

200400228B

厚生労働科学研究費補助金

基礎研究成果の臨床応用研究事業

「虚血性疾患に対する血管内皮前駆細胞移植の基礎・臨床応用」

平成 14～16 年度 総合研究報告書

主任研究者 浅原 孝之

平成 17 (2005) 年 3 月

目次

1.総合研究報告書	1
-----------	---

浅原 孝之

2.研究成果の刊行に関する一覧表	9
------------------	---

3.代表的論文	11
---------	----

1 総合研究報告書

総括研究報告書

血管内皮前駆細胞トランスレーショナルリサーチ総括

主任研究者 浅原孝之 先端医療振興財団 再生医療研究部長

研究要旨 虚血性心疾患患者および下肢虚血性疾患患者に対する、自己血管内皮前駆細胞(EPC)移植治療法の開発を進めた。様々なEPC採取法・培養法などを試み、EPCの細胞学的活性を確認した。その一つの成果として、G-CSFの投与によりEPCを骨髄から末梢血へ強制動員した後に、apheresisにより単核球分画を採取し、CD34陽性細胞をEPCとして分離し、虚血部位に局所移植する治療が臨床研究段階に進展した。下肢虚血性疾患は8例が試みられ、順調に経過している。さらに虚血性心疾患を対象とした再生治療の臨床プロトコール作製を進めた。

分担者名

浅原 孝之 先端医療振興財団
再生医療研究部長
川本 篤彦 先端医療振興財団
主任研究員
増田 治史 東海大学医学部
再生医学センター 研究主任
村澤 聡 先端医療振興財団
主任研究員
西村 浩美 先端医療振興財団
主任研究員
岩畔 英樹 東海大学医学部
再生医学センター 研究員
西川 光郎 キリンビール株式会社
医薬カンパニー
医薬探索研究所
グループリーダー

1. 研究目的

以下の3つの研究目的が設定された。

(1) 効率的な細胞増殖・採取法の確立

細胞活性が高い血管内皮前駆細胞(EPC)の同定・採取する方法を確立し、治療応用方法を検討する。

(2) 細胞移植技術の開発

EPCの最も効率的な細胞移植技術を開発する。

(3) 臨床治療研究の開始・遂行

下肢虚血性疾患・虚血性心疾患を対象とする血管再生治療を推進する。臨床研究プロトコールを作製し、を開始遂行する。

3-A) 臨床研究プロトコールの作製

3-B) 治療前・後の評価

2. 研究方法

研究計画は、以下の3部で遂行された。

(1) 効率的な細胞増殖・採取法の確立

A) 効率的なEPC増幅法の開発：末梢血液中の血管内皮前駆細胞数は少量（0.1%以

下) で不十分なため、本計画における臨床治療研究では G-CSF 製剤を 5 日間投与 (10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$) し、血管内皮前駆細胞を骨髓から末梢血に強制動員させる。これで前駆細胞数は約 10 倍に増加するとされているが、今後より効果的な血管内皮前駆細胞増殖法をまず *in vitro* で確立する。その一例として、スタチン製剤を使用する方法を検討した。

B) 効率的な血管内皮前駆細胞の開発：末梢血中に増加した血管内皮前駆細胞をより効率よく採取し治療効果を発揮するため、本計画における臨床治療研究では G-CSF 投与後に CD34 陽性細胞のみを血管内皮前駆細胞分画として分離する。この細胞採取と治療までの培養法の改善、タンパク投与・遺伝子改変などによる EPC 細胞活性の促進を探る。

(2) 細胞移植技術の開発

A) 血管内皮前駆細胞の移植技術：虚血性心疾患では、NOGA マッピングシステムで虚血部位を診断し、その誘導下に細胞を虚血部位へ経カテーテル的に移植する。下肢虚血性疾患治療では、通常の筋注針を用いる。

(3) 臨床治療研究

臨床試験の基本経過は、以下を予定する。

A) 臨床研究プロトコルの作製

従来および本研究データに基づいた下肢虚血性疾患、続いて虚血性心疾患の臨床プロトコルの作製を計画した。この作製には臨床研究情報センター (TRI) の協力を得た。

本研究は、薬物治療・血管形成術・バ

イパス手術などの既存の治療に抵抗性、あるいはそれらの適応にならない慢性の虚血性心疾患患者および下肢虚血患者を対象として計画される。G-CSF 製剤および apheresis による有害事象を可能な限り防止するため、日本造血細胞移植学会・日本輸血学会のガイドラインに準拠して、症例の適格基準・G-CSF の用量調節規準・apheresis 施行手順・有害事象発生時の試験中止規準等を厳格に設定する。

B) 治療前・後の評価

単盲検下での用量漸増試験として行い、細胞移植治療の臨床効果・安全性を客観的に評価する。症例の登録・データの統計学的解析は、独立したデータセンターである臨床研究情報センター (TRI) で行う。

i) 虚血性心疾患

治療前および治療後 3 カ月・12 ヶ月後に、自覚症状 (狭心症および心不全症状)、トレッドミル負荷心電図による運動耐容能、PET 検査による冠動脈血流量、冠動脈造影による側副血流発達度、MRI による左室機能等を評価する。

ii) 慢性下肢虚血性疾患

治療前および治療後 3 カ月・12 ヶ月後に、自覚症状 (下肢疼痛)、ABI、トレッドミル負荷心電図による運動耐容能、下肢潰瘍・壊死所見、サーモグラフィー、下肢血管造影等を評価する

(倫理面への配慮)

上記の臨床試験は、先端医療センター再生医療審査委員会・神戸市立中央市民病院倫理委員会から実施の承認を得た後に、被験者から同意を得て開始される。

3. 研究結果および考察

(1) 効率的な細胞増殖・採取法の確立

A) 効率的な EPC 増幅法の開発：

G-CSF により動員した後に得られた末梢血 CD34+細胞の FACS 解析により、最も未分化な血管内皮前駆細胞と考えられている CD34+AC133+KDR+細胞の存在を認め、その存在比率は総 CD34+細胞のうち、0.6%であった。この結果より、G-CSF で動員される末梢血 CD34+細胞に血管内皮前駆細胞の存在が示唆された。G-CSF の動員により、血管再構築能を有する細胞が大量に得られる可能性を示したと考えられ、実際の血管再生医療を目指す上で、その足がかりになると思われる。

次に、血管内皮前駆細胞移植の単核球移植に対する優位性を実験的に証明した。健康人に G-CSF 製剤を皮下注射し、アフエレーシスで末梢血単核球を採取し、この単核球から CD34 陽性細胞（血管内皮前駆細胞）を分離した。血管内皮前駆細胞あるいは単核球を心筋虚血ヌードラットの心筋内へ移植したところ、移植後 3 日目に単核球移植群（3 例）では全例に高度の出血性梗塞が出現したが、血管内皮前駆細胞移植群（3 例）では同副作用は認められなかった。移植 4 週後での心筋線維化面積も、血管内皮前駆細胞移植群（7 例）が単核球移植群（7 例）に比して有意に低値を示した。単核球移植と血管内皮前駆細胞移植の優劣はこれまで明らかでなかったが、本研究により血管内皮前駆細胞を単核球から分離して移植する意義が示された。

さらに、EPC の増幅をはかるために、スタチン製剤を用いて、EPC の変化を確認した。スタチン製剤を使用した場合、投与したマウスにおいてコントロール群に比べ角膜の

EPC による血管新生が明らかに亢進していた。また *in vitro* の実験の結果、スタチン製剤は EPC の増殖、および移動を亢進させた。この結果、スタチン製剤が EPC の動員に関与することが明らかになった。虚血性疾患患者は背景に高コレステロール血症を合併していることが多くすでに同薬剤が投与されている場合が多いが、EPC による細胞治療の際により良い効果を発揮する可能性が示唆される。

B) 効率的な血管内皮前駆細胞の開発：

まず、将来的な EPC の体外培養治療を想定して、EPC 培養増殖を試みた。7 日間の無血清培養により、全細胞数は、20 倍程度に増加した。また、未分化 EPC（AC133 陽性細胞）は、4 倍程度に増幅された。また未分化及び分化過程 EPC の細胞表面抗原である KDR 陽性細胞は 50 倍、CD34 陽性細胞は 8 倍程度に増加した。適切な成長因子、サイトカインの組み合わせを考慮することにより無血清培養条件下において未分化 EPC 及び分化過程 EPC の増幅が可能であることが示唆された。

つぎに、EPC の質的改良を狙い、VEGF 遺伝子を導入した強化 EPC 移植を試みた。VEGF 遺伝子導入 EPC の血管再生療法の有効性を検証する実験では、細胞移植後、4 週間後の LD による評価において、非遺伝子導入 EPC、コントロール遺伝子導入 EPC 移植群に比較し、VEGF 遺伝子導入 EPC 移植群は、有意に約 2 倍の血流改善が認められた。肉眼的下肢 salvage 評価において、VEGF 遺伝子導入 EPC 移植群では、約 60% 認められたのに対し、非遺伝子導入 EPC、コントロール遺伝子導入 EPC 移植群では、全く認められなかった。以上により VEGF

遺伝子を EPC に導入することにより、治療に用いる移植 EPC 数を非遺伝子導入 EPC の約 3%において有効性が示された。これは、機能強化 EPC 移植療法により患者の自己血由来 EPC の採取において、患者負担を軽減させる意義があるものと考えられる。EPC への虚血転写因子 Hif1-alpha 遺伝子導入も試みられた。Hif1-alpha 遺伝子導入 EPCs の細胞死の発生頻度はコントロール遺伝子導入 EPCs に比し有意に減少していた。また、HUVEC を用いた接着能の解析では、Hif1-alpha 遺伝子導入 EPC 移植群において有意に接着数の増加が認められた。FACS によるマーカー解析では、接着系因子（インテグリン、セレクチン）の陽性率の増加が認められた。以上の結果から、Hif1-alpha 遺伝子導入 EPC 移植による機能的な新生血管、血流の改善には、細胞分子レベルでの接着能の関与が非常に影響を及ぼしていると考えられた。

(2) 細胞移植技術の開発

A) 血管内皮前駆細胞の移植技術：

カテーテル動物実験の結果では、安全に細胞は心筋に移植され、虚血心筋内の血管形成は著明に促進された。虚血心臓の機能回復も細胞治療を受けた群だけが著明に改善を遂げた。心筋虚血改善に必要な EPC 投与数に関する検討課題については 200ml の末梢血から得られる CD31 陽性単核球成分 100 万個を心内膜から投与することで、梗塞範囲縮小、毛細血管密度増加、左室壁運動改善が得られた。この結果、G-CSF で EPC の動員をはかり、上記診断治療カテーテルによる細胞移植と組み合わせ、精密で効果的な治療効果を得る技術の確立出来る

がたつたと考えられる。

(3) 臨床治療研究

重症慢性下肢虚血患者に対する上記臨床試験は、上記の手続きを経て、平成 15 年 11 月に開始された。顆粒球コロニー刺激因子製剤の投与により末梢血に動員された骨髄単核球細胞をアフエレーシスで採取し、磁気細胞分離により単核球から分離された血管内皮前駆細胞（CD34 陽性細胞）を虚血下肢の筋肉内に移植している。現在までに 8 例の患者に対する移植が安全に行われ、自他覚所見の著明な改善が得られている。虚血性心疾患に対する臨床試験も平成 17 年春の開始を目指して、臨床プロトコルはすでに完成して、倫理委員会の承認も得ている。現在最終的な臨床体制を確立準備中である。

臨床試験の開始に先立って、豊富な基礎研究データの準備が重要であることは言うまでもないが、患者の倫理面に配慮し、移植治療を安全かつ有効に施行するためには、綿密に臨床試験を計画し、詳細な臨床試験プロトコルを作成することが重要である。今回、GCP 規準臨床試験に準拠したプロトコルを作成することにより、臨床試験を安全にかつ科学的で、再現性の期待できる形で開始することができた。

倫理面への配慮としては、本研究が自家末梢血から採取した血管内皮前駆細胞を虚血部位に投与するため、ドナーを必要とせず、倫理的な問題はない。細胞採取・純化の全過程は、先端医療センター細胞培養センターで施行される。「重症下肢虚血患者に対する自家末梢血血管内皮前駆細胞移植による血管再生治療に関する第 I・II 相試

験」の実施計画は、平成 15 年 11 月に先端医療センターおよび神戸市立中央市民病院の倫理委員会が実施の承認を得た。実際の臨床試験開始にあたっては、被験者に治療の内容、期待される効果、想定される危険性、患者の権利等を十分に説明したうえで、文書による同意を取得している。

実質的な臨床研究の計画は、「医薬品の臨床試験の実施の基準に関する省令（平成 9 年 3 月 27 日厚生省令第 28 号）」を参考に遂行される。

4. 結論

本研究により、虚血性疾患（下肢虚血性疾患・虚血性心疾患）に対する血管内皮前駆細胞（EPC）移植の血管再生療法の、基礎的基盤が確立し、臨床応用も開始になった。まだまだ技術的開発が望まれるが、一般治療として十分な安全性を伴った治療効果の高い新規治療法として、臨床研究の最終結果が期待される。

5. 研究発表

1) 国内

口頭発表・講演：33件

2) 海外

口頭発表・講演：30件

原著論文：37件

そのうち主なもの

45. Asahara T, Isner JM. Endothelial progenitor cells for vascular regeneration. *J Hematother Stem Cell Res.* 2002; 11: 171-178. Review.
46. Asahara T, Kawamoto A, Kalka C, Masuda H. Therapeutic potential of bone marrow-derived endothelial progenitor cell for cardiovascular ischemic diseases. *Gene Ther Reg.* 2002;4:361-374.
47. Murayama T, Asahara T. Bone marrow-derived endothelial progenitor cells for vascular regeneration. *Curr Opin Mol Ther.* 2002; 4: 395-402.
48. Murayama T, Tepper OM, Silver M, Ma H, Losordo DW, Isner JM, Asahara T, Kalka C. Determination of bone marrow-derived endothelial progenitor cell significance in angiogenic growth factor-induced neovascularization in vivo. *Exp Hematol.* 2002; 30: 967-972.
49. Iwaguro H, Yamaguchi J, Kalka C, Murasawa S, Masuda H, Hayashi S, Silver M, Li T, Isner JM, Asahara T. Endothelial progenitor cell VEGF gene transfer for vascular regeneration. *Circ.* 2002; 105: 732-738.
50. Murasawa S, Llevadot J, Silver M, Asahara T, et al. Constitutive human telomerase reverse transcriptase expression enhances regenerative properties of endothelial progenitor cells. *Circ.* 2002; 106: 1133-1139.
51. Walter DH, Ritting K, Bahlmann FH, Kirchmair R, Silver M, Murayama T, Nishimura H, Losordo DW, Asahara T, Isner JM. Statin therapy accelerates reendothelialization: a novel effect involving mobilization and incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *Circ.* 2002; 105: 3017-3024.
55. Kawamoto A, Asahara T, Losordo DW. Transplantation of endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Cardiovasc Radiat Med.* 2002; 3:221-225.
56. 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. *Circ.* 2003; 107:461-468.
57. 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*. 2003;107:1322-1328.
58. Masuda H, Asahara T. Post-natal endothelial progenitor cells for neovascularization in tissue regeneration. *Cardiovasc. Res.* 2003; 58; 390-398.
 62. Asahara T. Endothelial Progenitor Cells for Postnatal Vasculogenesis. *AJP*. 2003; (in press).Review.
 63. Iwaguro H, Asahara T. Endothelial Progenitor Cell: Ex vivo expansion and Gene Transfer. *Humana Press*. 2003; (in press).
 64. Kawamoto A, Losordo DW, Asahara T. Transplantation of Endothelial Progenitor Cells for Therapeutic Neovascularization. *Cardiovascular Radiation Medicine*. 2003; 3:221-225.
 65. Yamamoto K, Takahashi T, Asahara T, Ohura N, Sokabe T, Kamiya A, Ando J. Proliferation, differentiation, and tube formation by endothelial progenitor cells in response to shear stress. *J A Appl Physiol*. 2003; 95:2081-2088.
 66. Iwakura A, Luedemann C, Shastry S, Hanley A, Kearney M, Aikawa R, Isner JM, Asahara T, Losordo DW. Estrogen-Mediated, Endothelial Nitric Oxide Synthase-Dependent Mobilization of Bone Marrow-Derived Endothelial Progenitor Cells contributes to Reendothelialization After Arterial Injury. *Circ*. 2003; 108:144-150.
 67. Kawamoto A, Asahara T, Losordo DW. Transplantation of endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Handbook of Cardiovascular Cell Translation*. 2004; 3:31-41.
 68. Asahara T, Kawamoto A. Endothelial Progenitor Cells for Postnatal Vasculogenesis. *AJP:Cell Physiology*. 2004 Sep;287(3):C572-9.
 69. Murayama T, Oren M, Tepper, Asahara T. Methods in Endothelial Cell Biology: Murine Bone Marrow Transplantation Models that Enable the Study of EPC Recruitment. *Springer*.2004:17;179-185.
 70. Iwaguro H, Asahara T. Protocols for Endothelial Progenitor Cells Culture and Gene Transfer. *Molecular Cardiology*. 2004(in press).
 75. Ishikawa M, Asahara T. Endothelial Progenitor Cell Culture for Vascular Regeneration. *Stem Cells and Development*. 2004 Aug;13(4):344-9.
 78. Kusano KF, Allendoerfer KL, Munger W, Pola R, Bosch-Marce M, Kirchmair R, Yoon YS, Curry C, Silver M, Kearney M, Asahara T, Losordo DW. Sonic Hedgehog Induces Arteriogenesis in Diabetic Vasa Nervorum and Restores Function in Diabetic Neuropathy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004 Sep 9.
 80. Masaaki Ii, Hiromi Nishimura, Atsushi Iwakura, Andrea Wecker, Elizabeth Eaton, Takayuki

Asahara & Douglas W. Losordo.
Endothelial progenitor cells are rapidly
recruited to

myocardium and mediate protective effect
of ischemic preconditioning via “imported”
nitric

oxide synthase activity. *Circ.* 2004 (in
press).

Progenitor Cells for Vasculogenesis. *Physiology.*
2005;
20:36-42

6. 知的所有権の出願・取得状況（予定を
含む）
3件

81. Murasawa S, Asahara T. Endothelial

2 研究成果の刊行に関する一覧

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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
Masuda H, Asahara T	Post-natal endothelial progenitor cells for neovascularization in tissue regeneration	Cardiovasc Res	58(2)	390-398	2003
Yamaguchi J, H, Asahara T et al.	Stromal cell-derived factor-1 effects on ex vivo expanded endothelial progenitor cell recruitment for ischemic neovascularization.	Circulation	107(9)	1322-1328	2003
<u>Murasawa S</u> , Asahara T	Endothelial Progenitor Cells for Vasculogenesis	Physiology	20	36-42	2005
村澤 聡、 浅原 孝之	2003年における遺伝子再生医学研究(連載：遺伝子再生医学講座)	Angiology Frontier	3	53-56	2004
Kawamoto A, Murayama T, Kusano K, Ii M, Tkebuchava T, Shintani S, Iwakura A, Johnson I, von Samson P, Hanley A, Gavin M, Curry C, Silver M, Ma H, Kearney M, Losordo DW.	Synergistic effect of bone marrow mobilization and vascular endothelial growth factor-2 gene therapy in myocardial ischemia.	Circulation.	110(11)	1398-1405.	2004
Weber A, Pedrosa I, Kawamoto A, Himes N, Munasinghe J, Asahara T, Rofsky NM, Losordo DW.	Magnetic resonance mapping of transplanted endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization in ischemic heart disease.	Eur J Cardiothorac Surg.	26 (1)	137-143	2004
Asahara T, <u>Kawamoto A</u> .	Endothelial progenitor cells for postnatal vasculogenesis.	Am J Physiol Cell Physiol.	287(3)	C572-579	2004
Nishimura H, Asahara T.	Bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascular formation.	EXS.	(94)	147-154.	2005

3 代 表 的 論 文

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

Yo Iwami ^a, Haruchika Masuda ^a, Takayuki Asahara ^{a,b} *

^a Department of Regenerative Medicine Science, Tokai University School of Medicine,
Bohseidai, Isehara, Kanagawa, Japan

^b 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

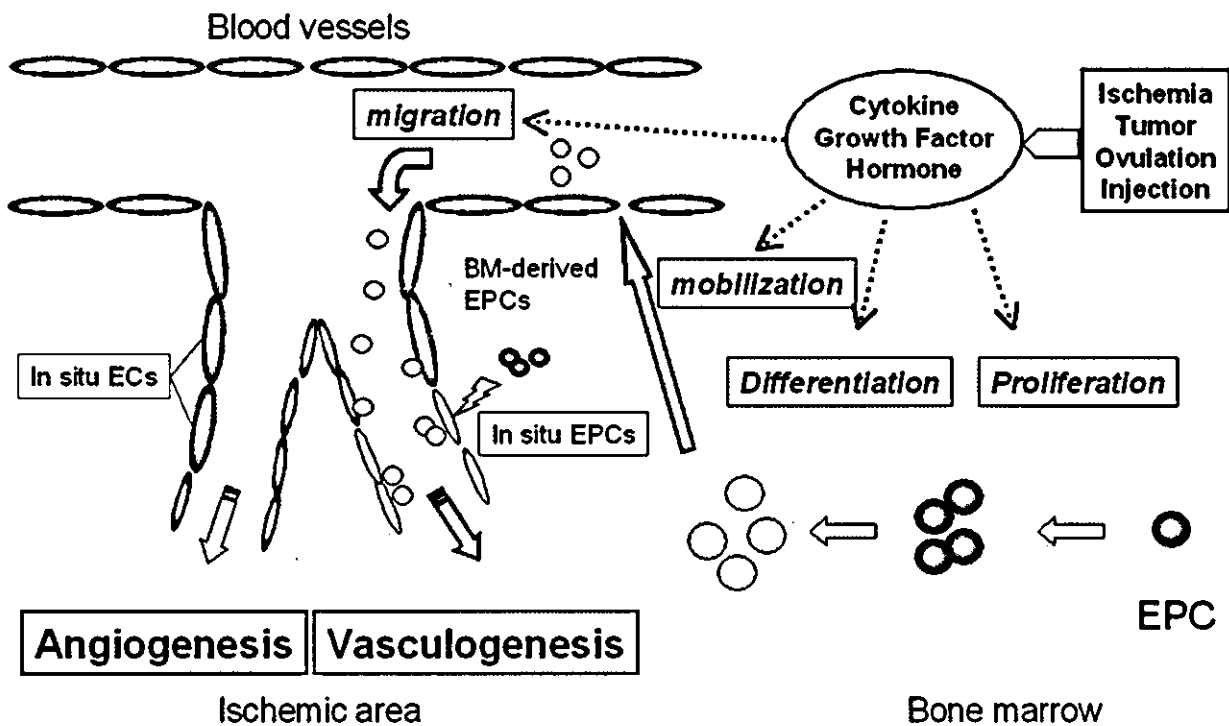


Fig. 1 Post-natal neovascularization in the physiological or pathological events is consistent with neovessel formation contributed by angiogenesis and vasculogenesis at the various rates between their two mechanisms. Angiogenesis and vasculogenesis are due to the activations of *in situ* ECs and BM-derived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

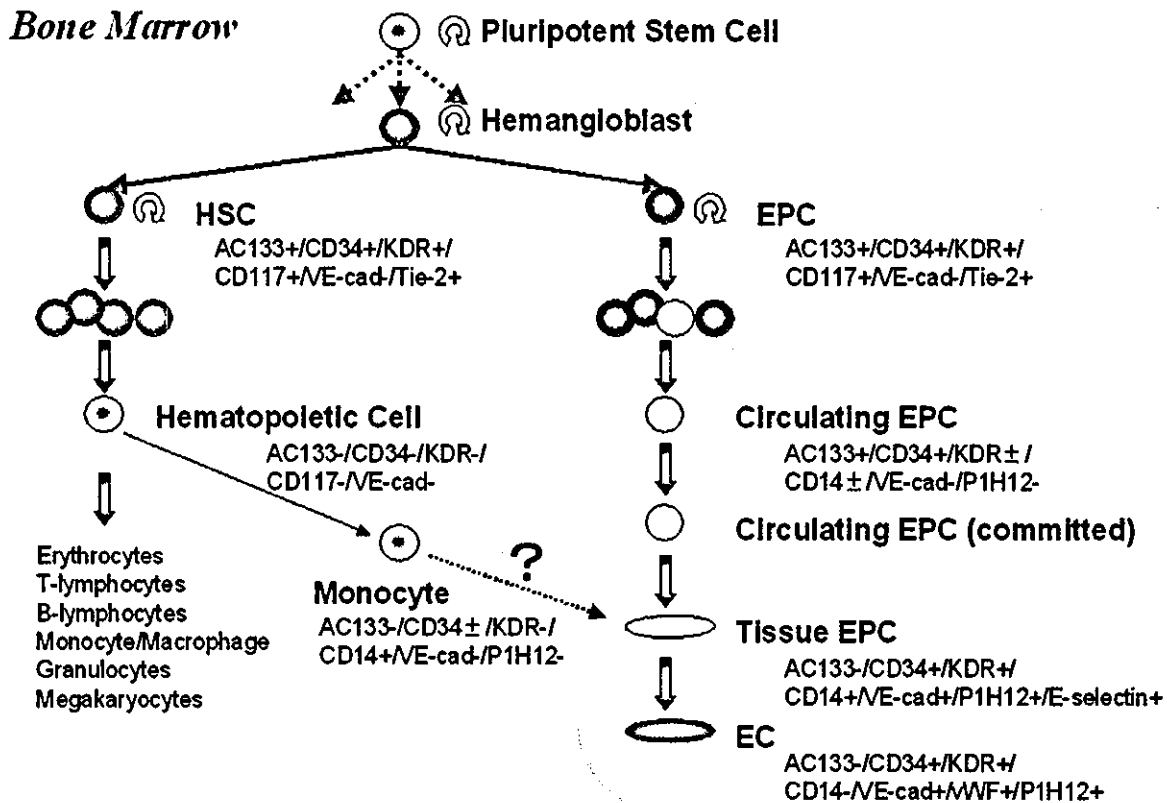


Fig. 2 Putative cascade and expressional profiles of human bone marrow-derived endothelial progenitor cell differentiation. (+: positive, -: negative).

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 α -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