

総説

## 血管再生医療の現況と将来展望

魚地 孝聡<sup>1)</sup> 増田 治史<sup>2)</sup> 浅原 孝之<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>協和発酵工業株式会社 医薬研究センター

<sup>2)</sup>東海大学医学部 再生医療科学

### ACTUAL STATE AND FUTURE PROSPECT OF THERAPEUTIC NEO-VASCULOGENESIS

Taka-aki Uochi<sup>1)</sup>, Haruchika Masuda<sup>2)</sup> and Takayuki Asahara<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>Pharmaceutical Research Center, Kyowa Hakko Kogyo Co., LTD.

<sup>2)</sup>Department of Regenerative Medicine, Division of Basic Clinical Science,  
Tokai University School of Medicine

**Key words** : Therapeutic neovascularization, Vasculogenesis, Angiogenesis, EPC ( Endothelial progenitor cell ) VEGF

#### はじめに

ES細胞(胚性幹細胞)の応用に始まった臓器再生技術への挑戦は、体性幹細胞発見により再生医療に新たな風を吹き込んでいる。従来の治療法は、患部をいかに適切に治癒するかが焦点であった。しかし、この治療法は患部が治癒可能であることが前提で、修復不可能な状態まで異常をきたしてしまった患部に適応できる例は少なく、根治の可能性は低い。このような症例に応用できる新しい治療法開発には、多くの期待が集められている。

体性幹細胞として最もよく研究されているのは造血幹細胞であり、その他にも血管内皮・皮膚・肝臓・腎臓・神経・消化管粘膜細胞・生殖細胞にも存在することが報告されている。最近では、ES細胞と同等の能力を持つMAPCs (multipotent adult progenitor cells) の存在も示唆され<sup>1)</sup>、これら体性幹細胞を用いた再生医療研究が盛んに行われている。本稿ではこれら体性幹細胞を用いた再生医療研究の中でも最もよく研究され、すでに臨床応用にまで発展している血管再生医療の話題を中心に紹介する。

#### 脈管発生と血管新生

血管形成には脈管発生 (Vasculogenesis) ・血管

新生 (Angiogenesis) という大きく2つのプロセスが関与することが考えられている (Fig. 1)。

血管内皮前駆細胞は、VEGF受容体の1つであるVEGF-R2 (KDR) を細胞表面に発現する。このVEGF/VEGF-R2シグナル伝達経路が血管内皮前駆細胞の増殖・成熟化の過程において重要な役割を担うことは既に報告されている<sup>2,3)</sup>。成熟した血管内皮細胞は、分化・増殖を繰り返した後に管腔構造を形成する。この管腔形成には、血管内皮細胞表面にて発現するVEGF-R1 (Flt-1)、VEGF-R3 (Flt-4) の関与が示唆されている。特に、VEGF-R3は血管内皮細胞によるネット構造・接着維持に重要であると考えられている<sup>4)</sup>。また、VEGF-R1はVEGFに対する親和性がVEGF-R2と比べ10倍強いこと、キナーゼドメイン欠損ノックアウトマウスは正常に発生することから、VEGFのVEGF-R2との結合を競合阻害することで管腔構造の過剰増殖を抑制していると考えられている<sup>5)</sup>。これら因子のほかにもneuropilin-1もVEGF-R2とヘテロダイマーを形成することでVEGFによるVEGF-R2リン酸化効率を向上し、血管形成促進することも報告されている<sup>6)</sup>。このように血管内皮前駆細胞が目的部位に直接進入・

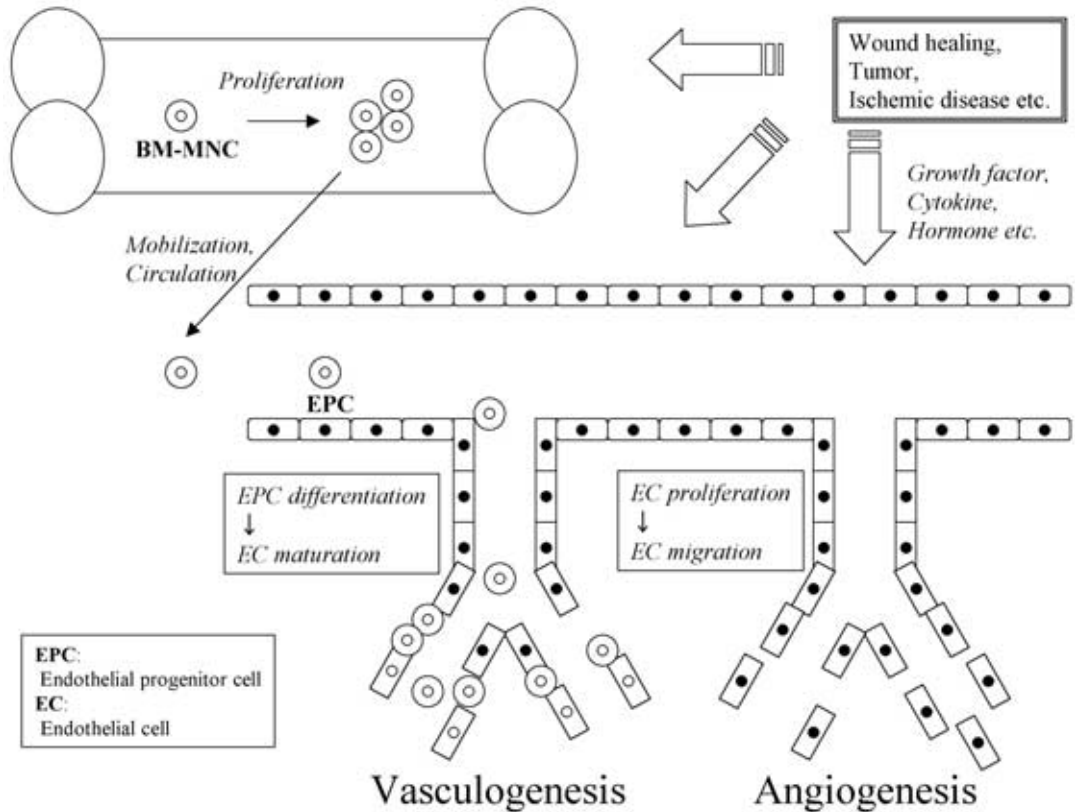


Fig. 1 Schema of vascular reconstruction

分化することで原始的な血管が形成される過程を脈管発生という。

脈管発生により形成された血管は、周囲に存在する間葉系細胞や壁細胞が放出する Angiopoietin-1 を細胞表面に発現する受容体 Tie-2 を介して受け取る。Angiopoietin-1 シグナルを受けた血管内皮細胞は PDGF を放出する。この PDGF は壁細胞の PDGF-R を介して壁細胞の運動性を向上し、血管内皮細胞への動員を促進する<sup>7)</sup>。この血管内皮細胞と壁細胞との相互作用は新生血管の安定性において非常に重要である。Angiopoietin-1 を阻害する因子として Angiopoietin-2 が既に同定されている。血管内皮細胞と壁細胞が強固に接着した状態では、新たな血管が発生することは困難である。しかし、Angiopoietin-2 により Angiopoietin-1 の Tie-2 との結合を競合阻害することで血管内皮

細胞と壁細胞との解離を促進し、血管内皮細胞を不安定化させる。実際に、Angiopoietin-2 産生トランスジェニックマウスでは、Angiopoietin-1 ノックアウトマウスと同様の表現型が観察されている<sup>8)</sup>。このように、既存の血管がサイトカインにより物理的变化を引き起こし、血管支配領域拡張、血管リモデリング促進を行う過程を総じて血管新生という。

#### EPC (血管前駆細胞) の発見

浅原らは、血管内皮細胞特異的に発現上昇が認められている遺伝子 (Tie-2, Flk-1) のプロモーター領域の下流に  $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを利用し、骨髄移植マウスモデルを作製した。このマウスを用いて、ガン・創傷治療・下肢虚血などを人工的に誘発し、それぞれの組織にて血管形成を誘導した。

組織回収後、免疫組織化学的に組織における抗原性を観察した結果、移植骨髄由来細胞が新生血管に存在し、血管新生の一翼を担っていることが確認された。さらに、成体末梢血から CD34 陽性細胞を単離し、血管内皮細胞用培地で培養すると、スピンドル様の形態を示す接着性細胞が出現する。これらの細胞は、血管内皮細胞の特徴であるアセチル化 LDL 取込み活性 およびレクチン結合活性を有していた。また、これらスピンドル様細胞を FACS にて解析した結果、VEGF-R1, VEGF-R2, CD31, CD34 など血管内皮細胞と同様の細胞表面マーカー発現様式を示した<sup>9)</sup>。これらの結果は、脈管発生は初期発生ばかりでなく成体血管新生においても作用しており、血液成分中に脈管新生を担う体性幹細胞、すなわち血管内皮前駆細胞 (Endothelial Progenitor cell) が存在することを明らかにした。

### EPC を利用した血管再生医療

EPC の下肢虚血動物モデル虚血部位への移植を実施した結果、虚血に伴う血流量低下・壊死の抑制により虚血改善が確認された。また、ヌードラットを用いた心筋梗塞モデルでも同様に心筋壊死抑制・新生血管増大が認められており、動物モデルでの有効性は証明されていた<sup>10)11)</sup>。

病変局所血管再構築による組織機能改善を目的とした血管再生療法の概念は、1994 年 Isner らにより、VEGF 遺伝子導入プラスミドを用いて重症下肢動脈閉塞疾患 (ASO) 患者に施行されたことに始まる<sup>12)</sup>。しかし、糖尿病患者、高脂血症患者に対して病的血管新生を亢進させる、内皮機能障害の高齢者には EC 反応性低下により有効性が期待できないなど効果が期待できる患者は限定されており、効果持続性・反復投与によるコストなどを考慮すると治療法としての問題点も指摘されていた。そこで、EPC を用いた細胞療法が注目されている。

#### ①骨髄単核球移植療法

自己骨髄より全単核球画分を採取し、下肢虚血患者の虚血肢に投与する試みが 2000 年から関西医科大・久留米大・自治医科大の共同グループにより開始された。下肢虚血患者 (ASO, Burger

病) より自己骨髄単核球細胞を調整し、虚血部筋肉内投与にて細胞移植した。二重盲検臨床試験の結果、ABI (上肢・下肢血圧比)・疼痛緩和・トレッドミル歩行距離に改善傾向が観察された<sup>13)</sup>。しかし、EPC 分画は 0.1% 以下と微量で、血球成分の分泌成長因子・サイトカインの効果と考えられている。

#### ②サイトカイン強制動員療法

サイトカイン投与により未分化 EPC を末梢血中に強制動員し、虚血局所に EPC を量的に増加させる方法として開発された。虚血部位では低酸素状態が亢進し HIF-1 $\alpha$  が安定化している。これにより VEGF および Angiopoietin-1 の発現が亢進し、これらに誘引・動員された EPC が虚血部位に集積する。実際に、虚血性疾患患者を対象に GM-CSF 投与して血流を回復させる二重盲検臨床試験が実施されており、側副血行の改善傾向が観察されている<sup>14)</sup>。G-CSF 投与の臨床試験も実施されている。

#### ③強制動員未分化 EPC 移植療法

サイトカイン投与により強制動員された未分化 EPC を AC133, CD34, VEGF-R2 などの細胞表面マーカーを指標に末梢血単核球から分離し、虚血患者局所に移植することで側副血行を改善させる方法として開発された (Fig. 2)。本移植療法では上述した方法と比べ、未分化 EPC を濃縮し局所に投与することで移植細胞数削減・血管形成促進領域局限化を可能にした。さらに、末梢血より細胞が入手できるため、患者の負担・リスク軽減も大きなメリットになっている。実際に、神戸先端医療センターおよび東海大にて臨床試験も開始され、虚血性疾患の患者に対して良好な経過が観察されている。

#### ④遺伝子導入 EPC 移植療法

サイトカイン投与は病的血管新生を促進するという 2 面性があり、適応患者の限定・治療コスト増加など問題点も指摘されている。これら問題点を解決する方策として、EPC 機能強化ハイブリット療法が期待される。実際に、VEGF 遺伝子を導入した EPC 移植療法の有効性が動物モデルにて確認されている<sup>15)</sup>。この方法の利点は、EPC を細

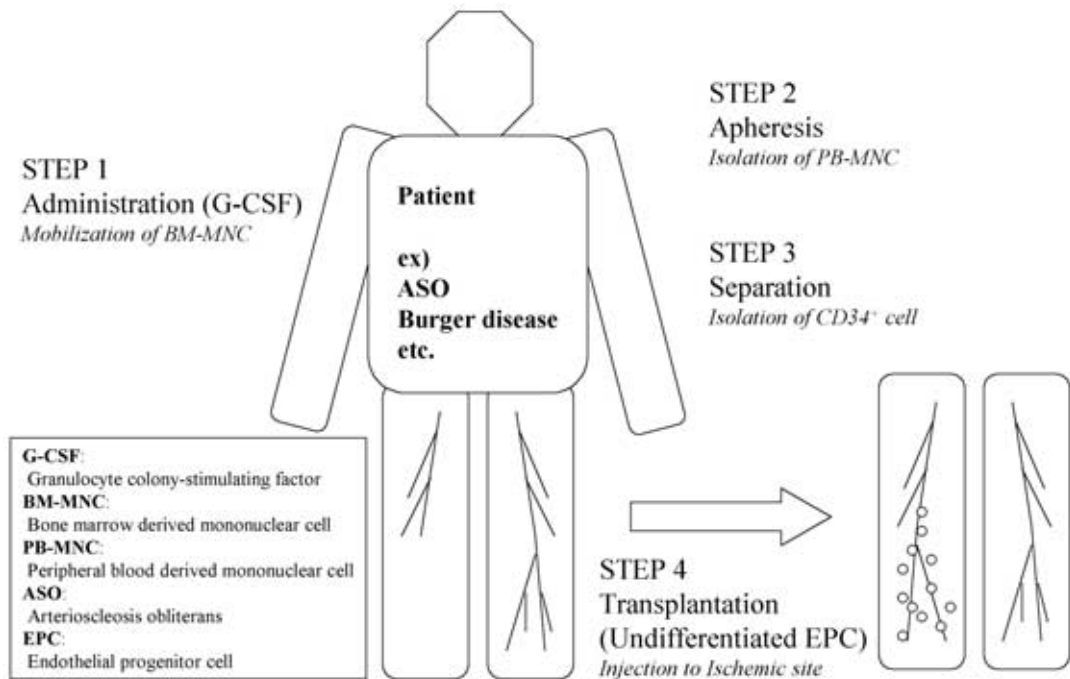


Fig. 2 Schema of therapeutic neovascularization

胞ベクターとして多種の機能遺伝子を選択・導入できる点があげられる。これにより、適応疾患は虚血性疾患にとどまらず、動脈硬化・血栓症・糖尿病性網膜症・ガン治療など血管新生能亢進・低下をとまなう多種多様の幅広い分野に応用できる可能性が期待できる。この治療法によりこれまでの細胞移植療法の問題点が解消でき、さらに適応疾患拡大も視野に入る可能性も高い。遺伝子導入法を始めとする方法論の開発とともに、早期の治療ガイドライン作成が期待される。

#### ⑤生体外増幅・分化 EPC 移植療法

遺伝子導入 EPC 移植療法は EPC 機能強化に焦点が当てられた方法であるのに対し、この治療法は体外的に EPC を培養することで増殖・分化を促進し、EPC 移植療法を効率的に行うことを目的としている。臍帯血・骨髄血・末梢血より単核球を単離後、未分化 EPC を増殖・分化誘導し、虚血疾患部位に移植する方法である。実際に、虚血疾患動物モデルにて有効性が確認されている。本試験開発により、これまでの細胞移植療法の問題点

が解消できる可能性が高い。今後、臨床応用を目指す上で、単離・精製した単核球画分より未分化 EPC を効率的に増殖・分化誘導させる無血清培養系開発に期待される。

#### EPC を利用しない血管再生医療

近年ではより多種に渡る理論と方法論の開発により、さまざまな試みが行われている。血管再生医療は大きく 2 種類の方法に分類される。ひとつは内在性因子（サイトカインなど）を利用し血管内皮細胞などを刺激することで血管形成を制御する方法、もうひとつは EPC など体性幹細胞などを含む外来性因子を移植して血管形成効率を促進する方法である。

内在性因子を導入する方法としては、bFGF、HGF、VEGF をはじめ、血管ホルモンである CNP (C-type natriuretic peptide) の遺伝子療法が動物モデルで有効性が確認されている<sup>16)</sup>。一方、HGF 遺伝子療法は、VEGF と同様に壁細胞に影響を与えず、血管内皮細胞のみ増殖させる効果が期待できる。また、HGF は虚血部位にて発現量が低下し

ているが、虚血状態にて細胞表面に HGF 受容体である c-Met の発現量が上昇している。HGF 遺伝子導入により臨床効果が期待できることより、VEGF 遺伝子導入と同様な治療効果が期待されている。現在、阪大にて HGF 遺伝子療法の臨床試験が行われており良好な経過が観察されている<sup>17)</sup>。

外来因子を導入する方法として、未分化・分化 EPC 移植をはじめ、ES 細胞移植療法や人工血管を使用する方法が動物モデルで有効性が確認されている。特に人工血管は材料に自己組織および成体吸収性ポリマーを使用することで従来よりも高い臨床効果が期待されている。従来の人工血管では長期間移植状態を保つため、生体適合性・耐久性がつねに問題として取り上げられた。近年になり、東京女子医大のグループらにより生体吸収性素材と自己組織を用いた人工血管が開発された。生体吸収性高分子を使用することで移植人工物は残留しない、自己組織を使用するため生体適合性・耐久性に優れている、移植血管が成長する可能性が高いなどが期待されている。現在、東京女子医大にて生体吸収性人工血管の臨床応用が行われており良好な経過が観察されている<sup>18)</sup>。

### 将来の課題

血管再生療法 (therapeutic neovascularization) の概念が打ち立てられて以来、サイトカイン療法・細胞移植療法など新しい医療技術が開発されてきた。しかし、EPC ひとつ取り上げてもその起源、培養・分化誘導方法、脈管発生に至るメカニズムなど明らかにされるべき問題点は山積されている。今後、これらの問題点が順次解決されることで細胞移植による多様な治療法開発の糸口が見つけられるものと考えられる。さらに、このような最新の技術を取り入れた治療法がより広く普及していくためには、治療効果の有効性・治療方法の安全性・治療ツール (生体試料) の安定性が保証される必要がある。これらの信頼を得るためにも GLP/GMP/GCP 基準 (Good Laboratory Practice, Good Manufacturing Practice, Good Clinical Practice) に従ったガイドライン作成が必須になる。これらのハードルは決して低いものではない

いが、乗り越えることで血管再生療法が世間に幅広く定着し、一人でも多くの患者に最新医療が提供されることに期待したい。

### 文 献

- 1) Jiang, Y., Jahagirdar, B.N., Reinhardt, R.L., et al. : Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*, 418 : 41, 2002.
- 2) Ferrara, N., Carver-Moore, K., Chen, H., et al. : Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature*, 380 : 439-442, 1996.
- 3) Shalaby, F., Rossant, J., Yamaguchi, T.P., et al. : Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature*, 376 : 62-66, 1995.
- 4) Dumont, D.J., Jussila, L., Taipale, J., et al. : Cardiovascular failure in mouse embryos deficient in VEGF receptor-3. *Science*, 282 : 946-949, 1998.
- 5) Hiratsuka, S., Minowa, O., Kuno, J., et al. : Flt-1 lacking the tyrosine kinase domain is sufficient for normal development and angiogenesis in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95 : 9349-9354, 1998.
- 6) Soker, S., Takashima, S., Miao, H.Q., et al. : Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell*, 92 : 735-745, 1998.
- 7) Hellstrom, M., Kalen, M., Lindahl, P., et al. : Role of PDGF-B and PDGFR-beta in recruitment of vascular smooth muscle cells and pericytes during embryonic blood vessel formation in the mouse. *Development*, 126 : 3047-3055, 1999.
- 8) Maisonpierre, P.C., Suri, C., Jones, P.F., et al. : Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie-2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science*, 277 : 55-60, 1997.
- 9) Asahara, T., Murohara, T., Sullivan, A., et al. : Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*, 275 : 964-967, 1997.
- 10) Kalka, C., Masuda, H., Takahashi, T., et al. : Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97 : 3422-3427, 2000.
- 11) Kawamoto, A., Gwon, H.C., Iwaguro, H., et al. : Therapeutic potential of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia. *Circulation*, 103 : 634-637, 2001.
- 12) Isner, J.M., Pieczek, A., Schainfeld, R., et al. : Clini-

- cal evidence of angiogenesis after arterial gene transfer of phVEGF165 in patient with ischaemic limb. *Lancet*, 348 : 370-374, 1996.
- 13) 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 randomized controlled trial. *Lancet*, 360 : 427-435, 2002.
- 14) Seiler, C., Pohl, T., Wustmann, K., et al. : Promotion of collateral growth by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in patients with coronary artery disease. A randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Circulation*, 104 : 2012-2017, 2001.
- 15) Iwaguro, H., Yamaguchi, J., Kalka, C., et al. : Endothelial progenitor cell vascular endothelial growth factor gene transfer for vascular regeneration. *Circulation*, 105 : 732-738, 2002.
- 16) Yamahara, K., Itoh, H., Chun, T.H., et al. : Significance and therapeutic potential of the natriuretic peptides/cGMP/cGMP-dependent protein kinase pathway in vascular regeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 100 : 3404-3409, 2003.
- 17) Morishita, R. : Recent progress in gene therapy for cardiovascular disease. *Cir. J.*, 66 : 1077-1086, 2002.
- 18) Matsumura, G., Hibino, N., Ikeda, Y., et al. : Successful application of tissue engineered vascular autografts : clinical experience. *Biomaterials*, 13 : 2303-2308, 2003.
-