

SDF-1/CXCR4 システムを利用したより治療効果の高い血管新生療法の開発

高橋 将文* 柴 祐司 池田 宇一

要 旨：近年、骨髄細胞を用いた血管新生療法が研究・臨床応用されてきている。われわれは、骨髄細胞におけるケモカイン SDF-1 α の受容体である CXCR4 の発現を増加させることにより、その血管新生効果が促進されることを見出した。今後、SDF-1/CXCR4 システムの役割が解明されることにより、SDF-1/CXCR4 システムを標的としたより効果の高い血管新生療法の開発が期待される。

(J Jpn Coll Angiol, 2010, 50: 323–329)

Key words: cytokines, implantation, ischemia, paracrine effect, regeneration

はじめに

近年、幹細胞移植による心血管再生療法が研究・臨床応用されてきている。とくに、血管分野における再生医療の発展は著しく、重症虚血肢に対する骨髄幹細胞を用いた血管新生・再生療法は、現在数多くの施設で行われている。この骨髄幹細胞移植療法は、国内の多施設共同研究である TACT(Theapeutic Angiogenesis by Cell Transplantation)-1 臨床試験によって、その有効性と安全性が報告された¹⁾。また、2003 年には閉塞性動脈硬化症およびパーチャー病に対する高度先進医療として保険認可されている。骨髄幹細胞移植を用いた血管新生療法では、自己骨髄細胞を使用するため免疫学的および倫理的な問題が少ないという利点があるが、全身麻酔下で 400～600 ml の骨髄液を採取する必要があることから、全身状態の不良な患者や高齢者などではその適応に限界がある²⁾。また、この治療法における再移植における安全性も確立されていない。このような問題点の克服と、患者により優しい治療法の開発を目的として、これまでわれわれは、顆粒球コロニー刺激因子(Granulocyte Colony-stimulating Factor; G-CSF)やマクロファージコロニー刺激因子(Mac-

rophage Colony-stimulating Factor; M-CSF)に注目して研究を行ってきた³⁻⁵⁾。

これらの研究の過程で、血管傷害後の新生内膜形成および心筋梗塞後の血管新生、心室リモデリングにおいて、骨髄から動員される CXC chemokine receptor 4⁺ (CXCR4⁺)細胞とそのリガンドであるケモカイン Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1 α : CXCL12)との相互作用、つまり SDF-1/CXCR4 システムが重要な役割を果たしていることを見出した。SDF-1 α は、発生過程における造血幹細胞の骨髄へのホーミングに必須のケモカインであり、生体においても幹細胞を骨髄に留めておく機能を果たしている。一方、その受容体である CXCR4 は AIDS ウイルス(HIV-1)の宿主細胞への侵入に必要な分子であることも示されて注目されている。心血管系においては、SDF-1/CXCR4 システムが発生過程での心室中隔形成や胃腸管の血管形成に重要であることが報告されており⁶⁾、さらに最近、血管新生や動脈硬化、心筋虚血といった心血管疾患においてもさまざまな役割を果たしていることが示されている⁷⁻⁹⁾。本稿では、SDF-1/CXCR4 システムを利用した新たな血管新生療法の開発について、最近のわれわれの知見を中心に概説する。

信州大学大学院医学系研究科循環器病態学分野

*現 自治医科大学分子病態治療研究センターバイオイメージング研究部

2009 年 3 月 18 日受付 2009 年 7 月 24 日受理

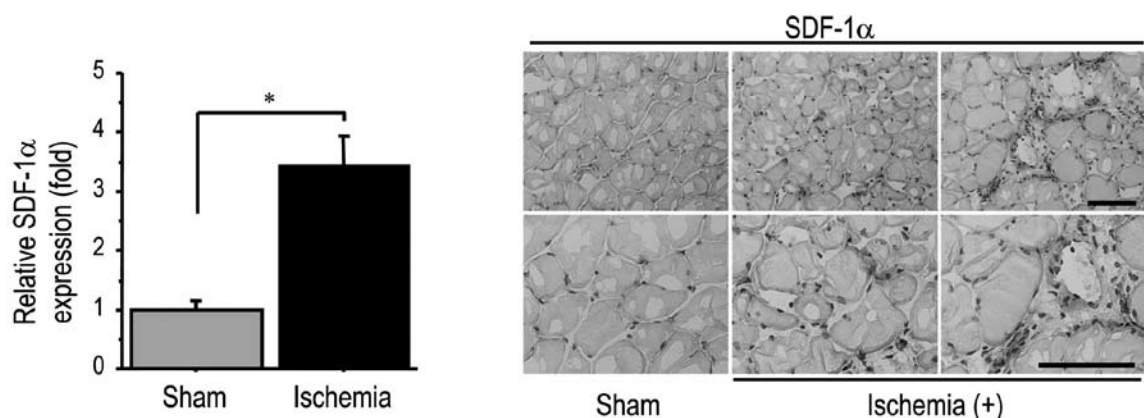


Figure 1 SDF-1α expression in hindlimb ischemia.

A: Total RNA was extracted from the ischemic and non-ischemic adductor muscles 24 h after the induction of hindlimb ischemia. Real-time RT-PCR was performed to evaluate SDF-1α mRNA expression. Data are expressed as means ± SEM (n=4). *p<0.05.

B: The ischemic and non-ischemic (sham) adductor muscles were excised 7 days after the ischemia induction and immunohistochemically stained with anti-SDF-1α antibody. Scale bar represents 100 μm.

A | B

虚血組織における SDF-1α の発現

マウス大腿動脈を結紮して作製する下肢虚血モデル⁽¹⁰⁾における SDF-1α の発現を real-time RT-PCR 法と免疫組織染色法により検討したところ、虚血部位において SDF-1α の発現が有意に亢進していることが明らかとなった(**Fig. 1**)。また、SDF-1α の発現細胞を明らかにするため、骨格筋マーカーである desmin と血管内皮細胞のマーカーである CD31 でそれぞれ二重免疫染色を行ったところ、骨格筋では SDF-1α が発現しておらず、一部の血管内皮細胞と間質部分で発現していることが示された。SDF-1α の発現は転写因子 hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) によって制御されていることから、このマウス下肢虚血組織での SDF-1α 発現には HIF-1 が機能していると考えられる。

単細胞培養による CXCR4 発現の増加

SDF-1α の受容体である CXCR4 はおもに骨髄に存在する造血幹細胞や末梢血中の白血球において発現が認められる。われわれは以前、G-CSF や M-CSF 投与により骨髄からの CXCR4⁺ 細胞が末梢血中に動員されて、組織に発現する SDF-1α とインターアクションを起こし、虚血後血管新生や傷害血管の再内皮化を促進することを報告している^(3,5)。一方で、われわれは重症虚血肢に対す

る自己骨髄単核球移植による血管新生療法の臨床試験を行ってきたが、本治療法の有効性・安全性をより高める必要があることを痛感してきた。そこで、骨髄細胞上の CXCR4 発現を増加させてやれば、虚血部位で発現している SDF-1 とインターアクションを起こして、より効果的な血管新生を誘導できるのではないかと考え、骨髄細胞上の CXCR4 発現に影響する因子のスクリーニングを行った。このスクリーニングにより、37 度で 10% ウシ胎児血清(FCS)/DMEM での培養条件により CXCR4 発現が 24~36 時間にかけて有意に増強することを見出した(CXCR4 陽性率: 24 時間培養 80.1±5.8%, 新鮮骨髄細胞 2.1±0.9%) (**Fig. 2A**)⁽¹¹⁾。この発現増強作用は骨髄細胞に発現している他の分子(CCR7, Gr-1, CD3, Mac-1, CD34, Sca-1, Flk-1)では認められず、CXCR4 に特異的な作用であると考えられた(**Fig. 1B**)。また、この発現増強は Gr-1(顆粒球), Mac-1(単球・顆粒球), CD3 細胞(リンパ球)系のそれぞれの細胞で認められた(**Fig. 1C, D**)。そこで、新鮮骨髄細胞および 24 時間培養骨髄細胞をそれぞれ CXCR4^{Cul} と CXCR4^{Fr} として以下の検討を行った。

マウス下肢虚血モデルにおける CXCR4⁺ 骨髄細胞移植の効果

CXCR4^{Fr}(wild-type マウス新鮮骨髄細胞)および CXCR4^{Cul}(wild-type マウス培養骨髄細胞)をマウス下肢虚血

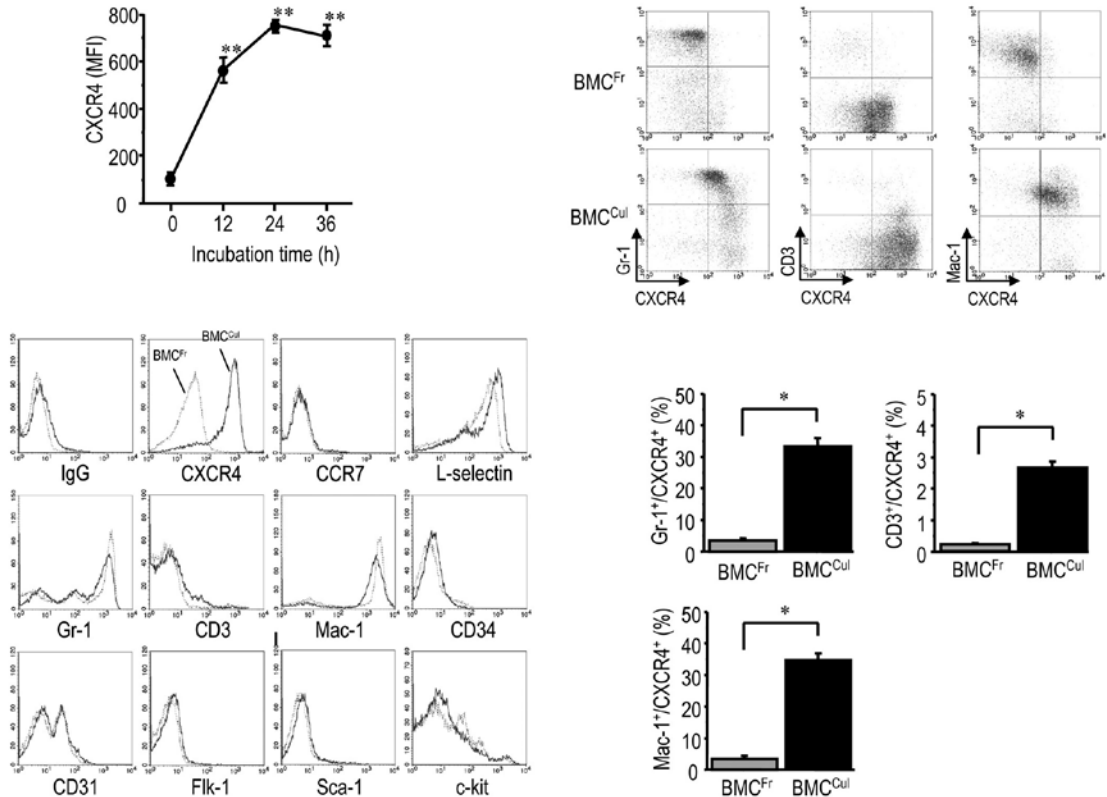


Figure 2 Upregulation of CXCR4 in cultivated BMCs.

A: BMCs were collected and incubated at 37°C for the indicated periods and stained with anti-CXCR4 antibody. The mean fluorescence intensity (MFI) of the CXCR4 expression was analyzed by flow cytometry. Data are expressed as mean ± SEM (n=3 for each). **p<0.01.

B: BMCs were collected and incubated at 37°C for 24 h. Freshly isolated (thin line) and cultivated BMCs (bold line) were stained with various antibodies against CXCR4, CCR7, L-selectin, Gr-1, CD3, Mac-1, CD34, CD31, Flk-1, Sca-1 and c-kit and analyzed by flow cytometry. Irrelevant IgG was used as a negative control. Representative data are shown (n=3).

C and D: Freshly isolated BMCs (BMC^{Fr}) and cultivated BMCs (BMC^{Cul}) were stained for CXCR4 and Gr-1, CD3 or Mac-1 and analyzed by flow cytometry. Representative data (C) and quantitative analysis (D) are shown. Data are expressed as means ± SEM (n=3).

モデルに移植したところ、Control(phosphate buffered saline; PBS)群 および CXCR4^{Fr} 群に比較して CXCR4^{Cul} 群において血流の改善が有意に促進された(**Fig. 3A, B**)。また、CD31 および VE-cadherin 抗体を用いた免疫組織染色法により CXCR4^{Cul} 群では他群に比較して毛細血管形成も有意に促進されていることがわかった(**Fig. 3C, D**)。さらに、この血流改善効果が骨髄細胞 CXCR4 発現に関わっているかを検討するため、CXCR4^{-/-} マウス(CXCR4^{-/-} マウスは胎生致死となる)の骨髄細胞を用いて検討したところ、wild-type マウス由来 CXCR4^{Cul} 骨髄細胞移植群

と比較して、CXCR4^{-/-} マウス由来 CXCR4^{Cul} 骨髄細胞移植群では、その血流改善効果が有意に低下していた(**Fig. 3E**)。

CXCR4 高発現細胞移植による血流改善の機序

CXCR4^{Cul} 骨髄細胞による血流改善促進効果の機序としては、以下の2つが考えられる。(1)CXCR4 リガンドである SDF-1α は虚血により発現が亢進することから移植骨髄細胞が局所により長く留まり(停留)、血管新生作用を示す可能性と(2)CXCR4^{Cul} 骨髄細胞がより多くのサ

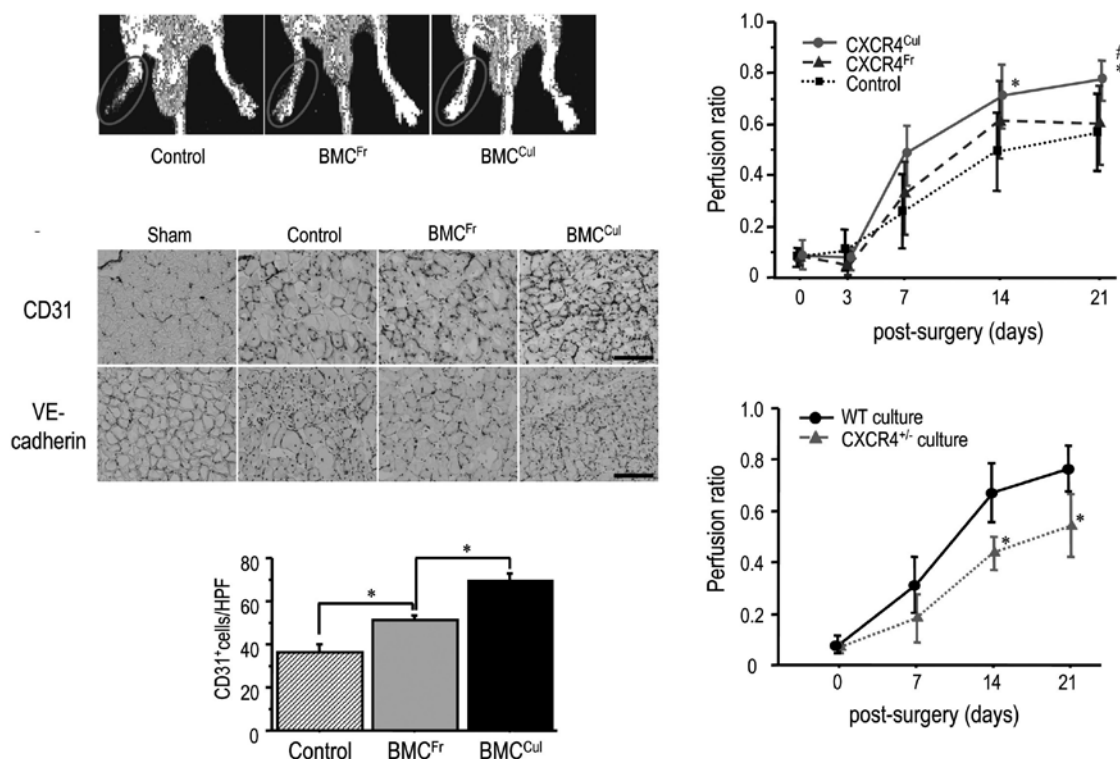


Figure 3 Neovascularization by BMC^{Fr} or BMC^{Cul} implantation.

BMC^{Fr} (5×10^6 cells), BMC^{Cul}, or PBS (control) was injected into the site of hindlimb ischemia 24 h after the surgery. Blood flow perfusion was measured using a laser Doppler perfusion imaging system.

A: Representative photographs of blood flow imaging on day 21 after the surgery are shown.

B: Quantitative analysis of the blood flow ratio was performed. Data are expressed as mean \pm SEM (n=9 for each). *p<0.05 vs. control, #p<0.05 vs. BMC^{Fr}.

C: The adductor muscles were excised 21 days after the surgery and immunohistochemically stained with antibodies against CD31 and VE-cadherin. Representative photographs are shown (n=3). Scale bar represents 100 μ m.

D: Quantitative analysis of CD31⁺ endothelial cells was performed. Data are expressed as mean \pm SEM (n=3 for each). *p<0.05 vs. wild-type BMC^{Cul}.

E: Wild-type BMC^{Cul} (5×10^6 cells) or CXCR4^{-/-} BMC^{Cul} was injected into the site of hindlimb ischemia 24 h after the surgery. Blood flow perfusion was measured using a laser Doppler perfusion imaging system. Quantitative analysis of the blood flow ratio was performed. Data are expressed as mean \pm SEM (n=6 for each). *p<0.05 vs. wild-type BMC^{Cul}.

イトカイン・増殖因子を産生する可能性である。そこで、移植骨髓細胞が停留しているかどうかを検討するため、Green fluorescent protein トランスジェニックマウス(GFPマウス)由来の CXCR4^{Cul} 骨髓細胞を虚血部位へと移植した後、移植部位の骨格筋を採取してコラゲナーゼ処理を行い、GFP⁺細胞をフローサイトメトリー法で解析した。CXCR4^{Cul}群では、CXCR4^{Fr}群と比較して移植後1日目での移植骨髓細胞の停留の有意な増加を認めた(Fig. 4A, B)。一方、骨髓細胞や末梢血細胞、脾細胞の中には GFP⁺細胞を認めなかった。しかし、この移植骨髓細胞の停留は3~21日目において消失しており、とくに移植21日目では移植細胞はほとんど認められなくなっていた。この結果は、移植骨髓 CXCR4細胞から血管内皮細胞への分化に否定的な所見であると考えられる。

移植細胞が血管内皮細胞へと分化して血管を形成している可能性がほとんどないと考えられたことから、さらなる血流改善の機序として移植部位での血管新生因子 interleukin-1 β (IL-1 β)と vascular endothelial growth factor-

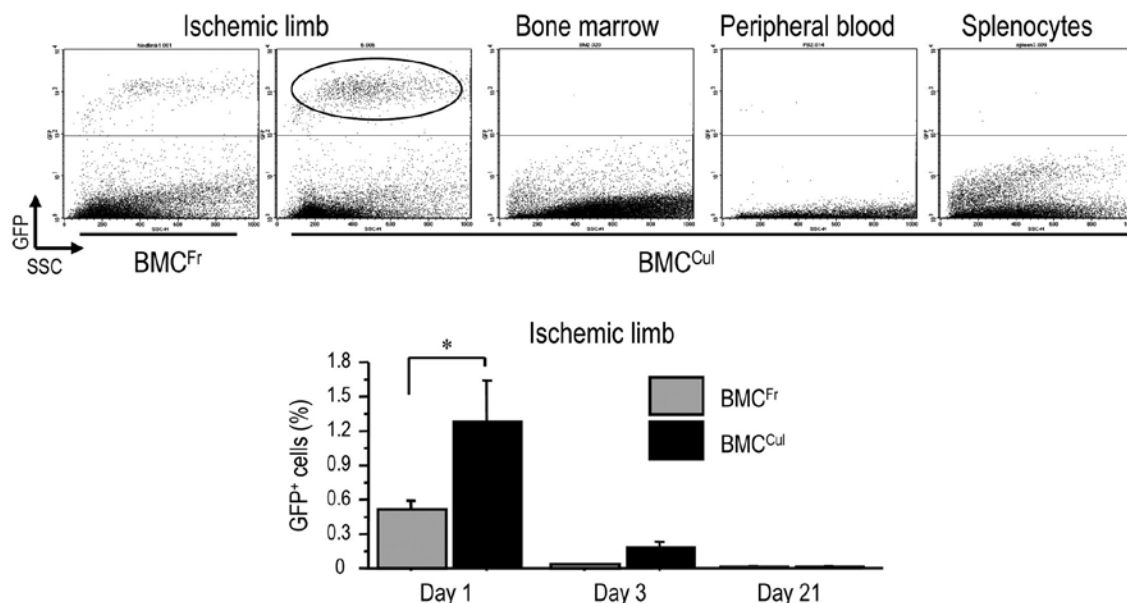


Figure 4 Fate of BMC^{Fr} or BMC^{Cul} injected into the ischemic hindlimb.

A: GFP⁺/BMC^{Fr} (5×10^6 cells) or GFP⁺/BMC^{Cul} (5×10^6 cells, 24 h of cultivation) were injected into the site of hindlimb ischemia. The adductor muscles were excised on day 1 after implantation and digested by treatment with collagenase. The BMCs, peripheral blood cells and splenocytes in the mice were also isolated. The implanted GFP⁺ cells were analyzed by flow cytometry. Representative data are shown (n=3).

B: Quantitative analysis of the implanted GFP⁺/BMC^{Fr} or GFP⁺/BMC^{Cul} on day 1 (n=6), day 3 (n=4) and day 21 (n=4) was performed. Data are expressed as mean \pm SEM. *p<0.05.

A(VEGF-A)のmRNA発現をreal-time RT-PCR法で評価した。Sham群と比較して虚血を作製したControl群でもこれら因子の有意な発現亢進を認め、CXCR4^{Fr}群ではIL-1 β の発現が増加傾向にあり、さらにCXCR4^{Cul}群ではIL-1 β およびVEGF-AともSham群とCXCR4^{Fr}群に比較して増加していた(**Fig. 5A**)。これら因子の産生細胞を明らかにするため、骨髓細胞を採取・培養してその発現を検討したところ、培養によってIL-1 β は3時間をピークとして、またVEGF-Aは6~48時間にかけて徐々に発現が増加することを明らかとした(**Fig. 5B**)。これらIL-1 β とVEGF-Aの発現は培養上清をELISA法で測定することによっても確認された(**Fig. 5C**)。また、これらの血管新生因子以外にも、monocyte chemoattractant protein-1(MCP-1)やIL-6などの炎症性サイトカインも発現が亢進することを確認している。さらに、これらIL-1 β とVEGF-Aの発現はCXCR4^{+/+}マウス由来の骨髓細胞では低下していたことから、これら血管新生因子の発現にCXCR4が直接関与している可能性が示唆された。

おわりに

われわれは、これまでSDF-1/CXCR4システムが血管傷害後の新生内膜形成に寄与していることや、心筋梗塞後の血管新生や血管リモデリングにも寄与していることを報告してきた。本稿で紹介した研究では、SDF-1/CXCR4システムの血管新生作用に着目して研究を行い、骨髓細胞において培養によりその表面のCXCR4発現が特異的に亢進され、このCXCR4発現が亢進した骨髓細胞を虚血部位に移植するとより効果的に血管新生が誘導されて血流が改善することを明らかとした¹¹⁾。また、その血流改善の機序として、虚血部位で発現するCXCR4リガンドであるSDF-1 α と移植した骨髓細胞上のCXCR4の相互作用が生じて、移植骨髓細胞がより多く虚血部位へと留まり、さらにIL-1 β やVEGF-Aといった血管新生作用のある因子をより多く発現することが示唆された。

近年、心血管疾患への治療法は長足の進歩を遂げているにもかかわらず、現在でも重症の虚血性心疾患や末

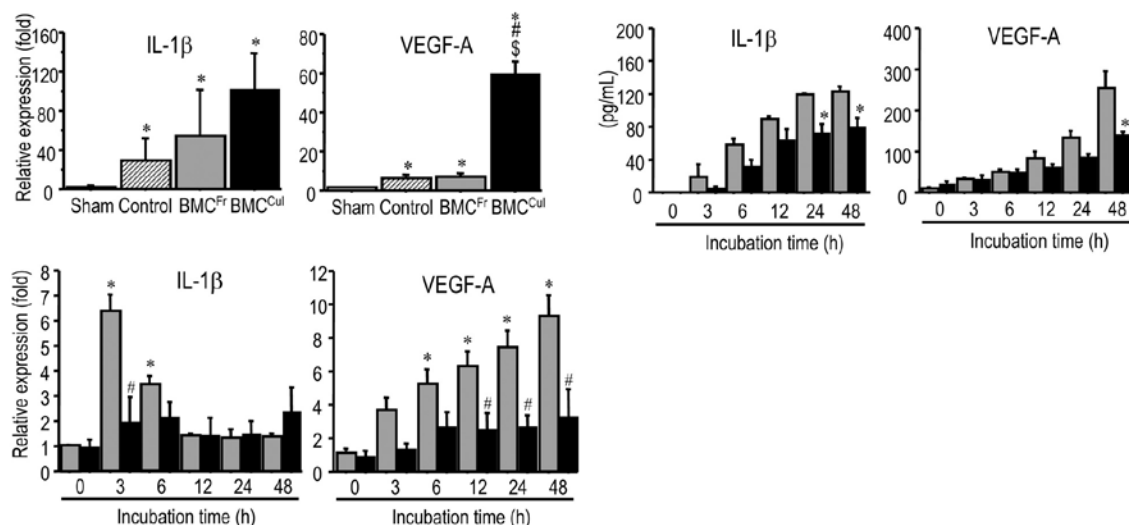


Figure 5 Cytokine mRNA expression in vivo and in vitro.

A: Total RNA was extracted from the adductor muscles of the sham-operated mice and mice implanted with or without BMC^{Fr}, BMC^{Cul} and PBS (control) 24 h after the surgery. Real-time RT-PCR was performed to evaluate mRNA expression of IL-1b and VEGF-A. Data are expressed as means \pm SEM (n=6 for each). *p<0.05 vs. sham, #p<0.05 vs. control, §p<0.05 vs. BMC^{Fr}.

B and C: BMCs were collected from the wild-type (gray) and CXCR4^{-/-} (black) mice, incubated at 37°C for the indicated periods, and analyzed by real-time RT-PCR (B) and ELISA (C). Data are expressed as mean \pm SEM (n=5 for each). *p<0.05 vs. 0 h, #p<0.05 vs. wild-type BMCs.

A	C
B	

梢動脈疾患では有効な治療法もなく、救命できなかったり、四肢の切断に至る症例も少なくない。今後、骨髄細胞によって誘導される血管新生過程における SDF-1/CXCR4 システムの詳細な解析が行われ、このシステムを利用したより効果的な血管新生療法の確立が期待される。

謝 辞

本稿で紹介した研究に使用した GFP マウスと CXCR4^{-/-} マウスを供与してくださいました大阪大学遺伝情報実験センター・岡部勝教授ならびに京都大学医科学研究所・長澤丘司教授に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T et al: Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial. *Lancet*, 2002, **360**: 427–435.
- 2) Jia L, Takahashi M, Yoshioka T et al: Therapeutic potential of endothelial progenitor cells for cardiovascular diseases. *Curr Vasc Pharmacol*, 2006, **4**: 59–65.
- 3) 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**: 61–69.
- 4) Shiba Y, Takahashi M, Yoshioka T et al: M-CSF accelerates neointimal formation in the early phase after vascular injury in mice: the critical role of the SDF-1-CXCR4 system. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007, **27**: 283–289.
- 5) Morimoto H, Takahashi M, Shiba Y et al: Bone marrow-derived CXCR4+ cells mobilized by macrophage colony-stimulating factor participate in the reduction of infarct area and improvement of cardiac remodeling after myocardial infarction in mice. *Am J Pathol*, 2007, **171**: 755–766.
- 6) Tachibana K, Hirota S, Iizasa H et al: The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract. *Nature*, 1998, **393**: 591–594.
- 7) Schober A, Karshovska E, Zerneck A et al: SDF-1 α -mediated tissue repair by stem cells: a promising tool in cardiovascular medicine? *Trends Cardiovasc Med*, 2006, **16**: 103–108.
- 8) Salcedo R, Oppenheim JJ: Role of chemokines in angiogenesis:

- CXCL12/SDF-1 and CXCR4 interaction, a key regulator of endothelial cell responses. *Microcirculation*, 2003, **10**: 359–370.
- 9) Schober A. Chemokines in vascular dysfunction and remodeling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008, **28**: 1950–1959.
- 10) Shiba Y, Takahashi M, Ikeda U: Models for the study of angiogenesis. *Curr Pharm Des*, 2008, **14**: 371–377.
- 11) Shiba Y, Takahashi M, Hata T et al: Bone marrow CXCR4 induction by cultivation enhances therapeutic angiogenesis. *Cardiovasc Res*, 2009, **81**: 169–177.

Development of New Therapeutic Angiogenic Strategy Using SDF-1/CXCR4 System

Masafumi Takahashi,* Yuji Shiba, and Uichi Ikeda

Department of Cardiovascular Medicine, Shinshu University Graduate School of Medicine, Nagano, Japan

*Division of Bioimaging Sciences, Center for Molecular Medicine, Jichi Medical University, Tochigi, Japan

Key words: cytokines, implantation, ischemia, paracrine effect, regeneration

Recent studies demonstrated that implantation of bone marrow cells successfully promotes therapeutic angiogenesis. We found that upregulation of CXCR4, a receptor for chemokine SDF-1 α , on bone marrow cells significantly enhances therapeutic angiogenesis in a murine model of hindlimb ischemia. These findings suggest that the SDF-1/CXCR4 system may serve as a useful source of BMCs for accelerating therapeutic angiogenesis in ischemic cardiovascular diseases.

(*J Jpn Coll Angiol*, 2010, **50**: 323–329)