

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K17783

研究課題名(和文) 悪性高熱症の新規原因遺伝子の探索

研究課題名(英文) Investigation of new causative genes for malignant hyperthermia

研究代表者

神崎 理英子 (Kanzaki, Rieko)

広島大学・病院(医)・寄附講座助教

研究者番号：70751402

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：悪性高熱症(malignant hyperthermia: MH)の素因の有無を調べるCICRテストが正常ではない患者8人とCICRテストは行っていないが臨床症状や家族のCICRからMHの素因を持っている可能性が比較的高いと思われるMH患者・家族6人の患者について、次世代シーケンサーを用いて遺伝子スクリーニングを行った。遺伝子の病原性が確定したvariant(多様体)を2サンプルに認め、存在頻度や病原性を評価するプログラムから病的だと判断されたvariantを3サンプルに認めた。これら3サンプルのvariantは機能解析を行い、新規の原因遺伝子が否か順次調査を行う予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究でRYR1およびCACNA1Sの中に病的である可能性の高いvariants(多様体)を3種類認めた。現段階では一般集団での該当遺伝子の存在する割合やbioinformaticsを用いた予測などからの推定なのでMHの原因遺伝子と完全に断定はできないが、今後機能解析を行うことで原因遺伝子だと確定する可能性は高い。筋生検を行わず低侵襲な血液からの遺伝子解析のみでMH素因を診断できる割合は、現在2割前後(当院にあるサンプルを参考にした場合)と低いが、今後、原因遺伝子と確定された遺伝子を少しずつ増やして行くことで、遺伝子解析でMH素因を診断できる割合を高くしていくことができる。

研究成果の概要(英文)：Eight patients and their families with a predisposition to MH from the CICR test and six MH patients and their families who did not perform CICR test but were likely to have a predisposition to malignant hyperthermia were genetically screened using a next-generation sequencer. We found known causative gene in two samples. Variants in RYR1 and CACNA1S, which may be pathogenic were found in three samples. We plan to analyze the functions of these three variants and investigate whether they are new causative genes.

研究分野：悪性高熱症

キーワード：悪性高熱症 遺伝子解析 RYR1 CACNA1S

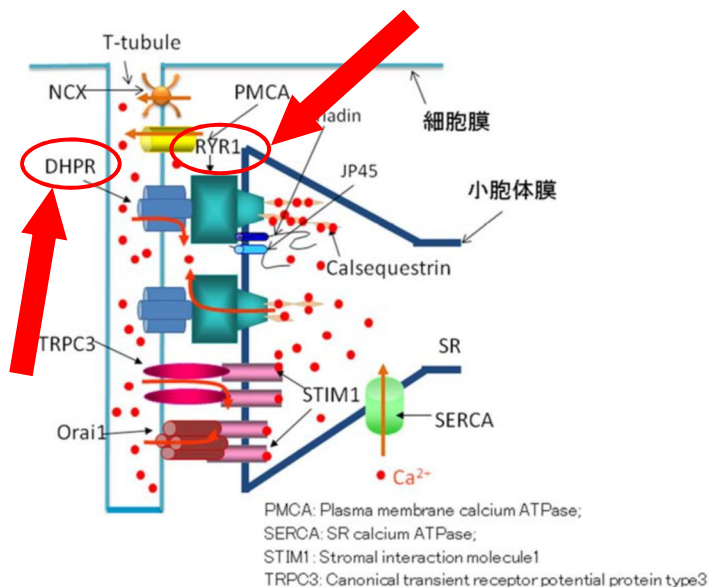
様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

悪性高熱症 (malignant hyperthermia: MH) は全身麻酔症例の 1 万 ~ 25 万例に 1 例に発生し、その頻度は稀であるが、致死的で重篤な麻酔の合併症の 1 つである。MH 素因をもった患者に誘因となる麻酔薬を使用すると骨格筋細胞質の Ca^{2+} が上昇する。この Ca^{2+} の上昇により、骨格筋細胞内の代謝が亢進し、体温上昇、頻脈、呼吸性・代謝性アシドーシス、筋強直、横紋筋融解を引き起こす。適切に治療されない場合は致命的となる。

MH の原因遺伝子として *RYR1* や *CACNA1S* が指摘されているが (右図、大矢印部分)、MH 素因者のうち *RYR1* に遺伝子変異が見つかる症例は約 70% で、*CACNA1S* に原因遺伝子が見つかる症例は約 1% と報告されている。このため、*RYR1* と *CACNA1S* 以外に、MH 発症に関与する遺伝子の存在があると予測される。

また、申請者は、本邦の MH 症例の遺伝子の研究で、*CACNA1S* の変異の割合が海外より高い可能性を示唆した。(神崎理英子ほか 最優秀演題 Q-OP1 日本麻酔科学会 第 66 回学術集会) しかし、いまだ不明な点も多く、MH の病態解明のためにも原因遺伝子の検索は重要な課題となっている。



2. 研究の目的

今回の研究の目的は、*RYR1* および *CACNA1S* 以外の新規の MH の原因遺伝子を探索して、将来的により安全な麻酔に寄与することである。

MH 素因を疑われる人が全身麻酔下に手術を受ける場合、MH 素因の有無が術前の段階で明らかになれば、より安全な医療を提供することが可能になる。MH 素因の診断法として Ca induced Ca release (CICR) 測定があるが、筋生検が必要で侵襲的な検査であるため、実施できる症例は限られるのが実態である。現在、原因遺伝子の特定には次世代シーケンサーを使用した遺伝子解析が進歩しており、速やかで安価な遺伝子診断が可能となりつつある。しかしながら、MH は重篤な疾患であるが、頻度が稀であるために遺伝子について研究が進んでおらず、素因者の 3 割ほどは原因遺伝子が不明である。

広島大学麻酔蘇生学教室では、1987 年から CICR 速度検査による MH の素因診断を行ってきた。さらに、その際に使用した骨格筋の余剰筋を保存しており、様々な研究に展開利用してきた。また、申請者らの研究グループはそれらを利用することで、余剰筋からヒト培養骨格筋細胞 (筋管細胞: myotubes) を作成し、様々な薬剤に対する細胞内 Ca^{2+} 動態を比較検討し報告してきた (Kobayashi M, et al. Anaesth Intensive Care 2011; 39: 252-61、Migita T, et al. J Anesth 2012; 26:579-584)。わが国に同様の研究をしている施設はほとんどなく、この研究により MH の新規の原因遺伝子を探索し、遺伝子診断の感度を上げることができれば、より安全な麻酔を行うことに寄与できる。

3. 研究の方法

本研究では、MH 素因を持つ患者の *RYR1* および *CACNA1S* 以外の新規の遺伝子変異の探索を行う。MH を発症した患者や家族で、MH 素因の診断のために、検査を受けた人・受ける人からの筋サンプル・血液サンプルを対象として、以下の実験 1~3 を行う。

実験 1. 筋管細胞の細胞内 Ca^{2+} 動態を測定し比較検討する。

MH を発症した患者や家族の筋サンプルを用い筋管細胞を培養し、細胞内 Ca^{2+} 動態を測定する。 Ca^{2+} 濃度は、Fura-2 AM プローブを用い励起波長 340/380nm、蛍光波長 510nm にて蛍光顕微鏡を介しイメージを取り込む (ORCA-AG; Hamamatsu Photonics)。筋管細胞の性質を確認するために、*RYR1* のアゴニストであるカフェイン (0.25、0.5、1.0、2.5、5.0、10、20 mM)、クレゾール (3.0、10、30、100、300、500、1000 μ M) をそれぞれ負荷し、反応から 50% 効果濃度を導き出す。

実験 2. CICR が亢進している患者のサンプルについて DNA の抽出を行い, RYR1 および CACNA1S の遺伝子変異のスクリーニングを行う.

実験 1. において反応の見られたサンプル患者からの血液を用いて, Quick Gene DNA 全血キット, 組織や細胞からは Quick gene DNA 組織キットを使用して DNA を抽出する. Quick Gene 810 を使用することで, 効率的に実験に必要な高純度な DNA を抽出することが可能となる. 抽出した DNA について, ターゲット領域を増幅し (Ion AmpliSeq Kit 使用), Ion PGM Hi-Q View OT2 Kit と Ion PGM Hi-Q View Sequencing Kit を使用して, 次世代シーケンサー (Ion PGM システム) を施行する. 読み取った変異について, 実際に変異が存在するかを Sanger 法で確認する.

実験 3. RYR1 および CACNA1S に遺伝子変異がなかったサンプルについて exome sequence を行い, 新規 MH の原因遺伝子を導き出す.

スクリーニングを行った検体の中で, RYR1 および CACNA1S に原因遺伝子を認めない検体については RYR1 および CACNA1S 以外の新規の原因遺伝子が関与している可能性が高い. これらの検体の中で, より遺伝子変異を認める可能性が高いと考えられる検体 (悪性高熱症の臨床診断の根拠となる症状がより明らかと診断された検体) については exome sequence を行い, タンパク質の全てのコーディング領域まで解析範囲を広げて新規の原因遺伝子の存在について探索を行う. より多くの患者検体について exome sequence を行うことで, 検体の中に同じ原因遺伝子で発症したものが重複する可能性が高くなり, 原因遺伝子の候補を絞り込み, 確定できる可能性が高くなる. 原因遺伝子の候補を絞り込み, 絞りこんだ候補遺伝子について機能解析を行い悪性高熱症の原因遺伝子の確定を試みる.

Exome sequence を行ったサンプルに同じ原因遺伝子のものが重複することで新たな原因遺伝子を絞ることができるため, 同一家系で CICR 陽性のサンプルが多数あるのが望ましいが, 同一家系でなくても, CICR 陽性で RYR1 および CACNA1S に原因遺伝子を認めない多くのサンプルに exome sequence を行うことができれば, 新規の遺伝子が見つかるはずである

4. 研究成果

MH の素因の有無を調べる CICR テストが正常ではない患者 8 人と CICR テストは行っていないが臨床症状や家族の CICR 検査の結果から MH の素因を持っている可能性が比較的高いと思われる MH 患者・家族 6 人の患者について, 次世代シーケンサーを用いて遺伝子スクリーニングを行った. 次世代シーケンサー (Ion PGM) を使用して RYR1 と CACNA1S について遺伝子スクリーニングを行い, 検出した遺伝子変異について, EMHG (European Malignant Hyperthermia Group) に認められている既知の原因遺伝子と一致しているものは, その症例の悪性高熱症の原因遺伝子と考えられるが, 検出したその他の変異については bioinformatics で病原性を評価するプログラム (CADD, SIFT, MutationTaster など) を複数使用して病原性の評価を行った. 病原性が高く, RYR1 もしくは CACNA1S に存在する新規の原因遺伝子の可能性があるものについて Sanger 法で実際の遺伝子変異の有無を確認した.

その結果, EMHG に認められた既知の変異を 2 サンプルに認め, 存在頻度が低く (MAF<0.1%) 複数の病原性を評価するプログラム (CADD, SIFT, MutationTaster など) でも病原性が高そうであると評価された新規の原因遺伝子の可能性がある RYR1 の変異・CACNA1S の変異を 3 サンプルに認めた. これらの変異は, 機能解析を行い, 新規の原因遺伝子か否か順次調査を行う予定である.

また, 今回原因遺伝子を認めなかったサンプルについては, これまでに原因遺伝子として認められている RYR1 および CACNA1S 以外の遺伝子に原因遺伝子がある可能性が高いと思われる. MH はかなり稀な疾患で, 今回サンプル数があまり集まらず, Exome sequence を行うのに適していそうなサンプル (3 世代のサンプルを確保できる MH の家系や, 臨床症状や素因検査 (CICR) から確実に MH を発症していると思われるが RYR1・CACNA1S に原因遺伝子を認めない症例) がなかったため, Exome sequence は見合わせた.

遺伝子解析の進歩に伴い, 広い範囲の遺伝子について比較的容易に解析が行えるようになったため, 原因遺伝子を認めなかったサンプルについては, 今後, 遺伝子解析の対象範囲をさらに広げて解析を行い, 新たな原因遺伝子について調査を進める予定である.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2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 Tsutsumi YM, Kakuta N, Kawanishi R, Tanaka K, Kanzaki R, Morio A, Noda Y, Miyoshi H, Kondo T, Mukaida K.	4. 巻 35
2. 論文標題 Malignant hyperthermia in a 16-day-old infant with congenital diaphragmatic hernia: a case report	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of anesthesia	6. 最初と最後の頁 311-314
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00540-021-02902-2	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 Rieko Kanzaki, Hiroyuki Morino, Keiko Mukaida, Kodai Kume, Ryosuke Ohsawa, Yuko Noda, Sachiko Otsuki, Hirotsugu Miyoshi, Takashi Kondo, Ryuji Nakamura, Masashi Kawamoto, Hideshi Kawakami, Yasuo Tsutsumi	4. 巻 -
2. 論文標題 Genetic screening for malignant hyperthermia and comparison of clinical symptoms in Japan Running title: Genetic screening and clinical symptoms of MH	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Hiroshima Journal of Medical Sciences	6. 最初と最後の頁 -
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 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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------