

博士論文

移植部位選択に焦点を当てた自家骨髄単核球細胞を用いた
血管新生療法の研究

根本 卓

目次

I. 要旨	P.3
-------	-----

II. 序文	P.4
--------	-----

III. 実験研究

実験①：自家骨髄単核球移植の効果に関する検討

1. 目的	P.11
-------	------

2. 方法	P.11
-------	------

3. 結果	P.19
-------	------

4. 小括	P.23
-------	------

実験②：側副血管発達のメカニズムに関する検討

1. 目的	P.24
-------	------

2. 方法	P.24
-------	------

3. 結果	P.29
-------	------

4. 小括	P.37
-------	------

IV. 考察	P.38
V. 結論	P.53
VI. 今後の展望	P.54
VII. 謝辞	P.55
VIII. 引用文献	P.56

移植部位選択に焦点を当てた自家骨髄単核球細胞を用いた血管新生療法の研究

東京大学大学院医学系研究科外科学専攻血管外科

指導教員 渡邊聡明教授

根本卓

I. 要旨

現在、自家骨髄単核球を用いた血管新生療法が臨床応用されており、慢性虚血肢に対してその移植効果はすでに報告されている。しかしどの部位に移植した場合に最も高い治療効果が得られるのか、つまり治療ターゲットに関する研究は少ない。ターゲットを絞れば、より効果的な治療効果を誘導できる可能性がある。今回、虚血時に側副血管が発達する筋肉に注目した。ウサギの大腿動脈切除後慢性虚血モデルにおいて、主に側副血管が発達する尾骨大腿筋内に選択的に自家骨髄単核球を筋肉内投与することにより、より効果的な側副血管の発達を誘導することができた。また単核球投与後の尾骨大腿筋内の血管新生関連因子の挙動を示すことができた。

II. 序文

糖尿病や透析患者の増加に伴って、末梢動脈閉塞性疾患（peripheral arterial disease：PAD）の患者は、現在増加の一途を辿っており、それとともに安静時痛や潰瘍・壊死を伴う重症虚血肢（critical limb ischemia：CLI）の患者も増加している。CLI の患者は、動脈の広範な閉塞性病変を伴い、また膝関節以下のレベルまで病変が及ぶことが多い。そのため、血管内治療の適応にならない症例が少なからず存在する。また外科的血行再建術の適応にならない、もしくは治療に反応しない症例も存在する。国際的な PAD 治療のガイドラインである TASC II (Trans Atlantic Inter-Society Consensus)においても、CLI に対して有効な薬物治療の推奨がないのが現状であり、治療抵抗性の症例では、壊死の進行により下肢切断を余儀なくされることが少なくない[1]。昨今の糖尿病や慢性腎不全の患者の増加に伴い、この傾向は顕著である。しかし、下肢切断は、当然ながら患者の QOL(Quality of life)を著しく損なうこととなる。

これら治療抵抗性の PAD 症例に対して、治療的血管新生療法は新たな治療オプションとしての可能性を提示している。分子生物学的研究の進歩により、血管の発生のメカニズムの解明とともに、血管新生を促す因子や細胞に関しても

徐々に明らかになっている。PAD に対する治療的血管新生療法の概念とは、これら血管新生を促す因子や細胞などを治療ターゲットにデリバリーすることにより、虚血部位への側副血行路の発達を促進させ、血液灌流を増加させることである[2,3,4,5]。したがって治療的血管新生療法を設計する上でのポイントは、「何（血管新生を促す因子や細胞）」を「何処（治療ターゲット）」へデリバリーするかを、明確に設定することと考えられる。

「何」をデリバリーすれば治療効果が期待できるかに関しては、すでに数多くの研究がなされており、有効性が確認されているものとしては、塩基性繊維芽細胞増殖因子 basic fibroblast growth factor (bFGF)、血管内皮細胞増殖因子 vascular endothelial growth factor (VEGF)、肝細胞増殖因子 hepatocyte growth factor (HGF)等の血管新生因子や、単核球細胞や血管内皮前駆細胞等の細胞が有名である[6,7,8,9,10]。しかし、その一方でこれらを「何処」へデリバリーするかという治療ターゲットに注目した研究は少ない。

学位申請者の研究グループでは、かねてよりデリバリーする因子や細胞を「何処」へデリバリーするかに関しても、PAD の病態に基づいて合理的に判断することが重要であると考えてきた。

治療ターゲットについて考えるためには、まず PAD における側副血行路発達メカニズムを再確認する必要がある。骨格筋は通常複数の動脈で栄養されており、それらの栄養動脈は細動脈ネットワークにより互いに交通している。生体の虚血に対する防御機構として、一つの栄養動脈が閉塞した際には、他の栄養動脈系へ血流の再分布が起こる。再分布した血液は細動脈ネットワークを通じて虚血部位へ供給されることとなるが、その血液供給は虚血を代償するには到底及ばない。そのためこの細動脈ネットワークは時間経過とともに徐々に発達し、虚血部への血液供給を増加させるが、この血管の発達過程が **arteriogenesis** と言われている機転であり、PAD における血管新生の主なプロセスである [11,12,13]。Arteriogenesis は、既存の細い動脈がリモデリングにより太くなるタイプの血管新生であり、これが十分に誘導されて虚血に陥った領域に対する側副血行路を十分に発達させることができれば虚血を代償することも可能である [14,15,16]。しかし、通常、この側副血行路の発達は不十分であることが多く、末梢の虚血を完全に代償するには至らず、症候性の PAD となる。このような病態の PAD に対し、arteriogenesis を促す因子や細胞を発達不十分な側副血行路(細動脈ネットワーク)にデリバリーし、さらなる arteriogenesis を誘導すること

できれば、虚血領域へ有効な血流増加をもたらし、より効果的な治療的血管新生療法となる可能性があると考えた(図 1)[17,18]。この場合、arteriogenesis を促す因子や細胞をいかに効率よく、発達不十分な側副血行路(細動脈ネットワーク)にデリバリーするかが鍵であり、これが治療ターゲット(「何処」へデリバリーするか)が重要であると考えた根拠である。

現在、特に我が国において重症虚血肢に対する治療的血管新生療法として骨髓単核球の自家移植が広く行われている[6,10]。当初は、骨髓単核球に含まれている血管内皮前駆細胞による vasculogenesis が血流改善のメカニズムと考えられていたが、近年の研究により、移植された単核球から放出される bFGF など様々な増殖因子やサイトカインの役割が大きくなったことが明らかになってきた[19,20]。もしそうであれば、骨髓単核球細胞により arteriogenesis を誘導することが可能なはずであり、事実、様々な実験研究により単核球の側副血行路発達促進効果が示されている[19,20]。これら実験研究において「何処」にデリバリーしているかに注目してみると、下腿や足部、特に腓腹筋に筋肉内投与されていることが多いことが分かる[6,10]。これは虚血肢において下腿から足部が主に虚血、壊死に陥ることが多いため、虚血部位という観点のみから血管新生因

子や細胞が投与されている例がほとんどである。しかし、適切なデリバリー部位に関しては、十分な検討が行われているとは言えない。

このような背景から、発達不十分な側副血行路へのデリバリーターゲットの有効性を示すために、本研究ではウサギの大腿動脈切除後慢性虚血モデルを使用した。学位申請者の研究グループは以前に、この慢性虚血モデルにおいて、発達不十分な側副血行路は主に内腸骨動脈の枝である後臀動脈と膝窩動脈の間に発達し、またこの側副血行路は大腿部の尾骨大腿筋内を走行することを報告した(図 2)[21]。以前の研究では、arteriogenesis の誘導効果の高い bFGF の尾骨大腿筋へのデリバリーで治療ターゲット選定の重要性を示したが、本研究でも、自家骨髄単核球を発達不十分な側副血行路が走行する尾骨大腿筋に投与することで arteriogenesis をより強く発現させ、虚血領域へ有効な血流増加をもたらし、より効果的な側副血管の発達を誘導できないか検討した。

実験の第一段階として、自家骨髄単核球の尾骨大腿筋への選択的移植による側副血行路の発達とその治療効果を検討した。その知見をもとに、第二段階として、自家骨髄単核球投与による側副血行路の発達のメカニズムに関して検証を行った。

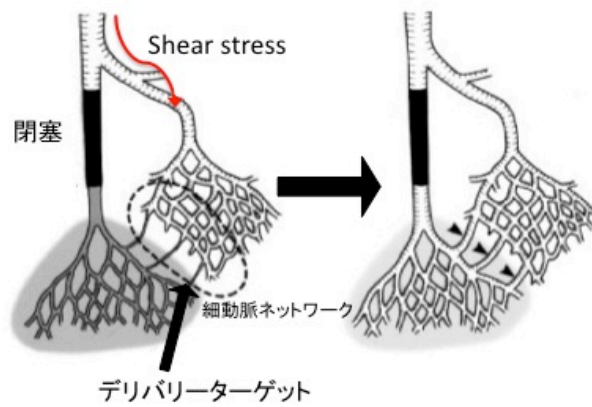


図 1：治療ターゲットとなる発達不十分な側副血行路

Hosaka A, Circulation 2004

より引用

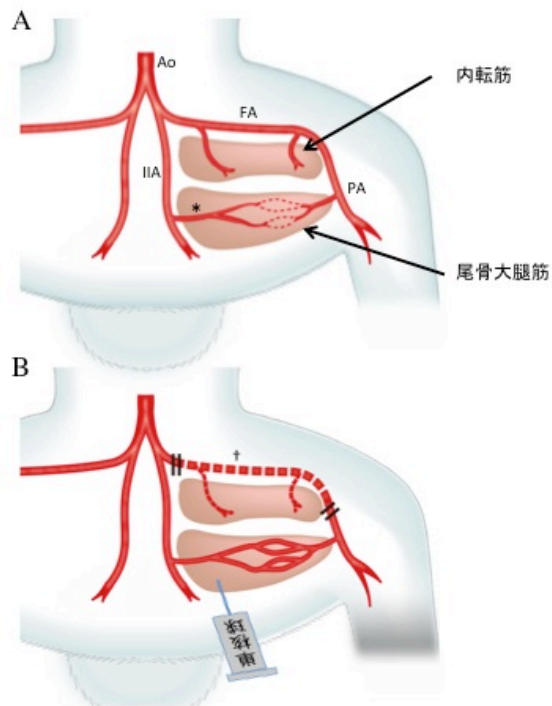


図 2：ウサギ慢性虚血モデルの側副血行路の発達部位と治療ターゲット

A; 尾骨大腿筋は、内腸骨動脈の分枝である後臀動脈と膝窩動脈の分枝から血液が供給され、細動脈ネットワークがある。内転筋は大腿深動脈から主に血液が供給される。

B; 大腿動脈切除モデルにおいて、尾骨大腿筋内の細動脈ネットワークが側副血行路として発達する。しかし末梢の血流を代償するには不十分な側副血行路であるため、この筋肉を骨髄単核球投与の治療ターゲットとする。

Ao; Aorta (大動脈), FA; Femoral artery (大腿動脈), IIA; Internal iliac artery (内腸骨動脈), PA; Popliteal artery (膝窩動脈), *; Posterior gluteal artery (後臀動脈), †; 大腿動脈切除部

III. 実験研究

実験①：自家骨髄単核球細胞移植の効果に関する検討

1. 目的

ウサギ慢性下肢虚血モデルにおいて、側副血行路の発達が見込まれる経路にある尾骨大腿筋に対し、選択的に自家骨髄単核球細胞を投与することによって、その治療効果を検討する。

2. 方法

- ・ ウサギ慢性下肢虚血モデルの作成

以下すべての動物実験は、「東京大学動物実験実施マニュアル」を遵守して行った。2.5-3.0kg の雄の日本白色ウサギ(Saitama Rabbitry, Saitama, Japan)を用いて、塩酸ケタミン(50mg/kg BW, Daiichi Sankyo, Tokyo, Japan)と塩酸キシラジン(2.5mg/kg BW, Bayer Yakuhin, Tokyo, Japan)を混合した麻酔薬を右臀筋内に注射して麻酔を行った。虚血モデルを作成するために、左下腹部から左膝窩まで左大腿内側に皮切をにおいて、左外腸骨動脈末梢から膝窩動脈直上までを切除し、術後 21 日経過した慢性下肢虚血モデルを以下の実験に使用した。

- ・ 骨髓単核球の吸引、分離

左大腿動脈切除後、21 日経過したウサギ慢性虚血モデルの右腸骨稜に骨髓穿刺を行い、ヘパリン加シリンジで 5ml の骨髓液を吸引した。吸引した骨髓液に同量の Histopaque (Sigma-Aldrich, St Louis, MO)を加え、常温下 1500rpm、30 分による比重遠心分離にかけ、骨髓単核球を分離した(図 3)。分離した骨髓単核球を採取し、10ml の Phosphate Buffered Saline (PBS)を加え、常温下 1200rpm、10 分で洗浄し、これを 3 回繰り返した[22]。

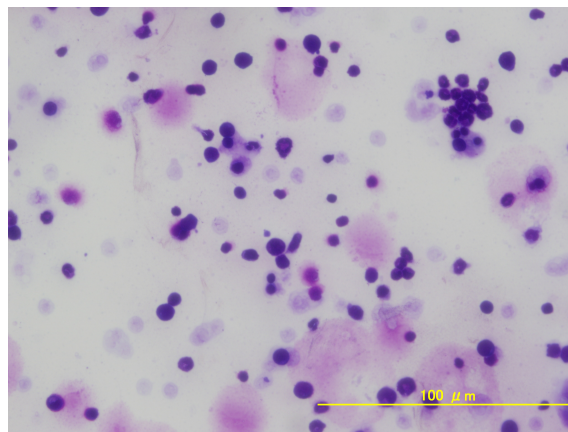


図 3 : Histopaque により分離された骨髓単核球細胞

- ・ 骨髓単核球の蛍光標識

上記で採取された洗浄後の骨髓単核球(7×10^6 個)を、PKH67 Green Fluorescent Cell Linker キット (Sigma-Aldrich, St Louis, MO)を用いて蛍光

標識した。同キットの Diluent C 0.5ml で希釈し、ここに同量の $4 \times 10^6 \text{M}$ の PKH67GL を加えて 25°C 下で 5 分インキュベートし蛍光標識を行った。その後、1%BSA 3ml を加え、染色反応を停止させ、3ml の PBS を加えて、 25°C 下 1500rpm、10 分で 3 回洗浄し、全量を 1ml として速やかに以下の実験に使用した (図 4)[23]。

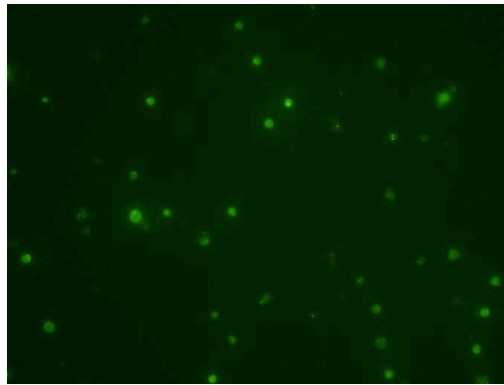


図 4：蛍光標識骨髄単核球

- ・ 尾骨大腿筋への骨髄単核球注射後の分布

慢性虚血モデルに対する骨髄単核球の筋肉内投与後の分布を調べるために、上記で蛍光標識した骨髄単核球を、骨髄を採取した左大腿動脈切除後 21 日目のウサギの左尾骨大腿筋に筋肉内投与を行った。尾骨大腿筋は大腿の背側の皮膚直下に位置しており、剃毛後に皮膚を湿らすと、皮膚直下に隆起した筋肉として同定可能である[21]。上記で作成した 1ml の蛍光標識骨髄単核球(7×10^6 個)

を左尾骨大腿筋に対して、23G 針を用い同筋の中樞、中央、末梢の 3 カ所に等間隔に、かつ深さ 1cm を目安に筋注した。投与後 3 日目、7 日目(各 3 羽)に、麻酔薬を過剰投与し安楽死させ、各群とも尾骨大腿筋と内転筋を採取し、尾骨大腿筋は等間隔に 9 分割し、その内 5 カ所(図 5、①～⑤)を凍結組織切片作製用包埋剤(O.C.T.コンパウンド ; Miles, Naperville, NJ, USA)で封入し、4 μ m で凍結切片を作製した。内転筋も同様に等間隔に 5 分割し、その内 3 カ所(図 5、⑥～⑧)を凍結組織切片作製用包埋剤で封入し、凍結切片を作製した。これら凍結切片を蛍光顕微鏡で観察した。

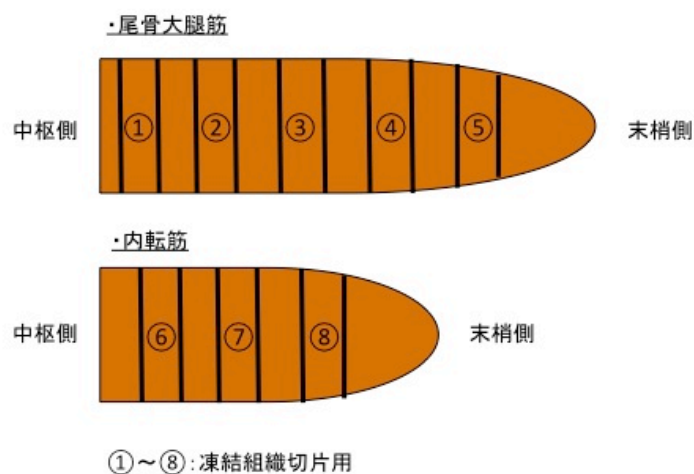


図 5 : 尾骨大腿筋、内転筋の切片法
尾骨大腿筋、内転筋とも等間隔に分割

- ・ 骨髄単核球移植実験モデルの作成

骨髄単核球の筋肉選択的移植効果を調べるために、慢性虚血モデル作成後、骨髄単核球投与部位により、尾骨大腿筋に投与する群(尾骨大腿筋群)と内転筋に投与する群(内転筋群)を作成した(各 10 羽)。内転筋は尾骨大腿筋の近傍にあり、同筋と同様に大腿部にある主要な筋肉であるが、この虚血モデルにおいて、その主たる栄養血管である大腿深動脈は結紮されており側副血行路の発達経路にはない。そのため、今回対照群として使用した。前述の麻酔法で鎮静後、尾骨大腿筋群は、蛍光標識骨髄単核球の投与方法と同様に、骨髄単核球に PBS を加え攪拌し、全体量として 1ml とした後、尾骨大腿筋に対して、23G 針を用い中枢、中央、末梢の 3 カ所に等間隔に、かつ深さ 1cm を目安に投与した。この際、内転筋には 1ml の PBS を、中枢、中央、末梢の 3 カ所に等間隔に投与した。一方、内転筋群は、内転筋に骨髄単核球を同様に投与し、尾骨大腿筋には PBS を投与した。また、もう一つのコントロール群(Vehicle 群)として、尾骨大腿筋、内転筋ともに PBS を投与した(10 羽)。骨髄単核球移植後、28 日経過した時点で、側副血管を評価した(図 6)。

	尾骨大腿筋群	内転筋群	Vehicle群
尾骨大腿筋	単核球	PBS	PBS
内転筋	PBS	単核球	PBS

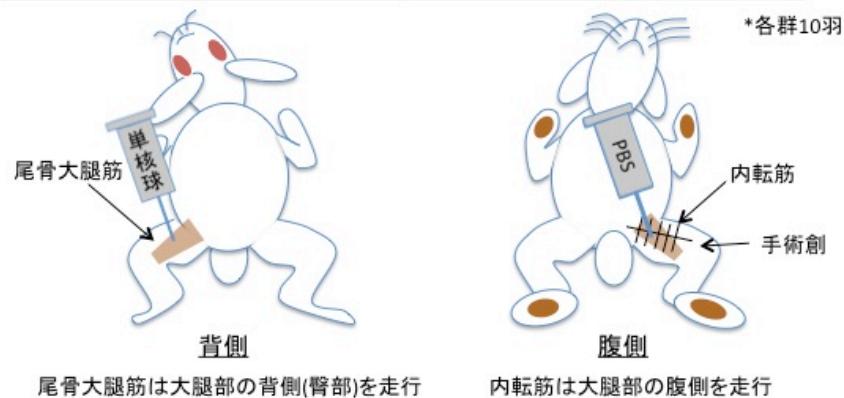


図 6：骨髄単核球移植の実験モデル

- ・ 側副血管の評価

以下、すべて前述の麻酔下で鎮静して行った。

a. 下腿血圧比 Calf blood pressure ratio

両下腿の血圧をドップラー法で測定し、患側の収縮期血圧(左下腿収縮期血圧)を健常側の収縮期血圧(右下腿収縮期血圧)で除したものを下腿血圧比として評価した。骨髄単核球移植直前と移植後 28 日経過した下腿血圧比を測定した [2,24]。

b. 内腸骨動脈血流量 Blood flow

右頸動脈から 2.8F 単孔カテーテルを左腸骨動脈まで誘導し、これを通して 0.014 インチドップラーガイドワイヤー (Volcano, San Diego, CA) を、左内腸骨動脈起始部に留置した。安静時の Average peak velocity (APV) と、パパベリン塩酸塩 (Nichi-Iko Pharmaceutical Co, Toyama, Japan) 2mg 投与時の最大時の APV を測定した。また、後述する血管造影写真をもとに、ワイヤー留置部の血管径(半径 r)を測定し、血流量を算出した[24,25]。

$$\text{安静時内腸骨動脈血流量(ml/min)} = \text{安静時 APV(cm/s)} \times \pi r^2(\text{mm}^2) \times 0.6$$

$$\text{最大内腸骨動脈血流量(ml/min)} = \text{最大時 APV(cm/s)} \times \pi r^2(\text{mm}^2) \times 0.6$$

c. 血管造影

血流量測定に引き続き、2.8F 単孔カテーテルを第一仙骨部まで引き抜き、ニトログリセリン(ミリスロール®, Kyowa, Tokyo, Japan) 0.5mg を動注後、造影剤(イオパミロン®370, Schering, Berlin, Germany)を 1ml/s で 5ml 注入して 4 秒後に血管造影を行った[24]。

2.5mm 径の円が 5mm 間隔に格子状に配列したシートを、血管造影画像フィルム上に置き、大腿部筋肉内に配置された円の数と、造影された血管と重なる円の数をカウントし、後者を前者で除した値を angiographic score として算出した[24]。

- ・ 統計解析

結果は、平均±標準偏差 Standard Deviation (SD)として表記した。3 群間の多重比較検定は、Tukey-Kramer 法で行ない、 $p<0.05$ を有意差ありと判断した。

統計ソフトは、JMP 9.0.2 software (SAS Institute Inc. USA)を使用した。

3. 結果

- ・ 尾骨大腿筋へ蛍光標識骨髄単核球投与後の分布

蛍光標識骨髄単核球は、尾骨大腿筋へ投与 3 日後は、筋線維間の結合組織に主に分布していた。分布は不均一であり、部位により大量に分布している所とそうではない所が混在して認められた (図 7A)。また、近傍に位置する内転筋には蛍光標識骨髄単核球は認められなかった(図 7B)。尾骨大腿筋投与 7 日目でも、3 日目と同様に、不均一性に尾骨大腿筋に分布していたが、内転筋には分布していなかった(図 7C,D)。

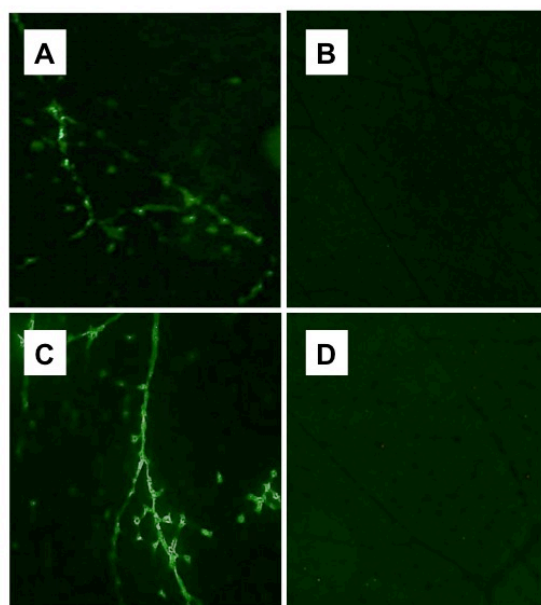


図 7：蛍光標識骨髄単核球の分布

蛍光標識骨髄単核球投与 3 日後(A; 尾骨大腿筋、B; 内転筋)

蛍光標識骨髄単核球投与 7 日後(C; 尾骨大腿筋、D; 内転筋)

- ・ 下腿血圧比

骨髄単核球投与 28 日目の下腿血圧比は、尾骨大腿筋群(0.90 ± 0.03)は、内転筋群(0.71 ± 0.07)や Vehicle 群(0.62 ± 0.07)よりも有意に高値を示した($p < 0.01$)。

また、内転筋群は、Vehicle 群よりも有意に高値を示した($p < 0.01$)(図 8A)。

- ・ 内腸骨動脈血流量

骨髄単核球投与 28 日目の安静時内腸骨動脈血流量は、尾骨大腿筋群(38.8 ± 5.48 ml/min)は、内転筋群(31.6 ± 4.32 ml/min)と Vehicle 群(27.0 ± 4.05 ml/min)よりも有意に高値を示した ($p < 0.01$)。内転筋群と Vehicle 群間には有意差は認めなかった。最大内腸骨動脈血流量も、安静時と同様に、尾骨大腿筋群(72.6 ± 10.7 ml/min)は、内転筋群(60.1 ± 5.1 ml/min)と Vehicle 群(51.4 ± 8.0 ml/min)よりも有意に高値を示した($p < 0.01$)。安静時同様、内転筋群と Vehicle 群間には有意差は認めなかった(図 8B)。

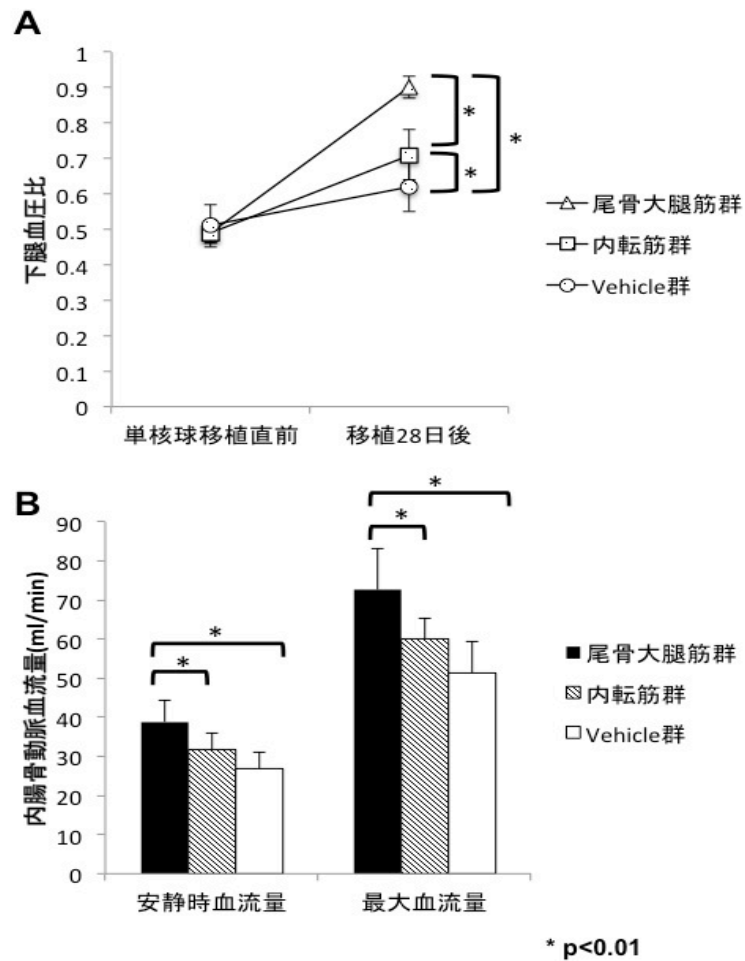


図 8：下腿血圧比と内腸骨動脈血流量

・ 血管造影

尾骨大腿筋群は、内転筋群や Vehicle 群と比較して、著明な側副血管の発達を認めた。内転筋群は中等度の側副血管の発達を認め、Vehicle 群は、ほとんど側副血管の発達を認めなかった(図 9A,B,C)。

尾骨大腿筋群(0.59 ± 0.08)は、内転筋群(0.44 ± 0.08)や Vehicle 群(0.33 ± 0.05)

と比較して、有意に angiographic score が高値であった($p<0.01$)。また、内転筋群は、Vehicle 群よりも有意に angiographic score が高値であった($p<0.01$)(図9D)。

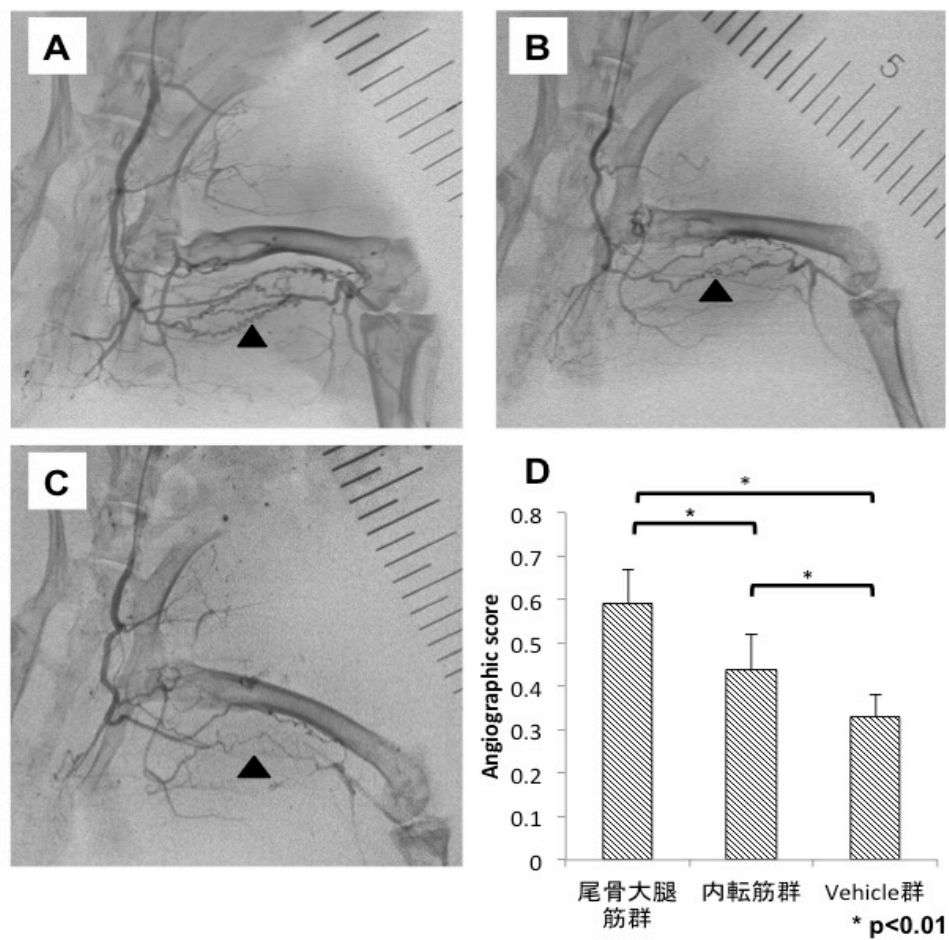


図9：血管造影と angiographic score

A：尾骨大腿筋群、B：内転筋群、C：Vehicle 群

Arrow head：発達した側副血管

4. 小括

ウサギ慢性下肢虚血モデルにおいて、自家骨髓単核球を尾骨大腿筋に選択的に投与することにより、下腿血圧比、血流量、angiographic score とともに有意に内転筋群や Vehicle 群と比較して高値であった。また血管造影でも、著明な側副血管の発達を認めた。

実験②：側副血管発達のメカニズムに関する検討

1. 目的

尾骨大腿筋へ選択的に自家骨髄単核球を投与することにより、どのように側副血管が発達するのか、そのメカニズムを対照と比較検討して明らかにする。

2. 方法

・ 組織標本の作成

ウサギ慢性下肢虚血モデルを作成後、骨髄単核球を尾骨大腿筋群、内転筋群、Vehicle 群に投与し、投与後 3 日目、7 日目、14 日目に、前述した麻酔下に腹部正中切開で腹部大動脈を露出した。腹部大動脈に順行性に挿入したカテーテルから 200ml のラクテートリンゲル液を 120mmHg で下大静脈を切開して還流させ、筋肉内に走行する血管内の血球成分を除去した。3 日目と 7 日目に回収した個体では(各群 n=5)、麻酔薬を過剰投与し犠牲死させ、各群とも左尾骨大腿筋と左内転筋を採取し、前述同様に尾骨大腿筋は等間隔に 9 分割し、その内 5 カ所(図 10、①～⑤)を凍結組織切片作製用包埋剤(O.C.T.コンパウンド ; Miles, Naparville, NJ, USA)で封入し、4 μ m で凍結切片を作製し、残りの 4 カ所(図 10、A～D)は蛋白抽出のために、液体窒素で凍結標本として-80℃で凍結保存と

した。内転筋も同様に等間隔に 5 分割し、その内 3 カ所(図 10、⑥～⑧)を凍結切片として作製し、残り 2 カ所を液体窒素で凍結保存した(図 10、E～F)。14 日目に回収した個体では(各群 n=3)、ラクテートリンゲル液の還流に引き続いて、4%パラホルムアルデヒドを 120mmHg で還流固定した。尾骨大腿筋と内転筋は、同様に各々9 分割、5 分割し、尾骨大腿筋の①～⑤と内転筋の⑥～⑧の部位をパラフィン固定とした[21]。

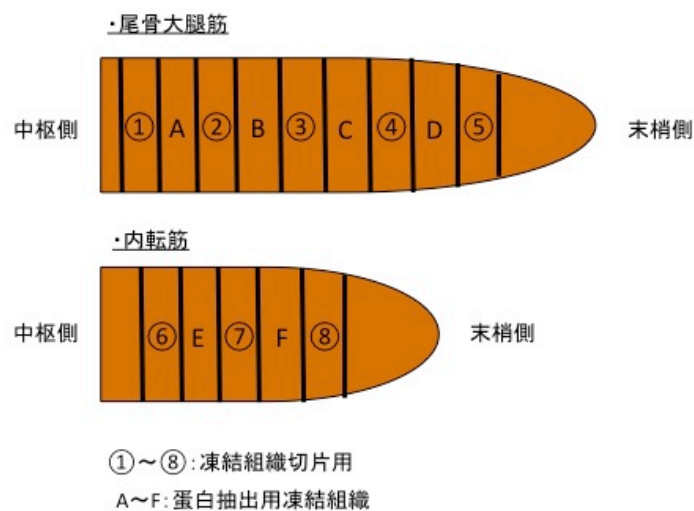


図 10：尾骨大腿筋、内転筋の切片法
尾骨大腿筋、内転筋とも等間隔に分割

・ 血管密度

尾骨大腿筋内の血管密度を計測するために、14 日目に回収した個体のパラフィン固定した組織から 4 μ m の切片を作成した。これを Hematoxylin-Eosin 染

色（HE 染色）し、光学顕微鏡で血管の数と組織切片の筋肉断面積を求めた。新たに発達した側副血管の血管径は $50\text{-}250\ \mu\text{m}$ とされており、 $50\text{-}250\ \mu\text{m}$ の径のものを発達した側副血管の指標としてカウントをした($\text{Arteries}_{50\text{-}250}$)[21,26]。筋肉の断面積は、Image J(Ver.1.42q, NIH, Bethesda, MD, USA)を用いて、筋肉の辺縁をマニュアルでトレースして求めた。また、血管径に関しては、組織切片の切る方向による径の変化をできる限り最小限にするために、直径の最も短い部分を動脈径として採用した。

血管密度は以下の計算式で算出した。

$$\text{Arteries}_{50\text{-}250} \text{ 密度}(\text{mm}^2) = \text{Arteries}_{50\text{-}250} \text{ の数} / \text{切片の断面積}$$

- ・ 免疫染色

骨髄単核球を投与後の尾骨大腿筋内に発現している血管新生関連因子を確認するために、上記で作成した 3 日目と 7 日目に回収した個体から採取した筋サンプルの $4\ \mu\text{m}$ の凍結切片を用いて、Ki-67、VEGF、線維芽細胞増殖因子レセプター-1 fibroblast growth factor receptor-1 (FGFR-1)を染色した。Ki-67 は増殖細胞のマーカーとして用い、VEGF と FGFR-1 は arteriogenesis の誘導時に

重要な役割を果たすことが知られている。アセトンで凍結切片を処理した後、10%正常ロバ血清でブロッッキングを行い、一次抗体として、抗 Ki-67 マウスモノクローナル抗体 (1:50, Dako, Glostrup, Denmark), 又は抗 VEGF マウスモノクローナル抗体 (1:50, Fitzgerald, MA, USA)、又は抗 FGFR-1 マウスモノクローナル抗体 (1:50, QED Bioscience, San Diego, CA, USA)を用いて、4°C overnight で反応させた。二次抗体は、ビオチン標識の抗マウス IgG 抗体 (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)を用いて、引き続き ABC Elite Kit (Vector Laboratories)で発色させ、蛍光顕微鏡を用いて観察した。切片の断面積は Image J を用いて前述同様に計測し、切片上の Ki-67 陽性細胞、VEGF 陽性細胞、FGFR-1 陽性血管をカウントして、以下の計算式で、密度を算出した。

$$\text{Ki-67 陽性細胞密度(/mm}^2\text{)} = \text{Ki-67 陽性細胞数/切片の断面積}$$

$$\text{VEGF 陽性細胞密度(/mm}^2\text{)} = \text{VEGF 陽性細胞数/切片の断面積}$$

$$\text{FGFR-1 陽性血管密度(/mm}^2\text{)} = \text{FGFR-1 陽性血管数/切片の断面積}$$

・ bFGF の Western blot 分析

骨髓単核球投与後の尾骨大腿筋内に発現している bFGF の発現を調べるため

に、ヘパリンビーズによる濃縮の後 western blot を行った。投与後 3 日目と 7 日目の個体から回収した 0.5g の尾骨大腿筋の筋肉凍結標本を 100 μ g/protein 毎に 1ml minimum essential medium (Invitrogen, Carlsbad, CA) で溶解し、heparin-sepharose CL-6B (GE healthcare, Uppsala, Sweden) を用いて bFGF を濃縮し、各サンプルは SDS-PAGE で分離し、ニトロセルロース膜に転写した。これに抗 bFGF モノクローナル抗体(1:500, MILLIPORE, Bedford, MA)を加え、2 次抗体として抗マウス IgG HRP 抗体を用い、ECL Plus system (GE healthcare, Uppsala, Sweden)を用いてシグナルを検出した [8,27]。

- ・ 統計解析

結果は同様に、平均±標準偏差(SD)として表記した。3 群間の多重比較検定は、Tukey-Kramer 法で行ない、 $p < 0.05$ を有意差ありと判断した。統計ソフトは、JMP 9.0.2 software (SAS Institute Inc. USA)を使用した。

3. 結果

- 血管密度

骨髄単核球投与後の尾骨大腿筋内の Arteries_{50-250} 密度の計測では、尾骨大腿筋群 ($0.25 \pm 0.11/\text{mm}^2$) は、内転筋群 ($0.08 \pm 0.03/\text{mm}^2$) や Vehicle 群 ($0.08 \pm 0.01/\text{mm}^2$) と比較して有意に高かった。内転筋群と Vehicle 群との間には有意差は認めなかった(図 11)。

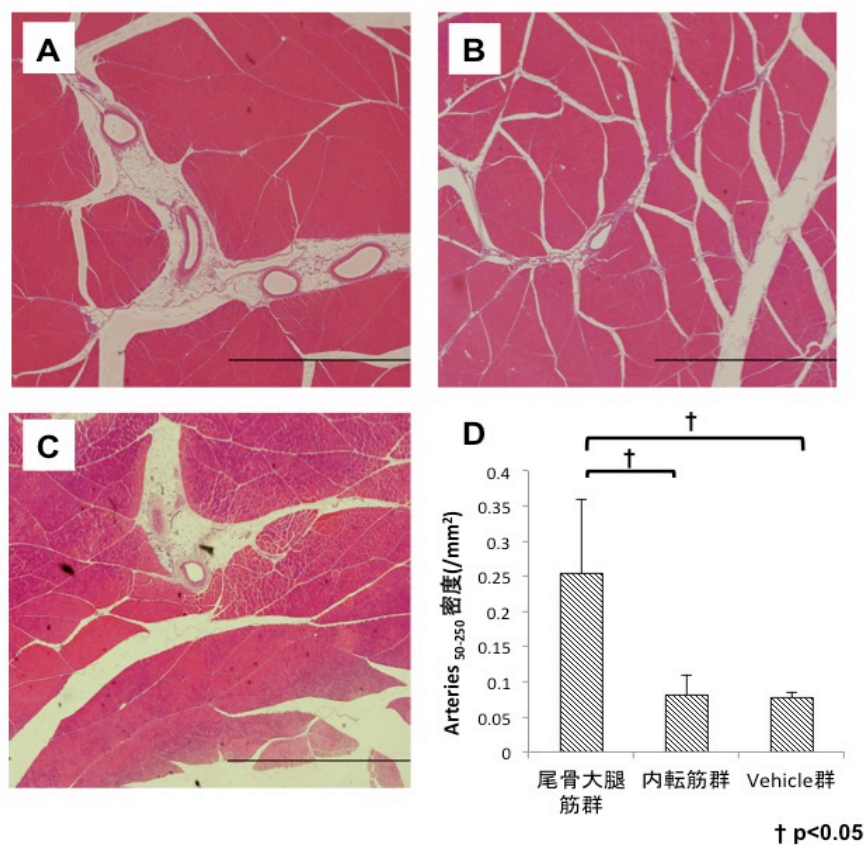


図 11：尾骨大腿筋内の血管密度

A：尾骨大腿筋群、B：内転筋群、C：Vehicle 群

Bar：200 μm

- ・ 免疫染色

a. Ki-67 陽性細胞密度

染色所見として、Ki-67 は、主に筋線維間の結合組織や血管を中心として染色されていた。

骨髄単核球投与 3 日後では、尾骨大腿筋群($3.4 \pm 0.9/\text{mm}^2$)の Ki-67 陽性細胞密度は、内転筋群($1.3 \pm 0.7/\text{mm}^2$)や Vehicle 群($1.2 \pm 0.5/\text{mm}^2$)と比較して有意に高値を示した($p < 0.01$)。内転筋群と Vehicle 群間には、有意差は認めなかった。

7 日後でも同様に、尾骨大腿筋群($3.2 \pm 1.7/\text{mm}^2$)は、内転筋群($1.3 \pm 0.7/\text{mm}^2$)や Vehicle 群($1.3 \pm 0.6/\text{mm}^2$)と比較して有意に高値を示したが($p < 0.05$)、内転筋群と Vehicle 群間には、有意差を認めなかった(図 12)。

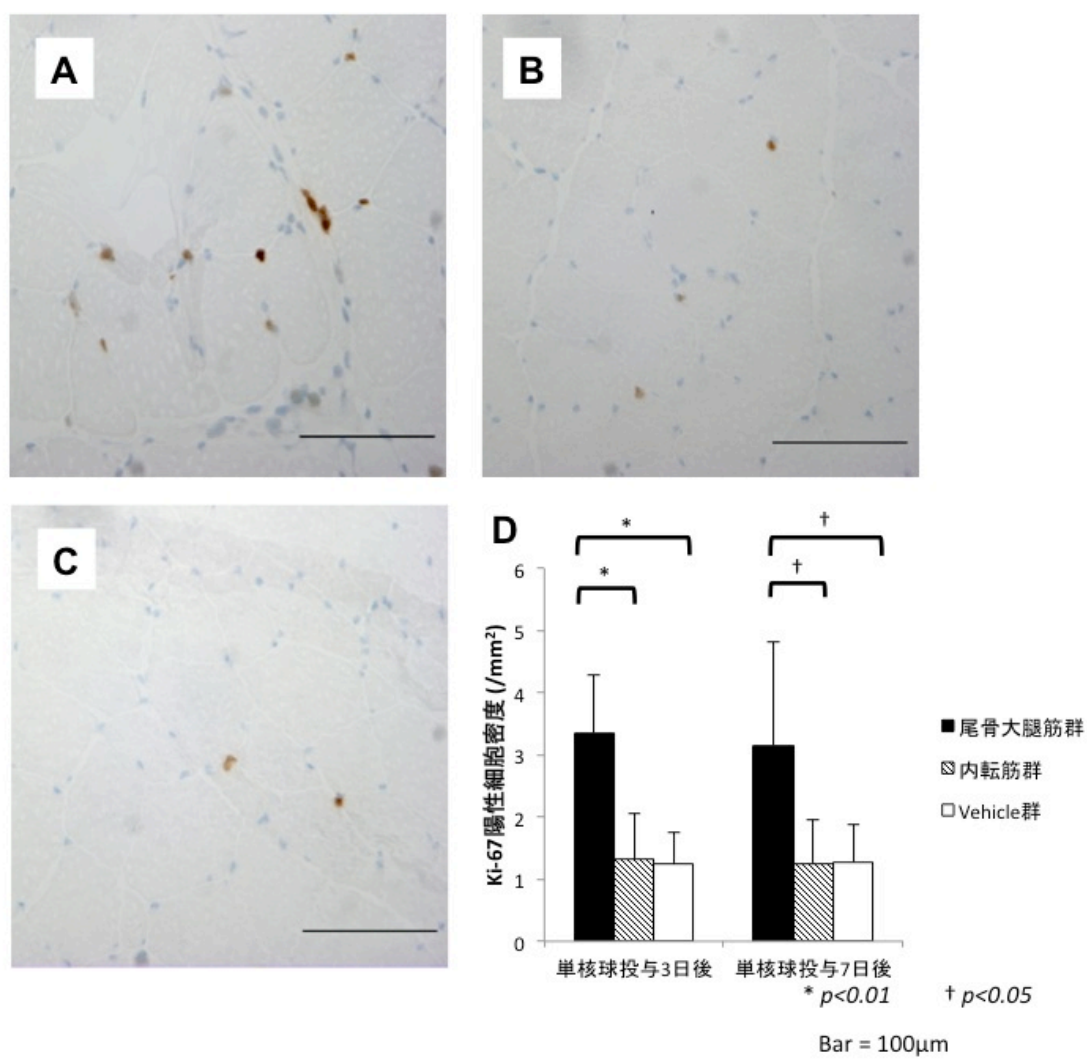


図 12：尾骨大腿筋内 Ki-67 陽性細胞密度

A：尾骨大腿筋群、B：内転筋群、C：Vehicle 群

b. VEGF 陽性細胞密度

VEGF は、主に筋線維間の結合組織や微細な血管を中心として染色されていた。

骨髄単核球投与 3 日後では、尾骨大腿筋群($21.9 \pm 5.1/\text{mm}^2$)の VEGF 陽性細胞密度は、内転筋群($14.2 \pm 3.2/\text{mm}^2$)と Vehicle 群($9.8 \pm 2.7/\text{mm}^2$)と比較して有意に高値を示した(各 $p < 0.05$, $p < 0.01$)。内転筋群と Vehicle 群間には、有意差は認めなかった。

7 日後では、尾骨大腿筋群($11.4 \pm 3.9/\text{mm}^2$)で高い傾向は認めたが、内転筋群($7.3 \pm 0.9/\text{mm}^2$)と Vehicle 群($7.3 \pm 4.7/\text{mm}^2$)の 3 群間に有意差は認めなかった(図 13)。

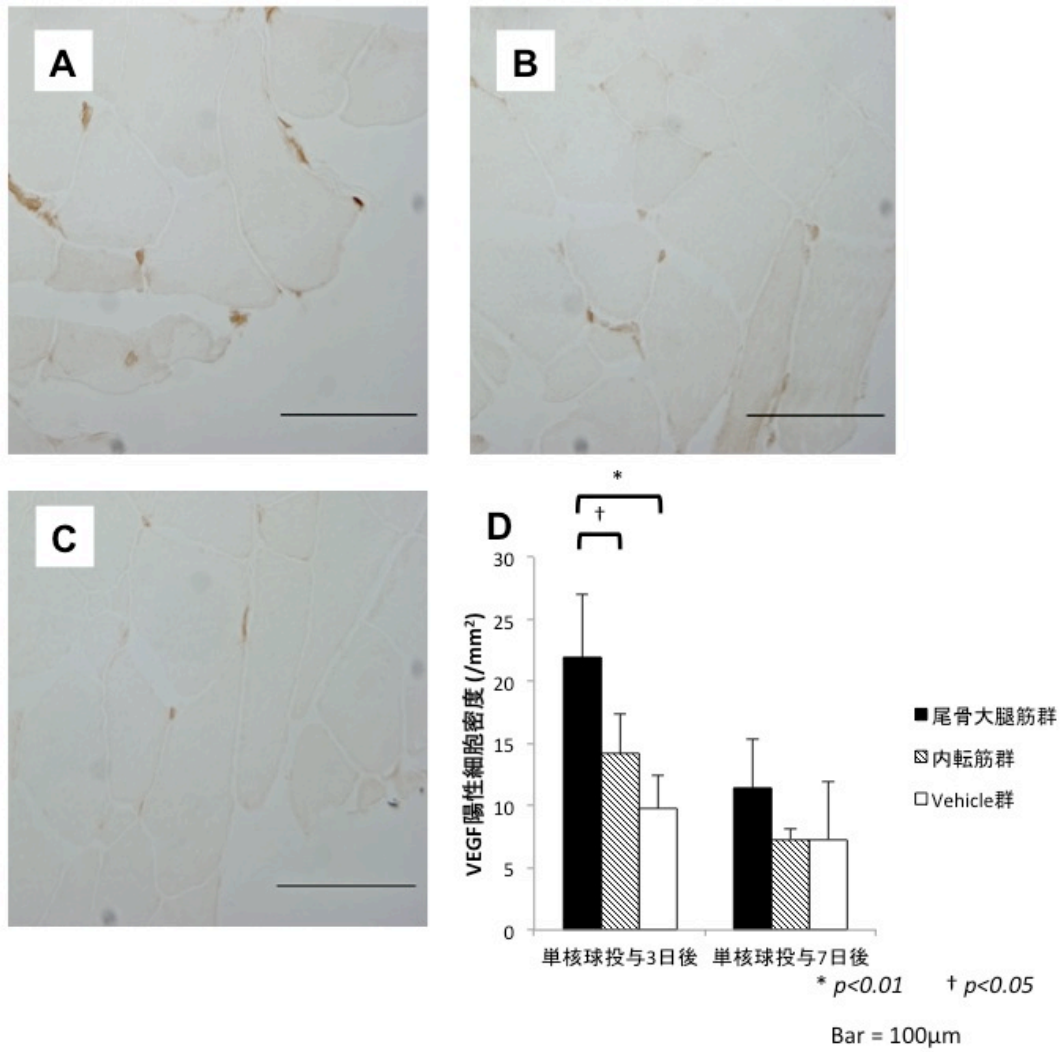


図 13 : 尾骨大腿筋内 VEGF 陽性細胞密度

A : 尾骨大腿筋群、B : 内転筋群、C : Vehicle 群

c. FGFR-1 陽性血管密度

FGFR-1 は、主に筋線維間の血管壁を中心として染色されていた。

骨髄単核球投与 3 日後では、尾骨大腿筋群($16.5 \pm 5.7/\text{mm}^2$)の FGFR-1 陽性血管密度は、内転筋群($6.4 \pm 3.7/\text{mm}^2$)や Vehicle 群($4.2 \pm 2.7/\text{mm}^2$)と比較して有意に高値を示した($p < 0.01$)。内転筋群と Vehicle 群間には、有意差は認めなかった。

7 日後でも同様に、尾骨大腿筋群($7.8 \pm 1.4/\text{mm}^2$)は、内転筋群($3.8 \pm 0.8/\text{mm}^2$)と Vehicle 群($2.7 \pm 0.3/\text{mm}^2$)と比較して有意に高値を示したが($p < 0.01$)、内転筋群と Vehicle 群間には、有意差を認めなかった(図 14)。

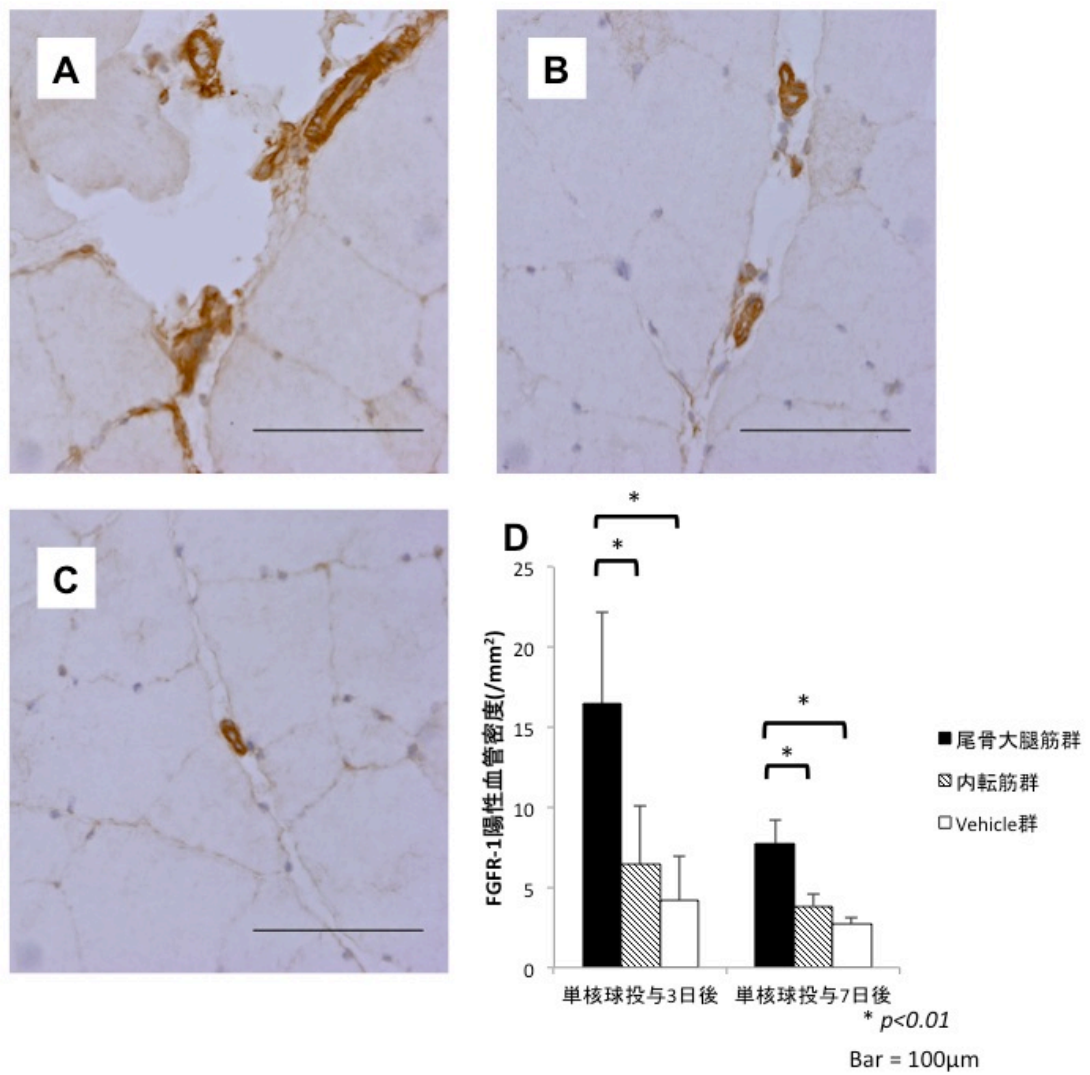


図 14：尾骨大腿筋内 FGFR-1 陽性血管密度

A：尾骨大腿筋群、B：内転筋群、C：Vehicle 群

- ・ 尾骨大腿筋における bFGF の発現

Western blot により、bFGF は 18kD と 22kD の二つのバンドを認めた。骨髄単核球投与後の尾骨大腿筋内の bFGF の発現は、3 日目は尾骨大腿筋群が内転筋群と Vehicle 群と比較して強い発現を認め、その発現は 7 日目まで認めた。また 7 日目には、中等度の bFGF の発現を内転筋群にも認めた(図 15)。

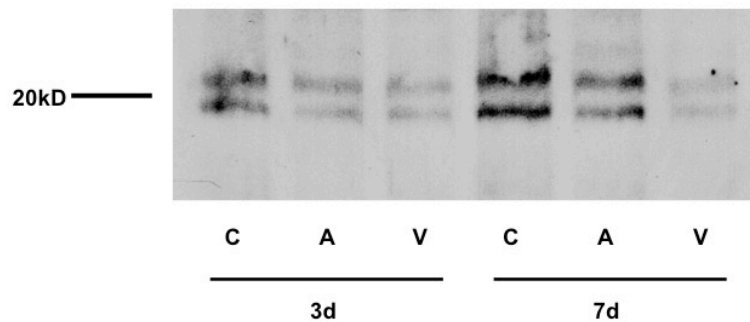


図 15：尾骨大腿筋における bFGF の発現

C：尾骨大腿筋群、A：内転筋群、V：Vehicle 群
3d：骨髄単核球投与 3 日後、7d：骨髄単核球投与 7 日後

d. 小括

ウサギ慢性下肢虚血モデルにおいて、尾骨大腿筋に選択的に自家骨髄単核球を投与することにより、側副血管の密度は有意に増加した。また免疫組織学的検討により、Ki-67、VEGF、FGFR-1 の arteriogenesis に関連した因子も尾骨大腿筋群において有意に上昇し、bFGF の強い発現を認めた。

IV. 考察

・実験モデルの発案について

本研究では、治療的血管新生療法において、「何」をデリバリーするかではなく、「何処」へデリバリーするかという、治療ターゲットに関する問題を主眼とした検討を行った。

下肢慢性虚血モデルにおいて、虚血部位への骨髄単核球投与により血管新生を誘導することが可能であるが、今回、治療ターゲットとして将来の側副血管となる細動脈ネットワークに注目した。虚血モデルにおいて側副血管に発達する可能性のある細動脈ネットワークを含む筋肉を同定し、この筋肉内に選択的に骨髄単核球を投与することにより、従来の方法よりもより効果的かつ有効な血管新生が誘導できるのではないかと推測した。

ヒトにおいて、自家骨髄単核球を採取するためには侵襲的処置が必要になる。実際、臨床の場合において自家骨髄単核球を使用するためには、腸骨から400-600ml程度の大量の骨髄採取が必要となる。これを実施するには全身麻酔もしくは脊髄麻酔が求められるため、患者負担は必然的に大きくなる[28,29]。そのため複数回にわたる骨髄採取は困難であり、限られた量で有効な血管新生

を誘導するためにも、より効果的なアウトカムを得られる投与部位の選定が重要となる。

前述したように、学位申請者の研究グループは過去の研究において、標準的なウサギの大腿動脈切除後慢性虚血モデルにおいて、側副血管が尾骨大腿筋内に発達することを明らかにしている。もともとウサギ大腿部の尾骨大腿筋は、中枢側は内腸骨動脈の分枝である後臀動脈から主な血流支配を受けており、また、末梢側は膝窩動脈からも一部血流支配がある(図 2)[21]。大腿動脈の血流が遮断されると、arteriogenesis の機転が働くことで後臀動脈と膝窩動脈間の細動脈ネットワーク(arteriolar connection)が発達し、代替ルートとして機能して末梢の虚血領域へ血流を供給することになる。しかし、arteriogenesis が十分誘導されずに側副血行路の発達が不十分であると、下腿が慢性虚血状態となる。この未発達の側副血管(細動脈ネットワーク)を含んでいる尾骨大腿筋を骨髄単核球投与の治療ターゲットとすることでより有効な血管新生ができるのではないかと考え、今回の実験を発案した。

・虚血時の **Arteriogenesis** 発生のメカニズムについて

現在、Arteriogenesis を誘導する因子として、shear stress や bFGF、monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) 等が知られている が、特に shear stress がこのプロセスを惹起する契機として重要であるとされている(図 16)[10,26,30]。虚血に対する生体の防御機構により、組織の栄養動脈が途絶えた際、元々あまり機能していなかった近傍の動脈へ細動脈ネットワークを通じて血液の再分布が起こる。この細動脈ネットワーク (arteriolar connection) への血流のシフトにより、shear stress(ずり応力)がネットワークの血管内皮細胞へ加わり、血管内皮細胞から MCP-1 が誘導される。MCP-1 により、monocyte や macrophages が血管内皮細胞周囲に遊走し、granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)、platelet-derived growth factor (PDGF)、tumor necrosis factor- α (TNF- α) などが産生され、その後、種々の growth factor が合成・分泌され、血管内皮細胞や平滑筋細胞の増殖による血管リモデリングが起こり、血管が拡大し成熟していく。この一連の arteriogenesis による変化により、細動脈ネットワークが発達し側副血行路となり、病変部の natural bypass として機能することになる(図 16)[9,12,14,15,31]。

ウサギの大腿動脈切除後慢性虚血モデルにおいては、大腿動脈切除後に後臀動脈へ血流の移動が起こることによって、後殿動脈と膝窩動脈との間の細動脈ネットワークに shear stress が加わるために、同部位に arteriogenesis が惹起されているものと考えられる。

ヒトにおいても、同様のこの反応により末梢の虚血領域に血流が供給されるわけであるが、この arteriogenesis が虚血組織の血流を代償するには不十分であるため、慢性虚血状態を惹起することとなる。治療的血管新生療法とは、この発達不十分な側副血行路を対象として arteriogenesis を強く誘導することで、より効果的な虚血の代償機転を誘導することを目的とする。

・自家骨髓単核球投与により期待される効果

骨髓には、造血幹細胞や間葉系幹細胞が存在しているが、骨髓単核球とはこれらの骨髓細胞から単核球の分画を分離したものであり、赤芽球やリンパ芽球、骨髓芽球等様々な単核細胞を含んだ総称である[32,33]。骨髓単核球を投与することにより期待される効果の一つとして、虚血部位に血管内皮前駆細胞を供給し、vasculogenesis を誘導するという報告があるが、単核球投与による

vasculogenesis の誘導は、当初の想定よりはるかに少ない程度でしか認められないことが明らかになっている[22]。もう一つの効果としては、骨髄単核球から様々な増殖因子やサイトカイン(bFGF、VEGF、HGF、PDGF、angiopoietin-1 など)が放出され、angiogenesis や arteriogenesis を誘導することが示されている。特に Tse や Francke らは、骨髄単核球による高い arteriogenesis の誘導効果を報告しており、側副血行路の発達促進を目指した本研究において、デリバリーするものとしての適性を十分に満たしていると考えられる[19,20]。

さて本研究では、shear stress を主に受ける未発達な側副血行路が走行する尾骨大腿筋に骨髄単核球を投与することで、いかに arteriogenesis を誘導し機能的な側副血行路を誘導するかに焦点を当てている。その意味で、骨髄単核球が筋肉内投与された後も遊走・拡散せずに局所に留まり、増殖因子やサイトカインを放出することが望ましい。そのため本研究では第一に、蛍光標識した骨髄単核球の尾骨大腿筋への筋注実験により単核球の mobility に関する検討をしているが、筋注後 7 日目においても尾骨大腿筋に分布し、近傍の他の筋(内転筋)への分布は認めなかった。これは単核球が筋肉注射した局所に留まり、周囲へ遊走・拡散しにくい可能性を示唆しており、単核球の筋注による選択的デリバ

リーが実効性のあるものであることを担保する所見と言えよう。

・尾骨大腿筋への選択的デリバリーの効果とメカニズムについて

側副血管の元となる細動脈ネットワークが、この実験モデルにおいて適切な治療ターゲットかどうかを検討するために、大腿動脈切除 21 日後に自家骨髄単核球を尾骨大腿筋もしくは内転筋に筋注した。前述のように、内転筋は大腿部における主要な筋肉であるが、このモデルにおいて、その主たる栄養血管である大腿深動脈は結紮処理されているため、内転筋内に存在する細動脈ネットワークは側副血行路として発達する経路とはならない。

側副血行路の発達は、下腿血圧比、内腸骨動脈血流量、血管造影で評価したが、前 2 者は下肢循環の総合的評価法として、従来からよく用いられている手法である[21,34,35]。また、arterigenesis の変化が起きて太くなった側副血行路は、血管造影で観察可能となることが多く、そのサイズは直径 50~250 μ m 程度である[21,26,36]。

結果は、下腿血圧比、内腸骨動脈血流量とも尾骨大腿筋群は、内転筋群や Vehicle 群と比較して有意に改善していた。また血管造影上、尾骨大腿筋群で著

明な側副血管の発達を観察でき、ここから算出した客観的指数である

angiographic score でも、尾骨大腿筋群は内転筋群と Vehicle 群と比較して有意に高く、血管造影の結果を裏付けた。以上より、尾骨大腿筋への骨髄単核球の投与は、側副血行路を効果的に発達させるとともに、有意に下肢血流を増加させることが明らかとなり、この所見は治療ターゲットの適切な選択が、単核球デリバリーによる治療的血管新生療法において高い治療効果をあげる上で重要であることを示している。

治療ターゲットを適切に選択することで、より効果的な側副血行路誘導が可能であった結果に基づき、次の段階としてそのメカニズムを、筋組織中の血管新生関連蛋白の発現で検討を行った。Arteriogenesis を強く誘導する血管新生因子として bFGF が知られているが、学位申請者の研究グループでもその有効性に関しては以前に報告している[21,34]。bFGF は細胞増殖促進作用において血管壁全層の細胞種への広いスペクトラムを持ち、血管内皮細胞の増殖を起こすのみではなく、中膜の平滑筋や外膜の線維芽細胞の増殖も促すため、血管全層のリモデリング機転である arteriogenesis を強力に誘導する増殖因子と認知されている[37]。骨髄単核球投与後における尾骨大腿筋内の bFGF を WB を用い

て検討したところ、単核球筋注後 3 日目、7 日目ともに尾骨大腿筋群が内転筋群や Vehicle 群と比較して bFGF が強く発現していた。そこで骨髄単核球投与後の尾骨大腿筋内における細胞増殖能を評価するために、Ki-67 の発現を調べた。Ki-67 は細胞増殖に関連した核蛋白であり、骨髄単核球投与後の細胞増殖を評価することができる。筋注後 3 日目、7 日目ともに、尾骨大腿筋群で動脈壁を中心とした Ki-67 の発現が有意に上昇しており、bFGF の集積性と一致して動脈壁における細胞増殖が誘起されていると考えられた。

一方で、bFGF は他の血管増殖因子を誘導する点でも重要である。間葉系細胞へ作用し、VEGF や HGF などの他の増殖因子を誘導されている [38,39,40]。実際、尾骨大腿筋内における VEGF 発現に関しては、単核球投与後 3 日目の免疫染色にて尾骨大腿筋群で有意に発現が上昇しており、特に血管壁及びその周囲の発現が顕著であった。もちろん、骨髄単核球から放出された他の因子が VEGF を誘導した可能性は否定できないと考えられる。VEGF は低酸素環境下で発現し、主に arteriogenesis よりも angiogenesis を誘導すると考えられているが [16,41]、学位申請者の研究グループは以前に、VEGF もしくは bFGF の単独遺伝子導入よりも、VEGF と bFGF の併用導入の方が、ウサギ慢

性虚血肢における虚血の改善効果に関して相乗効果をもたらすことを報告している[34]。同様のエビデンスは、他の研究においても報告されている[42]。VEGFは主に血管内皮細胞に特異的に作用するが、中膜・外膜には作用しないためにその新生血管は脆弱な構造となり局所的な浮腫が発生しやすいとされている[43]。一方で、bFGFは前述に示した通り、内皮細胞のみでなく中膜・外膜にも作用するため、VEGFにより発生した脆弱な新生血管の成熟を促すことにより、血流改善効果に貢献している可能性は高いと思われる(図 17) [34]。

FGFR-1はbFGFの特異的受容体であり、arteriogenesisが起こっている動脈壁にはFGFR-1が発現することが報告されている[44]。bFGFの発現と平行して、骨髓単核球の筋注後3日目、7日目ともに有意に尾骨大腿筋群でFGFR-1が発現増加しており、これによりbFGFの効果を増強していると考えられる。

一方、興味深いことには、内転筋群の下腿血圧比とangiographic scoreは、尾骨大腿筋群よりは値は低いものの、Vehicle群よりも有意に上昇しており、これは予想していなかった結果であった。前述のように、この大腿動脈切除後慢性虚血モデルでは、内転筋は基本的に側副血管が発達する可能性を持った細動脈ネットワークをほとんど内在させていないためである。蛍光標識した骨髓単

核球に移動性が見られなかったことを考慮すると、単核球を投与された内転筋内にある増殖因子やサイトカイン等が、尾骨大腿筋に拡散し作用したと考えるのが妥当と思われる。骨髓単核球筋注後7日目の Western blot において、Vehicle 群と比較し内転筋群で中等度の bFGF の発現があったことは、この結果を裏付けるものと言えよう。

・自家骨髓単核球の臨床応用の可能性

PAD に対する治療的血管新生療法では、bFGF や VEGF などの血管新生因子の投与によって虚血を改善させた報告もあるが、bFGF 投与による腎機能障害や、VEGF 投与による浮腫や非機能性血管形成(血管腫等)などの副作用の報告も少なくない[43]。一方で、骨髓単核球移植は、自家細胞移植であることに加え血液疾患等で臨床的にもすでに広く実施されており、その安全性は比較的に高いことが明らかになっている[45]。臨床にすぐに応用しやすい骨髓単核球の利用価値は高く、さらにデリバリー部位を含めてより効率的な使用法が検討されれば、その価値はさらに高まると考えられる。

本研究の結果をもとに、ヒトに対する治療的血管新生療法を実施する場合、

各症例の病態に応じた側副血行路の発達のパターンを理解することが前提となろう。PAD 患者において、下肢動脈の閉塞ないし狭窄部位に応じた側副血管の発達経路は、ある一定の傾向を認めている。例えば、浅大腿動脈に病変が存在した場合、側副血管は大腿深動脈と膝窩動脈の間に発達することが多く、この側副血管は大腿二頭筋を走行する。他の部位に病変がある場合も、血管造影所見の慎重な分析に基づいた側副血行路発達パターンの見極めにより、治療ターゲットの絞り込みは十分に可能と思われる。これらの治療ターゲットに骨髄単核球を選択的に投与することで、より効果的な側副血行路の誘導が実現できると考えられる(図 18)。

・ 研究の問題点と今後の課題

本研究で用いたウサギ慢性下肢虚血モデルは、正常血管の切除によって作成された慢性虚血モデルであり、PAD の基本的病態である動脈硬化性変化は加味されていない。従来より大腿動脈切除モデルを慢性虚血モデルとして様々な実験で使用されているが、今後、動脈硬化性変化に基づく慢性虚血モデルの作成が望まれる[2,8,21,34]。

また骨髄単核球投与に関連した解決すべき問題も残っている。投与量や投与回数、投与方法などが十分検討されていない点である。過去の報告を見ても、基本的にデリバリーする因子や細胞は単回投与がほとんどであり、またデリバリー法に関しても、本研究のような筋肉内投与以外にも動脈内投与等様々である。また、単核球を含めた細胞と血管新生因子を併用したハイブリッド療法に関してもまだ十分な報告がない。

長期的効果に関しても不明な点があるが、骨髄単核球投与に関する臨床試験である TACT trial では、少なくとも 2 年間の追跡において発癌等の有害事象はなく、虚血の改善を認めたという報告がある[10]。今後、長期的効果に関しても、さらなる検討が必要であると思われる。

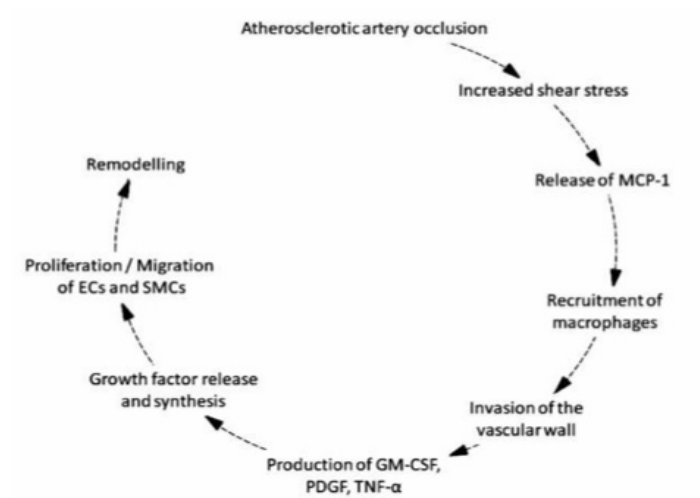


図 16 : Arteriogenesis の発生メカニズム

MCP-1; Monocyte chemoattractant protein-1, GM-CSF; Granulocyte Macrophage colony stimulating factor, PDGF;

Platelet-derived growth factor, $\text{TNF-}\alpha$; Tumor necrosis factor- α , EC; endothelial cell, SMC; smooth muscle cell

Holger Lawall, J Vasc Surg 2011

から引用

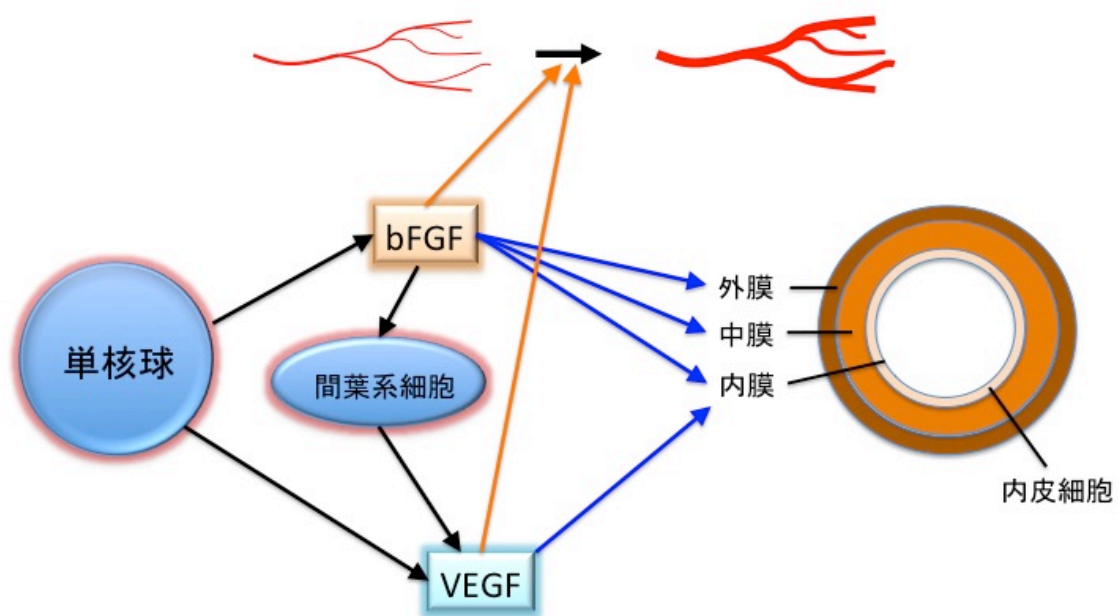


図 17：ターゲット部位での血管新生因子の挙動

骨髓単核球投与により直接的ないしは間接的に bFGF、VEGF が分泌され血管新生 (arteriogenesis) を促進する。また VEGF は主に血管内膜に作用するが、bFGF は血管壁全層に作用し、血管の成熟を促している可能性がある。

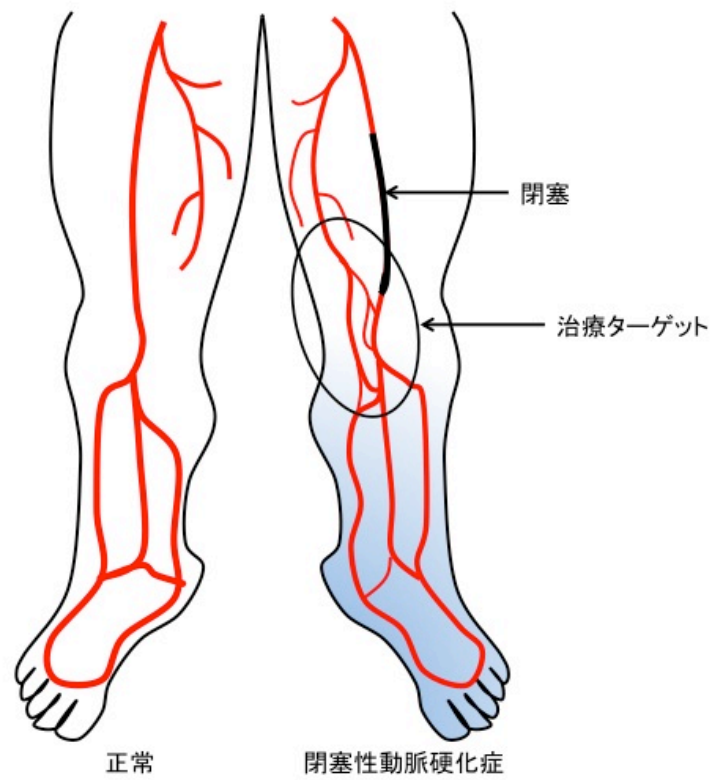


図 18：閉塞性動脈硬化症の側副血行路発達部位
浅大腿動脈閉塞時は、主に大腿深動脈と膝窩動脈間に側副血行路が発達する

V. 結論

ウサギの大腿動脈切除後の慢性下肢虚血モデルにおいて、側副血管に発達する可能性のある細動脈ネットワークが尾骨大腿筋内に存在するという知見に基づき、尾骨大腿筋に選択的に自家骨髄単核球を投与することにより、側副血管が有意に発達し、下肢の組織血流の改善を認めた。一方で近傍に存在するも、側副血管に発達し得る細動脈ネットワークを含まない内転筋への投与では十分な効果を認めなかった。

また、側副血行路発達のメカニズムの検討では、尾骨大腿筋内で bFGF や VEGF の血管新生関連因子の有意な発現を認め、側副血管発達に寄与しているものと考えられた。

側副血行路の発達パターンに基づいた治療ターゲットの選定が、治療的血管新生療法の治療効率を高めるための重要な条件の一つであることが示唆された。

VI. 今後の展望

現在、骨髄単核球の臨床応用に関しては、虚血改善効果に関するメカニズムが十分に検討されないまま人へ応用されているのが実情である。

その現状のなかで本研究は、骨髄単核球を筋肉選択的に投与することで虚血改善効果を示したのみならず、その改善のメカニズムの一部も明らかにした。

PAD 患者に対し、個々の閉塞部位に応じた側副血管の発達する可能性のある部位と、その走行する筋肉を同定できれば、今まで治療選択肢がなく下肢切断を待つのみであった患者に対しても治療効率に優れた治療的血管新生療法を実施できる可能性があり、QOL の改善へ大きく貢献するものと考ええる。

VII. 謝辞

本研究を遂行する機会及びご指導ご鞭撻を賜りました東京大学大学院医学系研究科外科学専攻腫瘍外科・血管外科 渡邊聡明教授に厚く深謝致します。

本研究を開始する機会を頂戴致し、基礎研究に従事させて頂き、終始懇切なるご指導を賜りました国際医療福祉大学教授ならびに山王メディカルセンター血管病センター・センター長 宮田哲郎先生、東京大学医学部附属病院トランスレーション・リサーチセンター 小山博之特任准教授、東京大学医学部附属病院血管外科 重松邦広先生に深謝致します。

また、本研究を遂行する上でご助言を頂きました、東京大学医学部附属病院血管外科の諸先生方におかれましても、心より厚く御礼申し上げます。

VIII. 参考文献

1. Norgren L, Hiatt WR, Dormandy JA, Nehler MR, Harris KA, Fowkes FG; TASC II Working Group. Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease (TASC II). *J Vasc Surg.* 2007;45:S5-67.
2. Takeshita S, Zheng LP, Brogi E, Kearney M, Pu LQ, Bunting S, Ferrara N, Symes JF, Isner JM. Therapeutic angiogenesis. A single intraarterial bolus of vascular endothelial growth factor augments revascularization in a rabbit ischemic hind limb model. *J Clin Invest.* 1994;93:662–70.
3. Lawall H, Bramlage P, Amann B. Stem cell and progenitor cell therapy in peripheral artery disease. A critical appraisal. *Thromb Haemost.* 2010;103:696–709.
4. Marui A, Kanematsu A, Yamahara K, Doi K, Kushibiki T, Yamamoto M, Itoh H, Ikeda T, Tabata Y, Komeda M. Simultaneous application of basic fibroblast growth factor and hepatocyte growth factor to enhance the blood vessels formation. *J Vasc Surg.* 2005;41:82–90.
5. Brenes RA, Jadowiec CC, Bear M, Hashim P, Protack CD, Li X, Lv W, Collins MJ, Dardik A. Toward a mouse model of hind limb ischemia to test therapeutic angiogenesis. *J Vasc Surg.* 2012;56:1669–79.
6. Miyamoto K, Nishigami K, Nagaya N, Akutsu K, Chiku M, Kamei M, Soma T, Miyata S, Higashi M, Tanaka R, Nakatani T, Nonogi H, Takeshita S. Unblinded pilot study of autologous transplantation of bone marrow mononuclear cells in patients with thromboangiitis obliterans.

Circulation. 2006;114:2679–84.

7. Nakamura S, Kanatani Y, Kishimoto S, Nakamura S, Ohno C, Horio T, Masanori F, Hattori H, Tanaka Y, Kiyosawa T, Maehara T, Ishihara M. Controlled release of FGF-2 using fragmin/protamine microparticles and effect on neovascularization. *J Biomed Mater Res A*. 2009;91:814–23.
8. Ohara N, Koyama H, Miyata T, Hamada H, Miyatake SI, Akimoto M, Shigematsu H. Adenovirus-mediated ex vivo gene transfer of basic fibroblast growth factor promotes collateral development in a rabbit model of hind limb ischemia. *Gene Ther*. 2001;8:837–45.
9. Schaper W, Scholz D. Factors regulating arteriogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23:1143–51.
10. Matoba S, Tatsumi T, Murohara T, Imaizumi T, Katsuda Y, Ito M, Saito Y, Uemura S, Suzuki H, Fukumoto S, Yamamoto Y, Onodera R, Teramukai S, Fukushima M, Matsubara H. Long-term clinical outcome after intramuscular implantation of bone marrow mononuclear cells (Therapeutic Angiogenesis by Cell Transplantation [TACT] trial) in patients with chronic limb ischemia. *Am Heart J*. 2008;156:1010–8.
11. van Oostrom MC, van Oostrom O, Quax PH, Verhaar MC, Hoefer IE. Insights into mechanisms behind arteriogenesis: what does the future hold? *J Leukoc Biol*. 2008;84:1379-91.
12. Planat-Benard V, Silvestre JS, Cousin B, André M, Nibbelink M, Tamarat R, Clergue M, Manneville C, Saillan-Barreau C, Duriez M, Tedgui A, Levy B, Pénicaud L, Casteilla L. Plasticity of human adipose

- lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. *Circulation*. 2004;109:656–663.
13. Schirmer SH, van Nooijen FC, Piek JJ, van Royen N. Stimulation of collateral artery growth: travelling further down the road to clinical application. *Heart*. 2009;95:191-7.
 14. Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med*. 2000;6:389–95.
 15. Schaper W. Collateral circulation: past and present. *Basic Res Cardiol*. 2009;104:5–21.
 16. Simons M. Angiogenesis: where do we stand now? *Circulation*. 2005;111:1556-66.
 17. van Royen N, Piek JJ, Buschmann I, Hoefer I, Voskuil M, Schaper W. Stimulation of arteriogenesis: a new concept for the treatment of arterial occlusive disease. *Cardiovasc Res*. 2001;49:543-53.
 18. Hosaka A, Koyama H, Kushibiki T, Tabata Y, Nishiyama N, Miyata T, Shigematsu H, Takato T, Nagawa H. Gelatin hydrogel microspheres enable pinpoint delivery of basic fibroblast growth factor for the development of functional collateral vessels. *Circulation*. 2004;110:3322-8.
 19. Tse HF, Siu CW, Zhu SG, Songyan L, Zhang QY, Lai WH, Kwong YL, Nicholls J, Lau CP. Paracrine effects of direct intramyocardial implantation of bone marrow derived cells to enhance neovascularization in chronic ischaemic myocardium. *Eur J Heart Fail*. 2007;9:747–53.

20. Francke A, Weinert S, Strasser RH, Braun-Dullaeus RC, Herold J.
Transplantation of bone marrow derived monocytes: a novel approach for
augmentation of arteriogenesis in a murine model of femoral artery
ligation. *Am J Transl Res*. 2013;5:155–69.
21. Nishiyama A, Koyama H, Miyata T, Watanabe T. Therapeutic site
selection is important for the successful development of collateral vessels.
J Vasc Surg. 2014, in press.
22. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T,
Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM. Isolation of putative
progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*. 1997;275:964–7.
23. Yuan Y, Fleming BP. A method for isolation and fluorescent labeling of
rat neutrophils for intravital microvascular studies. *Microvasc Res*.
1990;40:218–29.
24. Tsurumi Y, Takeshita S, Chen D, Kearney M, Rossow ST, Passeri J,
Horowitz JR, Symes JF, Isner JM. Direct intramuscular gene transfer of
naked DNA encoding vascular endothelial growth factor augments
collateral development and tissue perfusion. *Circulation*. 1996;94:3281–
90.
25. Bauters C, Asahara T, Zheng LP, Takeshita S, Bunting S, Ferrara N,
Symes JF, Isner JM. Physiological assessment of augmented vascularity
induced by VEGF in ischemic rabbit hindlimb. *Am J Physiol*.
1994;267:1263–71.
26. Scholz D, Ito W, Fleming I, Deindl E, Sauer A, Wiesnet M, Busse R,

- Schaper J, Schaper W. Ultrastructure and molecular histology of rabbit hind-limb collateral artery growth (arteriogenesis). *Virchows Arch.* 2000;436:257–70.
27. Kardami E, Fandrich RR. Basic fibroblast growth factor in atria and ventricles of the vertebrate heart. *J Cell Biol.* 1989;109:1865–75.
28. Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T, Ikeda U, Shintani S, Masaki H, Amano K, Kishimoto Y, Yoshimoto K, Akashi H, Shimada K, Iwasaka T, Imaizumi T. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial. *Lancet.* 2002;360:427-35.
29. Duong Van Huyen JP, Smadja DM, Bruneval P, Gaussem P, Dal-Cortivo L, Julia P, Fiessinger JN, Cavazzana-Calvo M, Aiach M, Emmerich J. Bone marrow-derived mononuclear cell therapy induces distal angiogenesis after local injection in critical leg ischemia. *Mod Pathol.* 2008;21:837-46.
30. Scholz D, Cai WJ, Schaper W. Arteriogenesis, a new concept of vascular adaptation in occlusive disease. *Angiogenesis.* 2001;4:247–57.
31. Demicheva E, Hecker M, Korff T. Stretch-induced activation of the transcription factor activator protein-1 controls monocyte chemoattractant protein-1 expression during arteriogenesis. *Circ Res.* 2008;103:477-84.
32. Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science.* 1997;276:71-4.

33. Asahara T, Takahashi T, Masuda H, Kalka C, Chen D, Iwaguro H, Inai Y, Silver M, Isner JM. VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *EMBO J*. 1999;18:3964-72.
34. Kondoh K, Koyama H, Miyata T, Takato T, Hamada H, Shigematsu H. Conduction performance of collateral vessels induced by vascular endothelial growth factor or basic fibroblast growth factor. *Cardiovasc Res*. 2004;61:132-42.
35. Lawall H, Bramlage P, Amann B. Treatment of peripheral arterial disease using stem and progenitor cell therapy. *J Vasc Surg*. 2011;53:445-53.
36. van Royen N, Hoefer I, Buschmann I, Heil M, Kostin S, Deindl E, Vogel S, Korff T, Augustin H, Bode C, Piek JJ, Schaper W. Exogenous application of transforming growth factor beta 1 stimulates arteriogenesis in the peripheral circulation. *FASEB J*. 2002;16:432-4.
37. Klagsbrun M. The fibroblast growth factor family: structural and biological properties. *Prog Growth Factor Res*. 1989;1:207-35. Review.
38. Fujii T, Yonemitsu Y, Onimaru M, Tanii M, Nakano T, Egashira K, Takehara T, Inoue M, Hasegawa M, Kuwano H, Sueishi K. Nonendothelial mesenchymal cell-derived MCP-1 is required for FGF-2-mediated therapeutic neovascularization: critical role of the inflammatory/arteriogenic pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26:2483-9.

39. Onimaru M, Yonemitsu Y, Tanii M, Nakagawa K, Masaki I, Okano S, Ishibashi H, Shirasuna K, Hasegawa M, Sueishi K. Fibroblast growth factor-2 gene transfer can stimulate hepatocyte growth factor expression irrespective of hypoxia-mediated downregulation in ischemic limbs. *Circ Res*. 2002;91:923–30.
40. Fujii T, Yonemitsu Y, Onimaru M, Inoue M, Hasegawa M, Kuwano H, Sueishi K. VEGF function for upregulation of endogenous PlGF expression during FGF-2-mediated therapeutic angiogenesis. *Atherosclerosis*. 2008;200:51–7.
41. Heil M, Eitenmüller I, Schmitz-Rixen T, Schaper W. Arteriogenesis versus angiogenesis: similarities and differences. *J Cell Mol Med*. 2006;10:45-55.
42. Asahara T, Bauters C, Zheng LP, Takeshita S, Bunting S, Ferrara N, Symes JF, Isner JM. Synergistic effect of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor on angiogenesis in vivo. *Circulation*. 1995;92:365-71
43. Yonemitsu Y, Kaneda Y, Morishita R, Nakagawa K, Nakashima Y, Sueishi K. Characterization of in vivo gene transfer into the arterial wall mediated by the Sendai virus (hemagglutinating virus of Japan) liposomes: an effective tool for the in vivo study of arterial diseases. *Lab Invest*. 1996;75:313-23.
44. Deindl E, Hoefer IE, Fernandez B, Barancik M, Heil M, Strniskova M, Schaper W. Involvement of the fibroblast growth factor system in

- adaptive and chemokine-induced arteriogenesis. *Circ Res.* 2003;92:561-8.
45. Spellberg B, Schiller GJ. Autologous bone marrow transplantation in acute leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am.* 1999;13:919-38.