

基礎技術の脈管病治療への応用：血管内皮前駆細胞

川本 篤彦^{1,2} 浅原 孝之^{1,2,3}

要 旨：近年，再生医療の分野において，器官形成や組織再生の研究が推し進められている。成体の末梢血中から発見された血管内皮前駆細胞（EPC）は，液性・細胞性因子の影響で骨髄より強制動員され，重症虚血部位の血管再生に寄与している。下肢虚血や虚血性心疾患に対する血管再生療法としてのEPC移植治療は，基礎からの橋渡し研究成果をもとに，現在では臨床試験が開始され，注目を集めている。（J Jpn Coll Angiol, 2005, 45: 131-135）

Key words: endothelial progenitor cell, cell therapy, vasculogenesis, critical limb ischemia, coronary artery disease

はじめに

血管研究は，癌や血管疾患の病態解明・治療法確立のために展開されてきた。最近の血管研究においては血液学，発生学などの知見を取り入れながら，血管形成における詳細な分化メカニズムの解明が新たな流れをつくり出している。また，血管形成は昨今の大きな流れである幹細胞による器官形成・組織再生において不可欠であり，再生医療発展の中心的役割を果たす可能性を持っているといえる。

骨髄に由来する血管内皮前駆細胞（endothelial progenitor cell: EPC）が末梢血中の単核球成分の一部として存在することが発見¹⁾されて以来，多くの*in vivo* *in vitro*の実験を通じてその治療応用の有用性を示唆する知見が集積された。現在，重症の冠動脈疾患（虚血性心疾患）や下肢虚血疾患（閉塞性動脈硬化症，パージャー病）患者の血管再生療法として臨床試験が開始されつつある。本稿では，今後，再生医療において大きな可能性を秘めているEPCを用いた血管再生療法について概説する。

成体におけるEPCの発見と体内動態

1997年，Asaharaら¹⁾は成体においてEPCが末梢血中の単核球成分の一部（CD34陽性細胞）として循環し，新規血管形成部位に取り込まれ，分化・増殖・遊走し，血管形成に寄与することを証明した。EPCは培養による分化過程でCD34，CD31（PECAM-1），CD133（AC133），Flk-1（VEGFR-2），Tie-2，VE-カドヘリンを，遅れてFlt-1（VEGFR-1），Tie-1，E-セレクトンを発現する。さらに，血管内皮系細胞に特異的な遺伝子である，Flk-1またはTie-2のプロモーターによる β -galactosidaseを発現するトランスジェニックマウスの骨髄移植モデルに対して虚血・癌・創傷治癒あるいは子宮・卵巣の血管形成を誘発した実験により，成体におけるEPCの主要供給源は骨髄であることが判明した²⁾。また，骨髄中EPCの循環血中への動員が顆粒球コロニー刺激因子（granulocyte colony stimulating factor: G-CSF）などのサイトカインや血管内皮増殖因子の投与により増強されることも明らかになった^{3,4)}（Fig. 1）。

これらの機序は，胎生期のみに存在するとされた血管発生（vasculogenesis）⁵⁾に一致し，それまでに考えられてきた成体における既存血管からの血管新生（angiogenesis）⁶⁾とは異なる概念を生み出した。これ以後，成体の新規血管形成は血管新生と血管発生の相互

¹⁾神戸先端医療センター再生医療研究部

²⁾理化学研究所神戸研究所発生・再生科学総合研究センター
幹細胞医療応用研究チーム

³⁾東海大学医学部基盤診療学系再生医療科学

2005年2月25日受理

作用によるものと考えられるようになった。

EPC移植による血管再生療法

循環器領域におけるEPCの治療応用としては、虚血部位の血管再生療法や動脈硬化部位の血管内皮再生療法が考えられている。

現在、移植に必要なEPCの採取法、分離法の検討が進んでいる。方法の1つは、EPCの表面マーカー(CD34, AC133など)に対する抗体を用いて、末梢血あるいは骨髓の単核球からEPCを分離する方法(fresh isolation法)である。ただし、上記の表面マーカーはEPCと造血幹細胞に共通しているため、分離された細胞の中には造血幹細胞も混入している。今後、EPCに対する、より特異的なマーカーの発見が求められている。その一方で、fresh isolation法は、造血幹細胞移植ですでに臨床適用されている。Isolex, CliniMACSなどの磁気細胞分離装置を用いれば、滅菌された閉鎖回路で細胞を分離でき、細胞の培養・加工を行わないので、細胞培養センター(cell processing center: CPC)施設内での手技を要さない。また、これらの装置を用いて分離されたCD34陽性細胞やAC133陽性細胞を造血幹細胞として移植した臨床経験の中では、細胞移植による副作用は報告されていない。fresh isolation法は、EPCの純度の点で若干の問題を残してはいるものの、分離方法および安全性が確立されている面から、臨床適用の初期段階に適した方法と考えられる。ただし、ヒトの末梢血からCD34陽性細胞あるいはAC133陽性細胞を採取する場合、小動物への投与には十分な細胞数を得られるが、臨床適用を考慮するとG-CSFなどのサイトカインを用いて骨髓細胞を末梢血に強制動員させて、より多くの細胞数を確保する必要がある。

これに対して、末梢血単核球を培養し、増殖・分化誘導を受けたEPCを採取する方法(*ex vivo* expansion法)は、fresh isolation法に比してEPCの採取効率・純度の両面で優れている。しかし、現状では、細胞の培養過程で動物血清を用いる方法しか確立されていないので、自家血清中あるいは無血清中で効率よく培養する方法を確立する必要がある。また、細胞の培養・加工を行うので、臨床適用に際してはCPC施設の整備が必須である。このほか、fresh isolation法で分離された細胞をさらに培養する方法も検討され始めている(Fig. 1)。

Kalkaら⁷⁾は、健康人の末梢血単核球を培養して得ら

れたEPCをヌードマウスの下肢虚血モデルに静脈内投与し、移植細胞の虚血部位への集積、マウス由来血管内皮細胞と共同した血管再生への貢献を組織学的に確認した。組織学的な毛細血管密度やレーザードブラ法による虚血肢の血液灌流も、細胞移植後に有意に改善し、重症虚血後壊死に対する下肢温存率が、対照群に比してEPC移植群で著明に向上した。Muroharaら⁸⁾もヒト臍帯血から採取したEPCを下肢虚血ヌードラットに移植し、同様に良好な成績を報告している。EPC移植治療は、免疫不全ラットやブタの心筋梗塞モデルにも応用され、組織学的に新生血管の増生・心筋壊死の減少を誘導し、左室機能の改善にも貢献することが判明した^{9,10)}(Fig. 2)。この方法は、EPCの増殖能・分化能を利用した強力かつ生理的な先進的医療として注目を受けている。また、遺伝子治療による血管新生療法で治療効果が低いとされる内因性血管新生能低下例に対しても、EPCの局所投与により新たな血管形成に必要な血管内皮細胞を補充できると考えられる。

その他の方法として、細胞遺伝子治療(cell mediated gene therapy)がある。ヒトのEPCにVEGF遺伝子をアデノウイルスベクターで導入し強制発現させ、細胞単独治療における非有効用量の細胞を投与したところ、血管形成・血流改善の面で細胞単独治療をしのぐ治療効果が確認され、投与細胞数を1/30にまで低減できると報告されている¹¹⁾。また、テロメラーゼを活性化させるテロメラーゼ逆転写酵素(telomerase reverse transcriptase: TERT)の遺伝子をEPCに導入する方法も報告されている。TERT遺伝子導入はEPCの分裂寿命延長を誘導できることが示され、細胞機能の評価ではTERTの導入群で増殖・遊走能がともに増強し、アポトーシスが抑制され、さらにTERTを強制発現させたEPCを下肢虚血動物モデルに投与したところ、VEGFの場合と同様に、細胞単独治療をしのぐ効果が確認されている¹²⁾。これらの基礎研究結果より、細胞遺伝子治療を用いることで、より少ない細胞数でも十分な治療効果が得られることが明らかになった。すなわち、個々の細胞の質を高めることも今後の臨床応用において有効であることが示された。

EPCを用いた血管再生療法の利点として、EPCの新規血管形成部への選択的集積性が挙げられる。これにより、血管の形成を空間的に制御することが理論的に可能と考えられる。また、移植担体が細胞であること

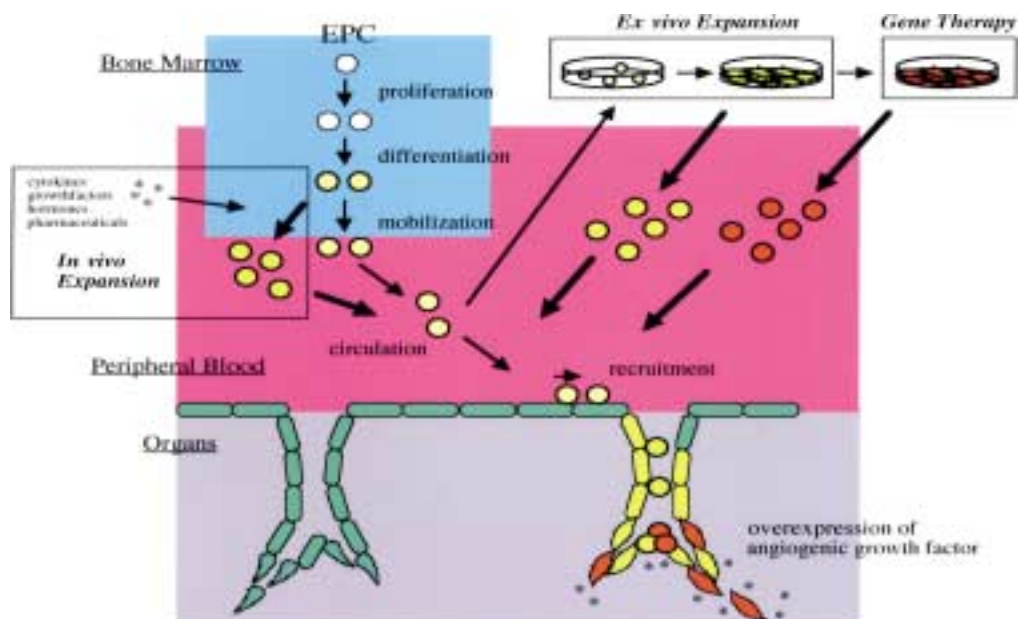


Figure 1 Kinetics and therapeutic application of endothelial progenitor cells (EPCs) for postnatal neovascularization.

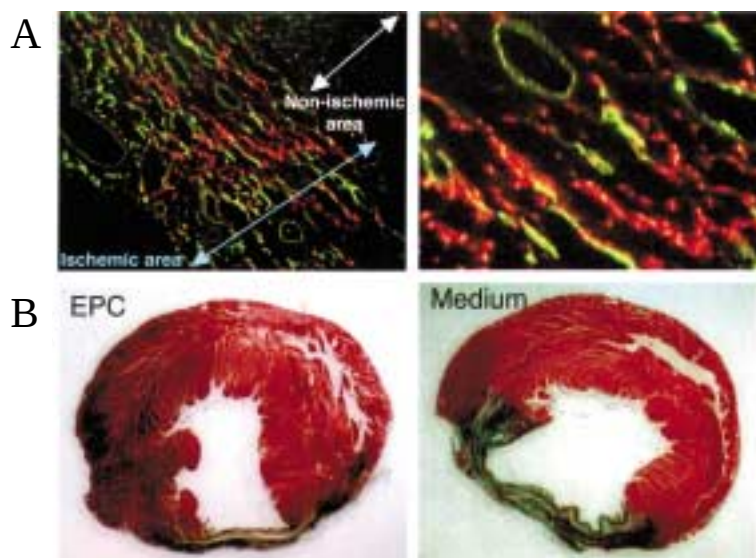


Figure 2 Ex vivo expanded EPCs incorporate into foci of neovascularization (A) and inhibit left ventricular remodeling after myocardial infarction (B).

から、遺伝子導入などの操作が比較的容易にできることも挙げられる。安全性等については慎重に検討する必要があるが、現在の分子生物学的テクニックを用いれば、EPCに対してさまざまな操作を行うことができ

ると考えられる。このように、EPCを用いて、血管形成を効率よくコントロールできれば、循環器疾患のみならず、癌治療、さまざまな再生医療の臨床において、新たな治療の選択肢になり得ると考えられる。



Figure 3 Intramuscular transplantation of autologous CD34+ cells (EPCs) in patients with chronic critical limb ischemia in Kobe Institute of Biomedical Research and Innovation (ongoing phase I/II clinical trial).

虚血性疾患に対するEPC移植臨床試験

下肢・心筋などの虚血性疾患に対するEPC移植に関する基礎研究，前臨床研究に引き続いて，同細胞移植の臨床適用も開始されている。Stammら¹³⁾は，心筋梗塞患者に対する冠動脈バイパス手術中に自家骨髄AC133陽性細胞の心筋内移植も併用し，術後に左室機能と心筋灌流が改善したという。Assmusら¹⁴⁾は，心筋梗塞患者への急性期血行再建の後に11例に自家末梢血培養EPC，9例に自家骨髄単核球を移植した。両移植群で左室収縮能および左室viabilityが同等に改善したという。これらの成績は，虚血性疾患に対するEPC移植の臨床的有用性を示唆しているが，現時点ではパイロットスタディーのレベルにとどまっている。今後，治療群・対照群の設定，治療効果の評価システムなどについて，さらに科学的な検証が必要である。

当研究室では，2003年11月に慢性重症下肢虚血に対する自家EPC移植による血管再生治療に関する第I/II相臨床試験を開始した。試験デザインは単盲検下での用量漸増試験である。対象はFontaine分類III度，IV度の慢性重症下肢虚血患者で，血管形成術やバイパス手術の適応にならない重症例である。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レーションで採取した後に，磁気細胞分離法により単核球中のCD34陽性細胞をEPCとして分離する。分離されたEPCは，腰椎麻酔下で下肢虚血部筋肉内に移植されており，高い治療成果を上げている(Fig. 3)。

おわりに

EPCを用いた血管再生療法の最も優れた点は，EPCは，1)血管内皮細胞以外の細胞系列への分化に伴うリスクが少ないこと，2)治療侵襲の低さ，3)自己の細胞を使用するため免疫拒絶が起こらない点である。従来行われてきた骨髄細胞を用いた血管再生療法は，骨髄細胞が多分化能を有する細胞群であるため，不必要な場所に不必要な細胞が生着・分化・増殖する危険性を含み，また骨髄採取時における全身麻酔などの侵襲がある。この点で，EPCを用いた血管再生療法が最も安全性・有効性の高い治療法になる可能性があり，心筋梗塞等の虚血性心疾患治療への応用も期待される。現在，われわれの研究室では臨床の場における安全でより効率的な治療を目標として，さらに慎重な基礎研究の積み重ねと，動物を用いた前臨床試験を行っている。

文 献

- 1) Asahara T, Murohara T, Sullivan A et al: Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*, 1997, 275: 964–967.
- 2) Asahara T, Masuda H, Takahashi T et al: Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res*, 1999, 85: 221–228.
- 3) Asahara T, Takahashi T, Masuda H et al: VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *EMBO J*,

- 1999, **18**: 3964–3972.
- 4)Takahashi T, Kalka C, Masuda H et al: Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med*, 1999, **5**: 434–438.
- 5)Risau W, Sariola H, Zerwes HG et al: Vasculogenesis and angiogenesis in embryonic-stem-cell-derived embryoid bodies. *Development*, 1988, **102**: 471–478.
- 6)Folkman J, Klagsbrun M: Angiogenic factors. *Science*, 1987, **235**: 442–447.
- 7)Kalka C, Masuda H, Takahashi T et al: Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97**: 3422–3427.
- 8)Murohara T, Ikeda H, Duan J et al: Transplanted cord blood-derived endothelial precursor cells augment postnatal neovascularization. *J Clin Invest*, 2000, **105**: 1527–1536.
- 9)Kawamoto A, Gwon HC, Iwaguro H et al: Therapeutic potential of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia. *Circulation*, 2001, **103**: 634–637.
- 10)Kawamoto A, Tkebuchava T, Yamaguchi J et al: Intramyocardial transplantation of autologous endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization of myocardial ischemia. *Circulation*, 2003, **107**: 461–468.
- 11)Iwaguro H, Yamaguchi J, Kalka C et al: Endothelial progenitor cell vascular endothelial growth factor gene transfer for vascular regeneration. *Circulation*, 2002, **105**: 732–738.
- 12)Murasawa S, Llevadot J, Silver M et al: Constitutive human telomerase reverse transcriptase expression enhances regenerative properties of endothelial progenitor cells. *Circulation*, 2002, **106**: 1133–1139.
- 13)Stamm C, Westphal B, Kleine HD et al: Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. *Lancet*, 2003, **361**: 45–46.
- 14)Assmus B, Schachinger V, Teupe C et al: Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation*, 2002, **106**: 3009–3017.

Transplantation of Endothelial Progenitor Cells for Therapeutic Vasculogenesis

Atsuhiko Kawamoto,^{1,2} and Takayuki Asahara^{1,2,3}

¹Department of Regenerative Medicine, Kobe Institute of Biomedical Research and Innovation, Hyogo, Japan

²Laboratory for Stem Cell Translational Research, RIKEN Kobe Institute Center for Developmental Biology, Hyogo, Japan

³Department of Regenerative Medicine Science, Tokai University School of Medicine, Kanagawa, Japan

Key words: endothelial progenitor cell, cell therapy, vasculogenesis, critical limb ischemia, coronary artery disease

Bone marrow-derived endothelial progenitor cells (EPCs) are capable of incorporating into foci of postnatal neovascularization and differentiating into mature endothelial cells. Transplanted EPCs reconstitute the organ system by generating vasculogenesis as shown in myocardial and limb ischemia models. Now, researchers focus on utilizing this strategy in phase I/II clinical trials.

Considering the importance of vascular development in the process of organogenesis, vasculogenesis by EPCs may represent an essential cascade for tissue/organ regeneration following pathological damages in various critical diseases. The exciting achievement may also open the way to advancement in vasculogenesis therapy for various somatic stem cell transplantation.

(J Jpn Coll Angiol, 2005, **45**: 131–135)