

Thesis

1型リアノジン受容体を介したヒト樹状細胞応答の解析 悪性高熱症素因者診断のための可能性

埼玉医科大学 医学部 麻酔学

(指導：菊地 博達 教授)

成田 弥生

共同研究者： 植村 靖史 (埼玉医科大学 医学部 免疫学)

劉 天懿 (埼玉医科大学 医学部 免疫学)

松下 祥 (埼玉医科大学 医学部 免疫学)

菊地 博達 (埼玉医科大学 医学部 麻酔学)

Analysis of Human Dendritic Cell Responses Mediated by Type 1 Ryanodine Receptor -A Possible Diagnostic Tool for Malignant Hyperthermia-

NARITA YAYOI (Department of Anesthesiology, Saitama Medical University, Moroyama, Iruma-gun, Saitama 350-0495, Japan)

悪性高熱症 (malignant hyperthermia; MH) は、 Ca^{2+} チャネルの一つである1型リアノジンレセプター (ryanodine receptor type 1; RyR1) の変異に起因して、全身麻酔時に筋小胞体の Ca^{2+} 動態異常を示すことにより発症する遺伝性筋疾患である。発症時には筋強直、発熱の他にも多様な症状を呈するため、世界的に統一された臨床診断基準は今のところない。現在、生検により得られた筋細胞のCICR (Ca^{2+} induced Ca^{2+} release) を確定診断に用いているが、高度の侵襲性を有すること、検査時間が長いこと、施設の制限等により普及していない。したがって、侵襲性の少ない一般採血による検査が可能になれば、日常検査の一つとして広く応用することが出来る。

樹状細胞 (dendritic cells; DCs) は末梢血中に存在する白血球の一つであり、種々の刺激に対して液性因子産生や細胞遊走、形態学的変化等、多様な細胞応答を示し、免疫制御において重要な役割を演じている。しかし、ヒトDCにおけるRyR発現を確認した報告は現在のところ無い。我々はこのDCに着目し、RyRサブタイプの発現およびRyRを介した Ca^{2+} 応答性を解析した。その結果、DCはRyR1遺伝子を発現しており、そのRyRを特異的に刺激することで細胞内 Ca^{2+} ストアに由来する Ca^{2+} 上昇を示した。また、この Ca^{2+} 上昇はRyR阻害剤により抑制された。従って、DCには Ca^{2+} チャネルとして機能するRyR1が存在し、これを介して特異的な細胞応答を示す可能性がある。DCはMH素因者を同定する新規診断法開発のために、RyR1応答を指標として患者と健常人の相違点を探索するのに有用である。

Keywords: 悪性高熱症, 樹状細胞, リアノジン受容体

緒言

悪性高熱症 (malignant hyperthermia; MH) は、全身麻酔時に使用する揮発性の吸入麻酔薬や脱分極性
医学博士 甲第1049号 平成19年3月23日 (埼玉医科大学)

筋弛緩薬の使用により発症する筋疾患である。臨床症状は高熱、筋強直、呼吸性・代謝性アシドーシス、頻脈、不整脈、高カリウム血症や高CK血症、ミオグロビン尿等を呈する^{1,2)}。この疾患は常染色体優性遺伝を示すが、日常生活上は全く問題がなく、全身麻酔を受

けた場合にのみ発症するため、患者は悪性高熱症素因者 (malignant hyperthermia susceptible; MHS) と表現される。発症した場合には重篤で、適切な治療が行なわれなかった場合には死に至ることもある²⁾。疾患の本態は骨格筋細胞内のカルシウムイオン (calcium ion; Ca^{2+}) 動態異常に起因する代謝亢進であり、MHに特異的な臨床症状はなく、世界的に統一された臨床診断基準は今のところ存在しない。

骨格筋細胞内の Ca^{2+} は、骨格筋の収縮及び解糖作用やミトコンドリア機能を調節している。 Ca^{2+} はアクチンフィラメント上にあるトロポニンCと結合することで、トロポミオシンとアクチンの構造的変化を起こし、ミオシンにあるATPaseを活性化することでATPが分解され、筋収縮がおこると考えられている。また、骨格筋細胞内の Ca^{2+} が増加すると、細胞内のグリコーゲンからグルコースへ、さらにグルコースが分解されエネルギーと乳酸を産生する。骨格筋小胞体 (sarcoplasmic reticulum; SR) の Ca^{2+} が調節レベルを超えて上昇すると、ミトコンドリア内に Ca^{2+} を取り込み貯蔵する機能が作動する。ミトコンドリアではATPの需要増加に対応して、好氣的代謝が活性化されて酸素を消費してATPを産生する。また、一過性の Ca^{2+} の増加に対しては、ATPを消費して骨格筋小胞体へ Ca^{2+} を取り込み、骨格筋細胞内の Ca^{2+} を維持しようとする作用もある。しかし、MHSに揮発性吸入麻酔薬やサクシニルコリン (SCh) が投与されると、骨格筋の Ca^{2+} 調節機構が破綻して Ca^{2+} 濃度が上昇する。その結果、筋収縮やグリコーゲンの分解が活性化され、SRへの Ca^{2+} の取り込みが増加する。これらにはATPが必要であるため、ミトコンドリアでは、 Ca^{2+} を取り込む作用以外にもATP産生のために好氣的代謝が促進され、酸素を消費してATPが産生される。骨格筋の収縮、ミトコンドリア好氣的代謝、解糖系、ATPの加水分解などにより熱が産生される。MHではこのような一連の反応の結果、 O_2 とATPとグリコーゲンが枯渇して、 CO_2 と乳酸と熱が過剰に産生され、最終的には骨格筋細胞膜も障害されと考えられている³⁻⁵⁾。つまり、MHの最初の変化は骨格筋細胞内での Ca^{2+} の上昇である。

小胞体膜上の Ca^{2+} チャネルには、リアノジン受容体 (ryanodine receptor; RyR) とイノシトール三リン酸受容体 (inositol triphosphate receptor; IP_3R) がある⁶⁾。 IP_3R は、ホスホリパーゼC γ の作用によりホスファチジルイノシトール2リン酸がイノシトール三リン酸とジアシルグリセロールに分解されることにより産生される。 IP_3R はイノシトール三リン酸が結合して活性化され、これによって Ca^{2+} 遊離が誘発される⁷⁾。これに対しRyRは植物アルカロイドであるリアノジンが特異的に結合する受容体であり^{8,9)}、リアノジンの結合により受容体は開口状態に固定される。この受容体は細胞質内の Ca^{2+} 濃度が上昇することにより細胞内ストアか

ら Ca^{2+} が放出されるという機能、つまり Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release (CICR) を担っている⁹⁾。

RyRには、主に骨格筋に存在する1型、主に心筋に存在する2型、主に脳組織に存在する3型の、3種類のサブタイプが存在する¹⁰⁻¹⁴⁾。これら3種のサブタイプは別々の遺伝子にコードされ、それぞれ約5000アミノ残基より構成されているが、65%以上のアミノ酸配列の相同性があり、それぞれが類似の構造的特徴を有している¹⁵⁾。悪性高熱症の原因遺伝子であるRyR1は、ヒトでは第19染色体に位置し、106エクソン遺伝子で、5038アミノ酸から構成される大きなタンパク質をコードすることが知られている^{11,12)}。マウスでは第7染色体に位置し、RyR1欠損マウスは呼吸不全によると考えられる新生致死の表現型を示し、その骨格筋組織は顕著な退縮を示す¹⁶⁾。

現在のMHの確定診断は、局所麻酔下に筋生検を行い、骨格筋の Ca^{2+} 動態異常を直接観察することにより行われている。しかしこの方法にはいくつかの問題点がある。1. 素因者への侵襲性が高いこと、2. CICR速度の測定を行っている施設が少ないこと、3. 筋肉採取後、48時間以内に検査を終了する必要があること、4. 測定に時間がかかり、同時に何例も検査をすることが不可能である等が挙げられる²⁾。原因遺伝子 (RyR1) が判明していることから、遺伝子の変異点を検索する方法も試みられたが、人種による変異点の差や、変異点の不明な症例も多いことが明らかとなっており、遺伝子変異の検索による診断は困難とされている¹⁷⁾ (表1)。

遺伝要因を有するヒトが、MHを発症する可能性があるかどうかを、侵襲性の高い筋肉の生検に頼らずに、簡便で、より精度が高い方法で予測することができれば、この疾患の解明、及び予防に貢献できる。採血による検査法は簡便で、患者への侵襲性の低い診断法といえる。

リンパ球は抗原や種々の液性因子により刺激されることで多様なサイトカイン産生性を示す。MHでみられる臨床症状は筋強直や代謝性アシドーシス、頻脈、体温上昇等多様であり、サイトカインによる作用等、免疫システムを巻き込んだ結果生じる可能性もある¹⁸⁾。近年、Bリンパ球には Ca^{2+} 放出チャネルとして機能するRyR1と IP_3R が存在し¹⁹⁾、これらの相互作用が多様な免疫応答に関与していることが示唆されている。

最近、 Ca^{2+} チャネルとして機能するRyR1が、マウスの樹状細胞 (dendritic cell; DC) に発現することが明らかにされた²⁰⁾。DCは生体内の至る所に存在し、常に外界からの異物の侵入を監視し、生体内に侵入する異物特有の構造パターンを認識することで、未成熟な状態から免疫応答を惹起する成熟DCへと分化する。さらに、認識した異物の構造の違いにより、異なる分化

表1. 現在の悪性高熱症診断法

検体 (採取法)	検索対象	問題点
スキンドファイバー (筋生検)	CICR速度の測定	侵襲性が高い 施設が少ない 採取後、48時間以内の検査が必要
DNA (採血)	遺伝子変異検索	変異点多様 (人種差、変異点不明例もあり)
B細胞 (採血)	IL-1 β 測定	産生されるIL-1 β は微量
筋細胞 (筋生検)	IL-6測定	侵襲性が高い

CICR; Ca²⁺ induced Ca²⁺ release

を経ることで免疫応答性 (特にヘルパー T (Th) 応答性) を制御している²¹⁾. 細菌由来の LPS を認識した DC は, 主に細胞性免疫応答 (Th1) を誘導し, 寄生虫などに由来する特殊な糖脂質の糖鎖構造を認識した DC は, 主に体液性免疫応答 (Th2) を誘導する²²⁻²⁶⁾. このように高度に発達分化した免疫担当細胞は, 種々の刺激に対し多様な遺伝子を発現し, 生体内の免疫恒常性を維持するために重要な役割を演じている. さらに, DC は種々の刺激により特殊な液性因子を産生するだけでなく, 細胞遊走, 形態学的変化等多様な細胞応答を示すことから, MHS と健常人との相違点を, これらをターゲットとして探索するのに有用である.

本研究では, ヒト DC を用いた悪性高熱症診断法の開発を目的として, ヒト DC における RyR サブタイプの発現と RyR の Ca²⁺ チャネルとしての機能を RyR アゴニストを用いて評価し, その有用性を明らかにした.

材料と方法

モノサイト由来 DC (monocyte-derived dendritic cells; Mo-DCs) の誘導

インフォームドコンセントの得られた健常人ボランティアの末梢血から Ficoll-Paque を用いた密度勾配遠心法により末梢血単核球 (peripheral blood mononuclear cells; PBMCs) を分離した. さらにこの PBMC より, CD14 MicroBeads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) を用いて CD14 陽性細胞を分離した. 分離した CD14 陽性細胞を 6 穴プレートに 2×10^6 /ml になるように調整し, 50 ng/ml ヒトリコンビナント (rh) IL-4, および 50 ng/ml rhGM-CSF (Pimmune, Osaka, Japan) を加えた 5% ヒト血清入り RPMI1640 (SIGMA, St Louis, MO) で 5 日間培養したものをモノサイト由来樹状細胞として用いた. DC に成熟刺激を加えないものを未熟 DC (immature DC; iDC) とし, iDC に成熟誘導因子であるプロスタグランジン E₂ (PGE₂) (10 μ M) + TNF α (100 ng/ml), あるいは LPS (10 μ g/ml) を加え, 48 時間培養して得られたものを成熟 DC として解析に用いた.

RT-PCR による RYR 発現の評価

ヒト免疫担当細胞株; (human acute monocytic leukemia cell line) THP-1 (モノサイト), Jurkat (T 細胞), CD14 陽性モノサイト, モノサイト由来 DC (iDC, PGE₂-DC, LPS-DC) より total RNA を抽出し (RNeasy Mini Kit, QIAGEN, Maryland, USA), complementary DNA (以下 cDNA) を合成した (Omniscript RT kit, QIAGEN, Maryland, USA). 内在性のコントロールとして β -actin を使用し, RyR1-3 の陽性コントロールとしてヒト脳 cDNA (Origene, Rockville, MD, USA) を使用した. 以下に示すプライマーを用いて各 RyR サブタイプの遺伝子発現を Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) 法により評価した.

RyR1; 5'-GACATGGAAGGCTCAGCTGCT-3',
5'-CAGATGAAGCATTGTTGCTCTCCAT-3',
RyR2; 5'-AAGGAGCTCCCCACGAGAAGT-3',
5'-CAGATGAAGCATTGTTGCTCTCCAT-3',
RyR3; 5'-AAGAGGAAGAAGCGATGGT-3',
5'-CAGATGAAGCATTGTTGCTCTCCAT-3',
 β -actin; 5'-CCTCGCCTTTGCCGATCC-3',
5'-GGATCTTCATGAGGTAGTCAGTC-3',

PCR 反応は 95°C 1 分, 62°C 1 分, 72°C 2 分, 30 サイクルで反応させた.

細胞内カルシウム動態の測定

calcium buffer (calcium buffer; 145 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM Na₂HPO₄, 1 mM MgCl₂, 5 mM glucose, 1 mM CaCl₂, and 10 mM HEPES (N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid; pH 7.5)) および Ca 指示薬 Fura-2-AM (5 μ M) (Biotium, Hayward, CA, USA) で DC を 4°C, 30 分インキュベートした. 1×10^6 /ml に調整した DC を, cell tak (BD Biosciences, CA, USA) を塗布したガラスベースディッシュ (Iwaki, Chiba, Japan) に固定し, 4°C にて 30 分間静置した. この際に RyR1 阻害薬として 20 μ M ダントロレン (Calbiochem, Darmstadt,

Germany), IP₃R阻害薬として10 μ M ゼストスポンギン C (Wako, Osaka, Japan), 細胞外Ca²⁺キレート剤として5 mM EGTA (WAKO, Osaka, Japan), 細胞内Ca²⁺キレート剤としてBAPTA-AM (nacalai tesque, Kyoto, Japan) 存在あるいは非存在下のものを用意した. これを37°Cに保ち, RyRアゴニストである細胞内Ca²⁺誘導性試薬(4-クロロ-m-クレゾール; 4-chloro-*m*-cresol; 4CmC, ならびにATP)を直接添加した. ニコンTE2000倒立顕微鏡(Nikon ECLIPSE TE 2000)とAqua Cosmos画像解析装置(浜松ホトニクス; Hamamatsu Photonics)を用いて5秒毎の蛍光強度を2波長励起1波長蛍光計測(340 nm, 380 nm)した. 結果は340/380 nm 蛍光強度比にて示した.

結果

1. ヒトDCはRyR1を発現する

主なヒト免疫担当細胞におけるRyRサブタイプの遺伝子発現を評価した. THP-1 (モノサイト), Jurkat (T細胞), およびヒトCD14陽性モノサイト, iDC, PGE₂-DC, LPS-DCを解析に用いた. ヒト脳細胞はすべてのRyRサブタイプ(RyR1, 2および3)を発現する為, これを陽性コントロールとした. また, β -actinは内在性コントロールとした. 図1に示すように, RyR1はTHP-1, CD14モノサイト, iDC, PGE₂-DC, LPS-DCに発現が認められた. 特にiDCは, PGE₂-DC, LPS-DCなどの成熟DCに比較してRyR1遺伝子の高発現を認めた. RyR2はTHP-1のみに発現が認められたがCD14モノサイト, iDC, および分化誘導されたDCには発現が認められなかった. RyR3を発現する免疫担当細胞は認められなかった.

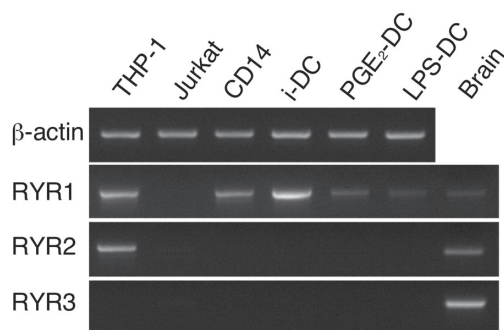


図1. ヒトDCにおけるRyRサブタイプの遺伝子発現. THP-1, Jurkat, およびヒトCD14モノサイト, iDC, PGE₂-DC, LPS-DCにおけるRyRサブタイプの発現をRT-PCR法で解析した結果を示す. 脳cDNAは各RyRサブタイプの陽性コントロールとして, β -actinは内在性コントロールとして使用した.

2. 4CmCはヒトDCにおける細胞内ストアからの細胞内Ca²⁺上昇を誘導する

先に示したように, ヒトDCはRyR1遺伝子を発現することが明らかである. そこで我々は, RyRアゴニストである4CmCをDCに付加することによって, 細胞内Ca²⁺が上昇するかを検討した(図2).

その結果, 細胞内外のCa²⁺を除去せずに4CmC(500 μ M)刺激することによりヒトDCは, 細胞内Ca²⁺の持続性の上昇を示した(図2A). さらに, EGTAを用いて細胞外Ca²⁺を除去して4CmC刺激した場合においては, 細胞内Ca²⁺の一過性の上昇を示した(図2B). 一方, BAPTA-AMを用いて細胞内Ca²⁺を除去して4CmC刺激した場合では細胞内Ca²⁺上昇は認められなかった(図2C). また, EGTAとBAPTA-AMの両方を存在させ, 細胞内外のCa²⁺をキレートした状態で4CmC刺激した場合においても細胞内Ca²⁺上昇は認められなかった(図2D).

以上の結果より, ヒトiDCは4CmC刺激することにより細胞内Ca²⁺上昇を示すが, この細胞内Ca²⁺上昇は細胞内Ca²⁺ストアに由来することが明らかとなった.

3. ヒトiDCは4CmC刺激とATP刺激に対し, RyRを介した細胞内Ca²⁺上昇を示す

4CmC刺激した際に認められる細胞内Ca²⁺上昇が,

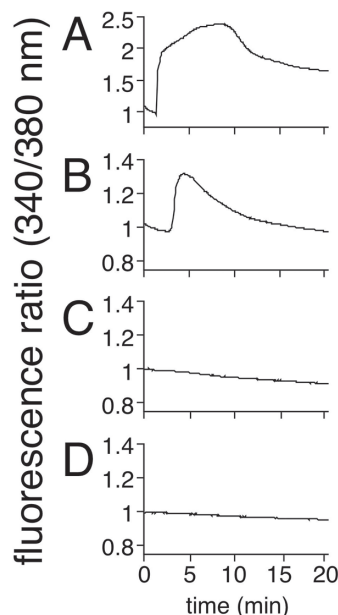


図2. 4CmCに対するヒトDCのCa²⁺応答性. A; EGTA(5 mM)非存在下, BAPTA-AM(50 μ M)非存在下でヒトDCを4CmC(500 μ M)刺激した際のCa²⁺応答を示す. B; EGTA存在下, 4CmC刺激したヒトDCにおけるCa²⁺応答を示す. C; BAPTA-AM存在下で4CmC刺激したヒトDCにおけるCa²⁺応答を示す. D; EGTA存在下, BAPTA-AM存在下で4CmC刺激したヒトDCにおけるCa²⁺応答を示す. 横軸は時間, 縦軸は2波長励起1波長蛍光計測によって得られた蛍光比, fluorescence ratio (340/380 nm)を示す.

RyR特異的な応答であるかを評価するために、RyR阻害薬であるダントロレン、あるいはIP₃R阻害薬であるゼストスポンギンCを作用させ、それぞれの受容体機能を阻止した状態で、4CmC (RyR刺激薬)、あるいはATPで刺激した。ATPは細胞表面上のP2Y受容体に結合し、シグナルを伝達することによってIP₃Rを活性化し、細胞内Ca²⁺上昇を促進する。また、ATPはRyRに対してアゴニストとして作用し、細胞内Ca²⁺上昇に促進的に作用することが知られている。

細胞外のCa²⁺をキレートし、各受容体の阻害薬のない状態で、DCを4CmC刺激した場合には細胞内Ca²⁺の上昇を示した(図3A)。ダントロレン存在下、4CmC刺激した場合には、DCにおける細胞内Ca²⁺上昇の抑制が認められた(図3B)。一方、ゼストスポンギンC存在下、DCを4CmC刺激した場合には、細胞内Ca²⁺上昇に抑制は認められなかった(図3C)。以上より、4CmC刺激により誘導される細胞内Ca²⁺上昇は、RyRを介したものであり、IP₃Rを介さない応答であることが示唆された。

細胞外のCa²⁺をキレートせずに、また各受容体の阻害薬のない状態で、DCをATP刺激した場合には細胞内Ca²⁺の上昇が認められた(図4A)。一方、ダントロレン存在下ATP刺激した場合には、DCにおける細胞内Ca²⁺上昇の抑制が認められた(図4B)。以上より、ATP刺激により誘導されるDCの細胞内Ca²⁺上昇にはRyRを介した応答が関与することが示唆された。

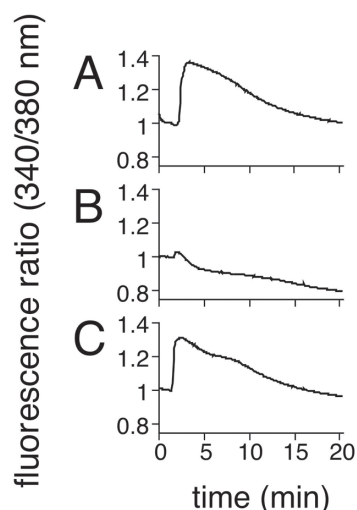


図3. ヒトDCにおける4CmCによるRyRを介したCa²⁺応答性。A; EGTA存在下、ヒトDCを4CmC刺激した際のCa²⁺応答を示す。B; EGTA存在下、ダントロレン存在下、ヒトDCを4CmC刺激した際のCa²⁺応答を示す。C; EGTA存在下ゼストスポンギンC存在下、ヒトDCを4CmC刺激した際のCa²⁺応答を示す。横軸は時間、縦軸は2波長励起1波長蛍光計測によって得られた蛍光比、fluorescence ratio (340/380 nm)を示す。

考 察

MHは、全身麻酔時に使用する揮発性の吸入麻酔薬や脱分極性筋弛緩薬の使用により発症するが、1. 臨床症状が多様であること^{1,2)}、2. EtCO₂の上昇、体温上昇など不適切な麻酔によっても同様の症状が見られること、3. 甲状腺疾患等、合併症依存性を示すこと等の理由により、疾患自体の鑑別が難しいとされている。近年、Bリンパ球およびEBウイルス形質転換B細胞を4CmC刺激することにより、RyR1を介して細胞内Ca²⁺が上昇することが報告された^{19,27)}。すでに4CmC刺激によりEBウイルス形質転換B細胞が産生するIL-1β¹⁸⁾、あるいは筋細胞が産生するIL-6²⁸⁾を指標にMHSを同定しようとする試みがある。前者は、4CmC刺激に対してEBウイルス形質転換B細胞が産生するIL-1βは微量であるため、その検出が困難であることが問題点である。一方、後者は生検時の生体への侵襲性が高いことが問題点である。従ってこれらを応用してMHSと健常人との差を日常検査に用いるのは困難である。また、これらの液性因子を短時間で大量に産生させるのに必要な4CmC濃度は極めて細胞毒性が高く、生理的細胞応答とは大きく異なっている等の点から、診断への有用性および普遍性に乏しい。一方、RyR1の遺伝子変異を解析することによりMHSを診断する方法が報告されているが、MHSにおけるRyR1遺伝子の変異が複数箇所にわたって存在すること、さらにこれらの変異部位が人種により異なる等の理由から正確な診断を行うことが困難とされている²⁹⁾。

DCは生体内の至る所に存在し、異なる分化を経ることで免疫応答性(特にヘルパーT(Th)応答性)を制

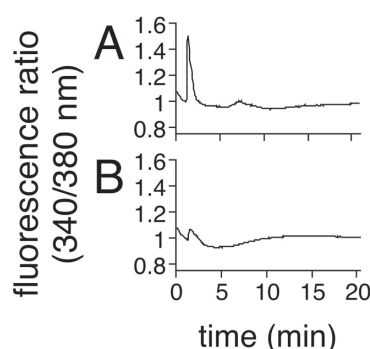


図4. ATP刺激におけるCa²⁺上昇にはRyRが関与する。A; EGTA非存在下、ヒトDCをATP刺激した際のCa²⁺応答を示す。B; EGTA非存在下ダントロレン存在下、ヒトDCをATP刺激した際のCa²⁺応答を示す。横軸は時間、縦軸は2波長励起1波長蛍光計測によって得られた蛍光比、fluorescence ratio (340/380 nm)を示す。

御する高度に発達分化した免疫担当細胞である。特に、DCから産生される種々の内因性発熱物質は、悪性高熱症で認められる多様な症状を構成する可能性があり、RyR1アゴニストに対するDC応答性を評価することで、MHの病態への関与も明らかとなるかもしれない。

マウスDCのRyR発現を確認した報告はすでに存在する²⁰⁾。しかし、ヒトのDCのRyR発現を確認した報告は現在のところない。本研究で我々はヒトのDCにおけるRyRの発現をRT-PCR法を用いて確認した。RyR1は健常人のCD14モノサイト、iDC、PGE₂-DC、LPS-DCに発現していた。また、iDCはPGE₂-DC、LPS-DCなどの成熟DCに比較してRyR1遺伝子を高発現していることが明らかになった。LPS-DCやPGE₂-DCは、成熟刺激により誘導されるサイトカイン、ケモカイン、細胞表面分子等の遺伝子発現が選択的に上昇することが知られている。したがって、RyR1遺伝子発現量が相対的に減少して見えているのかもしれない。RyR1蛋白発現量の解析、および成熟DCにおけるRyRを介したCa²⁺応答の評価が必要である。RT-PCRによる解析結果では、成熟DCよりiDCの方がRyR1遺伝子の発現が高かったために、RyRアゴニストに対するCa²⁺応答性はiDCが最も高いことが予想された。従って、Ca²⁺応答性の評価にiDCを用いた。

iDCをRyRアゴニストにより刺激した場合に、Ca²⁺上昇が認められ、さらに細胞外のCa²⁺をキレートした場合でも一過性のCa²⁺上昇が見られた。これに対し、細胞内Ca²⁺をキレートすると、Ca²⁺上昇は認められなかった(図2)。従ってRyR刺激によるCa²⁺上昇は細胞内Ca²⁺ストアに由来することが明らかとなった。また、iDCをRyR刺激した際に認められるCa²⁺上昇は、RyR阻害薬であるダントロレンによって抑制されたことから、この反応はRyRを介したものと考えられる。DCにはRyR1遺伝子のみしか発現しない為(図1)、4CmCによって誘導されるCa²⁺上昇はRyR1を介したものと考えられる。さらにIP₃Rの特異的阻害薬であるゼストスポンギンCは、4CmC刺激時のCa²⁺上昇を阻害しないことから4CmCにより誘導されるCa²⁺上昇はIP₃Rを介さない応答と考えられる(図3)。ATPはRyRに対してアゴニストとして作用し、細胞内Ca²⁺上昇に促進的に作用することが知られている。これに一致して、RyR阻害薬存在下でATP刺激した場合では、DCのCa²⁺上昇は認められなかった(図4)。従って、ATP刺激によるDCのCa²⁺上昇過程にはRyRを介したCa²⁺移動が関与するものと考えられる。

以上より、ヒトDCにはCa²⁺チャネルとして機能するRyR1が発現していることが明らかとなった。また、RyRアゴニスト刺激におけるDCのCa²⁺応答にはRyRを介したCa²⁺の移動が関与していることが示唆された。従って、ヒトDCは、MHSと健常人との相違

点をRyR1を介したDC応答性をターゲットとして探索するのに有用である。Ca²⁺測定は日常検査に用いるのは困難である。しかしRyRアゴニスト刺激により特異的に産生されるDCの液性因子等を検出することができれば広く日常検査として応用が可能となる。またMHSと健常人のDC応答性の相違点とCICRの相関、遺伝子変異との関連を明らかにすることにより、より正確な診断法を確立できるものと考えられる(図5)。

最近、RyR1ノックアウトマウスのDCには機能不全が認められないことが報告された³⁰⁾。ヒトDCは微生物由来の特殊な構造を認識して多様な応答を示すが、これらの応答性にRyR1の関与はないだろうか。筋細胞では、T管構造が存在するために、電位依存性Ca²⁺チャネルであるジヒドロピリジンレセプターがRyRと近接して存在し、電位刺激をRyRに伝える膜電位センサーとして機能している。筋細胞に特有に認められるT管構造はDCには存在しないため、ジヒドロピリジンレセプターとRyRの関係およびCa²⁺応答性は、筋細胞と異なっている可能性がある。これら筋細胞とDCのRyR機能の相違点、および免疫応答性へのRyR機能関与について、今後も継続して探索していきたいと考えている。

結 論

我々は、ヒトDCにおいて3つのRyRサブタイプの中でRyR1のみが発現することを初めて明らかにした。さらに、RyR1にアゴニスト活性を示す4CmCやATP刺激に対し細胞内Ca²⁺上昇を示すことを初めて示した。ヒトDCは、MH素因者と健常人との相違点を探索するのに有用なターゲット細胞である。

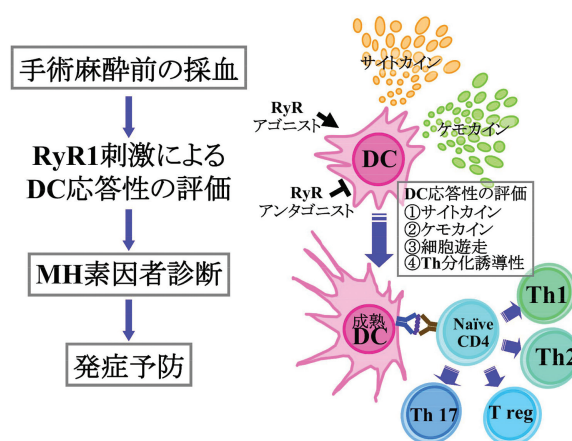


図5. ヒトDCを用いたMHの新規診断法の開発。手術麻酔前の採血により得られたDCを刺激し、産生されるサイトカイン、ケモカインの測定を行うことでMHSの診断を行うことができるかもしれない。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導いただきました埼玉医科大学医学部麻醉学教授、菊地博達先生、埼玉医科大学医学部免疫学教授、松下祥先生に心より感謝いたします。また、直接御指導いただきました埼玉医科大学医学部免疫学講師、植村靖史先生に心より感謝いたします。また、埼玉医科大学医学部免疫学、埼玉医科大学医学部麻醉学の教室員、中央研究施設形態部門の大島晋先生、中央研究施設機能部門の坂本安先生、皆様からの多くの御協力に深謝いたします。本研究課題は平成17年度落合記念賞を受賞いたしました。

参考文献

- 1) 弓削孟文. 悪性高熱症 最新の知見. 麻酔 1994;43: 86-92.
- 2) 向田圭子. 悪性高熱症 最新の知見と診断・治療. LiSA 1995;2:50-8.
- 3) Avila G. Intracellular Ca^{2+} dynamics in malignant hyperthermia and central core disease: established concepts, new cellular mechanisms involved. Cell Calcium 2005;37:121-7.
- 4) Wappler F. Malignant hyperthermia. Eur J Anaesthesiol 2001;18:632-52.
- 5) Loke J, MacLennan DH. Malignant hyperthermia and central core disease: disorders of Ca^{2+} release channels. Am J Medicine 1998;104:470-86.
- 6) Grafton G, Thwaite L. Calcium channels in lymphocytes. Immunol 2001;104:119-26.
- 7) Pawson T, Scott JD. Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins. Science 1997;278: 2075-80.
- 8) Jenden DJ, Fairhurst AS. The pharmacology of ryanodine. Pharmacol Rev 1969;21:1-25.
- 9) Fleischer S, Ogunbunmi EM, Dixon MC, Fleer EA. Localization of Ca^{2+} release channels with ryanodine in junctional terminal cisternae of sarcoplasmic reticulum of fast skeletal muscle. Proc Natl Acad Sci USA 1985;82:7256-9.
- 10) Otsu K, Willard HF, Khanna VK, Zorzato F, Green NM, MacLennan DH. Molecular cloning of cDNA encoding the Ca^{2+} release channel (ryanodine receptor) of rabbit cardiac muscle sarcoplasmic reticulum. J Biol Chem 1990;265:13472-83.
- 11) Takeshima H, Nishimura S, Matsumoto T, Ishida H, Kangawa K, Minamino N, et al. Primary structure and expression from complementary DNA of skeletal muscle ryanodine receptor. Nature 1989; 339:439-45.
- 12) Zorzato F, Fujii J, Otsu K, Phillips M, Green NM, Lai FA, et al. Molecular cloning of cDNA encoding human and rabbit forms of the Ca^{2+} release channel (ryanodine receptor) of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. J Biol Chem 1990;265:2244-56.
- 13) Hakamata Y, Nakai J, Takeshima H, Imoto K. Primary structure and distribution of a novel ryanodine receptor/calcium release channel from rabbit brain. FEBS Lett 1992;312:229-35.
- 14) Takeshima H, Nishimura S, Nishi M, Ikeda M, Sugimoto T. A brain-specific transcript from the 3'-terminal region of the skeletal muscle ryanodine receptor gene. FEBS Lett 1993;322:105-10.
- 15) Takeshima H. Primary structure and expression from cDNAs of the ryanodine receptor. Ann NY Acad Sci 1993;707:165-77.
- 16) Takeshima H, Iino M, Takekura H, Nishi M, Kuno J, Minowa O, et al. Excitation-contraction uncoupling and muscular degeneration in mice lacking functional skeletal muscle ryanodine-receptor gene. Nature 1994;369:556-9.
- 17) Ibarra MC, Wu S, Murayama K, Minami N, Ichihara Y, Kikuchi H, et al. Malignant hyperthermia in Japan: mutation screening of the entire ryanodine receptor type 1 gene coding region by direct sequencing. Anesthesiol 2006;104:1146-54.
- 18) Girard T, Cavagna D, Padovan E, Spagnoli G, Urwyler A, Zorzato F, et al. B-lymphocytes from malignant hyperthermia-susceptible patients have an increased sensitivity to skeletal muscle ryanodine receptor activators. J Biol Chem 2001;276:48077-82.
- 19) Sei Y, Gallagher KL, Basile AS. Skeletal muscle type ryanodine receptor is involved in calcium signaling in human B lymphocytes. J Biol Chem 1999;274: 5995-6002.
- 20) O'Connell PJ, Klyachko VA, Ahern GP. Identification of functional type 1 ryanodine receptors in mouse dendritic cells. FEBS Lett 2002;512:67-70.
- 21) Kapsenberg ML. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. Nat Rev Immunol 2003;3: 984-93.
- 22) Whelan M, Harnett MM, Houston KM, Patel V, Harnett W, Rigley KP. A filarial nematode-secreted product signals dendritic cells to acquire a phenotype that drives development of Th2 cells. J Immunol 2000;164:6453-60.
- 23) Okano M, Satoskar AR, Nishizaki K, Harn DA, Jr. Lacto-N-fucopentaose III found on Schistosoma mansoni egg antigens functions as adjuvant for proteins by inducing Th2-type response. J Immunol 2001;167:442-50.

- 24) van der Kleij D, Latz E, Brouwers JF, Kruize YC, Schmitz M, Kurt-Jones EA, et al. A novel host-parasite lipid cross-talk. Schistosomal lysophosphatidylserine activates toll-like receptor 2 and affects immune polarization. *J Biol Chem* 2002;277:48122-9.
- 25) van der Kleij D, Yazdanbakhsh M. Control of inflammatory diseases by pathogens: lipids and the immune system. *Eur J Immunol* 2003;33:2953-63.
- 26) Agrawal S, Agrawal A, Doughty B, Gerwitz A, Blenis J, Van Dyke T, et al. Cutting edge: different Toll-like receptor agonists instruct dendritic cells to induce distinct Th responses via differential modulation of extracellular signal-regulated kinase-mitogen-activated protein kinase and c-Fos. *J Immunol* 2003;171:4984-9.
- 27) Hosoi E, Nishizaki C, Gallagher KL, Wyre HW, Matsuo Y, Sei Y. Expression of the ryanodine receptor isoforms in immune cells. *J Immunol* 2001;167:4887-94.
- 28) Ducreux S, Zorzato F, Muller C, Sewry C, Muntoni F, Quinlivan R, et al. Effect of ryanodine receptor mutations on interleukin-6 release and intracellular calcium homeostasis in human myotubes from malignant hyperthermia-susceptible individuals and patients affected by central core disease. *J Biol Chem* 2004;279:43838-46.
- 29) Kraev N, Loke JC, Kraev A, MacLennan DH. Protocol for the sequence analysis of ryanodine receptor subtype 1 gene transcripts from human leukocytes. *Anesthesiol* 2003;99:289-96.
- 30) Stolk M, Leon-Ponte M, Merrill M, Ahern GP, O'Connell PJ. IP₃Rs are sufficient for dendritic cell Ca²⁺ signaling in the absence of RyR1. *J Leukoc Biol* 2006;80:651-8.