

## 重症虚血肢に対する再生医療の現状

清水 直美<sup>1)</sup> 井関 徹<sup>1)</sup> 森谷 純治<sup>2)</sup> 舘野 馨<sup>2)</sup> 南野 徹<sup>2)</sup>  
小室 一成<sup>2)</sup>

キーワード：虚血肢，血管内皮細胞，血管新生因子

### はじめに

近年，血管内皮前駆細胞の存在が明らかになった。この発見によって，閉塞性動脈硬化症 (ASO)，バージャー病 (TAO) などの重症末梢性動脈疾患に対する新たな治療法として，血管内皮前駆細胞を用いた血管再生医療が可能となり，現在急速に普及しつつある。しかしその後の検討から，これら前駆細胞が実際に血管を形成する以外にも，非常に重要な治療メカニズムが存在することが判明してきた。本稿では，血管再生治療についてその概略にふれ，最近の新しいエビデンスについても紹介する。

### 血管疾患における再生医療

末梢性動脈疾患は主に動脈硬化性病変によって，上下肢の血液の供給が妨げられることによって生じる。この病態は先進国においては成人の 10～15% にみられ，脳血管障害や冠動脈病変の合併も多い。閉塞性動脈硬化症 (ASO) は下肢の末梢性血管病変で最もよく見られる疾患であるが，血栓性血管炎の結果として同じような病態を呈するバージャー病 (TAO) も知られている。この疾患は小～中細動脈が病変の主座であり，喫煙と密接な関連があり，男性に多く，冠動脈病変との関連は少ないと言われている。これらの疾患が軽症のうちは無症候性であることも多いが，病態の進行に伴いしびれ・冷感や間欠性跛行などの症状が見られるようになる。上下肢の虚血性病変がさらに進行すると虚血性潰瘍，安静時疼痛を伴う重症下肢虚血を呈することとなる。末梢性動脈疾患の治療には薬物治療，経皮的血管形成術，バイパス術などがあるが，その選択は症状の重症度や病変の進展程度により決定される。しかし重症下肢虚血を呈する患者の 50% 近くが治療に対する反応が不十分であり，1 年以内に切断を余儀なくさ

れるという現状から<sup>1)</sup>，新たな治療戦略が待ち望まれていた。近年，血管内皮前駆細胞の発見とともに，組織中に新たに血管が形成される現象について詳細な機序が判明し，これらを重症虚血肢疾患に対する治療法として応用する血管再生医療が開発され，飛躍的に進歩することとなった。

### 血管再生の機序

成人期の血管形成には 3 つの機序が知られている<sup>2)3)</sup>。組織が虚血に陥ると，既存の血管内皮細胞が増殖・遊走し新しい血管が伸張し，新たな毛細血管網を形成する。これは (狭義の) 血管新生 Angiogenesis と呼ばれる。また，動脈の閉塞に伴いもともと存在する小動脈への血流が増加しメカニカルストレスが加わることによって，虚血部位に至る既存の血管が remodeling を受け太くなり，新生した血管へ血流を補給することとなるが，この機序は側副血行路形成 Arteriogenesis と呼ばれる。また，骨髄に由来する細胞が血流を介して虚血部位に到達し血管内皮細胞へ分化することで，これらの機序を補強するといわれており，脈管形成 Vasculogenesis と呼ばれる。これらの機序は血管内皮増殖因子 (VEGF) や線維芽細胞増殖因子 (FGF) など，種々の液性因子によって調整されている<sup>4)5)</sup>。液性因子の分泌細胞としては，虚血により浸潤した炎症細胞や，間葉系細胞，筋細胞などから分泌され，その機序の一端を担っていると考えられているがまだ不明な点も多い。

### 血管再生治療の開発

このように成人期における血管形成のメカニズムが解明されるに伴い，新しい治療戦略が展開されることになった。最初の試みは血管増殖因子を用いた，組換え蛋白質治療，遺伝子治療であった。1994 年，米国タ

1) 千葉大学医学部附属病院輸血部

2) 千葉大学大学院医学研究院循環病態医科学

〔受付日：2007 年 4 月 24 日，受理日：2007 年 11 月 15 日〕

フツ大学で閉塞性動脈硬化症 (ASO) 患者に対する VEGF 遺伝子治療が臨床応用されて以来、血管増殖因子を用いた臨床試験が数多く行われ<sup>6)7)</sup>、phase I 試験では比較的よい結果が得られたが、phase II 試験では、臨床的有効性が示されず残念な結果に終わった<sup>8)</sup>。その原因として、これら増殖因子のデリバリー方法が最適でなく、十分な組織発現が得られなかった点や、虚血臓器での血管再生には多種多様な増殖因子、細胞群が関与しているはずであり、単剤療法では機能的血管再生をもたらすのに不十分であったのではということも指摘されている。また、重症虚血肢患者では、糖尿病、高血圧など様々な疾患を合併しており、治療に対する反応性が低下していることも関係していると考えられる<sup>8)9)</sup>。上記の結果を得て、最近、幾つかの血管増殖因子の組み合わせや改良ベクターを用いた臨床試験が進行中であり、その成果が待たれている。

このような流れの中で、1997年に Asahara らによって、末梢血中にも骨髄由来の血管内皮前駆細胞が存在し、成体においても胎児期同様に血管の分化、Vasculogenesis が起こるということが示され、血管内皮前駆細胞 (endothelial progenitor cells; EPC) と命名された<sup>10)</sup>。更に、彼らはその後の研究で末梢血由来の EPC 移植により虚血組織に血管再生がもたらされることを証明した<sup>11)</sup>。当初、EPC の供給源として、骨髄単核球がまず注目され、その後顆粒球コロニー刺激因子を用いた末梢血幹細胞も着目されることとなった。そして、これら前駆細胞は非常に豊富な血管新生因子を産生することも明らかになり、Vasculogenesis 機序だけでなく血管増殖因子の産生 (paracrine effect) を介して、血管再生を促すと考えられるようになった。

### 細胞移植による血管再生治療の臨床応用

このような中で世界に先駆けて我が国で重症虚血肢疾患に対して、血管再生治療が行われた<sup>12)</sup>。対象は従来の内科的治療、バイパス手術の適応のない慢性虚血肢の患者で、安静時疼痛あるいは虚血性潰瘍、壊死のある症例とされた。従来、骨髄移植を行うのと同様の方法で骨髄穿刺液を回収、分離後、単核球細胞を虚血下肢に筋肉注射する移植方法がとられ、25 症例のパイロットスタディーにて安全性を確認後、両下肢に虚血のある 20 症例に対して骨髄単核球と、末梢血単核球を移植し、その効果について比較検討した。骨髄単核球移植により治療後 4 週間目の評価では、ABI の有意な改善が 65% にみられ、安静時疼痛の改善も 80% に認めた。組織酸素分圧の改善も同様に確認され、疼痛なしでの歩行可能時間も 1 分程度改善した。これら、臨床効果は移植後 6 カ月まで持続したが、一方で全 45 症例のうち、1 例の突然死を含む 3 例が急性心筋梗塞により死亡

した。この臨床試験により、重症虚血肢に対する骨髄単核球細胞移植において一定の効果と安全性が確認され、国内の一部の施設で高度先進医療の認可を受けている。虚血肢に対する再生医療に関しては、骨髄から EPC を動員する目的で顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) を投与し、成分採血の機器を用いて末梢血から単核球を採取する方法や、その中から更に EPC を純化、分離し投与する方法、また G-CSF 単独投与にて内因性の EPC による血管再生を期待する方法も臨床応用がはじまっている。

しかし、後述するように、このような患者群に対して、骨髄採取や G-CSF の投与を行うことに関しては留意しなければいけない点も多々ある。その意味で、より低侵襲な血管再生治療が求められていた。このような中、我々は G-CSF を投与せずに末梢血から自家単核球を採取し投与する方法の有用性を見出し、臨床応用している。本臨床研究を行う基礎となった研究の内容と、当院での臨床成績を簡単に紹介する<sup>13)14)</sup>。

### 末梢血単核球を用いた血管新生治療

我々は、サイトカイン非使用にて、末梢血単核球 (PB-MNC) と骨髄 (BM-MNC) の血管新生治療に与える効果について比較検討を行った。8 週相当の C57BL/6 にて虚血肢モデルを作成し、同系マウスより末梢血単核球、骨髄を採取し筋注にて移植を施行のうえ、レーザードップラー法により血流の改善度を比較した。その結果、(Tateno ら<sup>14)</sup>) コントロール PBS 群に比し、PB-MNC 群で有意に血流の改善を認めた ( $p < 0.01$ )。BM-MNC 群でも PBS 群に比し、有意な血流の改善を認めている ( $p < 0.05$ )。非常に興味深いことに PB-MNC 群と BM-MNC 群で差は認められなかった。同モデルの虚血肢の筋肉切片を CD31 で染色し、CD31 陽性細胞数を比較したが、PBS 群に比し PB-MNC 群で有意に CD31 陽性細胞の増加が認められ ( $p < 0.01$ )、BM-MNC 群でも同様に陽性細胞の増加が認められた ( $p < 0.05$ )。この系でも示されるように、やはり PB-MNC 群と BM-MNC 群での差は認められなかった<sup>14)</sup>。

これらの基礎研究の結果をふまえ、サイトカイン非使用にて末梢血単核球を用い、重症虚血肢疾患に対する血管再生医療を開始した。

#### 1. 適応症例

当院、倫理委員会承認のもと、末梢血単核球を用いた血管新生治療を 2002 年 7 月より開始した。適応症例は従来の内科的、外科的治療に反応しない Fontaine 分類 III、IV 度相当の ASO またはバージャー病の症例である。本治療は、移植後各種血管新生因子の血中濃度が著明に上昇することから、高度糖尿病性網膜症、悪性腫瘍を有する症例も除外される。したがって全症

Table 1 Patient characteristics

<u>Age</u>	61.8 ± 11.3	<u>ABPI</u>	0.79 ± 0.26
<u>Gender</u>		<u>Rest pain scale</u>	2.90 ± 1.11
Male	24 (82.8%)	<u>Complications</u>	
Female	5 (17.2%)	CRF on HD	14 (48.3%)
<u>Diagnosis</u>		CAD	13 (44.8%)
ASO	19 (65.5%)	CVD	8 (27.6%)
TAO	10 (34.5%)	DM	16 (55.2%)
<u>Ischemic status</u>		HL	16 (55.2%)
Fontaine 3	4 (13.8%)	HT	13 (44.8%)
Fontaine 4	25 (86.2%)	Others	24 (82.7%)
<u>Previous treatment</u>			
PTA	7 (24.1%)		
Bypass surgery	2 (6.9%)		

ABPI, ankle-brachial blood pressure index; CRF, chronic renal failure; CAD, coronary artery disease; CVD, cerebrovascular disease; DM, diabetes mellitus; HL, hyperlipidemia; HT, hypertension

文献 14 より改変

例において悪性腫瘍のスクリーニングを行い、根治後5年間再発がない症例についてはその適応があると判断している。糖尿病性網膜症については可能な限りの治療を行ったうえで、十分なインフォームド Consentのもとに本治療を行い、その後も厳重にフォローアップしている。

## 2. アフェレーシス内容・移植

成分採血装置として GAMBRO 社製 Spectra を使用している。回路のプライミングは生理食塩水、抗凝固剤として ACD-A 液を使用し、採取は manual mode MNC にて行っている。流速 40ml/min の流速で1回の体外循環処理量上限 10L とし採取を行い、成分採血中、Ht 2~3% となるよう採取ポートを監視し微調整を行っている。最近では好中球の混入を減少する目的で回転速度 817 rpm から 1,001rpm とした採取を行っている。採取成分は、採血終了後、300ml の分離バックにうつし、室温、3,000rpm (2,000xg)、10分間遠心後、血漿を除去し採取成分を約 30ml 程度に濃縮調整としている。このような処理を行うと、その成分中には単核球だけでなく、非常に高濃度の血小板も含まれることになる。副作用として一般的にはクエン酸中毒があげられるが、当院では流速を低く抑えているので、口唇や四肢のしびれ、悪心等低カルシウム血症としての副作用はまず出現しない<sup>15)</sup>。遠心濃縮後の細胞成分を虚血患肢へ筋注により移植している。当院では、病棟個室で静脈麻酔、酸素投与のサポートにて安全にそして短時間に移植が行われている。

## 3. 臨床成績

### 1) 患者背景

評価可能症例は 29 症例、年齢の中央値 62 歳、男性 24 例、女性 5 例であった。ASO 19 例、TAO 10 例、8 割以上の症例が Fontaine IV 度であり、前治療として、

PTA、Bypass 術を約 3 割に認めた。合併症として慢性腎不全による透析患者を約半数に認め、冠動脈病変、脳血管病変をそれぞれ 44.8%、27.6% に認めた。また、糖尿病、高脂血症、高血圧を約 50% に認め、大多数の症例が一つ以上の合併症を有していた (Table 1)。

### 2) 治療効果

初回治療 2 カ月の時点で Rest pain, ischemic ulcers, walking distance, ABPI のいずれか一つでも改善が認められた症例を response あり (レスポンドー)、全く治療効果が得られなかった症例を response なし (ノンレスポンドー) と判断した。対象 29 症例中 21 例がレスポンドー、8 例がノンレスポンドーであった。

### 3) 治療効果と関連する因子

年齢、性別、疾患毎、また虚血の状態と治療効果との関連性を検討した。Table 2 に示すように、これらの因子に関してレスポンドー群とノンレスポンドー群間には有意差は認められなかった。同様に透析、冠動脈病変、脳血管性病変、高血圧、糖尿病、高脂血症と治療効果について検討したが、Table 2 から明らかなようにこれらの因子と治療効果との関連性も認められなかった。また、移植前の糖尿病、高脂血症のコントロールの程度と治療効果の関連性も認められなかった。CRP 値を移植後 1, 3, 7, 14 日の時点で測定しているが、治療効果があった群では有意に CRP の上昇を認めた (no response  $2.9 \pm 3.8$ mg/dl, response  $5.4 \pm 11.0$ mg/dl,  $p=0.018$ ) (Table 2)。さらに、我々は炎症性血管新生因子を移植後の経過を通して測定し、治療有効群で有意に IL-1 $\beta$ , VEGF の上昇を確認した<sup>14)</sup>。

### 4) 治療効果とアフェレーシス内容

大多数の症例で 2 回の成分採血、移植が行われている。流速は 40ml/min と比較的緩徐に抑え、約 4 時間の採取で中央値約 240ml の成分を採取している。採取成分は治療無効群、有効群でそれぞれ、総有核細胞数 (TNC)  $1.7 \times 10^{10}$  個、 $1.7 \times 10^{10}$  個、総単核球細胞数 (TMC)  $1.2 \times 10^{10}$  個、 $1.1 \times 10^{10}$  個、総血小板数  $37 \times 10^{10}$  個、 $39 \times 10^{10}$  個と、採取成分と治療効果に有意な関連性は認めなかった (Table 2)。当初、採取成分を FACS にて解析したが、CD34 陽性細胞と治療効果においても有意な関連性は認めなかった。

## 今後の血管再生治療

血管再生治療のこれまでの歴史と、近年の研究成果ならびに我々の経験をふまえ、今後の血管再生治療のありかたについて考察してみたい。

### 1. 血管新生治療に、幹細胞は必要か？

従来、骨髄中には幹細胞や血管内皮前駆細胞が豊富に含まれ、再生治療の移植源として非常に有用であると考えられてきた。事実、動物実験のみならず<sup>16)17)</sup>、臨

Table 2 Clinical response and patient background, apheresis procedure

	no response (n = 8)	response (n = 21)	P value
<u>Age</u>	60.6 ± 11.7	62.3 ± 11.3	NS
<u>Gender</u>			
Male	7 (87.5%)	17 (81.0%)	NS
Female	1 (12.5%)	4 (19.0%)	NS
<u>Diagnosis</u>			
ASO	6 (75.0%)	13 (61.9%)	NS
TAO	2 (25.0%)	8 (38.1%)	NS
<u>Ischemic status</u>			
Fontaine III	1 (12.5%)	3 (14.3%)	NS
Fontaine IV	7 (87.5%)	18 (85.7%)	NS
Previous revascularization	3 (37.5%)	5 (23.8%)	NS
Duration of illness (month)	19.6 ± 24	52.1 ± 55.8	NS
Need for major amputation	8 (100%)	13 (61.9%)	NS
<u>Complications</u>			
CRF on HD	4 (50.0%)	10 (47.6%)	NS
CAD	4 (50.0%)	9 (42.9%)	NS
CVD	3 (37.5%)	5 (23.8%)	NS
HT	4 (50.0%)	9 (42.9%)	NS
DM	6 (75.0%)	10 (47.6%)	NS
HL	4 (50%)	12 (57.1%)	NS
<u>Laboratory data</u>			
FBS (mg/dl)	139.6 ± 45.1	133.2 ± 49.3	NS
HbA1c (%)	5.6 ± 0.9	5.8 ± 0.9	NS
T-Cho (mg/dl)	169.8 ± 33.2	184.6 ± 37.2	NS
LDL-Cho (mg/dl)	105.6 ± 24.6	114.8 ± 37.2	NS
HDL-Cho (mg/dl)	43.9 ± 10.0	49.7 ± 10.7	NS
CRP (mg/dl)	2.9 ± 3.8	5.4 ± 11.0	0.018
<u>Analysis of apheresis procedure</u>			
No. of course	2 ± 1.2	2 ± 1.5	NS
Blood flow (ml/min)	40 ± 1.9	40 ± 3.3	NS
Product volume (ml)	233 ± 34	235 ± 16	0.034
Apheresis volume (ml)*	9,219 ± 1,425	9,500 ± 993	0.003
Apheresis volume/BW (ml)	153 ± 27	155 ± 28	NS
<u>Analysis of blood products</u>			
TNC (×10 <sup>10</sup> )	1.7 ± 0.8	1.7 ± 0.7	NS
TMC (×10 <sup>10</sup> )	1.2 ± 0.5	1.1 ± 0.4	NS
Ht (%)	3.6 ± 0.9	3.1 ± 0.7	0.006
PLT (×10 <sup>10</sup> )	37 ± 15	39 ± 16	NS

データは mean ± SD もしくは患者数 (%) で示した。

FBS, fasting blood sugar; T-Cho, total cholesterol; LDL, low density lipoprotein; HDL, high density lipoprotein; CRP, C-reactive protein; TNC, total nuclear cell; TMC, total mononuclear cell; PLT, platelet

統計処理: Student's *t* test \*Welch test

文献 14 より改変

床報告でもその有用性が多く報告されている<sup>12)</sup>。一方、我々の研究では、幹細胞を含まない末梢血単核球を用い十分な効果を得ている。これらのことから、我々は血管新生治療に移植細胞中の幹細胞が関与するメカニズムはかならずしも必須ではないと考えている。実際、我々のその後のマウスの実験系で骨髄単核球から VEGFR 陽性細胞 (血管内皮前駆細胞の大部分) を除去した移植源を用いても、血管新生が認められることを確認している<sup>14)</sup>。しかし、移植後にホストの血管増殖因子の産生がその治療効果に重要な役割をはたしていることから明らかなように、ホストの血管内皮前駆細胞、単球をはじめ、他の様々な細胞機能の重要性を忘

れてはならない。

## 2. 骨髄幹細胞に依存しない血管新生の機序

近年、幹細胞同様に末梢血単核球や血小板が様々な血管新生因子を産生しうる能力を有し、骨髄幹細胞のみならず、それ以外の細胞によるパラクライン機構の重要性が報告されてきている<sup>18)~22)</sup>。我々の施設の検討からも、移植後反応の認められた群では経過中 CRP の上昇が確認されたが、その現象と連動し、IL-1 $\beta$ 、VEGF の上昇も確認された。また、最近の我々の研究から、移植した細胞によって筋細胞が刺激され筋肉内での IL-1 $\beta$ 、VEGF の発現が上昇していることも判明し (Table 2)、移植源だけでなく受け手側の因子も重要であるこ

とが明らかになってきている<sup>14)</sup>。

### 3. 最も適切な移植細胞源は何か？

Table 1にも示されるように、対象症例には透析患者も多数含まれており、全身麻酔下で骨髄を仰臥位で採取することは非常にリスクが高い。また、骨髄採取の前には自己血を400mlから600ml近く前もって採取することになるが、貧血（腎性、慢性炎症性等）のある患者や、下肢の潰瘍による感染巣を有している患者では、貯血自体適応の面から困難である。血液学的領域では、健常人ドナーに顆粒球増殖刺激因子（G-CSF）を大量に投与し、末梢血にこぼれ出てくる幹細胞を成分採血の機器を用いて採取し、同種造血幹細胞移植源として使用しており、2000年4月より保険適応となつてからは同種骨髄移植の代替法として急速に普及している。しかし、諸外国ではPBSCの動員、採取に関連して、脳血管障害、心筋梗塞、脾破裂など生命を脅かすような重大な有害事象、さらには死亡例も報告されている。G-CSFは血液を過凝固に傾けるため、健常人ドナーにおける投与の際にはその適応が厳しく管理されている。虚血性心疾患や脳梗塞などの既往を有する症例に対して、幹細胞を採取するためにG-CSFの投与を行うのであれば、なおのことその手法、インフォームドコンセントの取り方においても十分な配慮が必要とされる。以上の点から鑑みても、当院での採取方法は安全性、簡便性、複数採取可能である面、そして費用面からも非常に有益であると思われる。

### おわりに

骨髄中の血管内皮前駆細胞が内皮に分化し血管形成に関与するという思想のもとに、血管新生治療は爆発的に様々な手法で普及した。しかし、血管新生が全身に及ぼす副作用についても常に留意しなければならない。また、現在でもなお、本治療の効果は60~70%程度であり、血管再生治療をさらに成熟したものへと導くためにもそのメカニズムを詳細に解明することが重要である。今後更なる知見の集約のもとに、簡便、安全、低コストでありながら最も有効性の高い手法の確立と普及が望まれる。

### 文 献

- 1) Dormandy JA, Rutherford RB: Management of peripheral arterial disease (PAD). TASC Working Group. TransAtlantic Inter-Society Consensus (TASC). *J Vasc Surg*, 31: S1—S296, 2000.
- 2) Carmeliet P: Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med*, 6: 389—395, 2000.
- 3) Risau W: Mechanisms of angiogenesis. *Nature*, 386: 671—674, 1997.

- 4) Hanahan D: Signaling vascular morphogenesis and maintenance. *Science*, 277: 48—50, 1997.
- 5) Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, et al: Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature*, 407: 242—248, 2000.
- 6) Henry TD, Annex BH, McKendall GR, et al: The VIVA trial: Vascular endothelial growth factor in Ischemia for Vascular Angiogenesis. *Circulation*, 107: 1359—1365, 2003.
- 7) Grines CL, Watkins MW, Helmer G, et al: Angiogenic Gene Therapy (AGENT) trial in patients with stable angina pectoris. *Circulation*, 105: 1291—1297, 2002.
- 8) Simons M, Bonow RO, Chronos NA, et al: Clinical trials in coronary angiogenesis: issues, problems, consensus: An expert panel summary. *Circulation*, 102: E73—86, 2000.
- 9) Yla-Herttuala S, Alitalo K: Gene transfer as a tool to induce therapeutic vascular growth. *Nat Med*, 9: 694—701, 2003.
- 10) Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al: Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*, 275: 964—967, 1997.
- 11) 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.
- 12) 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: 427—435, 2002.
- 13) Minamino T, Toko H, Tateno K, et al: Peripheral-blood or bone-marrow mononuclear cells for therapeutic angiogenesis? *Lancet*, 360: 2083—2084; author reply 2084, 2002.
- 14) Tateno K, Minamino T, Toko H, et al: Critical roles of muscle-secreted angiogenic factors in therapeutic neovascularization. *Circ Res*, 98: 1194—1202, 2006.
- 15) Shimizu N, Asai T: Analysis for the optimal blood draw speed to collect sufficient peripheral blood mononuclear cells by COBE Spectra. *Ther Apher Dial*, 8: 190—193, 2004.
- 16) Ikenaga S, Hamano K, Nishida M, et al: Autologous bone marrow implantation induced angiogenesis and improved deteriorated exercise capacity in a rat ischemic hindlimb model. *J Surg Res*, 96: 277—283, 2001.
- 17) Li TS, Hamano K, Suzuki K, et al: Improved angiogenic potency by implantation of ex vivo hypoxia prestimu-

- lated bone marrow cells in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 283: H468—473, 2002.
- 18) Rehman J, Li J, Orschell CM, et al: Peripheral blood “endothelial progenitor cells” are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors. *Circulation*, 107: 1164—1169, 2003.
- 19) 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: 1046—1052, 2001.
- 20) Heil M, Ziegelhoeffer T, Pipp F, et al: Blood monocyte concentration is critical for enhancement of collateral artery growth. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 283: H2411—2419, 2002.
- 21) Iba O, Matsubara H, Nozawa Y, et al: Angiogenesis by implantation of peripheral blood mononuclear cells and platelets into ischemic limbs. *Circulation*, 106: 2019—2025, 2002.
- 22) Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, et al: Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms. *Circulation*, 109: 1543—1549, 2004.

## THERAPEUTIC NEOVASCULARIZATION FOR ISCHEMIC LIMBS

*Naomi Shimizu*<sup>1)</sup>, *Tohru Iseki*<sup>1)</sup>, *Jyunji Moriya*<sup>2)</sup>, *Kaoru Tateno*<sup>2)</sup>, *Tohru Minamino*<sup>2)</sup> and *Issei Komuro*<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>Division of Blood Transfusion, Chiba University Hospital

<sup>2)</sup>Division of Cardiovascular Science and Medicine, Chiba University Hospital

### **Keywords:**

ischemic limbs, endothelial progenitor cells, angiogenic factors