

血管再生医療の実施と展望

一骨髄系体細胞移植を用いた末梢性血管疾患・狭心症への血管新生医療一

松原弘明*, 森 泰清*, 岩坂壽二*

抄 録

骨髄細胞には血管内皮細胞, 心筋細胞, 平滑筋細胞などの心血管系構成細胞の幹細胞が含まれる。さらに, 骨髄細胞自身が強力な血管新生因子である VEGF や bFGF を分泌する。骨髄細胞から幹細胞を含む単核球分画を単離し, 虚血組織 (虚血下肢・心筋) に移植すると毛細血管が増生し血行再建・機能改善が見られた。新生血管には移植骨髄細胞が取り込まれ, 骨・軟骨への分化は観察されなかった。動物実験での基礎データをもとに倫理委員会での承認を受け, ヒト虚血肢 (ASO・バージャー病) に対して自己骨髄単核球細胞を利用した血管新生療法 (Trial for Therapeutic Angiogenesis Using Cell Transplantation: TACT) を久留米大学・自治医科大学と共同で開始した。2000年6月より, 2002年2月1日までに外科的・内科的治療によっても血行再建の認めない患者45人の虚血下肢 (Fontaine 3-4度) に対して自己骨髄細胞移植を randomised, double-blinded にて実施した。対照細胞は末梢血単核球を用いた。全身麻酔下で自家骨髄液約500CCを採取したのち骨髄単核球を分離し, 約10億個の細胞を虚血肢の筋肉内40箇所に分注した。45人中31人で下肢の血圧が1か月後には10 mmHg以上上昇し, トレッドミル歩行距離は約2.9倍以上増加し, 下肢の疼痛は45人中39人で消失した。下肢潰瘍は31人中27人で完全に治癒した。腓腹筋注射部位の炎症・浮腫は認めず, 血中の VEGF・FGF 濃度, 単核球細胞数は変化しなかった (Lancet 360: 427-435, 2002)。

骨髄単核球細胞には骨髄間葉系・造血系幹細胞から分化する心筋幹細胞も含まれる。家畜ブタを用いて慢性虚血心筋を作製し, NOGA3次元解析により冬眠虚血部位を同定しカテーテルを用いて細胞移植を行った。全例で心機能改善・虚血域の縮小がみられた。2001年12月19日に実施された難治性狭心症患者への開胸下移植では狭心痛の著明改善 (CCS クラスIVからI), 心筋虚血部の壁運動改善 (シンチ, エコー, NOGA 解析), 心機能改善 (LVG: EF 43%から52%) がみられた。血管造影では側副血行の増生は認めなかった。不整脈の発現は半年間見られていない。

はじめに

本邦における心血管系の再生医学の一つの起爆剤は1999年の2月に脳死患者から行われた心臓・肝臓・腎臓の臓器移植に始まる。もう一つの大切な要因は1998年の11月に米国ウイスコンシン大学がヒト ES (胚幹細胞) を発表したことである。同時期に末梢血には骨髄から動員された血管内皮前駆細胞 (EPC) が存在すること¹⁻³⁾, 血管内皮増殖因子の vascular endothelial growth factor (VEGF), fibroblast growth factor (FGF), hepatic growth factor (HGF) の蛋白・遺伝子血管新生治療⁴⁻⁸⁾, 心筋細胞が骨髄間葉系幹細胞⁹⁾だけでなく造血系幹細胞¹⁰⁻¹²⁾からも分化可能であることが最近報告された。著者らは閉塞性動脈硬化やバージャー病など虚血下肢に対する骨髄単核球細胞移植を用いた血管新生治療の効果を2重盲検試験で確認してきた¹³⁾。このように, 心血管系での再生医学研究は新世紀を迎え従来の研究室レベルでの基礎研究が臨床応用へと融合した。血管が動

*関西医科大学第2内科・心血管病センター

脈硬化により硬化すると血流が減少し、慢性的な虚血状態に陥る。この閉塞性動脈硬化症のなかで細胞移植の適用になるのは下肢・上肢血圧比 (ankle-brachial blood pressure ration: ABPI) が0.6以下に低下して (正常は1.1以上) 下肢に重症虚血の存在する虚血下肢である。内科的・外科的にも血行再建困難な no-option 虚血下肢や狭心症の症例である。本稿では実際に臨床応用が始まった骨髓単核球細胞移植による血管再生治療の成績を中心に今後の心血管系の再生医療の展望を述べる。

血管新生とは

発生学や組織学の視点から、広義の血管新生は以下の2種類に大別される。1つは発生初期における内皮細胞の前駆細胞である血管芽細胞 (angioblast または endothelial progenitor cell) からのまったく新しい脈管系の発生で、脈管形成 (Vasculogenesis) と呼ばれるものであり、もう1つのタイプは、すでに組織に存在する血管系からの、内皮細胞増殖および遊走を基本とした新しい娘血管枝の形成で、狭義の血管新生 (Angiogenesis) と呼ばれるものである^{14, 15)}。動脈形成 (arteriogenesis) は狭窄に陥り血流量が低下した血管が shear stress や単球浸潤などにより内径が拡張し、血管構造が正常化して血流が回復することと定義されている。最近まで、生後の血管新生は、すべて angiogenesis によるものであると考えられてきたが、循環血液中を流れる EPC がこの vasculogenesis に関与し、虚血下肢や虚血心筋での側副血行路は Vasculogenesis が初期反応であり、angiogenesis が遅れて参加すると認識されてきた。さらにこの血管新生には VEGF, HGF, bFGF, Angiopoietin-1 などの増殖因子・血管成熟促進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になった。

血管新生療法

前述の血管新生の機序を治療に用いようとした血管新生療法の概念は古くから存在した。これまでに動物実験において、様々な成長因子が血管新生療法に試みられてきた。1992年 Yanagisawa-Miwa¹⁶⁾ は、イヌ心筋梗塞モデルを作成し、冠動脈内に bFGF (basic fibroblast growth factor) を

投与し心筋梗塞の治療過程を改善し、心機能をも改善することを報告した。1994年 Takeshita¹⁷⁾ は、ウサギ片側下肢虚血モデルを作成し、腸骨動脈内に VEGF (vascular endothelial growth factor) を投与し側副血行の発達を促進させることを報告した。近年、国内でも大阪大学の森下¹⁸⁾ は、上記と同様のウサギ片側下肢虚血モデルを作成し、腸骨動脈内にヒト型 HGF を投与し側副血行の有意な改善を報告した。また、欧米ではすでに臨床の場に移行しており、1994年ボストン、タフツ大学の Isner¹⁹⁾ らの研究グループは VEGF165 の遺伝子を含む発現プラスミドベクターを閉塞性動脈硬化症 (ASO) 患者の血管内にカテーテルを用いて投与し有意な側副血行の改善が認められたことを報告した。この報告は、循環器領域における世界初のヒト遺伝子治療の症例報告となった。

血管内皮前駆細胞による細胞移植治療の可能性

造血細胞と血管内皮細胞は共通の幹細胞 (hemangioblast) より発生すると考えられている。1996年 Noishiki²⁰⁾ は、イヌ腹部大動脈人工血管置換モデルを作成し、自己骨髓全血を移植することにより人工血管内側に再内皮化を認め、血栓を予防できたことを報告した。1998年 Shi²¹⁾ は、イヌ胸部下行大動脈人工血管置換モデルを作成し、全身照射を行った後に、別のイヌからの骨髓を経静脈的に移植し人工血管内側の再内皮化に骨髓細胞が関与することを報告した。また in vitro 実験系において CD34 陽性幹細胞が VEGF, bFGF, IGF-1 の存在下に血管内皮細胞を形成することを報告した。CD34 陽性幹細胞は、通常の末梢血中には骨髓の約1/20の0.05%しか存在しない²¹⁾。つまり、骨髓由来の幹細胞の方がより有用な血管新生がなされると考えられる。室原博士らは、ウサギ下肢虚血モデルを作成し、自己骨髓単核球移植で、虚血下肢の側副血行や血管新生の改善がみられたと報告している¹²⁾。

骨髓細胞移植による ASO・Burger 病患者の虚血下肢への血管新生医療 (-TACT-1 Trial-Randomized, Double-Blind Control Study)

骨髓単核球には血管内皮系幹細胞が約0.01%存在し、内皮系幹細胞以外の造血系幹細胞は VEGF, Angiopoietin-1 などの血管内皮増殖因子・血管成

熟促進因子を合成・放出する(図1)。骨髓単核球の虚血下肢への筋肉内投与が有効な血流増加・

血管新生増加を誘導することが、著者らや久留米大学の室原博士らによって動物実験で確認された

骨髓単核球細胞移植

- 1) 血管内皮幹細胞・心筋幹細胞の供給
- 2) 血管内皮増殖因子の合成・分泌 (bFGF, VEGF, Angiopoietin)

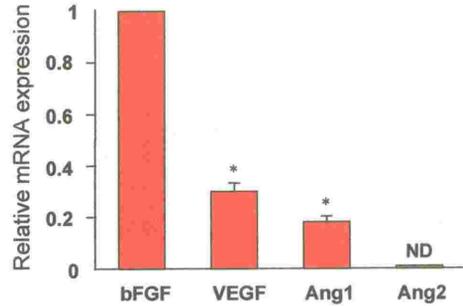
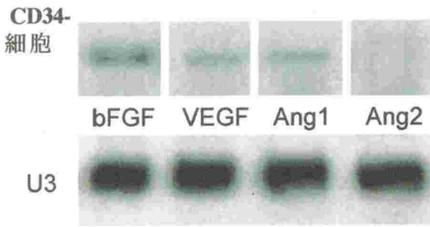
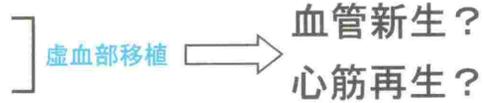


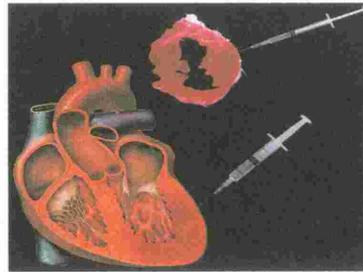
図1 骨髓単核球移植による血管新生・心筋再生医療

骨髓単核球細胞の移植は血管内皮幹細胞・心筋幹細胞の供給と VEGF・FGF・angiopoietin-1 といった血管新生因子を産生することにより血管新生・心筋再生を誘導する

- 1) 腸骨より骨髓細胞採取



- 3) 虚血心筋部位への筋肉内投与



- 2) 骨髓単核球細胞の単離・濃縮



- 4) 移植骨髓細胞の新生血管・心筋細胞への分化

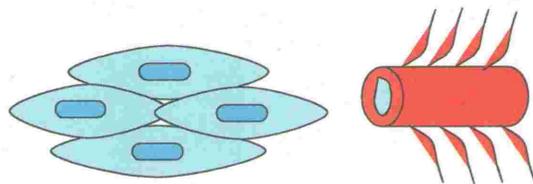


図2 概念図—骨髓単核球移植による狭心症治療—

全身麻酔下で腸骨より自家骨髓液約500 CCを採取したのち速やかに骨髓単核球を分離し、約10億個の細胞を虚血心筋の筋肉内に移植する。

(概念図, 図2)^{22,23}. これらの基礎データをもとに倫理委員会の承認を受け, ヒト虚血肢に対して Vasculogenesis を利用した血管新生療法を久留米大学・自治医科大学と共同で2000年1月より開始した (Japan Trial for Therapeutic Angiogenesis Using Cell Transplantation : J-TACT). これをうけて2000年6月より, 現在まで外科的・内科的治療によっても下肢虚血改善の認めない患者45人の虚血下肢 (Fontaine 3 - 4 度) に対して自己骨髄細胞移植を実施した. コントロール不良の糖尿病・網膜症, 悪性腫瘍の合併症例は除外した. 全身麻酔下で自家骨髄液約500 CCを採取したのち速やかに骨髄単核球を分離し, 約10億個の細胞を虚血肢の筋肉内40箇所に分割注入した. 第1相試験の結果 (生食を対照利用, n = 25) を受けて, 第2相試験に必要な患者数を算定し, randomized, double-blind control (n = 20) を開始した. 第1相試験で対照として対側の虚血肢に同時投与した末梢血単核球細胞 (PB - MNC) や生食では血流増加はみられなかった. 第2相試験の対照としては末梢血単核球を用いた. この第2相試験では骨髄移植群

では ABI (上肢・下肢血圧比) が ≈ 0.97 増加し, 対照末梢血単核球群の ABI が ≈ 0.024 より統計学的有意な差を認めた. 下肢疼痛完全緩和が20人中18人でみられた. トレッドミル歩行距離は約2.6倍以上増加した (図3). 注射部位の炎症・浮腫は認めず, 血中の VEGF・FGF・HGF 濃度, 単核球細胞数は変化しなかった. 動物実験と同様に骨形成など内皮細胞以外の細胞への分化は認めなかった. 血管造影では著明な血流増加が観察された (図4). 下肢潰瘍は2月後には著明に改善した (図5). この治療成績は Lancet に世界初の循環器病での細胞移植による血管新生治療として掲載され, 注目されている¹³. 本邦でも16大学病院, 3国立病院で同じプロトコルで no option 虚血下肢を対象に実施されている.

狭心症に対する血管新生蛋白・遺伝子や造血性サイトカイン (GM-CSF, G-CSF) を用いた血管新生療法

これまでに冠動脈結紮による虚血心筋動物モデルなどでは VEGF, bFGF 蛋白の冠動脈内投与は

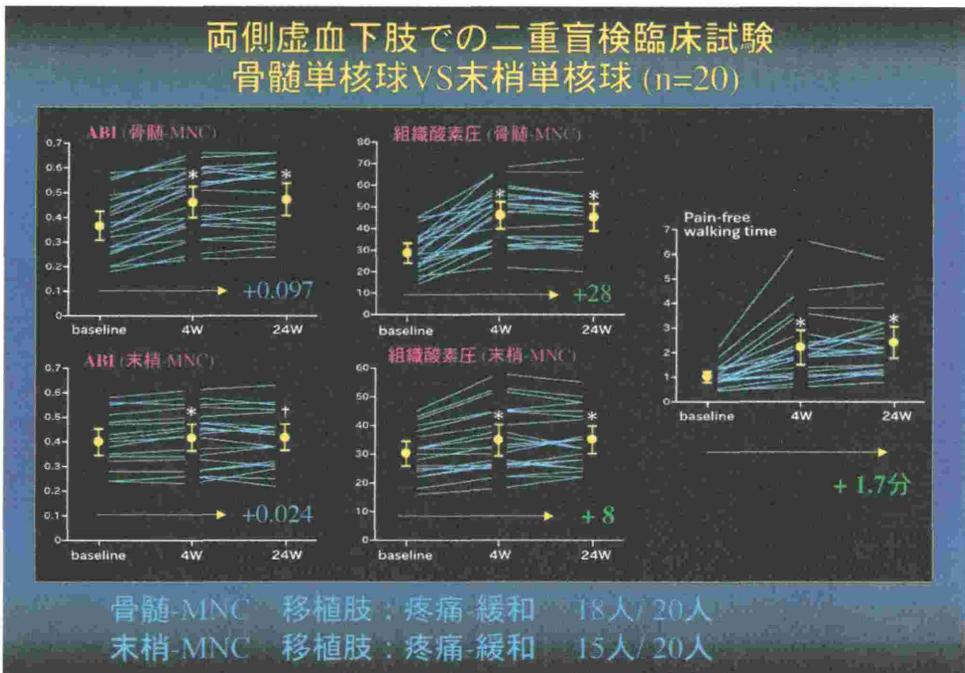


図3 骨髄単核球移植と末梢単核球を用いた ASO, Buerger 病への Randomized, double-blinded study 両側虚血下肢を持つ ASO, Buerger 病症例に Randomized, double-blinded により骨髄単核球移植か末梢単核球を同数移植し下肢上肢血圧比, 組織酸素分圧を比較した.

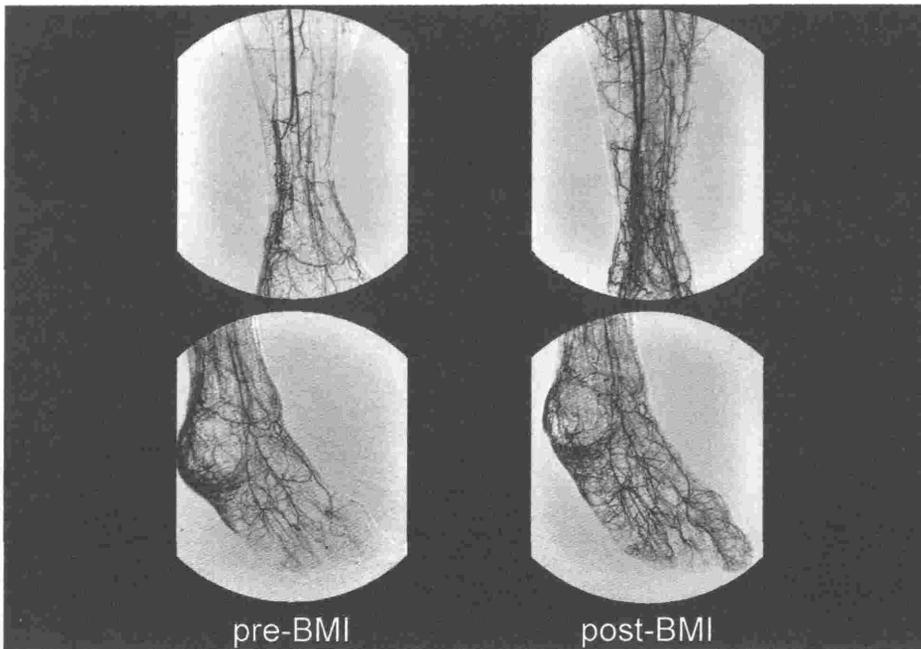


図4 骨髓細胞移植 (BMI) 後に血管造影 (DSA) で著明な血流増加が観察された1例



図5 骨髓細胞移植による下肢潰瘍の改善

側副血管形成、心収縮機能を改善させるとの多くの論文が発表された。その成績を基礎に、大規模数の冠動脈疾患患者での2重盲検試験が行われたが、VEGF蛋白⁷⁾、bFGF蛋白²⁴⁾のいずれも冠動

脈内投与による血管再生治療は偽薬投与と比較して効果なしと結論づけられた。タフツ大学研究グループはVEGF165の遺伝子を含む発現プラスミドベクターを19人の冠動脈疾患患者にカテーテル

を用いて2重盲検試験で経皮的に投与した。19人と少人数であったが、狭心痛の発現、運動機能などで有意な改善が見られた⁸⁾。このような遺伝子心筋内注入のように、緩やかに長期間にわたってのVEGF蛋白放出は有効かもしれない。しかしながら、同様のアデノbFGFの遺伝子心筋内注入は2重盲検試験で有効性がないと結論づけられている。

造血性サイトカインであるGM-CSFが骨髄から血管内皮前駆細胞を動員させるとの基礎データが報告されていた²⁵⁾。このGM-CSFを二重盲検試験で21人の冠動脈疾患症例に投与し、collateral flowの有意的な増加が観察され、その血管新生への効果が臨床でも実証された²⁶⁾。

狭心症に対する骨格筋芽細胞移植

骨格筋には多能性幹細胞が存在し心筋内に移植されたときには心筋細胞への分化が可能である。摘出自己骨格筋を細切し、培養して増殖させた骨格筋芽細胞を実際に心筋梗塞患者においてバイパス開胸手術時に運動機能のない梗塞心筋に移植された²⁷⁾。10人の患者に移植した時点で重症不整脈が2人に出現し、このphase-1臨床研究は中止となった。心筋細胞への分化と同時に骨格筋細胞への分化が誘導され、骨格筋タイプのイオンチャンネルが発現してリエントリー回路が形成され不整脈が誘発されたのではないかと著者は考えている。しかし、その後米国で細胞調整法を厳密にすると不整脈の誘発はみられなかったと報告され、今後の展開が期待される。

大動物狭心症モデルに対する骨髄単核球細胞移植

骨髄単核球には血管内皮系幹細胞が約0.01%存在し、内皮系幹細胞以外の造血系幹細胞はVEGF, Angiopoietin-1などの血管内皮増殖因子・血管成熟促進因子を合成・放出する(図1)。最近、非常に未分化な造血系幹細胞(lin-, c-kit+, sca1+)が心筋幹細胞に分化するとの報告がなされた²⁸⁾。血管内皮系幹細胞、心筋幹細胞に加えて血管内皮増殖因子を含む骨髄単核球移植が血管再生に有効である可能性を大動物実験で著者らは検討した²⁹⁾(概念図、図2)。冠動脈結紮によるブタ急性心筋梗塞モデルでは自家骨髄単核球を梗塞周囲部位

に開胸にて心外膜側より心筋内に移植した。4週間後には移植部血管数が3倍以上増加し、血管造影で明らかな側副血管が観察された。移植骨髄細胞は新生血管の20・30%に内皮細胞として分化していた。骨や骨芽細胞の形成、6か月週一回24時間Holter心電図フォローした不整脈の出現は認めなかった²⁹⁾。また、著者らの系では移植骨髄細胞の心筋細胞への分化は観察できず、一部はマクロファージへの分化が認められた。ヒトの狭心症は慢性虚血心であるため、大動物実験モデルとしてはアメリロイドコンストリクターでの冠動脈狭窄が必要である。また、カテーテルを介した経皮的注入が将来は好ましい。NOGA mappingシステムは虚血冬眠心筋を同定し、経カテーテル的に細胞移植が可能な画期的な装置である。電気的活動を示す部位と機械的運動を示す部位がリアルタイムに同定可能であり、不一致領域は冬眠心筋である。紫>青>黄が良好に活動・運動を示す部位であり、赤が活動・運動低下部位である。経カテーテル的に冬眠心筋に骨髄単核球を移植した部位は著しく運動低下部位が改善した(赤から紫)(図6)。生食を注入した冬眠心筋は改善ではなくさらなる悪化を示した(赤色部位の拡大)³⁰⁾。

No-option 重症狭心症 (CCS class IV) に対する骨髄単核球移植治療

狭心症モデル大動物実験での成績に加えて、閉塞性動脈硬化やバジャー病など虚血下肢に対する骨髄単核球細胞移植を用いた血管新生治療の効果が2重盲検試験で確認された¹³⁾ことより、関西医大倫理委員会において狭心症患者への骨髄単核球細胞移植治療が許可された。64歳の男性で、心筋梗塞発症後8年を経過し、バイパス手術2回、冠動脈形成術5回を受けている。CCS class IVの重症狭心症であり、安静時狭心痛が頻発し、1日15回程度のニトログリセリンスプレーを使用している。肋間小切開にてNOGA mappingシステムで同定された虚血冬眠心筋に心外膜側より、自家骨髄単核球を30箇所に移植した。14日以内に狭心痛は全く消失した。冬眠心筋部位での運動低下部位は改善した(赤から紫)(図7)。4か月間、週一回24時間Holter心電図フォローした不整脈の出現は認めなかった。CPK, Troponinで評価される心筋傷害は最小限であり、4日以内に正常域

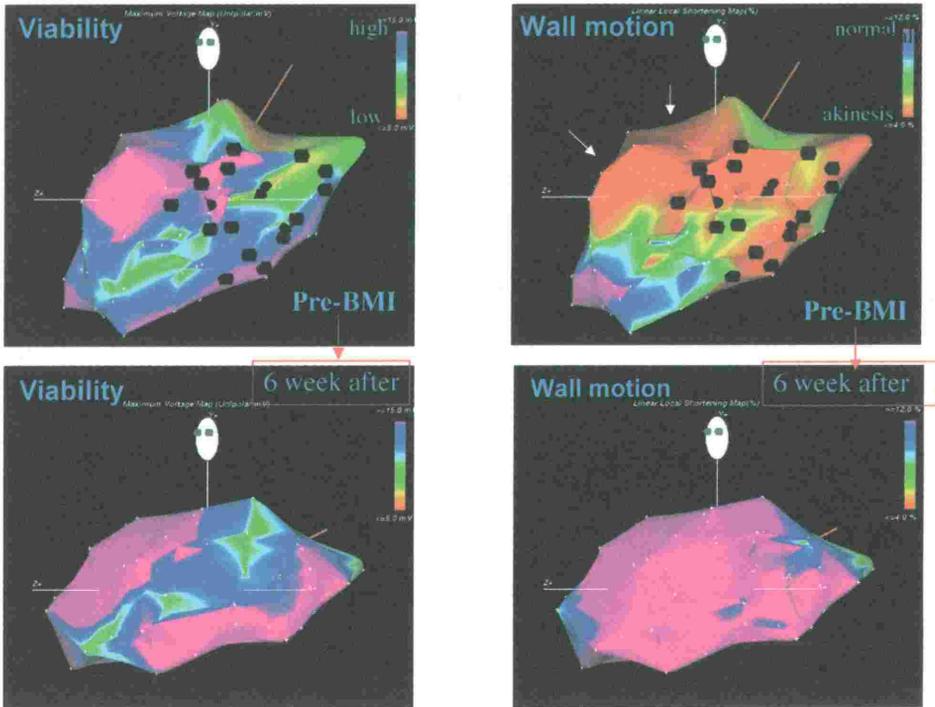


図6 NOGA マッピングシステムによる慢性虚血心筋への骨髄単核球移植
 Ameroid constrictor で作製したブタ慢性虚血モデルにおいて NOGA システムにより電気活動陽性(紫: viability), 壁運動低下(赤: wall motion)の虚血冬眠部位(矢印)に約20箇所骨髄単核球をカテーテルを介して移植した(黒点)(左図)。3か月後には壁運動は著しく改善し(赤から紫色:右図), 左心室収縮率(EF)は22%から49%へと増加した。BMI: bone marrow implantation

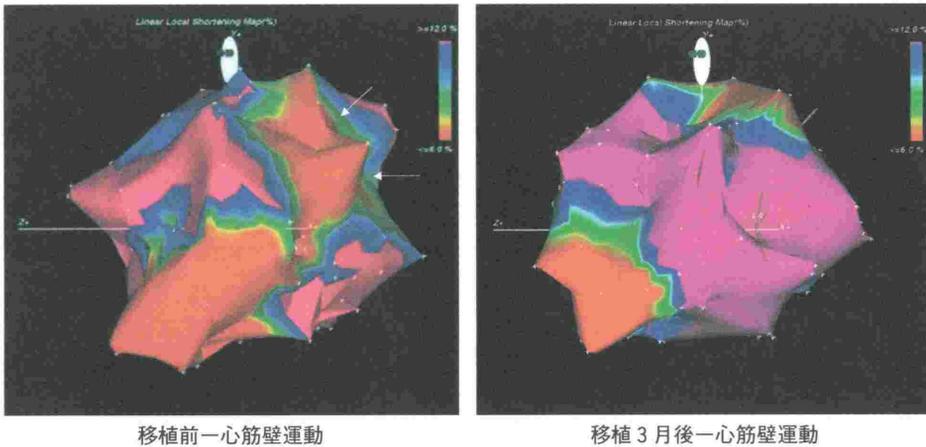


図7 NOGA マッピングシステムによる狭心症症例への骨髄単核球移植効果の評価
 壁運動低下(赤: wall motion)の虚血冬眠部位(矢印)に約30箇所骨髄単核球を移植した。3か月後には壁運動は著しく改善し(赤から紫色:右図), 左心室収縮率(EF)は42%から53%へと増加した。BMI: bone marrow implantation

に復帰した。左心室収縮率は43%から52%へと増加した。心筋シンチでは負荷後再分布現象は消失

し、運動対応能は3倍も亢進した(図8)。

Pre-BMI

Post-BMI

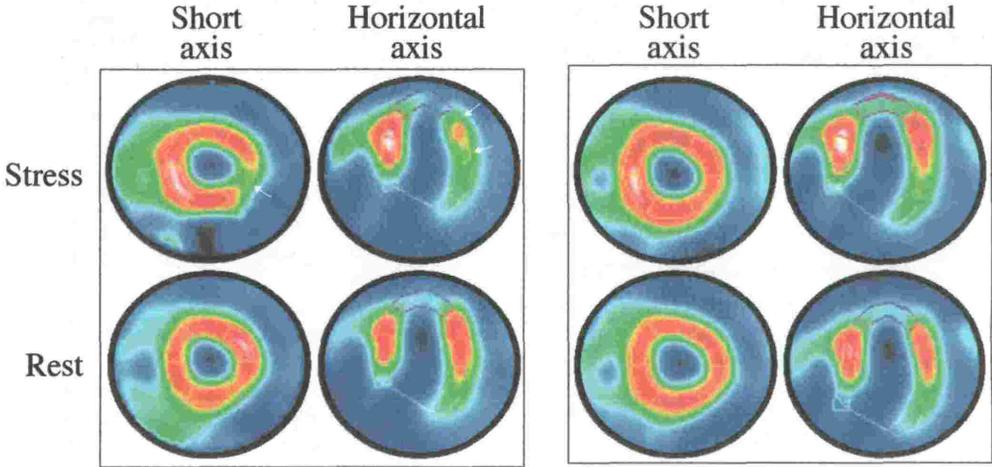


図8 SPECT-sestamibi 心筋シンチによる狭心症症例への骨髄単核球移植効果の評価
 左室下壁側壁の負荷後再分布領域(矢印)は骨髄単核球移植の3か月後には消失している。
 BMR: bone marrow implantation

今後の方向

-TACT Trial-Randomized, Double-Blind Control Study は世界で初めてその効果が確認された骨髄細胞移植による血管新生医療である。閉塞性動脈硬化やバージャー病など虚血下肢に対する骨髄単核球細胞移植を用いた血管新生治療の効果が2重盲検試験で確認されたことより、再建不可能な虚血下肢への細胞移植治療の安全性・有効性が示された。重症狭心症への骨髄単核球移植は1例ではあるが、有望な血行再建治療と期待される。虚血下肢に対する骨髄細胞移植症例では、可能性は非常に少ないが、移植細胞のマクロファージへの分化、血管平滑筋細胞への分化による冠動脈、頸動脈の動脈硬化病変の修飾は、移植後の血管造影で注意深くフォローがなされている。

文 献

- 1) Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al : Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 275 : 964-967, 1997
- 2) Shi Q, Rafii S, Wu MH, et al : Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood* 92 : 362-367, 1998
- 3) Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, et al : Expression of VEGF-2 and AC133 by circulating human CD34+ cells

identified a population of functional endothelial precursors. *Blood*. 95 : 952-958, 2000

- 4) Isner M, Asahara T : Angiogenesis and vasculogenesis as therapeutic strategies for postnatal neovascularization, *J Clin Invest* 103 : 1231-1236, 1999
- 5) 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
- 6) Isner JM : Myocardial gene therapy. *Nature* 415 : 234-239, 2002
- 7) Henry TD, Mckendall GR, Azrin MA, et al : VEGF in Ischemic for Vascular Angiogenesis (VIVA) trial: one year follow up. *Circulation* 102 suppl : II -309, 2000
- 8) Losordo DW, Vale PR, Hendel RC, et al : Phase1/2 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
- 9) Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, et al : Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest* 103 : 697-705, 1999
- 10) Tomita S, Li RK, Weisel RD, et al : Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function. *Circulation* 100 : 247 II -256 II, 1999
- 11) Kobayashi T, Hamano K, Li TS, et al : Enhancement of angiogenesis by the implantation of self bone marrow cells in a rat ischemic heart model. *J Surg Res* 89 : 189-195, 2000
- 12) Anversa Pand Nadal-Ginard B, Myocyte renewal and ventricular remodeling, *Nature* 415 : 240-243, 2002
- 13) 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 controlled trial *Lancet* 360 : 427-435, 2002
- 14) Risau W : Vasculogenesis, angiogenesis and endothelial cell differentiation during embryonic development. In: Feinberg RN, Sherer GK, Auerbach R (Eds) *The development of the vascular system*. Vbl 14, Karger, Basel, pp 58-68, 1991
 - 15) Folkman J. Tumor angiogenesis : therapeutic implications. *N Engl J Med* 285 : 1182-1186, 1971
 - 16) Yanagisawa-Miwa A, Uchida Y, Nakamura F, et al : Salvage of infarct myocardium by angiogenic action of basic fibroblast growth factor. *Science* 257 : 1401-1403, 1992
 - 17) 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
 - 18) 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
 - 19) 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
 - 20) Noishiki Y, Tomizawa Y, Yamane Y, et al : Autocrine angiogenic vascular prosthesis with bone marrow transplantation. *Nature Med* 2 : 90-93, 1996
 - 21) Bender JG : Identification and comparison of CD34-positive cells and their subpopulations from normal peripheral blood and bone marrow using multicolor flow-cytometry. *Blood* 77 : 2591, 1991
 - 22) Shintani S, Murohara T, Ikeda H, et al : Augmentation of postnatal neovascularization with autologous bone marrow transplantation. *Circulation* 103 : 897-895, 2001
 - 23) Iba O, Matsubara H, Nozawa Y, et al : Angiogenesis by implantation of peripheral blood mononuclear cells and platelets into ischemic limbs *Circulation* 106 : 2019-2025, 2002
 - 24) Simon M, Annex BH, Laham RJ, et al : Pharmacological treatment of coronary artery disease with recombinant fibroblast growth factor-2. Double-blind, Randomized, Controlled Clinical Trial *Circulation* 105 : 788-793, 2002
 - 25) Takahashi T, Kalka C, Masuda H, et al : Ischemia and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial cells for neovascularization. *NatMed* 5 : 434-438, 1999
 - 26) Seiler C, Pohl T, Wustmann K, et al : Promotion of collateral growth by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in patients with coronary artery disease. A randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Circulation* 104 : 2012-2017, 2001
 - 27) Menasch P, Hage AA, Scorsin M, et al : Myoblast transplantation for heart failure *Lancet* 357 : 279-281, 2001
 - 28) Orlic D, Kjustura J, Chimenti S, et al : Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium *Nature* 410 : 701-705, 2001
 - 29) Kamihata H, Matsubara H, Nishiue 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
 - 30) Kamihata H, Matsubara H, Nishiue N, et al : Improvement of Collateral Perfusion and Regional Function by Catheter-Based Implantation of Peripheral Blood Mononuclear Cells into Ischemic Hibernating Myocardium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (in press)