

ソニック・ヘッジホッグ (Sonic hedgehog) を用いた 新たな心筋組織の修復

草野 研 吾

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 循環器内科学

キーワード：遺伝子治療，再生，サイトカイン，Morphogen，血管新生

緒 言

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様々な血管新生因子、すなわち FGF, VEGF, HGF, HIF-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。我々は、新しい血管新生因子である Sonic hedgehog (Shh) を用い、新たな心筋組織の修復の可能性について報告し、次世代のターゲットとしての可能性について、Gene Therapy のコラムでも取り上げられた²⁾。ここではそのユニークな働きについて述べて行きたい。

Sonic hedgehog とは

Sonic hedgehog (Shh) は、hedgehog (HH) ファミリーに属する蛋白質のひとつで、1978年に Eric Wieschaus (エリック・ヴィーシャウス) と Christiane Nusslein-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年に二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、胎生期の個体発生の際、形態形成に深くかかわることが知られている。

成体における Sonic hedgehog の役割

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、我々は、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、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⁴⁾。

Sonic hedgehog の血管新生作用

Shh 蛋白質のユニークな点は、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、様々な血管新生に関与するサイトカインの放出を促し、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点である。Shh の投与によって生じた新生血管自体にも特徴がある。すなわち Shh によって新生される血管は、他の血管新生性サイトカインのそれに比べ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。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つて血管の成熟に関与するという報告があり、VEGF と

平成19年2月受理
〒700-8558 岡山市鹿田町2-5-1
電話：086-235-7351 FAX：086-235-7353
E-mail：kusanokengo@hotmail.com

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⁵⁾。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 : EPC⁶⁾) 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^{7,8)}。我々はこの EPC への効果も検討した。Shh には線維芽細胞から様々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⁹⁾, stromal derived factor-1 (SDF-1) の発現を検討したところ、Shh は SDF-1 の発現を増加させた⁴⁾。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。

さらに最近我々は、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) を促すことを報告した¹⁰⁾。こうした結果から、Shh は様々な状況 (特に組織虚血時) 下で非常に強力な血管新生因子として作用することが伺える。

Sonic hedgehog 遺伝子を用いた血管新生効果 (vivo)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様々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いうことが推測できる。しかしながら Shh 蛋白は非常に半減期が短く、Shh 蛋白の投与では不十分である。そこで我々はヒト 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。虚血心モデルは、ラット急性心筋虚血モデルと、ブタ慢性心筋虚血モデルである。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太い血管の増生を認め、心機能の回復に血管新生が大きく関与していることが伺えた。

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。Insulin-like growth factor-1 (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。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。

終わりに

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、様々な効果を介して急性・慢性の組織障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。

謝 辞

今回、この研究に当たって、留学の機会を与えて頂いた岡山大学循環器内科、大江透教授、留学先の故 Isner 教授、Losordo 教授に深謝申し上げます。

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, Tabin C : Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA. *Cell* (1993) **75**, 1401-1416.
- 4) Kusano KF, Pola R, Murayama T, Curry C, Kawamoto A, Iwakura A, Shintani S, Ii M, Asai J, Tkebuchava T, Thorne T, Takenaka H, Aikawa R, Goukassian D, von Samson P, Hamada H, Yoon YS, Silver M, Eaton E, Ma H, Heyd L, Kearney M, Munger W, Porter JA, Kishore R, Losordo DW : Sonic hedgehog myocardial gene therapy : tissue repair through transient reconstitution of embryonic signaling. *Nat Med* (2005) **11**, 1197-1204.
- 5) Siddiqui AJ, Blomberg P, Wardell E, Hellgren I, Eskandarpour M, Islam KB, Sylven C : 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.
- 6) Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM : Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* (1997) **275**, 964–967.
- 7) Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver M, Kearne M, Magner M, Isner JM : Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res* (1999) **85**, 221–228.
- 8) Murayama T, Tepper O, Silver M, Ma H, Losordo D, Isner J, Asahara T, Kalka C : Determination of bone marrow-derived endothelial progenitor cell significance in angiogenic growth factor-induced neovascularization in vivo. *Exp Hematol* (2002) **30**, 967.
- 9) Yamaguchi J, Kusano KF, Masuo O, Kawamoto A, Silver M, Murasawa S, Bosch-Marce M, Masuda H, Losordo DW, Isner JM, Asahara T : Stromal cell-derived factor-1 effects on ex vivo expanded endothelial progenitor cell recruitment for ischemic neovascularization. *Circulation* (2003) **107**, 1322–1328.
- 10) Asai J, Takenaka H, Kusano KF, Ii M, Luedemann C, Curry C, Eaton E, Iwakura A, Tsutsumi Y, Hamada H, Kishimoto S, Thorne T, Kishore R, Losordo DW : Topical sonic hedgehog gene therapy accelerates wound healing in diabetes by enhancing endothelial progenitor cell-mediated microvascular remodeling. *Circulation* (2006) **113**, 2413–2424.