[受賞]

虚血肢における M-CSF の血流改善機序

中野 景司

(小児科学講座)

Mechanisms Underlying Acceleration of Blood Flow Recovery in Ischemic Limbs by Macrophage Colony-Stimulating Factor

Keiji NAKANO

(Department of Pediatrics)

要 約

近年, Minamino らはマクロファージコロニー刺激因子 (M-CSF) が血管内皮前駆細胞 (EPC) を骨髄から末梢血に動員することにより虚血部位の血管数が増加し, 血流が改善することを報告した. 今回筆者らは M-CSF の EPC 動員のメカニズムについて研究をおこなった. M-CSF はその受容体を発現している骨髄細胞, 特に骨髄球系細胞に作用し, それらの細胞からの血管内皮成長因子 (VEGF) の産生を増加させた. In vivo で抗 VEGF 抗体を投与すると, M-CSF による血流改善効果と EPC 動員効果が阻害された. これらの結果から M-CSF は骨髄内の骨髄球系細胞から産生される VEGF を介して EPC を骨髄内から虚血部位に動員することにより, 血流を改善させるということがわかった.

はじめに

Asahara らは, 血管内皮に分化しうる EPC が骨髄中や末梢血中に存在することを報告した^{1,2)}. これらの発見をもとに, Tateishi や Yuyama らは閉塞性動脈硬化症やバージャー病患者に骨髄単核球を用いることで虚血肢の血流を改善させるだけでなく, 潰瘍や疼痛も減少させることを報告した³⁾. その後, 骨髄細胞移植が虚血性心疾患にも有効であることも報告された⁴⁾.

現在 3 種のコロニー刺激因子 (G-CSF: 顆粒球コロニー刺激因子, M-CSF: マクロファージコロニー刺激因子, GM-CSF: 顆粒球マクロファージコロニー刺激因子) が知られている. G-CSF と GM-CSF については骨髄細胞を刺激して造血系前駆細胞や EPC を動員することが報告されている⁵⁻⁸⁾. G-CSF は虚血性心疾患に対し既に臨床応用されているが, その効果は賛否両論である⁹⁻¹²⁾.

近年, 本学病理学第一講座の Minamino と Adachi らが, G-CSF と同様に M-CSF にも骨髄から末梢血に EPC を動員する働きがあることを報告した¹³⁾. G-CSF による EPC の動員には CXCR4 と SDF-1 の

down regulation が関わっていると報告されているが¹⁴⁾, M-CSF の作用機序は解明されていない. 本研究では血管新生に重要な役割を担う VEGF に注目し, M-CSF の血流改善機序を解析した.

材料と方法

実験動物

清水実験材料より供給された C57BL/6 マウス (B6 マウス) 6~8 週齢の雄を使用した.

試薬

CD3, CD19, CD11b, CD11c, Ter119, CD45, Flk-1, NK1.1 に対する抗体は BD Bioscience 社の製品を使用した.

CD115 (M-CSF 受容体) に対する抗体は eBioscience 社の製品を使用した. 抗 VEGF 抗体は Lab Vision 社の製品を使用した.

Human G-CSF は中外製薬株式会社から, Human M-CSF は森永乳業株式会社から提供されたものを使用した.

下肢虚血モデルの作成

B6 マウスの右側鼠径部皮膚を切開し、鼠径動静脈を結紮・離断したのち皮膚を縫合する。その後、後述のレーザードップラーを用いて処置肢の血流途絶を確認する¹⁵⁾。

G-CSF, M-CSF, 抗 VEGF 抗体の投与

M-CSF および G-CSF をそれぞれ 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ずつ腹腔内投与する。抗 VEGF 抗体は 250 $\mu\text{g}/\text{匹}$ を腹腔内投与する。

レーザードップラー法による血流測定

マウスの下肢を剃毛し pentobarbital で麻酔する。コルクボードに固定し、Laser Doppler Perfusion Image analyzer (Moor Instruments 社) を用いて血流を測定した¹⁵⁾。それにより得た血流分布画像を虚血肢/健常肢の血流比として数値化した。

細胞培養

培養液として RPMI1640 (10%FCS 含有) を使用し CO2 インキュベータ内で培養した。M-CSF 添

A

B

図 1

加群には培養液中に 10 ng/ml となるよう M-CSF を添加した。

また、骨髄中の各種細胞の分離には Ter119, Gr-1, Mac-1, CD19 の蛍光抗体で標識した骨髄細胞を EPICS ALTRA (Beckman Coulter 社) を用いて選別し、同条件で培養した。

ELISA による VEGF 濃度の測定

Quantikine Mouse VEGF immunoassay kit (R&D systems 社) を用いて血清および培養上清中の VEGF 濃度を測定した。

フローサイトメトリー

細胞表面抗原の解析には、FACScan (Becton and Dickinson 社) を使用した。また、本研究においては、EPC を Flk-1 陽性 /CD45 陰性 /Ter119 陰性の細胞と定義した¹⁷⁾。

結 果

実験1：抗 VEGF 抗体は G-CSF ではなく M-CSF の血流改善効果を阻害する

図1に示す5群を設定した。Day 0 に下肢虚血モデルマウスを作成し、抗 VEGF 抗体は Day 0 のみに、G-CSF および M-CSF は Day 0, 1, 2 に投与した。Day 0, 3, 7 に血流を測定した。図1A にレーザードップラーで得た血流イメージを、図1B に血流イメージから解析した虚血肢/健常肢比をグラフに示す。抗 VEGF 抗体を投与した群では M-CSF の血流改善効果が抑制されるが、G-CSF の効果は抑制されなかった。この結果から、M-CSF は VEGF を介して血流を改善させるということがわかった。また、G-CSF の血流改善効果に関しては CXCR4 と SDF-1 とを介するメカニズムが報告されているが、本結果とは矛盾しなかった。

実験2：骨髄細胞における M-CSF 受容体の発現

マウスの骨髄を採取し、M-CSF 受容体 (CD115)

図2

図 3

と種々の lineage marker で染色しフローサイトメーターで解析した。図2に示すように、主に Gr-1 陽性細胞と Mac-1 陽性細胞が CD115 を発現していた。

実験3: M-CSF 刺激による骨髓細胞の VEGF 産生

ELISA 法を用いて血清中の VEGF 濃度を測定したが、無処置のマウスおよび M-CSF を投与したマウスのいずれの血清からも VEGF は検出できなかった (data not shown)。次に細胞が産生する VEGF を測定するために、骨髓細胞 (BMCs) と脾細胞とを $1 \times 10^6/\text{ml}$ ずつ培養液に浮遊させ、M-

CSF 添加群と無添加群を作成し、Day 1, 3, 5 の培養上清中の VEGF 濃度を測定した (図3A)。脾細胞の培養上清からは VEGF は検出されなかったが、骨髓細胞からは VEGF 産生がみられ、さらに M-CSF 添加群では VEGF 産生が亢進していた。

そこで、骨髓中のどの種の細胞が VEGF を産生しているかを検討するため、種々の lineage marker で標識した骨髓細胞をセルソーターを用いて分離・培養し、上清中の VEGF 濃度を測定した (図3B)。実験2で CD115 を発現していた Gr-1 陽性細胞と Mac-1 陽性細胞で、VEGF 産生と M-CSF 刺激による産生の亢進が認められた。

図4

実験4: M-CSF のEPC 動員効果を抗VEGF 抗体が阻害する

実際に抗 VEGF 抗体が末梢への EPC の動員を阻害するかを検討した (図4)。M-CSF 単独投与群, M-CSF・抗 VEGF 抗体併用群, コントロール群を作製し Day 0 に各試薬をマウスに投与する。Day 4 に末梢血を採取しフローサイトメーターで解析した。M-CSF を投与すると末梢血中の EPC が増加したが, 抗 VEGF 抗体を同時に投与すると末梢血での EPC 動員が抑制された。

考 察

従来, EPC を介した血管新生は胎生期におけると考えられていたが, Asahara らは成人の末梢血中にも EPC が存在し, 成人の血管新生にも働いていることを証明した。また彼らは EPC が骨髄細胞の一部として存在し, 骨髄から末梢血中に動員されるということも報告した。これらの知見をもとに, 骨髄細胞が閉塞性動脈硬化症やバージャー病の血流改善を目的に臨床応用されるようになった。

それと平行してサイトカインを用いた血管新生も盛んに研究されるようになり, G-CSF や GM-CSF による末梢血中の EPC 増加効果とその機序

が次第に明らかになってきた。

今回の研究では M-CSF の血流改善機序についての解析を行った。抗 VEGF 抗体が M-CSF の血流改善効果を阻害することから, そのメカニズムに VEGF が大きな役割を担っているということがわかった (実験1)。

VEGF は血管新生における最も重要なサイトカインのひとつで, あらゆる臓器で発現がみられるが, 虚血状態や腫瘍の発育にも関与している²³⁻²⁹⁾。VEGF は G-CSF, GM-CSF, エストロゲンなどと同様に EPC を骨髄から末梢血中に動員する^{13,22,30,31)}。しかしながら, VEGF を全身性に投与すると浮腫の発生などの副作用が出現することがわかっている³²⁾。

実験結果から, M-CSF を投与すると骨髄細胞 (主に骨髄球系細胞) から VEGF が産生されるが, 血清中の VEGF 濃度は上昇しないことがわかった。すなわち M-CSF の血流改善の機序において, VEGF は全身性ではなく骨髄内局所で作用していると考えられる。上述したように VEGF が骨髄内の EPC を末梢血中に動員する作用があることは報告されており, 本実験結果と併せると, M-CSF が骨髄中の顆粒球系細胞を刺激し VEGF 産生を亢進→末梢血中に EPC が増加→虚血部位に EPC が動

員され血管新生が促進される, という機序が考えられた。実験4の抗 VEGF 抗体を投与すると EPC の動員が阻害されるという結果もこれを支持している。

M-CSF は化学療法の補助療法としてすでに臨床使用されており, 重大な副作用は報告されておらず, 虚血性疾患に対する新たな治療戦略として有効であると考えられた。

謝 辞

本研究は本学病理学第一講座において, 池原進教授・足立靖助教授の指導のもと行われた。また同教室のスタッフにも多くの支援を賜り, ここに感謝の意を表する。

文 献

- Asahara, T., Murohara, T., Sullivan, A., et al.: Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*, 275: 964-967, 1997.
- Asahara, T., Masuda, H., Takahashi, T., Kalka, C., Pastore, C., Silver, M., Kearne, M., Magner, M. and Isner, J. M.: Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res*, 85: 221-228, 1999.
- Tateishi-Yuyama, E., Matsubara, H., Murohara, T., et al.: Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomized control trial. *Lancet*, 360: 427-435, 2002.
- Kobayashi, T., Hamano, K., Li, T. S., et al.: Enhancement of angiogenesis by the implantation of self bone marrow cells in a rat ischemic heart model. *J Surg Res*, 89: 189-195, 2000.
- Andreeff, M. and Welte, K.: Hematopoietic colony-stimulating factors. *Seminars in Oncology*, 16: 211-229, 1989.
- Tsuchiya, M., Nomura, H., Asano, S., et al.: Characterization of recombination human granulocyte-colony stimulating factor produced in mouse cells. *EMBO J*, 6: 611-616, 1987.
- Teshima, T., Harada, M., Takamatsu, Y., Makino, K., Inaba, S., et al.: Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF)-induced mobilization of circulating haematopoietic stem cells. *Br J Haematol*, 84: 570-573, 1993.
- Schwartzberg, L. S., Birch, R., Hazelton, B., Tauer, K. W., Lee, P. Jr, Altomose, R., George, C., Blanco, R., Wittlin, F., Cohen, J., et al.: Peripheral blood stem cell mobilization by chemotherapy with and without recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. *J Haemathother*, 1: 317-327, 1992.
- Kang, H. J., Kim, H. S., Zhang, S. Y., Park, K. W., Cho, H. J., Koo, B. K., Kim, Y. J., Soo Lee, D., Sohn, D. W., Han, K. S., Oh, B. H., Lee, M. M. and Park, Y. B.: 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*, 363: 751-756, 2004.
- Ripa, R. S., Yongzhong, W., Jørgensen, E. and Kastrup, J.: Bone-Marrow stem cell mobilization induced by granulocyte-colony stimulating factor in patients with a PCI-treated acute ST-elevated myocardial infarction is safe: Results from a double-blind randomized study, the stem cells in myocardial infarction. (STEMMI) trial. *Circulation*, 110 sup III: 238, 2004.
- Peetsch, M., Ince, H., Kleine, H. D., Schmidt, H., Rehders, T., Körber, T., Freund, M. and Nienaber, C. A.: No restenosis after G-CSF in acute myocardial infarction: insights from FIRSTLINE-AMI (front-integrated revascularization and stem cell liberation in evolving acute myocardial infarction by granulocyte colony-stimulating factor). *Circulation*, 110 sup III: 238, 2004.
- Ince, H., Petzsch, M., Kleine, H. D., Schmidt, H., Rehders, T., Körber, T., Chatterjee, T., Freund, M. and Nienaber, C.: Prevention of LV remodeling with G-CSF in acute myocardial infarction: insights from FIRSTLINE-AMI (front-integrated revascularization and stem cell liberation in evolving acute myocardial infarction by granulocyte colony-stimulating factor). *Circulation*, 110 sup III: 352, 2004.
- Minamino, K., Adachi, Y., Okigaki, M., Ito, H., Togawa, Y., Fujita, K., Tomita, M., Suzuki, Y., Zhang, Y., Iwasaki, M., Nakano, K., Koike, Y., Matsubara, H., Iwasaka, T., Matsumura, M. and Ikehara, S.: Macrophage Colony-Stimulating Factor (M-CSF) as Well as Granulocyte Colony-Stimulating Factor (G-CSF) Accelerates Neovascularization. *Stem Cells*, 23: 347-354, 2005.
- Petit, I., Szyper-Kravitz, M., Nagler, A., Lahav, M., Peled, A., Habler, L., Ponomaryov, T., Taichman, R. S., Arenzana-Seisdedos, F., Fujii, N., Sandbank, J., Zipori, D. and Lapidot, T.: G-CSF induces stem cell mobilization by decreasing bone marrow SDF-1 and up-regulating CXCR4. *Nat Immunol*, 3: 687-694, 2002.
- Amano, K., Okigaki, M., Adachi, Y., Fujiyama, S., Mori, Y., Kosaki, A., Iwasaka, T. and Matsubara, H.: Mechanism for IL-1 beta-mediated neovascularization unmasked by IL-1 beta knock-out mice. *J Mol Cell Cardiol*, 36(4): 469-480, 2004.
- Iwasaki, M., Adachi, Y., Minamino, K., Suzuki, Y., Zhang, Y., Okigaki, M., Nakano, K., Koike, Y., Wang, J., Mukaide, H., Taketani, S., Mori, Y., Takahashi, H.,

- Iwasaka, T. and Ikehara, S.: Mobilization of Bone Marrow Cells by G-CSF Rescues Mice from Cisplatin-Induced Renal Failure, and M-CSF Enhances the Effects of G-CSF. *J Am Soc Nephrol*, 16: 658–666, 2005.
- 17) Folkman, J. and Shing, Y.: Angiogenesis. *J Biol Chem*, 267: 10931–10934, 1992.
 - 18) Schaper, W., De Brabander, M. and Lewi, P.: DNA synthesis and mitoses in coronary collateral vessels of the dog. *Circ Res*, 28(6): 671–679, 1971.
 - 19) Lindemann, A. and Rumberger, B.: Vascular complications in patients treated with granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF). *Eur J Cancer*, 29A: 2338–2339, 1993.
 - 20) Adachi, K., Suzuki, M., Sugimoto, T., Yoroze, K., Takai, H., Uetsuka, K., Nakayama, H. and Doi, K.: Effects of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) on bleomycin-induced lung injury of varying severity. *Toxicol Pathol*, 31: 665–673, 2003.
 - 21) Takahashi, T., Kalka, C., Masuda, H., Chen, D., Silver, M., Kearney, M., Magner, M., Isner, J. M. and Asahara, T.: Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med*, 5: 434–438, 1999.
 - 22) Dvorak, H. F.: Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. *J Clin Oncol*, 20: 4368–4380, 2002.
 - 23) Detmar, M., Yeo, K. T., Nagy, J. A., Van de Water, L., Brown, L. F., Berse, B., Elicker, B. M., Ledbetter, S. and Dvorak, H. F.: Keratinocyte-derived vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) is a potent mitogen for dermal microvascular endothelial cells. *J Invest Dermatol*, 105: 44–50, 1995.
 - 24) Ferrara, N., Houck, K., Jakeman, L. and Leung, D. W.: Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins. *Endocrine Rev*, 13: 18–32, 1992.
 - 25) Ferrara, N. and Davis-Smyth, T.: The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocrine Rev*, 18: 4–25, 1997.
 - 26) Thomas, K. A.: Vascular endothelial growth factor, a potent and selective angiogenic agent. *J Biol Chem*, 271: 603–606, 1996.
 - 27) Barbera-Guillem, E., Nyhus, J. K., Wolford, C. C., Friece, C. R. and Sampsel, J. W.: Vascular endothelial growth factor secretion by tumor-infiltrating macrophages essentially supports tumor angiogenesis, and IgG immune complexes potentiate the process. *Cancer Res*, 62: 7042–7049, 2002.
 - 28) Jablonska, E., Puzewska, W., Grabowska, Z., Jablonski, J. and Talarek, L.: VEGF, IL-18 and NO production by neutrophils and their serum levels in patients with oral cavity cancer. *Cytokine*, 30: 93–99, 2005.
 - 29) Asahara, T., Takahashi, T., Masuda, H., Kalka, C., Chen, D., Iwaguro, H., Inai, Y., Silver, M. and Isner, J. M.: VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *EMBO J*, 18: 3964–3972, 1999.
 - 30) Strehlow, K., Werner, N., Berweiler, J., Link, A., Dirnagl, U., Priller, J., Laufs, K., Ghaeni, L., Milosevic, M., Bohm, M. and Nickenig, G.: Estrogen increases bone marrow-derived endothelial progenitor cell production and diminishes neointima formation. *Circulation*, 107: 3059–3065, 2003.
 - 31) Vajanto, I., Rissanen, T. T., Rutanen, J., Hiltunen, M. O., Tuomisto, T. T., Arve, K., Narvanen, O., Manninen, H., Rasanen, H., Hippelainen, M., Alhava, E. and Yla-Herttuala, S.: Evaluation of angiogenesis and side effects in ischemic rabbit hindlimbs after intramuscular injection of adenoviral vectors encoding VEGF and LacZ. *J Gene Med*, 4: 371–380, 2002.