

論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（医学）	氏名	近藤 隆志
学位授与の条件	学位規則第 4 条第①・2 項該当		
論文題目			
Genetic and functional analysis of the RYR1 mutation p.Thr84Met revealed a susceptibility to malignant hyperthermia (悪性高熱症の発症に関連する疑いがある 1 型リアノジン受容体の遺伝子変異 p.Thr84Met の遺伝子解析および機能解析)			
論文審査担当者			
主査	教授	橋本 浩一	印
審査委員	教授	廣橋 伸之	
審査委員	准教授	仁井内 浩	
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>悪性高熱症 (malignant hyperthermia: MH) は細胞内カルシウム代謝異常に伴う骨格筋の異常な代謝亢進によって引き起こされる致死性疾患で，臨床症状は揮発性吸入麻酔薬や脱極性筋弛緩薬によって誘発される。MH の主病因は，骨格筋の筋小胞体に存在する 1 型リアノジン受容体 (RYR1) の遺伝子変異にあるとされる一方で，その遺伝子変異は，MH 以外の先天性ミオパチーの原因となることも知られている。しかし，両者の原因となる遺伝子変異の全容は明らかになっていない。本研究では，ミオパチー患者から新規に発見された遺伝子変異 c.251 C>T (p. Thr84Met) に対する遺伝子解析および機能解析を行い，この遺伝子変異がカルシウム代謝に与える影響を検討した。</p> <p>遺伝子については，同意を得た患者および家族の末梢血から抽出した DNA を用いて PCR-サンガー法による RYR1 遺伝子変異の検索を行った。病的意義の判定を 3 種類の遺伝子解析プログラム (Mutation Taster, PolyPhen2, SIFT) により行ったところ，p. Thr84Met には遺伝性および病的意義があると判定された。機能解析については，① 患者の筋組織から得た筋芽細胞を培養して作成した筋管細胞とカルシウム代謝異常を持たない筋管細胞を比較し，② 遺伝子変異を持つ RYR1 遺伝子を導入した HEK293 細胞と野生型 (wild type: WT) の RYR1 遺伝子を導入した HEK293 細胞を比較して，カルシウム代謝の評価を行った。HEK293 細胞への遺伝子導入は遺伝子導入試薬を用いて行い，蛍光蛋白質 (GFP) が組み込まれたベクターに，RYR1 遺伝子を挿入して人工的に作製した Thr84Met および WT の 2 種類の RYR1 発現ベクターを，HEK293 細胞内にそれぞれ導入した後，蛍光顕微鏡により RYR1 の発現を確認した。カルシウム代謝の評価は，カルシウムイオンと特異的に結合する蛍光プローブ (Fura-2) を筋管細胞もしくは HEK293 細胞に負荷した後，2 波長の光 (340nm/380nm) を照射し，カルシウムイメージングシステムにより 2 波長の蛍光強度比を計測した。カルシウム反応性は，Fura-2 を用いて 50%効果濃度 (EC₅₀) を算出して評価した。RYR1 刺激にはカフェインとクレゾールを用い，EC₅₀ を，① 患者由来の筋管細胞 (Patient) とカルシウム代謝異常を持たない筋管細胞 (Control) ，② p. Thr84Met-HEK293 細胞 (p. Thr84Met) と WT-HEK293 細胞 (WT) の間でそれぞれ比較検討した。数値は平均値±標準偏差で示し，統計学的検定は対</p>			

応のない t 検定を用い、 $p < 0.01$ を有意とした。

筋管細胞の RYR1 刺激薬に対する EC_{50} は、カフェインでは Control (n=17) で 5.08 ± 0.60 mM, Patient (n=13) で 3.02 ± 0.88 mM, クレゾールでは Control (n=17) で 277.2 ± 63.8 μ M, Patient (n=13) で 160.6 ± 92.8 μ M となり、両刺激薬で 2 種類の筋管細胞の間で有意差を認めた (カフェイン: $p < 0.0001$, クレゾール: $p = 0.0003$)。HEK293 細胞の RYR1 刺激薬に対する EC_{50} は、カフェインで WT (n=30) は 2.70 ± 0.57 mM, p.Thr84Met (n=30) は 1.81 ± 0.70 mM, クレゾールで WT (n=30) は 119.8 ± 30.1 μ M, p.Thr84Met (n=30) は 84.0 ± 31.3 μ M となり、いずれも 2 種類の HEK293 細胞の間で有意差を認めた (カフェイン, クレゾールとも $p < 0.0001$)。

以上の結果から、新規に発見された RYR1 の遺伝子変異 p.Thr84Met は、RYR1 刺激に対する反応性を亢進させ、悪性高熱症の発症に関与している可能性を示唆した。この研究結果は、悪性高熱症の発症原因の解明の一助になると期待される。

よって審査委員会委員全員は、本論文が著者に博士 (医学) の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。

最終試験の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（医学）	氏名	近藤 隆志
学位授与の条件	学位規則第4条第①・2項該当		
論文題目			
Genetic and functional analysis of the RYR1 mutation p.Thr84Met revealed a susceptibility to malignant hyperthermia (悪性高熱症の発症に関連する疑いがある 1 型リアノジン受容体の遺伝子変異 p.Thr84Met の遺伝子解析および機能解析)			
最終試験担当者			
主査	教授	橋本 浩一	印
審査委員	教授	廣橋 伸之	
審査委員	准教授	仁井内 浩	
〔最終試験の結果の要旨〕			
判 定 合 格			
<p>上記3名の審査委員会委員全員が出席のうえ、平成30年5月7日の第74回広島大学研究科発表会（医学）及び平成30年5月8日日本委員会において最終試験を行い、主として次の試問を行った。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1 ヒト由来の筋細胞の培養法 2 この研究に用いた以外の RYR1 受容体に影響する内因性刺激物質 3 細胞内カルシウム濃度の測定法 4 麻酔薬を使用した悪性高熱症の診断法 5 この研究結果が及ぼす臨床的意義 <p>これらに対して極めて適切な解答をなし、本委員会が本人の学位申請論文の内容及び関係事項に関する本人の学識について試験した結果、全員一致していずれも学位を授与するに必要な学識を有するものと認めた。</p>			