

次世代の血管新生治療の開発

森谷 純治¹ 南野 徹^{1,2}

要 旨：骨髄や末梢血単核球細胞移植による血管新生療法は現在ヒトへと臨床応用されているが、糖尿病患者においてその効果が低いなどの問題点がある。これに対して今回われわれは糖尿病状態ではセマフォリン 3E や p53 といった血管新生抑制因子の発現が亢進しており、それらの因子の抑制によって血管再生過程が回復することを明らかとした。これらの結果は血管新生抑制因子を標的とした新たな血管新生治療の開発の可能性を示唆している。(J Jpn Coll Angiol, 2010, 50: 351-355)

Key words: therapeutic angiogenesis, semaphorins, p53, diabetes

序 言

末梢血中に骨髄由来の血管内皮前駆細胞が存在することが報告されて以来、骨髄単核球細胞を用いた虚血性心臓血管疾患の治療は著しい速さでヒトへと臨床応用された。しかし未だにその明確な作用メカニズムは不明である。これに対してわれわれは、独自に末梢血単核球細胞の有用性について基礎的な検討を行った。その結果、末梢血単核球細胞は骨髄由来の単核球と比較して血管新生効果が勝るとも劣らないことなどを明らかにし¹⁾、末梢血単核球細胞を用いたヒト重症末梢性動脈疾患に対する治療について臨床研究を開始した。これまでに 80 数例に対して本治療を行い、70%以上の症例に有用性を認めた。レスポナーとノンレスポナーとの臨床データの比較や、動物モデルを用いた基礎的な検討により、末梢血単核球移植によって虚血肢の筋組織の再生がおり、その再生過程において筋組織が分泌する血管増殖因子が持続的に虚血肢に作用し、血管再生を誘導することによって筋組織の再構築を促進していることがわかった^{2,3)}。その一方で、こうした血管新生治療は糖尿病などの患者において効果が低いことが観察されているが、そのメカニズムは明らかではない。これに対してわれわれは糖尿病状態においては、セマフォリン 3E(以下 Sema3E)や p53 といった

血管新生抑制因子の発現が亢進していることを見出した。本稿ではこの血管新生抑制因子をターゲットとした、新たな血管新生治療の開発の可能性について概説する。

対象と方法

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⁴⁾。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。

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⁵⁾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* においては主として HUVEC(ヒト臍帯静脈血管内皮細胞)を用いて実験を行い、*in vivo* ではマウスの大腿動脈を結紮した下肢虚血

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2月18日受付 2010年4月12日受理

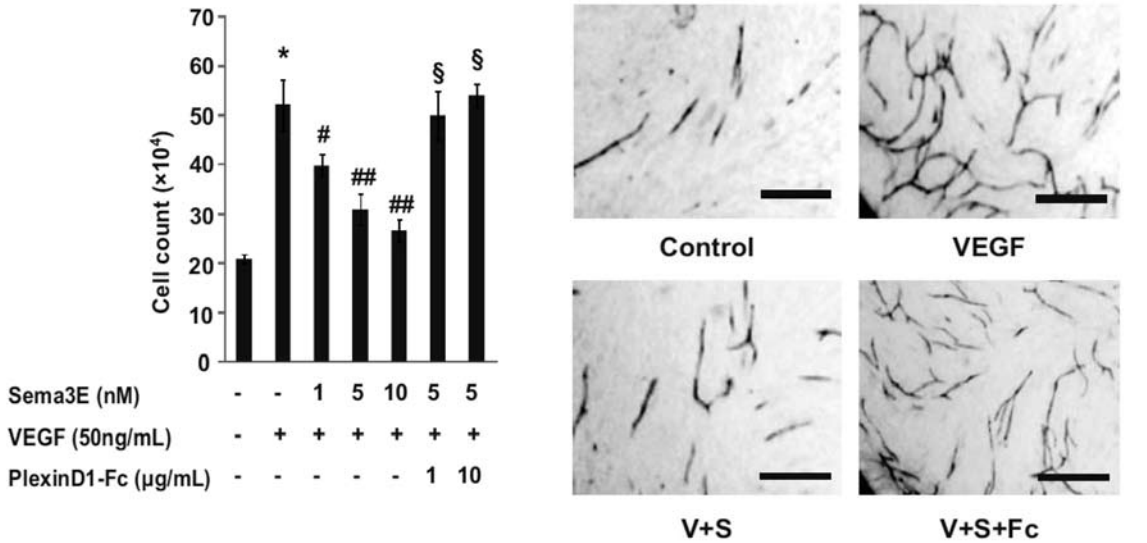


Figure 1 Sema3E suppresses VEGF-induced angiogenesis. (Circ Res 2010)

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). *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). Vehicle treatment served as control (Control). Scale bar=300 μm.

A | B

モデルを作成し、虚血肢における Sema3E/plexinD1 の発現を調べた。虚血後の血管新生能の評価はレーザードブラ血流計 (Moor 社製) による下肢血流、および虚血筋組織における CD31 の免疫染色による血管数により行った。

結果

HUVEC に 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. 1)。Sema3E は VEGF の受容体である VEGFR-2 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。

マウス下肢虚血モデルにおいては虚血作成後 3 日目より

Sema3E および plexinD1 の発現の上昇が認められ (Fig. 2)、Sema3E は虚血組織の骨格筋、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 Sema3E を抑制する plexinD1-Fc の発現ベクタープラスミドを筋注すると、レーザードブラによる虚血後の血流の改善を認め、また血管数 (CD31 陽性細胞数) が有意に促進しており (Fig. 2)、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。

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⁶⁾。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この仮説を立てた。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. 3)。また Sema3E の発現は塩化コバルト処理により低酸素の擬似的処理をした HUVEC においても上昇が認められ、in vitro においては低酸素刺激によって p53

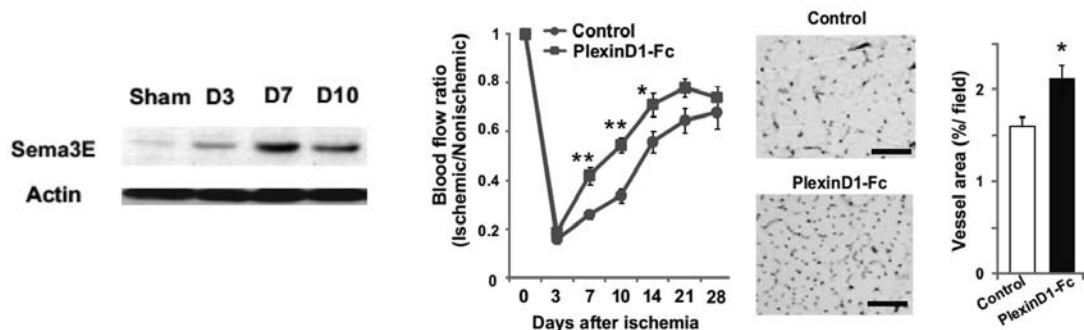


Figure 2 Expression of Sema3E is up-regulated and negatively regulates angiogenesis in ischemic tissues. (Circ Res 2010)
 A: Western blot analysis for Sema3E expression in ischemic limbs on day 3 (D3), day 7 (D7), and day 10 (D10) after surgery (n=5). Sham, sham-operated.
 B: Blood flow recovery and vessel area 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). Vessel area was evaluated at day 10 after surgery. Scale bar=100 μm.

A | B

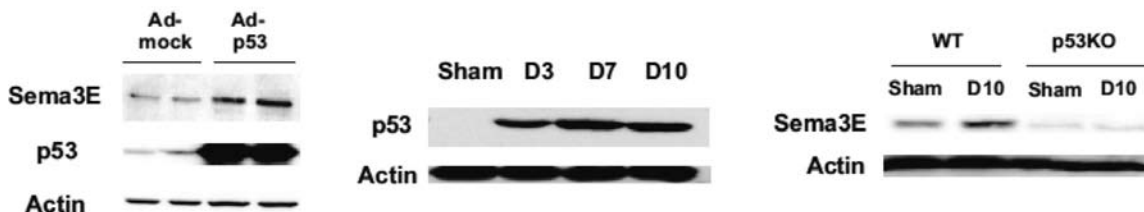


Figure 3 p53 regulates expression of Sema3E. (Circ Res 2010)
 A: Endothelial cells were infected with an adenoviral vector encoding p53 (Ad-p53) or mock (Ad-mock) and subjected to Western blot analysis for expression of Sema3E and p53.
 B: Western blot analysis for p53 expression on day 3 (D3), day 7 (D7), and day 10 (D10) after surgery (n=4). Sham, sham-operated.
 C: 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). Sham, sham-operated.

A | B | C

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。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. 3)。

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⁷⁾。ストレプトゾチ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。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. 4)。

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. 4)。これらの結果から Sema3E は p53 によって発現が制御さ

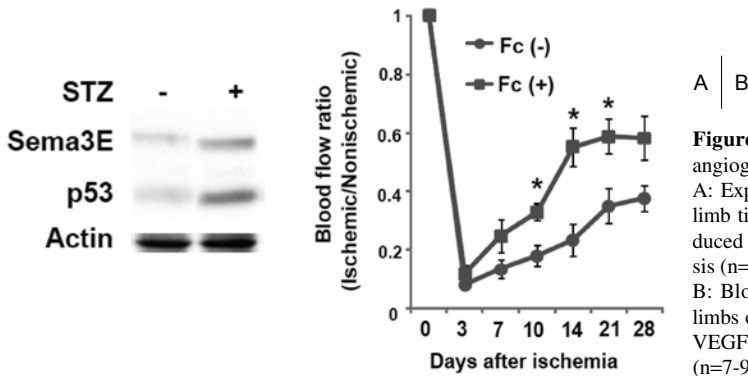


Figure 4 Sema3E inhibition improves impaired angiogenesis in diabetic mice. (Circ Res 2010)
 A: Expression of Sema3E and p53 was examined in limb tissues of control (STZ-) and streptozotocin-induced diabetic mice (STZ+) by Western blot analysis (n=4).
 B: Blood flow recovery was analyzed in ischemic limbs of diabetic mice treated with VEGF (Fc(-)) or VEGF+plexinD1-Fc (Fc(+)). *P < 0.01 versus Fc (-) (n=7-9). Data represent means ± SEM.

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、とくに糖尿病などの既存の血管新生因子(VEGFなど)の治療のみでは効果のない病態に対しても有効であると考えられた。

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。われわれはまた、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。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Sema3E以外のサブタイプ、セマフォリン3A(以下Sema3A)やセマフォリン4A(以下Sema4A)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。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^{8,9)}、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やSema4A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¹⁰⁾、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。したがって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¹¹⁾。具体的には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、臨床応用するにあたって悪性腫瘍や増殖型網膜症、黄斑変性症といった血管増殖性の疾患の悪化や新規発症がないかどうかについて、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) Minamino T, Toko H, Tateno K et al: Peripheral-blood or bone-marrow mononuclear cells for therapeutic angiogenesis? *Lancet*, 2002, **360**: 2083–2084.
- 2) Tateno K, Minamino T, Toko H et al: Critical roles of muscle-secreted angiogenic factors in therapeutic neovascularization. *Circ Res*, 2006, **98**: 1194–1202.
- 3) Moriya J, Minamino T, Tateno K et al: Long-term outcome of therapeutic neovascularization using peripheral blood mononuclear cells for limb ischemia. *Circ Cardiovasc Interv*, 2009, **2**: 245–254.
- 4) Carmeliet P, Tessier-Lavigne M: Common mechanisms of nerve and blood vessel wiring. *Nature*, 2005, **436**: 193–200.
- 5) Kruger RP, Aurandt J, Guan KL: Semaphorins command cells to move. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005, **6**: 789–800.
- 6) Harris SL, Levine AJ: The p53 pathway: positive and negative feedback loops. *Oncogene*, 2005, **24**: 2899–2908.
- 7) Falanga V: Wound healing and its impairment in the diabetic foot. *Lancet*, 2005, **366**: 1736–1743.
- 8) 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.
- 9) 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.
- 10) 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.
- 11) Moriya J, Minamino T, Tateno K et al: Inhibition of semaphorin as a novel strategy for therapeutic angiogenesis. *Circ Res*, 2010, **106**: 391–398.

Establishment of a Novel Strategy for Therapeutic Angiogenesis

Junji Moriya¹ and Tohru Minamino^{1,2}

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

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

Key words: therapeutic angiogenesis, semaphorins, p53, diabetes

Injection of bone marrow or peripheral blood mononuclear cells for limb ischemia has now become prevalent in clinical practice. However, it has been known that diabetic patients tend to show little improvement by this treatment. Here we report that an angiogenic inhibitor such as semaphorin3E (Sema3E) or p53 was up-regulated in ischemic tissue of diabetes and inhibition of these factors lead to amelioration of blood flow recovery. 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 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. 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, such as in the diabetic state. (J Jpn Coll Angiol, 2010, **50**: 351–355)