

血管透過性を標的とする重症感染症治療薬の可能性



研究ノート

岡田 欣晃*

Potential therapeutic drugs for severe infectious diseases
by targeting vascular permeability

Key Words : Vascular permeability, severe infectious diseases, endothelial cells

はじめに

私たちの体に感染した病原体は増殖しつつ、血管や免疫細胞を活性化し、炎症性サイトカインの産生を誘導する。いくつかの炎症性サイトカインは血管に作用し、透過性を亢進させる。これらのプロセスは、病原体の侵入部位に効率よく免疫細胞を送達し、病原体を排除する生体防御の仕組みである。一方で、重症感染症においてはこれらのプロセスが過剰に誘導されることで、致死的な病態が引き起こされる(図1)。これまでに、病原体の増殖を抑制する抗病原体薬、主に免疫細胞の活性化を抑制する抗炎症薬、炎症性サイトカイン抑制薬など優れた治療薬が開発されてきた。しかし、これらの治療薬を用いてもなお、重症感染症の病態を完全に抑制することは難しく、COVID-19のパンデミックにおいても多くの人命が

失われた。そこで私たちは、重症感染症に対する治療薬として、いまだ治療薬の存在しない血管透過性亢進のプロセスを抑制する新しい治療薬を開発しようと考えた。

血管透過性は、血管の内腔を覆う内皮細胞どうしの接着によって制御されている。内皮細胞は、Claudin-5 (CLDN5) や VE-cadherin などの細胞膜上のタンパク質を介して互いに接着する^{1,2}。通常、この接着により、内皮細胞間のすき間が小さくなり、透過性が低く保たれている。病原体感染時には炎症性サイトカインの刺激により、これらの接着が弱められ透過性が亢進することは知られていたが、病原体自身がこの内皮細胞間の接着分子にどのような影響を与えるのかは詳しく分かっていなかった。そこで私たちは、新型コロナウイルスが内皮細胞間の接

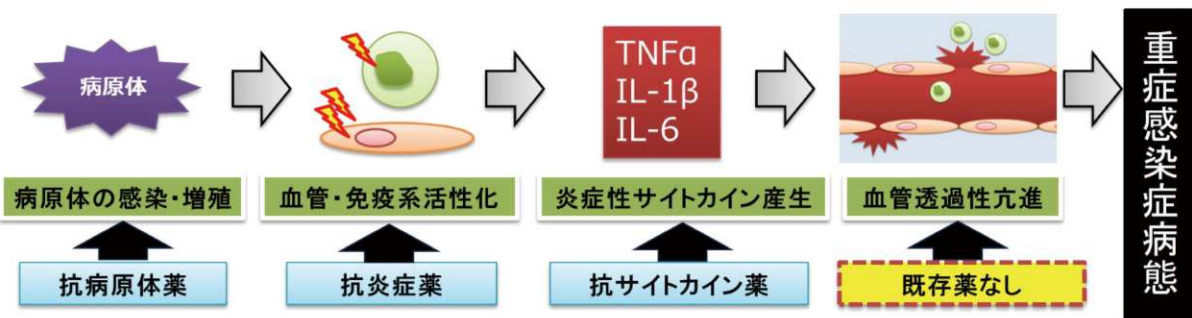


図1 病原体が重症感染症を誘導するプロセスと治療薬



* Yoshiaki OKADA

1975年6月生まれ
大阪大学 大学院薬学研究科 博士後期
課程 修了 (2003年)
現在、大阪大学 大学院薬学研究科
臨床薬効解析学分野 准教授
博士(薬学)
専門/血管生物学・薬学
TEL : 06-6879-8164
FAX : 06-6879-8164
E-mail : okadabos@phs.osaka-u.ac.jp

着や透過性に与える影響について解析を行った。

新型コロナウイルスによる血管透過性の制御

新型コロナウイルスが血管透過性に与える影響を、肺の微小環境を再現できる気道チップを用いて解析した³。気道チップは、気道上皮細胞と肺の内皮細胞を、それぞれ上下2つの流路に播種した共培養系である。まず、上の流路の気道上皮細胞に新型コロナ

ウイルスを処理すると、新型コロナウイルスは気道上皮細胞に感染・増殖し、その後、下の流路の内皮細胞に侵入することが観察された。また、この時の内皮細胞の遺伝子発現量の解析から、新型コロナウイルスが、内皮細胞間の接着を担う CLDN5 の発現量を強く減少させることが明らかになった。さらにタンパク質の染色実験から、新型コロナウイルスは CLDN5 タンパク質の発現を低下させるのみならず、内皮細胞の間にウイルスが通過できるサイズのすき間を生じさせることが明らかになった。これらの結果から、新型コロナウイルスは、CLDN5 発現を抑制して、内皮細胞の透過性を過剰に高めることが示された。さらに、生体において CLDN5 量や機能が低下する意義を解析するために、マウスの CLDN5 機能を阻害する実験を行ったところ、肺の血管透過性が過剰に高まり、血液成分が血管外にもれる肺水腫が誘導された³。これらの結果から、新型コロナウイルスによる CLDN5 発現の抑制は、血管透過性を過剰に高め、肺水腫を誘導する可能性が示された。

ここまでの検討から、新型コロナウイルスが CLDN5 量を低下させることが血管透過性を高める原因であることが考えられたため、逆に CLDN5 量を増やすことで治療できるかを検証した³。気道チップの内皮細胞の CLDN5 量を遺伝子発現ベクターや低分子薬で増加させたところ、新型コロナウイルスによる内皮細胞透過性の亢進や炎症誘導が抑制された。このことから、CLDN5 量を増やし、内皮細胞どうしの接着を強める戦略で、新型コロナウイルスが誘導する血管透過性の過剰亢進と病態進展を抑制できることが示された。

血管透過性抑制分子 Robo4 への着目

ここまでの検討から、内皮細胞間接着を強める戦略で、新型コロナウイルスによる血管透過性の過剰亢進が抑えられることが分かったため、私たちは次に、血管透過性抑制分子として知られているタンパク質 Roundabout4 (Robo4) に着目し、重症感染症治療薬を開発しようと考えた。私たちはこれまでに、Robo4 が、内皮細胞間の VE-cadherin を介する接着を安定化して、炎症時の内皮細胞の透過性を抑制することを明らかにしてきた⁴。この知見を踏まえ、内皮細胞における Robo4 発現を増やすことで、血

管透過性を抑制し、重症感染症の病態を治療できるのではないかと考えた。この戦略の妥当性を解析するために、内皮細胞の Robo4 の発現量を特異的に増やした遺伝子改変マウスを作製したところ、予想通り、血管透過性と重症感染症病態が緩和された⁵。この結果を踏まえ、内皮細胞における Robo4 発現を増やす低分子薬の開発に着手した。

Robo4 の発現を調節するメカニズムの解析⁵

Robo4 発現を増やす薬の開発に向け、Robo4 の発現量を調節する仕組みを解析した。Robo4 発現量を増減させるシグナル伝達系を探索するために、Robo4 の転写調節配列^{6,7}を用いて発現量の変化を発光強度により解析できる細胞株を作製し、約 2000 個の低分子化合物を含むライブラリから Robo4 発現量を変化させる化合物を探索した。その結果、Robo4 の発現を抑制する化合物として ALK5 と呼ばれる受容体に対する阻害剤が同定された。ALK5 はリガンドである TGF- β と結合し、細胞内の転写を調節するタンパク質である SMAD2/3 を活性化してシグナルを伝達していくことが知られていた。このシグナルに着目した解析から、この TGF- β -ALK5-SMAD2/3 のシグナルが Robo4 発現を増やすことが示された。一方で、このシグナルと競合的に働くシグナル伝達系として知られていた BMP9-ALK1-SMAD1/5 シグナルは Robo4 発現を抑制することが明らかになった。これらの結果から、Robo4 の発現量は、ALK5 と ALK1 を介する 2 つのシグナルでそれぞれ正と負に制御されることが示された。

ALK1 阻害剤が重症感染症モデルマウスの血管透過性と病態に与える影響⁵

私たちは、Robo4 発現を調節するシグナル伝達系の解析結果を踏まえ、Robo4 発現を減らす ALK1 シグナルの阻害剤が、Robo4 発現を増やす薬になる可能性を考えた。ALK1 阻害剤をマウスに投与すると、肺における Robo4 発現が増加した。また、ALK1 阻害剤を事前に投与したマウスは、細菌の膜成分であるリポ多糖を投与した敗血症マウスの肺血管透過性と死亡率を抑制した。この ALK1 阻害剤の効果は、Robo4 を持たないマウスでは観察されなかったことから、ALK1 阻害剤は Robo4 発現促進

を介して、敗血症マウスの肺の血管透過性を抑制し、病態を緩和したことが示された。

また、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。ALK1 阻害剤を気道チップの内皮細胞に処理したところ、新型コロナウイルスが誘導する透過性の過剰亢進が抑制された。さらに、ALK1 阻害剤の投与は、新型コロナウイルス感染マウスの肺障害と死亡率を抑制した。これらの結果から、Robo4 発現を増やす薬で、血管透過性の過剰亢進を抑制し、敗血症や新型コロナウイルスの病態を緩和できることが示された。

おわりに

今回の研究から、新型コロナウイルスが内皮細胞間の接着分子の発現を抑制することで、血管透過性の過剰な亢進を誘導し、病態を進展させること、また、内皮細胞間の接着を強める分子を増やす薬で、血管透過性亢進と死亡率を抑制できることを示すことができた。今回提案した血管透過性抑制薬は、病原体の種類を問わない作用機序のため、今後問題となるワクチンや治療薬が存在しない新たな病原体による重症感染症にも適用できる可能性がある。今後、将来のパンデミックに備え、様々な血管透過性抑制薬の候補分子が開発され、実用化されることを期待したい。

謝辞

本研究をご支援くださった先生方、学生の皆様に心から感謝致します。

参考文献

1. Cerutti, C. & Ridley, A.J. Endothelial cell-cell adhesion and signaling. *Exp Cell Res* **358**, 31-38 (2017).
2. Dejana, E., Orsenigo, F. & Lampugnani, M.G. The role of adherens junctions and VE-cadherin in the control of vascular permeability. *J Cell Sci* **121**, 2115-2122 (2008).
3. Hashimoto, R. *et al.* SARS-CoV-2 disrupts respiratory vascular barriers by suppressing Claudin-5 expression. *Sci Adv* **8**, eabo6783 (2022).
4. Shirakura, K. *et al.* The Robo4-TRAF7 complex suppresses endothelial hyperpermeability in inflammation. *J Cell Sci* **132** (2019).
5. Morita, M. *et al.* Upregulation of Robo4 expression by SMAD signaling suppresses vascular permeability and mortality in endotoxemia and COVID-19 models. *Proc Natl Acad Sci U S A* **120**, e2213317120 (2023).
6. Okada, Y. *et al.* A GABP-binding element in the Robo4 promoter is necessary for endothelial expression in vivo. *Blood* **112**, 2336-2339 (2008).
7. Okada, Y. *et al.* A three-kilobase fragment of the human Robo4 promoter directs cell type-specific expression in endothelium. *Circ Res* **100**, 1712-1722 (2007).