

News Release



2022年9月22日

京都大学 iPS 細胞研究所(CiRA)

大阪大学大学院薬学研究科

新型コロナウイルスが血管へ侵入するメカニズムを解明

～Claudin-5 発現抑制による呼吸器の血管内皮バリア破壊～

ポイント

- 新型コロナウイルスは Claudin-5 の発現を抑制し、呼吸器の血管内皮バリアを破壊する。
- 気道チップを用いて新型コロナウイルスによる呼吸器の血管内皮バリア破壊の機序を解明した。
- フルバスタチンにより、新型コロナウイルスによる呼吸器の血管内皮バリア破壊を治療できる。

1. 要旨

橋本 里菜 研究員(CiRA 増殖分化機構研究部門)、高橋 潤也 大学院生(大阪大学大学院薬学研究科 臨床薬効解析学分野)、高山 和雄 講師(CiRA 同部門)、岡田 欣晃 准教授(大阪大学同分野)らの研究グループは、新型コロナウイルス(SARS-CoV-2)^{注1}が、血管内皮細胞間の密着結合に関わる Claudin-5(CLDN5)^{注2}の発現を抑制することで血管内皮バリアを破壊し、血管内へと侵入することを明らかにしました。

SARS-CoV-2 は、呼吸器上皮細胞に感染したのち、血管を介して他の臓器に伝播します。このとき、SARS-CoV-2 は呼吸器から血管の壁(血管内皮細胞^{注3}のバリア)をこえて血管内に侵入しますが、そのメカニズムは不明でした。研究グループは、気道上皮細胞と血管内皮細胞で構成された気道チップ^{注4}を使用して、SARS-CoV-2 が血管内皮細胞間の密着結合に関わる CLDN5 の発現を抑制し、Vascular endothelial-cadherin(VE-cadherin)による血管内皮細胞間の接着結合を減弱させることで、血管内皮バリアを破壊することを見出しました。実際、新型コロナウイルス感染症(COVID-19)患者さんの肺において CLDN5 の遺伝子およびタンパク質発現量が減少していることを確認しました。また、血管内皮細胞の CLDN5 の発現量を、遺伝子導入や低分子薬(フルバスタチン^{注5})で増加させることで、SARS-CoV-2 による血管内皮バリア破壊を抑止することができました。これらの結果から、CLDN5 の発現抑制は、SARS-CoV-2 による血管内皮バリア破壊による呼吸器病態の進展と重症化に重要なメカニズムであり、CLDN5 の発現促進が COVID-19 の新しい治療戦略となることが示されました。また、COVID-19 患者さんの呼吸器病態の再現と治療薬の探索ができる気道チップ技術は、今後 COVID-19 を含む重症呼吸器感染症の病態解明と治療薬開発のための優れたツールとなることが期待されます。

この研究成果は 2022 年 9 月 22 日(日本時間)に「Science Advances」でオンライン公開されました。

2. 研究の背景

血管内皮細胞は SARS-CoV-2 感染受容体であるアンジオテンシン変換酵素 2 (ACE2)^{注6} の発現量が少ないため、SARS-CoV-2 にほとんど感染しません。しかし、COVID-19 患者さんでは、血管炎や血管内皮バリア破壊が観察されます。血管内皮バリアが破壊されると、SARS-CoV-2 が血管を介して、呼吸器から他臓器へ移動するのを促進するだけでなく、肺の血管外への免疫細胞や血液成分の浸潤を促し、肺炎や急性呼吸窮迫症候群 (ARDS)^{注7} などの重症病態を誘発します。SARS-CoV-2 による血管内皮バリア破壊は、COVID-19 患者さんにおいて阻止すべき重大な問題ですが、そのメカニズムはほとんど解明されていません。

本研究では、SARS-CoV-2 に感染させた気道チップのヒト肺血管内皮細胞 (HMVEC-L) の包括的な遺伝子発現を解析し、SARS-CoV-2 による血管内皮バリア破壊に寄与する遺伝子として CLDN5 を特定しました。さらに、CLDN5 の機能解析を進めるとともに、CLDN5 が COVID-19 の創薬ターゲットになりうるか検討しました。

3. 研究結果

1) 気道チップによる SARS-CoV-2 による血管内皮バリア破壊の再現

SARS-CoV-2 による血管内皮バリアの破壊および呼吸器から血管への移行を模倣するために、気道チップを使用しました。気道チップは、気道上皮細胞 (線毛細胞、クラブ細胞、杯細胞、基底細胞) と HMVEC-L で構成され、気道チャンネルおよび血管チャンネルにそれぞれ空気および培地を流すことにより、気道における微小環境を再現できます (図 1A)。気道チャンネルにおけるウイルスゲノム量は感染 4 日目にピークに達する一方で、血管チャンネルでは 3 日目に増加し始め感染 7 日目でピークに達しました (図 1B)。以上のように気道チップを用いることにより、SARS-CoV-2 が気道から血管へ漏出する様子を再現することに成功しました。

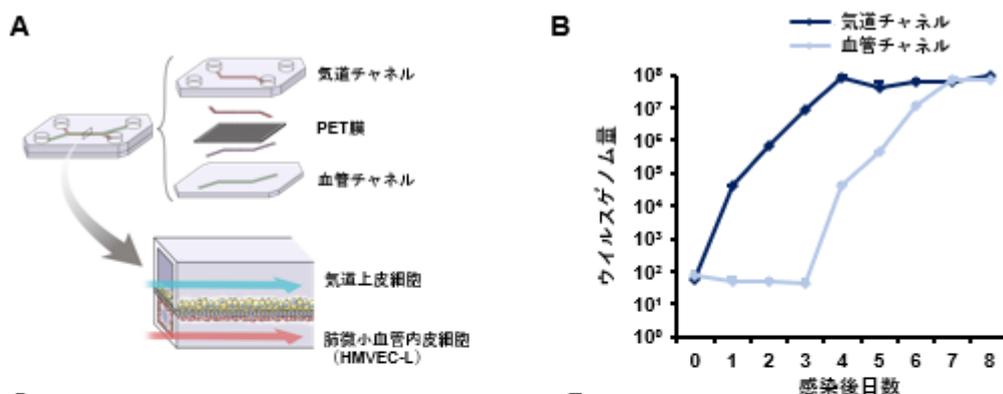


図1: 気道チップを用いた SARS-CoV-2 による血管内皮バリア破壊の再現

(A) 気道チップの概略図。SARS-CoV-2 を気道チャンネルに感染させ 8 日間解析した。(B) 気道および血管チャンネルにおけるウイルスゲノム量の経時変化

2) SARS-CoV-2 による血管内皮バリア破壊の原因遺伝子の探索

遺伝子発現を包括的に調べたところ、感染した気道チップの HMVEC-L においては、細胞接着関連遺伝子発現が減少していました。特定した細胞接着関連遺伝子のうち、CLDN3、CLDN5、PCDHB1、PCDHB8、IGSF9B の遺伝子発現が顕著に減少していました (図 2A)。さらに、これらのうち、CLDN5 の内因性遺伝子発現量が最も高いことが示されました (図 2B)。以上

のことから、CLDN5 は SARS-CoV-2 による血管内皮バリア破壊の原因遺伝子である可能性が示唆されました。

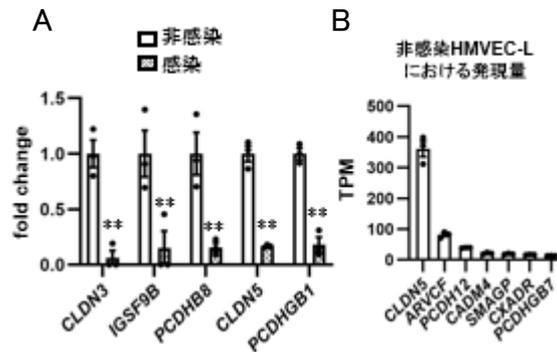


図 2: SARS-CoV-2 による血管内皮バリア破壊の原因遺伝子の探索

(A) 特定した細胞接着関連遺伝子遺伝子のうち、減少が顕著な上位 5 つの遺伝子 * $p < 0.05$ の有意差を示す。(B) 非感染 HMVEC-L における内因性遺伝子発現量が高い上位 7 つの遺伝子

3) SARS-CoV-2 は気道チップ上の HMVEC-L における CLDN5 の発現を抑制する

感染した気道チップ上の HMVEC-L 間の結合部での CLDN5 タンパク質の減少も観察されました(図 3)。VE-cadherin タンパク質の発現量は感染により変化しませんでした。以上のことから、SARS-CoV-2 が HMVEC-L において CLDN5 の発現を抑制し、VE-cadherin の局在を変化させることで、血管内皮バリアを破壊することが示されました。

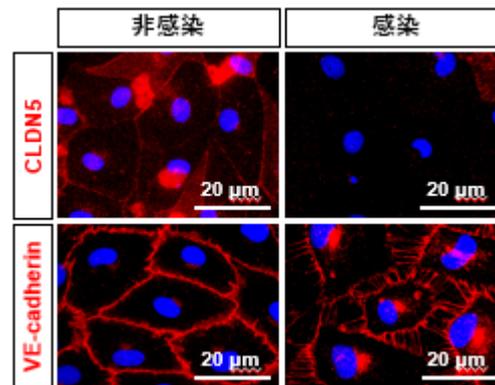


図 3: 気道チップの HMVEC-L における CLDN5 と VE-cadherin 発現解析

非感染、感染時の HMVEC-L における CLDN5 および VE-cadherin タンパク質の局在 ** $p < 0.01$ の有意差を示す。

4) CLDN5 の過剰発現が SARS-CoV-2 による血管内皮バリア破壊を抑制した

ドキシサイクリン(DOX)作用により、CLDN5 の発現量が上昇する HMVEC-L を作製しました(図 4A)。CLDN5 の過剰発現は、SARS-CoV-2 の血管チャネルへの侵入および VE-cadherin を介した細胞間接着の減弱を防止しました(図 4B, 4C)。以上の結果から、HMVEC-L における CLDN5 の過剰発現が、SARS-CoV-2 による血管内皮バリア破壊を抑制することが示されました。

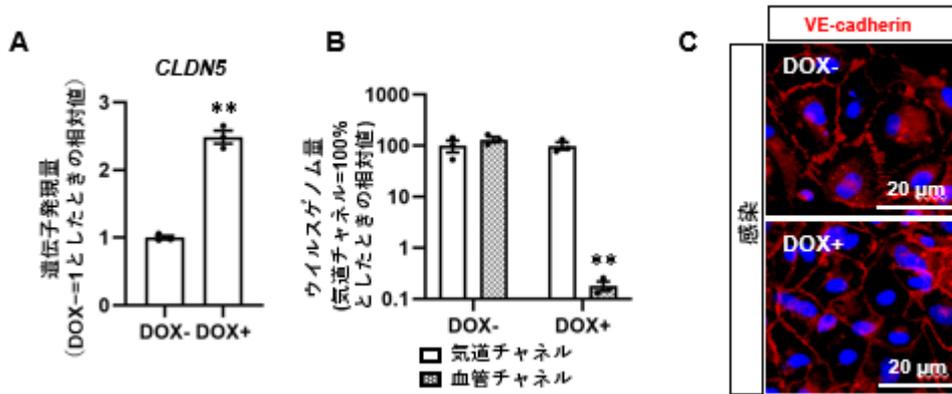


図 4: CLDN5 過剰発現 HMVEC-L を用いた SARS-CoV-2 感染実験

(A) CLDN5 発現誘導可能な HMVEC-L に DOX を作用させた際の CLDN5 の遺伝子発現量 (B) DOX 作用による気道および血管チャンネル中のウイルスゲノム量の変化 (C) DOX 作用による VE-cadherin の局在変化 *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ の有意差を示す。

5)フルバスタチン誘導性の CLDN5 の発現上昇が SARS-CoV-2 による血管内皮バリア破壊を抑制した

スタチン治療により COVID-19 患者さんの死亡率が低下することが報告されています。スタチンの一種であるシンバスタチンは、肺動脈内皮細胞における CLDN5 発現を増加させることにより急性肺損傷を軽減することも報告されています。

本研究では、HMVEC-L にフルバスタチンを作用させたところ、CLDN5 の遺伝子発現量を増加できることを確認しました(図 5A)。また、SARS-CoV-2 の血管チャンネルへの侵入および VE-cadherin を介した細胞間接着の減弱を部分的に防止しました(図 5B, 5C)。以上の結果から、フルバスタチンは CLDN5 の発現を増加させ、SARS-CoV-2 による血管内皮バリア破壊を抑制することが示唆されました。

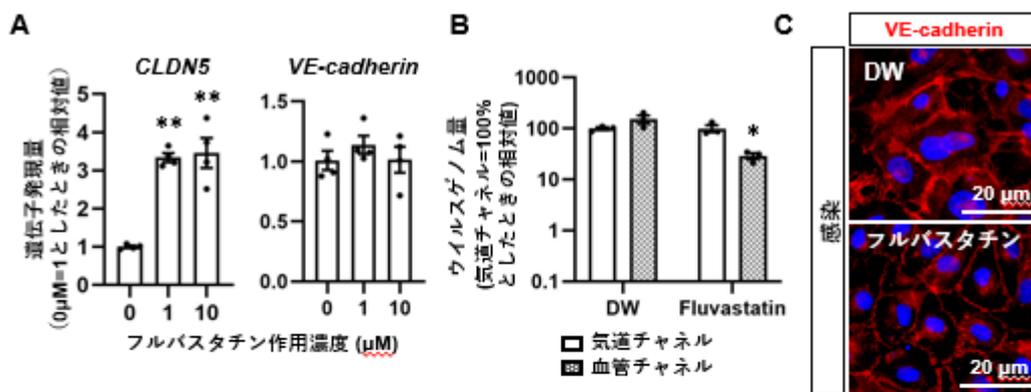


図 5: フルバスタチンを作用させた HMVEC-L を用いた SARS-CoV-2 感染実験

(A) フルバスタチン作用時の HMVEC-L における CLDN5、VE-cadherin 遺伝子発現量 (B) フルバスタチン作用による気道および血管チャンネル中のウイルスゲノム量の変化 (C) フルバスタチン作用による VE-cadherin の局在変化 *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ の有意差を示す。

6) COVID-19 患者さんにおける CLDN5 発現

COVID-19 と CLDN5 の関係を調べるために、健常人および COVID-19 患者さんの肺の検体を用いて CLDN5 の発現を解析しました。COVID-19 患者さんの肺において、CLDN5 の遺伝子発現量が低下していました。また、CLDN5 タンパク質がほとんど消失してしまいました(図 6A)。さらに、重症度の異なる COVID-19 患者さんの血清中の CLDN5 濃度を測定したところ、重症患者さんの血清 CLDN5 濃度(180 pg / mL)は、軽症・中等症患者の血清 CLDN5 濃度(484 pg / mL)よりも低いことがわかりました。(図 6B)。CLDN5 の主な供給源は血管内皮細胞であるため、血清中の CLDN5 の量は、血管内皮細胞における CLDN5 の発現量と相関していると考えられます。以上のことから、CLDN5 の発現低下は、感染した気道チップだけでなく、COVID-19 患者さんの肺においても確認できました。

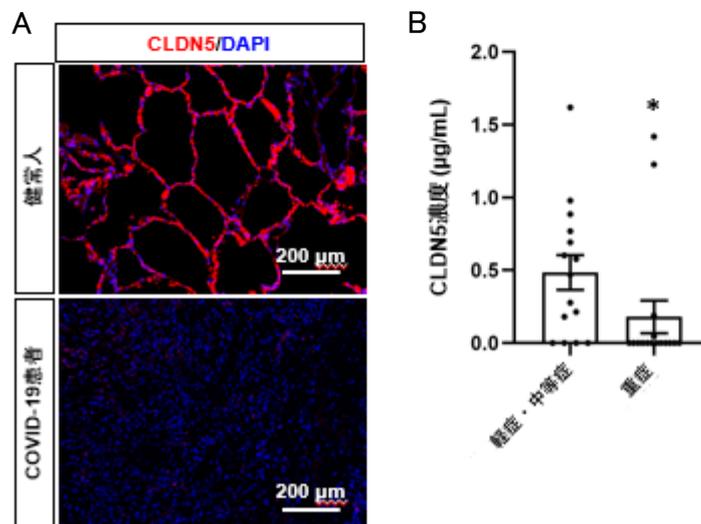


図 6: COVID-19 患者さん肺の検体を用いた解析

(A) 健常人と COVID-19 患者の肺切片の CLDN5 の免疫染色画像 (B) 軽症/中等症、重症の COVID-19 患者血清中の CLDN5 濃度比較 (ELISA) * $p < 0.05$ の有意差を示す。

4. まとめと展望

本研究では、気道チップを用いて、SARS-CoV-2 感染が血管内皮細胞における CLDN5 の発現を抑制することで、血管内皮バリア破壊を誘発することを発見しました。この現象は COVID-19 患者さんの肺でも確認することができました。また、CLDN5 の過剰発現とフルバスタチンの作用により、SARS-CoV-2 によるバリア破壊を抑制できることを明らかにしました。以上の研究を通して、呼吸器における SARS-CoV-2 による血管内皮バリア破壊のメカニズムを発見し、COVID-19 に対する新しい治療戦略を提案しました。

5. 論文名と著者

○ 論文名

“SARS-CoV-2 disrupts respiratory vascular barriers by suppressing Claudin-5 expression”

○ ジャーナル名

Science Advances

○ 著者

Rina Hashimoto^{1#}, Junya Takahashi^{2#}, Keisuke Shirakura², Risa Funatsu², Kaori Kosugi¹, Sayaka Deguchi¹, Masaki Yamamoto³, Yugo Tsunoda^{4,5}, Maaya Morita², Kosuke Muraoka², Masato Tanaka², Tomoaki Kanbara², Shota Tanaka², Shigeyuki Tamiya⁶, Nagisa Tokunoh^{6,7}, Atsushi Kawai^{2,6}, Masahito Ikawa^{2,6,8}, Chikako Ono^{6,8}, Keisuke Tachibana², Masuo Kondoh², Masanori Obana^{2,9,10}, Yoshiharu Matsuura^{6,8}, Akihiro Ohsumi¹¹, Takeshi Noda^{4,5}, Takuya Yamamoto^{1,12,13}, Yasuo Yoshioka^{2,6,7,8,9,10}, Yu-suke Torisawa¹⁴, Hiroshi Date¹¹, Yasushi Fujio^{2,8,9}, Miki Nagao³, Kazuo Takayama^{1,15*}, Yoshiaki Okada^{2,8*}

#筆頭著者 *責任著者

○ 著者の所属機関

1. 京都大学 iPS 細胞研究所 (CiRA)
2. 大阪大学大学院薬学研究科
3. 京都大学大学院医学研究科臨床病態検査学
4. 京都大学医生物学研究所微細構造ウイルス学分野
5. 京都大学大学院生命科学研究科微細構造ウイルス学分野
6. 大阪大学微生物病研究所
7. 一般財団法人阪大微生物病研究会
8. 大阪大学感染症総合教育研究拠点 (CiDER)
9. 大阪大学先導的学際研究機構 (OTRI)
10. 大阪大学国際医工情報センター (MEI)
11. 京都大学医学部附属病院呼吸器外科
12. 理化学研究所革新知能統合研究センター iPS 細胞連携医学的リスク回避チーム
13. 京都大学ヒト生物学高等研究拠点 (ASHBi)
14. 京都大学大学院工学研究科 マイクロエンジニアリング専攻
15. 日本医療研究開発機構革新的先端研究開発支援事業 (AMED-CREST)

6. 本研究への支援

本研究は、主に以下の支援を受けて実施されました。

- 京都大学基金 iPS 細胞研究基金
- 公益財団法人 三菱財団
- 公益財団法人 千里ライフサイエンス振興財団
- 国立研究開発法人日本医療研究開発機構 (20fk0108533h0001, 22gm1610005h0002, JP21am0101084, JP21am0101123)
- 日本学術振興会 科学研究費助成事業 (20H03382, 20K21481)
- 公益財団法人 武田科学振興財団

7. 用語説明

注 1) SARS-CoV-2

新型コロナウイルス(severe acute respiratory syndrome coronavirus 2)。新型コロナウイルス感染症(COVID-19)の原因ウイルス。

注 2) Claudin-5

肺や脳に発現する約 23 kDa の 4 回膜貫通タンパク質であり、肺の血管内皮バリアや脳の血液脳関門バリアの制御に関与。

注 3) 血管内皮細胞

血管の内側をおおう細胞。この細胞どうしが接着することにより血管内皮のバリア機能が生み出され、物質や免疫細胞の通過が制御される。

注 4) 気道チップ

気道における上皮—内皮構造を再現できる培養モデル。マイクロ流体デバイス上に細胞を播種し、気道上皮細胞と血管内皮細胞を動的な環境で培養することで、機能的な気道様構造を作製できる。

注 5) フルバスタチン

血液中のコレステロールを低下させる作用を持ち、高コレステロール血症の治療と心血管疾患の予防に使用されるスタチン系薬剤の一種。

注 6) アンジオテンシン変換酵素 2(ACE2)

SARS-CoV-2 の感染受容体。細胞表面に存在するタンパク質。心臓の保護、血管の拡張、炎症の抑制などの役割がある。SARS-CoV-2 が感染する際に、細胞内にウイルスとともに取り込まれることも知られている。

注 7) 急性呼吸窮迫症候群(ARDS)

肺に液体がたまり、血液中の酸素量が低下することが原因で発生する疾患。重症 COVID-19 でよく見られる症状。