

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	野田 祐子
学位授与の条件	学位規則第 4 条第①・2 項該当		
論文題目 The effects of dantrolene in the presence or absence of ryanodine receptor type 1 variants in individuals predisposed to malignant hyperthermia (悪性高熱症素因者における 1 型リアノジン受容体変異の有無によるダントロレンの効果の相違)			
論文審査担当者			
主 査	教授 酒 井 規 雄	印	
審査委員	教授 橋 本 浩 一		
審査委員	講師 近 藤 隆 志		
<p>[論文審査の結果の要旨]</p> <p>悪性高熱症 (以下 MH) は、重篤な麻酔合併症の一つである。病因は骨格筋細胞内のカルシウム (Ca^{2+}) 代謝異常であり、その大半は 1 型リアノジン受容体 (RyR1) の遺伝子変異に起因している。しかし、実際はすべての MH 患者から <i>RYR1</i> 遺伝子変異が見つかるわけではない。ダントロレンは、MH の治療薬として唯一臨床的に利用可能な薬剤で、筋小胞体 (SR) 上に存在する RyR1 に作用することで MH に有効であると考えられている。効果が主に RyR1 に対する作用に起因するのであれば、<i>RYR1</i> 遺伝子変異の有無によりその効果が異なる可能性がある。本研究では、<i>RYR1</i> 遺伝子変異の有無によってダントロレンの効果に違いがあるかどうかを、ヒト筋細胞を用いて検討することを目的とした。</p> <p>本研究は、広島大学倫理委員会の承認を得て実施した。Ca²⁺-induced Ca²⁺ release (CICR) 速度検査により MH 素因があると判断された者を対象とし、対象者に遺伝子検査を行い、<i>RYR1</i> に遺伝子変異がある群 (RYR1+群) とない群 (RYR1-群) の 2 群に分けて検討した。対象者の骨格筋から myotube を作成し、カフェイン (Caf) に対する half maximal effective concentration (EC₅₀) および安静時細胞内 Ca²⁺ 濃度 (安静時 [Ca²⁺]_i) を測定し、2 群間においてダントロレン 5μM または 15μM 負荷前後での EC₅₀ の変化とダントロレン 50μM 負荷前後の安静時 [Ca²⁺]_i の変化に差異があるかどうかを調査した。</p> <p>患者より採取した筋肉片から myoblast を培養した後、測定用のディッシュで myoblast から myotube へ分化させた。細胞内 Ca²⁺ の測定は、蛍光指示薬 fura-2/AM を用い、蛍光比 (340/380nm) を計測・解析した。測定中は灌流液を一定速度で灌流し、灌流液に混合する Caf を低濃度から段階的に濃度をあげて測定し EC₅₀ を算出した。ダントロレン負荷前後の EC₅₀ の比較は、ダントロレンなし、あるいは 5 または 15μM のダントロレンを含む灌流液を使用することで行った。また、安静時 [Ca²⁺]_i のダントロレン負荷前後の比較もダントロレンを含まない灌流液またはダントロレン 50μM 含む灌流液を用いることで行った。さらに、安静時 [Ca²⁺]_i は検量線を用いて蛍光比から濃度を算出した。統計分析は、EC₅₀ および安静時 [Ca²⁺]_i のダントロレン負荷前後の変化に関しては二元配置反復測定分散分析 (two-way repeated-measures analysis of variance : two-way repeated measures ANOVA) を用い、EC₅₀ に対するダントロレンの効果は Tukey の多重比較検定を用いた。それぞれ p < 0.05 で有意差ありとした。</p> <p>CICR 速度検査で MH 素因を認めた対象者は 11 人であった。そのうち、<i>RYR1</i> 遺伝子変異を認めたのは 6 人 (RYR1+群)、認めなかったのは 5 人 (RYR1-群) であった。Caf に対する EC₅₀ はダントロレン投与により有意な上昇を認め (P < 0.0001)、ダントロレン負荷と <i>RYR1</i> 遺伝子変異の有無の間に有意な交互作用は認めなかった (P = 0.59)。安静時 [Ca²⁺]_i は両群間で有意な差は認めず (P = 0.15)、ダントロレンの負荷により安静時 [Ca²⁺]_i は有意に低下した (P < 0.0001)。また、ダントロレン投与と <i>RYR1</i> 遺伝子変異の有無の間に有意な交互作用は認めなかった (P = 0.21)。</p>			

本研究では、RYR1+群とRYR1-群の2群間でダントロレン投与前後のCafに対するEC₅₀と安静時[Ca²⁺]_iの変化に差を認めない結果となった。よってMH患者に対するダントロレンの効果は、RYR1遺伝子変異の有無で差異を認めないといえる。

本研究で評価した安静時[Ca²⁺]_iは、細胞質、SR、細胞外基質間のCa²⁺の移動により規定されている。RYR1+群では、変異型RyR1を介してSRから細胞質にCa²⁺が漏出することで安静時[Ca²⁺]_iは上昇しており、ダントロレンが変異型RyR1に作用することで安静時[Ca²⁺]_iは減少したと考えられた。同様にRYR1-群の安静時の[Ca²⁺]_iもダントロレンによって有意に減少し、さらにダントロレンによる減少がRYR1+群と比較して差を認めなかったことから、ダントロレンはRyR1以外にも作用して安静時[Ca²⁺]_iの上昇を抑制していると考えられた。これは、過去の動物モデルを用いた研究で、RyR1以外のCa²⁺調節機構に関わるチャネルにもダントロレンが作用していたという報告と一致している。本研究では、ヒトの筋細胞を用いて、ダントロレンがRyR1以外の骨格筋細胞内Ca²⁺調節機構に作用していることの可能性が示された。

以上の結果から、本論文はダントロレンがRYR1遺伝子変異の有無に関わらず、MH患者に有効な治療薬であることを明らかにした。このことは、MHの臨床像の理解に寄与するところ大である。

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