

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K16602

研究課題名（和文）悪性高熱症のメカニズムにおけるTRPV1チャネル機能の解明と新規治療法開発

研究課題名（英文）Elucidation of TRPV1 channel function in the mechanism of malignant hyperthermia

研究代表者

三好 寛二（Miyoshi, Hirotugu）

広島大学・病院（医）・講師

研究者番号：50645364

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：悪性高熱症は常染色体優性遺伝の遺伝性の筋疾患である。本疾患の素因を持っている場合、全身麻酔薬の揮発性吸入麻酔薬に曝露すると代謝亢進と高体温により致命的となる。悪性高熱症の原因は、リアノジン受容体の遺伝子変異とされるが、悪性高熱症患者の半数はこの受容体の遺伝子変異を持っていないことから、リアノジン受容体以外にも原因となる遺伝子変異があると考えられている。この研究では、悪性高熱症患者から新規に発見されたTRPV1の遺伝子変異に注目して、悪性高熱症との関連を調べた。ノックインマウスを作成し、全身麻酔薬により悪性高熱症が生じるかどうかを検証したが調査した遺伝子変異では悪性高熱症は生じなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

全静脈麻酔による全身麻酔により悪性高熱症を発症した患者からTRPV1（Q261P）の遺伝子変異が見つかったことに注目し、悪性高熱症の発症機序にこのTRPV1の遺伝子変異が悪性高熱症の機序に関与しているかどうかを調べた。TRPV1の遺伝子変異のノックインマウスを作成し揮発性吸入麻酔薬への曝露により悪性高熱症を発症するかどうかを検証したが、いずれの濃度のセボフルラン、デスフルラン、イソフルランにも特異的な反応を示さず、悪性高熱症の特徴である心拍数の上昇や体温の上昇は見られなかった。一方で、このTRPV1の変異はMyotubeにおいてCapsaicinへの反応性が完全に欠如することが分かった。

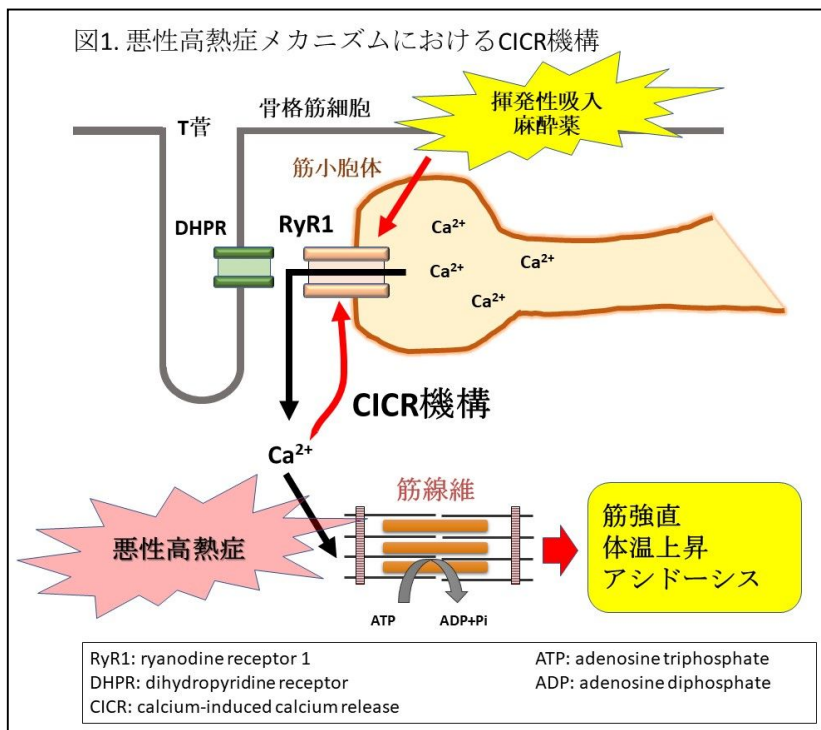
研究成果の概要（英文）：Malignant hyperthermia is an autosomal dominant inherited muscle disease. Exposure to volatile inhalation anesthetics in patients predisposed to malignant hyperthermia can be fatal due to hypermetabolism and hyperthermia. The main cause of malignant hyperthermia is said to be genetic mutation of ryanodine receptor type 1. On the other hand, it is known that half of patients with malignant hyperthermia do not have this receptor gene mutation. This suggests that malignant hyperthermia is caused by genetic mutations other than the ryanodine receptor. In this study, we focused on the TRPV1 gene mutation newly identified in patients with malignant hyperthermia and investigated the relationship between this gene mutation and malignant hyperthermia. We created TRPV1 knock-in mice and examined whether general anesthetics induce malignant hyperthermia. According to the research results to date, the investigated TRPV1 gene mutations do not cause malignant hyperthermia.

研究分野：麻酔科学

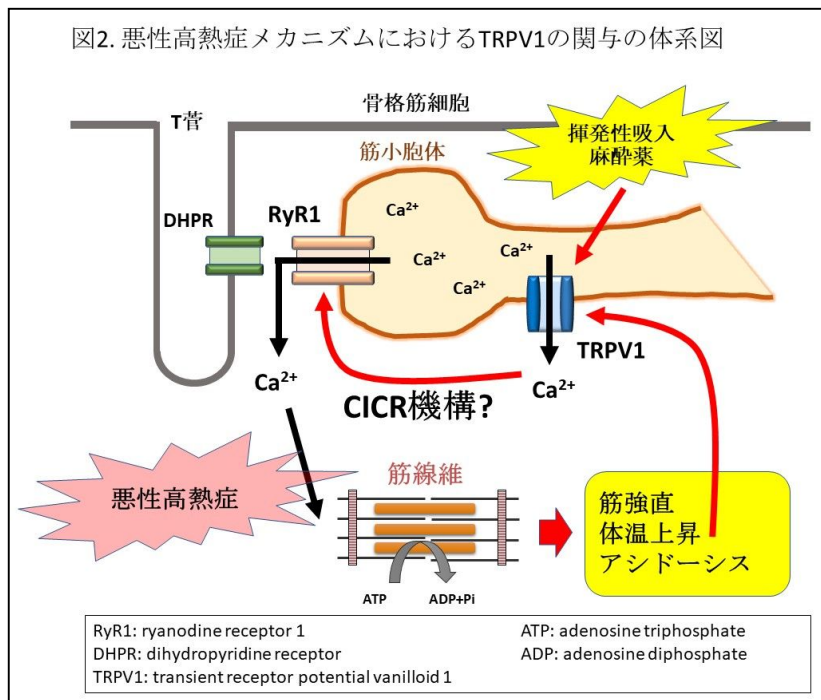
キーワード：悪性高熱症 TRPV1 遺伝子解析 遺伝子変異

1. 研究開始当初の背景

悪性高熱症は遺伝性筋疾患で、遺伝性素因の保有者が誘発剤となる麻酔薬に暴露することで発症する致死性の麻酔合併症の一つである。悪性高熱症の原因遺伝子として、リアノジン受容体 (RyR1) は古くから認知されており、この研究領域ではこれまで RyR1 や近傍の受容体や蛋白についての機能解析が行われてきた。RyR1 は骨格筋細胞の筋小胞体の細胞内カルシウム調節を担う受容体であるが、細胞内カルシウム濃度の上昇にตอบสนองし筋小胞体からカルシウムを放出する、カルシウム誘発カルシウム放出 (Calcium induced calcium release: CICR) 機構において主要な役割を果たしている (図1) RyR1 に機能異常がある場合、この CICR 機構が亢進し、細胞内カルシウムが異常高値となり MH を発症する。



近年、RyR1 とは全く別な部位にある Transient Receptor Potential Vanilloid 1 (TRPV1) が悪性高熱症のメカニズムに関与している可能性が注目されている。TRPV1 はイオンチャネルであり、熱や酸、カプサイシンなどの物理的・化学的な様々な刺激に反応し、筋小胞体のカルシウムを細胞質へ放出する。TRPV1 への刺激により放出された細胞内カルシウムが RyR1 の CICR 機構を促進させる可能性が報告されている。右の図2 は本研究課題の疑問を模式図で表したものである。



今回の研究では、これまでに我々の研究室で行った悪性高熱症患者の遺伝子解析において新規に見つかった、TRPV1 の新規の遺伝子変異をターゲットとして、悪性高熱症との関連性について調査した。

2. 研究の目的

悪性高熱症患者から新規に見つかった TRPV1 の遺伝子変異と悪性高熱症の発症の関連を調査すると同時に、TRPV1 が悪性高熱症の機序に関与する場合、TRPV1 を標的とした悪性高熱症の新しい治療法を考案することを目的とした。

3. 研究の方法

TRPV1 の遺伝子変異のノックインマウス (C57BL/6J, TRPV1-Q261P) を作成し、動物実験モデルおよび細胞実験により TRPV1 が悪性高熱症の発症機序に関与するかを検証する。ノックインマウス (Hetero 型) に対してまず、静脈麻酔で全身麻酔を開始し、続いて悪性高熱症の誘発剤となる揮発性吸入麻酔薬を曝露させることにより悪性高熱症を発症するかどうかを検証する。続いて、Homo 型のノックインマウスでの実験を計画しているが、書類作成時点で作成中である。さらに、TRPV1-Q261P の培養骨格筋から得られた Myotube の実験においても、カフェインやクレーゾールに対する反応の亢進が見られるかを検証する。

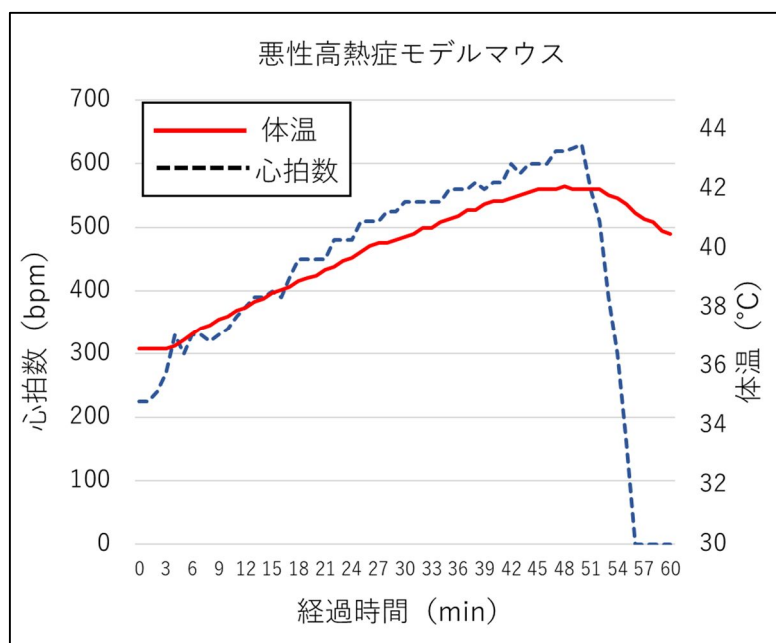
TRPV1 のノックインマウスにおいて環境温を上昇させ、うつ熱を引き起こした場合の反応性を調査する。

比較対象として当教室で保有しているリアノジン受容体の遺伝子変異を持つ悪性高熱症のモデルマウスを用いた。

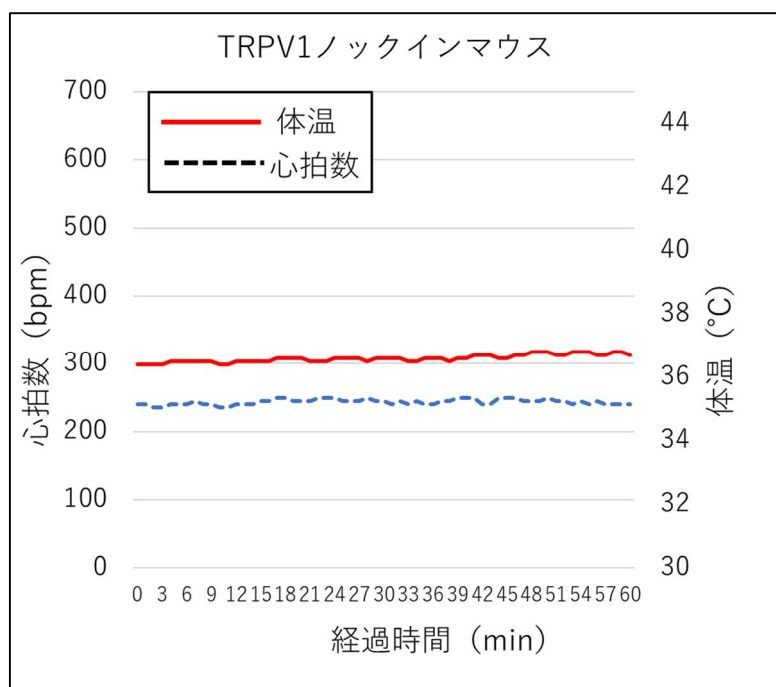
4. 研究成果

2022 年度は、TRPV1 の遺伝子変異のノックインマウス (C57BL/6J, TRPV1-Q261P) を作成した。ノックインマウスの作成は受精卵を株式会社セツロテック (徳島大学発ゲノム編集ベンチャー企業) に依頼し、以降の実験であるマウス受精卵の移植などは広島大学で行った。

比較対象としてリアノジン受容体の遺伝子変異を持つ悪性高熱症モデルマウスの揮発性吸入麻酔薬への曝露時の心拍数及び体温の変化を右図に示す。麻酔薬曝露とともに体温及び心拍数が上昇し、約 50 分で心停止に至った。



2023 年度はノックインマウス (Hetero 型) に対してまず、揮発性吸入麻酔薬への曝露により悪性高熱症を発症するかどうかを検証したが、いずれの濃度のセボフルラン、デスフルラン、イソフルランにも特異的な反応を示さず、悪性高熱症の特徴である心拍数の上昇や体温の上昇は見られなかった。TRPV1 ノックインマウスの揮発性吸入麻酔薬への曝露時の心拍数及び体温の変化を右図に示す。麻酔薬曝露後も体温及び心拍数の変動を生じていない。



Homo 型のノックインマウスを作成中であり、マウスが作成されれば Homo 型での悪性高熱症の反応を調べる予定である。

一方で、TRPV1-Q261P の培養骨格筋から得られた Myotube の実験において、カフェインやクレーゾールに対する反応の亢進はみられなかった。しかし、Myotube において、Capsaicin による刺激により細胞内カルシウムの上昇は見られず、本刺激薬への反応性が欠如していると考えられた。

以上の結果から、TRPV1-Q261P の遺伝子変異は揮発性吸入麻酔薬と誘因として生じる悪性高熱症のメカニズムには関与していないと考えられた。一方で、TRPV1-Q261P の変異は Myotube において Capsaicin への反応性が完全に欠如することが分かった。外気温への反応性の欠如により全静脈麻酔中に悪性高熱症を発症した可能性も考慮し、ノックインマウスを用いて全身麻酔中

に環境温を上昇させる実験(うつ熱環境への反応性を検証する実験)を追加で行ったが、変異を持っていないマウスと比較して体温上昇に差は見られなかった。今後、TRPV1の機能欠如が及ぼす影響について行動学的な検証を行う予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Miyoshi Hirotsugu, Otsuki Sachiko, Mukaida Keiko, Kido Kenshiro, Sumii Ayako, Ikeda Tsuyoshi, Noda Yuko, Yasuda Toshimichi, Narasaki Soshi, Kato Takahiro, Kamiya Satoshi, Horikawa Yousuke T., Tsutsumi Yasuo M.	4. 巻 14
2. 論文標題 Effects of Remimazolam on Intracellular Calcium Dynamics in Myotubes Derived from Patients with Malignant Hyperthermia and Functional Analysis of Type 1 Ryanodine Receptor Gene Variants	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Genes	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） 10.3390/genes14112009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 三好寛二、城戸健士郎、渡辺知幸、向田圭子、安田季道、堤 保夫
2. 発表標題 リアノジン受容体1型遺伝子変異マウスにおける悪性高熱症の発症様式にセボフルラン濃度および性差が及ぼす影響
3. 学会等名 日本麻酔科学会第70回学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 城戸健士郎、三好寛二、渡辺知幸、向田圭子、安田季道、堤 保夫
2. 発表標題 セボフルランおよびデスフルラン投与によるリアノジン受容体1型遺伝子変異マウスにおける悪性高熱症発症様式の比較
3. 学会等名 日本麻酔科学会第70回学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 三好寛二、向田圭子、野田祐子、城戸健士郎、住井彩子、神崎理英子、安田季道、堤 保夫
2. 発表標題 Investigating patients with malignant hyperthermia by gene panel testing in Japan
3. 学会等名 41th Annual European Malignant Hyperthermia EMHG（国際学会）
4. 発表年 2023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
--	---------------------------	-----------------------	----

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