

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 4月 1日現在

機関番号：17102
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22590083
 研究課題名（和文） 心筋梗塞時におけるG蛋白質共役7回膜貫通型受容体キナーゼ5の役割
 解明
 研究課題名（英文） Role of G protein-coupled receptor kinase 5 in myocardial infarction

研究代表者

仲矢 道雄（NAKAYA MICHIO）
 九州大学・薬学研究院・准教授
 研究者番号：80464387

研究成果の概要（和文）： G蛋白質共役型7回膜貫通受容体キナーゼ（GRK）は、G蛋白質共役型7回膜貫通受容体（GPCR）をリン酸化することによりGPCRを脱感作へと導くキナーゼとして知られている。我々は心筋梗塞モデル処置をしたマウス心臓においてGRK5の発現量が増加することを見出した。また、梗塞処置後の生存率を調べたところ、GRK5ノックアウトマウス群は野生型マウス群に比べ、生存率が有意に低下した。

研究成果の概要（英文）： G protein-coupled receptor kinases (GRKs) were initially identified as molecules that phosphorylate G-protein coupled receptors, leading to their desensitization. We first found that GRK5 expression was significantly increased in the infarct area of left ventricle after myocardial infarction (MI). We next examined the mortality rate of WT and β -arrestin2 KO mice after MI. GRK5 KO mice were more prone to die than WT mice after MI.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：薬理学

科研費の分科・細目：生物系薬学

キーワード：心臓、G蛋白質共役型7回膜貫通型受容体キナーゼ、心筋梗塞

1. 研究開始当初の背景

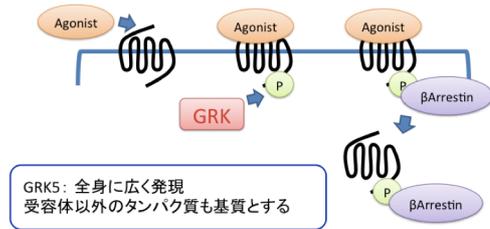
心不全は心臓がポンプとしての機能を十分に果たせなくなった状態であり、さまざまな循環器疾患の終末像として捉えられている。心不全は現在、日本人の死因の16%（平成17年度）を占め、5年生存率も50%と低い。さらに高齢化社会の到来に伴い今後はますます患者数が増加するものと考えられる。このような事情から心不全に対する画期的、効果的な治療法の確立が早急に望まれている。

る。 β アドレナリン受容体遮断薬（ β ブロッカー）は β アドレナリン受容体からのシグナルを遮断することにより心筋細胞の働きを減弱させ、弱った心臓への負担を軽くする。この作用から β ブロッカーは近年、心不全治療の第一選択薬として広く使用されている。我々はこれまで β ブロッカーが心臓の機能に及ぼす影響および β 1アドレナリン受容体（ β 1受容体）からのシグナル伝達についてGRK5,6、 β アレスチン1,2のノックアウトマウス（KOマウス）を用いて詳細に解析

を行ってきた。β1受容体を含め7回膜貫通型G蛋白質共役受容体(GPCR)は一般に、アゴニストの結合により活性化されるとGRKファミリー分子によりリン酸化される。その後、そのリン酸化部位にβアレスチンが結合し、脱感作へと導かれる(図1)。

GRKファミリー分子は現在7種存在し、心臓においては特にGRK2、5が豊富に発現している。興味深いことにこの2分子は心不

G protein-coupled receptor kinase (GRK):
Gタンパク質共役型受容体をリン酸化するキナーゼ 図1



全患者の心臓において発現量がさらに増加していることが報告されている(Dzimiri N *et al.*, *Eur. J. Pharmacol.*, 2004)。このことからGRK2、5が心筋梗塞、心肥大などの心疾患に密接に関与している可能性が考えられる。GRK2に関しては近年、その心不全時における役割に関して精力的に研究がなされ、心肥大、心筋梗塞時の両方において病態を悪化させる分子であることがわかってきた(Dorn GW 2nd, *J. Mol. Med.*, 2009)。しかしながら、GRK5の心不全時における役割は未だほとんど明らかではない。

2. 研究の目的

GRK2、5は上述のような共通の特徴を持つ一方、それぞれ特有の基質GPCRが存在すること、GRK5のみが核移行シグナルを持つことなどからそれぞれ固有の機能も有するものと推測される。実際、ごく最近になって心肥大時におけるGRK5の役割の一端が初めて明らかになり、驚くべきことにGRK5は心肥大時に細胞質から核内に移行してヒストンデアセチラーゼ5(HDAC5)をリン酸化し、心肥大悪化遺伝子の転写を促進することが明らかとなった(Martini JS *et al.*, *Proc.Natl.Acad.Sci.*, 2008)。一方で心筋梗塞時におけるGRK5の役割に関する研究は、国内外においてこれまで全く報告がない。そこで本研究では心筋梗塞時におけるGRK5の役割を明らかにし、GRK5をターゲットとした心筋梗塞治療薬創成の礎を築くことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 心筋梗塞時のGRK5の発現上昇時期の

特定。

心筋梗塞発生直後から心臓内においては細胞死、免疫細胞の浸潤、梗塞部の修復など様々なイベントが秩序だてて次々に起こる。心筋梗塞後のステージである、心不全時の患者においてGRK5の発現量が増加していることは示されているが、GRK5の発現量が心筋梗塞発生後、上述のどのイベント時に顕著に増加してくるのかについては全く明らかではない。そこで、マウスに心筋梗塞モデル作成処置を施し、処置後から1日おきに心臓を摘出し、GRK5のmRNA、蛋白質量の変化を調べる。

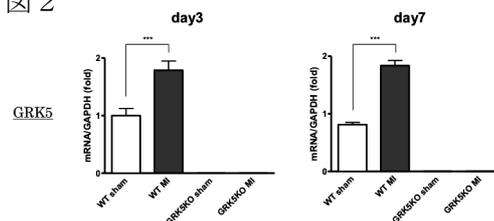
(2) 心筋梗塞モデル処置後のGRK5のKOマウスの異常解析。

GRK5KOマウスと野生型(WT)マウスに心筋梗塞モデル作成処置を施し、GRK5の欠損による梗塞後の病態変化を評価する。その際は特に細胞死(TUNEL染色による)、梗塞領域の増減(ヘマトキシリン・エオシン染色法による)、梗塞部位での線維化(ピクノシリウス染色法による)、および梗塞後の修復プロセスに焦点を当てて解析する。修復プロセスに関しては免疫染色による好中球、マクロファージの浸潤の程度評価と、それらの浸潤に伴う線維化関連分子、炎症性サイトカイン、ケモカインの発現量の増減を解析する。特に異常が認められた心筋梗塞後のステップにおいては、野生型マウスと比較してマイクロアレイ解析を行う。また、GRK5の欠損による梗塞後の心臓の機能的変化を心エコー法、心カテーテルによる左心室内圧測定法により評価する。

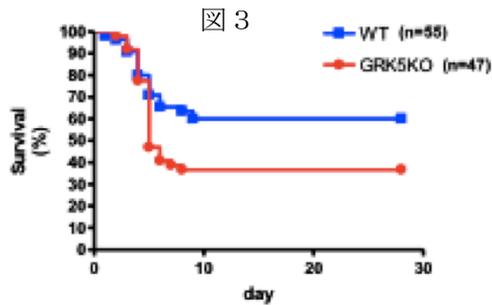
4. 研究成果

心不全患者においてGRK5が増加しているという報告がある。そこでまず、マウスに心筋梗塞モデル作成処置(冠動脈左前下行枝の結紮)を施し、処置後3、7日目の心臓においてGRK5のmRNA量の変化を調べた。その結果、GRK5のmRNAの発現量がMI施術後3日後、7日後のそれぞれにおいて約2倍に増加していた(図2、sham=偽処置群MI=心筋梗塞処置群)。また、GRK5KOマウス群ではsham、MI群ともにGRK5の発現は認められなかった。

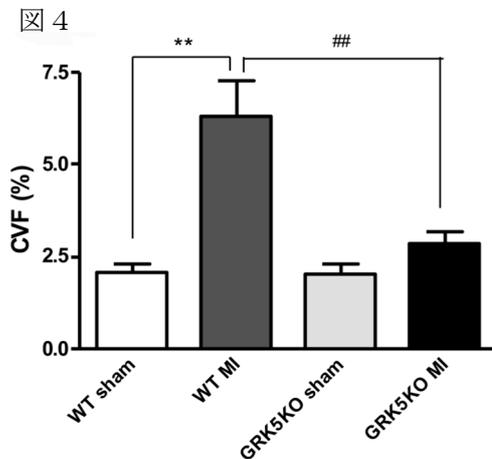
図2



次に WT マウスあるいは GRK5KO マウスに心筋梗塞処置を施し、処置後の生存率を4週間にわたり調べたところ、GRK5KO マウス群は WT 群に比べ生存率が有意に低下した(図3)。生存率の違いは心筋梗塞処置後3日目から5日目において顕著に認められたことから、処置後3日目における GRK5KO マウス群と WT マウス群の心機能の違いを調べたが、有意な差は観察されなかった。そこで次に処置後3日目の GRK5KO マウス群と WT マウス群から心臓 RNA を調製し、マイクロ



アレイ解析を行った。その結果、コラーゲンのみならず、線維化促進因子である TGF- β 、細胞外マトリックスの一つであるペリオスチン、マトリックスメタロプロテアーゼなど多くの心筋梗塞後の心臓の線維化に関係する遺伝子の発現上昇が GRK5KO マウスでは WT マウスに比べ有意に低下していることを見出した。リアルタイム PCR 法を用いて処置後3日目の心臓におけるそれら心臓の線維化に関連する遺伝子の mRNA の発現上昇を調べたところ、GRK5KO マウス群では WT マウス群に比べ、発現上昇の低下が確かに認められた。この結果から、GRK5KO マウス群は心筋梗塞後の線維化が適切に進行していない可能性が考えられた。実際、心筋梗塞処置後4日目の心臓切片を作成し、心臓の線維化の程度を picosirius red 染色によって定量したところ、GRK5KO マウス群では WT マウス群と比較してコラーゲンの蓄積が有意に低下していることが明らかとなった(図



4)。これらの結果は GRK5 KO マウス群の死因が全て不十分な心臓の線維化による心破裂であったこととも一致する。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計8件)

1. **Michio Nakaya**, Mitsuru Tajima, Hidetaka Kosako, Takeo Nakaya, Akiko Hashimoto, Kenji Watari, Hiroaki Nishihara, Mina Ohba, Shiori Komiya, Naoki Tani, Motohiro Nishida, Hisaaki Taniguchi, Yoji Sato, Mitsuru Matsumoto, Makoto Tsuda, Masahiko Kuroda, Kazuhide Inoue & Hitoshi Kurose. GRK6 deficiency in mice causes autoimmune disease due to impaired apoptotic cell clearance.

Nat. Commun. 4, 1532 (2013) doi: 10.1038/ncomms2540. (査読有り)

2. Noriko Makita*, Yoji Kabasawa*, Yuko Otani, Firman, Junichiro Sato, Makiko Hashimoto, **Michio Nakaya**, Hiroaki Nishihara, Masaomi Nangaku, Hitoshi Kurose, Tomohiko Ohwada, Taroh Iiri. Attenuated desensitization of β -adrenergic receptor by water-soluble N-nitrosamines that induce S-nitrosylation without NO release.

Circ. Res. 112, 327-334 (2013) doi: 10.1161/CIRCRESAHA.112.277665. (査読有り)

3. **Michio Nakaya**, Satsuki Chikura, Kenji Watari, Natsumi Mizuno, Koji Mochinaga, Supachoke Mangmool, Satoru Koyanagi, Shigehiro Ohdo, Yoji Sato, Tomomi Ide, Motohiro Nishida & Hitoshi Kurose. Induction of cardiac fibrosis by β -blocker in G protein-independent but GRK5/ β -arrestin2-dependent signaling pathways.

J. Biol. Chem. 287, 35669-35677 (2012) doi: 10.1074/jbc.M112.357871. (査読有り)

4. Kinue Nishioka, Motohiro Nishida, Marina Ariyoshi, Zhong Jian, Shota Saiki, Mayumi Hirano, **Michio Nakaya**, Yoji Sato, Satomi Kita, Takahiro Iwamoto, Katsuya Hirano, Ryuji Inoue, & Hitoshi Kurose.

Cilostazol suppresses angiotensin II-induced vasoconstriction via

protein kinase A-mediated phosphorylation of the transient receptor potential canonical 6 channel. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 31, 2278-2286 (2011) doi: 10.1161/ATVBAHA.110.221010. (査読有り)

5. Naoyuki Kitajima, Kenta Watanabe, Sachio Morimoto, Yoji Sato, Shigeki Kiyonaka, Masahiko Hoshijima, Yasuhiro Ikeda, **Michio Nakaya**, Tomomi Ide, Yasuo Mori, Hitoshi Kurose, & Motohiro Nishida. TRPC3-mediated Ca²⁺ influx contributes to Rac1-mediated production of reactive oxygen species in MLP-deficient mouse hearts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 409, 108-113 (2011) doi: 10.1016/j.bbrc.2011.04.124. (査読有り)

6. Motohiro Nishida, Mariko Ogushi, Reiko Suda, Miyuki Toyotaka, Shota Saiki, Naoyuki Kitajima, , **Michio Nakaya**, Kyeong-Man Kim, Tomomi Ide, Yoji Sato, Kazuhide Inoue, & Hitoshi Kurose. Heterologous down-regulation of angiotensin type 1 receptors by purinergic P2Y₂ receptor stimulation through S-nitrosylation of NF- κ B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108, 6662-6667 (2011) doi: 10.1073/pnas.1017640108. (査読有り)

[学会発表] (計 6 件)

1. **仲矢道雄、黒瀬等**
心筋梗塞時における GRK5 の役割解析
日本薬学会 第 133 年会, 2013 年 3 月 (シンポジウム) (横浜)

2. **仲矢道雄、黒瀬等**
アポトーシス細胞の貪食における GRK6 の関与
第 85 回日本生化学会大会, 2012 年 12 月 (シンポジウム) (福岡)

3. **仲矢道雄**
受容体シグナリングにおけるイメージング技術の応用
日本薬学会 第 132 年会, 2012 年 3 月 (シンポジウム) (札幌)

4. **仲矢道雄、千蔵さつき、渡健治、西田基宏、黒瀬等**
G タンパク質共役型受容体キナーゼ/ β アレ

スチンを介した新規機能,
第 85 回日本薬理学会年会, 2012 年 3 月 (シンポジウム) (京都)

5. **仲矢道雄、西田基宏、黒瀬等**
 β アドレナリン受容体遮断薬の GRK5/ β アレスチン 2 を介した心臓の線維化
日本薬学会 第 131 年会, 2011 年 03 月 (シンポジウム) (静岡)

6. **仲矢道雄、西田基宏、黒瀬等**
Induction of cardiac fibrosis by β -blocker in G protein-independent but GRK5/ β -arrestin2-dependent signaling pathways
第 84 回日本薬理学会年会, 2011 年 3 月 (シンポジウム) (横浜)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]
○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]
ホームページ等

<http://chudoku.phar.kyushu-u.ac.jp/index.html>

6. 研究組織
(1) 研究代表者
仲矢道雄 (NAKAYA MICHIO)
九州大学・薬学研究院・准教授
研究者番号: 80464387