

## 急性心筋梗塞に対する G-CSF 治療の臨床研究：現状と問題点

高野 博之, 小室 一成

Takano H, Komuro I: G-CSF therapy for acute myocardial infarction. J Jpn Coron Assoc 2010; 16: 97-106

### I. はじめに

顆粒球コロニー刺激因子 (granulocyte colony-stimulating factor; G-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, 骨髄幹細胞や前駆細胞の動員作用をもつことから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 (Lin<sup>-</sup> c-kit<sup>+</sup> 細胞) を移植してその効果を検討した<sup>1)</sup>。9 日後にこの細胞は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医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他のグループから発表されている<sup>2-4)</sup>。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, 間葉系幹細胞は心筋細胞に分化するという報告もある<sup>5)</sup>。上述した造血性サイトカイン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<sup>6)</sup>。本稿では心臓疾患に対する G-CSF の作用と機序に関する基礎研究と臨床研究の結果を概説する。

### II. 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<sup>6)</sup>。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<sup>7)</sup>。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が抑制された<sup>7)</sup>。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によりわ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。

### III. G-CSF を急性心筋梗塞後から投与した際の効果

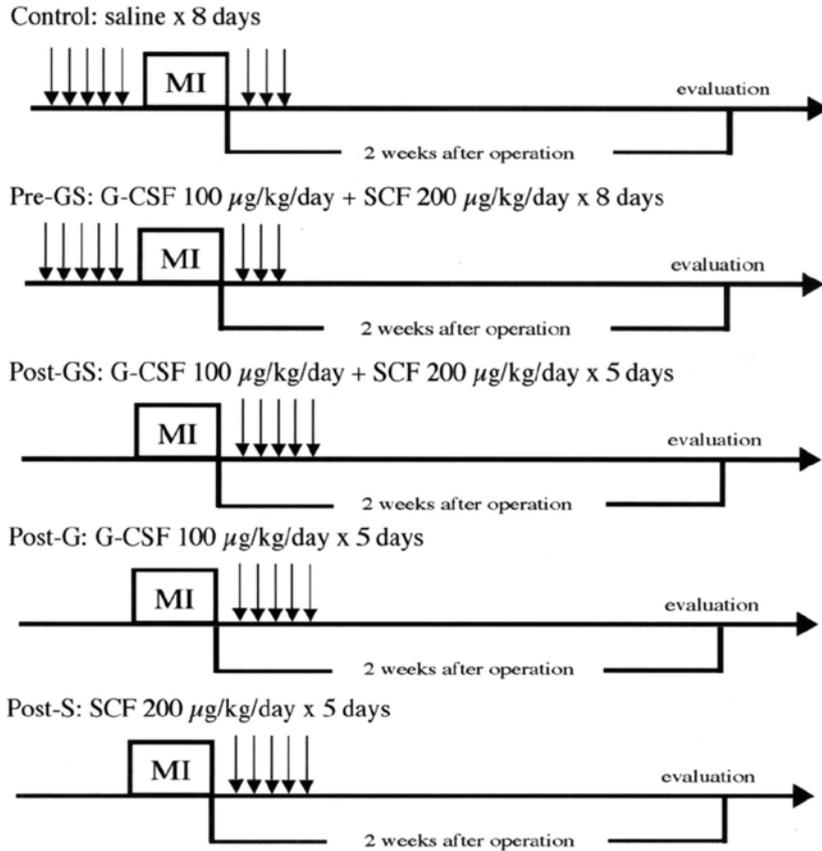
われわれはマウスの急性心筋梗塞モデルを用いて, Orlic ら<sup>7)</sup>のように G-CSF と SCF を心筋梗塞前より投与した群 (Pre-GS), 心筋梗塞後から投与した群 (Post-GS), G-CSF を単独で心筋梗塞後から投与した群 (Post-G), SCF を単独で心筋梗塞後から投与した群 (Post-S), 生理食塩水のみを投与した群 (Control) に分け, 各サイトカインの効果を比較検討した (図 1A)<sup>8)</sup>。Control 群に比べ G-CSF を用いた 3 つの治療群 (Pre-GS, Post-GS, Post-G) では死亡率が同程度に改善した。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 (図 1B, C)<sup>8)</sup>。また, 心筋梗塞領域の壁厚の減少も軽減した (図 1D)。G-CSF を用いた 3 つの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, 血管内皮細胞のアポトーシスは減少していた<sup>8)</sup>。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を抑制する効果があることが明らかになった。

### IV. 急性心筋梗塞後の心臓に対する G-CSF の作用機序

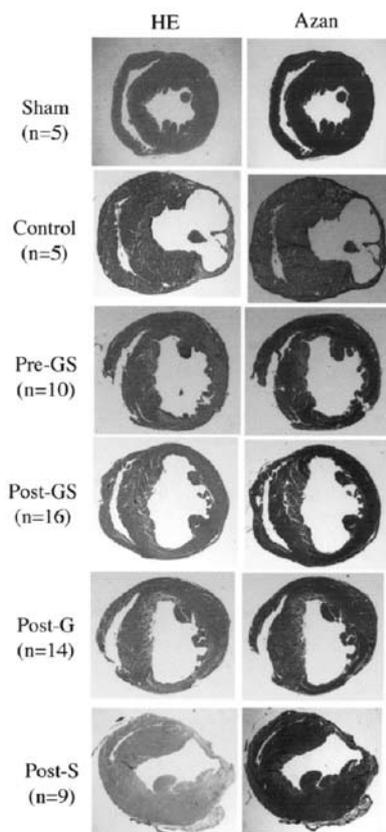
心臓に対する G-CSF の作用機序として, マクロファージの細胞数や matrix metalloproteinase (MMP)-1, MMP-9 発現の増加を介して心筋梗塞後の急性期における修復過程を促進させるという報告がある<sup>9)</sup>。一方, 早期に梗塞領

千葉大学大学院医学研究院循環病態医科学 (〒260-8670 千葉市中央区亥鼻 1-8-1)

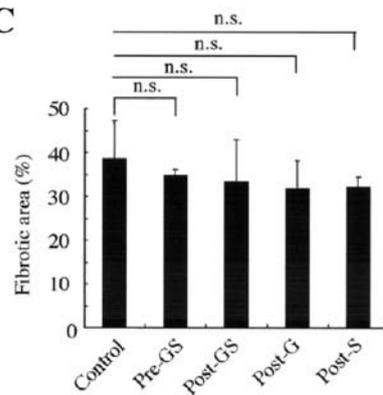
A



B



C



D

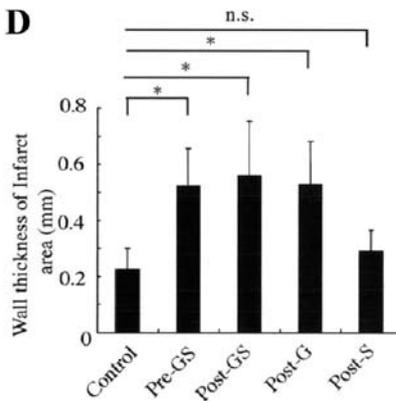


図1 マウスの急性心筋梗塞に対するG-CSFの効果  
 マウスの急性心筋梗塞モデルにG-CSF (100 µg/kg/day), SCF(200 µg/kg/day)を投与し2週間後に評価。Post-GS, Post-G, Post-S 群では心筋梗塞2時間後から最初の皮下投与を開始。  
 A: 実験のプロトコール, B: 心臓のhematoxylin-eosin染色とAzan染色, C: 左室横断面積に対する線維化面積の割合, D: 梗塞領域の壁厚. P<0.05 (Ohtsuka M et al, 2004<sup>8)</sup>より改変引用)

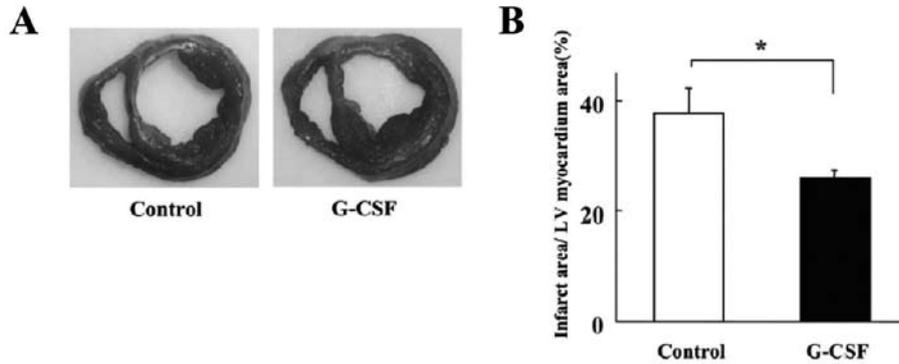


図2 プタの急性心筋梗塞に対する G-CSF の効果  
 プタの急性心筋梗塞モデルに G-CSF (10  $\mu$ g/kg/day  $\times$  7 日間) を皮下投与し 4 週間後に評価。  
 A: 梗塞心の TTC 染色, B: 梗塞サイズ.  $P < 0.05$   
 (Iwanaga K et al, 2004<sup>12)</sup> より改変引用)

域での transforming growth factor (TGF)- $\beta$  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<sup>10, 11)</sup>。Orlic らは、サイトカイン治療により動員された骨髄幹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<sup>7)</sup>、われわれの研究では 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<sup>8)</sup>。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もある<sup>5)</sup>。

われわれは、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<sup>12)</sup>。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 (図 2A, B)。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において Akt の活性化および VEGF の発現亢進が認められた<sup>12)</sup>。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、ブタの実験において心筋梗塞後 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も検討した。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 法と免疫細胞染色で確認した (図 3A, B)<sup>13)</sup>。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。そこで、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<sup>13)</sup>。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 4A, B)<sup>13)</sup>。特に、7 日後から G-CSF を開始した場合、効果はみられなかった。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心臓保護作用に重要な役割を果たしていると考えられた (図 5)。

#### V. 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<sup>14)</sup>。35 分間の虚血後、120

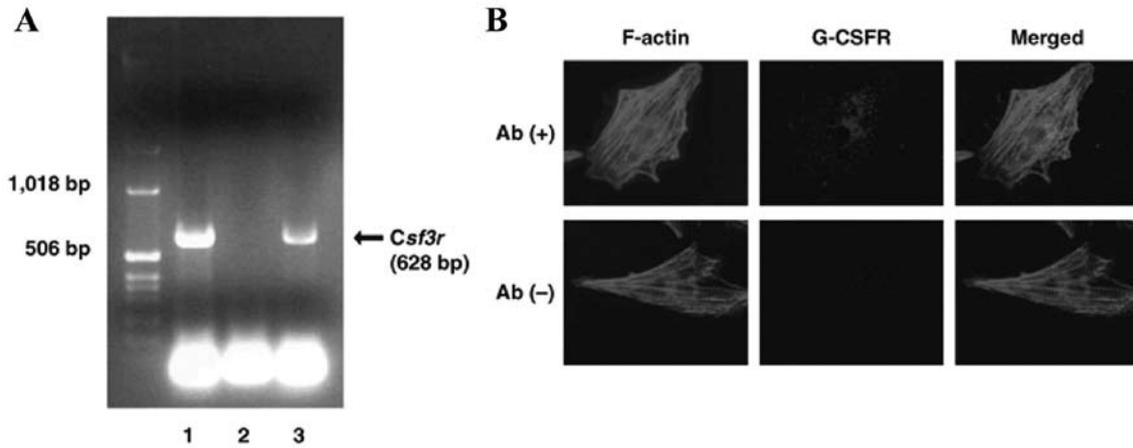


図3 マウスとラットの培養心筋細胞における G-CSF 受容体の発現  
 A: RT-PCR. 1 レーン: マウスの心臓, 2 レーン: 陰性コントロール, 3 レーン: 新生仔マウスの培養心筋細胞から抽出した mRNA.  
 B: 新生仔ラットの培養心筋細胞を用いた免疫組織染色. G-CSF 受容体(G-CSFR), アクチン-ファロイジン. 下段は G-CSF 受容体抗体と反応させなかった細胞の写真.  
 (Harada M et al, 2005<sup>13</sup>)より改変引用)

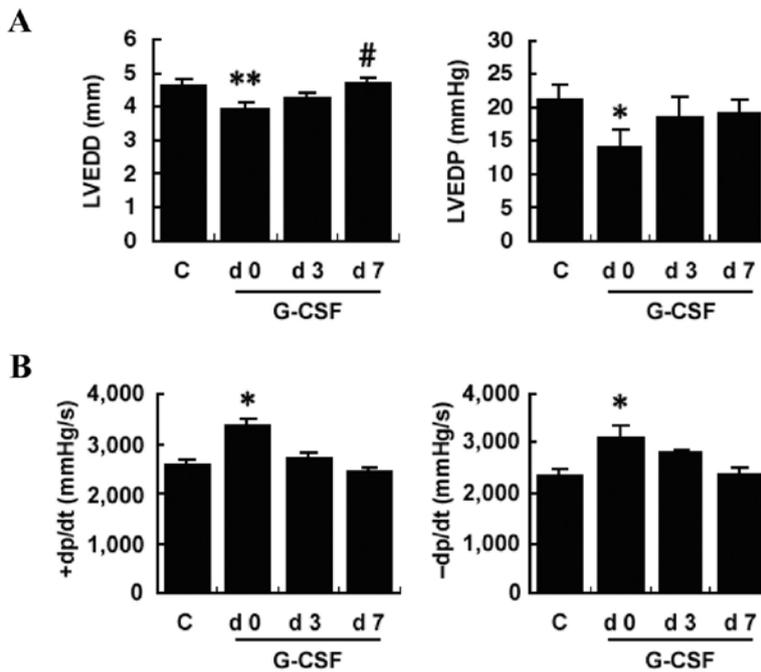


図4 G-CSF の開始時期による効果の違い  
 野生型マウスに G-CSF(100  $\mu$ g/kg/day  $\times$  5 日間)を急性心筋梗塞の直後, 3 日後, 7 日後から開始した際の心エコー 検査(A)と心カテーテル検査(B)による評価.  
 \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs コントロール群との比較, # $P < 0.01$  vs 心筋梗塞直後から治療開始した群との比較.  
 (Harada M et al, 2005<sup>13</sup>)より改変引用)

分間の再灌流を行った. G-CSF は再灌流開始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 が有意に改善し心筋梗塞サイズの縮小も認められた. また, G-CSF 投与により再灌流 15 分後の心臓での Akt, Jak2, STAT3, endothelial NO synthase(eNOS)のリン酸化が増加した. さらに, G-CSF による梗塞縮小効果は 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<sup>14</sup>. 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(postconditioning-like effect)をおよ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. 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<sup>15</sup>. 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

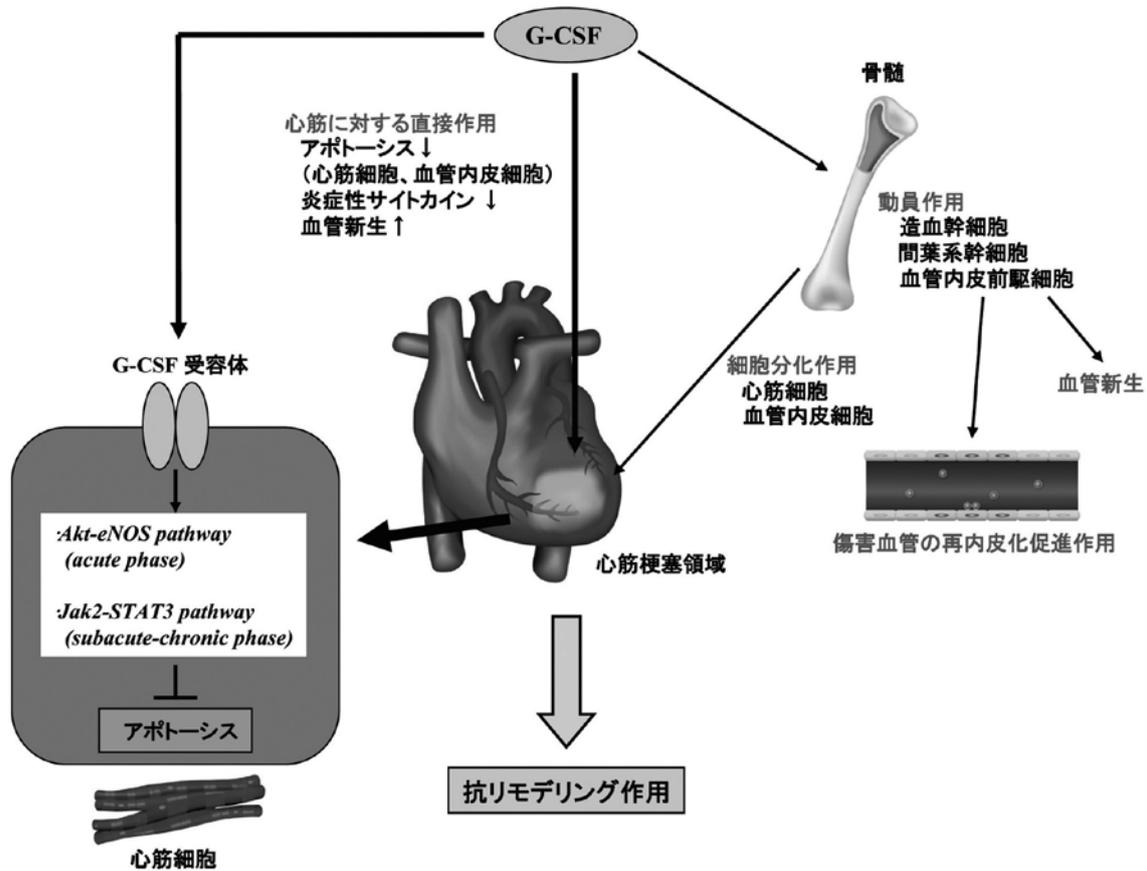


図5 急性心筋梗塞後の心臓リモデリングに対する G-CSF の作用機序

した結果、心機能は有意に改善した。さらに、この効果は3カ月後でも認められた<sup>15)</sup>。

#### VI. 急性心筋梗塞以外の心疾患に対する G-CSF の効果

われわれはブタを用いて慢性虚血によるハイバネーション(冬眠心筋)モデルを作製し、G-CSF の効果を検討した<sup>16)</sup>。ブタの冠動脈にアメロイドコンストラクターを装着し4週間後にハイバネーションを確認した後、G-CSF を7日間投与し4週間後に解析した。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およぼすと考えられた<sup>16)</sup>。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 が治療法のひとつとなりうるか興味深い。

陳旧性心筋梗塞後の慢性心不全に対しても、G-CSF は梗塞領域の壁厚の非薄化を抑制し線維化を減少させることにより心機能を改善した<sup>17)</sup>。G-CSF により STAT3 の活性化や GATA-4, ミオシン重鎖, トロポニン I, デスミンの発現増加がみられた。また、G-CSF による治療で

MMP-2, 9 の発現は増加し、TNF- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ )、アンジオテンシン II 1 型受容体、TGF- $\beta$  の発現は減少した<sup>17)</sup>。さらに、G-CSF を中止した後も心機能の改善効果は継続して認められた。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。

わが国では慢性心不全の原因として虚血性心疾患のほか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-X7.1 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<sup>18)</sup>。このモデルではアポトーシスではなくオートファジーによる心筋細胞死が認められたが、G-CSF により抑制された<sup>18)</sup>。心臓における TNF- $\alpha$  の発現は減少し、Akt, STAT3, MMP-2, 9 の活性化は増加した。

#### VII. 動脈硬化と傷害血管に対する G-CSF の作用

Kang らのグループから G-CSF はインターベンション治療(PCI)後のステント内再狭窄を増加させるという結果が報告された<sup>19)</sup>。この臨床研究では急性心筋梗塞後のゴールデンタイムに PCI を行わず、G-CSF(10  $\mu$ g/kg)を4日間投与してから PCI を行っており通常の治療法とは

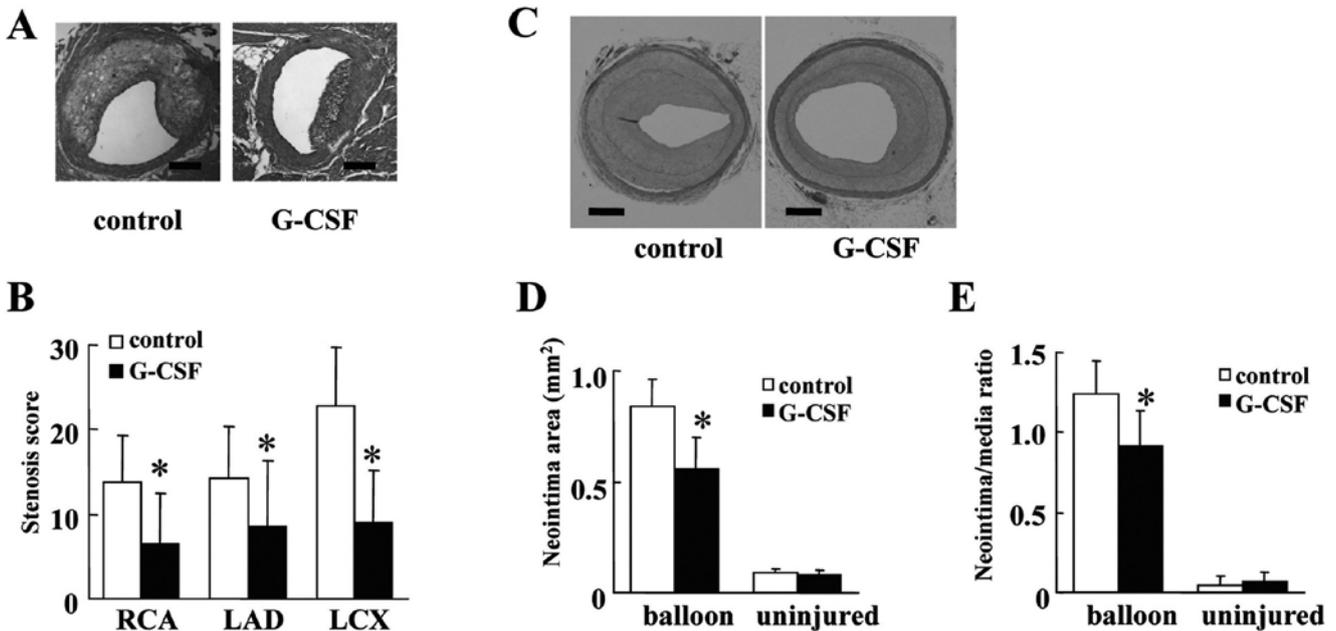


図6 動脈硬化モデルに対する G-CSF の効果  
 ウサギに G-CSF (100  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day} \times 7$  日間) を投与し、4 週間後に評価。  
 WHHL ウサギの冠動脈の写真(A)と stenosis score(B)。高脂血症ウサギの腸骨動脈(バルーン傷害4週間後)の写真(C)と neointima area(D), neointima/media ratio(E)。  
 \* $P < 0.05$ 。  
 (Hasegawa H et al, 2006<sup>23</sup>)より改変引用)

異なるプロトコルで実施された。また、6カ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であった。Hillらは、ハイリスクの重症狭心症患者16人を対象に G-CSF (10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) を5日間投与する非ランダム化試験を行った結果、重大な有害事象を多く認めた<sup>20</sup>。全ての患者は PCI 治療にても CCS のクラス3または4の狭心症症状があったため、冠動脈内に多くの不安定化プラークが存在していたと考えられる。したがって、G-CSFにより病態が悪化したのか否かは不明である。一方、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再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告されている<sup>21, 22</sup>。われわれ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おこしたウサギの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ている(図6A~E)<sup>23</sup>。

ステント留置後の血管に対する G-CSF の効果を調べた動物実験も行われている。ウサギの腸骨動脈内に paclitaxel-eluting stent (PES) を留置後、G-CSF を6日間投与して60日後に血管を評価した結果、paclitaxelによる平滑筋細胞の増殖抑制効果と G-CSF による EPC の動員効果が相まって再内皮化が促進し新生内膜の肥厚が抑制された<sup>24</sup>。ブタの冠動脈(左前下行枝)を30分間バルーンで

閉塞して心筋梗塞を作製し、3日後に冠動脈内に sirolimus-eluting stent (DES) を留置し、その24時間後から G-CSF を7日間投与して28日後に血管を評価した結果、G-CSFによる平滑筋細胞の増殖や遊走が sirolimusにより抑制されるため再狭窄はみられなかった<sup>25</sup>。世界中で急性心筋梗塞に対する G-CSF の効果や安全性を検討する臨床研究が進められたが、インターベンション治療後の再狭窄を増やすという結果は報告されていない。

#### VIII. G-CSF の効果と安全性を検討した最近の臨床研究の結果

心機能に対する G-CSF の効果については肯定する結果と否定する結果の両方が報告されている(表1)<sup>26-29, 31</sup>。Valgimigliらは PCI を施行した急性心筋梗塞患者に対する G-CSF (5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 4日間) の効果を検討するランダム化試験を行った<sup>26</sup>。Quantitative gated SPECT (QGS) の結果、G-CSF 群 (n=8) ではコントロール群 (n=8) に比べ有意差はみられなかったが6カ月後の左室駆出率 (EF) は増加し左室拡張末期容積は縮小する傾向にあった。2群間で PCI 後の再狭窄率に差はなかった。Inceらは PCI を施行した急性心筋梗塞患者に対する G-CSF (10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 6日間) の効果をランダム化試験 (FIRSTLINE-AMI) で検討した<sup>27</sup>。G-CSF 治療は PCI 後、平均1.5時間たってから開始された。心エコーの結果、G-CSF 群 (n=25) ではコントロール群 (n=25) に比べ4カ月後の EF や梗塞領域での壁

表1 G-CSF の効果を検討したランダム化比較試験の結果

G-CSF (投与量×日数)	AMI 発症から G-CSF 開始 までの時間 (PCI から G-CSF 開始までの時間)	患者数	結果 (G-CSF vs Cont)	引用文献 (著者と臨床試験名)
5 µg/kg × 4 days	37 hours <sup>a</sup> (NM)	G-CSF (n=10) Control (n=10)	6 months (SPECT) EF ~ (P=0.068) LV size ~ (P=0.054)	Valgimigli et al <sup>26)</sup>
10 µg/kg × 6 days	6.5 hours <sup>a</sup> (1.5 hours <sup>a</sup> )	G-CSF (n=25) Control (n=25)	4 months (LVG, UCG, PET) EF ↑ (P<0.001) LV size ↓ (P<0.002)	Ince et al <sup>27)</sup> (FIRSTLINE-AMI)
10 µg/kg × 5 days	5 days <sup>a</sup> (NM)	G-CSF (n=56) Control (n=58)	4-6 months (SPECT, MRI) EF ~ (P=0.14) Infarct size ~ (P=0.56)	Zohlh�fer et al <sup>28)</sup> (REVIVAL-2)
10 µg/kg × 6 days	33.5 hours <sup>b</sup> (29.5 hours <sup>b</sup> )	G-CSF (n=39) Control (n=39)	6 months (MRI) EF ~ (P=0.9) LV size ~ (P=0.7)	Ripa et al <sup>29)</sup> (STEMMI)
2.5 µg/kg × 5 days	21 hours <sup>a</sup> (14.5 hours <sup>a</sup> )	G-CSF (n=18) Control (n=22)	6 months (SPECT) EF ↑ (P=0.013) LV size ↓ (P=0.007)	Takano et al <sup>31)</sup> (GLEAM)

NM, not mentioned; NS, not significant

<sup>a</sup> 平均値, <sup>b</sup> 中央値

運動が有意に改善した。また、左室拡張末期径は G-CSF 群では変化しなかったがコントロール群では拡大した。再狭窄率は両群で差はなかった。一方、Zohlh fer らはより多くの急性心筋梗塞患者 (n=114) を対象に G-CSF (10 µg/kg, 5 日間) の効果をランダム化試験 (REVIVAL-2) で検討した<sup>28)</sup>。G-CSF 治療は急性心筋梗塞発症後 5 日目から開始された。急性心筋梗塞後に増加する血中の幹細胞や EPC の数は発症後 7 日目がピークであることや、急性心筋梗塞後に骨髄細胞を冠動脈内に注入した際の左室機能に対する効果を検討した臨床研究 (REPAIR-AMI) の結果、PCI 後 4 日目に以降に細胞を注入した場合に効果が著明であったことから、彼らは G-CSF 治療の開始時期を 5 日目に設定した。REVIVAL-2 では G-CSF 治療は安全に行われたが、ベースラインと 6 カ月後で行われた MRI の結果、G-CSF 群 (n=56) とコントロール群 (n=58) の間で梗塞サイズと EF の変化に有意差はみられなかった<sup>28)</sup>。Ripa らは PCI を施行した急性心筋梗塞患者 (n=70) を対象に G-CSF (10 µg/kg, 6 日間) の効果をランダム化試験 (STEMMI) で検討したが、G-CSF 群 (n=37) とコントロール群 (n=33) の両群で MRI による 6 カ月後の EF の改善度は同程度であった<sup>29)</sup>。急性心筋梗塞を発症してから G-CSF 治療を開始するまでの時間 (中央値) は 33.5 時間であった。G-CSF 群の方で左前下行枝領域の心筋梗塞症例の割合が多く、PCI により TIMI flow grade 3 が得られた症例数は少ない傾向にあった。

わが国では、Suzuki らが PCI を施行した急性心筋梗塞患者 24 症例を対象に、G-CSF (2.6 µg/kg, 10 日間) の効果を検討した。G-CSF 群 (n=12) ではコントロール群 (n=12) に比べ、peak CK 値と 1 カ月後の左室造影検査で

測定した EF の相関直線が上方にシフトしており、G-CSF による EF の改善効果が認められた<sup>30)</sup>。われわれも基礎研究の成果をふまえて、2003 年より急性心筋梗塞後の心臓リモデリングと心機能低下に対する G-CSF の効果を検討する臨床研究を開始した (G-CSF treatment for left ventricular dysfunction after AMI; GLEAM trial)<sup>31)</sup>。発症 12 時間以内に入院シインターベンション治療 (ステント留置術) により TIMI flow grade 3 の再灌流が認められた急性心筋梗塞の 40 症例を対象とした。画像検査による評価がより明確にできるよう左前下行枝 (LAD) 1 枝の完全閉塞による急性心筋梗塞で他に有意狭窄病変を有さない症例に限定した。その後の血行動態が安定しておりインフォームドコンセントが得られた症例を最小化法による無作為割付により、2 群 (G-CSF 群と Control 群) に分けた。薬剤の投与は単盲検法により実施した。登録症例は発症 24 時間以内に 1 回目の G-CSF か同量の生理食塩水を皮下注射した。G-CSF の 1 回の投与量は 2.5 µg/kg (急性心筋梗塞後に用いても白血球数が 40000 を超えない量をシミュレーションし投与量を設定) とした。1 日 1 回で計 5 日間連続投与した。発症 4 日後と 6 カ月後に SPECT (QGS) により心機能 (LVEF)、サイズ (LVESV, LVEDV)、虚血領域 (defect score) を評価した。また、6 カ月後にも定量的冠動脈造影検査 (QCA) を施行した。その結果、6 カ月後の LVEF は G-CSF 群においてのみ有意な改善効果が認められた (図 7A)。LAD 領域の defect score は G-CSF 群においてのみ有意な減少が認められた (図 7B)。6 カ月後の再狭窄率は両群で有意な差を認めなかった<sup>31)</sup>。

ランダム化比較試験の結果<sup>26-31)</sup> から G-CSF は再狭窄を

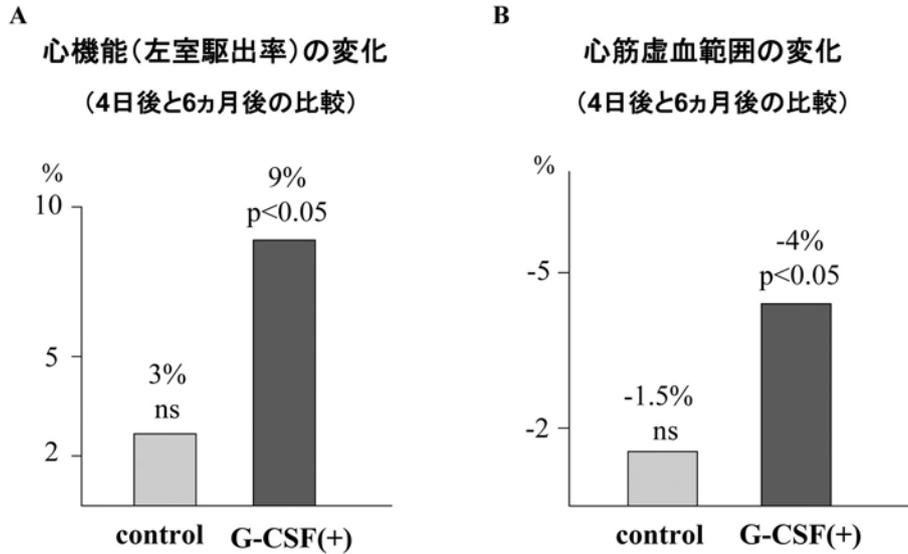


図7 GLEAM 試験の結果  
A: 心機能(左室駆出率 EF)の変化, B: LAD 領域の心筋虚血範囲の変化  
(Takano H et al, 2007<sup>31)</sup>より改変引用)

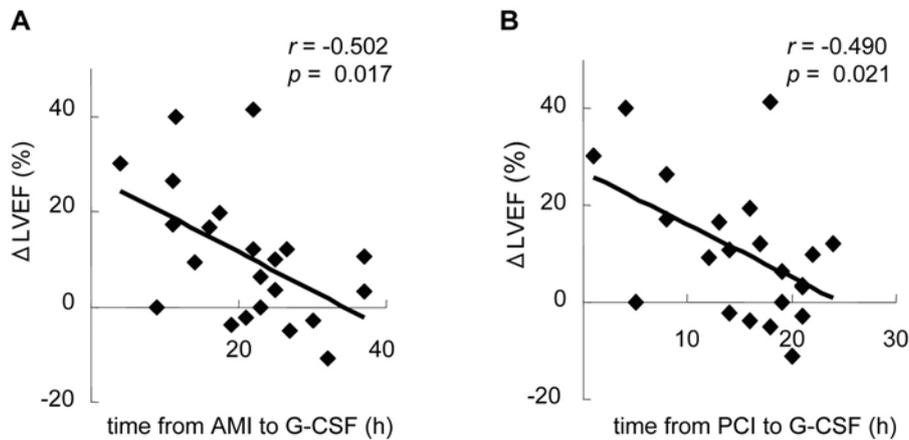


図8 急性心筋梗塞または PCI から G-CSF 治療までの時間と EF の改善度との関係  
急性心筋梗塞発症後から G-CSF 治療開始までの時間(A), PCI 施行後から G-CSF 治療開始までの時間(B), と EF の改善度.  
(Takano H et al, 2007<sup>32)</sup>より改変引用)

増加させないことがわかったが、急性心筋梗塞に対する効果についてはまだ一定の見解に至っていない。これらの試験間には梗塞責任血管, PCI 後の TIMI flow grade, 急性心筋梗塞から G-CSF 治療開始までの時間, などに違いがある。G-CSF 群とコントロール群の間で左前下行枝を責任血管とする急性心筋梗塞症例数の割合に差がなく、全例で PCI 後に TIMI flow grade 3 が得られた臨床研究<sup>27, 31)</sup>では G-CSF による改善効果が認められた。また、急性心筋梗塞発症から 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、上述したわれわれのマウスの実験結果<sup>13)</sup>と一致していることがわ

かる(表 1)。われわれの臨床研究の結果でも急性心筋梗塞から G-CSF 治療までの時間や PCI から G-CSF 治療までの時間は EF の改善度と逆相関を示した(図 8A, B)<sup>32)</sup>。G-CSF の心臓保護効果は心筋に対する直接作用が主であるので G-CSF 治療の開始時間は極めて重要である。G-CSF の心筋保護作用の主な機序がアポトーシスの抑制であるならば心筋梗塞後早期に開始したほうが望ましく、臨床においても発症後 1 日以内に開始するほうが良好な効果を得るには適していると考えられる。実際、動物を用いた基礎研究の多くは最初の G-CSF 投与を心筋梗塞直後から 24 時間の間に開始して効果を検討している。

G-CSF の投与期間や投与方法(皮下注, 静注, 冠動脈注)についてもまだ検討の余地がある. 効果を評価するための検査方法としてどのような検査を組み合わせるのか, いつ評価すべきかについても検討していかなければならない. 今後はさらに研究デザインを検討し最も適した方法で急性心筋梗塞に対する G-CSF の効果と安全性を大規模臨床試験で検証していく必要がある.

基礎研究により開発された新規の治療法を臨床応用させるためには, 先を急がず一步一步着実にデータを蓄積していくことが極めて重要である. また, トランスレーショナルリサーチでは基礎研究者と臨床医との間に綿密な連携が必要なことはいうまでもない.

#### IX. おわりに

虚血性心疾患に対する G-CSF 治療は, 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 の開始時間, 投与量, 投与期間, 投与方法や評価方法, 評価時期について, より適切なプロトコ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望まれる. また, 短期効果だけでなく長期効果に関する評価も必要である. また, 非虚血性心筋症に対する効果や, 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の研究結果が待たれる.

#### 文 献

- Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, Pickel J, McKay R, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P: Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 2001; **410**: 701-705
- Murry CE, Soonpaa MH, Reinecke H, Nakajima H, Nakajima HO, Rubart M, Pasumarthi KB, Virag JI, Bartelmez SH, Poppa V, Bradford G, Dowell JD, Williams DA, Field LJ: Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature* 2004; **428**: 664-668
- Balsam LB, Wagers AJ, Christensen JL, Kofidis T, Weissman IL, Robbins RC: Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium. *Nature* 2004; **428**: 668-673
- Nygren JM, Jovinge S, Breitbach M, Säwén P, Röhl W, Hescheler J, Taneera J, Fleischmann BK, Jacobsen SE: Bone marrow-derived hematopoietic cells generate cardiomyocytes at a low frequency through cell fusion, but not transdifferentiation. *Nat Med* 2004; **10**: 494-501
- Kawada H, Fujita J, Kinjo K, Matsuzaki Y, Tsuma M, Miyatake H, Muguruma Y, Tsuboi K, Itabashi Y, Ikeda Y, Ogawa S, Okano H, Hotta T, Ando K, Fukuda K: Nonhematopoietic mesenchymal stem cells can be mobilized and differentiate into cardiomyocytes after myocardial infarction. *Blood* 2004; **104**: 3581-3587
- Takano H, Qin Y, Hasegawa H, Ueda K, Niitsuma Y, Ohtsuka M, Komuro I: Effects of G-CSF on left ventricular remodeling and heart failure after acute myocardial infarction. *J Mol Med* 2006; **84**: 185-193
- Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Limana F, Jakoniuk I, Quaini F, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P: Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; **98**: 10344-10349
- Ohtsuka M, Takano H, Zou Y, Toko H, Akazawa H, Qin Y, Suzuki M, Hasegawa H, Nakaya H, Komuro I: Cytokine therapy prevents left ventricular remodeling and dysfunction after myocardial infarction through neovascularization. *FASEB J* 2004; **18**: 851-853
- Minatoguchi S, Takemura G, Chen XH, Wang N, Uno Y, Koda M, Arai M, Misao Y, Lu C, Suzuki K, Goto K, Komada A, Takahashi T, Kosai K, Fujiwara T, Fujiwara H: 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**: 2572-2580
- Miki T, Miura T, Nishino Y, Yano T, Sakamoto J, Nakamura Y, Ichikawa Y, Ikeda Y, Kobayashi H, Ura N, Shimamoto K: Granulocyte colony stimulating factor/macrophage colony stimulating factor improves postinfarct ventricular function by suppression of border zone remodelling in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2004; **31**: 873-882
- Sugano Y, Anzai T, Yoshikawa T, Maekawa Y, Kohno T, Mahara K, Naito K, Ogawa S: Granulocyte colony-stimulating factor attenuates early ventricular expansion after experimental myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 2005; **65**: 446-456
- Iwanaga K, Takano H, Ohtsuka M, Hasegawa H, Zou Y, Qin Y, Odaka K, Hiroshima K, Tadokoro H, Komuro I: Effects of G-CSF on cardiac remodeling after acute myocardial infarction in swine. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; **325**: 1353-1359
- Harada M, Qin Y, Takano H, Minamino T, Zou Y, Toko H, Ohtsuka M, Matsuura K, Sano M, Nishi J, Iwanaga K, Akazawa H, Kunieda T, Zhu W, Hasegawa H, Kunisada K, Nagai T, Nakaya H, Yamauchi-Takahara K, Komuro I: G-CSF prevents cardiac remodeling after myocardial infarction by activating the Jak-Stat pathway in cardiomyocytes. *Nat Med* 2005; **11**: 305-311
- Ueda K, Takano H, Hasegawa H, Niitsuma Y, Qin Y, Ohtsuka M, Komuro I: G-CSF directly inhibits myocardial ischemia-reperfusion injury through Akt-eNOS pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; **26**: e108-e113
- Kanellakis P, Slater NJ, Du XJ, Bobik A, Curtis DJ: Granulocyte colony-stimulating factor and stem cell factor improve endogenous repair after myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 2006; **70**: 117-125
- Hasegawa H, Takano H, Iwanaga K, Ohtsuka M, Qin Y, Niitsuma Y, Ueda K, Toyoda T, Tadokoro H, Komuro I: Cardioprotective effects of granulocyte colony-stimulating factor in swine with chronic myocardial ischemia. *J Am*

- Coll Cardiol 2006; **47**: 842–849
- 17) Li Y, Takemura G, Okada H, Miyata S, Esaki M, Maruyama R, Kanamori H, Li L, Ogino A, Misao Y, Khai NC, Mikami A, Minatoguchi S, Fujiwara T, Fujiwara H: Treatment with granulocyte colony-stimulating factor ameliorates chronic heart failure. *Lab Invest* 2006; **86**: 32–44
  - 18) Miyata S, Takemura G, Kawase Y, Li Y, Okada H, Maruyama R, Ushikoshi H, Esaki M, Kanamori H, Li L, Misao Y, Tezuka A, Toyo-Oka T, Minatoguchi S, Fujiwara T, Fujiwara H: Autophagic cardiomyocyte death in cardiomyopathic hamsters and its prevention by granulocyte colony-stimulating factor. *Am J Pathol* 2006; **168**: 386–397
  - 19) Kang HJ, Kim HS, Zhang SY, Park KW, Cho HJ, Koo BK, Kim YJ, Soo Lee D, Sohn DW, Han KS, Oh BH, Lee MM, Park YB: Effects of intracoronary infusion of peripheral blood stem-cells mobilized 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**: 751–756
  - 20) Hill JM, Syed MA, Arai AE, Powell TM, Paul JD, Zalos G, Read EJ, Khuu HM, Leitman SF, Horne M, Csako G, Dunbar CE, Waclawiw MA, Cannon RO 3rd: Outcomes and risks of granulocyte colony-stimulating factor in patients with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 2005; **46**: 1643–1648
  - 21) Yoshioka T, Takahashi M, Shiba Y, Suzuki C, Morimoto H, Izawa A, Ise H, Ikeda U: Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) accelerates reendothelialization and reduces neointimal formation after vascular injury in mice. *Cardiovasc Res* 2006; **70**: 61–69
  - 22) Takamiya M, Okigaki M, Jin D, Takai S, Nozawa Y, Adachi Y, Urao N, Tateishi K, Nomura T, Zen K, Ashihara E, Miyazaki M, Tatsumi T, Takahashi T, Matsubara H: 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**: 751–757
  - 23) Hasegawa H, Takano H, Ohtsuka M, Ueda K, Niitsuma Y, Qin Y, Tadokoro H, Shiomi M, Komuro I: G-CSF prevents the progression of atherosclerosis and neointimal formation in rabbits. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; **344**: 370–376
  - 24) Cho HJ, Kim TY, Cho HJ, Park KW, Zhang SY, Kim JH, Kim SH, Hahn JY, Kang HJ, Park YB, Kim HS: The effect of stem cell mobilization by granulocyte-colony stimulating factor on neointimal hyperplasia and endothelial healing after vascular injury with bare-metal versus paclitaxel-eluting stents. *J Am Coll Cardiol* 2006; **48**: 366–374
  - 25) Lim SY, Kim YS, Ahn Y, Jeong MH, Rok LS, Kim JH, Kim KH, Park HW, Kim W, Cho JG, Park JC, Kang PM, Schwartz RS, Kang JC: The effects of granulocyte-colony stimulating factor in bare stent and sirolimus-eluting stent in pigs following myocardial infarction. *Int J Cardiol* 2007; **118**: 304–311
  - 26) Valgimigli M, Rigolin GM, Cittanti C, Malagutti P, Curello S, Percoco G, Bugli AM, Della Porta M, Bragotti LZ, Ansani L, Mauro E, Lanfranchi A, Giganti M, Feggi L, Castoldi G, Ferrari R: 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**: 1838–1845
  - 27) Ince H, Petzsch M, Kleine HD, Schmidt H, Rehders T, Körber T, Schümichen C, Freund M, Nienaber CA: 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**: 3097–3106
  - 28) Zohlhänger D, Ott I, Mehilli J, Schömig K, Michalk F, Ibrahim T, Meisetschläger G, von Wedel J, Bollwein H, Seyfarth M, Dirschinger J, Schmitt C, Schwaiger M, Kastrati A, Schömig A: Stem cell mobilization by granulocyte colony-stimulating factor in patients with acute myocardial infarction: a randomized controlled trial. *JAMA* 2006; **295**: 1003–1010
  - 29) Ripa RS, Jørgensen E, Wang Y, Thune JJ, Nilsson JC, Søndergaard L, Johnsen HE, Køber L, Grande P, Kastrup J: 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**: 1983–1992
  - 30) Suzuki K, Nagashima K, Arai M, Uno Y, Misao Y, Takemura G, Nishigaki K, Minatoguchi S, Watanabe S, Tei C, Fujiwara H: Effect of granulocyte colony-stimulating factor treatment at a low dose but for a long duration in patients with coronary heart disease. *Circ J* 2006; **70**: 430–437
  - 31) Takano H, Hasegawa H, Kuwabara Y, Nakayama T, Matsuno K, Miyazaki Y, Yamamoto M, Fujimoto Y, Okada H, Okubo S, Fujita M, Shindo S, Kobayashi Y, Komiyama N, Takekoshi N, Imai K, Himi T, Ishibashi I, Komuro I: Feasibility and safety of granulocyte colony-stimulating factor treatment in patients with acute myocardial infarction. *Int J Cardiol* 2007; **122**: 41–47
  - 32) Takano H, Ueda K, Hasegawa H, Komuro I: G-CSF therapy for acute myocardial infarction. *Trends Pharmacol Sci* 2007; **28**: 512–517