



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

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

大阪大学大学院 薬学研究科 創成薬学専攻

臨床薬効解析学分野

森田 真綾

目次

序論.....	3
本論.....	5
Robo4 過剰発現がマウス LPS 投与モデルに与える影響の解析.....	5
化合物スクリーニングによる Robo4 発現を制御するシグナル伝達系の探索.....	5
TGF- β シグナルが Robo4 発現に与える影響.....	7
BMP9-ALK1-SMAD1/5 シグナルが Robo4 発現に与える影響.....	9
ALK1 阻害剤がマウス病態モデルに与える影響.....	10
考察.....	14
結論.....	17
実験項目.....	18
謝辞.....	24
参考文献.....	25

序論

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といった過程によって進行する。最初の3つの過程は、抗菌・抗ウイルス薬、ステロイド、サイトカインとその受容体に対する抗体など、有効な既存薬によって制御することができる。一方で、血管透過性亢進を直接抑制する薬剤は開発されていない。血管透過性亢進は、生理的条件下では免疫細胞の血管外遊走を促進し、病原体の排除に寄与する。しかし、重症感染症や敗血症において生じる過剰な血管透過性亢進は、多臓器に重篤な血管漏出や浮腫を引き起こし、急性呼吸窮迫症候群 (ARDS) のような致命的な病態を引き起こす。

血管透過性は、血管内腔を覆う内皮細胞同士の接着結合や密着結合などの細胞間結合によって制御される。接着結合は cadherin と nectin により、また密着結合は occludin、claudin、junctional adhesion molecule により制御されている¹⁻³。これらの膜貫通タンパク質のうち、vascular endothelial cadherin (VE-cadherin) は、血管内皮細胞に特異的に発現し、透過性制御に重要な役割を果たしている。VE-cadherin による接着結合は、vascular endothelial growth factor (VEGF) や tumor necrosis factor- α (TNF- α) を含む炎症性サイトカインによって解離する⁴⁻⁶。VEGF と TNF- α は、重症感染症において致命的な臓器障害を引き起こすことが知られ、これらの因子の中和は、内毒素血症や敗血症のマウスモデルの血管透過性と死亡率を低下させる^{1,7-9}。したがって、VE-cadherin による接着結合を安定化する分子は、重症感染症の病態を抑制する新規治療薬となる可能性が考えられる。

接着結合を安定化させる有望な標的のひとつに、Roundabout4 (Robo4) がある。Robo4 は血管内皮細胞に特異的に発現し、血管系を安定化させる^{10,11}。Robo4 は、血管透過性亢進を抑制することにより、マウスの感染症モデルや内毒素血症モデルの生存率を向上させ^{12,13}、腫瘍の転移を抑制することが知られている^{14,15}。Robo4 は Slit2、Unc5B、TRAF7 などの相互作用タンパク質を介した複数のメカニズムにより、VEGF や TNF- α が誘導する内皮の透過性亢進を抑制する^{12,16,17}。以前の報告では、内皮細胞における Robo4 発現の抑制または促進が、それぞれ TNF α 誘導性の内皮透過性亢進を増強または減弱させることが示され、Robo4 発現レベルの制御によって血管透過性を制御できることが示唆されている¹²。さらに、Robo4 発現を低下させる histone deacetylase (HDAC) 阻害剤 MS-275 は、マウス肺の血管透過性と腫瘍転移を亢進させることから、Robo4 発現を制御する低分子により血管透過性と疾患を制御できることが示された¹⁴。これらの情報から、Robo4 発現促進は、血管透過性の抑制を介して重症感染症や敗血症の病態を緩和させる、新しい治療戦略となる可能性が考えられる。また、Robo4 の発現を増強する低分子は、これらの疾患に対する治療薬になり得ると考えられる。

本研究では、まず、Robo4 発現促進による重症感染症治療の有効性を評価するために、血管内皮細胞特異的 Robo4 過剰発現マウスを作製し、重症感染症病態に対する Robo4 発現増強の効果を検討した。次に、新規 Robo4 発現促進分子を同定するために、Robo4 発現を制御するシグナル伝達経路を探索した。最後に、Robo4 発現を促進する低分子化合物が重症感染症病態に与える影響を解析したので、その結果を順に報告する。

本論

Robo4 過剰発現がマウス LPS 投与モデルに与える影響の解析

著者らはこれまでに、マウスにおける Robo4 ノックアウトが、LPS 誘発血管透過性と死亡率を増加させ、実験的転移モデルにおける肺コロニー数を増加させることを証明した^{12, 14}。Robo4 過剰発現がこれらの病態モデルに与える影響を調べるため、血管内皮細胞特異的に Robo4 過剰発現を誘導できるマウス (Robo4^{iEC} マウス) を作製した (Fig. 1A)。Robo4^{iEC} マウスにタモキシフェンを投与すると、複数の臓器で Robo4 発現量が増加し (Fig. 1B)、タモキシフェン依存的に Robo4 過剰発現を誘導できたことが示された。次に、Robo4 過剰発現が肺の血管透過性に及ぼす影響を、LPS 投与モデルとメラノーマ細胞転移モデルを用いて調べた。LPS を投与し炎症を誘導したモデルでは、Control (CDH5-Cre/ERT2) マウスと比較して Robo4^{iEC} マウスの肺におけるエバンスブルーの血管外漏出が減少した (Fig. 1C)。静脈内投与した B16-F10 メラノーマ細胞の血管から肺への浸潤も、Robo4^{iEC} マウスでは減少した (Fig. 1D)。これらの結果から、Robo4 過剰発現が肺の血管透過性を抑制することが示された。さらに、LPS を投与した Robo4^{iEC} マウスは、Control マウスと比較して生存率が改善した (Fig. 1E)。これらの結果は、Robo4 発現量の増加が、重症感染症で誘導される全身性炎症時の血管透過性と死亡率を抑制することを示している。

化合物スクリーニングによる Robo4 発現を制御するシグナル伝達系の探索

Robo4 の発現を制御するシグナル伝達経路を調べるため、マウス内皮細胞株 MS1 細胞を用いた薬剤スクリーニング系を確立した。MS1 細胞のゲノムにヒト Robo4 と SV-40 のプロモーターおよびルシフェラーゼを含む配列を安定導入し、MS1-Robo4 細胞と MS1-SV40 細胞を作製した (Fig. 2A)。これらの細胞株を用いて、Robo4 プロモーターの活性を制御するが、コントロールの SV-40 プロモーターの活性は制御しない小分子を同定するスクリーニング系を確立した。Robo4 抑制因子として知られる HDAC 阻害剤 (Trichostatin A (TSA)) と NF-κB 阻害剤 (ammonium pyrrolidine dithiocarbamate (APDC)) は、MS1-SV40 の活性は抑制せず MS1-Robo4 のルシフェラーゼ活性を抑制した (Fig. 2B)。このシステムを用いて、LoPac ライブラリーに含まれる 1,280 種類の低分子をスクリーニングし (Fig. 2C)、Robo4 プロモーター活性を低下させる可能性のある候補を 7 種類同定した。このうち、IPA-3 (PAK-1 阻害剤)、GR127935 (5-HT1B/1D アンタゴニスト)、SB-525334 (ALK5 阻害剤) の 3 分子は、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) における内在性 Robo4 の発現を低下させた (Fig. 2D)。これらの結果から、PAK-1、5-HT1B/1D、ALK5 に関するシグナル伝達経路が Robo4 発現の潜在的な制御因子であることが示された。これらのうち、内皮透過性との関連が示されている transforming growth factor-β (TGF-β) -SMAD シグナルを制御する ALK5 に注目した¹⁸。

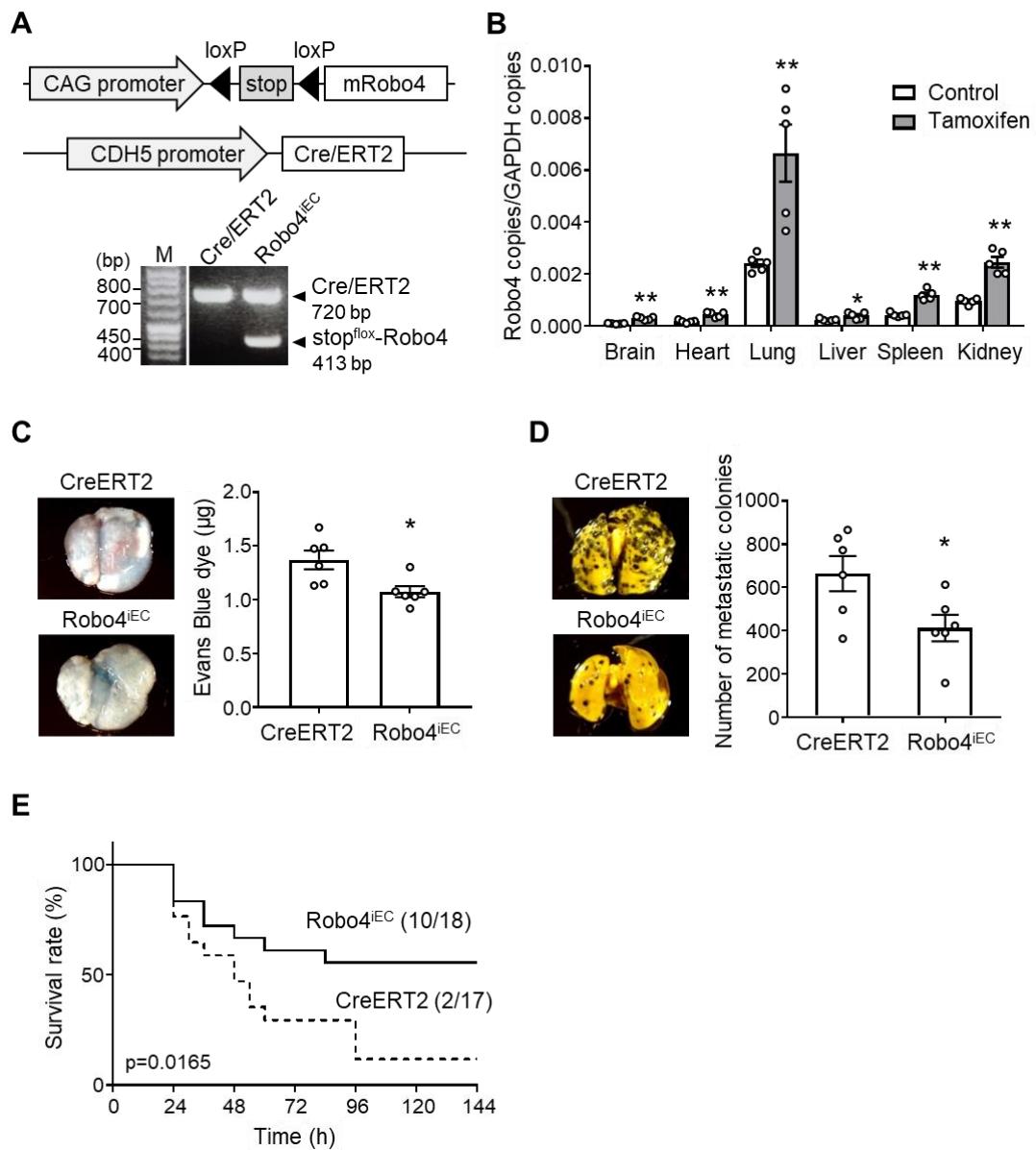


Figure 1. Endothelial-specific Robo4 overexpression suppresses LPS-induced mortality and melanoma cell migration in mice. (A) Transgenes and genotyping results of Robo4^{iEC} mice. CDH5 promoter induces endothelial-specific expression of Cre/ERT2. Tamoxifen activates Cre/ERT2 and induces deletion of the floxed Stop codon and CAG promoter-driven mRobo4 overexpression. (B) Expression level of Robo4 mRNA in the organs of Robo4^{iEC} mice treated with tamoxifen ($n = 5$, $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ by the unpaired t test) (C) Vascular permeability in the lungs in the Robo4^{iEC} and control (CDH5-Cre/ERT2) mice. ($n = 6$, $^*P < 0.05$ by the unpaired t test) (D) Experimental metastasis models using Robo4^{iEC} and control mice treated with tamoxifen. B16-F10 melanoma cells were intravenously injected, and metastasized colonies were counted ($n = 6$, $^*P < 0.05$ by the unpaired t test). (E) Survival study using LPS-injection models in Robo4^{iEC} and control mice treated with tamoxifen (control: $n = 18$, Robo4^{iEC}: $n = 17$; $P = 0.017$ by the log-rank test) Data are expressed as the mean \pm SEM.

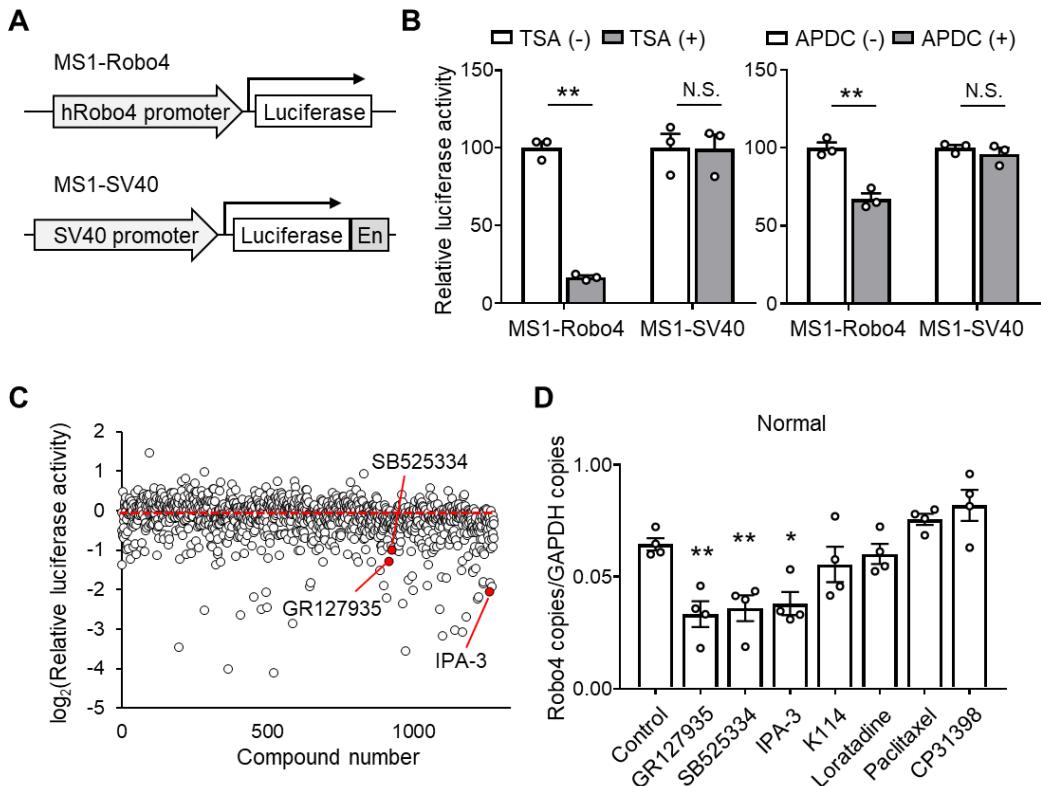


Figure 2. Screening for small molecules regulating Robo4 expression in ECs. (A) Two MS1 cell lines used for screening. Mouse EC line (MS1) cells were stably transfected with luciferase gene driven by human Robo4 promoter or SV-40 promoter with enhancer (En). (B) Effect of known Robo4 suppressor on luciferase activity in cell lines. Inhibitors for histone deacetylase (TSA) and NF- κ B (APDC) specifically suppressed luciferase activity in MS1-Robo4 ($n = 4$, ** $P < 0.01$ by the unpaired t test). (C) Screening results for LoPac library using cell lines. Data expressed as relative promoter activity (Robo4 promoter activity/SV40 promoter activity). (D) Robo4 expression levels in HUVECs treated with candidates from the screening ($n = 4$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ by Dunnett's test). Data are expressed as the mean \pm SEM.

TGF- β シグナルが Robo4 発現に与える影響

ALK5 は TGF- β 受容体であり、その下流の SMAD2/3 を活性化することが知られている。SMAD2/3 による Robo4 発現制御機構を調べるために、HUVEC に SMAD2/3 に対する Small Interfering RNA (siRNA) を導入し、SMAD2/3 をノックダウンしたところ、Robo4 の発現が減少した (Fig. 3A)。この結果から、TGF- β -ALK5-SMAD2/3 経路が Robo4 の発現を制御すること、また TGF- β 刺激のない培養条件 (通常培養) でも、この経路が恒常的に活性化されていることが示唆された。これと一致して、TGF- β 1/2 処理は HUVEC における Robo4 発現を変化させなかった (Fig. 3B)。そこで、内在的な TGF- β -ALK5-SMAD2/3 シグナルが抑制される培養条件を検討し、マトリゲル培養条件を見出した

(Fig. 3C)。この条件では、TGF- β -ALK5-SMAD2/3 シグナルによって誘導される plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1)^{19,20} の発現が抑制された (Fig. 3D)。また、Robo4 の発現も通常培養と比較して抑制され (Fig. 3D)、TGF- β 1/2 处理により Robo4 の発現が増加した (Fig. 3B)。これらの結果から、TGF- β -ALK5-SMAD2/3 シグナルが Robo4 の発現を促進することが示された (Fig. 4E)。

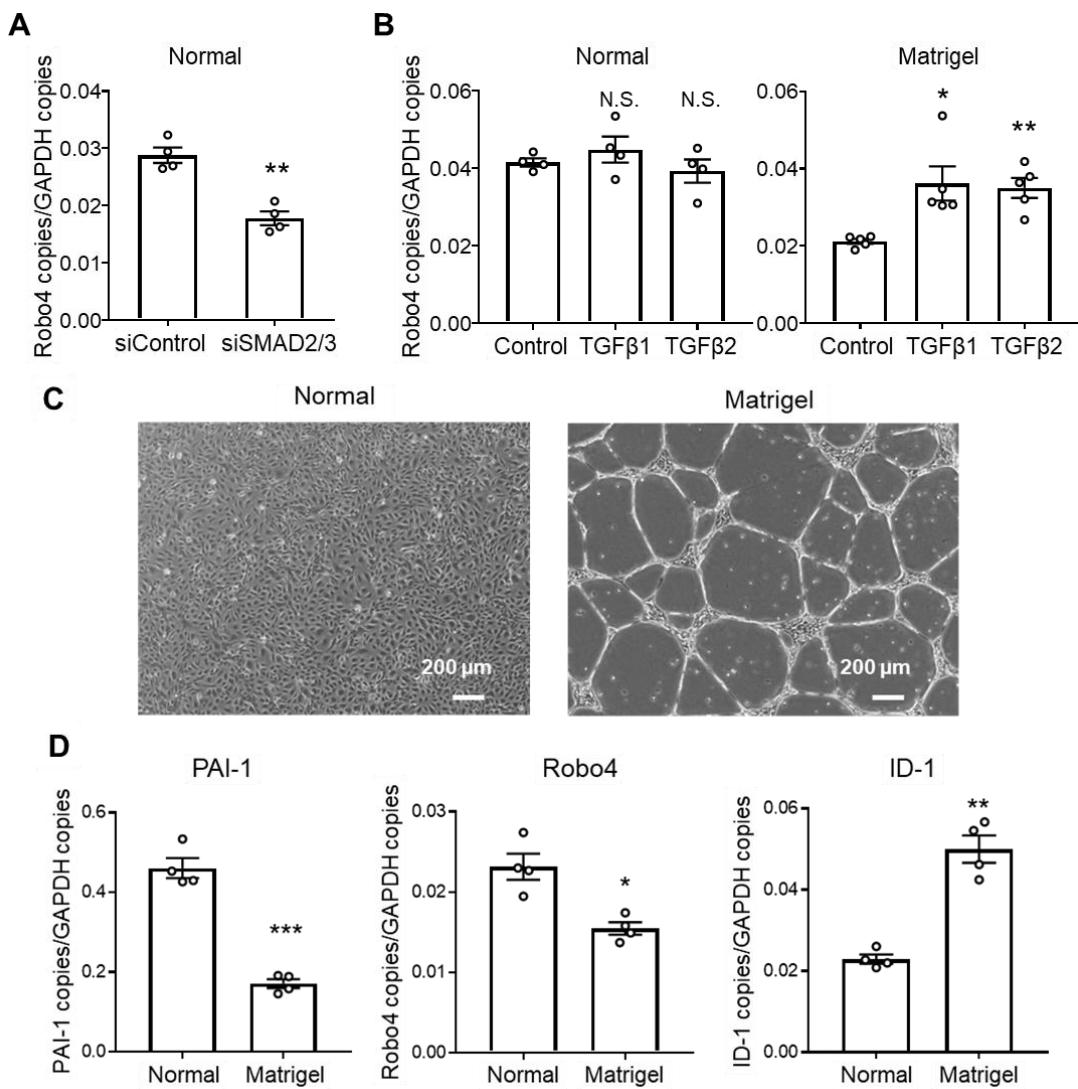


Figure 3. TGF- β Activates Robo4 Expression in a Culture Condition-Dependent Manner.
(A) Robo4 expression levels in HUVECs treated with siRNA for SMAD2 and SMAD3 (n = 4, **P < 0.01 by the unpaired t test). **(B)** Robo4 expression level in TGF- β 1/2-treated HUVECs under normal (n = 4, *P < 0.05, **P < 0.01 by Dunnett's test). **(C)** HUVECs cultured in the presence or absence of Matrigel. Pictures are representative images of HUVECs cultured in normal or Matrigel conditions. Scale bar = 200 μ m. **(D)** Effect of Matrigel culture on PAI-1, Robo4, and ID-1 expression. HUVECs were cultured in the presence or absence of Matrigel for 24 h, and PAI-1, ID-1, and Robo4 expression was measured by qPCR (n = 4, *p < 0.05, **p < 0.01, by the unpaired t-test). Data are expressed as the mean \pm SEM.

BMP9-ALK1-SMAD1/5 シグナルが Robo4 発現に与える影響

これまでの結果を踏まえ著者らは、ALK5 シグナルと競合的に働くことが報告されている ALK1 シグナル^{19,20}が、Robo4 発現を抑制する可能性を考えた。まず、ALK1 シグナルにより発現が促進される inhibitor of differentiation-1 (ID-1) の HUVEC における発現量を解析したところ、Robo4 発現が抑制されるマトリゲル培養によって増加した (Fig. 3D)。次に、ALK1-SMAD1/5 シグナルは bone morphogenetic protein 9 (BMP9) によって活性化されることから²¹、BMP9-ALK1-SMAD1/5 シグナルが Robo4 発現に与える影響を調べた。通常培養 HUVEC では、BMP9 处理により Robo4 の発現が抑制された (Fig. 4A)。BMP9 による Robo4 の抑制は、siRNA を用いた SMAD1/5 のノックダウン (Fig. 4B) や、ALK1 阻害剤である K02288 (Fig. 4C) によって阻害された。K02288 の単独処理は、通常培養 HUVEC において Robo4 発現を増加させなかつたが、マトリゲル培養では Robo4 発現量を増加させた (Fig. 4D)。これらの結果から、BMP9-ALK1-SMAD1/5 シグナルが Robo4 の発現を抑制すること (Fig. 4E)、また K02288 が Robo4 発現促進活性を持つ低分

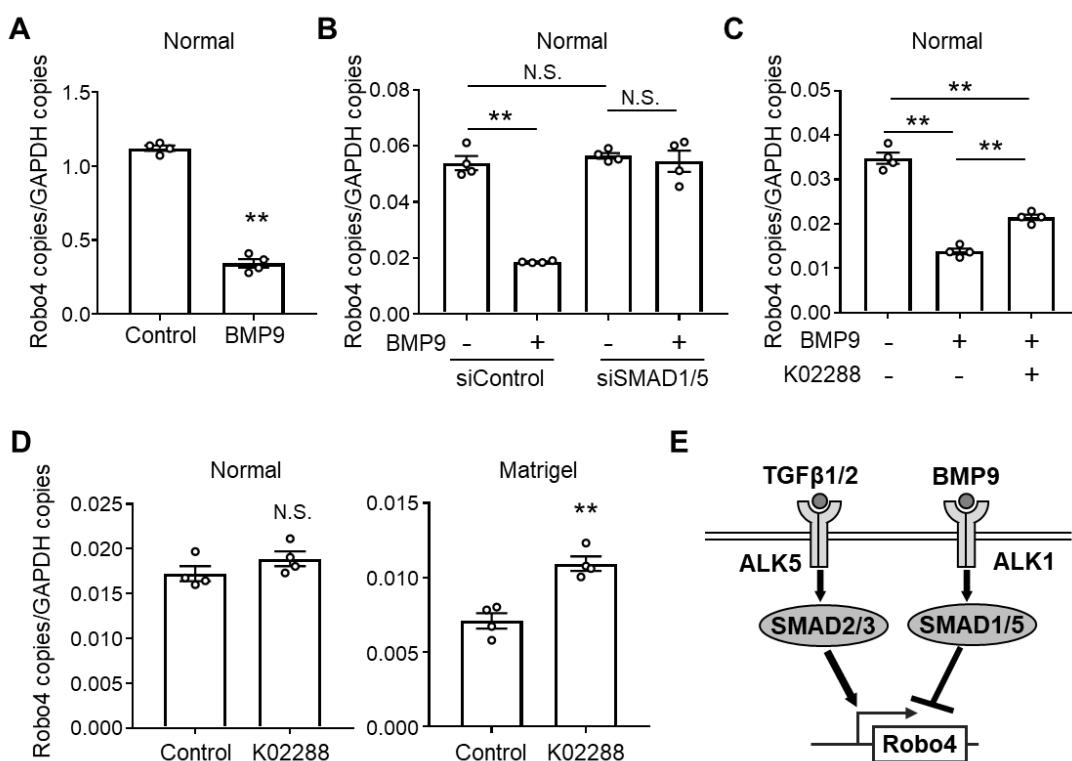


Figure 4. BMP9-ALK1-SMAD1/5 Signaling Suppresses Robo4 Expression. (A) Robo4 expression levels in HUVECs treated with BMP9 (n = 4, **P < 0.01 by the unpaired t test). (B) Robo4 expression levels in HUVECs treated with BMP9 and siRNA for SMAD1 and SMAD5 (n = 4, **P < 0.01; N.S., not significant by Tukey's test). (C) Robo4 expression levels in HUVECs treated with K02288 and BMP9 (n = 4, **P < 0.01 by Tukey's test). (D) Robo4 expression levels in HUVECs cultured in Matrigel containing K02288 (n = 4, **P < 0.01; N.S., not significant by the unpaired t test). (E) Schematic illustration of positive and negative Robo4 regulation by TGF-β-ALK5-SMAD2/3 and BMP9-ALK1-SMAD1/5 signaling pathways. Data are expressed as the mean ± SEM.

子である可能性が示された。

ALK1 阻害剤がマウス病態モデルに与える影響

K02288 がマウスの Robo4 発現を増加させるかを調べるため、まずマウスの臓器における ALK1 の発現レベルと発現パターンを解析した。ALK1 の発現は、他の臓器と比較して肺で特に高く (Fig. 5A)、K02288 は肺に主に作用することが示唆された。肺組織の ALK1 と VE-cadherin に対する免疫蛍光染色から、ALK1 は主にマウス肺血管系の内皮細胞に発現していることが示された (Fig. 6, upper panels)。次に、K02288 をマウスに静脈内投与し、肺および ALK1 を発現しない臓器として選択した腎臓における Robo4 の

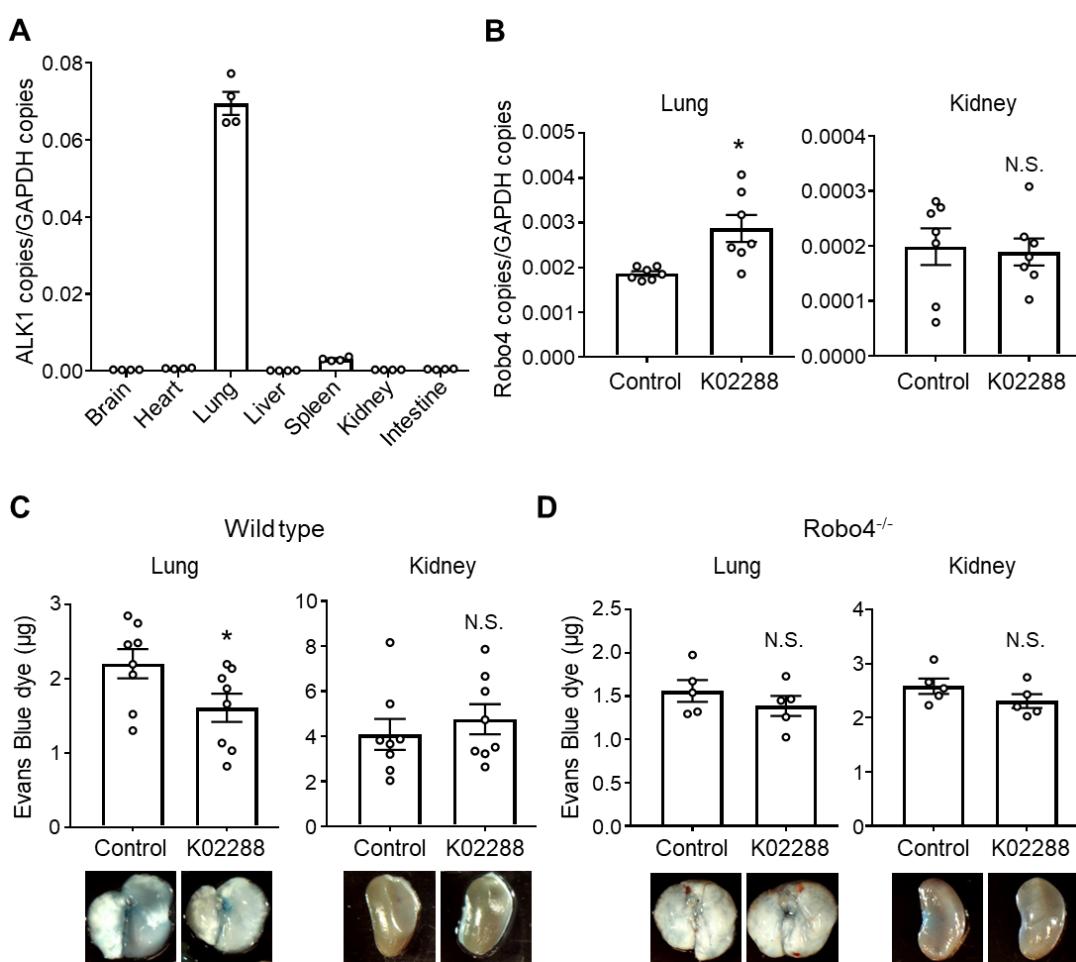


Figure 5. ALK1 inhibitor increased Robo4 expression and suppresses LPS-induced vascular permeability in mice. (A) ALK1 expression levels in organs of C57BL/6 mice (n = 4). (B) Robo4 expression levels in lungs and kidneys of wild-type (C57BL/6N) mice treated with or without K02288 (n = 7, *P < 0.05, N.S., not significant by the unpaired t test). (C) Vascular permeability assay using wild-type mice treated with or without K02288. Extravasated Evans blue in lungs and kidneys was quantified (n = 8, *P < 0.05; N.S., not significant by the unpaired t test). (D) Vascular permeability assay using $\text{Robo4}^{-/-}$ mice treated with or without K02288. Extravasated Evans blue in lungs and kidneys was quantified (n = 5, N.S., not significant by the unpaired t test). Pictures are representative images of the lungs and kidneys. Data are expressed as the mean \pm SEM.

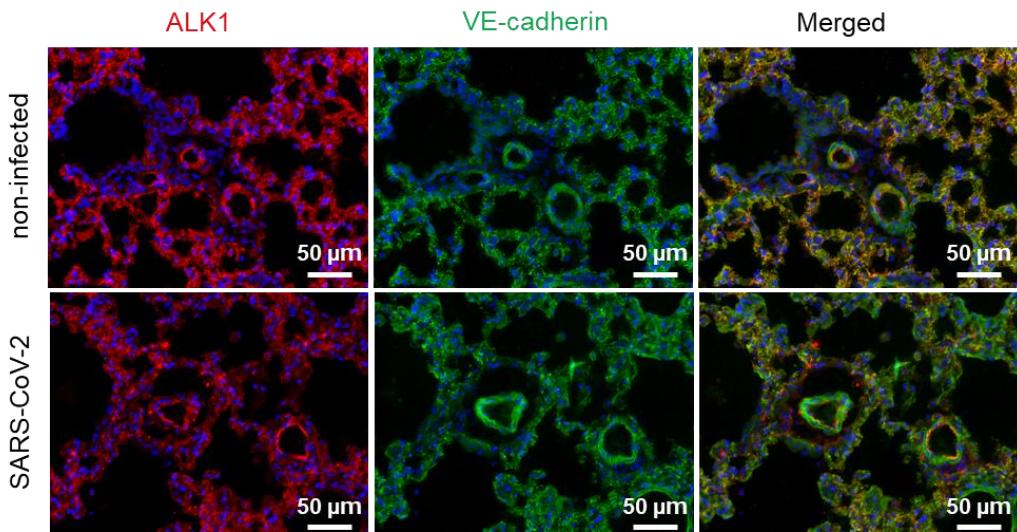


Figure 6. Expression of ALK1 in mouse lung endothelial cells. Immunofluorescent staining for ALK1 and VE-cadherin using mouse lungs infected with or without SARS-CoV-2.

発現を解析した結果、K02288 は肺の Robo4 発現を増加させたが、腎臓では増加させなかった (Fig. 5B)。これと一致して、K02288 は、LPS を投与した野生型マウスの肺ではエバンスブルーの血管外漏出を抑制したが、腎臓では抑制しなかった (Fig. 5C)。一方、Robo4^{-/-}マウスでは、K02288 は肺および腎臓の両方においてエバンスブルーの漏出に影響を与えるなかった (Fig. 5D)。さらに、K02288 は野生型マウスの肺におけるメラノーマ細胞の血管外浸潤を減少させたが、Robo4^{-/-}マウスでは減少させなかった (Fig. 7A, B) ことから、K02288 の Robo4 依存的な作用が示された。これらの結果から、K02288 は Robo4 の発現を増加させ、マウスの肺における血管透過性を抑制することが示された。

さらに、K02288 が LPS 投与マウスの生存率に与える影響を調べた。K02288 の事前投与は、LPS 投与を投与した野生型マウスの死亡率を減少させたが、Robo4^{-/-}マウスでは死亡率を変化させなかった (Fig. 7C, D)。これらの結果から、K02288 事前投与は Robo4 依存的に LPS 投与マウスの病態を改善し、生存率を改善することが示された。

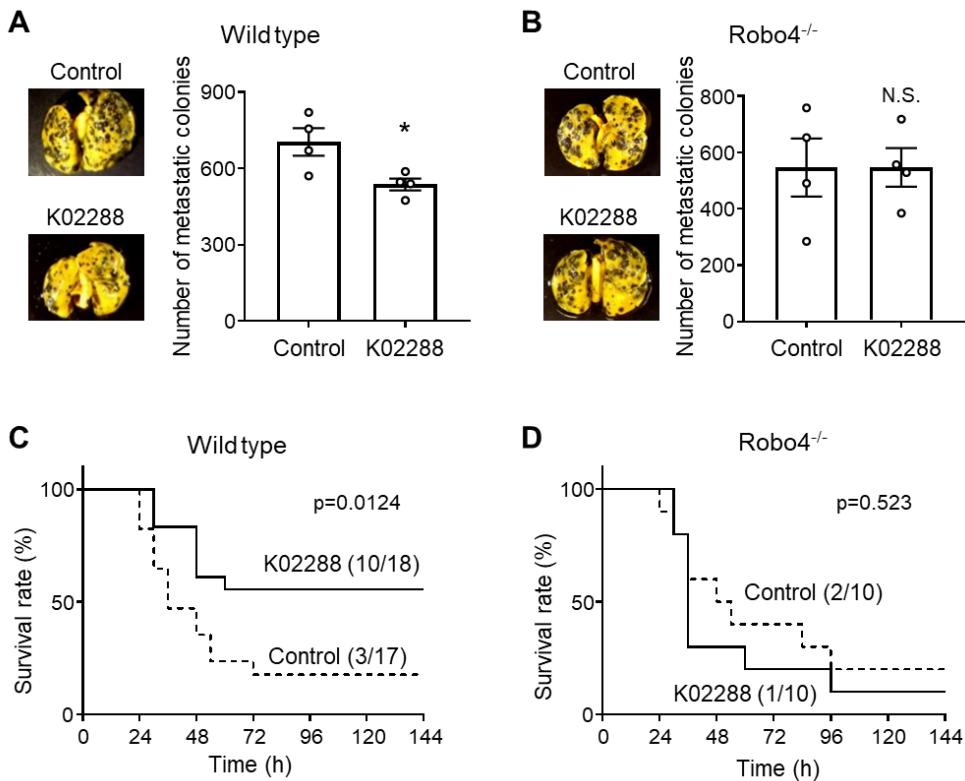


Figure 7. ALK1 inhibitor ameliorates LPS-induced mortality and experimental metastasis of melanoma cells in mice. (A) Lung colony number in the experimental metastasis models using wild-type mice treated with or without K02288. (n = 4, *P < 0.05 by the unpaired t test). **(B)** Lung colony number in the experimental metastasis models using Robo4^{-/-} mice treated with or without K02288. (n = 4, N.S., not significant by the unpaired t test). **(C)** Survival study of LPS-injected wild-type (C57BL/6N) mice treated with or without K02288 (control: n = 17, K02288: n = 18; P = 0.012 by the log-rank test). **(D)** Survival study using LPS-injected Robo4^{-/-} mice treated with or without K02288 (n = 10; P = 0.523 by the log-rank test). Data are expressed as the mean ± SEM.

最後に、airway-on-a-chip (Fig. 8A) を用いて、重症急性呼吸器症候群コロナウイルス 2 (SARS-CoV-2) が誘導する内皮バリア破綻に K02288 が与える影響を解析した。airway-on-a-chip は、上部（気道チャネル）に気道上皮細胞、下部（血管チャネル）に肺微小血管内皮細胞を含み、肺微小環境を模倣する培養システムである。著者らの研究チームでは以前、SARS-CoV-2 が気道チャネルの上皮細胞で複製され、内皮バリアを破綻させることによって血管チャネルに移動することを証明した²²。K02288 処理は、気道チャネルにおける SARS-CoV-2 のコピー数に影響を与えることなく、血管チャネルへの SARS-CoV-2 の移動を減少させた (Fig. 8B)。同様に、K02288 処理は、SARS-CoV-2 が誘発する VE-cadherin 結合の解離を抑制した (Fig. 8C)。これらの結果から、K02288 が SARS-CoV-2 誘導性の内皮バリア破綻を抑制することが示された。

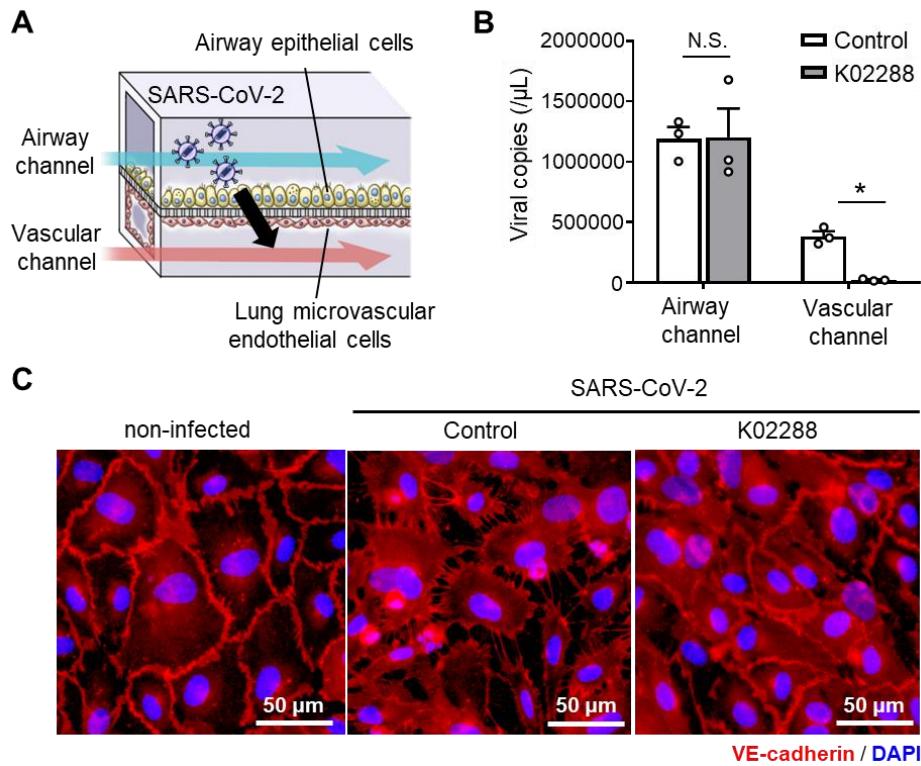


Figure 8. ALK1 inhibitor suppresses SARS-CoV-2-induced endothelial hyperpermeability. (A) Schematic illustration of the airway-on-a-chip. Medium containing 0.1 MOI SARS-CoV-2 was injected into the airway channel. The SARS-CoV-2-infected airway-on-a-chips were cultured with the AO differentiation medium (airway channel) and DMSO- or K02288 (1 μM)-containing EGM2-MV medium (vascular channel) for 6 d. (B) Viral copy numbers in the cell culture supernatant of the airway and vascular channels (* $P < 0.05$ by the unpaired t test). (C) Immunofluorescent staining for VE-cadherin in the lung microvascular ECs in the airway-on-a-chip.

次に、K02288 が SARS-CoV-2 感染マウスに与える影響を解析した。SARS-CoV-2 感染は、肺における ALK1 の内皮細胞特異的な発現パターンをほとんど変化させなかつた (Fig. 6, lower panels)。K02288 の腹腔内投与は、SARS-CoV-2 感染マウスの Robo4 発現を増加させ (Fig. 9A)、肺障害を軽減し (Fig. 9C)、死亡率を低減した (Fig. 9B)。以上の結果から、K02288 は SARS-CoV-2 感染時の肺血管内皮細胞の透過性亢進を抑制し、死亡率を抑制することが示された。

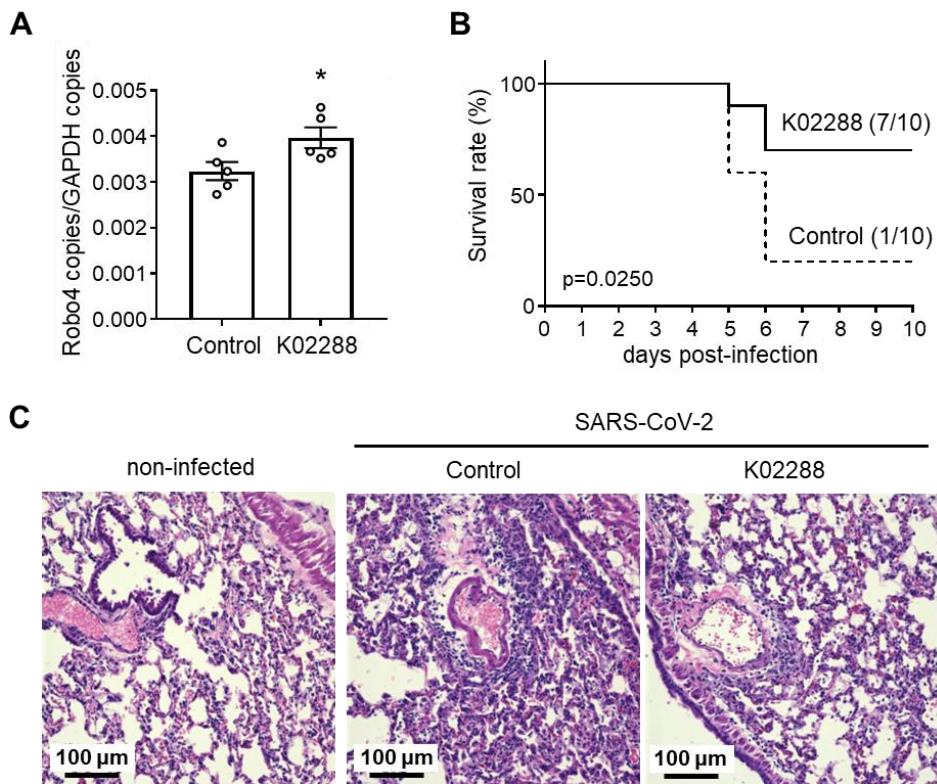


Figure 9. ALK1 inhibitor suppresses SARS-CoV-2-induced mortality in mice. (A) Robo4 expression levels in lungs of SARS-CoV-2 infected BALB/c mice treated with or without K02288 (n = 5, *P < 0.05 by the unpaired t test). (B) Survival study of SARS-CoV-2-infected BALB/c mice treated with or without K02288 (control: n = 10, K02288: n = 10; P = 0.025 by the log-rank test). We defined the day that mice had less than 75% of the initial body weight as the day of death. (C) Representative images of hematoxylin and eosin-stained lung sections from SARS-CoV-2-infected mice with or without K02288 treatment and noninfected mice. Data are expressed as the mean ± SEM.

考察

本研究では、Robo4 の過剰発現が LPS 投与マウスの血管透過性と死亡率を抑制することを示した。また、Robo4 の発現を制御するシグナル伝達経路を解析し、2 つの競合する SMAD シグナル伝達経路が Robo4 の発現を正負に制御することを見出した。さらに、ALK1 阻害剤 K02288 が Robo4 発現促進剤として機能し、血管透過性の亢進を抑制すること、LPS 投与マウスおよび SARS-CoV-2 感染マウスの死亡率を抑制することを示した。このように、Robo4 を介した血管透過性亢進の抑制が重症感染症に対する有効な治療戦略であることを示し、Robo4 の発現を増加させることにより血管透過性を抑制する薬剤として ALK1 阻害剤を同定することに成功した。

Robo4 を介した感染症病態の改善について、Robo4 シグナルが敗血症モデルやインフルエンザ感染モデルにおいて、死亡率やサイトカインストームを抑制することが

London らの報告で示されている¹³。この研究は、血管透過性の抑制が細菌やウイルスなど様々な病原体により誘導される重症感染症の死亡率を抑制する新しい戦略となることを提唱した点で重要である。一方で、Robo4 シグナルの活性化メカニズムに関しては議論の余地がある。London らの研究では、Robo4 のリガンドである Slit2 を用いて、Robo4 の下流シグナル伝達を活性化している¹⁷。しかし、Robo4 には他の Robo ファミリータンパク質が持つ Slit2 結合ドメインがないこと、いくつかの論文で Robo4 と Slit2 の直接の相互作用が検出されていないことから、Slit2 が Robo4 のリガンドであるかはいまだ不明である^{16,23,24}。さらに、Robo4 は他の 2 つのメカニズムで血管系を安定化されることも示されている。1 つ目は、細胞膜に存在する Robo4 がネトリン受容体 Unc5B のリガンドとして機能し、隣接する内皮細胞に安定化シグナルを伝達するメカニズムである^{16,24}。2 つ目は、Robo4 が TRAF7 と相互作用し、炎症時の血管透過性を抑制するメカニズムである¹²。本研究で採用した、血管内皮細胞における Robo4 発現を増加させる戦略は、上記の 3 つすべてのメカニズムを介して Robo4 の機能を増強させることができると考えられる。

本研究では、TGF- β -ALK5-SMAD2/3 および BMP9-ALK1-SMAD1/5 シグナル伝達経路が、Robo4 の発現をそれぞれ正と負に制御することを示した。これまでに、TGF- β -ALK5 シグナルは、内皮細胞の増殖、管形成、移動を抑制することで、血管新生を阻害することが報告されている^{20,25}。また、このシグナル伝達経路は、内皮細胞移動の負の制御因子として PAI-1 を誘導する²⁶。Robo4 は内皮の遊走を抑制することで内皮細胞を安定化させることから、TGF- β -ALK5-SMAD2/3 シグナルによる Robo4 発現の促進は合理的であると考えられる^{11,17}。対照的に、ALK1 シグナルは内皮細胞の機能を条件・リガンド依存的に制御している。TGF- β に刺激された ALK1 シグナルは SMAD1/5 活性化を介して内皮細胞の遊走と増殖を誘導する²⁵という報告がある一方で、TGF- β や BMP9 に刺激された ALK1 シグナルは内皮細胞の遊走や血管新生を阻害するという報告もある^{21,27-29}。同様に、BMP9 は血管透過性を正と負に制御することが示されている^{30,31}。本研究では、K02288 が血管透過性を抑制したことから、ALK1 が血管透過性の亢進に寄与していることが示された。しかし、LPS 投与モデルにおける ALK1 の主要なリガンドの特定や、ALK1 が血管透過性を亢進するメカニズムの解明には至っていない。重症感染症における ALK1 シグナルの病理学的意義を理解するためには、さらなる研究が必要である。さらに、SMAD シグナルの培養条件依存的なスイッチング機構の生理的意義と、この機構がどのように Robo4 の発現を制御しているのかを明らかにする必要がある。

本研究の結果と過去の報告から、ALK1 は肺血管内皮細胞に特異的かつ高発現していることが示された³²。K02288 は肺において Robo4 の発現を促進し、血管透過性を抑制したが、腎臓ではその効果が認められなかった。これらの結果から、K02288 は主に肺

血管内皮細胞に作用し、肺血管の透過性を抑制しマウスの死亡率を抑制したことが示唆される。この点から、ALK1 は重症感染症における肺傷害に対し、他の臓器への副作用が少なく有用な治療標的となる可能性がある。

本研究のスクリーニングでは、Robo4 の発現を抑制する 3 つの低分子 IPA-3 (PAK-1 阻害剤)、GR127935 (5-HT1B/1D アンタゴニスト)、SB-525334 (ALK5 阻害剤) を同定した。この結果は、本研究で注目した SMAD シグナルに加えて、PAK-1 と 5-HT1B/1D も Robo4 の発現制御に関与していることを示唆している。PAK-1 と 5-HT1B/1D を介したシグナル伝達による Robo4 の発現制御は報告されていないが、これらのシグナル伝達経路は、SMAD シグナルとともに、Robo4 発現を増加させる新たな薬剤の開発に寄与する可能性がある。

以上、本研究では、Robo4 を標的として血管透過性を抑制することが、重症感染症に対する新たな治療戦略となり得ることを示すことができた。また、Robo4 の発現を増加させる低分子が、重症感染症病態を抑制する効果的な薬剤となり得ることを示した。このような血管透過性を標的とする新薬は、既存薬と併用することで、既存の感染症および新興感染症によって生じる重症患者の死亡率低下に貢献する可能性がある。今後、本研究の成果が、感染症による死者を減らす新たな治療法の確立につながることを期待したい。

結論

本研究では、Robo4 発現促進戦略による重症感染症治療効果の検証、および新規 Robo4 発現促進薬の探索と評価を行い、以下のことを明らかにした。

1. Robo4 過剰発現は LPS 投与モデルマウスの血管透過性亢進と死亡率を抑制する
2. TGF- β -ALK5-SMAD2/3 シグナル伝達経路は Robo4 発現を促進する
3. BMP9-ALK1-SMAD1/5 シグナル伝達経路は Robo4 発現を抑制する
4. ALK1 阻害剤 K02288 は培養内皮細胞とマウス肺の Robo4 発現を促進する
5. ALK1 阻害剤 K02288 は Robo4 依存的に LPS 投与モデルマウスの血管透過性亢進と死亡率を抑制する
6. ALK1 阻害剤 K02288 は SARS-CoV-2 感染による肺血管内皮細胞のバリア破綻を抑制し、SARS-CoV-2 感染マウスの生存率を改善する

実験項

細胞培養

HUVEC (Lonza) は microvascular endothelial cell growth medium-2 (EGM-2MV ; Lonza) 中で培養した。スクリーニング細胞株 MS1-Robo4 および MS1-SV40 は、以下の手順で作製した。プライマー (Table 1) を用いた PCR により pTRE2pur ベクター (タカラバイオ) からピューロマイシン耐性遺伝子を増幅し、In-Fusion HD Cloning Kit (タカラバイオ) を用いてプラスミド pGL3-Robo4³⁴ および pGL3-Control (Promega) に挿入した。得られたプラスミドを *AseI* で消化して直鎖化し、Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を用いて MS1 細胞に導入した。導入から 48 時間後、安定に導入された細胞を、ピューロマイシン (0.8 μ g/mL) で 18 日間培養することにより選択した。樹立細胞 (MS1-Robo4 および MS1-SV40) およびマウス黒色腫細胞株 B16-F10 (American Type Culture Collection) は、10% ウシ胎児血清 (FBS)、100U/mL ペニシリン、100 μ g/mL ストレプトマイシンを含むダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM; Nacalai Tesque) で培養した。細胞はすべて 37°C、5% CO₂ 条件下で培養した。

化合物ライブラリーのスクリーニング

スクリーニングのために、MS1-Robo4 または MS1-SV40 細胞 (5×10^3 cells) を Multi Drop (Tecan) を用いて 384 ウェルブラックプレート (Corning) に播種し、24 時間培養した。FDSS7000 (浜松ホトニクス) と Steady-Glo Luciferase Assay System (Promega) を用いてルシフェラーゼ活性を測定した。

HUVEC への低分子化合物およびサイトカイン添加

HUVEC を LoPac ライブラリーの低分子化合物 (10 μ M; GR127935, SB525334, IPA-3, K114, loratadine, paclitaxel, CP31398) または K02288 (1 μ M; Cayman Chemical) または TGF- β 1、TGF- β 2 (5 ng/mL) で処理し、24 時間培養した。低分子およびサイトカイン処理では、HUVEC を 5% FBS 含有 EBM-2 培地で 16 時間培養し、K02288 (1 μ M) で 30 分間処理した後、BMP9 (1 ng/mL) で 6 時間処理した。

HUVEC のマトリゲル培養

EBM-2 で希釀したマトリゲル (Corning) をプレーティングし、37°C で 30 分間インキュベートした。HUVEC をマトリゲル上に播種し、24 時間培養後、TGF- β 1、TGF- β 2 (5 ng/mL) または K02288 (1 μ M) で 24 時間処理した。

siRNA を用いた HUVEC での遺伝子ノックダウン

SMAD1 (VHS41097), SMAD2 (VHS41107), SMAD3 (s8401), SMAD5 (VHS41124) に対する

る siRNA、およびコントロール siRNA (Stealth RNA siRNA Negative Control Med GC Duplex #2) を Thermo Fisher Scientific から購入し、ノックダウン実験に使用した (SMAD1/5; 10 nM, SMAD2; 20 nM, SMAD3; 5 nM)。SMAD2/3 または SMAD1/5 のノックダウンには、Lipofectamine RNAi-Max (Invitrogen) を用いて HUVEC に siRNA を導入し、それぞれ 24 時間または 48 時間インキュベートした。SMAD1/5 siRNA を導入した細胞は、低血清培地で 16 時間培養し、BMP9 (1 ng/mL) で 6 時間処理した。

Robo4 過剰発現マウスと Robo4 欠損マウスの作製

マウス Robo4 cDNA 断片を PCR で増幅し、pCAG-stop^{flx} ベクター (#51269; Addgene) に挿入した³⁵。導入遺伝子断片 (cytomegalovirus-immediate early enhancer/chicken b-actin/rabbit b-globin (CAG) promoter-stop^{flx}-mRobo4) をプラスミドから単離し、マイクロインジェクションにより C57BL/6 マウスの受精卵に導入し、偽妊娠マウスに移植して CAG-stop^{flx}-Robo4 マウスを樹立した。CAG-stop^{flx}-Robo4 マウスを CDH5-Cre/ERT2 マウス³⁶ と交配し、Robo4^{iEC} マウスを作製した。Robo4 欠損マウス (Robo4^{-/-}) の作製は以前に報告されている¹²。本研究における動物実験は、SARS-CoV-2 感染モデルを除き、すべて大阪大学倫理委員会の承認を得ている (承認番号: Douyaku-30-11-2)。

Robo4^{iEC} マウスを用いた解析では、雌雄の Robo4^{iEC} マウス (6 weeks old) にコーン油に溶解したタモキシフェン (1 mg/mouse; Sigma-Aldrich) を 4 日間連続で腹腔内投与した。最初の投与から 2 週間後に臓器を摘出し、RNA 調製に用いた。K02288 処理マウスを用いた解析では、雄の C57BL/6 マウス (8 週齢) に、1%ジメチルスルホキシド (DMSO) 含有リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 中の K02288 (0.5 mg/kg body weight) を静脈内投与した。24 時間後、肺と腎臓を採取し、RNA 調製に用いた。

qRT-PCR

細胞または臓器からの total RNA は、RNeasy Mini Kit (Qiagen)、FastGene RNA Basic Kit (日本ジェネティクス)、または ISOGEN (ニッポンジーン) を用いて調製した。RNA は Superscript VILO Master Mix (Invitrogen) を用いて逆転写した。QuantiTect SYBR Green PCR Kit (Qiagen) と特異的プライマー (Table 1) を用いて、CFX384 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) によりリアルタイム RT-PCR を行った。コピー数は、標的配列を含む既知量のプラスミドを用いて作製した標準曲線から算出するか、 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法を用いて標的 mRNA レベルの相対定量を行った。遺伝子の発現レベルは GAPDH レベルに對して正規化した。

LPS 投与マウスの生存率解析

Robo4^{iEC} または CDH5-Cre/ERT2 マウス (雄、5~6 週齢) に、コーン油に溶解したタモキシフェン (1 mg/mouse) を 4 日間連続で腹腔内投与した。最初の投与から 2 週間後、

マウスに PBS 中の LPS (25 mg/kg body weight; Sigma-Aldrich) を腹腔内投与した。C57BL/6N および Robo4^{-/-}マウス (雄、7~8 週齢) に、1%DMSO 含有 PBS に溶解した K02288 (0.5 mg/kg body weight) を静脈内投与した。24 時間後、C57BL/6N および Robo4^{-/-}マウスに LPS (それぞれ 8, 12 mg/kg body weight) を腹腔内投与した。生存率は 144 時間評価した。

血管透過性解析

Robo4^{iEC} または CDH5-Cre/ERT2 マウス (雄、6 週齢) にタモキシフェン (1 mg/mouse) を 2 日間連続腹腔内投与した。投与から 10 日後、マウスに LPS (80 mg/kg 体重) を腹腔内投与した。6 時間後、PBS 中の 1%エバンスブルー色素 100 µL をマウスに静脈内投与した。1 時間後、イソフルラン麻酔下でマウスを 2 mM のエチレンジアミン四酢酸 (EDTA) を含む PBS で灌流し、臓器を摘出した。臓器をホルムアミド中で 2 日間インキュベートすることにより、エバンスブルー色素を溶出させた。溶出した色素は、620 nm で光学濃度を測定することにより定量した。K02288 を用いたアッセイでは、C57BL/6N および Robo4^{-/-}マウス (雄、8 週齢) に K02288 (0.5 mg/kg body weight) を静脈内投与した。投与 24 時間後、マウスに LPS (16.5 mg/kg body weight) を腹腔内投与した。6 時間後、マウスにエバンスブルー色素を投与し、同様の方法でアッセイした。

実験的肺転移モデル

Robo4^{iEC} または CDH5-Cre/ERT2 マウス (雌、6 週齢) にタモキシフェン (1 mg/mouse) を 3 日間連続で腹腔内投与した。最初のタモキシフェン投与から 2 週間後、マウスに B16-F10 細胞 (3×10^5 cells) を 0.02%EDTA 含有 PBS で静脈内投与した。2 週間後、肺を摘出し、ブアン液で固定した。MAS-500 USB カメラ (Marutsu elec) を装着した SZX7 実体顕微鏡 (Olympus) を用いて、肺表面の転移したコロニー数を測定した。K02288 を用いたアッセイでは、C57BL/6N および Robo4^{-/-}マウス (雌、6 週齢) に K02288 (2 mg/kg body weight) を腹腔内投与した。24 時間後、マウスに B16-F10 細胞を投与し、同様の方法でアッセイした。

SARS-CoV-2 の調製

重症急性呼吸器 SARS-CoV-2 株 B.1.1.214 (GISAID アクセッション番号 : EPI_ISL_2897162) は COVID-19 患者の鼻咽頭スワブサンプルから分離された。本研究は京都大学の研究倫理委員会の承認を得た (R2379-3)。ウイルスは Vero/TMPRSS2 細胞 (JCRB1818、JCRB セルバンク)³⁷で増殖させ、-80°Cで保存した。Vero/TMPRSS2 細胞は、5%FBS と 1%ペニシリン/ストレプトマイシンを添加した最小必須培地 (Sigma-Aldrich) で培養した。SARS-CoV-2 を用いた *in vitro* 実験は、京都大学のバイオセーフティレベル 3 の施設で、厳格な規則に従って行われた。

マウス由来 SARS-CoV-2 (MA10) は、環状ポリメラーゼ伸長反応 (CPER) 法により調製した³⁸。MA10 のバックボーンは SARS-CoV-2 国立感染症研究所株 (2019-nCoV_Japan_TY_WK-5212020) である。MA10 は 7 つの変異 : nsp4 : T295I、nsp7 : K2R、nsp8 : E23G、S : Q493K/Q498Y、P499T、orf6 : F7S を有しており、これらは BALB/c マウスでの連続継代中に SARS-CoV-2 に導入された適応変異として Leist らによって報告されている³⁹。簡単に説明すると、ウイルスを VeroE6/TMPRSS2 細胞 (JCRB1819; JCRB セルバンク) で増幅し、-80°C で保存した。VeroE6/TMPRSS2 細胞は、10%FBS と 1%ペニシリン/ストレプトマイシンを添加した DMEM (high Glucose) (Nacalai Tesque) で培養した。MA10 を用いた *in vivo* 実験は、大阪大学のバイオセーフティレベル 3 の施設で、厳格な規則に従って行われた。

Airway-on-a-chip および SARS-CoV-2 感染モデルの作製

ヒト肺微小血管内皮細胞 (HMVEC-L) は Lonza から入手し、EGM-2MV 培地 (Lonza) で維持した。Airway-on-a-chip を作製するために、ポリジメチルシロキサン (PDMS) デバイスの底部チャネル (血管チャネル) をフィブロネクチン (3 µg/mL, Sigma) でプレコートした。PDMS デバイスは既報⁴⁰に従って作製した。HMVEC-L を EGM-2MV 培地に 5×10^6 cells/mL の密度で懸濁した。10 µL の懸濁液を PDMS デバイスのフィブロネクチンコーティングされた底部チャネルに注入した。1 時間後、PDMS デバイスを裏返し、EGM-2MV 培地を血管チャネルに加えた。4 日後、ヒト気道オルガノイド (AO) を解離し、一番上のチャネル (気道チャネル) に播種した。AO は以前の報告⁴¹に記載されているように作製した。AO を単細胞に解離し、AO 分化培地に 5×10^6 cells/mL で懸濁した。懸濁液 10 µL を上部チャネルに注入した。1 時間後、AO 分化培地を気道チャネルに加えた。細胞は 5%CO₂ を含む加湿雰囲気下、37°C で培養した。SARS-CoV-2 (0.1 MOI) を含む AO 分化培地を気道チャネルに注入し、2 時間培養した。感染した airway-on-a-chip は、AO 分化培地 (気道チャネル) と DMSO または K02288 (1 µM) を含む EGM-2MV 培地 (血管チャネル) で 6 日間培養し、気道チャネルと血管チャネルの細胞培養上清中のウイルス RNA コピー数を測定した。

ウイルス RNA コピー数の測定

細胞培養上清を同量の 2×RNA 溶解バッファー (0.4 U/µL SUPERase-In RNase Inhibitor (Thermo Fisher Scientific)、2% Triton X-100、50 mM KCl、100 mM Tris-HCl (pH7.4)、40% グリセロールを含む蒸留水) と合わせ、室温で 10 分間インキュベートした。混合物を蒸留水で 10 倍に希釈した。ウイルス RNA は、QuantStudio 1 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific) 上の One-Step TB Green PrimeScript PLUS RT-PCR Kit (Perfect Real Time) (Takara Bio) と特異的プライマー (Table 1) を用いて定量した。標準曲線は、日本遺伝子研究所から購入した SARS-CoV-2 RNA (1×10^5 copies/µL) を用いて作成した。

免疫蛍光染色

HMVEC-L に接着したポリエチレンテレフタレート膜を airway-on-a-chip から機械的に除去し、免疫蛍光染色に使用した。得られた細胞を 4%パラホルムアルデヒド(PFA)で固定し、0.2% Triton X-100 を含む PBS で透過処理し、2%ウシ血清アルブミンと 10%FBS を含む PBS でブロックした。得られた細胞を VE-cadherin に対する抗体 (F8、Santa Cruz Biotechnology) と反応させ、続いて Alexa Fluor 594 (Thermo Fisher Scientific) に結合した二次抗体と反応させた。スライドは、ProLongTM Gold Antifade Mountant with DAPI (Thermo Fisher Scientific) でマウントし、BZ-X700 (KEYENCE) を用いて解析した。

1%PFA 固定したマウス肺切片を、0.2%Triton X-100 を含む PBS で透過処理し、ALK1 (AF770、R&D Systems) および VE-cadherin (ab282277、Abcam) に対する抗体と反応させた後、Alexa Fluor 488 または Alexa Fluor 546 (Thermo Fisher Scientific) に結合した二次抗体と反応させた。スライドは Vector TrueVIEW Autofluorescence Quenching Kit with DAPI (Vector Laboratories) を用いて処理・マウントし、BZ-X700 (KEYENCE) を用いて解析した。

SARS-CoV-2 感染マウスの生存率解析

雄の BALB/c マウス (8 週齢) に SARS-CoV-2 (MA10 ; 2×10^5 PFU/mouse) を経鼻投与した。SARS-CoV-2 感染の 1 日前および 1、3、4、5、6 日後に、1%DMSO 含有 PBS またはビヒクル中の K02288 (2 mg/kg body weight) をマウスに腹腔内投与し、体重を測定した。人道的エンドポイントは、感染時の初期体重に対して 25% の体重減少とした。マウスの体重が初期体重の 75% 以下になった日を死亡日と定義した。SARS-CoV-2 を用いた動物実験は大阪大学倫理委員会の承認を得た (承認番号 BIKEN-AP- R02-09-0)。

SARS-CoV2 感染マウスからの肺組織および RNA の調製

雄の BALB/c マウス (8 週齢) に SARS-CoV-2 (MA10 ; 2×10^5 PFU/mouse) を経鼻投与した。感染 4 日後に肺を採取した。K02288 処置マウスは、K02288 (1%DMSO を含む PBS 中 2 mg/kg body weight) またはビヒクルを、SARS-CoV-2 感染の 1 日前、1 日後および 3 日後にマウスに腹腔内投与した。肺を採取した。肺は RNA 調製に用いるか、1~4%PFA で固定し、凍結切片の調製に用いた。

ヘマトキシリン・エオジン染色

4%PFA 固定したマウス肺切片をヘマトキシリン・エオジン Y (H&E、富士フィルム和光純薬) で染色し、BZ-X700 (KEYENCE) を用いて解析した。

統計分析

データは平均値±SEMで表した。P値はlog-rank検定、unpaired t検定、一元配置または二元配置ANOVAにTukeyの検定またはDunnettの検定を加えて算出した。統計解析はすべてPrism 7(GraphPad Software Inc.)を用いて行った。平均値の差の統計的有意性は、図の凡例に示した検定を用いて決定した。

Table 1

qPCR for HUVECS		5'-3'
human Robo4	Fw	TTATGGCTCCCTCATCGCTG
	Rv	GAGGCTGTCTGAGCTGGAAC
human PAI-1	Fw	GAAGATCGAGGTGAACGAGACTG
	Rv	ACCACAAAGAGGAAGGGTCTGT
human ID-1	Fw	CTCCAACGTAAAGGTCCCTGATGTAG
	Rv	CGACATGAACGGCTGTTACTCAC
human GAPDH	Fw	TGCACCACCAACTGCTTAGC
	Rv	GGCATGGACTGTGGTCATGAG
qPCR for mouse		5'-3'
mouse Robo4	Fw	CATGGTGGAAAGACGGGAAA
	Rv	CGAGTCATTCTCTCTGCTCTGA
mouse ALK1	Fw	GCTCAGTCACAATCCAGAGAAG
	Rv	ACACTCTCTCACTCCCTCTAC
mouse GAPDH	Fw	TGCACCACCAACTGCTTAG
	Rv	GGCATGGACTGTGGTCATGA
Generation of Robo4^{iEC} mouse		5'-3'
CAG-stop ^{flx} -Robo4 genotyping primer	Fw	CCATCAAGCTGATCCGGAAC
	Rv	GTAACAGGGAGGGTCCCATCC
CDH5-CreERT2 genotyping primer	Fw	GCCTGCATTACCGGTCGATGCAACGA
	Rv	GTGGCAGATGGCGCGAACACCATT

謝辞

本稿を終えるにあたり、終始懇切丁寧な御指導、御鞭撻を賜りました、大阪大学大学院薬学研究科教授 藤尾慈先生に厚く御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、終始多大なる有益な御助言と御助力を賜りました、大阪大学大学院薬学研究科准教授 岡田欣晃先生に心より深謝いたします。

本研究において、多くの御指導、御助力を賜りました、大阪大学大学院薬学研究科教授 辻川和丈先生、同研究科准教授 尾花理徳先生、同研究科助教 田中翔大先生、大阪大学微生物病研究所特任教授 吉岡靖雄先生に厚く御礼申し上げます。

また、多大なる御助力を賜りました、大阪大学微生物病研究所教授 伊川正人先生、慶應義塾大学医学部教授 久保田義顕先生、京都大学iPS細胞研究所講師 高山和雄先生、京都大学iPS細胞研究所 橋本里菜先生、大阪大学微生物病研究所 徳納渚沙先生、Max Planck Institute for Molecular Biomedicine 白倉圭佑先生に心より深謝いたします。

日々の研究生活において、数々の御協力、御助言を頂き、また、心温かく見守ってくださいました大阪大学大学院薬学研究科臨床薬効解析学分野ならびに旧生命情報解析学分野の皆様に深く感謝いたします。

最後に、常日頃から御支援いただきました友人、そして家族に心より感謝いたします。

参考文献

1. E. Dejana, F. Orsenigo, M. G. Lampugnani, The role of adherens junctions and VE-cadherin in the control of vascular permeability. *J. Cell Sci.* **121**, 2115–2122 (2008).
2. C. Cerutti, A. J. Ridley, Endothelial cell-cell adhesion and signaling. *Exp. Cell Res.* **358**, 31 (2017).
3. M. Corada, *et al.*, Vascular endothelial-cadherin is an important determinant of microvascular integrity in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 9815–9820 (1999).
4. F. E. Nwariaku, *et al.*, Tyrosine phosphorylation of vascular endothelial cadherin and the regulation of microvascular permeability. *Surgery* **132**, 180–185 (2002).
5. D. J. Angelini, *et al.*, TNF- α increases tyrosine phosphorylation of vascular endothelial cadherin and opens the paracellular pathway through fyn activation in human lung endothelia. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* **291**, 1232–1245 (2006).
6. J. Gavard, J. S. Gutkind, VEGF controls endothelial-cell permeability by promoting the β -arrestin-dependent endocytosis of VE-cadherin. *Nat. Cell Biol. 2006 811* **8**, 1223–1234 (2006).
7. A. Ashkenazi, *et al.*, Protection against endotoxic shock by a tumor necrosis factor receptor immunoadhesin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 10535 (1991).
8. C. J. Walsh, *et al.*, Monoclonal Antibody to Tumor Necrosis Factor α Attenuates Cardiopulmonary Dysfunction in Porcine Gram-negative Sepsis. *Arch. Surg.* **127**, 138–145 (1992).
9. K. J. Tracey, *et al.*, Anti-cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteraemia. *Nat. 1987 3306149* **330**, 662–664 (1987).
10. L. Huminiecki, M. Gorn, S. Suchting, R. Poulsom, R. Bicknell, Magic roundabout is a new member of the roundabout receptor family that is endothelial specific and expressed at sites of active angiogenesis. *Genomics* **79**, 547–52 (2002).
11. K. W. Park, *et al.*, Robo4 is a vascular-specific receptor that inhibits endothelial migration. *Dev. Biol.* **261**, 251–67 (2003).
12. K. Shirakura, *et al.*, The Robo4-TRAF7 complex suppresses endothelial hyperpermeability in inflammation. *J. Cell Sci.* **132** (2019).
13. N. R. London, *et al.*, Targeting Robo4-dependent slit signaling to survive the cytokine storm in sepsis and influenza. *Sci. Transl. Med.* **2**, 23–19 (2010).
14. T. Kashio, *et al.*, HDAC inhibitor, MS-275, increases vascular permeability by suppressing Robo4 expression in endothelial cells. *Tissue Barriers* **9** (2021).
15. H. Zhao, *et al.*, Endothelial Robo4 suppresses breast cancer growth and metastasis through regulation of tumor angiogenesis. *Mol. Oncol.* **10**, 272 (2016).

16. A. W. Koch, *et al.*, Robo4 Maintains Vessel Integrity and Inhibits Angiogenesis by Interacting with UNC5B. *Dev. Cell* **20**, 33–46 (2011).
17. C. A. Jones, *et al.*, Robo4 stabilizes the vascular network by inhibiting pathologic angiogenesis and endothelial hyperpermeability. *Nat. Med.* **14**, 448 (2008).
18. T. E. Walshe, *et al.*, TGF- β Is Required for Vascular Barrier Function, Endothelial Survival and Homeostasis of the Adult Microvasculature. *PLoS One* **4** (2009).
19. T. Ota, *et al.*, Targets of transcriptional regulation by two distinct type I receptors for transforming growth factor- β in human umbilical vein endothelial cells. *J. Cell. Physiol.* **193**, 299–318 (2002).
20. M. J. Goumans, *et al.*, Balancing the activation state of the endothelium via two distinct TGF-beta type I receptors. *EMBO J.* **21**, 1743–1753 (2002).
21. L. David, C. Mallet, S. Mazerbourg, J. J. Feige, S. Bailly, Identification of BMP9 and BMP10 as functional activators of the orphan activin receptor-like kinase 1 (ALK1) in endothelial cells. *Blood* **109**, 1953–1961 (2007).
22. R. Hashimoto, *et al.*, SARS-CoV-2 disrupts respiratory vascular barriers by suppressing Claudin-5 expression. *Sci. Adv.* **8** (2022).
23. S. Suchting, P. Heal, K. Tahtis, L. M. Stewart, R. Bicknell, Soluble Robo4 receptor inhibits in vivo angiogenesis and endothelial cell migration. *FASEB J.* **19**, 121–123 (2005).
24. C. A. Jones, *et al.*, Robo4 stabilizes the vascular network by inhibiting pathologic angiogenesis and endothelial hyperpermeability. *Nat. Med.* **14**, 448–453 (2008).
25. M. J. Goumans, *et al.*, Activin Receptor-like Kinase (ALK)1 Is an Antagonistic Mediator of Lateral TGF β /ALK5 Signaling. *Mol. Cell* **12**, 817–828 (2003).
26. G. Deng, S. A. Curriden, S. Wang, S. Rosenberg, D. J. Loskutoff, Is plasminogen activator inhibitor-1 the molecular switch that governs urokinase receptor-mediated cell adhesion and release? *J. Cell Biol.* **134**, 1563 (1996).
27. S. Lamouille, C. Mallet, J. J. Felge, S. Bailly, Activin receptor-like kinase 1 is implicated in the maturation phase of angiogenesis. *Blood* **100**, 4495–4501 (2002).
28. C. Mallet, D. Vittet, J. Feige, S. Bailly, J.-J. Feige, TGF β 1 Induces Vasculogenesis and Inhibits Angiogenic Sprouting in an Embryonic Stem Cell Differentiation Model: Respective Contribution of ALK1 and ALK5. *Stem Cells* **24**, 2420–2427 (2006).
29. M. Scharpfenecker, *et al.*, BMP-9 signals via ALK1 and inhibits bFGF-induced endothelial cell proliferation and VEGF-stimulated angiogenesis. *J. Cell Sci.* **120**, 964–972 (2007).
30. W. Li, *et al.*, Circulating BMP9 Protects the Pulmonary Endothelium during Inflammation-induced Lung Injury in Mice. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **203**, 1419–1430 (2021).

31. V. Brand, *et al.*, Impact of selective anti-BMP9 treatment on tumor cells and tumor angiogenesis. *Mol. Oncol.* **10**, 1603 (2016).
32. M. P. Panchenko, M. C. Williams, J. S. Brody, Q. Yu, Type I receptor serine-threonine kinase preferentially expressed in pulmonary blood vessels. <https://doi.org/10.1152/ajplung.1996.270.4.L547> **270** (1996).
33. E. S. Winkler, *et al.*, SARS-CoV-2 Causes Lung Infection without Severe Disease in Human ACE2 Knock-In Mice. *J. Virol.* **96** (2022).
34. Y. Okada, *et al.*, A Three-Kilobase Fragment of the Human Robo4 Promoter Directs Cell Type-Specific Expression in Endothelium. *Circ. Res.* **100**, 1712–1722 (2007).
35. M. Hermann, *et al.*, Binary recombinase systems for high-resolution conditional mutagenesis. *Nucleic Acids Res.* **42**, 3894 (2014).
36. K. Okabe, *et al.*, Neurons limit angiogenesis by titrating VEGF in retina. *Cell* **159**, 584–596 (2014).
37. S. Matsuyama, *et al.*, Enhanced isolation of SARS-CoV-2 by TMPRSS2-expressing cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **117**, 7001–7003 (2020).
38. S. Torii, *et al.*, Establishment of a reverse genetics system for SARS-CoV-2 using circular polymerase extension reaction. *Cell Rep.* **35**, 109014 (2021).
39. S. R. Leist, *et al.*, A Mouse-Adapted SARS-CoV-2 Induces Acute Lung Injury and Mortality in Standard Laboratory Mice. *Cell* **183**, 1070 (2020).
40. S. Deguchi, *et al.*, Usability of Polydimethylsiloxane-Based Microfluidic Devices in Pharmaceutical Research Using Human Hepatocytes. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **7**, 3648–3657 (2021).
41. E. Sano, *et al.*, Cell response analysis in SARS-CoV-2 infected bronchial organoids. *Commun. Biol.* **5** (2022).