



Title	血管透過性抑制分子Robo4の発現制御機構の解明と重症感染症治療への応用
Author(s)	森田, 真綾
Citation	大阪大学, 2024, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/96139
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏 名 (森 田 真 綾)

論文題名 血管透過性抑制分子Robo4の発現制御機構の解明と重症感染症治療への応用

論文内容の要旨

感染症の病態は、病原体への暴露、免疫細胞の活性化、炎症性サイトカインの産生、血管透過性亢進の誘導などの過程を経て進行する。血管透過性の亢進は、血管を構成する内皮細胞同士の接着が解離することで生じ、免疫細胞を血管外に遊走させることで病原体の排除を促進する。一方で、過剰な血管透過性亢進は、循環不全や臓器障害などの致死性病態を誘導する。これまでの感染症治療薬は、病原体や免疫細胞を標的としており、血管透過性を直接的に抑制することができない。そこで著者らは、重症感染症に対して、血管透過性を抑制する新規薬の開発を目指した。

本研究では、血管内皮細胞に特異的に発現するタンパク質Roundabout4 (Robo4)に着目した。これまでに、Robo4は接着結合分子VE-cadherinの解離を抑制して血管透過性亢進を抑制すること、Robo4ノックアウト (KO) マウスでは感染症病態が悪化することが示されている。そこで著者らは、Robo4発現を増やすことで、血管透過性や感染症病態を抑制できると考えた。本研究では、Robo4発現の促進により血管透過性を抑制する新規感染症治療薬の開発を目指し、Robo4発現促進が重症感染症の病態に与える影響の解析、およびRobo4発現促進薬の探索とその活性評価に取り組んだ。

まず、Robo4発現量の増加が感染症病態に与える影響を解析した。タモキシフェン投与により血管内皮細胞特異的にRobo4を過剰発現するRobo4^{ieC}マウスを作製し、リポ多糖 (LPS) 投与により過剰な炎症を誘導したところ、Robo4過剰発現が肺の血管透過性を抑制し、生存率を増加させることが示された。

次に、Robo4発現促進薬の開発に向け、Robo4の発現を制御するシグナル伝達系を探索した。ヒトRobo4プロモーターにルシフェラーゼ遺伝子を連結させた配列を導入したマウス脾臓由来内皮細胞株 (MS1細胞) を用いた化合物スクリーニングにより、Robo4プロモーター活性を変化させる分子を選出した。選出した化合物をヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) に処理した結果、Robo4発現抑制分子として、activin receptor-like kinase 5 (ALK5) の阻害剤であるSB525334が同定された。

ALK5はtransforming growth factor- β (TGF- β) をリガンドとする受容体型キナーゼであり、転写因子SMAD2/3を活性化する。siRNAによるSMAD2/3のノックダウンはHUVECのRobo4発現量を減少させ、TGF- β 1/2処理は、通常の単層培養ではなくマトリゲル上で培養したHUVECにおけるRobo4の発現量を特異的に増加させた。これらの結果から、HUVECではTGF- β -ALK5-SMAD2/3シグナルがRobo4発現を促進すること、通常培養条件下のこのシグナルが活性化していることが示された。

さらにマトリゲル培養による遺伝子発現の変化を解析したところ、Robo4発現やALK5-SMAD2/3シグナルにより誘導されるPAI-1発現の減少と、ALK1-SMAD1/5シグナルにより誘導されるID-1 発現の増加が確認された。そこで、ALK1-SMAD1/5シグナルのRobo4発現への影響を検証した。ALK1のリガンドであるbone morphogenetic protein (BMP9)の添加によりHUVECのRobo4発現が減少し、この減少はsiRNAによるSMAD1/5のノックダウンやALK1阻害剤K02288の処理によって阻害された。また、K02288の単独処理は、マトリゲル培養条件下のHUVECのRobo4発現を増加させた。これらの結果から、BMP9-ALK1-SMAD1/5シグナルはRobo4発現を抑制することが示され、K02288がRobo4発現促進薬として機能する可能性が見出された。

ALK1阻害剤K02288がマウスに与える影響を解析した。K02288を野生型マウスに静脈内投与したところ、ALK1発現量の多い肺でRobo4発現量が増加した。また、K02288を投与した野生型マウスにLPSを投与したところ、K02288により肺の血管透過性が低下し、生存率が増加した。Robo4 KOマウスを用いて同様の解析を行ったところ、K02288による血管透過性の低下と生存率の増加は見られなかった。これらの結果から、K02288はRobo4発現の促進を介して、LPS投与マウスの病態を抑制することが示唆された。

最後に、K02288が新型コロナウイルス感染症に与える影響を解析した。解析には、気道上皮細胞を含む気道チャ

ネルと肺微小血管内皮細胞を含む血管チャネルから成る呼吸器チップ（Airway-on-a-chip）を用いた。上皮細胞に SARS-CoV-2 を感染させ、血管チャネルに K02288 を加えて培養したところ、気道チャネルから血管チャネルに移行するウイルス量が K02288 によって減少した。また、この時の内皮細胞では、接着結合分子 VE-cadherin の SARS-CoV-2 による解離が K02288 によって抑制されていた。さらに、K02288 の投与は、SARS-CoV-2 感染マウスの生存率を増加させ、肺障害を抑制した。これらの結果から K02288 は SARS-CoV-2 が誘導する血管透過性の過剰な亢進を抑制し、致死病的病態を抑制することが示された。

以上の結果より、Robo4 の発現を促進し血管透過性を抑制する戦略で、重症感染症の死亡率を低減できることが示された。また、Robo4 発現は TGF β -ALK5-SMAD2/3 シグナルおよび BMP9-ALK1-SMAD1/5 シグナルによって正と負に制御されることが明らかとなった。さらに、ALK1 阻害剤は、Robo4 発現促進薬として機能し、重症感染症の血管透過性亢進と死亡率を抑制することが示された。本研究から、血管透過性を抑制する Robo4 の発現促進薬が、感染症の新規治療薬となる可能性が示された。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (森 田 真 綾)			
	(職)	氏 名	
論文審査担当者	主 査	教授	藤尾 慈
	副 査	准教授	岡田 欣晃
	副 査	教授	辻川 和丈
	副 査	特任教授 (常勤)	吉岡 靖雄

論文審査の結果の要旨

感染症の病態は、病原体への暴露、免疫細胞の活性化、炎症性サイトカインの産生、血管透過性亢進の誘導などの過程を経て進行する。血管透過性の亢進は、血管を構成する内皮細胞同士の接着が解離することで生じ、免疫細胞を血管外に遊走させることで病原体の排除を促進する。一方で、過剰な血管透過性亢進は、臓器障害などの致死病的病態を誘導する。しかし、これまでの感染症治療薬は、病原体や免疫細胞を標的とし、血管透過性を直接的に抑制することができなかった。そこで学位申請者は、血管透過性を抑制する新機序で作用する重症感染症治療薬の開発を目指し研究を行った。

具体的には、血管内皮細胞に特異的に発現し、血管透過性亢進を抑制する機能を持つタンパク質Roundabout4 (Robo4)に着目し、その発現を増やすことで血管透過性や感染症病態を抑制できるかを解析した。まず、血管内皮細胞特異的にRobo4の過剰発現を誘導できるマウスを作製し、Robo4の過剰発現が敗血症モデルマウス (LPS投与マウス) の肺血管透過性を抑制し、生存率を増加させることを示した。

次に、Robo4発現を促進する薬の開発に向け、Robo4の発現を制御するシグナル伝達系を探索した。ヒトRobo4プロモーターの活性を変化させる化合物のスクリーニングにより、Robo4の発現を減少させる化合物としてactivin receptor-like kinase 5 (ALK5) 阻害剤 (SB525334) を同定した。ALK5阻害剤の作用メカニズムの解析から、ALK5のリガンドであるtransforming growth factor- β (TGF- β) -ALK5-SMAD2/3シグナルがRobo4発現を促進することを示した。さらにこのシグナル伝達系と競合的に作用するシグナル伝達系として知られている、bone morphogenetic protein (BMP9)-ALK1-SMAD1/5シグナルがRobo4発現を抑制すること、またALK1阻害剤 (K02288) がRobo4発現促進薬となる可能性を見出した。

ALK1阻害剤をマウスに投与する実験から、ALK1阻害剤が、肺のRobo4発現を増加させること、敗血症 (LPS投与) マウスの肺の血管透過性と死亡率を低下させることが示された。Robo4 K0マウスを用いた同様の解析から、このALK1阻害剤の効果がRobo4発現依存的であることを示した。さらに、ALK1阻害剤が新型コロナウイルス感染モデルに与える影響を解析した。その結果、ALK1阻害剤が呼吸器環境を模した臓器チップにおけるSARS-CoV-2誘導性の血管内皮バリアの破綻を抑制すること、またSARS-CoV-2感染マウスの肺障害と死亡率を抑制することが示された。これらの結果からALK1阻害剤は、重症感染症における血管透過性と致死病的病態を抑制することを明らかにした。

以上、学位申請者は、Robo4を標的とし血管透過性を抑制する新しい戦略で、重症感染症の病態を抑制できること、また、Robo4発現を制御するシグナル伝達系を明らかにし、その知見からRobo4発現促進薬を同定したこと、さらにRobo4促進薬が血管透過性と重症感染症致病的病態を抑制することを明らかにし、「血管透過性を標的とする新たな重症感染症の治療薬を提唱した」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。