

かわかみ まさあき

氏 名 川上 正晃

学位の種類 博士 (医学)

学位記番号 富医薬博甲第 246 号

学位授与年月日 平成 29 年 9 月 28 日

学位授与の要件 富山大学学位規則第 3 条第 3 項該当

教育部名 富山大学大学院医学薬学教育部 博士課程
生命・臨床医学専攻

学位論文題目

Role of G protein-coupled receptor kinase 2 in oxidative and nitrosative stress-related neurohistopathological changes in a mouse model of sepsis-associated encephalopathy

(敗血症関連脳症モデルマウスの酸化およびニトロソ化ストレスによる神経病理学的変化における G タンパク質共役型受容体キナーゼ 2 の役割)

論文審査委員

(主査)	教授	黒田 敏
(副査)	教授	田村 了以
(副査)	教授	笹原 正清
(副査)	教授	中辻 裕司
(指導教員)	教授	山崎 光章

論文内容の要旨

〔目的〕

敗血症は感染に対する免疫応答の機能不全によって起こる生命を脅かす全身性の臓器障害と定義される。その免疫応答の機能不全は中枢神経まで波及し、脳障害を起こす。これを敗血症関連脳症と呼び、中枢神経に直接的な感染のない二次性のびまん性の脳障害と定義される。重症敗血症の9-71%に合併するという報告があり、敗血症関連脳症が合併すると敗血症の死亡率が増加することが知られている。その病態形成にはミクログリアの活性化や酸化ストレスの増大が関与している可能性が指摘されているが、その詳細は不明であり、また治療方法は確立しておらず、敗血症治療戦略においても重要な課題である。

Gタンパク質共役受容体（GPCR）をリン酸化する酵素として発見されたGタンパク質共役受容体キナーゼ2（GRK2）は、近年GPCR以外の様々な反応経路で相互作用を持つことが報告されている。すでにアルツハイマー型認知症や慢性心不全といった疾患に対する治療標的としても注目されて研究が行われている。また、これまでに、敗血症モデルマウスにおいてGRK2阻害薬を投与するとその生存率が改善する事が見出されている。

今回、敗血症関連脳症の病態形成におけるGRK2の役割についてin vitroとin vivoの両方から解析を行い、GRK2の治療標的としての可能性を検討した。

〔方法並びに結果〕

In vitro

【方法】 マウス脳由来ミクログリア細胞株であるMG6を使用して解析を行った。MG6にリポポリサッカライド（LPS）を用いて炎症反応を惹起した。GRK2 siRNAとGRK2阻害薬を用いてGRK2を抑制し、その炎症応答の変化を測定した。

【結果】 LPS刺激による炎症応答誘導に伴い、GRK2の細胞内局在は時間経過と共に変化が見られ、このLPS誘導性の局在変化は濃度依存性を示すことが分かった。ついで、LPS刺激によるMG6細胞の炎症応答におけるGRK2の役割を調べるために、siRNAを用いてGRK2のノックダウンを行なった。その結果、GRK2ノックダウンにより、LPS誘導性のTNF- α 、IL-6、IL-1 β などの炎症性サイトカイン産生には影響を与えなかった一方で、LPS誘導性の活性酸素種の産生は有意に抑制されており、誘導型NOS（iNOS）の発現の抑制を認めた。このLPS誘導性のiNOSの発現はGRK2阻害薬投与によっても抑制された。iNOSは炎症により誘導され一酸化窒素を含む窒素酸化物の合成を担う酵素である。そこで、LPS誘導性の酸化窒素産生に対するGRK2の寄与を検討した結果、GRK2をノックダウンによりLPS誘導性の酸化窒素の産生が抑制されることが分かった。これらの検討により、マクログリアMG6細胞において、LPS誘導性の酸化ストレスの増加にGRK2が関与している可能性が示唆された。

In vivo

【方法】 盲腸結紮穿孔（CLP群）によって敗血症を誘導して作成した敗血症関連脳症モ

デルマウスを用いて実験を行った。controlは腹膜切開縫合のみを行った（sham群）。治療群はGRK2阻害薬をCLP施行直前と施行12時間後の2回で静注した（CLP-GRK2i群）。CLP施行後24時間で脳サンプリングを行い、各種解析を行った。

【結果】control群およびCLP群の大脳皮質でGRK2が発現している事、CLP群の大脳皮質におけるGRK2の発現量が増加することが分かった。そして、CLP群では大脳皮質において活性酸素種の増大がみられたが、CLP-GRK2i群においてはその活性酸素種の産生が抑制されていた。また、CLP群の脳サンプルにおいて、MG6と同様に、炎症性サイトカインの産生は増大した。CLP-GRK2i群では、炎症性サイトカインの産生はCLP群と変わらなかったが、iNOSの発現は抑制された。さらに、酸化ストレスの指標であるマロンジアルデヒドはCLP群で増加を認めたが、CLP-GRK2i群ではその増加が抑制され、抗酸化酵素であるスーパーオキシドディスムターゼはCLP群では減少を認めたが、CLP-GRK2i群では減少は認めなかった最後に、ヘマトキシリン・エオジン染色法を用いて大脳皮質における神経病理学的変化を評価すると、CLP群で認められたびまん性変化がCLP-GRK2i群では抑制を認めた。

これらの検討により、CLP誘導性敗血症関連脳症モデルマウスにおいて、その脳症の病態形成にGRK2が酸化/ニトロソ化ストレスを増大させることで関与している可能性が示唆された。

〔考察〕

敗血症関連脳症は重症敗血症患者の死亡率をあげる合併症であり、その病態には酸化ストレスが関与している可能性が指摘されてきた。我々は以前、フリーラジカルスカベンジャーであるエダラボンが敗血症関連脳症の病態形成を阻害するという報告をしている。今回、LPSで刺激されたMG6と敗血症モデルマウスの脳において、GRK2を阻害すると酸化/ニトロソ化ストレスが抑制されることを示した。ただ、MG6と脳のどちらにおいてもTNF- α ・IL-1 β といった炎症性サイトカインは抑制されておらず、このGRK2の阻害がどのような反応経路によって酸化ストレスを抑制しているかは不明であり、今後さらなる検討が必要である。

〔総括〕

敗血症において、脳の酸化ストレスおよびニトロソ化ストレスの増大にはGRK2が関与している可能性を示唆し、これはGRK2が敗血症関連脳症に対する有効な治療標的となりうる可能性を示唆した。

学位論文審査の要旨

「目的」

敗血症は、感染に対する免疫応答の機能不全によって生じる生命を脅かす全身性臓器障害である。その免疫応答の機能不全は中枢神経にまで波及し脳障害を起こすことが知られている。これは敗血症関連脳症と呼ばれており、中枢神経に直接的な感染がない二次性びまん性脳障害と定義される。重症敗血症の9-71%に合併すると言われており、その合併は敗血症の死亡率を上昇させる。その病態形成にはミクログリアの活性化や酸化ストレスの増大が関与している可能性が指摘されているが、その詳細は不明であるとともに治療方法も確立されておらず、敗血症の治療戦略においても重要な課題である。

Gタンパク質共役型受容体(GPCR)をリン酸化する酵素として発見されたGタンパク質共役型受容体キナーゼ2(GRK2)は、近年、GPCR以外の様々な反応経路で相互作用を持つことが報告されている。すでにアルツハイマー型認知症や慢性腎不全といった疾患に対する治療標的としても注目されている。これまでに敗血症モデルマウスにおいてGRK2阻害薬を投与すると、その生存率が改善することが見出されている。これらの経緯に基づいて、今回、敗血症関連脳症の病態形成におけるGRK2の役割について、*in vitro* および *in vivo* 双方の観点から解析した。また、GRK2の治療標的としての可能性を検討した。

「方法」

1. *in vitro* 実験

マウス脳由来ミクログリア細胞株であるMG6を使用して解析した。MG6にlipopolysaccharide(LPS)を投与して炎症反応を惹起した。GRK2 siRNAとGRK2阻害薬を用いてGRK2を抑制して、その炎症反応の変化を測定した。

2. *in vivo* 実験

盲腸結紮穿孔を実施して作製した敗血症モデルマウス(CLP)を用いて実験を行なった。コントロールとして腹膜切開縫合のみを行なったsham群を作製した。治療群はGRK2阻害薬をCLP施行直前と12時間後の2回にわたって静注した。CLP施行24時間後に脳を摘出して炎症応答に対する変化を検討した。

「結果」

1. *in vitro* 実験

LPS刺激による炎症反応の誘導に伴って、GRK2の細胞内局在は時間経過とともに変化が認められ、このLPS誘導変化には濃度依存性が確認された。次いで、LPS刺激によるMG6細胞の炎症応答におけるGRK2の役割を調べるためにsiRNAを用いてGRK2をノックダウンした。その結果、GRK2のノックダウンは、LPS誘導によるTNF- α 、IL-6、IL-1 β などの炎症性サイトカインの産生には影響を与えなかった。一方、LPS誘導性の活性酸素の産生は有意に抑制され、誘導型NOS(iNOS)の発現も抑制された。この効果はGRK2阻害薬であるmethyl 5-[2-(5-nitro-2-furyl)vinyl]-2-furoateによっても確認された。さらにGRK2のノックダウンはLPS誘導性の酸化窒素産生を抑制することが判明した。以上より、ミクログリアMG6細胞において、GRK2はLPSによる炎症性サイトカインの産生には関与していないものの、LPSによる酸化ストレスの増加に関与していることが示唆された。

2. *in vivo* 実験

Western blot および蛍光免疫染色にて、sham群に比べてCLP群で脳皮質におけるGRK2の発現が有意に増加していた。また、dihydroethidine hydrochloride(DHE)染色にて、sham群に

比べて CLP 群で脳皮質における活性酸素の産生が有意に増加したが、GRK2 阻害薬はその産生を有意に抑制した。また、GRK2 阻害薬は敗血症による iNOS の発現増加、malondialdehyde (MDA) の増加、superoxide dismutase (SOD) の減少をそれぞれ有意に抑制した。CLP は脳皮質にびまん性にダメージを与えたが、GRK2 阻害薬はそのダメージを有意に抑制した。GRK2 阻害薬は、CLP による炎症性サイトカインの産生増加に有意な効果を発揮しなかった。

[総括]

本研究によって、敗血症関連脳症の一つのメカニズムとして、ミクログリアにおける GRK2 の活性化による酸化ニトロ化ストレスの増大が炎症性サイトカインを介さない経路で脳皮質のびまん性損傷に関与している可能性が示唆された。

これまでの研究においても、活性酸素消去剤であるエダラボンが敗血症関連脳症の病態形成を有意に抑制することなどが報告されており、敗血症関連脳症の発症には酸化ストレスが関与している可能性が指摘されている。今回の川上正晃君の研究は、その推論を強く支持するとともに、本症の発生が脳内ミクログリアの GRK2/GPCR 系の活性化、次いで酸化およびニトロ化ストレスの増加を介していることを新たに指摘した点で新規性、学術的重要性を有している。また、GRK2 を標的とした創薬につながる研究として発展することが期待される。

以上より、川上正晃君は、きわめて予後不良である敗血症関連脳症において、その病態を明らかにするとともに将来の治療戦略を明らかにしている点で、本審査委員会は本論文が特に医学における新規性、学術的重要性において質の高い論文であると評価し、博士（医学）の学位に十分値するものと判定した。