

平成 2 6 年 6 月 2 日現在

機関番号：3 2 4 0 9

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：2 4 6 5 9 7 0 4

研究課題名（和文）エクソーム解析の応用による悪性高熱症の新規原因遺伝子の同定

研究課題名（英文）Identification of causative gene for Malignant Hyperthermia using exome sequencing

研究代表者

的場 奈々（MATOBA, Nana）

埼玉医科大学・医学部・研究員

研究者番号：8 0 6 2 2 9 6 9

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,900,000 円、（間接経費） 870,000 円

研究成果の概要（和文）：特定の麻酔薬等で誘発される悪性高熱症は、原因の半数以上が1型リアノジン受容体をコードするRYR1に認められる。本研究では、RYR1の全エクソンに異常を認めなかった症例について、エクソームシーケンスを行った。候補となりうるカルシウムシグナル関連遺伝子や既知の染色体上感受性領域および保因者のみで共通して認めた変異を照らし合わせた結果、既知の原因遺伝子であるCACNA1S上の新規変異を同定した。当該遺伝子はL型カルシウムチャネルのサブユニットをコードし、リアノジン受容体と共役するものである。今後本変異が実際に悪性高熱症の原因となりうるかどうか細胞レベルでの検討が必要である。

研究成果の概要（英文）：We performed exome sequencing of Japanese families with malignant hyperthermia. All exons of RYR1 of the carrier in this family were directly sequenced in previous research and no causative mutation has been found. To detect disease causing mutation efficiently, we prepared sets of candidate genes that contain 1) genes related to calcium signaling, 2) genes located on malignant hyperthermia susceptibility loci, 3) genes expressed in tissues where RYR1 and CACNA1S are highly expressed or 4) genes that interact with CACNA1S or RYR1 directly or indirectly. Using data from exome sequencing and the candidate gene sets, we identified 5 plausible mutations. One of the mutations was in CACNA1S that codes voltage-gated L-type calcium channel alpha subunit. This subunit interacts with Ryanodine receptor 1. The functional validation if this mutation is really causative of this family awaits further study such as an electrophysiological experiment.

研究分野：医歯薬学

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：悪性高熱症 エクソームシーケンス

## 1. 研究開始当初の背景

悪性高熱症は、骨格筋のカルシウム調節の異常により発症する疾患で、揮発性吸入麻酔薬や脱分極性筋弛緩薬の投与で引き起こされる。発症すると、筋小胞体から異常にカルシウムイオンが放出されて骨格筋の異常収縮が起こり、結果として高熱・筋硬直・アシドーシスなどの代謝亢進症状を呈する。本症は常染色体優性遺伝形式をとり、その中でも 50%以上の患者で骨格筋筋小胞体の 1 型リアノジン受容体をコードする *RYR1* に変異が見つかっている。

*RYR1* 以外にも L 型カルシウムチャネルのサブユニットをコードする *CACNA1S* ならびに染色体上の 4 領域で悪性高熱症との関連が報告されている (Malignant Hyperthermia Susceptibility, MHS1-6)。

これまでの技術では、これらの候補領域について全ての検体を解析することは非効率的であり、困難であった。しかしながら、次世代シーケンサの登場で、網羅的に短時間で複数の検体を同時に解析できるようになった。

本邦における悪性高熱症のゲノム解析としては、2006 年に埼玉医科大学麻酔科の菊地らが悪性高熱症に対する感受性試験 (カルシウム誘導性カルシウム放出速度測定試験, CICR) で陽性と診断した 58 名の日本人について *RYR1* 遺伝子の全エクソンに対してサンガー法によるダイレクトシーケンスを行なった例がある。この結果、25 名については *RYR1* エクソン上に病因と思われる変異が認めなかった。

## 2. 研究の目的

本研究では、前項で示した *RYR1* エクソンに病的変異を認めなかった 25 名のうち 1 名を含む 1 家系についてエクソーム解析を行い、日本人における新規悪性高熱症原因遺伝子を同定することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### 症例

発端者は 16 歳男性 (当時) で、外反肘の骨きり術にあたり、悪性高熱症誘発薬物とされているサクシニルコリンが使用された。術中の体温上昇や頻脈、アシドーシスにより悪性高熱症と診断され、術後のカフェイン収縮テストにおいてもカフェインによる収縮の増強が認められ、陽性と判定された。図 1 に示す発端者の家族について CICR により、2 名が保因者、3 名が非保因者と診断された (診断済みは\*で明示)。

### 解析手法

#### (1) エクソームシーケンス

CICR にて素因性診断がなされたメンバ (図 1, \*で明示) を対象とした。

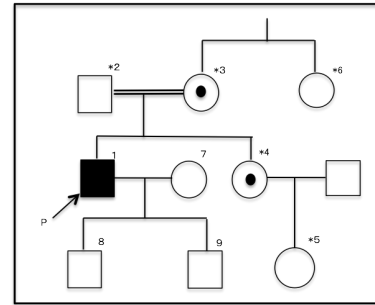


図 1 対象家系

各被験者から得た血液あるいは筋肉由来のゲノム DNA について、Agilent Human SureSelect<sup>XT</sup> 50 MB kit (Agilent) によりエクソン領域を濃縮した。各ライブラリは、識別のためのインデックス配列を付与、クラスト形成した後、HiSeq2000 (Illumina) を用いて 101bp のペアエンドでシーケンスした。得られた画像データは Illumina CASAVA pipeline により FASTQ 形式ファイルへ変換した。

#### (2) データ処理

上述の FASTQ ファイルを用いて、Q20 をみたくないものをトリミングするとともに、Human 1KG reference (GRCh37 + decoy) 配列にマッピングした (BWA)。シーケンス前処理で行う PCR 由来のバイアスを避けるために、重複リードは Picard を用いて除去 (タグ付け) した。また、ミスアライメントの生じやすい欠失・挿入のあることが予測される領域については、既知の情報 (1000 Genomes Project, Mills) をもとに再リアライメントを行った (GATK IndelRealigner)。クオリティ値補正には GATK Recalibration を用いた。GATK UnifiedGenotyper にて変異のコールを行い、GATK VariantFiltration にてクオリティの低い変異、リード数の少ない箇所の変異を取り除いた。各変異は ANNOVAR を用いて変異の種類や遺伝子名、頻度情報等のアノテーション付けを行った。

#### (3) 変異の絞り込み

以下の条件を満たす変異を選択した。

- エクソン・スプライシングサイト上の変異
- アミノ酸置換を伴う変異
- dbSNP135 に登録されていない変異
- 家族内 CICR 陽性のメンバが共有しているが、陰性のメンバでは認めない変異

#### (4) 候補遺伝子リスト準備

効率的に候補遺伝子 (変異) を探索するために、下記の条件を満たす変異をリストアップした。

- 悪性高熱症感受性領域上の遺伝子
- これまでに知られている MHS1-6 領域上

の遺伝子を UCSC Table Browser (<http://genome.ucsc.edu/>) を用いて抽出 計 1,172 個

#### 発現パターンによる抽出

既知遺伝子である *RYR1*, *CACNA1S* は骨格筋特異的に発現している。そこで、BioGPS (<http://biogps.org/>) に公開されている GeneAtlas U133A gcrma(ヒト), GeneAtlas MOE430 gcrma(マウス) から *RYR1*, *CACNA1S* と類似の発現パターンを示す遺伝子(Correlation Cutoff 値: 0.7) を抽出した。マウスの遺伝子群は NCBI の HomoloGene を用いて相当するヒト遺伝子を選択した。871 遺伝子

#### カルシウムシグナル・既知遺伝子と関連のある遺伝子

悪性高熱症の病態の特徴であるカルシウムシグナルに着目し、カルシウム関連遺伝子を IPA, KEGG(04020:Calcium signaling pathway) から抽出した。215 遺伝子

#### *RYR1*・*CACNA1S* 関連遺伝子

と同様 IPA を用いて既知原因遺伝子との関連が報告されている遺伝子を抽出した。286 遺伝子

これらの遺伝子群で重複しているもの(図2)がより有力な候補になる。(3)で得られた変異をもつ遺伝子とこれらの遺伝子と比較した。

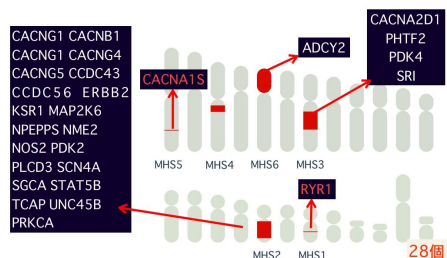


図 2 MHS 領域上の有力候補遺伝子

## 4. 研究成果

### (1) 候補の絞り込み

表 1 に示したように保有者間で共通する 369 個の変異を認めた。このうち、頻度の高い多型を除いたところ、82 個の変異まで絞り込むことができた。これらの変異をもつ遺伝子群と、3.(4)の候補遺伝子リストと比較したところ 5 つの遺伝子が候補として残った。

この中には既知の原因遺伝子である *CACNA1S* が含まれた。当該変異の有害性を機能変化予測ツールによって判定した結果、Polyphen2, SIFT とともに“良性”と判定したが、Mutation Taster は“病理性”と判定した。なお、既知の変異である T1354S の変異についての判定結果は、“良性”であった。

表 1 検出された変異の概要

	2(Ctrl)	3(Case)	4(Case)	5(Ctrl)	6(Ctrl)
Total Variants	79,662	80,449	77,610	80,876	94,260
(Het)	44,073	45,323	45,323	45,781	43,627
Variants on Exon	11,455	11,590	11,245	11,640	11,390
Variants on splicing	147	169	149	157	162
Not Synonymous Variants (+ splicing site)	5,375	5,407	5,317	5,494	5,409
	(+147)	(+169)	(+149)	(+157)	(+162)
Shared in Case			2,826		
Not In Ctrl			369		
Low Frequency			82		
On Predicted Genes			5		

### (2) 発端者ゲノムでの確認

エクソームシーケンス時に利用できなかった発端者のゲノムを用い、該当変異についてサンガー法を用いたダイレクトシーケンスを実施した結果、発端者でも該当変異を認めた。

前述したように、*CACNA1S* 遺伝子は悪性高熱症患者で 2 番目に報告例の多い遺伝子であるが、今回発見した変異での報告はない。*CACNA1S* がコードする L 型カルシウムチャネルサブユニットは、電位依存性カリウムチャネルサブユニットに類似の 6 回膜貫通領域のリピートを 4 個持つ。今回見つかった変異は、このうち、カルシウム流入ポアを形成する S6 ドメイン上に位置していた(図3)。

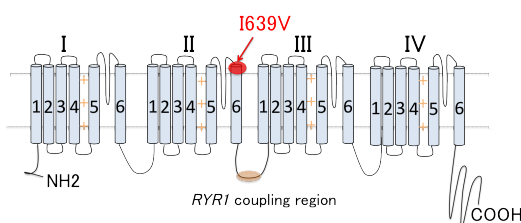


図 3 *CACNA1S* の二次構造予測図

このことから、本解析において確認されたアミノ酸置換がカルシウムチャネルの立体構造変化をもたらし、 $\text{Ca}^{2+}$  流入に影響を与えていることが示唆された。

ただ、平成 25 年に公開された日本人の variant データベース(HGVD)に MAF=0.01 で本変異を確認した。悪性高熱症の特徴である、麻酔薬等に暴露されるか、あるいは親族に発症者がいるか、CICR 等の検査を受けるかによってしか、保因者が否かの見極めができない現状では、公開されているデータベースに登録されているものが“コントロール”となりうるかどうかについては議論の残るところである。また、近年ではハロタン等の誘発物質が使われなくなってきたことから、淘汰の機会を失っている可能性も考えられる。

そこで、原因変異となりうるか機能確認

のため、該当遺伝子の cDNA に変異を導入し、電気生理学的解析を行っているところである。

その他 3 家系についてエクソーム解析を行い、同様の解析を適用しているが、これまでに有力な候補は同定されていない。診断基準に用いた CICR の解釈方法やターゲット遺伝子の再設定、多因子疾患の可能性も視野に入れて解析方法の改良を含め検討が必要である。

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 4 件)

Nana MATOBA, Identification of novel mutations in Japanese families with Malignant Hyperthermia using whole exome sequencing, 第 35 回分子生物学会、2012 年 12 月 13 日、福岡国際会議場・マリノメッセ福岡(福岡県福岡市)

Nana MATOBA, Exome sequencing identified a novel mutation in *CACNA1S* in a Japanese family with Malignant Hyperthermia, The 62<sup>nd</sup> Annual Meeting of the American Society of Human Genetics, 2012 年 11 月 7 日, Moscone Center (San Francisco, U.S.A.)

Nana MATOBA, Detection of a novel mutation in *CACNA1S* in a Japanese family, The 10<sup>th</sup> RCGM International Symposium of Academic Frontier, 2012 年 11 月 3 日, 埼玉医科大学創立 30 周年記念講堂(埼玉県日高市)

Nana MATOBA, Exome sequencing and family-based analysis for the identification of a mutation in a Japanese family with Malignant Hyperthermia, Joint Conference on Informatics in Biology, Medicine and Pharmacology, 2012 年 10 月 15 日, タワーホール船堀(東京都江戸川区)

〔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  
該当無し

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

的場 奈々(MATOBA, Nana)  
埼玉医科大学・医学部・研究員  
研究者番号：80622969

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：