

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18298

研究課題名（和文）線維芽細胞を用いた悪性高熱症の低侵襲的診断法の確立

研究課題名（英文）Establishment of minimally invasive diagnostic method for malignant hyperthermia using fibroblasts

研究代表者

近藤 隆志（Kondo, Takashi）

広島大学・病院（医）・講師

研究者番号：20711774

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,900,000円

研究成果の概要（和文）：筋生検による診断が必要である悪性高熱症（MH）の機能検査を低侵襲的に行うため、線維芽細胞から骨格筋細胞への分化を誘導する転写因子（MyoD1）を皮膚線維芽細胞に導入することで骨格筋細胞（筋管細胞）を作成した。次に、正常線維芽細胞から作成した筋管細胞に対してカルシウム感受性試験を行い、MH患者の筋管細胞に対するカルシウム感受性試験と比較を行った。検討の結果、MH患者由来筋管細胞のカルシウム感受性が正常線維芽細胞から作成した筋管細胞よりも有意に亢進しており、線維芽細胞から作成した筋管細胞によりMHの機能検査を行うことができる可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

悪性高熱症（MH）の機能診断のために必要な筋生検は侵襲が大きく、特に小児においては全身麻酔が必要となるため検査を行うことが困難な実態にある。本研究成果により、正常ヒト線維芽細胞を分化させて作成した筋細胞によって機能解析を行うことができることが示された。現状では、MH患者の皮膚線維芽細胞から分化させた筋細胞を用いた機能解析は実用化されていないが、本研究の方法による皮膚を利用する検査法が確立すれば、従来の筋生検を必要とする検査よりも患者に与える侵襲を軽減することができ、MHの検査が従来よりも普及することが期待される。

研究成果の概要（英文）：To perform a less invasive functional test for malignant hyperthermia (MH), which requires diagnosis by muscle biopsy, we use a transcription factor (MyoD1) that induces the differentiation of fibroblasts into skeletal muscle cells (myotube cells). We created myotube cells by introducing MyoD1 into skin fibroblasts. Next, a calcium sensitivity test was performed on myotube cells prepared from fibroblasts, and a comparison was made with a calcium susceptibility test on myotube cells in MH patients. As a result of the examination, the calcium sensitivity of myotube cells derived from MH patients was significantly higher than that of myotube cells prepared from normal fibroblasts. The results of this study showed the possibility that myotube cells prepared from fibroblasts could be used for MH function testing.

研究分野：麻酔科学

キーワード：悪性高熱症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

悪性高熱症は揮発性吸入麻酔薬や脱分極性筋弛緩薬によって誘発される筋疾患であるが、日常生活ではほとんど症状はなく、ひとたび発症すると迅速に診断・治療が行われないと致命的となり、死亡率は10～15%と報告されている。悪性高熱症の主病因は、骨格筋細胞内に存在する1型リアノジン受容体(RYR1)の遺伝子変異によるカルシウム代謝異常と考えられており、原因薬剤によりRYR1が活性化されることで筋小胞体からのカルシウム放出が促進され、細胞内カルシウム濃度の上昇により骨格筋の異常収縮が生じ、代謝亢進および筋細胞の破壊に伴い発熱、アシドーシス、高カリウム血症、高ミオグロビン血症などの症状を呈する。

悪性高熱症の確定診断を行うためには、遺伝子検査の他に筋生検による機能検査としてCa-induced Ca release (CICR) 検査やIn vitro contracture test (IVCT)が必要であるが、これらの検査は特に小児患者においては筋生検が全身麻酔を伴う侵襲的検査であることが問題である。一方、悪性高熱症に関係するRYR1の表現型の差異は原因遺伝子の変異以外にも多くの環境および遺伝要因によって生じると考えられており、発症の原因となる遺伝子変異に関しては明らかになっていない部分も多い。

2. 研究の目的

CICR 検査のための筋生検を行う際に同時に患者皮膚から採取して培養した線維芽細胞を、筋芽細胞に分化誘導する遺伝子導入試薬により骨格筋細胞に分化させて機能検査を行い、筋生検を必要としない検査法を確立することを主たる目的とする。線維芽細胞から分化させた筋細胞を用いた機能解析は現在実用化されていない。線維芽細胞を用いた診断法が確立すれば、従来の筋生検を必要とする検査よりも患者に与える侵襲を軽減することができ、検査が従来よりも普及することが期待される。

また、細胞の薬剤への反応性の検討を行うことと併せて患者の遺伝子情報を解析することにより、新たな原因遺伝子の同定や、病態のさらなる解明ならびに効果的な治療方法への応用が可能となると考えられる。

3. 研究の方法

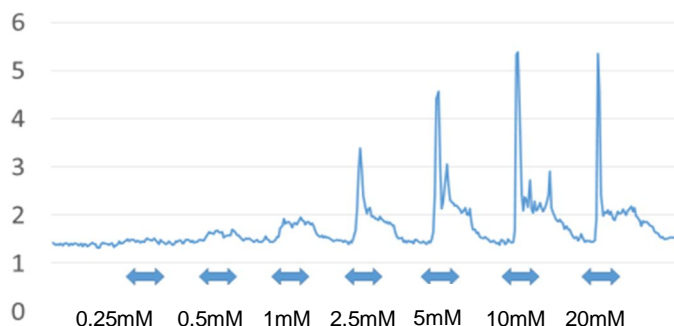
悪性高熱症の確定診断のための機能検査の一つであるCICR 検査を受ける患者を対象とした。CICR 検査は、筋生検を行って採取した筋組織よりスキンドファイバーを作成し、これに種々の濃度のカルシウムを負荷して筋小胞体からのカルシウム放出速度を算出することで、筋小胞体のカルシウム代謝を評価するものである。

まず、対象患者のCICR 検査に際して筋生検を行う際に血液および皮膚の一部を採取し皮膚線維芽細胞を培養し、培養した線維芽細胞に骨格筋細胞への分化を誘導する転写因子(Myod1)を組み込んだ遺伝子発現ベクターを導入することで骨格筋細胞を作成した後、作成した骨格筋細胞に対してカルシウム感受性試験を行うこととした。われわれの研究室で行っているカルシウム感受性試験のプロトコルは以下の通りである。

細胞内カルシウム濃度の測定は、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)を導入した骨格筋細胞に蛍光顕微鏡で二波長の光(340nm/380nm)を照射して観察すると、細胞内カルシウム濃度上昇に伴いFura-2 ratio (340nm/380nm)が上昇することを利用して行う。340/380nm比は、カルシウムイメージングシステムを用いて計算する。カルシウム感受性を評価するために、RYR1 刺激薬(カフェイン)を段階的に負荷してそれぞれの薬剤濃度に対して得られたFura-2 ratioから用量反応曲線を作成して50%効果濃度(EC50)を算出し、コントロールと比較する。

Ca測定の実際(カフェイン負荷)

Fura-2 ratio
(340/380nm)



コントロールは、CICR 検査が陰性 (=カルシウム放出速度の亢進を認めない) の患者から得た骨格筋細胞とする。コントロールと比較して EC50 の有意な低下 (=カルシウム感受性の亢進) を認め、臨床所見や他の検査法でも悪性高熱症の陽性所見が得られた場合、線維芽細胞から作成した骨格筋細胞を用いたカルシウム感受性試験が有用であると考えられる。また、機能検査と並行して対象患者から採取した血液により患者の遺伝子情報を解析することで、悪性高熱症の原因となる新たな原因遺伝子の同定や、病態のさらなる解明が可能となると期待される。

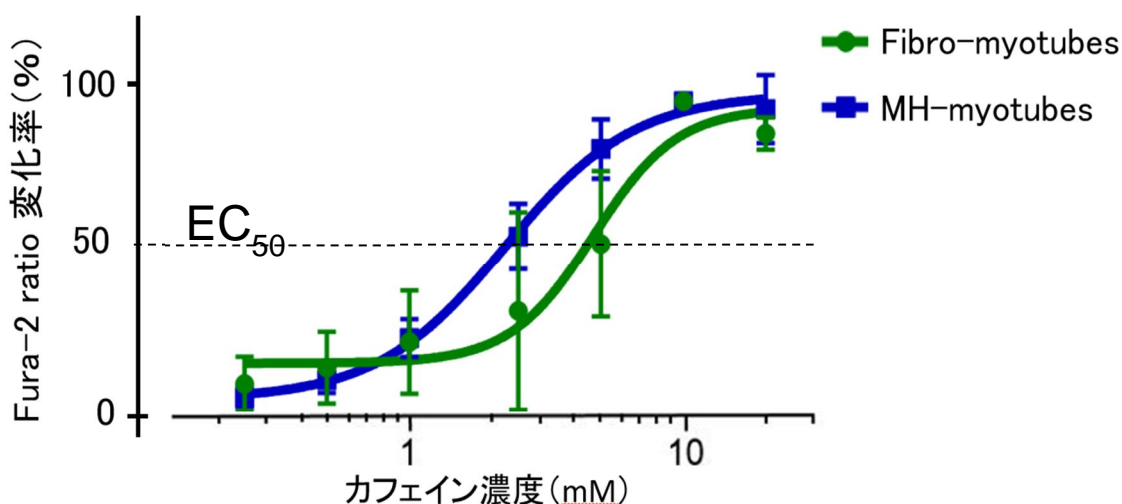
4. 研究成果

本研究の方法は、患者皮膚からの線維芽細胞培養、線維芽細胞から筋細胞への分化誘導、作成した筋細胞による機能解析の3つのプロセスに大きく分けられる。

初年度は実験系を確立するために CICR を受ける MH 疑い患者から皮膚を採取して線維芽細胞の培養を試みたが、CICR を受ける患者が少なく十分な検体を確保することができず皮膚からの線維芽細胞培養法を確立することができなかった。そのため、それと並行して購入した正常ヒト線維芽細胞を使用して同様の実験を行ったが、骨格筋細胞まで分化させていく過程で細胞死を起こしたために機能解析を行える段階に至らなかった。

次年度は、初年度に引き続き MH 疑い患者皮膚からの線維芽細胞培養を進める一方で、正常ヒト線維芽細胞からの筋細胞への分化誘導手法の確立を目指した。初年度と同様に CICR の検査対象患者がほとんどなく MH 疑い患者皮膚の培養法を確立することはできなかったが、正常ヒト線維芽細胞からの筋管細胞への分化誘導が可能となり、機能解析を行う準備を整えることができた。最終年度は、前年と同様に MH 疑い患者皮膚の確保が困難であったため、前年度に確立した細胞分化誘導手法により、正常ヒト線維芽細胞から分化誘導して作成した筋管細胞と MH 患者由来の筋管細胞の2種類の細胞を用いて RYR1 刺激薬(カフェイン)に対する反応性を評価した。カルシウムプローブを導入した筋管細胞にカフェインを段階的に負荷した後、得られた細胞内カルシウム濃度により作成した用量反応曲線から EC50 を算出し、線維芽細胞由来筋管細胞 (fibro 群, n=5) と MH 患者由来筋管細胞 (MH 群, n=10) の間で EC50 を比較して Ca²⁺感受性を評価した。統計学的検定は対応のない t 検定を用い、p<0.05 を有意とした。

検討の結果、EC50(mM)は、fibro 群: 4.97 ± 0.67 , MH 群: 2.40 ± 0.56 であり、MH 群で有意に EC50 が低下していた (p=0.0002)。この結果は、MH 群が fibro 群よりも低濃度のカフェインでカルシウム濃度が上昇すること、つまりカルシウム反応性が亢進していることを示している (下図)。



過去の文献における非 MH 患者由来筋管細胞の EC50 は、 5.08 ± 0.60 mM (n=17) であったと報告されている。今回の検討では、非 MH 患者と MH 患者の筋管細胞を比較した従来の文献的報告と同様に、MH 患者由来筋管細胞の RYR1 刺激に対するカルシウム感受性が線維芽細胞由来筋管細胞よりも有意に亢進しており、線維芽細胞から作成した筋管細胞により MH の機能検査を行うことができる可能性が示された。この検討結果は、2022 年の日本麻酔科学会第 69 回学術集会で発表予定である。

本研究期間中、主な目的であった悪性高熱症の患者皮膚線維芽細胞から作成した筋組織による機能検査の確立はできなかったが、正常ヒト線維芽細胞から分化誘導して作成した筋管細胞による機能解析は可能となり今後の新たな機能検査確立の可能性が示されたことで、悪性高熱症の診断がより簡便に行えることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Tsutsumi Yasuo M., Kakuta Nami, Kawanishi Ryosuke, Tanaka Katsuya, Kanzaki Rieko, Morio Atsushi, Noda Yuko, Miyoshi Hirotsugu, Kondo Takashi, Mukaida Keiko	4. 巻 35
2. 論文標題 Malignant hyperthermia in a 16-day-old infant with congenital diaphragmatic hernia: a case report	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Anesthesia	6. 最初と最後の頁 311 ~ 314
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00540-021-02902-2	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 -
1. 著者名 Kamiya Satoshi, Nakamura Ryuji, Saeki Noboru, Kondo Takashi, Miyoshi Hirotsugu, Narasaki Soushi, Morio Atsushi, Kawamoto Masashi, Hirano Harutoyo, Tsuji Toshio, Tsutsumi Yasuo M.	4. 巻 11
2. 論文標題 Prediction of blood pressure change during surgical incision under opioid analgesia using sympathetic response evoking threshold	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-87636-7	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 -
1. 著者名 Morio Atsushi, Tsutsumi Rie, Kondo Takashi, Miyoshi Hirotsugu, Kato Takahiro, Narasaki Soshi, Satomi Shihō, Nakaya Erika, Kuroda Masashi, Sakaue Hiroshi, Kitamura Tadahiro, Tsutsumi Yasuo M.	4. 巻 31
2. 論文標題 Leucine induces cardioprotection in vitro by promoting mitochondrial function via mTOR and Opa-1 signaling	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases	6. 最初と最後の頁 2979 ~ 2986
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.numecd.2021.06.025	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 -
1. 著者名 Kondo Takashi, Toyota Yukari, Narasaki Soshi, Watanabe Tomoyuki, Miyoshi Hirotsugu, Saeki Noboru, Tsutsumi Yasuo M.	4. 巻 6
2. 論文標題 Intraoperative responses of motor evoked potentials to the novel intravenous anesthetic remimazolam during spine surgery: a report of two cases	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 JA Clinical Reports	6. 最初と最後の頁 97
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s40981-020-00401-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kondo Takashi, Saeki Noboru, Otsuki Sachiko, Tsutsumi Yasuo M.	4. 巻 34
2. 論文標題 Evaluation of a new face mask concept for oxygen administration: a crossover study in healthy volunteers	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Anesthesia	6. 最初と最後の頁 950 ~ 952
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00540-020-02861-0	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 -

1. 著者名 Kondo Takashi, Izumi Hiromichi, Kitagawa Makiko	4. 巻 2020
2. 論文標題 Comparison of the Effects of Desflurane, Sevoflurane, and Propofol on the Glottic Opening Area during Remifentanyl-Based General Anesthesia Using a Supraglottic Airway Device	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Anesthesiology Research and Practice	6. 最初と最後の頁 1 ~ 6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2020/1302898	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 呉 晟名, 高橋 信也, 森田 翔平, 前田 和樹, 片山 桂次郎, 黒崎 達也, 近藤 隆志, 村下 純二, 末田 泰二郎	4. 巻 23
2. 論文標題 大動脈基部・上行置換術後の覚醒遅延に門脈体循環シャントの関与が疑われた一例	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cardiovascular Anesthesia	6. 最初と最後の頁 83-87
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11478/jscva.2019-3-001	査読の有無 無
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 0件)

1. 発表者名 里見志帆, 荒田久美子, 近藤隆志, 加藤貴大, 堤保夫
2. 発表標題 成人心臓手術の術後管理に高流量鼻カニューラによる一酸化窒素吸入療法が有用であった2症例
3. 学会等名 日本麻酔科学会中国・四国支部第58回学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 近藤隆志, 竹野典子, 神谷諭史, 森尾篤, 三好寛二, 堤保夫
2. 発表標題 フォンタン術後患者の副腎外褐色細胞腫に対する後腹膜鏡下腫瘍摘除術の麻酔経験
3. 学会等名 日本心臓血管麻酔学会第25回学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 近藤隆志, 安田季道, 神崎理英子, 向田圭子, 濱田宏, 河本昌志
2. 発表標題 悪性高熱症患者で発見された1型リアノジン受容体の一塩基多型E3756Qの機能解析
3. 学会等名 日本麻酔科学会第66回学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 近藤 隆志, 三好 寛二, 濱田宏
2. 発表標題 高度肺高血圧症を伴う心室中隔欠損症および大動脈弁狭窄症に対する根治手術の術後管理に高流量鼻カニュラによる一酸化窒素吸入療法が有用であった1例
3. 学会等名 日本心臓血管麻酔学会第24回学術大会
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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------