

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 23 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460336

研究課題名(和文)敗血症病態におけるGRK2の創薬標的分子としての可能性の探究

研究課題名(英文)Studies on GRK2 as a potential drug discovery target for the sepsis syndrome

研究代表者

服部 裕一(Hattori, Yuichi)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・教授

研究者番号：50156361

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：GRK2は多くのシグナル伝達ネットワークにおける統合ノード機能が明らかにありつつある遍在性キナーゼである。マウスに盲腸結紮穿孔(CLP)を行い敗血症を起こしたとき、GRK2阻害薬投与は急性肺傷害を軽減させた。敗血症の予後にも影響する敗血症性脳症(SAE)におけるGRK2の役割について検討したところ、ミクログリアにおいて、LPSによりGRK2の発現は増加し、CLPマウスにおいて、GRK2阻害薬の投与は、ニトロ化及び酸化ストレスを軽減させ、大脳皮質の組織病理学的変化を阻止した。それ故、GRK2を標的とした創薬の開発は、SAEなど敗血症病態への臨床応用に向けた新しい治療戦略の基盤として期待される。

研究成果の概要(英文)：While GRK2 was originally discovered for its role in the process of desensitization of agonist-activated GPCRs, emerging evidence suggests that GRK2 can participate in the regulation of diverse cellular responses by phosphorylating a large number of non-GPCR substrates and interacting with a plethora of proteins involved in signaling and trafficking. GRK2 inhibitor was found to mitigate acute lung injury in mice with CLP-induced sepsis. Furthermore, we found using cultured mouse microglia that GRK2 was upregulated by LPS challenge and the knockdown of GRK2 gene expression abrogated the LPS-induced increase in the production of ROS and NO. The pharmacological inhibition of GRK2 was shown to downregulate ROS generation and iNOS expression and to prevent the histopathologic changes in brains of mice with CLP-induced sepsis. Thus, GRK2 may serve as a potentially interesting therapeutic target for sepsis syndrome, including sepsis-associated encephalopathy.

研究分野：薬理学

キーワード：GRK2 敗血症 炎症性サイトカイン 活性酸素 敗血症性脳症 ミクログリア iNOS

1. 研究開始当初の背景

G タンパク質共役受容体キナーゼ 2 (GRK2)は、多くのシグナル伝達ネットワークにおける統合ノードとしての機能が明らかになりつつある。遍在性の必須タンパク質キナーゼである。さらに、いくつかの炎症性疾患、心血管疾患および腫瘍のような状況においてGRK2の存在量および活性の変化が認められていることから、このような変化が病変の開始または進行に寄与することが示唆されるようになった。GRKが複数のGタンパク質共役受容体(GPCR)の脱感作と細胞内移行において主要な役割を果たすことが当初からわかっていたが、GRK2はGPCR以外のいくつかの基質もリン酸化し、シグナル伝達に関連するさまざまなタンパク質と動的に会合することが明らかになっている。GRK2は免疫系の種々のタイプの細胞に高く発現しており、様々な炎症疾患においてその発現が変化していることから、炎症の病態形成に重要な働きをしていると考えられるが、一方で細胞生存に関わる細胞内シグナリングの修飾にも影響するなど多面的な性質をもっている。

高齢者人口の増加、悪性腫瘍や移植時の化学療法などによる免疫機能の低下、多剤耐性菌の出現などにより、敗血症は現在においてもなお高い死亡率を有している。敗血症は、主要臓器の障害を起こし極めて高い致死性を示すが、敗血症性ショックおよび多臓器不全に対する堅固な治療法は未だに確立されていない。敗血症進展のリスクを回避し、敗血症患者の時宜を得た治療の重要性を考慮する、という観点から昨年にその定義が見直され、「感染に対する制御不能な宿主反応による生命に関わる臓器不全」であるとされた。われわれは予備実験においてGRK2阻害薬が敗血症による致死率を劇的に改善することを見出したことから、GRK2が敗血症において炎症以外の有害分子としても働いていることを示唆するものであり、GRK2を分子標的とした敗血症性ショックならびに多臓器不全に対する治療の有用性は高く期待でき、

本症の治療薬開発に与えるインパクトは大きいものと想定した。

2. 研究の目的

敗血症性ショックおよび多臓器不全に対する堅固な治療法の突破口を見出すことが、現在救命救急領域で求められているニーズである。そこで、本研究では敗血症の病態生理の形成にGタンパク質共役受容体キナーゼ2 (GRK2)による細胞内シグナルの修飾が重要な役割を果たしていると想定し、敗血症時のGRK2の発現および活性の変化を捉え、GRK2阻害薬を用い、敗血症性ショックならびに多臓器不全におけるその有用性を評価し、また敗血症に続発する重篤な合併症である敗血症性脳症(SAE)におけるGRK2の関与を検討し、GRK2を分子標的とした敗血症治療が新しい方向性を生み出していけるか検証することを目的とした。

3. 研究の方法

臨床に近似した盲腸結紮穿孔敗血症マウスを用いて、分子生物学、生化学、病理組織学および生体機能学的手法を駆使して、敗血症性ショックや多臓器不全といった病態形成に寄与する炎症や細胞死に対し抑制的な遺伝子群の発現や、それらによって起こる生化学的、組織学的あるいは機能学的変化と、GRK2との関連を評価し、培養ミクログリアを用いて、エンドトキシンを投与したときの、炎症や細胞生存に寄与する細胞内シグナルや転写因子の動態における、GRK2の敗血症性脳症における役割について *in vitro* 実験から明らかにし、敗血症治療において、GRK2阻害薬の将来臨床応用の実用化の可能性を探るとともに、GRK2の敗血症における分子病態生理的意義を解明した。

4. 研究成果

8-12週齢の雄性BALB-Cマウスに盲腸結紮穿孔(CLP)を行い、敗血症を生じさせたとき、

GRK2 阻害薬である methyl 5-[2-(5-nitro-2-furyl)vinyl]-2-furoate の投与は、炎症性サイトカインの増加を減弱させ、組織の炎症病理像およびアポトーシス発現増加にも、有意な阻止効果を示した。GRK2 阻害薬治療を 56.4 ng/kg/day の用量で投与したとき、CLP 誘発性敗血症マウスの生存率は有意な改善を認めた。以上の結果は、敗血症病態形成における GRK2 の役割が示唆される。さらに敗血症性臓器障害の一つであり、敗血症の予後にも影響する敗血症性脳症における GRK2 の役割について検討した。株化 MG6 ミクログリア細胞において、エンドトキシンである LPS 刺激により GRK2 の発現は増加し、GRK2 の siRNA により GRK2 をノックダウンしたとき LPS による iNOS の発現量は mRNA およびタンパク量ともに有意に減少し、NO 産生量も低下した。さらに LPS による活性酸素(ROS)産生量も低下した。CLP 誘発性敗血症マウス(C57BL/6J)において、GRK2 阻害薬の投与は、ROS 産生量の上昇を軽減させ、脂質過酸化物質である MDA (マロンジアルデヒド)の増加を抑え、SOD (superoxide dismutase) の活性低下を改善した。結果的に、CLP マウスにみられる大脳皮質の神経細胞変性を有意に低下させた。これらの結果から、GRK2 を標的分子とする創薬の開発が、敗血症性脳症を防止あるいは進展を阻止する有力な治療戦略を提供するかもしれないことが示唆された。

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6件)

Yuichi Hattori, Kohshi Hattori, Tokiko Suzuki, Naoyuki Matsuda

Recent advances in the pathophysiology and molecular basis of sepsis-associated organ dysfunction: Novel therapeutic implications and challenges.

Pharmacol Ther 2017 (in press) 査読有
Doi: 10.1016/j.pharmthera.2017.02.040.

Mari Sakai, Tokiko Suzuki, Kengo Tomita, Shigeyuki Yamashita, Sailesh Palikhe, Kohshi Hattori, Naoki Yoshimura, Naoyuki Matsuda, Yuichi Hattori

Diminished responsiveness to dobutamine as an inotrope in mice with cecal ligation and puncture-induced sepsis: Attribution to phosphodiesterase 4 upregulation.

Am J Physiol Heart Circ Physiol 312, 2017 (in press) 査読有

Doi:10.1152/ajpheart.00828.2016.

服部裕一, 服部貢士, 鈴木登紀子
G タンパク質共役型受容体キナーゼ 2 (GRK2)の分子病理的役割
日本臨床 74 巻, 10 号, 1761-1768, 2016.

Wakana Ohashi, Kohshi Hattori, Yuichi Hattori

Control of macrophage dynamics as a potential therapeutic approach for clinical disorders involving chronic inflammation.

J Pharmacol Exp Ther 354 (3) 240-250, 2015.

査読有

大橋若奈, 服部裕一
敗血症性急性肺傷害における GRK2 の創薬ターゲットとしての可能性
日薬理誌 145 巻, 3 号, 122-128, 2015.

Qiang Wang, Hiroki Yokoo, Michinori Takashina, Kimimasa Sakata, Wakana Ohashi, Lobna A Abdelzaher, Takahiro Imaizumi, Takuya Sakamoto, Kohshi Hattori, Naoyuki Matsuda, Yuichi Hattori

Anti-inflammatory profile of levosimendan in cecal ligation-induced septic mice and in

lipopolysaccharide-stimulated macrophages.

Crit Care Med 43 (11) e508-e520, 2015.

査読有

〔学会発表〕(計4件)

服部裕一

Role of GPCR regulatory molecules in endothelial cell inflammatory responses to high glucose .

第 81 回日本循環器学会学術集会(Topic 3 : Endothelium, Health and Diseases)

2017年3月18日

金沢(金沢都ホテル)

酒井麻里, 芳村直樹, 服部裕一

敗血症性心筋症の病態形成機構の解明と新たな治療への応用 .

第 90 回日本薬理学会年会(シンポジウム: 革新的心不全治療戦略創出を指向した心機能制御機構の新たな展開)

2017年3月15日

長崎(長崎新聞文化ホール)

服部裕一

Gタンパク質共役受容体活性制御機構分子を標的とした糖尿病性心血管障害の治療戦略 .

第 17 回応用薬理シンポジウム(シンポジウム: 生活習慣病に対する治療戦略 II 循環器疾患)

2015年9月4日

新潟(新潟大学医学部有壬記念館)

大橋若奈, 服部裕一

敗血症性急性肺損傷における GRK2 の創薬ターゲットとしての可能性 .

第 87 回日本薬理学会年会(シンポジウム: ARDS 最新治療戦略のためのトランスレーショナルリサーチアプローチ)

2014年3月19日

仙台(仙台国際センター)

〔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://www.med.u-toyama.ac.jp/pharma/index.html>

[html](#)

6. 研究組織

(1)研究代表者

服部 裕一 (HATTORI, YUICHI)

富山大学大学院医学薬学研究部 (医学)・教授

研究者番号: 50156361

(2)研究分担者

大橋 若奈 (OHASHI, WAKANA)

富山大学大学院医学薬学研究部 (医学)・助教

研究者番号: 50381596