

幹細胞医療応用研究チーム

Laboratory for Stem Cell Translational Research

チームリーダー 浅原孝之
ASAHARA, Takayuki

これまでの血管内皮前駆細胞 (Endothelial Progenitor Cell: EPC) の研究と成体幹細胞を用いた研究は、成体の血管形成が血管新生 (angiogenesis) と呼ばれる組織既存の血管からの血管造成だという概念を覆した。我々成体にも、胎児発生に見られるような、血管幹細胞・前駆細胞から新たな血管を創り出すメカニズムである血管発生 (vasculogenesis) が存在することが明らかになったのである。当研究チームでは、この幹細胞の研究を基礎研究と治療研究を結び付けるための translational research として展開している。現在、成体幹細胞が血管発生と共に器官再生する環境とそのメカニズムを解明し、将来的にはその過程を踏まえた具体的な治療行程の可能性を探っている。

1. 幹細胞器官再生における血管形成の重要性 (長谷川, 西村 *)

個体発生, 臓器形成, 組織再生において体性幹細胞は細胞分裂を繰り返し、やがてコロニーから組織, 臓器を形成する。当初は酸素, 二酸化炭素, 養分などの交換が単純な拡散によりなされるが、やがて限界に達する。成体マウスの脳室近傍細胞に由来する神経幹細胞は一定の密度以下で培養すると分裂を繰り返し、単一細胞由来する球状の浮遊コロニー, ニューロスフェア (neurosphere) を形成する。ニューロスフェアは神経幹細胞よりなるコロニーであるが、ほとんどのコロニーは半径がおよそ 250~300 マイクロメートルに達するとコロニーサイズの成長を停止する。この距離は生体内における拡散による物質交換の限界距離とほぼ一致する。また、サイズの増大を停止したニューロスフェアにおいては虚血組織において血管再構築を促すとされる血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor: VEGF), アンギオポイエチン-2 (angiopoietin-2: Ang-2), 血小板由来成長因子 B 鎖 (platelet derived growth factor B chain: PDGF-B) などの発現が、サイズを増大しつつある小型のニューロスフェアに比べ、増加している。このことは拡散による物質交換がサイズの増大を停止したニューロスフェアにおいては限界に達し、虚血と同等の状態に陥っていることがうかがえる。しかしながら、免疫染色にて VEGF の発現を検討してみると、その分布は最もコロニーの表面から離れた中心部に強く発現するのではなく、ニューロスフェア全体に発現している。この発現パターンは虚血により誘導される転写因子である Hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) でも同様であった。フランダース生命技術研究所の Carmeliet らも腫瘍組織における HIF-1 α の発現が必ずしも組織中心部に限局しないことを報告しているが、その機序についての結論は得られていない。

このようにコロニーが一定以上のサイズに育つには血管構造が必要に加えて、近年、胎生期に未分化な内胚葉系の細胞が肝細胞や膵島細胞に分化し、組織形成する過程で、分化に必須のシグナルを血管内皮細胞が出していることが報告された。フォックス・チェイス癌研究所の松本らは血管内皮細胞が発生しない Flk-1 knockout mouse にお

いては肝細胞への分化は認めるものの肝芽が形成されないことより、血管内皮細胞が脈管を形成するためだけではなく肝臓の発生初期段階の形態形成に必要なことを示した。ハーバード大学の Lammert らは摘出した内胚葉組織を単独で培養した結果と血管原基となる Dorsal aorta と共に共培養した結果を比較し、インスリンを産生する膵島の形成には血管内皮細胞からの Signaling が必要なことを同様に示した。これまでは組織を養うための血管を構成する細胞として必要と考えられていた血管内皮細胞が、臓器や組織への分化を制御していることは、胎生期ばかりでなく成体における幹細胞による組織再生においても重要な役割を血管内皮細胞が担う可能性を示すものである。

現在は、この血管内皮細胞系と、神経前駆細胞系の相互作用を研究することで、その重要因子の同定に努めている。

2. 血管内皮前駆細胞の再生医療応用に関する検討 (浜田, 村澤 *)

虚血性疾患に対して、末梢血から分離した未分化 (Ex vivo) での増殖, 分化の誘導を受けていない) 血管内皮前駆細胞の移植治療も実験的に試みられている。コロンビア大学の Kocher らは、G-CSF により強制動員された CD34 陽性細胞をヒト末梢血から分離して、ヌードラットの心筋虚血モデルに静脈内投与した。移植された CD34 陽性細胞は、前述した培養血管内皮前駆細胞移植と同様に、虚血心筋での neovascularization に寄与し、左室機能を改善させた。また、CD34 陽性細胞は、梗塞部周囲心筋の apoptosis も抑制したという。当研究チームでも、前臨床研究としてブタ慢性心筋虚血モデルを用いて、自家未分化血管内皮前駆細胞の心筋内移植を試み、心筋虚血の軽減効果、心機能の改善効果を確認している。

さらに理想的な応用は血管内皮前駆細胞の遺伝子治療である。虚血部位、あるいは障害動脈部位に血管内皮細胞増殖因子の遺伝子治療を施した血管内皮前駆細胞を投与することが可能である。タフツ大学の故 Jeffery Isner 教授を中心に研究された重症心虚血、下肢動脈硬化症の患者に対する遺伝子治療による血管新生療法をすでに 8 年間続けてきているが、その最大の問題点は、いかに安全に効率良く患部に遺

伝子発現できるかである。血管内皮前駆細胞による遺伝子治療は、次世代治療法として開発されつつある。当研究チームでは、培養ヒト血管内皮前駆細胞に VEGF 遺伝子をアデノウイルスベクターを用いて導入した。In vitro では、VEGF 遺伝子導入された血管内皮前駆細胞は、 β -galactosidase 遺伝子導入された血管内皮前駆細胞に比して増殖能、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞への接着能が高いことが明らかになった。マウス下肢虚血モデルを用いた in vivo でも、VEGF 遺伝子導入は、静脈内に移植された血管内皮前駆細胞の虚血部位への集積を促進し、虚血肢の血流を増加させ、組織学的な毛細血管密度も増加させた。虚血肢の壊死、脱落の頻度も、VEGF 遺伝子導入群で著明に軽減した。特筆すべきことは、移植に用いた血管内皮前駆細胞数が治療域以下であったにもかかわらず、VEGF 遺伝子導入によって高度の抗虚血効果が得られることが示された点である。

血管内皮前駆細胞への遺伝子導入は、がん治療にも応用可能である。がん移植マウスモデルに蛍光マーカーを取り込ませた血管内皮前駆細胞を投与すると、選択的にがん増殖部位に集積し、血管構造に組み込まれることが確認されている。増殖抑制あるいは細胞死誘導因子の遺伝子を組み込んだ血管内皮前駆細胞を用いた遺伝子治療が考えられている。

現在は、この血管内皮前駆細胞の効率的な採取が確立され、新しい遺伝子導入法の確立に努めている。

* 共同研究員

The emerging field of stem cell-based therapy continues to receive attention as one of the most promising frontiers of medical science. Building on previous work in which he identified bone marrow-derived endothelial progenitor cells (EPCs) and demonstrated their role in the generation of new blood vessels, Takayuki Asahara seeks to characterize adult stem and progenitor cells with even greater differentiative potential, and simultaneously to translate that research into clinically relevant advances.

Blood vessels are formed by two distinct physiological processes in the adult body. In angiogenesis, new blood vessels are generated from pre-existing, differentiated endothelial cells. Vasculogenesis, on the other hand, involves the recruitment and differentiation of previously undifferentiated EPCs at the site of new blood vessel growth. These EPCs are themselves the progeny of adult stem cells known as hemangioblasts, which can be induced to demonstrate true pluripotency under the right culture conditions. The vascularization of regenerating tissue is a critical component of the natural healing process as well as fundamental to the recovery of blood vessels that have been damaged, blocked or lost, and the ability to promote and regulate the growth of new blood vessels using EPCs will provide impetus and new areas to explore for researchers and clinicians working to develop treatments for disorders of the cardiovascular and other systems.

Stimulating EPC accumulation

Researchers in the Asahara lab found that EPCs taken from human subjects and expanded ex vivo contributed to the vascularization of the damaged limbs of mice at higher efficiencies if the limbs were first injected with a factor known as SDF-1 (stromal cell-derived factor-1), a

chemokine originally identified in mouse bone marrow and whose only known receptor is expressed in hematopoietic stem cells. The CXCR4 transmembrane receptor, present in CD34+ hematopoietic cells, shows a strong attraction to SDF-1 and is believed to help recruit stem cells to sites in need of vascular replacement or repair.

This belief was borne out by the EPC transplantation study, in which the researchers first isolated large numbers of human EPCs for transplantation into mouse models of limb ischemia - localized oxygen starvation of tissue resulting in damage to blood vessels. The transplanted human EPCs were found to improve neovascularization in the ischemic mouse limbs, as well as to reduce the secondary effects of prolonged ischemia, which include necrosis and autoamputation. The incorporation of the transplanted EPCs at ischemic sites was determined by measuring the uptake of labeled human progenitor cells in tissue sections from the SDF-1 and uninjected groups, which showed that the EPCs accumulated at nearly two times the rate in the limbs which had been injected with SDF-1 compared to that in the control group. This represents an important first proof-of-principle demonstration that the homing of EPCs to a damaged area can be augmented by an extrinsic factor.

Targeted and autologous transplantation

EPCs represent an extremely promising new mode of promoting the therapeutic growth of blood vessels, but significant obstacles must be overcome before that promise can be realized. Previous studies in rats have used quantities of EPCs that would require impracticably large supplies of peripheral blood to derive equivalent amounts of EPCs for use in humans, and the possibility of rejection of blood from non-self sources by the immune system remains another important potential barrier. Members of the Asahara team sought to address these questions by developing a system for the local, rather than systemic, transplantation of EPCs freshly isolated from the host. These studies were conducted using a swine model of myocardial (heart muscle) ischemia, from which small quantities of blood were drawn to allow the isolation and expansion of EPCs, identified by the presence of the marker molecule CD31. Catheters were used to inject similar quantities of either CD31+ or CD31- cells, or of a control solution containing no cells, directly into ischemic sites in the hearts of pigs, to test the effects of the concentrated delivery of autologous EPCs. The results showed that the targeted transplantation of CD31+ hematopoietic cells reduced ischemic damage and promoted neovascularization, resulting in improved cardiac function, while pigs receiving CD31- or control solutions experienced no such benefits. A complementary study involving the targeted transplantation of human CD34+ cells into ischemic rat hearts showed that non-autologous cells can also incorporate into damage sites and differentiate into functioning endothelial cells, even when the transplanted quantities are one-twentieth the amounts used in similar previous experiments.

Research Subjects

1. To identify post-natal pluripotent stem cells from adult tissues
2. To define cellular and molecular mechanisms of stem cell commitment into vascular lineage cells
3. To elucidate the contribution of stem cell vascular de-

velopment during organogenesis, and transfer the findings to therapeutic applications

Staff

Team Leader

Dr. Takayuki ASAHARA

Research Scientists

Dr. Tsuyoshi HAMADA

Dr. Satoshi HASEGAWA

Technical Staff

Mr. Akira OYAMADA

Ms. Kazuyo SADAMOTO

Assistants

Ms. Yumiko MASUKAWA

Visiting Members

Dr. Hiroshi AKIMARU (Cardio, Inc.)

Dr. Alev CANTAS (Ruhr Univ., Germany)

Ms. Saeko HAYASHI (Inst. Biomed. Res. Innovation)

Dr. Hirokazu HIRATA (Inst. Biomed. Res. Innovation)

Ms. Miki HORII (Inst. Biomed. Res. Innovation)

Dr. Masakazu ISHIKAWA (Inst. Biomed. Res. Innovation)

Dr. Atsuhiko KAWAMOTO (Inst. Biomed. Res. Innovation)

Dr. Hirokazu KURATA (Cardio, Inc.)

Mr. Yoshiaki MIYAMOTO (Cardio, Inc.)

Dr. Yoshinobu MURAKAMI (Inst. Biomed. Res. Innovation)

Dr. Satoshi MURASAWA (Inst. Biomed. Res. Innovation)

Ms. Shuko NAKAMORI (Inst. Biomed. Res. Innovation)

Dr. Hiromi NISHIMURA (Inst. Biomed. Res. Innovation)

Mr. Takashi SUYAMA (Cardio, Inc.)

Ms. Haruna TAKANO (Inst. Biomed. Res. Innovation)

Mr. Yusuke UEOKA (Cardio, Inc.)

Trainees

Dr. Hiroto IWASAKI (Med. Sch., Osaka City Univ.)

Dr. Tomoyuki MATSUMOTO (Med. Sch., Kobe Univ.)

誌 上 発 表 Publications

[雑誌]

(原著論文) *印は査読制度がある論文

Young H. E., Duplaa C., Romero-Ramos M., Chesselet M., Vourch P., Yost M. J., Ericson K., Terracio L., Asahara T., Masuda H., Tamura-Ninomiya S., Detmer K., Bray

R. A., Steele T. A., Hixson D., el-Kalay M., Tobin B. W., Russ R. D., Horst M. N., Floyd J. A., Henson N. L., Hawkins K. C., Groom J., Parikh A., Blake L., Bland L. J., Thompson A. J., Kirincich A., Moreau C., Hudson J., Bowyer III F. P., Lin T. J., and Black A. C.: "Adult reserve stem cells and their potential for tissue engineering", *Cell Biochem. Biophys.* **40**, 1–80 (2004). *

Ishikawa M. and Asahara T.: "Endothelial progenitor cell culture for vascular regeneration", *Stem Cells Dev.* **13**, 344–349 (2004). *

(総 説)

Asahara T. and Kawamoto A.: "Endothelial progenitor cells for postnatal vasculogenesis", *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **287**, 572–579 (2004).

Iwami Y., Masuda H., and Asahara T.: "Endothelial progenitor cells: past, state of the art, and future", *J. Cell. Mol. Med.* **8**, 488–497 (2004).

Murasawa S. and Asahara T.: "Endothelial progenitor cells for vasculogenesis", *Physiology* **20**, 36–42 (2005).

中森修子, 浅原孝之: "血管形成の分子機序", *Med. Sci. Dig.* **30**, 565–569 (2004).

Murakami Y., 川本篤彦, 浅原孝之: "血管内皮前駆細胞移植による血管再生および虚血性疾患治療", *移植* **39**, 528–533 (2004).

松本知之, 川本篤彦, 浅原孝之: "血管内皮前駆細胞を用いた血管再生", *血管医学* **5**, 539–546 (2004).

岩崎弘登, 川本篤彦, 小山田晃, 浅原孝之: "内皮前駆細胞移植による血管新生", *治療学* **38**, 1088–1093 (2004).

岩崎弘登, 川本篤彦, 浅原孝之: "血管内皮前駆細胞を用いた血管再生療法", *脈管学* **44**, 139–144 (2004).

(その他)

中辻憲夫, 浅原孝之: "ES 細胞の万能性と再生医療", *実験医学* **21**, 78–84 (2003).

[単行本・Proc.]

(その他)

Murayama T., Tepper O. M., and Asahara T.: "Murine bone marrow transplantation models that enable the study of EPC recruitment", *Methods in Endothelial Cell Biology*, edited by Augustin H. G., Springer-Verlag, Heidelberg, pp. 179–185 (2004).

口 頭 発 表 Oral Presentations

(国際会議等)

Asahara T.: "Vascular Regeneration", 30th Ann. Meet. of the European Group for Blood and Marrow Transplantation/ 20th Meet. of the EBMT Nurses Group/ 3rd Meet. of the EBMT Data Management Group (EBMT 2004), Barcelona, Spain, Mar. (2004).

Asahara T.: "Link between angiogenesis and neurogenesis: implication for development, disease and treatment", *Symp. Francqui Foundation*, Brussels, Belgium, Mar. (2004).

Asahara T.: "Endothelial progenitor cells for vascular medicine", *Cardiovascular Cell and Gene Therapy Conf. 2*, Cambridge, USA, Apr. (2004).

- Asahara T.: “The therapeutic potential of stimulated endothelial progenitor”, Angioplasty Summit 2004, (Cardio Vascular Reserch Foundation Asia), Seoul, Korea, Apr.–May (2004).
- Asahara T.: “Stem cells growth factors and angiogenesis future treatment strategies”, Vascular Biology Meet., Saar, Germany, May (2004).
- Asahara T.: “Vascular stem cell/ cell transdifferentiation”, 13th Int. Vascular Biology Meet., Toronto, Canada, June (2004).
- Asahara T.: “Stem cell biology for vascular regeneration”, 18th World Congr. of Int. Soc. for Heart Research (ISHR 2004 World Congress), Brisbane, Australia, Aug. (2004).
- Asahara T.: “Circulating endothelial cells in vascular repair”, 2004 Grover Conf. on the Pulmonary Circulation, (The American Heart Association), Sedalia, USA, Sept. (2004).
- Asahara T.: “Endothelial progenitor cell biology and therapeutic regeneration”, Basic Concepts and Innovative Strategies in Heart Disease, Capri, Italy, Oct. (2004).
- Asahara T.: “Application of hematopoietic stem cells for therapy for cardiovascular diseases”, ISN Forefronts in Nephrology: Stem Cell and Regeneration of the Kidney, Karuizawa, Jan. (2005).
- (国内会議)
- 浅原孝之: “幹細胞生物学の血管医学への応用”, 第 104 回日本外科学会定期学術集会, 大阪, 4 月 (2004).
- 浅原孝之: “血管再生治療の現状”, 第 25 回日本炎症・再生医学会, 東京, 7 月 (2004).
- 浅原孝之: “Endothelial precursor cells”, Ernest Shering Foundation + RIKEN Symp., 神戸, 10 月 (2004).