

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592291

研究課題名(和文) リアノジン受容体が関連する先天性筋疾患が悪性高熱症を発症する可能性

研究課題名(英文) Does every patient of congenital RYR1-associated myopathy develop malignant hyperthermia?

研究代表者

安田 季道 (Toshimichi, Yasuda)

広島大学・医歯薬学保健学研究院(医)・助教

研究者番号：20432718

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：先天性筋疾患患者から発見されたリアノジン受容体(RYR1)の遺伝子変異が悪性高熱症を発症する可能性があるか否かを確認した。RYR1のC末端に遺伝子変異が存在する場合、野生型以外のアミノ酸に変異するとRYR1のアゴニストに対する反応が抑制される傾向が見られた。つまり、悪性高熱症を発症するようなカルシウム動態の変化は認められなかった。一方、RYR1のC末端に遺伝子変異が存在する場合、野生型以外のアミノ酸に野生型以外のアミノ酸に変異するとRYR1のアゴニストに対する反応がこわしんする傾向が見られた。このように遺伝子変異が生じる部位によってその本能が大きく変わってくることを示唆された。

研究成果の概要(英文)：We investigated how the variants of the type 1 ryanodine receptor (RYR1) modulate intracellular calcium concentration. The variants which exist in C terminal of RYR1 have hypersensitive response to caffeine, while the variants which exist in center of RYR1 have less sensitive to caffeine than wild type. Therefore, we concluded that the patients of congenital myopathy who have the variants in C terminal of RYR1 have low possibility to predispose malignant hyperthermia, on the other hand, the patients of congenital myopathy who have the variants in center of RYR1 have high possibility to predispose malignant hyperthermia.

研究分野：医学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・麻酔・蘇生学

キーワード：リアノジン受容体 悪性高熱症 先天性筋疾患 遺伝子変異

### 1. 研究開始当初の背景

悪性高熱症素因者の 1 型リアノジン受容体 (RYR1) には、多くの場合、遺伝子変異がみられることが知られている。加えて、先天性筋疾患のうち、セントラルコア病 (以下 CCD) をはじめとしていくつかの疾患で、RYR1 の遺伝子変異がその原因として報告されている<sup>1, 2)</sup>。

今まで、CCD の症例において手術中に悪性高熱症を発症したという報告がなされている。それらの症例では、カルシウム誘導カルシウム放出 (CICR) 速度の検討などを行い悪性高熱症であることが確定している症例もある。このため、一般的に CCD などの先天性筋疾患の症例では悪性高熱症のトリガーとなる麻酔薬の投与を避けることが多い。しかし、CCD 症例のうち CICR 速度の亢進などを認め MH と診断されている症例はごく一部であり、CCD などの先天性筋疾患症例のすべてが悪性高熱症を発症するのか否かはわかっていない。

そこで、今回、先天性筋疾患症例の RYR1 から発見された遺伝子変異について、それがカルシウム異常を引き起こし MH の原因となりうるのかを検討する。

### 参考文献

1. Wu S, Ibarra MC, Malicdan MC, et al. Central core disease is due to RYR1 mutations in more than 90% of patients. *Brain*. 2006 129: 1470-80.

2. Sato I, Wu S, Ibarra MC, et al. Congenital neuromuscular disease with uniform type 1 fiber and RYR1 mutation. *Neurology*. 2008 70: 114-22

### 2. 研究の目的

先天性筋疾患症例の RYR1 から発見された遺伝子変異が、カルシウム異常を引き起こし MH の原因となりうるのかを実験的に検討していく。

### 3. 研究の方法

#### 遺伝子変異のある RYR1 発現ベクターの作成

野生型の RYR1 発現ベクターはトロント大学の MacLennan 先生から提供していただいた。この野生型の RYR1 発現ベクターから遺伝子変異を導入したい部位を前後 1000bp の長さで切り出し、pBluescript II にライゲーションし、このベクターに対して、遺伝子変異を導入する。遺伝子変異の導入は、QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) を使用しておこなう。遺伝子変異が導入された pBluescript II から遺伝子変異を導入した部位を前後 1000bp の長さで切り出し、再度発現ベクターにライゲーションする。遺伝子変異の確認のため、遺伝子変異を導入した近辺のシークエンスを行う。発現ベクターは、RYR1 と蛍光レポーターである AcGFP を同時発現させるために pTRE-Tight-BI-AcGFP を使用する。

#### 遺伝子変異部位の選択

RYR1 の遺伝子変異のなかで、central core disease (CCD) などの先天性筋疾患の症例で多く見られる C 末端側の遺伝子変異を調べる。特に、MH および CCD をそれぞれ発症する同じ部位の違った遺伝子変異が数箇所報告されているが、これらがどのようなカルシウム動態を示すかを観察する。

#### RYR1 発現ベクターの Human Embryonic Kidney (HEK) 293 細胞への遺伝子導入

HEK293 は DMEM に 10% FCS および抗生物質を添加した培養液を使用し、37 度、5% CO<sub>2</sub> 下で培養をおこなう。80% コンフルエントの HEK293 細胞を回収し、35mm ガラスボトムディッシュで継代、培養する。遺伝子導入には Fugene HD を使用する。Fugene HD、発現ベクターおよび培養液を混合し、さらに 72 時間培養する。

#### 細胞内カルシウム放出の測定

HEK293 細胞を hepes-buffered salt solution (HBSS)で洗浄し、5 $\mu$ M の Fura-2 を導入する。1時間静置した後、測定を開始する。

測定は、340nm と 380nm の光で励起させて、510nm の蛍光を蛍光顕微鏡で測定する。カフェインは HBSS で様々な濃度に希釈し、サンプルディッシュに一定の速度で灌流させる。340/380nm 比はカルシウムイメージングシステムで計算する。

#### 4. 研究成果

まず、われわれはリアノジン受容体のC末端の遺伝子変異についての実験を行った。日本人の悪性高熱症素因者(MHS)のリアノジン受容体(RYR1)において4894番目のアミノ酸であるアラニンがスレオニンへ変異したという報告がされている。一方、同部位のアラニンからプロリンへの変異が先天性筋疾患である congenital neuromuscular disease with uniform type 1 fiber (CNMDU1)患者のRYR1から発見されている。われわれはこの部位のアミノ酸変異が細胞内のカルシウム動態にどのような影響を及ぼしているかを確認するために、RYR1の存在しない細胞(HEK293細胞)に、野生型のRYR1及び遺伝子変異の入ったRYR1をそれぞれ遺伝子導入した。結果は、MHSから報告されたアミノ酸変異はRYR1のアゴニストであるカフェインに対する感受性を亢進し、悪性高熱症(MH)の原因となることが確認された。一方、CNMDU1患者から報告されたアミノ酸変異を導入したRYR1はカフェインにほとんど反応しなくなった。このことより、CNMDU1患者に見られたアミノ酸変異はMHの原因とはならないことが確認できた。これに加えて、野生型であるアラニンにアミノ酸としての特性が似ているグリシンにアミノ酸を変異させた場合も、

カフェインに対する反応が著しく抑制された。これらのことから、4894番目のアミノ酸変異は多くの場合、カフェインに対する反応が抑制される傾向にあるのではないかと予想された。このことは以前よりRYR1のC末端の遺伝子変異は多くは先天性筋疾患の患者から発見されていることとも一致する。

次に、中央の遺伝子変異である2508番目のアミノ酸変異に注目して研究を行った。この変異はセントラルコア病を発症している患者のRYR1からも発見されている。アルギニンからシステイン、ヒスチジンおよびグリシンへの変異が今までに報告されている。これらの変異が導入されたRYR1はすべてカフェインに呈する反応が亢進しており、EC50は野生型で1.97mMであるのに対して、システインでは1.48mM、ヒスチジンでは1.48mM、グリシンでは1.33mMであった。加えて、野生型のアルギニンとアミノ酸の特性が類似しているリジンに変えて実験を行ってみたところ、C末端での変異の場合とは違い、カフェインに対する反応が亢進することが確認された。RYR1の中央に位置する2508番目のアルギニンはどのアミノ酸に変異しても悪性高熱症を発症する可能性が示唆された。このことは、以前から報告があるように、悪性高熱症患者から発見されるRYR1の遺伝子変異が多くの場合中央およびN末端に存在するということと一致する。これらのことを総合すると、先天性筋疾患を発症したすべての症例で悪性高熱症を発症するのではなく、RYR1の変異が生じる部位によりその反応の違いが生じる可能性が示唆された。

また、これらの実験と同時に筋肉のカルシウム動態に関与するタンパク質の1つであるJP-45の遺伝子多型に関する実験で、一定の結果が得られたので論文の作成を行った。JP-45のc.323C>T(p.P108L)およびc.449G>C(p.G150A)の遺伝子多型の発現率は、悪性高熱症素因者と非素因者でほぼ

同程度であった。しかし、これらの遺伝子多型が存在している JP-45 の機能解析を行ったところこれらの遺伝子多型が存在するとジヒドロピリジン受容体の KCl に対する反応を低下させることがわかった。RYR1 に同じ遺伝子変異を有している悪性高熱素因者であっても臨床症状に大きな違いみられることがある。今回の結果は、RYR1 以外のタンパク質のアミノ酸変異が悪性高熱症及び先天性筋疾患の臨床症状の違いに大きく関与している可能性を示唆している。悪性高熱症を発症する可能性がある RYR1 の遺伝子変異を保持していても今回報告した遺伝子多型が JP-45 に存在している場合、悪性高熱症の臨床症状が減弱あるいは起こらなくなる可能性がある。これらの遺伝子多型と悪性高熱症および先天性筋疾患の病態への影響に関しては更に研究していく必要がある。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 4 件)

1. Intrathecal adrenomedullin modulates acute inflammatory pain in the rat formalin test.  
Sugimoto Y1, Shiraishi S, Yasuda T, Hamada H, Kawamoto M.  
Neurosci Lett. 2013 Sep 27;552:146-50. doi: 10.1016/j.neulet.2013.07.055. 査読有り
2. JP-45/JSRP1 variants affect skeletal muscle excitation-contraction coupling by decreasing the sensitivity of the dihydropyridine receptor.  
Yasuda T, Delbono O, Wang ZM, Messi ML, Girard T, Urwyler A, Treves S, Zorzato F. Hum Mutat. 2013 Jan;34(1):184-90. 査読有り
3. Calcium channel blockers are inadequate for malignant hyperthermia crisis.  
Migita T, Mukaida K, Yasuda T, Hamada H, Kawamoto M.  
J Anesth. 2012 Aug;26(4):579-84. 査読有り

4. Mutated p.4894 RyR1 function related to malignant hyperthermia and congenital neuromuscular disease with uniform type 1 fiber (CNMDU1).

Haraki T, Yasuda T, Mukaida K, Migita T, Hamada H, Kawamoto M. Anesth Analg. 2011 Dec;113(6):1461-7. 査読有り

[学会発表](計 4 件)

1. Mukaida K., Haraki T., Yasuda T., Hamada H., Kawamoto M. Effect of dantrolene on prevention of malignant hyperthermia crisis by decreasing the sensitivity of ryanodine receptor 1 1-4/June/2013, Barcelona, Spain.

Euroanaesthesia

2. Yasuda T., Delbono O., Girard T., Albert Urwyler A., Zorzato F. and Treves S. JP-45 variants are genetically encoded modulators of DHPR activity: a study in human skeletal muscle myotubes and mouse FDB fibers.

11-14/May/2012, Leeds, United Kingdom. European malignant hyperthermia group 2012 Annual Meeting

3. Haraki T., Yasuda T., Mukaida K., Migita T., Hamada H., Kawamoto M.

Mutated p.4894 RyR1 function related to malignant hyperthermia and congenital neuromuscular disease with uniform type 1 fiber (CNMDU1).

Euroanaesthesia 2011年6月13日-15日アムステルダム, オランダ

4. Mukaida K., Migita T., Haraki T., Yasuda T., Hamada H., Kawamoto M.

Effect of dantrolene on calcium homeostasis in cultured myotubes from individuals with predisposition to malignant hyperthermia

Euroanaesthesia 2011年6月13日-15日アムステルダム, オランダ

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

安田 季道 (YASUDA Toshimichi)  
広島大学・医歯薬学保健学研究院・助教  
研究者番号：20432718

(2)研究分担者

河本 昌志 (KAWAMOTO Masashi)  
広島大学・医歯薬学保健学研究院・教授  
研究者番号：40127642

原木 俊明 (HARAKI Toshiaki)  
広島大学病院・助教  
研究者番号：40403563  
(H25年度より研究分担者)

(3)連携研究者

研究者番号：