

血管新生因子 Shh

草野 研吾 大江 透

要 旨：hedgehogは胎生期の形態形成に関係する重要なmorphogenである。哺乳類におけるhedgehog familyにはSonic- (Shh), Desert- (Dhh), Indian-hedgehog (Ihh)と3種類のサブタイプが知られている。近年の研究によって、hedgehog系が成体の心血管系にも存在すること、Shhが線維芽細胞を刺激してさまざまな血管新生を促す複数のサイトカインが放出されることが明らかとなり、新たな遺伝子治療のターゲットとして注目されている。(J Jpn Coll Angiol, 2006, 46: 311-316)

Key words: angiogenesis, gene therapy, morphogen

はじめに

遺伝子あるいは、細胞を用いた血管新生療法が循環器領域の次世代の治療として大変注目されており、一部は臨床応用されている。血管新生因子に関しては、Folkmanらによって腫瘍の成長に関与する因子であることが初めて示され¹⁾、その後の研究によってさまざまな血管新生因子、すなわちFGF (fibroblast growth factor), VEGF (vascular endothelial growth factor), HGF (hepatocyte growth factor), HIF (hypoxia-inducible factor)-1などが同定され血管新生に関与していることが明らかになってきた。今回は、新しい血管新生因子であるSonic hedgehog (Shh)を取り上げ、そのユニークな働きについて述べていきたい²⁾。

Sonic hedgehogとは

Sonic hedgehog (Shh)は、hedgehog (HH)ファミリーに属する蛋白質の1つで、1978年にEric Wieschaus (エリック・ヴィーシャウス)とChristiane Nüsslein-Volhard (クリスティアーネ・ニュスライン=フォルハルト)により同定された遺伝子である。1995年に2人はノーベル生理学・医学賞を受賞したが、これらのスクリーニングでショウジョウバエ (*Drosophila*) の胚の分節パターンをコントロールするShh遺伝子が同定された。hedgehogの名前の由来は、このhedgehog遺伝子の機能を失った変異

体の表現型の胚が小さな歯のような突起物に覆われていて、その様子がハリネズミ (hedgehog) に似ていることから名づけられた。

哺乳類には3種類の相同遺伝子があり、先に見つかった2種類、すなわちDesert hedgehog (Dhh), Indian hedgehog (Ihh)が、実在するハリネズミの種類から名づけられたのに対し、Sonic hedgehog (Shh)は、当時人気だったセガのゲームソフトのキャラクターであるソニック・ザ・ヘッジホッグから名づけられた³⁾。

これらの遺伝子 (Shh, Dhh, Ihh) から合成されるhedgehog蛋白質の中で、Shhは胎生期の発生段階において最も重要なmorphogenとして知られている。すなわち、胎生期に発生源から濃度勾配をもって発せられ、その結果として個体発生の際、形態の形成に深くかわることが知られている。哺乳類においてShh系が関連していると考えられている器官は、たとえば、四肢、脳脊髄正中線構造、中枢神経系、肺、胃腸系などである^{4,5)}。Dhhは、骨、軟骨や泌尿性器系に関連することが報告されていて、Ihhは末梢神経、男性生殖腺や内皮細胞に関連することが報告されている^{6,7)}。一方、Shhの遺伝子変異は腹側正中線の欠失が起因する全前脳胞遺残症、Smith-Lemli-Optiz症候群、Gorlin's症候群などの全身疾患を引き起こすことや、Shhの過剰な産生が乳癌、基底細胞癌、横紋筋肉腫、グリア芽腫、骨肉腫などの癌形成にかかわることも知られている。

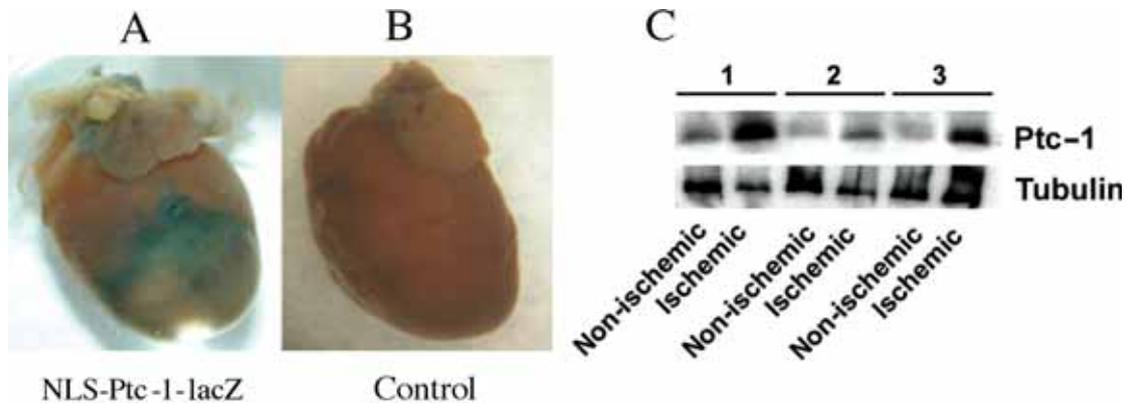


Figure 1 Ptc-1 expression after myocardial ischemia.

A, B: Ligation of the anterior descending coronary artery was performed in NLS (nuclear localized signal)-Ptc-1-lacZ mice. Compared with the control heart, whole mount X-gal staining seven days after myocardial ischemia shows strong upregulation for Ptc-1 in the area surrounding the ischemic myocardium.

C: Western blot analysis of Ptc-1 expression in ischemic and non-ischemic myocardium. Marked Ptc-1 upregulation was observed in the ischemic tissue.

Shhの受容体はpatched-1(Ptc-1)である。このPtc-1は細胞膜のsmoothend(Smo)と結合しているが、ShhがPtc-1に結合するとPtc-1とSmoの結合がはずれ、その下流にある数種類のシグナルが活性化される。その細胞内 transcriptional factorの1つとしてGliが知られている⁸⁾。

成体におけるSonic hedgehogの役割

このように、長年の間、Shhは胎生期の器官発生時期にのみ存在するのではないかと考えられていたが、われわれは、Shhの受容体のPtc-1が、成体の心筋虚血部位に過剰発現していること(Fig. 1), Shh自体が虚血部位で著明に増加していることを報告し、胎生期のみならず、成体においてもhedgehog系が存在することを明らかにした⁹⁾。すでにShh蛋白は近年の研究によって強い血管新生作用を持つことや、神経賦活化作用を持つこと(後述)が報告されているため、成体におけるShh-, Ptc-1-, Gli pathwayが、発生期だけでなく組織傷害時に生じる組織修復の際に何らかの役割を担っている可能性が明らかとなった。

Sonic hedgehogの血管新生作用

Shhに血管新生作用があるであろうということは、発生に関するさまざまな事実から予想されていた。すなわち、Shhヌル変異体では、発生期において肺での血管分岐が生じないこと¹⁰⁾、Shhの過剰発現が背部神経管に

おける神経外胚葉の血管形成に関与していること¹¹⁾など、Shhに関連して血管の形成や発達をコントロールされていることがうかがえる事実が多数報告されていたからである。Polaらは、recombinant Shh蛋白を筋注することによってマウス下肢虚血モデルにおける血管新生をlaser Dopplerを用いた血流測定や組織学的に証明した¹²⁾。一般に血管新生に関与するサイトカインは、直接血管内皮に作用し、血管内皮の増殖や遊走を促す。しかしながらShh蛋白のユニークな点は、血管内皮には直接作用せず、線維芽細胞などの間葉系細胞に作用し、作用した細胞から、さまざまな血管新生に関与するサイトカインの放出(VEGF, angiopoietin-1, -2)を促し、それらのサイトカインが血管内皮に作用して間接的に血管新生に関与するということである。また、Shhをブロックすることによって、下肢虚血によって生じるVEGFの増加が抑制されることから、ShhはVEGFよりも上流で局所の血管新生をコントロールしている可能性が示唆されている¹³⁾。

Shhの投与によって生じた新生血管自体にも特徴があることが報告されている。VEGF投与によって新生される血管が血管内皮のみを有する毛細血管が中心であるのに対し、Shhのそれは、はるかに血管径の大きな、より成熟した血管が形成される。マウスのcorneaモデルでVEGFとShhのpelletを用いて新生された血管を比較するとはるかに血管径の大きな血管が作り出されるこ

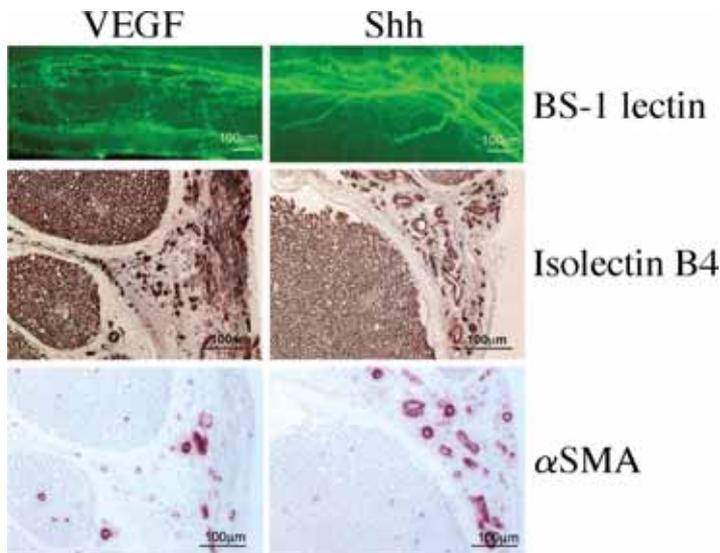


Figure 2 Shh treatment results in larger neovasculature with greater smooth muscle content.

Representative photomicrographs of longitudinal views of BS-1 lectin staining (upper), cross sectional views of isolectin B4 staining (middle) and cross sectional views of α -smooth muscle actin staining (lower). Compared with VEGF-treated nerve (left), the Shh induced vasculature appears larger and contains a greater number of vessels with a smooth muscle cell layer (right).

とがわかる。すでにangiopoietin-1には、pericyteを血管内皮周囲に引き寄せる作用があって血管の成熟に関与するという報告があり、VEGFとangiopoietin-1の同時投与によって、平滑筋を有する血管新生が生じることが報告されている¹⁴⁾。先に述べたようにShhにはangiopoietin-1、VEGFを含む多数の血管新生にかかわる複数のサイトカインを放出することができるため、そういったユニーク作用が成熟した血管新生に関与していることが考えられる。

また、血管新生には血管内皮が増殖・遊走して生じる“angiogenesis”と、血管内皮前駆細胞(endothelial progenitor cell: EPC)⁵⁾が局所に集合・分化して生じる“vasculogenesis”の2つがあることが報告されている^{16,17)}。われわれはこのEPCへの効果を検討した。Shhには線維芽細胞からさまざまなサイトカインを放出させることができるため、EPCを局所に集める作用のあるサイトカイン¹⁸⁾、stromal derived factor-1(SDF-1)の発現を検討したところ、Shhは容量依存性にSDF-1の発現を増加させた⁹⁾。これは、Shhの局所投与によってangiogenesisのみならずvasculogenesisの亢進も生じさせている可能性が考えられる。

さらに最近、ShhのレセプターのPtc-1がEPCにも存在し、Shh投与によってEPCの増殖・遊走・tube formationなど、EPCの分化そのものにShhが直接作用して、血管新生(vasculogenesis)を促すことをわれわれは報告

した¹⁹⁾。こうした結果から、Shhはさまざまな状況(特に組織虚血時)で非常に強力な血管新生因子として作用することがうかがえる。

Sonic hedgehogを用いた血管新生効果(*in vivo*)

(1) 糖尿病性神経障害モデル(Fig. 2)

糖尿病における末梢神経症状には、座骨神経以下の神経周囲のさやあるいは神経内にある血管の消失、すなわち微小循環障害が大きな原因となっていることが報告されている。われわれは、組み換え型Shh蛋白あるいはVEGFプラスミドを糖尿病ラットへ全身投与することによって、神経周囲、神経内の血管新生が惹起され、神経機能が回復することを報告した。組織学的にはVEGFに比べ神経周囲に α 平滑筋陽性のやや太い血管の増生を認め、より成熟した血管新生が生じていることが確認された。同時に、Shh投与によって、dorsal root ganglia(DRG)において内因性の神経賦活化因子(brain derived neurotrophic factor: BDNF, insulin-like growth factor: IGF)の増加が認められ、Shhには血管新生作用だけでなく神経賦活化因子の上昇が神経機能の回復に関与している可能性を報告した²⁰⁾。また、これらのサイトカインの放出には神経線維芽細胞が重要であることを報告した。

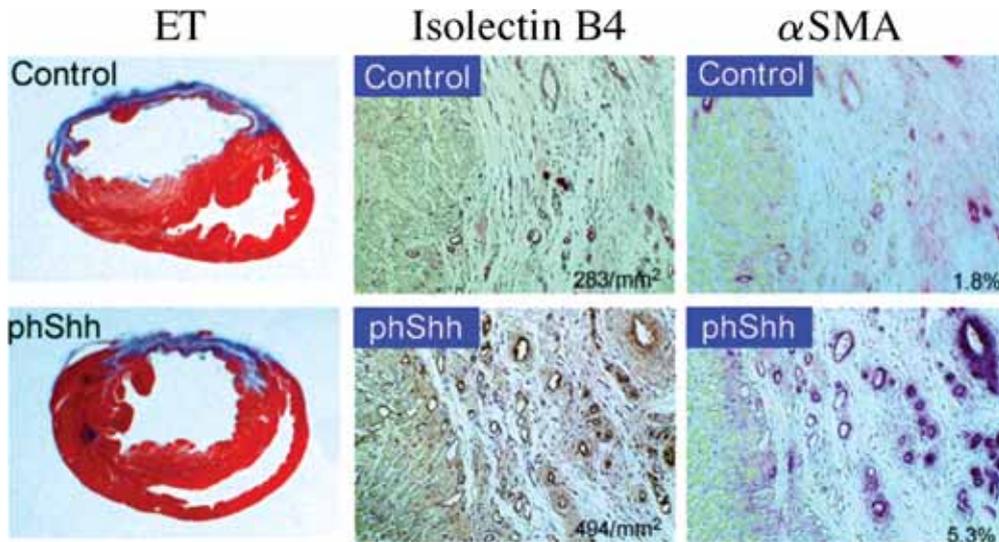


Figure 3 (left) Representative elastic-trichrome (ET) stained sections from rats 4 weeks after phShh vs. control plasmid injection. Left ventricular fibrosis was significantly reduced in rats with phShh-300 and 600 μg group. (middle) Representative immunohistochemical findings for isolectin B4 in ischemic myocardium of rats 4 weeks after phShh injection. Capillary density was significantly preserved in rats with phShh-300 and 600 μg group. (right) Representative immunohistochemical findings for α -smooth muscle actin (αSMA). More smooth muscle actin positive vasculature was observed in phShh injected rat heart.

(2) 虚血性心疾患モデル (Fig. 3, 4)

以上のような結果から、Shhの投与は、心筋梗塞などの虚血性心疾患においても、間質に存在する線維芽細胞からのさまざまなサイトカインの放出を介して血管新生、ひいては組織の修復を促すのではないかと推測できる。言いかえるとhedgehog系をさらに活性化させることは、種々の内因性サイトカインの放出を促し、より強力な修復を促すことができるのではないかと考えられる。しかしながらShh蛋白は非常に半減期が短く(数十分で体内から消失)、Shh蛋白の投与のみでは不十分である。そこでわれわれはヒトShhプラスミドを作成し、その局所投与による遺伝子治療を試みた。プラスミドに挿入した塩基はShhの活性をもつN末600bpを用いた。虚血心モデルは、ラット冠動脈結紮による急性心筋虚血モデルと、ブタ冠動脈へのconstrictor留置による慢性心筋虚血モデルである。前者には、開胸下での直接注入を行い、後者にはNOGAシステム(Cordis社製)を用いカテーテルによる心内膜からの直接注入を行った。いずれのモデルでも注入4週後の評価にて心機能の改善を認め、同時に虚血部位での線維化の減少やNOGAによる虚血領域の減少が確認され

た。組織学的には虚血部位に α 平滑筋陽性のやや太い血管の増生を認め、血管新生が生じていることが確認され(Fig. 3)、心機能の回復に血管新生が大きく関与していることがうかがえた。

さらにTie2/LacZマウスからの骨髄移植キメラマウスを用いてEPCの関与について検討を行ったところ、Shh注入によって有意に骨髄由来のTie2/LacZ細胞、すなわちEPCが局所に集積していることが確認された(Fig. 4)。先に述べたようにShhはSDF-1の増加作用があることが*in vitro*の実験で明らかになっており、このSDF-1の作用によって流血中のEPCが局所に引き寄せられたことが推測された。

また虚血性心疾患における心機能の増悪にはアポトーシスが重要な役割を果たしていることが知られている。IGF-1は心臓において重要な抗アポトーシス効果のあるサイトカインとして知られている。われわれはこのアポトーシスに対するShhの作用も検討した。興味深いことに、Shhは心筋線維芽細胞からのIGF-1の産生を容量依存的に増加させ、マウス心筋虚血モデルにおいて、Shhプラスミドの投与によって強力にアポトーシス心筋細胞が減少していることが観察された。

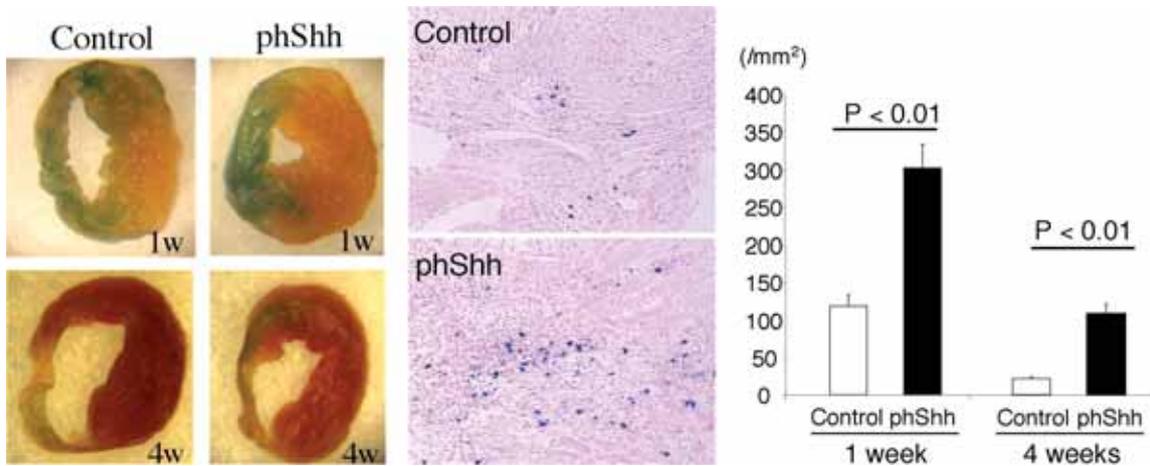


Figure 4 Contribution of bone marrow-derived endothelial progenitor cells (EPCs). (left) Representative macroscopic photograph following X-gal staining of myocardium in Tie-2/LacZ/BMT mice 1 and 4 weeks after MI. X-gal is more evident in the ischemic area in the phShh injected heart 1 week after MI compared with control. Four weeks after MI, evidence of X-gal positivity in the control heart was virtually absent, however weak X-gal expression was still observed in the phShh injected heart. (middle) Representative photomicrographs following X-gal staining of myocardium in Tie-2/LacZ/BMT mice 1 week after MI. X-gal positive cells (blue) indicate Tie-2-expressing BM-derived EPCs. (right) Quantitative analyses of X-gal positive cells between Shh and control groups 1 and 4 weeks after MI. There are significant differences in X-gal positive cells between control and phShh group. n = 5 per group.

(3) wound healingモデル¹⁹⁾

wound healingに血管新生が重要な役割を果たしていることが知られている。Asaiらは、wound repair時に皮膚局所(皮膚線維芽細胞)にShh pathwayが存在することを確認し、糖尿病マウスにおけるwound healingにShh プラスミドを塗布したところ、急速なwound repairが生じたことを報告した。組織学的には骨髄由来のEPC集積がShh投与によって上昇したこと、種々の内因性血管新生サイトカインが上昇していたことを報告し、心筋虚血の修復時と同じように皮膚においてもShh系をターゲットとした治療が有効であることを報告している。

おわりに

このように、Shhを用いた遺伝子治療は血管新生のみならず、さまざまな効果を通じて急性・慢性の組織傷害修復に寄与していることが確認された。近年、幹細胞、すなわち発生に必要な特殊な細胞が再生治療のターゲットとして臨床応用されつつあるがShhのような発生期に重要な役割を果たすmorphogenを用いることは、従来行われてきた単一の血管新生作用のあるサイトカイン治療と異なり、発生にかかわる重要な環境因子も

今後の再生治療のターゲットとなりうると考えられ、今後有望な治療ターゲットになることが期待される。

文 献

- 1) Folkman J, Haudenschild C: Angiogenesis in vitro. *Nature*, 1980, **288**: 551-556.
- 2) Donahue JK: Gene therapy, angiogenesis, Sonic Hedgehog: Sonic The Hedgehog to the rescue? *Gene Ther*, 2006, **13**: 998-999.
- 3) Riddle RD, Johnson RL, Laufer E et al: Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA. *Cell*, 1993, **75**: 1401-1416.
- 4) Zardoya R, Abouheif E, Meyer A: Evolution and orthology of hedgehog genes. *Trends Genet*, 1996, **12**: 496-497.
- 5) Bitgood MJ, McMahon AP: Hedgehog and Bmp genes are coexpressed at many diverse sites of cell-cell interaction in the mouse embryo. *Dev Biol*, 1995, **172**: 126-138.
- 6) Bitgood MJ, Shen L, McMahon AP: Sertoli cell signaling by Desert hedgehog regulates the male germline. *Curr Biol*, 1996, **6**: 298-304.
- 7) St-Jacques B, Hammerschmidt M, McMahon AP: Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation.

- Genes Dev, 1999, **13**: 2072–2086.
- 8)Villavicencio EH, Walterhouse DO, Iannaccone PM: The sonic hedgehog-patched-gli pathway in human development and disease. *Am J Hum Genet*, 2000, **67**: 1047–1054.
 - 9)Kusano KF, Pola R, Murayama T et al: Sonic hedgehog myocardial gene therapy: tissue repair through transient reconstitution of embryonic signaling. *Nat Med*, 2005, **11**: 1197–1204.
 - 10)Pepicelli CV, Lewis PM, McMahon AP: Sonic hedgehog regulates branching morphogenesis in the mammalian lung. *Curr Biol*, 1998, **8**: 1083–1086.
 - 11)Rowitch DH, S-Jacques B, Lee SM et al: Sonic hedgehog regulates proliferation and inhibits differentiation of CNS precursor cells. *J Neurosci*, 1999, **19**: 8954–8965.
 - 12)Pola R, Ling LE, Silver M et al: The morphogen Sonic hedgehog is an indirect angiogenic agent upregulating two families of angiogenic growth factors. *Nat Med*, 2001, **7**: 706–711.
 - 13)Pola R, Ling LE, Aprahamian TR et al: Postnatal recapitulation of embryonic hedgehog pathway in response to skeletal muscle ischemia. *Circulation*, 2003, **108**: 479–485.
 - 14)Siddiqui AJ, Blomberg P, Wardell E et al: Combination of angiopoietin-1 and vascular endothelial growth factor gene therapy enhances arteriogenesis in the ischemic myocardium. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, **310**: 1002–1009.
 - 15)Asahara T, Murohara T, Sullivan A et al: Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*, 1997, **275**: 964–967.
 - 16)Asahara T, Masuda H, Takahashi T et al: Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res*, 1999, **85**: 221–228.
 - 17)Murayama T, Tepper OM, Silver M et al: Determination of bone marrow-derived endothelial progenitor cell significance in angiogenic growth factor-induced neovascularization in vivo. *Exp Hematol*, 2002, **30**: 967–972.
 - 18)Yamaguchi J, Kusano KF, Masuo O et al: Stromal cell-derived factor-1 effects on ex vivo expanded endothelial progenitor cell recruitment for ischemic neovascularization. *Circulation*, 2003, **107**: 1322–1328.
 - 19)Asai J, Takenaka H, Kusano KF et al: Topical sonic hedgehog gene therapy accelerates wound healing in diabetes by enhancing endothelial progenitor cell-mediated microvascular remodeling. *Circulation*, 2006, **113**: 2413–2424.
 - 20)Kusano KF, Allendoerfer KL, Munger W et al: Sonic hedgehog induces arteriogenesis in diabetic vasa nervorum and restores function in diabetic neuropathy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, **24**: 2102–2107.

Sonic Hedgehog

Kengo F. Kusano and Tohru Ohe

Department of Cardiovascular Medicine, Graduate School of Medicine,
Dentistry and Pharmaceutical Sciences, Okayama University, Okayama, Japan

Key words: angiogenesis, gene therapy, morphogen

Hedgehog is a prototypical morphogen to regulate epithelial/mesenchymal interactions during embryonic development. There are three known mammalian HH family members; Sonic hedgehog (Shh), Desert hedgehog (Dhh) and Indian hedgehog (Ihh). Among them, Shh is the most widely expressed during development and the best studied. Recently it has been reported that the hedgehog-signaling pathway is intact even in the postnatal adult heart and can be activated after ischemia. Shh can promote a favorable effect on recovery from ischemia, not only by promoting neovascularization, but by broader effects, consistent with the role of this morphogen in embryonic life.

(*J Jpn Coll Angiol*, 2006, **46**: 311–316)