

令和元年6月20日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K20098

研究課題名(和文)人工多能性幹細胞(iPS細胞)を用いた悪性高熱症の低侵襲的診断法の確立

研究課題名(英文) Establishment of a minimally invasive diagnostic method using induced pluripotent stem cells

研究代表者

近藤 隆志(Kondo, Takashi)

広島大学・病院(医)・助教

研究者番号：20711774

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：主な目的である悪性高熱症の患者血液もしくは皮膚から作成したiPS細胞を分化させた筋組織による機能検査の確立はできなかったが、代替手法である線維芽細胞から筋芽細胞への直接転換を経た筋管細胞作成は可能となり、今後の新たな機能検査確立の可能性が示された。
また、並行して行った患者の遺伝子情報解析から新たに発見された遺伝子変異が悪性高熱症の発症原因の一つである1型リアノジン受容体の機能異常をきたすことを、Human embryonic kidney cell (HEK細胞)を用いたカルシウム感受性試験により示すことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

悪性高熱症の診断には機能検査として筋生検が重要であるが、特に小児患者においては筋生検が侵襲的検査であることが問題となるため、本研究により悪性高熱症の低侵襲的診断法を確立できる可能性が示されたことで今後の診断がより簡便に行えることが期待される。
また、遺伝子情報解析およびHEK細胞による機能解析により、悪性高熱症の原因となるリアノジン受容体の新たな遺伝子変異を同定することができた。

研究成果の概要(英文)：It was not possible to establish a functional test with muscle tissue differentiated from iPS cells created from blood or skin of patients with malignant hyperthermia. However, direct conversion from fibroblasts to myoblasts as an alternative method has become possible to create myotubes through the study, and the possibility of establishing a new functional test has been shown.
In addition, it is shown by a functional analysis using human embryonic kidney cells that gene mutations newly discovered from gene information analysis of patients performed in parallel cause functional abnormality of type 1 ryanodine receptor which is one of the causes of onset of malignant hyperthermia.

研究分野：麻酔科学

キーワード：悪性高熱症

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

1. 研究開始当初の背景

悪性高熱症は揮発性吸入麻酔薬や脱分極性筋弛緩薬によって誘発される筋疾患であるが、日常生活ではほとんど症状はなく、薬剤等により誘発されて発症する。若年男性に好発するとされ、ひとたび発症すると迅速に診断・治療が行われないと致命的となり、死亡率は10~15%と報告されている。悪性高熱症の主病因は、骨格筋細胞内に存在する1型リアノジン受容体(RYR1)の遺伝子変異によるカルシウム代謝異常と考えられており、原因薬剤によりRYR1が活性化されることで筋小胞体からのカルシウム放出が促進され、細胞内カルシウム濃度の上昇により骨格筋の異常収縮が生じ、代謝亢進および筋細胞の破壊に伴い発熱、アシドーシス、高カリウム血症、高ミオグロビン血症などの症状を呈する。

悪性高熱症の確定診断を行うためには、遺伝子検査の他に筋生検による機能検査が必要であるが、小児の場合は全身麻酔下での筋生検となるため、侵襲が大きく検査を行うことが困難な状態にある。一方、悪性高熱症に関係するRYR1の表現型の差異は原因遺伝子の変異以外にも多くの環境および遺伝要因によって生じると考えられており、発症の原因となる遺伝子変異に関しては明らかになっていない部分も多い。

2. 研究の目的

対象患者から採取した血液および皮膚からiPS細胞を作成した後、iPS細胞を分化させて作成した骨格筋細胞を用いて機能検査を行い、筋生検を必要としない検査法を確立することを主たる目的とする。iPS細胞を用いた診断法が確立すれば、従来の筋生検を必要とする検査よりも患者に与える侵襲が軽減されることとなり、遺伝子情報の収集および解析がより一層進むことが期待される。

また、機能検査と並行して患者の遺伝子情報を解析することにより、悪性高熱症の原因として現在既知の遺伝子変異に加え新たな原因遺伝子を同定することができ、病態のさらなる解明ならびに効果的な治療方法への応用が可能となると考えられる。

3. 研究の方法

悪性高熱症の確定診断のための機能検査の一つであるCa-induced Ca release (CICR) 検査を受ける患者を対象とする。CICR検査は、筋生検を行って採取した筋組織よりスキンドファイバーを作成し、これに種々の濃度のカルシウムを負荷して筋小胞体からのカルシウム放出速度を算出することで、筋小胞体のカルシウム代謝を評価するものである。

まず、対象患者のCICR検査に際して筋生検を行う際に、血液および皮膚の一部を採取し、白血球あるいは皮膚線維芽細胞へウイルスベクター等を用いて分化万能性の獲得に必要な数種類の遺伝子を導入し、iPS細胞を作成する。遺伝子導入の確認は、GFPなどの蛍光蛋白を同時に導入することにより評価する。iPS細胞の作成方法はいくつか報告されているため、従来の方法に則り作成を行うが、困難な場合は使用するベクターの変更(他のウイルスベクターやエピソーマルベクターなど)など、条件を再検討する。

次に、作成したiPS細胞を専用培地で培養し、骨格筋細胞へ分化誘導する転写因子(Myod1)を組み込んだ遺伝子発現ベクターをiPS細胞に導入することで骨格筋細胞に分化させる。iPS細胞から骨格筋細胞への分化誘導は、既報の方法に従って行う。

以上の方法でも骨格筋細胞が作成できない場合は、遺伝子導入条件の変更や、Myod1を組み込んだ遺伝子発現ベクターを直接線維芽細胞に導入して骨格筋細胞に分化させることなどを検討する。

骨格筋細胞の作成法を確立した後、作成した悪性高熱症疑いの患者由来の骨格筋細胞に対してカルシウム感受性試験を行う。カルシウム感受性試験は、われわれの研究室で行っているプロトコルに従って行う。細胞内カルシウム濃度の測定は、カルシウムイオンと特異的に結合する蛍光プローブ(Fura-2)を導入した骨格筋細胞に蛍光顕微鏡で二波長の光(340nm/380nm)を照射して観察すると、細胞内カルシウム濃度上昇に伴いFura-2 ratio(340nm/380nm)が上昇することを利用して行う。340/380nm比は、カルシウムイメージングシステムを用いて計算する。カルシウム感受性を評価するために、RYR1刺激薬(カフェイン、4-クロロ-M-クレゾール)を骨格筋細胞に段階的に負荷してそれぞれの薬剤濃度に対して得られたFura-2 ratioから用量反応曲線を作成してEC50を算出し、コントロールと比較する。コントロールは、CICR検査が陰性(=カルシウム放出速度の亢進を認めない)の患者から得た骨格筋細胞とする。コントロールと比較してEC50の有意な低下(=カルシウム感受性の亢進)を認め、臨床所見や他の検査法でも悪性高熱症の陽性所見が得られた場合、iPS細胞から作成した骨格筋細胞を用いたカルシウム感受性試験が有用であると考えられる。

4. 研究成果

初年度は血液からのiPS細胞作成およびiPS細胞からの骨格筋細胞作成を確立させることを目標としていたが、血液からのiPS細胞作成が遺伝子導入手法などの問題により困難であったため、研究立案時に計画していた代替手法としての線維芽細胞を利用した骨格筋細胞作成をiPS細胞作成と並行して開始した。骨格筋細胞への分化誘導を促す転写因子Myod1を組み込んだ遺伝子発現ベクターを直接線維芽細胞に導入することで同様に骨格筋細胞への分化が期待できる。線維芽細胞にMyod1を導入すると、まず線維芽細胞が単核の筋芽細胞へと転換され、筋芽

細胞が増殖融合することで多核の筋管細胞となり最終的に筋収縮能を持つこととなる。筋管細胞を培養増殖させることで筋細胞としての機能解析を行うことが可能となるが、初年度は筋管細胞を作成する段階まで実現することができた。

次年度からは、主に使用する材料を線維芽細胞に変更して線維芽細胞からの iPS 細胞作成を試みるとともに、線維芽細胞に直接 MyoD1 を組み込んだ遺伝子発現ベクターを導入することにより線維芽細胞を筋芽細胞に分化させて骨格筋細胞を作成する代替実験を行った。線維芽細胞からの iPS 細胞作成は血液からの iPS 細胞作成と同様に困難であった。代替実験で筋芽細胞から筋管細胞の作成は可能となったが、細胞培養条件などの問題により次の段階である筋管細胞による機能解析を安定して行える状況には至らなかった。そのため、機能検査と並行して計画していた遺伝子情報解析の一環として、対象となる CICR 検査を行われた患者から新たに同定された遺伝子変異 c.251 C>T (p.Thr84Met) に対して、human embryonic kidney 細胞 (HEK 細胞) を用いた機能解析を行うこととした。機能解析として、遺伝子変異 Thr84Met を持つ RYR1 遺伝子を導入して p.Thr84Met-RYR1 受容体を発現させた Human Embryonic Kidney (HEK 293 細胞) と、コントロールとしての野生型 (wild type: WT) の RYR1 遺伝子を導入して WT-RYR1 受容体を発現させた HEK293 細胞を比較することにより、p.Thr84Met-RYR1 受容体のカルシウム代謝の評価を行った。HEK293 細胞への遺伝子導入は遺伝子導入試薬を用いて行い、蛍光蛋白質 (GFP) が組み込まれたベクターに RYR1 遺伝子を挿入して人工的に作成した p.Thr84Met および WT の 2 種類の RYR1 発現ベクターをそれぞれ HEK293 細胞内に導入した後、蛍光顕微鏡により RYR1 の発現を確認した。カルシウム代謝の評価は、上記研究方法で述べた骨格筋細胞に対するカルシウム感受性試験と同様の方法で行った。2 種類の HEK293 細胞に RYR1 刺激薬 (カフェイン) を段階的に負荷して、それぞれの濃度に対して得られた反応の比率から用量反応曲線を作成し、50% 効果濃度 (EC50) を算出して比較した。EC50 (mM) は、WT: 2.70 ± 0.56 、p.Thr84Met: 1.81 ± 0.69 ($p < 0.05$) となり、2 種類の RYR1 の間で有意差を認めた。この結果より、p.Thr84Met-RYR1 は RYR1 刺激に対するカルシウム感受性が亢進していると考えられたため、その結果について学会発表を行った。

最終年度も線維芽細胞からの iPS 細胞作成を試みたが、それまでと同様に困難であり確立するに至らなかった。そのため、前年度に行った p.Thr84Met-RYR1 の HEK 細胞を用いた機能解析に加えて遺伝子解析および筋管細胞による機能解析を行い、この遺伝子変異がカルシウム代謝に与える影響を詳細に検討した。遺伝子については、患者および家族の末梢血から抽出した DNA を用いて PCR-サンガー法による RYR1 遺伝子変異の検索を行った。3 種類の遺伝子解析プログラム (Mutation Taster, PolyPhen2, SIFT) により病的意義の判定を行った結果、p.Thr84Met には遺伝性および病的意義があると判定された。機能解析については、患者の筋組織から得た筋芽細胞を培養して作成した筋管細胞とカルシウム代謝異常を持たない筋管細胞の比較、遺伝子変異を持つ RYR1 遺伝子を導入した Human Embryonic Kidney (HEK) 293 細胞と野生型 (wild type: WT) の RYR1 遺伝子を導入した HEK293 細胞の比較、の 2 つによりカルシウム代謝の評価を行った。カルシウム代謝の評価は、Fura-2 を負荷した筋管細胞もしくは HEK293 細胞に RYR1 刺激薬を段階的に負荷して、得られた用量反応曲線から算出した EC50 を比較して行った。RYR1 刺激薬にはカフェインとクレゾールを用い、EC50 を患者由来の筋管細胞 (Patient) とカルシウム代謝異常を持たない筋管細胞 (Control)、p.Thr84Met-HEK293 細胞 (p.Thr84Met) と WT-HEK293 細胞 (WT) の間でそれぞれ比較した。筋管細胞の RYR1 刺激薬に対する EC50 は、カフェインで Control (n=17): 5.08 ± 0.60 mM、Patient (n=13): 3.02 ± 0.88 mM、クレゾールで Control (n=17): 277.2 ± 63.8 μ M、Patient (n=13): 160.6 ± 92.8 μ M となり、両刺激薬で 2 種類の筋管細胞の間で有意差を認めた (カフェイン: $p < 0.0001$ 、クレゾール: $p = 0.0003$)。また、用量反応曲線は患者由来の筋管細胞で左方偏移を示し、カルシウム感受性の亢進を示した。HEK293 細胞の RYR1 刺激薬に対する EC50 は、カフェインで WT (n=30) は 2.70 ± 0.57 mM、p.Thr84Met (n=30) は 1.81 ± 0.70 mM、クレゾールで WT (n=30) は 119.8 ± 30.1 μ M、p.Thr84Met (n=30) は 84.0 ± 31.3 μ M となり、いずれも 2 種類の HEK 細胞の間で有意差を認めた (カフェイン、クレゾールとも $p < 0.0001$)。用量反応曲線も筋管細胞と同様に p.Thr84Met 細胞群で左方偏移を示し、カルシウム感受性の亢進を示した。これらの結果から、RYR1 の遺伝子変異 p.Thr84Met は、RYR1 刺激に対する反応性を亢進させ、悪性高熱症の発症に関与している可能性が示唆されたため、その成果について論文報告を行った。

本研究期間中、主な目的であった悪性高熱症の患者血液もしくは皮膚から作成した iPS 細胞を分化させた筋組織による機能検査の確立はできなかったが、代替手法である線維芽細胞から筋芽細胞への直接転換を経た筋管細胞作成は可能となり今後の新たな機能検査確立の可能性が示されたことで、悪性高熱症の診断がより簡便に行えることが期待される。また、遺伝子情報解析および細胞機能解析により、悪性高熱症の原因となる RYR1 の新たな遺伝子変異を同定することができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1. Kondo T, Yasuda T, Mukaida K, Otsuki S, Kanzaki R, Miyoshi H, Hamada H, Nishino I, Kawamoto M.
Genetic and functional analysis of the RYR1 mutation p.Thr84Met revealed a susceptibility to malignant hyperthermia.
J Anesth. 2018 Apr;32(2):174-181. 査読有
DOI:10.1007/s00540-018-2451-6.

〔学会発表〕(計 1 件)

1. 近藤隆志, 安田季道, 向田圭子, 濱田宏, 河本昌志
「悪性高熱症素因を有する患者より新規に発見された 1 型リアノジン受容体遺伝子変異の機能解析」
2017 年(平成 29 年)6 月 8-10 日 日本麻酔科学会第 64 回学術集会(福岡)

〔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

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。