The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	血管内皮細胞特異的受容体Robo4の炎症における役割の解明
Author(s)	白倉, 圭佑
Citation	大阪大学, 2018, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/69517
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　　白倉　圭佑　　）	
論文題名	血管内皮細胞特異的受容体Robo4の炎症における役割の解明

論文内容の要旨

Roundabout4（Robo4）は血管内皮細胞特異的に発現する一回膜貫通型受容体である。これまでにRobo4は虚血部位や腫瘍などの病的環境で、血管内皮細胞増殖因子（VEGF）が誘導する病的血管新生や血管透過性亢進を抑制する機能を持つことが報告されている。近年、Robo4は炎症時の血管透過性亢進をも抑制する可能性が報告され、Robo4は炎症性疾患の治療標的となる可能性が期待されている。しかし、Robo4の炎症における機能については不明な点が多い。本研究では、Robo4の炎症における役割の解明を目指して、Robo4が炎症時のサイトカイン産生や血管透過性を制御するかについて解析を行った。

まず、Robo4の炎症時のサイトカイン産生への寄与を解析した。Robo4が病原体排除や創傷治癒に重要な炎症性サイトカインIL-6の産生に与える影響を解析した。グラム陰性菌外膜成分LPSの皮下投与により炎症を誘導するモデルにおいて、Robo4ノックアウトマウスは、野生型マウスと比べIL-6産生量が低下していた。Robo4が血管内皮細胞（以下、内皮細胞）からのIL-6産生に与える影響を解析するため、ヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC）にsiRNAを導入しRobo4のノックダウン実験を行った。その結果、Robo4のノックダウンは、LPSや炎症性サイトカインであるTNFα、IL-1βが誘導するIL-6産生を抑制した。さらに、Robo4が免疫細胞からのIL-6産生に与える影響を解析するため、HUVECと単球様細胞株（U937細胞）の共培養実験を行った。その結果、U937細胞とLPSで刺激したHUVECとの接着時に強力なIL-6産生が誘導され、Robo4のノックダウンはこのIL-6産生を抑制した。以上より、Robo4は炎症時に内皮細胞と免疫細胞からのIL-6産生を促進することが明らかになった。

Robo4が免疫細胞のIL-6産生を制御するメカニズムとして、Robo4が内皮細胞により産生され、単球に作用するサイトカインの発現を制御する可能性を考え、Granulocyte Macrophage colony-stimulating Factor（GM-CSF）に着目した。GM-CSFが共培養系のIL-6産生を制御するかを解析するため、GM-CSFの中和、添加実験を行った。その結果、GM-CSFは共培養系において単球に作用し、単球のIL-6産生を誘導した。次に、Robo4が内皮細胞からのGM-CSF産生に与える影響を解析したところ、Robo4のノックダウンはIL-1βが誘導するHUVECからのGM-CSF産生を抑制した。そこで共培養系において内皮細胞でのIL-1βシグナルがIL-6産生を誘導するか明らかにするため、IL-1 receptor agonist（IL-1Ra）を用いた解析を行った。その結果、HUVECへのIL-1Ra処理は共培養系で誘導されるIL-6産生を抑制した。また、共培養系においてIL-1βを産生する細胞を同定するため、内皮細胞と単球のそれぞれをGM-CSFで刺激したところ、IL-1βは単球から産生されることが明らかになった。以上の結果より、炎症時に内皮細胞と単球がIL-6を増幅するメカニズムの存在が明らかになった。すなわち、内皮細胞と単球の共培養系において、炎症性刺激により内皮細胞が活性化されると内皮細胞はGM-CSFとIL-6を産生し、GM-CSFは単球からのIL-6とIL-1β産生を誘導する。さらにIL-1βが再び内皮細胞に作用することで、内皮細胞と単球の間でIL-6産生を増幅する。Robo4は内皮細胞からのGM-CSF産生を促進し、その結果単球からのIL-6増幅産生を促進する。したがってRobo4は炎症時に内皮細胞と免疫細胞間でのIL-6増幅機構を促進する役割を担うことが明らかになった。

次にRobo4が炎症時の血管透過性制御に与える影響を解析した。LPSの腹腔内投与による全身性炎症モデルにおいて、Robo4ノックアウトマウスは野生型マウスと比べ生存率が低下し、肺、心臓、小腸での血管透過性が亢進していた。さらに、HUVECを用いたRobo4のノックダウン及び強制発現実験から、Robo4はTNFαが誘導するVE-Cadherinの細胞内取込み抑制を介し、血管透過性亢進を抑制することを見出した。また、Robo4のC末端及びN末端領域欠損変異体を用いた検討より、Robo4のC末端領域が血管透過性抑制に寄与することが明らかになった。Robo4が血管透過性を制御する詳細なメカニズムを明らかにするため、内皮細胞におけるRobo4の相互作用因子の同定を試みた。FLAGタグを付加したRobo4を発現させたHUVECを用いた免疫沈降実験と質量分析により、Robo4のC末端領域に結

合する新規タンパク質としてTRAFファミリーに属するTRAF7を同定した。内皮細胞におけるRobo4とTRAF7の細胞内局在を免疫染色法で解析したところ、Robo4はTRAF7の発現に関わらず核近傍の細胞質領域に局在した。一方で、TRAF7は単独発現の場合には細胞膜の近傍に局在したが、Robo4と共発現した場合、TRAF7は核近傍の細胞質領域でRobo4と共局在した。本結果より、Robo4はTRAF7の細胞内局在を制御することが明らかになった。さらに、TRAF7のノックダウン及び強制発現実験より、TRAF7はRobo4と同様に血管透過性亢進を抑制することが明らかになった。一方、TRAF7ノックダウン下でRobo4を強制発現すると、Robo4の血管透過性抑制効果が見られなかった。以上の結果より、Robo4は、TRAF7と相互作用し、TRAF7機能を介して血管透過性を抑制することが示された。

本論文において著者は、炎症におけるRobo4の生理的機能の解明を目指した検討を行い、Robo4が炎症下のサイトカイン産生と血管透過性亢進を制御することを見出した。本知見から、Robo4は炎症部位においてサイトカイン産生を介する免疫系活性化の促進や、透過性低下作用による血管の安定化に寄与することが示された。

様式７

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　白倉　圭佑　）		
論文審査担当者	（職）	氏　名
主 査	教授	土井　健史
副 査	教授	八木　清仁
副 査	教授	藤尾　慈

論文審査の結果の要旨

白倉君は、血管内皮細胞特異的に発現するRoundbout4（Robo4）の炎症における生理的役割の解明を目指して、Robo4が炎症時のサイトカイン産生と血管透過性制御に与える影響について解析を行った。その結果、Robo4が炎症性サイトカイン産生を促進し、血管透過性を抑制する機構を明らかにした。

まず、Robo4は炎症時に、病原体排除や創傷治癒に重要な炎症性サイトカインIL-6 の産生を促進することを見出した。その機構として、Robo4は血管内皮細胞からのGM-CSF産生を促進することにより、血管内皮細胞と単球の両細胞からのIL-6産生を促進することが明らかになった。以上の結果より、Robo4は血管内皮細胞と単球間でのIL-6増幅機構を促進する機能を持ち、Robo4が血管内皮細胞による免疫細胞活性化機構の役割を担うことを見出した。

次に、Robo4は炎症時において血管透過性を抑制することを明らかにした。その機構として、Robo4はC末端領域を介して炎症時のVE-Cadherin細胞内取込みを抑制すること、またRobo4のC末端領域には新規血管透過性抑制因子TRAF7が相互作用することを見出した。以上の結果より、Robo4はTRAF7の機能制御を介し、炎症時の血管透過性を抑制する役割を担うことが明らかになった。

以上より、本研究はRobo4による血管内皮細胞の新たな炎症応答制御機構の解明に至り、得られた知見は血管炎症を伴う疾病の治療法開発に貢献することが期待されることにより、博士（薬科学）の学位論文に値するものと認める。