

顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)による 虚血性心疾患の再生治療

高野 博之*, 小室 一成*

はじめに

顆粒球コロニー刺激因子 (granulocyte colony-stimulating factor; G-CSF), マクロファージコロニー刺激因子 (macrophage colony-stimulating factor; M-CSF), 顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子 (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; GM-CSF), 幹細胞因子 (stem cell factor; SCF), エリスロポエチン (erythropoietin; EPO) などのサイトカインは造血因子として知られており, 骨髄幹細胞の動員作用をもつことから最近では再生医療の分野でも注目されている. Orlic らはマウスの急性心筋梗塞モデルを作製後, 梗塞領域に骨髄幹細胞 ($\text{Lin}^- \text{c-kit}^+$ 細胞) を移植してその効果を検討した¹⁾. 9日後にこれらの細胞が心筋細胞や血管内皮細胞, 血管平滑筋細胞に分化し心臓再生治療の可能性を示唆した. 一方, マウスの心筋梗塞モデルを用いた研究で, 造血幹細胞は心筋細胞には分化しないという結果が2つのグループから発表された^{2,3)}. 骨髄の造血幹細胞に関しては心筋細胞に分化する可能性は controversial であるが, 間葉系幹細胞ではその可能性を示唆する結果が報告されている⁴⁾. 上述した造血性サイトカインの中には骨髄幹細胞だけでなく血管内皮前駆細胞 (endothelial progenitor cell; EPC) も動員させる作用があるので, 血管新生作用による虚血性心疾患の治療効果も期待される⁵⁾. 本稿では虚血性心疾患に対する G-CSF の作用について概説する.

G-CSF

G-CSF は骨髄系前駆細胞の増殖, 分化, 生存などの促進作用や骨髄幹細胞, 成熟好中球に対する動員作用をもつことから, 臨床において化学療法後の好中球減少症や造血幹細胞移植などの際に用いられている. 造血作用以外に抗アポトーシス作用, 抗炎症作用, EPC の増殖・遊走作用なども報告されている⁵⁾. Orlic らは骨髄幹細胞の動員作用をもつサイトカインが傷害心筋に対し心臓再生を促進するか否かについて検討した⁶⁾. マウスに5日間, G-CSF と SCF の両者を投与してから急性心筋梗塞モデルを作製し, その後もさらに3日間, 2つのサイトカインを投与し27日後に心機能を解析した結果, サイトカイン投与群では急性心筋梗塞後の死亡率は有意に減少し心機能の低下や心臓リモデリングは抑制された⁶⁾. この結果は非常に興味深いものであるが, 残念ながらサイトカインの投与は心筋梗塞発症前より開始されており, 臨床応用できないプロトコールである. また G-CSF はすでに臨床の場で使われているが, SCF はアレルギー反応などの副作用で我が国では治験の途中で中止になったため併用療法は実現不可能である.

G-CSF を急性心筋梗塞後から投与した際の効果

我々はマウスの急性心筋梗塞モデルを用いて, Orlic らのように G-CSF と SCF を心筋梗塞前より投与した群 (Pre-GS), 心筋梗塞後から投与した群 (Post-GS), G-CSF を単独で心筋梗塞後から投与した群 (Post-G), SCF を単独で心筋梗塞後から投与した群 (Post-S), 生理食塩水のみを投与した群 (Control) に分け, 各サイトカインの効果を比較検

*千葉大学大学院医学研究院循環病態医科学

討した⁷⁾。Control 群に比べ G-CSF を用いた 3 つの治療群 (Pre-GS, Post-GS, Post-G) では死亡率を同程度に改善した。3 群とも心筋梗塞後の心機能低下は抑制され、心腔内の大きさや心筋梗塞領域の線維化面積は縮小した⁷⁾。また、心筋梗塞領域の壁厚の減少も軽減した。各治療群間でこれらの効果に差はみられなかった。治療群では梗塞境界領域の血管数は増加し、アポトーシスを起こした血管内皮細胞数は減少していた⁷⁾。梗塞境界領域の血管内皮細胞の中には骨髄由来の細胞が認められたが、心筋細胞に分化した細胞は確認できなかった。これらの結果から、G-CSF を単独で急性心筋梗塞後から開始しても心臓リモデリングや心機能低下は抑制されることが明らかになった。

急性心筋梗塞後の心臓に対する G-CSF の作用機序

心臓に対する G-CSF の作用機序として、マクロファージの細胞数や matrix metalloproteinase (MMP)-1, MMP-9 発現の増加を介して心筋梗塞後の急性期における修復過程を促進させるという報告がある⁸⁾。一方、早期に梗塞領域での transforming growth factor (TGF)- β やコラーゲンの産生を増加させて、梗塞後の心拡大を抑制するという報告もある^{9,10)}。Orlic らは、サイトカイン治療により動員された骨髄細胞が心筋細胞や細動脈、毛細血管に分化することで梗塞心を再生し心筋梗塞サイズを縮小するという結果を示したが⁶⁾、我々の研究では G-CSF による心筋細胞への分化促進作用は認められなかった⁷⁾。最近では、G-CSF により梗塞領域に動員されて心筋細胞に分化するのは骨髄の造血幹細胞ではなく間葉系幹細胞であるという報告がある⁴⁾。

我々は、さらに大動物のブタを用いて同様の検討を行った。心筋梗塞作製 24 時間後より、G-CSF を 7 日間投与する群 (G-CSF) と生理食塩水のみを投与する群 (Control) の 2 群に分け 4 週間後に解析を行った¹¹⁾。心エコー検査の結果、G-CSF 群では Control 群に比べ心臓リモデリングや心機能低下が抑制されていた。また病理所見で G-CSF による心筋梗塞サイズの縮小が認められた。G-CSF 群では Control 群に比べ虚血領域や梗塞領域の血管数が有意に増加していた。さらに G-CSF 群では血管内皮

細胞のアポトーシスが減少していた。G-CSF によるこれらの機序を調べるために両群の心臓を梗塞領域、虚血 (境界) 領域、非梗塞 (遠隔) 領域に分けて、生存シグナルに関与するキナーゼである Akt の活性化や血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor; VEGF) の発現を調べた。その結果、Control 群に比べ G-CSF 群では虚血領域と梗塞領域で Akt の活性化と VEGF の発現亢進が認められた¹¹⁾。これらの結果から、G-CSF による Akt の活性化や VEGF の発現亢進がアポトーシス細胞数の減少と血管数の増加に関与していることが示唆された。

マウスおよびブタの実験から G-CSF は急性心筋梗塞後より単独で投与しても心臓保護作用を有することが確認された。その機序の一つとして骨髄幹細胞による血管細胞への分化の可能性もあるが、ブタの実験で心筋梗塞後 1 週間の時点ですでに G-CSF による心機能改善効果を認めたことから、それ以外の可能性も考えられた。そこで、心臓に対する直接作用について引き続き検討した¹²⁾。最初に、培養心筋細胞に G-CSF 受容体が存在することを RT-PCR と免疫細胞染色で確認した。G-CSF により時間依存的に心筋細胞内で Janus kinase (Jak)/Signal transducer and activator of transcription (STAT) のシグナル伝達経路が活性化した。過酸化水素 (H_2O_2) により心筋細胞のアポトーシスが惹起されるが、G-CSF は H_2O_2 による心筋細胞のアポトーシスを抑制した。機能を欠失した変異体である Dominant negative STAT3 を心筋細胞に遺伝子導入したところ G-CSF による抗アポトーシス作用は消失した。G-CSF の心臓保護作用における STAT3 の関与を *in vivo* で確かめるために、Dominant negative STAT3 遺伝子を心筋特異的に過剰発現するマウス (Tg マウス) を用いて検討した¹²⁾。野生型マウス (Wt マウス) と Tg マウスに心筋梗塞を作製して G-CSF の効果を比較したところ、Wt マウスでみられた G-CSF の心臓保護作用は Tg マウスでは認められなかった。興味深いことに、G-CSF の効果は急性心筋梗塞の発症から治療開始までの時間が長くなるにつれて減弱した (図 1A, B)¹²⁾。これらの結果から、G-CSF は直接、心筋細胞に作用し Jak2/STAT3 を介したシグナル伝達経路の活性化が急性心筋梗塞後の抗リモデリング作用に重要な役割を果たしていると考えられた (図 2)。

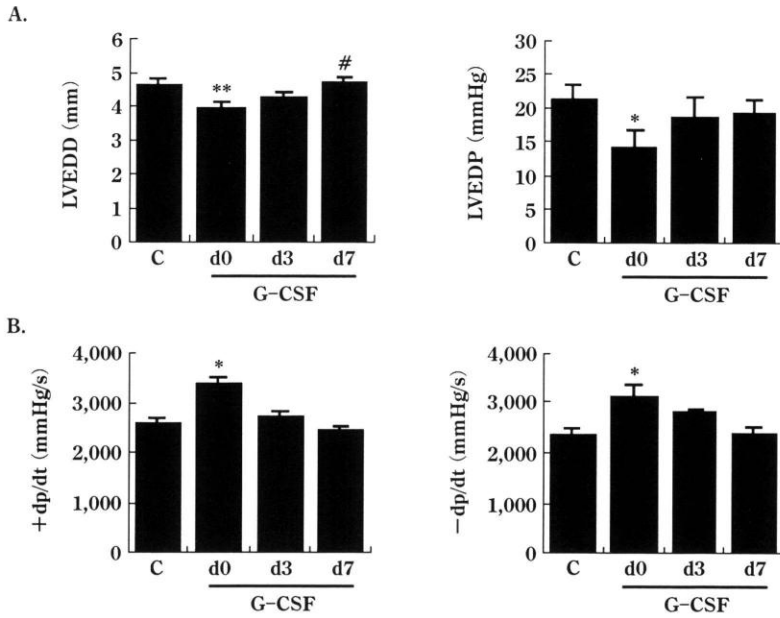


図1 G-CSFの開始時期による効果の違い(文献¹²⁾より改変引用)

野生型マウスにG-CSF(100 μ g/kg/day \times 5日間)を急性心筋梗塞の直後、3日後、7日後から開始した際の心エコー検査(A)と心カテーテル検査(B)による評価。

*p<0.05, **p<0.01 vs. コントロール群との比較, # p<0.01 vs. 心筋梗塞直後から治療開始した群との比較。

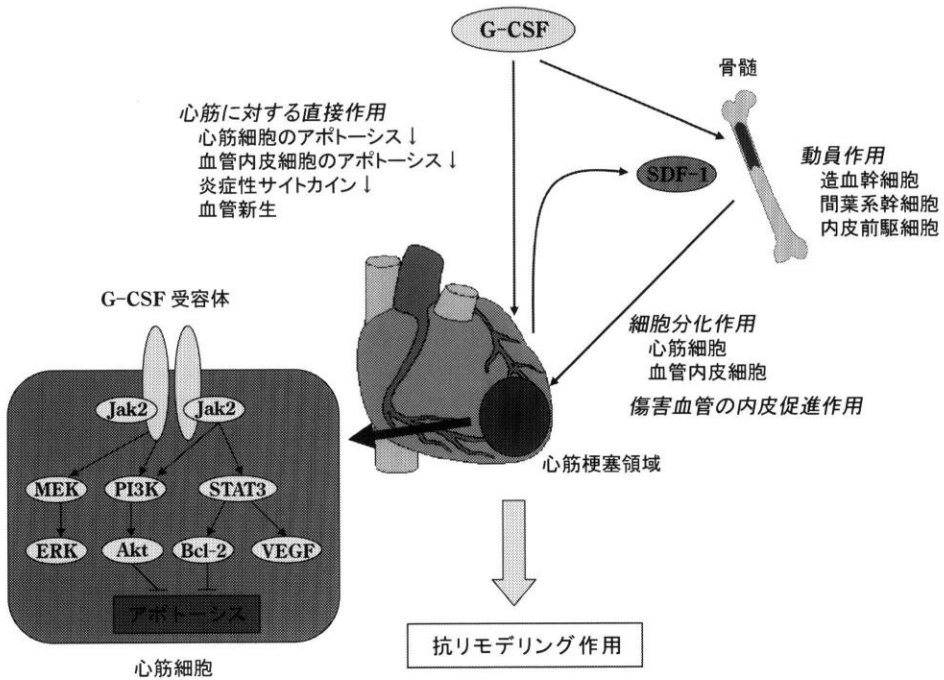


図2 急性心筋梗塞後の心臓リモデリングに対するG-CSFの作用機序(文献⁵⁾より改変引用)

心筋虚血再灌流後の心臓に対する G-CSF の効果

虚血再灌流後の心臓に対する G-CSF の直接作用をラットの灌流心を用いて検討した¹³⁾。35 分間の虚血後、120 分間の再灌流を行った。G-CSF は再灌流時より灌流液に加えた。その結果、G-CSF 投与により濃度依存的に再灌流後の left ventricular developed pressure (LVDP) が有意に改善し梗塞サイズの縮小も認められた (図3A, B)。G-CSF 投与により再灌流後 15 分における Akt, Jak2, STAT3 のリン酸化が増加した。また、endothelial NO synthase (eNOS) の G-CSF による梗塞量縮小効果は Jak2 阻害薬, PI3 kinase 阻害薬, eNOS 阻害薬によって抑制されたが、ERK 阻害薬では抑制されなかった (図3C, D)¹³⁾。これらの結果から、G-CSF は虚血再灌流後の心臓にも直接作用することや、再灌流後からの投与でも心臓保護作用 (post conditioning-like effect) を及ぼすことが示された。また、虚血再灌流後の急性期における G-CSF の心臓保護作用には Akt-eNOS の活性化を介した non-genomic な作用も重要である可能性が示唆された (図3E)。マウスの虚血再灌流モデルを用いて *in vivo* で G-CSF の効果を調べた研究もある¹⁴⁾。左冠動脈を 1 時間虚血状態にした後に再灌流させ、その後から G-CSF を 5 日間投与して 28 日後に心機能を解析した結果、心機能は有意に改善した。さらに、この効果は 3 ヶ月後でも認められた¹⁴⁾。ウサギの冠動脈を結紮し 30 分間の心筋虚血後、再灌流時に冠動脈内に G-CSF を 1 回注入した場合でも、皮下注射による 5 日間連続投与と同様の心臓リモデリング抑制効果が認められた¹⁵⁾。

急性心筋梗塞以外の心疾患に対する G-CSF の効果

我々は最近、ブタを用いて慢性虚血によるハイパネーション (冬眠心筋) モデルを作製し、G-CSF の効果を検討した¹⁵⁾。ブタの冠動脈にアメロイドコンストラクターを装着させ 4 週間後にハイパネーションを確認した後、G-CSF を 7 日間投与した。G-CSF は虚血領域の壁運動や血流を改善させた結果、心拡大や心機能低下を軽減した。病理の結果、虚血領域の線維化の程度は減少し血管数は増加していた。G-CSF は心臓における Akt を活性化して、

抗アポトーシス作用や抗線維化作用を及ぼすと考えられた¹⁶⁾。冠動脈バイパス術やインターベンション治療の適応がない重症慢性虚血の症例に対して今後、G-CSF が治療法の 1 つとなりうるか興味深い。

陳旧性心筋梗塞後の心不全に対しても、G-CSF は梗塞領域の形態を変化させ線維化を減少させることにより心機能を改善した¹⁷⁾。G-CSF により STAT3 の活性化や GATA-4, myosin heavy chain, troponin I, desmin の発現増加がみられた。また、metalloproteinase-2, 9 の発現は増加し tumor necrosis factor- α , angiotensin II type 1 receptor, TGF- β の発現は減少した¹⁷⁾。さらに、G-CSF を中止した後も心機能の改善効果は認められた。これらの結果から、陳旧性心筋梗塞による慢性心不全に対しても G-CSF の効果が期待される。

我が国では、慢性心不全の原因として虚血性心疾患の他に心筋症も多く認められる。拡張型心筋症モデルである UM-X 7.1 ハムスターを用いた研究では、G-CSF の長期投与により心機能や心臓リモデリングの改善が認められ生存率の減少も抑えられた¹⁸⁾。このモデルではオートファジーによる心筋細胞死が認められたが、G-CSF によりこれらの変化は抑制された¹⁸⁾。

G-CSF の効果と安全性を検討した最近の臨床研究の結果

韓国のグループにより、急性心筋梗塞の患者に G-CSF を投与した結果、高率にステント内の再狭窄を起こしたという結果が報告された¹⁹⁾。しかしながら、急性心筋梗塞にも拘らず、G-CSF を 4 日間投与してからインターベンション治療を行うというプロトコルであり、6 ヶ月後にフォローアップの冠動脈造影検査が行われた症例は極めて少数の解析結果であった。心疾患に対して初めて G-CSF の効果を検討した臨床研究であったため、一流の学術誌に掲載されこの分野の研究に警鐘をならす結果となった。しかし、問題のあるプロトコルであり我が国ではまず承認されないような臨床研究である。動脈硬化に対する G-CSF の作用に関しては病変を悪化させることなく、また傷害血管に対しては内皮化を促進させることにより新生内膜の肥厚を抑制するという動物実験の結果が報

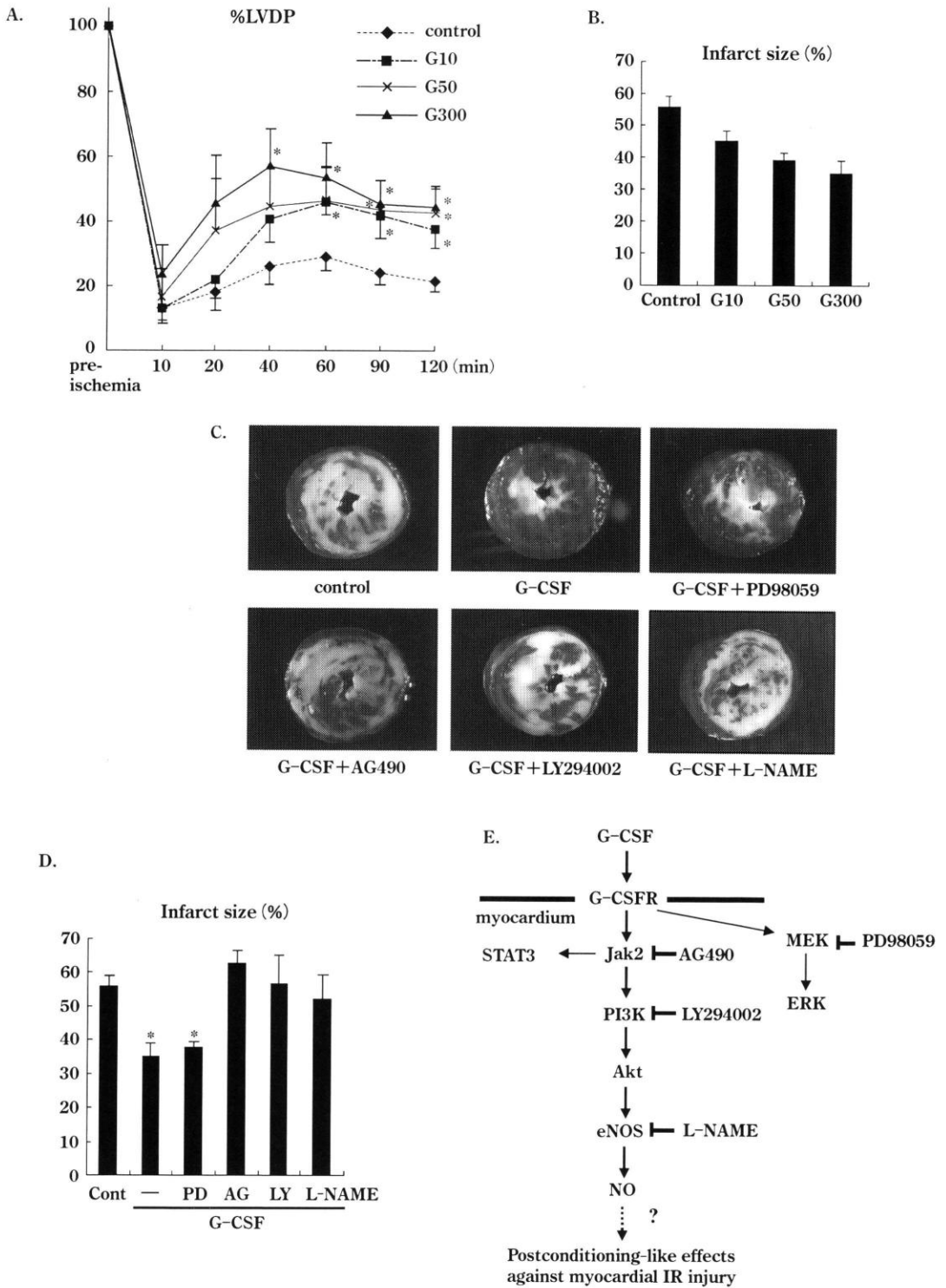


図3 心筋虚血再灌流モデルにおける G-CSF の効果 (文献¹³) より改変引用)

ラットのランゲンドルフ心での再灌流後の LVDP (A) と再灌流 2 時間後の心筋梗塞サイズ (B). G-CSF (10ng/ml, 50ng/ml, 300ng/ml) は再灌流後から投与. 各阻害薬による心筋梗塞サイズの変化 (D). TTC 染色の写真 (C). 心筋虚血再灌流障害に対する G-CSF の急性効果の機序 (E).

G; G-CSF, PD; ERK 阻害薬, AG; Jak2 阻害薬, LY; PI3 kinase 阻害薬, L-NAME; NOS 阻害薬, * $p < 0.05$, # $p < 0.01$.

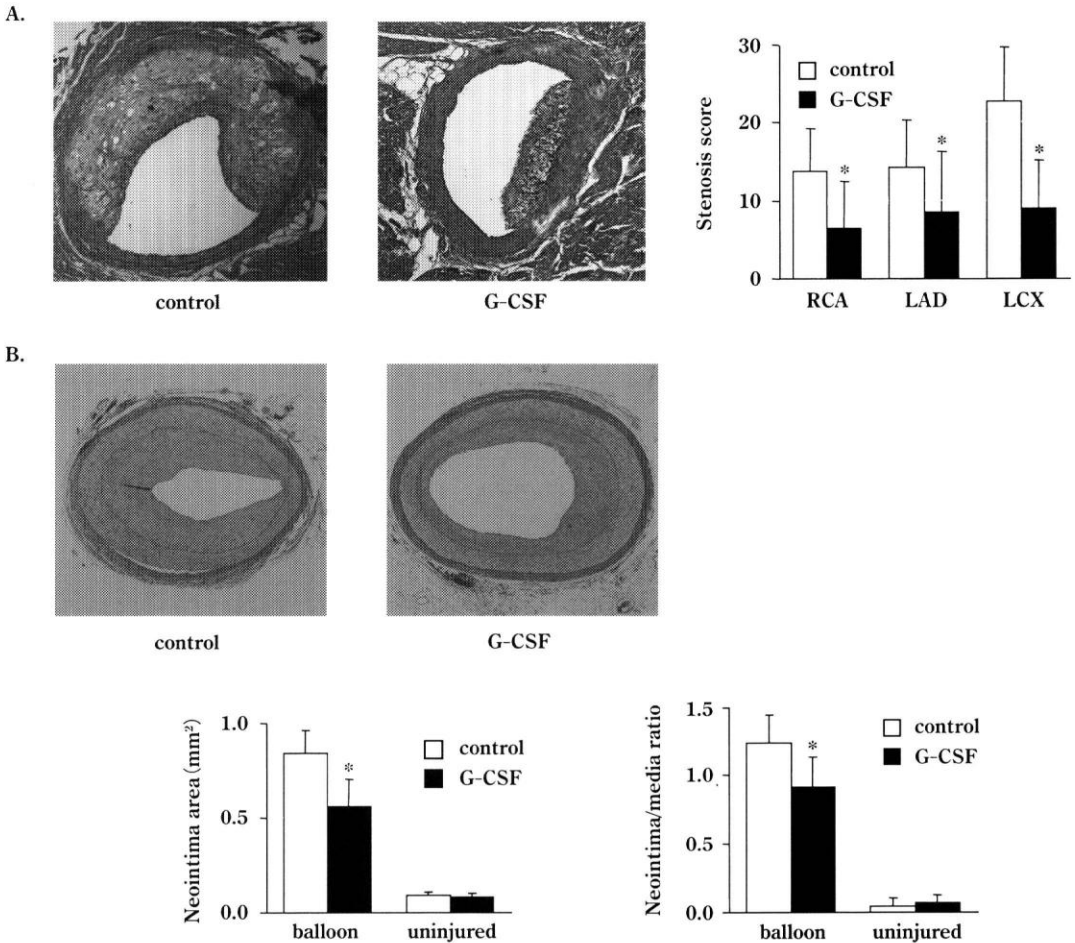


図4 動脈硬化モデルに対する G-CSF の効果(文献²²⁾より改変引用)

WHHL ウサギの冠動脈の写真と Stenosis score (A). 高脂血症ウサギの腸骨動脈(バルーン傷害 4 週間後)の写真と Neointima area, Neointima/media ratio (B). * $p < 0.05$.

告されている^{20,21)}。我々も動脈硬化のモデルである Watanabe heritable hyperlipidemic (WHHL) ウサギと高脂肪食を与えて血管傷害を起こしたウサギの 2 つの動物モデルを用いて、G-CSF が動脈硬化や血管リモデリングを悪化させないことを確認した(図 4A, B)²²⁾。その後も世界中で急性心筋梗塞に対する G-CSF の効果を検討する臨床研究が慎重に進められ、G-CSF はインターベンション治療後の再狭窄を増やさないという結果や心機能を改善させるという結果が報告されつつある^{23~25)}。しかしながら、最近では比較的大規模な臨床研究で G-CSF の効果を否定する結果も発表された^{26,27)}。G-CSF の効果を検討した臨床研究の結果を比較検討してみると、急性心筋梗塞から G-CSF 治療開始までの時間が遅くなるにつれ効果がなくなることが

わかり、上述した我々のマウスの実験結果と一致していることがわかる(表 1)。

おわりに

虚血性心疾患に対し G-CSF による治療法は、投与方法が皮下注射であることや自己の幹細胞を生体内で利用することから、非常に簡便かつ侵襲を伴わない治療法として今後の発展が期待される。しかしながら実際に心血管疾患をもつ患者にサイトカイン治療を行った場合の効果や安全性については慎重に検討していく必要がある。今後は G-CSF の投与量、投与方法、開始時間に関し、より適正なプロトコールによるランダム化された大規模臨床試験による検証が必要となるであろう。また、短期効果だけでなく長期効果に関する評価も

表1 最近の臨床研究の結果

G-CSF (投与量×日数)	G-CSFの開始時期 (AMI発症からの時間)	患者数	結果 (G-CSF vs. Cont)	Reference
5 μ g/kg×4 days	1-2 days	G-CSF (n=10) Control (n=10)	6 months EF \uparrow (p=0.068) LV size \downarrow (p=0.054)	Valgimigli, et al ²³⁾
10 μ g/kg×7 days	2 days	G-CSF (n=14) Control (n=9)	3 months EF \uparrow (p<0.01) Perfusion \uparrow (p<0.001)	Kuethel, et al ²⁴⁾
10 μ g/kg×6 days	90 minutes	G-CSF (n=25) Control (n=25)	4 months EF \uparrow (p<0.001) LV size \downarrow (p<0.002)	Ince, et al FIRSTLINE-AMI ²⁵⁾
10 μ g/kg×5 days	5 days	G-CSF (n=56) Control (n=58)	4-6 months EF \sim (p=0.14) Infarct size \sim (p=0.56)	Zohnhofer, et al REVIVAL-2 ²⁶⁾
10 μ g/kg×6 days	1-2 days	G-CSF (n=39) Control (n=39)	6 months EF \sim (p=0.9) LV size \sim (p=0.7)	Ripa, et al STEMMI ²⁷⁾

必要である。非虚血性心不全に対する効果や、G-CSF と他の造血性サイトカインとの combination therapy の効果についても今後さらなる検討が望まれる。

文 献

- 1) Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al: Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 2001; 410: 701-5.
- 2) Murry CE, Soonpaa MH, Reinecke H, et al: Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature* 2004; 428: 664-8.
- 3) Balsam LB, Wagers AJ, Christensen JL, et al: Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium. *Nature* 2004; 428: 668-73.
- 4) Kawada H, Fujita J, Kinjo K, et al: Nonhematopoietic mesenchymal stem cells can be mobilized and differentiate into cardiomyocytes after myocardial infarction. *Blood* 2004; 104: 3581-7.
- 5) Takano H, Qin Y, Hasegawa H, et al: Effects of G-CSF on left ventricular remodeling and heart failure after acute myocardial infarction. *J Mol Med* 2006; 84: 185-93.
- 6) Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al: Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 10344-9.
- 7) Ohtsuka M, Takano H, Zou Y, et al: Cytokine therapy prevents left ventricular remodeling and dysfunction after myocardial infarction through neovascularization. *FASEB J*. 2004; 18: 851-3.
- 8) Minatoguchi S, Takemura G, Chen XH, et al: Acceleration of the healing process and myocardial regeneration may be important as a mechanism of improvement of cardiac function and remodeling by postinfarction granulocyte colony-stimulating factor treatment. *Circulation* 2004; 109: 2572-80.
- 9) Miki T, Miura T, Nishino Y, et al: Granulocyte colony stimulating factor/macrophage colony stimulating factor improves postinfarct ventricular function by suppression of border zone remodeling in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2004; 31: 873-82.
- 10) Sugano Y, Anzai T, Yoshikawa T, et al: Granulocyte colony-stimulating factor attenuates early ventricular expansion after experimental myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 2005; 65: 446-56.
- 11) Iwanaga K, Takano H, Ohtsuka M, et al: Effects of G-CSF on cardiac remodeling after acute myocardial infarction in swine. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 325: 1353-9.
- 12) Harada M, Qin Y, Takano H, et al: G-CSF prevents cardiac remodeling after myocardial infarction by activating the Jak-Stat pathway in cardiomyocytes. *Nat Med* 2005; 11: 305-11.
- 13) Ueda K, Takano H, Hasegawa H, et al: G-CSF directly inhibits myocardial ischemia-reperfusion injury through Akt-eNOS pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: e108-13.
- 14) Kanellakis P, Slater NJ, Du XJ, et al: Granulocyte colony-stimulating factor and stem cell factor improve endogenous repair after myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 2006; 70: 117-25.
- 15) Hasegawa H, Takano H, Shiraishi H, et al: Intracoronary injection of granulocyte colony-stimulating factor

- ameliorates the progression of left ventricular remodeling after myocardial ischemia/reperfusion in rabbits. *Circ J* 2006; 70: 942-4.
- 16) Hasegawa H, Takano H, Iwanaga K, et al: Cardioprotective effects of granulocyte colony-stimulating factor in swine with chronic myocardial ischemia. *J Am Coll Cardiol* 2006; 47: 842-9.
 - 17) Li Y, Takemura G, Okada H, et al: Treatment with granulocyte colony-stimulating factor ameliorates chronic heart failure. *Lab Invest* 2006; 86: 32-44.
 - 18) Miyata S, Takemura G, Kawase Y, et al: Autophagic cardiomyocyte death in cardiomyopathic hamsters and its prevention by granulocyte colony-stimulating factor. *Am J Pathol* 2006; 168: 386-97.
 - 19) Kang HJ, Kim HS, Zhang SY, et al: Effects of intracoronary infusion of peripheral blood stem-cells mobilised with granulocyte-colony stimulating factor on left ventricular systolic function and restenosis after coronary stenting in myocardial infarction: the MAGIC cell randomised clinical trial. *Lancet* 2004; 363: 751-6.
 - 20) Yoshioka T, Takahashi M, Shiba Y, et al: Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) accelerates reendothelialization and reduces neointimal formation after vascular injury in mice. *Cardiovasc Res* 2006; 70: 61-9.
 - 21) Takamiya M, Okigaki M, Jin D, et al: Granulocyte colony-stimulating factor-mobilized circulating c-Kit+ /Flk-1+ progenitor cells regenerate endothelium and inhibit neointimal hyperplasia after vascular injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: 751-7.
 - 22) Hasegawa H, Takano H, Ohtsuka M, et al: G-CSF prevents the progression of atherosclerosis and neointimal formation in rabbits. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 344: 370-6.
 - 23) Valgimigli M, Rigolin GM, Cittanti C, et al: Use of granulocyte-colony stimulating factor during acute myocardial infarction to enhance bone marrow stem cell mobilization in humans: clinical and angiographic safety profile. *Eur Heart J* 2005; 26: 1838-45.
 - 24) Kuethe F, Figulla HR, Herzau M, et al: Treatment with granulocyte colony-stimulating factor for mobilization of bone marrow cells in patients with acute myocardial infarction. *Am Heart J* 2005; 150: 115
 - 25) Ince H, Petzsch M, Kleine HD, et al: Preservation from left ventricular remodeling by front-integrated revascularization and stem cell liberation in evolving acute myocardial infarction by use of granulocyte-colony-stimulating factor (FIRSTLINE-AMI). *Circulation* 2005; 112: 3097-106.
 - 26) Zohlnhofer D, Ott I, Mehilli J, et al: Stem cell mobilization by granulocyte colony-stimulating factor in patients with acute myocardial infarction: a randomized controlled trial. *JAMA* 2006; 295: 1003-10.
 - 27) Ripa RS, Jorgensen E, Wang Y, et al: Stem cell mobilization induced by subcutaneous granulocyte-colony stimulating factor to improve cardiac regeneration after acute ST-elevation myocardial infarction: result of the double-blind, randomized, placebo-controlled stem cells in myocardial infarction (STEMMI) trial. *Circulation* 2006; 113: 1983-92.