

幹細胞生物学の血管医学への応用

浅原 孝之^{1,2}

要 旨：血管内皮前駆細胞(EPC)は、骨髄由来の血液中に存在する幹細胞で、癌、創傷治癒、虚血あるいは子宮、卵巣の血管形成に血管再生の機序で参加する。その細胞は、サイトカイン/成長因子の影響で骨髄より動員され、血管形成をコントロールしている。EPCの研究は医療応用に大きな可能性を秘めている。本稿では、虚血部位の血管再生療法においてEPCを移植する技術が開発されているので、その知見を紹介する。(J Jpn Coll Angiol, 2007, 47: 477-481)

Key words: endothelial progenitor cell, vasculogenesis, myocardiogenesis, stem cell, ischemic diseases

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一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年に成人抹消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・分化し血管新生に関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る。実際、冠動脈疾患や下肢虚血疾患(パ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すでに開始され、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の量および質が低下し、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後、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。

EPCの発見

1997年に筆者らは、成人の抹消血単核球分画か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(vascular endothelial growth factor)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(fluorescence activated cell sorting)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、成体抹消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(bone marrow transplantation: BMT)モデル(Tie-2/LacZ BMT mouse

¹先端医療センター・理化学研究所神戸研究所幹細胞医療応用研究チーム

²東海大学医学部再生医療科学

2007年8月7日受理

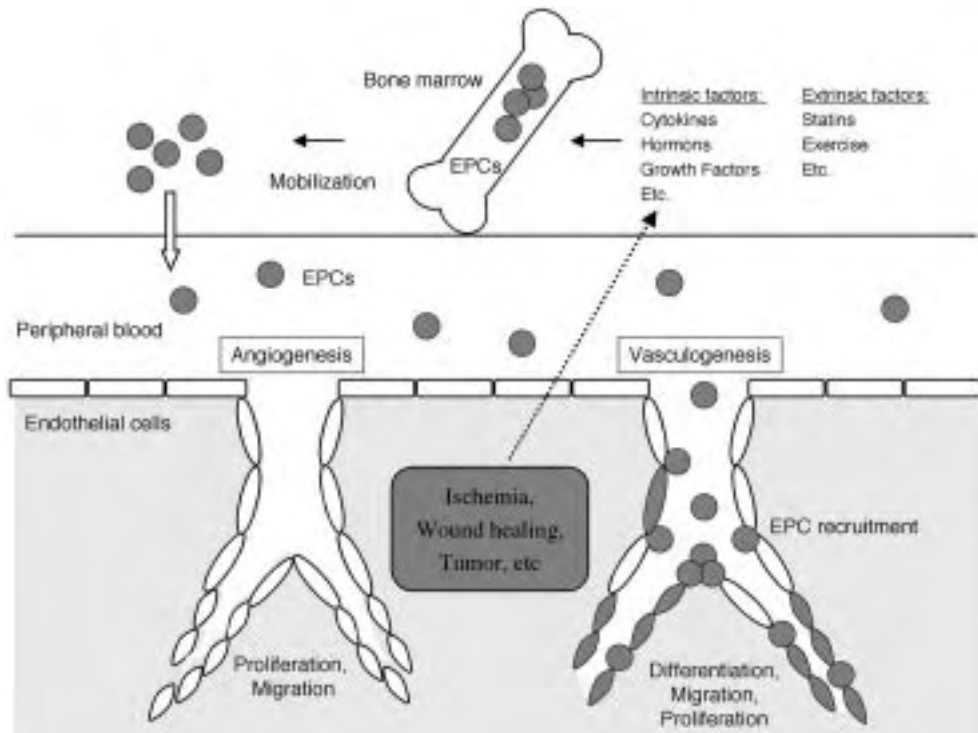


Figure 1 Endothelial progenitor kinetics for vasculogenesis. EPCs are derived from bone marrow and mobilized into peripheral blood, regulated by growth factors, cytokines and hormones. EPCs are recruited into ischemic area and differentiated into blood vessel *in situ*.

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または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は骨髄由来であり末梢血ではCD34⁺細胞として循環しながら存在し、生理的および病的に関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。

EPCの血管形成への関与

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は生体に何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さまざまなサイトカイン/成長因子(例えばVEGF⁴⁾, SDF-1⁵⁾, PDGF-CC⁶⁾, G-CSF⁷⁾, BDNF⁸⁾, PlGF⁹⁾, Angiopoietin-1¹⁰⁾など)やホルモン(estrogen¹¹⁾, erythropoietin¹²⁾)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¹³⁾(Fig. 1)。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。

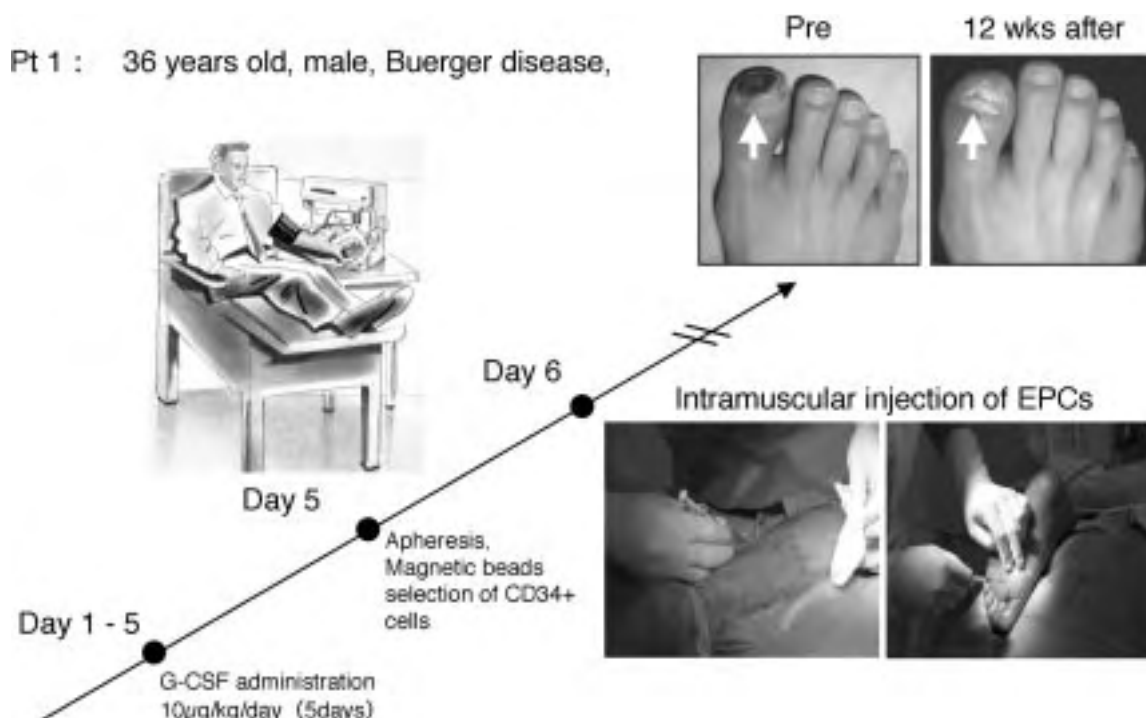


Figure 2 Phase I/II trial of EPC transplantation to chronic peripheral vascular disease patients. After transplantation of CD34⁺ cells, ischemia recovered by enhanced vasculogenesis.

EPC移植による血管再生療法

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パージャ病など)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・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髓から動員された単核球をアフエレーシスで採取した後に、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。

海外では、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 Neovascularization 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。また、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または骨髓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、すでに良好な成績を収めている(Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction: TOPCARE-AMI¹⁷⁾)。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。

おわりに

EPCの特性および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が持つさまざまな特徴・機能を生かしたこれらの治療戦略は、これから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可能性を秘めている。今後も緻密な基礎研究およ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。

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) Folkman J, Klagsbrun M: Angiogenic factors. *Science*, 1987, **235**: 442–447.
- 4) 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.
- 5) Yamaguchi J, Kusano KF, Masuo O et al: Stromal cell-derived factor-1 effects on *ex vivo* expanded endothelial progenitor cell recruitment for ischemic neovascularization. *Circulation*, 2003, **107**: 1322–1328.
- 6) Li X, Tjwa M, Moons L et al: Revascularization of ischemic tissues by PDGF-CC via effects on endothelial cells and their progenitors. *J Clin Invest*, 2005, **115**: 118–127.
- 7) Powell TM, Paul JD, Hill JM et al: Granulocyte colony-stimulating factor mobilizes functional endothelial progenitor cells in patients with coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, **25**: 296–301.
- 8) Kermani P, Rafii D, Jin DK et al: Neurotrophins promote revascularization by local recruitment of TrkB+ endothelial cells and systemic mobilization of hematopoietic progenitors. *J Clin Invest*, 2005, **115**: 653–663.
- 9) Hattori K, Heissig B, Wu Y et al: Placental growth factor reconstitutes hematopoiesis by recruiting VEGFR1(+) stem cells from bone-marrow microenvironment. *Nat Med*, 2002, **8**: 841–849.
- 10) Hattori K, Dias S, Heissig B et al: Vascular endothelial growth factor and angiotensin-1 stimulate postnatal hematopoiesis by recruitment of vasculogenic and hematopoietic stem cells. *J Exp Med*, 2001, **193**: 1005–1014.
- 11) Iwakura A, Luedemann C, Shastri S et al: Estrogen-mediated, endothelial nitric oxide synthase-dependent mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells contributes to reendothelialization after arterial injury. *Circulation*, 2003, **108**: 3115–3121.
- 12) Heeschen C, Aicher A, Lehmann R et al: Erythropoietin is a potent physiologic stimulus for endothelial progenitor cell mobilization. *Blood*, 2003, **102**: 1340–1346.
- 13) Li M, Nishimura H, Iwakura A et al: Endothelial progenitor cells are rapidly recruited to myocardium and mediate protective effect of ischemic preconditioning via “imported” nitric oxide synthase activity. *Circulation*, 2005, **111**: 1114–1120.
- 14) Llevadot J, Murasawa S, Kureishi Y et al: HMG-CoA reductase inhibitor mobilizes bone marrow - derived endothelial progenitor cells. *J Clin Invest*, 2001, **108**: 399–405.
- 15) Laufs U, Werner N, Link A et al: Physical training increases endothelial progenitor cells, inhibits neointima formation, and enhances angiogenesis. *Circulation*, 2004, **109**: 220–226.
- 16) Rehman J, Li J, Parvathaneni L et al: Exercise acutely increases circulating endothelial progenitor cells and monocyte/macrophage-derived angiogenic cells. *J Am Coll Cardiol*, 2004, **43**: 2314–2318.
- 17) Assmus B, Schächinger V, Teupe C et al: Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation*, 2002, **106**: 3009–3017.

Endothelial Progenitor Cells for Vascular Medicine

Takayuki Asahara

¹Institute of Biomedical Research and Innovation, Laboratory for Stem Cell Translational Research, RIKEN Center for Developmental Biology, Hyogo, Japan

²Department of Regenerative Medicine Science, Tokai University School of Medicine, Kanagawa, Japan

Key words: endothelial progenitor cell, vasculogenesis, myocardiogenesis, stem cell, ischemic diseases

The potential for regenerative abilities of stem cells has been under intense investigation. *In vitro*, stem, and progenitor cells possess the capabilities of self-renewal and differentiation into organ-specific cell types. *In vivo*, transplantation of these cells may reconstitute organ systems, as shown in animal models. 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 into 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. The possibility that modulation of vasculogenesis can be used therapeutically to augment as well as inhibit neovascularization deserves further investigation.

(J Jpn Coll Angiol, 2007, **47**: 477–481)