

令和元年6月24日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10938

研究課題名(和文) 培養ヒト骨格筋細胞を用いた運動誘発性横紋筋疾患の発症予防と発症予測に関する研究

研究課題名(英文) Study on prevention and onset of exercise-induced rhabdomyopathies using cultured human skeletal muscle cells

研究代表者

河本 昌志 (Kawamoto, Masashi)

広島大学・医歯薬保健学研究科・教授

研究者番号：40127642

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：悪性高熱症(MH)素因を、スキンドファイバーを使用したCa-induced Ca release (CICR)速度の亢進の有無で判定し、この検査後の残余筋を培養し、還流液の温度変化によるその筋のCa動態を測定した。またダントロレンの抑制効果についても検討した。これをMH原因遺伝子であるRYR1の変異を導入したHEK細胞についても検討した。

その結果、環境温の上昇による骨格筋細胞内のCa濃度の上昇は、ヒト培養骨格筋細胞でもHEK細胞でも確認された。ダントロレンはHEK細胞でも培養骨格筋細胞でも、温度上昇によるCa濃度を低下させたことから、この薬剤はMHの発症予防に効果がある可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

悪性高熱症(MH)はいまだ原因が特定できない致死性の疾患の一つである。そんな中でもダントロレンは治療に有効なため長く用いられてきたが、MHの発症予防に対する効果は乏しいとされてきた。この研究により、ダントロレンはMHの発症予防の効果もある可能性を示唆する結論が得られた。

よって今後は、ダントロレンの予防的な臨床応用も視野に、MHの発症リスクの低減を図ることが可能になると期待される。

研究成果の概要(英文)：Malignant hyperthermia (MH) predisposition is determined by the presence or absence of an increase in Ca-induced Ca release (CICR) rate using skinned fibers, and the residual muscle is cultured after this examination. The environmental temperature was changed and the kinetics of Ca was measured. The inhibitory effect of dantrolene was also examined. This was also examined for HEK cells into which a mutation of the MH causative gene RYR1 was introduced. As a result, an increase in Ca concentration in skeletal muscle cells due to an increase in environmental temperature was confirmed in both cultured human skeletal muscle cells and HEK cells. Dantrolene reduced Ca concentration due to temperature increase in HEK cells and cultured skeletal muscle cells. We concluded that this agent may be effective in preventing the onset of MH.

研究分野：麻酔蘇生学

キーワード：悪性高熱症 骨格筋筋小胞体 1型リアノジン受容体 細胞内カルシウム調節 ヒト培養骨格筋細胞
ントロレン Ca-induced Ca release 遺伝子導入

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

悪性高熱症の病因は骨格筋筋小胞体 (SR) の 1 型リアノジン受容体 (RYR1) の機能異常によるカルシウム (Ca) 調節異常で、誘発薬への暴露を契機に細胞内 Ca 濃度が異常上昇することで発症する。RYR1 遺伝子の変異により SR からの Ca による Ca 放出 (CICR) 機能に異常が生じ、悪性高熱症素因者では CICR 速度の亢進が認められている。CICR 速度は温度上昇により対数的に増大する。また、RYR1 変異 p.Y522S の myotube では温度上昇により安静時 (resting) の細胞内 Ca の上昇が wildtype より大きいことが報告されている。悪性高熱症と熱中症を発症した症例の報告もある。温度上昇刺激による骨格筋細胞内の Ca 動態が悪性高熱症素因者と非素因者では異なることが予想される。

2. 研究の目的

温度上昇刺激がヒト培養骨格筋細胞や RYR1 導入 HEK293 細胞の細胞内 Ca 動態に与える影響を検討して、その影響が悪性高熱症素因の有無や RYR1 の変異の有無により異なるか否かを調査した。悪性高熱症の治療薬であるダントロレンの作用に対する温度上昇の影響、温度上昇刺激時の Ca 上昇抑制作用について検討する。

3. 研究の方法

MH 素因の有無の判定は、スキンドファイバーを使用した Ca-induced Ca release (CICR) 速度の亢進の有無で判定した。CICR 検査後の残余骨格筋からヒト骨格筋細胞を培養し、一部を凍結保存した。CICR 速度の亢進の有無で、還流溶液の温度上昇による Ca 動態を測定し、ダントロレンの温度上昇に対する抑制作用について検討を行った。当教室で作製した悪性高熱症原因遺伝子である RYR1 の変異を導入した HEK 細胞についても同様に検討を行った。

- (1) Myotubes の培養：対象細胞を解凍し、10%FBS 加 DMEN/F2 (アンピシリン、カナマイシン、アンフォテリシン入り) 培地で測定用の 35mm のノンコートガラスボトムディッシュに撒いて培養。80%コンフルエントの状態を 2%FBS 加 DMEN/F12 に変更し myotubes への分化を誘導。培地変更後 7~14 日で測定を行った。
- (2) Ca²⁺動態の測定：カルシウム蛍光指示薬である Fura2/AM 5 μM を室温で 1 時間負荷後、Hepes-buffered salt solution (HBSS) で洗浄して 30 分間静置。340, 380nm の 2 波長で励起し、測定は 510nm で行った。カルシウム画像解析装置を使用し、37 °C の HBSS で灌流して 340/380 比を算出。Ratio340/380 から Ca²⁺濃度への換算は、Ca²⁺キャリブレーションキット (Invitrogen™) より得られた検量線を使用した。
- (3) 測定項目
静止時の Ca²⁺濃度、RYR1 刺激薬 (カフェイン、40mM) の EC₅₀ (50%効果の濃度) を用量反応曲線から算出、Caf10mM 刺激による ratio 340/380 の上昇還流溶液 (BSS) の温度を 35 ~ 43 °C まで上昇させて、ratio の上昇率 (35 °C で 10mM Caffeine 刺激による上昇を 100%として) を測定。
43 °C における Caffeine 10mM 刺激による ratio の上昇率 (35 °C で 10mM Caffeine 刺激による上昇を 100%として) を測定。
ダントロレン 50 μM の静止時の Ca²⁺濃度低下作用の比較
43 °C でのダントロレン 50 μM の Ca 低下作用について 35 °C の低下作用と比較 (35 °C での ratio の低下を 1.0 とする)。
ダントロレン 50 μM 存在下で 35 ~ 43 °C まで還流温度を上昇させたときの、ratio の上昇を測定 (ダントロレンを加えないときの ratio の上昇を 100%とする)。
- (4) 対象
悪性高熱症の素因検査である CICR (Ca-induced Ca release) 検査で陽性であった 3 例と正常であった (悪性高熱症の素因がない) 6 例について、培養骨格筋細胞で ~ の測定を行った。
悪性高熱症の原因遺伝子変異と認められている p.Ala4894Thr と p.Arg2508Cys の変異 RYR1 遺伝子導入した HEK 細胞と Wild RYR1 を導入した HEK 細胞について、~ まで測定を行った。
ヒト培養骨格筋細胞のなかで、遺伝子検査により原因と考えられる変異が同定された 2 症例 (M-1 M-2)、RYR1 には変異がなかったが CICR 速度の亢進が認められた 2 症例 (A-1, A-2) および CICR 速度の亢進もなく RYR1 の遺伝子変異も認められなかった 1 症例 (N-1) について ~ までの項目の測定を行い、比較検討した。
- (5) 群間の有意差検定は一元配置分散分析、対応のない t 検定で行い、p<0.05 を有意差ありとした。

4. 研究成果

温度上昇による ratio の変化 (CICR 亢進群と CICR 非亢進群での比較)

1) 灌流液の温度が上昇するに従い ratio は上昇し, 低下すると ratio も低下した (図 1).

2) 35 から 43 に伴う ratio の上昇率は CICR 亢進群と非亢進群で有意な差は認められなかった (図 2).

3) 35 10mM カフェイン刺激に対する ratio の上昇と 43 での上昇に差はなかった. また, CICR 亢進群と CICR 非亢進群で有意差は認められなかった (図 3).

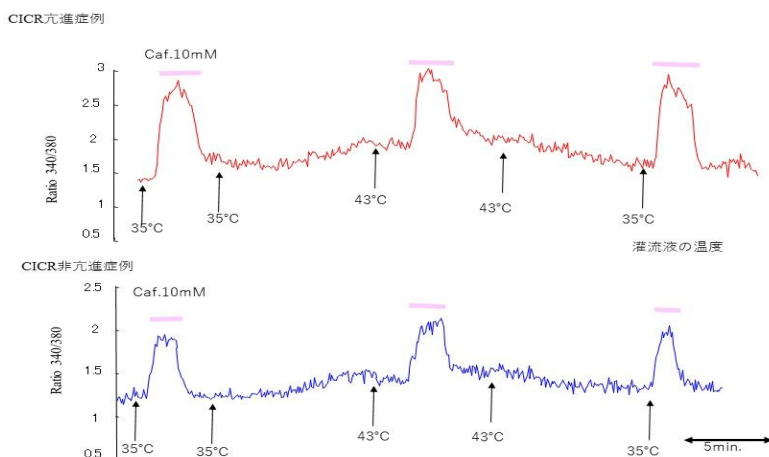


図 1. 温度変化による Ratio の変動とカフェイン刺激による反応

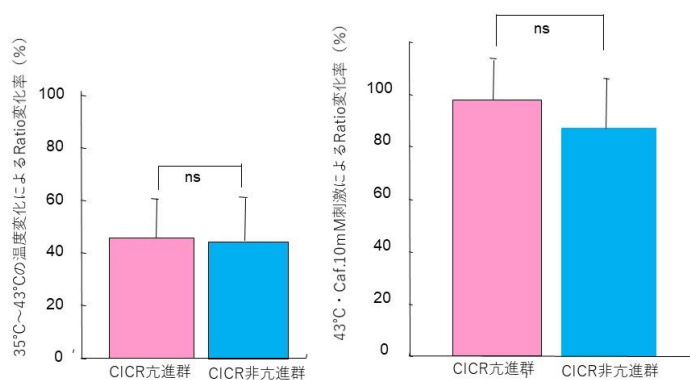


図 2. 温度上昇による Ratio 上昇率 図 3. 43 カフェイン刺激による上昇率

悪性高熱症の原因となる RYR1 遺伝子変異を導入した HEK 細胞における検討

1) 灌流液の温度を 35 から 43 に上昇させたとき HEK 細胞の ratio は wild type, Ala4894Thr および Arg2508Cys のすべてで上昇した. その一例を図 4 に示した.

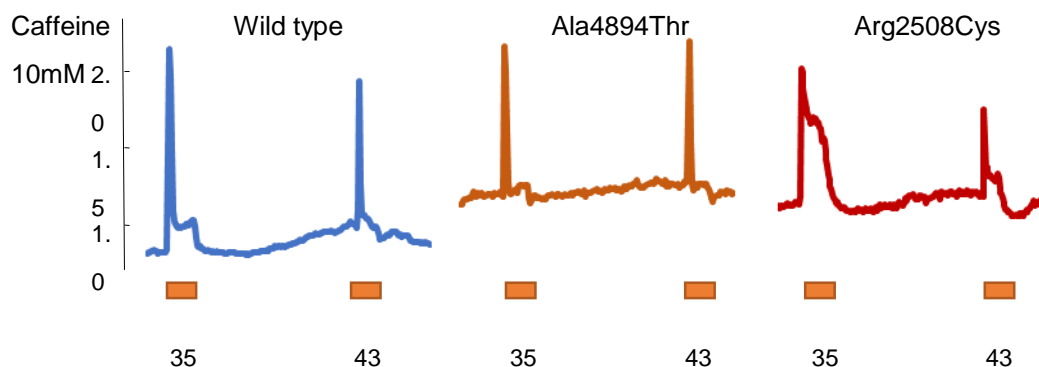


図 4. HEK 細胞における温度上昇による Ratio の変化の一例

2) 温度上昇 (35 ~ 43) による Ratio の上昇比率 (Caffeine10mM 刺激による ratio の上昇を 100% とする) は, 3 群間で有意差が認められた. Arg2508Cys が最も上昇率が高かった. 43 での Caffeine10mM 刺激による ratio の上昇比率 (35 100% とする) でも, 有意差が認められた (図 5) .

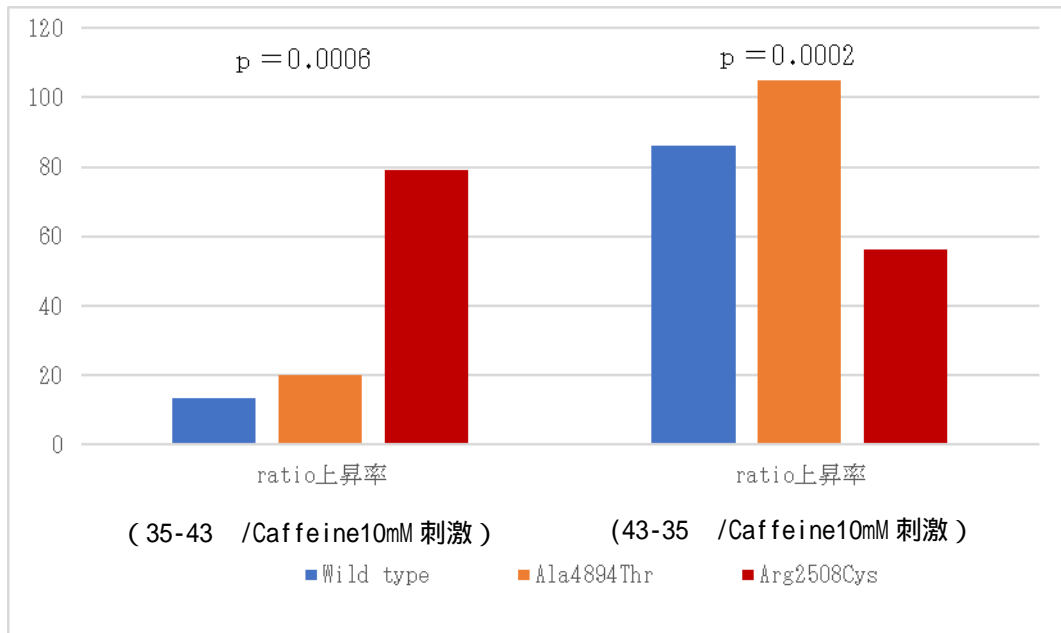


図 5. 温度上昇による HEK 細胞の Ca 動態 (ratio 上昇比率)

3) ダントロレンの効果

HEK 細胞における 50 μ M の静止時の Ca²⁺濃度低下作用は 3 群間で有意差があり, Arg2508Cys で最も大きかった. ダントロレン 50 μ M の Ca 低下作用における温度の影響は 3 群間で有意差はなかった. 35 の低下作用と同等あるいはそれ以上の効果 (wildtype 157.8 \pm 84.0%, Ala 4894 Thr 100.5 \pm 31.1%, Arg2508Cys 168.9 \pm 180.2%) が認められた. ダントロレン 50 μ M 存在下で, 35 ~ 43 まで還流温度を上昇させたときの, ratio の上昇比率 (ダントロレンを加えないときの ratio の上昇を 100% とする) は 3 群間で有意差はなく, 比率は wildtype 85.7 \pm 52.3%, Ala 4894 Thr 118 \pm 62.0%, Arg2508Cys 105 \pm 38.9% で, 温度上昇刺激に対するダントロレンの Ca 上昇抑制作用は認められなかった. それぞれの群の n は 11 と少なく, 値のばらつきも大きかった.

ヒト培養骨格筋細胞での検討

RYR1 遺伝子の変異が確認された培養骨格筋細胞 M-1(Arg280Cys+Met2208Lys), M2(Val2280Ile+Arg2625Cys), CICR 速度の亢進が認められたが RYR1 遺伝子変異はない A-1, A-2 と RYR1 遺伝子変異も, CICR 速度の亢進もなかった N-1 の 5 症例 (表 1) 5 症例間で有意差が認められたのは, Caffeine10mM 刺激による ratio の上昇比率への温度の影響で, M-1(Arg280Cys+Met2208Lys), 症例で 43 における Caffeine10mM 刺激による ratio の上昇が小さかった. ダントロレンは 43 での Ca 濃度低下作用は, すべての症例で 35 における低下より大きかった.

| | M-1 n=9 | M-2 n=6 | A-1 n=8 | A-2 n=6 | N-1 n=7 | P 値 |
|--|------------|------------|------------|------------|------------|--------|
| ratio上昇率 (%) (35-43°C/Caffeine 10mM刺激) | 32 ± 9.8 | 31 ± 14 | 34 ± 11 | 24 ± 5.4 | 41 ± 14 | 0.1009 |
| ratio上昇率 (%) (Caffeine10mM刺激 43°C/35°C) | 73 ± 10 | 42 ± 14 | 60 ± 12 | 85 ± 17 | 62 ± 39 | 0.0052 |
| 50 μ M Dantroleneのratio低下率 (%) (43°C/35°C) | 144 ± 33 | 136 ± 336 | 103 ± 26 | 143 ± 29 | 113 ± 45 | 0.0722 |
| ratio上昇比率 (%) (35-43°C+50 μ M Dantrolene/35-43°C) | 71 ± 26 | 56 ± 22 | 78 ± 13 | 72 ± 8.4 | 56 ± 9.4 | 0.0852 |

表 1. ヒト培養骨格筋細胞への温度変化の影響の比較

ダントロレンによる温度上昇刺激に対する抑制作用は、すべての症例で認められた。

以上より、環境温の上昇により、骨格筋細胞内の Ca 濃度の上昇は、ヒト培養骨格筋細胞でも RYR1 を導入した HEK 細胞でも確認された。しかし、その Ca 上昇の程度に、MH の素因 (RYR1 の変異による Ca 調節機能の変化の有無) との関連性は、認められなかった。ダントロレンは HEK 細胞でも培養骨格筋細胞でも、35 から 43 で Ca 濃度を低下させた。また、骨格筋細胞では温度上昇に伴う Ca 上昇の抑制作用が認められ、予防投与としての効果が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 9 件)

- 1) Takashi Kondo, Toshimichi Yasuda, Keiko Mukaida, Sachiko Otsuki, Rieko Kanzaki, Hirotsugu Miyoshi, Hiroshi Hamada, Nishino Ikuzo, Masashi Kawamoto. Genetic and functional analysis of the RYR1 mutation p.Thr84Met revealed a susceptibility to malignant hyperthermia. J Anesth. 2018; 32(2): 174-181. doi: 10.1007/s00540-018-2451-6. (査読あり)
- 2) Sachiko Otsuki, Toshimichi Yasuda, Keiko Mukaida, Yuko Noda, Rieko Kanzaki, Hirotsugu Miyoshi, Takashi Kondo, Hiroshi Hamada, Masashi Kawamoto. Myotoxicity of local anesthetics is equivalent in individuals with and without predisposition to malignant hyperthermia. J Anesth. 2018; 32(4): 616-623. doi: 10.1007/s00540-018-2526-4. (査読あり)

〔学会発表〕(計 13 件)

- 1) 神崎理英子, 安田季道, 向田圭子, 三好寛二, 大月幸子, 河本昌志
悪性高熱症の原因遺伝子の変異と臨床所見および Ca-induced Ca release 速度との関連.
日本麻酔科学会 65 回学術集会 (横浜) 2018.6.17-19 (査読あり)
- 2) 向田圭子, 大月幸子, 神崎理英子, 河本昌志, 市原靖子, 菊地博達
ヒト培養骨格筋細胞のカルシウム動態解析による悪性高熱症素因診断法の評価
日本麻酔科学会第 64 回学術集会 (神戸) 2017.6.8-10 (査読あり)
- 3) 野田祐子, 三好寛二, 近藤隆志, 安田季道, 向田圭子, 河本昌志
悪性高熱症の原因である p.R508C を組み込んだリアノジン受容体の温度上昇による細胞内 Ca 動態は野生型と変わらない
日本麻酔科学会第 64 回学術集会 (神戸) 2017.6.8-10 (査読あり)

〔図書〕(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<https://home.hiroshima-u.ac.jp/anesth/mh/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 佐伯 昇

ローマ字氏名: Noboru Saeki

所属研究機関名：広島大学

部局名： 病院

職名： 講師

研究者番号（8桁）：30325170

(2)研究協力者

研究協力者氏名： 向田 圭子

ローマ字氏名： Keiko Mukaida

研究協力者氏名： 大月 幸子

ローマ字氏名： Sachiko Otsuki

研究協力者氏名： 近藤 隆志

ローマ字氏名： Takashi Kondo

研究協力者氏名： 安田 季道

ローマ字氏名： Toshimichi Yasuda

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。