

令和 2 年 6 月 24 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16733

研究課題名(和文) 悪性高熱症の新規原因遺伝子の探索

研究課題名(英文) The search for novel causative genes of malignant hyperthermia

研究代表者

野田 祐子(Noda, Yuko)

広島大学・病院(医)・医科診療医

研究者番号：00790065

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：悪性高熱症を発症した患者や悪性高熱症の家族歴がある患者を対象にリアノジン受容体(RYR1)およびジヒドロピリジン受容体(CACNA1S)の遺伝子変異の解析を行った。16種類の既知の変異と、17種類の新規の原因遺伝子の可能性の高い変異を認めた。新規の原因遺伝子の可能性のある変異は機能解析を行い、原因遺伝子か否かの確認も行った。RYR1とCACNA1Sに変異を認めなかったサンプルは、exome sequenceに提出し、新規の原因遺伝子の探索を試みた。計16サンプル提出し、原因遺伝子の候補を絞ることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

悪性高熱症は主にリアノジン受容体(RYR1)の遺伝子変異が原因であると言われているが、発症した患者のうち実際にRYR1から遺伝子変異が確認されない症例も多い。これはRYR1以外に未知の遺伝子要因が存在していることを示唆しているが、その探索は遅々として進んでおらず、今回の研究は、悪性高熱症の新たな原因遺伝子を探索し、悪性高熱症の遺伝子診断の確立に少なからず寄与できた。

研究成果の概要(英文)：We analyzed gene variants of ryanodine receptor (RYR1) and dihydropyridine receptor (CACNA1S) in patients with malignant hyperthermia and family history of malignant hyperthermia.

We identified 16 known mutations in RYR1 and CACNA1S and 17 variants with a high possibility of a new causative mutation. We also performed functional analysis of variants with a high possibility of a new causative mutation and confirmed whether it was the causative mutation or not. Samples with no mutation in RYR1 and CACNA1S were submitted to the exome sequence to try to find a new causative variants. By submitting a total of 16 samples, we were able to narrow down the candidates for the causative variants.

研究分野：麻酔蘇生学

キーワード：悪性高熱症 リアノジン受容体 ジヒドロピリジン受容体 次世代シーケンサー 遺伝子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

悪性高熱症の原因遺伝子としてリアノジン受容体 (*RYR1*) やジヒドロピリジン受容体 (*CACNA1S*) が挙げられるが、悪性高熱症素因者のうち *RYR1* に遺伝子変異が見つかる症例は約 70% 程度¹⁾ で、*CACNA1S* に遺伝子変異が見つかる症例は約 1% 程度²⁾ である。残りの 30% 前後の症例では原因遺伝子は現状では分からないが、これまでに発表されていない新規の遺伝子がまだいくつかあり、発症に寄与していると思われる。

そこで、今回、悪性高熱症素因を持つ可能性の高い患者(悪性高熱症の発症者、家族、類縁疾患の患者)の血液等から DNA を抽出し、*RYR1* と *CACNA1S* に変異を持つ次世代シーケンサーを用いてスクリーニングを行い、既知の変異を持たず、新規の遺伝子変異を持つ可能性が高いと思われるサンプルについて exome sequence を施行し新規の遺伝子変異の探索を行った。

参考文献：

1) . Ibarra M CA. Malignant hyperthermia in Japan: mutation screening of the entire ryanodine receptor type 1 gene coding region by direct sequencing. *Anesthesiology*. 2006 Jun; 104(6):1146-54.

2) . Stewart SL. Identification of the Arg1086His mutation in the alpha subunit of the voltage-dependent calcium channel (*CACNA1S*) in a North American family with malignant hyperthermia. *Clin Genet*. 2001 Mar; 59(3):178-84.

2. 研究の目的

悪性高熱症は主に *RYR1* の遺伝子変異が原因であると言われているが、発症した患者のうち実際に *RYR1* から遺伝子変異が確認されない症例も多い。これは *RYR1* 以外に未知の遺伝子要因が存在していることを示唆しているが、その探索は遅々として進んでいない。

今回の研究では、悪性高熱症の新たな原因遺伝子を探索し、悪性高熱症の遺伝子診断の確立に寄与することを目的とした。

3. 研究の方法

悪性高熱症を発症した患者や悪性高熱症の家族歴がある患者で悪性高熱症素因の診断のために Ca induced Ca release 検査 (CICR) を受けた患者を対象とした。

悪性高熱症素因の診断のために Ca induced Ca release 検査(CICR)を受ける患者を対象として血液サンプルの採取および DNA の抽出を行った。承諾を得た患者の血液などから DNA 抽出キットを用いて DNA を抽出した。Ion PGM システムを使用して、*RYR1* および *CACNA1S* の遺伝子変異の解析を行った。*RYR1* および *CACNA1S* の変異がスクリーニングできるようにカスタマイズされたパネルを作成し、保存血液などから抽出した DNA を使用して遺伝子変異の検索を行った。

実際には、まず、解析したい DNA に PGM でシーケンスするためのアダプター配列を付加し、PCR による標的配列の増幅を行った。次に、微細な水滴の中にビーズと一分子のライブラリーを入れ、その水滴中で PCR を行うことにより一つのビーズにつき一つの配列が付加したビーズを調整した。解析チップに調整したテンプレートを流し込み、チップ上の各ウェルに一つのビーズを入れた。シーケンスを開始すると 1 ウェルに対して一つの配列が得られた。得られた遺伝子配列を参考配列と比較し、遺伝子変異の有無を確認した。遺伝子変異が見つかった場合は、サンガー法で再確認した。*RYR1* および *CACNA1S* に原因となる遺伝子変異が確認できないサンプルについては、新規の原因遺伝子が存在する可能性があるため、exome sequence を施行して、その探索を行った。

得られた遺伝子情報に対して BWA¹⁾、Samtools²⁾などを用いて解析を加えた。アミノ酸置換による影響を調べるために、PolyPhen³⁾、SIFT⁴⁾ および Mutation Taster⁵⁾ を使用した。

これら統計学的解析は広島大学原爆放射線医科学研究所放射線影響評価研究部門分子疫学研究分野の森野豊之の助言を得ながら研究を進めた。

1) BWA : <http://bio-bwa.sourceforge.net/>

2) Samtools : <http://bio-bwa.sourceforge.net/>

3) Annovar : <http://www.openbioinformatics.org/annovar/>

4) PolyPhen2 : <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>

5) Mutation Taster : <http://www.mutationtaster.org/index.html>

4. 研究成果

これまでに、143 サンプルについて DNA を抽出してスクリーニングを行い、*RYR1* と *CACNA1S* に 16 種類の既知の変異:(*RYR1*: T84M, Q155K, R163C, G341R, R533H, R614L, P1592L, V2280I, R2336H, S2345R, P2366R, R2508C, R2508H, L4838V, I4898T, *CACNA1S*: R174W)

や, 17 種類の新規の原因遺伝子の可能性の高い変異:(R_{YR1}: D167G, E176D, R367Q, S604P, S2345T, I2358T, R2454G, R2625C, E3104K, N3913D, K4477N, A5025G, 38990285_38990287delGGA, CACNA1S: D1382V, F1161L, S879P, A560T)を認めた .
 さらに, これらの *R_{YR1}* や *CACNA1S* に認めた新規の原因遺伝子の可能性のある変異うち, *S2345R* と *S2345T* に関しては機能解析を行い原因遺伝子が否かの確認を行った .
 変異(*S2345R* および *S2345T*) *R_{YR1}* 遺伝子を発現させた HEK293 細胞と, 野生型 *R_{YR1}* 遺伝子を発現した HEK293 細胞作成し, 蛍光指示薬 fura-2/AM を負荷した後, 340 および 380nm の波長で励起し両者の波長比(ratio)を計測することで細胞内のカルシウム動態を評価した¹⁾.
 種々の濃度(0.3125, 0.625, 1.25, 2.5, 5.0, 10.0 および 20.0mM)のカフェインを含有する灌流液を添加し, ratio340/380 変化を測定した . 用量反応曲線から EC₅₀(the half-maximal effective concentration)を計算し, 統計学的検定には対応のない両側 t 検定を用いた . p 値<0.05 を統計学的に有意とした 野生型を発現させた HEK 細胞および *R_{YR1}* 変異型(*S2345R* および *S2345T*) を発現させた細胞のカフェイン用量反応曲線を図 1, 2 示す .

図 1

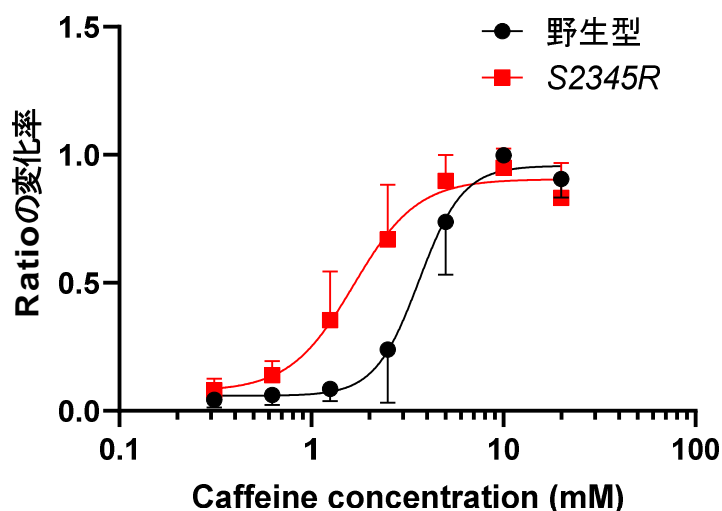
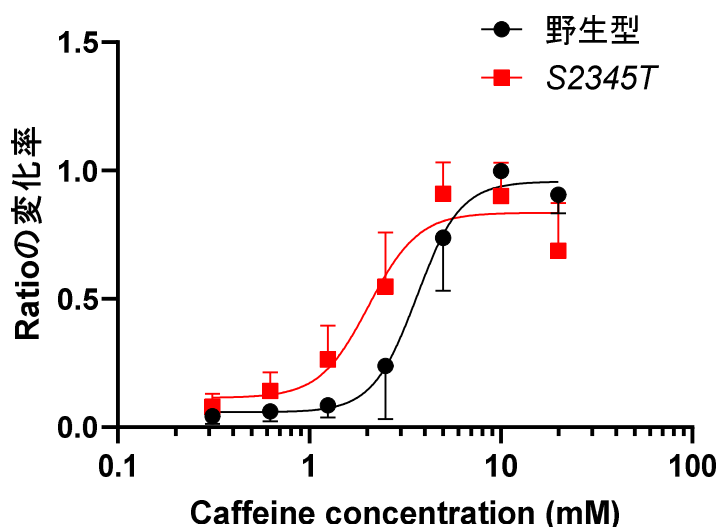


図 2



野生型 (n = 27)の平均 EC₅₀±SD は 3.79±1.05 mM であり, *S2345R* (n = 25) , および *S2345T* (n = 26)平均 EC₅₀±SD はそれぞれ 1.91±0.78 mM (P <0.001)および 2.16±0.84 mM (P <0.001)であった . *S2345R* , *S2345T* いずれの変異によるカルシウム動態の変化が悪性高熱症の発症に寄与していることが示唆された .

また、*RYR1* と *CACNA1S* に悪性高熱症の原因遺伝子となりそうな変異を認めなかったサンプルについては、新規の原因遺伝子を持つ可能性が高いものを exome sequence に提出し、新規の原因遺伝子の探索を試み、現在までに計 16 サンプル提出したが、新規の原因遺伝子の探索は難しく、ある程度原因遺伝子の候補を絞った段階である。今後さらに適切なサンプルがあれば追加で exome sequence に提出して解析を行うことにより、原因遺伝子が特定できる可能性も高くなる。

参考文献：

1) . Tong J, Oyamada H, Demaurex N, Grinstein S, McCarthy TV, MacLennan DH. Caffeine and halothane sensitivity of intracellular Ca²⁺ release is altered by 15 calcium release channel (ryanodine receptor) mutations associated with malignant hyperthermia and/or central core disease. *J Biol Chem.* 1997;272:26332–9.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 野田祐子	4. 巻 53
2. 論文標題 帝王切開を脊髄くも膜下麻酔で2度行った血友病A確定保因者の麻酔管理	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 麻酔と蘇生	6. 最初と最後の頁 55-58
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 野田祐子、三好寛二、近藤隆志、安田季道、向田圭子、河本昌志
2. 発表標題 悪性高熱症の原因であるp.R2508Cを組み込んだリアノジン受容体の温度上昇による細胞内Ca動態は野生型と変わらない
3. 学会等名 日本麻酔科学会第64回学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 神崎理英子、安田季道、向田圭子、原木俊明、三好寛二、大月幸子、野田祐子、河本昌志
2. 発表標題 30年前に悪性高熱症を診断され最近になってCACNA1Sに遺伝子変異が認められた1症例
3. 学会等名 日本臨床麻酔学会第37回大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 野田祐子
2. 発表標題 デブランチ胸部ステントグラフト内挿術後に生じた冠攣縮性狭心症の1例
3. 学会等名 日本心臓血管麻酔学会第22回学術大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yuko Noda, Toshimichi Yasuda, Hirotugu Miyoshi, Keiko Mukaida, Hiroshi Hamada.
2. 発表標題 Functional Analysis of Newly Found Ryanodine Receptor 1 Variants in Malignant Hyperthermia Susceptible Patients.
3. 学会等名 American Society of Anesthesiologists Annual Meeting, 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考