

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 4 月 10 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293014

研究課題名(和文) 血管と免疫のクロストークによる敗血症発症機構の解明と治療薬開発への応用

研究課題名(英文) Novel anti-sepsis strategy targeting the endothelial cell-specific receptor Robo4

研究代表者

岡田 欣晃 (Okada, Yoshiaki)

大阪大学・薬学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：50444500

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：敗血症は病原体感染などに起因する全身性急性炎症疾患であり、世界で年間800万人が死亡する驚異的疾患である。現在治療には、病原体や免疫系を標的とする治療薬が用いられているが、その効果は限定的であり新規治療薬開発が望まれている。そこで我々は敗血症治療の新標的として血管に着目し、血管特異的な受容体Robo4の機能の解析を行った。その結果、Robo4が血管内皮細胞と免疫細胞からの炎症性サイトカイン産生を制御するメカニズムが解明されるとともに、Robo4発現抑制が敗血症治療の新戦略となる可能性を見出した。また、本戦略での新規治療薬開発のためのスクリーニング系の構築にも成功した。

研究成果の概要(英文)：The goal of our study is to develop a new drug to treat sepsis. Although antibiotics and steroids have been used for the treatment of sepsis, their effects are limited. To develop new anti-sepsis drugs targeting vascular blood vessels, we focused on Robo4 that is a transmembrane receptor specifically expressed in endothelial cells. In this study we demonstrated that Robo4 downregulation suppresses IL-6 production not only from endothelial cells but also from monocytes through a crosstalk with GM-CSF, suggesting a new anti-sepsis strategy using molecules that inhibit Robo4 expression. To this end, we established a screening system for small molecules that suppress Robo4 expression.

研究分野：血管生物学

キーワード：Robo4 敗血症 血管内皮細胞 炎症 単球 インターロイキン6 治療薬 低分子化合物

### 1. 研究開始当初の背景

敗血症の重篤な全身性炎症病態は、感染により惹起される血中サイトカイン濃度の過剰産生(サイトカインストーム)により引き起こされる。特にIL-6やVEGFなどの濃度上昇は、免疫の過活性化や血管透過性の過剰亢進を介して、ショックや多臓器不全など敗血症の致死的病態を誘導する。現在、世界的な治療ガイドラインに沿って、抗生物質やステロイドを用いた治療が行われているがその効果は限定的である。このため未だ不明な点の多い敗血症発症メカニズム解明と、新しいサイトカインストーム抑制治療法の開発が急務である。

### 2. 研究の目的

我々はこれまでに血管内皮細胞特異的受容体Robo4のノックアウトマウスを用いた解析から、Robo4が敗血症モデルにおける炎症性サイトカイン産生の促進に寄与することを見出している。また、培養細胞を用いた解析から、Robo4の発現抑制がLPSなどの炎症メディエーターにより誘導される内皮細胞、およびそこに接着する単球からの炎症性サイトカイン(IL-6など)産生を抑制することを見出した。そこで本研究では、(1)Robo4がどのようなシグナル伝達系を介してIL-6発現を制御するのか、またRobo4がどのようなクロストークを介して単球からのIL-6産生を制御するのかを解析する。得られた結果から、Robo4発現抑制がマウス敗血症病態を緩和させるメカニズムを解明する。また、(2)Robo4発現抑制による敗血症治療の可能性を検討すると共に、敗血症治療薬としてのRobo4発現を制御する低分子治療薬のスクリーニング系を構築する。

### 3. 研究の方法

(1)Robo4の発現抑制が血管内皮細胞からのIL-6産生を抑制するメカニズムを解明するために、Robo4の細胞内ドメイン結合タンパク質の精製と同定を行う。ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)にアデノウイルスを用いてFlagタグ付きRobo4を発現させ、免疫沈降法によりRobo4の相互作用タンパク質を精製する。得られたサンプル中のタンパク質を質量分析により同定する。次に、Robo4の発現抑制が内皮細胞に接触する単球からのIL-6産生を抑制するメカニズムを解析する。HUVECと単球系細胞(U937)の共培養系を用いて、両細胞のクロストークに寄与する相互作用タンパク質もしくは液性因子を同定する。

(2)Robo4発現抑制による敗血症治療の可能性を検討するために、Robo4 siRNAをマウスに導入し、敗血症治療効果を検証する。また、Robo4発現を効果的に抑制する低分子化合物開発を目指し、これまでに同定したRobo4発現抑制分子(Trichostatin A: TSA)の標的分子の同定および、TSAを用いたスクリーニング

系を構築する。

### 4. 研究成果

(1)Robo4が内皮細胞からのIL-6産生を抑制するメカニズムを解明するために、Robo4-Flag発現用アデノウイルスベクターを内皮細胞(HUVEC)に感染させ、免疫沈降によりRobo4細胞内ドメイン相互作用タンパク質を精製した。得られたサンプルを質量分析装置を用いて解析し、新規Robo4細胞内領域結合タンパク質3種を同定することに成功した。このうち、1種のタンパク質は炎症シグナル伝達分子のファミリーに属し、内皮細胞からの炎症性サイトカイン産生調節に寄与した。本結果から、Robo4が本結合分子を介して炎症下における内皮細胞からのサイトカイン産生を調節することが示された。

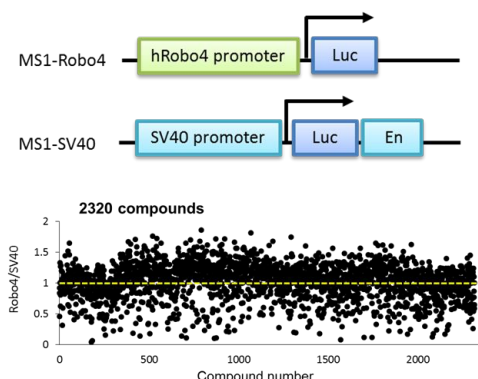
次に、Robo4が接着する単球からのIL-6産生を抑制するメカニズムを解明するために、内皮細胞から分泌される単球制御因子(IL-8、GM-CSF)に着目し解析を行った。LPS処理した内皮細胞に単球を積層した共培養系に、IL-8、GM-CSF抗体を添加したところ、GM-CSF抗体添加時のみIL-6産生が強く抑制された。また、内皮細胞におけるRobo4の発現抑制は、GM-CSFの産生量を有意に減少させた。本結果から、Robo4は炎症下の内皮細胞からのGM-CSF産生を促進することで、単球からのIL-6産生を促進することが明らかになった。以上の結果から、Robo4の発現抑制が内皮細胞、単球からのIL-6産生を抑制するメカニズムの解明に成功した。

(2)Robo4発現抑制による敗血症治療が可能であるかを検証するために、Robo4 siRNAが敗血症病態に与える影響を評価した。Robo4発現をin vitroで90%抑制するsiRobo4を敗血症およびコントロールマウスに投与後、各臓器におけるRobo4発現量およびマウス生存時間の解析を行った。その結果、siRobo4はマウス肺のRobo4発現を50%抑制し、敗血症マウスの生存時間を延長させた。またこの時、一部の炎症性サイトカインの血中濃度の抑制がみられた。本結果から、siRobo4が敗血症病態を緩和させることが示唆された。

次に、Robo4発現抑制活性をもつ低分子化合物ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤Trichostatin A(TSA)が、Robo4発現を抑制するメカニズムを解析した。レポーターアッセイ、ゲルシフトアッセイを用いた解析から、TSAの応答配列がRobo4近位プロモーターに存在すること、またTSAはこの領域に結合する転写活性化因子SP1、GABPの結合に影響を与えないことを見出した。また、Robo4発現抑制に寄与するヒストン脱アセチル化酵素のサブタイプ2種類を同定することに成功した。

最後に、TSAとRobo4プロモーターレポーター配列を安定導入したマウス内皮細胞株

を用いた Robo4 発現制御化合物のスクリーニング系を構築した。予備検討において本スクリーニング系が良好に作動することを確認した(図1)。



**図1 Robo4 発現制御分子のスクリーニング細胞と予備スクリーニング結果**

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計8件)

Tanaka T, Maekawa N, Kashio T, Izawa K, Ishiba R, Shirakura K, Ishimoto K, Hino N, Aird WC, Doi T, Okada Y. Tumor necrosis factor  $\alpha$  induces the expression of the endothelial cell-specific receptor Roundabout4 through the nuclear factor- $\kappa$ B pathway. *Biol Pharm Bull.* 2017; 40(4):504-509. 査読有  
DOI: 10.1248/bpb.b16-00938

Kita A, Hino N, Higashi S, Hirota K, Narumi R, Adachi J, Takafuji K, Ishimoto K, Okada Y, Sakamoto K, Tomonaga T, Takashima S, Mizuguchi H, Doi T. Adenovirus vector-based incorporation of a photo-cross-linkable amino acid into proteins in human primary cells and cancerous cell lines. *Sci Rep.* 2016; 6:36946. 査読有  
DOI: 10.1038/srep36946

Hashimoto Y, Kawahigashi Y, Hata T, Li X, Watari A, Tada M, Ishii-Watabe A, Okada Y, Doi T, Fukasawa M, Kuniyasu H, Yagi K, Kondoh M. Efficacy and safety evaluation of claudin-4-targeted antitumor therapy using a human and mouse cross-reactive monoclonal antibody. *Pharmacol Res Perspect.* 2016; 4(5):e00266. 査読有  
DOI: 10.1002/prp2.266

Hashimoto Y, Tada M, Iida M, Nagase S,

Hata T, Watari A, Okada Y, Doi T, Fukasawa M, Yagi K, Kondoh M. Generation and characterization of a human-mouse chimeric antibody against the extracellular domain of claudin-1 for cancer therapy using a mouse model. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016; 477(1):91-5. 査読有  
DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.06.025

Ishimoto K, Kawamata N, Uchihara Y, Okubo M, Fujimoto R, Gotoh E, Kakinouchi K, Mizohata E, Hino N, Okada Y, Mochizuki Y, Tanaka T, Hamakubo T, Sakai J, Kodama T, Inoue T, Tachibana K, Doi T. Ubiquitination of Lysine 867 of the Human SETDB1 Protein Upregulates Its Histone H3 Lysine 9 (H3K9) Methyltransferase Activity. *PLoS One.* 2016; 11(10):e0165766. 査読有  
DOI: 10.1371/journal.pone.0165766

Okada Y, Naruse H, Tanaka T, Funahashi N, Regan ER, Yamakawa K, Hino N, Ishimoto K, Doi T, Aird WC. Expression of the Robo4 receptor in endothelial cells is regulated by two AP-1 protein complexes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015; 467(4):987-91. 査読有  
DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.10.029

Okada Y, Funahashi N, Tanaka T, Nishiyama Y, Yuan L, Shirakura K, Turjman AS, Kano Y, Naruse H, Suzuki A, Sakai M, Zhixia J, Kitajima K, Ishimoto K, Hino N, Kondoh M, Mukai Y, Nakagawa S, Garcia-Cardena G, Aird WC, Doi T. Endothelial cell-specific expression of roundabout 4 is regulated by differential DNA methylation of the proximal promoter. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014; 34(7):1531-8. 査読有  
DOI: 10.1161/ATVBAHA.114.303818

Okada Y. Regulation of endothelial cell-specific Robo4 gene expression by DNA methylation and non-lineage specific transcription factors. *Yakugaku Zasshi.* 2014; 134(7):817-21. 査読有  
DOI: 10.1248/yakushi.13-00258

[学会発表](計19件)

Yoshiaki Okada, Keisuke Shirakura, Kiichiro Yano, Naoya Shigesada, Yu Fukushima, Ryosuke Ishiba, Taito Kashio, William C. Aird, Takefumi Doi. Novel anti-sepsis strategy targeting the endothelial cell-specific receptor Robo4, 第2回春期特別日本血管生物医学学会シンポジウム 2016年6月3日 大阪大学微生物病研究

所(大阪), 口頭発表

白倉圭佑, William Aird, 岡田欣晃, 土井健史, Robo4 が炎症時の血管透過性を制御するメカニズムの解析, 第 17 回 Pharmaco-Hematology シンポジウム, 2016 年 9 月 3 日, 帝京大学板橋キャンパス(東京), 口頭発表

田中亨, 岡村麻紀, 川端健二, 岡田欣晃, 土井健史, 血管内皮細胞特異的 Robo4 発現が生み出されるメカニズムの解明, 第 17 回 Pharmaco-Hematology シンポジウム, 2016 年 9 月 3 日, 帝京大学板橋キャンパス(東京), 口頭発表

Keisuke Shirakura, Toru Tanaka, William C. Aird, Takefumi Doi, Yoshiaki Okada, Roundabout4 suppresses TNF $\alpha$ -induced vascular hyperpermeability via TRAF7, 19th International Vascular Biology Meeting, 2016 年 11 月 2 日, 米国ボストン, ポスター発表

田中亨, 血管内皮細胞特異的な Robo4 プロモーターの DNA メチル化パターン形成機構の解明, 第三回日本血管生物医学会若手研究会, 2017 年 3 月 3 日, 淡路夢舞台国際会議場(兵庫), 口頭発表

白倉圭佑, 炎症時の血管透過性を制御する Robo4 細胞内シグナルの解明, 第三回日本血管生物医学会若手研究会, 2017 年 3 月 3 日, 淡路夢舞台国際会議場(兵庫), 口頭発表

前河直樹, 田中亨, 櫻尾泰斗, William C. Aird, 岡田欣晃, 土井健史, TNF- $\alpha$  は NF- $\kappa$ B 経路を介して血管内皮細胞特異的受容体 Robo4 の発現を促進する, 2017 年 3 月 25 日, 日本薬学会第 137 年会, 仙台国際センター(宮城県)口頭発表

田中 亨, 間庭佑典, 岡田淳雅, 川端健二, Aird WC, 岡田欣晃, 土井健史, Robo4 プロモーターの血管内皮細胞特異的な DNA メチル化パターン形成に寄与する因子の探索, 第 9 回日本エピジェネティクス研究会年会, 2015 年 5 月 25 日, 学術総合センター橋講堂(東京)ポスター発表

重定直弥, 真鍋詩織, 山本奈那, William Aird, 岡田欣晃, 土井健史, 血管内皮細胞特異的受容体を標的とする新規全身性炎症治療薬の開発, 第 14 回次世代を担う若手ファーマ・バイオフォーラム 2015, 2015 年 9 月 12 日, 千葉大学亥鼻キャンパス(千葉), 口頭発表

岡田欣晃, Robo4 発現抑制分子を用いた新規敗血症治療戦略の可能性, 第二回血管生物医学会若手研究会, 2016 年 3 月 5 日, 東北大学(宮城), 口頭発表

白倉圭佑, Robo4 強制発現が炎症下の血管透過性制御に与える影響について, 第二回血管生物医学会若手研究会, 2016 年 3 月 5 日, 東北大学(宮城), 口頭発表

山本浩樹, 井口大輔, 早石知浩, Susanne M. KRUG, Michael FROMM, 渡利彰浩, 岡田欣晃, 竹田浩之, 永浜政博, 土井健史, 澤崎達也, 近藤昌夫, 八木清仁, Tricellular tight junction を標的とした新規バリア制御技術, angubindin-1 の開発, 日本薬学会第 136 年会, 2016 年 3 月 28 日, 横浜(神奈川)口頭発表

松田 基, 橋本洋佑, 川東祐美, 畑 智幸, 渡利彰浩, 近藤昌夫, 岡田欣晃, 多田 稔, 石井明子, 深澤征義, 土井健史, 八木清仁, Claudin を標的とした創薬基盤技術の開発 ~ claudin-4 を標的としたがん治療戦略の有効性及び安全性の評価 ~, 日本薬学会第 136 年会, 2016 年 3 月 29 日, 横浜(神奈川), ポスター発表

Yoshiaki Okada, Nobuaki Funahashi, Yuji Nishiyama, Toru Tanaka, Keisuke Shirakura, Yusuke Maniwa, William C. Aird, Takefumi Doi, DNA methylation of the proximal promoter regulates endothelial cell-specific Robo4 gene expression, The 18<sup>th</sup> International Vascular Biology Meeting (国際), 2014 年 4 月 14 日, みやこめっせ(京都), ポスター発表

白倉圭佑, 酒井美貴, 福島 優, 真鍋詩織, William Aird, 岡田欣晃, 土井健史, 血管内皮細胞特異的受容体 Robo4 の炎症応答における役割, 第 15 回 Pharmaco-Hematology シンポジウム, 2014 年 5 月 24 日, 名古屋市立大学大学院薬学研究科(愛知), 口頭発表

Keisuke Shirakura, Miki Sakai, Yu Fukushima, Shiori Manabe, William C. Aird, Yoshiaki Okada, Takefumi Doi, Roles of Endothelial cell specific receptor, Robo4 in inflammatory response, 第 8 回 SKO シンポジウム(国際), 2014 年 6 月 10 日, 大阪大学銀杏会館(大阪), 口頭発表

真鍋詩織, 山本奈那, Aird WC, 岡田欣晃, 土井健史, Robo4 発現抑制による炎症抑制機構の解析と敗血症治療薬開発への応用, 第 64 回日本薬学会近畿支部総会・大会, 2014 年 10 月 11 日, 京都薬科大学(京都), 口頭発表

山内沙織, 白倉圭佑, William C Aird, 岡田欣晃, 土井健史, 血管内皮細胞特異的受容体 Robo4 の血管透過性制御における役割, 第 64 回日本薬学会近畿支部総会・大会, 2014 年 10 月 11 日京都薬科大学(京都)ポスター発表

岡田欣晃, 血管内皮細胞特異的受容体 Robo4 の敗血症治療標的としての可能性, 第 1 回血管生物若手研究会, 2015 年 2 月 6 日, 東京大学医学部(東京), 口頭発表

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称: Claudin 5 抗体、及びその抗体を含有する医薬品

発明者: 岡田欣晃, 近藤昌夫, 橋本洋佑, 白倉圭佑, 土井健史, 八木清仁, 竹田浩之, 澤崎達也

権利者: 大阪大学

種類: 特許

番号: 特許願 2016-237370 号

出願年月日: 2016 年 12 月 7 日

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.phs.osaka-u.ac.jp/homepage/b018/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

岡田 欣晃 (OKADA, Yoshiaki)  
大阪大学・薬学研究科・准教授  
研究者番号: 50444500

### (2) 研究分担者

土井 健史 (DOI, Takefumi)  
大阪大学・薬学研究科・教授  
研究者番号: 00211409

### (3) 連携研究者

藤尾 慈 (FUJIO, Yasushi)  
大阪大学・薬学研究科・教授  
研究者番号: 20359839

黒田 悦史 (KURODA, Etsushi)  
大阪大学・免疫学フロンティアセンター・特任准教授  
研究者番号: 10299604

### (4) 研究協力者

William Aird (Aird, William)  
Harvard Medical School・教授