

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 12 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861376

研究課題名(和文)一塩基多型が1型リアノジン受容体の機能に与える影響についての検討

研究課題名(英文)Analysis of single nucleotide polymorphism in type 1 Ryanodine receptor

研究代表者

原木 俊明(Haraki, Toshiaki)

広島大学・医歯薬保健学研究院・助教

研究者番号：40403563

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)：全身麻酔の合併症の一つである悪性高熱症は、稀な疾患だが一旦発症すると致死率の高い病態である。1型リアノジン受容体の機能異常が原因とされ、これまでに約30の遺伝子変異が原因遺伝子として認定されている。

本研究では、原因遺伝子に加えて一塩基多型が1型リアノジン受容体の機能にどのような影響を与えているかを人工的に変異遺伝子を導入した1型リアノジン受容体を作成し、実験的に調査した。一塩基多型単独では受容体機能は変化しなかったが、悪性高熱症の原因とされる遺伝子変異と一塩基多型の両方の変異が存在した場合、悪性高熱症の原因遺伝子単独の場合と比較して、やや受容体機能が亢進している結果となった。

研究成果の概要(英文)：Malignant hyperthermia, due to hypersensitivity of type 1 ryanodine receptor (RyR1), is a life-threatening disorder triggered by anesthetic agents. We analyzed the functions of RyR1 which have mutation (T2206M) and/or single nucleotide polymorphism (E3756Q) in order to investigate the influences of single nucleotide polymorphism in RyR1. The function of RyR1 which has only single nucleotide polymorphism is equivalent, and RyR1 which has mutation and single nucleotide polymorphism are notably sensitive to agonists.

研究分野：麻酔科学

キーワード：悪性高熱症

1. 研究開始当初の背景

悪性高熱症は吸入麻酔薬や脱分極性筋弛緩薬への暴露を契機に発症する稀な疾患である。異常高熱、筋強直、高二酸化炭素血症、混合性アシドーシス、高カリウム血症などの症状を呈し、治療薬であるダントロレンを用いて適切な治療がなされなければ多臓器不全に至り、致命的となる疾患である。その原因は1型リアノジン受容体 (RyR1) の機能異常とされている。1型リアノジンの受容体は約5000個のアミノ酸からなる受容体タンパク質で、筋小胞体膜上に発現し、筋細胞内のカルシウムを上昇させる機能を担っている。これまでに300以上の遺伝子変異が報告されているが、それらの機能解析が行われたのはごく一部にとどまっている。悪性高熱症の原因遺伝子として約30の遺伝子変異がヨーロッパ悪性高熱研究会から報告されており、受容体機能が亢進し、筋細胞内のカルシウムイオンが異常高値を示すことが、悪性高熱症の本隊とされている。一方、1型リアノジン受容体の一塩基多型が報告されているが、受容体機能にどのような影響を与えるか明らかになっていない。

2. 研究の目的

1型リアノジン受容体の一塩基多型が受容体機能にどのような影響を与えるか、実験的に検証する。これまでの報告から、悪性高熱症の原因遺伝子で1型リアノジン受容体の2206番目のアミノ酸がスレオニンからメチオニンに変化したT2206M-RyR1、一塩基多型として3756番目のアミノ酸がグルタミン酸からグルタミンに変化したE3756Q-RyR1の機能を評価することとした。さらに悪性高熱症の原因遺伝子であるT2206Mと一塩基多型であるE3756Qが同時に生じさせた受容体の機能評価を研究の目的とした。また、それらの変異がダントロレンの治療効果にどのような影響を及ぼすかについて評価することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 悪性高熱症の原因遺伝子の一つであるT2206Mを生じさせた1型リアノジン受容体と(T2206M-RyR1)と一塩基多型を生じさせた1型リアノジン受容体(E3756Q-RyR1)、原因遺伝子と一塩基多型を同時に生じさせた1型リアノジン受容体(T2206M+E3756Q-RyR1)を人工的に作成した(図1)。作成した変異遺伝子を遺伝子導入用のベクターに挿入した。遺伝子導入用のベクターはGFPタンパクが事前に導入されているものを用いることで、RyR1受容体とGFPタンパクを同時発現するようにした。RyR1を挿入したベクターを遺伝子導入用の細胞であるHuman Embryonic Kidney cell (HEK-293細胞)に導入した。細胞内カルシウム濃度を測定する前に励起波長490nmで励起し510nmの蛍光波長を観察することで、GFP

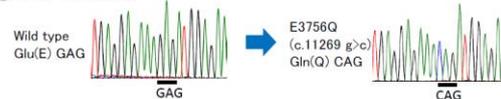
タンパク質が光るHEK-293細胞を確認することで、RyR1受容体遺伝子が発現している細胞とした。コントロールとして遺伝子変異が認められない野生型を用いた。

図1

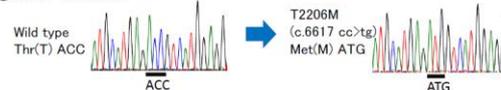
使用したRYR1…以下の4種類

①野生型(WT: wild type) …コントロールとして使用

②SNP:E3756Q



③MH:T2206M



④SNP+MH:E3756Q+T2206M

(2) 遺伝子導入を行ったHEK-293細胞に蛍光色素Fra-2を負荷し、その蛍光色素を340nmと380nmで励起し、510nmの蛍光波長を観察することで細胞内カルシウムイオン動態を評価した。

1型リアノジン受容体のアゴニストであるカフェインを0.3125mM、0.625mM、1.25mM、2.5mM、5mM、10mM、20mMの順に負荷し、細胞内カルシウムイオン動態を観察することで受容体機能の評価を行った。評価を行うためにそれぞれの遺伝子変異を導入した細胞を30個ずつ観察した。

また、同様に1型リアノジン受容体のアゴニストである4-クロロ-m-クレゾールを15.625μM、31.25μM、62.5μM、125μM、250μMの順に負荷し、カフェインと同様にカルシウムイオン動態を観察した。

さらに悪性高熱症の唯一の治療薬であるダントロレンを負荷することで、一連のカルシウム動態にどのような影響を与えるか実験を行った。

(3) アゴニストに対する細胞内カルシウムイオンの変化から、容量-反応曲線を描き50%効果濃度を計算した。

4. 研究成果

(1) 1型リアノジン受容体のアゴニストであるカフェインに対する50%効果濃度は、野生型が 1.99 ± 0.68 (95%信頼区間: 1.701-2.635) mM、一塩基多型((E3756Q-RyR1)では 1.78 ± 0.70 (95%信頼区間: 1.609-1.960)、悪性高熱症の原因遺伝子(T2206M-RyR1)では 1.30 ± 0.46 (95%信頼区間: 1.122-1.365) mM、一塩基多型+悪性高熱症の原因遺伝子(T2206M+E3756Q-RyR1)では 1.09 ± 0.36 (95%信頼区間: 0.926-1.116) だった(図2、3)。

一塩基多型単独では受容体機能に影響を与えていなかったが、悪性高熱症の原因遺伝子

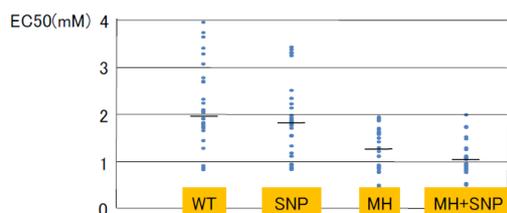
に一塩基多型が加わることで、悪性高熱症の原因遺伝子単独の受容体機能よりわずかに亢進する可能性が示された。ただし、その受容体機能の変化は軽微であり、実際の病態にどのような影響を与えるかは不明である。

図 2

	WT	SNP	MH	MH+SNP
n	30	30	30	30
EC50(mM)	1.99±0.68	1.78±0.70	1.30±0.46	1.09±0.36
95%CI	1.701-2.035	1.609-1.965	1.122-1.365	0.926-1.116

CI:信頼区間

図 3



(2) 1型リアノジン受容体のアゴニストである4-クロロ-m-クレゾールでは安定した細胞内カルシウム濃度の変化を得ることができなかった。これは4-クロロ-m-クレゾールがカフェインと比較して反応しやすいアゴニストであり、実験途中でHEK-293細胞が細胞死に至るものが多く、安定した結果が得られなかったことが原因と考えている。負荷する4-クロロ-m-クレゾールの濃度を低くしたり、濃度の変化を緩やかにしたりすることで安定した結果を得られるように引き続き検討を行っているが、すでにカフェインで一連の結果が得られていることから、4-クロロ-m-クレゾールの結果の有無は本研究の結果に直接的な影響を及ぼすものではないと考えている。

(3) 悪性高熱症の治療薬であるダントロレンについては、ダントロレンの負荷量が多い場合、野生型、一塩基多型 (E3756Q-RyR1)、悪性高熱症型 (E3756Q-RyR1)、同時発現型 (T2206M+E3756Q-RyR1) のいずれの変異遺伝子においても細胞内カルシウムイオンが全く上昇しなかった。一方、ダントロレンの負荷が少ない場合はアゴニストに対する抑制効果が見られなかった。この結果から、それぞれの容量-反応曲線を描くことができず、現時点では50%効果濃度を描くに至っていない。今後の検討として、ダントロレンの負荷量だけでなく、負荷を行う時間を調整し、引き続き検討を行っていく方針である。なお、高濃度を負荷した場合はカルシウムイオン

が全く上昇しなかったことから、受容体機能の抑制効果は疑いようがなく、治療薬としての効果を検証することはできたと考えられる。しかし、ダントロレンの負荷量が少ない場合は、リアノジン受容体機能の抑制効果を認めなかったことから、臨床においても十分量のダントロレンが投与されなければ、悪性高熱症にたいする治療効果を示さない可能性を示しているのかもしれない。

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1件)

日本麻酔科学会 第63回学術集会 (2016年5月26日、博多) 「1型リアノジン受容体の一塩基多型が細胞内カルシウム代謝に及ぼす影響の検討」、近藤隆志、安田季道、三好寛二、原木俊明、向田圭子、河本昌志

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：
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

原木 俊明 (Haraki Toshiaki)
広島大学 医歯薬保健学研究院 助教
研究者番号：40403563

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者 ()

研究者番号 :