

血管内皮前駆細胞を用いた血管再生療法

岩崎 弘登^{*1,*2,*3} 川本 篤彦^{*1,*2} 浅原 孝之^{*1,*2,*4}

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。成体の血液中に存在する血管内皮前駆細胞は、重症虚血部位の血管再生に関与し、液性・細胞性因子の影響で骨髄より強制動員され、再生血管の発達にも寄与している。最近では、この機序を利用することで、下肢虚血や虚血性心疾患の血管再生療法として行われるようになり、臨床において非常に重要な分野となってきている。(J. Jpn. Coll. Angiol., 2004, 44: 139-144)

Key words: Endothelial progenitor cell, Cell therapy, Vasculogenesis, Chronic critical limb ischemia, Myocardial infarction

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作り出している。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(organogenesis)・組織再生(tissue regeneration)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。

1997年、浅原らが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を発見¹⁾して以来、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、今後の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を概説する。

成体におけるEPCの発見と血管形成への関与

1997年、浅原らは成体において骨髄に由来するEPCが末梢血中の単核球成分の一部として循環し、新たに血管が形成される局所に取り込まれ、分化・増殖・遊走し、新規血管の形成に関与することを証明した¹⁾(Fig. 1)。さらに、血管内皮系細胞に特異的な遺伝子である、Flk-1, 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を作製し、虚血・癌・創傷治癒あるいは子宮・卵巣の血管形成を誘発すると、それぞれの組織においてドナー骨髄由来のFlk-1あるいはTie-2を発現している細胞が新たな血管を構成していることが示された^{2,3)}。

この機序は、胎生期のみが存在するとされた血管発生(vasculogenesis)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)⁴⁻⁶⁾とは異なる概念を生み出した(Fig. 2)。つまり“既存血管内皮細胞の再形成”ではなく、“EPCからの発生”のメカニズムによる血管形成も存在することが判明した。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作用によるものと考えられるようになった。

EPCの特性

末梢血中の単核球成分の一部として循環するEPCは、サイトカイン、増殖因子の影響で骨髄より動員される^{7,8)}。EPCは培養過程で一定細胞数以上からなる細

*1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大阪市立大学大学院医学研究科循環器外科学

*4東海大学医学部基盤診療学系再生医療科学

2004年4月1日受理

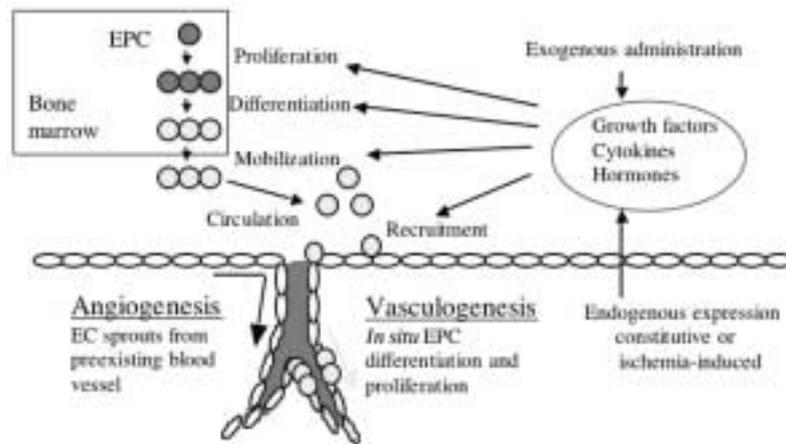


Figure 1 EPC Kinetics. Neovascularization encompasses both angiogenesis and vasculogenesis. Angiogenesis represents the classic paradigm of new vessel growth. Vasculogenesis involves participation of BM-derived EPCs, which circulate the sites of neovascularization where they differentiate *in situ* mature endothelial cells. Growth factors, cytokines, or hormones released endogenously in response to tissue ischemia, or administered exogenously for therapeutic neovascularization, act to promote EPC proliferation, differentiation, and mobilization from to neovascular foci.

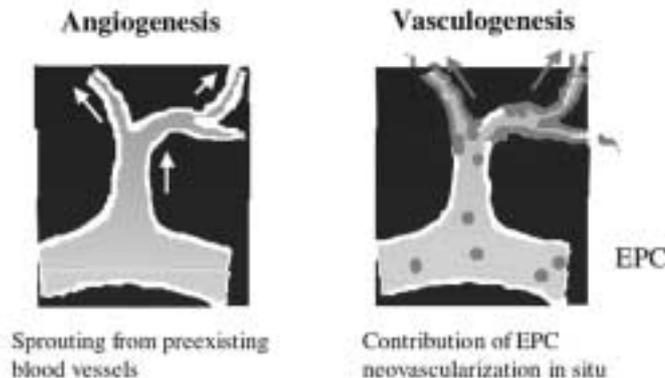


Figure 2 Angiogenesis and vasculogenesis. Angiogenesis is the process that new blood vessels develop by sprouting from preexisting vessels. Vasculogenesis is responsible for the development of the vascular system during embryogenesis. EPCs may be home to the site of neovascularization and differentiate into endothelial cells *in situ*.

胞塊(コロニー)を形成したのち、その辺縁部から紡錘状のフィブロネクチンに付着する細胞として分化し、その後、線状構造をも形成する。EPCは、FACSの解析によりCD34, CD31(PECAM-1), CD133(AC133), Flk-1(VEGFR-2), Tie-2, VE-カドヘリンを発現しており、遅れてFlt-1(VEGFR-1), Tie-1, E-セレクチンが発現することが知られている。

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。免疫不全マウスの下肢虚血モデルにヒトのEPCを投与すると、新生血管の増加がもたらされ、虚血筋肉組織内の血流改善が確認された⁹⁾(Fig. 3)。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

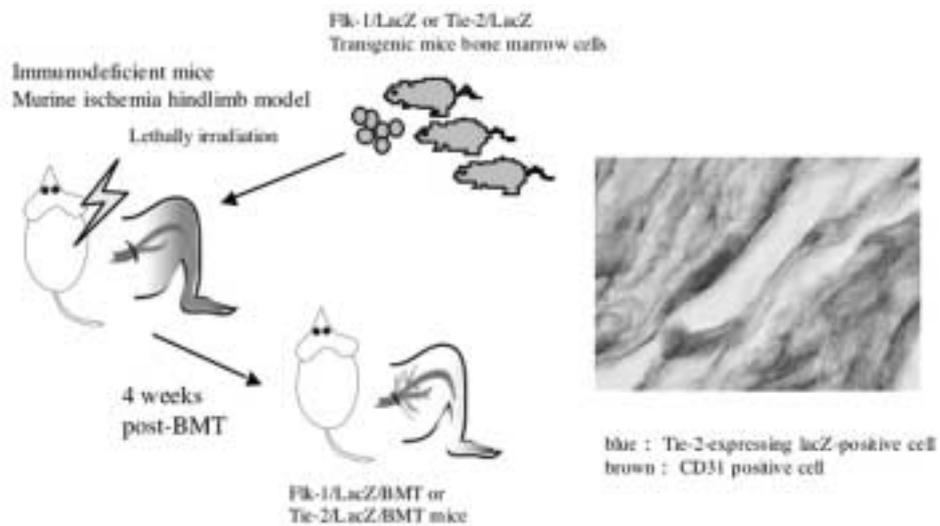


Figure 3 Bone marrow origin of EPCs responsible for postnatal vascularization. Wild type mice were lethally irradiated and transplanted with BM harvested from transgenic mice in which constitutive LacZ expression is regulated by an endothelial cell-specific promoter, Flk-1 or Tie-2. Ischemic muscles following BMT have shown localization of Flk-1 or Tie-2 expression. EPCs has shown to facilitate successful salvage of ischemic limbs and improvement of blood flow.

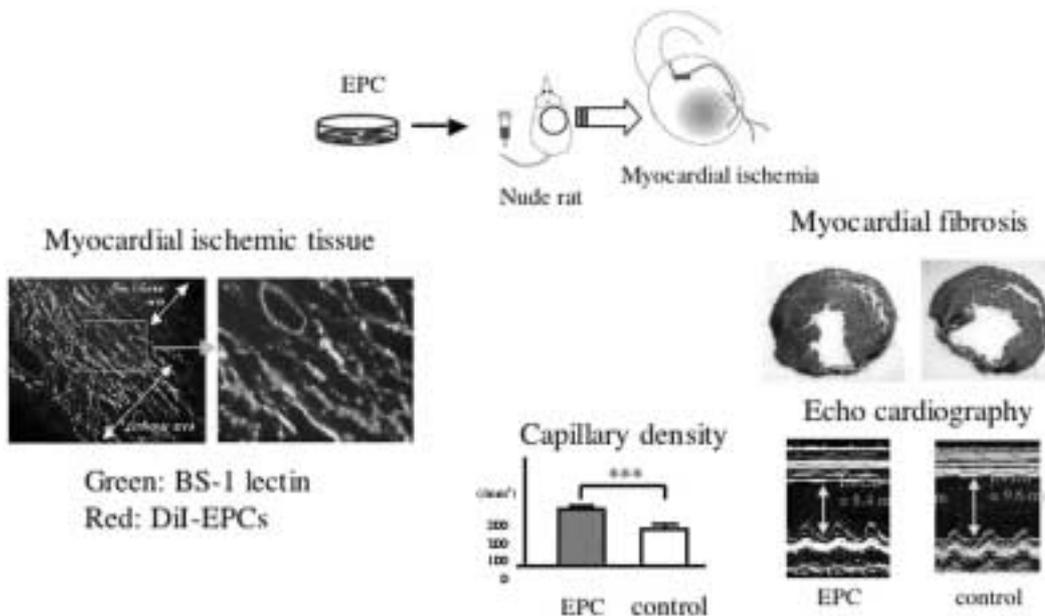


Figure 4 Therapeutic potential of *ex vivo* expanded EPC for myocardial ischemia. *Ex vivo* expanded EPCs incorporate foci and preserve left ventricular function after myocardial ischemia.



Figure 5 Cell transplantation under lumbar anesthesia. Transplantation into only single with severer ischemia. CD34 positive cells (EPCs) were injected into chronic limb ischemia in stem cell translational research laboratory.

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^{10, 11}(Fig. 4)。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再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vascular endothelial growth factor(VEGF)遺伝子をアデノウイルスベクターにて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すると、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¹²。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(TERT)の遺伝子をEPCに導入する方法もある。EPCの分裂寿命の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、apoptosisが抑制され、さらに動物実験において、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¹³。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、癌治療や、さまざまな再生医療の臨床の場において、新たな治療の選択肢となりうる事が考えられる。

EPC移植の臨床試験

当研究室では、2003年11月から慢性重症下肢虚血に対する自家EPC移植による血管再生療法に関する第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、血管形成術や手術の適応にならない重症例である。EPC採取は、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エーシス採取したのちに、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。EPCの投与は腰椎麻酔下に行い、治療効率を高めるため局所投与を行っており、その治療成果を上げている(Fig. 5)。

安全性とその期待

EPCを用いた血管再生療法の最も優れた点は、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)治療侵襲の軽さ、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髓細胞を用いた血管再生療法は、骨髓細胞が多分化能を有している細胞のため、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、全身麻酔などの手術侵襲がある。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が期待される。

おわりに

さまざまな臓器の機能低下を改善する目的で行われる組織幹細胞による器官形成・組織再生過程における血管形成の研究は、再生医学発展の中心的役割を果たす可能性を持っているとともに、必須の戦略になると考えられる。さまざまな幹細胞を用いて臓器再生が試みられているが、移植される幹細胞の生着・分化・機能発現にEPCを用いた血管新生・再生が支持療法として重要になる可能性がある。

現在、われわれの研究室では臨床の場において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) Isner JM, Asahara T: Angiogenesis and vasculogenesis as therapeutic strategies for postnatal neovascularization. *J Clin Invest*, 1999, **103**: 1231–1236.
- 3) 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.

- 4) Folkman J, Klagsbrun M: Angiogenic factors. *Science*, 1987, **235**: 442–447.
- 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) Flamme I, Risau W: Induction of vasculogenesis and hematopoiesis *in vitro*. *Development*, 1992, **116**: 435–439.
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) 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.
- 10) 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.
- 11) 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.
- 12) 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.
- 13) 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.

Endothelial Progenitor Cells for Therapeutic Neovascularization

Hiroto Iwasaki,^{1,2,3} Atsuhiko Kawamoto,^{1,2} and Takayuki Asahara^{1,2,4}

¹Stem Cell Translational Research, Kobe Institute of Biomedical Research

²Innovation/RIKEN Center of Developmental Biology

³Department of Cardiovascular Surgery, Osaka City University Medical School

⁴Department of Regenerative Medicine Science, Tokai University School of Medicine

Key words: Endothelial progenitor cell, Cell therapy, Vasculogenesis, Chronic critical limb ischemia, Myocardial infarction

Recently, many researchers have been investigating the mechanism of organ and tissue regeneration.

Endothelial progenitor cells (EPCs) were identified in adult peripheral blood, which were capable of incorporating into foci of neovascularization and differentiating into mature endothelial cells *in situ*. These findings are consistent with vasculogenesis in embryonic neovascularization. *In vivo*, transplantation of EPCs reconstitutes organ system by enhancing vasculogenesis as shown in myocardial and limb ischemic models. Now, researchers attempt to utilize this strategy for new blood vessel formation in clinical trials.

The availability of EPCs in human has suggested the promising advances in the field of regeneration medicine. This exciting achievement opened a way to clinical application of stem cell therapy. Considering the importance of blood vessel development in the process of organogenesis, vasculogenesis by EPCs may be an essential cascade for tissue and organ regeneration following pathological damages in various critical diseases.

Basic background and clinical application of therapeutic neovascularization by EPC transplantation for tissue/organ regeneration is summarized in this article. (J. Jpn. Coll. Angiol., 2004, **44**: 139–144)