

虚血後血管新生における血管制御分子セマフォリン 3E の役割とその治療応用への可能性

森谷 純治¹ 南野 徹^{1,2} 舘野 馨¹ 小室 一成¹

要 旨：セマフォリン 3E(Sema3E)は胎生期における神経、血管網の発生において重要な役割を果たしている分子であることが知られているが、生後の血管新生における役割はよく知られていない。今回われわれは虚血によって Sema3E の発現が p53 依存性に上昇し、血管新生抑制因子として働いていることを明らかとした。Sema3E を抑制することは、VEGF 等の既存の血管新生因子の治療のみでは効果のない症例に対する新たな治療的血管新生の標的となり得ると考えられる。

(J Jpn Coll Angiol, 2010, 50: 343-349)

Key words: angiogenesis, semaphorins, p53, diabetes

はじめに

血管と神経とは非常に類似した解剖学的走行を示すことはよく知られている。最近の研究において、これら血管と神経の協調したネットワークの形成に「神経軸索ガイダンス分子」と呼ばれる分子が関与していることが明らかとなった¹⁾。すなわち神経軸索ガイダンス分子は、従来神経細胞の軸索を誘引または反発させる分子として知られていたが、これらの分子が胎生期の血管網の形成にも重要な役割を担っていることが示されたのである。

セマフォリン 3E(以下 Sema3E)とその特異的な受容体であるプレキシシン D1(以下 plexinD1)は、ともに神経軸索ガイダンス分子の一つである。Sema3E あるいは plexinD1 の欠失マウスにおいては胎生期に血管形成網の無秩序化がおこることから、これらの分子はいずれも胎生期における血管形成において非常に重要な分子であることが知られていた²⁾ものの、生後の血管新生における役割は不明であった。そこで今回われわれは、生後の血管新生における Sema3E および plexinD1 の役割を調べるため、in vitro および in vivo の実験系で検討した。

方法と結果

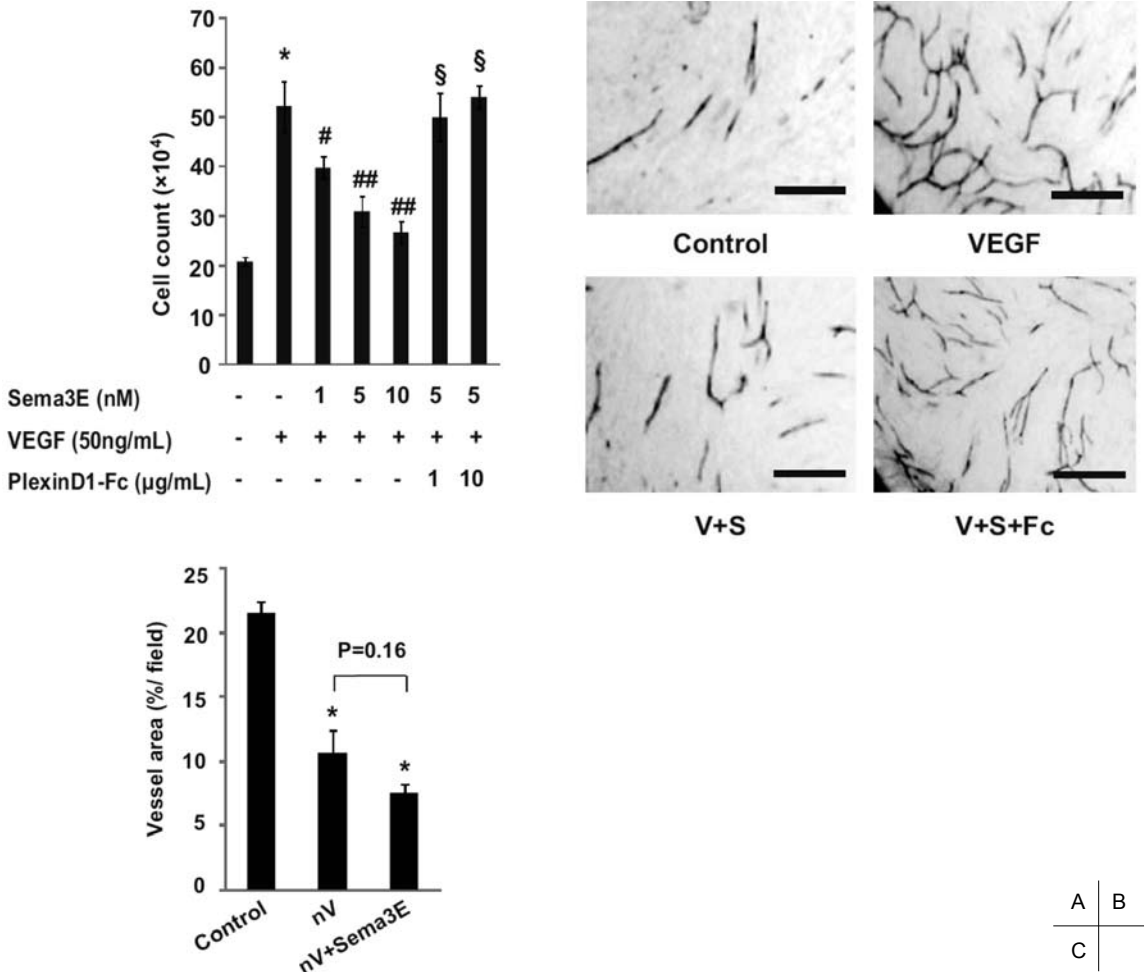
Sema3E/plexinD1 の役割を調べるため、まず HUVEC (ヒト臍帯静脈血管内皮細胞)を用いて実験を行った。VEGF(血管内皮増殖因子)を投与すると、HUVEC の増殖および脈管形成が促進されたが、この効果は Sema3E の投与により濃度依存性に抑制された。さらにこの Sema3E の血管新生抑制作用は、Sema3E に対して抑制的に作用する plexinD1-Fc 融合蛋白(以下 plexinD1-Fc)を投与することで打ち消されることがわかった(Fig. 1A, 1B)。Sema3E は VEGF の受容体である VEGFR2 のリン酸化を抑制し、その結果 VEGF による血管新生促進のシグナル経路を抑制していた。VEGF の中和抗体をあらかじめ投与した HUVEC においては Sema3E を投与しても細胞の増殖や脈管形成は有意には抑制されなかったことから、Sema3E の血管新生抑制効果は VEGF 依存性であることが示唆された(Fig. 1C)。

次に in vivo における Sema3E/plexinD1 の役割を調べるため、マウス下肢虚血モデルを作成し、虚血肢における Sema3E および plexinD1 の発現を調べる実験を行った。虚血後 3 日目より Sema3E および plexinD1 の発現の上昇が虚血肢において認められ(Fig. 2A, 2B)、Sema3E は虚

¹千葉大学大学院医学研究院循環病態医科学

²科学技術振興機構戦略的創造研究推進事業さきがけ

2010 年 1 月 14 日受付 2010 年 3 月 19 日受理



A	B
C	

Figure 1 Sema3E suppresses VEGF-induced angiogenesis.

A: Cultured endothelial cells were treated with VEGF alone (50 ng/ml) or VEGF + Sema3E (1, 5, or 10 nM) or VEGF + Sema3E + plexinD1-Fc (1 or 10 μg/ml). Sema3E significantly inhibited VEGF-induced endothelial cell proliferation, which was effectively reversed by plexinD1-Fc treatment. *P<0.01 versus Sema3E (-)/VEGF (-)/plexinD1-Fc (-) (n=4). #P<0.05, ##P<0.01 versus Sema3E (-)/VEGF (+)/plexinD1-Fc (-) (n=4). §P<0.01 versus Sema3E (5 nM)/VEGF (+)/plexinD1-Fc (-) (n=4). Data represent mean ± SEM.

B: Photographs show tube formation of endothelial cells in the presence of VEGF (50 ng/ml) (VEGF), VEGF + Sema3E (5 nM) (V+S) or VEGF + Sema3E + PlexinD1-Fc (10 μg/ml) (V+S+Fc). Scale bar=300 μm. Vehicle treatment served as control (Control).

C: VEGF-induced tube formation was examined in the presence of anti-VEGF antibody (500 μg/ml) (nV), Sema3E (5nM) (Sema3E) or anti-VEGF antibody plus Sema3E (nV+Sema3E). Vehicle treatment served as control (Control). In the presence of anti-VEGF antibody, Sema3E did not significantly inhibit tube formation. *P<0.01 versus Control (n=4).

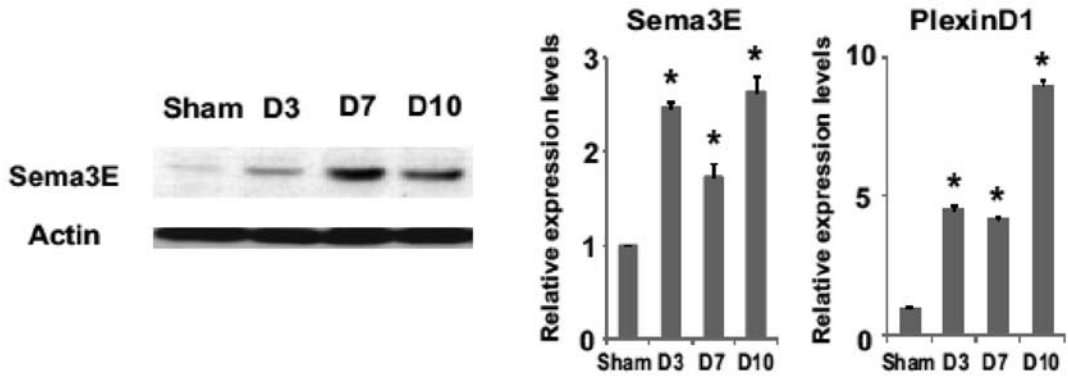


Figure 2 Expression of Sema3E is markedly up-regulated in ischemic tissues.

A: Western blot analysis for Sema3E expression in ischemic limbs on day 3 (D3), day 7 (D7), and day 10 (D10) after surgery (n=5). Sham, sham-operated.

B: The mRNA levels of Sema3E and plexinD1 in ischemic limbs on day 3 (D3), day 7 (D7), and day 10 (D10) after surgery were assessed by real-time PCR analysis. Sham, sham-operated. *P<0.01 versus sham (n=5). Data represent mean \pm SEM.

血組織の骨格筋、小動脈および毛細血管に、plexinD1は主として毛細血管に発現していることがわかった。マウス下肢虚血モデルに plexinD1-Fc の発現ベクタープラスミドを筋注すると、レーザー Doppler による虚血後の血流の改善および血管数(CD31 陽性細胞数)が有意に促進し、逆に Sema3E の発現ベクタープラスミドを筋注すると虚血後の血管新生が減弱した(Fig. 3A~3C)。また Sema3E 欠失マウスでは下肢虚血後の血管新生能が上昇していることもわかり、少なくともマウスの下肢虚血後の血管新生において、Sema3E/plexinD1 が抑制的に作用していることが示唆された(Fig. 3D)。

癌抑制遺伝子として知られている p53 は低酸素によって活性化され、腫瘍血管新生に対して抑制的に働くことが知られている³⁾。そこでわれわれは低酸素による p53 の誘導が、Sema3E の発現を正に制御しているのではないかという仮説を立てた。この仮説を検証するため、ウイルスベクターを用いた実験を行った。アデノウイルスを用いて p53 を過剰に発現させた HUVEC においては、コントロールの HUVEC に比して Sema3E の発現が上昇していた(Fig. 4A)。また Sema3E の発現は塩化コバルト処理により低酸素刺激した HUVEC においても上昇が認められ、さらに p53 の発現を阻害する HPV E6 の遺伝子をコードするレトロウイルスを感染させた HUVEC においては、塩化コバルト処理による低酸素刺激を行っても Sema3E の発現上昇はおこらなかったことから、in vitro に

おいては低酸素刺激によって p53 が活性化し Sema3E の発現が誘導されるという機序が示唆された(Fig. 4B)。この in vitro の結果に一致して、マウス下肢虚血モデルの虚血筋組織における p53 および Sema3E の発現はともに虚血後 3 日目より上昇が認められたが、この虚血による Sema3E の上昇は p53 欠失マウスの下肢虚血筋組織では認められなかったことから、in vivo の虚血筋組織においても、p53 依存性に Sema3E の発現が上昇し、虚血後血管新生に対して抑制的に作用していることが示唆された(Fig. 4C, 4D)。

糖尿病の患者においては虚血後の血管新生能が低下していることが知られているが、その詳細な機序に関しては明らかではない⁴⁾。ストレプトゾトシンを腹腔内投与した 1 型糖尿病モデルマウスにおいて下肢虚血を作成し、血管新生能を評価した。糖尿病モデルマウスにおいては虚血後の血流の改善および血管数が非糖尿病モデルマウスに比べて有意に減少しており、さらに VEGF の発現ベクタープラスミドを筋注した血流の改善効果も著しく障害されていた(Fig. 5A, 5B)。次に糖尿病モデルマウスの筋組織において p53 と Sema3E の発現を調べたところ、これらの分子の発現が非糖尿病モデルマウスに比し、糖尿病モデルマウスにおいて有意に上昇していることがわかり、これら血管新生抑制分子の発現の上昇が糖尿病モデルマウスにおける血管新生障害に関与していることが示唆された(Fig. 5C)。

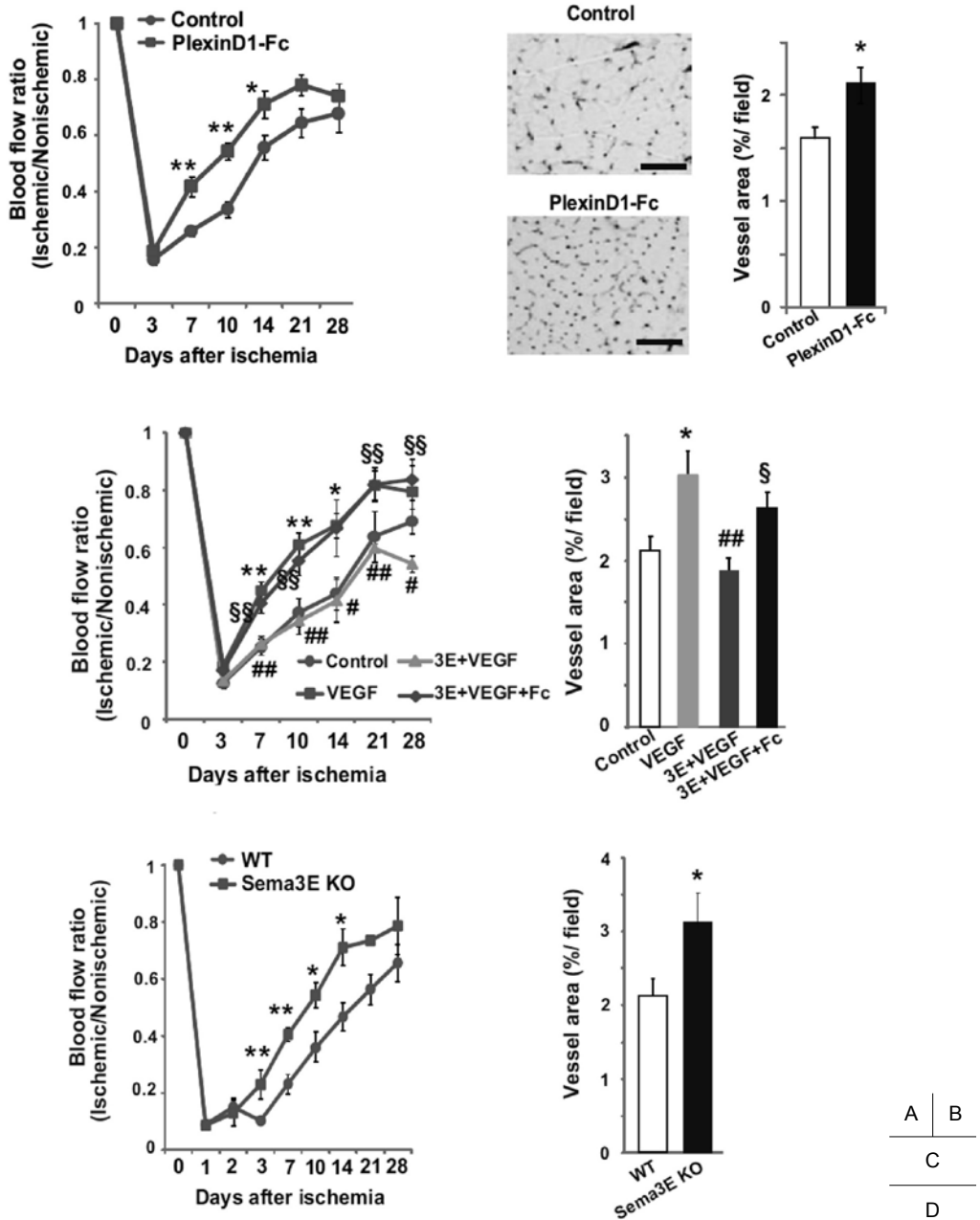


Figure 3 Sema3E negatively regulates angiogenesis in ischemic tissue.

A, B: Blood flow recovery (A) and vessel area (B) in ischemic limbs of mice treated with an empty vector (Control) or the plexinD1-Fc expression vector (plexinD1-Fc). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ versus Control ($n = 8$ for A, B). Data represent mean \pm SEM. Photographs show immunohistochemistry for CD31 in ischemic limbs on 10 days after surgery. Scale bar = 100 μ m.

C: Blood flow recovery (left) and vessel area (right) in ischemic limbs of mice treated with mock (Control), VEGF only (VEGF), Sema3E + VEGF (3E+VEGF), or Sema3E, VEGF and plexinD1-Fc (3E+VEGF+Fc). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ versus Control ($n = 4-6$). # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ versus VEGF ($n = 5-6$). § $P < 0.05$, §§ $P < 0.01$ versus 3E+VEGF ($n = 5$). Data represent mean \pm SEM.

D: Blood flow recovery (left) and vessel area (right) in ischemic limbs of wild-type mice (WT) and Sema3E-deficient mice (Sema3E KO). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ versus WT mice ($n = 3-8$). Data represent mean \pm SEM.

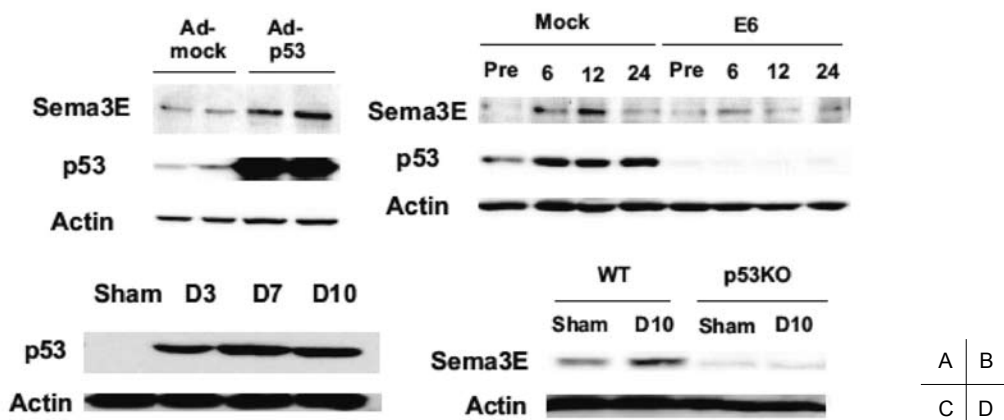


Figure 4 p53 regulates expression of Sema3E.

A: Endothelial cells were infected with an adenoviral vector encoding p53 (Ad-p53) or mock (Ad-mock) and subjected to Western blot analysis for expression of Sema3E and p53. Overexpression of p53 up-regulated Sema3E expression.
 B: Endothelial cells were infected with a retroviral vector encoding HPV16 E6 (E6) or mock (Mock) and treated with CoCl₂ (100 μM) for 6, 12, 24 hours (6, 12, 24). Expression of Sema3E and p53 was examined by Western blot analysis. CoCl₂ markedly up-regulated Sema3E expression compared to control (Pre), and this up-regulation was inhibited by disruption of p53.
 C: Western blot analysis for p53 expression on day 3 (D3), day 7 (D7), and day 10 (D10) after surgery (n=4). Sham, sham-operated. Expression of p53 was markedly up-regulated 3 days after surgery and this up-regulation persisted for 10 days.
 D: Western blot analysis for Sema3E expression in ischemic limbs of wild-type (WT) or p53-deficient (p53KO) mice on day 10 after surgery (n=4). Sema3E expression was increased in ischemic limbs of wild-type mice (WT) but not p53-deficient (p53KO) mice. Sham, sham-operated.

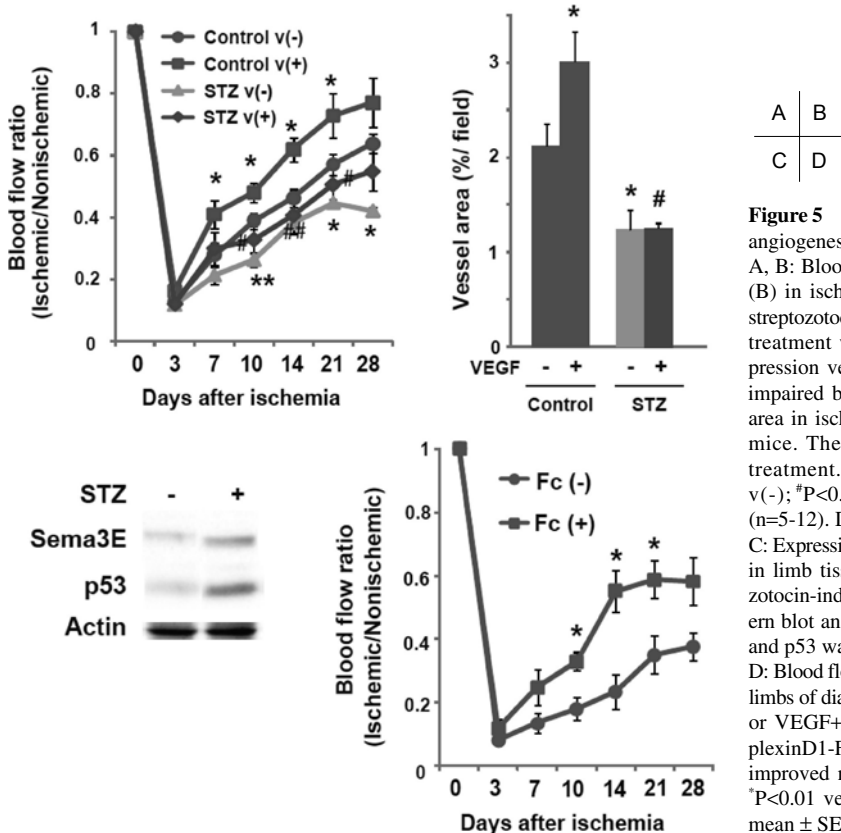


Figure 5 Sema3E inhibition improves impaired angiogenesis in diabetic mice.

A, B: Blood flow recovery (A) and vessel area (B) in ischemic limbs of control (Control) or streptozotocin-induced diabetic (STZ) mice after treatment with mock (v-) or the VEGF expression vector (v+). Diabetic mice showed impaired blood recovery and a smaller vessel area in ischemic limbs compared with control mice. They showed less response to VEGF treatment. *P<0.05, **P<0.01 versus Control/v(-); #P<0.05, ##P<0.01 versus Control/v(+). Data represent mean ± SEM.
 C: Expression of Sema3E and p53 was examined in limb tissues of control (STZ-) and streptozotocin-induced diabetic mice (STZ+) by Western blot analysis (n=4). Expression of Sema3E and p53 was up-regulated in diabetic mice.
 D: Blood flow recovery was analyzed in ischemic limbs of diabetic mice treated with VEGF (Fc-) or VEGF+plexinD1-Fc (Fc+). Treatment of plexinD1-Fc in addition to VEGF significantly improved neovascularization in diabetic mice. *P<0.01 versus Fc(-) (n=7-9). Data represent mean ± SEM.

一方、糖尿病モデルマウスの虚血肢に VEGF と plexinD1-Fc の発現ベクタープラスミドを同時に投与すると、VEGF 単独投与群と比較して著明な血流改善が得られた (Fig. 5D)。

これらの結果から Sema3E は p53 によって発現が制御されている血管新生抑制分子であることがわかり、Sema3E を抑制することは、とくに VEGF 等の既存の血管新生因子の治療のみでは効果のない症例に対して、血管新生因子による治療効果を増強させることによって治療的血管新生をもたらすという、新たなストラテジーとなり得ると考えられる。

考 察

われわれは本研究において、Sema3E/plexinD1 がマウス下肢虚血モデルの生後の血管新生において抑制的に作用していることを示した。神経細胞においてはセマフォリンが主として軸索反発因子として働くのに対して、VEGF が軸索誘引因子として拮抗的に働くことが知られている。そこでわれわれは、血管内皮細胞における VEGF との関係を検討したところ、Sema3E が VEGF の受容体である VEGFR-2 の活性化とその下流のシグナル経路を抑制することで血管新生に対して抑制的に作用していることも明らかとした。Semaphorin と VEGF の両方に結合し得る分子として Neuropilin が知られているが、Sema3E が VEGFR-2 の活性化を抑制する機序として、この Neuropilin が関係している可能性がある。また HUVEC を用いた *in vitro* の実験系において、VEGF の中和抗体処理を行っても完全には Sema3E の血管新生抑制効果が消失しなかったことから、VEGF 非依存性、とくに Sema3E/plexinD1 自身のシグナル経路によって血管新生に対して抑制的に働いている機序の存在が示唆される。実際 Sema3E は VEGF だけでなく HGF および bFGF による血管新生に対しても抑制的に働くことがわかり (データ非公表)、少なくとも部分的には VEGF 非依存性に Sema3E/plexinD1 が血管新生を抑制していると考えられるが、その詳細については今のところ不明である。

PlexinD1 の欠失マウスが大血管異常を呈し胎生致死であるのに対して、Sema3E の欠失マウスはとくに大血管の異常を呈さず、生後もほぼ正常に発育することが知られている。また plexinD1 は Sema3A, Sema3C, Sema4A といった Sema3E 以外のサブタイプとも結合する一方で、Sema3E は plexinD1 とのみ結合するといわれてい

る。さらに Sema3A および Sema3C は plexinD1 のほかに plexin の別のサブタイプである plexinA1 にも結合することが知られており、Sema3A/C も Sema3E/plexinD1 と同様に、plexinA1/D1 を介して胎生期の血管網の形成に重要な役割を果たしていることが知られている。最近になって Sema3A および Sema4A が生後の血管新生に対して抑制的に働いていることが報告されたことから^{5,6)}、plexinD1-Fc による血管新生の促進作用は、Sema3E に対する抑制作用だけでなく、Sema3A/4A に対する抑制作用によってもたらされている可能性がある。

われわれの結果はまた、p53 が虚血組織における Sema3E の誘導に重要な役割を果たしていることを示したが、どのように p53 が Sema3E の発現を制御しているかについての詳細なメカニズムはいまだ不明である。腫瘍細胞の抑制において p53 による血管新生抑制作用は重要であると考えられるため、Sema3E/plexinD1 は p53 変異による悪性腫瘍に対する治療の標的ともなり得る。また高血糖は p53 を活性化し活性酸素種を増大させることが報告されており⁷⁾、Sema3E を含めた p53 による血管新生抑制因子の発現上昇が、糖尿病における血管新生障害に強く関わっている可能性は高い。

以上より Sema3E/plexinD1 は、糖尿病症例における虚血性心血管疾患をはじめとする、既存の血管新生療法に対して効果の乏しい症例に対する新たな治療の標的となり得ると考えられる⁸⁾。具体的には plexinD1-Fc の発現ベクタープラスミドを筋肉内注射する遺伝子治療や plexinD1-Fc タンパクによる抗体医薬などが考えられる。Sema3E を抑制する治療を既存の血管新生因子による治療と組み合わせることで、外因性に投与した血管新生因子の作用の増強のみならず、虚血により発現が増加している内因性の VEGF をはじめとした各種血管新生因子による作用も増強させ得ることが期待される。一方で癌抑制遺伝子 p53 を介した血管新生抑制の経路が標的となるため、悪性腫瘍の発生をはじめとした副作用の発現がないかどうかについても臨床応用するにあたって慎重に検討する必要がある。

結 論

虚血後血管新生において Sema3E の発現が p53 依存性に上昇し、血管新生抑制因子として働いていることが明らかとなった。Sema3E を抑制することは、糖尿病性血管障害をはじめとする既存の治療のみでは効果の乏しい症例に対して新たな治療法を提供し得ると考えられる。

文 献

- 1) Carmeliet P, Tessier-Lavigne M: Common mechanisms of nerve and blood vessel wiring. *Nature*, 2005, **436**: 193–200.
- 2) Kruger RP, Aurandt J, Guan KL: Semaphorins command cells to move. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005, **6**: 789–800.
- 3) Harris SL, Levine AJ: The p53 pathway: positive and negative feedback loops. *Oncogene*, 2005, **24**: 2899–2908.
- 4) Falanga V: Wound healing and its impairment in the diabetic foot. *Lancet*, 2005, **366**: 1736–1743.
- 5) Toyofuku T, Yabuki M, Kamei J et al: Semaphorin-4A, an activator for T-cell-mediated immunity, suppresses angiogenesis via Plexin-D1. *EMBO J*, 2007, **26**: 1373–1384.
- 6) Maione F, Molla F, Meda C et al: Semaphorin 3A is an endogenous angiogenesis inhibitor that blocks tumor growth and normalizes tumor vasculature in transgenic mouse models. *J Clin Invest*, 2009, **119**: 3356–3372.
- 7) Brodsky SV, Gealekman O, Chen J et al: Prevention and reversal of premature endothelial cell senescence and vasculopathy in obesity-induced diabetes by ebselen. *Circ Res*, 2004, **94**: 377–384.
- 8) Moriya J, Minamino T, Tateno K et al: Inhibition of semaphorin as a novel strategy for therapeutic angiogenesis. *Circ Res*, 2010, **106**: 391–398.

A Pathological Role of Semaphorin3E in Postnatal Angiogenesis and Its Implication for Therapeutic Angiogenesis

Junji Moriya,¹ Tohru Minamino,^{1,2} Kaoru Tateno,¹ and Issei Komuro¹

¹Department of Cardiovascular Science and Medicine, Chiba University Graduate School of Medicine, Chiba, Japan

²PRESTO, Japan Science and Technology Agency, Saitama, Japan

Key words: angiogenesis, semaphorins, p53, diabetes

The axon-guiding molecules known as semaphorins and their receptors (plexins) play an important role in development of the vascular network during embryogenesis. However, it remains unclear whether these molecules are involved in postnatal angiogenesis. Here we report that semaphorin3E (Sema3E), one of the class 3 semaphorins, and its specific receptor plexinD1 inhibit angiogenesis in adults. Sema3E inhibited cell growth and tube formation by suppressing the vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling pathway. Expression of Sema3E and plexinD1 was markedly up-regulated in ischemic limbs of mice, and inhibition of this pathway by introduction of the plexinD1-Fc gene or disruption of Sema3E led to significant improvement of revascularization. Hypoxia up-regulated Sema3E expression by activating the tumor suppressor protein p53 in endothelial cells. Expression of p53 and Sema3E was increased in diabetic mice and this increase was further enhanced by ischemia. Consequently, blood flow recovery after VEGF treatment was significantly impaired in diabetic mice compared with VEGF-treated control mice. These changes were effectively reversed by additional introduction of the plexinD1-Fc gene. These results indicate that Sema3E/plexinD1 negatively regulates postnatal angiogenesis and suggest that inhibition of sema3E would be a novel strategy for therapeutic angiogenesis, especially when VEGF treatment is ineffective.

(J Jpn Coll Angiol, 2010, **50**: 343–349)