

低酸素状態再現のために解糖系を導入した心筋細胞モデルの構築

天野 晃^{†a)} 富田 幸子^{††} 松岡 達^{†††} 嶋吉 隆夫^{††††}
陸 健銀^{†††††} 松田 哲也^{††}

Construction of Myocardial Cell Model Including Glycolysis Model
for Reproducing Hypoxic Reaction

Akira AMANO^{†a)}, Sachiko TOMITA^{††}, Satoshi MATSUOKA^{†††},
Takao SHIMAYOSHI^{†††††}, Jianyin LU^{†††††}, and Tetsuya MATSUDA^{††}

あらまし 心臓は非常に多くのエネルギーを消費して血液を拍出しており、心筋細胞におけるエネルギー代謝と、心筋細胞の興奮収縮連関の関連性の解明は、病態解明等のために重要なテーマである。特に虚血性心疾患は、細胞への酸素供給低下により、細胞に異常を来す疾病であり、このような疾病における心機能の低下は、第1に酸素濃度の低下によって生じるエネルギーバランスの不均衡が原因と考えられている。虚血時の心機能の低下の主たる原因である低酸素に対する心筋細胞の応答を再現するためには、低酸素状態で活性化される解糖系が重要である。しかしながら、現在提案されている心筋細胞モデルは、解糖系が導入されていないために、低酸素状態の再現性に問題がある。本研究では、低酸素に対する心筋細胞の応答を再現するために、モルモットの心筋細胞モデルである Kyoto model に解糖系を導入した新たな心筋細胞モデルを構築した。構築したモデルを用いて、動物実験の実験条件に従ったシミュレーションを行い、非ベータリング状態の心筋細胞における低酸素に対する応答の再現を試みた。再現結果は、対応する動物実験結果の傾向と高い類似性を示した。

キーワード 生体機能シミュレーション、心筋細胞モデル、低酸素反応、解糖系、ミトコンドリア

1. ま え が き

心臓は、全身に血液を拍出するため多大なエネルギーを消費する臓器であり、心筋細胞の収縮能は、アデノシン三リン酸 (ATP) の濃度に絶対的に依存する。心臓の機能理解には、心筋細胞における ATP の産生と消費機構の解明が必須である。

低酸素や虚血性心疾患は、細胞への酸素供給低下

により、細胞に異常を来す疾病である。心筋では、正常時、ATP の大部分はミトコンドリアで合成される。細胞への酸素供給の低下は、酸素を必要とするミトコンドリアにおける ATP 産生の低下をもたらす。代わりに解糖系において、酸素を必要としない嫌氣的解糖作用による ATP 産生の増加を引き起こす。しかしながら、好氣的状態時の ATP 産生量に比べ、解糖系の ATP 産生量は絶対的に劣るため、細胞内のエネルギーバランスに不均衡が生じ、心臓ポンプ機能に支障を来す。したがって、低酸素や虚血性心疾患の病態をモデル上で再現するために、低酸素に対する心筋細胞の応答を再現することが非常に重要である。現在提案されている心筋細胞モデルには、ミトコンドリアモデルが導入されているものも存在するため、十分な酸素が存在している好氣的状態はモデルによる再現が可能である。しかしながら、解糖系が導入されているモデルは提案されていないため、嫌氣的状態の再現性には問題がある。

本研究では、低酸素の状態を再現するため、従来の心筋細胞モデルに解糖系を導入した心筋細胞モデルを

[†] 立命館大学生命科学部, 草津市
Ritsumeikan University, College of Life Sciences, Kusatsu-shi, 525-8577 Japan

^{††} 京都大学大学院情報学研究所, 京都市
Kyoto University, Graduate School of Informatics, Kyoto-shi, 606-8501 Japan

^{†††} 京都大学大学院医学研究科, 京都市
Kyoto University, Graduate School of Medicine, Kyoto-shi, 606-8501 Japan

^{††††} 財団法人京都高度技術研究所, 京都市
ASTEM Research Institute of Kyoto, Kyoto-shi, 600-8013 Japan

^{†††††} 京都大学細胞・生体シミュレーションプロジェクト, 京都市
Kyoto University, Cell/Biodynamics Simulation Project, Kyoto-shi, 606-8501 Japan

a) E-mail: a-amano@fc.ritsumeikan.ac.jp

構築する。

2. 背景

2.1 心筋内のエネルギー

心臓では、ATP、クレアチンリン酸 (PCr) などを ADP、AMP、クレアチン (Cr) 等とリン酸に変換することで、化合物の形で貯蔵されているエネルギーを利用し、ポンプ機能が維持されている。心筋では、通常冠血流によって運搬される多種の物質を摂取して、主にミトコンドリアにおける好氣的代謝によりエネルギーを産生する。具体的には、 β 酸化 (beta oxidation) により血液から供給される脂肪酸 (fatty acid) からアセチル CoA (Acetyl-CoA) を産生し、アセチル CoA やピルビン酸 (pyruvate) を用いてミトコンドリアにおける TCA サイクルにより、NAD から NADH を生成し、酸化的リン酸化反応で酸素と NADH を利用して ADP から ATP を産生する。また、産生された ATP は、心筋細胞内に大量に存在する Cr と結合することで PCr と ADP が生成される。ATP 不足時には PCr と ADP から ATP が産生されるので、PCr は ATP のバッファとして機能している。これらの反応と同時に、補助的に解糖系によるエネルギー産生も行われる。解糖の経路は、グルコース (glucose) またはグリコーゲン (glycogen) が、ピルビン酸及び乳酸 (lactate) へ酸化される Embden-Meyerhof 経路である [1] (図 1)。

解糖系には二つの経路があり、酸素が十分供給され

ている状態では、解糖は好氣的経路で行われ、ピルビン酸が終産物となる。ピルビン酸は、ミトコンドリア内でコエンザイム A (CoA-SH) と結合し、TCA 回路に入る。一方、嫌氣的状態では、解糖系における嫌氣的解糖作用で ATP が産生される。心筋エネルギーの約 90 ~ 95% が、ミトコンドリアにおける好氣的代謝により供給される。

低酸素あるいは虚血状態では、細胞内の酸素濃度が低下し、好氣的代謝が低下するが、嫌氣的解糖作用による ATP 産生がこれを補償する。解糖経路には、解糖系の酵素反応に共役して NAD から NADH を産生する反応が一つ含まれている (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)。この反応で生成された NADH は、通常はミトコンドリア内の好氣的反応により NAD に再酸化され、再び解糖反応に用いられる。しかし、嫌氣的状況下では、ミトコンドリアでの再酸化は行われず、細胞質側に蓄積する。NADH の蓄積は、ピルビン酸から乳酸への還元 (lactate dehydrogenase) を活性化させる。これにより、解糖作用に必要な NAD を再生する。その結果、解糖系の終産物は乳酸となり、好氣的状態と比較して大量の乳酸が生成される。

2.2 酸素の欠乏を生じる疾患

日本人の死因の第 2 位は心疾患 [2] であり、その中で大部分を占めるのが、心臓の局所への血流減少により酸素の欠乏 (虚血) が生ずる虚血性心疾患である。虚血心における初期のポンプ機能不全を理解するためには、冠血流が遮断された後の心筋収縮力の急速な低下のメカニズムを明らかにする必要があるが、動物実験等による詳細な計測は困難であり、これを補完するツールとしてシミュレーションモデルを用いた解析が重要視されている。

2.3 従来モデルの問題点

本研究では低酸素状態の再現性が高い心筋細胞モデルの構築を目指す。既存のモデルを組み合わせることで高精度なモデル構築を目指す。基本となる心筋細胞モデルとして Kyoto model [3] を用いる。Kyoto model は、モルモットのイオンチャネルやイオン交換機転などの細胞内機能要素を精密にモデル化した包括的心筋細胞モデルであり、細胞膜電位やイオン濃度変化を高い精度で再現可能である。また、Kyoto model では、酸化的リン酸化反応がモデル化されており、好氣的条件下における心筋細胞のエネルギー産生と消費の関係性を検証することができる。しかしながら、Kyoto model には、解糖系は導入されていないので、

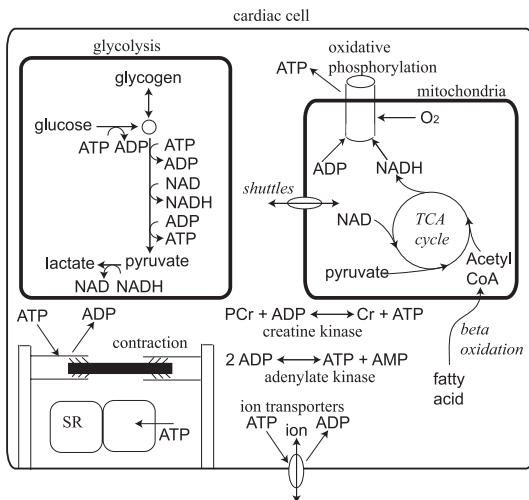


図 1 心筋細胞のエネルギー産生系と消費系

Fig. 1 Energy production and consumption systems in cardiac cell.

低酸素状態のシミュレーションの再現性に問題がある。そこで、本研究では、Kyoto model に、既存の解糖系モデルを組み合わせることにする。

3. 心筋細胞モデルと解糖系モデルの統合

本章では、Kyoto model における ATP 計算と Kyoto model に統合する解糖系モデルについて述べ、Kyoto model と解糖系モデルの統合方法について述べる。

3.1 シミュレーションモデル

3.1.1 心筋細胞モデル Kyoto model

Kyoto model には、ATP 産生系として、ミトコンドリアにおける酸化的リン酸化機構、クレアチンキナーゼ、アデニル酸キナーゼがモデル化されている。また、ATP 消費として、 Na^+/K^+ ポンプ、筋小胞体の Ca^{2+} ポンプ (SERCA)、細胞膜上の Ca^{2+} ポンプ (PMCA)、収縮機構中のミオシンにおける ATP 消費がモデル化されている (図 1)。

クレアチンキナーゼ反応の平衡定数については、文献による報告があるが、速度定数に関する報告はほとんど存在しない。この反応速度は速いことが知られているため、Kyoto model では、平衡定数から速度定数が決定されている [4]。Kyoto model には、Korzeniewskiらの骨格筋酸化的リン酸化モデル [5] を改良したモデルが導入されている [4]。Kyoto model では、骨格筋と心筋のミトコンドリア量の差異を考慮して、NADH 量としてモルモットにおける計測値 [6] を用いることで、ミトコンドリアの体積を 6.7% から 23% に増加させている。なお、Kyoto model では、NADH 産生部分 (TCA 回路) は簡単な数式で記述し、簡単化のために β 酸化とミトコンドリア内外の物質の輸送を行うシャトル系は削除されている。また、Kyoto model では細胞質の総無機リン酸濃度 ($[P_i]_{total}$) は、46.0 (mM) に設定されている。

本研究では、心筋細胞モデルの負荷モデルとして、先行研究において構築した全身循環モデル [7] を導入している。

3.1.2 解糖系モデル Lambeth モデル

Lambeth らによる解糖系モデルは、骨格筋のモデルであり、グリコーゲン (GLY) から乳酸 (LAC) までの既知の代謝経路がすべてモデル化されている [8] (表 1)(図 2)。このモデルでは、代謝産物の濃度変化は、ミカエリス-メンテン式による酵素反応速度を用いた微分方程式で表現されている。

表 1 Lambeth モデルに含まれる反応過程
Table 1 Reaction processes in Lambeth model.

Glycogen Phosphorylase (GP) $GLY_n + P_i \leftrightarrow GLY_{n-1} + G1P$ グリコーゲン (GLY) がグルコース 1-リン酸 (G1P) に分解
Phosphoglucomutase (PGLM) $G1P \leftrightarrow G6P$ G1P がグルコース 6-リン酸 (G6P) に転換
Phosphoglucoisomerase (PGI) $G6P \leftrightarrow F6P$ G6P がフルクトース 6-リン酸 (F6P) に転換
Phosphofructokinase (PFK) $F6P + ATP \leftrightarrow FBP + ADP$ F6P は、ATP によるリン酸化を受け、フルクトース 1, 6-ビスリン酸 (FBP) に変換される。この過程は、高エネルギー及び低エネルギーリン酸化化合物の影響を受ける。高エネルギーリン酸化化合物は抑制的に、また、低エネルギーリン酸化化合物は促進的に作用する。
Aldolase (ALD)・Triose Phosphate Isomerase (TPI) $FBP \leftrightarrow GAP + DHAP$ FBP がグリセルアルデヒド 3-リン酸 (GAP) とデヒドロキシアセトンリン酸 (DHAP) に変換 $GAP \leftrightarrow DHAP$ GAP と DHAP は相互に変換
Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (GAPDH) $GAP + NAD + P_i \leftrightarrow 13BPG + NADH$ GAP は NAD による酸化により、1, 3-ジホスホグリセリン酸 (13BPG) に変換
Phosphoglycerate Kinase (PGK) $13BPG + ADP \leftrightarrow 3PG + ATP$ 13BPG に貯蔵されたエネルギーは、ADP との反応により ATP として捕そくされ、3-ホスホグリセリン酸 (3PG) が残置
Phosphoglyceromutase (PGM)・Enolase (EN) $3PG \leftrightarrow 2PG$ 3PG は 2-ホスホグリセリン酸 (2PG) に転換 $2PG \leftrightarrow PEP$ 2PG はホスホエノールピルビン酸 (PEP) に転換
Pyruvate Kinase (PK) $PEP + ADP \leftrightarrow PYR + ATP$ PEP の高エネルギーリン酸が ADP へ転移され、ピルビン酸 (PYR) が残置
Lactate Dehydrogenase (LDH) $PYR + NADH \leftrightarrow LAC + NAD$ PYR は、NADH を共役物質とした反応により乳酸 (LAC) に還元

3.1.3 ヘキソキナーゼ (Hexokinase) モデル Lueck モデル

Hexokinase は、ATP 1 分子を消費して、グルコース (GLU) 1 分子をグルコース 6-リン酸 (G6P) へと変換する過程である。Lambeth らの解糖系モデルには、この反応が含まれていないので、ミカエリス-メンテン式による酵素反応として簡略化されたモデルである Lueck らのモデル [9] を用いた (図 3)。

3.2 Kyoto model との統合

本研究では、Lambeth らの解糖系モデルと Hexok-

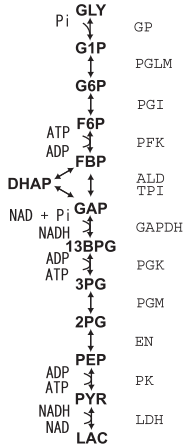


図 2 Lambeth らの解糖系モデル [8]
Fig.2 Lambeth model [8].



図 3 Lueck らの Hexokinase モデル [9]
Fig.3 Lueck model [9].

inase モデルとを統合した解糖系モデルを作成し、これを Kyoto model に統合した。ここでは、このモデルを解糖系統合モデルと呼ぶ。本モデルでは、図 1 に示した ATP 産生に關する主要な細胞内機能要素の中で、TCA サイクル、ミトコンドリアのシャトル系、脂肪酸の β 酸化は含まれていない。TCA サイクルは簡易モデルとして実装されているが、シャトル系、 β 酸化については Anoxia における機能は限定的であるので、本モデルでは省略した。

統合にあたっては、まず共通物質の扱い、総量や比率の検討を行った(表 2)。次に動物実験結果との整合性をとるため、ATP 濃度に直接関係する、三つのモデルのバランスを決める係数と、ATP バッファであるクレアチンの反応速度、Anoxia における解糖系へのエネルギー物質供給源となるグリコーゲンの蓄積量のバランスを調整した(表 3)。

3.2.1 Lambeth らのモデルと Lueck らのモデルの統合

Lambeth らのモデルと Lueck らのモデルでは、G6P, ATP, ADP が共通するパラメータである。二つのモデル間で、共通するパラメータを統一することでモデルの統合が可能となる。

3.2.2 Kyoto model と解糖系モデルの共通物質の統合

Kyoto model と解糖系モデルでは、細胞質の ATP,

表 2 各モデルに用いられている物質濃度パラメータ
Table 2 Substrate concentration parameters in each model.

Metabolite	解糖系モデル (細胞質)	Kyoto model
GLU		
GLY		
G1P		
G6P		
F6P		
FBP		
HAP		
GAP		
13BPG		
3PG		
2PG		
PEP		
PYR		
LAC		
NAD+NADH		(mitochondria)
Pi		(cell/mitochondria)
ATP		(cell/mitochondria)
ADP		(cell/mitochondria)
AMP		(cell)

: モデルに存在するパラメータ,
: 総無機リン酸量に影響を与えるパラメータ

表 3 モデル間のバランスを調整するパラメータ
Table 3 Parameters for adjusting balances among elementary models.

解糖系の速度パラメータ (k)	値	0.05
決定法	骨格筋と心筋の好氣的代謝と嫌氣的代謝の比率及びミトコンドリア体積比	
ヘキソキナーゼの速度パラメータ (k')	値	0.05
決定法	骨格筋と心筋の好氣的代謝と嫌氣的代謝の比率及びミトコンドリア体積比	
グリコーゲン濃度	値	21 mM
決定法	文献及びモデルフィット [11], [12]	
クレアチンキナーゼの速度定数 (Cr + P PCr) (k_{fCK})	値	8.025×10^{-2}
決定法	モデルフィット	
クレアチンキナーゼの速度定数 (Cr + P PCr) (k_{bCK})	値	4.835×10^{-8}
決定法	モデルフィット	

ADP, AMP の濃度、リン酸及び NADH と NAD の総和が共通のパラメータである。これらのパラメータを Kyoto model と解糖系モデルにおいて、統一することにより解糖系モデルの Kyoto model への統合が可能となる。また、統合に際して、統合モデルにおけるリン酸と NADH, NAD の総量は、両モデルの物質量の和とする。表 2 に解糖系モデルのパラメータと、

Kyoto model のパラメータの関係を示す．

Kyoto model では、ATP、ADP とリン酸は細胞質とミトコンドリアで独立に定義されている．解糖系は細胞質中に存在するため、Kyoto model の細胞質側の ATP、ADP、リン酸と、解糖系モデルの ATP、ADP、リン酸は共通であるとした．また、AMP は Kyoto model では、細胞質においてのみ定義されており、これは解糖系モデルにおける AMP と共通とした．

Kyoto model において、細胞質のリン酸は、総無機リン酸量と、細胞質、ミトコンドリア中に存在するリン酸化合物の量から求められている．表 2 において、により記した物質は、解糖系におけるリン酸化合物であり、これらのリン酸化合物も総無機リン酸の要素として考慮しなければならない．解糖系全体におけるリン酸化合物の量は、式 (1) で表される．

$$P_{glycolytic} = G1P + G6P + F6P + 2 \cdot FBP \\ + DHAP + GAP + 2 \cdot 13BPG \\ + 3PG + 2PG + PEP \quad (1)$$

Kyoto model では、細胞全体における総無機リン酸量は 46.0 (mM) と設定されているが、式 (1) によって求められる解糖系のリン酸化合物量に基づいて、Kyoto model における総無機リン酸量を 47.2946 (mM) に変更した．

なお、表 2 において NAD と NADH も Kyoto model と解糖系モデルに共通するパラメータである．しかし、これらの濃度は、解糖系モデルでは細胞質における濃度であるのに対し、Kyoto model ではミトコンドリアにおける濃度である．通常、細胞質とミトコンドリアにおける NAD と NADH は、リンゴ酸シャトルと呼ばれる輸送系を介して交換輸送が行われる．したがって、細胞質とミトコンドリアにおいて、NAD と NADH の濃度の和は、それぞれ一定の値をとる．Kyoto model におけるミトコンドリアの NAD と NADH 濃度は、二つの物質の濃度の和が一定であるという条件のもとに計算されている．また、NAD と NADH は、解糖系の反応の中で GAPDH や LDH などの酵素により酸化、あるいは、還元される物質であり、解糖系における ATP 産生の過程で欠かすことのできない重要な物質である．

Jo らの実験結果によると、ミトコンドリアと細胞質側の NADH 濃度の比は 4~5 : 1 と報告されている [6]．この結果に基づいて、細胞質側における NAD と NADH 濃度の総和は、ミトコンドリアの 1/5 と

した．

なお、本研究では、低酸素状態の再現を目的としているが、リンゴ酸シャトルは、酸素濃度の影響を受ける機構であり、酸素濃度の低下とともに働きは抑制され最終的に停止する．したがって本研究で取り扱う低酸素状態では、リンゴ酸シャトルの働きは無視できるとし、本モデルでは、リンゴ酸シャトルは省略した．

3.2.3 解糖系速度調節パラメータ

骨格筋は、解糖系に依存する組織であり、心筋はミトコンドリアに依存する組織であるので、骨格筋に基づく Lambeth らのモデルの ATP 産生速度は、心筋の解糖系の速度より速いことが予想される．そこで、Lambeth らのモデル及び、Lueck らのモデルについて、それぞれの反応速度に係数 k 、 k' を乗ずることにより、骨格筋と心筋の差を表すこととし、骨格筋と心筋の代謝比率、ミトコンドリア体積比を用いて比率を推定した．この比率を用いて、統合モデルにおける ATP、PCr の時間変化の再現性を確認した．

骨格筋における嫌氣的代謝と好氣的代謝の比率は $r_s = 7 \sim 10$ と報告 [10] されており、心筋と骨格筋のミトコンドリア体積比は前述のとおり $v_r = 3 \sim 5$ 倍とされている．心筋における嫌氣的代謝と好氣的代謝の比率は $r_c = 1/10 \sim 1/20$ とされているので、心筋と骨格筋の解糖系の速度比は $r_s \times r_c / v_r = 1/3 \sim 1/20$ 程度と予想される．本研究では、 k 、 k' の値として、それぞれ 0.05 を用いた．

まず、グリコーゲンから乳酸までの ATP の産生部分に該当する Lambeth らのモデルの反応速度の妥当性を確認するため、構築したシミュレーションモデルにおいて、 k の値を変更したときの ATP、PCr 濃度の時間変化を調べた．Lambeth らのモデルは、代謝経路の途中に Hexokinase により生成される物質があるので、グルコースの影響を排除するため、グルコース濃度は 0 とした．解糖系の速度調節パラメータ k を変更したときの ATP と PCr の時間変化を図 4 (a), (b) に示す．

シミュレーションの結果、 k の値が高いほど、ATP が枯渇するまでの時間は短縮した．また、 k が 1.0, 0.25, 0.1 の場合、Anoxia 開始直後、一時的に ATP がやや減少するが、その後、ATP 濃度はわずかに上昇し、ほぼ一定の濃度を維持した後、急激に減少する．特に、 $k = 1.0$ のときは、Anoxia 直後の減少が、ほとんど認められず、Anoxia 開始前の ATP 濃度とほぼ同じ値を維持した．一方、 k の値が低い 0.06, 0.05,

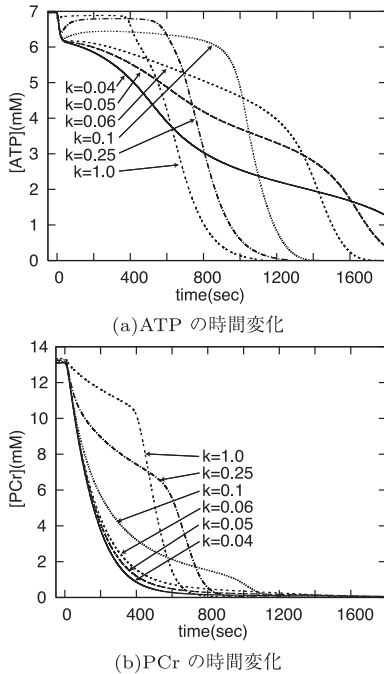


図 4 k が ATP, PCr に与える影響
Fig.4 Effect of k for ATP and PCr.

0.04 の場合には、Anoxia 開始直後に急激に減少した後、減少は緩徐になるものの、一定の値とはならなかった。PCr の時間変化では、 k が 1.0, 0.25 のように高い値の場合、Anoxia 開始直後の PCr 濃度の減少は緩徐であり、その後、減少は急激となる。一方、 k の値が低い場合、PCr は Anoxia 開始直後より急激に減少し、Anoxia 開始後 400 秒には、ほぼ枯渇する結果となった。ATP, PCr の時間変化について、Hearse らによる動物実験の結果 [13] と比較すると、いずれについても $k = 0.05$ を用いた場合に再現性が高い結果となった。

次に Hexokinase 速度の妥当性を確認するため、構築したシミュレーションモデルにおいて、 k' の値を変更したときの ATP, PCr 濃度の時間変化を調べた。

Hexokinase の速度が、他の解糖系の反応に比べて速い場合、Hexokinase は ATP を消費してグルコースをリン酸化するので ATP 消費が増大し、早期に動物実験の結果より低い濃度で安定した後 ATP が枯渇することが確認された。逆に Hexokinase の反応速度が遅い場合、グルコースからグルコース 6-リン酸へのリン酸化が抑制されるため、グルコースから作られる ATP 産生量が減少し、ATP 濃度は、動物実験より低

い値で緩やかに変化した。

提案モデルで利用した Hexokinase と他の解糖系との速度差は動物実験結果を再現するように調整したものであるが、上記の結果から、比較的高い ATP 濃度を一定時間維持する比率になっていると考えられる。

3.2.4 グリコーゲン濃度

血液中から取り込まれたグルコースは、解糖系の代謝過程において、グリコーゲンとして貯えられる。グリコーゲンの蓄積量は組織により異なることが知られており、統合モデルでは、文献より心筋におけるグリコーゲンの蓄積量を推定し、動物実験結果との比較により値を調整した。

心筋におけるグリコーゲン濃度は、骨格筋における濃度の約 1/4 ~ 1/5 とされている [11]。Zhou らは心筋におけるグリコーゲンの濃度を動物実験の値から 33 mM と報告している [12]。骨格筋モデルである Lambeth らのモデルではグリコーゲンの濃度は 112 mM とされているが、本研究では、心筋を対象とした Hearse らの実験結果の濃度変化を再現するために 21 mM とした。この値は、Lyon らの実験結果や、Zhou らの値に近い値である。

構築したシミュレーションモデルにおいてグリコーゲン濃度を変更してシミュレーションを行い、パラメータの妥当性を確認した。前述の解糖系の速度パラメータを用いた場合、Anoxia 開始後、ATP が枯渇するまでに要する時間（以下、枯渇時間）は、グリコーゲン濃度 112 mM の場合、約 120 分 (7200s) であり、グリコーゲン濃度 21 mM の場合、約 30 分 (1800s) となり、用いたパラメータで動物実験に整合する結果が得られた。一方、グリコーゲン濃度は PCr の時間変化にほとんど影響を与えなかった。

3.2.5 クレアチンキナーゼの速度定数

Kyoto model の ATP 産生系には、クレアチンキナーゼ反応のモデルが導入されている。この反応の速度は十分速い反応であると仮定されており、報告されている平衡定数に基づいて値が設定されている。ATP が豊富に存在する環境下ではクレアチンキナーゼ反応の速度は、ATP 濃度変化に大きな影響を与えないため Kyoto model では、平衡定数に基づいて比率のみが調整されており、絶対値としては十分大きな値が使用されている。しかしながら、Anoxia 条件では、クレアチンキナーゼの反応速度は、ATP 濃度変化に大きな影響を与える。クレアチンキナーゼの反応速度は調査した範囲では報告がなかったため、本研究では実

験結果に整合する値として、Kyoto model 文献値の 1/200 とした。

クレアチンキナーゼ速度定数の影響を評価するため、最終的に構築したシミュレーションモデルにおいて、速度定数を変更してシミュレーションを行った。シミュレーションでは、速度定数が小さくなると、PCr の濃度変化が緩徐になり、PCr の枯渇に至るまでの時間が延長することが分かった。また、ATP 濃度は Anoxia 開始直後にわずかながら急激に減少するが、クレアチンキナーゼの速度定数が低いほど、その減少は大きい。その後、ATP 濃度の減少は緩徐となるが、クレアチンキナーゼの速度定数が小さいほど、枯渇に至るまでの間の ATP 濃度が高くなる。ここでは、これらの時間変化が動物実験結果に最も整合する値として文献値の 1/200 を用いた。

4. 実験

4.1 無酸素 (Anoxia) 動物実験

Hearse らは、非ペーシング単離ラット心について、グルコースを含むかん流液を用いた 30 分の Anoxia 実験の結果 (図 5 の) と含まないかん流液を用いた実験の結果 (図 6 の) を報告している [13]。実験では、酸素供給下の 5 分の非ペーシング状態に続いて 15 分のペーシングを行い、続く 30 分間非ペーシング状態で Anoxia とし、その後 20 分間ペーシング状態で再酸素化を行っている。なお、図 5 及び図 6 には、[13] の Fig. 2 における 30 分間の Anoxia 時の ATP、PCr の濃度変化のみを示した。

グルコースを含まないかん流液によりかん流された実験では、30 分の時間経過とともに ATP、PCr 濃度がほぼ 0 となり、エネルギー枯渇が生じている。一方、グルコースを含むかん流液を用いた実験結果では、Anoxia 開始直後に ATP 濃度が一時的に減少するが、その後、ある程度の濃度を維持する。PCr もグルコースを含まないかん流液を用いた結果と比較すると、高い濃度を維持しており、嫌気の状態におけるエネルギー状態の維持にグルコースが重要な物質であることを示唆している。

また、Taylor らは、薬物により解糖系を抑制し、非ペーシングラット心を用いて、Anoxia 実験を行っている [14] (図 7)。この実験では、PCr の枯渇が、ATP の枯渇よりも先行して生じているが、PCr の枯渇後、ATP もわずかに遅れて枯渇するという結果を示している。

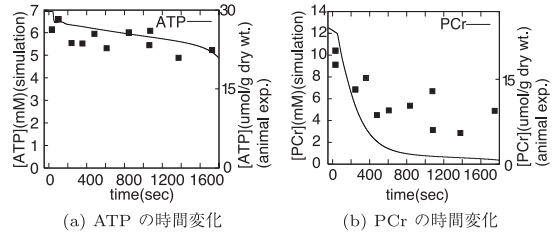


図 5 Hearse らによるグルコースかん流時の Anoxia 実験結果 () [13] と、モデル 3 を用いた解糖系統合モデル (グルコース 11.1 mM) の Anoxia シミュレーションの結果 (実線)

Fig. 5 Animal anoxia experiment with glucose by Hearse et al. [13] () and simulation results of model 3 (glucose 11.1 mM).

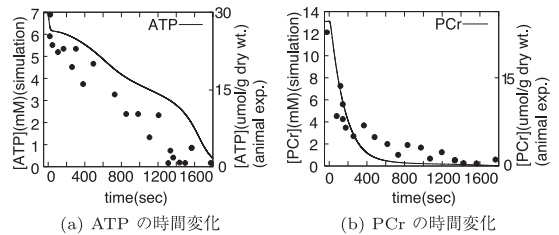


図 6 Hearse らによる解糖系を抑制した Anoxia 実験結果 () [13] と、モデル 2 を用いた解糖系統合モデル (グルコース 0 mM) の Anoxia シミュレーションの結果 (実線)

Fig. 6 Animal anoxia experiment without glycolysis system by Hearse et al. [13] () and simulation results of model 2 (glucose 0 mM).

4.2 シミュレーション実験条件

解糖系統合モデルを用いて、Anoxia 動物実験のシミュレーションを行った。実験では、三つの状態を検討した。いずれの条件でも、心筋細胞は非ペーシング状態とした。時刻 0 (s) で酸素濃度を酸素供給がある状態 (0.146 mM) から酸素供給を停止 (0 mM) することにより、モデル上で Anoxia の状態を再現した。モデル 1 は、3.2 で説明した解糖系の速度調節パラメータと Hexokinase の速度調節パラメータ (k , k') を 0 にすることにより、解糖系の働きを抑制した状態を再現する。このモデルに対応する動物実験は、Taylor らの実験結果である [14]。モデル 2 は、解糖系及び Hexokinase の速度 (k , k') をそれぞれ 0.05 とすることで、解糖系が機能している状態を再現している。更に、グルコース濃度を 0 (mM) とすることで、グルコースの影響を排除した状態を再現した。このモデルに対応する動物実験は、Hearse らの実験 [13] における、グルコースかん流がないときの Anoxia 実験結果

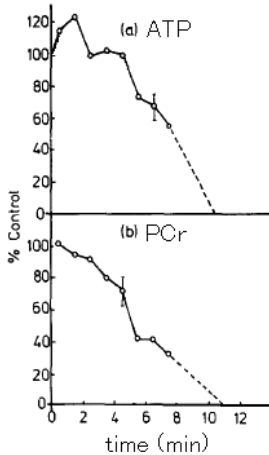


図 7 Taylor らによる解糖系を抑制した Anoxia 実験結果 ([14] から改変). 上図: ATP の Anoxia 開始後の時間変化, 下図: PCr の時間変化

Fig. 7 Animal anoxia experimental data by Taylor et al. [14]. Upper panel: ATP, Lower panel: PCr.

表 4 実験条件
Table 4 Experimental conditions.

Parameter	モデル 1	モデル 2	モデル 3
GLU (mM)	0	0	11.1
k	0	0.05	0.05
k'	0	0.05	0.05
実験結果	Taylor	Hearse	Hearse
		GLU かん流なし:	GLU かん流あり:

(図 6:) である.

モデル 3 は, モデル 2 と同様に, 解糖系及び Hexokinase の速度を, それぞれ 0.05 とする. グルコース濃度を 11.1 (mM) とすることで, 動物実験におけるグルコースかん流がある状態を再現した. このモデルに対応する動物実験は, Hearse らの実験におけるグルコースかん流があるときの Anoxia 実験結果 (図 5:) である. 表 4 に実験条件をまとめる.

4.3 シミュレーション結果

解糖系を抑制したモデル (表 4: モデル 1) における ATP, PCr の時間変化を図 8 に示す. PCr の減少に引き続いて, ATP 濃度が減少することが確認できる. 酸素供給の停止は, 電子伝達系の ComplexIV に作用し, ミトコンドリア膜内外のプロトン濃度こう配を減少させる. その結果, ATP 合成の機能低下を生じる. しかし, Anoxia 開始直後は, 細胞内の ATP は高い濃度を維持しており, 減少するまでに遅延時間が生じている. 一方, PCr は Anoxia 開始後に大きく減少する. PCr が枯渇すると ATP の減少を来していることが確

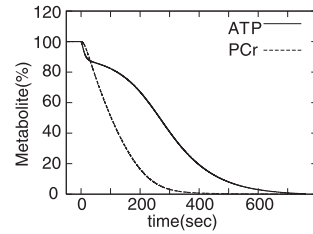


図 8 解糖系抑制時の Anoxia シミュレーションの ATP・PCr の時間変化 (モデル 1)

Fig. 8 Simulation results of ATP and PCr under anoxia without glycolysis system (model 1).

認できる. Anoxia 開始後, 初期の段階において ATP 濃度が維持されているのは, クレアチンキナーゼにより ATP が供給されているためである. これらの時間変化は, Taylor らの実験結果の傾向に近い.

解糖系を導入したモデルでグルコースの影響を排除したモデル (表 4: モデル 2) の ATP と PCr の時間変化を図 6 (a), (b) に実線で示す. ATP は, Anoxia 開始直後に急激に減少し, 引き続いて緩やかな減少に転じ, 枯渇直前に再び減少が激しくなる. PCr は, Anoxia 開始と同時に大きく減少している. ATP の Anoxia 開始直後の減少, その後の緩やかな変化, 枯渇直前における減少傾向の激化, 及び PCr の時間変化は, モデル 2 に対応する Hearse らの動物実験結果と類似している.

解糖系を導入したモデルでグルコースの影響を考慮したモデル (表 4: モデル 3) の ATP と PCr の時間変化を図 5 (a), (b) に実線で示す. グルコース存在下では, グルコースの影響を排除したモデルと比較して, 動物実験と同様に, ATP が高い濃度に維持されていることが確認できる. PCr の時間変化は, モデル 2 の PCr の時間変化と比較するとわずかながら高い濃度を示す結果が得られた.

なお, Hearse らの実験では ATP 及び PCr の濃度は心筋乾燥重量当りの量 ($\mu\text{mol/g} = \text{mmol}/1000\text{g}$) で記載されているが, 心筋重量に対する心筋乾燥重量はおよそ 20%と報告されているので, $M = \text{mol}/l = \text{mol}/1000\text{g}$ に換算するとおよそ 1/4 の値になる. 図 5 (a), 図 6 (a) では細胞質の 7 mM が乾燥重量当り 30 mmol に相当するとしてスケールを合わせた. 一方, PCr の濃度は動物実験の結果と整合性が低かったが, ここでは時間変化の傾向を見るため, 細胞質の 8 mM が乾燥重量当り 15 mmol に相当するとして図 5 (b), 図 6 (b) はスケールを合わせた.

シミュレーション結果から、ATP の時間変化は、モデル 2、モデル 3 とともに、Hearse らの Anoxia 実験の結果と類似した傾向を示した。PCr は、モデル 2 では動物実験と非常に近い結果を示しているが、モデル 3 では動物実験結果に比べて PCr 濃度が低い結果となった。しかしながら、モデル 2 と 3 の PCr を比較すると、モデル 3 の PCr はモデル 2 よりも高い濃度を示した。

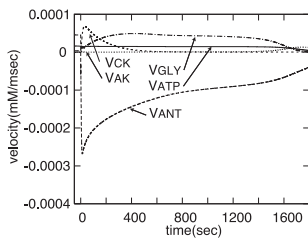
ATP 消費系と産生系の反応速度の時間変化を、モデル 2 及びモデル 3 について、それぞれ図 9 (a), (b) に示す。モデルの ATP 消費速度である v_{ATP} は、ミオシン、NaK ポンプ、筋小胞体の Ca ポンプ、細胞膜上の Ca ポンプにおける ATP 消費の総和を表している。グラフでは、正の v_{ATP} 値は ATP の消費を表す。 v_{ANT} 、 v_{CK} 、 v_{AK} 、 v_{GLY} は、モデルの ATP 産生系の反応速度で、それぞれ、ミトコンドリアからの ATP 供給、クレアチンキナーゼによる ATP 供給、アデニル酸キナーゼによる ATP 供給、解糖系からの ATP 供給を表している。グラフでは、これらの産生系に関する正の値は ATP の産生、負の値は消費を表している。

図 9 (a), (b) のいずれにおいても、好氣的条件下では ATP の供給を行うミトコンドリアからの ATP 産生速度 (v_{ANT}) が、Anoxia 開始直後に負の方向に逆転し、ATP の消費に転じていることが確認できる。本

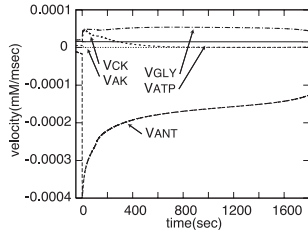
来は細胞質の ADP とミトコンドリア内の ATP を交換して細胞質に ATP を供給する ADP/ATP 交換体 (ANT) において、逆の反応が生じていることを示している。

図 10 (a) に、ATP 合成酵素 F1F0-ATPase によるミトコンドリア内での ATP 産生速度 (v_{SN}) の時間変化を示す。ミトコンドリアからの ATP 供給の速度 (v_{ANT}) と同様に、ATP 合成酵素においても ATP 産生速度 (v_{SN}) が Anoxia 開始後、負の方向に大きく逆転しており、本来は、ATP を産生する ATP 合成酵素において、ATP の消費が行われていることが確認できる。これは、ミトコンドリアの膜電位が脱分極を起こすと、ATP 合成酵素による反応が逆方向に転じ、ATP を消費することが原因である。図 10 (b) に、ミトコンドリアの膜電位の時間変化を示すが、ミトコンドリアの膜電位は、Anoxia 開始と同時に脱分極を起こしていることが確認できる。膜電位の脱分極により、ATP 合成酵素で ATP が消費され、その結果、ミトコンドリアの ADP/ATP 交換体は、細胞質から ATP を取り込むこととなったと考えられる。

一方、Anoxia による嫌氣的条件下で ATP の供給を担う解糖系による ATP 産生に注目してみる。モデル 2 とモデル 3 における解糖系による ATP 産生速度 (v_{GLY}) の時間変化を図 11 に示す。モデル 3 における解糖系の ATP 産生速度は、モデル 2 と比較すると速く、ATP 供給量が多いことを示している。その結果、図 6 (a)、図 5 (a) に現れていたように、モデル 2 に比べると、モデル 3 で ATP 濃度が高い値に維持されることになったと考えられる。また、図 11 から、Anoxia 開始直後には、いずれのモデルでも一時的に解糖系の ATP 産生速度が上昇していることが確認できるが、モデル 3 では、上昇がより大きい。このため、Anoxia



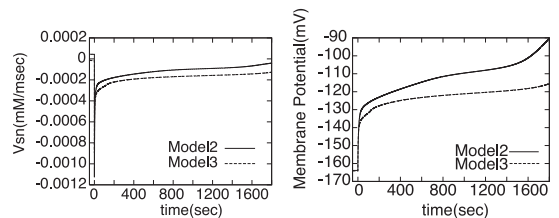
(a) グルコース 0mM



(b) グルコース 11.1mM

図 9 解糖系統合モデルの ATP の消費と産生速度 (モデル 2, 3)

Fig. 9 ATP consumption and production rate of combined model (model 2, 3).



(a) v_{SN} (b) ミトコンドリア膜電位

図 10 グルコースによる ATP 産生速度 (v_{SN}) とミトコンドリア膜電位

Fig. 10 ATP production rate by glucose (v_{SN}) and mitochondrial membrane potential.

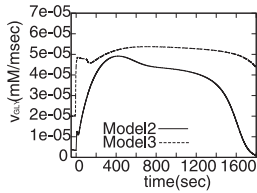


図 11 解糖系の ATP 産生速度 v_{GLY} (モデル 2 とモデル 3)

Fig. 11 ATP production rate of glycolysis system v_{GLY} (model 2, 3).

表 5 定常状態における ATP 産生速度 (平均)
Table 5 Average ATP production rate at stable condition.

ATP 供給	ATP 産生速度 (mM/ms)	比率 (%)
ミトコンドリアの 酸化的リン酸化反応	6.24×10^{-4}	95.4
解糖系	3.03×10^{-5}	4.6
合計	6.54×10^{-4}	

開始直後の ATP の減少が、モデル 3 の図 5 (a) では、モデル 2 の図 6 (a) よりも少なくなったと考えられる。また、図 9 (a) と (b) において、Anoxia 開始直後にクレアチンキナーゼ反応による ATP 産生速度 v_{CK} が両モデルとも上昇しているが、モデル 3 における上昇はモデル 2 に比べると低い。これは、モデル 3 においては、Anoxia 開始直後における解糖系の ATP 産生速度が上昇し、解糖系からの ATP 供給量が多くなったため、モデル 2 に比べると v_{CK} の上昇が抑制されたと考えられる。

4.4 ペーシング状態におけるエネルギー代謝シミュレーション

構築した解糖系統合モデルを用いて、ペーシング状態において、ミトコンドリアの酸化的リン酸化反応より供給される ATP と、解糖系による ATP 産生の比率を確認する。実験には、正常な状態のモデルであるモデル 3 を使用する。刺激頻度は、Kyoto model の標準値である 2.5 Hz とする。

表 5 に定常状態における各産生系からの ATP 産生速度と全体の ATP 産生における比率を示す。ミトコンドリアにおける ATP 産生は 95.4%、解糖系における ATP 産生は 4.63% という結果となり、心筋エネルギーの約 90 ~ 95% が酸化的リン酸化反応によるとされる生理学的な数値に近い結果となった。しかしながら、提案モデルにはリンゴ酸シャトルは導入されていないので、シャトル系の影響評価は今後の課題である。

5. むすび

心臓において、酸素濃度が低下する嫌気的条件下における ATP 産生は解糖系により行われる。虚血や低酸素症などの細胞への酸素供給量の減少を生じる病態モデルを実現するためには、解糖系は不可欠な要素である。本研究では、モルモットの心筋細胞モデルである Kyoto model に Lambeth らの解糖系モデルと Lueck らの Hexokinase モデルを統合した解糖系統合心筋細胞モデルを構築した。

低酸素に対する心筋細胞応答を確認するために、動物実験の実験条件に合わせてシミュレーションを行い、非ペーシング状態の細胞における Anoxia 実験の再現を行った。シミュレーションの結果、正常解糖系、解糖系抑制条件、グルコース抑制条件のいずれにおいても、動物実験に近い結果を得ることができ、本モデルの妥当性が確認された。

今後の課題として、リンゴ酸シャトルの導入、細胞-ミトコンドリア間の酸素透過性の導入などが挙げられる。

文 献

- [1] 三浦義彰, ハーパー・生化学, 原書 18 版, 丸善, 1982.
- [2] 厚生労働省大臣官房統計情報部, 平成 19 年 人口動態統計の年間推計.
- [3] M. Kuzumoto, A. Takeuchi, H. Nakai, C. Oka, A. Noma, and S. Matsuoka, "Simulation analysis of intracellular Na⁺ and Cl⁻ homeostasis during beta 1-adrenergic stimulation of cardiac myocyte," Prog. Biophys Mol. Biol., vol.96, no.1-3, pp.171-186, 2007.
- [4] S. Matsuoka, H. Jo, N. Sarai, H. Jo, and A. Noma, "Simulation of ATP metabolism in cardiac excitation-contraction coupling," Progress in Biophysics and Molecular Biology, vol.85, pp.279-299, 2004.
- [5] B. Korzeniewski and J.A. Zoladz, "A model of oxidative phosphorylation in mammalian skeletal muscle," Biophysical Chemistry, vol.92, pp.17-34, 2001.
- [6] H. Jo, A. Noma, S. Matsuoka, E.A. Robbins, and P.D. Boyer, "Calcium-mediated coupling between mitochondrial substrate dehydrogenation and cardiac workload in single guinea-pig ventricular myocytes," J. Molecular and Cellular Cardiology, vol.40, pp.394-404, 2006.
- [7] 天野 晃, 信秋 裕, 嶋吉隆夫, 陸 健銀, シム エンボ, 松田哲也, "心筋細胞 β 刺激系モデルを導入したヒト乳児循環動態シミュレーションシステムの構築," 信学論 (D), vol.J91-D, no.8, pp.2177-2187, Aug. 2008.
- [8] M.J. Lambeth and M.J. Kushmerick, "A computational model for glycogenolysis in skeletal muscle," Annals of Biomedical Engineering, vol.30, pp.808-

827, 2002.

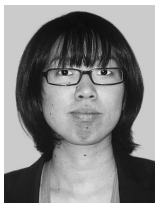
- [9] J.D. Lueck and H.J. Fromm, "Kinetics, mechanism, and regulation of rate skeletal muscle hexokinase," *J. Biological Chemistry*, vol.240, pp.1341-1347, 1974.
- [10] H.J. Green, I.G. Fräsera, and D.A. Ranney, "Male and female differences in enzyme activities of energy metabolism in vastus lateralis muscle," *J. Neuro. Sci.*, vol.65, no.3, pp.323-331, 1984.
- [11] J.B. Lyon and J. Porter, "The relation of phosphorylase to glycogenolysis in skeletal muscle and heart of mice," *J. Biological Chemistry*, vol.238, pp.1-11, 1963.
- [12] L. Zhou, J.E. Salem, G.M. Saidel, W.C. Stanley, and M.E. Cabrera, "Mechanistic model of cardiac energy metabolism predicts localization of glycolysis to cytosolic subdomain during ischemia," *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, vol.288, pp.H2400-H2411, 2005.
- [13] D.J. Hearse and E.B. Chain, "The role of glucose in the survival and 'recovery' of the anoxia isolated perfused rat heart," *Biochem. J.*, vol.128, pp.1125-1133, 1972.
- [14] D.J. Taylor, P.M. Matthews, and G.K. Radda, "Myoglobin-dependent oxidative metabolism in the hypoxic rat heart," *Respiration Physiology*, vol.63, pp.275-283, 1986.

(平成 21 年 5 月 15 日受付, 9 月 26 日再受付)



天野 晃 (正員)

1988 京大・工・電気卒。1990 同大学院修士課程了。1993 同大学院博士課程学修退学。同年工学部助手。1995 広島市立大学助教授。2002 京都大学大学院情報学研究科助教授。2009 立命館大学生命科学部教授。生体シミュレーション, コンピュータビジョン, 文書画像処理の研究に従事。IEEE BME, CS, 人工知能学会, ME 学会各会員。



富田 幸子

2008 京都大学大学院情報学研究科修士課程了。現在, KDDI (株) に勤務。



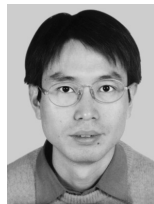
松岡 達

1989 鳥取大学大学院医学研究科博士課程了, 医博。1989 鳥取大学医学部付属病院医員 (内科学第一), 1991 米国テキサス大学 SWMC 研究員 (生理学), 1993 米国 UCLA 心臓血管研究所, 研究員, 1994 京都大学医学部, 助手 (生理学), 2007 京都大学大学院医学研究科, 次世代免疫制御を目指す創薬医学融合拠点特定准教授 (科学技術振興) 現在に至る。生体シミュレーション, 細胞生理学研究に従事。日本生理学会, 日本循環器学会, 日本心電学会, Biophysical Society 各会員。



嶋吉 隆夫

1999 京都大学大学院工学研究科修士課程了。2003 (財) 京都高度技術研究所入社。生体機能シミュレーション, ソフトウェアシステムの研究に従事。情報処理学会会員。



陸 健銀 (正員)

2002 京都工芸繊維大学博士課程了。同年オムロン (株) センシング研究所, 顔認識などの研究開発に従事。2004 から京大大学生体・細胞シミュレーションプロジェクト研究員, 生体シミュレーション, 特に心筋細胞・心臓の収縮シミュレーションの研究に従事。



松田 哲也 (正員)

1981 京大・医卒, 1988 同大学院医学研究科博士課程了。医博。同年 4 月京都大学医学部附属病院第 3 内科助手, 1997 同医療情報部助教授, 2000 京都大学大学院情報学研究科教授, 現在に至る。生体シミュレーション, 循環器領域の MRI 撮影法及び画像処理に関する研究に従事。ISMRM, SCMR, IEEE BME, 生体医工学会, 日本内科学会, 日本循環器学会, 日本磁気共鳴医学会各会員。