

# Les progéniteurs endothéliaux circulants, utilisation potentielle en thérapie cellulaire de l'ischémie

par Georges Uzan

Unité de Recherche INSERM 602, Groupe Hospitalier Paul Brousse, 12, avenue Paul Vaillant Couturier, 94807 Villejuif Cedex. E-mail : uzan@vjf.inserm.fr

Reçu le 1<sup>er</sup> février 2005

## RÉSUMÉ

La découverte de précurseurs circulants des cellules endothéliales (PEC) chez l'homme adulte a révolutionné le concept d'angiogenèse post-natale. De nombreux travaux sont venus confirmer l'existence des PEC, leur origine médullaire et leur aptitude à s'intégrer dans des structures vasculaires dans des sites de néoangiogenèse. Ils suggèrent que les PEC sont naturellement impliqués dans la prévention de l'ischémie en participant directement à l'angiogenèse de réparation. De par leur tropisme pour les sites de néoangiogenèse, les PEC constituent un outil thérapeutique dans la prévention ou la régression de l'ischémie, et une alternative à l'injection locale de facteurs proangiogéniques tels que le VEGF, qui comporte des risques. L'utilité de la transplantation autologue de cellules d'origine médullaire a été confirmée récemment par les premières études cliniques, qui

montrent que des cellules mononucléées médullaires injectées à des patients souffrant d'ischémie des membres inférieurs ou cardiaque améliorent la reperfusion des tissus ischémiques. Cependant il s'agit d'études pionnières, réalisées sur un faible nombre de patients, elles utilisent des populations de cellules peu purifiées et ces essais ne sont pas randomisés. Elles posent cependant des questions importantes, notamment sur l'opportunité de purifier les cellules injectées, et sur la nature des cellules médullaires réellement impliquées dans la régénération vasculaire. Des études supplémentaires sont cependant nécessaires pour améliorer le produit de thérapie cellulaire. Il faudrait utiliser des populations de cellules plus homogènes, valider sur le long terme le bénéfice du traitement et explorer de façon extensive tous les effets secondaires possibles.

## SUMMARY Therapeutic potential of circulating endothelial cells

The discovery of circulating endothelial progenitors (EPCs) in human blood has completely modified the concept of post natal angiogenesis. Many studies have further confirmed the existence of EPCs, their medullar origin and capacity to be integrated in vascular structures at the sites of neoangiogenesis. They suggest that EPCs could be naturally involved in the prevention of ischemia by participating directly to the formation of collateral vessels. These cells have a high tropism for the sites of angiogenesis. They may thus be used as a powerful tool to prevent or treat ischemic diseases and constitute an alternative to the risky local injection of pro-angiogenic growth factors. The efficiency of bone marrow cells autologous transplantation was recently proved by the first clinical

trials. Bone marrow mononuclear cells locally injected to patients with limb or cardiac ischemia have been shown to improve reperfusion in ischemic tissues. These trials are still preliminary: they were performed with heterogeneous cells only on few patients and were not randomized. However they raise important questions, essentially on the necessity of cell purification prior to injection and on the nature of the bone marrow cells which are really involved in ischemic tissue regeneration. Further investigations are then required to improve the cell therapy outcome by 1) using more defined cell population, 2) clearly demonstrating the long term improvement of vascular function and 3) performing extensive analysis of the possible side effects.

## INTRODUCTION

La paroi interne de l'ensemble des vaisseaux sanguins est tapissée d'une monocouche de cellules endothéliales, qui constitue une barrière entre le sang et les tissus sous-

jacents. Cette barrière de cellules est essentielle au bon fonctionnement de la circulation sanguine. Elle est positionnée stratégiquement afin d'influencer le flot sanguin et le développement de nouveaux vaisseaux (angiogenèse). Cependant, les cellules endothéliales ne consti-

tuent pas une barrière étanche, elles permettent les échanges entre le sang et les tissus. Les cellules endothéliales régulent, par exemple, le transport des cellules circulantes, responsables de l'immunité, vers les tissus. Une altération de la monocouche endothéliale a des conséquences importantes, car elle est directement ou indirectement responsable des maladies cardiovasculaires. Ainsi, l'athérosclérose est une maladie qui résulte d'un remodelage tissulaire anormal des vaisseaux, faisant suite à une invasion par des leucocytes activés qui induit une réduction de la lumière de vaisseaux sanguins clés. Des maladies comme le diabète entraînent d'importantes lésions vasculaires, conduisant à des pathologies cardiovasculaires graves. La diminution d'apport en sang (ischémie) et consécutivement en oxygène est à l'origine d'une altération du métabolisme des tissus, conduisant à des lésions, qui dépendent de la gravité de l'ischémie. Ainsi, les conséquences de cette baisse de l'apport sanguin au niveau des tissus seront réversibles quand l'ischémie est modérée ou passagère, et graves voire susceptibles d'aboutir à la destruction du tissu (nécrose, escarres, gangrène, infarctus) lorsque l'ischémie est importante ou chronique.

Depuis quelques années, l'espoir de guérir ces lésions vasculaires par des protocoles de thérapie cellulaire se précise. Plusieurs approches utilisant différents types cellulaires sont tentés. Cet article décrit les approches utilisant des progéniteurs capables de se différencier en cellules endothéliales.

## LES PROGÉNITEURS ENDOTHÉLIAUX CIRCULANTS

La découverte en 1997 de progéniteurs circulants des cellules endothéliales (PEC) chez l'homme adulte a complètement changé notre vision de l'angiogenèse post-natale (Asahara *et al.*, 1997). Jusque là, on pensait que la formation de nouveaux vaisseaux se faisait à partir de vaisseaux préexistants (angiogenèse), alors que la croissance de vaisseaux à partir de cellules souches était réservée aux stades précoces de l'embryogenèse. Depuis, de nombreux travaux sont venus confirmer l'existence de ces précurseurs, leur origine médullaire (Shi *et al.*, 1998) et leur aptitude à s'intégrer dans des structures vasculaires (pour revue Carmeliet & Luttun, 2001). Certains facteurs de croissance comme le VEGF ou le G-CSF, ou des médicaments comme les statines augmentent le flux de progéniteurs endothéliaux de la moelle vers le sang. Des populations enrichies en PEC peuvent être obtenues en triant les cellules sanguines à l'aide de différents marqueurs, tels que CD34, CD 133, Flk-1/KDR (Peichev *et al.*, 2000) ou des marqueurs spécifiques de l'endothélium tels que CD146.

Une population de cellules endothéliales circulantes matures, probablement détachées des vaisseaux sanguins existe aussi dans le sang périphérique. En terme de marqueurs, ces cellules ont un phénotype comparable à celui des cellules endothéliales matures des vaisseaux. Leur nombre augmente dans certaines pathologies comme l'infarc-

tus du myocarde (Mutin *et al.*, 1999). En culture, ces cellules adhèrent rapidement et ont un pouvoir de prolifération limité, ce qui permet de les distinguer des PEC, qui mettent plus de temps à adhérer et qui ont un pouvoir de prolifération beaucoup plus important. Ainsi, lorsque les PEC sont mis en culture, ils forment des foyers de cellules qui croissent lentement pendant environ dix jours, puis ces cellules acquièrent un haut potentiel prolifératif, qui se maintient pendant plusieurs semaines.

De nombreuses expériences, dont la plupart sont basées sur des greffes de moelle, montrent que les PEC ont un tropisme exclusif pour les sites de néoangiogenèse (Rafii *et al.*, 2003). Dans ces sites, les PEC qui sont circulantes et immatures, deviennent adhérentes et se différencient en cellules endothéliales fonctionnelles qui s'incorporent aux nouveaux vaisseaux. Les mécanismes responsables de ces changements phénotypiques et fonctionnels ne sont pas encore très bien connus, mais il est probable que l'hypoxie et les conditions inflammatoires qui caractérisent les tissus ischémiques jouent un rôle dans ces processus.

## QUELLES SONT LES CELLULES SOUCHES À L'ORIGINE DES PROGÉNITEURS ENDOTHÉLIAUX CIRCULANTS ?

La moelle osseuse contient un grand nombre de cellules souches, dont les relations de filiation ne sont pas clairement établies. La cellule souche considérée comme étant la plus probablement à l'origine des PEC est une cellule bipotente, capable de générer à la fois les cellules endothéliales et les cellules hématopoïétiques, appelée l'hémangioblaste. L'existence d'une telle cellule souche est admise depuis longtemps chez l'embryon, bien que réellement démontrée récemment (Eichman *et al.*, 1997). Des études réalisées en dilution limite sur des cellules de moelle osseuse adulte ou de cordon ombilical, triées sur l'expression des marqueurs CD34 et KDR (récepteur du VEGF) ont montré que des cellules souches ayant des caractéristiques d'hémangioblastes existaient après la naissance. La population de cellules triées selon ces critères a des caractéristiques de cellules souches hématopoïétiques très précoces, capables de s'auto-renouveler, et pouvant être cultivées à très long terme. Une sous-population de ces cellules est capable de générer de façon clonale, à la fois des cellules hématopoïétiques et des cellules endothéliales (Pelosi *et al.*, 2002). L'hypothèse la plus couramment admise est que les PEC sont issus de cellules médullaires, analogues aux hémangioblastes décrits chez l'embryon. L'argument le plus fort d'une origine hémangioblastique des PEC provient de patients atteints de leucémie myéloïde chronique (Gunsilius *et al.*, 2000). Cette leucémie est caractérisée par une translocation chromosomique unique t(9;22), qui produit un gène de fusion bcr/abl. Dans cette étude, les auteurs ont recherché la translocation dans les cellules endothéliales circulantes des patients. Une proportion significative des

cellules endothéliales circulantes du sang périphérique mobilisé portent le gène de fusion bcr/abl. Ce gène de fusion est un marqueur clonal et son expression dans les cellules endothéliales et les cellules hématopoïétiques va dans le sens de l'existence de cellules souches communes aux deux types cellulaires.

Cependant, d'autres types de cellules souches sont capables de se différencier en cellules endothéliales. Une étude réalisée dans les cellules embryonnaires de souris a permis de mettre en évidence une cellule souche vasculaire capable de donner à la fois des cellules endothéliales et des cellules de muscle lisse (Yamashita *et al.*, 2000). Plus récemment, des cellules souches à large spectre de différenciation appelées les MAPC ont été mises en évidence dans la moelle. Ces cellules sont capables de se différencier non seulement en cellules mésenchymateuses, mais également en cellules ayant des caractéristiques endodermique et ectodermiques. Injectées dans des blastocystes de souris, ces cellules participent à la formation de la plupart des cellules somatiques (Jiang *et al.*, 2002). La différenciation des MAPC en cellules endothéliales a également été décrite (Reyes *et al.*, 2002).

Par ailleurs, d'autres études ont montré que des cellules ayant des caractéristiques de cellules souches mésenchymateuses circulent dans le sang périphérique et dans le sang de cordon (Huss *et al.*, 2000; Kuznetsov *et al.*, 2001; Bieback *et al.*, 2005). Plus récemment, une nouvelle sorte de cellules souches somatiques ayant un très large pouvoir de différenciation ont été identifiées dans le sang de cordon. Ces cellules appelées "unrestricted somatic stem cells", ont une très grande capacité d'auto-renouvellement et sont capables de se différencier en cellules de type mésodermique, endodermique et ectodermique (Kögler *et al.*, 2004).

Une hypothèse intéressante concernant l'origine des PEC est qu'elles dérivent de cellules circulantes multipotentes, dont on révèle le caractère endothélial en les cultivant d'emblée dans des milieux inductifs. Il pourrait aussi exister un compartiment de progéniteurs endothéliaux, plus ou moins différenciés, dont la composition changerait au cours de la vie. Cette hypothèse est étayée par une étude récente, qui montre que les PEC de sang de cordon et de sang périphérique sont produit par des cellules souches ayant des propriétés différentes (Ingram *et al.*, 2004).

### **RÔLE PHYSIOLOGIQUE POTENTIEL DES PEC ET RÔLE POTENTIEL DANS L'ANGIOGÈNESE TUMORALE**

Des expériences récentes réalisées sur des hommes ayant subi une transplantation cardiaque de donneurs de sexe féminin montrent que les PEC sont naturellement intégrés dans les vaisseaux des tissus cardiaques (Quaini *et al.*, 2002). Ceci suggère que ces progéniteurs participent naturellement à la prévention de l'ischémie, en participant directement à l'angiogenèse de réparation. Une

autre étude confirme cette hypothèse en montrant que l'infarctus aigu du myocarde induit la mobilisation des PEC en périphérie. Enfin, une augmentation des facteurs de risque d'infarctus du myocarde serait corrélée avec la baisse du nombre de progéniteurs endothéliaux dans le sang circulant (Vasa *et al.*, 2001). Ces observations indiquent que les PEC peuvent être impliqués dans la prévention de l'ischémie et pourraient donc être utilisés comme outil dans des stratégies d'angiogenèse thérapeutique, ou plus précisément de néo-vascularisation. Cette possibilité a été explorée dans de nombreuses études pré-cliniques, qui se sont avérées prometteuses. Cependant, ce type de thérapie cellulaire est-il dépourvu de risques ? Si le rôle de l'angiogenèse dans la progression tumorale est établi depuis plusieurs années, la participation des PEC à ce processus est encore mal connue. Cependant, l'équipe de Rafii a démontré récemment que des souris ayant un défaut d'angiogenèse (souris mutantes sur des gènes de la famille *id*) sont résistantes à la greffe de cellules tumorales. La greffe de cellules médullaires provenant de souris sauvages confère à ces souris la permissivité tumorale, selon un mécanisme qui fait intervenir les PEC de la souris donneuse (Lyden *et al.*, 2001). Par contre, la greffe de cellules provenant de souris mutantes *id* ne lève pas la résistance aux tumeurs. Ces données sont les premières qui montrent une relation directe entre recrutement des PEC et le développement de tumeurs. D'autres études chez l'animal ont montré que les PEC pouvaient être recrutés par l'angiogenèse tumorale, comme cela a été par exemple montré par PET scan dans un modèle de tumeur chez le rat (Tamura *et al.*, 2004), ou dans un modèle de gliome humain, développé chez la souris SCID. Une fois les cellules tumorales greffées, les PEC sont injectées par voie intraveineuse. Les cellules endothéliales qui en dérivent sont alors retrouvées au voisinage des tumeurs, ce qui confirme le tropisme de ces cellules pour les sites angiogéniques (Moore *et al.*, 2005). Ces observations montrent qu'utiliser les PEC en thérapie cellulaire n'est pas dénué de risques. Il faut donc bien définir les populations de patients à traiter et les doses de cellules à injecter avant de lancer des études cliniques à grande échelle.

### **CELLULES ENDOTHÉLIALES CIRCULANTES COMME SOURCE DE THÉRAPIE CELLULAIRE DE L'ISCHÉMIE**

L'angiogenèse thérapeutique constitue un enjeu important dans le traitement de l'ischémie cardiaque ou des membres inférieurs. Parmi les stratégies testées ces dernières années, l'injection locale de facteurs pro-angiogéniques tels que le VEGF est l'une des plus explorées. Cependant, des données récentes montrent que le VEGF, même s'il a un réel pouvoir angiogénique, pouvait conduire à la formation d'hémangiomes lorsqu'il était délivré de façon continue par le biais de rétrovirus (Lee *et al.* 2000). Ce type d'approche peut donc être risqué et il est fondamental de pouvoir contrôler de façon précise les doses

délivrées, ainsi que leur protocole d'administration, avant d'étendre cette application thérapeutique.

La découverte des PEC offre une alternative prometteuse aux approches utilisant les facteurs de croissance pro-angiogéniques. Cette possibilité thérapeutique a été explorée dans un nombre croissant d'expériences réalisées chez l'animal, qui indiquent que les cellules endothéliales circulantes peuvent corriger des ischémies telles que celle du myocarde ou des membres inférieurs. L'équipe d'Asahara (Kalka *et al.*, 2000) a transplanté des progéniteurs endothéliaux provenant de sang périphérique dans des souris nude athymiques dont une artère fémorale a été excisée. Chez ces souris, cette opération provoque généralement la nécrose du membre suivi d'une auto-amputation. La transplantation de progéniteurs endothéliaux humains de sang périphérique a permis de sauver le membre ischémique dans 60 % des animaux testés, contrairement aux souris contrôles transplantées avec des cellules endothéliales microvasculaires humaines (lignée HMVEC), ou auxquelles a été injecté du milieu conditionné par des progéniteurs endothéliaux de sang périphérique.

Murohara *et al.*, 2000) ont, par ailleurs, obtenu des résultats équivalents en transplantant localement des progéniteurs endothéliaux circulants de sang de cordon à des rats nude ayant subi une ischémie du membre inférieur. Ces auteurs montrent de plus que les progéniteurs endothéliaux provenant du sang de cordon ou du sang périphérique induisent de la même façon une augmentation de la densité des vaisseaux au niveau de l'ischémie ainsi que le rétablissement de la circulation sanguine.

La limite de l'utilisation des PEC pour la thérapie cellulaire de l'ischémie est la faible fréquence de ces cellules dans le sang périphérique. Ceci impose donc que les PEC soient préalablement amplifiés, avec le risque d'une perte des propriétés thérapeutiques de ces cellules car l'amplification entraîne une différenciation des PEC en cellules endothéliales. Notre laboratoire étudie de façon précise l'évolution du phénotype des PEC au cours de l'amplification. Nous avons ainsi montré que même après plusieurs cycles d'amplification, les PEC conservent un fort pouvoir de prolifération, une réactivité importante aux facteurs de croissance, indiquant la conservation d'un certain caractère immature (Bompais *et al.*, 2004).

Afin de contourner la difficulté de la rareté des PEC qui rend leur purification difficile, des équipes cliniques ont injecté des cellules mononucléées de la moelle, partant du principe que les PEC étaient d'origine médullaire et que la moelle contenait de nombreux types cellulaires qui pouvaient favoriser l'angiogenèse. Ces cellules ont été injectées à des patients souffrant d'ischémie des membres inférieurs (Tateishi-Yuyama *et al.*, 2002) ou d'ischémie cardiaque (Strauer *et al.*, 2002). D'autres essais cliniques ont été réalisés par la suite. Tous montrent que l'injection de cellules médullaires autologues sont bien tolérées par les patients et apportent un relatif effet thérapeutique. Cependant il s'agit d'études pionnières, réalisées sur un faible nombre de patients, non randomisées, et utilisant des populations de cellules peu purifiées. Ainsi, on ne sait pas quelles sont les cellules réellement actives dans le produit de thérapie cellulaire.

Il n'est pas du tout exclu que les cellules injectées agissent de façon paracrine. L'efficacité à long terme de cette thérapie est actuellement controversée.

Ces essais cliniques posent cependant des questions importantes, notamment sur l'opportunité de purifier les cellules injectées. En effet, parmi les cellules mononucléées de la moelle, les cellules hématopoïétiques et stromales sécrètent des facteurs de croissance proangiogéniques. Par ailleurs, les différentes composantes du stroma de la moelle, en particulier les composantes vasculaires peuvent participer à la réparation du tissu ischémique. Il est cependant probable que parmi les cellules injectées, les progéniteurs endothéliaux jouent un rôle important dans la régénération vasculaire de ces tissus.

Il est donc important de continuer les recherches pré-cliniques et cliniques dans deux directions, l'une utilisant des cellules peu purifiées, et l'autre utilisant des progéniteurs endothéliaux circulants ou médullaires, davantage purifiés et caractérisés.

## CONCLUSIONS

L'ensemble de ces données indique que les cellules endothéliales circulantes pourraient constituer un outil thérapeutique intéressant pour revasculariser les tissus ischémiques. Le fait que ces cellules présentent un tropisme très fort pour les sites de néoangiogenèse les rend particulièrement intéressantes. Il est probable que l'inflammation et/ou l'hypoxie ont un puissant pouvoir attractif sur les PEC. Dans ce contexte, l'amplification *in vitro* des angioblastes circulants pourrait constituer un enjeu clinique considérable (Carmeliet & Luttun 2001).

Enfin, les pathologies avec atteinte ischémique affectent en général des personnes plutôt âgées. Cependant, le nombre de PEC et leur efficacité diminuent avec l'âge. Ceci limite donc probablement l'efficacité de la thérapie cellulaire utilisant des cellules circulantes ou médullaires. Une alternative utilisant le sang de cordon comme source de cellules souches thérapeutiques est sérieusement envisagée, même si la tolérance de ces cellules par le système immunitaire reste à évaluer. Malgré cela, même si la thérapie cellulaire exige un traitement immunosuppresseur, elle reste dans certains cas le seul espoir thérapeutique.

## BIBLIOGRAPHIE

- Asahara T., Murohara T., Sullivan A., Silver M., van der Z. R., Li T., Witzenbichler B., Schatteman G. & Isner J. M., Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*, 1997, 275, 964-967.
- Bieback K., Kem S., Kluter H. & Eichler H., Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Stem Cells*. 2004, 22, 625-634.
- Bompais H., Chagraoui J., Canron X., Crisan M., Liu X. H., Anjo A., Tolla-Le Port C., Leboeuf M., Charbord P., Bikfalvi A. & Uzan G., Human endothelial cells derived from circulating progenitors display specific functional properties compared with mature vessel wall endothelial cells. *Blood*, 2004, 103, 2577-2584.

- Carmeliet P. & Luttun A., The emergin role of the bone marrow-derived stem cells in (therapeutic) angiogenesis. *Thromb. Haemost.*, 2001, 86, 289-297
- Eichmann A., Corbel C., Nataf V., Vaigot P., Breant C. & Le Douarin N. M., Ligand-dependent development of the endothelial and hemopoietic lineages from embryonic mesodermal cells expressing vascular endothelial growth factor receptor 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, 94, 5141-5146.
- Gunsilius E., Duba H. C., Petzer A. L., Kahler C. M., Grunewald K., Stockhammer G., Gabl C., Dirnhofer S., Clausen J. & Gastl G., Evidence from a leukaemia model for maintenance of vascular endothelium by bone-marrow-derived endothelial cells. *Lancet*, 2000, 355, 1688-1691
- Huss R., Lange C., Weissinger E. M., Kolb H. J. & Thalmeier K. Evidence of peripheral blood-derived, plastic-adherent CD34(-/low) hematopoietic stem cell clones with mesenchymal stem cell characteristics. *Stem Cells*, 2000, 18, 252-260.
- Jiang Y., Jahagirdar B. N., Reinhardt R. L., Schwartz R. E., Keene C. D., Ortiz-Gonzalez X. R., Reyes M., Lenvik T., Lund T., Blackstad M., Du J., Aldrich S., Lisberg A., Low W. C., Largaespada D. A. & Verfaillie C. M., Nuriptency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*, 2002, 418, 41-49.
- Kalka C., Masuda H., Takahashi T., Kalka-Moll W. M., Silver M., Kearney M., Li T., Isner J. M. & Asahara T., Transplantation of *ex vivo* expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000, 97, 3422-3427.
- Kalka C., Takahashi T., Masuda H., Asahara T. & Isner J. M., Vascular endothelial factor (VEGF): therapeutic angiogenesis and vasculogenesis in the treatment of cardiovascular disease. *Med. Klin.*, 1999, 94, 193-201.
- Kuznetsov S. A., Mankani M. H., Gronthos S., Satomura K., Bianco P. & Robey P. G., Circulating skeletal stem cells. *J. Cell. Biol.*, 2001, 153, 1133-1140.
- Lee R. J., Springer M. L., Blanco-Bose W. E., Shaw R., Ursell P. C. & Blau H. M., VEGF gene delivery to myocardium: deleterious effects of unregulated expression. *Circulation*, 2000, 102, 898-901
- Lin Y., Weisdorf D. J., Solovey A. & Hebbel R. P., Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood. *J. Clin. Invest.*, 2000, 105, 71-77.
- Lyden D., Hattori K., Dias S., Costa C., Blaikie P., Butros L., Chadburn A., Heissig B., Marks W., Witte L., Wu Y., Hicklin D., Zhu Z., Hackett N. R., Crystal R. G., Moore M. A., Hajjar K. A., Manova K., Benezra R. & Rafii S., Impaired recruitment of bone-marrow derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. *Nat. Med.*, 2001, 7, 1194-1201.
- Moore X. L., Lu J., Sun L., Zhu C. J., Tan P. & Wong M. C., Endothelial progenitor cells' "homing" specificity to brain tumors. *Gene Ther.*, 2004, 11, 811-818.
- Murohara T., Ikeda H., Duan J., Shintani S., Sasaki K., Eguchi H., Onitsuka I., Matsui K. & Imaizumi T., Transplanted cord blood-derived endothelial precursor cells augment postnatal neovascularization. *J. Clin. Invest.*, 2000, 105, 1527-1536.
- Mutin M., Canavy I., Blann A., Bory M., Sampol J. & Dignat-George F., Direct evidence of endothelial injury in acute myocardial infarction and unstable angina by demonstration of circulating endothelial cells. *Blood*, 1999, 93, 2951-2958
- Quaini F., Urbanek K., Beltrami A. P., Finato N., Beltrami C. A., Nadal-Ginard B., Kajstura J., Leri A. & Anversa P., Chimera of the transplanted heart. *N. Engl. J. Med.*, 2002, 346, 5-15.
- Murohara T., Ikeda H., Duan J., Shintani S., Sasaki K., Eguchi H., Onitsuka I., Matsui K. & Imaizumi T., Transplanted cord blood-derived endothelial precursor cells augment postnatal neovascularization. *J. Clin. Invest.*, 2000, 105, 1527-1536.
- Peichev M., Naiyer A. J., Pereira D., Zhu Z., Lane W. J., Williams M., Oz M. C., Hicklin D. J., Witte L., Moore M. A. & Rafii S., Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood*, 2000, 95, 952-958.
- Pelosi E., Valtieri M., Coppola S., Botta R., Gabbianelli M., Luth V., Marziali G., Masella B., Muller R., Sgadari C., Testa U., Bonanno G. & Peschle C., Identification of the hemangioblast in postnatal life. *Blood*, 2002, 100, 3203-3208.
- Rafii S. & Lyden D., Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. *Nat. Med.*, 2003, 9, 702-712.
- Reyes M., Dudek A., Jahagirdar B., Koodie L., Marker P. H. & Verfaillie C. M., Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow. *J. Clin. Invest.*, 2002, 109, 337-346.
- Shi Q., Rafii S., Wu M. H., Wijelath E. S., Yu C., Ishida A., Fujita Y., Kothari S., Mohle R., Sauvage L. R., Moore M. A., Storb R. F., Hammond W. P., Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood*, 1998, 92, 362-367.
- Strauer B. E., Brehm M., Zeus T., Kosterling M., Hernandez A., Sorg R. V., Kogler G. & Wemet P., Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation*, 2002, 106, 1913-1918.
- Tamura M., Unno K., Yonezawa S., Hattori K., Nakashima E., Tsukada H., Nakajima M., Oku N., *In vivo* trafficking of endothelial progenitor cells their possible involvement in the tumor neovascularization. *Life Sci.*, 2004, 75, 575-584.
- 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, 427-435.
- Vasa M., Fichtlscherer S., Aicher A., Adler K., Urbich C., Martin H., Zeiher A. M. & Dimmeler S., Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ. Res.*, 2001, 89, 1-7
- Yamashita J., Itoh H., Hirashima M., Ogawa M., Nishikawa S., Yurugi T., Naito M., Nakao K. & Nishikawa S., Flk1-positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors. *Nature*, 2000, 408, 92-96.