

細胞-遺伝子ハイブリッド治療への応用. 田畑泰彦編 ドラッグデリバリーシステム DDS 技術の新たな展開とその活用法、遺伝子医学別冊 pp.194-199、メディカル ドゥ (2003).

6. Hidezo Mori/Hikaru Matsuda: Cardiovascular Regeneration Therapies Using Tissue Engineering Approaches. Springer, 2005

H. 知的財産権の出願・登録状況
準備中 4 件

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
清水達也	細胞シート用材料	筏 義人	再生医療工学の最先端	シーエムシー出版	東京都	2002	29-35
増田治史 浅原孝之	血管内皮前駆細胞による血管再生	須田年男 岡野栄之	再生医学	中山書店	東京都	2003	162-168
國本 聡 笠原啓史 福山直人 田中越郎 知久正明 永谷憲歳 西上和宏 岩畔英樹 増田治史 浅原孝之 盛 英三	遺伝子による血管新生	田畑泰彦	再生医療の実際	羊土社	東京都	2003	116-123
知久正明 西上和宏 佐藤英一 盛 英三	放射光および普及型X線源を用いた微小血管造影による再生血管の評価	西村恒彦	機能・画像代謝が贈診断法と分子画像	南山堂	東京	2003	177-186
藤井隆文 永谷憲歳 徳永宜之 神田宗武 福山直人 田中越郎 田畑泰彦 浅原孝之 盛 英三	ゼラチンによる遺伝子の徐放化と細胞-遺伝子ハイブリッド治療への応用	田畑泰彦	遺伝子医学別冊・ドラッグデリバリーシステムDDS技術の新たな展開とその活用法	メディカルドゥ	大阪	2003	194-199
Nagaya N, Fukuyama N, Tabata Y, Mori H.	Potentiation of Rgenerative Theapy by Non-Viral Vektor, Gelatin Hydrogel	Mori H, Matsuda H.	Cardiovascular Regeneration Therapies Using Tissue Engineering Approaches	Springer	東京	2005	17-30

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Fukunaka Y, Iwanaga K, Morimoto K, Kakemi M, Tabata Y	Controlled release of plasmid DNA from cationized gelatin hydrogels based on hydrogel degradation.	J. Control. Release	80(1-3)	333-343	2002
Iwaguro H, Yamaguchi J, Kalka C, Murasawa S, Masuda H, Hayashi S, Silver M, Li T, Isner JM, Asahara T.	Endothelial progenitor cell vascular endothelial growth factor gene transfer for vascular regeneration.	Circulation	105(6)	732-738	2002
Kawamoto A, Tkebuchava T, Yamaguchi J, Nishimura H, Yoon YS, Milliken C, Uchida S, Masuo O, Iwaguro H, Ma H, Hanley A, Silver M, Kearney M, Losordo DW, Isner JM, Asahara T.	Intramyocardial transplantation of autologous endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization of myocardial ischemia.	Circulation	107(3)	461-468	2002
西上和宏 徳永宣之 神田宗武 白井幹康 笠原啓史 田中越郎 盛 英三	血管再生療法の未来と画像評価法	BME	16(2)	45-50	2002

土持裕胤 福山直人 白井幹康 田中越郎 笠原啓史 神田宗武 永谷憲歳 徳永宣之 Pearson JT 西浦直亀 田畑泰彦 盛 英三	生分解性ゼラチンを用いた遺伝子治療	遺伝子医学	6(3)	382-385	2002
福山直人 笠原啓史 田中越郎 安藤 潔 浅原孝之 田畑泰彦 盛 英三	ゼラチン-遺伝子複合体を用いた血管新生療法	循環器科	51(3)	259-263	2002
Shimizu T, Yamato M, Kikuchi A, Okano T.	Tissue engineering for myocardial regeneration.	J Artif Org.	5(4)	216-222	2002
Hosseinkhani H, Tabata Y.	In vitro gene expression by cationized derivatives of an artificial protein with repeated RGD sequences, Pronectin.	J. Control. Release	86(1)	169-182	2003
Kushibiki T, Tomoshige R, Fukunaka Y, Kakemi M, Tabata Y.	In vivo release and gene expression of plasmid DNA by hydrogels of gelatin with different cationization extents. x	J. Control. Release	90(2)	207-216	2003
Aoyama T, Yamamoto S, Kanematsu A, Ogawa O, Tabata Y.	Local delivery of matrix metalloproteinase gene prevents the onset of renal sclerosis in streptozotocin-induced diabetic mice.	Tissue Eng.	9(6)	1289-1299	2003
Matsuda A, Furuzono T, Walsh D, Kishida A, Tanaka J.	Surface modification of a porous hydroxyapatite to promote bonded polymer coatings.	J. Mater. Sci., Mater. Med.	14(11)	973-978	2003
Masuda H, Asahara T.	Post-natal endothelial progenitor cells for neovascularization in tissue regeneration.	Cardiovasc Res.	58(2)	390-398	2003

Yamaguchi J, Kusano KF, Masuo O, Kawamoto A, Silver M, Murasawa S, Bosch-Marce M, Masuda H, Losordo DW, Isner JM, Asahara T.	Stromal cell-derived factor-1 effects on ex vivo expanded endothelial progenitor cell recruitment for ischemic neovascularization.	Circulation	107(9)	1322-1328	2003
Kasahara H, Tanaka E, Fukuyama N, Sato E, Sakamoto H, Tabata Y, Ando K, Iseki H, Shinozaki Y, Kimura K, Kuwabara E, Koide S, Nakazawa H, Mori H.	Biodegradable gelatin hydrogel potentiates the angiogenic effect of fibroblast growth factor 4 plasmid in rabbit hindlimb ischemia.	Am Coll Cardiol.	41(6)	1056-62	2003
河合敏明 鈴木克彦 高瀬欣治 川上博己 望月 亮 山口孝一 田中越郎 笠原啓史 福山直人 篠崎芳郎 盛 英三 東 将浩 西上和宏 田中良一 内藤博昭	微小血管撮影装置開発と再生血管の可視化	Radiosotopes	52(1)	55-58	2003

Nagaya N., Kangawa K., Kanda M., Uematsu M., Horio T., Fukuyama, N., Hino J., Harada-Shiba M., Okumura H., Tabata Y., Mochizuki N., Chiba Y., Nishioka K., Miyatake K., Asahara T., Hara H., Mori H.	Hybrid cell-gene therapy for pulmonary hypertension based on phagocytosing action of endothelial progenitor cells.	Circulation	108(7)	889-895	2003
Nagaya N., Okumura H., Uematsu M., Shimizu W., Ono F., Shirai M., Mori H., Miyatake K., Kangawa K.	Repeated inhalation of adrenomedullin ameliorates pulmonary hypertension and survival in monocrotaline rats.	Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.	285(5)	H2125-2131	2003
永谷憲歳	再生医療	Thrombosis Circ.	11(4)	352-357	2003
Shimizu T., Yamato M., Kikuchi A., Okano T.	Cell sheet engineering for myocardial tissue reconstruction.	Biomaterials	24(13)	2309-2316	2003
清水達也	細胞シートを用いた心筋の組織工学	医学のあゆみ	207(11)	915-919	2003
清水達也	心筋	バイオマテリアル-生体材料-	21(3)	194-195	2003
Hosseinkhani H, Tabata Y.	PEGylation enhances tumor targeting of plasmid DNA by an artificial cationized protein with repeated RGD sequences Pronectin®.	J. Control. Release.	97(1)	157-171	2004
Hosseinkhani H, Azzam T, Tabata Y, Domb AJ.	Dextran-spermine polycation: an efficient nonviral vector for in vitro and in vivo gene transfection.	Gene Ther.	11(2)	194-203	2004

Kushibiki T, Matsuoka H, Tabata Y.	Synthesis and physical characterization of poly(ethylene glycol)-gelatin conjugates.	Biomacromolecules.	5(1)	202-8	2004
Kimura T, Okuno A, Miyazaki K, Furuzono T, Ohya Y, Ouchi T, Mutsuo S, Yoshizawa H, Kitamura Y, Fujisato T, Kishida A.	Novel PVA-DNA nanoparticles prepared by ultra high pressure technology for gene delivery	Mater. Sci. Eng. C	24(6-8)	797-801	2004
Iwami Y, Masuda H, Asahara T.	Endothelial progenitor cells: past, state of the art, and future	J Cell Mol Med.	8(4)	488-497	2004
Fujii T, Nagaya N, Iwase T, Murakami S, Miyahara Y, Nishigami K, Ishibashi-Ueda H, Shirai M, Itoh T, Ishino K, Sano S, Kangawa K, Mori H.	Adrenomedullin enhances therapeutic potency of bone marrow transplantation for myocardial infarction in rats	Am J Physiol Heart Circ Physiol.	288(3)	H1444-H1450	2005
Nagaya N, Kangawa K.	Adrenomedullin in the treatment of pulmonary hypertension.	Peptides	25(11)	2013-2018	2004
Tokunaga N., Nagaya N., Shirai M., Tanaka E., Ishibashi-Ueda H., Harada-Shiba M., Kanda M., Ito T., Shimizu W., Tabata Y., Uematsu M., Nishigami K., Sano S., Kangawa K., Mori H.	Adrenomedullin Gene Transfer Induces Therapeutic Angiogenesis in a Rabbit Model of Chronic Hind Limb Ischemia. Benefits of a Novel Nonviral Vector, Gelatin	Circulation	109(4)	526-531	2004

Nagaya N., Kyotani S., Uematsu M., Ueno K., Oya H., Nakanishi N., Shirai M., Mori H., Miyatake K., Kangawa K.	Effects of Adrenomedullin Inhalation on Hemodynamics and Exercise Capacity in Patients With Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension	Circulation	109(3)	351-356	2004
Okumura H., Nagaya N., Itoh T., Okano I., Hino J., Mori K., Tsukamoto Y., Ishibashi-Ueda H., Miwa S., Tambara K., Toyokuni S., Yutani C., Kangawa K.	Adrenomedullin infusion attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury through the phosphatidylinositol 3- kinase/Akt- dependent pathway	Circulation	109(2)	242-248	2004
Iwase T, Nagaya N, Fujii T, Itoh T, Ishibashi-Ueda H, Yamagishi M, Miyatake K, Matsumoto T, Kitamura S, Kangawa K.	Adrenomedullin enhances angiogenic potency of bone marrow transplantation in a rat model of hindlimb ischemia.	Circulation	111(3)	356-362	2005
Nagaya N, Mori H, Murakami S, Kangawa K, Kitamura S	Adrenomedullin: angiogenesis and gene therapy.	Am J Physiol			in press
清水達也 岡野光夫	細胞シート工学を利用し た組織再構築	Bio Clinica	19(10)	74-78	2004
清水達也	組織工学の心血管病への 応用	分子血管病	58(1)	58-64	2004
清水達也	組織工学における血管新 生	血管医学	5(6)	41-48	2004

4 細胞シート用材料

清水達也*

4.1 はじめに

組織・臓器は細胞およびそれを取り囲む細胞外マトリックス (ECM) よりなる。再生医療においては前記されているような種々の材料を細胞が接着するための足場として用い、これをECMの替わりとする手法が広く用いられている。このように、最初から3次元的な形態をもった組織を再構築する手法に対し、我々の研究室では細胞およびECMからなるシート状の細胞を一つのユニットとして積層化し3次元組織を再構築するという新規手法を開発した。この細胞シートの回収には温度変化のみで細胞の脱着・接着を制御できる温度応答性培養皿を用いる。本節ではこの培養皿を用いた新規組織工学的手法「細胞シート工学」について概説し、組織再構築に関する研究成果の具体例を紹介する。

4.2 細胞シート作製デバイス (温度応答性培養皿)

細胞は培養基材表面とその膜レセプターおよび細胞接着タンパク質を介して接着するが (図1A)、通常その脱着にはトリプシンなどのタンパク分解酵素が用いられ、その接着因子やレセプターは破壊される (図1B)。これに対し、我々の研究室では低温処理のみで細胞に損傷を与える

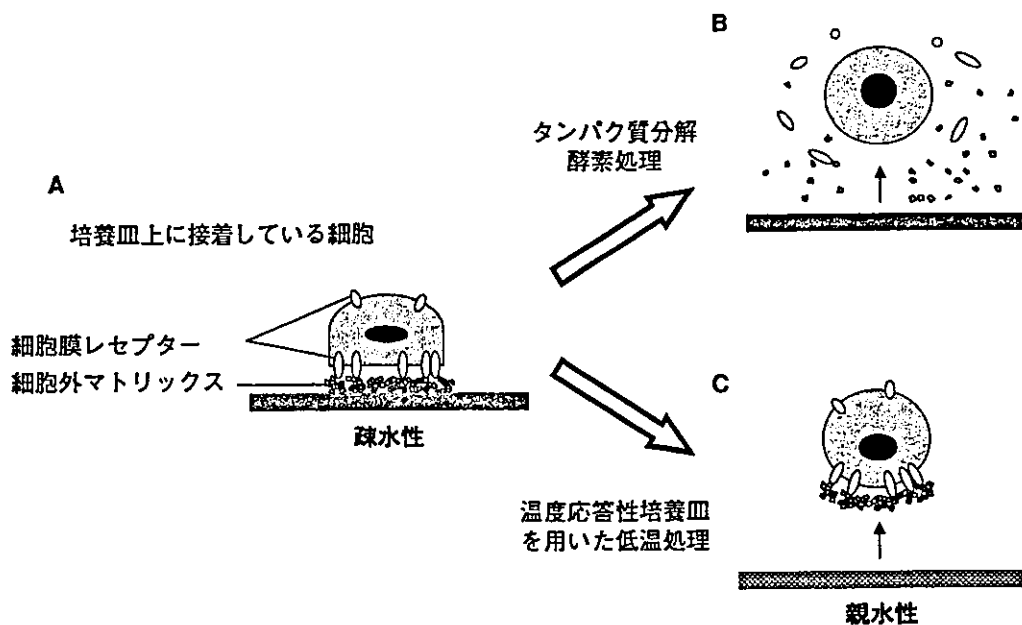


図1 細胞脱着メカニズムの比較

* Tatsuya Shimizu 東京女子医科大学 先端生命医科学研究所 助手

第1章 再生用材料

ことなく脱着させることのできる温度応答性培養皿を開発した^{1, 2)}。このデバイスは温度応答性高分子であるポリ *N*-イソプロピルアクリルアミド (PIPAAm) を電子線を用いて市販の培養皿に表面グラフトしたものである。PIPAAm は培養皿とナノメートルオーダーの厚さで共有結合しており、温度に応答して親水・疎水の可逆的な変化をおこし、その細胞接着性を変える。すなわち培養温度 (37°C) では疎水性の表面となるため、細胞が接着するのに対し、低温 (32°C以下) では親水化するために培養皿表面の高分子と細胞接着因子の結合が解離し、その結果、細胞が培養皿表面から膜レセプターや細胞接着因子とともに損傷を受けることなく脱着する³⁾ (図 1-C)。また細胞の脱着は、ATP 阻害薬 (NaN₃) やアクチン重合阻害薬サイトカラシンによりその脱着が抑制されることよりその脱着メカニズムとして培養皿表面の親水・疎水の変化という細胞にとって受動的な機序に加え、エネルギー代謝を介した細胞内骨格の収縮・再構築という能動的な機序が重要であることが明らかとなっている^{4, 5)}。

次に、細胞を密な状態に培養した場合は細胞と細胞が直接あるいは ECM を介して互いに接着する (図 2A)。トリプシンなどのタンパク分解酵素を用いた場合は細胞と培養皿の接着が解離するとともに、細胞間接着も破壊されるため、細胞はばらばらになって浮遊することになる (図 2B)。一方、温度応答性培養皿上での低温処理においてはこの細胞間接着には全く影響を与えないため、細胞がシート状に脱着する (図 2C)。この技術により既存の細胞回収法では不可能であった細胞シートの作製・回収が可能となった。また、細胞シートと培養皿を接着させていたフィブロネクチンなどの細胞接着因子は細胞シートの下面に維持されるため、他の表面に移動時

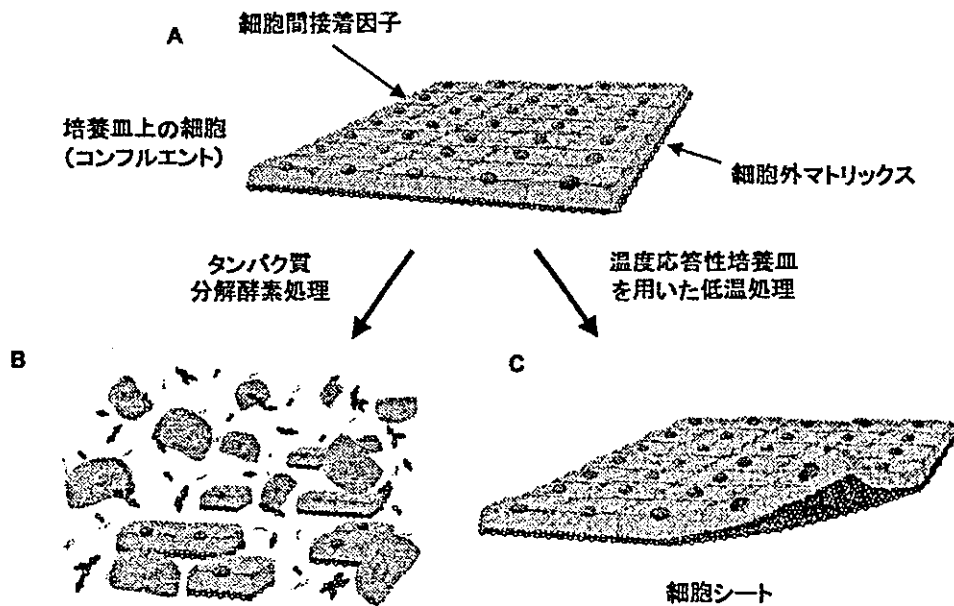


図2 細胞シートの回収

や細胞シート積層時に「糊」として働き、再接着を促進するというメリットがあることも明らかとなっている⁶⁾。

4.3 細胞シート工学

温度応答性培養皿を用いて回収した細胞シートを移動あるいは積層化し、組織モデルや移植組織を構築する技術を「細胞シート工学」と呼んでいる。細胞シートのマニピュレーション法としては、脱着後細胞内骨格の収縮により相似形に小さくそして厚くなった細胞シートをピンセットやピペットを使い操作する方法と親水性 PVDF (poly(vinylidene difluoride)) 膜などの支持膜を用い、培養皿上と同じ大きさのまま脱着・移動する方法がある。いずれの場合も細胞間の接着は保たれており、用途に応じてそれぞれの手法を用いている。後者の具体的な方法を図3に示す。まず、支持膜を温度応答性培養皿の細胞上に接着し、低温処理後、細胞シートを支持膜とともに脱着し、その後、目的とする培養機材表面に移動し、再び37℃で培養すると再接着し、支持膜だけを取り除くことが可能である。この操作により細胞シートの形態・機能を維持したままのマニピュレーションが可能である。すでにこの培養皿を用い、肝細胞、内皮細胞、平滑筋細胞、腎上皮細胞、皮膚表皮細胞、心筋細胞シートの回収・移動が可能となっている^{7~13)}。また、細胞シートを別の細胞シート上に移動・再接着することにより重層化が可能であり、さらにこの操作を反復することにより多層化が可能である。細胞シートの利用法としては、①単層シート移植、②同一細胞シートの積層化による均一な組織構築(図4)、③数種の細胞シートの積層化による層状構造を呈する組織の構築(図5)がある。それぞれ対象組織・臓器として、①皮膚、角膜、

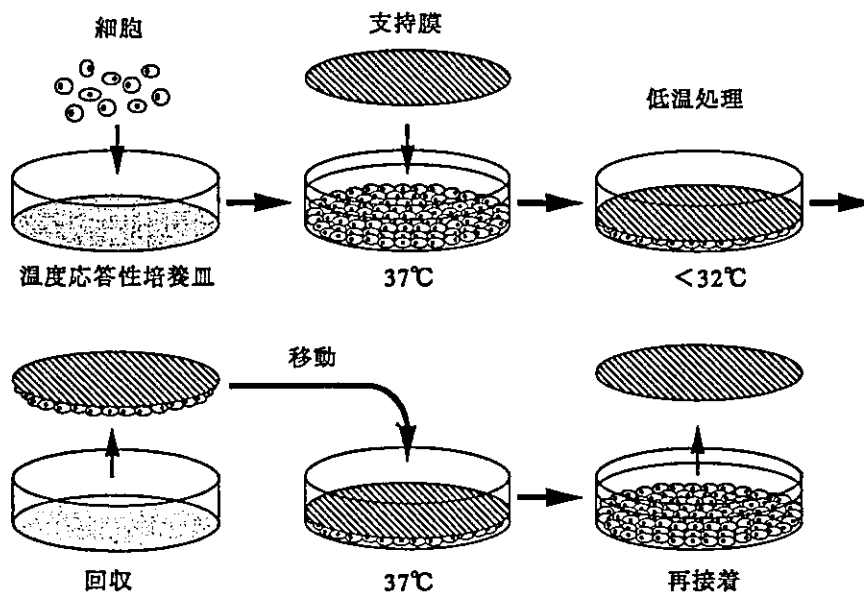


図3 支持膜を用いた細胞シートマニピュレーション

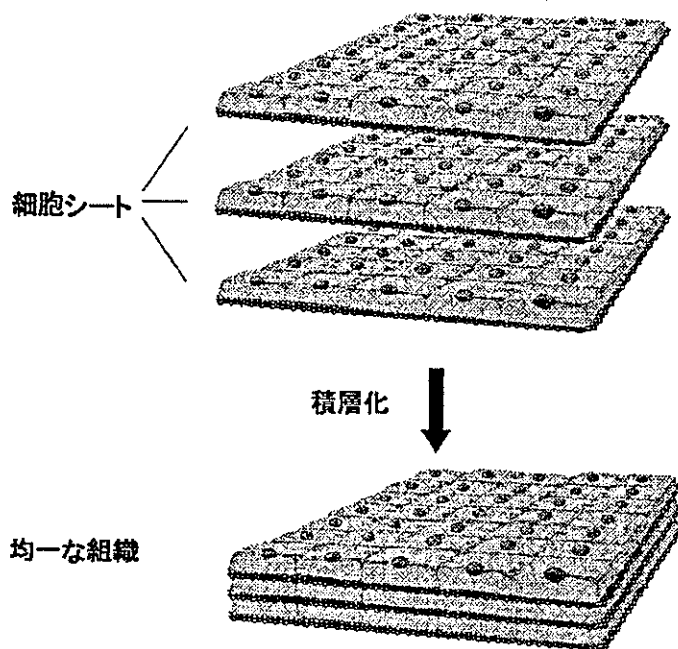


図4 同一細胞シートの積層化

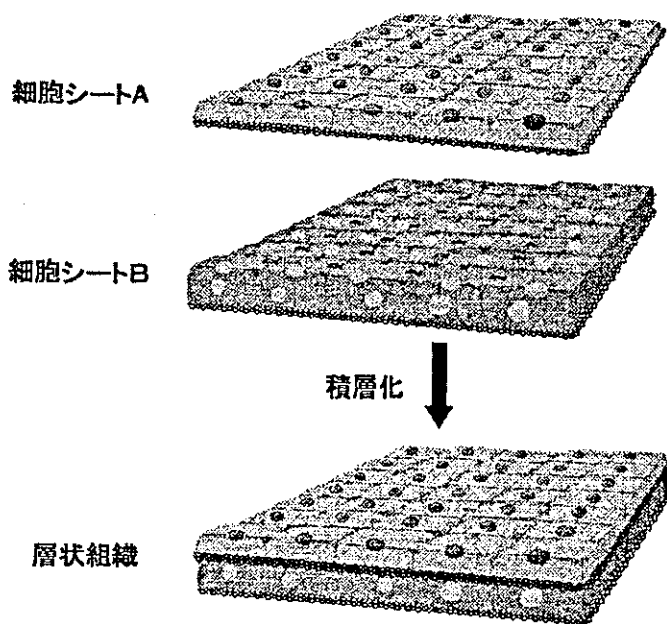


図5 異なる細胞シートの積層化

網膜, ②心筋, 骨格筋, ③肝臓, 血管, 腎臓, 膀胱が挙げられる。以下に, それぞれについての具体例を示す。

4.4 単層シート (皮膚)

皮膚に関しては, Green の方法で積層培養させた角化表皮細胞をディスパーゼで剥離・回収し皮膚欠損部に移植することが既に臨床応用されているが, ディスパーゼ処理による細胞接着因子の破壊が少なからず生じ, それに伴う生着率の低下, 感染が問題となっている。そこで, ヒト角化表皮細胞をこの温度応答性培養皿に培養し, 増殖・重層化させた後に重層角化表皮細胞シートとして脱着・回収した。低温処理による回収ではディスパーゼによる回収と異なり E-カドヘリンなどの細胞間接着分子やラミニン 5 などの ECM が分解されることなく維持されており, デスマソームの損傷なども生じないという知見を得た¹¹⁾。このことは温度応答性培養皿を使用して脱着, 回収した表皮細胞シートは現在使用されている培養人工皮膚の問題点を解消する可能性を示唆しており, 現在臨床に向けた研究が行われている。

4.5 同一細胞シートの積層化 (心筋)

海外においてはコラーゲンゲル, ポリ乳酸, アルギン酸あるいはゼラチンからなる 3次元の支持体を用いた心筋細胞の 3次元培養が行われている。しかし, 3次元支持体を用いて心筋細胞培養を行うことは細胞の密な接着や自由な収縮弛緩の妨げになると考えられる。一方, 温度応答性培養皿上に心筋細胞を培養して心筋細胞シートを作製したところ, 全体が同期して拍動する細胞シートの回収が可能となった。また, 培養基材から脱着することにより自由度が増し, 全体としてより大きな収縮弛緩運動をするという知見を得た¹⁰⁾。この細胞シートを重層化したところ, 2枚のシート間に電氣的にも形態的にも結合が生じ, 組織全体が同期して拍動することも示された¹²⁾。4枚まで積層化したところ肉眼レベルで拍動する心筋組織が構築された。さらにヌードラット背部皮下組織への移植実験を行ったところ, 3週間の時点でホストの心電図とは異なるグラフト由来の電位が確認された。心筋グラフトの肉眼レベルでの拍動が確認されるとともに組織切片上, 多数の新生血管を認め, 心筋様組織が再構築されていた。現在, 少なくとも3ヶ月まで移植心筋グラフトが拍動を維持したまま残存することが示されている¹⁴⁾。この心筋グラフトの不全心筋への移植により心機能が改善することが期待される。

4.6 異なる細胞シートの積層化 (肝臓)

肝臓は肝実質細胞と血管内皮細胞が層状に配列し, 生体内における合成, 代謝を効率的に行っている。肝実質細胞は, 通常の培養環境ではその分化機能を著しく低下させ, 長期培養も困難で

あることが知られているが、肝細胞シートと内皮細胞シートの重層化によりアルブミン合成能を維持した肝細胞の長期培養が可能となっている¹³⁾。これは、肝細胞と内皮細胞との接着により生体に似た環境を再現し、細胞相互間のコミュニケーションを可能にしたことによるものと考えられる。この手法を用い、組織構築による機能発現のメカニズムを追究するとともに、肝組織再構築への応用を行っている。

4.7 まとめ

以上のように温度応答性培養皿およびそれを使った細胞シート工学は、既存の培養技術では不可能であったシート状の細胞の回収、移動、重層化を実現しており、再生医療分野をさらに発展させる新技術として貢献するものと考えられる。

文 献

- 1) N. Yamada *et al.*, *Makromol. Chem., Rapid Commun.*, 11, 571 (1990)
- 2) T. Okano *et al.*, *J. Biomed. Mater. Res.*, 27, 1243 (1993)
- 3) M. Yamato *et al.*, *Biomaterials*, 21, 981 (2000)
- 4) T. Okano *et al.*, *Biomaterials*, 16, 297 (1995)
- 5) M. Yamato *et al.*, *J. Biomed. Mater. Res.*, 44, 44 (1999)
- 6) A. Kushida *et al.*, *J. Biomed. Mater. Res.*, 45, 355 (1999)
- 7) A. Kikuchi *et al.*, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, 9, 1331 (1998)
- 8) M. Hirose *et al.*, *Biomacromolecules*, 1, 377 (2000)
- 9) A. Kushida *et al.*, *J. Biomed. Mater. Res.*, 54, 37 (2001)
- 10) T. Shimizu *et al.*, *Tissue Eng.*, 7, 141 (2001)
- 11) M. Yamato *et al.*, *Tissue Eng.*, 7, 473 (2001)
- 12) T. Shimizu *et al.*, *J. Biomed. Mater. Res.*, 60, 110 (2002)
- 13) M. Harimoto *et al.*, *J. Biomed. Mater. Res.*, in press
- 14) T. Shimizu *et al.*, *Circ. Res.*, 90, e40 (2002)

2 血管 血管内皮前駆細胞による血管再生

増田治史^{1,2)}・浅原孝之^{1,2)}

¹⁾ 東海大学医学部生理学教室

²⁾ 東海大学再生医学センター

成体内血管内皮前駆細胞の発見により、血管再生の概念および治療に新たな展開が生まれた。従来の既存隣接血管内皮細胞による血管新生の概念に加え、血管内皮前駆細胞の骨髄からの動員、局所における組み込み、遊走、増殖、分化による血管発生の概念が加えられた。本細胞の生物学的特徴や成体内動態の解析が行われ、虚血性疾患などを標的にした本細胞移植による血管再生療法の開発が進められている。

Keywords | endothelial progenitor cell (EPC), EPC therapy, multipotent adult progenitor cell, post-natal vasculogenesis, therapeutic neovascularization

はじめに

近年、種々の成体内組織において、幹細胞 (stem cell)、前駆細胞 (progenitor cell) の存在が認められ、これらの幹・前駆細胞が病理学的/生理学的組織・器官再生をつかさどっていると考えられるようになり、自己組織の幹・前駆細胞を用いた治療 (stem/progenitor cell therapy) による再生医学の分野が開かれつつある¹⁾。たとえば、虚血性疾患の成体反応として、血管形成 (neovascularization) が引き金になり虚血組織機能再生が起こると考えられる。このような組織・器官再生において中心的役割を担う血管形成の概念は、血管内皮前駆細胞 (endothelial progenitor cell; EPC) の発見により、EPCによる治療的血管形成 (therapeutic neovascularization) という

新たな展開を生みだそうとしている²⁾。本稿では、EPCによる血管再生療法について解説する。

成体内 EPC の発見

EPCは、マウス胎仔期の血管発生過程において存在が確認されており、血液幹細胞 (hematopoietic stem cell; HSC) と共通の幹細胞である血液血管芽細胞 (hemangioblast) を有すると考えられている³⁾。両者は、チロシンキナーゼ受容体 (flk-1, flt-1, Tie-1, Tie-2), c-kit, Sca-1, CD34, CD31などの共通抗原を有する。しかし、HSCは分化とともにこれらの発現を失うのに対し、EPCはこれらの抗原性を保持する。成体においても、HSCの存在はすでに確認されていたので、共通の抗原性を有するEPCおよび成体内血液血管芽細胞の存在が推察された。

Blood vessel: The therapeutic neovascularization with endothelial progenitor cells

Haruchika Masuda^{1,2)} & Takayuki Asahara^{1,2)}

¹⁾ Department of Physiology, Tokai University School of Medicine

²⁾ Division of Organogenesis, Research Center for Regenerative Medicine, Tokai University

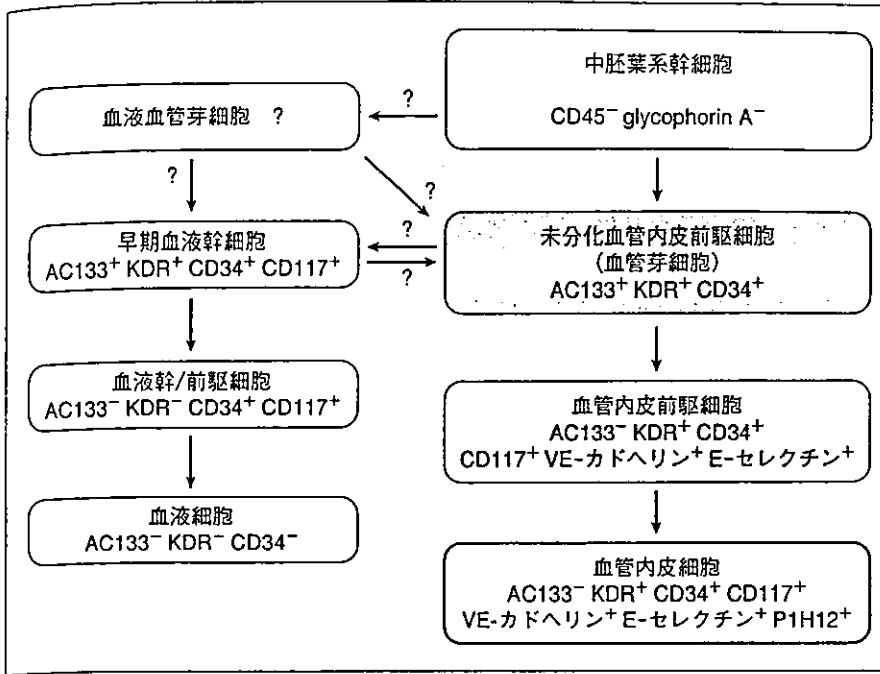


図1 ヒトEPCの起源と分化カスケード

血管内皮前駆細胞 (EPC) は、骨髄中において推定上の血液血管芽細胞から血液幹細胞とともに分化すると考えられている。また、中胚葉系幹細胞からも分化しうることが報告された。

ヒト末梢血より CD34⁺細胞を選別し、フィブロネクチン表面にて EC (endothelial cell, 血管内皮細胞) 用培地を用いて培養すると, spindle 型接着性細胞が増殖し, 血管様構造や放射状コロニーを形成する。これらの細胞は, フローサイトメトリーあるいは免疫組織染色で調べると EC に特徴的な抗原 (CD34, CD31, KDR/flk-1, Tie-2, E-selectin, Ulex-1 lectin, ecNOS, vWF) の発現とアセチル化 LDL の取り込みを認め, RT-PCR にて ecNOS, CD31, KDR/flk-1, Tie-2 などの遺伝子発現が認められた²⁾。蛍光標識 CD34⁺細胞をマウス重症下肢虚血モデルに尾静脈投与すると, 数週間後の虚血筋肉組織において, 蛍光を発するヒト CD34⁺細胞由来の細胞が新生血管を形成しているのが観察された。これらの結果は, 血液中における CD34⁺の EPC の存在を示している。

ヒト成体内 EPC の起源

EPC の分化を考える場合, 骨髄・末梢血中の早期分化段階の血液幹細胞に見出された膜抗原 AC133 が, 既知の HSC における膜抗原 (CD34, KDR/flk-1, CD117/c-kit) とともに, 重要である (図1)^{4,5)}。G-CSF にて動員させたヒト末梢

血 AC133⁺細胞を採取し, *in vitro* にて培養後, 血液系および内皮系細胞に, また *in vivo* にて EC に分化しうることが報告された⁶⁾。つまり, ヒトの骨髄または末梢血において, AC133⁺細胞は推定される成体内血液血管芽細胞の標識抗原である可能性が示唆され, 分化に伴い, CD34 抗原性の出現とともに AC133 の抗原性が消退していくものと考えられる。その後, HSC の分化において, CD34 を含む CD117, KDR, Tie-2 などの幹細胞抗原が失われる。一方, EPC からの EC 系列への分化では, 終末分化した EC で P1H12 抗原が認められるもの⁷⁾, HSC との共通抗原をはじめ, 分化段階早期から認められる EC 系列の抗原性を保持し続ける。

最近, Reyes らにより, フィブロネクチン上での, EGF (epidermal growth factor, 上皮増殖因子), PDGF (platelet-derived growth factor, 血小板由来増殖因子)-BB の添加培養により, ヒト骨髄単核球中 CD45⁻ glycoporphin A⁻ の細胞分画に中胚葉系細胞の多様な細胞への分化能力をもつ成体多能性前駆細胞 (multipotent adult progenitor cell; MAPC) が単離された⁸⁾。MAPC は, CD34⁻であり, KDR/flk-1 と AC133 の弱い発現

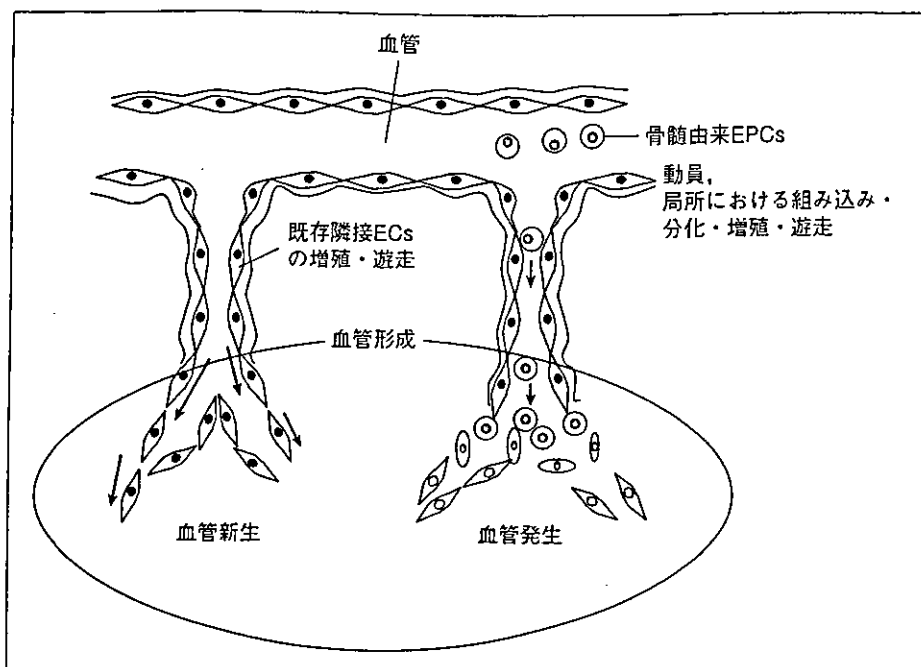


図2 成体内血管形成過程

成体内では、既存隣接血管内皮細胞の増殖、遊走による血管新生の概念に加え、EPCが骨髄から未分化のまま局所にたどり着き、増殖、分化、遊走により成立する血管発生の概念が確立された。成体内EPC動態は、成長因子、サイトカイン、性ホルモンなどにより制御されていることが判明している。

が認められ、低濃度FCS (fetal calf serum, ウシ胎仔血清), VEGF (vascular endothelial growth factor, 血管内皮細胞増殖因子) 存在下でAC133の消退, KDR発現の増強, CD34, VE-カドヘリン, vWF (von Willebrand 因子) などのEC抗原を認めるようになり, MAPCがEPCの起源であることが報告された。しかし, MAPCから血液系細胞への分化は観察されず, MAPCを起源とするEPCへの分化は, 上記の, 推定上血液血管芽細胞から分化する系とは異なることが示唆され, EPCの起源や分化には多様性が存在すると考えられる。

一方, CD34⁻CD14⁺の抗原を有する単球, マクロファージが*in vitro*のangiogenicな条件下でEC抗原を発現し, *in vivo*の血管形成局所でもEC様細胞として新生血管を構築しうることが示され, このような分化した血液細胞がEPCの起源になりうることが報告された^{9, 10)}。しかし, VE-カドヘリン, vWFなどのECの抗原性を獲得してもKDR⁻であり, マクロファージの抗原(CD45⁺CD68⁺)を保持しており, EPCへの分化とは考えにくい。

以上のように, 成体内EPCの起源および分化システムの全容は明らかにされていない。EPCがどの幹細胞から分化し, また, どの程度分化の進

んだ細胞が骨髄や血液, あるいは組織中に存在するのか説明が待たれる。

成体内血管形成

成体内血管形成の概念において, EPCの発見により²⁾, 従来の既存血管ECの増殖・遊走による血管新生(angiogenesis)以外に¹¹⁾, EPCの骨髄からの動員, 局所組織への組み込み, 増殖, 分化, 遊走による血管発生(post-natal vasculogenesis)の概念が加わった(図2)。EPCの体内動態を観察する動物モデルによる検討において, 腫瘍, 創傷治癒, 虚血, 子宮内膜などの成体内の病的/生理的血管形成には, EPCがかかわる血管発生の機構が存在することが報告されている¹²⁾。また, ヒトでも, 骨髄移植を受けたBCR/ABL癌遺伝子により特徴づけられる慢性骨髄性白血病(CML)患者の心血管にドナー由来のECおよびBCR/ABL癌遺伝子をもつECが確認され, 正常血管のturnoverにも骨髄由来のEPCがかかわっていることが示された¹³⁾。

また, 成体内のEPC動態において, VEGF, SDF-1 (stromal derived factor-1), angiopoietin-1, GM-CSF, G-CSF^{14, 15)}などの成長因子や性ホルモンにより骨髄から末梢血中に動員されるこ

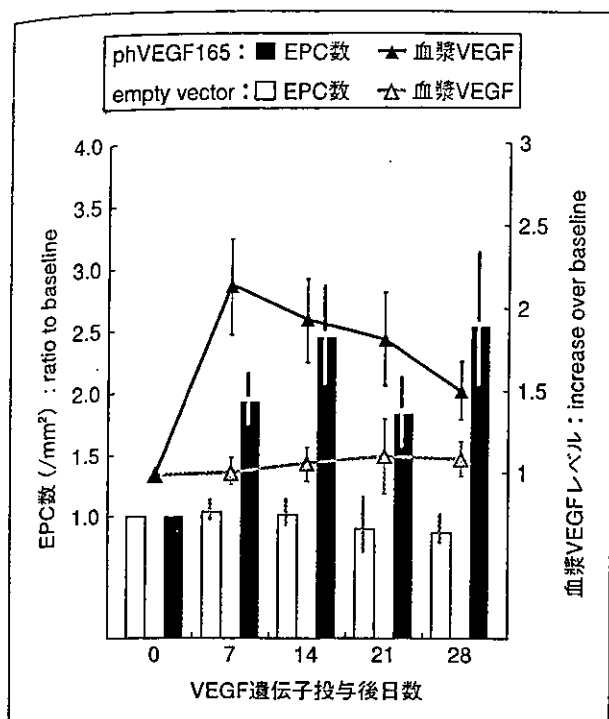


図3 VEGF 遺伝子投与患者における血漿 VEGF レベルおよび末梢血中培養 EPC の推移

VEGF 遺伝子投与による血漿中 VEGF の上昇に伴い、末梢血中の培養 EPC 数の増加が認められた。

(Kalka C et al. *Circ Res* 86, 1198-202, 2000¹⁴⁾ を改変)

とも判明している (図3)。EPC が関与する血管発生の血管形成に占める割合について、肉芽モデルで 10% 程度¹⁶⁾、癌組織では 35~45% との報告がある¹⁷⁾。このように、病理的血管形成における血管発生の関与率は、疾患、病態、重症度において異なると考えられる。

今後 EPC 動態について、内因性に影響を与える因子はもとより、種々の薬剤などの外来性因子による影響を検討することは、血管形成の観点から病態の解明や虚血性疾患における血管形成促進治療、あるいは癌における腫瘍血管形成抑制治療を考えていくうえで重要となるものと考えられる。

EPC の血管再生療法への応用

病変局所血管再構築による組織機能改善を目的とした血管再生療法 (therapeutic neovascularization) の概念は、1994 年、J. M. Isner により、VEGF 遺伝子プラスミドを用いて患部の血管形成を促進することを目的に重症下肢動脈閉塞疾患患

者に施行されたことに始まる¹⁷⁾。しかし、内皮機能障害のある高齢者、糖尿病、高脂血症患者の虚血性疾患に対し、単一因子やその遺伝子投与による治療には限界があると考えられる。つまり、これらの患者においては、局所の内皮機能の改善、血管新生の誘導、側副血管の発達による虚血組織の機能改善は、投与因子に対する EC の反応性、効果の持続性、また反復投与によるコストなどの面から、効果の期待される患者が限定されてしまうことが予想される。

そこで、EPC を用いた細胞治療 (EPC-therapy) が考案されている (図4)。虚血局所血管形成において、EPC を投与することにより、EC 系細胞の量的増加および VEGF などのオートクリン、パラクリンによる質的向上が考えられ、さらに有効な治療的血管形成が期待される。

治療に使用される自己 EPC の調整手段として、以下の 4 つの方法が考案されている。

1. 単核球を用いる場合

未分化 EPC (uncommitted EPC) を骨髄から末梢血により多く動員させる作用をもつ増殖因子 (VEGF, SDF-1, angiopoietin-1 など) やサイトカイン (G-CSF, GM-CSF など) の前処置により、動員された未分化 EPC を含む単核球を増加させることが可能となる。

自己骨髄より採取された未分化 EPC 含有単核球の有効性が、ラビットの下肢虚血モデルを用いて示された¹⁸⁾。また、臨床的にも、患者骨髄から採取した単核球を虚血下肢に投与し、その有効性が示された¹⁹⁾。

2. 未分化 EPC を用いる場合

動員された単核球から AC133, CD34, KDR などの抗原マーカーにより選別された未分化 EPC を用いる。末梢血から CD34 の抗体ビーズ法により選別した未分化 EPC を、糖尿病マウスの下肢虚血モデルの患側筋肉内に投与することにより、有効性が確認された²⁰⁾。このような EC 抗原マーカーにより選別された未分化 EPC による治療の有効性を示すものとして注目される。

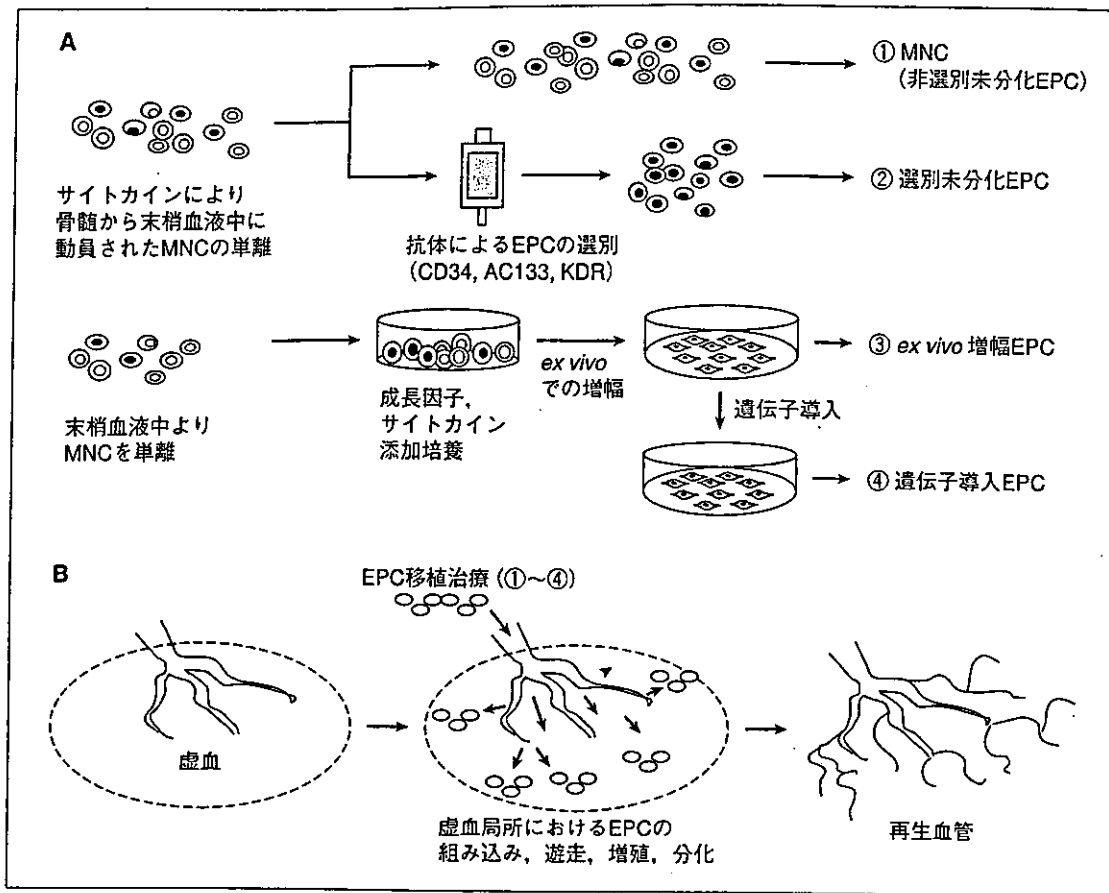


図4 自己血由来EPCを用いた血管再生療法の概念図

細胞調整法は、①成長因子、サイトカインなどにより、骨髄から未分化EPCを含む単核球 (MNC) を動員させる、②動員された単核球から抗体ビーズ法により未分化EPCを選別する、③成長因子、サイトカインを用いた未分化EPCの培養により分化・増幅されたEPCを誘導する、④分化・増幅されたEPCに遺伝子を導入することが考えられる (A)。これを、虚血局所に投与することにより血管再生を促進し、組織機能の改善を図る (B)。

3. 分化・増幅EPCを用いる場合

筆者らは、VEGF, IGF (insulin-like growth factor, インスリン様増殖因子) などの増殖因子を用いた培養系により、ヒト末梢血由来EPCの分化誘導および増幅を行った。このEPCを下肢虚血モデルマウスや心筋梗塞モデルラットに尾静脈内投与し、患部組織の血管形成の促進と患側血流改善、心機能の改善が認められ、有効性が確認された^{21, 22)}。

4. 遺伝子導入による機能強化EPCを用いる場合

EC機能障害をもつ患者や高齢者では自己EPC機能も低下していることが報告されているが²³⁾、EPC機能を改善あるいは増強させるVEGFなどの遺伝子を導入することにより治療効果が期待でき

る (gene modified EPC therapy)。筆者らは、VEGFのアデノウイルスを *ex vivo* にて分化・増幅させたEPCに感染させ、これをマウス下肢虚血モデルに投与することにより有効性を確認した (図5)²⁴⁾。遺伝子導入されていない、“naked”のEPCを用いた場合に比べ、投与EPC数を約3%程度に抑えることができる。このことは、臨床応用において遺伝子導入ベクターの問題が存在するが、EPC採取のための自己血採血量を大幅に減少させることが可能であることを意味し、患者負担の軽減からも現実的な応用の可能性を示している。このようなEPCの応用を展開するうえで、自己骨髄・血液由来EPCの効率的選別法、分化増幅法、さらには投与法の確立が望まれる。

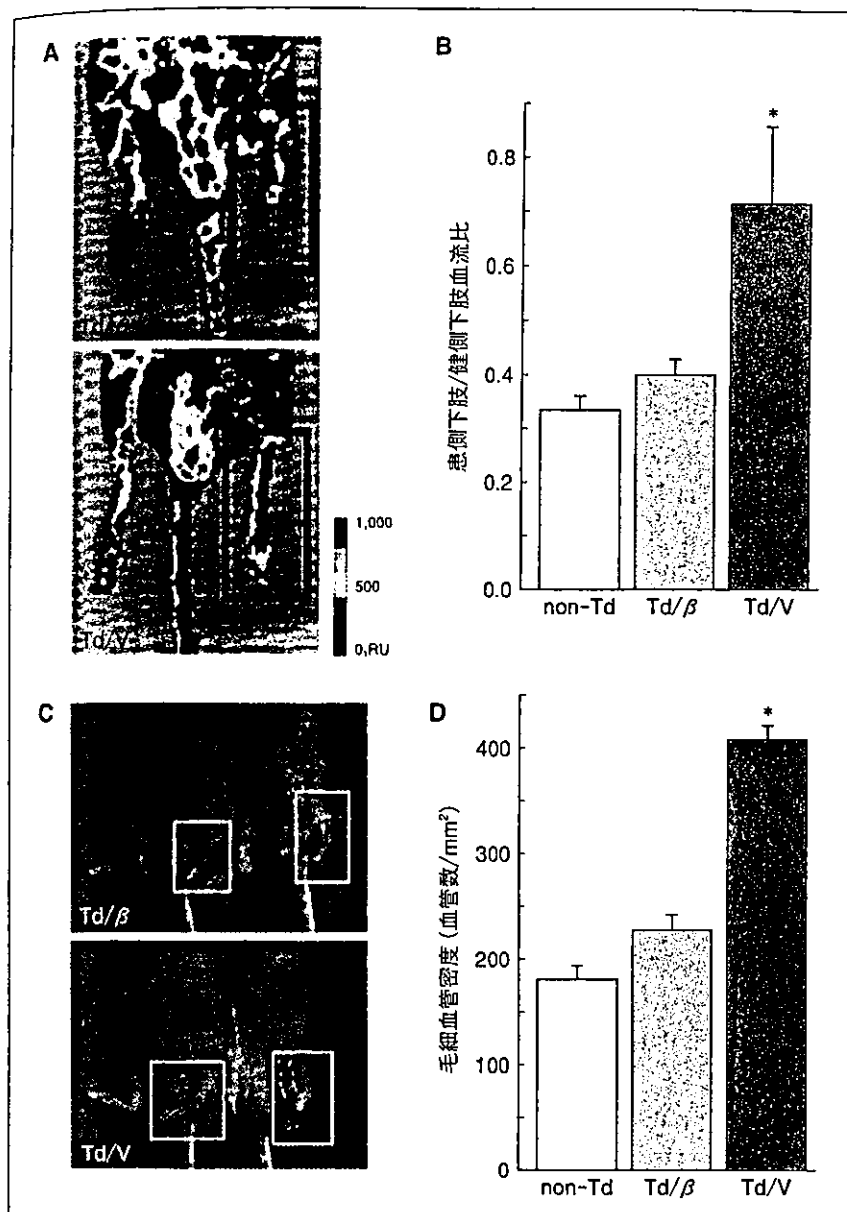


図5 自己血由来EPCを用いた血管再生療法の有効例

VEGF遺伝子導入機能強化EPC移植後、マウス虚血下肢において毛細血管密度の増加とともに、血流および組織機能改善が認められる。移植28日後、レーザードプラー画像(A)、患側下肢/健側下肢血流比(B)、虚血下筋肉眼所見(C)、毛細血管密度(D)。

* $p < 0.05$, Td/V: VEGF遺伝子導入EPC移植群, non-Td: 非遺伝子導入EPC移植群, Td/ β : β -ガラクトシダーゼ遺伝子導入EPC移植群。

(Iwaguro H et al. *Circulation* 105, 732-8, 2002²⁴) を改変)

おわりに

EPCを用いた近未来的細胞療法は、自己組織からの細胞採取法、調整法、投与方法などの手技が確立されれば、免疫学的拒絶反応や倫理的問題を憂慮することなく、簡便で有効な治療法として期待

され、患者の精神的・肉体的負担を軽減させ、QOLを確保できる可能性がある。しかし、このような臨床応用に向けたEPC研究において、成体内の動態、その分子機構など、いまだ未解決である。今後、倫理的問題を考慮しつつ、基礎研究に則した慎重な臨床応用へのプロセスが不可欠である。

文献

- 1) Asahara T, Kalka C & Isner JM. Stem cell therapy and gene transfer for regeneration. *Gene Ther* 7, 451-7 (2000)
- 2) Asahara T, Murohara T, Sullivan A et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 275, 964-7 (1997)