

図① 中胚葉から心臓への分化経路

MEF) のうえに ES 細胞を重層して培養することが多いが、近年は技術の向上によりフィーダーレイヤーを必要としない培養も可能になった。ヒトの ES 細胞もすでに多数樹立され、わが国においても京都大学再生医科学研究所の中辻 憲夫教授により 3 株ほど ES 細胞が樹立されている。ヒトの ES 細胞は LIF により未分化機構が維持されることはなく、MEF との共培養が必須であるとされている。また、マウスと同様にヒトの ES 細胞からも心筋細胞に分化することがすでに報告されている。ES 細胞から心筋細胞への分化には BMP 2 や Wnt といったシグナル伝達経路が重要であるとされている (図①)。

ES 細胞の臨床応用上の利点は①大量培養が可能で、②分化を誘導する方法が確立している点である。逆に欠点は、まず手技的には、①ヒトで未分化維持のために MEF との共培養が必要であり、② ES 細胞から心筋細胞への選択的分化誘導法の確立が必要であり、また臨床的には、③未分化細胞が混入して移植後に奇形腫が生じてしまう可能性があり、④同種移植であるため移植後の免疫抑制剤の長期使用が必要となり、さらに、⑤倫理的問題が残されている点、などがあげられる。

近年、韓国よりヒトクローン胚の形成に成功したことが報じられた。しかし、その場合でも 100 個以上の卵を用いて 1 個成功した程度とされている。先進諸国のほとんどでクローン人間の作成は禁止されているが、臓器作

成を目的としたクローン ES 細胞は一部の国でおこなわれる可能性はある。この点に関しては今後国民的な議論がなされるべきである。技術革新により、卵細胞を用いずに ES 細胞レベルでのクローン化ができれば倫理的にはハードルが低くなって臨床応用される可能性もあり、更なる研究が望まれる。

### ③ 骨髄間葉系幹細胞の利用

骨髄は造血の主たる場であり、骨髄中の細胞のほとんどは造血幹細胞に由来する血液細胞である。しかし骨髄中には造血幹細胞に由来する細胞以外にも、一部間質細胞とよばれる接着系の細胞が存在し、造血幹細胞の機能維持にはたらいっている。これら間葉系の細胞は *in vitro*、*in vivo* で骨芽細胞、軟骨芽細胞、脂肪細胞、骨格筋細胞、心筋細胞などの中胚葉系の細胞に分化するが、近年では一部外胚葉系の神経細胞に分化することが知られるようになり、体性幹細胞とよばれるようになった。なお、一時期造血幹細胞にも多分化能を有することが報告され、造血幹細胞の多分化能が誇張された。これは心臓移植後の剖検心臓を用いた研究よりはじまった。すなわち、女性ドナーから提供された心臓が男性レシピエントに移植され、一定時間後に別の理由で死亡し剖検したところ、心臓内に Y 染色体陽性の心筋細胞が観察されたと報告された。この現象は男性骨髄から多能性幹細胞が心臓に移

動し、心筋に分化したものであろうとされた。しかし、その後細胞融合という現象が報告され、造血幹細胞のみかけの多能性に関しては細胞融合が原因ではないかという否定的な見解が多く示された。

われわれの GFP トランスジェニックマウスを用いた骨髄移植モデルによる検討でも造血幹細胞の多能性に関しては否定的な所見が得られている。すなわち、骨髄移植モデルで心筋細胞に分化する細胞は間葉系幹細胞であると考えられる。

最近のトピックスは骨髄内の成人多能性幹細胞 (multipotent adult progenitor cell : MAPC) であろう。MAPC はミネソタ大学の Verfeillie 教授らのグループ<sup>1)</sup>が報告した多分化能を有する細胞で、あらゆる種類の細胞に分化誘導可能な細胞であると報告されている。MAPC を別のマウスの受精卵の胚盤胞に注射してキメラマウスを形成させると、MAPC は胚性幹細胞と同様にほぼすべての細胞に分化することが報告された。しかし、MAPC の培養法はきわめて細胞密度の薄い条件で培養しないと細胞が分化するとされ、再現性も乏しいことから細胞を *in vitro* で長期間培養することによるアーチファクトではないかとする声もある。MAPC に関しては今後の研究をみたくて慎重に判断されるべきであろう。

#### ④ 心筋内の幹細胞の利用

Anversa らのグループ<sup>2)</sup>は心筋細胞中の幹細胞因子 (stem cell factor : SCF) レセプターである c-kit 陽性の小型細胞を単離して培養すると心筋、平滑筋、内皮細胞に分化すると報告した。この c-kit 陽性細胞は心尖部と心房内に存在、心筋梗塞の発症に伴って梗塞巣に移動し心筋細胞に分化することによって梗塞巣の修復に関与しているのではないかとしている。

また、Schneider らのグループ<sup>3)</sup>は心臓に幹細胞抗原-1 (stem cell antigen-1 : Sca-1) 陽性の細胞が存在し、これらの細胞を DNA 脱メチル化剤の 5-アザシチジンを用いて心筋細胞に分化が可能であることを示し、これらが心筋細胞の前駆細胞ではないかとしている。この Sca-1 陽性細胞は尾静脈より注射すると心筋梗塞部にホーミングするという。さらに Goodell らのグループ<sup>4)</sup>は心臓内に存在する side population (SP) 細胞を採取し

てくると一部の細胞が心筋細胞に分化すると報告した。SP 細胞は Mulligan らのグループ<sup>5)</sup>が骨髄の造血幹細胞を濃縮する方法として開発したもので、DNA 結合色素の Hoechst 33342 の細胞外へのくみ出し能力を指標として幹細胞を分離する方法である。Hoechst 33342 を細胞外にくみ出すポンプは ABC トランスポーターである MRD 1 が関与しているとされ、この蛋白を発現する細胞に幹細胞としての能力が高いとされる。c-kit, Sca-1, MRD 1 自体の構造、機能、発現する細胞をまとめたものを表①に示す。これらの c-kit 陽性細胞、Sca-1 細胞、MRD 1 陽性の SP 細胞は一部重複する性質をもつが、基本的には異なる細胞であると思われ、その存在頻度、生体での機能と存在意義は今後の解決すべき問題であろう。

これらの心臓内に存在する幹細胞が心筋細胞として存在するとして、これらを生体外に取り出して大量培養し、*in vitro* で心筋細胞に分化させて、再移植するには *in vitro* での大量培養法の確立と心筋分化誘導法が必要不可欠のものとなろう。むしろ、生体内で増殖・分化させるほうが現実的である。今後の更なる研究の発展が期待される。

#### ⑤ 再生心筋の移植方法

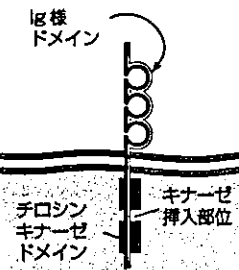
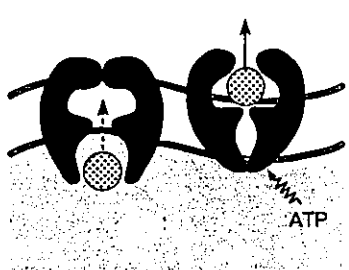
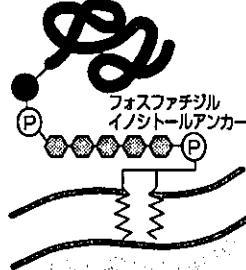
これまでの心臓への再生心筋細胞移植は、*in vivo* で心臓に直接細胞を注射するという方法がとられた。しかし、この方法では生着率が低く、また、移植できる細胞数もかぎられていた。

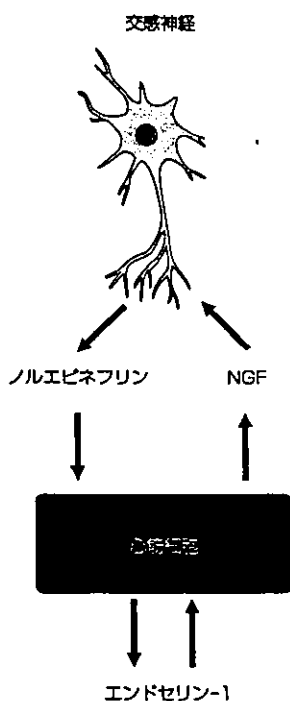
これに対し、東京女子医科大学の岡野 光夫教授らは温度により分子形態が変化し、脂溶性・水溶性が変化する化合物 poly-N-isopropylacryl-amide (PIPAAm) という化合物を用いた。この化合物を培養皿の表面にコーティングして温度感受性培養皿を作成し、これを用いて培養細胞をシート状に回収することに成功した。Shimizu ら<sup>6)</sup>はこの培養皿を用いて心筋細胞シートを作成し、ラット皮下に長期間生着して拍動をつづける層状の心筋組織の開発に成功した。しかし器官としての心臓を再生するには血管や神経支配、催不整脈性などクリアすべき問題も多く、今後の研究を待つことになろう。

#### ⑥ 心臓の交感神経支配の形成

心臓は交感神経の分布密度が高い臓器の 1 つである。

表① c-kit/MRD 1/Sca-1の構造・分布および機能

	c-kit	MRD1	Sca-1
構造	 <p>Ig様ドメイン チロシンキナーゼドメイン キナーゼ挿入部位</p>	 <p>ATP</p>	 <p>フォスファチジルイノシトールアンカー</p>
分布	メラノサイト 肥満細胞 生殖細胞 幹細胞	肝細胞, 胆管細胞 刷子縁細胞 腎尿細管細胞, 癌細胞 脳血管内皮細胞 幹細胞	血管壁 腎皮質細胞 胸腺, 脾臓 Tリンパ球 幹細胞
機能	増殖 遊走 分化 分泌	膜に存在する排出ポンプ アポトーシスの抑制	細胞接着 シグナル伝達 T細胞活性化



図② 心臓と交感神経

交感神経の刺激は心臓に心拍数上昇, 房室伝導の上昇, 陽性変力作用などをもたらす。心臓を支配する交感神経は主として星状神経節の神経細胞の支配を受ける。われわれの近年の解析では, 心臓への交感神経支配は胎性後期に心筋細胞から分泌される神経成長因子 (nerve

growth factor : NGF) を指標にして星状神経節細胞から軸索が伸長してくる。このときに心筋細胞がオートクリンに分泌するエンドセリン-1が心筋細胞自身に作用してET-Aレセプター, Giβγを介して経路でNGFを分泌させることが明らかとなった(図②)。このエンドセリン-1/NGF経路が存在しない場合には心筋細胞に交感神経が伸長せず, さらに星状神経節の交感神経細胞体自身がアポトーシスを起こすことも明らかとなった。上述の問題点をクリアするために, 再神経支配についても今後の研究が待たれる。

### おわりに

上述のように骨髄間葉系幹細胞やES細胞などを用いた心筋細胞の分化誘導が可能になり, また, シート状にした再生心筋の作成も可能となってきた。しかし器官レベルで機能するためにはさらにクリアすべき問題が山積しており, これらが解決されなければ治療に利用できる心筋は作成できない。

しかし近年の進歩はめざましいものがあり, これらがクリアできたとき, 再生心筋の臨床応用の具現化も可能であると確信している。



文 献

- 1) Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL *et al* : Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418 : 41-49, 2002
- 2) Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D *et al* : Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell* 114 : 763-776, 2003
- 3) Oh H, Bradfute SB, Gallardo TD *et al* : Cardiac progenitor cells from adult myocardium : homing, differentiation, and fusion after infarction. *Proc Natl Acad Sci USA* 100 : 12313-12318, 2003
- 4) Jackson KA, Majika SM, Wang H *et al* : Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest* 107 : 1395-1402, 2001
- 5) Goodell MA, Rosenzweig M, Kim H *et al* : Dye efflux studies suggest that hematopoietic stem cells expressing low or undetectable levels of CD34 antigen exist in multiple species. *Nat Med* 3 : 1337-1345, 1997
- 6) Shimizu T, Yamamoto M, Akutsu T *et al* : Electrically communicating three-dimensional cardiac tissue mimic fabricated by layered cultured cardiomyocyte sheets. *J Biomed Mater Res* 60 : 110-117, 2002

## 6. 間葉系幹細胞を用いた心筋再生

板橋 裕史\*・福田 恵一\*<sup>1)</sup>  
Itabashi Yuji Fukuda Keiichi

\*慶應義塾大学医学部循環器内科 <sup>1)</sup>講師

**Summary** 各種の心疾患の終末像である重症心不全に対する唯一の治療法は、心臓移植しか存在しないが、ドナー不足や免疫抑制療法の副作用等の問題点は克服されていない。近年の研究により、骨髄細胞より心筋細胞が分化誘導されることが報告されてきており、さらにその由来として、骨髄間質細胞中の多能性幹細胞が注目されている。これらの分化誘導された心筋細胞を心臓へ移植したり、分化を促進するサイトカインを投与したりすることによって、心機能を改善させようとする試みがなされている。

### はじめに

心筋梗塞や拡張型心筋症などの広範囲に及ぶ、心筋障害を原因とした各種の心疾患の最終病像は、心筋細胞の喪失や機能低下に伴う収縮力不足による心不全である。種々の薬物療法では十分な心機能の改善が望めない程の重篤な心不全では、現時点では、心臓移植以外に確立された治療法は存在しない。しかし、米国においても数多くの心臓移植対象患者がいるものの、移植の恩恵にあずかれるのはその中の極一部にとどまっており、心臓移植療法においても慢性的なドナー不足が深刻な問題となっている。また、心臓移植には免疫拒絶、感染症、発癌などの解決せねばならない問題

も存在する。移植に変わる治療方法の開発が切望される中で、各種の多能性幹細胞を用いた再生医学に大きな期待が寄せられている。しかし、心筋細胞は生体内で最終分化した細胞であり、それ自体が増殖しない細胞であると考えられ、今日に至るまで心筋細胞の再生は極めて困難であるとされてきた。近年、骨髄細胞や胚性幹細胞 (embryonic stem cell: ES細胞) をはじめとした、各種の幹細胞から心筋細胞を分化誘導する報告が相次いでなされるようになり、中でも我々は、骨髄間葉系幹細胞を用いることにより心筋細胞が再生されることを報告している。本稿では、心筋梗塞による心不全への治療として期待される、様々な幹細胞を用いた心筋再生、再生心筋細胞移植の実際

(略語一覧)

ES細胞 (embryonic stem cell; 胚性幹細胞)

について、今後の展望を踏まえ述べる。

## 1. 心筋細胞再生のための治療戦略

心筋細胞は生後2週間くらいまで分裂増殖し、その後は細胞分裂を行わず、個々の細胞が増大する事によって心臓全体が大きくなり成人の心臓が形成される。骨格筋細胞の研究において、MyoDという転写因子が発生の段階で発現し、骨格筋細胞の形成に重要な役割を果たしていることが判明している<sup>1)</sup>。この遺伝子は、他の細胞に導入し強制発現させると、その細胞が骨格筋細胞に形質転換するという性質を持つことから、マスター遺伝子と呼ばれた。MyoDの発見以来、心筋細胞におけるマスター遺伝子を単離する試みがなされたが、その結果、マスター遺伝子こそ単離されはしなかったものの、心筋細胞の発生に重要な遺伝子として *Nkx-2.5*, *GATA4*, *MEF2C*, *eHAND*, *TEF-1* などの心筋組織の形成において重要な役割を果たす遺伝子が次々に発見され<sup>2-4)</sup>、心筋細胞の発生メカニズムの解明へ大きく貢献した。これらの遺伝子の導入により生理的な心筋細胞発生分化のプログラムを再現できれば、非心筋細胞の心筋細胞への分化誘導が実現できるのではないかと期待されている。

他の心筋再生の方法として、細胞の分裂増殖をつかさどる遺伝子を導入することにより、一度最終分化に至り増殖する能力を失った心筋細胞に、再び細胞分裂能を獲得させるという試みがある。細胞の分裂増殖にはサイクリン、サイクリン依存性キナーゼ (cyclin-dependent kinase: CDK) などの細胞周期調節遺伝子、癌抑制遺伝子などの細胞周期にかかわる遺伝子が関与しているが、これまで細胞周期調節遺伝子や発癌ウィルスの腫瘍抗原 (SV40 large T 抗原など) を心筋細胞に遺伝子

導入する事で、分裂増殖可能な心筋細胞を作成する研究がなされている<sup>5)</sup>。

そして第3の方法として、各種の多能性幹細胞から心筋細胞を分化誘導させる方法が挙げられるが、その際に用いられる幹細胞としては、体性幹細胞としての骨髄間葉系幹細胞とES細胞に期待が寄せられている。ES細胞の増殖能は著しく、心筋細胞へ効率的に分化誘導を行う技術が確立されれば、細胞供給源として極めて有用となる可能性を秘めている。しかし、ES細胞を作成する際に倫理的な問題が生じること、移植後の拒絶を回避するためには、宿主と同一の遺伝子を持ったES細胞を用いる必要があるが、そうしたES細胞を作成するのにあたり、表現形に異常をきたさずに核移植を行う手法が確立されるまでには、まだしばらく時間を要するであろうことなどが、現在の障害となっている。こうした背景の中で、宿主由来の間葉系幹細胞を用いて心筋細胞を再生させる手法は倫理的な問題がなく、拒絶の心配もないことから臨床への応用を考えた際に理想的な方法といえる(表1)。

## 2. 心筋細胞の再生

### 1) 体性幹細胞を用いた心筋細胞の再生

近年の研究により、成人の組織においても様々な臓器において、未分化幹細胞が残存していることが明らかになった。間葉系の幹細胞としては、骨髄中の幹細胞が注目されている。骨髄の細胞は、将来血球に分化する造血幹細胞とこれに由来する各種の血球系細胞、そしてこの血球系細胞を支持するための骨髄間質細胞より構成される。骨髄間質細胞は多彩なサイトカイン・細胞増殖因子等を分泌し、また造血幹細胞が生存・機能している微小環境を構築し、血球系細胞の再生・増殖・

【略語一覧】

CDK (cyclin-dependent kinase; サイクリン依存性キナーゼ)



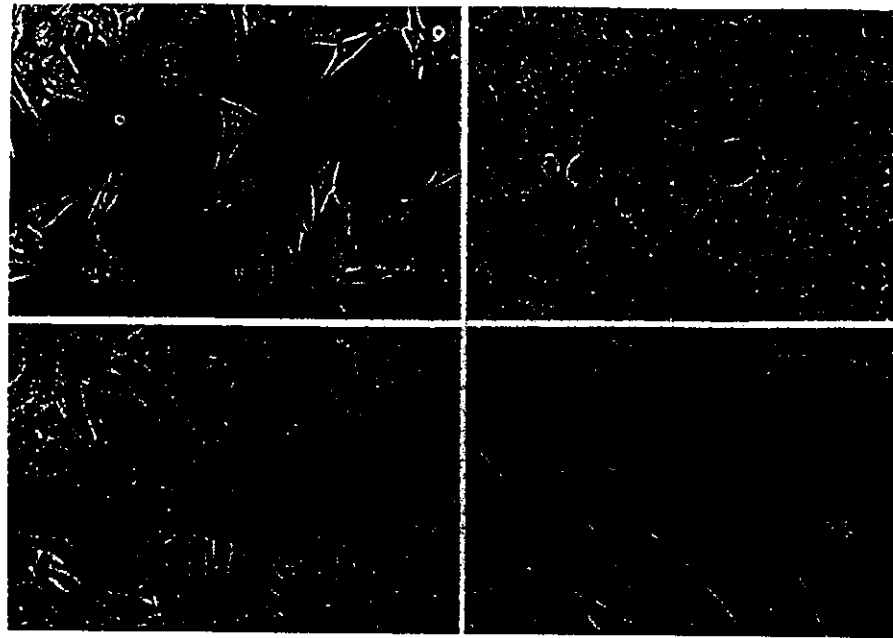


図1 最終分化誘導における CMG 細胞の位相差顕微鏡写真

5-アザシチデンによる、最終分化誘導後の CMG 細胞像。(左上) 5-アザシチデン投与前の CMG 細胞。線維芽細胞に似た様相を呈する。(右上) 5-アザシチデン投与後 1 週間後の CMG 細胞。(左下) 5-アザシチデン投与後 2 週間後の CMG 細胞。棒状に形態変化した細胞が認められる。(右下) 5-アザシチデン投与後 3 週間後の CMG 細胞。ネットワークを形成した細胞が同期した自律収縮を示す。(パネル内の線は 100  $\mu$ m を示す。)

性ナトリウム利尿ペプチド (brain natriuretic peptide : BNP) を発現していた。

心筋細胞は筋肉が収縮するための蛋白として  $\alpha$ -アクチン、ミオシン重鎖、ミオシン軽鎖などを持っているが、これらの収縮蛋白にはいくつかのアイソフォームが存在しているが、それは胎児(胎仔)期と成人(成獣)期、あるいは心房と心室などで筋肉の収縮速度、エネルギー効率などが異なり、それぞれに都合の良い条件を整えるためと考えられている。生体内の心筋細胞と CMG 細胞の収縮蛋白のアイソフォームを表 2 に示した。

心筋細胞に分化した CMG 細胞の場合、上記の様にアイソフォームの発現様式は  $\alpha$ -アクチンの場合 Skeletal 型 > Cardiac 型、ミオシン重鎖の場

合  $\beta$  型 >  $\alpha$  型であった。ミオシン軽鎖では 2v 型が発現しているのに対し、2a 型の発現はみられなかった。また、CMG 細胞では分化誘導後にはナトリウム利尿ペプチドである ANP、BNP の発現が観察された。心筋収縮蛋白質の発現様式より判断すると、CMG 細胞の心筋細胞としての表現型は、胎仔型心室筋細胞の形質をもつと考えられた。

心筋細胞は自律神経の作用により、心拍数の変動、心収縮力の調整、興奮伝播速度の調節が行われる。交感神経と副交感神経は神経終末よりノルエピネフリンとアセチルコリンを分泌する。一方、心筋側はノルエピネフリンの  $\alpha 1$ 、 $\beta 1$ 、 $\beta 2$  受容体、アセチルコリンのムスカリン型 M1、

《略語一覧》

BNP (brain natriuretic peptide ; 脳性ナトリウム利尿ペプチド)



表2 心筋収縮蛋白のアイソフォームから見たCMG細胞の表現型

skelatal	cardiac	skelatal > cardiac	skelatal	cardiac	skelatal > cardiac
$\alpha$ 型 > $\beta$ 型	$\alpha$ 型	$\beta$ 型 > $\alpha$ 型	$\alpha$ 型 > $\beta$ 型	$\alpha$ 型	$\beta$ 型 > $\alpha$ 型
2a	2a	2v	2v	2v	2v

表3 CMG細胞由来再生心筋細胞の受容体発現と受容体刺激による効果

$\alpha$ 受容体			$\beta$ 受容体		ムスカリン受容体	
$\alpha$ 1A	$\alpha$ 1B	$\alpha$ 1D	$\beta$ 1	$\beta$ 2	M1	M2
最終分化誘導前より(漸増)	最終分化誘導前より(不変)	最終分化誘導前より(漸減)	最終分化誘導後1週より	最終分化誘導後1週より	最終分化誘導後1週より	最終分化誘導後1週より
ERK活性化	ERK活性化	ERK活性化	cAMP上昇	cAMP上昇	IP3上昇	IP3上昇
肥大作用			心拍数上昇, 心収縮力増強			

M2受容体を発現し、神経とシナプスを形成する。CMG細胞ではノルエピネフリンの $\alpha$ 1受容体を最終分化前より発現し、ノルエピネフリンの $\beta$ 1、 $\beta$ 2受容体、アセチルコリンM1、M2受容体を心筋細胞の形質獲得後には発現していた。また、これらの受容体は細胞内シグナル伝達機構も有していた<sup>1)</sup>(表3)。

3) サイトカインを用いた心筋細胞再生の促進  
 骨髄由来の幹細胞が、心筋細胞に分化することが判明してから、様々なサイトカインを用いて心筋再生を促進する試みがなされてきた。なかでも顆粒球コロニー増殖因子 (granulocyte-colony-stimulating factor: G-CSF) は、骨髄から末梢血中への幹細胞の動員を促進することによって、障害心筋領域での心筋再生が増加する作用があると

期待された。G-CSFが心筋再生に及ぼす影響を確認するために、我々は共同研究により致死量の放射線照射を行い、宿主の骨髄細胞を死滅させたマウスにEGFP (enhanced green fluorescence protein) を発現する全骨髄細胞を移植した後に心筋梗塞を作成し、G-CSFの投与の有無により骨髄細胞から再生される心筋細胞がどのように変化するかを調査した。その結果、心筋梗塞作成後10日間G-CSFを投与したマウスでは、梗塞巣周辺においてEGFPを発現する心筋細胞、すなわち骨髄由来の再生心筋細胞が166倍に増加していた。また、骨髄中の幹細胞から心筋細胞が分化誘導されることが報告されて以来、造血幹細胞と骨髄間質細胞のどちらが再生心筋細胞の由来となっているかが、しばしば議論されてきた。我々は、再生心

〈略語一覧〉

G-CSF (granulocyte-colony-stimulating factor ; 顆粒球コロニー増殖因子)  
 EGFP (enhanced green fluorescence protein)

筋細胞へと分化した多能性幹細胞がいずれの由来であるかを調べるために放射線照射を行い、骨髄細胞を死滅させたマウスの骨髄中に、心筋細胞に分化した際にEGFPを発現するように遺伝子導入を行ったCMG細胞(骨髄間質細胞由来)を移植し、心筋梗塞を作成した後にG-CFSを投与したモデルでは、心筋梗塞巣の周囲に多くのEGFP陽性心筋細胞が認められた。これらの結果からG-CFSは心筋梗塞巣において、骨髄幹細胞からの心筋再生を促進し、心機能を改善する効果があること、これらの再生心筋細胞は造血幹細胞ではなく骨髄間質細胞より分化している可能性が高いことが示された<sup>10)</sup>。

## おわりに

成人の組織内に存在する多能性幹細胞の分化能が研究されるに従い、これらは組織再生の有力な材料であり、これまで不可能と考えられていた心筋組織の再生が実現の可能性を帯びてきた。しかし、心筋の再生に関してはまだ動物モデルのみの報告も少なくなく、ヒトに臨床応用するにはまだ解決すべき課題も多く残されている。

循環器領域における再生医療の分野でも、心筋再生治療に関する研究は着実に進んでおり、実際に骨髄細胞、筋芽細胞などを用いた臨床試験が欧米では次々に行われている。これらの臨床試験においては心機能が改善されたなど、おおむね良好な結果が報告されているようである。しかし、これらの細胞移植研究において、心機能改善の機序に関してはリモデリングの防止や血管新生の促進など、さまざまなメカニズムが考えられており、心筋再生自体が心機能の改善に、どの程度貢献しているのかは未だ不明である。

原疾患を問わず、重篤な心不全に陥った心臓をよみがえらせるためには、心筋組織の再生が不可

欠である。今後、各種の多能性幹細胞から心筋が再生される機序がより詳細に解明され、臨床応用にたどり着く日が来ることが切望されている。

## 文献

- 1) Runicki MA, et al: MyoD or Myf-5 is required for the formation of skeletal muscle. *Cell* 75: 1351-1359, 1993
- 2) Komuro I, Izumo S: Csx: a murine homeobox-containing gene specifically expressed in the developing heart. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:8145-8149, 1993
- 3) Lints TJ, et al: Nkx-2.5: a novel murine homeobox gene expressed in early heart progenitor cell and their myogenic descendans. *Development* 119: 969, 1993
- 4) Kuo CT, et al: GATA4 transcription factor is required for ventral morphogenesis and tube formation. *Genes Dev* 11: 1061-1072, 1997
- 5) Lin Q, Schwarz J, Bucana C, Olson EN: Control of mouse cardiac morphogenesis and myogenesis by transcription factor MEF2C. *Science* 276: 1404-1407, 1997
- 6) Firulli AB, et al: Heart and extra-embryonic mesodermal defects in mouse embryos lacking the bHLH transcription factor Hand1. *Nat Genet* 18: 266-270, 1998
- 7) Leferovich JM, et al: Heart regeneration in adult MRL mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 9830-9835, 2001
- 8) Makino S, et al: Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells *in vitro*. *J Clin Invest* 103: 697-705, 1999
- 9) Hakuno D, et al: Bone Marrow-Derived Regenerated Cardiomyocytes (CMG Cells) Express Functional Adrenergic and Muscarinic Receptors. *Circulation* 105: 380-386, 2002
- 10) Kawada H, et al: Nonhematopoietic mesenchymal stem cells can be mobilized and differentiate into cardiomyocytes after myocardial infarction. *Blood* 104: 3581-3587, 2004

## **Endothelial progenitor cells: past, state of the art, and future**

**Yo Iwami<sup>a</sup>, Haruchika Masuda<sup>a</sup>, Takayuki Asahara<sup>a,b</sup> \***

<sup>a</sup> *Department of Regenerative Medicine Science, Tokai University School of Medicine,  
Bohseidai, Isehara, Kanagawa, Japan*

<sup>b</sup> *Stem Cell Translational Research, Kobe Institute of Biomedical Research and Innovation/RIKEN  
Center of Developmental Biology, Chuo-Ku,  
Kobe, Hyogo, Japan*

*Received: October 10, 2004; Accepted: November 8, 2004*

- **Introduction**
- **Post-natal vasculogenesis**
- **Profiles of EPCs in adults**
- **Regulation of EPC Mobilization**
  - **EPC kinetics in adults**
  - **EPC mobilization by endogenous agents**
  - **EPC mobilization by exogenous agents**
- **Therapeutic potential of EPC transplantation**
  - **Indications of EPC transplantation**
  - **Cell source and modification of EPC for transplantation**
  - **Gene modified EPC therapy**
- **EPC preview**
- **Conclusion**

### **Abstract**

Recent evidences suggest that endothelial progenitor cells (EPCs) derived from bone marrow (BM) contribute to *de novo* vessel formation in adults occurring as physiological and pathological responses. Emerging preclinical trials have shown that EPCs home to sites of neovascularization after ischemic events in limb and myocardium. On the basis of these aspects, EPCs are expected to develop as a key strategy of therapeutic applications for the ischemic organs. Such clinical requirements of EPCs will tentatively accelerate the translational research aiming at the devices to acquire the optimized quality and quantity of EPCs. In this review, we attempt to discuss about biological features of EPCs and speculate on the clinical potential of EPCs for therapeutic neovascularization.

**Keywords:** endothelial progenitor cell (EPC) - vasculogenesis - angiogenesis - therapeutic neovascularization - cardiovascular disease - cell therapy

---

\* Correspondence to: Takayuki ASAHARA  
Present address: Department of Regenerative Medicine  
Science, Tokai University School of Medicine,

Bohseidai, Isehara, Kanagawa 259-1193, Japan.  
Tel.: (+81) 463-96-1121(ext. 2597), Fax: (+81) 463-95-0961  
E-mail: asa777@aol.com

## Introduction

The identification of EPCs derived from BM was an outstanding event of stem cell biology in the field of vascular biology. This unique cell population existing in peripheral blood mononuclear cells (PBMNCs) derived from BM shares a similar profile to that of hematopoietic stem cells (HSCs) and incorporates into foci of physiological or pathological neovascularization in response to various angiogenic growth factors. Considering the importance of blood vessel formation on embryonic organogenesis, the development of tissue and organ regeneration could not be able to be realized without understanding the biological mechanisms of vasculogenesis by EPCs. This review provides an update of EPC biology as well as highlighting their potential utility for therapeutic neovascularization.

## Post-natal vasculogenesis

EPCs, HSCs related descendants, have been isolated from human adult PBMNCs [1, 2]. Flk-1 and CD34 antigens were used to detect putative EPCs [3]. This methodology was supported by former findings that embryonic HSCs and EPCs share certain antigenic determinants, including Flk-1, Tie-2, c-Kit, Sca-1, CD133, and CD34. These progenitor cells have consequently been considered to be derived from a common precursor, putatively termed 'hemangioblast'.

In vitro, EPCs differentiated into endothelial lineage cells, and in animal models of ischemia, heterologous, homologous, and autologous EPCs were shown to incorporate into sites of active neovascularization. This finding was followed by diverse identifications of EPCs by several groups [4–7] using equivalent or different methodologies. Recently, similar studies with EPCs isolated from human cord blood have demonstrated their analogous differentiation into ECs in vitro and in vivo [8, 9]. These findings, together with other recent studies [10, 11], are consistent with the notion of post-natal "vasculogenesis", which is de novo vessel formation by *in situ* incorporation, differentiation, migration, and/or proliferation of BM-derived EPCs [3] (Fig. 1).

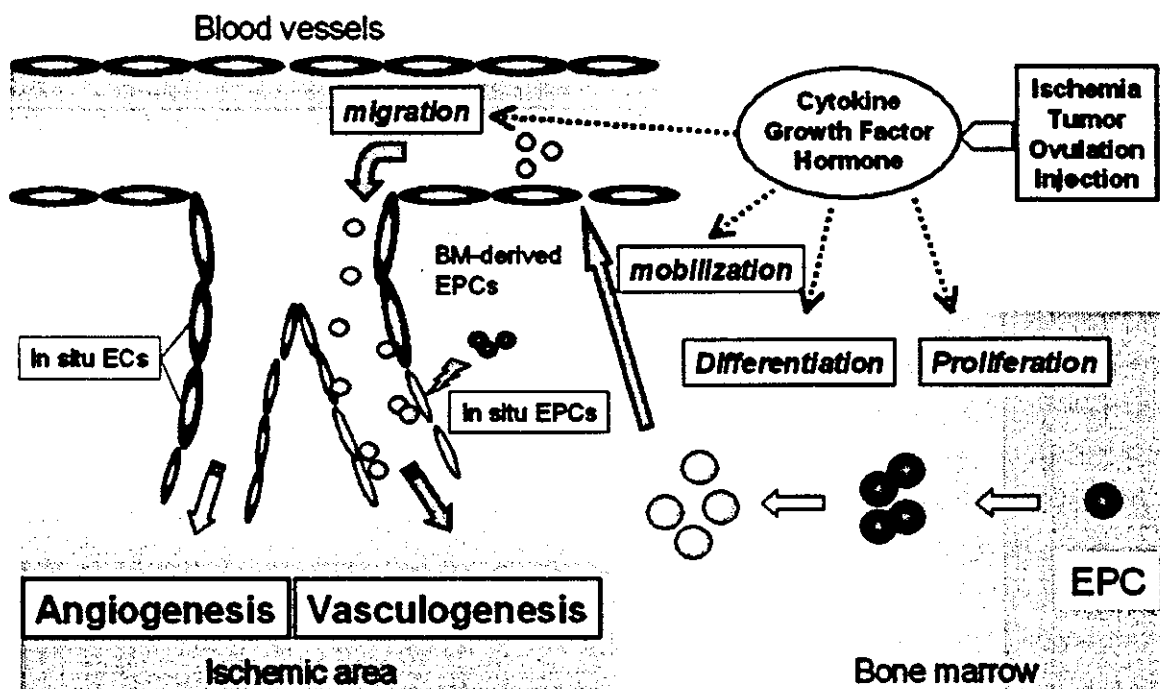
Several studies have demonstrated that BM-derived EPCs functionally contribute to vasculogenesis during wound healing [12], limb ischemia [1, 3, 13–17], postmyocardial infarction [18, 19], endothelialization of vascular grafts [2, 12, 20, 21], or physiological cyclic organogenesis of endometrium [3] under the influence of appropriate cytokines, growth factors and/or hormones through the autocrine, paracrine, and/or endocrine systems.

These findings have raised important questions regarding fundamental concepts of blood vessel growth and development in adult subjects. Does the differentiation of EPCs *in situ* (vasculogenesis) play an important role in adult neovascularization, and would impairments in this process lead to clinical diseases? There is now a strong body of evidence suggesting that vasculogenesis does, in fact, make a significant contribution to postnatal neovascularization. Recent studies with animal bone marrow transplantation (BMT) models in which BM (donor)-derived EPCs could be distinguished have shown that the contribution of EPCs to neovessel formation may range from 5 to 25% in response to granulation tissue formation [22] or growth factor-induced neovascularization [23]. Also, in the tumor neovascularization, the range is approximately 35–45% higher than the former events [24]. The degree of EPC contribution to post-natal neovascularization is predicted to depend on each vessel formation event or disease.

More recently, Tamaki et al. reported that tissue specific stem/progenitor cells with the potency of differentiation into myocytes or ECs were isolated in skeletal muscle tissue of murine hindlimb, although the origin remains to be clarified [25]. This studies have introduced the concept that the origin of EPCs may not be limited to BM, *e.g.* tissue specific stem/progenitor cells possibly provide '*in situ* EPCs' as other sources of EPCs than BM. (Fig. 1)

## Profiles of EPCs in adults

Since the initial report of EPCs [1][2], a number of groups have set out to define this cell population more profoundly. Because EPCs and HSCs share many surface markers, and no simple definition of EPCs exists, various methods of EPC isolation have



**Fig. 1** Post-natal neovascularization in the physiological or pathological events is consistent with neovessel formation contributed by angiogenesis and vasculogenesis at the various rates between their two mechanisms. Angiogenesis and vasculogenesis are due to the activations of *in situ* ECs and BM-derived or *in situ* EPCs, respectively.

been reported [1, 2, 4, 6–9, 15, 16]. The term of EPC may therefore encompass a group of cells that exist in a variety of stages ranging from heman-gioblast to fully differentiated endothelial cell (EC).

Under the current status, it is impossible to differentiate ‘immature EPCs’ from primitive HSCs, as those cells share common surface markers, i.e. CD133, CD34, or VEGFR2 (KDR). In circulation, the cell population with the capacity of differentiation to EPCs is considered to be included in the cell population expressing CD133 and VEGFR2 markers in the subset of CD34 positive cells [7]. Circulating EPCs are constitutively expressing stem/progenitor markers, i.e. CD34 or VEGFR2 except CD133, and start expressing endothelial lineage specific markers, VE cadherin or E-selectin. On the other hand, following the commitment and differentiation to hematopoietic stem/progenitor cells, the surface markers of CD133 and VEGFR2 are extinguished. Such stem/progenitor cell markers do not express on the differentiated hematopoietic cells. Alternatively, kinds of surface markers are expressed to characterize individual hematopoietic cell populations. CD133 is a marker to differ-

entiate immature EPCs or primitive HSCs from circulating EPCs. To differentiate EPCs from hematopoietic stem/progenitor cells, VE cadherin or E-selectin are useful. Accordingly, circulating EPCs may be isolated via selection by the antigenicity of CD34, VEGFR2, and/or VE cadherin and also circulating immature EPCs by CD133 (Fig. 2).

In adult human body, there is a strong evidence to suggest that impaired neovascularization results in part from diminished cytokine production. However, endogenous expression of cytokines is not the only factor leading to impaired neovascularization. Diabetic or hypercholesterolemic animals-like clinical patients-exhibit the evidence of dysfunction in mature endothelial cells. While the cellular dysfunction does not necessarily preclude a favorable response to cytokine replacement therapy, the extent of recovery in limb perfusion in these animals fails to reach that of control animals; this suggests another limitation imposed by a diminished responsiveness of EPCs/ECs. Recently Vasa *et al.* have further investigated EPC kinetics and their relationship to clinical disorders, showing that

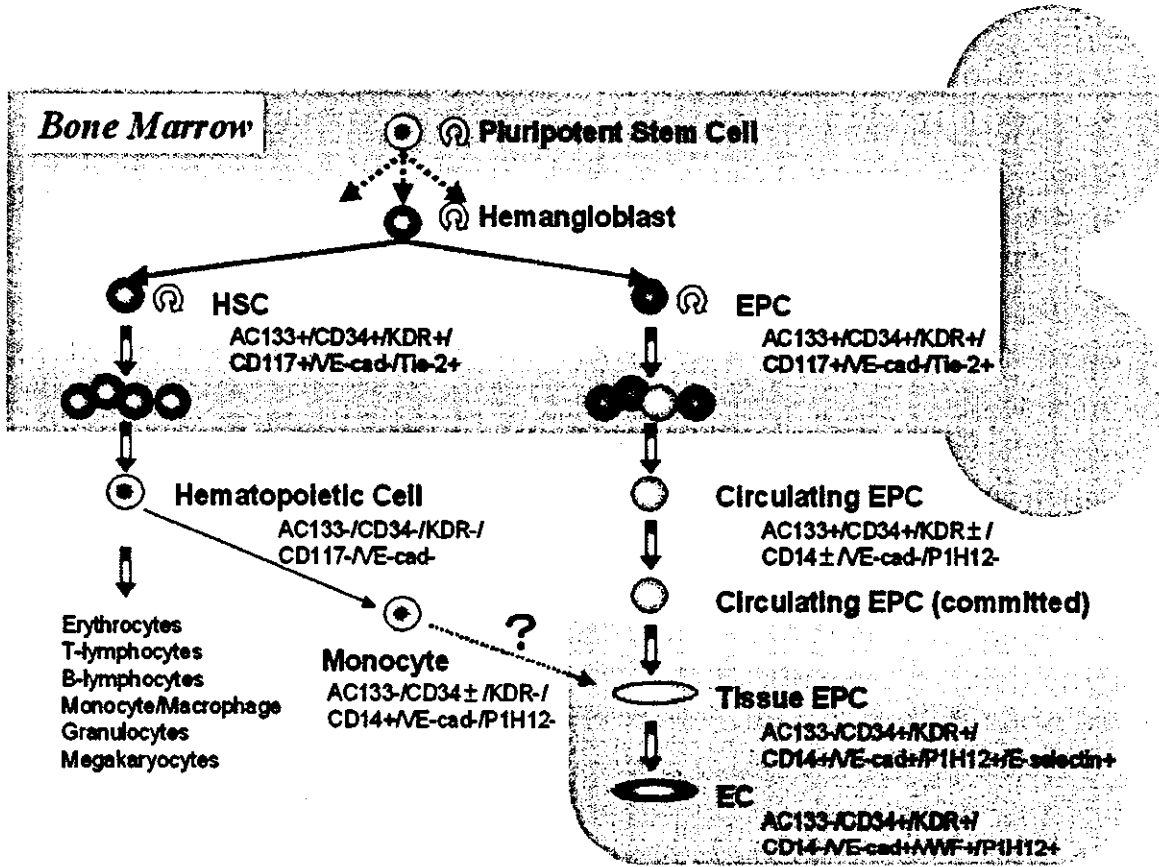


Fig. 2 Putative cascade and expressional profiles of human bone marrow-derived endothelial progenitor cell differentiation. (+: positive, -: negative).

the number and migratory activity of circulating EPCs inversely correlate with risk factors for coronary artery disease, such as smoking, family history and hypertension [26]. Tepper *et al.* reported that proliferation and tube formation of EPCs were down regulated in patients with type 2 diabetes compared with normal subjects [27]. Valgimigli *et al.* indicated that circulating EPCs decreased in patients with severe heart failure (HF) [28]. On the basis of these findings, monitoring of BM-derived EPC kinetics in the patients with vascular diseases is expected to be valuable in the evaluation of lesion activity and/or therapeutic efficacy.

The aging characterized by impaired neovascularization might be also associated with dysfunctional EPCs and defective vasculogenesis. Indeed, preliminary results from our laboratory indicated that the replacement of native bone marrow (including its compartment of progenitor cells) of

young mice with bone marrow transplanted from old animals leads to a marked reduction in neovascularization following corneal micropocket injury, compared with young mice transplanted with young bone marrow. These studies thus established evidence of an age-dependent impairment in vasculogenesis (as well as angiogenesis) and the origin of progenitor cells as a critical parameter influencing neovascularization. Moreover, analysis of clinical data in older patients disclosed a significant reduction in the number of circulating EPCs before and after VEGF165 gene transfer; specifically, the number of circulating EPCs of younger patients with critical limb ischemia was five times more than the number in older individuals. Impaired EPC mobilization and/or activity in response to VEGF may thus contribute to the age-dependent defect in postnatal neovascularization.

## Regulation of EPC Mobilization

### EPC kinetics in adults

Given the result of common antigenicity, BM has been considered the origin of EPCs as HSCs in adults. The BMT experiments have demonstrated the incorporation of BM-derived EPCs into foci of physiological and pathological neovascularization [3]. Wild-type mice were lethally irradiated and transplanted with BM harvested from transgenic mice in which constitutive LacZ expression is regulated by an EC-specific promoter: Flk-1 or Tie-2. Histological examination of the tissues in growing tumors, healing wounds, ischemic skeletal and cardiac muscles, and cornea micropocket surgery after BMT has shown localization of Flk-1- or Tie-2-expressing endothelial lineage cells derived from BM in blood vessels and stroma around vasculatures. The similar incorporation was observed in physiological neovascularization in uterus endometrial formation after induced ovulation as well as estrogen administration [3].

Previous investigators have shown that wound trauma causes mobilization of hematopoietic cells, including pluripotent stem or progenitor cells in spleen, bone marrow, and peripheral blood. Consistent with EPC/HSC common ancestry, the recent data have shown that mobilization of BM-derived EPCs constitutes a natural response to tissue ischemia. The former murine BMT model presented the direct evidence of enhanced BM-derived EPC incorporation into foci of corneal neovascularization after the development of hindlimb ischemia. Light microscopic examination of corneas excised 6 days after micropocket injury and concurrent surgery to establish hindlimb ischemia demonstrated a statistically significant increase in cells expressing -galactosidase in the corneas of mice with, versus those without, an ischemic limb [17]. This finding indicates that circulating EPCs are mobilized endogenously in response to tissue ischemia, following the incorporation of EPCs into the foci neovascularization to promote tissue repair. Moreover, such concept were also reflected in clinical findings of EPC mobilization in patients with coronary artery bypass grafting, burns [12], and acute myocardial infarction [19].

## EPC mobilization by endogenous agents

Having demonstrated the potential for endogenous mobilization of BM-derived EPCs, we considered that artificial expansion and mobilization of this putative EC precursor population might represent an effective means to augment the resident population of ECs that is competent to respond to administered angiogenic cytokines. Such a program might thereby address the issue of endothelial dysfunction or depletion that may compromise strategies of therapeutic neovascularization in older, diabetic, and/or hypercholesterolemic animals and patients. Granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) is well known to stimulate hematopoietic progenitor cells and myeloid lineage cells, but has recently been shown to exert a potent stimulatory effect on EPC kinetics. The delivery of this cytokine induced EPC mobilization and enhanced neovascularization of severely ischemic tissues and de novo corneal vascularization [17].

Among other growth factors, vascular endothelial growth factor (VEGF), critical for angio/vasculogenesis in the embryo, has recently been shown to be the critical factor for vasculogenesis and angiogenesis. Our studies carried out first in mice [13] and subsequently in patients undergoing VEGF gene transfer for critical limb or myocardial ischemia [29] established that a previously unappreciated mechanism by which VEGF contributes to neovascularization is in part by mobilizing BM-derived EPCs. Similar modulation of EPC kinetics has been observed in response to other hematopoietic stimulators, such as granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF), angiopoietin-1 [30], stroma-derived factor-1 (SDF-1) [31], and erythropoietin [32], or endogenous hormone, estrogen [33, 34].

## EPC mobilization by exogenous agents

This potent therapeutic strategy of EPC mobilization has recently been implicated not only by natural hematopoietic or angiogenic stimulants but also by recombinant pharmaceuticals. The statins inhibit the activity of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase, which catalyzes the synthesis of mevalonate, a rate-limiting step in cholesterol biosynthesis. The statins rapidly activate Akt signaling in ECs, thereby stimulating EC

bioactivity *in vitro* and enhancing angiogenesis *in vivo* [35]. Recently, we [36] and Dimmeler and colleagues [37] demonstrated a novel function for HMG-CoA reductase inhibitors that contributes to postnatal neovascularization by augmented mobilization of BM-derived EPCs through stimulation of the Akt signaling pathway. With regard to its pharmacological safety and effectiveness on hypercholesterolemia, one of the risk factors for atherogenesis, the statin might be a potent medication against atherosclerotic vascular diseases.

On the other hand, some antiangiogenic agents, *i.e.* angiostatin or soluble flk-1, have been shown to inhibit BM-derived EPC kinetics, leading to tumor regression, as BM-derived EPC kinetics is a critical factor for tumor growth, in terms of tumor neovascularization [38].

### Therapeutic potential of EPC transplantation

The regenerative potential of stem cells is presently under intense investigation. *In vitro*, stem and progenitor cells possess the capability of self-renewal and differentiation into organ-specific cell types. When placed *in vivo*, these cells are then provided with the proper milieu that allows them to reconstitute organ systems. We therefore considered a novel strategy of EPC transplantation to provide a source of robust ECs that might supplement fully differentiated ECs thought to migrate and proliferate from preexisting blood vessels according to the classic paradigm of angiogenesis developed by Folkman and colleagues.

Although it is not known whether local administration of exogenous EPCs may augment tumor neovascularization, this issue should be carefully considered for clinical application of EPC cell therapy to treat cardiovascular diseases.

### Indications of EPC transplantation

Three kinds of clinical states could be currently applied to indications of EPC transplantation, (1) Critical limb ischemia such as arteriosclerosis obliterans (ASO) or Burger disease, (2) Post myocardial infarction which is excluded from percutaneous

catheter intervention (PCI) or coronary artery bypass grafting (CABG), (3) Vascular graft as a means of improving biocompatibility.

(1) Our studies indicated that cell therapy with *ex vivo* expanded EPCs could successfully promote neovascularization of ischemic tissues, even when administered as 'sole therapy,' *i.e.* in the absence of angiogenic growth factors. Such a 'supply-side' version of therapeutic neovascularization in which the substrate (EPCs/ECs) rather than ligand (growth factor) comprises the therapeutic agent, was first demonstrated by intravenously transplanting human EPCs to immunodeficient mice with hindlimb ischemia [15]. Not only did the heterologous cell transplantation improve neovascularization and blood flow recovery, but also led to important biological outcomes-notably, the reduction of limb necrosis and auto-amputation by 50% in comparison with controls. Murohara *et al.* reported similar findings in which human cord blood-derived EPCs also augmented neovascularization in a hindlimb ischemic model of nude rats, followed by *in situ* transplantation [9]. In addition, Shatteman *et al.* [16] conducted local injection of freshly isolated human CD34<sup>+</sup> MNCs into diabetic nude mice with hindlimb ischemia and showed an increase in the restoration of limb flow. These findings provided novel evidence that exogenously administered EPCs rescue impaired neovascularization in an animal model of critical limb ischemia.

(2) A similar strategy with limb ischemia applied to a model of myocardial ischemia in the nude rat demonstrated that transplanted human EPCs localize to areas of myocardial neovascularization, differentiate into mature ECs and enhance neovascularization. These findings were associated with preserved left ventricular (LV) function and diminished myocardial fibrosis [39]. Kocher *et al.* attempted intravenous infusion of freshly isolated human CD34<sup>+</sup> MNCs into nude rats with myocardial ischemia, and found preservation of LV function associated with inhibition of cardiomyocyte apoptosis [40]. These strategies resulted in preservation of LV function associated with inhibition of cardiomyocyte apoptosis. These experimental findings obtained using immunodeficient animals suggest that both cultured and freshly isolated human EPCs have therapeutic potential in peripheral and coronary artery diseases.



(3) EPCs have recently been applied to the field of tissue engineering as a means of improving biocompatibility of vascular grafts. Artificial grafts first seeded with autologous CD34<sup>+</sup> cells from canine bone marrow and then implanted into the aorta were found to have increased surface endothelialization and vascularization compared with controls [20]. Similarly, when cultured autologous ovine EPCs were seeded onto carotid interposition grafts, the EPC-seeded grafts achieved physiological motility and remained patent for 130 days vs. 15 days in nonseeded grafts [21].

### Cell source and modification of EPC for transplantation

A critical limitation for the therapeutic application of postnatal EPCs is their low number in the circulation. Especially patients with cardiovascular risk factors, aging, or HF who are the candidate for cell therapy have been considered to possess lower EPCs.

*Ex vivo* expansion of EPCs cultured from PBMCs of healthy human volunteers typically yields  $5.0 \times 10^6$  cells per 100 ml of blood on day 7. Our animal studies [15] suggest that heterologous transplantation requires systemic injection of  $0.5\text{--}2.0 \times 10^4$  human EPCs/g body weight of the recipient animal to achieve satisfactory reperfusion of an ischemic hindlimb. Rough extrapolation of these data to human suggests that a blood volume of as much as 12 l may be necessary to obtain adequate numbers of EPCs to treat critical limb ischemia in patients.

Considering autologous EPC therapy, certain technical improvements that may help to overcome the primary scarcity of a viable and functional EPC population should include: (1) local delivery of EPCs, (2) adjunctive strategies (e.g. growth factor, cytokine, or drugs) to promote BM-derived EPC mobilization [13, 17], (3) enrichment procedures, *i.e.* leukapheresis or BM aspiration, or (4) enhancement of EPC function by gene transduction, (5) *ex vivo* expanded EPCs from self-renewable primitive stem cells in BM or other tissues, (6) allogenic EPCs derived from umbilical cord blood (Fig. 3).

These approaches of EPC modification to acquire the ideal quality and quantity of EPCs for

EPC therapy have already been applied to clinical patients in some institutions and preliminary results are expected to come out in the near future.

In some cases, nonselected total BM cells or BM-MNCs including immature EPC population have also been investigated for their potential to induce neovascularization. Several experiments have reported that autologous BM administration into hindlimb ischemic model and myocardial ischemic model, and could augment neovascularization in ischemic tissue mainly through the production of angiogenic growth factors and less through the differentiation of a portion of the cells into EPCs/ECs *in situ*. Although there are no long-term safety and efficacy data for local delivery of such cell population mostly composed of inflammatory leukocytes, these strategies have already been investigated in some institutions.

### Gene modified EPC therapy

A strategy that may alleviate potential EPC dysfunction in ischemic disorders is considered reasonable, given the findings that EPC function and mobilization may be impaired in certain disease states. Genetic modification of EPCs to overexpress angiogenic growth factors, to enhance signaling activity of the angiogenic response, and to rejuvenate the bioactivity and/or extend the life span of EPCs, can constitute such potential strategies.

We have recently shown for the first time that gene-modified EPCs rescue impaired neovascularization in an animal model of limb ischemia [14]. Transplantation of heterologous EPCs transduced with adenovirus encoding human VEGF165 not only improved neovascularization and blood flow recovery, but also had meaningful biological consequences, *i.e.* limb necrosis and auto-amputation were reduced by 63.7% in comparison with controls. Notably, the dose of EPCs needed to achieve limb salvage in these *in vivo* experiments was 30 times less than that required in the previous experiments involving unmodified EPCs [15]. Thus, EPC cell therapy combined with gene (*i.e.* VEGF) transduction may be one option to overcome the limited number and function of EPCs that can be isolated from peripheral blood in patients.

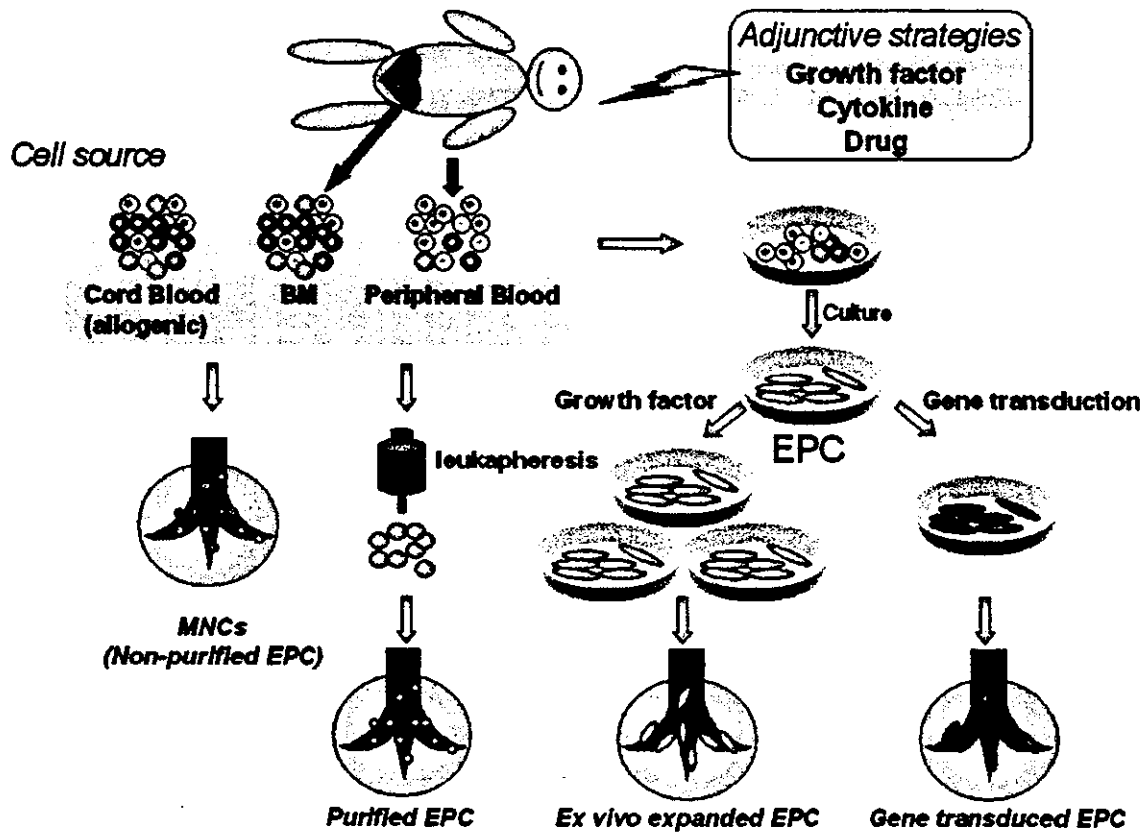


Fig. 3 Therapeutic application of EPCs for neovascularization.

### EPC preview

EPCs have also been investigated in the cerebrovascular field. Embolization of the middle cerebral artery in Tie2/lacZ/BMT mice disclosed that the formation of new blood vessels in the adult brain after stroke involves vasculogenesis/EPCs. Similar data were reported using gender-mismatched wild-type mice transplanted with BM from green fluorescent protein-transgenic mice. However, whether autologous EPC transplantation would augment cerebral revascularization has yet to be examined.

To date, the role of EPCs in tumor angiogenesis has been demonstrated by several groups. Davidoff et al. showed that BM-derived EPCs contribute to tumor neovasculature and that BM cells transduced with an anti-angiogenic gene can restrict tumor growth in mice. Lyden et al. recently used angiogenic defective, tumor resistant Id-mutant mice and showed the restoration of tumor angiogenesis with

BM (donor)-derived EPCs throughout the neovessels following the transplantation of wild-type BM into these mice. These data demonstrate that EPCs are not only important but also critical to tumor neovascularization. Given the findings, 'anti-tumor EPC mediated gene therapy' by transplantation of EPCs transferred genes to inhibit tumor growth may be developed in the near future.

Pulmonary hypertension might also be included into EPC therapy candidates. Nagaya *et al.* [41] reported that transplantation of vasodilator gene-transduced EPCs derived from umbilical cord blood ameliorates pulmonary hypertension in rats.

### Conclusion

BM-derived EPCs in adults possess numerous potentials as clinical tools for cardiovascular dis-

ease, tissue engineering, tumor, and so on. To acquire the more optimized quality and quantity of EPCs, several issues remain to be addressed in this research field. Some of the future perspectives are as follows: (1) identification of a specific marker for EPC with which other lineage cells do not share; (2) evaluation of EPC transdifferentiation in vitro and in physiological, pathological, and iatrogenic regeneration of tissues and organs; (3) methodological optimization of EPC purification, expansion, gene transfer, and administration to improve the efficacy of EPC transplantation; and (4) comparison of the therapeutic impact between purified EPCs and total bone marrow MNCs.

## References

- Asahara T., Murohara T., Sullivan A., Silver M., van der Zee R., Li T., Witzendichler B., Schatteman G., Isner J.M., Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis, *Science*, 275: 964-967, 1997
- Shi Q., Rafii S., Wu M.H., Wijelath E.S., Yu C., Ishida A., Fujita Y., Kothari S., Mohle R., Sauvage L.R., Moore M.A., Storb R.F., Hammond W.P., Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells, *Blood*, 92: 362-367, 1998
- Asahara T., Masuda H., Takahashi T., Kalka C., Pastore C., Silver M., Kearne M., Magner M., Isner J.M., Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization, *Circ Res*, 85: 221-228, 1999
- Gehling U.M., Ergun S., Schumacher U., Wagener C., Pantel K., Otte M., Schuch G., Schafhausen P., Mende T., Kilic N., Kluge K., Schafer B., Hossfeld D.K., Fiedler W., *In vitro* differentiation of endothelial cells from CD133-positive progenitor cells, *Blood*, 95: 3106-3112, 2000
- Gunsilius E., Petzer A.L., Duba H.C., Kahler C.M., Gastl G., Circulating endothelial cells after transplantation, *Lancet*, 357: 1449-1450, 2001
- Lin Y., Weisdorf D.J., Solovey A., Heibel R.P., Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood, *J. Clin. Invest.*, 105: 71-77, 2000
- Peichev M., Naiyer A.J., Pereira D., Zhu Z., Lane W.J., Williams M., Oz M.C., Hicklin D.J., Witte L., Moore M.A., Rafii S., Expression of VEGFR-2 and CD133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors, *Blood*, 95: 952-958, 2000
- Nieda M., Nicol A., Denning Kendall P., Sweetenham J., Bradley B., Hows J., Endothelial cell precursors are normal components of human umbilical cord blood, *Br J Haematol*, 98: 775-777, 1997
- Murohara T., Ikeda H., Duan J., Shintani S., Sasaki K., Eguchi H., Onitsuka I., Matsui K., Imaizumi T., Transplanted cord blood-derived endothelial precursor cells augment postnatal neovascularization, *J. Clin. Invest.*, 105: 1527-1536, 2000
- Hatzopoulos A.K., Folkman J., Vasile E., Eiselen G.K., Rosenberg R.D., Isolation and characterization of endothelial progenitor cells from mouse embryos, *Development*, 125: 1457-1468, 1998
- Springer M.L., Chen A.S., Kraft P.E., Bednarski M., Blau H.M., VEGF gene delivery to muscle: potential role for vasculogenesis in adults, *Mol. Cell*, 2: 549-58, 1998
- Gill M., Dias S., Hattori K., Rivera M.L., Hicklin D., Witte L., Girardi L., Yurt R., Himel H., Rafii S., Vascular trauma induces rapid but transient mobilization of VEGFR2(+)/CD133(+) endothelial precursor cells, *Circ. Res.*, 88: 167-174, 2001
- Asahara T., Takahashi T., Masuda H., Kalka C., Chen D., Iwaguro H., Inai Y., Silver M., Isner J.M., VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells, *EMBO J.*, 18: 3964-3972, 1999
- Iwaguro H., Yamaguchi J., Kalka C., Murasawa S., Masuda H., Hayashi S., Silver M., Li T., Isner J.M., Asahara T., Endothelial progenitor cell vascular endothelial growth factor gene transfer for vascular regeneration, *Circulation*, 105: 732-738, 2002
- Kalka C., Masuda H., Takahashi T., Kalka Moll W.M., Silver M., Kearney M., Li T., Isner J.M., Asahara T., Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97: 3422-3427, 2000
- Schatteman G.C., Hanlon H.D., Jiao C., Dodds S.G., Christy B.A., Blood-derived angioblasts accelerate blood-flow restoration in diabetic mice, *J. Clin. Invest.*, 106: 571-578, 2000
- Takahashi T., Kalka C., Masuda H., Chen D., Silver M., Kearney M., Magner M., Isner J.M., Asahara T., Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization, *Nat. Med.*, 5: 434-438, 1999
- Edelberg J.M., Tang L., Hattori K., Lyden D., Rafii S., Young adult bone marrow-derived endothelial precursor cells restore aging-impaired cardiac angiogenic function, *Circ. Res.*, 90: E89-E93, 2002
- Shintani S., Murohara T., Ikeda H., Ueno T., Honma T., Katoh A., Sasaki K., Shimada T., Oike Y., Imaizumi T., Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction., *Circulation*, 103: 2776-2779, 2001
- Bhattacharya V., McSweeney P.A., Shi Q., Bruno B., Ishida A., Nash R., Storb R.F., Sauvage L.R., Hammond W.P., Wu M.H., Enhanced endothelialization and microvessel formation in polyester grafts seeded with CD34(+) bone marrow cells, *Blood*, 95: 581-585, 2000
- Paushal S., Amiel G.E., Guleserian K.J., Shapira O.M., Perry T., Sutherland F.W., Rabkin E., Moran A.M., Schoen F.J., Atala A., Soker S., Bischoff J., Mayer J.E. Jr., Functional small-diameter neovessels created using

- endothelial progenitor cells expanded *ex vivo*, *Nat. Med.*, 7: 1035-1040, 2001
22. Crosby J.R., Kaminski W.E., Schatteman G., Martin P.J., Raines E.W., Seifert R.A., Bowen Pope D.F., Endothelial cells of hematopoietic origin make a significant contribution to adult blood vessel formation, *Circ. Res.*, 87: 728-730, 2000
  23. Murayama T., Tepper O.M., Silver M., Ma H., Losordo D.W., Isner J.M., Asahara T., Kalka C., Determination of bone marrow-derived endothelial progenitor cell significance in angiogenic growth factor-induced neovascularization in vivo, *Exp. Hematol.*, 30: 967-972, 2002
  24. Reyes M., Dudek A., Jahagirdar B., Koodie L., Marker P.H., Verfaillie C.M., Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow, *J. Clin. Invest.*, 109: 337-346, 2002
  25. Tamaki T., Akatsuka A., Ando K., Nakamura Y., Matsuzawa H., Hotta T., Roy R.R., Edgerton V.R., Identification of myogenic-endothelial progenitor cells in the interstitial spaces of skeletal muscle, *J. Cell. Biol.*, 157: 571-577, 2002
  26. Vasa M., Fichtlscherer S., Aicher A., Adler K., Urbich C., Martin H., Zeiher A.M., Dimmeler S., Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease, *Circ. Res.*, 89: E1-E7, 2001
  27. Tepper O.M., Galiano R.D., Capla J.M., Kalka C., Gagne P.J., Jacobowitz G.R., Levine J.P., Gurtner G.C., Human endothelial progenitor cells from type II diabetics exhibit impaired proliferation, adhesion, and incorporation into vascular structures, *Circulation*, 106: 2781-6, 2002
  28. Valgimigli M., Rigolin G.M., Fucili A., Della Porta M., Soukhomovskaia O., Malagutti P., Bugli A.M., Bragotti L.Z., Francolini G., Mauro E., Castoldi G., Ferrari R., CD34+ and Endothelial Progenitor Cells in Patients With Various Degrees of Congestive Heart Failure, *Circulation*, 110: 1209-1212, 2004
  29. Kalka C., Masuda H., Takahashi T., Gordon R., Tepper O., Gravereaux E., Pieczek A., Iwaguro H., Hayashi SI., Isner J.M., Asahara T., Vascular endothelial growth factor(165) gene transfer augments circulating endothelial progenitor cells in human subjects, *Circ. Res.*, 86: 1198-1202, 2000
  30. Hattori K., Dias S., Heissig B., Hackett N.R., Lyden D., Tateno M., Hicklin D.J., Zhu Z., Witte L., Crystal R.G., Moore M.A., Rafii S., Vascular endothelial growth factor and angiopoietin-1 stimulate postnatal hematopoiesis by recruitment of vasculogenic and hematopoietic stem cells, *J. Exp. Med.*, 193: 1005-1014, 2001
  31. Yamaguchi J., Kusano K.F., Masuo O., Kawamoto A., Silver M., Murasawa S., Bosch Marce M., Masuda H., Losordo D.W., Isner J.M., Asahara T., Stromal cell-derived factor-1 effects on *ex vivo* expanded endothelial progenitor cell recruitment for ischemic neovascularization, *Circulation*, 107: 1322-1328, 2003
  32. Heeschen C., Aicher A., Lehmann R., Fichtlscherer S., Vasa M., Urbich C., Mildner Rihm C., Martin H., Zeiher A.M., Dimmeler S., Erythropoietin is a potent physiologic stimulus for endothelial progenitor cell mobilization, *Blood*, 102: 1340-1346, 2003
  33. Iwakura A., Luedemann C., Shastry S., Hanley A., Kearney M., Aikawa R., Isner J.M., Asahara T., Losordo D.W., Estrogen-mediated, endothelial nitric oxide synthase-dependent mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells contributes to reendothelialization after arterial injury, *Circulation*, 108: 3115-3121, 2003
  34. Strehlow K., Werner N., Berweiler J., Link A., Dirnagl U., Priller J., Laufs K., Ghaeni L., Milosevic M., Bohm M., Nickenig G., Estrogen increases bone marrow-derived endothelial progenitor cell production and diminishes neointima formation, *Circulation*, 107: 3059-3065, 2003
  35. Kureishi Y., Luo Z., Shiojima I., Bialik A., Fulton D., Lefer D.J., Sessa W.C., Walsh K., The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin activates the protein kinase Akt and promotes angiogenesis in normocholesterolemic animals, *Nat. Med.*, 6: 1004-1010, 2000
  36. Llevadot J., Murasawa S., Kureishi Y., Uchida S., Masuda H., Kawamoto A., Walsh K., Isner J.M., Asahara T., HMG-CoA reductase inhibitor mobilizes bone marrow-derived endothelial progenitor cells, *J. Clin. Invest.*, 108: 399-405, 2001
  37. Dimmeler S., Aicher A., Vasa M., Mildner Rihm C., Adler K., Tiemann M., Rutten H., Fichtlscherer S., Martin H., Zeiher A.M., HMG-CoA reductase inhibitors (statins) increase endothelial progenitor cells via the PI 3-kinase/Akt pathway, *J. Clin. Invest.*, 108: 391-397, 2001
  38. Lyden D., Hattori K., Dias S., Costa C., Blaikie P., Butros L., Chadburn A., Heissig B., Marks W., Witte L., Wu Y., Hicklin D., Zhu Z., Hackett N.R., Crystal R.G., Moore M.A., Hajjar K.A., Manova K., Benezra R., Rafii S., Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth, *Nat. Med.*, 7: 1194-1201, 2001
  39. Kocher A.A., Schuster M.D., Szabolcs M.J., Takuma S., Burkhoff D., Wang J., Homma S., Edwards N.M., Itescu S., Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function, *Nat. Med.*, 7: 430-436, 2001
  40. Taguchi A., Soma T., Tanaka H., Kanda T., Nishimura H., Yoshikawa H., Tsukamoto Y., Iso H., Fujimori Y., Stern D.M., Naritomi H., Matsuyama T., Administration of CD34+ cells after stroke enhances neurogenesis via angiogenesis in a mouse model, *J. Clin. Invest.*, 114: 330-338, 2004
  41. 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: 889-895, 2003