

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08856

研究課題名（和文）悪性高熱症の新規原因遺伝子の機能解析

研究課題名（英文）Functional analysis of new causative genes of malignant hyperthermia

研究代表者

安田 季道（Yasuda, Toshimichi）

広島大学・医系科学研究科（医）・助教

研究者番号：20432718

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：今回の研究では、リアノジン受容体以外から悪性高熱症の原因となる可能性がある遺伝子変異が発見された場合にどのような実験系において確認を行っていくかを検討した。ノックインマウスを複製し吸入麻酔薬および脱分極性筋弛緩薬に対する個体の反応を見るだけでなく、筋管細胞を培養し細胞内のカルシウム動態の変化を観察するなどの補助的な実験を組み合わせるべきであると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

悪性高熱症の原因となる遺伝子変異はそのほとんどがリアノジン受容体から見つかっているが、すべてが見つかるわけではない。今後、新たな遺伝子に存在する遺伝子変異が悪性高熱症の原因となる可能性が指摘されたとき、今回検討した実験系を使用することにより、その遺伝子変異が本当に悪性高熱症の原因となりうるのかが検証できる。新たな原因遺伝子を発見することは、悪性高熱症の原因を探索し治療を考えることにおいて非常に有意義なことである。

研究成果の概要（英文）：In the study, we investigated how to confirm the discovery of genetic mutations other than ryanodine receptors that may cause malignant hyperthermia in an experimental system. In addition to knock-in mice to observe the response of individuals to inhalational anesthetics and depolarizing muscle relaxants, it was thought that additional experiments, such as culturing myotubular cells and observing changes in intracellular calcium dynamics, should be conducted in combination.

研究分野：悪性高熱症

キーワード：悪性高熱症 リアノジン受容体 遺伝子変異 ジヒドロピリジン受容体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

悪性高熱症の原因の一つとして、リアノジン受容体の遺伝子変異が指摘されてきた。

リアノジン受容体には現在、悪性高熱症に関連する300以上の遺伝子変異が報告されており、そのうち36の遺伝子変異に関しては機能解析が行われ、悪性高熱症の原因となることが確認されている。近年、リアノジン受容体以外の遺伝子が悪性高熱症の原因となっている可能性が指摘されている。現在、標準的に行われている悪性高熱症の機能解析の方法では、リアノジン受容体の遺伝子変異の機能解析は可能であるが、他の遺伝子の機能解析を行なうことはできない。今回の研究ではリアノジン受容体以外から発見された遺伝子変異が悪性高熱症の原因であるか否かを確認するための新たな実験系を作成し、それらの機能解析を行っていく。

2. 研究の目的

今回の研究の目的はリアノジン受容体以外の遺伝子に存在する遺伝子変異が悪性高熱症の原因となるかを判定する実験系を確立することである。まず、ジヒドロピリジン受容体に存在する悪性高熱症の原因となりうる候補の遺伝子変異が、実際に悪性高熱症の原因となるのかを確認する。本研究ではリアノジン受容体およびジヒドロピリジン受容体以外の原因遺伝子の遺伝子変異が本当にMHの原因となるかを検証する実験系を確立することを目的とする。2つの実験系を作成する予定である。CRISPR/Cas9システムを使用したノックイン細胞の作成およびそれを用いた希少疾患の原因遺伝子の機能解析が行われてきているが、悪性高熱症の原因遺伝子の機能解析に使用されたことはない。広島大学では、現在、次世代シーケンサーを使用した悪性高熱症の新規原因遺伝子の探索を行っている。この研究から新規原因遺伝子の候補が発見された場合は、ジヒドロピリジン受容体の遺伝子変異の機能解析に引き続きそれら遺伝子変異の機能解析をこの実験系を用いて行っていく予定である。

3. 研究の方法

ノックインマウスの作成

目的とする遺伝子変異の部位に相当するガイドRNA設計する。それとともに受精卵に導入するCas9のmRNAは発現プラスミドを使用して合成する。ドナーDNAには、一本鎖オリゴヌクレオチド(ssDNA)を使用する。遺伝子導入のための溶液は、Cas9mRNA、ガイドRNAおよびssDNAを混合してRNase free waterで調製する。マウス受精卵に対し、混合溶液を顕微注入する。

ノックイン細胞の作成

細胞はマウス筋細胞の細胞株であるC2C12細胞を使用する。DMEMに10%FCSと抗生物質を加えた培養液を用い、37℃、5%二酸化炭素下でC2C12細胞を培養する。測定用の培養容器に継代したのち、培養液を2%FBS/DMEM/F12に変更し筋管細胞への分化を誘導する。目的とする遺伝子変異の部位に相当するガイドRNA設計する。Cas9は生成されたタンパク質を使用する。ガイドRNA、Cas9タンパクおよびドナーDNAの混合液をC2C12に遺伝子導入する。抗生物質の耐性が獲得されているので細胞を選択していく。

Myotubesの培養

ノックインマウスから筋芽細胞を採取したのち、25cm²のフラスコで80%コンフルエントになるまで培養する。トリプシンを用い細胞を回収した後、測定用の35mmのノンコートガラスボトムディッシュに撒いて同様に培養し、80%コンフルエントの状態で培地を2%FBS加DMEM/F12に変

更し, myotubeへの分化を誘導した後, 培地変更後7~10日で測定を行う。

励起波長比(Ratio) 340/380の測定

カルシウム蛍光指示薬であるFura2/AM 5 μ Mを室温で1時間負荷後, Hepes-buffered salt solution (HBSS)で洗浄して30分間静置する。蛍光倒立顕微鏡とカルシウム画像解析装置を使用して, 340 nmと380nmの2波長で励起し測定は510nmで行う。37 °CのHBSSで灌流し, 340/380の比を算出する。Ca²⁺キャリブレーションキットを使用して340/380比からCa²⁺濃度への換算を行う。リアノジン受容体の刺激薬に対する細胞内カルシウムの濃度変化をノックインマウスの細胞およびコントロールの細胞で比較し, その遺伝子変異がMHの原因となりうるかを調べる。C2C12に関しても同様の方法を用いて, 野生型をコントロールとして比較検討する。

4. 研究成果

今回の研究では, C2C12 というマウス筋芽細胞由来の細胞株にゲノム編集により遺伝子変異を導入することからはじめた。まずは, ノックインよりも比較的容易であると考えられるジヒドロピリジン受容体のノックアウト細胞を作製することにした。しかし, ノックアウト細胞の作製時のノックアウトが成功している細胞を選択する過程が非常に難しく, 結局ノックアウト細胞を選択し回収することができなかった。比較的容易といわれているノックアウト細胞の作製ができなかったことで方法論の修正が必要であると考えられた。ノックインの導入効率に関しては細胞株に対してよりもマウスに対してのほうが高いことが知られている。われわれの今までの実験手法から細胞株を使用した実験のほうが都合がよいという理由から細胞株を使用した実験をはじめたが, 細胞株ではなくマウスへのノックインを行っていく必要があると考えられた。悪性高熱症の新規原因遺伝子を継続的に検索していきながら, ノックインマウスを作製するための実験を行える環境づくりを行った。まず, 実際にノックインマウスを作製する遺伝子変異の候補を選定した。ジヒドロピリジン受容体の遺伝子変異候補として, 4か所が挙げられた。これらはいずれも遺伝子変異の解析でよく使用される CADD が 26 以上と高く, mutation taster, PolyPhen2 および SIFT などのアルゴリズムにおいても病原性が高いことが確認された。ジヒドロピリジン受容体以外のいわゆる新規の原因遺伝子の候補としては, 数個の遺伝子が挙げられた。それらのどの部位の遺伝子変異がより原因遺伝子として確からしいかを検討したが, 候補となる遺伝子変異は結局見つからなかった。ジヒドロピリジン受容体のノックインマウスを実際に作製するための準備としては, 大学内で組換え DNA 実験および動物実験の実験計画書を提出して, 審査を通過させるなど進めていたのだが, どの遺伝子のどの部位に変異を入れるべきかということが最終的に決定できなかったことなどの理由からノックインマウスを作製するまでには至らなかった。そのため, ノックインマウスを作製した後に行う細胞による機能解析を行うための実験系を作成することにした。過去に凍結保存していた筋芽細胞を解冻し, 実験に使用した。リアノジン受容体(RYR1)およびジヒドロピリジン受容体(CACNA1S)に遺伝子変異を持つ筋芽細胞のうち, 過去に病的であると確認されている変異であるリアノジン受容体の 614 番目のアルギニンがロイシンにアミノ酸置換される遺伝子変異(RYR1 R614L)およびジヒドロピリジン受容体の 174 番目のアルギニンがトリプトファンにアミノ酸置換される遺伝子変異(CACNA1S R174W)を持つ筋芽細胞についてカフェイン刺激による細胞内カルシウム濃度の変化を測定した。

RYR1 R614L の筋芽細胞ではリアノジン受容体の刺激薬であるカフェインに対する 50%効果濃度(EC50)は 2.38mM とコントロールに比較して有意な低下を認めた。また, CACNA1S R174W の筋芽細胞ではカフェインの EC50 は 2.38mM であった。一方で, R174W の別の検体では EC50 が 4.45mM

となった。正常者から採取された筋芽細胞のカフェインのEC50は一般的に4~5mM程度である。今回はそれに比較して明らかにEC50が低下していると予想される検体を使用した。ジヒドロピリジン受容体の遺伝子変異がある筋芽細胞では有意な低下を確認できなかったものがあった。リアノジン受容体に遺伝子変異がある細胞と比較するとジヒドロピリジン受容体に遺伝子変異が存在する細胞ではEC50の低下が顕著でない細胞も存在する可能性が示唆された。それゆえ、リアノジン受容体に遺伝子変異がある場合に比較してそのほかの遺伝子に遺伝子変異が存在する場合は表現型が緩やかな可能性があり、それらが病的であるかを判定する場合には様々な実験系を組み合わせる必要があることが示唆された。ノックインマウスを作製した際には個体に吸入麻酔薬を使用した時の体温の反応などに並行して、細胞の実験なども組み合わせる病的な遺伝子変異なのか否かの判定を行っていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Otsuki S, Yasuda T, Mukaida K, Noda Y, Kanzaki R, Miyoshi H, Kondo T, Hamada H, Kawamoto M.	4. 巻 32
2. 論文標題 Myotoxicity of local anesthetics is equivalent in individuals with and without predisposition to malignant hyperthermia.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Anesth.	6. 最初と最後の頁 616-618
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00540-018-2526-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kondo T, Yasuda T, Mukaida K, Otsuki S, Kanzaki R, Miyoshi H, Hamada H, Nishino I, Kawamoto M.	4. 巻 32
2. 論文標題 Genetic and functional analysis of the RYR1 mutation p.Thr84Met revealed a susceptibility to malignant hyperthermia.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Anesth.	6. 最初と最後の頁 174-181
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00540-018-2451-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 安田 季道, 河本 昌志	4. 巻 42
2. 論文標題 【現場で使い尽くす診療ガイドライン選集2018】もう一步踏み込むための重要ガイドライン 患者管理・その他 悪性高熱症患者の管理に関するガイドライン2016	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 救急医学	6. 最初と最後の頁 1480-1483
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 近藤 隆志, 安田 季道, 神崎 理英子, 向田 圭子, 濱田 宏, 河本 昌志
2. 発表標題 悪性高熱症患者で発見された1型リアノジン受容体の一塩基多型E3756Qの機能解析
3. 学会等名 第66回日本麻酔科学会年次総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 神崎理英子、安田季道、向田圭子、森野豊之、川上秀史、河本昌志
2. 発表標題 悪性高熱症の原因遺伝子スクリーニング
3. 学会等名 第66回日本麻酔科学会年次総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuko Noda, Toshimichi Yasuda, Hirotsugu Miyoshi, Keiko Mukaida, Hiroshi Hamada
2. 発表標題 Functional Analysis of Newly Found Ryanodine Receptor 1 Variants in Malignant Hyperthermia Susceptible Patients
3. 学会等名 ANESTHESIOLOGY annual meeting
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 神崎 理英子、安田 季道、向田 圭子、三好 寛二、大月 幸子、河本 昌志
2. 発表標題 悪性高熱症の原因遺伝子の変異と臨床所見およびCa-induced Ca release速度との関連
3. 学会等名 第65回日本麻酔科学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	外丸 祐介 (Sotomaru Yusuke) (90309352)	広島大学・自然科学研究支援開発センター・教授 (15401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------