

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 21 日現在

機関番号	32409
研究種目	若手研究 (B)
研究期間	2010~2011
課題番号	22791453
研究課題名 (和文)	単球リアノジン 1 受容体刺激が誘導する細胞死を指標とした悪性高熱症診断法の開発
研究課題名 (英文)	Development of a diagnostic method for malignant hyperthermia indexed by cell death provoked by stimulation of ryanodine 1 receptors in monocytes
研究代表者	
	塚本 真規 (TSUKAMOTO MASANORI)
	埼玉医科大学・医学部・助教
	研究者番号：80536780

研究成果の概要 (和文)： 悪性高熱症 (MH) 素因者のスクリーニング法を開発するために、リアノジン 1 受容体 (RyR1) を構成的に発現する単球の細胞死を指標とした検査法を検討した。RyR1 アゴニストのブピバカインならびにカフェインはヒト単球系細胞 THP-1 の細胞内カルシウム濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) を増加させ、RyR1 阻害薬ダントロレンはそれを抑制した。ブピバカインは THP-1 のネクロシスを惹起したが、カフェインは起こさなかった。同様にブピバカインは THP-1 のミトコンドリア膜電位を急速に低下させ、ダントロレンはその作用を抑制したが、カフェインの効果はブピバカインのそれより小さかった。これらのことから $[Ca^{2+}]_i$ 増加は RyR1 アゴニストによる細胞障害の直接的な原因ではないと考えられた。RyR1 アゴニストによるミトコンドリア障害と細胞障害の関連を評価する必要があると示唆された。

研究成果の概要 (英文)： To develop a new diagnostic method for malignant hyperthermia, utility of necrotic cytotoxicity assay provoked by agonists for ryanodine-1 receptors (RyR1) in monocytes was evaluated. Two RyR1 agonists, bupivacaine as well as caffeine, elevated intracellular Ca^{2+} concentration. However, bupivacaine but not caffeine provoked cell death. Differential effects of these RyR1 agonists on mitochondrial membrane potential mimicked those on necrotic cell death. These indicated that intracellular Ca^{2+} mobilization was not the direct cause of cell death provoked by RyR1 agonists. Further evaluation concerning the relationship between mitochondrial damage and necrosis provoked by RyR1 agonists should be required.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,700,000	510,000	2,210,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・麻酔・蘇生学

キーワード：麻酔学・悪性高熱症・リアノジン受容体・ブピバカイン・カフェイン・ミトコンドリア・細胞障害・ネクロシス

1. 研究開始当初の背景

悪性高熱症 (MH) は、遺伝的素因を有するヒトが全身麻酔を受ける際に発生しうる致死合併症である。病因は揮発性吸入麻酔薬と筋弛緩薬サクシニルコリンによって引き起こされる筋小胞体の Ca^{2+} 動態異常によるものである。発症時には代謝性アシドーシスや横紋筋融解、頻脈、体温上昇など多様な症状が認められ、適切な処置が行われない場合には死に至る。MH は Ca^{2+} 放出チャネルとして機能するリアノジン 1 受容体 (RyR1) をコードする遺伝子の多数の変異に起因しているため、遺伝子変異解析による診断法では MH の発症を正確に予測することが出来ない。本邦では現在のところ、生検によって得られた筋細胞の Ca^{2+} induced Ca^{2+} release (CICR) を測定することによって素因者を同定する方法 (Endo M. et al. Biomed. Res. 1983;4:83) が唯一有効な検査法とされているが、患者への侵襲性が高いことが問題となっている。したがって 遺伝的要因を有するヒトが MH を発症する可能性を、手術麻酔前に、より簡便で侵襲性が低く精度も高い方法で予測することが出来れば、この疾患の発症予防に貢献できる。

研究代表者が所属する研究室では、免疫制御の中心的な役割を果たしているヒト樹状細胞に RyR1 が発現し、この細胞が MH 素因者の迅速なスクリーニングの標的となりうることを報告してきた (菊地博達編「悪性高熱症」、克誠堂出版、2006 年、Biochem Biophys Res Commun 2007;362:510)。また同時に、単球・マクロファージ系の樹立細胞株である THP-1 が RyR1 を構成的に発現していることを確認している。

RyR1 のアゴニストによる刺激は持続的な細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇を引き起こすが (Biochem Biophys Res Commun 2007;362:510, 埼玉医科大学雑誌 2007;34:T11)、後者は一般的にアポトーシスならびにネクローシス細胞死の原因と考えられている。われわれは最近、アミド型局所麻酔薬であるブピバカインを THP-1 に添加すると、短時間のうちにアポトーシスならびにネクローシス細胞障害が発生することを確認した。アミド型局所麻酔薬は、臨床的には MH 患者に対して安全に使用できると考えられているが、局所麻酔薬として使用する濃度では強力な RyR1 アゴニストとして作用することが知られている。また、このクラスの薬剤が MH を発症したとする症例報告も散見される (J Anesth Clin Res 2011;2:11)。

また、MH の重要な臨床所見として横紋筋融解症が知られている。この病態は横紋筋細胞内の酵素が血液中に逸脱することから診断されるため、MH の臨床像は RyR1 発現細胞のネクローシスに他ならない。

これらの事から、①RyR1 を発現する末梢血細胞は、ネクローシスを指標とすることで MH 素因者のスクリーニングの材料となりうることを、②RyR1 を発現している樹立細胞株 THP-1 は、MH 素因者スクリーニング法を開発する上で、倫理的な問題の発生しない研究材料を安定して供給可能なツールであることを示唆している。

末梢血に由来する浮遊細胞のネクローシスは、フローサイトメトリー (FCM) により、少量の試料から、短時間で、定量的に測定できる。また、いったん測定プロトコルが確立すれば、FCM は現在用いられている診断法 (筋生検による CICR 測定) と比較し、①技術者の技能に依存する部分が少なく②低侵襲である、などの利点を持ち、非常に有用な診断ツールになると考えられる。

2. 研究の目的

MH 素因者の新たなスクリーニング法を開発するため、RyR1 発現細胞である単球の細胞死を指標とした検査法が有用であるかどうかを検討する。

3. 研究の方法

(1) 細胞障害の評価

1×10^5 cells/ml の細胞密度で継代した THP-1 を 3 日後に培養液で 2 回洗浄し、 2×10^6 cells/ml に調整した細胞浮遊液を実験に供与した。96 穴細胞培養プレートにこの細胞浮遊液を 0.1 ml 加え、さらに同量の各種試薬を混合した緩衝塩類 (BSS) を加え、加湿された 5%CO₂ 環境下で 37°C に加温した。

RyR1 アゴニストによる細胞障害をネクローシスとアポトーシスのふたつの様式に分けて評価した。Propidium iodide (PI) は二本鎖 DNA に結合する性質を持つが、正常な細胞膜を透過しない。一方ネクローシスに特徴的な細胞膜のバリア機能が破綻した状態で、PI は細胞核 DNA に結合し赤色蛍光が増加する。一方、早期アポトーシス細胞では、細胞膜表面にホスファチジルセリン (PS) が出現する。PS に特異的に結合する annexin V をフルオレセインイソチオシアネート (FITC) で標識し細胞に負荷すると、アポトーシス細胞表面が緑色蛍光で染色される。

THP-1 を各種試薬とともに一定時間加温

した後、細胞浮遊液を試験管に回収した。この細胞浮遊液を PI ならびに FITC-annexin V で 10 分間負荷した後、フローサイトメーター (BD FACS Canto II, 日本ベクトン・ディッキンソン) を利用して細胞に付随する蛍光を測定した。

FCM により細胞障害の様式を検討した後、加温機能付き蛍光プレートリーダー (Fluoroskan Ascent, Thermo Scientific) を利用して蛍光強度の時間依存性変化を観察した。この実験では 96 穴プレートに RyR1 アゴニストを負荷すると同時に蛍光指示薬の添加を行なった。

(2) 細胞内 Ca^{2+} 濃度の測定

2×10^6 cells/ml に調整した細胞浮遊液に可視光蛍光 Ca^{2+} 指示薬 Fluo-3/AM (4 μ M) を負荷し 30 分間加温した。Fluo-3 を負荷した細胞は培養液で二回洗浄した後、再び 2×10^6 cells/ml に調整し、96 穴細胞培養プレートに 0.05 ml ずつ加えた。同量の各種試薬を混合した BSS を加え、加湿された 5%CO₂ 環境下で 15 分間 37°C に加温した。続いて加温機能付き蛍光プレートリーダーにセットし、Fluo-3 依存性の蛍光強度の測定を開始した。10 分間基底状態の蛍光を観察した後、専用プログラムで同期制御されたディスペンサーにより 0.1 ml の RyR1 アゴニストを加え蛍光測定を継続した。

(3) ミトコンドリア膜電位の測定

RyR1 アゴニストによるミトコンドリア膜電位の変化を評価するため、蛍光指示薬 tetramethyl rhodamine methyl ester (TMRM) を負荷し蛍光強度の変化を観察した。各種試薬による細胞の前負荷、RyR1 アゴニストの添加は細胞内 Ca^{2+} 濃度測定と同じ方法で施行した。

(4) 累積的スーパーオキシド産生の評価

RyR1 アゴニストによる THP-1 のスーパーオキシド産生を評価するため、蛍光指示薬 hydroethidine (HE) を負荷し蛍光強度の変化を観察した。各種試薬による細胞の前負荷、RyR1 アゴニストの添加は細胞内 Ca^{2+} 濃度測定と同じ方法で施行した。

4. 研究成果

まず FCM を利用してブピバカインが惹起する THP-1 の細胞障害様式を検討した。THP-1 を臨床使用濃度である 1 mg/ml のブピバカインとともに持続的に 37°C で加温したところ、1~2 時間後に有意な細胞障害が検出された。FITC-annexin V に陽性となる細胞

も検出されたが、より多くの PI 陽性細胞が検出された。このことから、RyR1 を発現する単球系細胞に臨床使用濃度のブピバカインを負荷すると、短時間でネクロシス優位の急性細胞障害が発生するものと考えられた。

続いて、単球系細胞にネクロシスを発生させる機序として、食食機能に関連して産生される活性酸素種によって自己細胞障害が惹起される可能性を考慮し、ブピバカイン負荷による累積的スーパーオキシド産生を評価した。100 μ g/ml のブピバカインはスーパーオキシド産生の指標である HE の蛍光強度を有意に増加した。HE 蛍光強度は少なくともブピバカイン濃度 1 mg/ml まで濃度依存性に増加し、短くとも 2 時間まで時間依存性に増加した。スーパーオキシド消去薬であるスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) はブピバカインによる HE 蛍光強度の増加を強く抑制した。RyR1 阻害薬であるダントロレンも濃度依存性 (1~75 μ M) にブピバカインによる HE 蛍光増強を抑制したが、その抑制作用は SOD による効果よりも弱かった。これらのことから、ブピバカインが惹起するスーパーオキシド産生の少なくとも一部は RyR1 の活性化を介すると考えられた。

次に、ブピバカインによるスーパーオキシド産生が前者による細胞障害の原因であるか確認するため、ブピバカイン負荷後 8 時間までのネクロシス発生を蛍光プレートリーダーを使用して評価した。この方法で PI に関連する蛍光強度を観察する場合、個々の細胞の蛍光を観測可能な FCM と異なり、96 穴プレートの各ウェルに加えられたすべての細胞が発する蛍光の総和となる。前述の FCM を用いた計測では 2 時間以内に有意な細胞障害が認められたが、蛍光プレートリーダーを使用すると、PI に関連する有意な蛍光強度の増加はブピバカイン負荷後 3 時間程度で検出され始めた。スーパーオキシド産生を有意に抑制した SOD は、ブピバカイン負荷によりネクロシスが発生する時間を遅延させなかった。これらのことから、単球系細胞が産生するスーパーオキシドは、RyR1 アゴニストによる細胞障害の直接的原因ではないと考えられた。

現在のところ、MH は RyR1 の持続的な興奮により細胞内 Ca^{2+} が上昇し、横紋筋などの RyR1 発現組織が細胞障害となり発症すると考えられている。そこで、ブピバカイン以外の RyR1 アゴニストであるカフェインもブピ

バカインと同様の細胞障害を惹起するかを検討した。

THP-1 に fluo-3 を負荷し、細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化を測定した。RyR1 アゴニスト刺激前の基底状態の細胞内 Ca^{2+} 濃度は、ダントロレンならびにカルシウムキレートである ethylene glycol tetraacetic acid (EGTA) で有意に低下した。カフェイン (20 mM) 負荷による細胞内 Ca^{2+} 増加はブピバカイン (1 mg/ml) によるものより高く、両者ともダントロレンで抑制された。一方、カフェイン負荷による PI 依存性蛍光強度の増加は認められず、RyR1 アゴニストによる細胞内 Ca^{2+} 増加は RyR1 発現細胞のネクロシスの直接的原因ではない可能性が示唆された。

二つの RyR1 アゴニストの薬理学的な相違点を説明するために、ミトコンドリア膜電位の指標となる TMRM を負荷した THP-1 の蛍光強度を観察した。TMRM 依存性の蛍光強度の低下はミトコンドリア膜電位の低下を示している。TMRM 依存性の蛍光強度はブピバカイン (1 mg/ml) 負荷後 30 秒以内に急激に低下し、以後低値が持続した。ダントロレンと EGTA はブピバカインによる TMRM 蛍光の低下を遅延させ、かつ、抑制した。一方、カフェイン (20 mM) は TMRM 蛍光を減少させる傾向にあったが、ブピバカインによる変化より有意に小さかった。

これらのことから、RyR1 アゴニストによる RyR1 発現細胞のネクロシス発生は、細胞内 Ca^{2+} 濃度の増加が直接的な原因ではなく、それに付随するミトコンドリア障害の強弱に影響される可能性が示唆された。これまで本邦の MH 素因者の臨床診断は、RyR1 アゴニストの細胞内 Ca^{2+} 動態への影響を観察する方法を採用し、MH と細胞障害の関連は検討されてこなかった。RyR1 発現細胞のネクロシスである横紋筋融解症は MH の重症度を反映している。今回の研究を通して、MH の発症メカニズムとしてミトコンドリア障害を検討する必要が示唆されたとともに、新たな MH 診断法として細胞障害を評価することの重要性が指摘された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Azma T, Sugimoto Y, Kinoshita H, Ito T, Tsukamoto M, Hoshijima H, Nakao M, Kikuchi H, Detection of the full-length transcript variant for neurokinin-1

receptor in human whole blood associated with enhanced reinforcement of clot by substance-P, J Thromb Thrombolysis 33:329-337, 2012, 査読有

- ② 塚本真規, 市原靖子, 松本延幸, 菊地博達, ウサギ骨格筋における保存温度・期間による筋小胞体からのカルシウム (Ca^{2+}) による Ca^{2+} 放出速度の変化, 麻酔, 査読有, 2011;60:132-137

[学会発表] (計 5 件)

- ① 東 俊晴, 星島 宏, 伊藤大真, 塚本真規, 土井克史, 松本延幸, ヒト単球系細胞の組織因子活性発現に対する完全長ニューロキニン 1 受容体 (NK1R) 発現の影響, 日本麻酔科学会第 59 回学術集会, 2012 年 6 月 7 日~9 日, 神戸
- ② 東 俊晴, 伊藤大真, 星島 宏, 塚本真規, 土井克史, 松本延幸, ブピバカインによるヒト単球系細胞の NADPH オキシダーゼ活性増強には PI3K 経路が関与する, 日本ペインクリニック学会第 45 回大会, 2011 年 7 月 22 日~23 日, 松山
- ③ 東 俊晴, 杉本由紀, 伊藤大真, 星島宏, 塚本真規, 菊地博達, サブスタンス P による白血球依存性血小板凝固活性亢進に影響を与える完全長イソ型 NK1 受容体ならびにその他の周術期要因の解析, 日本麻酔科学会第 58 回学術集会, 2011 年 5 月 19 日~21 日, 神戸
- ④ 伊藤大真, 東 俊晴, 塚本真規, 星島宏, 杉本由紀, 菊地博達, ブピバカインが惹起するヒト単球系細胞 THP-1 の細胞障害, スーパーオキシド産生, NADPH オキシダーゼ活性の時間的推移の相違, 日本麻酔科学会第 58 回学術集会, 2011 年 5 月 19 日~21 日, 神戸
- ⑤ 塚本真規, ウサギ骨格筋の CICR (Ca-induce Ca-release) 速度の経時的変化, 日本麻酔科学会第 57 回学術集会, 2010 年 6 月 3 日~5 日, 福岡

6. 研究組織

(1) 研究代表者

塚本 真規 (TSUKAMOTO MASANORI)
埼玉医科大学・医学部・助教
研究者番号：80536780