

京都大学	博士 (医学)	氏名	水野 礼
論文題目	In vivo imaging reveals PKA regulation of ERK activity during neutrophil recruitment to inflamed intestines (炎症腸管へ浸潤する好中球内での PKA および ERK 活性の生体内 FRET イメージング)		
(論文内容の要旨)			
<p><b>【背景】</b> 組織で炎症が起こると、ロイコトリエン B4 (LTB4)、インターロイキン-8 (IL-8)、formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP) などの走化性因子が放出される。血中を循環している好中球は、走化性因子の濃度勾配を感知して、回転、接着、クローリング、血管外遊走という過程を経て間質内に侵入し、炎症部位へ向けて遊走する。このような好中球誘導を制御する分子メカニズムの研究は、これまで数多くなされてきたが、その殆どが試験管内で行われたもので、単一もしくは、せいぜい数個程度の走化因子の影響を検討しているに過ぎない。しかし、生体内においては、好中球リクルートの促進性、抑制性の多数のシグナルが混在し、それらがどのように、好中球に対して、協調的に、または、拮抗的に作用するのかという点に関して多くを知られていない。そこで本研究は、多様なシグナルが存在する生体内において、好中球リクルートの制御メカニズムの解明を目的とした。今回は、好中球リクルートを含む様々な生物学的現象で中心的役割を果たす Extracellular Signal-regulated Kinase (ERK) と Protein Kinase A (PKA) という2つのシグナル伝達分子の生体内での活性に注目した。</p> <p><b>【方法】</b> 生体内での好中球リクルートにおける分子活性を可視化するために FRET (Förster resonance energy transfer) バイオセンサーを全身で発現するトランスジェニックマウス (ERK : Eisuke マウス、PKA : PKAchu マウス) の消化管を、二光子顕微鏡を用いて観察した。Lipopolysaccharide (LPS) および fMLP を腸管内に注入し炎症を惹起し、2時間後に炎症組織に誘導される好中球内での ERK と PKA 活性を観察した。</p> <p><b>【結果】</b> Eisuke マウスの解析から、好中球の ERK 活性は、Adhesion、特に Spreading の過程で急激に上昇し、クローリング、血管外遊走、間質内遊走の過程で高い ERK 活性を維持することが分かった。また、MEK 阻害剤 (PD0325901) を静注し ERK 活性を阻害すると、クローリング、血管外遊走、間質内遊走が阻害された。これらの結果より、ERK が好中球誘導における重要な制御因子であることが示唆された。</p> <p>一方、PKAchu マウスの解析から、好中球の PKA 活性は間質での遊走速度と逆相関関係を示すことが判明した。また、Eisuke マウスに dibutyryl cyclic AMP を静注し、PKA を活性化すると、好中球の ERK 活性が阻害され、間質遊走の抑制を認めた。この結果から、PKA は ERK に拮抗的に作用することにより、好中球リクルートを負に制御していることが示唆された。また、腸管炎症時に Flurbiprofen axetil や Indomethacin などの NSAIDs をマウスに投与すると、好中球の ERK 活性が上昇し、クローリング、血管外遊走、間質内遊走が活性化され、好中球リクルートが促進された。また、NSAIDs は好中球の PKA 活性を抑制した。この NSAIDs による好中球誘導は、NSAIDs 投与によって、炎症組織で Prostaglandin E2 (PGE2) の産生が抑制され、その結果、PGE2 の下流の E-prostanoid 4 (EP4) シグナルが抑制されることで、PKA の抑制、ERK の活性化が起こり、好中球誘導が促進されることによって起こることがわかった。</p> <p><b>【結論】</b> FRET バイオセンサー発現マウスの生体内観察法から、生体内で ERK が好中球</p>			

<p>リクルートの重要な Regulator であること、PKA が ERK に拮抗的に作用して好中球リクルートを負に制御すること、また、NSAIDs が PGE2/EP4/PKA シグナルを抑制することで、ERK および好中球リクルートが活性化されるということが分かった。本研究で用いた FRET バイオセンサー発現マウスと、2光子顕微鏡による生体内イメージングの手法を使用することで、より生理的な条件下での好中球動態、薬剤の好中球リクルートに及ぼす影響などの解明が可能になると考えられた。</p> <p>(論文審査の結果の要旨)</p> <p>グラム陰性菌感染による急性腸炎では、様々な化学伝達物質に反応し、好中球が血管内から炎症巣へ遊出する。好中球誘導に関わる細胞内シグナル伝達物質の活性変化は、これまで主に in vitro で解析されてきた。申請者は、FRET バイオセンサー発現トランスジェニックマウスと二光子顕微鏡を用いた生体内観察により、好中球誘導過程における ERK と PKA の活性化のタイミング、相互作用を解析した。好中球の血管内皮への接着の過程で ERK 活性は急激に上昇し、その後、高い活性状態を維持した。一方、PKA 活性は、間質の好中球遊走能と逆相関関係を示した。dbcAMP を静注し PKA を活性化すると、好中球の ERK 活性は低下し遊走も抑制された。</p> <p>次に、抗炎症剤の好中球遊走への影響を調べた。NSAIDs 投与により、好中球の PKA 活性は抑制され、ERK および遊走能は活性化された。EP4 作動薬は、PKA を活性化し、NSAIDs による ERK 活性および遊走能の亢進を抑制した。</p> <p>つまり、ERK 活性は好中球の遊走能と正の相関を示し、PKA は ERK に拮抗的に作用することで好中球遊走を抑制することが分かった。また、NSAIDs は PGE<sub>2</sub>/EP4/PKA シグナルを抑制することで、ERK および好中球遊走を活性化することが示唆された。</p> <p>以上の研究は、急性腸炎時の好中球誘導制御における ERK と PKA の関係性の解明に貢献し、より生理的な環境である生体内における好中球誘導メカニズムの理解に寄与するところが多い。</p> <p>したがって、本論文は博士 (医学) の学位論文として価値あるものと認める。</p> <p>なお、本学位授与申請者は、平成26年6月9日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。</p>
--

要旨公開可能日： 年 月 日以降