

## 心筋梗塞時のリモデリングにおける GRK5 の役割

九州大学大学院 薬学研究院 薬効安全性学分野  
黒瀬 等

### 1. はじめに 緒言 目的 背景 序論

心臓は全身に血液を供給するために、1日に10万回以上も収縮と拡張を繰り返している。収縮・弛緩の仕事量に見合った酸素は冠動脈により供給されている。冠動脈は、右冠動脈、左冠動脈前下行枝、および左冠動脈回旋枝から成っている。心筋梗塞はこれら冠動脈が閉塞することによって心臓に血液が供給されなくなり、心筋が虚血状態を経て壊死してしまった状態である。冠動脈の閉塞は主に動脈硬化をきたした冠動脈に血栓ができることによって引き起こされる。40歳以上の中高年層に発症しやすい疾患である。発症した90%以上の患者で不整脈を併発する。また、心不全や心破裂を伴う場合もある。現在、心筋梗塞を含めた心疾患は悪性新生物（がん）に次いで日本人の死因の第2位であり、高齢化に伴う虚血性心疾患の増加により、今後も心疾患の患者数は増加することが予想されている。心筋梗塞の治療には、心臓カテーテルなど外科的な方法のほか薬物による治療も行われている。例えば、血栓を溶解させるためにウロキナーゼや組織プラスミノゲンアクチベーターが用いられており、また胸痛を抑制するためにモルヒネが投与され、さらに不整脈の予防にリドカインなどが用いられている。

心筋梗塞後、梗塞部位においては細胞の壊死に端を発した炎症反応が引き起こされる。その後、壊死した細胞のスペースを補うため、線維芽細胞が集積し癒痕巣とよばれる線維組織に置き換えられていく(1)。そしてさらに梗塞によって低下した心拍出量を増大させるために正常な心筋細胞の配置転換が起こる。その結果、心臓の肥大が生じ、また肥大に伴い間質の線維化も引き起こされる。間質の線維化とはコラーゲンなどの細胞外マトリックスが、間質に過剰に蓄積した状態のことである。過剰な間質の線維化は、心臓を硬くし拡張障害を引き起こすことから、好ましくない応答だと考えられている。また、線維化は刺激伝達系に異常を与え、心筋梗塞後の死亡原因の第一位である不整脈を誘発することも知られている。

G Protein-coupled receptors (GPCRs) は7回膜貫通型の受容体であり、ホルモンが結合すると細胞内に応答を生体に引き起こす。GPCRはリガンドの結合によって活性化されるのみならず、速やかに応答は減弱される(脱感作される)。GPCRの脱感作は、活性化されたGPCRのC末端領域が、セリンスレオニンキナーゼであるG Protein-coupled receptor kinases (GRKs)によってリン酸化されることにより開始される(2)。その後、リン酸化されたGPCRを $\beta$ -アレスチンが認識し、GPCRによるGタンパク質の活性化を阻害するとともに、受容体のインターナリゼーションを引き起こす。哺乳類のGRKファミリーには7種の分子が存在し、共通のドメインとしてRGSドメインおよび触媒ドメインを持っている。このうち、GRK1とGRK4およびGRK7の発現は非常に限られた組織に見られる。GRK2/3/5/6は様々な組織に発現しており、特にGRK5は心臓での発現が高い。興味深いことにこのGRK2とGRK5は心不全患者の心臓において発現量が増加していることが報告されている。近年、GRK2に関しては心不全時での役割に関して精力的に研究がなされ、心肥大や心筋梗塞の発症時において病態を悪化させる分子であることが報告された。最近、心肥大時におけるGRK5の役割の一端が初めて報告された。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、心肥大関連遺伝子の転写を促進するように働いていた。すなわちGRK5は心肥大時において心臓の機能を悪化させるように働く分子であると考えられた。しかしながら、心筋梗塞時におけるGRK5の役割については、これまで報告されていない。そこで本研究では心筋梗塞時におけるGRK5の役割を明らかにすることを目的とした。

### 2. 方法

心筋梗塞モデルマウスの作成は、8~10週齢のC57BL/6J野生型 (WT) 雄性マウスとGRK5ノックアウト (GRK5-KO) 雄性マウスの左冠動脈前下行枝を結紮することで行った。生存率は、梗塞処

置後4週間にわたりマウスの死亡発生を調べ、 Kaplan-Meier法により生存曲線を作成することで得た。マウスの心機能は、左室内カテーテル検査と心エコー検査により評価した。線維化関連遺伝子の発現変化は、qRT-PCR法およびウェスタンブロット法を用いて評価した。マクロファージの浸潤は、心臓切片標本を抗F4/80抗体を用いて染色し定量することで評価した。

### 3. 結果 研究成果

心筋梗塞処置後のGRK5-KOマウス群の生存率は、WT群に比べ生存率が有意に低下していた。GRK5-KOマウス群の死因は全て心破裂であったこと、また心破裂は心臓の強度が低下して起こることから、GRK5-KOマウス群で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。そこで心筋梗塞処置後4日目の心臓切片を作成し、心臓の線維化の程度を検討したところ、GRK5-KO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た。処置後3日目の心臓サンプルを用いて梗塞処置後のコラーゲンmRNAの発現を調べたところ、GRK5-KOマウス群はWTマウス群より低かった。また、コラーゲンのみならず、線維化促進因子であるTGF- $\beta$ 、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線維化関連タンパクの発現上昇も、GRK5-KOマウス群ではWTマウス群と比較して顕著に低下していた。心筋梗塞後の線維化には梗塞部での炎症が重要な役割を果たす。そこで、梗塞処置後の心臓における炎症性サイトカインの発現量を測定した。その結果、GRK5-KOマウス群ではWTマウス群に比べ、炎症性サイトカイン (TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ ) の発現上昇が有意に低下していた。また、この結果に対応し、処置後4日目の梗塞部へのマクロファージの浸潤がGRK5-KOマウス群ではWTマウス群に比べ顕著に低下していた。

心エコー法は、非侵襲的に心臓の形態や動きの情報が得られる検査である。GRK5-KOマウス群はWTマウス群に比べ心筋梗塞処置後の心破裂による死亡が増加していたことから、GRK5-KOマウス群では心筋梗塞処置後の心臓のリモデリングが十分に進んでいない可能性が考えられた。また、両群間で心筋梗塞処置後の生存率の違いが顕著にみられるのは処置後3日目からであった。そこで、心エコーを用いて心筋梗塞処置後3日目のマウスの心壁厚や心室内腔などの変化を観察し、GRK5-KOマウス群とWTマウス群の心臓の形態変化を検討した。心拍数は両群において有意な差はなく、心拍数が他のパラメーターに及ぼす影響はないと考えられた。拡張期左室内径 (LVIDd) および収縮期左室内径 (LVIDs) は、sham群に比べ心筋梗塞処置後で有意な増加がみられたものの、心筋梗塞処置を施したWTマウス群とGRK5-KOマウス群の間では有意な差はみられなかった。一方、WTマウス群においては、収縮能の指標である内径短縮率 (FS) および駆出分画 (EF) はsham群に比べ心筋梗塞処置群に有意な低下がみられた。しかし、心筋梗塞処置を施したWTマウス群とGRK5-KOマウス群の間では有意な差はみられなかった。さらに、拡張期の心室中隔厚 (IVSd)、左室後壁厚 (LVPwd) の心筋梗塞処置による変化は、sham群と処置群間およびWTマウス群とGRK5-KOマウス群の間で有意な差は認められなかった。すなわち、心筋梗塞処置後3日目においてWTマウス群とGRK5-KOマウス群の間で、心筋梗塞処置によって引き起こされる心臓の形態変化には明らかな差は認められなかった。しかし、心筋梗塞処置後28日目では、WTマウス群に比べGRK5-KOマウス群では、LVIDsおよびLVPwdに有意な増加と駆出分画の有意な減少がみられた。すなわち、心筋梗塞処置により、GRK5-KOマウス群の収縮能はWTマウス群に比べ低下していることが明らかとなった。

炎症性サイトカインの産生はNF- $\kappa$ B経路によって発現が制御されている。NF- $\kappa$ B経路の活性化は次のように考えられている。静止状態ではNF- $\kappa$ Bを構成するp55とp65のサブユニットがI $\kappa$ B $\alpha$ と複合体を形成し細胞質に存在している。刺激によりI $\kappa$ B $\alpha$ がIKKによりリン酸化を受け分解されるとp55とp65が核に移行し各種遺伝子の転写を促進する。このとき、p65はリン酸化を受ける。また、GRK5はI $\kappa$ B $\alpha$ と相互作用することが報告されている (3)。そこで、GRK5がI $\kappa$ B $\alpha$ と結合できるかを検討したところ、過去の報告と一致してGRK5はI $\kappa$ B $\alpha$ と結合した。次に、野生型のGRK5あるいはキナーゼ活性を欠失したGRK5 (K215R-GRK5) とI $\kappa$ B $\alpha$ を共発現させ、I $\kappa$ B $\alpha$ のリン酸化を検討した。その結果、野生型GRK5の発現ではI $\kappa$ B $\alpha$ のリン酸化は増加した。一方、キナーゼ活性欠失変異体のK215R-GRK5ではI $\kappa$ B $\alpha$ のリン酸化の増加は観察されなかった。この結果は、GRK5はI $\kappa$ B $\alpha$ のリン酸化を直接あるいはIKKのリン酸化を介して間接的に制御していることが明らかになった。GRK5によるI $\kappa$ B $\alpha$ のリン酸化に対する効果は、NF- $\kappa$ Bの活性化を評価できるルシフェラーゼレポーター遺伝子を用いた測定系でも確認できた。すなわち、野生型GRK5を発現させるとNF- $\kappa$ Bのレポーター遺伝子の転写活性は増加したのに対し、キナーゼ活性を欠失させたK215R-GRK5を発現させた場合は、NF- $\kappa$ Bの転写活性化は観察されなかった。これらの結果は、GRK5はNF- $\kappa$ Bの活性化に必須の役割を果たしていることを示している。

心筋梗塞時の炎症応答にどの細胞に発現しているGRK5が重要なのかを調べる目的で骨髄移植の実験を行った。GRK5-K0マウスの遺伝的バックグラウンドはC57BL/6Jであり、このCD45抗原はCD45.2である。このマウスには遺伝的バックグラウンドがCD45を除いて同じコンジュニックマウス(CD45.1マウスと略す)が存在する。CD45のみが異なるCD45.2マウスおよびCD45.1マウスの2種のマウスを用いて骨髄移植を行った。GRK5-K0マウスに $\gamma$ 線を照射し骨髄を破壊した後、野生型CD45.1マウスの骨髄を移植し、キメラマウスを作成した(WT $\rightarrow$ K0マウスと略す)。一方、逆に野生型CD45.1マウスに $\gamma$ 線を照射し、GRK5-K0マウスの骨髄を移植したキメラマウスも作成した(K0 $\rightarrow$ WTマウスと略す)。また、コントロールとして野生型マウスの骨髄を野生型マウスに移植したキメラマウスも作成した(WT $\rightarrow$ WTマウスと略す)。GRK5の発現を調べると、マクロファージなどの骨髄に由来する細胞のみがWT型のWT $\rightarrow$ K0マウスでは、梗塞領域および非梗塞領域とも発現はほとんど見られなかった。逆に、骨髄に由来する細胞のみがGRK5-K0型のK0 $\rightarrow$ WTマウスでは、WT $\rightarrow$ WTマウスとほとんど変わらなかった。したがって、心臓に発現しているGRK5のほとんどは、マクロファージなどの骨髄由来細胞ではなく、心筋細胞や線維芽細胞に由来していることが明らかになった。次に、心臓に浸潤してきたマクロファージと心線維芽細胞を単離し、GRK5の発現をWestern blotにて検討したところ、心線維芽細胞での発現が強く認められた。心筋梗塞後の炎症応答に心線維芽細胞も関与していることが示されていることから、心線維芽細胞においてGRK5によるNF- $\kappa$ Bを介した炎症応答が重要な役割を果たしていることが示唆された。そこで、野生型およびGRK5-K0マウスより心線維芽細胞を単離し、炎症性サイトカインTNF- $\alpha$ で刺激した後のp65のリン酸化を測定した。野生型マウスより調製した心線維芽細胞ではTNF- $\alpha$ の刺激によりp65のリン酸化が上昇したのに対し、GRK5-K0マウスより単離した心線維芽細胞では活性化は認められなかった。心筋梗塞処置後の組織切片にてリン酸化p65(phospho-p65)の免疫染色を行うと、GRK5-K0マウスの心臓切片ではphospho-p65の量は低下していた。phospho-p65とCD68(マクロファージなどのマーカー分子)あるいは $\alpha$ -SMA(心線維芽細胞のマーカー分子)との共染色を行うと、全てとはいかないものの $\alpha$ -SMAとphospho-p65との染色は一致した。心線維芽細胞でGRK5を介してNF- $\kappa$ Bの活性化が起きていることを示唆している。これらの結果は、心線維芽細胞でのGRK5を介した炎症応答が初期の炎症に続く線維化に重要なこと、炎症応答が正常に起きないと炎症に続いて起こる線維化の過程が抑制されることを示している。

#### 4. 考察 まとめ

本研究により、GRK5は心線維芽細胞での炎症応答を仲介しており、正常な炎症応答が進行しないと、続いて起こる線維化が正常に誘導されずに心破裂が生じると考えられる。しかしながら、過剰な炎症応答はそれのみで心筋梗塞後の生存率の低下を引き起こすことから、過剰な炎症応答も心筋梗塞処置後の心臓には良くないことが考えられる。今後は、心筋梗塞時にどのようなシグナルがGRK5の活性化を引き起こすのか、またGRK5がNF- $\kappa$ Bを活性化するメカニズムについて(IKKを介した作用か直接作用か)、さらにマクロファージの炎症応答におけるGRK5の役割についてなどを明らかにする必要がある。

#### 5. 参考文献

1. Fraccarollo D, Paolo Galuppo P, and Bauersachs J. *cardiovasc Res* 94, 293-303 (2012)
2. Belmonte SL, and Blaxall BC. *Circ Res* 109, 309-319 (2011)
3. Patial S, Luo J, Porter KJ, Benovic JL, and Parameswaran N. *BNiochem J* 425, 169-178 (2009)