—Reviews—

血管内皮前駆細胞移植による血管再生治療の現状と未来

浅 原 孝 之[a,b]

Endothelial Progenitor Cells for Vascular Medicine

Takayuki ASAHARA[a,b]

[a]*Regenerative Medicine and Research, Kobe Institute of Biomedical Research and Innovation/RIKEN Center for Developmental Biology, 2–2 Minatojima-minamimachi, Chuo-ku, Kobe 650–0047, Japan, and* [b]*Regenerative Medicine Science, Tokai University School of Medicine, Bohseidai, Isehara City 259–1193, Japan*

(Received January 12, 2007)

The regenerative potential of stem cells has recently been under intense investigation. *In vitro*, stem and progenitor cells have the ability for self-renewal and differentiation into organ-specific cell types. *In vivo*, transplantation of these cells may reconstitute organ systems, as shown in animal models of disease. In contrast, differentiated cells do not exhibit such characteristics. Human endothelial progenitor cells (EPCs) have been isolated from the peripheral blood of adult individuals, expanded *in vitro* and committed to an endothelial lineage in culture. The transplantation of these human EPCs has been shown to facilitate successful salvage of limb vasculature and perfusion in athymic nude mice with severe hindlimb ischemia, while differentiated endothelial cells (human microvascular endothelial cells) failed to accomplish limb-saving neovascularization. Future studies will clarify the mechanisms and circumstances that may be responsible for modulating the contribution of vasculogenesis to postnatal neovascularization. Specifically in this regard, it is intriguing to consider the possibility that certain angiogenic growth factors acknowledged to promote both angiogenesis and vasculogenesis in the embryo, but have been assumed to promote neovascularization exclusively by angiogenesis in the adult, may in fact promote migration, proliferation, and mobilization of EPCs from bone marrow. The possibility that modulation of vasculogenesis can be used therapeutically to augment as well as inhibit neovascularization deserves further investigation.

Key words——endothelial progenitor cell; stem cell; vascular regeneration; ischemic disease

1. はじめに

成体の血管形成メカニズムは，これまで既存血管の構成要素のうちの1つである内皮細胞が増殖・遊走して新たな血管を作り出す血管新生（angiogenesis）という概念が中心であった．しかし，1997年に成人末梢血中に血管内皮前駆細胞（endothelial progenitor cell; EPC）が発見[1]されて以来，胎生期にのみ認められるとされていた血管発生（vasculogenesis）という現象が成体においても同様に認められ，局所でEPCが増殖・分化し血管新生に係わっていることが明らかになった．それ以来，循環器学の分野を中心に，血液学や発生学などの知見も含め成体での血管形成に関する研究が幅広く行われるようになった．近年，このEPCに関連する研究が幅広く行われており，その治療応用の有用性が示唆されている．実際，冠動脈疾患や下肢虚血疾患（バージャー病や閉塞性動脈硬化症など）を含む重症虚血性疾患患者に対して，自己EPCを虚血部位に移植するという血管再生療法の臨床試験が既に開始され良好な成績が報告されつつある．その反面，老化や糖尿病に代表される基礎疾患により患者のEPC量及び質が低下し，移植後に十分な治療効果が期待できないという問題点も抱えている．

本稿では，成体での血管形成のメカニズムを概説したのち，EPCの特性を生かした現行のEPC移植治療を含めた将来的展望について概説する．

2. EPCの発見

1997年に浅原らは，成人の末梢血単核球分画か

[a]理化学研究所神戸研究所/先端医療センター幹細胞医療応用研究チーム（〒650–0047 神戸市中央区港島南町2–2），[b]東海大学医学部再生医療科学（〒259–1193 伊勢原市望星台）
e-mail: Asa777@aol.com

本総説は，日本薬学会第126年会シンポジウムS4で発表したものを中心に記述したものである．

ら単離された表面抗原のうちの一つであるCD34陽性（CD34$^+$）細胞が，VEGFなどを含めた内皮細胞成長因子などとの培養により血管内皮細胞に分化することを発見した.[1] FACSの解析により，CD34$^+$細胞はCD31（PECAM-1），CD133（AC133），Flk-1（VEGFR-2），Tie-2，VE-cadherinなどの血管内皮細胞マーカーも同時に発現し，分化がある程度進むとFlt-1（VEGFR-1），Tie-1，E-selectinも発現するようになることが明らかになった．また，このCD34$^+$細胞を下肢虚血マウスに全身投与すると，虚血部位に取り込まれ，分化・増殖・遊走し新生血管の形成に関与することも明らかになった．これらの所見から，成体末梢血中に血管内皮細胞の前駆体，すなわちEPCの存在が証明されたことになる．その後，EPCの体内動態を解明するために血管内皮細胞系に特異的に発現する遺伝子のFlk-1, Tie-2の制御下でβ-galactosidaseを発現するトランスジェニックマウスを用いた骨髄移植（BMT: bone marrow transplantation）モデル（Tie-2/LacZ BMT mouse model）において，虚血領域，腫瘍移植，創傷治癒，月経周期に伴う子宮内膜増殖を誘発すると，いずれの組織においても骨髄由来であるFlk-1又はTie-2を発現している細胞が，新生血管の中に取り込まれていることが確認された.[2] 以上の所見から，EPCは骨髄由来であり抹梢血ではCD34$^+$細胞として循環しながら存在し，生理的及び病的に係わらず新生血管形成に関与することが確認された．このメカニズムは胎生期にのみ存在すると考えられていた血管発生の現象に一致し，それまでに考えられていた既存血管からの血管新生[3]とは異なる概念を成体における血管形成の中に植え付けることになった．この発見以来，成体での新生血管形成は従来の血管新生と血管発生の相互作用によって起こるものと考えられるようになった．

3. EPCの血管形成への関与

3-1. EPCの動員と動態　前項でも述べたように，末梢血中のEPCは単核球分画の一部として体内を循環していてその起源は骨髄に由来する．通常，末梢血EPCと骨髄EPCは生体になんらかの刺激がない限りは数的には平衡状態を保っている．つまり，常に一定の割合でEPCは骨髄から末梢へ動員されていて，抹消血中のEPC数は一定レベルを保っている．そして，ひとたび組織が虚血に陥ると様々なサイトカイン/成長因子，例えばVEGF,[4] SDF-1,[5] PDGF-CC,[6] G-CSF,[7] BDNF,[8] PLGF,[9] Angiopoietin-1[10]など，やホルモン（estrogen,[11] erythropoietin[12]）によりEPCは骨髄から動員（mobilization）され，末梢血中のEPC数は上昇することが知られている（Fig. 1）．ただし，われわれは心臓での反復する短時間の虚血（ischemic preconditioning）などの特殊な状況下では，多数のEPCが急激に標的臓器（心臓）に集積するために，ごく早期には骨髄からの動員が掛かるまでの間に循環しているEPC数が一過性に減少することを確認している.[13] その他EPCを骨髄から動員するものとしては，HMG-CoA還元酵素阻害薬（Statin製剤）[14]や運動/トレーニング[15,16]などといった外的因子も報告されている．このようにして，末梢循環に

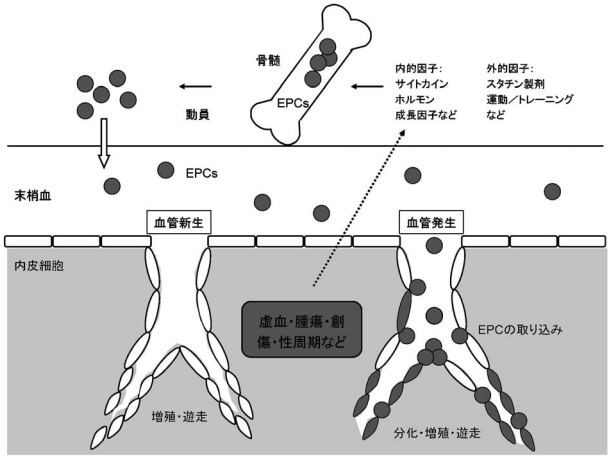

Fig. 1. Post-natal Neovascularization

Post-natal neovascularization in the physiological or pathological events is consistent with neovessel formation contributed by angiogenesis and vasculogenesis at the various rates between their two mechanisms. Angiogenesis and vasculogenesis are due to the activations of in situ ECs and BM-derived or in situ EPCs, respectively.

浅原孝之

神戸先端医療センター研究所副所長．1984年東京医科大学卒業．1993年マサチューセッツ州ボストンのタフツ大学St. Elizabeth's Medical CenterのJeffrey M. Isner教授の下に留学．血管新生・遺伝子治療の基礎・臨床研究を進めていたが，これらの研究の中で骨髄由来の血管内皮前駆細胞の存在を発見．血管内皮前駆細胞の機能解析・分化過程の研究を発展させる中で，血管形成を中心とする再生・幹細胞医学をメインテーマに活動するに至る．現在神戸先端医療センター研究所副所長（理研提携チームリーダー），東海大学再生医療科学教授，として活動中．趣味はサッカー・ジャズ・散歩・趣味をみつけること．

入ったEPCは上記サイトカインによる走化/遊走促進作用で，虚血巣に集積するようになる．

3-2. EPCの細胞学的特性　次に，集積したEPCが虚血巣でどのようにして血管新生又は血管発生に係わるかについては，大きく分けて2つの機序が考えられている．第一に，EPCが新しく作られる血管に直接参加して血管壁の構成成分となる，いわゆる血管発生の部分に貢献する役割．これに関してはこれまでにも多くの知見[1,2]が集積されており，確立されたEPCの役割であると言える．しかし，実際に前述にあるようなTie-2/LacZ BMTマウスを用いた解析によると，集積したEPCの中で直接新生血管に取り込まれている割合はむしろ少なく，血管外に留まるEPCの方がはるかに多いという報告[13]もある．それでは，この血管外に留まっているEPCはどのような役割を果たすのだろうか？そこで，第二の役割について述べる．間質に留まるだけで血管形成には直接関与しないEPC，これらはただそこに留まっているのではなく，EPC自体が種々のサイトカインを合成して既存の内皮細胞の増殖・遊走を促進する，つまり血管新生の部分に間接的に貢献しているのである．われわれ及び他のグループは，これまでにEPCが少なくともVEGF, eNOS, iNOS,[13] IGF-1, SDF-1,[17] HGF, G-CSF[18]などのサイトカインを分泌することを確認している．これらのサイトカインは血管新生に促進的に働くものが多く，EPCはいわゆる既存血管に対するパラクライン効果として血管新生促進の役割を担っていると言える．

4. EPC移植による血管再生療法

以上のようなEPCの細胞特性を利用して，現在日本国内を始めとして海外でもこのEPCを用いた移植治療が行われている．まず，われわれの研究室で行われている臨床試験について紹介しよう．当施設では，2003年11月から慢性重症下肢虚血患者（閉塞性動脈硬化症やバージャー病など）に対する自家EPC移植による血管再生治療に関する第I/II相試験（transplantation of endothelial progenitor cells for vascular regeneration in no-option patients with chronic critical limb ischemia; EPOCH-CLI）を開始した．試験デザインは単盲検下での用量漸増試験であり，対象はFontaine分類III度・IV度の重症患者で，血管形成術やバイパス手術の適応にならない症例である．EPCはG-CSFの皮下投与により骨髄から動員された単核球をアフェレーシスで採取したのちに，磁気細胞分離法により単核球中の$CD34^+$細胞EPCを多く含む細胞分画として分離する．細胞の投与は，腰椎麻酔下で治療効率を高めるために虚血肢筋肉への局所投与を行っている（Fig. 2）．また，心筋虚血例での細胞移植は，NOGAマッピングガイド下に虚血部へ経カテーテル的に行う予定である．上記の臨床試験は，神戸医療産業都市構想の一環として設立された先端医療センター（開発・治療部門）・臨床研究情報センター（データ管理部門）・神戸市立中央市民病院（治療部門）の共同プロジェクトとして行われている．一方，日本国内では末梢血又は骨髄の単核球を特定のマーカーで選別せずに下肢及び心筋虚血部位に移植する治療も多施設で行われているが，$CD34^+$細胞と非選別単核球のどちらがより有効であるかについてはいまだ一定の見解は得られておらず，今後の臨床研究報告を待たなければならない．

では次に，海外で行われているEPC移植治療についていくつか簡単に紹介しよう．まず，筆者らの研究室とほぼ同じコンセプトで慢性虚血性心疾患患者に対して行われているのが，米国ボストンにあるCaritas St. Elizabeth's Medical Centerの心血管研究部門を中心とした多施設共同臨床研究（Injection of Autologous CD34-Positive Cells for Neovasculari-

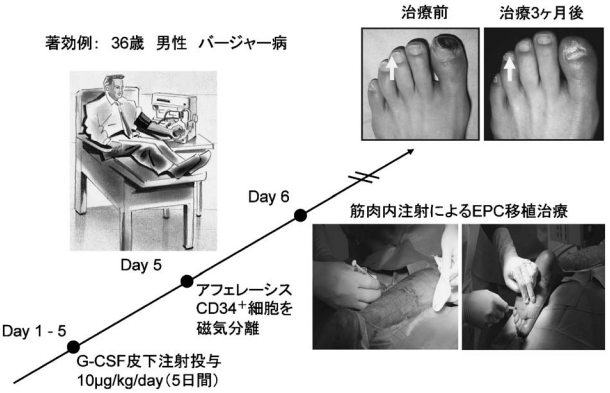

Fig. 2. One Successful Case of Autologous $CD34^+$ Cell Transplantation Therapy for Ischemic Hindlimb in Burger Disease

Thirty six year old male patient who had toe necrosis due to microcirculation failure received $CD34^+$ cell injection at 40 sites in ischemic limb under lumbar anesthesia, and the necrosis was significantly improved with blood flow recovery (data not shown) 3 months after the treatment. This improvement was maintained for at least one year.

zation and Symptom Relief in Patients with Myocardial Ischemia）であり，全米初のトライアルとして注目されている．又，ドイツのフランクフルト大学では，急性心筋梗塞患者の自己末梢血又は骨髄から採取した単核球をEPC分化培地で3日間培養し，シャーレに接着した細胞をEPCの豊富な細胞分画（>90%）として，亜急性期（発症3—6日目）に経カテーテル的に冠動脈から細胞を注入して，既に良好な成績をおさめている（Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction; TOPCARE-AMI[19]）．このように，EPCは今後血管再生治療の中心的存在となる可能性があり，さらなる適応拡大が期待される．

5. 今後のEPC移植治療の問題点

さて，前項ではEPCを用いた治療的血管新生の現状について述べたが，実際の治療を行う段階においては問題点もあり，ここではその問題点について述べたい．これまでのマウス下肢虚血モデルを用いたEPC投与実験報告にもあるように，虚血改善効果はEPC投与数に依存することが確認されている．[20] したがって，より多くのEPCを確保・投与することが一定の治療効果を得るためには必要であると考えられる．このような証拠に基づき，臨床応用では前述のようにG-CSFを用いて強制的に骨髄のEPCを動員し，回収するという工夫を凝らしているが，実際に治療を受ける患者は高齢であったり種々の基礎疾患が存在したりする場合が多い．老化現象[21]はもちろんのこと，喫煙などの嗜好[22]・高血圧症[23,24]・糖尿病[24,25]・高脂血症[24]といったいわゆる冠動脈疾患における危険因子とされているものでは，いずれの場合でも抹消血循環EPCの数が減少しているだけでなくその細胞機能も低下していることが知られている．当然のことながら，このような患者の自己血又は骨髄液から得たEPCを移植しても十分な治療効果は期待できない．

このような問題点を克服するため，これまでの報告ではVEGF[26]やTelomerase reverse transcriptase[27]などの特定遺伝子をEPCに導入することで，EPCを遺伝子レベルで修飾し，細胞機能を改善させようとする試みもなされている．

6. おわりに

EPCの特性及びEPCを用いた血管再生療法とその展望について概説した．EPCが持つ様々な特徴・機能を生かしたこれらの治療戦略は，これからも循環器学のみならず他の分野においても新しい治療展開を期待させるものになる可能性を秘めている．今後も緻密な基礎研究及び前臨床研究を基に，臨床試験で安全性・有効性を確立していくとともに，問題点を克服した次世代のEPC移植治療を開発・確立していく必要がある．

REFERENCES

1) Asahara T., Murohara T., Sullivan A., Silver M. van der Zee R., Li T., Witzenbichler B., Schatteman G., Isner J. M., *Science*, **275** (5302), 964–967 (1997).
2) Asahara T., Masuda H., Takahashi T., Kalka C., Pastore C., Silver M., Kearne M., Magner M., Isner J. M., *Circ. Res.*, **85** (3), 221–228 (1999).
3) Folkman J., Klagsbrun M., *Science*, **235**, 442–447 (1987).
4) Asahara T., Takahashi T., Masuda H., Kalka C., Chen D., Iwaguro H., Inai Y., Silver M., Isner J. M., *EMBO J.*, **18** (14), 3964–3972 (1999).
5) Yamaguchi J., Kusano K. F., Masuo O., Kawamoto A., Silver M., Murasawa S., Bosch-Marce M., Masuda H., Losordo D. W., Isner J. M., Asahara T., *Circulation*, **107** (9), 1322–1328 (2003).
6) Li X., Tjwa M., Moons L., Fons P., Noel A., Ny A., Zhou J. M., Lennartsson J., Li H., Luttun A., Ponten A., Devy L., Bouche A., Oh H., Manderveld A., Blacher S., Communi D., Savi P., Bono F., Dewerchin M., Foidart J. M., Autiero M., Herbert J. M., Collen D., Heldin C. H., Eriksson U., Carmeliet P., *J. Clin. Invest.*, **115** (1), 118–127 (2005).
7) Powell T. M., Paul J. D., Hill J. M., Thompson M., Benjamin M., Rodrigo M., McCoy J. P., Read E. J., Khuu H. M., Leitman S. F., Finkel T., Cannon 3rd R. O., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **25** (2), 296–301 (2005).
8) Kermani P., Rafii D., Jin D. K., Whitlock P., Schaffer W., Chiang A., Vincent L., Friedrich M., Shido K., Hackett N. R., Crystal R. G., Rafii S., Hempstead B. L., *J. Clin. Invest.*, **115** (3), 653–663 (2005).

9) Hattori K., Heissig B., Wu Y., Dias S., Tejada R., Ferris B., Hicklin D. J., Zhu Z., Bohlen P., Witte L., Hendrikx J., Hackett N. R., Crystal R. G., Moore M. A., Werb Z., Lyden D., Rafii S., *Nat. Med.*, **8** (8), 841–849 (2002).
10) Hattori K., Dias S., Heissig B., Hackett N. R., Lyden D., Tateno M., Hicklin D. J., Zhu Z., Witte L., Crystal R. G., Moore M. A., Rafii S., *J. Exp. Med.*, **193** (9), 1005–1014 (2001).
11) Iwakura A., Luedemann C., Shastry S., Hanley A., Kearney M., Aikawa R., Isner J. M., Asahara T., Losordo D. W., *Circulation*, **108** (25), 3115–3121 (2003).
12) Heeschen C., Aicher A., Lehmann R., Fichtlscherer S., Vasa M., Urbich C., Mildner-Rihm C., Martin H., Zeiher A. M., Dimmeler S., *Blood*, **102** (4), 1340–1346 (2003).
13) Ii M., Nishimura H., Iwakura A., Wecker A., Eaton E., Asahara T., Losordo D. W., *Circulation*, **111** (9), 1114–1120 (2005).
14) Llevadot J., Murasawa S., Kureishi Y., Uchida S., Masuda H., Kawamoto A., Walsh K., Isner J. M., Asahara T., *J. Clin. Invest.*, **108** (3), 399–405 (2001).
15) Laufs U., Werner N., Link A., Endres M., Wassmann S., Jurgens K., Miche E., Bohm M., Nickenig G., *Circulation*, **109** (2), 220–226 (2004).
16) Rehman J., Li J., Parvathaneni L., Karlsson G., Panchal V. R., Temm C. J., Mahenthiran J., March K. L., *J. Am. Coll. Cardiol.*, **43** (12), 2314–2318 (2004).
17) Urbich C., Aicher A., Heeschen C., Dernbach E., Hofmann W. K., Zeiher A. M., Dimmeler S., *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **39** (5), 733–742 (2005).
18) Rehman J., Li J., Orschell C. M., March K., L., *Circulation*, **107** (8), 1164–1169 (2003).
19) Assmus B., Schachinger V., Teupe C., Britten M., Lehmann R., Dobert N., Grunwald F., Aicher A., Urbich C., Martin H., Hoelzer D., Dimmeler S., Zeiher A. M., *Circulation*, **106** (24), 3009–3017 (2002).
20) Kalka C., Masuda H., Takahashi T., Kalka-Moll W. M., Silver M., Kearney M., Li T., Isner J. M., Asahara T., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **97** (7), 3422–3427 (2000).
21) Heiss C., Keymel S., Niesler U., Ziemann J., Kelm M., Kalka C., *J. Am. Coll. Cardiol.*, **45** (9), 1441–1448 (2005).
22) Michaud S. E., Dussault S., Haddad P., Groleau J., Rivard A., *Atherosclerosis*, **187** (2), 423–432 (2006).
23) Imanishi T., Moriwaki C., Hano T., Nishio I., *J. Hypertens.*, **23** (10), 1831–1837 (2005).
24) Vasa M., Fichtlscherer S., Aicher A., Adler K., Urbich C., Martin H., Zeiher A. M., Dimmeler S., *Circ. Res.*, **89** (1), E1–7 (2001).
25) Ii M., Takenaka H., Asai J., Ibusuki K., Mizukami Y., Maruyama K., Yoon Y. S., Wecker A., Luedemann C., Eaton E., Silver M., Thorne T., Losordo D. W., *Circ. Res.*, **98** (5), 697–704 (2006).
26) Iwaguro H., Yamaguchi J., Kalka C., Murasawa S., Masuda H., Hayashi S., Silver M., Li T., Isner J. M., Asahara T., *Circulation*, **105** (6), 732–738 (2002).
27) Murasawa S., Llevadot J., Silver M., Isner J., M., Losordo D. W., Asahara T., *Circulation*, **106** (9), 1133–1139 (2002).