

様式2

論 文 要 旨

論 文 題 目

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

氏 名 川上正晃

- 備考 ① 論文要旨は，2,000字程度とする。  
② A4判とする。

#### 〔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- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$ 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、ミクログリア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- $\alpha$ ・IL-1 $\beta$ 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。