

Review

CD34 陽性細胞移植による血管・組織の再生治療

藤田 靖之^{1,2)}, 木下 慎¹⁾, 川本 篤彦^{1,2)}¹⁾ 先端医療振興財団 先端医療センター病院 再生治療ユニット²⁾ 先端医療振興財団 先端医療センター研究所 血管再生研究グループ

Vascular and Tissue Regeneration by CD34+ Cells

Yasuyuki Fujita^{1,2)}, Makoto Kinoshita¹⁾, and Atsuhiko Kawamoto^{1,2)}¹⁾ Unit of Regenerative Medicine, Institute of Biomedical Research and Innovation²⁾ Group of Vascular Regeneration Research, Institute of Biomedical Research and Innovation

CD34 is a cell surface marker, which is expressed in various somatic stem/progenitor cells such as bone marrow (BM)-derived hematopoietic stem cells and endothelial progenitor cells (EPCs), skeletal muscle satellite cells, epithelial hair follicle stem cells, and adipose tissue mesenchymal stem cells. CD34+ cells in BM and peripheral blood are known as a rich source of EPCs; therefore, therapeutic application of BM-derived CD34+ cells has been attempted for vascular regeneration in cardiovascular diseases. Preclinical and early clinical studies of BM or granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF)-mobilized CD34+ cell therapy revealed promising outcomes with regard to safety, feasibility, and potential efficacy in critical limb ischemia (CLI) by atherosclerosis obliterans or Buerger's disease, acute myocardial infarction, chronic myocardial ischemia (refractory angina), and dilated cardiomyopathy. Our research group is now preparing for a phase III clinical trial of CD34+ cell therapy in CLI on the basis of previous phase I/II and phase II trials.

Recently, CD34+ cell therapy has also been applied to non-healing fractures and decompensated liver cirrhosis, in which reduced blood supply is a key factor associated with disease progression. Both preclinical and pilot clinical investigations indicated the safety, feasibility, and effectiveness of G-CSF-mobilized CD34+ cell therapy in these non-cardiovascular diseases. This review provides an overview of the preclinical and clinical reports to demonstrate the usefulness, current limitations, and future prospects of cell-based therapy in various types of diseases.

CD34 は様々な体性幹細胞の表面マーカーであり、骨髄由来の造血幹細胞／血管内皮前駆細胞、骨格筋衛星細胞、毛包幹細胞、脂肪組織間葉系幹細胞などに発現している。骨髄または顆粒球コロニー刺激因子 (granulocyte colony stimulating factor: G-CSF) 動員 CD34 陽性細胞を用いた血管再生療法は、慢性重症下肢虚血、治療抵抗性狭心症、急性心筋梗塞、拡張型心筋症など様々な心血管疾患患者を対象に開始され、高い安全性と良好な初期成績が報告されている。当研究グループでは、慢性重症下肢虚血患者に対する第 I/II 相、第 II 相臨床試験を終え、現在第 III 相試験の準備中である。最近では、心血管疾患以外に、肝硬変や難治性骨折など、その病態に局所の血流障害が関与する疾病に対しても、G-CSF 動員 CD34 陽性細胞移植治療が行われ、良好な初期成績が示されている。

本総説では、骨髄由来 CD34 陽性細胞を用いた血管再生治療について、前臨床試験および初期臨床試験の成績を紹介し、将来の展望についても言及する。

Keywords: CD34, cell therapy, clinical trial, ischemia, regeneration

2014 年 11 月 14 日受付, 2015 年 1 月 16 日受理

この論文は、第 17 回日本小児心血管分子医学研究会における特別講演をもとに執筆されたものである。

別刷り請求先: 〒650-0047 神戸市中央区港島南町 2-2 先端医療振興財団先端医療センター病院再生治療ユニット 川本篤彦

doi: 10.9794/jspccs.31.80

はじめに

CD34 とは細胞膜を貫通する表面抗原であり、骨髓・末梢血の造血幹細胞および血管内皮前駆細胞 (endothelial progenitor cell: EPC), 骨格筋の衛星細胞, 上皮の毛包幹細胞, 脂肪組織の間葉系幹細胞などに発現している。つまり, CD34 とは生体内における様々な幹細胞のマーカーであると考えられている¹⁾。これら CD34 を発現する細胞を CD34 陽性細胞と称している。

1997 年に Asahara ら²⁾ がヒト末梢血単核球中の CD34 陽性細胞が EPC を豊富に含む分画であることを明らかにして以来, 骨髓由来 EPC が末梢血への動員, 血管形成部位への生着, 分化, 増殖などを介した「血管発生」に重要な役割を果たすことが知られるようになった (Fig. 1)。EPC による血管再生メカニズムとして, EPC 自身による血管発生に加えて, vascular endothelial growth factor (VEGF), basic fibroblast growth factor (bFGF), hepatocyte growth factor (HGF), insulin-like growth factor (IGF)-1, stro-

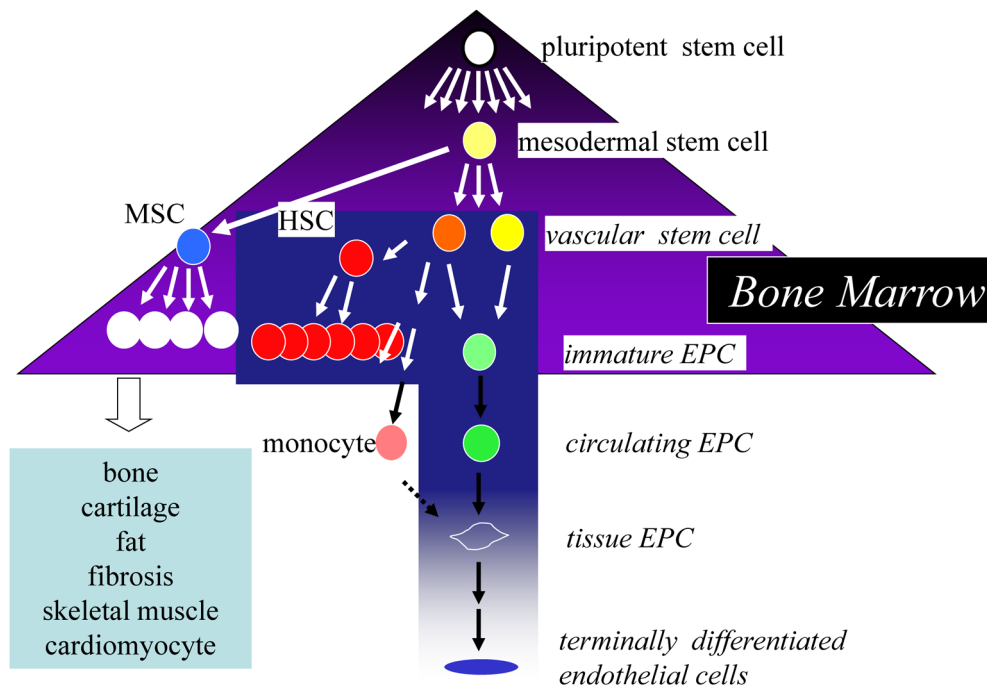


Fig. 1 Schematic differentiation cascade of bone marrow stem/progenitor cells

Hematopoietic stem cell (HSC), vascular stem cell, and endothelial progenitor cell (EPC) are CD34 positive. MSC, mesenchymal stem cell.

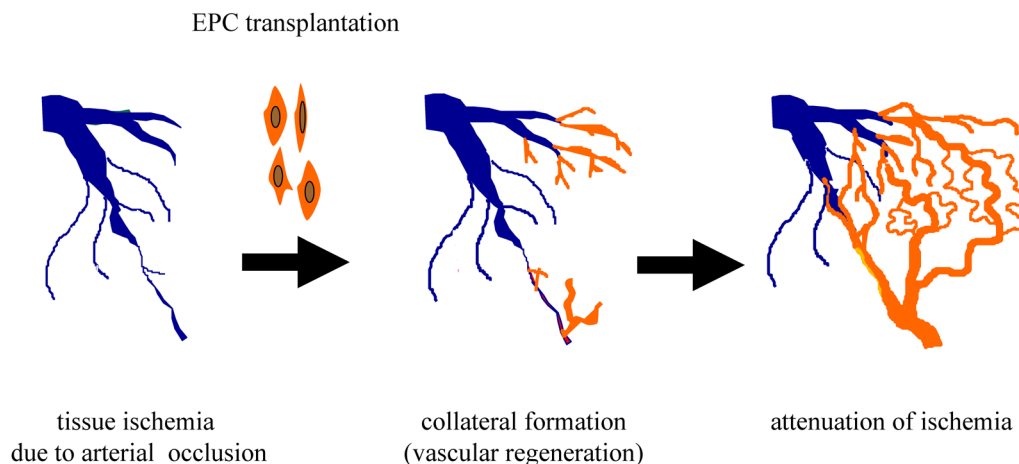


Fig. 2 Vascular regeneration by transplantation of EPCs

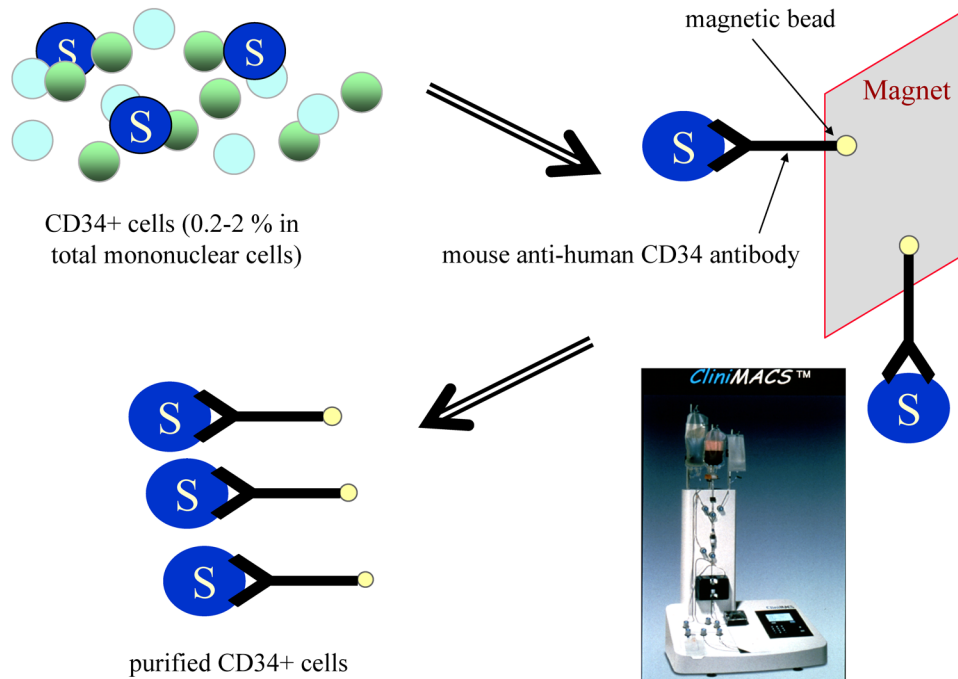


Fig. 3 Principle of the magnetic isolation of CD34+ cells and the medical device for cell isolation
S, stem cell.

mal cell-derived factor (SDF)-1などの血管新生因子・サイトカインの発現 (paracrine 効果) も報告されている³⁾。

これらの病態生理学的役割を背景として、難治性虚血性疾患に対するEPC投与による血管再生治療が試みられるようになった (Fig. 2)。治療に用いるEPCは、1) 骨髄または末梢血の単核球から、各表面抗原に対する抗体を用いて、CD34陽性細胞またはCD133陽性細胞として分離する、あるいは2) 単核球を血管新生因子などとともに培養することによって得ることができる。このうち、CD34またはCD133陽性細胞は、臨床用の細胞分離機器がすでに開発されており、分離工程で細胞培養も要さないことから、その有用性に期待が寄せられている (Fig. 3)。

本稿では、骨髄または末梢血のCD34陽性細胞を中心に、EPC移植による各種循環器疾患に対する血管再生治療の前臨床および臨床試験の成績を紹介する。また、CD34陽性細胞移植による血管再生効果を生かした、循環器領域以外の疾患に対する再生治療についても概説する。

1. 重症下肢虚血

下肢虚血の原因疾患として、動脈硬化を主病態とする閉塞性動脈硬化症 (atherosclerosis obliterans:

ASO)、血管炎によるバージャー病・膠原病などがあるが、虚血が高度に進行し、下肢安静時疼痛または潰瘍・壊死を呈するに至った病態は重症下肢虚血 (critical limb ischemia: CLI) と称されている。CLI発症後1年の転帰は、死亡25%、大切断後生存30%、CLI持続25%であると報告されており、いくつかの進行性悪性腫瘍に匹敵するほど予後不良である。一般に、下肢虚血に対する治療は、まず薬物療法が試みられ、症状改善が認められない場合には外科的バイパス手術や血管内治療による血行再建が試みられるが、およそ25~40%のCLI患者においてこれら血行再建術の適応がない⁴⁾。CLI患者に対する治療の最大の目的は救肢・救命であるが、現行の血行再建術の適応がない、あるいは治療抵抗性の患者においては、きわめて予後不良である。このようなNo option CLI患者に対する新たな血行再建治療として、EPC移植による血管再生治療が注目されている。

Kalkaら⁵⁾は、健常人の末梢血単核球を培養して得られたEPCを用いて、ヌードマウスの下肢虚血モデルに対する血管再生治療を試みた。EPCを下肢虚血2日後に静脈内投与すると、移植された細胞が虚血部位に集積し、マウス由来の血管内皮細胞と共同して血管再生に貢献していることが組織学的に確認された。組織学的な毛細血管密度やレーザードプラ法による虚血肢の血液灌流も、細胞移植後に有意に改善した。この

結果、重症虚血後壊死に対する下肢温存率が、対照群で7~8%にすぎなかったのに対し、EPC移植群では59%と著明に改善した。Losordoらは、健康人への顆粒球コロニー刺激因子 (granulocyte colony stimulating factor: G-CSF) 皮下注射後に末梢血から採取・分離したCD34陽性細胞を下肢虚血ヌードラットに移植し、同様に良好な成績を確認した(未発表データ)。

以上の前臨床試験成績を基に、筆者らは⁶⁾、2003年から「慢性重症下肢虚血患者に対する自家末梢血血管内皮前駆細胞 (CD34陽性細胞) 移植による血管再生治療に関する第I/IIa相試験」を実施した。全17例の患者背景は、男性9例、女性8例、平均年齢50歳、ASO 5例(うち1例は維持血液透析患者)、バージャー病12例、Rutherford分類では4群6例、5群9例、6群2例であった。細胞の採取・分離法であるが、5日間のG-CSF製剤の投与により末梢血に動員された単核球をアフレスシスで採取し、さらに磁気細胞分離装置 (CliniMACS[®]) を用いてCD34陽性細胞を分離した。分離されたCD34陽性細胞は、純度が平均93%、生存率が平均87%の高い品質を示した。得られたCD34陽性細胞は、腰椎麻酔下で虚血下肢筋肉内へ移植した。全症例で治療後1年以内の死亡・下肢大切断は発生せず、自立歩行機能を温存し得た。また、潰瘍・壊死の治癒、虚血性疼痛の改善、足趾上腕

血圧比 (TBI)、経皮的酸素分圧 (TcPO₂) などの生理学的血流指標の経時的改善が認められ、CLIからの離脱率は治療後1年で88%の高率であった。また、治療後4年におよぶ長期成績についても検討した。死亡は移植後2年まで発生せず、それ以降に4例が心疾患により死亡したが、本細胞治療との関連は否定された。下肢大切断は治療後4年間発生しなかった。CLI離脱率は、治療後4年まで80%以上の高率を維持した。TBIは治療後4年、TcPO₂は治療後3年まで、治療前に比して有意な改善を示した (Fig. 4)⁷⁾。

以上のように、初期臨床試験で良好な安全性・有効性成績が示されたが、筆者らは、さらにCD34陽性細胞分離機器 (Isolex[®]) の薬事承認を目指し、2008年から医療機器 Good Clinical Practice (GCP) に準拠した医師主導治験を開始した。本治験は、再生医療領域における本邦初の医師主導治験であった。対象は11例のCLI患者であり、その背景は、男性6例、女性5例、平均年齢49歳、ASO 4例(透析患者は除外)、バージャー病7例、Rutherford分類では4群6例、5群5例であった。この医師主導治験においても、前述の第I/IIa相試験での良好な成績がほぼ再現された。すなわち臨床的イベントとしては、治療後1年間の死亡例なし、感染性壊疽による下肢大切断1例、予定外小切断なしであった。CLI離脱率は治療後6ヶ月で約

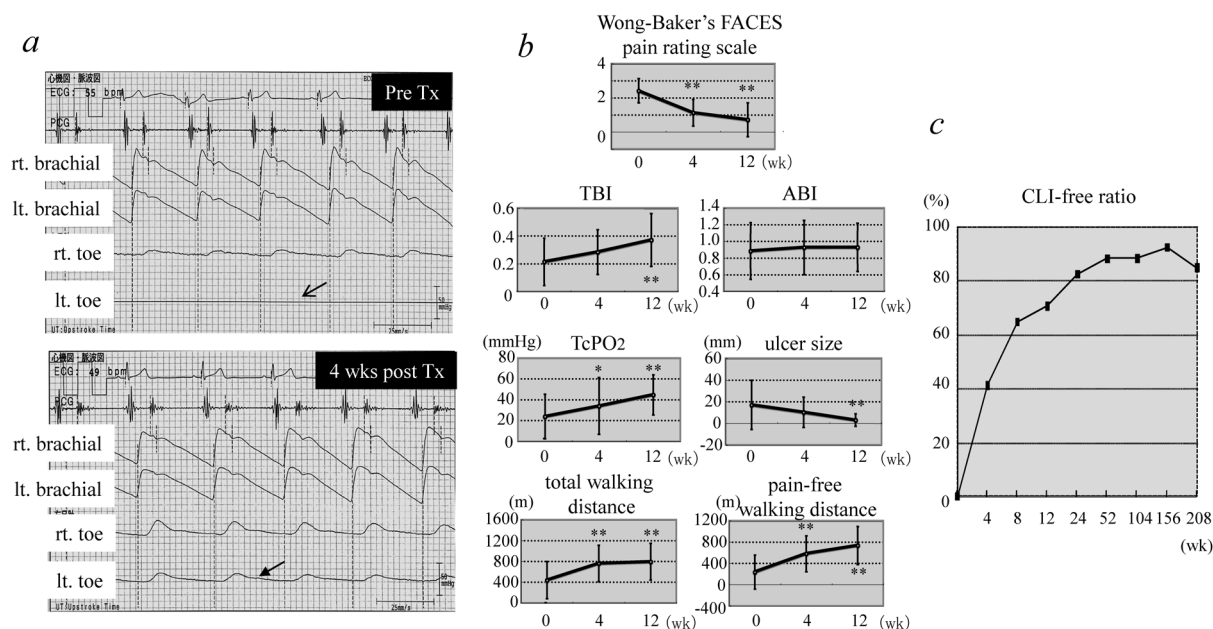


Fig. 4 Potential efficacy of CD34+ cell therapy in patients with critical limb ischemia (CLI)

a: Representative recordings of brachial and toe blood pressures before and 4 weeks after CD34+ cell therapy. Improvement in lt. toe pressure can be observed (arrows). b: Serial changes in various efficacy parameters such as ankle brachial pressure index (ABI), toe brachial pressure index (TBI), and transcutaneous partial oxygen pressure (TcPO₂). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. c: Long-term outcome of CD34+ cell therapy; CLI-free ratio until 4 years after cell injection.

80%の高率であり、各種の安静時疼痛スケール、生理学的血流指標、Quality of Life 指標は治療後経時的に改善した⁸⁾。現在、第 III 相の検証的治験に向けて準備を進めている。

最近、米国からも ASO による CLI 患者 28 例に対する GCSF 動員 CD34 陽性細胞移植の第 I/II 相プラセボ対照試験 (ACT34-CLI 試験) の成績が報告され、非切断生存率がプラセボ群に比して CD34 陽性細胞群で有意に高かったという⁹⁾。Dong ら¹⁰⁾ も、25 例の CLI 患者に対する GCSF 動員 CD34 陽性細胞移植を試み、安静時痛スコアの軽減、足関節上腕血圧比 (ABI)・TcPO₂ の改善を報告している。

また、Tanaka ら¹¹⁾ は、糖尿病性潰瘍患者に対して GCSF 動員 CD34 陽性細胞移植を実施し、潰瘍の治癒、皮膚灌流圧の改善などの効果を報告している。

2. 急性心筋梗塞

急性心筋梗塞に対しては、緊急冠動脈インターベンションによる再疎通療法が普及し、その急性期予後は著しく改善されたが、発症 6 時間以降に再疎通療法が実施された場合には、左室機能温存効果が乏しいことが知られている。再疎通後も左室機能低下が遷延する症例では、慢性期心不全、死亡などの予後不良イベントの発生率が高く、このようなハイリスク患者群に対して、細胞治療による心血管再生効果が期待されている。

筆者ら¹²⁾ は、ヌードラット急性心筋梗塞モデルに対して、健常人末梢血単核球を培養して得られた EPC を静脈内移植し、EPC 移植による梗塞境界領域における毛細血管密度の増加、左室線維化面積の縮小、左室収縮能の改善などの効果があることを報告した。また、健常人の GCSF 動員 CD34 陽性細胞の心筋内移植でも同様の効果があることを示した。この研究では、末梢血単核球の心筋内移植と安全性・有効性を比較したが、単核球移植では細胞用量が高くなると移植後に炎症細胞浸潤・心筋内出血が重篤化し、血管再生・心機能改善効果が低下したが、純化 CD34 陽性細胞移植ではこれらの副反応は認められず、高い有用性が示された¹³⁾。CD34 陽性細胞の単核球に対する優位性を示すもう一つの成績として、Hofmann ら¹⁴⁾ による臨床研究が挙げられる。FDG 標識した単核球または CD34 陽性細胞を急性心筋梗塞患者の冠動脈内に移植し、その後の体内分布を PET でトレースしたところ、単核球移植の場合は移植細胞の多くが肝臓・脾臓に集積し、心臓でも梗塞部位の中心に認め

られたのに対し、純化した CD34 陽性細胞移植では梗塞境界領域に特異性高く集積していた。これらの所見から、冠動脈内投与された CD34 陽性細胞は、効率高く虚血部に集積し、心血管再生に寄与していることが示唆される。

以上の前臨床研究を基盤として、Quyyumi ら¹⁵⁾ は、急性心筋梗塞患者 31 例を対象に自家骨髄 CD34 陽性細胞の冠動脈内移植に関する第 I 相用量漸増試験を実施した。CD34 陽性細胞移植後に心筋シンチによる心筋灌流が改善し、MRI による心筋梗塞範囲が縮小することを示し、これらの効果の用量依存性も報告した。これに引き続き、160 例の急性心筋梗塞患者を対象にした第 II 相ランダム化プラセボ対照試験 (PRESERVE 試験) が実施中で、すでに全症例への治療および経過観察が終了している。本年中に判明する見込みの総括報告に注目が集まっている¹⁶⁾。

3. 慢性虚血性心疾患

慢性虚血性心疾患は、冠動脈硬化を基盤とする、進行性で予後不良の疾患である。本疾患の予後 (心臓死、心筋梗塞発症などの心事故発生率) は、狭心症の自覚の有無によらず、心疾患の客観的な重症度、例えば心筋シンチによる負荷時心筋灌流異常、冠動脈造影による冠動脈罹患枝数、心臓 MRI による左室駆出率などに規定される。慢性重症虚血性心疾患患者に対する薬物療法の効果は少なく、多枝疾患例の 2 年間の死亡率は 18%、左室収縮能低下例では 2~3 年以内に 20~25% の症例が心臓死に至ると報告されている。冠血行再建術 (血管形成術やバイパス手術) の有効性については、可逆的な心筋虚血を有する多枝疾患例あるいは左室収縮能低下例では虚血の軽減を介して予後と心不全徴候を改善し得る (2~3 年以内の心臓死発生率は 1~6%) と報告されている。しかし、慢性重症虚血性心疾患患者の中には、冠動脈病変の解剖学的形態や、繰り返す再狭窄・グラフト閉塞のため、従来の冠血行再建術の適応にならない症例が存在し、現状ではこのような症例に対する有効な治療法は確立されていない。

筆者ら¹⁷⁾ は、ブタ慢性心筋虚血モデルを用いて、自家末梢血 EPC の移植効果について検討した。EPC の分離には、抗ブタ CD34 抗体が市販されていないため、抗 CD31 抗体を用い、非特異的接着細胞の除去も行った。EPC を経カテーテル的に虚血心筋内へ注射したところ、虚血部毛細血管密度の増加、虚血部面積の減少、左室収縮能の改善を認めた。

臨床適用では, Stamm ら¹⁸⁾ が, 慢性心筋梗塞患者に対する冠動脈バイパス術中に自家骨髄 CD133 陽性細胞の心筋内移植も併用し, 術後に左室機能と心筋灌流の改善を確認した。

Losordo ら¹⁹⁾ は, 慢性重症虚血性心疾患 (治療抵抗性狭心症) 患者 24 例に対する GCSF 動員自家 CD34 陽性細胞の経カテーテル的心筋内移植に関する二重盲検プラセボ対照用量漸増試験を行った。同細胞移植による重篤な有害事象は発生せず, 各群の症例数が少ないため治療効果を統計学的には解析していないが, 心筋虚血に関する自他覚所見 (狭心発作頻度, 運動耐容能など) はプラセボ群に比して CD34 陽性細胞移植群で改善度が大きい傾向が認められた。この結果を踏まえて, 167 例の治療抵抗性狭心症患者を対象に, 多施設共同第 II 相試験 (ACT34-CMI 試験)²⁰⁾ が実施され, この大規模試験でも CD34 陽性細胞移植による心筋虚血所見の有意な改善効果が確認されている。また, 移植後の心血管イベント (死亡, 心筋梗塞, 緊急再疎通療法など) の発生頻度も, プラセボ群に比して CD34 陽性細胞移植群で低下する傾向が示された。

Jimenez-Quevedo ら²¹⁾ は, 治療抵抗性狭心症患者 28 例を対象に GCSF 動員自家 CD133 陽性細胞の経カテーテル的心筋内移植に関する二重盲検ランダム化比較試験を行った。CD133 陽性細胞の心筋内移植治療は安全に行われ, 細胞治療群では狭心症重症度や心筋シンチにおける安静時・負荷時スコアの改善などが認められた。以上の成績から, 次期大規模臨床試験の開始が期待されている。

4. 拡張型心筋症

いわゆる非虚血性心疾患に対しても, CD34 陽性細胞移植の臨床的有用性が報告されている。Vrtovec ら²²⁾ は, 拡張型心筋症患者 110 例を対象に, ランダム化オープンラベル試験 (GCSF 動員自家 CD34 陽性細胞の冠動脈内投与群 55 例および標準治療群 55 例) を実施した。治療 1~5 年後の左室駆出率および 6 分間歩行距離は, 標準治療群に比して CD34 陽性細胞移植群で有意に改善し, 5 年間のイベントフリー生存率も, 標準治療群に比して CD34 陽性細胞移植群で有意に良好であった。興味深いことに, 心筋シンチで心筋への移植細胞生着率が高かった症例ほど, 左室駆出率改善効果が大きかった。

拡張型心筋症における CD34 陽性細胞移植の効果発現メカニズムは明らかではないが, 拡張型心筋症の

病態における微小循環障害の関与が報告されており, CD34 陽性細胞による微小循環の改善が, 左室機能改善に寄与した可能性がある。

5. 循環器領域以外への適用

心血管系以外の組織・臓器であっても, 疾患の進展機序に血行障害が関与することがあり, また, 各種の組織再生の過程において血管の再生が必須であることが知られている。これらの知見を背景にして, 循環器疾患以外の疾病に対しても CD34 陽性細胞移植が試みられ, その有用性が報告されはじめている。

整形外科領域では, 難治性骨折に対する適用が試みられている。一般に, 骨折の 90~95% は初回手術で治癒するが, 創部の血流障害を合併する例では治癒が遅延し, 偽関節に至る。Fukui ら²³⁾ は, ヌードラット偽関節モデルに対してヒト CD34 陽性細胞または単核球の局所移植を行ったところ, CD34 陽性細胞群でより優れた骨折治癒が得られ, その機序として創部の血管再生・骨再生効果に加え, 単核球群に比して細胞移植部の炎症が軽微であることを報告した。この報告を基に, Kuroda ら²⁴⁾ は, 偽関節患者 7 例を対象として, GCSF 動員自家 CD34 陽性細胞の骨折部局所移植のパイロット臨床試験を実施した。移植の際には細胞の局所への生着率を高めるため, アテロコラーゲンを足場に用いた。細胞移植は全例で安全に施行された。レントゲンの骨折治癒は, 細胞治療後 12 週で 7 例中 5 例 (71.1%) の高率で認められ, 同研究グループによる自然経過観察例における治癒率 (18.1%) に比して著しい高値を示した。

また, 消化器内科領域では, 肝硬変の再生医療に適用されはじめている。肝硬変の進展過程では, 間質の線維化により, 類洞細胞から肝細胞への血流が障害され, このため肝細胞の再生が阻害されることが知られている。Nakamura ら²⁵⁾ は, ヌードラット肝硬変モデルに対してヒト末梢血 CD34 陽性細胞移植を試み, 肝線維化の抑制, 肝細胞再生の促進, 死亡率の低下を認めた。さらに最近になって, 10 例の肝硬変患者を対象に GCSF 動員自家 CD34 陽性細胞移植を実施したパイロット臨床試験の結果を報告²⁶⁾ した。それによると, 細胞治療後にドプラエコーによる肝血流量の増加, 中~高用量移植例における血清アルブミン値の上昇が認められた。

以上のように, 循環器以外の領域でも CD34 陽性細胞による血管再生治療が組織再生に貢献すると報告されはじめており, 今後の研究の発展が期待される。

おわりに

上述したように、骨髄由来 CD34 陽性細胞の血管再生効果に注目が集まり、まず心血管疾患に対する前臨床試験、それに引き続き臨床試験が試みられてきた。下肢虚血、心筋虚血、拡張型心筋症のいずれの疾患においても、すでに初期臨床試験で良好な成績が報告されており、今後は検証的な第 III 相試験の実施とその成果が待たれるところである。

また、最近では、循環器以外の分野でも、その病態に局所の血流障害が関与する疾患に対して CD34 陽性細胞移植が試みられ、前臨床研究、初期臨床試験で本治療の有用性が報告されている。今後は幅広い分野への治療展開が期待されている。

最後に小児疾患への適応の可能性についても触れておきたい。川崎病による虚血性心疾患、膠原病による末梢動脈血管炎、protein C 欠損症、protein S 欠損症、アンチトロンビン欠損症などによる血栓症発症後に残存する組織虚血、難治性骨折などは骨髄由来 CD34 陽性細胞移植の適応になる可能性があると考えられる。今後の研究の進展を期待したい。

引用文献

- 1) Sidney LE, Branch MJ, Dunphy SE, et al: Concise review: Evidence for CD34 as a common marker for diverse progenitors. *Stem Cells* 2014; **32**: 1380-1389
- 2) Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al: Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997; **275**: 964-967
- 3) Iwasaki H, Kawamoto A, Ishikawa M, et al: Dose-dependent contribution of CD34-positive cell transplantation to concurrent vasculogenesis and cardiomyogenesis for functional regenerative recovery post myocardial infarction. *Circulation* 2006; **113**: 1311-1325
- 4) Norgren L, Hiatt WR, Dormandy JA, et al: Inter-society consensus for the management of peripheral arterial disease (TASC II). *Journal of vascular surgery: official publication, the Society for Vascular Surgery [and] International Society for Cardiovascular Surgery, North American Chapter* 2007; **45**Suppl S: S5-S67
- 5) Kalka C, Masuda H, Takahashi T, et al: Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**: 3422-3427
- 6) Kawamoto A, Katayama M, Handa N, et al: Intramuscular transplantation of G-CSF-mobilized CD34⁺ cells in patients with critical limb ischemia: A phase I/IIa, multicenter, single-blinded, dose-escalation clinical trial. *Stem Cells* 2009; **27**: 2857-2864
- 7) Kinoshita M, Fujita Y, Katayama M, et al: Long-term clinical outcome after intramuscular transplantation of granulocyte colony stimulating factor-mobilized CD34 positive cells in patients with critical limb ischemia. *Atherosclerosis* 2012; **224**: 440-445
- 8) Fujita Y, Kinoshita M, Furukawa Y, et al: Phase II clinical trial of CD34⁺ cell therapy to explore endpoint selection and timing in patients with critical limb ischemia. *Circ J* 2014; **78**: 490-501
- 9) Losordo DW, Kibbe MR, Mendelsohn F, et al: Autologous CD34⁺ cell therapy for critical limb ischemia investigators: A randomized, controlled pilot study of autologous CD34⁺ cell therapy for critical limb ischemia. *Circ Cardiovasc Interv* 2012; **5**: 821-830
- 10) Dong Z, Chen B, Fu W, et al: Transplantation of purified CD34⁺ cells in the treatment of critical limb ischemia. *J Vasc Surg* 2013; **58**: 404-411
- 11) Tanaka R, Masuda H, Kato S, et al: Autologous G-CSF-mobilized peripheral blood CD34(+) cell therapy for diabetic patients with chronic non-healing ulcers. *Cell Transplant* 2014; **23**: 167-179
- 12) Kawamoto A, Gwon HC, Iwaguro H, et al: Therapeutic potential of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia. *Circulation* 2001; **103**: 634-637
- 13) Kawamoto A, Iwasaki H, Kusano K, et al: CD34-positive cells exhibit increased potency and safety for therapeutic neovascularization post myocardial infarction compared with total mononuclear cells. *Circulation* 2006; **114**: 2163-2169
- 14) Hofmann M, Wollert KC, Meyer GP, et al: Monitoring of bone marrow cell homing into the infarcted human myocardium. *Circulation* 2005; **111**: 2198-2202
- 15) Quyyumi AA, Waller EK, Murrow J, et al: CD34⁺ cell infusion after ST elevation myocardial infarction is associated with improved perfusion and is dose dependent. *Am Heart J* 2011; **161**: 98-105
- 16) Poole JC, Quyyumi AA: Progenitor cell therapy to treat acute myocardial infarction: the promise of high-dose autologous CD34⁺ bone marrow mononuclear cells. *Stem Cells Int* 2013; **2013**: 658480
- 17) Kawamoto A, Tkebuchava T, Yamaguchi JI, et al: Intramyocardial transplantation of autologous endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization of myocardial ischemia. *Circulation* 2003; **107**: 461-468
- 18) Stamm C, Westphal B, Kleine HD, et al: Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. *Lancet* 2003; **361**: 45-46
- 19) Losordo DW, Schatz RA, White CJ, et al: Intramyocardial transplantation of autologous CD34⁺ stem cells for intractable angina. A phase I/IIa double-blind, randomized controlled trial. *Circulation* 2007; **115**: 3165-3172
- 20) Losordo DW, Henry TD, Davidson C, et al: Intramyocardial, autologous CD34⁺ cell therapy for refractory angina. *Circ Res* 2011; **109**: 428-436
- 21) Jimenez-Quevedo P, Gonzalez-Ferrer JJ, Sabate M, et al: Selected CD133⁺ progenitor cells to promote angiogenesis in patients with refractory angina. Final results of the PROGENITOR randomized trial. *Circ Res* 2014; **115**: 950-960
- 22) Vrtovc B, Poglajen G, Lezaic L, et al: Effects of intracoronary CD34⁺ stem cell transplantation in nonischemic dilated cardiomyopathy patients: 5-year follow-up. *Circ Res* 2013; **112**: 165-173
- 23) Fukui T, Mifune Y, Matsumoto T, et al: Superior potential of CD34-positive cells compared to total mononuclear

-
- cells for healing of nonunion following bone fracture. *Cell Transplant* 2014; [Epub ahead of print]
- 24) Kuroda R, Matsumoto T, Niikura T, et al: Local transplantation of granulocyte colony stimulating factor-mobilized CD34⁺ cells for patients with femoral and tibial nonunion: Pilot clinical trial. *Stem Cells Transl Med* 2014; **3**: 128–134
- 25) Nakamura T, Tsutsumi V, Torimura T, et al: Human peripheral blood CD34-positive cells enhance therapeutic regeneration of chronically injured liver in nude rats. *J Cell Physiol* 2012; **227**: 1538–1552
- 26) Nakamura T, Torimura T, Iwamoto H, et al: CD34⁺ cell therapy is safe and effective in slowing the decline of hepatic reserve function in patients with decompensated liver cirrhosis. *J Gastroenterol Hepatol* 2014; **29**: 1830–1838, [Epub ahead of print]