様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ２７ 年　 ６ 月 １８ 日現在

機関番号：１５４０１
研究種目：基盤研究(C)
研究期間：2012～2014
課題番号：２４５９２２９７

研究課題名（和文）悪性高熱症の発症予防に関する実験的研究

研究課題名（英文）Experimental study on prevention of malignant hyperthermia

研究代表者
河本　昌志（KAWAMOTO, Masashi）

広島大学・医歯薬保健学研究院・教授

研究者番号：４０１２７６４２

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　4,000,000円

研究成果の概要（和文）：悪性高熱症（MH）の遺伝子解析ではRYR1の47エクソンp.Arg2508Cys変異が多い．この変異のある培養骨格筋細胞のCa動態はRYR1刺激薬に対する感受性が高い．
MHの素因があり，RYR1刺激薬への感受性も高く静止時のCa2+が上昇しているヒト培養骨格筋細胞で，MH素因はあるがCa2+濃度が正常な骨格筋培養細胞と，MHの素因がなく正常な細胞について，Ca2+動態とダントロレンの影響を検討した．
MH素因がある細胞では，15μMダントロレンの前投与によりカフェインの用量反応曲線が右方に偏位し，EC50は上昇したことから，ダントロレンの予防投与が有効である可能性が示唆された．

研究成果の概要（英文）：This study aimed to investigate the inhibitory effects of dantrolene on RYR1 sensitivity related to Ca2+ release in cultured myotubes obtained from MH (Malignant hyperthermia)-predisposed patients and assessed the possibility of preventing MH crisis with dantrolene pretreatment. The Ca2+ in each myotubes from MH-predisposed patients were determined by using the fluorescent Ca indicator fura-2, and the effect of dantrolene in lowering Ca2+ were examined. Caffeine was used to activate RYR1 and half-maximal activation concentrations (EC50) of caffeine were determined in myotubes. Using 15 microM dantrolene increased the EC50 for caffeine near the normal range in myotubes. Pretreatment with 15 microM of dantrolene can prevent MH crises.

研究分野：医歯薬学

キーワード：悪性高熱症　骨格筋細胞　カルシウムイオン　ダントロレン

１．研究開始当初の背景

(1)悪性高熱症（MH）の病因は骨格筋細胞内のカルシウム(Ca^{2+})調節異常で，小胞体(SR)からの Ca^{2+}放出に関与する 1 型 Ryanodine Receptor（*RYR1*)遺伝子変異が主な原因である[1]．*RYR1* の変異は 300 以上あり，その変異部位や変異アミノ酸により Ca^{2+}調節作用は異なっている.

(2)ダントロレンは MH の特効薬であるが，その作用機序は複合的ですべてが明らかではない[1]．*RYR1* の D1 に結合部位があり，筋細胞質の Ca^{2+}を低下させる．MH 発症時の治療に有効なダントロレン濃度は 22.5-73μM で，この濃度で SR からの Ca^{2+}放出を部分的に抑制する[2]．一方，心筋細胞ではより低濃度のダントロレン(0.1-1.0μM)は，正常な心筋細胞には作用しないが，SR からの Ca^{2+}リークが増大している *RYR2* 変異心筋細胞では，心収縮力の改善が認められている[3]．CASQ1 ノックアウトマウスではハロタンによる MH 発症と熱負荷による熱中症の発症を，ダントロレン前投与により予防できるという報告[4]がある．SR からの Ca^{2+}のリークが増大し SR の Ca^{2+}貯蔵量が減少している骨格筋細胞では MH 発症予防効果というダントロレンの新しい作用が発見できる可能性がある.

２．研究の目的

日本人に頻度が高く Central Core 病(CCD)の併発例もある p.Arg2508Cys 変異 *RYR1*[5,6] ヒト培養骨格筋細胞と同様に MH 素因があり（CICR: Ca-induced Ca release 速度亢進）かつ静止時 Ca^{2+}濃度が上昇しているヒト培養骨格筋細胞の Ca^{2+}調節機能に対するダントロレンの効果を分析し，予防投与の有用性・有効な濃度と作用時間の検討を行った.

３．研究の方法

p.Arg2508Cys 変異があるヒト培養骨格筋細胞と同様に MH 素因がありかつ静止時 Ca^{2+}濃度が上昇しているヒト培養骨格筋細胞(A-High 群)，MH 素因があるが静止時 Ca^{2+}濃度が正常であるヒト培養骨格筋細胞(A-Normal 群)と MH 素因がない正常ヒト培養骨格筋細胞(N-Normal 群)について，カルシウム蛍光指示薬として Fura2/AM による Ca^{2+}動態を解析して，SR への Ca^{2+}貯蔵量，細胞外からの Ca^{2+}流入を比較検討した．さらに，これらについてのダントロレンの作用および効果を検討した.

MH 素因の有無，はスキンドファイバーを使用した Ca-induced C release (CICR)速度の亢進の有無で判定した.

(1) Myotubes の培養[7]：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で培地を 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) Ca^{2+}動態の測定：カルシウム蛍光指示薬である Fura2/AM 5μM 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℃の HBSS で潅流して 340/380 比を算出．Ratio340/380 から Ca^{2+}濃度への換算は，Ca^{2+}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

①静止時の Ca^{2+}濃度，RYR1 刺激薬（カフェイン，4CmC）の EC_{50}（50%効果の濃度)を用量反応曲線から算出， 10mM カフェインで 2 分間刺激し，その AUC(ratio-時間曲線の面積:S)を比較.

②ダントロレンの Ca^{2+}濃度低下作用：ダントロレンの濃度を 0.15，0.5，1.5，5.0，15，50μM と変えて負荷し，Ca^{2+}濃度の低下作用に対する IC_{50} を算出.

③ダントロレン 50μM の静止時の Ca^{2+}濃度低下作用の比較

④50μM ダントロレンの S に対する効果：50μM ダントロレン投与前の 10mM カフェイン刺激の S(pre)に対する S(dan)をダントロレン処置時間（2，7，15，30，60 分後）で比較.

⑤SOCE (store operated Ca^{2+} entry)に対する抑制作用の検討：Ca^{2+} free の状態でカフェイン 10mM 刺激し，Ca^{2+}2.5mM の HBSS で潅流すると細胞内の Ca^{2+}が上昇する．この上昇速度への 50μM ダントロレンの抑制作用についてダントロレン投与前を 100%として換算.

⑥RYR1 刺激に対するダントロレンの抑制作用をダントロレン 5，15μM 処置後カフェイン EC_{50} で検討．p.Arg2508Cys 変異 *RYR1* 遺伝子導入した HEK293 細胞と Wild *RYR1* を導入した HEK293 細胞について，静止時 Ca^{2+}濃度とこれに対するダントロレンの効果を検討した.

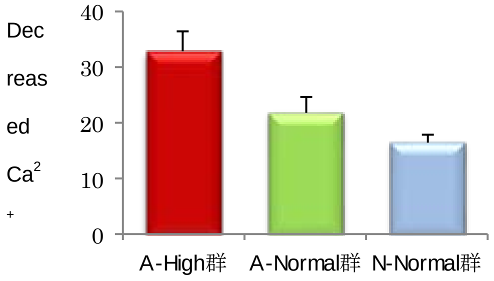
４．研究成果

(1) p.Arg2508Cys 変異を含む A-High 群(n=7)，A-Normal 群(n=7)，N-Normal 群(n=7)で測定を行った．その背景と静止時 Ca^{2+}と EC_{50} を示した(表 1)．(値は平均±標準誤差)

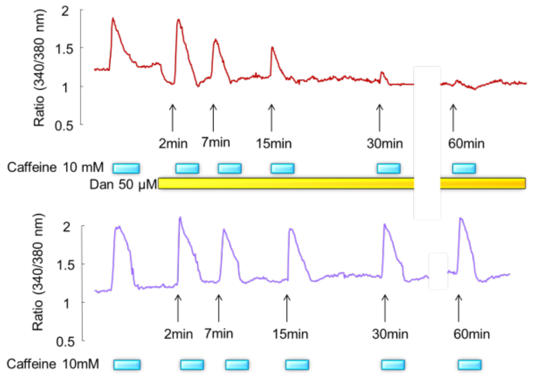
表 1.対象の背景と培養骨格筋細胞の Ca2+パラメータ

	A-High 群	A-Normal 群	N-Normal 群
N	7	7	7
年齢(才)	41.1±9.04	47.7±8.31	43.9±8.41
性別(男性/女性)	3 / 4	5 / 2	5 / 2
静止時 Ca^{2+} (nM)	107.1±2.7	74.2±0.76	75.1±1.8
S	707±153	1889±180	1930±235
EC_{50}			
カフェイン(mM)	2.56±0.13	2.92±0.11	5.19±0.35
4-CmC (μM)	111.4±12.0	134.7±13.8	250.0±13.8

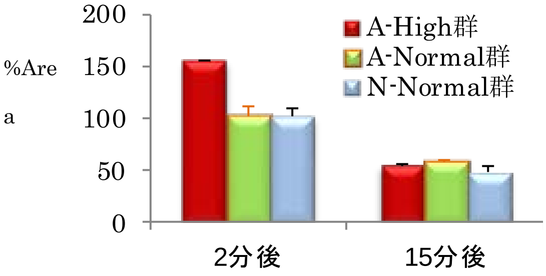
A-High 群と A-Normal 群ではカフェインと 4CmC の EC_{50} は N-Normal 群と比較すると，有意な低下が認められ，MH 素因がこの方法でも証明された．A-High群ではSが有意に低下し，SR の Ca^{2+}のコンテントの減少が示唆された．
(2) Ca^{2+}濃度抑制に対するダントロレンの IC_{50} は 3 群間で有意差なく，A-High 群，A-Normal 群，N-Normal 群で，5.00±0.61，4.93±0.48，5.42±0.77μM であった．
(3)ダントロレンの静止時の Ca^{2+}濃度低下作用は，A-High 群で有意に大きく 32.8±3.7(nM)であった．(下図)



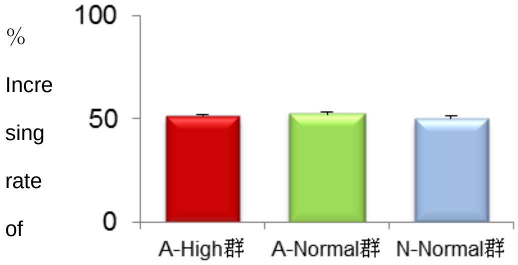
(4) A-High 群におけるダントロレン 50μM の $S_{2.5}$ に対する効果を下図（赤線）に示した．ダントロレン作用 2 分後のカフェイン刺激では $S_{2.5}$ は，ダントロレン作用前より増大したが，作用時間の経過とともに減少した．ダントロレンを使用しない（紫線）ものは，時間経過で $S_{2.5}$ の減少は認められなかった．



50μM ダントロレン処理前後のカフェイン刺激による%S（ S_{dan}/S_{pre}）は，2 分後は A-High 群，A-Normal 群，N-Normal 群でそれぞれ，152.4±25.4 102.2±9.3，101.6±7.5 で 3 群間に有意差が認められたが，15 分後は 54.4±3.3 56.9±9.3，47.1±6.1 と有意差はなかった．(下図)
(5) SOCE (store operated Ca^{2+} entry)に対



する抑制効果について，3 群間で有意差はなく，A-High 群，A-Normal 群，N-Normal 群でそれぞれ，51.3±4.3，52.3±3.4，50.3±5.4%であった．（下図）



(6) ダントロレン 5，15μM 処置後カフェイン EC_{50} は，A-High 群と A-Normal 群では上昇し，たが，N-Normal 群では有意な変化はなった．もともと RYR1 刺激の亢進が認められる骨格筋細胞では，この亢進した感受性を低下させる作用がダントロレンには認められた．

表 2. カフェインの EC50 へのダントロレンの影響の比較

	A-High 群	A-Normal 群	N-Normal 群
カフェイン EC_{50} (mM)			
ダントロレン－	2.56±0.13	2.92±0.11	5.19±0.35
ダントロレン 5μM	3.43±0.22	3.99±0.20	5.08±0.17
ダントロレン 15μM	3.99±0.62	4.61±0.20	5.24±0.10

(7)p.Arg2508Cys 変異 *RYR1* 遺伝子導入した HEK293 細胞は Wild *RYR1* を導入した HEK293 細胞にくらべ，静止時 Ca^{2+}濃度は高い傾向であった．ダントロレンの作用については、ダントロレンによりカフェインによる Ca^{2+}上昇反応が、経時的に減少する傾向が強く、EC_{50} の計算ができなかった．
p.Arg2508Cys 変異と同様に MH 素因がありかつ静止時 Ca^{2+}濃度が上昇している（SR からの Ca^{2+}リークが増大）骨格筋細胞に対して，ダントロレンは Ca^{2+}リークが亢進した心筋細胞への作用と同じように，RYR1 の感受性を低下させ，Ca^{2+}動態を正常化させる作用がある可能性が示唆された．

<引用文献>

1. Hirshey Dirksen SJ, et al. Anesth Analg 2011; 113 : 1108-19
2. Chrednichenko G, et al. Mol Pharmacol 2008; 73: 1203-12
3. Kobayashi S, et al. JACC 2009; 53: 1993-2005
4. Protasi F, et al. J Physiol 2009; 587; 3095-100
5. Migita T, et al. J Anesth 2009; 23: 341-6
6. Ibarra CA, et al. Anesthesiology 2006; 11: 1146-54
7. Kobayashi M, et al. Anaesth Intensive Care 2011; 39: 252-61

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 6 件）

① Miyoshi K, Yasuda T, Kawamoto M. et al. Several ryanodine receptor type 1 gene mutations of p.Arg2508 have the potential to cause malignant hyperthermia. Anesth Analg 2015 (in press) (査読:有)
② 右田貴子, 向田圭子, 濱田 宏, 河本昌志. 術後悪性高熱症の検討. 麻酔と蘇生 2013; 49: 7-11 (査読:有)
③ Migita T, Mukaida K, Yasuda T, Hamada H, Kawamoto M. Calcium channel blockers are inadequate for malignant hyperthermia crisis. J Anesth 2012; 26: 579-84(査読:有)
④ Migita T, Mukaida K, Kobayashi M, Hamada H, Kawamoto M. The severity of sevoflurane-induced malignant hyperthermia. Acta Anaesthesiol Scand 2012; 56: 351-6 (査読:有)
⑤ 向田圭子, 河本昌志. 悪性高熱症 最近の話題について. 日本臨床麻酔学会誌 2012; 32: 682-690 (査読:有)
⑥ 安田季道, 河本昌志. 腹腔鏡下虫垂切除術中の悪性高熱症. LiSA 2012; 19:74-78 (査読:無)

〔学会発表〕（計 9 件）

① Miyoshi H, Haraki T, Yasuda T, Mukaida K, Hamada H, Kawamoto M. Two different variants of p.2508 in Japanese malignant hyperthermia patients causing hypersensitivity of RyR1 receptor. Euroanaesthesia, 5.30-6.3, 2014. Stockholm, Sweden
② 向田圭子, 三好寛二, 河本昌志, 他. 悪性高熱症発症に対するダントロレンの予防投与は有効か？（骨格筋細胞のカルシウム動態の検討から）. 第 61 回日本麻酔科学術集会 2014.5.15-17, 横浜
③ 向田圭子, 右田貴子, 河本昌志, 他. 熱中症(III 度)の既往および家族歴がある患者の悪性高熱症素因について. 第 24 回日本臨床麻酔学会 2014.11.1-3, 東京
④ 大月幸子, 向田圭子, 河本昌志, 他. 短時間のセボフルラン投与により発症した悪性高熱症の 2 例. 第 24 回日本臨床麻酔学会 2014.11.1-3, 東京
⑤ 向田圭子, 市原靖子, 河本昌志, 他. CICR 速度亢進を示した悪性高熱症素因者の RYR1 変異の Ca 調節障害. 第 59 回日本人類遺伝学会 2014.11.19-22, 東京
⑥ 向田圭子, 三好寛二, 河本昌志, 他. 卵白によるアナフィラキシーの既往と悪性高熱症素因がある患児の麻酔. 第 23 回日本臨床麻酔学会 2013.11.1-3, 金沢
⑦ 向田圭子, 安田季道, 河本昌志, 他. ダントロレンは悪性高熱症素因者の骨格筋小胞体の Ca-induced Ca release 速度を抑制するか. 第 60 回日本麻酔科学術集会 2013.5.23-25, 札幌
⑧ Mukaida K, Haraki T, Kawamoto M. et al. Effect of dantrolene on prevention of malignant hyperthermia crisis by decreasing the sensitivity of ryanodine receptor1. Euroanaesthesia, 2013.6.1-4. Barcelona, Spain
⑨ 向田圭子, 安田季道, 河本昌志, 他. 悪性高熱症素因者由来の培養骨格筋細胞の脱分極刺激によるカルシウム動態の検討. 第 59 回日本麻酔科学術集会 2012.6.7-9, 神戸

〔図書〕（計 2 件）

① 河本昌志. 悪性高熱症: 麻酔科研修ノート. 永井良三総監修. 診断と治療社 2014, 318-321.
② 向田圭子, 河本昌志. 悪性高熱症素因: 澄川耕二編；麻酔前の評価・準備と予後予測. 克誠堂出版 2012: 228－232

〔その他〕
ホームページ等
http://home.hiroshima-u.ac.jp/anesth/mh/

６．研究組織
(1)研究代表者
河本 昌志（KAWAMOTO MASASHI）
広島大学･大学院医歯薬保健学研究院･教授
研究者番号：40127642

(2)研究分担者
濱田 宏（HAMADA HIROSHI）
広島大学･大学院医歯薬保健学研究院･准教授
研究者番号：10218539

(3)研究協力者
向田圭子（MUKAIDA KEIKO）
広島県障害者リハビリテーションセンター麻酔科･主任医長