

令和 4 年 5 月 2 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：20K17813

研究課題名(和文)CACNA1S変異が細胞内カルシウム動態に及ぼす影響の検討

研究課題名(英文)Investigation of the effect of CACNA1S mutation on intracellular calcium kinetics

研究代表者

大月 幸子(Otsuki, Sachiko)

広島大学・医系科学研究科(医)・助教

研究者番号：90774018

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): 悪性高熱症は骨格筋細胞内のカルシウム濃度が異常上昇することで生じる全身麻酔の致死的な合併症である。今回、カルシウム拮抗薬であるニフェジピンを投与した際の細胞内カルシウム動態を測定した。悪性高熱症の原因遺伝子であるCACNA1SとRYR1変異でその反応を比較する予定であったが、CACNA1S変異のある細胞が一種類しか測定できなかったため、悪性高熱症の素因の有無で結果を比較した。ニフェジピンの50%効果濃度は悪性高熱症素因あり(n=10)で $0.79 \pm 0.20 \mu\text{M}$ 、素因なし(n=5)で $1.32 \pm 0.15 \mu\text{M}$ であり(p=0.0013)、悪性高熱症素因骨格筋でより細胞内カルシウム濃度が上昇した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ニフェジピンは悪性高熱症素因者の骨格筋で優位に細胞内カルシウム濃度を上昇させ、高濃度のニフェジピンでは筋小胞体からのカルシウム漏出が続くことが分かった。このことから、悪性高熱症の素因者では、健常者と比較し、ニフェジピンにより細胞内カルシウム濃度が上昇しやすい可能性が考えられるが、臨床的な血中濃度の範囲内では問題になることはあまりないと考えられた。

研究成果の概要(英文): Malignant hyperthermia is a lethal complication of general anesthesia caused by abnormally elevated calcium concentration in skeletal muscle cells. We investigated the intracellular calcium kinetics of nifedipine, a calcium antagonist. We planned to compare the response with CACNA1S and RYR1 mutations, the genes responsible for malignant hyperthermia. However, since only one cell type with the CACNA1S mutation could be measured, the results were compared with and without a predisposition to malignant hyperthermia.

The 50% effective concentration of nifedipine was  $0.79 \pm 0.20 \mu\text{M}$  in those with a predisposition to malignant hyperthermia (n=10) and  $1.32 \pm 0.15 \mu\text{M}$  in those without (n=5)(p=0.0013).

Intracellular calcium concentrations were more elevated in skeletal muscle predisposed to malignant hyperthermia.

研究分野：麻酔

キーワード：悪性高熱症 カルシウム拮抗薬

## 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、吸入麻酔薬や脱分極性筋弛緩薬の暴露により誘発される常染色体顕性遺伝の潜在的な筋疾患である。発症率は約10万例に1例と稀ではあるが、一旦発症すると進行は急峻で、特効薬であるダントロレンが発見された現代でも死亡率が15%もある致死的な疾患である。その本態は骨格筋細胞内のカルシウム ( $\text{Ca}^{2+}$ ) 調節異常で、原因として1型リアノジン受容体 (ryanodine receptor type 1; RYR1) と電位依存性L型 Ca チャネルの 1 サブユニット (CACNA1S) の遺伝子変異が考えられている。これまでに、MH 症例の約50-70%が RYR1、約1%が CACNA1S の変異によるものであることが報告されているが、最近の当教室での研究では本邦の MH 症例では CACNA1S の変異の割合が海外より高い可能性が示唆された。CACNA1S に関しては変異が単独で出現するか、他の  $\text{Ca}^{2+}$  調節遺伝子の未知の変異と組み合わせで出現するかはまだわかっていない。また、CACNA1S 変異は様々な発現形態であり、遺伝的に不均一であることや、浸透度が不明であるため、MH を積極的に予測するために使用することは困難である。それゆえ臨床的に多彩な病態を示す可能性が考えられる。加えて、その骨格筋の  $\text{Ca}^{2+}$  動態も様々な変化を呈する可能性が考えられるため、遺伝子変異による骨格筋細胞の細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  調節機能の違いについて、CACNA1S 変異が既知の RYR1 変異とどのような違いが認められるのかを明らかにする必要があると考えられた。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、CACNA1S に変異のある骨格筋を用いて、種々の薬剤に対する細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  動態を検討することで、RYR1 遺伝子変異による MH の発症機序や治療方法、使用禁忌薬との違いを明らかにすることである。

MH の研究は、その発症頻度の違いから、RYR1 遺伝変異を中心に研究が進められてきた。しかしながら、今までの海外による報告においては、MH の発症における CACNA1S による変異患者の割合は非常に低く、1%程度であることから、CACNA1S 変異についての研究は多くなされていない。本邦での CACNA1S 変異の割合は海外に比べて高いため、この変異の様々な作用について明らかにすることは学術的・臨床的に重要なことと思われる。CACNA1S 変異についての研究を進めることで、新たな CACNA1S 変異の細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  動態を明らかにすることができると考えた。

### 3. 研究の方法

CACNA1S 変異の細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  動態を明らかにするために以下の研究を行った。

- (1) コントロール、RYR1 変異あり、CACNA1S 変異あり、の筋管細胞の細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  動態を、RYR1 のアゴニストであるカフェイン、クレゾールを用いて測定し比較検討する。
- (2) MH 治療薬であるダントロレンの効果について、同様に上記3群を比較する。
- (3) L型  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルのブロッカー - (ニフェジピン) の作用についても同様に検討する。

これまでの報告によると、MH 素因者の筋管細胞では、RYR1 アゴニストであるカフェイン、クレゾール、ハロタンによる細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇が見られる。また L型 Ca チャネルのブロッカーであるニフェジピンは筋管細胞の細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  を濃度依存性に上昇させ、その50%効果濃度は健常者と比べ低いことが明らかになっている。ニフェジピンは MH が発症した際、ダントロレンと併用することで心停止を起こす可能性があり、併用注意の薬剤である。そのため、L型  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルに異常のある CACNA1S 変異筋管細胞では、RYR1 変異筋管細胞よりニフェジピン

によって細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度が異常に上昇する可能性が考えられる。

#### 4. 研究成果

CACNA1Sに変異のある細胞のうち、 $\text{Ca}^{2+}$ 動態が測定できたものは1種類のみであった。そのため、CACNA1SとRYR1の比較ができなかったため、悪性高熱症の素因あり( $\text{Ca}^{2+}$  induced  $\text{Ca}^{2+}$  release; CICR亢進,  $n=10$ )の筋管細胞と素因なし(CICR非亢進,  $n=5$ )の細胞で結果を比較した。

##### (1) カフェイン、クレゾール

カフェインの50%効果濃度 ( $\text{EC}_{50}$ )は、素因ありが  $5.1 \pm 0.5$  mM, 素因なしが  $2.6 \pm 0.6$  mMであった ( $p=0.0007$ )。クレゾールの  $\text{EC}_{50}$  は、素因ありが  $295 \pm 53$   $\mu\text{M}$ , 素因なしが  $151 \pm 35$   $\mu\text{M}$ であった ( $p=0.0013$ )。

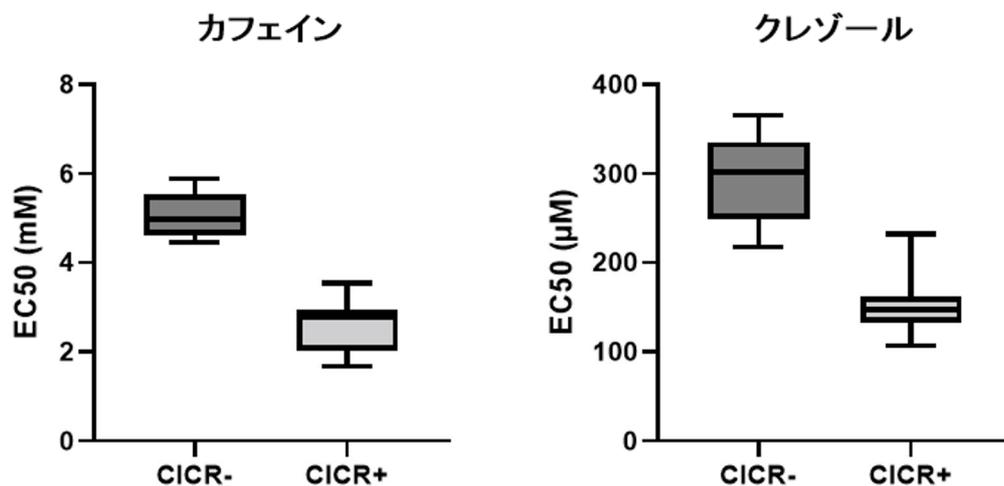


図1. カフェインとクレゾールの50%効果濃度

(2)(3) 最初にカフェイン 10mMを負荷し反応した細胞を測定に使用した。ニフェジピンを0.05, 0.15, 0.5, 1.5, 5, 15, 50  $\mu\text{M}$ と順に負荷したところ、細胞内カルシウム濃度も順に上昇した。 $\text{EC}_{50}$  は素因ありで  $0.79 \pm 0.20$   $\mu\text{M}$ 、素因なしで  $1.32 \pm 0.15$   $\mu\text{M}$ だった ( $p=0.0013$ )。

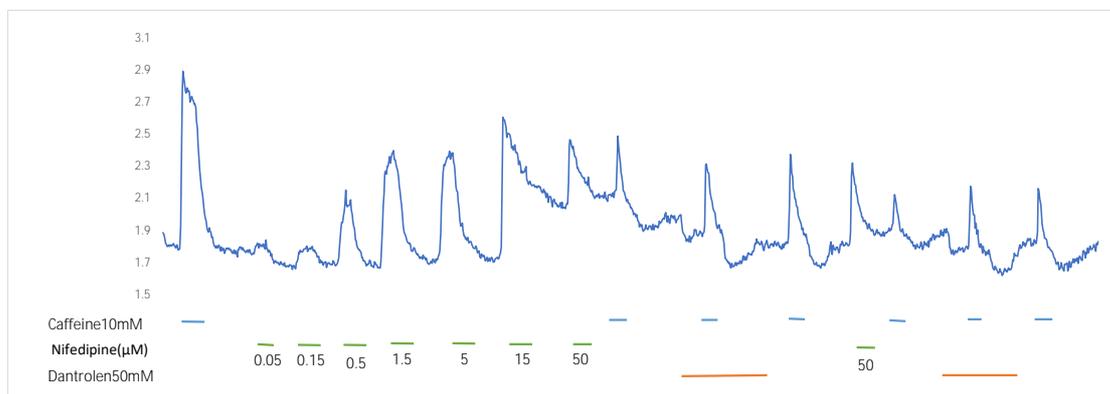


図2. ニフェジピンを負荷した際のカルシウム濃度の変化

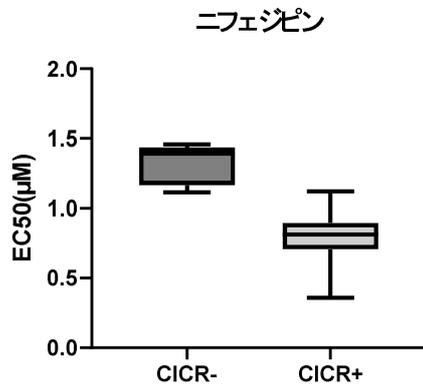


図3. ニフェジピンの50%効果濃度

ニフェジピンを15  $\mu$ M以上の濃度で刺激すると負荷終了後も基線が元に戻らなかった。この状態の時にカフェイン10mMを負荷すると、Ca上昇曲線下面積はコントロール時と比較し小さくなった。このことから、ニフェジピン15  $\mu$ M以上を負荷した際は、筋小胞体に貯蔵されているCa<sup>2+</sup>コンテンツが減少し、leaky状態になっていると考えられた。この基線の上昇は、ダントロレン50  $\mu$ Mで回復した。

また、Ca<sup>2+</sup> freeのニフェジピン15  $\mu$ Mを負荷した際のCa反応は減弱した。このことからニフェジピン15  $\mu$ M刺激中も細胞外からCa<sup>2+</sup>が流入していることを示唆している。

以上のことから、ニフェジピンは悪性高熱素因者の骨格筋で有意に細胞内カルシウム濃度を上昇させ、15  $\mu$ M以上のニフェジピンで筋小胞体をleaky状態に変化させることが分かった。また、この反応はダントロレンで抑制され、筋小胞体へのカルシウムの流入も関与していることがわかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
---------	---------