

Fig. 2. Electrophoretic images of products of DMSS. Cell lines from which the genomic DNA originated are shown at the top of each lane. The restriction enzymes used for genomic DNA digestion are shown at the bottom of each lane. White arrows indicate bands that differ between HeLaS3 and 293T *HpaII*-digested DNA. (A) Alu primers used in first PCR; (B and C) four arbitrary primers used in first PCR.

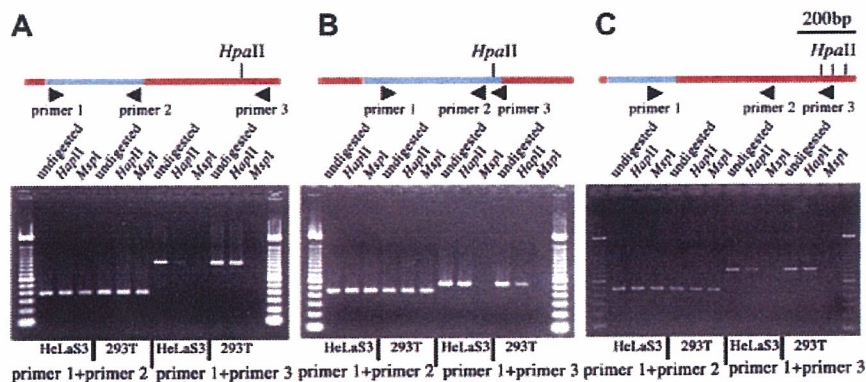


Fig. 3. Confirmation of the methylation states of *HpaII* sites identified in Fig. 2. Blue and orange lines indicate the cloned fragments and the adjacent regions in the genome, respectively. Arrowheads indicate the primer positions. (A) Corresponds to the band in Fig. 2A (primer 1: GGACCCTAGAGAGAACTCT; primer 2: GATTCCTGACAGCAGCATAA; primer 3: GAGTCCTTGAGAAGGCAATA). (B) Corresponds to the band in Fig. 2B (primer 1: TGAGCTCTGACAGTTCATAAT; primer 2: AACCAGAGCATGACATTCAAA; primer 3: TGGGAGGTCCG ATGCTCA). (C) Corresponds to the band in Fig. 2C (primer 1: CAACTATCAGGTTTCTTAGCT; primer 2: GTCCTAGGTGTGGAAAAAT; primer 3: GGCCTGACAGCAGAGATG).

genomic DNA (Fig. 3A). When we used primer 1 and primer 2, there was no *HpaII* site between these two primers, and the band intensity of all PCR products was similar. However when primer 1 and primer 3 were used, there was one *HpaII* site, and although clear bands were seen for both HeLaS3 and 293T undigested template DNA, and 293T DNA digested by *HpaII*, the band intensity was decreased for HeLaS3 DNA digested by *HpaII*. The remaining slight band for *HpaII*-digested HeLaS3 DNA is likely due to heterogeneity of genomic DNA methylation in the HeLaS3 population. These data indicate that the methylation state of the *HpaII* sites shown in Fig. 3A differs between HeLaS3 and 293T cells. In this area, there are no *HpaII* site polymorphisms for the HeLaS3 and 293T genomes (data not shown). These data also indicate that using our method it is possible to screen for differentially methylated regions not only in the DNA corresponding to the bands on polyacrylamide gels, but also in the surrounding regions.

DMSS using degenerate arbitrary primers in the first PCR

To cover the region without repetitive elements and to allow screening for differentially methylated sites in genomes of species other than human, we tried to amplify genomic DNA using degenerate arbitrary primers. In this case, we used a mix of four arbitrary primers to amplify genomic DNA.

DMSS images for gels using only arbitrary primers are shown in Fig. 2B and C. We detected several bands that differed between HeLaS3 and 293T *HpaII*-digested DNA and cloned two of these bands, as indicated by the white arrows in Fig. 2B and C. We determined the sequences of these two bands and checked the surrounding genome sequences (Accession Nos. AADD01055609 and AADD01186865 in GenBank). For the band shown in Fig. 2B, one *HpaII* site was located in the band sequence (Fig. 3B) and for the band shown in Fig. 2C, several *HpaII*

sites were located in the region in the genome surrounding the band sequence (Fig. 3C).

We checked the methylation states of these *HpaII* sites in the genomes of both cell lines. Similar to when Alu primers were used, the difference in DMSS band patterns between HeLaS3 and 293T DNA reflected the methylation states of these *HpaII* sites (Fig. 3B and C). We also confirmed that there is no *HpaII* site polymorphism for the HeLaS3 and 293T genomes (data not shown) in these areas.

Conclusions

In this study, we developed a simple and highly sensitive method of screening for differentially methylated regions of the genome, and confirmed its utility. This method is likely to be useful for epigenetic research in situations where it is difficult to obtain large numbers of uniform cells, for example, when screening for changes in methylation sites in tissue stem cells at different stages of differentiation.

If DMSS were to be used for very small colonies cultured from a single cell, the method could be applied widely. In almost all cases, large populations of cells are subject to heterogeneity of genomic DNA methylation to some extent. Such heterogeneity is a serious problem for genome-wide screening for differentially methylated regions. It is thus advantageous to screen for differentially methylated regions using very small colonies because the effects of methylation heterogeneity can be avoided.

To improve the efficiency of this method still further, a DNA sequencer for band imaging, such as the fluorescent differential display method [5], could be used.

In this study, we performed genome-wide screening for differentially methylated regions using 10 cells of each of two cell lines using the DMSS method. However, the DMSS method could theoretically be used for single cells. Further trial might prove the possibility of single cell DMSS based on our work in a near future.

Acknowledgments

We thank Dr. M. Okano (RIKEN CDB) and Dr. H. Sasaki (National Institute of Genetics) for their helpful suggestions. We also thank Dr. Y. Kobayashi, Dr. M. Kuraki, Dr. K. Miura, Dr. H. Wakisaka and Dr. J. Imaki (National Defense Medical College) for advice on prepar-

ing the manuscript. This work was supported in Kobe Translational Research Cluster.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.bbrc.2006.12.024.

References

- [1] J. Kawai, S. Hirotsune, K. Hirose, S. Fushiki, S. Watanabe, Y. Hayashizaki, Methylation profiles of genomic DNA of mouse developmental brain detected by restriction landmark genomic scanning (RLGS) method, *Nucleic Acids Res.* 21 (1993) 5604–5608.
- [2] G. Liang, M.L. Gonzalzo, C. Salem, P.A. Jones, Identification of DNA methylation differences during tumorigenesis by methylation-sensitive arbitrarily primed polymerase chain reaction, *Methods* 27 (2002) 150–155.
- [3] T. Ushijima, K. Morimura, Y. Hosoya, H. Okonogi, M. Tatemitsu, T. Sugimura, M. Nagano, Establishment of methylation-sensitive-representational difference analysis and isolation of hypo- and hypermethylated genomic fragments in mouse liver tumors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 (1997) 2284–2289.
- [4] I. Hatada, M. Fukasawa, M. Kimura, S. Morita, K. Yamada, T. Yoshikawa, S. Yamanaka, C. Endo, A. Sakurada, M. Sato, T. Kondo, A. Horii, T. Ushijima, H. Sasaki, Genome-wide profiling of promoter methylation in human, *Oncogene* 25 (2006) 3059–3064.
- [5] T. Ito, K. Kito, N. Adati, Y. Mitsui, H. Hagiwara, Y. Sakaki, Fluorescent differential display: arbitrarily primed RT-PCR fingerprinting on an automated DNA sequencer, *FEBS Lett.* 351 (1994) 231–236.
- [6] F.B. Dean, S. Hosono, L. Fang, X. Wu, A.F. Faruqi, P. Bray-Ward, Z. Sun, Q. Zong, Y. Du, J. Du, M. Driscoll, W. Song, S.F. Kingsmore, M. Egholm, R.S. Lasken, Comprehensive human genome amplification using multiple displacement amplification, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99 (2002) 5261–5266.
- [7] V.G. Cheung, S.F. Nelson, Whole genome amplification using a degenerate oligonucleotide primer allows hundreds of genotypes to be performed on less than one nanogram of genomic DNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 (1996) 14676–14679.
- [8] A. Bernards, J.M. Kooter, P.A. Michels, R.M. Moberts, P. Borst, Pulsed field gradient electrophoresis of DNA digested in agarose allows the sizing of the large duplication unit of a surface antigen gene in trypanosomes, *Gene* 42 (1986) 313–322.
- [9] S.A. Ledbetter, D.L. Nelson, S.T. Warren, D.H. Ledbetter, Rapid isolation of DNA probes within specific chromosome regions by interspersed repetitive sequence polymerase chain reaction, *Genomics* 6 (1990) 475–481.
- [10] J. Jurka, A. Milosavljevic, Reconstruction and analysis of human Alu genes, *J. Mol. Evol.* 32 (1991) 105–121.
- [11] W. Liu, W. Chu, P.V. Choudary, C.W. Schmid, Cell stress and translational inhibitors transiently increase the abundance of mammalian SINE transcripts, *Nucleic Acids Res.* 23 (1995) 1758–1765.

糖尿病マクロアングイオパシー発症・進展の予防と治療
大血管症新規治療法開発の現状と今後の展望

血管内皮再生療法

村澤 聡 浅原孝之

Vascular endothelium regeneration therapy

Satoshi Murasawa, Takayuki Asahara

Group for Vascular Regeneration Research, Institute of Biomedical Research and
Innovation/Stem Cell Translational Research Laboratory,
Center for Developmental Biology, Riken Kobe Institute

Abstract

CD34 positive cells were first defined as endothelial progenitor cells (EPCs) from circulating mononuclear cells in peripheral blood. EPCs have shown to be mobilized from bone marrow by the various factors, incorporate into sites of physiological and pathological neovascularization and differentiate into mature endothelial cells (ECs). Post-natal vasculogenesis has been considered to be involved in neovascularization of adult tissues. Recently, freshly isolated CD34 positive cells transplantation has started as clinical trial for ischemic diseases. In the clinical situation, we should consider the cell number and cell quality derived from the patients who have atherosclerosis background, especially diabetes. *Ex vivo* expansion or gene modification of EPCs could be the strategies for the next generation cell therapy to overcome these issues.

Key words: endothelial progenitor cell (EPC), CD34, vasculogenesis, ischemic diseases, cell transplantation

はじめに

血管内皮前駆細胞 (endothelial progenitor cell: EPC) が発見されて以来, 心血管領域での再生医学に関する研究が進み, 最近では血管再生を期待した細胞移植療法が虚血性疾患に対して臨床研究として開始されている. EPC の適用拡大は目覚ましく, 最近では心筋細胞への分化も研究レベルで明らかになり, 整形外科領域では骨細胞への分化の関与も明らかになりつつある. 一方で眼科領域では網膜の新生血管増殖に, ま

た腫瘍領域では腫瘍血管増殖の過程にも EPC の関与が示唆され, 虚血性疾患とは反対に血管新生を抑制する機序を用いた治療の検討が行われている. また虚血性疾患に対する細胞移植においては, 患者の基礎疾患に糖尿病などの動脈硬化促進因子が関与する例が多いことから, 治療に際して EPC の数の減少と, 細胞機能の低下が問題となっている.

本稿では主に EPC に関する最近の研究動向, および虚血性疾患に対する現状の臨床研究の状況, および次世代の臨床治療への取り組みにつ

神戸先端医療センター血管再生研究グループ / 理化学研究所幹細胞医療応用研究チーム

0047-1852/06/¥40/頁/JCLS

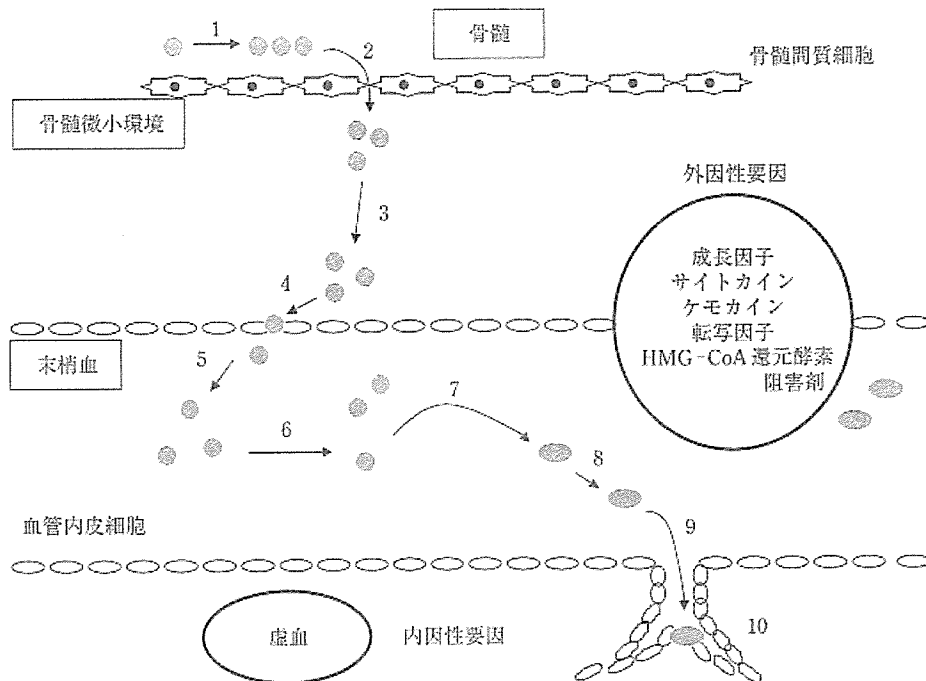


図1 血管内皮前駆細胞動態(kinetics)

成体において血管内皮前駆細胞(EPC)が骨髓から末梢血中に動員され、重症虚血部位の血管形成に関与することが明らかになった。これには多くの外因性要因や内因性要因が関与する。これらの要因が作用することにより、EPCは次のような過程で末梢血管障害部位に集積し、血管再生を促すことが想定されている。1: 骨髓内増殖・分化, 2: 骨髓微小環境内移行, 3: 骨髓微小環境内遊走, 4: 末梢循環血移行, 5・6: 末梢血中移動, 7: 分化, 8・9: 血管障害部位への誘導(外因性あるいは内因性要因による), 10: 血管障害部位にて増殖・分化。この過程は胎児期に存在する血管発生(vasculogenesis)、つまり血管内皮前駆細胞が未分化のままその場所にたどり着き、増殖、分化することで血管を構築する過程と同様と考えられている。

いて述べる。

1. 血管内皮前駆細胞(EPC)

1990年代、米国タフツ大学ではJeffrey Isner教授を中心に重症心虚血、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おり成果をあげていた。血管内皮増殖因子(vascular endothelial growth factor: VEGF)プラスミド遺伝子を用いた虚血部血管新生療法が進められていたなか、1997年、EPCが成体の循環血液中に存在し、重症虚血部位の血管形成に関与することを浅原らが発見した¹⁾。この発見により、これまで胎児期のみ存在するとされた血管発生(vasculogenesis)、つまりEPCが未分化のままその場所にたどり着き、増殖、分化することで血管を構築する過程が成体の血管形

成にもかかわっていることが示唆され、既存隣接血管の血管内皮細胞による増殖、遊走により成立する血管新生(angiogenesis)²⁾とは異なる概念が成体においても存在することが明らかになった。このEPCは通常健康人において末梢血中に存在する割合は非常に少ないが(1%以下)、虚血や創傷などの状態になると骨髓から動員され血管障害部位に集積し、血管修復に関与、あるいは周囲の微小血管構築による血流の回復により病態改善に貢献することが知られている(図1)。このほか、サイトカインや増殖因子に加えHMG-CoA還元酵素阻害剤(スタチン製剤)でもEPCが骨髓から動員されることが示され臨床への応用が示唆されている³⁾。

最初、EPCは末梢血中のCD34陽性細胞として純化されたが、実際CD34は造血幹細胞でも

表1 血管内皮前駆細胞の細胞源、および純化方法

細胞源	純化方法
骨髓単核球	CD34 CD133 (磁気ビーズ)
臍帯血単核球	CD34 CD133 (磁気ビーズ)
末梢血単核球	CD34 CD133 (磁気ビーズ) 末梢血単核球接着細胞

血管内皮前駆細胞(EPC)は最初、末梢血中のCD34由来細胞として同定されたが、その後の研究により細胞源として末梢血のみならず、骨髓や臍帯血もEPCの細胞源となり得ることが示された。一方でEPCのfunctionを明らかにするための基礎研究に、これまで末梢血単核球由来接着細胞が盛んに用いられ多くの報告がなされてきたが、最近ではそれぞれの細胞源由来の単核球をCD34やCD133で純化した細胞を用いた検討が進められている。しかしいまだEPCに完全に特異的な表面マーカーは同定されていないのが現状である。

発現しており、血管系と血液系は共通の幹細胞(hemangioblast)から分化することが示唆されている。その後、単核球の培養によって得られた接着細胞をEPCとして用いた研究が盛んに行われいくつもの報告が出されたが、これらの細胞は細胞表面マーカーの異なる細胞群の集団であるため、より特異的なEPCとしての細胞群を求めてその後様々な細胞源を用いて細胞表面マーカーによって純化された細胞が研究に用いられる流れとなっている(表1)。なかでもCD133の発見はEPCの分類に新しい概念をもたらした。CD133は骨髓由来幹細胞など、未分化な細胞群で発現しているためEPCに関してはより未分化な状態で発現しており、分化とともに発現頻度が低くなり一方でCD34が発現してくるという傾向が確認された⁴。一方で、最近CD34陰性かつCD133陽性分画がCD34陽性かつCD133陽性分画よりもより高い血管再生能力を有するとする報告もあり⁵いまだ議論の

残るところである。一方で末梢血EPCがCD11やCD14など単球/マクロファージ系細胞由来であるという報告があるが⁶、EPCの細胞培養法や細胞分画に用いる抗体が施設によって統一されておらず、施設間の評価を困難にしている。いずれにしてもEPCがサイトカインや増殖因子によって骨髓から動員を受け、虚血や血管障害部位に集積するシグナル伝達機構などの詳細なメカニズムについては、これから解明すべき課題として残されている。

2. 細胞移植による血管新生療法

著者らは成体におけるvasculogenesisの機序を解明するため、血管内皮系細胞に特異的に発現される遺伝子(Flk-1, Tie-2)のプロモーターによる β -galactosidaseを発現するトランスジェニックマウスからの骨髓移植マウスモデルを作成した。これに、癌、創傷治癒、虚血あるいは子宮、卵巣の血管形成を誘発させたところ、それぞれの組織にて骨髓由来のFlk-1あるいはTie-2を発現している細胞が新たな血管を構成していることが示された。つまり、胎児内だけでなく成体においてもangiogenesisとvasculogenesisの機序で血管形成が成立していることが判明した。

その後、ヌードラット下肢虚血モデル⁷や心筋梗塞モデル⁸を用いた研究により血管内皮前駆細胞移植が虚血改善効果を有することが次々と明らかにされた。また、大動物(ブタ)の心筋梗塞モデルを用いた研究でも同様に虚血改善効果が認められ⁹、ヒトへの臨床応用の展望が開けるようになった。2003年から先端医療センターでは、重症下肢虚血患者を対象にした、自己末梢血由来CD34陽性細胞を用いた細胞移植療法を開始した。引き続き重症慢性虚血性心疾患患者を対象にした細胞移植を計画している。患者血由来CD34陽性細胞の細胞数依存的虚血改善効果を確認するため、ヌードラット心筋梗塞モデルに細胞を移植し心機能改善効果を調べたところ、細胞数依存的に心機能改善効果が認められた¹⁰。先に述べたように、虚血状態では健常人に比べると骨髓から末梢血へEPCがよ

り多く動員されていることが考えられるが、治療に用いるには十分ではない。そこで骨髄からの動員を促進するためG-CSF(granulocyte colony-stimulating factor)が用いられている。更にapheresisを行うことにより十分な数の単核球を採取し、これを磁気ビーズに結合させたCD34抗体で分離し、磁気システムでCD34陽性細胞のみを純化している。得られた細胞は虚血下肢側に局所注入している。

細胞移植の効果については今後の詳細な客観的検査の解析結果により明らかにされるが、同時に治療効果についてのメカニズムの解明も必要であると考えられる。すなわちメカニズムに関しては①移植細胞そのものによる血管再生効果、②移植細胞からサイトカインや増殖因子が放出されることによるバラクライン効果、③G-CSFそのものによる効果などが考えられる。①に関しては血管再生の機序はもちろんのこと^{7,8}、最近ではEPCの心筋細胞への分化について相次いで報告されており、今後の臨床応用が期待されるが⁹⁻¹²現段階ではEPCから心筋細胞への分化頻度は低く、この分化効率を高めることが臨床応用へのハードルとなっている。③に関しては、G-CSFが骨髄から幹細胞を動員し、心筋梗塞後のリモデリングを抑制するメカニズムにJak-Stat系のシグナルが関与していることを示した報告もある¹³。

3. 疾病とEPC function

虚血性疾患では動脈硬化性疾患が基礎にあることが多い。動物実験によってEPCが障害血管に取り込まれ、このことによりプラークの形成が阻害され結果として抗動脈効果作用を発揮することが推測されている。しかし臨床応用においては、自己末梢血から細胞を調整するという点から個々の病態において抽出される細胞数と細胞の質について考慮する必要がある。実際、動脈硬化性疾患患者特に糖尿病患者ではEPCの数が減少するばかりではなく増殖、接着、血管への取込み効率のいずれも低下することが示唆されており¹⁴、これらの問題を克服するために、より効率の良い細胞移植治療が検討されて

いる。その一つがEPCの体外培養である。もう一つが遺伝子治療との組み合わせである。このなかには①遺伝子治療と細胞治療の組み合わせという方法と、②遺伝子導入によって修飾された細胞を移植するという方法が含まれる。

4. 次世代の血管新生療法

a. 細胞の体外培養

EPCをはじめ、細胞治療に用いられる細胞群は、末梢血中に存在する細胞数が限られており、そのままでは治療に有効な細胞数を確保することが困難である。そこでEPCを体外培養する手法が検討されてきた。末梢血単核球をフィブロネクチン処理した培養ディッシュ上に播種し、内皮細胞特異的な培地を用いて培養すると播種1週間後には接着細胞が多数得られ、同細胞をEPCとして用いてきた。これらの細胞を更に長期2-3週間培養すると増殖能をもったコロニーが認められる。これらの細胞はEPCの中でもやや内皮系に分化した細胞群と考えられた。これらの細胞は内皮の特異的マーカーである、CD31、VE-cadherinなどを発現しているが、幹細胞に発現されるとされるCD133や、造血幹細胞や血管幹細胞に発現するCD34を認めることがあり、細胞の調整によって発現の程度が異なることがあった。その後、より純化した細胞群を用いるという概念からCD34やCD133などの抗体を用いて純化した細胞が使用されるようになってきている。また培地に関しては、臨床応用を見越して無血清培地での培養が検討されている。今後最適な培養条件が確立され臨床応用に移行する際には、これらの細胞を無菌状態で調整し、治療に供給できるCPC(cell processing center)の整備も同時に必要となってくる。

b. 遺伝子治療と細胞治療の組み合わせ

ボストン・タフツ大学のIsner教授らがVEGFプラスミドの遺伝子治療を末梢動脈閉塞症患者に試みて血管再生による効果を報告して以来、再生医療と遺伝子治療が密接な関連をもつことが示唆されるようになった。その後、心筋虚血に対しても、遺伝子治療による血管新生療法の

効果が示されている。遺伝子治療の候補因子には①成長因子、②ケモカイン、③転写因子などがあげられる。①についてはVEGFのほか別のVEGFファミリーとして、PlGF(placenta-derived growth factor)の血管新生作用が示唆されている。その他FGF(fibroblast growth factor), HGF(hepatocyte growth factor), angiopoietin-1, erythropoietin, IGF-1(insulin-like growth factor-1)なども、血管新生を促進する遺伝子治療の候補にあげられている。②のケモカインについては、単球系の細胞に働いて血管新生を促進するものとして、MCP-1(monocyte chemoattractant protein-1)がある。またSDF-1(stromal cell-derived factor-1)は虚血組織においてEPCを集積し、血管再生を促すことが動物モデルを使った実験で明らかにされている¹⁵⁾。③の転写因子では例えばHIF-1(hypoxia-inducible factor-1)としてあげられる。HIF-1は低酸素、虚血状態の組織においてVEGFを賦活化することが知られているため種々の系で研究が進められており、今後の臨床応用が期待される。複数の遺伝子のコンビネーションも検討されている。心筋虚血動物モデルを用いた検討として、Siddiquiらは、angiopoietin-1+VEGFのコンビネーション¹⁶⁾、またHaoらは、PDGF-BB+VEGFのコンビネーションでそれぞれ単独の遺伝子治療よりも優れた血管新生効果を報告している¹⁷⁾。

c. 遺伝子導入血管内皮前駆細胞の検討

実際にEPCのマーカの一つである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。また、先の項目でも述べたが虚血性疾患患者では動脈硬化性疾患が背景にあり、その動脈硬化の促進因子となる生活習慣病、特に糖尿病の罹患率は我が国でも増加の一途を辿っている。そこで効率の良い臨床効果を得るために、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。次世代の治療の候補としてEPCなどの移植細胞にあらかじめ遺伝子導入を施しこれらの問題を克服しようという試みが研究レベルで行われている(図2)。著者ら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いたが、その最大の問題点は、いかに安全に効率良く患部で遺伝子発現できるかにあった。EPCによる遺伝子治療は、細胞移植単独よりも更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EPC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EPCに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¹⁸⁾。

また著者らのグループでは、細胞老化を抑制する観点から、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EPC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、migrationがともに増強し、apoptosis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EPC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EPCが少量で虚血に対する治療効果を示したと考えられる¹⁹⁾。更に別の報告では、hTERTが単にEPCの生存、増殖のみならず、パラクラインの機序で成長因子の血中への遊離を促進することが知られており、今後の併用療法の実現に向けて興味深い知見である。同時にこの研究の中で彼らはヒト上皮細胞にhTERTを導入した系を用いて外因性テロメラーゼの誘導によって、細胞増殖

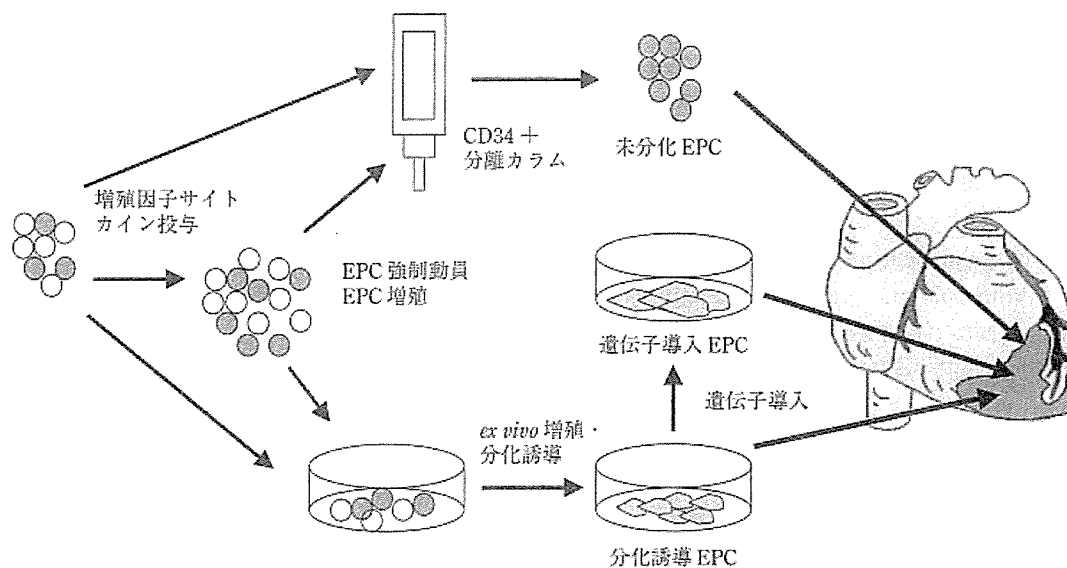


図2 血管内皮前駆細胞の臨床応用

虚血部位の血管新生療法に、血管内皮前駆細胞(EPC)を投与する細胞療法 cell therapy が考えられる。これには CD34 などの表面マーカーで単離してきた細胞をそのまま投与する方法、また体外培養により細胞を増殖後投与する方法などが考えられる。更に次世代の細胞療法として EPC の血管形成遺伝子治療があげられる。すなわち血管増殖を促す VEGF や細胞老化を遅らせる TERT などの遺伝子導入を施した EPC を虚血部位に投与することにより、虚血部位に EPC が取り込まれると同時に、標的遺伝子の発現により相乗的な血管再生効果が期待される。

に関連する遺伝子、特に上皮成長因子受容体 (EGFR) の発現が調節され、上皮細胞の増殖に関与することを示している²⁰⁾。

おわりに

以上、EPC に関する最近の研究動向、および虚血性疾患に対する現状の臨床研究の状況、および次世代の臨床治療への取り組みについて述べた。虚血性疾患に対する細胞移植療法は幾つかの施設で臨床研究が始められているが、細胞

源として骨髓単核球、末梢血単核球由来 CD34 陽性細胞など、G-CSF による骨髓からの動員の有無、細胞の投与経路、投与方法(局所投与か、血管内投与か)、対象患者の適応(急性、亜急性、慢性)、および重症度など検討すべきいくつかの因子があり、施設によっても異なるのが現状である。また研究分野では、細胞治療の効果のメカニズムについて解明されていない部分が多く、今後の課題となっている。

■ 文 献

- 1) Asahara T, et al: Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 275: 964-967, 1997.
- 2) Folkman J, Klagsbrun M: Angiogenic factors. *Science* 235: 442-447, 1987.
- 3) Murasawa S, et al: HMG-CoA reductase inhibitor mobilizes bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *J Clin Invest* 108: 399-405, 2001.
- 4) Raffi S, Lyden D: Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. *Nat Med* 9: 702-712, 2003.
- 5) Friedrich EB, et al: CD34-/CD133+/VEGFR-2+ endothelial progenitor cell subpopulation with potent vasoregenerative capacities. *Circ Res* 98: e20-e25, 2006.

- 6) Rehman J, et al: Peripheral blood "endothelial progenitor cells" are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors. *Circulation* 107: 1164-1169, 2003.
- 7) Kalka C, et al: Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 3422-3427, 2000.
- 8) Kawamoto A, et al: Therapeutic potential of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia. *Circulation* 103: 634-637, 2001.
- 9) Kawamoto A, et al: Intramyocardial transplantation of autologous endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization of myocardial ischemia. *Circulation* 107: 461-468, 2003.
- 10) Iwasaki H, et al: Dose-dependent contribution of CD34-positive cell transplantation to concurrent vasculogenesis and cardiomyogenesis for functional regenerative recovery after myocardial infarction. *Circulation* 113: 1311-1325, 2006.
- 11) Badorff C, et al: Transdifferentiation of blood-derived human adult endothelial progenitor cells into functionally active. *Circulation* 107: 1024-1032, 2003.
- 12) Murasawa S, et al: Niche-dependent Trans-lineage Commitment of Endothelial Progenitor Cells, not Cell Fusion in general, into Myocardial Lineage Cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25: 1388-1394, 2005.
- 13) Harada M, et al: G-CSF prevents cardiac remodeling after myocardial infarction by activating the Jak-Stat pathway in cardiomyocytes. *Nat Med* 11: 305-311, 2005.
- 14) Tepper OM, et al: Human endothelial progenitor cells from type II diabetics exhibit impaired proliferation, adhesion, and incorporation into vascular structures. *Circulation* 106: 2781-2786, 2002.
- 15) Yamaguchi J, et al: Stromal cell-derived factor-1 effects on ex vivo expanded endothelial progenitor cell recruitment for ischemic neovascularization. *Circulation* 107: 1322-1328, 2003.
- 16) Siddiqui AJ, et al: Combination of angiopoietin-1 and vascular endothelial growth factor gene therapy enhances arteriogenesis in the ischemic myocardium. *Biochem Biophys Res Commun* 310: 1002-1009, 2003.
- 17) Hao X, et al: Angiogenic effects of dual gene transfer of bFGF and PDGF-BB after myocardial infarction. *Biochem Biophys Res Commun* 315: 1058-1063, 2004.
- 18) Iwaguro H, et al: Endothelial progenitor cell vascular endothelial growth factor gene transfer for vascular regeneration. *Circulation* 105: 732-738, 2002.
- 19) Murasawa S, et al: Constitutive human telomerase reverse transcriptase expression enhances regenerative properties of endothelial progenitor cells. *Circulation* 106: 1133-1139, 2002.
- 20) Smith LL, et al: Telomerase modulates expression of growth-controlling genes and enhances cell proliferation. *Nat Cell Biol* 5: 474-479, 2003.

血管内皮前駆細胞(EPC)を用いた再生治療

岩崎 弘登 川本 篤彦 村澤 聡 浅原 孝之

脈管学 第46巻第3号

別刷

日本脈管学会

(J Jpn Coll Angiol, 2006, 46: 273-280)

血管内皮前駆細胞(EPC)を用いた再生治療

岩崎 弘登^{1,2} 川本 篤彦¹ 村澤 聡¹ 浅原 孝之^{1,3}

要 旨：骨髄に由来する血管内皮前駆細胞(endothelial progenitor cell: EPC)は1997年、浅原らにより末梢血中の単核球成分の一部(CD34陽性分画)として存在することが証明され、また既存隣接血管の血管内皮細胞による増殖、遊走により成立する血管新生(angiogenesis)のみならず、胎児期のみ存在するとされた血管発生(vasculogenesis)の機序が成体でも成立していることが証明された。現在、この機序(vasculogenesis)を利用して重症の冠動脈疾患や下肢虚血疾患(閉塞性動脈硬化症、パージャー病)患者の血管再生療法が臨床試験として開始され、その効果が期待されている。一方、CD34陽性細胞の可塑性において、血管系以外のlineageに分化する機序は、いまだ一定した見解が得られていない。今回われわれのグループは、*in vitro*また、*in vivo*のラット心筋梗塞モデル/ラット大腿骨難治性骨折モデルにおいてCD34陽性細胞移植による血管再生効果のみならず、心筋・平滑筋・骨芽細胞の再生効果を認め、また機能・組織学的に改善を示すことを証明した。これらの結果から末梢血CD34陽性細胞が多分化能を持つことが明らかになり、さらにこの細胞を用いた移植療法の新たな展開が期待されている。(J Jpn Coll Angiol, 2006, 46: 273-280)

Key words: endothelial progenitor cell, CD34⁺ cell, cell therapy, vasculogenesis, cardiomyogenesis

はじめに

近年の高齢化、食生活の変化などに伴い、動脈硬化を基盤とした虚血性心疾患が増加し、わが国でも死因の上位を占めている。しかし、その病態が重度(慢性心不全)になると既存の薬物治療、カテーテル治療、バイパス手術などのconventional strategiesでは治療効果が不十分、あるいは無効な症例も少なくなく、新しい治療方法の確立が望まれている。そこで登場してきたのが、さまざまな幹細胞を用いた臓器形成や組織再生の治療である。骨髄に由来する血管内皮前駆細胞(endothelial progenitor cell: EPC)が末梢血中の単核球成分の一部として存在し、また単核球中のCD34陽性分画がEPCのenriched populationであることが証明されて以来、多くの*in vivo/in vitro*の実験を通じて虚血性疾患に対しての

治療応用の有用性を示唆する知見が集積されている。現在、重症の冠動脈疾患や下肢虚血疾患(閉塞性動脈硬化症、パージャー病)患者に対する血管再生療法の臨床試験が開始されている。また一方で、近年、末梢血CD34陽性細胞はヘテロな細胞分画のため、その場の環境に応じてほかのlineageへの多分化能を示すことが期待されている。多くの場合、臓器機能の低下はその機能固有の細胞(たとえば心臓における心筋細胞)の絶対数の低下、あるいはそれらが機能を発揮するに十分な血流が供給されていないことに起因する。両因子ともに重要であるが、内因性血管形成能の低下した組織に、その臓器固有の細胞に分化しうる幹細胞を移植しても顕著な機能回復は期待し難い。したがって再生された臓器や組織を養う血管系の再構築が重要であり、血管新生・血管再生医療は残存臓器の機能改善のための治療に留まらず、再生医療の基盤技術になると考えられる。その機能を担う細胞起源として血管発生(vasculogenesis)とともにほかのlineageへ分化する作用

¹神戸先端医療センター血管再生研究グループ/理化学研究所幹細胞医療応用研究チーム

²大阪市立大学心臓血管外科

³東海大学医学部基盤診療学系再生医療科学

2006年5月31日受理

を持つ末梢血CD34陽性細胞の有用性が期待されている。本稿では今後、再生医療において大きな可能性を秘めている末梢血CD34陽性細胞を用いた心・血管・骨再生研究の動向とその臨床応用について著述する。

血管内皮前駆細胞の発見と血管形成への関与

近年、骨髄造血幹細胞 (hematopoietic stem cell: HSC) 以外にも、肝臓、骨髄間葉系、中枢神経系などのさまざまな組織において、多系統の細胞へ分化しうる多能性幹細胞 (multipotent stem cell) や、特定の細胞系列への分化能を持つ前駆細胞 (precursor または progenitor cell) の存在が明らかにされている¹⁻³⁾。

そのような中、われわれのグループはEPC (末梢血CD34陽性細胞) が成体の循環血液中に存在し、新たに血管が形成されつつある局所に取り込まれ、分化・増殖・遊走し、血管形成に関与することを証明した⁴⁾。この機序は、胎児期のみが存在するとされた血管発生に一致し、これまで考えられてきた成体の血管形成、すなわち既存隣接血管における血管内皮細胞の増殖、遊走による血管新生 (angiogenesis)⁵⁾とは異なる概念が生まれた。すなわち“既存血管内皮細胞の再形成”ではなく、“EPCからの発生”の機序が成体における血管形成に関与することが明らかになった。さらに血管内皮系細胞に特異的な遺伝子 (Fik-1, Tie-2) のプロモータによるβ-ガラクトシダーゼを発現するトランスジェニックマウスの骨髄移植モデルを作製し、虚血、癌、創傷治癒、あるいは子宮、卵巣の血管形成を誘発すると、それぞれの組織において、ドナー骨髄由来のFik-1、あるいはTie-2を発現している細胞が新たな血管を構成していることが示された^{6,7)}。つまり成体での血管形成において、骨髄由来のEPCが体循環を経て局所にたどり着き、血管発生の機序で新規血管を形成することが判明した。成体でのEPCの動態はVEGF (vascular endothelial growth factor), SDF (stromal cell derived factor)-1, アンジオポエチン1, GM-CSF (granulocyte macrophage colony stimulating factor), G-CSF (granulocyte colony stimulating factor) などのサイトカイン、増殖因子により骨髄から末梢血への動員が調節される。腫瘍、虚血性疾患、糖尿病網膜症、創傷治癒などの組織はさまざまなサイトカインを分泌し、EPCの骨髄から末梢血への動員と血管の新規形成部への取り込みを促進するものと考えられている。

末梢血CD34陽性細胞による血管再生療法

EPCを用いた血管再生療法の研究は、重症虚血性疾患に対する新たな治療法として大きな可能性を秘めている。その基礎的研究として、免疫不全マウスの下肢虚血モデルにヒトの培養EPC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⁸⁾。また、培養EPCだけでなく末梢血CD34陽性細胞を免疫不全ラットの心筋梗塞モデルに移植した研究では、組織学的に新生血管の増生・心筋壊死の減少が誘導され、左室機能の改善にも役立つことが判明した^{9,10)} (Fig. 1)。この方法は、EPC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先進的医療として注目を受け、現在、重症の冠動脈疾患や下肢虚血疾患 (閉塞性動脈硬化症、バージャー病) 患者に対する血管再生療法として末梢血CD34陽性細胞を用いた臨床試験が開始されている。VEGF等の成長因子遺伝子導入による血管新生療法が内因性の血管内皮細胞機能低下のため無効に終わるような症例に対しても、増殖能・分化能に富んだEPCを局所に補充すると、より高い治療効果を期待することができる。またEPC移植治療の利点として移植担体が細胞であることから、遺伝子導入などの操作が比較的容易にできることもあげられる。安全性等については検討する必要があるが、現在の分子生物学的テクニックを用いれば、治療に用いる細胞の機能を高めることも可能である。

EPCの心筋細胞への分化 (*in vitro*)

EPCによる血管発生の機序が明らかになって以来、重症下肢虚血および心筋虚血患者に対する血管再生療法として臨床応用が試みられ、その有効性が明らかになりつつある。一方、EPCの可塑性、すなわち血管系以外の細胞系列への分化能を応用した心血管再生治療も近年注目を集めている。当研究室の村澤らは微小環境下 (ニッチェ) における末梢血EPCの分化様式を調べるため、*in vitro*の系として1週間、ヒトEPCとラット心筋芽細胞株 (H9C2) を1:3の割合で共培養し、細胞融合、および心筋細胞へのEPCの分化効率について検討を行った。ヒト特異的心筋マーカーであるcardiac troponin-I (cTn-I) およびα-myosin heavy chain (α-MHC) 遺伝子発現を共培養のサンプルから調整したRNAを用いてRT-PCR (reverse transcriptase-polymerase chain reaction)

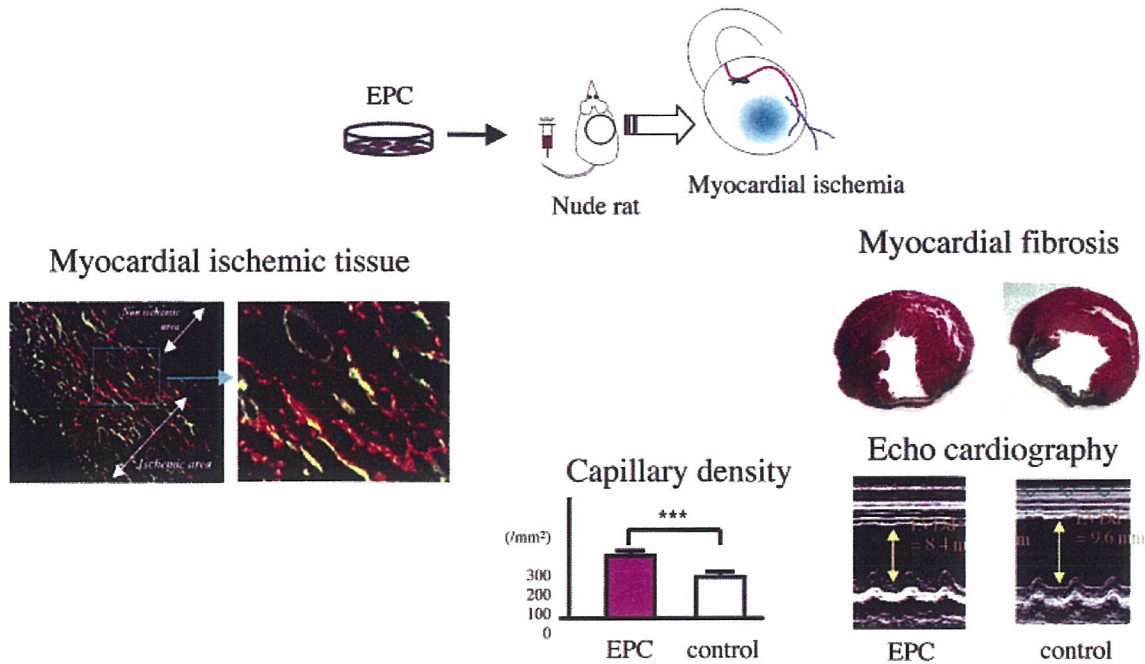


Figure 1 *Ex vivo* expanded EPCs incorporate into foci and preserve left ventricular function after myocardial ischemia. Myocardial ischemic tissue: green; BS-1 lectin, red; DiI-EPCs

で検討した。共培養前のヒト由来EPC単独のサンプルおよびラット由来H9C2単独のサンプルでは、いずれのマーカーの発現も認められなかったが、共培養後のサンプルでは、すべてのヒト特異的心筋マーカーが発現していた(Fig. 2)。ヒト特異的心筋抗体 α/β -MHCに対する蛍光免疫細胞染色では共培養後1週間で陽性細胞を検出した。さらに、ヒト細胞の検出のためにhuman leukocyte antigen (HLA)-ABCとcTn-Iの二重染色を行い、同様に陽性細胞を検出した。 α -MHC蛍光免疫細胞染色より計測したヒト心筋抗体陽性細胞の割合は、播種した全EPC中の約0.5%であった。また心筋細胞への分化機序を検討するため、Qtracker(Quantum Dot社製)による細胞染色システムを用いてEPCを赤色、H9C2を緑色に染色後、共培養を行い細胞融合の有無を検討した(Fig. 3)。本研究に用いた染色試薬は、細胞毒性が少なく長時間の染色が可能なおうえ、従来の染色システムに見られた周辺細胞への色素のもれ込みを最小限に抑える特徴を持つ。蛍光顕微鏡で観察した結果、細胞融合の割合は全体の約0.03%であった。今回の検討により、心筋虚血において、EPCが血管系への分化のみな

らず心筋細胞へ分化する可能性が示された。この機序には、おもに細胞融合ではなくtransdifferentiationが関与していると考えられた¹¹⁾。

末梢血CD34陽性細胞移植による心筋再生 (*in vivo*)

われわれのグループは前項の*in vitro*での研究に加え、*in vivo*においてもEPCの心筋細胞への分化に関する検討を行った。CD34陽性細胞は、G-CSFによる骨髄からの強制動員・アフェレーシス・磁気細胞分離により、慢性重症下肢虚血患者の末梢血から採取し、低用量(Low)、中用量(Mid)、または高用量(High)のCD34陽性細胞あるいはPBS(phosphate buffered solution)を免疫不全ラットの心筋梗塞モデルの心筋内へ移植した。移植後4週目に心機能を心エコー、Millarカテーテル検査で、分化機序を免疫組織化学、RT-PCR、fluorescence *in situ* hybridization (FISH)などで評価した。心機能(FS, \pm dP/dt)や組織学的指標(微小血管密度、左室梗塞範囲)はCD34陽性細胞移植後に用量依存性に改善した。human nuclei antibody (HNA)とcTn-Iとの二重染色

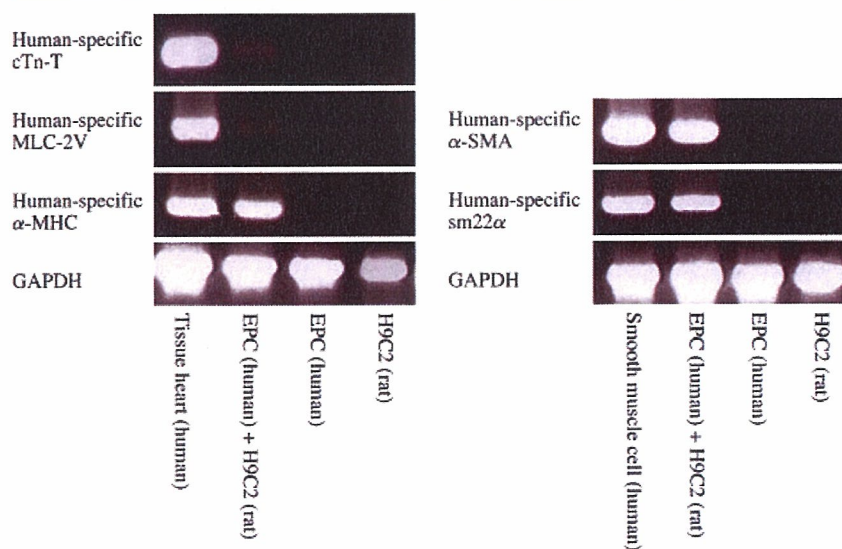
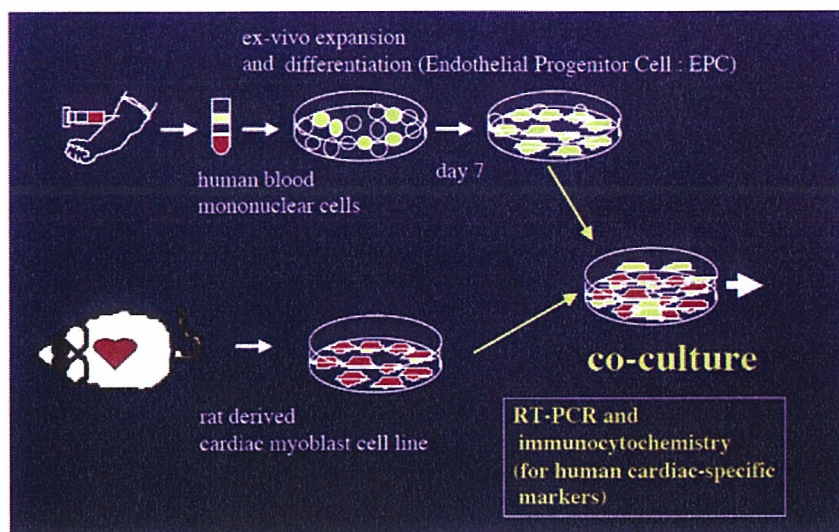


Figure 2 Coculture of human EPCs and rat cardiac myoblasts (H9C2) expressed human-specific cardiac and smooth muscle markers. RNA samples from various culture conditions were analyzed by RT-PCR. cTn-T, MLC-2V, and -MHC are specific markers for cardiomyocyte, and -SMA and sm22 are specific markers for smooth muscle cells. Left lane of each column shows positive control, and right lane of each column shows negative control (only rat-derived H9C2). Human EPC did not express both cardiac and smooth muscle cell markers. After coculture with human EPC and rat H9C2, both cardiac and smooth muscle markers were observed.

により検出されたヒト細胞，すなわち虚血部位でのヒトCD34陽性細胞由来の心筋細胞数も用量依存性に増加していた(Fig. 4)。また，ヒト特異的brain natriuretic peptide (BNP)抗体を用いた免疫組織化学検査でも，ヒト特異的BNP陽性心筋細胞密度がHigh群； 2480 ± 149 ，Mid群； 1860 ± 141 ，Low群； 423 ± 9 ，PBS群； $0 \pm 0/\text{mm}^2$ ，と用量依存性に高くなり，また，移植細胞由来のヒト血管平滑筋・内皮細胞も用量依存性に再生されたことが証明された。FISH解析よりこのCD34陽性細胞の多分化能にはcell fusionによらない機序，すなわちEPCの transdifferentiation, multipotent stem cellあるいはmultiple

progenitor cellsからの心筋細胞への分化等も関与していることが確認された。さらに詳細に検討した結果，虚血組織から抽出したRNAのRT-PCRにおいてもヒト特異的心筋・血管平滑筋・内皮マーカー (BNP, MHC, cTn-I, Nkx2.5, sm22α, SMA, KDR等)の遺伝子が用量依存性に増幅発現することも判明した¹²⁾。以上のことから慢性重症下肢虚血患者の強制動員CD34陽性細胞は，多分化能を持ち，心筋梗塞への移植治療において用量依存性に心筋・血管再生効果を示し，機能的・組織学的に臓器再生に貢献することが証明された。心筋細胞・血管細胞の両者を再生するポテンシャルを有する

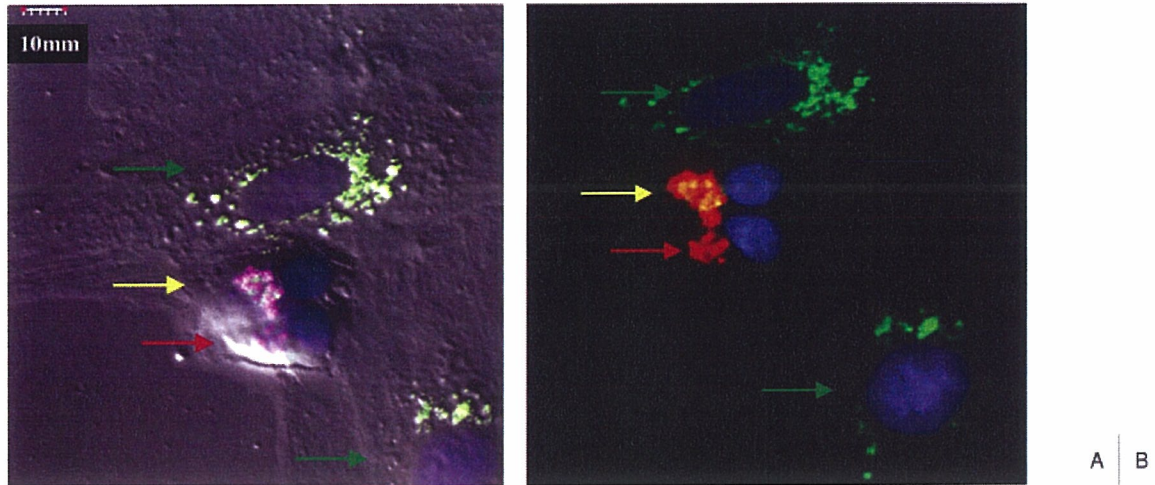


Figure 3 Evaluation of frequency of cell fusion in coculture system. We performed coculture using Qtracker (Quantum Dot Corp.), which is a nanocrystal labeling marker incorporated in the vesicles of the cytoplasm. H9C2 were labeled with the Qtracker 565 (green arrows), and hEPCs cells were labeled with Qtracker 655 (red arrows) (A and B). Cell fusion was observed in the EPCs attached to H9C2 (yellow arrows).

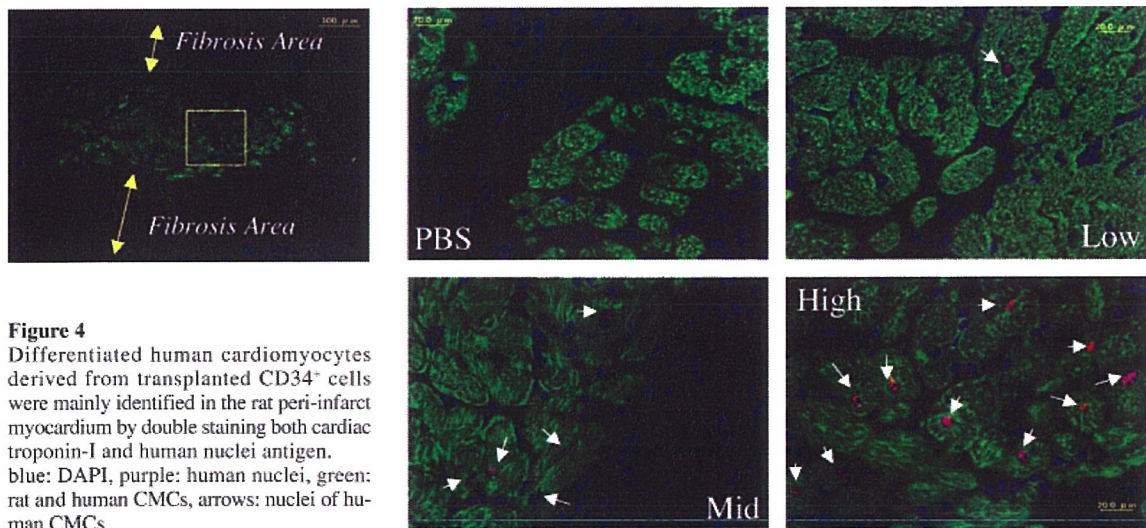


Figure 4 Differentiated human cardiomyocytes derived from transplanted CD34⁺ cells were mainly identified in the rat peri-infarct myocardium by double staining both cardiac troponin-I and human nuclei antigen. blue: DAPI, purple: human nuclei, green: rat and human CMCs, arrows: nuclei of human CMCs

点で、骨髄由来CD34陽性細胞移植は心不全、心筋梗塞治療にきわめて有用であることが示唆された。

血管内皮前駆細胞(EPC)移植の臨床試験と安全性

当研究室では、2003年11月から慢性重症下肢虚血患者に対する自家EPC移植による血管再生治療に関する

第I/II相臨床試験を開始した。試験デザインは単盲検下での用量漸増試験である。対象はFontaine分類III度、IV度の慢性重症下肢虚血患者で、血管形成術やバイパス手術の適応にならない重症例である。EPCは、G-CSFの皮下投与により骨髄から動員された単核球をアフゼレーシスで採取した後に、磁気細胞分離法により単核球中のCD34陽性細胞として分離する。EPCの投与は、

腰椎麻酔下で、治療効率を高めるため局所投与(虚血肢の筋肉内への投与)を行っており、その治療成果を上げている。また心筋梗塞等の慢性虚血性心疾患に対する自家EPC移植による血管再生治療に関する第I/II相臨床試験も準備中である。血管再生療法の適応となるのは、慢性虚血性心疾患のうち経皮的冠動脈形成術(percutaneous coronary artery intervention: PCI)や冠動脈バイパス術(coronary artery bypass graft: CABG)の適応にならない重症例である。細胞移植に関しては、NOGA mapping system (Cordis社製)を用いて心筋虚血部を同定し、CD34陽性細胞を心腔内から局所投与するものである。NOGA mapping systemを用いると、開胸手術と比較してより低侵襲で患者負担が軽減するため、心機能が極度に低下している症例でも比較的安全に血行再建・心筋再生が可能であると期待される。

EPC移植の臨床応用における 問題点と将来展望

EPC移植の臨床応用においては、現在のところ自家移植が主体になっている。その最大の理由は、同種移植や胚性幹細胞移植と比較して、倫理面・免疫学的にも問題が少ないことがあげられる。これまでに一定の安全性・有効性を示唆するデータが集積されつつあるが、今後克服すべき技術的な問題点として、より高用量のEPCを確保する技術の確立が望まれる。現在、その解決法の1つとして、細胞の全身投与でなく局所投与が試みられているが、下肢閉塞性動脈硬化症による広範な組織における虚血などでは、局所投与用であっても十分な細胞数の確保は困難である。十分な細胞数の確保のために、VEGFや、GM-CSFなどのサイトカインにより骨髄から強制動員をかけ^{13,14)}、さらにアフエレーシスと併用することにより収量を増やすこともできる。また、すでに臨床で行われているHSC移植のように、数回に分けて細胞を採取、凍結保存することにより全収量を増やすことも可能である。もちろん、体外でのEPCの増殖も十分考えられる。サイトカインや増殖因子を添加することによる細胞の培養・増幅も可能であるが、臨床応用においてはその安全性を十分に検討する必要がある。また、これまでに報告されてきたEPC培養法では動物血清が使用されてきたため、臨床応用に際しては人畜感染症のリスクを有する。今後は自己血清あるいは無血清培地を用いた培養法の確立

も必要な項目の1つである。その他の方法として、細胞を得るソースとして臍帯血が期待されている。国内外で臍帯血バンクの整備も進み、かつ、内容も充実しつつあり、HSC移植のためだけでなく、EPCを用いた治療にも利用が可能になることが期待される。臍帯血には骨髄に比してより未分化な細胞が含まれており、臍帯血より得られるEPCは成体から得られるものより長いテロメアを有し、より強い血管形成能を示す可能性が報告されている¹⁵⁾。さらに、採取が全くの非侵襲であるということも併せて考えると、今後、自己および同種移植における幹細胞の重要な供給源になることが予想される。

おわりに

最近、体性幹細胞あるいは前駆細胞の多分化能が示唆されるようになり、CD34陽性細胞についても、心機能改善が従来の血管発生(vasculogenesis)の機序のみならず、心筋再生(cardiomyogenesis)の機序によっても制御される可能性が報告されている¹⁶⁻¹⁸⁾。われわれのグループも同様に、培養EPCやCD34陽性細胞が*in vitro/in vivo*両方の系において心筋関連遺伝子発現や免疫染色による蛋白レベルでの心筋マーカーを発現し、心筋再生に貢献する結果を得た。さらに*in vitro*でEPCが心筋細胞に分化する機序において、細胞融合の割合は約0.03%と、非常に少ないものであり、このデータは、30~50%の高率で細胞融合を認めるとするLagasseら¹⁹⁾の報告と異なりBadorffら²⁰⁾の報告に比較的近いものであった。しかし、いまだ一定した見解が得られていないのが現状である。さらに重要な点は、いずれの系においても心筋細胞への分化の割合が約0.5~6%にすぎなかったことであり、今後、心筋再生の機序を応用した臨床治療のためには、この割合を増やすための検討が必要であると考えられる。

最後に、さまざまな臓器の機能低下を改善する目的で行われる組織幹細胞による器官再生(organogenesis)・組織再生(tissue regeneration)過程における血管形成の研究は、再生医学発展の中心的役割を果たす可能性を持っているとともに、必須の戦略になると考えられる。また、さまざまな幹細胞を用いて臓器再生が試みられているが、移植される幹細胞の生着・分化・機能発現にCD34陽性細胞を用いた血管再生が支持療法として重要になる可能性がある。

現在、われわれの研究室では臨床の場における安全でより効率的な治療を目標として、さらに慎重な基礎研究の積み重ねと、動物を用いた前臨床試験を行っている。

文 献

- 1) Malouf NN, Coleman WB, Grisham JW et al: Adult-derived stem cells from the liver become myocytes in the heart in vivo. *Am J Pathol*, 2001, **158**: 1929–1935.
- 2) Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC et al: Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 1999, **284**: 143–147.
- 3) Pagano SF, Impagnatiello F, Girelli M et al: Isolation and characterization of neural stem cells from the adult human olfactory bulb. *Stem Cells*, 2000, **18**: 295–300.
- 4) Asahara T, Murohara T, Sullivan A et al: Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*, 1997, **275**: 964–967.
- 5) Folkman J, Klagsbrun M: Angiogenic factors. *Science*, 1987, **235**: 442–447.
- 6) Isner JM, Asahara T: Angiogenesis and vasculogenesis as therapeutic strategies for postnatal neovascularization. *J Clin Invest*, 1999, **103**: 1231–1236.
- 7) Asahara T, Masuda H, Takahashi T et al: Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res*, 1999, **85**: 221–228.
- 8) Kalka C, Masuda H, Takahashi T et al: Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97**: 3422–3427.
- 9) Kawamoto A, Gwon HC, Iwaguro H et al: Therapeutic potential of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia. *Circulation*, 2001, **103**: 634–637.
- 10) Kawamoto A, Tkebuchava T, Yamaguchi J et al: Intramyocardial transplantation of autologous endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization of myocardial ischemia. *Circulation*, 2003, **107**: 461–468.
- 11) Murasawa S, Kawamoto A, Horii M et al: Niche-dependent translineage commitment of endothelial progenitor cells, not cell fusion in general, into myocardial lineage cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, **25**: 1388–1394.
- 12) Iwasaki H, Kawamoto A, Ishikawa M et al: Dose-dependent contribution of CD34-positive cell transplantation to concurrent vasculogenesis and cardiomyogenesis for functional regenerative recovery after myocardial infarction. *Circulation*, 2006, **113**: 1311–1325.
- 13) Asahara T, Takahashi T, Masuda H et al: VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *EMBO J*, 1999, **18**: 3964–3972.
- 14) Takahashi T, Kalka C, Masuda H et al: Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med*, 1999, **5**: 434–438.
- 15) Murohara T, Ikeda H, Duan J et al: Transplanted cord blood-derived endothelial precursor cells augment postnatal neovascularization. *J Clin Invest*, 2000, **105**: 1527–1536.
- 16) Yeh ET, Zhang S, Wu HD et al: Transdifferentiation of human peripheral blood CD34⁺-enriched cell population into cardiomyocytes, endothelial cells, and smooth muscle cells in vivo. *Circulation*, 2003, **108**: 2070–2073.
- 17) Galli R, Borello U, Gritti A et al: Skeletal myogenic potential of human and mouse neural stem cells. *Nat Neurosci*, 2000, **3**: 986–991.
- 18) Badorff C, Brandes RP, Popp R et al: Transdifferentiation of blood-derived human adult endothelial progenitor cells into functionally active cardiomyocytes. *Circulation*, 2003, **107**: 1024–1032.
- 19) Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M et al: Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med*, 2000, **6**: 1229–1234.

Vasculogenesis and Cardiomyogenesis by Endothelial Progenitor Cell (EPC)

Hiroto Iwasaki,^{1,2} Atsuhiko Kawamoto,¹ Satoshi Murasawa,¹ and Takayuki Asahara^{1,3}

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

²Department of Cardiovascular Surgery, Osaka City University Graduate School of Medicine, Osaka, Japan

³Department of Regenerative Medicine, Tokai University School of Medicine, Kanagawa, Japan

Key words: endothelial progenitor cell, CD34⁺ cell, cell therapy, vasculogenesis, cardiomyogenesis

Many researchers have been investigating the mechanism of organ and tissue regeneration. Endothelial progenitor cells (EPCs) were identified in adult peripheral blood, which were capable of incorporating into foci of neovascularization and differentiating into mature endothelial cells (ECs) *in situ*. These findings are consistent with vasculogenesis in embryonic neovascularization. Recently, our group results of human CD34⁺ cell (EPCs) transplantation into an immunodeficient rat myocardial ischemia model demonstrated that collaborative multilineage differentiation potential of EPCs into not only ECs but cardiomyocytes (CMCs) and smooth muscle cells was enhanced by cell dose escalation and was conducive to heart regeneration in terms of functional and histological recovery through vasculogenesis and cardiomyogenesis.

Now, researchers attempt to utilize this strategy for new blood vessel formation and CMCs development in clinical trials. The availability of EPCs in human have promised the advance in the field of regeneration medicine. This exciting achievement opened the way to clinical application of stem cell therapy. Considering the importance of blood vessel development in the process of cardiomyogenesis and vasculogenesis by EPCs may be an essential cascade for tissue and organ regeneration following pathological damages in various critical diseases.

Basic background and clinical application of therapeutic neovascularization and cardiomyogenesis by EPC transplantation for tissue/organ regeneration is summarized in this article. (J Jpn Coll Angiol, 2006, 46: 273–280)

Endothelial E-Selectin Potentiates Neovascularization via Endothelial Progenitor Cell-Dependent and -Independent Mechanisms

Yasunobu Nishiwaki, Masayuki Yoshida, Hideki Iwaguro, Haruchika Masuda, Noriko Nitta, Takayuki Asahara, Mitsuaki Isobe

Background—Although potential participation of bone marrow-derived circulating endothelial progenitor cells (EPCs) to neoangiogenesis has been proposed, the precise molecular mechanisms of EPC recruitment to vascular endothelium has not been fully elucidated.

Methods and Results—Peripheral blood mononuclear cells were isolated from healthy volunteers and cultured for 7 days to obtain EPCs. Tumor necrosis factor- α -activated human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) supported significantly more rolling and adhesion of EPCs compared with inactivated HUVEC monolayer. Pretreatment of activated HUVEC with an adhesion-blocking mAb to E-selectin significantly reduced EPCs adhesion to HUVECs. When HUVECs were transduced with a recombinant adenovirus of E-selectin (AdRSVE-sel) or that of β -galactosidase (AdRSVLacZ), E-selectin-transduced but not LacZ-transduced HUVECs exhibited significantly more EPC rolling as well as adhesion. Further, effect of AdRSVE-sel or AdRSVLacZ was examined in mouse hind limb ischemic model. AdRSVE-sel-transduced mice showed significantly less limb necrosis and higher laser Doppler ratio when compared with AdRSVLacZ-transduced mice. Interestingly, blood flow recovery of ischemic limb observed in AdRSVE-sel-transduced mice was more prominent when combined with EPC administration compared with that of AdRSVLacZ-transduced mice.

Conclusions—Endothelial E-selectin plays a crucial role in EPC-endothelial interaction in vitro. The importance of E-selectin was also confirmed in vivo even in the absence of exogenous EPC. These data provide molecular background for novel cell-based therapy for ischemic atherosclerosis. (*Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27:512-518.)

Key Words: angiogenesis ■ adhesion molecule ■ endothelial cell

Recent studies have provided ample evidence that vasculogenesis, the formation of new blood vessels by differentiation of endothelial cells from their precursors, may occur after embryonic development. The identification of endothelial progenitor cells (EPCs) in circulating blood in postnatal subjects and their contribution to the formation of new blood vessels¹⁻¹¹ has drawn attention to their potential for therapeutic application. Although a study that used an ischemic animal model¹² and carefully conducted clinical¹³ studies have documented the efficacy of the introduction of EPCs in ischemic tissues, the molecular mechanisms responsible for EPC recruitment into mature preexisting blood vessels are not fully understood. Several growth factors, including vascular endothelial growth factor,² stem cell growth factor,⁹ and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor,³ have been reported to be involved in the regulation of endothelial differentiation and migration to form functional vessels. However, the interaction between circulating EPCs and

mature blood endothelial cells, presumably a critical biological event during the initial phase of vasculogenesis, has not been extensively studied. In some studies, the number of exogenous EPCs present in the ischemic tissue has been reported to be not as much at 28 days as compared with 1 day after injury, suggesting that not only EPC but also the soluble factor they secreted or expressed may also be important to facilitate neovasculogenesis.¹⁴ To form properly assembled blood vessels, EPC orchestrate complex cell-cell adhesive interactions by coordinated actions of adhesion molecules and their ligands expressed on both EPC and preexisting endothelial cells.

E-selectin, a member of selectin family of adhesion molecules, is expressed primarily on activated vascular endothelium and facilitates rolling and adhesion of neutrophils, monocytes, and a subset of T lymphocytes.¹⁵ In addition to its role in acute and chronic inflammation, E-selectin has been shown to participate in ischemia/reperfusion injury in hu-

Original received August 13, 2006; final version accepted November 13, 2006.

From Department of Cardiovascular Medicine (Y.N., M.I.), Tokyo Medical and Dental University, School of Medicine, Tokyo, Japan; Department of Medical Biochemistry (Y.N., M.Y., N.N.), Tokyo Medical and Dental University, School of Medicine, Tokyo, Japan; Department of Regenerative Medicine (H.I., H.M., T.A.), Tokai University, School of Medicine, Kanagawa, Japan.

Correspondence to Masayuki Yoshida, 1-5-45, Yushima D9, Bunkyo-ku, Tokyo, 113-8519 Japan. E-mail masavasc@tmd.ac.jp

© 2007 American Heart Association, Inc.

Arterioscler Thromb Vasc Biol. is available at <http://www.atvbaha.org>

DOI: 10.1161/01.ATV.0000254812.23238.2b

mans¹⁶ and, more importantly, E-selectin and its ligands have been reported to be involved in angiogenesis.¹⁷ In the present study, we used a well-defined parallel plate flow chamber apparatus and demonstrated that E-selectin expressed on activated endothelial cells plays a major role in rolling and adhesion of EPC *in vitro*. That initial observation was confirmed by use of a recombinant adenoviral vector of E-selectin. Our *in vitro* results were confirmed *in vivo* by using an ischemic hind limb model. Our findings indicate that E-selectin is a major adhesion receptor on preexisting endothelial cells that function to initiate postnatal neo-angiogenesis. Further, overexpression of E-selectin may be useful for therapeutic usage of EPCs, the current availability of which limits potential clinical outcomes.

Methods

EPC Culture and Reagents

Peripheral blood mononuclear cells from human volunteers were plated on human fibronectin coated (Sigma) culture dishes and maintained in endothelial cell basal medium-2 (Clonetics) supplemented with 5% fetal bovine serum, human vascular endothelial growth factor-A, human fibroblast growth factor-2, human epidermal growth factor, insulin-like growth factor-1, and ascorbic acid, as previously described.¹⁻¹⁸ After 4 days of culture, nonadherent cells were removed by washing with phosphate-buffered saline, then cultured 3 more days before use in a simulated flow assay.

Flow-Cytometric Analysis of EPCs

After 7 days of culture, adherent cells were detached and incubated first with the indicated primary antibodies on ice, then washed twice with RPMI 1640 containing 5% fetal bovine serum. Next, they were incubated with a fluorescein isothiocyanate-labeled goat anti-mouse antibody. Fluorescence was analyzed using a fluorescence-activated cell sorter Caliber (Beckton-Dickinson).

Adenovirus Transduction of HUVECs

In some experiments, after a 24-hour incubation on coverslips, HUVECs were transduced using a recombinant adenovirus of human E-selectin (AdRSVE-sel)¹⁹ or that of β -galactosidase (AdRSVLacZ)²⁰ at an MOI of 100, 72 hours before use in an EPC flow assay, as described previously.²¹

Adhesion Assay Under Laminar Flow

Apparatus Design

The parallel-plate flow chamber used was previously described in detail.²² Briefly, the chamber was composed of 2 aluminum steel plates separated by a 200- μ m-thick silastic gasket, and the flow channel was formed by removal of a 2.5 \times 15-mm rectangular section from the gasket. Predetermined levels of flow were applied to the HUVEC monolayer by drawing the perfusion medium (D-PBS containing 0.2% human serum albumin) through the channel with a syringe pump (model 44; Harvard Apparatus). A plastic heating plate (Tokai Hit Co) was mounted on the stage of an inverted microscope (IX50; Olympus) to maintain the temperature at 37°C. The channel flow could then be approximated as a 2-dimensional fully developed laminar flow with a simple parabolic velocity profile.

Experimental Application

HUVECs were isolated for use in the flow assay, and then after 2 or 3 passages were plated onto 22-mm fibronectin coated glass cover slips and subjected to the flow chamber. Flow assay endothelial monolayers on coverslips were stimulated with tumor necrosis factor- α (10 ng/mL) and positioned in the flow chamber, which was mounted on an inverted microscope. Each monolayer was perfused for 3 minutes with perfusion medium and examined carefully to verify that it was confluent. Then, EPCs were diluted in the perfusion

medium to 10⁵ cells/mL and drawn through the chamber at a controlled flow rate to generate a calculated wall shear stress of 1.0 dyne/cm² for 10 minutes. The entire period of perfusion was recorded on videotape using a digital video recorder containing a time generator. Captured images were then transferred to a computer for image analysis to determine the number of rolling and adherent EPC in 5 to 10 randomly selected 20 \times microscopic fields for each experiment. Cells were considered to be adherent after 10 seconds of stable contact with the monolayer. Rolling EPCs were easily recognized, as their velocity was much slower (up to 80 μ m/second) than that of free-flowing cells.

In some experiments, the following antibodies were used to block EPC adhesion to HUVEC monolayers: mouse anti-E-selectin mAb (7A9), mouse anti-intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) mAb (Hu5/3), mouse anti-vascular cell adhesion molecule (VCAM)-1 (BBIG-V), mouse anti-sLx (KM-93), mouse anti-PSGL-1 (KPL-1), mouse anti CD18 (MEM48).

Mouse Hind limb Ischemia Model

All animal procedures were performed in accordance with guidelines provided by the Tokyo Medical and Dental University Institutional Animal Care and Use Committee. Athymic nude mice (Crea, Japan), 8 to 9 weeks old and 17 to 20 grams in weight, were used. First, AdRSVE-sel or AdRSVLacZ (at 1 \times 10¹⁰ pfu/limb) was injected into a lower limb of 19 mice. Seventy-two hours later, each mouse was anesthetized intraperitoneally with 160 mg/kg of pentobarbital for operative ligation of a femoral artery and vein, as previously described.^{4,13} In some experiments, EPCs at 1 \times 10⁵, 20% of the optimal number reported previously,^{4,13} in 100 μ L of endothelial cell basal medium-2 media without any growth factors were injected into the ischemic limb muscle of the mice immediately after the ligation procedure. To determine the fate of the transplanted EPCs, 4 mice from each group received EPCs marked with fluorescent carbocyanine DiI dye (Molecular Probes), as previously described.²³ In brief, suspended EPCs were washed with phosphate-buffered saline and incubated with DiI at a concentration of 2.5 μ g/mL of phosphate-buffered saline for 5 minutes at 37°C, then 15 minutes at 4°C. After 2 washings in phosphate-buffered saline, the cells were suspended in endothelial cell basal medium-2 medium. Further, 30 minutes before these mice were euthanized, they received an intravenous injection of 50 μ g of Bandeiraea simplicifolia lectin I (BS-1) conjugated with fluorescein isothiocyanate (Vector Laboratories).

Physiological Assessment of Animals

Laser Doppler perfusion imaging (Moor Instruments) was used to record blood flow 28 days after surgery, as previously described.²³ In the digital color-coded images, the red hue indicated regions with maximum perfusion, whereas medium perfusion levels were shown as yellow and low levels as blue. The resulting images also displayed absolute values in readable units. For quantification, the ratio of readable units between ischemic and nonischemic hind limbs was determined.

Histological Assessment of Mouse Tissues

Vascular density in sections taken from the ischemic hind limbs was evaluated at the microvascular level using a light microscope. Tissue sections from the lower calf muscles of ischemic limbs were harvested on day 28, then muscle samples were embedded in OCT compound (Miles), snap-frozen in liquid nitrogen (LN₂), and cut into 5- μ m-thick sections. A total of 20 different fields were randomly selected and the number of capillaries was counted at 40 \times magnification. Immunohistochemical analysis of human E-selectin was carried out using anti human E-selectin mAb (7A9) as a primary antibody. MOM immunodetection kit (Vector Laboratories) was used to specifically localize mouse primary antibody (7A9) on mouse tissues following manufacturer's instruction.

Statistical Analysis

All results were expressed as mean \pm SEM. Statistical significance was evaluated using a paired Scheffé *t* test or one-way ANOVA with