

# 論文内容要旨

Genetic and functional analysis of the RYR1  
mutation p.Thr84Met revealed a susceptibility to  
malignant hyperthermia

(悪性高熱症の発症に関連する疑いがある 1 型リ  
アノジン受容体の遺伝子変異 p.Thr84Met の遺伝子  
解析および機能解析)

Journal of Anesthesia, in press.

主指導教員：河本 昌志教授  
(医歯薬保健学研究科 麻酔蘇生学)

副指導教員：志馬 伸朗教授  
(医歯薬保健学研究科 救急集中治療医学)

副指導教員：濱田 宏准教授  
(医歯薬保健学研究科 麻酔蘇生学)

近藤 隆志

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

## 【論文要旨】

悪性高熱症 (malignant hyperthermia: MH) の主病因は、骨格筋の筋小胞体に存在する 1 型リアノジン受容体 (RYR1) の遺伝子変異による細胞内カルシウム代謝異常に伴う骨格筋の異常な代謝亢進と考えられており、吸入麻酔薬や脱分極性筋弛緩薬によって誘発される。一方、RYR1 の遺伝子変異は MH の他に先天性ミオパチーの原因となることも知られているが、両者の原因となる遺伝子変異の全容は明らかでない。本研究では、新規に発見された遺伝子変異 c.251 C>T (p.Thr84Met) に対する遺伝子解析および機能解析を行い、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、①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、②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。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 Thr84Met および WT の 2 種類の RYR1 発現ベクターを HEK293 細胞内にそれぞれ導入した後、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、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) を筋管細胞もしくは HEK293 細胞に負荷した後、2 波長の光 (340nm/380nm) を照射してカルシウムイメージングシステムにより観察して、細胞内カルシウム濃度の上昇に伴い 2 波長の蛍光強度の比率が上昇することを利用して行った。カルシウム反応性は、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、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 (EC<sub>50</sub>) を算出して評価した。RYR1 刺激薬にはカフェインとクレゾールを用い、EC<sub>50</sub> を①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)、② p.Thr84Met-HEK293 細胞 (p.Thr84Met) と WT-HEK293 細胞 (WT)、の間でそれぞれ比較した。統計学的検定は対応のない t 検定を用い、p<0.01 を有意とした。

筋管細胞の RYR1 刺激薬に対する EC<sub>50</sub> は、カフェインで Control (n=17) : 5.08 ± 0.60mM、Patient (n=13) : 3.02 ± 0.88mM、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、反応性の亢進を示した。HEK293 細胞の RYR1 刺激薬に対する EC<sub>50</sub> は、カフェインで WT (n=30) は 2.70 ± 0.57mM、p.Thr84Met (n=30) は 1.81 ± 0.70mM、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

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、反応性の亢進を示した。

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。