

Dantrolene prevents hepatic steatosis by reducing
cytoplasmic Ca^{2+} level and ER stress

(ダントロレンは細胞質 Ca^{2+} 濃度と小胞体ストレスを減少させることで脂肪肝を抑制する)

氏名 民谷 正輝

所属 山口大学大学院医学系研究科

医学専攻 器官病態内科学講座

令和2年 12月

目次

第1章 要旨.....	2
第2章 研究の背景.....	3
第3章 目的.....	3
第4章 研究方法.....	4
4.1 動物モデル.....	4
4.2 肝臓の組織分析.....	4
4.3 肝細胞の単離と培養.....	4
4.4 パルミチン酸による単離肝細胞の脂肪変性.....	5
4.5 Oil red O 染色.....	5
4.6 免疫蛍光抗体法による解析.....	5
4.7 肝細胞の細胞質 Ca^{2+} 濃度の解析.....	5
4.8 画像の定量化.....	5
4.9 統計学的解析.....	6
第5章 結果.....	7
5.1 ダントロレンはマウスにおいて脂肪肝を抑制する.....	7
5.2 ダントロレンは肝臓の FFA 取り込みを減少させる.....	8
5.3 ダントロレンは肝細胞において FFA による細胞質 Ca^{2+} 濃度の上昇を抑制する.....	9
5.4 ダントロレンは肝細胞において FFA による小胞体ストレスを減少させる.....	10
第7章 結語.....	11
第8章 謝辞.....	11
第9章 参考文献.....	12

第 1 章 要旨

背景：我々は、リアノジン受容体の安定化薬であるダントロレンが、心臓の小胞体からの Ca^{2+} 流出を抑制し、小胞体ストレスを抑制することを以前に報告した。肝臓において小胞体ストレスは脂質代謝の障害となり、NAFLD を引き起こす。

目的：我々はマウスで脂肪肝や肝細胞の小胞体ストレスにおけるダントロレンの効果を検討した。

方法：高脂肪食 (HFD) 経口投与でマウスの脂肪肝モデルを作成し、通常食群、HFD 群、HFD+ダントロレン群において投与 8 週後の肝臓の脂肪沈着を HE 染色で評価した。また、単離肝細胞においてパルミチン酸(FFA)による脂肪負荷培養を行い、ダントロレンを前投与した群と肝細胞の FFA の取り込み、細胞質 Ca^{2+} 濃度、小胞体ストレスを評価した。

結果：HFD 群では通常食群と比較して有意に肝臓の脂肪沈着を認めた。HFD とダントロレンを共に摂食させることで肝臓の脂肪沈着を抑制した。また、単離肝細胞において FFA 群では著明な脂肪沈着を認め、ダントロレンを前投与することで FFA の取り込みが抑制された。FFA 群では細胞質 Ca^{2+} 濃度が上昇しており、GRP78 の発現も増加していた。ダントロレンを前投与することで細胞質 Ca^{2+} 濃度の上昇と GRP78 の発現が抑制された。

結語：ダントロレンは、肝細胞において小胞体のリアノジン受容体を安定化させることで小胞体ストレスを抑制し、脂肪肝を抑制した。ダントロレンは NAFLD に対する新たな治療薬になりうる。

第2章 研究の背景

非アルコール性脂肪肝疾患(NAFLD)は脂肪肝から脂肪肝炎、繊維化を伴う壊死/炎症、肝硬変へと進行した病態まで含む慢性疾患である[1-3]。NAFLD は生活習慣病により発症し、単に脂肪が蓄積する脂肪肝と非アルコール性脂肪肝炎(NASH)に分類される[4]。NASH は NAFLD の 10-20%を占め、肝硬変、肝細胞癌(HCC)に進行する[5]。NASH は NAFLD から進行すると考えられているが、そのメカニズムは多くの因子があり明らかでない。

これらの因子のうち、我々は小胞体(ER)ストレス応答が生じると細胞質の Ca^{2+} 濃度が上昇することに注目した[6-7]。この研究の目的は遊離脂肪酸(FFA)による単離肝細胞の脂肪沈着において、細胞質 Ca^{2+} 濃度と小胞体ストレスの関連性を明らかにすることである。リアノジン受容体(RyR)は ER Ca^{2+} ホメオスタシスの役割を果たす可能性がある[8]。ダントロレンは骨格筋 RyR1 のアミノ酸突然変異によって生じる悪性高熱症に用いられる治療薬である[9-10]。ダントロレンは CPVT や心不全において RyR2 からの Ca^{2+} 漏出を抑制することが証明されている[11-15]。

第3章 目的

高脂肪食(HFD)投与による NAFLD においてダントロレンの効果を検討した。また、単離肝細胞においてパルミチン酸負荷(FFA)による細胞質 Ca^{2+} 濃度と小胞体ストレスの上昇とダントロレンの効果を検討した。

第4章 研究方法

4.1 動物モデル

本研究は NIH による実験動物の保護と使用のガイドライン (NIH Publication No. 85-23, revised 1996) を遵守して実施した。動物の飼育と実験計画は山口大学医学部動物倫理委員会の策定したガイドラインを遵守して行った。

Wild-type (WT) C57BL/6 マウスのオスを本研究に用いた。生後 5 週間から通常食 (CNT) 群、高脂肪食 (HFD; DIO Rodent Purified Diet w/60% Energy From Fat, TestDiet, MO, USA) 群、HFD にダントロレン (Fuji Film-Wako Chemicals, Tokyo, Japan) を加えた群にわけて、それぞれ 8 週間摂食させた。ダントロレンは 100 mg/kg/day となるよう餌に混合した。この量は以前の我々の報告で心不全と不整脈を抑制した濃度である [16]。ダントロレンの過度な湿気を避けるため、餌は少なくとも 3 日おきに交換した。マウスの体重は 1 週間毎に計測した。

4.2 肝臓の組織分析

肝臓の標本は 4% パラホルムアルデヒドで 2 時間固定し、10% ホルマリンで一晩保管した。組織は 3 μ 厚の切片にスライスし、HE 染色を行った。BZ-9000 顕微鏡 (Keyence, Tokyo, Japan) で観察した。

4.3 肝細胞の単離と培養

肝細胞はマウスから単離した。麻酔後に下大静脈と門脈を露出した。24G 針で下大静脈にカニューレションし、Liver Perfusion Medium (Gibco) で門脈へ逆行性に 4 ml/min で 5 分間還流した。続いて、Liver Digestion Medium (Gibco) に交換し、3.5 ml/min で 10 分間還流した。肝臓を摘出し、DMEM の中で細かく切除した。胆嚢は切除前に取り除いた。肝細胞は 70 μ m メッシュフィルターを通して、100 g, 5 分の遠心分離で回収した。ペレットは Attachment medium (William's medium E (Sigma), 5% FBS) で再攪拌し、I 型コラーゲンでコーティングした培養容器に散布した。細胞接着後 (3 時間) に培養液 (HepatoZYME-SFM (Thermo-Fisher), 1 \times ペニシリン・ストレプトマイシン, 2 mM L-グルタミン, 1.25 μ g/cm² I 型コラーゲン) を交換した。95% O₂ 5% CO₂, 37 度で培養した。

4. 4 パルミチン酸による単離肝細胞の脂肪変性

肝障害に対するダントレンの効果を検討するため、培養液に 0.2mM パルミチン酸を加えて、3 μ M ダントレン投与/非投与の群で 24 時間培養した。パルミチン酸は予め、1mM パルミチン酸, 0.17mM ウシ血清アルブミン(BSA), 70°Cで溶解しておいた。

4. 5 Oil red O 染色

培養された肝細胞は 10%パラホルムアルデヒドで 10 分間固定し、PBS で 3 回洗浄した。その後 60%イソプロパノールで 1 分間置換し、60% Oil red O 溶液で室温, 10 分間染色した。PBS で 2 回洗浄し、BZ-9000 顕微鏡(Keyence, Tokyo, Japan)で観察した。

4. 6 免疫蛍光抗体法による解析

免疫組織には Anti-GRP78 抗体(PA5-19503 1/600, Thermo Fisher Scientific, USA.)を用いた。単離肝細胞を 4%パラホルムアルデヒドで 5 分間固定し、0.1%トリトン X-100 と 1% BSA で 20 分間透過処理を行った。1%BSA と 3% Protein Block で 1 時間インキュベートした。その後 0.1% BSA、0.3% Protein Block に Anti-GRP78 抗体(1/1000)を加えて 4°Cで一晩反応させた。Alexa488-conjugated goat anti-rabbit (Molecular Probes) の 2 次抗体で標識した。その PBS で 3 回洗浄した。

4. 7 肝細胞の細胞質 Ca²⁺濃度の解析

単離培養肝細胞は 20 μ M Fluo4-AM (Molecular Probes) を 20 分間 37°Cで導入した。Tyrode 溶液で 2 回洗浄した後、BZ-9000 顕微鏡(Keyence, Tokyo, Japan)で細胞質 Ca²⁺濃度を測定した。

4. 8 画像の定量化

脂肪的の定量化は Oil red O 染色での面積と蛍光強度を Image-J ソフトウェアで解析した。Oil red O 染色で染まった脂肪滴を threshold で粒域となる閾値を設定した。1 細胞を関心領域に設定し、1 細胞ごとの平均蛍光強度を計算した。

4. 9 統計学的解析

3 群間の差に各群 3 匹のマウスで比較した検定には Post hoc Tukey's test 検定を併用した Kruskal-Wallis 検定を使用した(図 1)。3 群間の差に各群 60 細胞で比較した検定には Post hoc Tukey's test 検定を併用した一元配置分散解析を使用した(図 2, 3, 4)。すべてのデータは平均 ± 標準誤差 (SEM) で示した。P 値 0.05 以下を統計学的に有意差があるとした。

第 5 章 結果

5. 1 ダントロレンはマウスにおいて脂肪肝を抑制する

図 1A で示すように、HFD 群と HFD+DAN 群の摂食量は投与第一週以外はほぼ同等であったが、HFD+DAN 群の体重は HFD 群に比べて非常に軽かった。図 1B は各群の代表的な肝組織を示す。HFD+DAN 群では HFD 群と比較して明らかに肝臓の脂肪蓄積が減少した。肝組織の脂肪蓄積率は HE 染色から計算して図 1C に示す。

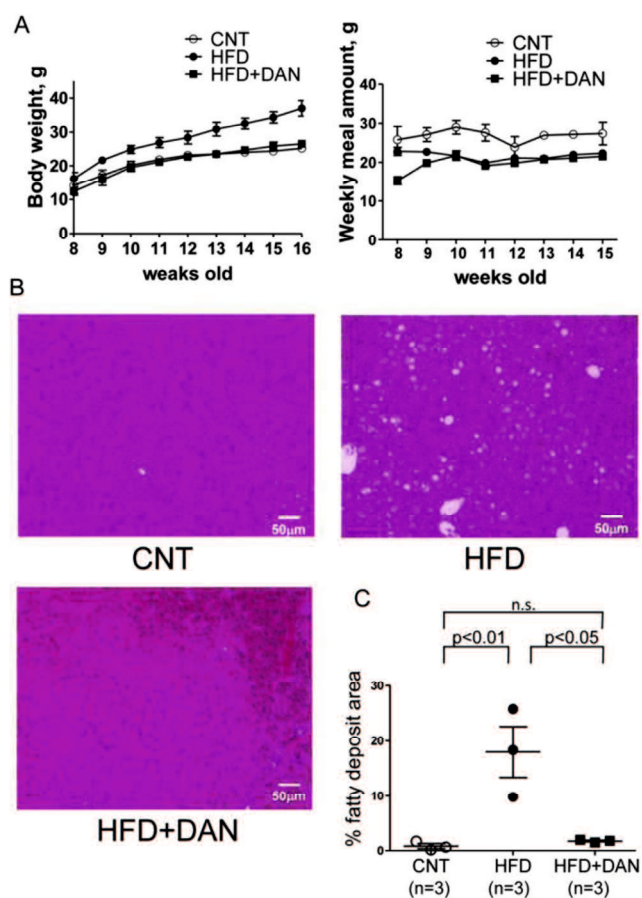


図 1 高脂肪食による肝臓の脂肪蓄積。Wild-type C57BL/6 マウスに通常食(CNT 群)もしくは高脂肪食(HFD 群)を 8 週間与えた。A: マウスの体重と餌摂取量。 B: 肝組織(倍率×100)。 C: HE 染色から肝組織の脂肪沈着の割合を計測した。HFD 群と HFD+DAN 群では有意な差を認める。値は 3 匹のマウスの平均値±標準誤差で示す。

5. 2 ダントロレンは肝臓の FFA 取り込みを減少させる

我々は 0.2 mM パルミチン酸を加えて肝細胞を培養することで、*in vitro* において脂肪毒性をモデル化した。肝細胞の脂肪滴は Oil red O 染色で評価した。図 2A は各群の代表的な Oil red O 染色を示す。脂肪蓄積はパルミチン付加して 24 時間で明らかだった(FFA 群)。FFA+DAN 群では FFA 群と比較して肝細胞の脂肪滴が明らかに減少した。肝細胞の脂肪滴の比率は Oil red O 染色から計算して図 2B に示す。

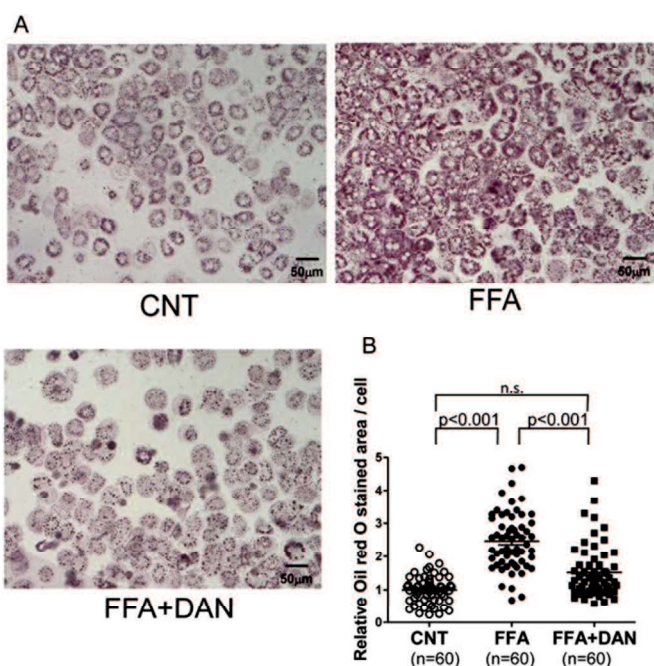


図2 肝細胞の脂肪沈着。マウスから肝臓を単離し、24 時間培養した。培養液単独で培養した群(CNT 群)、0.2 mM パルミチン酸を加えて培養した群(FFA 群)、0.2 mM パルミチン酸と 3 μM ダントロレンを加えて培養した群(FFA+DAN 群)で Oil Red O 染色を行った。A : 肝細胞の Oil Red O 染色の代表的な画像。B : Oil red O 染色で染まった面積の比率を計測した。FFA 群と FFA+DAN 群では有意な差を認める。値は 3 検体から得られた 60 細胞から算出し、平均値±標準誤差で示す。

5. 3 ダントロレンは肝細胞において FFA による細胞質 Ca^{2+} 濃度の上昇を抑制する

肝細胞の細胞質 Ca^{2+} 濃度は Fluo-4 AM を用いて測定した。図 3A は肝細胞に Fluo-4 AM を導入した代表的な図を示す。FFA+DAN 群では FFA 群と比較して Fluo-4AM の蛍光強度は明らかに減少した。Fluo-4 AM の蛍光強度を定量化したものを図 3B に示す。

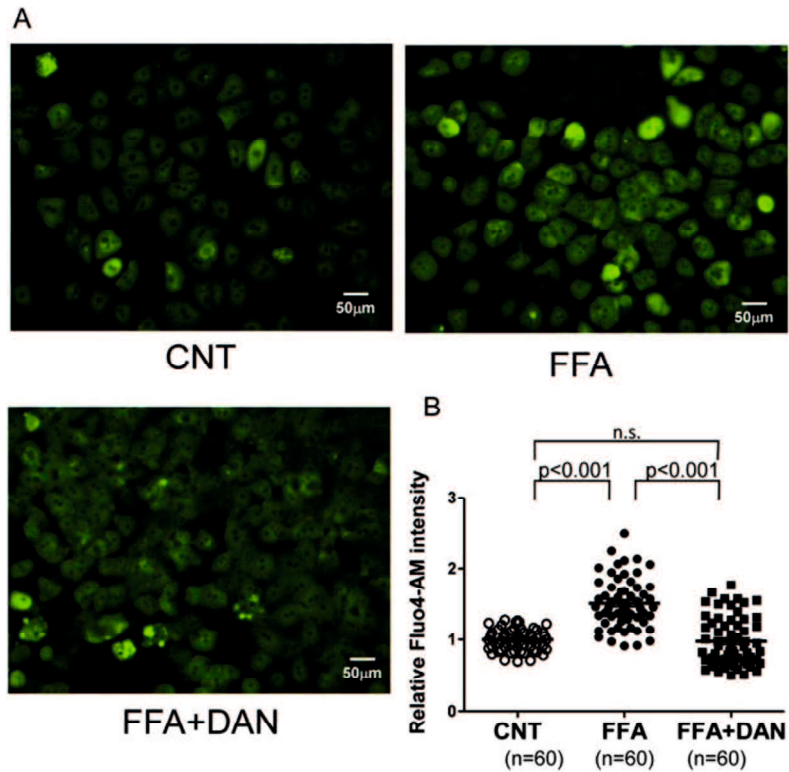


図 3 肝細胞の細胞質 Ca^{2+} 濃度。Fluo-4 AM は培養液単独で培養した群(CNT 群)、0.2 mM パルミチン酸を加えて培養した群(FFA 群)、0.2 mM パルミチン酸と 3 μM ダントロレンを加えて培養した群(FFA+DAN 群)に導入した。A: Fluo-4 AM を導入した肝細胞の代表的な画像。B: Fluo-4 AM の蛍光強度を計測した。FFA 群と FFA+DAN 群では有意な差を認める。値は 3 検体から得られた 60 細胞から算出し、平均値±標準誤差で示す。

5. 4 ダントロレンは肝細胞において FFA による小胞体ストレスを減少させる

肝細胞の小胞体ストレスは免疫蛍光抗体を用いて測定した。図 4A は GRP78 の代表的な図を示す。FFA+DAN 群では FFA 群と比較して GRP78 の発現は明らかに減少した。GRP78 の発現を定量化したものを図 4B に示す

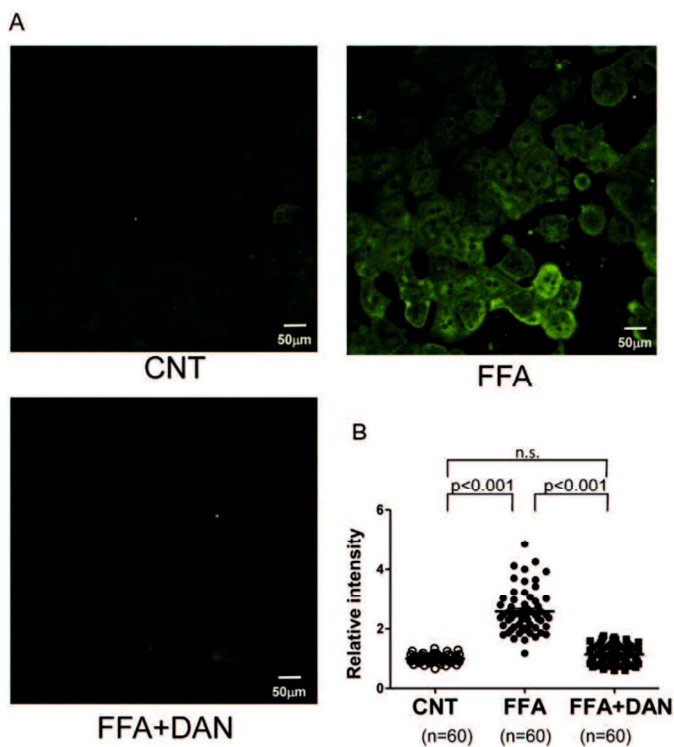


図 4 肝細胞の GRP78 発現。培養液単独で培養した群(CNT 群)、0.2 mM パルミチン酸を加えて培養した群(FFA 群)、0.2 mM パルミチン酸と 3 μM ダントロレンを加えて培養した群(FFA+DAN 群)で GRP78 の免疫蛍光を行った。A : 肝細胞の GRP78 の免疫蛍光の代表的な画像。B : GRP78 の蛍光強度を計測した。FFA 群と FFA+DAN 群では有意な差を認める。値は 3 検体から得られた 60 細胞から算出し、平均値±標準誤差で示す。

第6章 考察

この研究の第一の発見はダントレンが高脂肪食マウスモデルにおいて NAFLD を抑制することである。ダントロレンの効果のメカニズムを考察する。

小胞体はタンパク質の合成とフォールディング、脂質合成、 Ca^{2+} ホメオスタシスに重要な細胞小器官である。パルミチン酸による小胞体ストレスにより小胞体内 Ca^{2+} が減少することが知られている[17-18]。肝臓における小胞体ストレスの上昇により、脂質代謝が変化し、脂肪蓄積[19]やアポトーシス[20]に至る。したがって肝臓の小胞体ストレスの抑制は NAFLD に対する有望な治療戦略とみられる。

いくつかの研究は ^3H -リアノジン結合[21]、リアノジン受容体からの Ca^{2+} 放出[22]、mRNA 発現[23]で肝臓におけるリアノジン受容体の発現を分析している。まとめると、RyR1 だけが肝臓に発現しており、小胞体の Ca^{2+} 制御に重要な役割を担っている[8]。

この研究は NASH モデルにおけるダントレン経口投与の効果を検証した。ダントロレンは肝臓の脂肪沈着を抑制した。我々はダントロレンが小胞体からの Ca^{2+} 漏出を抑制することで小胞体ストレスを軽減し、肝細胞の脂肪沈着の悪循環を抑制すると結論した。我々の知る限り 1つの研究だけがダントロレンの脂肪肝の効果を報告している[18]。その研究はガウスシアルシファーゼアッセイで脂肪肝の小胞体内の Ca^{2+} 減少を報告している。ラットにダントロレン 15 mg/kg を 7日間腹腔内投与し、小胞体内の Ca^{2+} 減少を抑制している。投与方向は異なるが、我々のデータと知見は一致している。

第7章 結語

リアノジン受容体の安定化薬であるダントロレンを経口投与することで、小胞体ストレスを抑制し、肝臓の脂肪蓄積を軽減する。

第8章 謝辞

本研究を行うために多大なご指導・ご助言をいただいた山口大学大学院医学系研究科器官病態内科学 矢野雅文教授に感謝を申し上げます。また、山本健教授には指導教官として終始ご指導いただき、深謝の意を表します。また、器官病態内科学と共同研究である消化器内科学の多くの先生方、スタッフの方々にご指導、ご協力いただきました。ここに改めて感謝の意を表します。

第 9 章 参考文献

1. Chakravarthy MV, Waddell T, Banerjee R, Guess N. Nutrition and Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Current Perspectives. *Gastroenterol Clin North Am.* 2020 Mar;49(1):63-94. doi: 10.1016/j.gtc.2019.09.003.
2. Du J, Ji Y, Qiao L, Liu Y, Lin J. Cellular endo-lysosomal dysfunction in the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int.* 2020 Feb;40(2):271-280. doi: 10.1111/liv.14311.
3. Polyzos SA, Kountouras J, Mantzoros CS. Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: From pathophysiology to therapeutics. *Metabolism.* 2019 Mar;92:82-97. doi: 10.1016/j.metabol.2018.11.014.
4. Diehl, A.M.; Day, C. Cause, Pathogenesis, and Treatment of Nonalcoholic Steatohepatitis. *N. Engl. J. Med.* 2017, 377, 2063–2072.
5. Negro F. Natural history of NASH and HCC. *Liver Int.* 2020 Feb;40 Suppl 1:72-76
6. Bogdanovic E, Kraus N, Patsouris D, Diao L, Wang V, Abdullahi A, Jeschke MG. Endoplasmic reticulum stress in adipose tissue augments lipolysis. *J Cell Mol Med.* 2015 Jan;19(1):82-91. doi: 10.1111/jemm.12384.
7. Rieusset J. Endoplasmic reticulum-mitochondria calcium signaling in hepatic metabolic diseases. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 2017 Jun;1864(6):865-876. doi: 10.1016/j.bbamcr.2017.01.001.
8. Yumnam S, Hong GE, Raha S, Saralamma VV, Lee HJ, Lee WS, Kim EH, Kim GS. Mitochondrial Dysfunction and Ca(2+) Overload Contributes to Hesperidin Induced Paraptosis in Hepatoblastoma Cells, HepG2. *J Cell Physiol.* 2016 Jun;231(6):1261-8. doi: 10.1002/jcp.25222.
9. Krause T, Gerbershagen MU, Fiege M, Weissborn R, Wappler F. Dantrolene--a review of its pharmacology, therapeutic use and new developments. *Anaesthesia.* 2004 Apr;59(4):364-73.
10. Betzenhauser MJ, Marks AR. Ryanodine receptor channelopathies. *Pflugers Arch.* 2010 Jul;460(2):467-80

11. Kobayashi S, Yano M, Suetomi T, Ono M, Tateishi H, Mochizuki M, Xu X, Uchinoumi H, Okuda S, Yamamoto T, Koseki N, Kyushiki H, Ikemoto N, Matsuzaki M. Dantrolene, a therapeutic agent for malignant hyperthermia, markedly improves the function of failing cardiomyocytes by stabilizing interdomain interactions within the ryanodine receptor. *J Am Coll Cardiol*. 2009 May 26;53(21):1993-2005.
12. Hino A, Yano M, Kato T, Fukuda M, Suetomi T, Ono M, Murakami W, Susa T, Okuda S, Doi M, Kobayashi S, Yamamoto T, Koseki N, Kyushiki H, Ikemoto N, Matsuzaki M. Enhanced binding of calmodulin to the ryanodine receptor corrects contractile dysfunction in failing hearts. *Cardiovasc Res*. 2012; 96(3):433-43. doi: 10.1093/cvr/cvs271.
13. Fukuda M, Yamamoto T, Nishimura S, Kato T, Murakami W, Hino A, Ono M, Tateishi H, Oda T, Okuda S, Kobayashi S, Koseki N, Kyushiki H, Yano M. Enhanced binding of calmodulin to RyR2 corrects arrhythmogenic channel disorder in CPVT-associated myocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014 May 23;448(1):1-7. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.03.152.
14. Kato T, Yamamoto T, Nakamura Y, Nanno T, Fukui G, Sufu Y, Hamada Y, Maeda T, Nishimura S, Ishiguchi H, Murakami W, Fukuda M, Xu X, Hino A, Ono M, Oda T, Okuda S, Kobayashi S, Koseki N, Kyushiki H, Yano M. Correction of impaired calmodulin binding to RyR2 as a novel therapy for lethal arrhythmia in the pressure-overloaded heart failure. *Heart Rhythm*. 2017 Jan;14(1):120-127. doi: 10.1016/j.hrthm.2016.10.019.
15. Nishimura S, Yamamoto T, Nakamura Y, Kohno M, Hamada Y, Sufu Y, Fukui G, Nanno T, Ishiguchi H, Kato T, Xu X, Ono M, Oda T, Okuda S, Kobayashi S, Yano M. Mutation-linked, excessively tight interaction between the calmodulin binding domain and the C-terminal domain of the cardiac ryanodine receptor as a novel cause of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Heart Rhythm*. 2018 Feb 7. pii: S1547-5271(18)30101-2. doi: 10.1016/j.hrthm.2018.02.006.
16. Sufu-Shimizu Y, Okuda S, Kato T, Nishimura S, Uchinoumi H, Oda T, Kobayashi S, Yamamoto T, Yano M. Stabilizing cardiac ryanodine receptor prevents the development of cardiac dysfunction and lethal arrhythmia in Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II δ c transgenic mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2020 Apr 2;524(2):431-438. doi: 10.1016/j.bbrc.2020.01.107.
17. Hirsova P, Ibrahim SH, Gores GJ, Malhi H. Lipotoxic lethal and sublethal stress signaling in hepatocytes: relevance to NASH pathogenesis. *J Lipid Res*. 2016 Oct;57(10):1758-1770.

18. Wires ES, Trychta KA, Bäck S, Sulima A, Rice KC, Harvey BK. High fat diet disrupts endoplasmic reticulum calcium homeostasis in the rat liver. *J Hepatol.* 2017 Nov;67(5):1009-1017. doi: 10.1016/j.jhep.2017.05.023.
19. Flamment M, Kammoun HL, Hainault I, Ferré P, Foufelle F. Endoplasmic reticulum stress: a new actor in the development of hepatic steatosis. *Curr Opin Lipidol.* 2010 Jun;21(3):239-46.
20. Malhi H, Kaufman RJ. Endoplasmic reticulum stress in liver disease. *J Hepatol.* 2011 Apr;54(4):795-809.
21. Shoshan-Barmatz V. High affinity ryanodine binding sites in rat liver endoplasmic reticulum. *FEBS Lett.* 1990 Apr 24;263(2):317-20.
22. Lilly LB, Gollan JL. Ryanodine-induced calcium release from hepatic microsomes and permeabilized hepatocytes. *Am J Physiol.* 1995 Jun;268(6 Pt 1):G1017-24.
23. Lee BS, Sessanna S, Laychock SG, Rubin RP. Expression and cellular localization of a modified type 1 ryanodine receptor and L-type channel proteins in non-muscle cells. *J Membr Biol.* 2002 Oct 1;189(3):181-90.

この学位論文は、Masaki T, Takeshi Y, Naoki Y, Koichi F, Shinji T, Yoshihide N et al. Dantrolene prevents hepatic steatosis by reducing cytoplasmic Ca²⁺ level and ER stress. *Biochem Biophys Rep.* 2020 Jul 21;23:100787.doi: 10.1016/j.bbrep.2020.100787. に原著論文として発表したものからデータを引用して作成しました。