

特 集

—臓器移植・人工臓器・再生医療の現況—

幹細胞移植による血管再生治療

獨協医科大学 内科学 (心臓・血管)

井上 晃男 佐久間理吏

はじめに

近年、わが国においても食生活の欧米化・人口の高齢化に伴い、虚血性心疾患や閉塞性動脈硬化症などの動脈硬化性疾患が増加している。バルーン・ステントによる血管形成術やバイパス手術・人工血管移植術などの外科的治療法の進歩は、これらの疾患患者の救命・症状緩和に貢献してきた。しかしながらこれらの血行再建術によってもなお、胸痛・心不全症状を繰り返す難治性虚血性心疾患例や下肢切断を余儀なくされる重症閉塞性動脈硬化症例もあり、さらには血行再建術の不可能な症例も多い。このような症例に対し、局所に幹細胞移植を行い、虚血部周辺の組織からの血管新生や側副血行の発達を促すことにより組織の障害や壊死の進行を防ぎ、組織・臓器の機能を保護しようとする治療法が、再生医療の一環として提案された。

再生医療といえば、2006年に京都大学の山中伸弥教授によって樹立された「人工多能性幹細胞 (inducible pluripotent stem cell : iPS cell)」のインパクトがあまりにも強く、iPS細胞による再生医療の実現が国策にもなっている。すでにいくつかの分野では臨床応用も始まっており、この技術が日常診療の場に広く登場するのもそう遠いことではないかもしれないが、本稿では臨床の現場ですでに実用化されている血管再生治療に焦点を絞って概説する。

血管新生

血管新生に関する研究は、元来腫瘍の発育における栄養血管の新生という形で始まった¹⁾。腫瘍における血管新生は腫瘍の発育を促進する「悪玉」である。しかしながらその後血管新生に必須の因子として血管内皮細胞増殖因子 (vascular endothelial growth factor : VEGF) が発見され、やがて Isner ら²⁾ が VEGF 遺伝子を用いた虚血部血管新生療法を多くの動物実験を経て臨床応用したことで「善玉」としての「治療的血管新生」の研究が急

速に発展した。

胎生期においては、血球系細胞と血管系細胞は共通の骨髄由来の幹細胞から分化すると考えられており、こうした幹細胞が血球系細胞と血管系細胞それぞれの前駆細胞である造血幹細胞 (hematopoietic stem cell) と血管内皮前駆細胞 (endothelial progenitor cell : EPC) へと分化する。造血幹細胞は中心部に位置し、EPCは周辺部に位置することにより、血島 (blood islet) とよばれる細胞集団を形成する。血島のうち外周付近の細胞が血管内皮細胞に分化して血管を形成し、内側の細胞は血球へと分化する (図1)^{3,4)}。発生学や組織学の観点から、広義の血管新生 (neovascularization) は2種類に大別される。一つは発生初期におけるEPCからの全く新しい血管の形成で、血管発生 (vasculogenesis) と呼ばれる過程であり、もう一つのタイプは、すでに組織に存在する成熟血管からの、既存の血管内皮細胞の増殖および遊走・リモデリングを基本とした新しい血管枝の形成で、狭義の血管新生 (angiogenesis) と呼ばれる過程である⁵⁾。最近まで胎生期の後期以降および出生後すべての時期における血管新生は、angiogenesisによるものだけであると考えられてきたが、近年成人の末梢血単核細胞の分画中に血管内皮細胞に分化しうるEPCが存在することが示され、成人における血管新生にもこのvasculogenesisが関与し、虚血心筋や虚血下肢での側副血行路はvasculogenesisが初期反応であり、angiogenesisは遅れて関与することが明らかとなった。さらに、この血管新生にはVEGFに加え線維芽細胞増殖因子 (basic fibroblast growth factor : bFGF)、angiopoietin-1など様々な増殖因子が複雑に関与し、虚血組織において血管新生を誘導することが明らかとなった⁶⁾。

EPCは特異的な表面抗原をマーカーとして認識することでフローサイトメトリーを用いて検出が可能であり、臨床的にも末梢血中のEPCの測定が行われている。かつてはCD34陽性細胞をEPCとして評価することが多かったが、CD34はEPCのみに特異的な表面抗原で

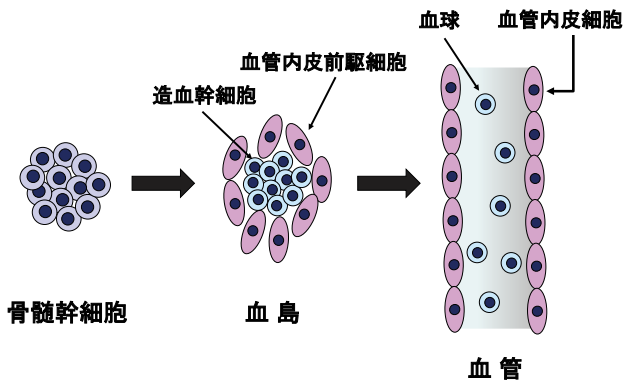


図1 骨髓幹細胞の血管系細胞への分化

骨髓幹細胞は血球系細胞と血管系細胞それぞれの前駆細胞である造血幹細胞と血管内皮前駆細胞へと分化する。造血幹細胞は中心部に位置し、血管内皮前駆細胞は周辺部に位置することにより、血島とよばれる細胞集団を形成する。血島のうち外周付近の細胞が血管内皮細胞に分化して血管を形成し、内側の細胞は血球へと分化する。

はなく造血幹細胞も含む、より上流の幹細胞のマーカである。そこで最近では flk-1, CD133 など他のマーカを組み合わせてより詳細な検討が行われている。しかしながらどのマーカの組み合わせがもっとも EPC に特異的な細胞を検出できるのかは未だ結論をみない。近年では CD34 陽性細胞を抽出、専用の培地で培養した後「コロニー形成を観察する「コロニー形成アッセイ (colony formation assay)」という方法が、最も特異的な EPC 検出法とされる⁷⁾。

血管新生蛋白・遺伝子や造血性サイトカインによる血管新生療法

これまでに動物実験において、様々な成長因子による血管新生療法が試みられてきた。虚血心筋動物モデルでは bFGF 蛋白⁸⁾ の冠動脈内投与が側副血管形成、心収縮機能を改善させると報告され、下肢虚血モデルにおいては VEGF⁹⁾ やヒト型肝細胞成長因子 (hepatocyte growth factor : HGF)¹⁰⁾ の腸骨動脈内投与による側副血行の有意な改善が報告された。しかしながらその後の冠動脈疾患患者での大規模二重盲検試験では、VEGF, bFGF いずれも冠動脈内投与による血管再生効果は認められなかった。

1994 年 Losordo ら¹¹⁾ はカテーテルを用いた VEGF 165 遺伝子発現プラスミドベクターの血管内投与を閉塞性動脈硬化症患者に行った。世界初のヒト遺伝子治療である。その後彼らは 19 人の冠動脈疾患患者における冠動脈内投与を行い、狭心痛の発現抑制・運動耐容能改善効果を報告した。血管新生蛋白の直接的投与に対し、こ

のような遺伝子注入は緩やかに長期間にわたって蛋白放出が持続するため有効なのかもしれない。しかしながら、アデノウイルスベクターによる bFGF 遺伝子心筋内注入が無効であったとの結果もある。またアデノ VEGF121 の閉塞性動脈硬化症患者における試験でも有効性なしと報告された。HGF の遺伝子導入はわが国において閉塞性動脈硬化症に対し二重盲検試験が行われており、良好な結果が出ている¹²⁾。

造血性サイトカインである顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (granulocyte macrophage-colony stimulating factor : GM-CSF) が骨髄から EPC を動員させることがわかり、冠動脈疾患患者に対する GM-CSF 投与が行われた。その結果側副血行の有意な増加が観察され、血管新生への効果が立証された¹³⁾。

細胞移植による血管新生療法

骨髓幹細胞には血管内皮細胞へ分化し得る EPC が約 0.01% 存在し、それ自体が血管新生を誘導する VEGF などの種々のサイトカインを放出し、既存の内皮細胞の増殖・遊走を促進する。また EPC 以外の造血系幹細胞も血管新生因子を合成・放出することがわかっている。このことから骨髓単核細胞を採取して、虚血部位に移植することで血管新生を促し、虚血を改善させる試みが行われた。まずウサギの片側下肢虚血モデルを用いて、自己骨髓単核細胞を局所へ移植することにより虚血下肢における側副血行や血管新生が促進されることが明らかとなった¹⁴⁾。またブタの虚血心筋モデルにおいても自己骨髓細胞の虚血組織内移植で有意に血管新生が増強された¹⁵⁾。これらの実験的根拠に基づき、閉塞性動脈硬化症やバージャー病などの末梢動脈疾患患者への自己骨髓細胞の虚血骨格筋内移植による血管新生療法の臨床応用がわが国でも行われてきた。外科的・内科的治療によっても下肢虚血改善を認めない患者虚血下肢 (Fontaine 3~4 度) に対する自己骨髓細胞移植の二重盲検試験 (Japan Trial for Therapeutic Angiogenesis Using Cell Transplantation : J-TACT) において上肢、下肢血圧比 (ankle brachial pressure index : ABPI) が有意に上昇し、下肢安静時疼痛が有意に改善するという良好な結果が得られた¹⁶⁾。骨髓細胞移植による血管再生の機序としては移植細胞中の EPC の血管内皮細胞への分化よりも EPC および他の幹細胞から放出された血管新生促進性サイトカインの刺激によるパラクライン効果と考えられている。そこでより簡便な方法として末梢血より単核細胞を分離して移植する方法も試みられたが、その効果は骨髓細胞移植に比べやや劣っていた。一方骨髓細胞のなかで CD34 陽性 EPC を多く含む分画のみを分離し、

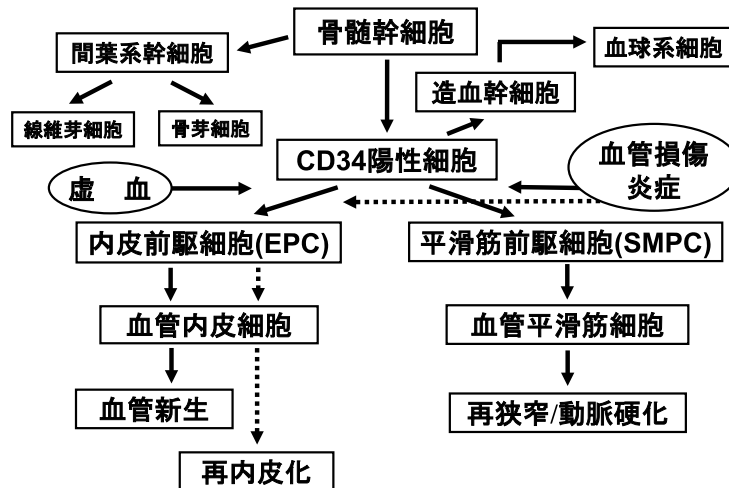


図2 骨髓幹細胞の血管系細胞への分化

血球系細胞と血管系細胞(内皮細胞・平滑筋細胞)は同じ幹細胞から分化する。CD34は骨髓幹細胞に広く発現するマーカーでCD34陽性細胞は内皮前駆細胞、平滑筋前駆細胞がともに含まれる。いずれに分化するのかは環境に依存する。虚血という環境下では内皮細胞に分化し、虚血組織に血管新生をもたらすが、ステント移植後などの傷害血管においては局所の炎症機転がトリガーとなり平滑筋細胞に分化し再狭窄や動脈硬化をひき起こすと考えられる。しかし傷害血管においても内皮細胞に分化し、生理的血管修復に必須の再内皮化という現象をももたらす。

EPC=endothelial progenitor cell, SMPC=smooth muscle progenitor cell

閉塞性動脈硬化症などの虚血肢へ移植する試みも行われ、よりすぐれた効果が期待されている。

虚血心筋への細胞移植も行われている。急性心筋梗塞患者の再灌流療法後や慢性冠動脈疾患で冠血管形成術やバイパス手術の困難な患者に対して、骨髓単核細胞や末梢血単核細胞を開胸下での直接移植、あるいは経カテーテル的移植が試みられている。急性心筋梗塞患者の場合は再灌流療法後に残存する微小循環障害による心筋虚血を改善することが目的である。主に急性期に冠血管形成術を行った後、1週間以内に血管形成術施行部位からバルーンカテーテルを用いて血流を遮断した状態で細胞注入が行われている¹⁷⁾。慢性冠動脈疾患の場合は慢性心筋虚血による狭心症症状や、低心機能を改善することを目的としており、虚血心筋へ開胸下での直接細胞注入¹⁸⁾やカテーテルでの経皮的細胞移植が行われている。後者の場合、NOGAシステムというマッピング装置で虚血部位を同定し、ニードル付きカテーテルで左室内から虚血心筋に細胞移植する方法がある¹⁹⁾。その他、側副血行供給血管の末梢にマイクロカテーテルで注入する経冠動脈アプローチ、冠状静脈洞からニードルカテーテルで心筋内に注入する方法などが考案されている。しかしながら虚血心筋への骨髓単核細胞/末梢血単核細胞移植の有効性に関しては結論をみない。

骨髓幹細胞の分化と傷害血管の修復機転

虚血組織において骨髓幹細胞は、EPCから血管内皮細胞へと分化することで、血管新生をもたらす虚血を改善する。一方血管形成術後などの傷害血管において血管内皮は著しい損傷を受けるが、その修復過程で、再内皮化が起こる。その際の再生内皮細胞もその一部は骨髓幹細胞由来と考えられている。また動脈硬化や血管形成術後の再狭窄は傷害血管の過剰修復反応と考えられ、血管平滑筋細胞の増殖によって起こる。こうした増殖平滑筋細胞も一部は骨髓幹細胞由来の平滑筋前駆細胞(smooth muscle progenitor cell: SMPC)からの分化によるものと考えられている²⁰⁾。すなわち流血中に骨髓由来のEPCとSMPCを含む「血管前駆細胞」が存在し、傷害血管の修復過程で内皮細胞へ分化すれば血管新生や再内皮化をもたらす「善玉」となる一方、平滑筋細胞に分化すると動脈硬化や再狭窄につながり「悪玉」となると考えられる。前述のごとくCD34陽性細胞をEPCとして評価していた時期もあったが、CD34はより上流の幹細胞のマーカーである。したがってCD34陽性細胞にはSMPCも含まれる(図2)。我々は冠動脈ステント術前後の末梢血でCD34陽性細胞を経時的に観察した。その結果通常のペアメタルステント植え込み例ではCD34

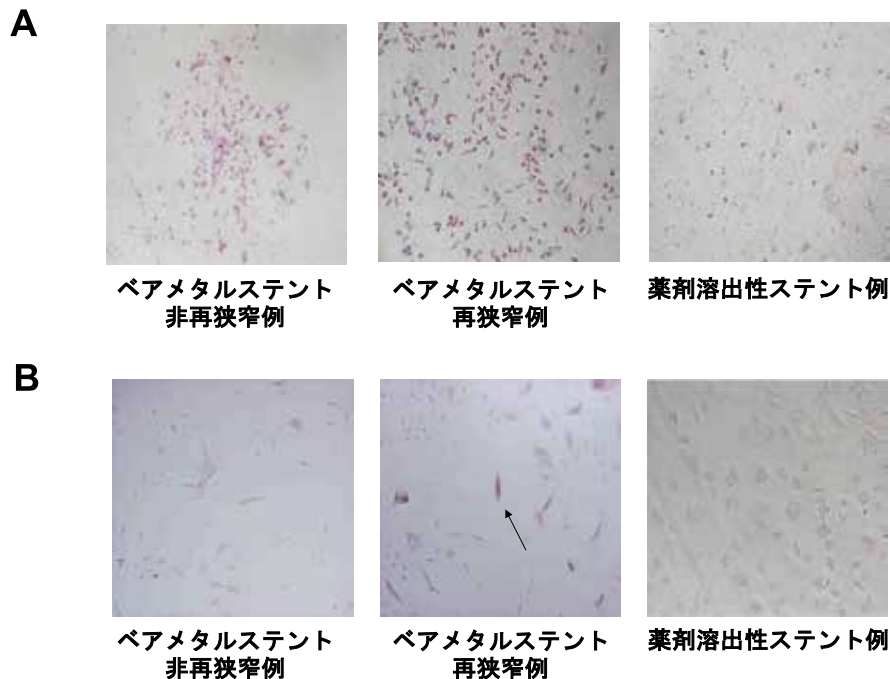


図3 ステント7日後における末梢血単核細胞の分化(自験例)

A：患者の末梢血単核細胞を血管内皮細胞環境下で培養すると、ベアメタルステント例では非再狭窄例、再狭窄例ともにCD31陽性内皮様細胞への著しい分化を示したが、薬剤溶出性ステント例ではわずかであった。**B**：同様に血管平滑筋細胞環境下で培養すると、再狭窄例において α -アクチン陽性平滑筋様細胞に分化する細胞が散見された(矢印)。(文献20より引用)

陽性細胞数は1週間後をピークに増加し、再狭窄例で特に著明であった。さらにステント1週間後の時点で患者の末梢血単核細胞を内皮細胞・平滑筋細胞それぞれの環境下で培養すると全例でCD31陽性内皮様細胞への著しい分化が観察されたが、再狭窄例では α -アクチン陽性平滑筋様細胞に分化する細胞も散見された。ところが薬剤溶出性ステント(drug eluting stent: DES)植え込み例では、CD34陽性細胞の増加は抑制され、培養単核細胞の内皮様細胞への分化も抑制されていた(図3)²¹⁾。これらの結果は傷害血管の修復機転・再狭窄機序における骨髄幹細胞の動員、分化の役割を裏付けるとともに、現状のDESの問題点である再内皮化障害を説明しうるものと考えられる²²⁾。

現存のDESが平滑筋細胞の増殖を抑え、再狭窄を予防することを目的としているのに対し、傷害血管の早期修復により再狭窄を抑えようとする試みもある。血管内皮細胞を誘導し、早期に再内皮化を計ろうというものでVEGF遺伝子²³⁾やCD34抗体²⁴⁾などをコーティングしたステントが考案されている。後者はCD34陽性EPCをステント植え込み部位に捕捉することを目的としたものであるが、CD34はMPCを含むため本ステントはSMPCも捕捉し再狭窄を助長する可能性もある。

幹細胞の平滑筋細胞への分化も血管新生における血管構築には必要な現象かもしれない。しかしながらこのことが動脈硬化や再狭窄の進展に結びつく可能性も念頭におくべきであろう。

脂肪由来再生細胞

間葉系幹細胞(mesenchymal stromal stem cell: MSC)は骨芽細胞、脂肪細胞、骨格筋細胞、軟骨細胞など間葉系に属する細胞への分化能をもつとされる細胞であり、骨髄幹細胞と並び再生医療への応用が期待されている。最近になりMSCは種々の組織(臍帯血、胎盤、脂肪組織等)から樹立できることが分かってきた。なかでも皮下脂肪組織は、大量のMSCを含むとともに、そこより樹立したMSCは増殖能が高いため注目を集めている。脂肪組織は以前は単なるエネルギー貯蔵庫と考えられていたが、近年さまざまな生理活性物質を産生、放出する内分泌器官であることや、多能性幹細胞が存在することが明らかとなってきた。脂肪組織は、その体積のほとんどが脂肪細胞で占められているが、その間隙にはMSCをはじめEPC、血管内皮細胞、血管周皮細胞(pericyte)、マクロファージなどが含まれている²⁵⁾。これらの細胞群は、採取した脂肪組織をコラゲナーゼ処理

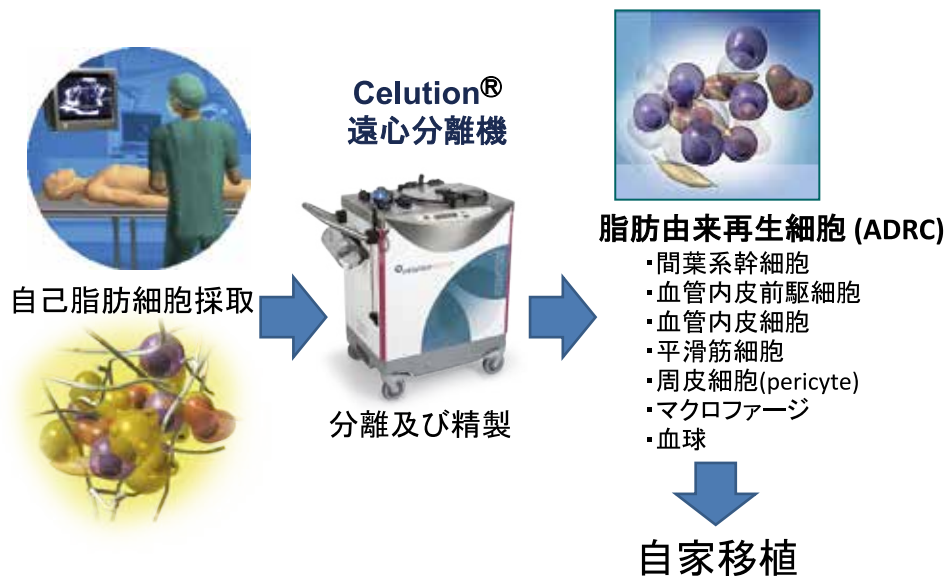


図4 脂肪由来再生細胞の精製・採取

腹部などから皮下脂肪を吸引し、コラゲナーゼ処理しながら遠心分離することで脂肪由来再生細胞 (ADRC) が精製・採取される。ADRCには間葉系幹細胞をはじめ血管内皮前駆細胞、血管内皮細胞、血管周皮細胞、マクロファージなどが含まれており、すぐれた組織再生能を有することから様々な領域での再生医療に応用されている。

し遠心することにより分離できる。腹部などから皮下脂肪を吸引し、特殊な遠心分離装置により精製・採取された細胞群はすぐれた組織再生能を有することから、脂肪由来再生細胞 (adipose-derived regeneration cells: ADRC) と呼ばれ、様々な領域での再生医療に応用されている。ADRCは米国Cytosol社の自動分離濃縮装置 (Celution®) を利用して採取することができる (図4)。

自己ADRCを用いた血管新生療法

再生医療に用いる細胞の細胞源としてのADRCを骨髄幹細胞と比較した場合、前者のメリットとしては簡便に多量の細胞が採取される点が挙げられる。ADRCは脂肪細胞をはじめ神経系細胞、骨格筋細胞、心筋細胞、血管細胞、骨・軟骨細胞など様々な細胞への分化能を有するといわれている (図5)。我々はCelution®を用いて採取したヒトADRCの分化能を検討し、脂肪細胞への分化能が高く、骨細胞へはほとんど分化しないことを確認している (図6)²⁶⁾。

ADRCを用いた再生医療は乳がん術後の乳房再建、変形性膝関節症、尿失禁、褥瘡、消化管手術後の瘻孔等の治療に応用されている。循環器領域でも急性心筋梗塞と慢性冠動脈疾患において治療効果が報告されている。急性心筋梗塞では冠血管形成術施行24時間以内に細胞注入を行う方法が用いられている。心筋梗塞急性期では梗塞周囲心筋内の毛細血管は透過性が亢進しているた

め、細胞がキャプチャーされやすいとの観点から血流を遮断せずに行っている。ごく少数例の検討ではあるが、ADRC治療群 (n=9) はプラセボ治療群 (n=4) に比べ、発症6か月後に梗塞サイズは有意に縮小、冠血流および心機能も改善した²⁷⁾。慢性冠動脈疾患においては、NOGAシステムのガイド下で心腔内へのニードルカテーテルを用いた細胞移植が実施されている。やはり少数例でのプラセボとの比較検討 (ADRC群: n=21, プラセボ群: n=6) でADRC移植後18か月後の左室機能の改善、運動耐容能の改善が報告されている²⁸⁾。いずれも欧州からの報告である。末梢動脈疾患におけるADRC移植に関しては韓国からの報告があり、血行再建術の適応のないバージャー病 (n=10) または糖尿病性足病変 (n=3) による重症下肢虚血患者において本法施行後の疼痛軽減、歩行距離の増加、サーモグラフィーによる血流増加、血管造影での血管新生所見などすぐれた効果が確認されている²⁹⁾。わが国でも医師主導型臨床研究として本法の安全性・有効性をみるTACT-ADRC研究が始まった。名古屋大学、信州大学など全国8施設での共同研究であり、本学も参加している。本研究は2014年11月より施行となった再生医療法に則って「第二種再生医療等技術」として認定を受けた上で実施している。また本研究では閉塞性動脈硬化症、バージャー病における重症下肢虚血の他、強皮症における手指のレイノー症状をも含む重症虚血肢を適応としてい

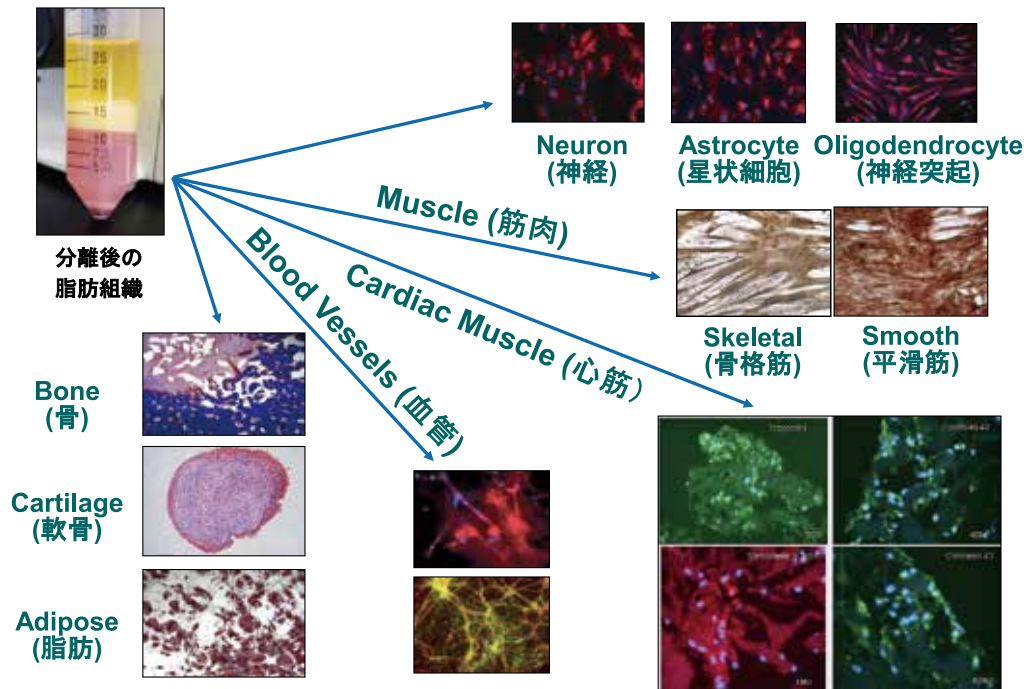


図5 脂肪由来再生細胞の多様な分化能

脂肪由来再生細胞 (ADRC) は脂肪細胞をはじめ神経系細胞, 骨格筋細胞, 心筋細胞, 血管細胞, 骨・軟骨細胞など様々な細胞への分化能を有する。

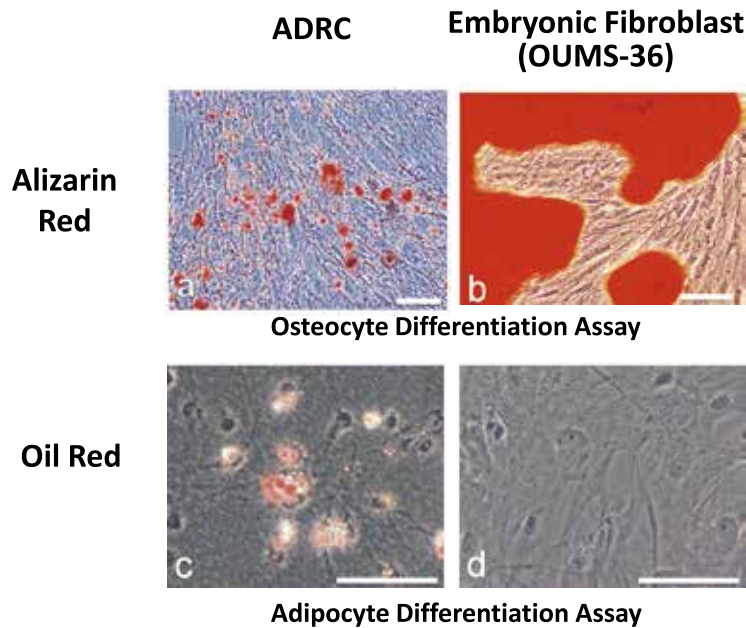


図6 脂肪由来再生細胞の分化能 (自験例)

脂肪由来再生細胞 (ADRC) の脂肪細胞, 骨細胞それぞれへの分化能を胚性線維芽細胞 (embryonic fibroblast) と比較検討した。骨細胞分化誘導培地 (osteocyte differentiation assay) で培養したところ, ADRC は骨細胞への分化はわずかであったが (a), 胚性線維芽細胞は骨への強い分化 (alizarin red で赤く染まっている部位) が認められた (b)。一方脂肪細胞分化誘導培地 (adipocyte differentiation assay) での培養では ADRC は oil red 陽性脂肪細胞へと分化したのに対し (c), 胚性線維芽細胞は脂肪細胞への分化は認めなかった (d)。 (文献 25 より引用)

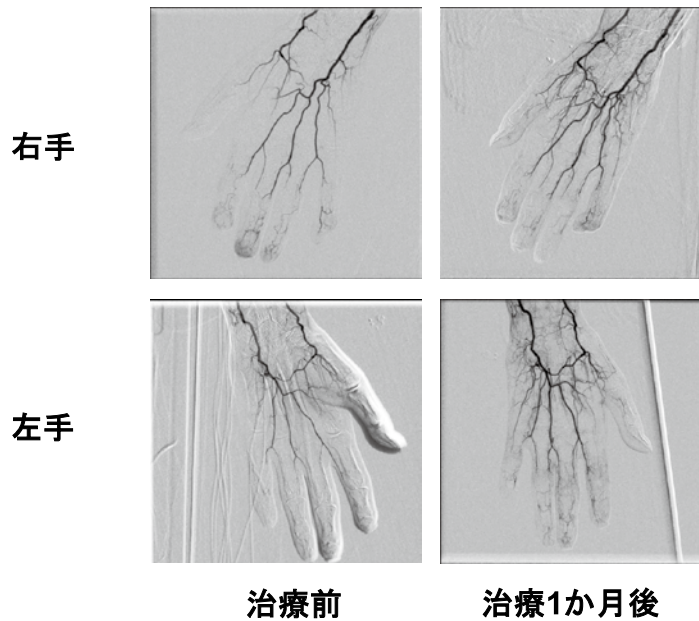


図7 脂肪由来再生細胞による血管再生治療の効果(自験例)
両側手指にレイノー症状を有する70歳女性の強皮症症例。本治療施行一か月後に両側とも虚血部位における新生血管の増生が観察される。

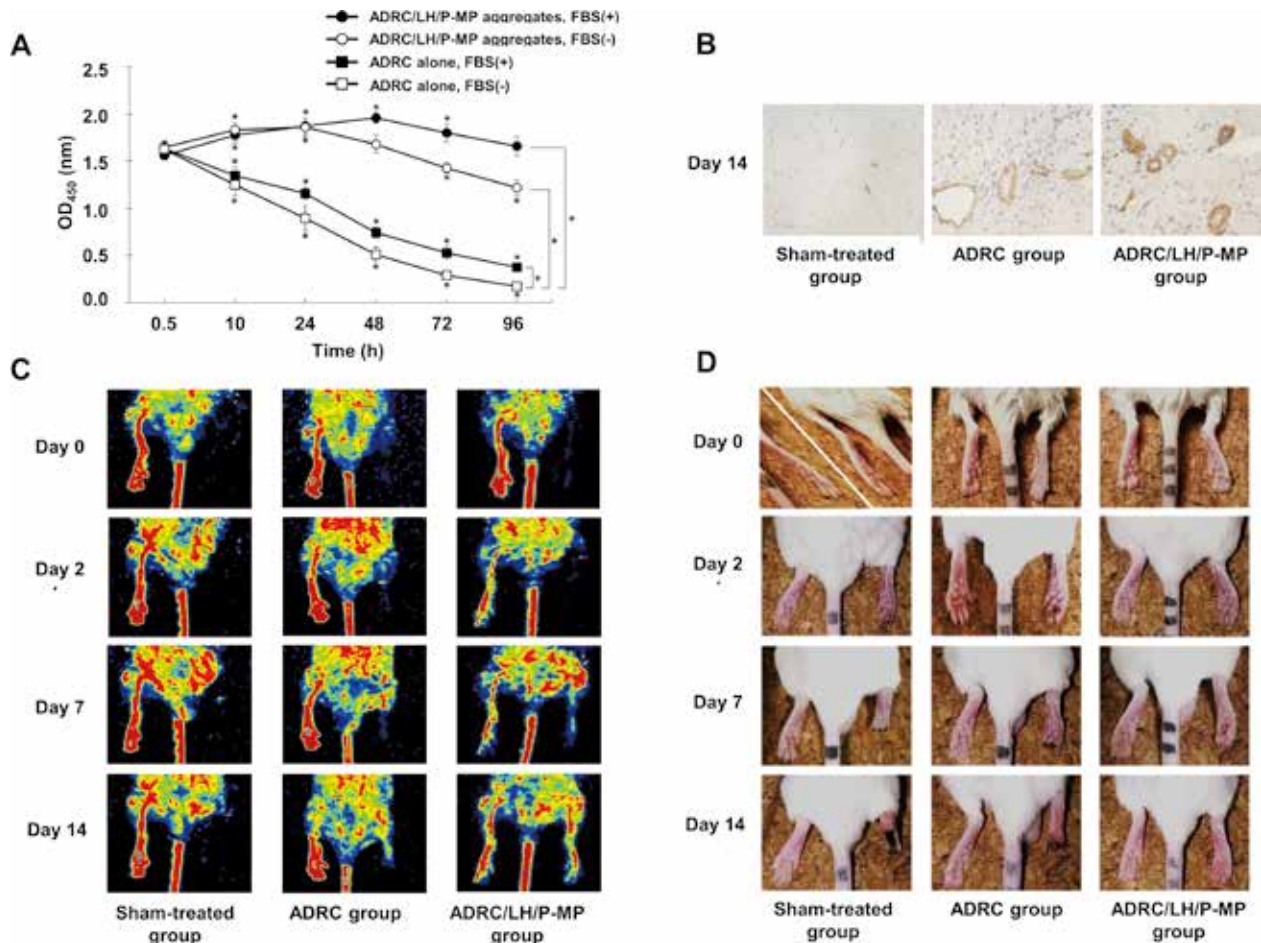


図8 脂肪由来再生細胞移植に際してのキャリアーとしての低分子ヘパリン/プロタミン-マイクロ/ナノ粒子(自験例)
脂肪由来再生細胞(ADRC)と低分子ヘパリン/プロタミン-マイクロ/ナノ粒子(low molecular weight heparin/protamine-micro/nano particle: LH/P-MP)の凝集塊(ADRC/LH/P-MP aggregates)はADRCの生存率(viability)を亢進させる(A)。マウスの急性下肢虚血モデルを用いてADRC/LH/P-MP aggregates移植とADRC単独移植とで新生血管数(B)、サーモグラフィーでの血流回復度(C)、救肢率(D)を比較した。その結果ADRC単独でもコントロール(sham-treated group)に比べると有効であったが、ADRC/LH/P-MP aggregates移植はさらに優れた効果を示した。(文献30より引用)
OD=optical density

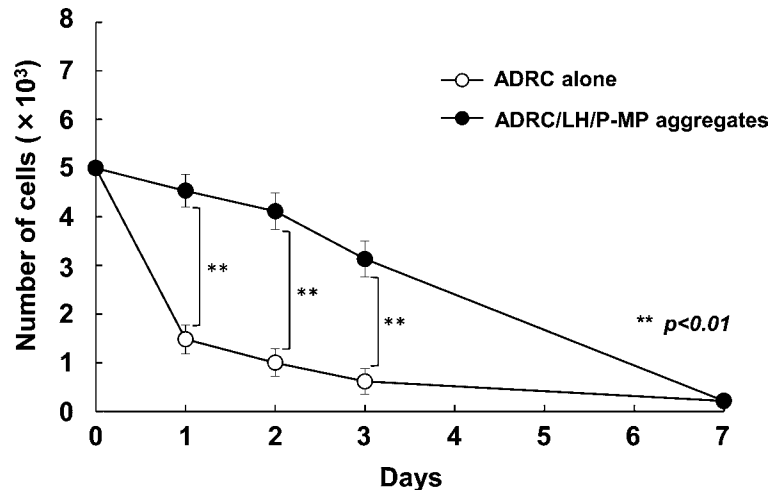


図9 低分子ヘパリン/プロタミン-マイクロ/ナノ粒子のヒト脂肪由来再生細胞におけるキャリアーとしての有用性(自験例)
TACT-ADRC 研究における本学大学病院での第一例目の治療施行時に採取した ADRC を用いて ADRC/LH/P-MP aggregates を作成したところ, ADRC/LH/P-MP aggregates は ADRC 単独と比べ, 明らかに細胞の viability が亢進していた。

る。目標症例数は 40 例であるが, すでに 20 例に実施されており, 当院でも 3 例(強皮症 2 例, バージャー病 1 例)に施行された。図 7 に当院で本治療を行ったレイノー症状を有する強皮症例(70 歳女性)の治療前後の血管造影所見を示す。治療わずか一か月後にすでに虚血部位における新生血管の増生が観察される。ADRC は血管細胞への分化能が非常に高いが, 本治療法の効果も骨髄細胞移植と同様パラクライン効果と考えられている。

ADRC キャリアーとしての低分子ヘパリン/ プロタミン-マイクロ/ナノ粒子

低分子ヘパリンとその拮抗薬であるプロタミンをある一定の配合で混合するとマイクロあるいはナノレベルの粒子が形成される (low molecular weight heparin/protamine-micro/nano particle : LH/P-MP)。この LH/P-MP は ADRC と親和性が高く両者を混合することで凝集塊が形成される (ADRC/LH/P-MP aggregates)。ADRC/LH/P-MP aggregates は ADRC の生存率 (viability) を亢進させることから ADRC による血管再生能を向上せしめる可能性がある³⁰⁾。我々はマウスの急性下肢虚血モデルを用いて, ADRC/LH/P-MP aggregates の移植の効果を検討した。その結果, ADRC/LH/P-MP aggregates 移植は虚血肢における新生血管数の増加, 血流の回復, 救肢率の向上に ADRC 単独よりも優れた効果を示した (図 8)³¹⁾。また前述の TACT-ADRC 研究における当院での治療施行時に採取した ADRC を用いて ADRC/LH/P-MP aggregates を作成

したところ, ADRC/LH/P-MP aggregates は ADRC 単独と比べ, 明らかに細胞の viability が亢進していた (図 9)。このことから LH/P-MP はヒト ADRC においてもそのキャリアーとして有用であろうことが示唆された。低分子ヘパリンとプロタミンはいずれも日常診療の場でよく使用される薬剤であることから, 今後 ADRC/LH/P-MP aggregates の虚血肢への移植の臨床応用は可能と考えられ, 是非ともこれを実現し, 本学から発信していきたいと考えている。

おわりに

幹細胞移植による血管再生医療の概念, 現状, 将来について述べた。本法は従来の方法では治療不可能な難治性の動脈硬化性疾患に対する福音となりうる優れた治療法と思われる。しかしながら日常診療の場に広く普及させていくためには乗り越えねばならない問題点も多々あることを認識する必要がある。

文 献

- 1) Folkman J, Merler E, Abernathy C, et al : Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. J Exp Med **133** : 275-288, 1971.
- 2) Isner JM : Myocardial gene therapy. Nature **415** : 234-239, 2002.
- 3) Risau W, Sariola H, Zerwes HG, et al : Vasculogenesis and angiogenesis in embryonic-stem-cell-derived embryoid bodies. Development **102** : 471-478, 1988.

- 4) Flamme I, Risau W : Induction of vasculogenesis and hematopoiesis in vitro. *Development* **116** : 435-439, 1992.
- 5) Risau W : Vasculogenesis, angiogenesis and endothelial cell differentiation during embryonic development. in "The development of the vascular system". ed by Feinberg RN, Sherer GK, Auerbach R. Karger, Basel, pp58-68, 1991.
- 6) Isner JM, Asahara T : Angiogenesis and vasculogenesis as therapeutic strategies for postnatal neovascularization. *J Clin Invest* **103** : 1231-1236, 1999.
- 7) Masuda H, Alev C, Akimaru H, et al : Methodological development of a clonogenic assay to determine endothelial progenitor cell potential. *Circ Res* **109** : 20-37, 2011.
- 8) Yanagisawa-Miwa A, Uchida Y, Nakamura F, et al : Salvage of infarcted myocardium by angiogenic action of basic fibroblast growth factor. *Science* **257** : 1401-1403, 1992.
- 9) Takeshita S, Zheng LP, Brogi E, et al : Therapeutic angiogenesis. A single intraarterial bolus of vascular endothelial growth factor augments revascularization in a rabbit ischemic hind limb model. *J Clin Invest* **93** : 662-670, 1994.
- 10) Morishita R, Nakamura S, Hayashi S, et al : Therapeutic angiogenesis induced by human recombinant hepatocyte growth factor in rabbit hind limb ischemia model as cytokine supplement therapy. *Hypertension* **33** : 1379-1384, 1999.
- 11) Losordo DW, Vale PR, Hendel RC, et al : Phase 1/2 placebo-controlled, double-blind, dose-escalating trial of myocardial vascular endothelial growth factor 2 gene transfer by catheter delivery in patients with chronic myocardial ischemia. *Circulation* **105** : 2012-2018, 2002.
- 12) Makino H, Aoki M, Hashiya N, et al : Long-term follow-up evaluation of results from clinical trial using hepatocyte growth factor gene to treat severe peripheral artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **32** : 2503-2509, 2012.
- 13) Seiler C, Pohl T, Wustmann K, et al : Promotion of collateral growth by granulocytemacrophage colony-stimulating factor in patients with coronary artery disease : a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Circulation* **104** : 2012-2017, 2001.
- 14) Shintani S, Murohara T, Ikeda H, et al : Augmentation of postnatal neovascularization with autologous bone marrow transplantation. *Circulation* **103** : 897-903, 2001.
- 15) Kamihara K, Matsubara H, Nishitue T, et al : Implantation of autologous bone marrow cells into ischemic myocardium enhances collateral perfusion and regional function via side-supply of angioblasts, angiogenic ligands and cytokines. *Circulation* **104** : 1046-1052, 2001.
- 16) Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T, et al : Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischemia by autologous transplantation of bone marrow cells : a pilot study and a randomized control trial. *Lancet* **360** : 427-435, 2002.
- 17) Wollert KC, Meyer GP, Lotz J, et al : Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction : the BOOST randomised controlled clinical trial. *Lancet* **364** : 141-148, 2004.
- 18) Nagamine H, Watanabe G, Shiobara S, et al : Intramyocardial CD34+ cell transplantation combined with off-pump coronary artery bypass grafting. *Heart Surg Forum* **7** : E285-E287, 2004.
- 19) Perin EC, Dohmann HF, Borojevic R, et al : Transendocardial, autologous bone marrow cell transplantation for severe, chronic ischemic heart failure. *Circulation* **107** : 2294-2302, 2003.
- 20) Sata M, Saiura A, Kunisato, et al : Hematopoietic stem cells differentiation into vascular cells that participate in the pathogenesis of atherosclerosis. *Nat Med* **8** : 403-409, 2002.
- 21) Inoue T, Sata M, Hikichi Y, et al : Mobilization of CD34-positive bone marrow-derived cells after coronary stent implantation : impact on restenosis. *Circulation* **115** : 553-561, 2007.
- 22) Inoue T, Croce K, Morooka T, et al : Vascular inflammation and repair : implication for reendothelialization, restenosis, and stent thrombosis. *JACC Cardiovasc Interv* **4** : 1057-1066, 2011.
- 23) Walter DH, Cejna M, Diaz-Sandoval L, et al : Local gene transfer of phVEGF-2 plasmid by gene-eluting stents : an alternative strategy for inhibition of restenosis. *Circulation* **110** : 36-45, 2004.
- 24) Aoki J, Serruys PW, van Beusekom H, et al : Endothelial progenitor cell capture by stents coated with antibody against CD34 : the HEALING-FIM (Healthy Endothelial Accelerated Lining Inhibits Neointimal

- Growth-First In Man) registry. *J Am Coll Cardiol* **45** : 1574-1579, 2005.
- 25) Gimble JM, Katz AJ, Bunnell BA : Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ Res* **100** : 1249-1260, 2007.
- 26) Inoue K, Nomura H, Sohma R, et al : Feasibility of exploiting celution™ system in autologous cell therapy in Dokkyo Medical University Hospital : safety and reproducibility. *Dokkyo J Med Sci* **41** : 7-12, 2014.
- 27) Houtgraaf JH, den Dekker WK, van Dalen BM, et al : First experience in humans using adipose tissue-derived regenerative cells in the treatment of patients with ST-segment elevation myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* **59** : 539-450, 2012.
- 28) Perin EC, Sanz-Ruiz R, Sánchez PL, et al : Adipose-derived regenerative cells in patients with ischemic cardiomyopathy : The PRECISE Trial. *Am Heart J* **168** : 88-95, 2014.
- 29) Lee HC1, An SG, Lee HW, et al : Safety and effect of adipose tissue-derived stem cell implantation in patients with critical limb ischemia : a pilot study. *Circ J* **76** : 1750-1760, 2012.
- 30) Nakamura S, Kishimoto S, Nakamura S, et al : Fragmin/protamine microparticles as cell carriers to enhance viability of adipose-derived stromal cells and their subsequent effect on in vivo neovascularization. *J Biomed Mater Res A* **92** : 1614-1622, 2010.
- 31) Kishimoto S, Inoue K, Nakamura S, et al : Low-molecular weight heparin protamine complex augmented the potential of adipose-derived stromal cells to ameliorate limb ischemia. *Atherosclerosis* **249** : 132-139, 2016.