

果が得られた。したがって、臨床のプロトコールにおいて、より有効な方法を工夫することが今後の課題となっている。実際、最近の生活習慣病の増加に伴い血管細胞がすでに障害を受けている場合が多くなってきている。このため従来の治療法が奏効しない症例が増加し、血管新生療法が次世代の治療として注目されているが、同時に問題点も残されている(図1)。

## 細胞治療の動向

遺伝子治療とともに、再生医学において細胞移植療法が注目を浴びている。1997年にわれわれのグループは、成人の末梢血中に血管内皮前駆細胞(EPC)が存在することを明らかにし<sup>9)</sup>、この細胞を用いた細胞移植による、虚血性疾患への応用を実現するために、基礎研究および、小動物、大動物を用いた細胞移植実験を積み重ねてきた。

ヒトの血管内皮前駆細胞は骨髓から末梢循環血中に、さまざまな刺激

によって動員されることがわかっている。サイトカインや成長因子などによる刺激のほか、虚血<sup>10)</sup>によっても骨髓から末梢血に動員される。具体的にはG-CSFによって末梢血中の血管内皮前駆細胞の数を十分に確保し細胞移植することにより虚血性疾患(ASO, 狭心症, 心筋梗塞)への臨床効果が期待される。われわれの最近のデータでは、HMG-CoA還元酵素阻害薬(スタチン製剤)が血管内皮前駆細胞を骨髓から末梢血中に動員し分化させることが $\beta$ -ガラクトシダーゼ発現骨髓移植マウスにおける角膜血管形成モデルと*in vitro*実験により示され、心筋虚血や脳虚血後の末梢血管再構築に利点があると考えられている。このように*ex vivo*で増殖・分化誘導を受けた血管内皮前駆細胞が治療に有効と考えられている<sup>11)12)</sup>。

細胞移植の有効性についてはこれまで動物モデルを用いた実験で明らかになってきた。これまでの研究では、免疫不全マウスの下肢虚血モデルにヒト血管内皮前駆細胞を投与す

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の促進が確認された<sup>13)</sup>。この治療法は、免疫不全ラット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生・心筋壊死の減少を誘導し、心筋の機能改善にも役割を果たすことが判明した<sup>14)</sup>。この方法は、血管内皮前駆細胞の前駆細胞としての増殖能・分化能を利用した強力かつ生理的な再生治療として注目を受けている。血管内皮前駆細胞は臍帯血中にも豊富に存在し、下肢虚血動物モデルへの投与によって血管新生が増強されることが明らかになった<sup>15)</sup>。

これらの基礎検討によって、動物レベルでの血管新生療法に血管内皮前駆細胞が有効であることは証明されたが、実際に血管内皮前駆細胞のマーカーの1つであるCD34陽性細胞は通常、末梢血中に1%以下しか存在していない。そこで実際に臨床応用するためには、細胞の数を確保するとともに、細胞の質を高める工夫が必要になってくる。この点を明らかにするため血管内皮前駆細胞の

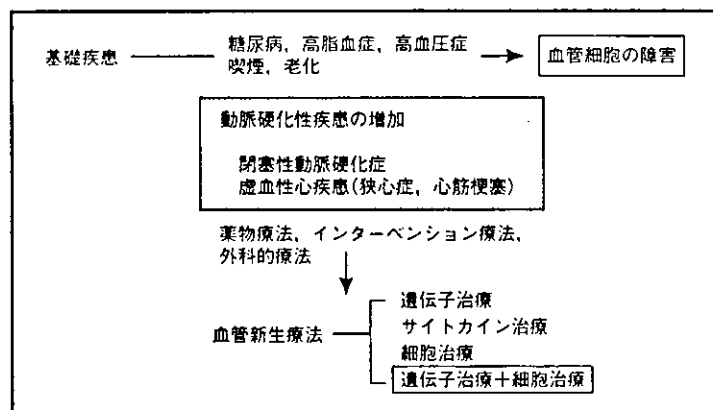


図1

### 生活習慣病の増加

生活習慣病の増加に伴い、わが国の閉塞性動脈硬化症の患者数は年々増加の傾向にある。重症度の診断に基づいて、薬物療法や、インターベンション療法、および外科的治療が選択されてきたが、重症虚血肢に対しては有効な治療がなく下肢切断を余儀なくされてきた。その後、海外で遺伝子による血管新生療法が臨床応用され、重症虚血肢に対して症状の改善が期待できるようになった。さらに最近では細胞移植による治療が開始されその有効性が確認されている。血管内皮前駆細胞移植や、さらに治療効果を高めるため、遺伝子導入を行った細胞移植の検討が進められており今後臨床応用が期待される。

細胞移植と遺伝子治療を組み合わせた方法の臨床応用への検討が注目を浴びている。われわれが留学していた米国の施設では重症心虚血、下肢動脈硬化症の患者に遺伝子治療による血管新生療法が続けられてきたが、その最大の問題点は、いかに安全に効率よく患部で遺伝子発現できるかにあった。血管内皮前駆細胞による遺伝子治療は、細胞移植単独よりもさらに有効な治療法であることが動物モデルを用いた実験で明らかになってきた。具体的には虚血部位、あるいは障害動脈部位に血管内皮細胞増殖因子や老化の遅延に関連した因子の遺伝子治療を施した血管内皮前駆細胞を投与することが可能と考えられる。これまでの研究で、ヒトの血管内皮前駆細胞VEGF遺伝子を強制発現させ、細胞治療よりはるかに少ない量の細胞を投与したところ、血管新生・血流改善の面で単独細胞治療をしのぐ治療効果が確認されている<sup>16)</sup>。

最近われわれは、一般にヒト体細

胞の老化に伴いテロメラーゼ活性が低下することに注目し、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)の遺伝子導入を血管内皮前駆細胞に施すことにより分裂寿命の延長を誘導することを明らかにし報告してきた。すなわちコントロールの細胞群に比べてTERTを導入した細胞群では継代に伴うテロメラーゼ活性低下は抑制されており、実際に老化(senescence)に移行する細胞の割合も減少していた。興味深いことにTERTを導入した細胞群においてのみ内皮への分化を示唆するコロニー形成が認められた。細胞機能の評価ではTERTの導入群で増殖、遊走がともに増強し、アポトーシスは抑制されていた。動物実験において、TERTを強制発現させた血管内皮前駆細胞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、単独細胞治療をしのぐ治療効果が確認された。つまり“若返り”させた血管内皮前駆細胞が少量で虚血に対する治療効果を示したと考え

られる<sup>17)</sup>。

心筋虚血の改善に関しては、血管再生の概念とともに、最近、心筋そのものの再生の概念が生まれてきた。血管内皮前駆細胞や、CD34陽性細胞についても、血管内皮細胞のみならず、心筋細胞に分化することが報告されており<sup>18)19)</sup>、われわれのグループでも同様の現象を確認している。ただし、臨床応用に結びつけるための効率のよい心筋再生への誘導条件については今後、さらに検討する必要があると思われる。

### 最近の細胞治療

細胞移植による血管新生療法は、末梢血に比べ骨髄中には豊富な血管内皮前駆細胞が含まれているため、近年、自己骨髄単核球細胞を用いた血管再生療法が動物モデルで検討され<sup>20)21)</sup>有効性が確認された。その後末梢性血管疾患患者に対して臨床応用が開始され、有意な血管新生を認めている<sup>22)</sup>。血管内皮前駆細胞によ

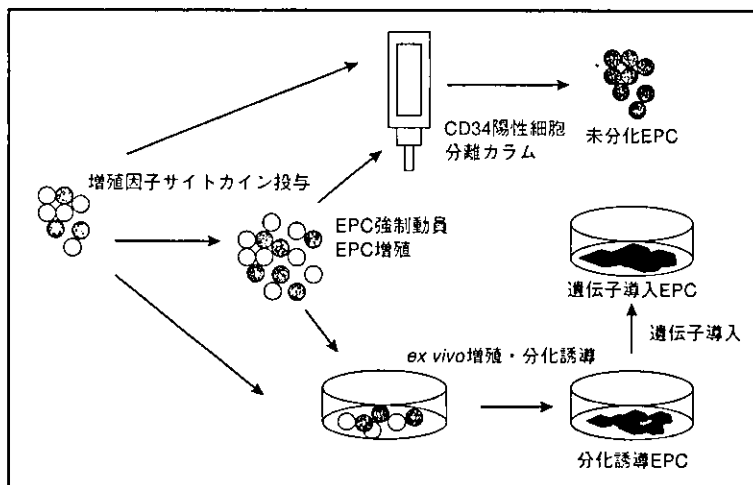


図2

#### 血管内皮前駆細胞(EPC)による細胞移植治療

血管内皮前駆細胞(EPC)による細胞移植治療には大きく分けて以下の3つの戦略がある。①サイトカインにより単核球を骨髄から動員後、CD34陽性細胞分離カラムを用いて純化したものをそのまま用いる方法。②末梢血単核球を体外培養し、増殖させた後用いる方法。③末梢血単核球を体外培養し増殖させた後、血管内皮増殖因子(VEGF)などの遺伝子導入を行い、遺伝子導入されたEPCを用いる方法。これらの方法はすべて、研究レベルでは虚血に対する効果がすでに明らかになっているが、実際に臨床研究として始まっているのは①の方法のみである。その他の方法については、細胞精製や、遺伝子導入などに対して今後さらに慎重な検討が必要である。

る細胞移植治療にはいくつかの戦略があるが(図2), われわれのグループでは, サイトカインを用いて患者末梢血中の血管内皮前駆細胞を十分量動員し, CD34のmagnetic beadsを用いて, CD34陽性細胞を純化することにより得られた細胞を, 末梢性血管疾患患者に移植する治療を開始したばかりである。具体的には, G-CSFの投与によって, 末梢血中のCD34陽性細胞を動員し, アフレーションによって, 大量の末梢血単核球を確保し, この細胞をCD34抗体で分離することにより, 治療に必要なCD34陽性細胞を得ることができた。これらの細胞の分画は, FACSを用いて98%以上の割合で純化されていることが確認されている。具体的な効果については今後の経過を待ちたい。

## おわりに

心血管領域における最近の遺伝子・再生医学研究の動向について概要を述べた。遺伝子治療, 細胞治療ともに共通していることは, 血管新生を期待する患者の背景が, 特に動脈硬化性疾患の場合, 一般に高齢であるため細胞そのものの機能が低下しているため, 効果を高めるための検討が必要になるという点であろう。細胞移植に関しては, 今後, 遺伝子導入により細胞機能を高めた細胞を体外培養によって増殖させた産物を, 臨床に応用することが考えられ, そのための検討が現在進められている。

## 文 献

- 1) Baumgartner I, Pieczek A, Manor O, et al : Constitutive expression of phVEGF<sub>121</sub> after intramuscular gene transfer promotes collateral vessel development in patients with critical limb ischemia. *Circulation* **97**(12): 1114-1123, 1998
- 2) Losordo DW, Vale PR, Symes JF, et al : Gene therapy for myocardial angiogenesis : initial clinical results with direct myocardial injection of phVEGF<sub>121</sub> as sole therapy for myocardial ischemia. *Circulation* **98**(25): 2800-2804, 1998.
- 3) Losordo DW, Vale PR, Hendel RC, et al : Phase 1/2 placebo-controlled, double-blind, dose-escalating trial of myocardial vascular endothelial growth factor 2 gene transfer by catheter delivery in patients with chronic myocardial ischemia. *Circulation* **105**(17): 2012-2018, 2002
- 4) Fortuin FD, Vale P, Losordo DW, et al : One-year follow-up of direct myocardial gene transfer of vascular endothelial growth factor-2 using naked plasmid deoxyribonucleic acid by way of thoracotomy in no-option patients. *Am J Cardiol* **92**(4): 436-439, 2003
- 5) Schumacher B, Pecher P, von Specht BU, et al : Induction of neoangiogenesis in ischemic myocardium by human growth factors : first clinical results of a new treatment of coronary heart disease. *Circulation* **97** : 645-650, 1998
- 6) Laham RJ, Sellke FW, Edelman ER, et al : Local perivascular delivery of basic fibroblast growth factor in patients undergoing coronary bypass surgery : results of a phase I randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Circulation* **100**(18): 1865-1871, 1999
- 7) Hendel RC, Henry TD, Rocha-Singh K, et al : Effect of intracoronary recombinant human vascular endothelial growth factor on myocardial perfusion ; evidence for a dose-dependent effect. *Circulation* **101**(2): 118-121, 2000
- 8) Ruel M, Wu GF, Khan TA, et al : Inhibition of the cardiac angiogenic response to surgical FGF-2 therapy in a Swine endothelial dysfunction model. *Circulation* **108**(Suppl. 1): II 335-340, 2003
- 9) Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al : Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* **275**(5302): 964-967, 1997
- 10) Takahashi T, Kalka C, Masuda H, et al : Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med* **5**(4): 434-438, 1999
- 11) Llevadot J, Murasawa S, Kureishi Y, et al : HMG-CoA reductase inhibitor mobilizes bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *J Clin Invest* **108**(3): 399-405, 2001
- 12) Dimmeler S, Aicher A, Vasa M, et al : HMG-CoA reductase inhibitors (statins) increase endothelial progenitor cells via the PI 3-kinase/Akt pathway. *J Clin Invest* **108**(3): 391-397, 2001
- 13) Kalka C, Masuda H, Takahashi T, et al : Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(7): 3422-3427, 2000
- 14) Kawamoto A, Gwon HC, Iwaguro H, et al : Therapeutic potential of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia. *Circulation* **103**(5): 634-637, 2001
- 15) Murohara T, Ikeda H, Duan J, et al : Transplanted cord blood-derived endothelial precursor cells augment

- postnatal neovascularization. *J Clin Invest* **105**(11): 1527-1536, 2000
- 16) Iwaguro H, Yamaguchi J, Kalka C, et al : Endothelial progenitor cell vascular endothelial growth factor gene transfer for vascular regeneration. *Circulation* **105**(6): 732-738, 2002
- 17) Murasawa S, Llevadot J, Silver M, et al : Constitutive human telomerase reverse transcriptase expression enhances regenerative properties of endothelial progenitor cells. *Circulation* **106**(9): 1133-1139, 2002
- 18) Badorff C, Brandes RP, Popp R, et al : Transdifferentiation of blood-derived human adult endothelial progenitor cells into functionally active. *Circulation* **107**(7): 1024-1032, 2003
- 19) Yeh ET, Zhang S, Wu HD, et al : Transdifferentiation of human peripheral blood CD34<sup>+</sup>-enriched cell population into cardiomyocytes, endothelial cells, and smooth muscle cells in vivo. *Circulation* **108**(17): 2070-2073, 2003
- 20) Shintani S, Murohara T, Ikeda H, et al : Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction. *Circulation* **103**(23): 2776-2779, 2001
- 21) Kamihata H, Matsubara H, Nishiue T, et al : Implantation of bone marrow mononuclear cells into ischemic myocardium enhances collateral perfusion and regional function via side supply of angioblasts, angiogenic ligands, and cytokines. *Circulation* **104**(9): 1046-1052, 2001
- 22) Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T, et al : Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells : a pilot study and a randomised controlled trial. *Lancet* **360**(9331):427-435, 2002