M-CSF の基礎と臨床

元吉 和夫

防衛医科大学校第3内科

“Basic and clinical studies on M-CSF”

Kazuo Motoyoshi

The Third Department of Internal Medicine, National Defense Medical College

Macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) was found in 1978 by our group as a homodimeric glycoprotein with a molecular weight of 85 kDa in human urine which stimulated macrophage colony formation in *in vitro* culture system of human and mouse bone marrow cells, and its gene was cloned by our group in collaboration with Genetics Institute in 1987. In vitro studies showed that M-CSF stimulated proliferation and differentiation of macrophage progenitor cells, and activated functions of mature macrophages such as killing of bacteria and fungi, production of granulocyte-macrophage CSF, granulocyte CSF, interleukin 6 and 8, tumor necrosis factor and reactive nitrogen intermediates, and cholesterol metabolism. In addition to the effects on macrophages, M-CSF was also found to stimulate proliferation and differentiation of trophoblasts and osteoclasts. Based on these basic studies, we conducted a large scale double blind clinical study using M-CSF and placebo, and found that administration of M-CSF to patients with acute myeloid leukemia after intensive chemotherapies accelerates recovery of neutrophils and platelets, reduces incidence and period of febrile neutropenia, total volumes of platelets transfused, and period required to finish three courses of consolidation therapies with a statistic significances. It was also found that administration of M-CSF reduced relapse rate and increased disease-free survival rate of younger AML patients (15-29 years old) with statistic significances. More recently, it was found that administration of M-CSF to patients with ovarian cancers after intensive chemotherapies following operations in which tumors were completely removed, shortened periods required to finish two courses of chemotherapies and increased survival rate with statistic significances. These results indicate that administration of M-CSF not only stimulates hematopoiesis after cancer chemotherapy, but also induces anti-tumor immunity against cancer cells.

Key words : M-CSF, op/op mouse, WHHL rabbit, double blind test, disease-free survival

Chromosome 1p13-p21

図1 M-CSF 遺伝子から3種類のM-CSF分子が生成される過程

表1 M-CSFの多彩な生物活性

1. 造血刺激活性
 - a. 単球の増殖と分化を刺激し、生存期間を延長する
 - b. 単球の細菌や真菌に対する殺菌能を刺激する
 - c. 単球の GM-CSF (Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) と G-CSF (Granulocyte CSF) の産生をプライミングすることによって好中球の産生を刺激する
 - d. 単球の IL-8 (Interleukin 8) 産生を増幅することによって好中球の殺菌能を刺激する
 - e. 単球の GM-CSF と IL-6 産生をプライミングすることによって血小板の産生を刺激する
 - f. RNI (Reactive nitrogen intermediate) 産生を増幅することによって殺腫瘍活性を高める
 - g. TNF (Tumor necrosis factor) 産生をプライミングすることによって殺腫瘍活性を高める
2. 絨毛細胞の増殖と分化を刺激する
3. 破骨細胞の増殖と分化を刺激する
4. 脂質代謝刺激活性
 - a. 単球の LDL (Low-density lipoprotein) 受容体およびスカベンジャー受容体の発現を高めることによって LDL および変性 LDL の取り込みを促進する
 - b. 単球のコレステロールエステル分解酵素を活性化するとともに, HDL (High-density lipoprotein) 受容体の発現を高めることによって LDL の逆転送を促進する
 - c. WHHL (Watanabe heritable hyperlipidemic) ウサギにおいて動脈硬化進展を防止する

M-CSF の発見と遺伝子クローニング

1978年筆者らはヒト尿中に *in vitro* でマウス骨髄細胞によるマクロファージコロニー形成を刺激する因子を発見して CSF-HU (Colony-stimulating factor from human urine) と命名した¹⁾。最終精製標品は 2×10^8 U/mg 蛋白の比活性をもった分子量85 kD の糖蛋白質であり、分子量43kD のサブユニットのホモ2量体であった²⁾。ついで1987年筆者らは米国の Gordon G. Wong (Genetics Institute 社, Boston) らと共同で CSF-HU の遺伝子クローニングに成功した³⁾。CSF-HU の cDNA (p3 ACSF-69) は 3981個のヌクレオチドからなり1個の open reading frame をもっており、その5'側に signal peptide 配列を持っていた。遺伝子組換え型 CSF-HU が大量に調製され *in vitro* および *in vivo* の実験が進むにつれて、CSF-HU が macrophage CSF (M-CSF) と呼ぶにふさわしいサイトカインであることが判明したので、筆者らは第16回国際実験血液学会 (1987年, 東京) および国際モノカインワークショップ (1987年, South Carolina) において、「CSF-HU を M-CSF と命名する」ことを提唱して承認された。

M-CSF 遺伝子はヒト第1番染色体1 p13-p21領域に1コピー存在し、それから4kb mRNA がつくられ、それ以後図1に示すようなプロセスを経て3種類の成熟型 M-CSF が産生される。このうち85kD -M-CSF は可溶型であり血中に存在するが⁴⁾、2種類の PG-M-CSF はコンドロイチン硫酸鎖を介して組織の細胞外マトリックスの V 型コラーゲンと結合して存在する組織結合型である⁵⁾⁶⁾。

可溶型 M-CSF の生物活性 (表1 参照)

1. 造血刺激活性

M-CSF は単球の増殖、分化を刺激するだけでなく、単球の細菌や真菌に対する殺菌能を刺激するとともに、単球の GM-CSF や G-CSF 産生をプライミングすることによって好中球産生を刺激する⁷⁾。さらに単球の IL-8 産生を刺激することによって好中球の殺菌能を刺激する⁸⁾。

M-CSF は単球の GM-CSF と IL-6 産生をプライミングすることによって血小板産生も刺激する。M-CSF は単球の RNI (Reactive nitrogen intermediate) 産生を刺激したり、腫瘍壊死因子 (TNF) の産生をプライミングすることによって単球の殺腫瘍

図2 骨吸収における PG-M-CSF の役割
骨の Lining cell の細胞外マトリックスの V 型コラーゲンとコンドロイチン硫酸鎖を介して結合して局在する PG-M-CSF は破骨細胞を骨の表面に呼び込んで骨吸収を刺激すると考えられる

活性を増強する⁹⁾¹⁰⁾。最近 M-CSF をマウスに投与すると脾臓に NK 細胞が誘導されることが明らかとなった¹¹⁾。

2. 絨毛細胞分化作用

妊娠に際して胎盤脱落膜や絨毛細胞で大量の M-CSF が産生されるが、これは未熟な単核の絨毛細胞 (cytotrophoblast) が細胞融合を繰り返しながら多核の成熟した合胞体細胞 (syncytiotrophoblast) へ分化する過程に M-CSF が必須の因子であるためである¹²⁾。この胎盤局所での M-CSF の大量産生は当然母体の高 M-CSF 血症をひきおこし、母体は感染症が無くても白血球増加症となる (妊娠性白血球増加症)¹³⁾。

3. 破骨細胞増殖分化作用

大理石病モデル動物である op/op マウスにおいて M-CSF 遺伝子内に点突然変異が起こっており、そのため機能を持たない短い M-CSF が産生されていることが報告¹⁴⁾されて以来、M-CSF の破骨細胞への作用について多くの研究が行われ、現在では M-CSF が破骨細胞前駆細胞の増殖と分化に必須の因

図3 AML患者の地固め療法後の好中球と血小板回復に及ぼすM-CSFの投与効果(文献23)

A) 化学療法開始から好中球が $1,000$ に回復するまでの日数

B) 化学療法開始から血小板が 10 万に回復するまでの日数

子であることがin vitroで証明されている¹⁵⁾。事実op/opマウスをM-CSFで治療すると骨に破骨細胞が、また末梢血に単球が出現し、大理石病を完全に直すことができる。このことは破骨細胞と単球は共通の前駆細胞から産生されることを示している。

4. 脂質代謝促進作用

筆者らが小児慢性好中球減少症患者に対するM-

CSFの好中球増加効果を調べるための臨床試験を実施していた時、M-CSF投与を受けた患者全員において血清総コレステロールが $-9.5 \sim -33.9\%$ も減少していることに気づいた¹⁶⁾。それ以後M-CSFの脂質代謝に及ぼす影響についてin vitroおよびin vivoでの研究が進展し、M-CSFが①マクロファージの低比重リポ蛋白質(LDL)受容体およびス

表2 M-CSF とプラセボを用いた2重盲検試験の結果

	プラセボ群	M-CSF 群	
登録症例数	101	97	
適格症例数	94	90	
解析対象症例数	94	88	
好中球回復の 中央値 (日)	96	85	p=0.0348
総感染頻度 (回)	185	133	p=0.0206
総感染日数 (日)	977	565	p=0.0029
血小板回復の 中央値 (日)	81	72	p=0.0364
血小板輸血頻度の 中央値 (日)	10	8	p=0.0259
血小板輸血量の 中央値 (単位)	115	80	p=0.0292
地固め療法終了の 中央値 (日)	110	93	p=0.0050

カベンジャー受容体の発現を高めることによって LDL および変性 LDL の取り込みを促進する¹⁷⁾, ②マクロファージのコレステロールエステル分解酵素を活性化するとともに, HDL 受容体の発現を高めることによって LDL の逆転送も促進することが明らかとなった。そこで M-CSF をヒトの家族性高コレステロール血症のモデル動物である WHHL (Watanabe heritable hyperlipidemic) ウサギに長期間投与したところ M-CSF 群では明らかに動脈硬化の進展が抑制されていた¹⁸⁾。

プロテオグリカン型 M-CSF

1992年筆者の研究グループの Suzu らは組織の細胞外マトリックスと結合して存在するプロテオグリカン型 M-CSF (PG-M-CSF) を発見した (図1 参照)⁵⁾⁶⁾。PG-M-CSF はその分子構造から判るように 85kD-M-CSF の全ての生物活性を持っているだけでなく, 付加的 C-末端ペプチドを持っていることと, そこにコンドロイチン硫酸鎖が結合していることなどの構造的異性性をもっていることから¹⁹⁾, 85kD-M-CSF には無い PG-M-CSF 特異的生物活性を持っている。PG-M-CSF 特異的生物活性として

は次のようなものがある。①骨の lining cell は M-CSF を産生するが, 産生された 85kD-M-CSF は骨髓腔内に拡散していくが, PG-M-CSF は細胞外マトリックスの V 型コラーゲンと結合して局所に存在するので, その周りに破骨細胞が集まって来て骨吸収が進行する (図2)²⁰⁾, ② PG-M-CSF は血清中の LDL と結合するが, その結合は PG-M-CSF のコンドロイチン硫酸鎖と LDL の Apo-B との結合である²¹⁾, ③ PG-M-CSF は basic Fibroblast growth factor (bFGF) と結合するが, その結合は PG-M-CSF の付加的 C-末端ペプチド部分と bFGF のヘパリン結合部位との結合である。この PG-M-CSF の bFGF への結合は, bFGF の線維芽細胞増殖刺激活性を容量依存性に抑制する²²⁾。

M-CSF の臨床応用

すでに述べたごとく, M-CSF は①骨髓における単球産生を刺激するだけでなく, 単球の殺菌能を活性化する, ②単球の GM-CSF と G-CSF 産生をブラッキングすることによって好中球産生を刺激するとともに, 単球の IL-8 産生を刺激することによって好中球の殺菌能を活性化する, ③単球の GM-CSF

図4 AML患者の白血病再発率(15~70歳と15~29歳, 1996年10月現在) (文献24)

と IL-6 産生をプライミングすることによって血小板産生を刺激する, ④単球の RNI 産生を刺激し, TNF 産生をプライミングすることによって単球の殺腫瘍活性を刺激する, などの活性を持っている。したがって抗癌剤投与を受けた癌患者に M-CSF を投与すると, ①好中球回復の促進と感染症の防止, ②血小板回復の促進と血小板輸血量の減少, それに ③癌の再発を防止し, 無病生存率を高める, などの臨床効果が期待されていた。

そこで筆者らは M-CSF の臨床効果を証明するために, AML 患者と卵巣癌患者において, M-CSF とプラセボを用いた大規模二重盲検試験を実施した。

1. M-CSF の AML 患者での二重盲検試験

1992年から1994年にかけて JALSG (Japan Adult Leukemia Study Group) によって M-CSF の臨床的有用性を評価するため大規模二重盲検比較試験が実施された²³⁾。この結果 M-CSF の臨床投与が,

①好中球が1,000に回復する日数と血小板が10万に

回復する日数を短縮する (図3),
 ②感染症の頻度と日数を減少させる,
 ③血小板輸血の頻度と輸血量を減少させる,
 ④3回の地固め療法を終了するのに要する日数を短縮する, などの点が統計的有意差をもって証明された (表2)。さらにこの2重盲検試験に登録されたAML患者の無病生存率はプラセボ群28.9%に対してM-CSF群43.8%とM-CSF群で高く, 30歳未満の患者群ではプラセボ群10.1%に対してM-CSF群65.6%と統計的有意 ($p=0.0130$) にM-CSF群で無病生存率が高かった。そこでM-CSF群とプラセボ群のAML再発率を比較すると, プラセボ群70.8%, M-CSF群54.0%とM-CSF群で約17%低く, 特に30歳未満の患者群ではM-CSF群の再発率 (34.4%)の方がプラセボ群の再発率 (89.9%)より統計的有意 ($p=0.013$) に低かった (図4)²⁴⁾。

2. M-CSFの卵巣癌での2重盲検試験

1992年から1996年にかけて実施されたM-CSFとプラセボを用いた2重盲検試験では, M-CSF投与が化療第2～第3クールの完遂日数の短縮と感染日数の短縮をもたらすことが統計的有意差をもって証明された²⁵⁾。さらに完全腫瘍摘出手術が行われた患者群においては, M-CSF群の再発率 (11.0%)の方がプラセボ群の再発率 (29.5%)より統計的有意 ($p=0.0189$) に低いことが証明された。

これらの結果はM-CSFを化学療法と併用することによって白血病や卵巣癌の再発を防止できることを示している。これまでの臨床試験ではGM-CSFやG-CSFには再発防止効果がないことが示されており, M-CSFは今後白血病や癌の治療に必須の薬剤となろう。

文

献

- 1) Motoyoshi K, Takaku F, Mizoguchi H, et al: Purification and some properties of colony-stimulating factor from normal human urine. *Blood* 52:1012-1020 1978
- 2) Hatake K, Motoyoshi K, Ishizaka Y, et al: Purification of human urinary CSF by high performance liquid chromatography. *J Chromato* 344:339-344 1985
- 3) Wong GG, Takaku F, Motoyoshi K, et al: Human CSF-1: Molecular cloning and expression of 4-kb cDNA encoding the human urinary protein. *Science* 235:1504-1508 1987
- 4) Suzu S, Yanai N, Motoyoshi K, et al: Characterization of macrophage colony-stimulating factor in body fluids by immunoblot analysis. *Blood* 77:2160-2165 1991
- 5) Suzu S, Ohtsuki T, Motoyoshi K, et al: Identification of a high molecular weight M-CSF as a glycosaminoglycan-containing species. *J Biol Chem* 267:4345-4348 1992
- 6) Suzu S, Ohtsuki T, Motoyoshi K, et al: Biological activity of a proteoglycan form of M-CSF and its binding to type V collagen. *J Biol Chem* 267:16812-16815 1992
- 7) Motoyoshi K, Yoshida K, Hatake K, et al: Recombinant and native human urinary colony-stimulating factor directly augments G- and GM-CSF production of human peripheral blood monocytes. *Exp Hematol* 17:68-71 1989
- 8) Hashimoto S, Yoda M, Motoyoshi K, et al: Interleukin 8 production in human monocytes. *Exp Hematol* 24:123-128 1996
- 9) Douzono M, Suzu S, Motoyoshi K, et al: Augmentation of cancer chemotherapy by preinjection of human M-CSF in L1210 leukemic cell-inoculated mice. *Jpn J Cancer Res* 86:315-321 1995
- 10) Sakurai T, Suzu S, Motoyoshi K, et al: Induction of TNF in mice by recombinant human M-CSF. *Jpn J Cancer Res* 85:80-85 1994
- 11) Sakurai T, Yamada M, Motoyoshi K, et al: Antimetastatic effect of rhM-CSF against lung and liver metastatic B16 melanoma. *Cancer Immunol Immunother* 1997 in press
- 12) Saito S, Saito M, Motoyoshi K, et al: Human M-CSF induces the differentiation of trophoblast. *Growth Factors* 9:11-19 1993
- 13) Saito S, Motoyoshi K, Ichijo M, et al: High serum M-CSF level during pregnancy. *Int J Hematol* 20:879-885 1992
- 14) Yoshida H, Hayashi S, Kunisada T, et al: The murine mutation osteopetrosis is in the coding

- region of the M-CSF gene. *Nature* 345: 442-444 1990
- 15) Tanaka S, Takahashi N, Udagawa N, et al: Macrophage colony-stimulating factor is indispensable for both proliferation and differentiation of osteoclast progenitors. *J Clin Invest* 91: 257-263 1993
- 16) Motoyoshi K, Takaku F: Serum cholesterol-lowering activity of human macrophage colony-stimulating factor. *Lancet* ii: 326-327 1989
- 17) Shimano H, Yamada N, Motoyoshi K, et al: Human M-CSF enhances the clearance of lipoproteins containing apolipoprotein B 100 via both low density lipoprotein receptor-dependent and -independent pathways in rabbits. *J Biol Chem* 265: 12869-12875 1990
- 18) Inoue I, Inaba T, Motoyoshi K, et al: Macrophage CSF prevents the progression of atherosclerosis in Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Atherosclerosis* 93: 245-254 1992
- 19) Kimura F, Suzu S, Motoyoshi K, et al: Structural analysis of proteoglycan macrophage colony-stimulating factor. *J Biol Chem* 269: 19751-19756 1994
- 20) Ohtsuki T, Hatake K, Motoyoshi K, et al: Immunohistochemical identification of proteoglycan form of macrophage colony-stimulating factor on bone surface. *Calcif Tissue Int* 57: 213-217 1995
- 21) Suzu S, Inaba T, Motoyoshi K, et al: Proteoglycan form of M-CSF binds low density lipoprotein. *J Clin Invest* 94: 1637-1641 1994
- 22) Suzu S, Kimura F, Motoyoshi K, et al: Direct interaction of proteoglycan M-CSF and basic fibroblast growth factor. *Blood* 83: 3113-3119 1994
- 23) Ohno R, Miyawaki S, Motoyoshi K, et al: Human urinary M-CSF reduces the incidence and duration of febrile neutropenia and shortens the period required to finish three courses of intensive consolidation therapy in acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 15: 2954-2965 1997
- 24) 元吉和夫, 宮脇修一, 畠 清彦ら: M-CSF 臨床応用の将来展望 *臨床血液* 38: 375-379 1997
- 25) 西村治夫, 薬師寺道明, 元吉和夫ら: 卵巣悪性腫瘍化学療法におけるヒトマクロファージコロニー刺激因子 (P-100) の有用性に関する二重盲検群間比較試験 *Oncology & Chemotherapy* 13: 161-169 1997