

特 集

末梢血単核球細胞移植による血管再生治療

獨協医科大学 内科学 (循環器)

小林 直彦 石光 俊彦

はじめに

これまで動脈硬化性疾患、特に虚血性心血管疾患に対する治療法が精力的に研究開発されているにも拘らず、先進諸国の死亡原因のトップは心血管疾患である。このように治療技術に多くの進歩があったにも拘らず、救い得ない患者が多く苦しんでいるのが現状であり、これら多くの患者の予後を改善し、QOL回復をもたらすために、新たなる治療戦略が求められていた。そのような中、近年の発生学、分子生物学ならびに組織工学の急速な進歩により再生医療の道が開かれた。再生医療とは、病気や損傷により機能低下や機能不全に陥った組織・臓器に対して、細胞の機能・再生機能を有効に活用して、組織・臓器の機能を再生させる医療と定義されている。再生医療は既に多くの臓器・病態の分野においてめざましい発展を遂げているが、虚血性疾患も例外ではない。虚血性心疾患、重症下肢虚血に対する血管再生治療が臨床応用されており、安全性と有用性には一定の評価が得られており、次世代の心血管疾患治療法として脚光を浴びるようになってきた。本稿では、閉塞性動脈硬化症などの重症虚血肢患者に対して、現在獨協医科大学病院で施行されている末梢血単核球細胞移植による血管再生治療について概説する。尚、この再生治療の適応疾患が、閉塞性動脈硬化症やバージャー病であるため、先ずこれらの疾患について概説する。

1. 適応疾患

1) 閉塞性動脈硬化症

閉塞性動脈硬化症 (arteriosclerosis obliterans : ASO) は、末梢動脈疾患 (peripheral artery disease : PAD) と称され、9割が男性に発症し、最も基本となる下肢虚血重症度の分類はFontaine分類である。Fontaine I度は、動脈閉塞があっても側副血行路により代償されている状態で、II度 (間歇性跛行) は、安静時には代償されているが、歩行などの運動負荷時には代償できずに相対的な虚血が起こる状態である。Fontaine III (安静時疼痛)・IV度 (皮膚潰瘍、壊疽) は、安静時にも虚

血状態にある重症虚血肢である。近年、ASOによるPADが増加しているが、その原因は高血圧症、糖尿病、高脂血症などの生活習慣病の増加と考えられている。特に最近では、糖尿病を原因とする血液透析患者の急増に伴い、重症虚血肢が増加し、さらに高齢者で冠動脈疾患や脳血管疾患、腎動脈や頸動脈といった主要臓器の動脈硬化性疾患、その他重篤な合併疾患を有していることが多い。患者の喫煙率は高く、またASOの長期予後は不良で、その多くが脳梗塞や心筋梗塞といった脳血管や心血管イベントを伴う。このようにASOは下肢虚血症状の原因となると同時に、脳血管、心血管イベントや予後の独立した危険因子であることから、循環器領域において重要な疾患概念である。

2) バージャー病

バージャー病は、20~40歳代の青壮年期男性に好発する非動脈硬化性の血管炎を主体とする疾患であり、本邦では約1万人の患者がいると推計されている。1908年にLeo Buergerが本疾患における11例の切断肢の病理所見を報告したことから、バージャー病あるいはビュルガー病と名付けられた。またその病理学的な所見から閉塞性血栓性血管炎 (thromboangiitis obliterans : TAO) とも呼ばれている。本疾患は一般に四肢末梢の中型から小型動脈が全層性の炎症細胞浸潤を伴う炎症所見を示し、進行すると内膜肥厚と内腔の血栓性閉塞が認められ、四肢や指趾の虚血症状を示す。また静脈もしばしば罹患し、血栓性静脈炎を合併することが知られている。本疾患の原因は不明であるが、膠原病と同様に自己免疫的機序が推測されている。また殆ど全ての症例に喫煙との関連が認められている。本疾患の診断のためには厚生労働省の診断基準があるが、喫煙歴のある50歳未満の男性に発症した下肢慢性動脈閉塞症では本疾患が疑われる。

2. 血管再生治療の歴史

1) 血管再生治療の臨床応用まで

血管再生治療のコンセプトそのものは決して新しいものではない。1980年代後半には、ネコの虚血肢モデル

に対して大網の脂質分画を投与し、虚血を改善させる試みが行われている。大網や脂肪細胞の再生医療への応用は、最近ではトピックスなものであり、このような研究が既に20年程前に存在したことは興味深い。1990年代初期にIsnerらは家兎の虚血肢モデルにVEGF蛋白を投与し、血管再生治療の臨床応用を検討した。動脈投与や静脈投与等、様々な投与法を検討し、投与法のいかに関わらず、側副血行の促進には100~1000 μ gのVEGF蛋白が必要なことを明らかにした。しかしながら、大量のVEGF蛋白を投与すると、投与した蛋白が全身を循環し、非目的部位へと到達するのは避け難い。血管増殖因子の全身への拡散は、糖尿病患者においては網膜症を悪化させ、癌患者では腫瘍血管の発達を促進させる。

大量の蛋白投与に伴う副作用を回避するために行き着いた結論が、遺伝子を用いたローカルドラッグデリバリーであった。Isnerらはカテーテルを用いて血管細胞へVEGF遺伝子を経皮的に導入し、それらの細胞からVEGF蛋白を分泌させようと考え、表面が親水性ゲルでコーティングされた冠動脈形成術用バルーンカテーテル(ハイドロゲル・バルーンカテーテル)による遺伝子導入を試みた。ハイドロゲルは、狭窄部位におけるバルーン通過性を改善するために施されたコーティングであるが、IsnerらはこのゲルにプラスミドDNAの水溶液をしみ込ませ、遺伝子キャリアとして用いた。このカテーテルを用いて、家兎虚血肢モデルにVEGF遺伝子の導入を行うと、約3週間にわたりその発現が認められ、VEGF蛋白の動脈内投与と同等以上の側副路発達効果が得られたのである。一方、末梢血中のVEGF蛋白の濃度はELISAによる測定限界付近にあり、極めて低値であった。本法がプラスミドDNA以外には何らベクターを用いない遺伝子導入法(naked DNAアプローチ)である点で、臨床応用における高い安全性が期待された。

2) ASOに対するVEGFを用いた血管再生治療

1994年、Isnerら¹⁾は血管再生治療の臨床試験を開始し、これが循環器領域における初の遺伝子治療としても知られており、内科治療や外科治療不応症の重症下肢虚血患者を対象として行われた。遺伝子治療から1~2ヵ月で血管造影上の新生血管出現が得られ、下肢疼痛や難治性潰瘍が消失した。しかしながら、バルーンカテーテルを用いた遺伝子導入は、動脈穿刺が不可能な例、下肢の動脈硬化が高度でカテーテルによるアプローチが困難な例などには施行できない。そこで考案されたのが、虚血筋への遺伝子導入である。Baumgartnerら²⁾は、VEGFプラスミドの筋注により、7~8割の症例で血管造影上の側副路発達や臨床症状の改善を得る事に成功し

た。この遺伝子導入法の単純化により、カテーテルでは治療困難であった症例にも血管再生治療が可能となり、その適応は大きく拡大することとなる。

3) 血管内皮前駆細胞の発見と細胞治療

遺伝子を用いた血管再生治療の臨床応用が進む中、1997年にAsaharaら³⁾はヒト末梢血中のCD34陽性細胞の分画中に成熟内皮細胞へと分化しうる血管内皮前駆細胞(endothelial progenitor cell:EPC)が存在することを明らかにした。これを契機として、遺伝子や蛋白を中心とした血管再生治療法に、細胞移植を用いた血管再生治療法の新しい流れが加わった。EPCは血球血管芽細胞(ヘマンジオブラスト)と呼ばれる幹細胞より分化するが、成人では通常骨髄中にあり、末梢血中にはきわめてわずかしかな存在しない。Kalkaら⁴⁾はヒト末梢血単核球からEPCを分離培養し、マウスの虚血肢モデルに投与することで下肢虚血の改善を得た。一方、Shintaniら⁵⁾は自己骨髄由来単核球移植によって家兎虚血肢の血管新生が増強することを報告した。移植された自己骨髄単核球が虚血組織における血管形成に参加、もしくは血管増殖因子を放出することで局所の血管新生を刺激したものと思われ、自己骨髄単核球細胞移植による血管再生治療法の臨床応用への契機となった。

3. 血管再生治療について

1) 血管再生治療

伝達動脈(conducting artery)や分配動脈(distributing artery)などが閉塞し、その末梢に虚血が生じると、その代償機転として組織中に新たな血管が出来る。この現象は血管再生と呼ばれており、血管新生(angiogenesis)、側副血行路形成(arteriogenesis)、脈管再生(post natal vasculogenesis)に大別される⁶⁾。血管新生とは、血管内皮細胞の増殖・遊走を介して既存の血管から新しい血管が芽出する現象をさす。側副血行路形成は、既存の血管がリモデリングすることで、より太い側副血行路を形成するメカニズムを呼ぶ。また流血中に存在するEPCが、虚血局所で血管内皮へと分化する機序は、脈管形成として知られている。これらの細胞の動態は、多様な液性因子によって制御されることも明らかとなっている。虚血の代償機転として、組織に新しい血管ができる現象を血管再生と呼ぶ。血管再生に関与する細胞や液性因子を有効に活用し、虚血組織に血管再生をもたらす治療法を血管再生治療といい、心臓や四肢などの重症虚血性疾患に対し応用されている。血管再生治療には、組み換え蛋白や遺伝子導入技術を用いた増殖因子補充療法⁷⁾と、骨髄単核球や末梢血単核球等を用いた細胞移植治療⁸⁾と

に大別される。このうち細胞移植治療は、虚血組織にEPCを供給し、また多種多様な液性因子を提供することで血管再生と組織保護をもたらすものと考えられ⁹⁾、増殖因子補充療法と比較して一層高い治療効果が得られるものと期待された。特に後者はパラクリン効果 (paracrine effect) と呼ばれており¹⁰⁾、現在の細胞治療の主要な機序であると考えられている。

2) 細胞移植治療

細胞移植による血管再生治療は、EPCおよびパラクリン効果に富んだ細胞の提供を意図して行われてきた。従って治療に用いられる細胞ソースには、骨髄単核球、末梢血単核球や、顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) により動員された末梢血幹細胞、ex vivoで増殖したEPCなどが用いられている。これらの細胞を重症下肢虚血、急性心筋梗塞、慢性心筋虚血等の虚血筋組織へ様々なルートにより投与することで、虚血の緩和と臓器機能の改善が得られることが、多くの基礎研究およびトランスレーショナルリサーチの結果で明らかとなった。これらの疾患は罹患人口が多く、既存の医療技術では治療し得ないno-option症例が多数存在することもあり、細胞移植による血管再生治療は比較的速やかに臨床応用されてきた。世界で初の自己骨髄単核球細胞移植による血管再生治療は、2000年にPADに対して我が国から報告された多施設共同研究TACT (Therapeutic Angiogenesis using Cell Transplantation) study¹¹⁾において示された。全身麻酔下で採取した数百ccの骨髄液から単核球を分離後、虚血肢に移植することで、ABI (足関節上腕血圧比) は0.97ポイントに増え、トレッドミル歩行距離は2.6倍に改善した。また下肢疼痛は9割、皮膚潰瘍は8割の症例で改善した。その有効性と安全性が報告されたことから、現在では国内外の数多くの施設において行われており、2003年にはASOおよびバージャー病に対する高度先進医療として保険認可されている。しかし骨髄単核球細胞移植を用いた血管再生医療では、対象疾患であるASO等では、糖尿病や慢性腎不全による血液透析や、バイパス術後などの全身合併症を有することが多く、骨髄単核球細胞移植を行う際の大量の骨髄採取時の全身麻酔に、過大なりスクを伴うことが危惧されていた。しかしその有効性と安全性が報告されたことから、細胞移植は次なるstepとして様々な治療法が試みられるようになる。

3) 末梢血単核球細胞移植治療

このような中、千葉大学附属病院の小室一成教授の研究グループでは、独自に末梢血単核球を用いた血管新生

治療 (サイトカイン非使用) について基礎研究を重ねてきており、その結果、単核球は高度な血管新生効果を持つこと、その効果は単核球移植により惹起される血管増殖因子の産生によること、末梢血由来の単核球は骨髄由来の単核球と比較して、血管増殖因子の産生や血管新生効果が勝るとも劣らないことを報告している¹²⁾。サイトカインを使用せず回収された末梢血単核球には幹細胞が非常に少ないにも拘らずこれだけの効果が得られたことや、幹細胞を除いた骨髄単核球でも同様の血管新生作用があることを示すデータも得られたことから、血管再生治療に幹細胞が関与するメカニズムは必ずしも必須ではないと考えられている。事実その後も骨髄単核球細胞移植による血管再生治療効果の大半は、単核球から分泌される血管増殖因子によるものであるとの報告や、骨髄単核球からの血管へ分化する頻度は極めて低いとの報告が相次いでおり、千葉大学の研究グループの報告を裏付けている^{13~16)}。末梢血単核球の採取法と安全性は既に千葉大学附属病院の研究グループで確立されており、幹細胞移植で危惧されているような異所性分化の心配も極めて低い。以上を考慮のうえ、十分な血管新生効果がより安全に期待できる、自己末梢血単核球細胞移植を臨床応用する方針とし、千葉大学と臨床共同研究のもとに、獨協医科大学病院循環器内科から本学倫理委員会へ申請し、2004年10月にこれが承認された。その後末梢血単核球細胞移植による血管再生治療が2005年6月から厚生労働省より高度先進医療として承認された。

4. 末梢血単核球細胞移植による血管再生治療

1) 血管再生治療の実際とプロトコール

世界で初の自己末梢血単核球細胞移植による血管再生治療の第1例目は、2002年に千葉大学病院で施行されている。対象は上記に記載したASOやバージャー病で、従来の治療法では下肢の大切断や虚血の悪化が防ぎ得ない、いわゆるno optionの重症下肢虚血症例 (Fontaine III~IV度) である。そのうち、未治療の増殖型糖尿病性網膜症や、5年以内に悪性疾患の既往がある症例は、血管新生により原疾患が悪化する危険があり、積極的な術前精査のうえ除外している。適応となった症例に対しては、書面による十分なインフォームドコンセントを得て治療を開始している。まず患肢あたりの単核球細胞数 1×10^{10} 個を目標として、自動血液成分分離装置 (GAN-BRO: COBE-Spectra) を用いて血液アフエーシスを行っている。実際の採取細胞数は、末梢血の分画および成分採血の効率に左右されるが、約40 ml/minの流速で約4時間の行程でほぼ全例において目標細胞数が達成可能である。これらの細胞を直ちに遠心濃縮し、虚血下肢

に1.5から3cm間隔で筋注移植している。細胞移植後は炎症反応と血管増殖因子産生が一過性に増加し、これに伴い下肢の血液灌流が増加する。千葉大学の研究グループでは初期のパイロット研究において、短期間に細胞移植を繰り返すことでこれらの反応が増強する傾向を見出しており、当院では千葉大学研究グループと同一プロトコルによる、2週間隔で計2回の細胞移植を行い1クールとするプロトコルを採用している。治療効果を認めたresponderの場合、治療後2週間以内に疼痛の軽減や良性肉芽の増成が確認されることが多い。ただし血行再建術とは異なり、皮膚潰瘍の治癒に月単位を要することがあり、長期にわたる形成外科的なフォローが必要となる症例が少なからず存在する。

2) 獨協医科大学病院での自己末梢血単核球細胞移植による血管再生治療

当院初の第1例目の自己末梢血単核球細胞移植による血管再生治療は、2005年6月22日に施行された。しかしこの日を迎えるにあたり、当時は大変苦勞をしたことを覚えている。大学病院で新しい治療を導入することの困難さを痛感させられた。また施行前に循環器内科以外に、血液内科、皮膚科、麻酔科、整形外科等の先生方や看護師、輸血部や臨床検査部のスタッフの方々と症例検討会を開いて、様々な角度から症例を十分検討した。

現在までの当院での症例についてであるが、2005年6月22日に第1例目が施行されて以来、現在2009年5月30日までに26例の患者に血管再生治療を施行している。年齢は49～77歳（平均66.7歳）。男性17例、女性9例で、血液透析施行中の患者が11例（42.3%）を占めた。一方、糖尿病合併例は18例（69.2%）と高率であった。また狭心症や心筋梗塞など虚血性心疾患を合併した症例は10例（38.5%）で、そのうち6症例（60%）は冠動脈バイパス術後の患者であった。以上のうち、改善例は16例（61.5%）で、大切断に至らず指先のみ的小切断で改善している例は4例で、以上20例（76.9%）の症例で改善が認められている。また大切断に至っている症例は、血管再生治療を始めた初期症例が多く、最近では適応など症例をよく検討して施行しており、改善率が上昇している。

では当院での第1例目の症例を紹介する。

症例1：72歳、男性。

診断：1：皮膚潰瘍（左第4趾）、2：ASO（Fontaine IV度）、3：2型糖尿病、4：陳旧性心筋梗塞、冠動脈バイパス術後、5：高血圧症、6：痛風、7：足白癬。

既往歴：1995年近医にて糖尿病、高血圧を指摘され



図1

るが放置。1998年近医にてHbA1c 13.9%、BS 291 mg/dl指摘され、以後当院内分泌代謝内科で通院加療中。2001年糖尿病性網膜症（増殖型）にて汎網膜光凝固術施行。2002年急性心筋梗塞発症し、冠動脈バイパス術施行。

現病歴：当院循環器内科と内分泌代謝内科で通院加療されていた。ASOの症状は2002年冠動脈バイパス術時より認めており、その当時はしびれ、冷感（Fontaine I度）程度であった。2004年1月頃より間歇性跛行（Fontaine II度）となり、2005年1月頃よりは左第IV趾に皮膚潰瘍（Fontaine IV度）がみられるようになってきた。3月下旬より近医でプロスタグランジンの点滴を連続的に施行されたが改善みられず、徐々に下肢疼痛、皮膚潰瘍の悪化がみられるようになった。そこで、様々な薬物治療に難治性で、かつ下肢の虚血症状が急速に進行するため2005年5月11日当科に入院となる。

入院後経過：5月12日心臓カテーテル検査施行した結果、3枝病変に対するgraftはall patentで、EFも62%と良好であった。また下肢MRAおよびDSAでは左右の総腸骨動脈から浅大腿動脈までには狭窄は認められず、特に左下腿3分枝に著明な狭窄所見が認められた。この所見と一致して、下肢サーモグラフィーでは右に比べ左下腿の著明な血流低下所見が認められ、ABIも右：0.76に対し、左：0.61と低下を確認した。入院後も様々な薬物治療に抵抗性で、症状は悪化するため、6月22日と7月6日に自己末梢血単核球細胞移植による血管再生治療を施行した。自己末梢血単核球細胞の採取は、当院輸血部において約4時間アフエレーシスを行ない、単核



図 2



図 3



図 4



図 5

球細胞成分を採取した(図1)。疼痛管理は麻酔科へ依頼しケタラルール、ドロレプタンなどの静脈内麻酔を用いて行なわれた。左下肢全体、足底部を含めて約70か所に分割筋肉内注入を行ない移植した(図2)。移植に伴う筋肉内出血や感染などは認められなかった。移植前(図3)と比べ、移植後数日で安静時疼痛、冷感、しびれなどの自覚症状の改善を認めるようになり、約1ヶ月程度で潰瘍の縮小化を認めた。さらに約3ヶ月程度で潰瘍は完全に完治した(図4)。ABIとしては、移植後4週後の患側で0.04(0.65)上昇にとどまったものの、4ヶ月の時点では0.12(0.73)上昇を認めた。現在、当院外来通院加療されているが、皮膚潰瘍の再発はみられていない。

また次に当院での8例目の症例を紹介する。

症例8：58歳、女性。

診断：1：糖尿病性壊疽(左第1,2趾)，2：ASO(Fontaine IV度)，3：糖尿病性腎症(維持血液透析)，4：糖尿病性網膜症，5：狭心症，冠動脈バイパス術後，6：高血圧症，7：陳旧性脳梗塞。



図 6

既往歴：1981年糖尿病指摘され、1989年より内服加療。1995年脳梗塞発症。2001年、狭心症にて冠動脈バイパス術施行。

現病歴：1999年10月より血液透析導入となり、近医の透析施設で外来維持血液透析(3回/週)されていた。数年前より左下肢の冷感、疼痛、間歇性跛行を自覚していたが放置していた。2006年5月頃より左第1,2趾の皮

膚水泡形成し皮膚科受診。2006年5月26日当科外来紹介され、6月21日施行の下肢MRAにて両膝下に高度狭窄、閉塞所見を認めた。2006年7月19日精査加療目的のため当科入院となる。

入院後経過：7月20日心臓カテーテル検査施行した結果、3枝病変に対するgraftはall patentで、EFも53.8%と良好であった。入院後より左第1, 2趾糖尿病性壊疽に対して炭酸ガス足浴、高気圧酸素療法、プロスタグランジン製剤の点滴静注、皮膚科にてデブリードメント等の処置など保存的療法を行なった。しかし入院経過中にて両踵にも水疱形成びらんを形成したため、8月23日と9月13日に自己末梢血単核球細胞移植による血管再生治療を施行した。移植前(図5)と比べ、移植後数日で安静時疼痛などの自覚症状の改善を認めるようになり、約2ヶ月程度で潰瘍の縮小化を認めた。さらに約6ヶ月程度で潰瘍は完全に完治した(図6)。現在、当院外来通院加療されているが、皮膚潰瘍の再発はみられていない。

以上、重症下肢虚血ASO患者に対して自己末梢血単核球細胞移植による血管再生治療を施行した2症例を紹介した。2症例とも難治性皮膚潰瘍や疼痛が著明で、さらに冠動脈バイパス術後や維持血液透析治療中とリスクが高い患者であるが、末梢血単核球細胞移植治療を安全に施行し、かつ良好な治療成績を経験したので報告した。

5. 足病変救済チーム連携医療

近年、前述したようにASOによるPADが増加しているが、その原因は高血圧症、糖尿病、高脂血症などの生活習慣病やメタボリック症候群の増加と考えられている。特に最近では、糖尿病を原因とする血液透析患者の急増に伴い、重症虚血肢が増加し、さらに高齢者で冠動脈疾患や脳血管疾患などの主要臓器の動脈硬化性疾患、その他重篤な合併疾患を併発している。またこれらの疾患の長期予後は不良で、その多くが脳梗塞や心筋梗塞といった脳血管や心血管イベントを伴うことが報告されている。このような患者は、医師、看護師、理学療法士などとの連携がうまくいっていないため、靴ずれから足潰瘍になるまで放置されている例、透析に週3回通院しているにもかかわらず足感染から切断に至る例なども散見される。このため足病変の救済をチーム連携医療として多方面からアプローチして足の診療にあたる必要性がある。そこで当院では足病変の評価や、フットケアの最適な予防や治療法を検討する会が立ち上げられた。現在循環器内科、胸部外科、皮膚科、形成外科、心臓・血管内科、内分泌代謝内科、整形外科、看護学部成人看護学、糖尿病看護認定看護師、皮膚・排泄ケア認定看護師、糖尿病療養指導士などの方々が参加して、月に1回のペー

スで開催し、症例の検討やフットケアについての事例検討を行っている。このような症例検討会により、重症な下肢虚血患者をチーム連携医療でより多くの患者を救済していきたいと考えている。

おわりに

自己末梢血単核球細胞移植による血管再生治療について、臨床応用の歴史から当院での症例やチーム連携医療について概説した。虚血性血管疾患は今後も、集学的治療を要する困難な疾患であり続けるものと考えられている。特に重症下肢虚血は、血行再建不能例に関しては悪性腫瘍と同等な死亡率を示すことから、米国では「unmet medical needs」として捉えられている。その意味からも血管再生治療への期待は大きいと思われる。重症虚血性疾患の患者数が年々増加している中、本治療をより多くの分野の関係者に知ってもらい、活かしてもらうために本稿が少しでも役に立てばと考え、またより多くの患者の救済を目指していきたく考えている。

謝 辞 稿を終えるにあたり、獨協医科大学 松岡博昭名誉教授、血液内科 三谷絹子教授、佐々木 光講師、皮膚科 山崎雙次教授、濱崎洋一郎准教授、麻酔科学 北島敏光教授、濱口眞輔准教授、第二外科 窪田敬一教授、内分泌代謝内科 笠井貴久男教授、胸部外科 福田宏嗣准教授、形成外科 朝度裕貴教授、鈴木康俊准教授、輸血部 篠原 茂主任、臨床検査部 新保 敬主任、看護学部成人看護学(慢性期) 鹿村眞理子教授、糖尿病看護認定小沼真由美看護師、千葉大学大学院医学研究院循環病態医科学・大阪大学大学院医学系研究科循環器内科学 小室一成教授に感謝の意を表します。

文 献

- 1) Isner JM, Pieczek A, Schainfeld R, et al : Clinical evidence of angiogenesis after arterial gene transfer of phVEGF165 in patient with ischaemic limb. *Lancet* **348** : 370-374, 1996.
- 2) Baumgartner I, Pieczek A, Manor O, et al : Constitutive expression of phVEGF165 after intramuscular gene transfer promotes collateral vessel development in patients with critical limb ischemia. *Circulation* **97** : 1114-1123, 1998.
- 3) Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al : Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* **275** : 964-967, 1997.
- 4) 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.
- 5) Shintani S, Murohara T, Ikeda H, et al : Augmentation of postnatal neovascularization with autologous bone marrow transplantation. *Circulation* **103** : 897-903, 2001.
 - 6) Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, et al : Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* **407** : 242-248, 2000.
 - 7) Losordo DW, Dimmeler S. Therapeutic angiogenesis and vasculogenesis for ischemic disease. Part I : angiogenic cytokines. *Circulation* **109** : 2487-2491, 2004.
 - 8) Losordo DW, Dimmeler S. Therapeutic angiogenesis and vasculogenesis for ischemic disease : part II : cell-based therapies. *Circulation* **109** : 2692-2697, 2004.
 - 9) 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.
 - 10) Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, et al : Marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote in vitro and in vivo arteriogenesis through paracrine mechanisms. *Circ Res* **94** : 678-685, 2004.
 - 11) 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.
 - 12) Minamino T, Toko H, Tateno K, et al : Peripheral blood or bone-marrow mononuclear cells for therapeutic angiogenesis? *Lancet* **360** : 2083-2084, 2002.
 - 13) 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.
 - 14) Ziegelhoeffer T, Fernandez B, Kostin S, et al : Bone marrow-derived cells do not incorporate into the adult growing vasculature. *Circ Res* **94** : 230-238, 2004.
 - 15) 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.
 - 16) Jackson KA, Majka SM, Wang H, et al : Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest* **107** : 1395-1402, 2001.