.sln）があるので、それをダブルクリックして Visual Studio を起動する（図 3）。

VB の編集画面で図 3 に示すデバッグ [開始] ボタンを押すとシミュレーターの実行画面が現れる。実行するシミュレーションプロトコルは、こちらも図 3 に示すソリューションエクスプローラーに表示されている各 Form の中で定義されている。ソリューションエクスプローラーで Form ファイルをダブルクリックして画面のデザインを表示させると画面上でそのまま編集ができ、また Form ファイルを選択した状態で [表示] タブの [コード] を選択すると Form のプログラムコードが表示されて編集できるようになる。デバッグ [開始] ボタンで実行する Form は、図 4 に示すようにソリューションエクスプローラーの中の [My Project] をダブルクリックして、[アプリケーション] の [スタートアップフォーム] のプルダウンリストの中から選択できる。

例えば、図 4 のようにスタートアップフォーム

で [Form_General] を選択し、図 3 で示したデバッグ [開始] ボタンを押すと、図 5 に示す Form_General の実行画面が表示される。

実行画面左側の [Simulation] グループボックスのテキストボックスにはシミュレーションを実行するために必要な条件がデフォルトで入力されている。[EAD/DAD] グループボックスのテキストボックスでは、早期後脱分極 (EAD) や遅延後脱分極 (DAD) の発生に関わる可能性がある変数を自由に変更できるようになっている。[Result] グループボックスのテキストボックスには、シミュレーション結果が示されている。ここで、いろいろな値を入力し、波形の変化や、Result に示される値の変化を観察してみることができる。各テキストボックスの詳細な定義については、Form_General.vb のプログラムコードに記載されているので、必要に応じて参照されたい。

3. HuVEC モデルの構成

HuVEC モデルのプログラムを実行できたところで、一度 HuVEC モデルの構成要素を確認しておきたい。図 6 に概略図を示してある。細胞内イ

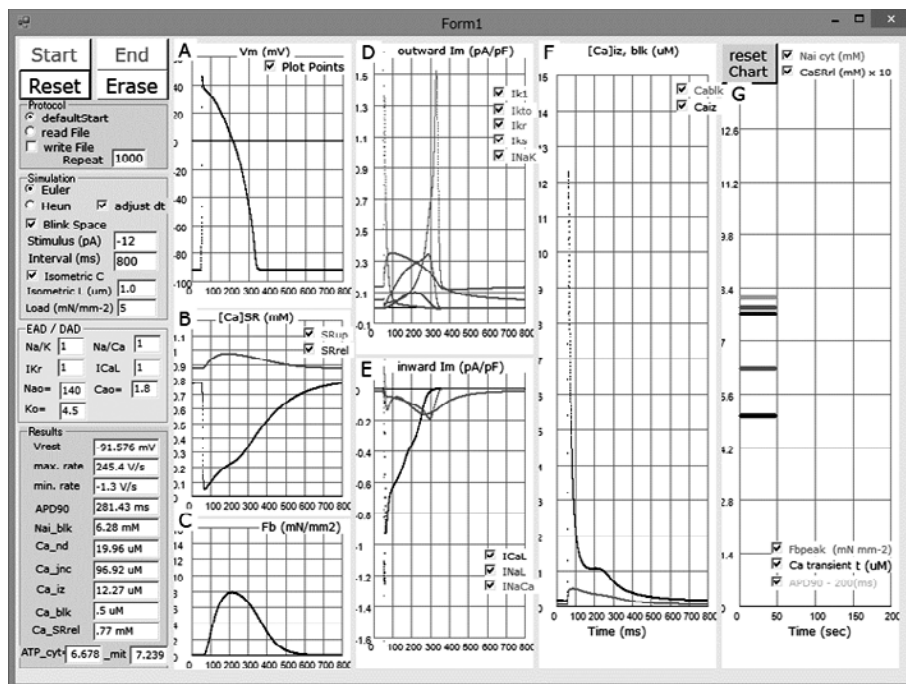


図5. Form_Generalの実行画面

A: 膜電位, B: 筋小胞体 (SR) Ca^{2+} 取り込みサイト (SRup) と放出サイト (SRrel) の Ca^{2+} 濃度, C: 細胞収縮力, D: 外向き電流, E: 内向き電流, F: 細胞内 Ca^{2+} 濃度, G: 細胞内 Na^{+} 濃度, SRrel の Ca^{2+} 濃度, 細胞の発生張力のピーク値, 一過性の Ca^{2+} 濃度変化のピーク値, (APD90-200 ms) の値の200秒間の時間経過. ここでは, 各パネルのすべてのチェックボックスにチェックを入れて, すべての点のプロットを表示させてある.

オン濃度は, Ca^{2+} , Na^{+} , K^{+} について計算しており, そのうち Ca^{2+} 濃度についてのみ細胞内を3つの分画に分けて詳細に局所濃度を計算できるようにしてある. 筋小胞体 (SR) 内の Ca^{2+} 濃度も放出サイト (SR releasing site, SRrel) と取り込みサイト (SR uptake site, SRup) の2つのコンパートメントに分けられており, Ca^{2+} はコンパートメント間を濃度差で駆動される拡散によって移動するようモデル化されている. 細胞膜を介した電流系はチャンネルとトランスポーターを合わせて計14種類, それに電気刺激を与えるために K^{+} イオンによって電荷を運ぶ注入電流 (I_{inject}) が加えられている. T管膜上には I_{CaL} と NCX が存在し, そのうち Intermediate zone (iz) には I_{CaL} と NCX が, Junction space (jnc) には I_{CaL} のみが分布している. Nanodomain では, I_{CaL} と向かい合わせに SRrel

のリアノジン受容体チャンネル (RyRs) が位置している. SERCA は ATP の加水分解エネルギーを用いて細胞質内 Ca^{2+} を SRup 内へと取り込む. 収縮タンパクによる収縮力の発生や, ミトコンドリアによるエネルギー代謝も, イオン電流や膜電位と同時に計算されている.

4. HuVEC モデルの振る舞いを観察する (Form_General.vb)

HuVEC モデルの構成要素の概要が掴めたところで, 今度は HuVEC モデルを使って様々なシミュレーション実験を行う. Form_General.vb のデバッグを開始すると表示される実行画面のうち, 左側にある [EAD/DAD] グループボックスの I_{NaK} , I_{NaCa} , I_{Kr} , I_{CaL} の各テキストボックスには, デフォルトで1という値が入っている. これは各

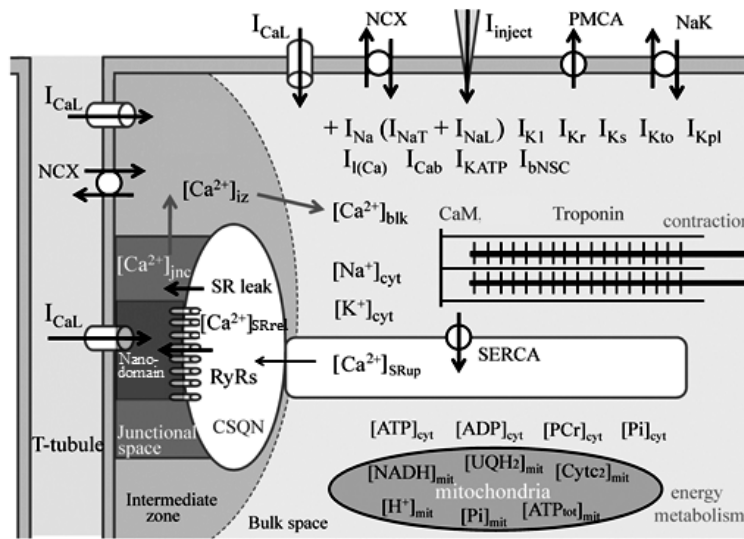


図 6. HuVEC モデルの概略図

I_{CaL} : L 型 Ca^{2+} チャンネル電流, I_{Na} : Na^+ チャンネル電流 (I_{NaT} : 一過性 Na^+ チャンネル電流, I_{NaL} : 遅延性 Na^+ チャンネル電流), I_{K1} : 内向き整流性 K^+ チャンネル電流, I_{Kr} : 遅延整流性 K^+ チャンネル電流の速い成分, I_{Ks} : 遅延整流性 K^+ チャンネル電流の遅い成分, I_{Kto} : 一過性外向き K^+ チャンネル電流, I_{Kpl} : プラトー相 K^+ チャンネル電流, $I_{l(Ca)}$: Ca^{2+} 依存性非選択性陽イオンリーク電流, I_{Cab} : 背景 Ca^{2+} 電流, I_{KATP} : ATP 依存性 K^+ チャンネル電流, I_{bNSC} : 背景非選択性陽イオン電流, NCX: Na^+/Ca^{2+} 交換機転, NaK: Na^+/K^+ ポンプ, PMCA: 形質膜 Ca^{2+} ポンプ, RyRs: リアノジン受容体チャンネル, SERCA: 筋小胞体 Ca^{2+} ポンプ, I_{inject} : 注入電流, $[Ca^{2+}]_{jnc, iz, blk, SRrel, SRup}$: Junction space, Intermediate zone, Bulk space, SRrel, SRup の Ca^{2+} 濃度, $[X]_{cyt}$: 細胞内 X 濃度, $[X]_{mit}$: ミトコンドリア内 X 濃度, CaM: カルモジュリン.

電流の振幅のスケーリングファクターであり、この値を変更することで各電流の大きさを自由に変更することができる。また、 Nao , $Ca0$, Ko の各テキストボックスには、外液イオン濃度が入力されている。これらの値を変更することで、外液イオン濃度を自由に変更してシミュレーションを実行することができる。

イオントランスポーター電流の大きさを変更する

I_{NaK} は ATP の加水分解エネルギーを使って、細胞内外の Na^+ と K^+ を各々の濃度勾配に逆らって交換する能動輸送を行う。 I_{NaK} のスケーリングファクターを 0 にすると、外向き電流成分が減少するために 90% 再分極時点での活動電位持続時間

(APD90) は延長し (APD90 の値は、[Results] グループボックス内に表示)、細胞内 Na^+ 濃度が上昇する。その結果、細胞内外のイオン濃度差を利用して受動輸送を行う I_{NaCa} の駆動力である細胞内外の Na^+ の濃度勾配が小さくなることで、細胞内 Ca^{2+} の細胞外への排出が抑制され、細胞内への Ca^{2+} 蓄積が進行する (細胞内 Ca^{2+} 蓄積や APD90 増加の時間経過は、パネル G で確認できる)。

I_{NaCa} のスケーリングファクターを 1 から少しずつ小さくしていくと、細胞内 Ca^{2+} の細胞外への排出効率が悪くなるため、次第に細胞内に Ca^{2+} が蓄積していく様子が観察される。そしてある閾値を超えると、定常状態に達する前にシミュレーションの計算が破綻してしまう。一見これはシミュ

レーターの不具合のようにも見えるが、実は生体内でも過度な Ca^{2+} 過負荷は心臓の拘縮を起こしてしまいポンプ機能を維持できなくなる、ある意味での生体機能の“破綻”が起こり得ると言える。実際の実験でも心臓特異的に NCX をノックアウトしたマウスは成体になるまで生存可能であるが、その心臓では NCX ノックアウトの代償として致命的な Ca^{2+} 過負荷を緩和するために I_{Cal} の発現量が 50% 程度低下していることが明らかになっている [2]。NCX ノックアウトと細胞内 Ca^{2+} 濃度についての細胞内イオンメカニズムについては、2006~7 年当時の京都大学グループ(野間教授ら)とオックスフォード大学グループ(Noble 教授ら)の共同でシミュレーションを使った詳細な検討もなされており、これは実験結果とシミュレーション結果が見事に一致した好例であった [3, 4]。

イオンチャネル電流の大きさを変更する

I_{Kr} のスケールリングファクターを 1 から 0 に変更すると、外向き電流系が示されているパネル D の青色でプロットされていた I_{Kr} が 0 になり、APD が延長する。

また、 I_{Cal} のスケールリングファクターを 0 にすると、大きな内向き電流がなくなるために、膜電位を脱分極させる効果が弱まるので再分極が早まり、活動電位持続時間 APD90 が短くなる。また、細胞内に流入してくる Ca^{2+} 量が激減し、SR 内に溜められる Ca^{2+} 量も十数%まで低下しており、収縮を引き起こすことができるだけの細胞内 Ca^{2+} 濃度変化が観察されなくなったことがわかる。(※この I_{Cal} をスケールリングさせるシミュレーションは、DVD 版 e-Heart の HuVEC ではそのまま実行できないので、e-Heart の HP よりダウンロードした最新版 HuVEC モデルを使用、もしくは [補足] を参照のうえコードを修正いただきたい)

外液イオン濃度を変更する

外液に含まれる Na^+ 、 Ca^{2+} 、 K^+ の濃度 (Na_o 、 Ca_o 、 K_o) を自由に変更することができるので、興味に応じて濃度を増減させ、予測されるような反応が見られるかどうかシミュレーションしてみる。例えば、 $[\text{Na}]_o$ 変化は活動電位の立ち上がり速度を決めるのに重要であり、 $[\text{Ca}]_o$ 変化は細胞

内 Ca^{2+} 濃度に大きく影響する。また、 $[\text{K}]_o$ 変化は静止膜電位を決定するのに非常に重要である。いろいろな条件を与えてみて、モデルの反応を観察されたい。

おわりに

本稿では、電子教科書 e-Heart の趣旨や目的を説明し、そのうちの第 1 回実習課題である概論で扱う包括的ヒト心室筋細胞モデル (HuVEC モデル) を使ってシミュレーターの基本的な使い方を解説した。HuVEC モデルは、我々が現在保有しているシミュレーター教材の中で最も複雑で大規模なモデルであり、電子教科書 e-Heart の中では教材全体を通しての到達目標を掲げるといって概論に位置づけてある。実際には出版された電子教科書 e-Heart には、本稿の第 1 部でも紹介したように初学者向けのシミュレーター教材が多数収められている。初めて生理学に触れる学部生にも抵抗なく受け入れられるような単純モデルから始まる流れになっており、それぞれの課題はシミュレーターと実習テキストがセットになった形で準備されている。学生に対する講義や実習等では、それらが有用であろう。また、シミュレーターのプログラムコードは自由に改編できるようになっているため、単純モデルをベースに研究を展開させていくという可能性もあり得るかもしれない。一方、HuVEC モデルのように既に研究のための使用に耐えうるであろう詳細なモデルも収められているので、コードで定義されたプロトコルを自らの研究で扱うテーマに沿った実験へと改編してシミュレーション実験を行うというようなことも可能であろう。そのように、e-Heart に収められているシミュレーターを、ユーザーの用途に合わせて自由に活用していただけることが著者一同の願いであり、今後の e-Heart の発展にもつながってくるだろうと期待するところである。我々の手元にある e-Heart 教材はまだまだ発展段階にあり、不十分な点も多く、プログラムの不具合も残っている。ユーザーからのコメントや感想、質問・疑問点やご指摘等をもとに、今後も更なる改善、拡張を続けていきたい所存であり、読者の皆様にも

```

***** whole cell ICaL_jnc via RyR *****
perNa_ICaL = ratioNa * PCaL
perK_ICaL = ratioK * PCaL
ICaLCa_LR = Fraction * PCaL * GHKCa_LR * Yooo * ATPfactor * scaleICaL
ICaLCa_L0 = Fraction * PCaL * GHKCa_L0 * Yooc * ATPfactor * scaleICaL

ICaLNa = Fraction * perNa_ICaL * ghkNa * po_LCC * ATPfactor * scaleICaL
ICaLK = Fraction * perK_ICaL * ghkK * po_LCC * ATPfactor * scaleICaL

```

補足図 1

```

Public Sub CaNanoDomain(ByVal v As Double) 'Calculate [Ca]nd with or without the blink space
  If v > -0.00001 And v <= 0 Then
    v = -0.00001
  ElseIf v < 0.00001 And v > 0 Then
    v = 0.00001
  End If

  Dim expF As Double = Math.Exp(-v / RTF2)

  If scaleICaL = 0 Then
    JLCC = 0
  Else
    JLCC = 0.000913
  End If

```

補足図 2

ご協力を賜ることができたら幸甚である。

[補足] DVD 版の HuVEC で I_{CaL} を 0 にするシミュレーションを実行するためには、コードに修正を加えて Nanodomain での I_{CaL} ブロックを実装する必要がある。

ソリューションエクスプローラーで [HuVECII] 中のコードを開くと、LCC と RyR で構成される Ca 放出ユニットに因んで [CaRU] と名付けられた Sub メソッドがある。そのメソッドの中で、Nanodomain の LCC によって運ばれる電流 I_{CaL} の大きさと、流入した Ca^{2+} によって決まる Nanodomain の Ca^{2+} 濃度が計算されている。 I_{CaL} にスケーリングファクターをかけることで電流サイズのスケーリングを実現できるようになるので、メソッド中の電流 I_{CaL} の大きさを計算する式にスケーリングファクターの効果を補足図 1 (四角で囲った部分) のように追加する。

さらに、Nanodomain の Ca^{2+} 濃度を計算する部分では、 I_{CaL} が完全にブロックされた場合に 0 にな

るよう、補足図 2 (四角で囲った部分) のように条件を追加する。なお、Nanodomain の Ca^{2+} 濃度は、LCC が開いているか閉じているかの ON/OFF 制御で決まっているため、スケーリングファクターをかけるのではなく条件文で記述することに留意。

文 献

1. Himeno Y, Asakura K, Cha CY, Memida H, Powell T, Amano A & Noma A: A human ventricular myocyte model with a refined representation of excitation-contraction coupling. *Biophys J* **21**: 415-427, 2015
2. Henderson SA, Goldhaber JI, So JM, Han T, Motter C, Ngo A, Chantawansri C, Ritter MR, Friedlander M, Nicoll DA, Frank JS, Jordan MC, Roos KP, Ross RS & Philipson KD: Functional adult myocardium in the absence of Na^+ - Ca^{2+} exchange: cardiac-specific knockout of NCX1. *Circ Res* **95**: 604-611, 2004
3. Sarai N, Kobayashi T, Matsuoka S & Noma A: A simulation study to rescue the Na^+ / Ca^{2+} exchanger knockout mice. *J Physiol Sci* **56**: 211-217, 2006

4. Noble D, Sarai N, Noble PJ, Kobayashi T, Matsuoka S & Noma A: Resistance of cardiac cells to NCX knock-

out: a model study. *Ann N Y Acad Sci* **1099**: 306-309, 2007

「教育のページ」は学部学生，大学院生，ポスドク，教員などを対象に，生理学教育に関する取り組みや意見を紹介することを目的としています．原稿は Web（日本生理学会ホームページ）上にも掲載されます．皆様のご投稿をお待ちしています．投稿規程は http://physiology.jp/magazine/contribution_rule/ をご参照ください．