

末梢血単核球移植による血管新生の機序

南野 徹 舘野 馨 小室 一成

要 旨：われわれは、これまでに末梢血単核球の有用性について基礎的な検討を行い、末梢血単核球を用いたヒト重症末梢性動脈疾患に対する血管再生治療の臨床研究を開始した。これまでに40数例に対して本治療を行い、70%以上の症例に有用性を認めた。レスポonderとノンレスポonderとの臨床データの比較をもとにした基礎的研究から、その治療効果は末梢血単核球移植により惹起される虚血骨格筋組織における血管増殖因子の産生によることが明らかとなりつつある。(J Jpn Coll Angiol, 2006, 46: 255-263)

Key words: endothelial progenitor cells, angiogenic factors, muscle cells

はじめに

循環器領域の医薬が近年急速な進歩を遂げているにもかかわらず、先進諸国における死因のトップは依然として心血管病である。現在の治療では救い得ない多数の重症患者が存在し、その多くが虚血性疾患である現状で提唱された、治療的血管新生therapeutic angiogenesisに非常に大きな期待が寄せられていることは改めて述べるまでもない。その治療法の開発には次に述べるような成人期における血管形成のメカニズムを解明した基礎的な研究が不可欠であった。

成人期の血管形成のメカニズム

成人期の血管形成にはこれまでangiogenesisとarteriogenesisの関与が知られていた^{1,2)}。angiogenesisはもともと存在している毛細血管が伸長することによって新たな毛細血管網を形成する過程であり、血管内皮増殖因子(vascular endothelial growth factor: VEGF)や線維芽細胞増殖因子(fibroblast growth factor: FGF)等さまざまな血管増殖因子によって協調的に調節されている。arteriogenesisはいわゆる血管造影上認められる小動脈の側副血行路の形成を意味する。動脈の閉塞に伴いもともと存在する小動脈への血流が増加し、メカニカルストレスが加わることによってarteriogenesisは促進さ

れる。

以上のような血管形成のメカニズムの解明によって、それらの因子を用いた血管新生治療の開発が展開することとなった。therapeutic angiogenesis最初の試みは、血管増殖因子を用いた組換えタンパク質治療ならびに遺伝子治療であった。1994年、米国タフツ大学で閉塞性動脈硬化症(atherosclerosis obliterans: ASO)患者に対するVEGF165遺伝子治療が臨床応用されて以来、VEGF・FGF等を用いたphase I, phase II試験が数多く行われた。しかしプラセボコントロール試験で十分な効果を立証できないケースがほとんどで、その反省として使用する因子の組み合わせや、安全かつ効率的・持続的なデリバリー方法が重要であるとの認識が広まってきた³⁾。

細胞治療による血管新生

1997~98年、いくつかの研究グループより新しい血管形成の概念が提唱された^{4,5)}。それは末梢血中に骨髓由来の血管内皮前駆細胞が存在し、成体においても胎児期同様に血管の分化形成、すなわちvasculogenesisが起こるというものである。初期の研究では、血管内皮前駆細胞は末梢血単核球をファイブロネクチンコートした培養皿に培養すると接着する細胞群に存在し、その表面マーカーとしてCD34(幹細胞のマーカー)、TIE2

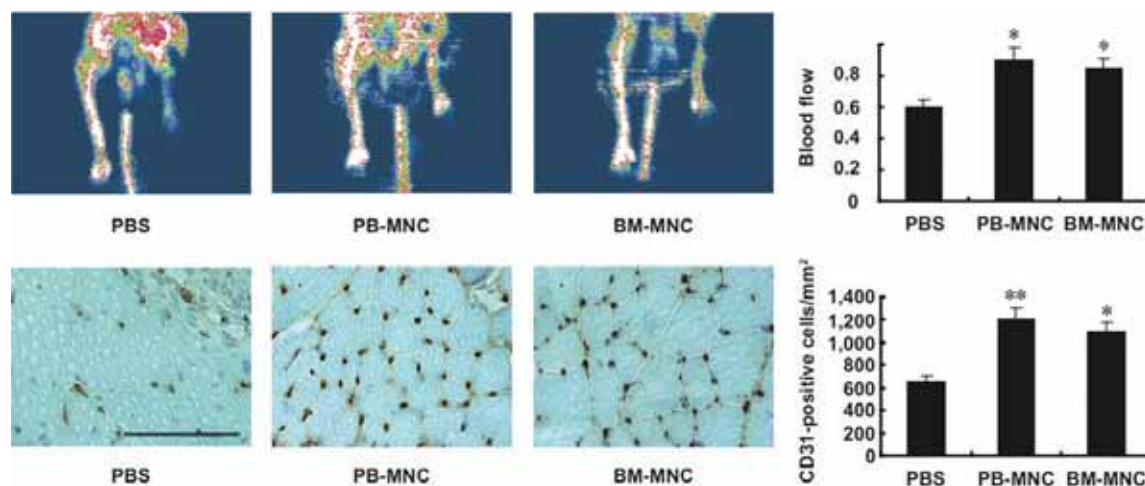


Figure 1 Effects of implanting peripheral blood mononuclear cells (PB-MNC).

A: Limb perfusion measured by a laser Doppler analyser at 2 weeks after treatment (upper photographs). The graph shows the ratio of ischemic limb (left) to nonischemic limb (right) blood flow. Data are shown as mean \pm SEM. Scale bar: 100 μ m, *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, versus PBS-treated group ($n = 8$).

B: Immunohistochemistry for CD31 (lower photographs, brown) in ischemic limbs at 2 weeks after treatment with PBS, PB-MNC, or bone marrow (BM)-MNC. The number of CD31-positive cells per square millimetre is shown. Data are shown as mean \pm SEM.

Scale bar: 100 μ m, *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, versus PBS-treated group ($n = 8$).

やVEGFレセプター α (血管内皮細胞のマーカー)などが重要であるとされた。その後も血管内皮前駆細胞についての研究は全世界で精力的に行われ、その結果、黄体形成などの生理的血管形成だけではなく、腫瘍血管形成や心筋梗塞などの虚血に対する血管形成、創傷治癒過程における血管形成などの病態に対しても血管内皮前駆細胞による血管形成が関与していることが明らかとなった。さらに動物を用いた虚血モデルにおいては、血管内皮前駆細胞を患部に直接移植する方法や、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によって血管内皮前駆細胞を骨髄より動員させる方法などによって、血管形成を誘導し病態を改善し得ることが多くのグループから報告された。さらに最近では、血管内皮前駆細胞が動脈血管内皮傷害部の修復にも大きく関与しており、動脈硬化の進展抑制効果もあるのではないかと考えられるようになった⁶⁾。これらの基礎研究をもとにヒト虚血性心血管疾患に対する細胞治療 (cell therapy) が、主にアジアとヨーロッパで盛んに行われ、その有効性が報告されている⁷⁻⁹⁾。

現在行われている多くのトランスレーショナルリサーチの問題点として、その作用メカニズムを十分解

明せずに大規模トライアルが進められていることが挙げられる。たとえば、血管内皮前駆細胞の定義についても多くの疑問が解決していない。血管内皮前駆細胞がどのような細胞群から由来するのか？ そのマーカーとして用いられているCD34やFlk-1は妥当なのか？

血管内皮前駆細胞は初期にはファイブロンネクチンに接着する細胞群の一部とされていたが、通常未熟な細胞の接着性は低いので、それらは逆に成熟した細胞 (血管壁からはがれた細胞) ではないのか？ 血管内皮前駆細胞や単核球の移植により血管新生が促進される機序について、最近の研究では、初期に報告されたように移植された細胞が高率に血管細胞に分化するのではなく、むしろ移植細胞から分泌される血管増殖因子が重要であるとするものが多い。しかし、移植された細胞がその部位にとどまるのは極めて短時間であることから、移植細胞が血管増殖因子の主要なソースと考えるのは困難である。

末梢血単核球を用いた血管新生治療

(1) 末梢血単核球移植の有効性の確認

このような中、われわれは独自に末梢血単核球を用いた血管新生治療 (サイトカイン非使用) について基礎

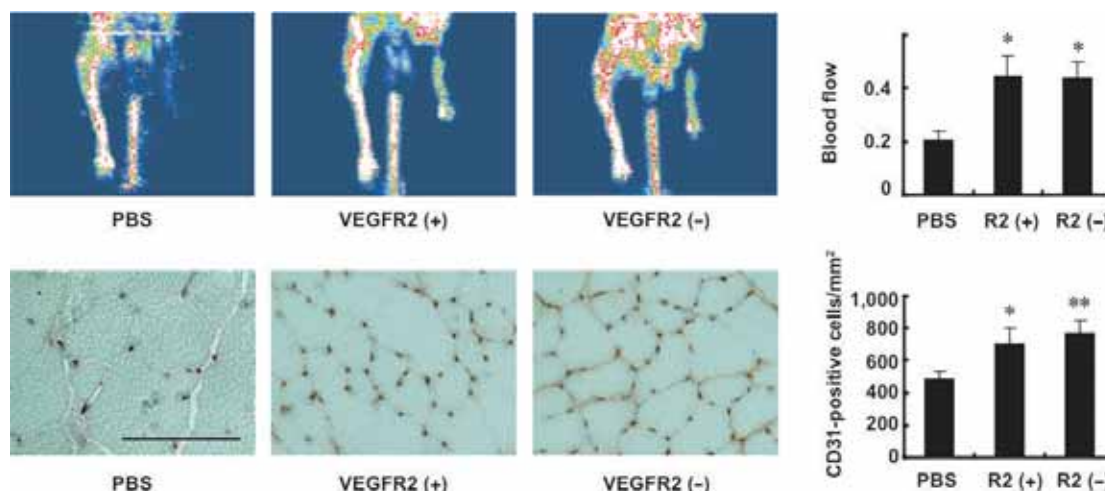


Figure 2 Depletion of VEGF receptor 2 (VEGFR2)-positive mononuclear cells did not affect the ability of implanted cells to promote an increase in perfusion (A) and capillary density (B) at 1 week after implantation. Data are shown as mean \pm SEM. Scale bar: 100 μ m, R2(-): VEGFR2-depleted mononuclear cells, R2 (+): control mononuclear cells, *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, versus PBS-treated group ($n = 8$).

研究を重ねてきた。その結果、単核球は高度な血管新生効果を持つこと、その効果は骨髄由来の単核球と比較して、優るとも劣らないことを見出した (Fig. 1)¹⁰。サイトカインを使用せず回収された末梢血単核球には幹細胞が非常に少ないにもかかわらずこれだけの効果が得られたことや、幹細胞を除いた骨髄単核球でも同様の血管新生作用があることを示すデータも得られたことから (Fig. 2)、血管新生治療に幹細胞が関与するメカニズムは必ずしも必須ではないとわれわれは考えている。事実その後も、骨髄単核球移植による血管新生治療効果の大半は単核球から分泌される血管増殖因子によるものであるとの報告や骨髄単核球からの血管へ分化する頻度は極めて低いとの報告が相次いでおり、われわれの考えをさらに裏付けしている¹¹⁻¹⁴。

末梢血単核球の採取法と安全性はすでに確立しており、骨髄細胞移植で危惧されているような異所性分化の心配も極めて低い。さらに骨髄細胞移植では、高度な心血管病変を有する患者に対して、全身麻酔を行うリスクを負う必要がある。以上を考慮のうえ、われわれは十分な血管新生効果がより安全に期待できる、自家末梢血単核球移植を臨床応用する方針とし、本学倫理委員会承認のもと、重症末梢性動脈疾患を対象とし

た臨床研究を2002年7月より開始した。

(2) 臨床成績

以後これまでに40例以上に対して本治療を行っている。適応は既存の治療法では改善の見込みない重症下肢虚血患者とし、除外項目として増殖型糖尿病性網膜症、悪性新生物を設けた。登録された全症例において難治性皮膚潰瘍や激しい安静時疼痛が認められ、7割以上が前医で下肢切断が必要と診断されていた。1年以上フォローを完了した症例の平均年齢は61.8歳、臨床診断は65.5%が閉塞性動脈硬化症、残りがバージャー病であった。約半数が血液透析患者で、80%以上の症例が複数の冠動脈リスクファクターを持っていた。われわれは連続成分採血により、これらの患者から単核球細胞 $1 \sim 2 \times 10^{10}$ 個と若干の血小板成分を採取し、虚血患肢へ筋注により移植している (Fig. 3)。プロトコル上移植は2回行っており、施行前と施行後2カ月、6カ月、1年後にFig. 4に示すような項目について検討し、自覚症状の評価、潰瘍の改善度、血流の改善度、合併症の評価を行っている。その結果、移植後2カ月目ですでに効果がみられ、6カ月目の時点では、さらに有意な安静時疼痛の改善、歩行距離の延長が認



Figure 3 Implantation of PB-MNC into human ischemic limb.

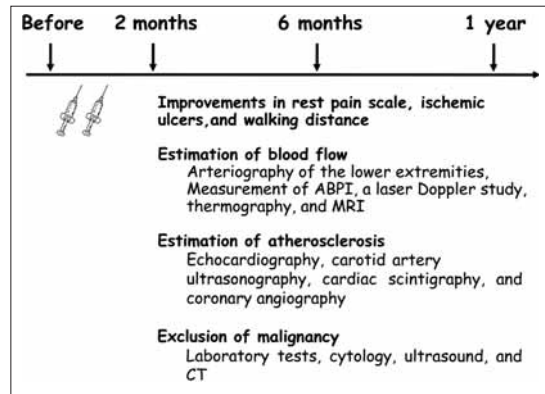


Figure 4 Protocol of the study.

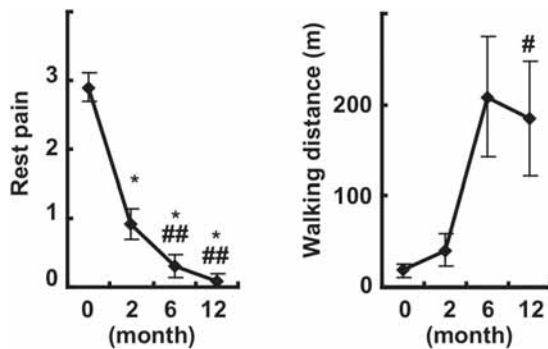


Figure 5 Changes in the rest pain scale after implantation of PB-MNC (A). Improvement of the maximum walking distance after implantation (B). Data are shown as mean ± SEM. *: $p < 0.001$ versus 0 month, #: $p < 0.05$, ##: $p < 0.001$, versus 2 months ($n = 29$).



Figure 6 Ischemic ulcers before and after treatment.

められた (Fig. 5)。その効果は少なくとも1年後の時点でも持続していた。安静時疼痛の改善は84.0%、皮膚潰瘍の改善は66.7%において認められた (Fig. 6)。前医で下肢切断が必要と診断されていた症例においての救肢率は85.7%であったが、全体では大切断に至った症例も年間10.3%の割合でみられた。重症下肢虚血の大切断率 (1年間) は約30~50%とされていることから、本治療の切断回避に対する有効性が示唆された。本研究の治療群での1年生存率は89.6%であったが、死亡原因は本治療と因果関係のない呼吸不全や腎不全であった。また重症下肢虚血を持つ患者の生存率は75%程度と報告されていることから、本治療が生存率を低

下させることはないと考えられた。以上のように、得られた臨床効果はわれわれの予想を上回るものであった。末梢血単核球移植は骨髓単核球移植と比較し著しく臨床効果が劣るとするデータもあるが、われわれの採血内容や移植プロトコールとは大きな開きがあり、この点が効果の違いになっているものと推測される。

周術期合併症として、フォロー中に痛風発作を2例、抗凝固剤服用患者での筋肉内出血を1例認めたものの、いずれも軽症であった。このほか脳梗塞発症が1例、既存の冠動脈病変が軽度進行した例が3例あったが、本治療法との明確な因果関係は不詳であった。われわれは本治療により動脈硬化病変が悪化する可能

Table Clinical response and patient background

| | Non-responders (n = 8) | Responders (n = 21) | P |
|-----------------------------|---------------------------|------------------------|-------|
| Age | 60.6 ± 11.7 | 62.3 ± 11.3 | n.s. |
| Gender | | | |
| Male | 7 (87.5%) | 17 (81.0%) | n.s. |
| Female | 1 (12.5%) | 4 (19.0%) | |
| Diagnosis | | | |
| ASO | 6 (75.0%) | 13 (61.9%) | n.s. |
| TAO | 2 (25.0%) | 8 (38.1%) | |
| Ischemic status | | | |
| Fontaine 3 | 1 (12.5%) | 3 (14.3%) | n.s. |
| Fontaine 4 | 7 (87.5%) | 18 (85.7%) | n.s. |
| Previous revascularization | 3 (37.5%) | 5 (23.8%) | n.s. |
| Duration of illness (month) | 19.6 ± 24.0 | 52.1 ± 55.8 | n.s. |
| ABPI | 0.85 ± 0.20 | 0.77 ± 0.28 | n.s. |
| Rest pain scale | 2.90 ± 1.40 | 2.90 ± 1.00 | n.s. |
| Need for major amputation | 7 (87.5%) | 14 (66.7%) | n.s. |
| Complications | | | |
| CRF on HD | 4 (50.0%) | 10 (47.6%) | n.s. |
| CAD | 4 (50.0%) | 9 (42.9%) | n.s. |
| LVEF (%) | 48.1 ± 28.4 | 48.2 ± 28.1 | n.s. |
| CVD | 3 (37.5%) | 5 (23.8%) | n.s. |
| Diabetes | 6 (75.0%) | 10 (47.6%) | n.s. |
| Hyperlipidemia | 4 (50.0%) | 12 (57.1%) | n.s. |
| Hypertension | 4 (50.0%) | 9 (42.9%) | n.s. |
| MBP (mmHg) | 81.0 ± 34.1 | 86.8 ± 31.9 | n.s. |
| Laboratory data | | | |
| FBS (mg/dL) | 139.6 ± 45.1 | 133.2 ± 49.3 | n.s. |
| HbA1c (%) | 5.6 ± 0.9 | 5.8 ± 0.9 | n.s. |
| T-Cho (mg/dL) | 169.8 ± 33.2 | 184.6 ± 37.2 | n.s. |
| LDL-Cho (mg/dL) | 105.6 ± 24.6 | 114.8 ± 32.7 | n.s. |
| HDL-Cho (mg/dL) | 43.9 ± 10.0 | 49.7 ± 10.7 | n.s. |
| Peak CRP (mg/dl) | 2.9 ± 3.8 | 5.4 ± 11.0 | 0.018 |

Data are shown as mean ± SD or the number of patients (%).

ASO: arteriosclerosis obliterans, TAO: thromboangiitis obliterans, ABPI: ankle-brachial blood pressure index, CRF: chronic renal failure, HD: haemodialysis, CAD: coronary artery disease, LVEF: left ventricular ejection fraction, CVD: cerebrovascular disease, MBP: mean blood pressure, FBS: fasting blood sugar, T-Cho: total cholesterol, LDL: low density lipoprotein, HDL: high density lipoprotein, CRP: C-reactive protein
Patients with osteomyelitis were excluded for analysis of CRP data.

性に十分配慮する必要があると考えており、全症例において、冠動脈造影検査・頸動脈エコーをフォローしている。しかし特に危惧されていた冠動脈疾患の急性増悪や新規発症は認められず、心筋SPECT(single photon emission CT)による評価にて、むしろ全体では血流

低下領域の縮小がみられることが明らかとなった。

(3) 臨床データの検討

われわれは本治療の効果を検証し、そのメカニズムを考察するために、レスポナーとノンレスポナー

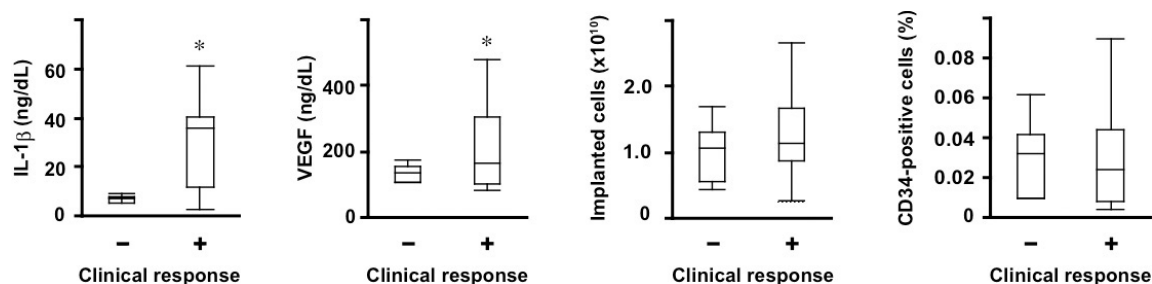


Figure 7 Factors associated with the response to treatment.

Results are shown as box plots representing median, 25th and 75th percentiles as boxes and the range of data as bars.

*: $p < 0.05$, versus non-responders (responders: $n = 21$, non-responders: $n = 8$).

の臨床データの比較を行っている (Table)。本治療の効果は、透析症例、冠動脈疾患や糖尿病などの合併症例でわずかに低下した。細胞移植に伴い血中のCRP (C-reactive protein) が上昇することは早くから観察されていたが、このCRPの上昇や、炎症性サイトカインであるIL-1βやVEGF値の上昇が、臨床効果と有意に関連することが明らかとなった (Fig. 7)。それに対して、移植細胞成分中の幹細胞数は極めて少数であり、しかも臨床効果との相関は全く認められなかった (Fig. 7)。これらのデータは、幹細胞は必須ではなく、単核球移植により惹起される血管増殖因子の産生が重要であることを示唆するものである。

末梢血単核球移植による血管新生の機序

(1) 虚血肢における血管増殖因子の発現亢進の重要性

これらの臨床データより、当初われわれは、本治療の作用機序として、単核球より分泌される血管増殖因子の重要性に注目した。特に臨床効果と最も相関のあったIL-1βは強力な血管増殖因子として知られており、VEGFの発現も誘導することから、その重要性についてIL-1β欠損マウスを用いて解析を行うこととした¹⁵⁾。まず野生型のマウスに虚血肢を作成し、野生型の単核球を移植すると、PBS (phosphate-buffered solution) 液と群より血流や血管数の増加がみられた (Fig. 8A, B)。予想に反して、IL-1β欠損マウスから得られた単核球を移植すると、野生型とほぼ同等の効果がみられた。これに対して、IL-1β欠損マウスの虚血肢に野生型の単核球を移植しても全く効果が得られなかったことから、ドナー側ではなく、レシピエント側のIL-1βの発現が重要であることが明らかとなった。これらの結果に一致し

て、野生型マウスの移植後の虚血肢における血管増殖因子の発現亢進は、野生型とIL-1β欠損の単核球でほぼ同等にみられたが、IL-1β欠損マウスの虚血肢ではみられなかった (Fig. 8C, D)。すなわち、IL-1βの分泌は移植細胞ではなく、移植された虚血肢であるということになる。虚血肢には骨髄由来細胞の浸潤がみられるため、それらがIL-1βのソースとなっている可能性がある。そこで、骨髄をIL-1β欠損マウスのものと置き換えた野生型キメラマウスと骨髄を野生型に置き換えたIL-1β欠損マウスを作成した。それらのマウスに虚血肢を作成し、IL-1βの欠損した単核球を移植したところ、移植による血管増殖因子の発現誘導とそれに伴う血管新生の促進は、前者のキメラマウスで認められたが、後者のマウスではみられなかった (Fig. 8E~G)。以上より、移植後の血管増殖因子の発現誘導には浸潤した骨髄由来細胞の関与は小さいものと考えられた。

(2) 骨格筋より分泌される血管増殖因子の重要性

次に、IL-1βの発現細胞を調べるために免疫染色を行ったところ、骨格筋が主要な発現細胞であることがわかった (Fig. 9A)。in situハイブリダイゼーションによる解析でも同様の結果が得られた (Fig. 9B)。培養骨格筋細胞と単核球を共培養すると、骨格筋における血管増殖因子の発現亢進がみられたことから、単核球移植は、虚血肢の骨格筋細胞における血管増殖因子の発現を亢進させる作用があるものと考えられた (Fig. 9C)。IL-1β欠損マウスの虚血肢においては、単核球移植による血流改善効果はみられないが、IL-1βの投与を単核球移植と併用することによって、血流改善効果を認めた (Fig. 9D)。しかし、野生型マウスの虚血肢にIL-1βのみ

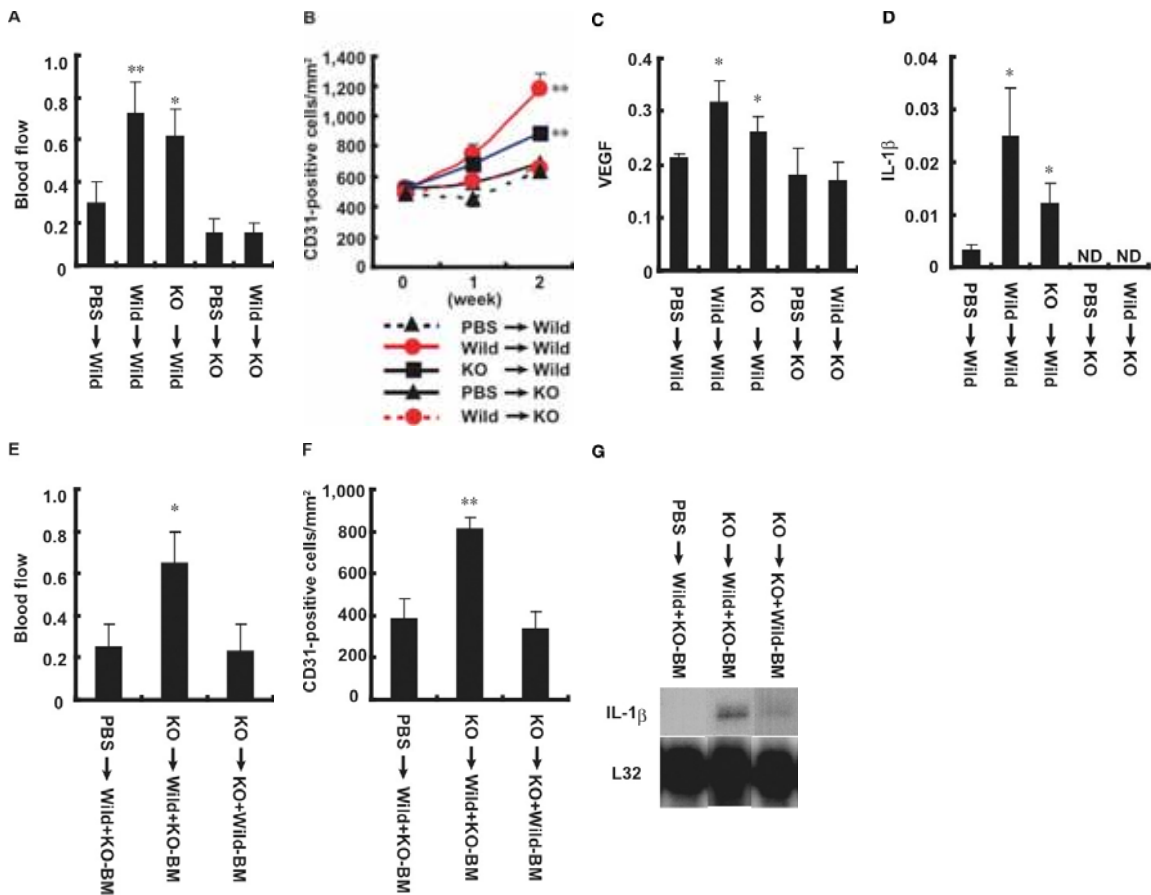


Figure 8 Impairment of PB-MNC-induced neovascularization in IL-1 β -deficient mice. A: The graph shows relative blood flow in the ischemic limbs of wild-type mice treated with PBS (PBS → Wild), wild-type PB-MNC (Wild → Wild), or IL-1 β -deficient PB-MNC (KO → Wild) and the limbs of IL-1 β -deficient mice treated with PBS (PBS → KO) or wild-type PB-MNC (Wild → KO). B: Immunohistochemistry for CD31 in ischemic limbs. C: Expression of VEGF in ischemic limbs of the same mice at 1 week after treatment was analysed by the ribonuclease protection assay (RPA). Relative expression to that of L32 (the internal control) is shown. D: Expression of IL-1 β in ischemic limbs of the same mice at 1 week after implantation was analysed by RPA and relative expression to that of L32 is shown. Data are shown as mean \pm SEM. ND: not detected, *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, versus PBS → Wild ($n = 5$). E, F and G: The graph shows blood flow (E), capillary density (F) and expression of IL-1 β (G) in the ischemic limbs of wild-type mice with IL-1 β -deficient bone marrow treated with PBS (PBS → Wild + KO-BM) or IL-1 β -deficient PB-MNC (KO → Wild + KO-BM) and the limbs of IL-1 β -deficient mice with wild-type bone marrow treated with IL-1 β -deficient PB-MNC (KO → KO + Wild-BM). Data are shown as mean \pm SEM. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, versus PBS → Wild + KO-BM ($n = 5$).

を投与しても血流の改善はみられないことから，単核球の骨格筋細胞に対する直接作用が重要であると考えられた。さらに最近われわれは，これらの血管増殖因子が単核球から分泌されるのではなく移植部位の虚血肢の筋組織，特に再生されつつある筋線維から産生されることが本治療の本質であることを明らかにしている。すなわち，末梢血単核球移植によって虚血肢の筋

組織の再生が起こり，その再生過程において筋組織が分泌する血管増殖因子が持続的に虚血肢に作用し，血管再生を誘導することによって筋組織の再構築を促進しているわけである。このようなメカニズムによって，一過性にしか作用しないはずの移植された単核球が1年以上にわたってその効果を発揮し得るのかもしれない。

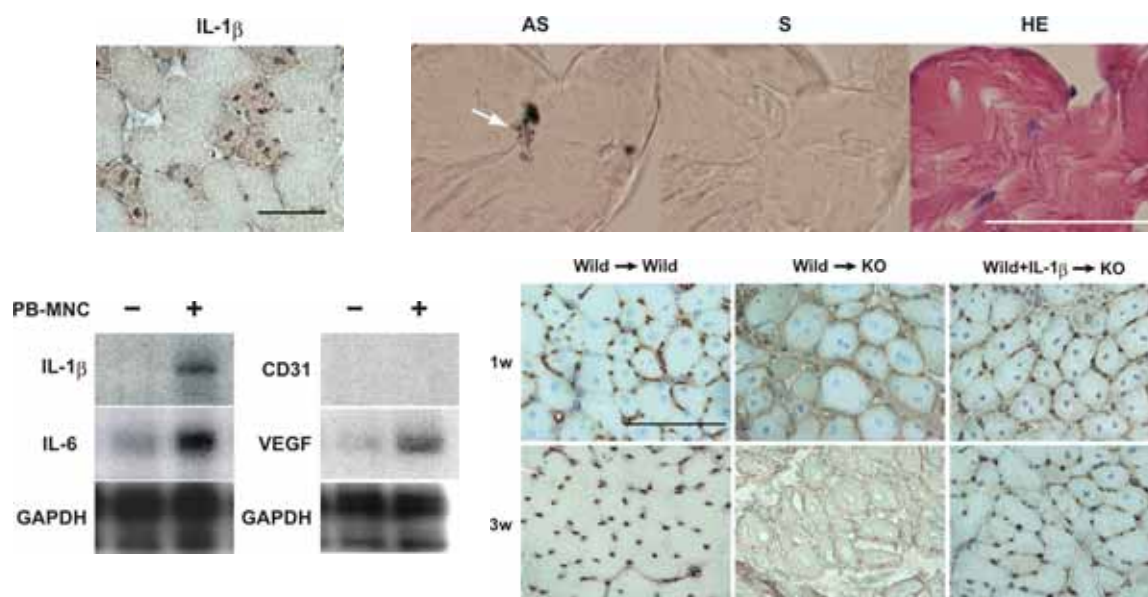


Figure 9 Mononuclear cell implantation increases the production of angiogenic factors by muscle cells.

A: Immunohistochemistry for IL-1β (brown) in ischemic limbs at 5 days after implantation.

Scale bar: 50μm.

B: *In situ* hybridization for IL-1β (arrow) in ischemic limbs at 5 days after implantation.

AS: antisense probe, S: sense probe, HE: hematoxylin eosin staining

C: C2C12 cells were cultured under differentiating conditions with or without PB-MNC (2.5×10^5 cells/ml) for 24 hours and expression of angiogenic cytokines was examined by RPA. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was used as the control.

D: Immunohistochemistry for CD31 in the ischemic limbs of wild-type mice treated with wild-type PB-MNC (Wild → Wild) and the limbs of IL-1β-deficient mice treated with wild-type PB-MNC (Wild → KO), or wild-type PB-MNC plus IL-1β (Wild + IL-1β → KO) at 1 week (upper) and 3 weeks (lower) after implantation.

Scale bar: 100μm.

| | |
|---|---|
| A | B |
| C | D |

おわりに

多くのサイトカイン、たとえばG-CSF、エリスロポエチン、VEGF、あるいはスタチンなどの薬剤が血管内皮前駆細胞の動員に関与し、血管新生を促進するという報告がある。特にG-CSFについては心筋細胞の再生をも期待してすでに臨床研究が始まっているが、その作用機序についてはこれまで十分に研究されていなかった。それに対してわれわれは、G-CSFの作用機序について、遺伝子改変マウスに急性心筋梗塞モデルを作成し検討した結果、G-CSFの効果は、心筋細胞に存在するG-CSF受容体とその下流のJak/Statシグナル経路を介して細胞死抑制タンパクや血管増殖因子の発現亢進をもたらし、心筋細胞を保護していることを明らかにした¹⁶⁾。つまり、G-CSFの幹細胞動員作用は心筋再生・血管新生にはほとんど関与していないということが明らかになったのである。G-CSFの作用機序は、今

回明らかになりつつある末梢血単核球移植の機序と似ている点があり興味深い。今後も、基礎研究から臨床応用を進めるだけでなく、臨床データを基礎研究にフィードバックさせることで、その作用メカニズムの解明を深め、一層効果の高い治療法を開発することが必要であると考えられる。

文 献

- 1) Cleaver O, Melton DA: Endothelial signaling during development. *Nat Med*, 2003, 9: 661–668.
- 2) Jain RK: Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med*, 2003, 9: 685–693.
- 3) Yla-Herttuala S, Alitalo K: Gene transfer as a tool to induce therapeutic vascular growth. *Nat Med*, 2003, 9: 694–701.
- 4) Asahara T, Murohara T, Sullivan A et al: Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*, 1997, 275: 964–967.

- 5 Shi Q, Rafii S, Wu MH et al: Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood*, 1998, **92**: 362–367.
- 6 Rafii S, Lyden D: Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. *Nat Med*, 2003, **9**: 702–712.
- 7 Losordo DW, Dimmeler S: Therapeutic angiogenesis and vasculogenesis for ischemic disease: part II: cell-based therapies. *Circulation*, 2004, **109**: 2692–2697.
- 8 Simons M: Angiogenesis: where do we stand now? *Circulation*, 2005, **111**: 1556–1566.
- 9 Tateno K, Minamino T, Miyauchi H et al: Application of hematopoietic cells to therapeutic angiogenesis. *Curr Pharm Des*, 2006, **12**: 557–563.
- 10 Minamino T, Toko H, Tateno K et al: Peripheral-blood or bone-marrow mononuclear cells for therapeutic angiogenesis? *Lancet*, 2002, **360**: 2083–2084.
- 11 Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS et al: Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms. *Circulation*, 2004, **109**: 1543–1549.
- 12 Ziegelhoeffer T, Fernandez B, Kostin S et al: Bone marrow-derived cells do not incorporate into the adult growing vasculature. *Circ Res*, 2004, **94**: 230–238.
- 13 Rehman J, Li J, Orschell CM et al: Peripheral blood “endothelial progenitor cells” are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors. *Circulation*, 2003, **107**: 1164–1169.
- 14 Jackson KA, Majka SM, Wang H et al: Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest*, 2001, **107**: 1395–1402.
- 15 Tateno K, Minamino T, Toko H et al: Critical roles of muscle-secreted angiogenic factors in therapeutic neovascularization. *Circ Res*, 2006, **98**: 1194–1202.
- 16 Harada M, Qin Y, Takano H et al: G-CSF prevents cardiac remodeling after myocardial infarction by activating the Jak-Stat pathway in cardiomyocytes. *Nat Med*, 2005, **11**: 305–311.

Implantation of Peripheral Mononuclear Cells: Investigation into Mechanisms of Therapeutic Neovascularization

Tohru Minamino, Kaoru Tateno, and Issei Komuro

Department of Cardiovascular Science and Medicine, Chiba University Graduate School of Medicine, Chiba, Japan

Key words: endothelial progenitor cells, angiogenic factors, muscle cells

We enrolled 29 no-option patients with critical limb ischemia and treated ischemic limbs by implantation of peripheral mononuclear cells. Cell therapy using peripheral mononuclear cells was very effective, and its efficacy was associated with increases in the plasma levels of interleukin-1 β (IL-1 β). Upon an experiment with IL-1 β -deficient mice, a limb ischemia model, we found that implanted cells do not secrete angiogenic factors sufficient enough for neovascularization. Instead, they stimulate muscle cells to produce angiogenic factors, thereby promoting neovascularization in ischemic tissues. Further studies will allow us to develop more effective treatments for ischemic vascular disease.

(J Jpn Coll Angiol, 2006, **46**: 255–263)