

令和 6 年 5 月 23 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K17812

研究課題名（和文）熱/労作不耐とリアノジン受容体変異の関連性の探索

研究課題名（英文）Exploring the association between heat/exertion intolerance and ryanodine receptor variants

研究代表者

野田 祐子（Noda, Yuko）

広島大学・病院（医）・助教

研究者番号：00790065

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：労作性熱中症(EHS)や運動誘発性横紋筋融解症といった熱/労作不耐と悪性高熱症(MH)は、発症の誘因は異なるが臨床症状は酷似しており、その相関は以前より示唆されている。遺伝子倫理委員会の承認後、来院した熱中症患者から血液採取を行った。血液採取にあたり、本研究の目的、意義、提供をつけた血液の使用に関して明記した説明文書を用いて説明し、書面で本研究への協力を得た。採取した血液サンプルからDNAをとりだし、RYR1遺伝子変異の有無を調査した。7人から5つのRYR1遺伝子バリエーションが見つかった。さらに、温度感受性TRPチャネルであるカプサイシン受容体のTRPV1遺伝子バリエーションが1つ見つかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

EHS患者からRYR1遺伝子変異が見つかったことから、RYR1遺伝子変異がEHSの遺伝的要因の一つではないかと以前から考えられてきた。RYR1遺伝子変異は、熱/労作不耐に起因する可能性が高く、このことから、EHSや運動誘発性横紋筋融解症などの熱/労作不耐と悪性高熱症(MH)との相関が示唆されている。しかし、この相関に関する研究はまだ十分ではない。本研究では、熱中症患者からRYR1遺伝子変異を同定し、これにより、熱/労作不耐の原因とMHの原因遺伝子であるRYR1遺伝子変異との関連性をより明確にすることに少なからず寄与できた。

研究成果の概要（英文）：Heat and exertion intolerances, such as exertional heat stroke (EHS) and exercise-induced rhabdomyolysis, and malignant hyperthermia (MH), have different triggers but exhibit very similar clinical manifestations, suggesting a possible correlation. Following approval by the Genetic Ethics Committee, blood samples were collected from patients who presented to the hospital with heat stroke. The purpose, significance, and use of the donated blood were explained in a written document, and written consent was obtained. DNA was extracted from the blood samples and analyzed for RYR1 gene variants; five RYR1 variants were identified in seven patients. Additionally, one gene variant for the capsaicin receptor TRPV1, a temperature-sensitive TRP channel, was found.

研究分野：麻酔蘇生学

キーワード：熱/労作不耐 労作性熱中症 リアノジン受容体 悪性高熱症 遺伝学 遺伝子

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

労作性熱中症や運動誘発性横紋筋融解症といった熱/労作不耐(heat/exercise intolerance)と悪性高熱症は、原因となるトリガーは異なるものの臨床症状は酷似しており、その相関は以前より示唆されている¹⁾。実際、労作性熱中症患者からも悪性高熱症の原因遺伝子であるリアノジン受容体(*RYR1*)遺伝子変異が見つかっており²⁾、*RYR1* 遺伝子変異は労作性熱中症の遺伝的要因の1つと考えられている。さらに、*RYR1* 遺伝子変異をもつ患者の一部は、極端な高温環境条件や身体活動がなかったにも関わらず労作性熱中症を発症したという報告もあり³⁾、*RYR1* 遺伝子変異が、熱/労作不耐に起因している可能性は高い。しかし、熱/労作不耐と *RYR1* 遺伝子変異の関連性の詳細はまだ明らかになっていない。

そこで、今回、熱中症患者から血液サンプルを採取し、採取した血液サンプルから DNA をとりだして *RYR1* 遺伝子変異の有無を調査した。

参考文献

- 1) Capacchione JF, Muldoon SM. The relationship between exertional heat illness, exertional rhabdomyolysis, and malignant hyperthermia. *Anesth Analg*. 2009 Oct;109(4):1065-9.
- 2) Dlamini N. et al. Mutations in *RYR1* are a common cause of exertional myalgia and rhabdomyolysis. *Neuromuscul Disord*. 2013 Jul;23(7):540-8.
- 3) Poussel M. et al. Exertional Heat Stroke and Susceptibility to Malignant Hyperthermia in an Athlete: Evidence for a Link? *J Athl Train*. 2015 Nov;50(11):1212-4.

2. 研究の目的

労作性熱中症や運動誘発性横紋筋融解症といった熱/労作不耐と悪性高熱症は、原因となるトリガーは異なるが臨床症状は酷似しており、その相関は以前より示唆されている。実際、労作性熱中症患者からも悪性高熱症の原因遺伝子であるリアノジン受容体(*RYR1*)遺伝子変異が見つかっており、*RYR1* 遺伝子変異は労作性熱中症の遺伝的要因の1つと考えられている。さらに、*RYR1* 遺伝子変異をもつ患者の一部は、極端な高温環境条件や身体活動がなかったにも関わらず労作性熱中症を発症したという報告もあり、*RYR1* 遺伝子変異が、熱/労作不耐に起因している可能性は高い。

今回の研究では、労作性熱中症や運動誘発性横紋筋融解症患者の発症予防を目指し、熱/労作性不耐の原因を既知の悪性高熱症 *RYR1* 遺伝子変異、特にどの遺伝子変異と関連させることが可能かを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

受診して熱中症と診断された患者および過去に熱中症と診断された患者を対象とした。遺伝子倫理委員会の承認後、熱中症患者から血液採取を行った。血液採取にあたり、本研究の目的、意義、提供をうけた血液の使用に関して明記した説明文書を用いて説明し、書面で本研究への協力を得た。採取した血液サンプルから DNA をとりだし、*RYR1* 遺伝子変異の有無を調査した。

実際には、採取した血液から DNA 抽出キットを用いて DNA を抽出した。*RYR1* 遺伝子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った。解析は Ion PGM システムを使用して行った。*RYR1* 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、実際に解析できるように準備をすすめた。解析が可能であることが確認したあと、患者血液から抽出された DNA を使用して、*RYR1* 遺伝子変異の検索を行った。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いれ、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。

熱中症患者からみつかった *RYR1* 遺伝子変異の minor allele frequency (MAF) を調べ、polymorphism でないかどうかを確認した。また、患者からどのくらいの割合で polymorphism でない *RYR1* 遺伝子変異が見つかったのかを調べることで、*RYR1* 遺伝子変異がどの程度熱/労作不耐に寄与しているかを調べた。

4. 研究成果

熱中症患者7人から5つの *RYR1* 遺伝子バリエーションが見つかった。さらに、温度感受性 TRP チャネルであるカプサイシン受容体の *TRPV1* 遺伝子バリエーションが1つ見つかった。以下にその詳細を示す。

年齢	性別	臨床症状	来院時体温 ()	<i>RYR1</i> 変異	<i>TRPV1</i> 変異
68	女	急性腎障害 横紋筋融解症 見当識障害	36.8		
77	男	意識障害	> 39	R1667C	
68	女	意識障害	> 40	G2060C	
59	男	意識障害	40.6		
68	男	意識障害 急性腎障害	40	P1773S	V508M
65	女	6歳時：高熱、嘔吐で熱中症と診断		N1164H, D2769N	
61	男	横紋筋融解症		P1773S, G2060C	

熱中症患者から見つかった *RYR1* 遺伝子変異のうち、gnomAD (https://gnomad.broadinstitute.org/gene/ENSG00000196218?dataset=gnomad_r4) による MAF および clinical significance, CADD スコアは以下であった。

<i>RYR1</i> 変異	MAF	clinical significance	CADD
R1667C	0.00205		1.628
G2060C	0.0667	benign	22.3
P1773S	0.000458	benign	23.1
N1164H	0.00000062		26
D2769N	0.0000316	Conflicting classifications of pathogenicity VUS, Likely benign	24

また、熱中症患者より見つかった *TRPV1* 遺伝子変異に関しては、gnomAD による MAF および clinical significance, CADD スコアは以下であった。

<i>TRPV1</i> 変異	MAF	clinical significance	CADD
V508M	0.000129		21.2

今回、熱中症患者より見つかった *RYR1* 遺伝子変異のうち、The ClinGen malignant hyperthermia susceptibility (MHS) variant curation expert panel による the American College of Medical Genetics and Genomics/Association of Molecular Pathologists (ACMG/AMP) criteria for *RYR1*-related MHS¹⁾ によると、G2060C および P1773S は、悪性高熱症の原因遺伝子としては、Benign と分類されているため、これら2つの *RYR1* 遺伝子変異は悪性高熱症との関連はなさそうである。そのほかの変異に関しては、報告がなく、病的か否かの判断は、*in silico* による予測診断ツールによる予測にしか過ぎない。今後、さらにサンプル数を増やして探索を継続していくことにより、熱/労作性不耐の原因を既知の悪性高熱症 *RYR1* 遺伝子変異と関連させることができる可能性が高くなる。

参考文献

1) Johnston JJ, Dirksen RT, Girard T, Hopkins PM, Kraeva N, Ognoun M, Radenbaugh KB, Riazi S, Robinson RL, Saddic Iii LA, Sambuughin N, Saxena R, Shepherd S, Stowell K, Weber J, Yoo S, Rosenberg H, Biesecker LG. Updated variant curation expert panel criteria and pathogenicity classifications for 251 variants for RYR1-related malignant hyperthermia susceptibility. *Hum Mol Genet.* 2022 Nov 28;31(23):4087-4093.

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 1件）

1. 著者名 Noda Yuko, Mukaida Keiko, Miyoshi Hirotsugu, Nakamura Ryuji, Yasuda Toshimichi, Saeki Noboru, Nishino Ichizo, Tsutsumi Yasuo M	4. 巻 50
2. 論文標題 The effects of dantrolene in the presence or absence of ryanodine receptor type 1 variants in individuals predisposed to malignant hyperthermia	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Anaesthesia and Intensive Care	6. 最初と最後の頁 312 ~ 319
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/0310057X211053644	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------