

アジアロエリスロポエチンの血管新生作用に関する研究

皆川 史郎

新潟大学大学院医歯学総合研究科循環器学分野

(主任：相澤義房教授)

Asialo - erythropoietin, A Non - hematopoietic Analogue of Erythropoietin, Revealed Strong Angiogenic Effect in Mice

Shiro MINAGAWA

Division of Cardiology, Niigata University

Graduate School of Medical and Dental Sciences

(Director: Prof. Yoshifusa Aizawa)

要 旨

【背景】 閉塞性動脈硬化症や心筋梗塞などの慢性臓器虚血に対して自己骨髄細胞移植 (BMI) 等による血管新生治療が試みられ一定の効果が示されているが、重症下肢虚血患者に対する効果は不十分である。我々は治療効果を改善する目的で BMI による血管新生の機序を明らかにする過程で、赤血球系造血因子のエリスロポエチン (EPO) に血管新生作用があることを見いだしたが、その作用は十分に大きいとは言えず、また EPO 本来の造血作用による多血症等の副作用を来す。そこで EPO 代謝産物の 1 つであるアジアロ EPO (AsEPO) に着目し、血管新生治療への応用の可能性を探った。

【方法】 8 週齢の ICR マウスを用い、大腿動脈起始部の結紮により下肢虚血を作成した。同系マウス的大腿骨より骨髄を採取し、マウス 1 虚血下肢あたり 1×10^7 の骨髄有核細胞を 4 カ所にわけて筋肉内投与した。また 1 虚血下肢あたり 400 IU/kgBW の EPO または AsEPO の単独又は同時投与を行った。下肢の壊死脱落をマーカーに下肢の生存曲線を比較した (各群 N = 13)。また虚血作成 6 日後の下肢でレーザードップラーによる血流の測定を行い、さらに大腿二頭筋標本作製し血管の数を測定し比較した (各群 N = 5 - 7)。健常マウスに 40, 400, または 4,000 IU/kgBW の EPO または AsEPO の単独投与を行い、造血作用を比較した。

【結果】 ① AsEPO は EPO と比較して、単独投与でも BMI との併用でも、下肢の生存・血流の改善・血管数において有意な増加を示した (血管新生作用で約 20 倍)。② 造血作用に関しては、EPO は既知の赤血球造血活性を示したが、AsEPO は 4,000 IU/kgBW の超高容量の投与によっても赤血球造血活性を示さなかった (造血活性比で 1/100 以下)。

【結論】 AsEPO は強い血管新生作用を示すと同時に、副作用としての赤血球造血活性が極めて低いことが示された。AsEPO は体内に存在する生理的物質であることから、血管再生療法における実用化に大きな期待が持てることが示された。

キーワード：再生医療, 血管新生, 下肢虚血モデル, エリスロポエチン, アシアロエリスロポエチン

Reprint requests to: Shiro MINAGAWA
Division of Cardiology Niigata University
Graduate School of Medical and Dental Sciences
1 - 757 Asahimachi - dori,
Niigata 951 - 8510 Japan

別刷請求先：〒951 - 8510 新潟市旭町通 1 - 757
新潟大学大学院医歯学総合研究科 循環器学分野
皆川 史郎

緒 言

再生医療に関する研究が盛んに行われているが、臨床応用に関しては血管再生の分野が先行している¹⁾。本施設も2001年12月を第一例目として慢性閉塞性動脈硬化症およびビュルガー病患者の虚血四肢への自家骨髄細胞移植 (BMI) を開始した。本治療は8割以上の患者に有効で、治療効果としては虚血性四肢潰瘍の改善、疼痛の軽減、無痛性歩行距離の延長などを認め、当初は画期的な治療として認識された。しかしながら症例の中には、本治療後も血流量の改善が小さく、臨床的治療効果およびQOLの改善も必ずしも十分とはいえない例が少なからず存在することが次第に明らかとなってきた。我々はこれを改善する目的で一連の基礎研究をおこない、BMIの作用機序を明らかにしたが²⁾、これら研究の中でエリスロポエチン (EPO) の生理的誘導体の1つであるアジアロEPO (AsEPO) の血管新生作用と治療薬としての有用性をマウスで検討した。

EPOは家兎に *in vivo* で赤血球を増加させる活性として認識され、宮家が再生不良性貧血患者の尿から精製したEPO標品³⁾のアミノ酸シーケンスをもとにクローニングされた⁴⁾。EPOは *in vivo* および *in vitro* で赤血球造血を誘導する、赤血球造血におけるもっとも重要なサイトカインである。EPOは165のアミノ酸残基がC末端近傍とN末端近傍の間でS-S結合をした球状糖タンパクで、3つのN型糖鎖と1つのO型糖鎖を有する。4つの糖鎖の末端はいずれもシアル酸で終止するが、体内および試験管内でいわば分子老化としてシアル酸が徐々に脱落してガラクトースが露出したAsEPOに変化する。体内のAsEPOは肝に発現しているガラクトース受容体によって代謝されるため、血中からすみやかに消失する。またEPOは中性ではシアル酸によって負に荷電しており、同じく負に荷電したEPO受容体と相互に反発するが、AsEPOはガラクトースによって正に荷電しているためEPO受容体との親和性が非常に高い⁵⁾。そのため高い血管新生作用と低い赤血球造血作用を示すことが予測される。

血管内皮や心筋はEPO受容体を発現しており、EPOは血管内皮や心筋の保護作用を有することから⁶⁾⁷⁾、EPOの直接作用が期待される。

実験動物と方法

マウス下肢虚血の作成

チャールスリバー (Yokohama, Japan) より雄8週齢のICRマウス (30-35g) を購入し実験に用いた。すべての実験手順はGuide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH publication No.86-23; National Institute of Health, Bethesda, MD) に基づき無菌的に行われた。マウスをケタミン (60mg/kg BW) およびキシラジン (6 mg/kg BW) の腹腔内投与により麻酔した。Isnerの方法に準じ左下肢の中間部に皮膚切開を加え、血管を露出した⁸⁾。大腿動脈起始部を結紮ののちその末梢の伏在動脈を結紮し、その他の側枝を剥離して本管とともに切除した。

骨髄細胞移植と虚血下肢の評価

同系のマウスを前記麻酔薬の致死量投与にて屠殺ののち、両側大腿骨より骨髄を採取した。骨髄をRPMI1640メディウムにて洗浄後、 1×10^7 コの細胞を同メディウム0.2 mlに再浮遊させ、虚血作成1時間以内に虚血部位に0.05mlずつ4カ所に分けて23G針と1mlシリンジを用いて筋肉内投与した (BMI: B群)。BMIのかわりにメディウム0.2 mlを使用したものをコントロールとした (C群)。rhEPO および rhAsEPO (いずれも中外製薬より供与) は一回投与量が400 IU/kg BWとなるように同メディウム0.2 mlに希釈して用いた。EPOまたはAsEPO併用BMIは、 1×10^7 個の骨髄細胞をEPOまたはAsEPO (400 IU/kg BW) を含む同メディウム0.2 mlに浮遊して筋肉内投与し、さらに24・48・72・96・120時間後にEPOまたはAsEPOのみの筋注を行った (BE群およびBA群)。またBMIのかわりにEPOまたはAsEPOのみの筋注を行い、さらに24・48・72・96・120時間後にEPOまたはAsEPOのみの筋注を行った (E群およびA群)。

下肢のチアノーゼからの回復および壊死脱落を肉眼的マーカーとして4週間観察した(C, E, A, B, BE, BA各群 n = 13). 虚血下肢の部分壊死脱落および全部壊死脱落をもって下肢の死亡と定義した. また虚血作成6日後に下肢血流測定を目的にレーザードップラー moorLDI (Moor Instruments, Wilmington, Delaware) を用いてイメージを取り込み (C群 n = 12, E群 n = 5, A群 n = 10, B群 n = 7, BE群 n = 5, BA群 n = 6), その後屠殺して大腿二頭筋を摘出し, OCTコンパウンド (Sakura Finetechnical, Tokyo, Japan) に包埋し液体窒素で凍結し -80°Cで保存して組織標本の作製に用いた. レーザードップラーで取り込まれたデータは, moorLDI解析ソフトによって両側下肢Fluxを測定し, 虚血作成した左下肢Fluxの健側右下肢Fluxに対する比を虚血下肢血流の代表値として用いた.

標本の作製・染色および画像解析

凍結標本から厚さ6 μ mの連続切片作成後シリコンコーティングしたスライドガラス (Matsunami Glass, Osaka, Japan) に貼付し, 風乾後アセトンで10分間固定した. 内因性ペルオキシダーゼを阻害したのちラット抗マウスCD31モノクローナル抗体 (Research Diagnostics, Flanders, NJ) およびワサビペルオキシダーゼ化ヤギ抗ラット二次抗体 (Amersham) と反応後, DABで発色した. 核染色にヘマトキシリンを用いた. 標本の状態が良好で解析を行えた個体数は, C群10個体, E群5個体, A群10個体, B群5個体, BE群6個体, BA群6個体であった. 顕微鏡はOlympus BX60 (Olympus, Tokyo, Japan) を用いて100倍で観察し, Olympus TVシステムDP50を用いてデジタル画像を作成した. 筋組織2.4 mm²から1,550 pixel/mmでRGB画像を作成し, Mac SCOPE (Mitani, Fukui, Japan) を用いて画像処理を行った. 茶色のドットを抽出することでCD31陽性の血管内皮の画像を得て, 2階調化ののちに血管の総数を測定した. 4 pixel²以下のdot clusterはノイズとして削除した. 同じ画像から目視にて筋線維数の計数を行い, 血管総数/筋線維数を血管数

の代表値とした.

造血作用の評価

健常マウスを用いて検討した (7群各8個体, 計56個体). EPOまたはAsEPOは一回投与量が40, 400, または4,000 IU/kg BWとなるようにメディウム0.2 mlに希釈して用いた. 0・24・48・72・96・120時間後の合計6回投与した. EPOを含有しないメディウムのみを6日間投与したものをコントロールとした. 11日目に致死的麻酔下のもとに右心房よりヘパリン加採血し, 死亡を確認したのちに脾臓の重量を測定した. Hb値 (g/dl) およびHct値 (%) は自動血球カウンター (Sysmex F-820) を用いて測定した. 網状赤血球比率 (Ret %) は既報のチアゾールオレンジ法の変法を用いフローサイトメーター (FACScan, B.D. 社) で測定した⁹⁾.

統計

各群の測定値は mean \pm SD で表記し, 多群間の比較 (ANOVA) はFisher法により差の検定を行い, p < 0.05をもって有意とした. 下肢の生存はKaplan-Meier法によって生存曲線を作成し, Wilcoxon試験によって生存率の差の検定を行った.

結 果

下肢の回復および脱落壊死

6群78個体のうちBA群の5個体を除く73個体に虚血作成1日後に下肢全体にわたるチアノーゼが観察された. 一部の個体でチアノーゼからの回復がみられ, 他は下肢の一部または全体の壊死脱落を来した (図1). C群では7日目までに12個体 (92.3%) で脱落壊死が見られ, 1個体は16日目にチアノーゼから回復した. E群では16日目までに12個体 (92.3%) で脱落壊死が見られ, 1個体は16日目にチアノーゼから回復した. A群では10日目までに8個体 (61.5%) で脱落壊死が見られ, 5個体は22日目までにチアノーゼから回復した. 生存曲線の差の検定ではこの3群の全

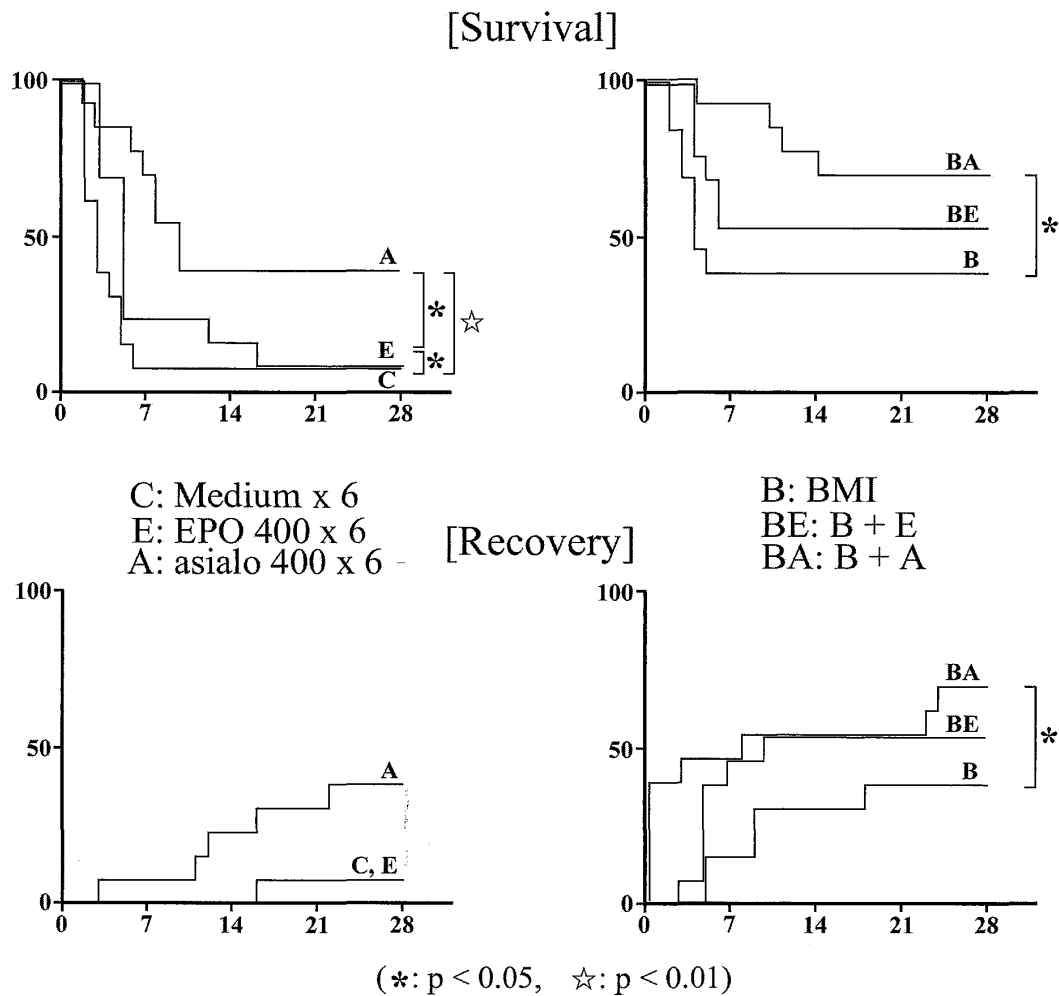


図1 マウス下肢虚血モデルにおける下肢の生存曲線（上段）およびチアノーゼからの回復曲線（下段）

EPOまたはAsEPO投与による単独治療の効果（左）と、BMIに併用した治療の効果（右）を分けて示す。EPO単独（E群）では無治療群（C）と根本的な違いが見られないが、AsEPO単独（A群）ではBMI治療群（B群）に匹敵する効果が見られた。BMI単独治療に比しEPO併用BMI（BE群）では早期にチアノーゼからの回復が見られたが、AsEPO併用BMI（BA群）ではチアノーゼに陥らない個体が5つあり、また他の8個体のうち4つがその後にチアノーゼから回復し、最終的にはわずか4個体のみが壊死に陥った。

との間で有意差が見られた。

B群では5日目までに8個体（61.5%）で脱落壊死が見られ、5個体は18日目までにチアノーゼから回復した。BE群では6日目までに6個体（46.2%）で脱落壊死が見られ、7個体は10日目までにチアノーゼから回復した。BA群では14日

目までに4個体（30.8%）で脱落壊死が見られ、5個体はチアノーゼを示さず、チアノーゼに陥った8個体のうち4個体は24日目までにチアノーゼから回復し、回復の見られなかった数はわずか4個体であった。生存曲線および回復曲線でB群とBA群の間に有意差が見られた。

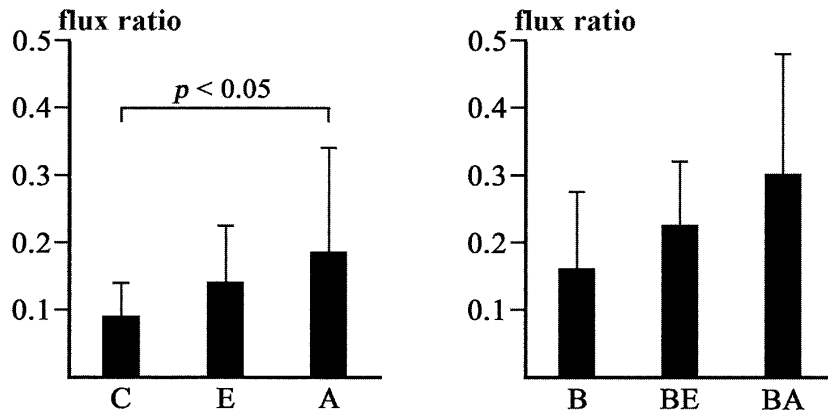


図2 下肢虚血作成6日後のレーザードップラーによる血流分布
単独治療においても、あるいはBMI併用治療においても自然型EPOに対するAsEPOの優位性が観察された。各群の説明は図1を参照。

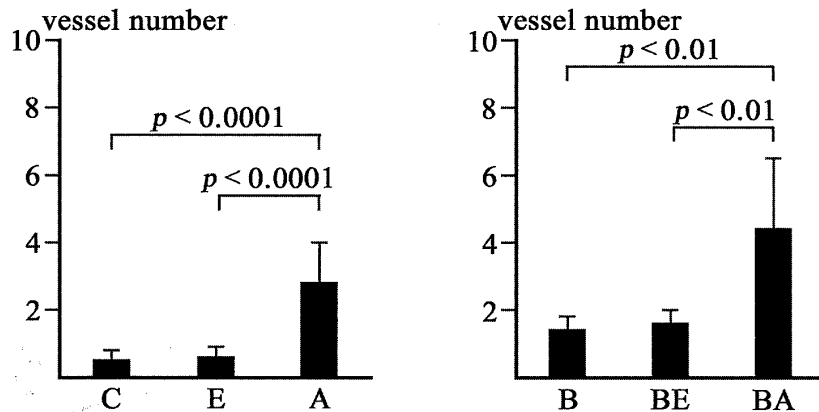


図3 下肢虚血作成6日後の虚血大腿筋組織における筋線維数に対する血管の相対数を示す
単独治療においても、あるいはBMI併用治療においても自然型EPOに対するAsEPOの圧倒的な優位性が観察された。AsEPO単独投与で見られた新生血管の数はBMIによる血管数の約2倍であった。各群の説明は図1を参照。

レーザードップラーによる血流の評価

下肢虚血作成6日後にレーザードップラーによってflux比を測定した(図2)。単独治療のflux比は、C群：0.087 ± 0.045, E群：0.141 ± 0.082, A群：0.187 ± 0.154で、C群とA群の間に有意差が見られた。BMI併用治療では、B群：0.159 ± 0.116, BE群：0.227 ± 0.095, BA群：

0.299 ± 0.178で、3群間に有意差が見られなかったが、無治療のC群と比較するとBE群(p = 0.0311)およびBA群(0.0009)では有意な血流増加が認められた。

組織標本での血管の観察

下肢虚血作成6日後にレーザードップラー測定

後作成した大腿二頭筋組織のうち良好な組織標本の得られたもので観察し、骨格筋線維1本あたりの血管数を比較した(図3)。単独治療の結果は、C群：0.50 ± 0.34, E群：0.61 ± 0.32, A群：2.83 ± 1.13で、A群で有意に多数の血管が観察された。BMI併用の結果は、B群：1.43 ± 0.38, BE群：1.64 ± 0.32, BA群：4.45 ± 2.02で、やはりAsEPOに強い血管新生効果が観察された。

赤血球造血作用

EPOまたはAsEPO投与開始後11日目のHb値・Hct値・Ret値および脾重量を図4に示す。EPOでは用量依存性の多血症が観察されたが、AsEPOでは4,000 IU/kgの6日間投与でも多血症は見られず、造血活性は自然型EPOの1/100ないしそれ以下であると推測された。なお、腎性貧血等に対し臨床で用いられる自然型EPOの一回投与の最大使用量は200 IU/kg(12,000 IU/body)であり最大で週一回投与とされるが、AsEPO 4,000 IU/kgの6日間連日投与でも造血が見られなかった。

考 察

血管の発生と発育

血管形成は新たに血管が形成されるVasculogenesis(血管の発生)と、既存の血管が発芽などによって伸長・分岐するAngiogenesis(血管の発育)の2段階で行われる¹⁰⁾。以前は出生後の創傷の治癒過程・悪性腫瘍・子宮粘膜などで見られる血管増殖にはAngiogenesisと同時にVasculogenesisが重要な役割を果たしていると考えられていた。血管再生治療ではBMIが最も一般的に行われているが、これは骨髄中に多量に含まれている血管内皮前駆細胞(EPC)からのVasculogenesisを期待したものである¹¹⁾。しかしながら実際に虚血局所や創傷の治癒で見られる血管増殖は主にangiogenesisによることがわかってきたために¹²⁾、BMIによる血管増殖の機序は不明となった。

血管再生治療の概要

血管治療の戦略にはBMIを代表とする「細胞療法」と、サイトカインの遺伝子またはサイトカインそのものを患者体内に投与する「サイトカイン治療」の2つの大きな流れがある¹³⁾。VEGFを用いた遺伝子治療は小規模phase-I trialで成功をおさめたが¹⁴⁾、その後おこなわれたrandomized placebo-controlled trialでの結果では無効とされた¹⁵⁾。FGF-2タンパクを用いた大規模試験では有効であったとするものと無効であったというものがあり評価が分かれているが、いずれにせよ有意差が出るか出ないかというレベルの効果と言える¹⁶⁾¹⁷⁾。HGFを用いた遺伝子治療は少数例の検討で今のところ有効とされているが、強い血管新生を誘導する画期的な治療薬としては限界がある¹⁸⁾。いずれの治療も効果が不十分であることから、我々はBMIの作用機序を明らかにすることから研究を開始した。

骨髄細胞移植による血管新生の機序

骨髄造血と骨髄内血管の再構築には密接な関わりがある。造血幹細胞は低酸素状態のニッチに存在し、増殖と分化ののちに成熟血球として末梢へ動員される。成熟白血球は遊走能を有するが、遊走能を持たない赤血球系細胞が末梢血管内へ移動するためにはサイトカイン分泌等を介して新生血管を赤芽球コロニーへ誘導する必要があることが容易に推測される。実際にBMIによる血管新生効果は、この赤芽球の血管誘導作用をもたらしている結果であると推論しこれを証明した²⁾。この研究のなかで、EPOには赤芽球を髄外で生存させることで血管新生を促進させる間接効果(BMIに対する併用効果)があることが確認された。またEPO単独の直接作用としてのin vitroでの血管新生効果も観察されたが、その活性は造血作用に比して著しく弱かった。EPOの直接作用として心筋細胞に対する抗細胞死効果があることも示した⁶⁾。実際にEPO受容体は造血細胞の他に中枢神経・心筋・血管に発現しており、増殖因子・生存因子として働いている¹⁹⁾。造血細胞ではEPO受容体のホモ二量体が発現していて、低濃度の

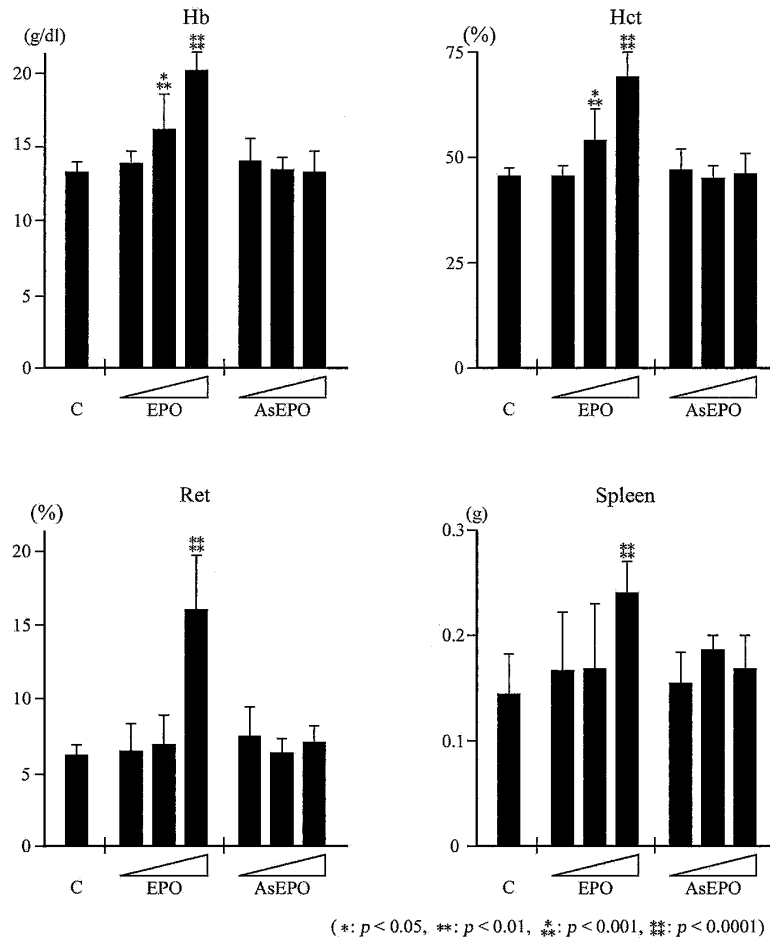


図4 EPOおよびAsEPOの赤血球造血作用

健常マウスに40, 400または4,000 IU/kgのEPOまたはAsEPOを6日間連日投与し, 11日目にHb (g/dl), Hct (%), 網赤血球比率 (Ret %) および脾重量 (g) を測定した。C群はEPOを含まないメディウムを6日間連日投与したもの。EPO投与によって用量依存性の赤血球造血作用が観察されたが, AsEPOにはこの投与量では造血作用が見られなかった。自然型EPOに対するAsEPOの造血作用は1/100もしくはそれ以下と推測される。なお, 齧歯類では骨髓造血のほかに脾造血が見られる。

EPOに対しendocrine的に作用するが, 他の細胞種ではEPO受容体/CD131ヘテロ二量体が発現していて高濃度EPOに対してparacrine的に作用する²⁰⁾。従ってEPOの副作用としての多血症を誘発することなく血管新生を誘導することは本来困難なことであるが, 緒言に述べた理由によってAsEPOに注目し, 製薬会社と共同で血管新生治

療薬としてのAsEPOを開発した。

今回の研究で明らかのように, AsEPOには常用量もしくはその数10倍量でも造血活性が見られず, またBMIに匹敵する血管新生効果が見られた。AsEPOは体内に存在する生理的な物質であるため, 臨床応用における安全性に期待がもてる。BMIの実験に用いた骨髓は健康な個体由来

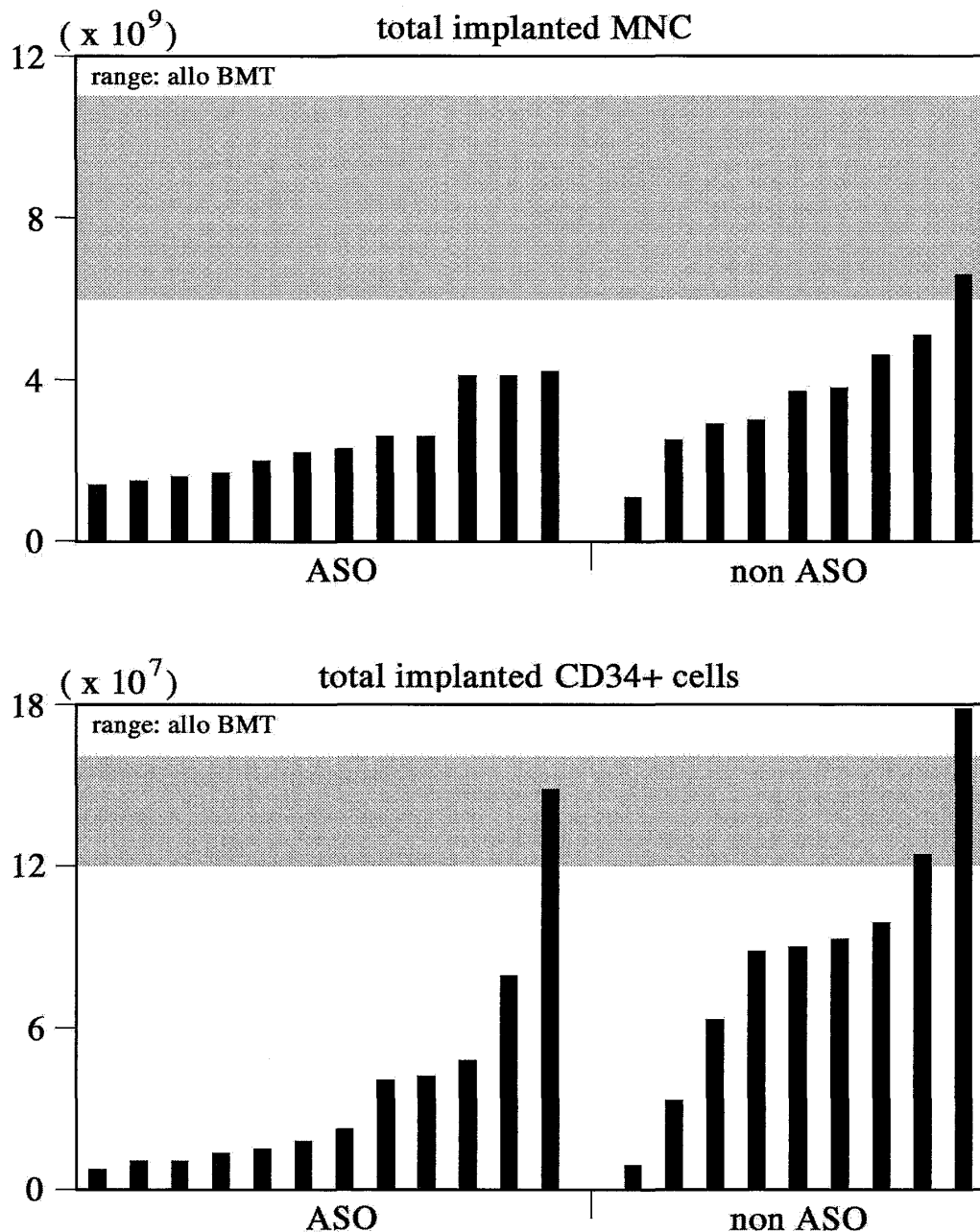


図5 実際の臨床症例における移植骨髓細胞数

閉塞性動脈硬化症 (ASO) の 12 例と Burger 病等の非 ASO の 9 例において、実際に移植された 600 mL の自己骨髓に含まれていた総単核細胞数 (上段) および総 CD34 陽性細胞数 (下段) を示す。比較のため、健康人 (白血病治療の骨髓移植ドナー: allo BMT) の骨髓 600 mL に含まれる細胞数を灰色帯で示す。下肢虚血患者の多くで骨髓の低形成が認められる。但し CD34 陽性細胞数の測定には複数の方法があるためデータにばらつきが生じる。いずれも腸骨から採取した骨髓であるので、実際の CD34 陽性細胞数は総細胞数 (上段) の 1% と考えてよい。

するものであるが、実際の臨床で移植される患者自己骨髄は原疾患の影響を受けて著しく低形成である場合が多い(図5)。この様な移植される骨髄細胞の“数と質”も実臨床におけるBMIの治療効果に影響していると考えられ、実際に我々の症例解析では、移植されたCD34陽性細胞数と移植後の血流回復の間に相関がみられた²¹⁾。一方では、全身性末梢性動脈血流障害の程度が強いほど骨髄も低形成である印象が強く、また重症例ほどBMI治療の効果が低いことを考え合わせると、CD34陽性細胞数は単に血流障害の程度を敏感に反映している可能性も否定できない。とはいえ、我々のこれまでの研究から²⁾、BMIによる血管新生効果は主に移植骨髄中に含まれている未熟赤芽球が分泌する複数の血管増殖因子に由来し、また未熟赤芽球数とCD34陽性細胞数が正比例することから、CD34陽性細胞数が移植骨髄の質を反映する良い指標になると思われる。

結 論

EPO誘導体の1つであるAsEPOは造血活性を欠き、単独でBMIに匹敵する血管新生作用を示した。AsEPOは生体内に存在する生理的物質であることから、血管新生における治療薬として有望である。

謝 辞

最後に、本研究においてご指導を賜りました新潟大学大学院医歯学総合研究科の相澤義房教授、鳥羽 健講師、加藤公則助手、及び共同研究を行った西川 尚先生、小澤拓也先生、五十嵐 登先生、小田雅人先生、本学第二病理学教室内藤 眞教授、長谷川 剛講師、青山 崇技官に深謝します。

参 考 文 献

- 1) 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 and Imaizumi T: Therapeutic Angiogenesis using Cell Transplantation (TACT) Study Investigators: 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.
- 2) Ozawa T, Toba K, Kato K, Minagawa S, Saigawa T, Hanawa H, Makiyama Y, Moriyama M, Honma K, Isoda M, Hasegawa G, Naito M, Takahashi M and Aizawa Y: Erythroid cells play essential roles in angiogenesis by bone marrow cell implantation. *J Mol Cell Cardiol* 40: 629 - 638, 2006.
- 3) Miyake T, Kung CK and Goldwasser E: Purification of human erythropoietin. *J Biol Chem* 252: 5558 - 5564, 1977.
- 4) Jacobs K, Shoemaker C, Rudersdorf R, Neill SD, Kaufman RJ, Mufson A, Seehra J, Jones SS, Hewick R and Fritsch EF: Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin. *Nature* 313: 806 - 810, 1985.
- 5) Higuchi M, Oh - eda M, Kuboniwa H, Tomonoh K, Shimonaka Y and Ochi N: Role of sugar chains in the expression of the biological activity of human erythropoietin. *J Biol Chem* 267: 7703 - 7709, 1992.
- 6) Mitsuma W, Ito M, Kodama M, Fuse K, Okamura K, Minagawa S, Kato K, Hanawa H, Toba K, Nakazawa M and Aizawa Y: Cardioprotective effects of recombinant human erythropoietin in rats with experimental autoimmune myocarditis. *Biochem Biophys Res Commun* 344: 987 - 994, 2006.
- 7) Chong ZZ, Kang JQ and Maiese K: Erythropoietin is a novel vascular protectant through activation of Akt1 and mitochondrial modulation of cysteine proteases. *Circulation* 106: 2973 - 2979, 2002.
- 8) Couffignal T, Silver M, Zheng LP, Kearney M, Witzensbichler B and Isner JM: Mouse model of angiogenesis. *Am J Pathol* 152: 1667 - 1679, 1998.
- 9) Toba K, Fuse I, Koike T, Tsuchiyama J, Higuchi W, Niikuni K, Abe T, Yano T, Takahashi M, Shibata A and Aizawa Y: Clinical application of reticulated platelet analysis using the Matic - modified thiazol orange method and flow cytometry.

- etry. *Jpn J Clin Hematol* 41: 1151 - 1157, 2000.
- 10) Risau W: Mechanism of angiogenesis. *Nature* 386: 671 - 674, 1997.
 - 11) Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schattman G and Isner JM: Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 275:964 - 967, 1997.
 - 12) Crosby JR, Kaminski WE, Schattman G, Martin PJ, Raines EW, Seifert RA and Bowen - Pope DF: Endothelial cells of hematopoietic origin make a significant contribution to adult blood vessel formation. *Circ Res* 87:728 - 730, 2000.
 - 13) Isner JM and Asahara T: Angiogenesis and vasculogenesis as therapeutic strategies for postnatal neovascularization. *J Clin Invest* 103: 1231 - 1236, 1999.
 - 14) Rajagopalan S, Trachtenberg J, Mohler E, Olin J, McBride S, Pak R, Rasmussen H and Crystal R: Phase I study of direct administration of a replication deficient adenovirus vector containing the vascular endothelial growth factor cDNA (CI-1023) to patients with claudication. *Am J Cardiol* 90: 512 - 516, 2002.
 - 15) Rajagopalan S, Mohler ER, 3rd, Lederman RJ, Mendelsohn FO, Saucedo JF, Goldman CK, Blebea J, Macko J, Kessler PD, Rasmussen HS and Annex BH: Regional angiogenesis with vascular endothelial growth factor in peripheral arterial disease: a phase II randomized, double-blind, controlled study of adenoviral delivery of vascular endothelial growth factor 121 in patients with disabling intermittent claudication. *Circulation* 108: 1933 - 1938, 2003.
 - 16) Simons M, Annex BH, Laham RJ, Kleiman N, Henry T, Dauerman H, Udelson JE, Gervino EV, Pike M, Whitehouse MJ, Moon T and Chronos NA: Pharmacological treatment of coronary artery disease with recombinant fibroblast growth factor - 2: double - blind, randomized, controlled clinical trial. *Circulation* 105: 788 - 793, 2002.
 - 17) Lederman RJ, Mendelsohn FO, Anderson RD, Saucedo JF, Tenaglia AN, Hermiller JB, Hillegass WB, Rocha - Singh K, Moon TE, Whitehouse MJ and Annex BH: TRAFFIC Investigators: Therapeutic angiogenesis with recombinant fibroblast growth factor - 2 for intermittent claudication (the TRAFFIC study): a randomised trial. *Lancet* 359: 2053 - 2058, 2002.
 - 18) Makino H, Aoki M, Hashiya N, Azuma J, Kurinami H, Takeya Y, Kaneda Y, Morishita R and Ogihara T: Two years follow - up of clinical trial of human gene therapy for peripheral arterial disease using hepatocyte growth factor gene transfer. *Circ J* 69, supplement I: 104, 2005.
 - 19) Erbayraktar S, Yilmaz O, Gokmen N and Brines M: Erythropoietin is a multifunctional tissue - protective cytokine. *Curr Hematol Rep* 2: 465 - 470, 2003.
 - 20) Brines M, Grasso G, Fiordaliso F, Sfacteria A, Ghezzi P, Fratelli M, Latini R, Xie QW, Smart J, Su - Rick CJ, Pobre E, Diaz D, Gomez D, Hand C, Coleman T and Cerami A: Erythropoietin mediates tissue protection through an erythropoietin and common beta - subunit heteroreceptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 14907 - 14912, 2004.
 - 21) Saigawa T, Kato K, Ozawa T, Toba K, Makiyama Y, Minagawa S, Hashimoto S, Furukawa T, Nakamura Y, Hanawa H, Kodama M, Yoshimura N, Fujiwara H, Namura O, Sogawa M, Hayashi J and Aizawa Y: Clinical application of bone marrow implantation in patients with arteriosclerosis obliterans, and the association between efficacy and the number of implanted bone marrow cells. *Circ J* 68: 1189 - 1193, 2004.

(平成 18 年 11 月 22 日受付)