

令和元年6月3日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08917

研究課題名(和文)悪性高熱症モデルと成り得る変異体細胞バンクの樹立

研究課題名(英文)A trial for establishment of the cell banks as the models of malignant hyperthermia

研究代表者

小口 勝司(Oguchi, Katsuji)

昭和大学・医学部・名誉教授

研究者番号：50129821

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：悪性高熱症(malignant hyperthermia, MH)の術前の遺伝子診断に繋がる遺伝子変異と薬物感受性の変化の関連を明らかにするために、MH患者の症例報告における1型リアノジン受容体(RyR1、Ca²⁺放出チャンネル)の遺伝子変異体を作製し効率的に発現する細胞株の樹立法を確立した。さらにCa²⁺イメージングシステムと組み合わせることによりMH型RyR1遺伝子変異による薬物感受性の変化の有無を解析して、幾つかのRyR1遺伝子変異部位とMH病態の関連を明らかにしてMH遺伝子診断の根拠となり得る実験結果を示すと共に全身麻酔薬創薬のためのMH疾患モデル細胞となり得ることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これらの研究成果により、国内外で、MH発症に関わるRyR1遺伝子変異部位が明らかにされて術前のMH遺伝子診断の根拠となり得る研究結果を示すと共に、これらのMH型RyR1変異体を発現する細胞をMH疾患モデルとしてより安全な新たな全身麻酔薬の開発に利用することにより安全な医療行為の発展に貢献できるものと期待される。本研究課題で使用したカセット構造化した野生型とMH型RyR1変異体cDNA、並びにその発現細胞株は、国内外の研究者の要望があれば提供することができるようになった。今後は、多くの研究者が簡易に目的とするRyR1変異体の作製と発現する細胞株の樹立も可能で、新たな研究の展開も期待される。

研究成果の概要(英文)： We established the simplified method for getting the cell lines to express the genetic variants of the type 1 ryanodine receptor (RyR1, Ca²⁺-releasing channel) in the case reports of malignant hyperthermia (MH) patients, and to develop in effectively to determine the association to lead to preoperative genetic diagnosis of the MH between the mutations in the RyR1 gene and change of the drug susceptibility. Furthermore, we analyzed the presence of the change in the drug susceptibility of the RyR1 expressed cells due to the RyR1 mutation sites by combining it with a Ca²⁺ imaging system. We showed that some RyR1 mutations associated with the MH patients in the case reports strongly related with the increment of the drug sensitivity giving the evidence of the MH genetic diagnosis and it could be MH disease model cells for drug discovery of a novel general anesthetics.

研究分野：医歯薬学

キーワード：悪性高熱症 リアノジン受容体 遺伝子診断 疾患モデル 全身麻酔薬

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

悪性高熱症(MH)は、揮発性の全身麻酔薬が引き金となって、感染その他に特に考えられる原因なしに、40℃を超える高熱を発する優性遺伝形質の疾患である(発生頻度は、全身麻酔約2万例に1例と推定されている)。発症前もしくは発症初期の速やかな診断が必要であり、その後の処置が不適切であるとショック状態を引き起こし、現在でも高率(約15%)に死の転帰をとる。発熱時に全身性の骨格筋拘縮が認められることが多く異常な熱産生の原因と考えられている。このMHの術前診断法として、患者の筋生検を用いたハロセン/カフェイン感受性試験が主に用いられているが、患者側には痛みを伴う侵襲的な生検筋が必要とされ、試験者側にも熟練された操作技術と生検後直ちにテストが成される必要があるなどの欠点も多い。この為に、この試験実施可能な施設が国内では1、2箇所の大学研究室のみに限定されてしまい、MH疾患に関する確定診断法としては普及していない。

現在、非侵襲的で簡易な術前MH診断法として、血液などから採取したゲノムDNAを用いる遺伝子診断法などを開発すべく研究が進められてきている。その結果、主にヒト19番染色体上にある細胞内カルシウムイオン動態を担う「カルシウムによるカルシウム放出(Ca²⁺-induced Ca²⁺ release、CICR)機構」の実体である「リアノジン受容体1型(RyR1)」をコードする遺伝子との連鎖が発見され薬理遺伝学的疾患(Pharmacogenetic disease)として指摘されて、症例報告として現在までに、ヒトMH疾患に見出されたRyR1遺伝子上の遺伝子多型は600ヶ所以上に達している。(The Human Gene Mutation Database; <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/gene.php?gene=RYR1>)

しかし、MH患者に診られる数多くのRyR1遺伝子変異部位の臨床報告例に比べて、これらの変異が全身麻酔薬であるハロセンやCICR機構の促進薬であるカフェインなどの薬物に対する感受性の増加などカルシウム放出チャンネルであるRyR1の機能的な変化を引き起こすことを実験的に明らかにした報告・論文等は僅かしかない。したがって、ほとんどのRyR1遺伝子変異部位の検索試験は確実な遺伝子診断として利用することが出来ないのが現状である。(European Malignant hyperthermia group. <http://www.emhg.org/nc/genetics/mutations-in-ryr1>: 現在(2016年4月時)までのMH遺伝子診断に利用可能な変異部位の総計は31箇所で、申請者らはその内で16箇所を確定する実験に筆頭著者もしくは共著者として参画している。)

2. 研究の目的

本研究では、変異部位の異なるMH型RyR1変異体の安定発現細胞株を樹立して、さらにCa²⁺イメージング(細胞内Ca²⁺動態の画像解析)の半自動的なハイコンテンツスクリーニング(HCS)システムを導入することによって、そのMH型RyR1変異体の安定発現細胞における各種薬物に対する感受性の変化を迅速に同時に解析して、どのMH型RyR1変異部位が実際に麻酔薬等に関する感受性の亢進に強く関連するかを明らかにする。これより得られる成果は、MH疾患の遺伝子診断のための確たる証拠となる。

さらに、今後が開発される新たな全身麻酔薬の前臨床試験において網羅的な安全性スクリーニングに必要な「MH疾患モデル細胞バンク」として応用することを目指した。

3. 研究の方法

申請者は、全長cDNA(約15000塩基対)に約1500塩基対毎にユニークな制限酵素部位をコードするアミノ酸配列を保ったまま導入し、制限酵素とリガーゼを利用して切り出し/差し入れが可能な「カセット構造化」に成功した。したがって、このcDNAカセットを利用した部位

特異的な変異導入が簡便に行なえるように改良した。

リアノジン受容体1型(RyR1)cDNAのカセット構造化について

(カラム内の縦線は、ユニークな制限酵素認識部位を示す)



RyR1をコードするアミノ酸配列を変えずにユニークな制限酵素切断部位を導入して「cDNAカセット構造化」を行った。

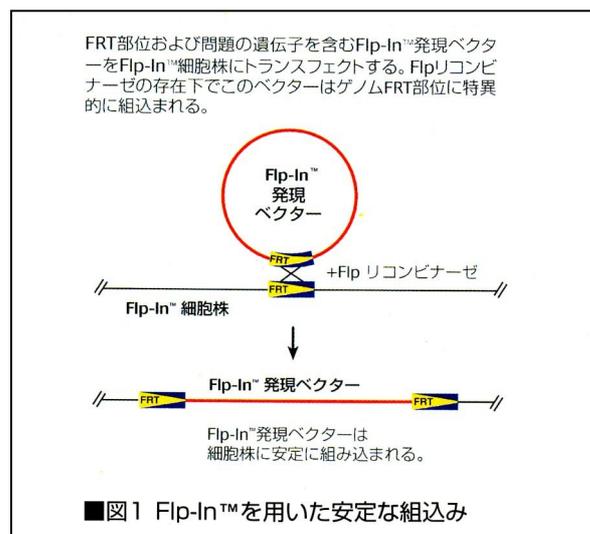
各カセット(約1500bp)は2種類の制限酵素でカット&ペーストが可能!



切り出した比較的短いcDNAカセット内でMH遺伝子変異(☆)を導入後に、元の位置に戻して全長とする。
☆「DNA sequence Design Supporter」にて、制限酵素部位をデザインして、変異導入の有無を簡易に確認できる。

本研究では、遺伝子組換え酵素 (Flp リコンビナーゼ) とその認識部位 FRT (Flp Recombination Target) を利用して細胞の染色体上の特定部位に目的

RyR1cDNA 遺伝子を効率的に組み込み、目的 RyR1 遺伝子を発現させることが出来る安定発現細胞群を樹立する実験系 (Flp-In システム、Invitrogen 社) を採用した。この実験系では目的 RyR1 遺伝子を染色体上の特定部位 FRT (1ヶ所) に組み込むので、挿入された目的遺伝子の染色体上での位置効果 (position effects) などの不安定な要因が少なくなり、比較的相同量な RyR1 発現量を持つ安定発現細胞株を獲得することが可能である。また、RyR1 の持続的な高発現状態



は細胞に毒性を生じてしまい、樹立した細胞株の維持や生細胞での細胞内 Ca²⁺動態の解析が困難となるので、テトラサイクリン (tetracycline, Tet) の添加により目的とする RyR1 の発現が誘導できる Tet 誘導発現系と組み合わせた Flp-In TRex システム (Invitrogen 社)、および Tet-Express システム (Takarabio-Clontech 社) を採用した。

樹立した RyR1 発現細胞株に Ca²⁺蛍光指示薬 fura2/AM を負荷した後、カフェインなど RyR1 作用薬を添加して小胞体からの Ca²⁺放出を介した細胞内 Ca²⁺濃度上昇の有無や細胞内 Ca²⁺シグナルパターンの変化を、顕微鏡一体型ハイコンテンツスクリーニングシステム (Image XpressMICRO、モレキュラーデバイス社) を用いて、細胞内 Ca²⁺イメージングによ

り画像解析を行った。

4. 研究成果

本研究を始めるに当たって、約 5000 アミノ酸残基から成る巨大なイオンチャンネルである RyR1 をコードする全長 cDNA が 15000 塩基対を超える長鎖になるために、培養細胞への遺伝子導入が困難となることが予測されたので、比較的導入効率の高いとされる HEK293 細胞を選択して実験をスタートした。この結果で樹立された Tet 誘導性 RyR1 発現 HEK 293 細胞株では、遺伝子導入操作毎の導入・発現の効率のバラ付きが少なくなって、一定量の RyR1 発現量を持つ安定細胞株として継代して維持することができるようになった。約 5000 アミノ酸配列の内アミノ基末領域 11 か所と中央部 14 か所（合計 25 か所）に MH 型アミノ酸配列に変異を持つ MH 型 RyR1 遺伝子変異体クローン（合計 25 種）を構築した。

次に、樹立した Tet 誘導性 RyR1 発現 293 細胞株の細胞内 Ca²⁺動態の解析のために、Ca²⁺蛍光指示薬 fura2/AM を負荷して、顕微鏡一体型 HCS(Image XpressMICRO、モレキュラーデバイス社)を使って得られた蛍光画像の解析から細胞内 Ca²⁺動態の細胞内 Ca²⁺イメージングを行うことができた。さらに、細胞内 Ca²⁺貯蔵部位である小胞体内部の Ca²⁺濃度も同時に測定するために Ca²⁺感受性の蛍光蛋白質である R-CEPIA1er を強制発現させることにより、Ca²⁺放出チャンネルである RyR1 活性のモニタリングもすることも可能となった。これらの結果、25 種類の MH 型 RyR1 変異体を発現する培養細胞株は MH 疾患モデル細胞になり得ることが判った。

しかし、カフェインなど RyR1 刺激薬を添加して測定する際に、HCS 機器から自動的に添加される溶液の流速(液圧)により、HEK293 細胞が培養ディッシュから剥離してしまい観測が困難になる場合が多かった。

このために、培養ディッシュ接着能が強く細胞内 Ca²⁺動態のイメージング操作に適すると考えられる CHO(チャイニーズハムスター卵巣由来)細胞にも、FRT 部位を有する新たな細胞株を獲得して樹立した。CHO 細胞においても RyR1 の強い持続的な発現状態は細胞死(アポトーシス)を引き起こすので、Tet 誘導性遺伝子発現様ではあるが、*P_{TRE3G}* プロモーターを持つ単一ベクターで目的遺伝子の発現を Tet-Express 添加により誘導できる Tet-Express 誘導性システム(Takarabio-Clontech 社)も採用することとした。そのために、pcDNA/FRT(Invitrogen 社)のサイトメガロウイルスプロモーター(*P_{CMV}*)部分を Tet 応答性因子 TRE3G プロモーター(*P_{TRE3G}*)に置き換えた pcDNA/FRT/TRE3G 型ベクターに改良して利用した。この培養ディッシュへの接着能が強い CHO 細胞を用いた場合には細胞内 Ca²⁺動態のイメージング解析に改善がみられた。

しかし、接着性の良い CHO 細胞における RyR1 発現の制御に用いている Tet-Express システム(Takarabio-Clontech 社)が一昨年(2017 年 11 月)より販売終了となったので、この代替えとなる膜透過性転写因子の作製をタカラバイオの担当者(林延江氏)と共に検討したが、発売元の Clontech 社からは明確な回答は得られなかった。このため、Tet-Express を断念して、他の方法(Tet-One システム、Tet システムと Cre-loxP システムを組み合わせた時空間的な発現誘導が可能な新たな発現誘導システムの開発等)も検討して研究を継続中である。

また、MH 型変異体を設計する際に、利用していた「アミノ酸配列はそのまま、その制限酵素切断部位を挿入出来る可能性のある位置」を教えてくれるネット上の "DNA sequence Design Supporter" が昨年初めより閉鎖されてしまい、変異体の塩基配列の設計が困難な状態陥っていたが、当サイトを運営した東京理科大学(山登一郎氏(名誉教授)と久保田幸雄氏(情

報管理課))のご配慮により再利用が可能となり、2018年11月より変異体の設計を再開することが可能となった。

(https://www.rs.noda.tus.ac.jp/~biost/OPFU/yama/public_html/test/ddsp.htm)

尚、本研究課題で使用したカセット構造化した野生型およびMH型RyR1変異体cDNA、並びにその発現細胞株の一部は、国内外(海外2、国内5か所)の研究者の要望により共同研究の形で提供して、現在も新たな研究が進行中である。これらの研究成果により、国内外で、MH発症に関わるRyR1遺伝子変異部位が明らかにされて術前のMH遺伝子診断の根拠となり得るものとされる事、さらには、これらのMH型RyR1変異体を発現する細胞をMH疾患モデルとしてより安全な新たな全身麻酔薬の開発に利用されてより安全な医療行為の発展に貢献できるものと期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 3件)

Kudo Y, Oyamada H, Matsuoka T, Inagaki A, Tsuchiya H, Ao Y, Kimura AM, Tsuji M, Oguchi K, Kiuchi Y. 「Construction of an all-in-one double-conditional shRNA expression vector」 Showa University Journal of Medical Sciences、査読有、vol.31、2019、pp41-50

Murayama T, Kurebayashi N, Ishigami-Yuasa M, Mori S, Suzuki Y, Akima R, Ogawa H, Suzuki J, Kanemaru K, Oyamada H, Kiuchi Y, Iino M, Kagechika H, Sakurai T. 「Efficient high-throughput screening by endoplasmic reticulum Ca²⁺ measurement to identify inhibitors of ryanodine receptor Ca²⁺-release channels.」Molecular Pharmacology、査読有、vol.94、No.1、2018、pp722-730.

Murayama T, Kurebayashi N, Ogawa H, Yamazawa T, Oyamada H, Suzuki J, Kanemaru K, Oguchi K, Iino M, Sakurai T. 「Genotype-phenotype correlations of malignant hyperthermia and central core disease mutations in the central region of the RYR1 channel.」Human Mutation、査読有、vol. 37、No.11、2016、pp1231-1241.

[学会発表](計 7件)

Oyamada H, Ao Y, Kudo Y, Okamoto R, Matsuoka T, Inagaki A, Aoyama E, Oguchi K, Kiuchi Y. 「Design and constructs of the single "All-in-One" type single double-conditional shRNA expression vectors for a spatio-temporal gene and/or cell targeting」第92回日本薬理学会年会、2019

山澤徳志子, 山口眞紀, 小川治夫, 村山尚, 小山田英人, 呉林なごみ, 鈴木純二, 金丸和典, 櫻井隆, 飯野正光「悪性高熱症関連変異を有する骨格筋型リアノジン受容体の構造と機能変化」日本筋学会第4回学術集会、2018

村山尚, 呉林なごみ, 湯浅磨里[石上], 森修一, 鈴木志奈, 秋間龍之介, 小川治夫, 鈴木純二, 金丸和典, 小山田英人, 木内祐二, 飯野正光, 影近弘之, 櫻井隆「小胞体内Ca²⁺濃度測定を利用した新規RyR1阻害薬のハイスループットスクリーニング」日本筋学会第4回学術集会、2018

Murayama T, Kurebayashi N, Ogawa H, Yamazawa T, Oyamada H, Oguchi K, Sakurai T. 「Genotype-phenotype correlations of central core disease mutations in the C-terminal region of the RYR1 channel」第90回日本薬理学会年会、2017

Suzuki Y, Akima R, Murayama T, Kurebayashi N, Ishigami-Yuasa M, Mori S, Kagechika H, Suzuki J, Kanemaru K, Iino M, Oyamada H, Oguchi K, Ogawa H, Toyoshima C, Sakurai T. 「A novel screening method for drugs inhibiting type 1 ryanodine receptor (RyR1) by ER Ca²⁺ monitoring」第90回日本薬理学会年会、2017

Oyamada H, Kudo Y, Ao Y, Okamoto R, Inagaki A, Matsuoka T, Oguchi K, Kiuchi Y. 「Some improvements in "all-in-one type" of a single double-conditional shRNA expression vector for making a spatio-temporal gene controlled transgenic animal」第90回日本薬理学会年会、2017

工藤芳子, 小山田英人, 松岡朋之, 土屋洋道, 稲垣彩美, 小口勝司, 木内祐二「時間的な遺伝子発現制御を目的とした二重支配型短鎖ヘアピン型RNA発現ベクターの単一化」第64回昭和大学学士会総会、2017

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：小山田英人

ローマ字氏名：OYAMADA HIDETO

所属研究機関名：昭和大学

部局名：医学部

職名：講師

研究者番号(8桁): 50266160

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。