



桜田一洋 氏

ものをつくる方法です。二つ目は、ES細胞はいろいろな株が樹立され、遺伝子の操作などできますから、種々雑多なES細胞をつくり、ESバンクを作るのもよいと思います。三つ目は、免疫的な攻撃を受けないような遺伝子操作を行い、万人に移植可能なES細胞、ユニバーサルESをつくることも一つの方法だと思います。四つ目は、ES細胞と自分の体細胞を融合させる方法です。融合させた細胞は4倍体のままですが、ES細胞のような分化能を獲得することが報告されています。4倍体の細胞が移植できるかどうかという別な問題がありますが、大きなストラテジーとしては、少なくともその四つぐらいはあるのではないかと考えています。

小室 臨床応用に最も近いのはどれですか。

山下 将来性があるのは、ユニバーサルESだと思います。これは心臓用、神経用というように、適切な分化傾向をもつよう分化させた細胞をアンプルに入れ、工場のようなところで品質管理しながら製品化するのです。たとえば心臓のカテーテルをするとき一緒にそのアンプルを溶かして打てばいい。そうすると日常の診療レベルで使え、産業としての展開が可能です。

梅澤 ユニバーサルESの際、免疫の拒絶の問題で、移植抗原についてはいくつ潰せばよいのでしょうか。

山下 それはまったくわかりません。潰したただ

けでは駄目かもしれないという話もありますし、逆に細胞レベルの移植でバラバラと入ったものにはあまり免疫は働かないのではないかと話もあります。

桜田 あまり潰し過ぎるとウイルス感染に対する防御が効かなくなる危険性があるので、どこを潰すかという問題も出てきます。ウイルス感染があまり問題にならない組織であればよいのですが、組織適合性抗原はウイルスに対する防御の機構もあると思うので、安全性と有効性に関しては今後の研究課題だと思います。

小室 未分化な細胞が移植されると、良性とはいえ腫瘍をつくるという問題があります。これに対してはどのような研究がなされているのですか。

山下 山中伸弥先生（京大再生研（奈良先端医大））のグループは、ES細胞のERasという因子の機能を阻害することで、分化全能性を維持しつつ、腫瘍形成能を抑えることに成功しています。ERas遺伝子を潰したES細胞を移植することも可能かもしれませんが、また、未分化な細胞だけに機能する自殺遺伝子を導入することも一つの方法です。

いずれにしろ、現在のES細胞ではそのまま移植することは難しく、造腫瘍性をなくしたものをつくる必要があります。

■臨床応用に最も近い疾患

小室 ES細胞を臨床に最も早く応用できるのは、どんな疾患だと思われませんか。一般的にはパーキンソン病といわれていますが。

山下 パーキンソン病か糖尿病だと思います。膵β細胞は分化させることさえできれば、臨床に使う日は近いような気がします。膵β細胞をカプセルに入れ、完全に隔離した状況で体の中に埋め、それが血糖を感知してインスリンを適切に出してくれればいい。問題が起これば取り出すことができますので、体の中に完全に取り

込ませる方法よりは安全です。

桜田 カプセルの中に入れるという方法は、パーキンソン病の治療にも使える可能性があります。パーキンソン病の治療で今いちばん有力なのは、脳内にドパミンを補充するというものですので、戦略としてはβ細胞の場合と似ていますね。



梅澤明弘 氏

間葉系幹細胞研究の現状

■間葉系細胞とは何か

小室 ES細胞は、移植する細胞の分化ウインドウ、拒絶や腫瘍性という課題が残されていますが、それに対して、それらの問題が比較的少なく、また多分化能をもった細胞として間葉系の幹細胞が注目されています。そもそも間葉系とはどういった細胞なのでしょう。研究の現状など梅澤先生からお話いただけますか。

梅澤 教科書には間充織を合成する細胞と書かれています。ですからほとんどの組織に存在します。たとえば心臓では心筋の間に存在している線維芽細胞は間葉系です。肺では、肺胞上皮の基底膜下に存在し、血管以外の細胞は間葉系の細胞です。また皮膚については、表皮の基底膜の下、真皮に存在する細胞は、脂肪細胞を含めて全部を間葉系と呼びます。

小室 オリジンは何ですか。

梅澤 オリジンは中胚葉です。ところで、神経の間に存在するマイクログリアは中胚葉由来なのですか。

桜田 それは現在議論されているところですが、最近、理研の西川伸一先生のグループが間葉系の幹細胞を中胚葉とは別に誘導できるということを報告されています。ですから、間葉系が独自に分化する可能性も示唆されています。

梅澤 間葉系細胞はいくつかの組織から得るこ

とができます。いま臨床で主に使われているのは骨髄間質由来の間葉系で、今年度にはフェーズIの安全性試験が厚生労働省へ申請されるだろうといわれています。

一方、研究段階としては、ペニスの包皮に存在する真皮の間葉系細胞、臍帯血由来の間葉系細胞があります。また、胎盤の間葉系細胞は非常にたくさんの量を得ることができますし、今まで廃棄されてきた臍帯血や胎盤が臨床で使えるとなると、すべてのHLAをカバーできるほどの種類が得られるだろうと予想されています。また、間葉系細胞で最も増殖能が高いのは、死亡胎児由来のものです。2004年7月、再生医療に死亡胎児を利用する治療が公式に認められました。今後死亡胎児については倫理的なことを含めて、間葉系細胞を用いた治療に非常に重要な意味もつことになると思います。

また、脂肪組織については、美容形成で吸引し、その脂肪組織を使って骨、軟骨、脂肪、骨格筋、心臓、神経、さらに肝臓までつくろうという研究者もいます。

もう一つ注目したいのは子宮内膜、月経血です。子宮内膜は生検で取ってくる必要がありますが、月経血は痛みを伴わないというメリットがあります。もちろん倫理的にはきわめて慎重を要します。また、大量に得られるお母さんの子宮内膜や月経血を、子供の酵素欠損、筋ジス

トロフィー、リソソーム病のほか、ちょっと聞き慣れないかもしれませんが、異染性脳白質異常栄養症、ニューロゴーシェ、ムコ多糖症、ハンター症候群、ハーラー症候群などの子供たちの酵素補充の供給源として使うことができます。

小室 いろいろな供給源から取ってきた間葉系の細胞は同じものなのでしょうか。

梅澤 形態学的にはとてもよく似ており、すべて線維芽細胞のように見えますが、実際はまったく違います。増殖期における細胞の遺伝子発現を DNA チップで網羅的に調べると、取ってきた元の組織の形質を見事に維持しています。たとえば子宮内膜に由来するものは、ホルモンの受容体の発現が高く、骨髄由来の細胞は骨形成因子である BMP の発現が高い。軟骨の場合は DNA チップだけではなく、ランダムシーケンスによる解析を行っても、遺伝子発現のトップ 10 は骨質に由来するものばかりです。

しかし、間葉系の細胞は *in vitro* では多分化能をもっています。たとえば脂肪細胞由来であっても脂肪のほかに骨、骨格筋に分化させることができます。ただ、増殖期においては元の組織の形質を保持しているのです。

間葉系の細胞が元の組織の形質を保持しているのは、おそらくメチル化で規定されているためだと考えられます。つまり、ゲノム上にきちっとしたエピジェネティクスが刷り込まれていて、たとえ分裂しても同じメチル化が維持されるため、決してほかの細胞になることはありません。ですから元の組織の枠には入っているけれども、その枠の中では多分化能をもっているのです。

■間葉系幹細胞の起源と治療におけるメリット

小室 いろいろなところから間葉系の細胞が取れるというお話でしたが、その中に間葉系の幹細胞がごく一部入っているという理解でいいの

ですか。

梅澤 これは二つの可能性があります。幹細胞がごく一部存在しているのだとしたら、混ざった状態で培養すると分化が進んだ前駆細胞は増殖できませんので、最終的には増殖能をもつ間葉系幹細胞が集団のほとんどを占めるようになると考えられます。

もう一つは、試験管の中ではある程度コミットした細胞が脱分化し、多分化能を有しているだけで、結局どの細胞も一緒に、間葉系幹細胞という細胞自体はまったく存在しないという説もあります。

桜田 起源細胞についての研究はまだあまり進んでいないのです。非造血系の幹細胞を組織から分離し、そのまま FACS で同定するという研究は非常に遅れています。これは、たとえば骨髄中では血液系の細胞と比較して非造血系の比率が非常に小さいからです。その起源になる細胞はいったい何なのかというのは間葉系の幹細胞の今後の研究でもとくに重要なポイントだと思います。

梅澤 そうですね。間葉系のよい点は、大量に増やすことができることです。骨髄由来の間葉系幹細胞は 1 回成功すれば 30 回は分裂しますので、1 つの細胞から 10^9 ($=2^{30}$) 以上の細胞を得ることができます。

小室 ヒト由来の骨髄幹細胞でも可能なのですか。

梅澤 ヒトでもまったく問題なく増えます。ただし、最初の分裂が起こるかどうかはかなり重要です。たとえば臍帯血由来の間葉系は、4 検体に 1 検体ぐらいいくも増えてこない。一方、月経血などは 100% 増えてきます。骨髄由来の間葉系細胞に関しては、産業技術総合研究所の培養技術は非常に進んでいて、患者の血清濃度 15% の条件下で失敗なく増やすことができます。臨床においては培養した細胞が 100% 分裂できることが要求されます。

従来、骨の欠損に対しては、腸骨を取り出して砕いたものを欠損部に入れる方法がとられてきました。腸骨を採取することは非常に痛みを伴います。ですから骨髄由来間葉系細胞が培養できて増やすことができるのであれば、大変大きなメリットになります。にもかかわらず、この治療が遅れているのは、間葉系幹細胞の骨への分化能が完璧ではないからです。骨のマーカはあるけれども見事な骨、硬い骨ができるかというとなかなか難しい。

これは軟骨においても同様です。たとえば、お相撲さんの軟骨が壊れているので新たにつくって入れてあげる場合、軟骨は弾性が重要ですが、荷重に耐えられるような軟骨ができない現状なので間葉系幹細胞ではなく、ほとんど増えない軟骨細胞が使われているのです。

さらに形成外科の領域で間葉系を移植すると、傷の治りが非常にいいという説も知られています。

小室 それはどうして治りがよいのですか。血管ができるからではなくて、皮膚ができるからですか。

梅澤 皮膚の場合、治りがよいというのは瘢痕ができないということです。周りの膠原線維の産生が低下すると見た目がきれいに治癒します。これは、移植した骨髄の間葉系細胞自体がきれいな真皮をつくるという説と、間葉系が出しているサイトカインが傷の治りをよくするという説があります。間葉系細胞を打たなくても、bFGFといったサイトカインを打てば傷がきれいに治るのは研究レベルで知られています。

■どこまで臨床応用されているか

小室 間葉系幹細胞はES細胞のように何にでも分化するのではなく、部分全能性しかありません。いまのところ、分化するとわかっている細胞にはどのようなものがありますか。

梅澤 骨、軟骨、脂肪、骨格筋、心臓、神経で

す。肝臓については、 α フェトプロテインは出るけれども、アルブミンは出ないという理由から、肝様細胞とされています。また、 β 細胞はES細胞と同じ問題点がありまして、インスリンを産生するものの、グルコースに反応せず、神経のマーカーはいつも同時に出ているというのが現状です。

小室 そのようになり多くの細胞に分化することはわかっているけれども、骨も軟骨も完全ではないわけですね。臨床に使われている例ではどんなものがありますか。

梅澤 米国ではリソソーム病の治療に、酵素の補充を目的に間葉系細胞が使われています。この場合は他家移植ですので、ユニバーサルESに対してユニバーサルな間葉系幹細胞といわれています。異染色性白質ジストロフィーやムコ多糖症VII型の患者にも、酵素補充を目的に、ユニバーサルな間葉系幹細胞が使われています。

小室 その幹細胞はどこから取ってきたのですか。

梅澤 骨髄です。骨髄由来の幹細胞は、患者が必要とする酵素もレベルは非常に低いけれども出しています。現在は酵素補充療法でやっていますが、もともとの細胞が生着するだけで酵素を産生してくれるので助けることが可能です。ユニバーサル細胞にするために特別に行うことはありませんが、品質管理規則(GMP)の基準を満たす必要はあります。

小室 米国 Osiris Therapeutics 社が樹立した細胞はユニバーサルではないのですか。Osiris 社の間葉系幹細胞は、アロ抗原による拒絶反応は問題にならないのですか。

梅澤 Osiris 社の細胞はユニバーサルな間葉系細胞です。また、ご指摘通り、アロ抗原による拒絶反応は問題になります。間葉系の細胞表面にHLA-DRは出ていませんが、クラスI抗原が出ていますので、私は拒絶されると思います。しかし Osiris 社の発表では「拒絶されにくい」

ということにはなっています。免疫抑制薬は必要になります。

リスクとベネフィットのバランスを考えてみたいと思います。たとえば先天性代謝疾患症の子供たちは致死的で、日本では代替治療がありません。免疫抑制薬が必要だとしても、間葉系幹細胞による酵素補充療法を行うことができるのであれば、これはきわめて重要な第一歩になる。

また、筋ジストロフィーも非常に重篤な疾患です。もし、細胞治療が筋ジストロフィーに有効であるならば、最終的には全身の筋肉に対して細胞が必要です。ですから、無尽蔵に得られるES細胞や間葉系幹細胞による治療は大きなベネフィットだと思います。

ここで重要なのは、移植した細胞そのものが筋肉になる必要はないことです。ES細胞が骨格筋と融合し、ES細胞側の正常なジストロフィー遺伝子が発現するようになればジストロフィン蛋白の補充になります。融合さえしてくればよいのです。

■細胞治療の発展していく方向

小室 もうすでに Osiris 社からユニバーサルな間葉系幹細胞が売られています。梅澤先生としては間葉系による細胞治療はどの方向に進むと思いますか。ユニバーサルなものが主流になるのか、それとも先生が最初に言われたようにいろいろなところから間葉系が取れるので、本人、家族のものを使う方向にいくのか。どちらでしょうか。

梅澤 ユニバーサルな間葉系幹細胞は、規格化されていることにメリットがあつて、後々の臨床でも同じ基準で行うことができます。つまり、細胞を化合物の薬と同じように使うことができます。一方、各個人の細胞を取って増やすオーダーメイド医療は、細胞を GMP 基準のセルプロセッシングセンターで増やして体内に戻

すことにはなりますが、これはなかなか普及しにくいのではないかと予想しています。

小室 Osiris 社の細胞はどんどん使われているのですか。

桜田 臨床試験の最終段階にきていますが、実際には市場に出るのはもう少し先になりそうですね。

小室 2, 3 年前には骨にかなり移植していて、2 年前のアメリカ心臓学会 (AHA) では心臓に応用すると、Osiris 社の社長自身が言っていましたね。

桜田 今後 FDA の基準に従った臨床試験をクリアしていかないと最終的には難しいと思います。

小室 拒絶反応はないと断言していましたが、本当ですかね。

桜田 先日ボストンで開催された ISSCR (International Society for Stem Cell Research) では、プロスタグランジンや、免疫抑制のサイトカインが間葉系幹細胞から産生されるためだろうといわれていました。ただ、分化した後、その状態が維持できるかどうかについては、今後の課題だと思います。

体性幹細胞研究と応用

■心臓疾患での現状

小室 心臓では骨格筋芽細胞を心臓に移植するという試みが実際に行われています。骨格筋では、分化しきっていないサテライト細胞が存在しているので、患者の大腿の筋肉を 10~20 g 取ってきて培養すれば、骨格筋芽細胞を増やすことができます。これを患者の心臓に植えて、同じ横紋筋としての作用を期待するという治療法です。欧米数カ国で 10 例以上行われていますが、一応は心臓の機能がよくなったという結

果が出ています。ただ、骨格筋芽細胞は心臓という環境においても骨格筋にしか分化しないので、不整脈という問題があり、ほとんどの人が抗不整脈薬を飲まなければなりません。または心室細動が起こるので除細動器を植え込まざるをえないという状態です。ですからやはり心筋に分化する細胞が望まれているのです。

われわれを含めて世界で3カ所が、心臓から一種の幹細胞様の細胞をSP細胞やSca-1というマーカーを使って取ることに成功しています。これらの細胞をある種の条件下で培養すると、心筋に分化し、体に戻すとさまざまな細胞に分化することを確認しました。しかし、心臓から細胞を取って心臓に植えるのは臨床的にどうかと思い、われわれは移植というより、生体内の心筋幹細胞の性質を明らかにして生体内で治す方向で研究しています。

■神経研究の現状と問題点

小室 心臓に比べてもっと進んでいると思われる神経のほうはいかがでしょうか。

桜田 臨床的なニーズは病気によってすごく違いがありますが、神経の再生医療では、最終的には脳の機能を回復させることが目的です。この場合は単に神経、あるいは神経系の細胞ができてだけでは不十分で、回路を再構築しないといけないという大きな問題があります。しかし神経回路と脳の機能の関係はまだ完全には明らかにされていないのです。

また、脳がもっている再生の力を理解し、それが不足するところを治療によって補おうという戦略は非常に重要視されています。実際、成人の脳の中にある神経幹細胞自体もある程度再生する力があることは、少なくともげっ歯類では報告をされていて、実際に障害を治す力もあることも報告されています。それではなぜ病気が治らないのかといいますが、次の三つの説があげられています。一つは、元 東京大学の中福

先生(現 オハイオ大)が実証されていることですが、非常に大きな障害の場合には、内的な力だけでは治しきれない。しかしこの場合、サイトカインを補充することで内的再生力を高めることにより治すことができる可能性はあります。二つ目は、神経変性疾患では、神経の再生能を抑えてしまうという説です。アルツハイマーの場合は β アミロイドの蓄積が、パーキンソン病の場合はドパミンの欠乏が脳内の神経再生を非常に顕著に抑制することが知られています。ですから、単に細胞治療を行うだけではなく、再生を抑制する部分を解除する必要があります。三つ目は幹細胞自体が老化すると、その機能が徐々に落ちてくるという説です。この場合は細胞治療が必須となると考えられます。

臨床上用いられている薬剤による内的な神経再生の促進という観点では、抗うつ薬、スタチン系の薬剤、それからPDE-5の阻害薬(バイアグラ[®])にニューロン新生促進活性があることが注目されています。なかでも抗うつ薬に関しては神経再生促進活性が薬効と直接関係することが2003年の夏に報告されました。この報告は、言い換えるとヒトの成人でも神経再生活性をある程度保持していることを示していて、今後新しい薬剤の開発により、内科的な神経再生のアプローチが可能になるのではと考えています。

小室 抗うつ薬による神経再生促進はとてもおもしろいと思いますが、どのようなメカニズムなのでしょうか。

桜田 抗うつ薬はセロトニン作動性あるいはアドレナリン作動性の神経を活性化させる効果があり、これらの神経が活性化しますと現時点では仮説ですが、BDNFやFGFといった神経再生活性のあるサイトカインが海馬の近くに誘導され、神経再生を誘導するのではないかとわれています。ですから、間接的に神経幹細胞の再生を促進していると考えられています。

小室 バイアグラとスタチンはどうですか。

桜田 バイアグラは PDE-5 阻害薬なので細胞内情報伝達系で NO の産生の促進などが背景になっていると考えられます。スタチン系については VEGF (血管新生促進因子) の産生を促進することで神経再生や増殖, 分化を促進している可能性が考えられています。

■神経再生に向けた臨床試験

桜田 死亡胎児の脳を移植する治療はすでに臨床応用されています。スウェーデンを中心に実施された非盲検試験では多数の有効例が報告されましたが, 最近米国で実施された二つの二重盲検試験では無効との報告がなされました。もちろん本試験の結果は中枢神経系の細胞治療のコンセプトを否定するものではなく, 米国を中心にさまざまな細胞治療の開発が進められています。たとえば, マイクロビーズに培養したヒトの網膜色素上皮細胞を付着させてパーキンソン病患者に移植する試験や, 培養神経幹細胞や間葉系幹細胞を神経再生に応用しようという研究・開発が実施されています。

梅澤 死亡胎児の脳を移植した臨床試験では, 免疫抑制薬を使っているのでしょうか。

桜田 従来スウェーデンなどで行われた非盲検試験では免疫抑制薬を使っていたのですが, アメリカの二重盲検試験では免疫抑制薬を使いませんでした。しかし, 生着率が非常に悪いわけではないので, 効かなかった原因として, 細胞の処理法や移植の方法が議論されています。ただ, 去年 (2003 年) 報告されたアメリカの臨床試験では, 最初の 6 ヶ月は非常に効いています。しかし 2 年たつと効果がなくなっているのです。今後その原因を解明する必要があると思います。

ただ, これはあくまで死亡胎児の脳を入れる方法で, ES 細胞や神経幹細胞を用いた試験とは明らかに違いますから, これを ES 細胞とか神経幹細胞を用いた治療と同じように考える必要

はまったくなく, あくまで臓器移植のような私たちでの移植の結果だと解釈しています。

■細胞治療が有効な脳疾患

小室 脳の細胞移植としては, 対象疾患は現在パーキンソン病だけなのですか。

桜田 多発性硬化症に神経幹細胞が有効だというのは去年報告されていますし, ハンチントン舞蹈病においても有効だという報告もあります。脊髄損傷における有効性も慶応大学の岡野先生のグループから報告されています。

小室 その場合は移植するのですか。

桜田 そうですね, 移植します。多発性硬化症は脳全体に広がる疾患ですが, 成人の神経幹細胞の末梢血投与が有効であることが, 昨年報告されました。多発性硬化症の場合は脱髄といって神経回路とは違う面がありますので, 移植によって回路が形成されたとはいえません。しかも自己免疫疾患的な特徴がありますので, やはり疾患によって違いがあると思います。

ただ, ラットとヒトの脳は明らかに違うでしょうから, 将来どうやって動物試験の結果を外挿していくかが問題です。サルの試験などで, 前臨床試験を行う必要もありますね。

小室 心臓の場合は, 心筋梗塞で心筋がなくなつたところに心筋を植えるという単純な発想です。しかし脳では神経回路をつくるところに問題があるのですね。

桜田 それに関してもやはり多様で, それぞれの疾患別に最適な方法は違うと思います。パーキンソン病のように, 回路のいらない, ドパミン補充を目的とした治療もありますので。

梅澤 Verfaillie 博士 (ミネソタ大学医学部幹細胞研究所) が成体万能幹細胞 (MAPC) と呼ばれる, 骨髄に存在する非血球系の体性幹細胞を脳梗塞治療に使われたそうですが, これは有効なのでしょうか。

桜田 動物試験のデータでは MAPC の移植が

脳梗塞に効くことが示されています。また、間葉系幹細胞の移植が効くという報告もさまざまなグループから出ています。脳梗塞は、ある程度機能を回復する例が報告されている疾患ですので、脳内における神経幹細胞による再生だけではなく、骨髄や末梢血由来の細胞による再生の仕組みが生理的に存在している可能性があります。このような末梢由来細胞による治療効果は、神経に分化して保護しているのか、再生因子分泌というパラクライン作用なのかは今後の研究課題だと思います。少なくとも GFP で標識した間葉系細胞が大量に脳内に入るとするのは確かなようです。

小室 心筋梗塞の場合、骨髄を移植しても心筋になる率は非常に低いといわれていますが、脳梗塞の場合は骨髄が神経細胞になるということはあるのですか。

桜田 神経細胞になるという報告はたくさんあるのですが、このようにしてできた神経細胞が長期間維持されるのかどうかは不明です。末梢血由来の細胞が組織修復に働くのかどうかは、150年前ドイツの Julius Cohenheim が提案して以来、喧々譁々で今も結論は出ていません。心筋梗塞についても骨髄は心筋にならないとされていますが、なるという報告をされている方もいます。骨髄からの心筋分化を報告されている研究でも、造血系からの分化は否定されています。移植のタイミングや炎症の状態によって分化の効率が変わるのかもしれない。また、すべての病態で同じように骨髄が寄与していると解釈する必要はないと思います。

■細胞移植のいちばんの成功例は虚血下肢例

梅澤 いま細胞治療で注目を浴びているのは、虚血下肢における骨髄と末梢血の移植であると理解しております。心臓に対して骨髄を移植しても骨髄細胞が心筋にならないとしたら、血管になるのかもしれないし、あるいはただ単に誘

導しているだけかもしれないですね。

小室 おっしゃるように細胞移植でいちばん進んでいて、有効性が最も認められているのは下肢虚血に対してといえますね。いまは骨髄の単核球を移植する方法がよいとされています。われわれは末梢血の単核球を移植しているだけですが、それもかなり有効で、われわれの成績でも7、8割の方が足の切断を免れています。下肢虚血は血管を増やせばいいわけですが、心臓に関しても虚血性の心疾患は血管を増やせばいいので、同じ手法が使えるのではないかと思います。

あと、骨髄を打つことによって心筋ができるかどうかに関しては、私はかなり否定的です。しかし、血管ができることで、間接的に再生が促進される可能性はあると考えています。

山下 心臓の機能回復に関しては、心筋そのものができればいいのですが、心筋ができなくても血管ができれば機能は回復することもありますし、さらには線維芽細胞ができればカチカチの結合織の弾性を回復することもあると思います。心筋が再生できて動くようになるのが理想的ですが、治療効果としては心機能の回復が得られ、それが安全かつ簡単に効果的であれば治療としては非常に有効です。治療の効果があればいいのであって、メカニズムがどれであっても問題ないと考えています。


小室 そうですね。ただ、メカニズムを誤解していると進歩がなかったり、違う方向に進んだり、また違ったものをつくったりということがあるので、やはり正しい理解は必要だろうと思います。

山下 そうですね。どういうメカニズムで治っているかというのは理解しないといけません。が、よくなった理由がはっきりわかれば心筋ができていなくてもよいと思います。

桜田 確かに必ずしも心筋を100%すべてに目的としなくてもいいかもしれない。ただ、心筋

の再生が必要な疾患も必ずあると思います。
小室 ES細胞, 間葉系の幹細胞, また体性幹細胞の現状と課題についてもよく理解できました。これから研究が進歩して, 実際に臨床に使

われる日も近いと思いますので, 皆さんの研究の発展を期待しています。どうもありがとうございました。



Hope for all people's health

人に、環境に、やさしい医薬品づくり。

肝臓疾患用剤・アレルギー用薬 (健保略称 強ミノC)

強力ネオミノファーゲンシー®

グリチルリチン製剤 STRONGER NEO-MINOPHAGEN C 薬価基準収載

包装 20mL×10管、20mL×30管、5mL×5管、5mL×50管

肝臓疾患用剤・アレルギー用薬

グリチロン錠 薬価基準収載

グリチルリチン製剤 GLYCYRON® Tab.

包装 100錠(PTP)、300錠(PTP)、500錠(PTP)、1,000錠(バラ)
2,100錠(PTP)、5,000錠(PTP)

「効能・効果」、「用法・用量」、「禁忌を含む使用上の注意」等は、現品添付文書をご参照ください。*資料は当社学術部担当者にご請求ください。

UM 株式会社 **ミノファーゲン製薬**

資料請求先 〒107-0052 東京都港区赤坂8-10-22
TEL 03(3402)6201(代)

03.12

Ascorbic acid restores sensitivity to imatinib via suppression of Nrf2-dependent gene expression in the imatinib-resistant cell line

Takahisa Tarumoto^a, Tadashi Nagai^a, Ken Ohmine^a, Takuji Miyoshi^a, Makiko Nakamura^a, Takahito Kondo^b, Kenji Mitsugi^c, Syuji Nakano^c, Kazuo Muroi^d, Norio Komatsu^a, and Kei-ya Ozawa^a

^aDivisions of Hematology and ^dCell Transplantation and Transfusion, Jichi Medical School, Tochigi, Japan;

^bDepartment of Biochemistry and molecular Biology in Disease, Atomic Bomb Disease Institute, Nagasaki University Graduate School of Medicine, Nagasaki, Japan; ^cFirst Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Kyushu University, Fukuoka, Japan

(Received 11 August 2003; revised 1 December 2003; accepted 15 January 2004)

Objective. Imatinib, a BCR/ABL tyrosine kinase inhibitor, has shown remarkable clinical effects in chronic myelogenous leukemia. However, the leukemia cells become resistant to this drug in most blast crisis cases. The transcription factor Nrf2 regulates the gene expression of a number of detoxifying enzymes such as γ -glutamylcysteine synthetase (γ -GCS), the rate-limiting enzyme in glutathione (GSH) synthesis, via the antioxidant response element (ARE). In this study, we examined the involvement of Nrf2 in the acquisition of resistance to imatinib. Since oxidative stress promotes the translocation of Nrf2 from the cytoplasm to the nucleus, we also examined whether ascorbic acid, a reducing reagent, can overcome the resistance to imatinib by inhibiting Nrf2 activity.

Results. Binding of Nrf2 to the ARE of the γ -GCS light subunit (γ -GCSL) gene promoter was much stronger in the imatinib-resistant cell line KCL22/SR than in the parental imatinib-sensitive cell line KCL22. The levels of γ -GCSL mRNA and GSH were higher in KCL22/SR cells, a finding consistent with the observation of an increase in Nrf2-DNA binding. Addition of a GSH monoester to KCL22 cells resulted in an increase in the IC₅₀ value of imatinib. In contrast, addition of ascorbic acid to KCL22/SR cells resulted in a decrease in Nrf2-DNA binding and decreases in levels of γ -GCSL mRNA and GSH. Consistent with these findings, ascorbic acid partly restored imatinib sensitivity to KCL22/SR.

Conclusion. Changes in the redox state caused by antioxidants such as ascorbic acid can overcome resistance to imatinib via inhibition of Nrf2-mediated gene expression. © 2004 International Society for Experimental Hematology. Published by Elsevier Inc.

Imatinib (imatinib mesylate; Novartis Pharmaceuticals, Basel, Switzerland), a specific BCR/ABL tyrosine kinase inhibitor, has been shown to be effective for treatment of chronic myelogenous leukemia (CML) in blast crisis (BC) and in chronic phase (CP) [1–2]. In recent clinical studies of imatinib with large numbers of BC patients, around 50% of patients achieved hematologic response [3]. However, drug resistance is a major problem for imatinib treatment of CML patients in BC because substantial numbers of patients have relapsed relatively soon after treatment with imatinib [2,3]. Previous studies have demonstrated possible mechanisms

involved in resistance to imatinib. These include amplification of and mutations in the BCR/ABL gene, increased expression of BCR/ABL protein and p-glycoprotein, and an increase in serum α 1 acid glycoprotein [4–9]. However, some imatinib-resistant cells show none of these changes [6], suggesting that the mechanisms involved in resistance to imatinib are very complex.

Nrf2, a member of the CNC family of basic region-leucine zipper transcription factors, has been shown to bind to antioxidant-responsive element (ARE) [10,11]. ARE has been found in the promoter region of several detoxifying and antioxidative stress genes such as γ -glutamylcysteine synthetase (γ -GCS) and glutathione-S-transferase (GST). Nrf2 contains 6 conserved domains: Neh1 to Neh6. Previous analysis has shown that Keap1, a homologue of the *Drosophila* actin-binding protein Kelch, binds to the Neh2 domain of Nrf2

Offprint requests to: Tadashi Nagai, M.D., Ph.D., Jichi Medical School, 3311-1 Yakushiji, Minamikawachi-machi, Kawachi-gun, Tochigi 329-0498, Japan; E-mail: t-nagai@jichi.ac.jp

in cytoplasm in a “nonstimulated” condition [12]. Activation inducers for Nrf2 such as oxidative stress cause dissociation of these two factors, resulting in migration of Nrf2 into the nucleus. There, Nrf2 binds to ARE as a heterodimer with other transcription factors, such as small Maf family proteins, and regulates ARE-mediated gene expression. Because induction of phase II detoxifying enzymes is significantly reduced in Nrf2 knockout mice and induction of some antioxidative stress genes such as hemeoxygenase I is severely impaired in Nrf2-deficient macrophages [13,14], it is thought that Nrf2 is necessary for expression of antioxidative stress genes as well as phase II detoxifying enzymes.

γ -GCS, the rate-limiting enzyme of the glutathione (GSH) synthetic pathway, catalyzes condensation of L-glutamate and L-cysteine, to form L- γ -glutamylcysteine [15]. GSH, a prominent cellular nonprotein thiol, functions as a cellular antioxidant, and is thus critical for maintenance of redox balance [16]. In addition to these functions, it has been shown that GSH has effects on MAP kinase signaling and activity of the transcription factor NF- κ B [17–19]. Also, it is involved in detoxification of substances in cells, via conjugation and transportation of substances out of cells [20]. Previous studies show that GSH is involved in resistance to some anti-cancer drugs, including cisplatin, doxorubicin, cytosine arabinoside, and daunorubicin [21,22]. γ -GCS is a heterodimer of heavy and light subunits: the catalytic domain is in the heavy subunit; the light subunit is important for regulation of the enzyme activity. Analysis of structure and function of the γ -GCS gene has shown that several cis-elements, including AP-1 and NF- κ B binding sites, may be important in expression of this gene, and indicates that ARE is critical for expression of this gene [23].

In the present study, we found that γ -GCSI mRNA levels, GSH concentration, and levels of Nrf2/DNA complex at the ARE of the γ -GCS light subunit (γ -GCSI) gene promoter were higher in the imatinib-resistant BCR/ABL⁺ cell line KCL22/SR than in the imatinib-sensitive parental cell line KCL22. We also found that ascorbic acid (AA) suppressed migration of Nrf2 to the nucleus, resulting in inhibition of GSH synthesis and restoration of sensitivity to imatinib in KCL22/SR cells.

Materials and methods

Cell culture

KCL22 is a BCR/ABL⁺ cell line that was established from peripheral blood cells of a patient with CML in BC [24]. KCL22/SR is an imatinib-resistant cell line that was derived from KCL22 in our laboratory [25]. Cells from these lines were grown in RPMI1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum and split every 3 to 4 days. KCL22/SR cells were maintained in the presence of 0.5 mM imatinib. To evaluate effects of GSH on sensitivity of KCL22 cells to imatinib, KCL22 cells were incubated in the presence of 10 mM glutathione monoester [26] for 24 hours prior to addition of various concentrations of imatinib. An MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] assay was performed

to evaluate cytotoxicity, and IC₅₀ values were determined from dose-response curves. To examine effects of AA, KCL22/SR cells were cultured without imatinib for 3 days, and were then incubated with 0.5 mM imatinib or 0.125 mM AA for 72 hours. Viable cells were counted by trypan blue exclusion after various periods of incubation.

Determination of glutathione concentration

A total of 2×10^6 cells were harvested and used to assay for glutathione. Glutathione concentration was measured using the GSH-400 system (OXIS Int. Inc., Portland, OR, USA), essentially according to the manufacturer's protocol.

Determination of intracellular peroxides in KCL22/SR cells

Cells were incubated with 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) as the fluorogenic substrate for 30 minutes. The level of intracellular peroxides was determined by flow cytometry, as described previously [27].

RNA blot analysis

Total RNA was isolated from KCL22 and KCL22/SR cells using the acid guanidium thiocyanate-phenol chloroform method [28]. Northern blot analysis was performed as described elsewhere [29]. Human cDNA clones of γ -GCS light and heavy subunits [21] were used as probes. The HG126 clone of the ribosomal RNA gene was used as an internal control.

Western blot analysis

Total cell lysate and nuclear extract were prepared from 1×10^7 cells, using a method described elsewhere [30]. Protein concentration was determined using a Protein Assay Kit (BioRad, Hercules, CA, USA). A 10% polyacrylamide gel was used to separate 10 μ g of protein electrophoretically. Immunoblotting and detection by enhanced chemiluminescence were performed as described elsewhere [31]. Rabbit polyclonal anti-Nrf2 (C-20) antibody was purchased from Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, USA). Mouse anti-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase monoclonal antibody, which was used as an internal control, was purchased from Chemicon International (Temecula, CA, USA).

DNA gel mobility shift assays

To evaluate the DNA binding activity of Nrf2, DNA gel mobility shift assays were performed using the oligomer 5'-CTACGATTTCTGCTTAGTCATTGTCTTCC-3', which contains the 11-bp ARE and its flanking sequences. This oligomer was end-labeled with [γ -³²P] ATP by T4 polynucleotide kinase (Boehringer Mannheim Corp., Indianapolis, IN, USA). The antisense oligomer was then added to the ³²P-end-labeled oligomer to yield a double-stranded probe. Nuclear extracts (5 μ g) were incubated with the ³²P-labeled oligomer for 15 minutes on ice, in a reaction mixture containing 20 mM HEPES buffer (pH 7.8), 60 mM KCl, 0.2 mM EDTA, 6 mM MgCl₂, 0.5 mM dithiothreitol (DTT), 10% [v/v] glycerol and 1.5 μ g of an equimolar mixture of poly (dI-dC) and poly (dA-dT). For competition assays, the AREm oligomer 5'-CTACGATTTCTGCTTCTGCTTCTTCC-3', which is a mutated ARE containing two transversions, was used in double-stranded form. In antibody-mediated competition assays, 3 μ L of anti-Nrf1, anti-Nrf2, anti-c-Jun, and anti-GATA-2 antibodies (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA) were first incubated with nuclear extracts on ice for 20 minutes and were then incubated with the probes for 10 minutes. This mixture was then

loaded onto a 4% polyacrylamide gel and electrophoresed at 150 V and 4°C.

Transfection and luciferase assays

We cotransfected 2 µg of luciferase reporter plasmid fused to human γ -GCS1 promoter region (pGCS1-pro; contains ARE and AP-1 binding sites) and 1 µg of effector plasmid or pRL-CMV (internal control) into KCL22/SR cells using TransFast reagent (Promega Corp., Madison, WI, USA), according to the manufacturer's protocol. Briefly, a total of 1×10^6 cells were incubated with the plasmids and TransFast, in 1 mL of medium without serum for 1 hour. Then, 5 mL of fresh medium containing 10% serum was added, and incubation was continued for 48 hours. Luciferase activity was determined using the Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega). Effector plasmids expressing full-length (pcDNA3/mNrf2#0) and dominant-negative (pcDNA3/mNrf2#Eco del) mouse Nrf2 were kindly provided by Drs. K. Ito and M. Yamamoto (Tsukuba University, Tsukuba, Japan).

Results

Formation of Nrf2/DNA complex at ARE was increased in KCL22/SR cells

It has been reported that ARE binds with CNC family transcription factors and plays a critical role in expression of a number of antioxidant and detoxifying enzymes such as γ -GCS, which is a rate-limiting enzyme in GSH synthesis. To clarify whether ARE-mediated regulation of gene expression is involved in imatinib resistance, we first examined DNA binding activity at ARE in the human γ -GCS1 gene promoter of KCL22 and KCL22/SR cells using a gel mobility shift assay. The band that was detected was much more prominent in KCL22/SR than in KCL22 (Fig. 1A). This band was completely suppressed by addition of anti-Nrf2 antibody, but not by anti-Nrf1, anti-c-Jun, or anti-GATA-2 antibodies, indicating that it is an Nrf2/DNA complex (Fig. 1B). The increase in Nrf2/DNA complex formation in KCL22/SR cells is not due to increased Nrf2 expression, because there was no difference in Nrf2 protein level between KCL22 and KCL22/SR cells when total cell lysate was used for immunoblot analysis (Fig. 1C). However, when nuclear extracts were used for immunoblot analysis, the level of Nrf2 protein was much higher in KCL22/SR cells than in KCL22 cells (Fig. 1C). These results suggest that induction of Nrf2/DNA complex formation in KCL22/SR cells is caused by movement of Nrf2 from cytoplasm to nucleus.

Nrf2 increased γ -GCS1 light subunit gene promoter activity

To clarify whether the Nrf2/DNA complex is active in transcription, we examined the effect of Nrf2 on ARE-mediated promoter activation by luciferase reporter assay. Results of these experiments are summarized in Figure 2. When pGCS1-pro, which contains ARE and AP-1 sites, was transfected into KCL22/SR cells, luciferase activity increased 150-fold over control activity, which was obtained by transfection of pGL3-Basic promoterless construct. Cotransfection of

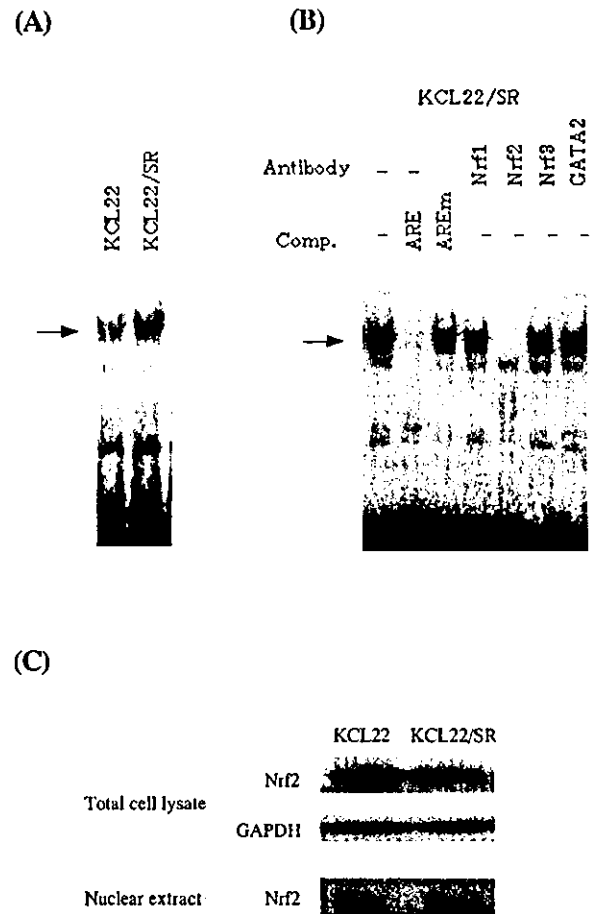


Figure 1. Formation of a DNA-protein complex at antioxidant responsive element (ARE) of the human γ -glutamylcysteine synthetase light subunit (γ -GCS1) gene promoter. (A): Nuclear extracts (5-mg aliquots) from KCL22 or KCL22/SR cells were incubated with end-labeled oligomers corresponding to ARE. (B): Competition assays were performed with a 200-fold molar excess of the indicated oligonucleotides or anti-Nrf2, anti-Nrf1, anti-c-Jun, and anti-GATA-2 antibodies. (C): Total cell extracts or nuclear extracts were prepared, separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, transferred onto a membrane, and reacted with anti-Nrf2 antibody. The expression of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was examined as an internal control.

the Nrf2 expression vector pcDNA3/Nrf2#0 resulted in a significant increase in luciferase activity. In contrast, expression of the dominant-negative form of Nrf2, which lacks the transcriptional activation domain (pcDNA3/mNrf2#Eco del), suppressed luciferase activity (Fig. 2). These results suggest that ARE in the γ -GCS1 gene promoter is active in transcription, and that induction of Nrf2/DNA complex formation at ARE leads to upregulation of promoter activity.

GSH level is higher in KCL22/SR than in KCL22 cells

The level of γ -GCS1 mRNA was significantly higher in KCL22/SR cells than in KCL22 cells (Fig. 3A), and the concentration of GSH was 1.5-fold higher in KCL22/SR cells than in KCL22 cells (Fig. 3B). Because γ -GCS is a rate-limiting enzyme of GSH synthesis, upregulation of γ -GCS1

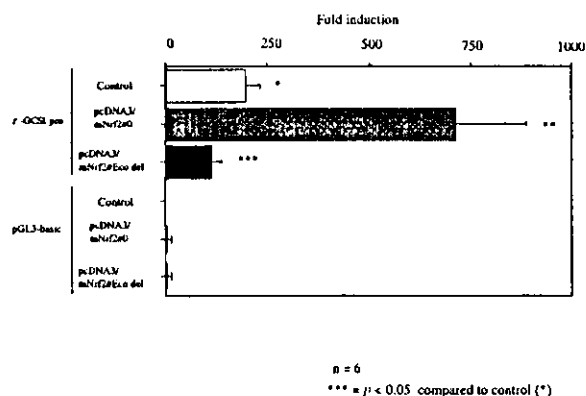


Figure 2. Effect of Nrf2 on the enhancer activity of the human γ -GCS1 gene promoter. KCL22/SR cells were transfected with luciferase reporter pGCS-pro or pGL3-Basic together with 1 μ g each of pcDNAmNrf2#0 or pcDNA3mNrf2#Eco del effector molecules. Firefly luciferase activity was normalized on the basis of Renilla luciferase activity. The results are expressed as the ratio of firefly luciferase activities of cells transfected with pGL3-basic without any effector molecule.

expression may lead to accumulation of GSH in KCL22/SR cells.

In previous studies, GSH was implicated in resistance to some anti-cancer drugs [9,10]. To clarify whether increased GSH levels are important for resistance to imatinib, we examined the effect of a GSH monoester on sensitivity to imatinib. Addition of a GSH monoester to imatinib-sensitive KCL22 cells resulted in a 2.8-fold increase in the IC_{50} value of imatinib (Fig. 3C). We also examined the effect of buthionine sulfoximine (BSO; a potent inhibitor of γ -GCS) on imatinib sensitivity of KCL22/SR cells, but failed to obtain usable results because of the severe toxicity of BSO.

Ascorbic acid reduced Nrf2/DNA complex formation by inhibiting movement of Nrf2 into nucleus

Because oxidative stress promotes movement of Nrf2 into the nucleus, it is likely that a shift in intracellular redox balance toward a reduced state inhibits movement of Nrf2 in KCL22/SR cells. To verify this hypothesis, we examined the effect of AA (a reducing reagent) on Nrf2/DNA complex formation. Peroxide levels in KCL22/SR cells were reduced by addition of 0.125 mM AA (Fig. 4A), strongly indicating that AA acts as an antioxidant. Formation of Nrf2/DNA complex in KCL22/SR cells was markedly decreased by addition of 0.125 mM AA (Fig. 4B) without any change in Nrf2 protein level in total cell lysate (Fig. 4C), suggesting that AA inhibited movement of Nrf2 into the nucleus.

Ascorbic acid restores imatinib sensitivity in KCL22/SR cells

We next examined the effects of AA on GSH synthesis and growth of KCL22/SR cells. Although the level of γ -GCS heavy subunit mRNA was not changed (data not shown), that of γ -GCS1 mRNA was significantly reduced by addition of 0.125 mM AA (Fig. 5A). Simultaneously, GSH concentration in KCL22/SR cells was reduced (Fig. 5B), indicating that AA inhibited GSH synthesis. AA had no inhibitory effect on

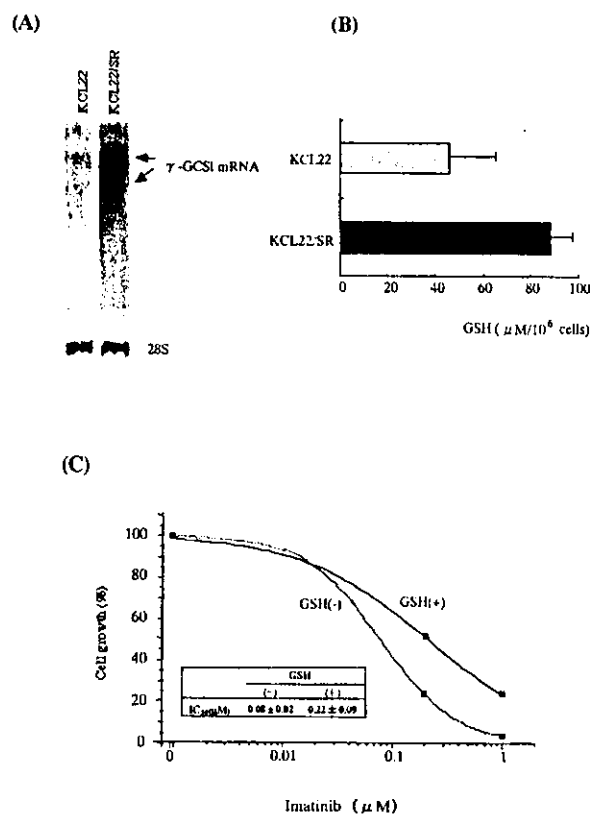


Figure 3. Glutathione synthesis in KCL22/SR cells. (A): The levels of γ -GCS1 mRNA were analyzed by Northern blotting. The filter was rehybridized to a ribosomal RNA probe. 28S ribosomal RNA bands are shown. (B): Glutathione (GSH) concentration was measured with the GSH-400 system (OXIS Int. Inc.), using 2×10^6 KCL22 or KCL22/SR cells, as described in Materials and Methods. (C): KCL22 cells were cultured with various concentrations of imatinib for 72 hours in the presence or absence of GSH. The ratio of IC_{50} is shown in the figure.

growth of KCL22/SR cells when administered alone, but combined treatment of KCL22/SR cells with imatinib and AA resulted in inhibition of cell growth (Fig. 5C). Consistent with these findings, addition of 0.125 mM AA resulted in a 50% decrease in the IC_{50} value of imatinib for KCL22/SR cells, suggesting that AA at this concentration is not directly cytotoxic but restores sensitivity of KCL22/SR cells to imatinib via, at least in part, suppression of intracellular GSH level.

Formation of Nrf2/DNA complex is increased in another imatinib-resistant cell line

To clarify whether an increase in formation of Nrf2/DNA complex occurs in imatinib-resistant cells in general or occurs only in KCL22/SR cells, we performed gel mobility shift assays using nuclear extracts of the imatinib-resistant cell lines K562/SR and KU812/SR, which were recently cloned in our lab, and their imatinib-sensitive parental strains (K562 and KU812, respectively). As shown in Figure 6, while there was no difference in the level of Nrf2/DNA complex between KU812/SR and KU812, the level of Nrf2/DNA complex was higher in K562/SR than in K562. These

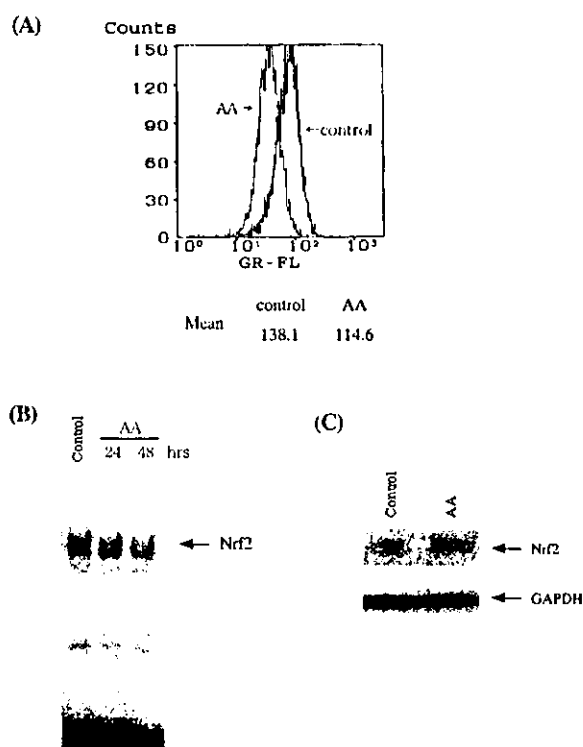


Figure 4. Effect of ascorbic acid on formation of Nrf2/DNA complex. (A): KCL22/SR cells were incubated with 0.125 mM ascorbic acid (AA) for 6 hours. The level of intracellular peroxides was determined by flow cytometry, as described in Materials and Methods. Decreased green fluorescence correlates with decreased peroxide levels. (B): KCL22/SR cells were incubated with 0.125 mM AA. The level of Nrf2/DNA complex formation at various time points was evaluated by gel mobility shift assay using oligomers corresponding to ARE. (C): KCL22/SR cells were cultured in the absence or presence of 0.125 mM AA for 24 hours. The levels of Nrf2 protein in total cell extracts were examined by immunoblot analysis using anti-Nrf2 antibody. The expression of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was examined as an internal control.

results suggest that induction of Nrf2 activity is involved in resistance to imatinib in some, but not all, imatinib-resistant cell lines.

Discussion

Recently, various new anti-cancer agents that target specific oncogenic molecules have been developed. Imatinib is one of the most successful of these reagents. However, a major problem with imatinib treatment is acquisition of resistance. In the present study, we used the imatinib-resistant BCR/ABL⁺ cell line KCL22/SR to investigate the mechanisms of resistance to imatinib. KCL22/SR was cloned from the human BCR/ABL⁺ cell line KCL/22. The IC₅₀ value of imatinib for KCL22/SR is about 11.6-fold higher than that of KCL22, indicating that KCL22/SR has acquired significant resistance to imatinib [25]. Examination of KCL22/SR has revealed no mutations in the BCR/ABL gene and no increase in levels of BCR/ABL protein or P-glycoprotein. Given that the level of phosphorylated BCR/ABL protein is

suppressed by imatinib treatment, these previous findings suggest that mechanisms independent of BCR/ABL activity are involved in the imatinib resistance of KCL22/SR [25]. The present results suggest that Nrf2 is involved in the imatinib resistance of KCL22/SR.

Nrf2 has been shown to regulate ARE-mediated gene expression. The present results demonstrate that formation of Nrf2/DNA complex at the ARE of the γ -GCSI gene promoter occurs at a significantly higher rate in KCL22/SR cells than in KCL22 cells (Fig. 1A). The amount of Nrf2/DNA complex was also increased in the imatinib-resistant cell line K562/SR, compared with its parental imatinib-sensitive line, K562 (Fig. 6), suggesting that this phenomenon occurs in many types of imatinib-resistant cells other than KCL22/SR cells. Consistent with these findings, the level of γ -GCSI mRNA was significantly higher in KCL22/SR cells than in KCL22 cells (Fig. 3A). The light subunit of the γ -GCS enzyme is a regulatory subunit and is important for regulation of γ -GCS activity. There was no difference in levels of γ -GCS heavy subunit (which contains a catalytic domain of γ -GCS) mRNA between KCL22/SR and KCL22 (data not shown). Nrf2-mediated induction of light subunit expression may result in upregulation of γ -GCS activity and a consequent increase in GSH synthesis (Fig. 3B). Addition of a GSH monoester to KCL22 cells resulted in an increase in the IC₅₀ value of imatinib (Fig. 3C), suggesting that upregulation of GSH synthesis due to increased Nrf2 activity is involved, at least in part, in the imatinib resistance of KCL22/SR cells. Clarification of whether similar abnormalities are involved in the imatinib resistance in primary cells from imatinib-resistant leukemia patients is important, and such studies are now being carried out in our laboratory.

GSH has been shown to detoxify substances in cells via conjugation and transport out of the cell [20]. However, it is unlikely that GSH directly inactivates imatinib via conjugation in KCL22/SR cells, because imatinib still effectively suppressed BCR/ABL kinase activity in these cells. Thus, mechanisms of imatinib resistance due to GSH accumulation may involve effects on other biological functions, such as intracellular signaling. Since addition of GSH did not result in restoration of the imatinib-mediated reduction of phospho-ERK1/2 levels in KCL22 cells (data not shown), MAPK may not be involved in the mechanisms of imatinib resistance due to GSH accumulation.

The present findings strongly suggest that Nrf2 is a good molecular target for overcoming imatinib resistance. AA reduced peroxide levels (Fig. 4A) and suppressed levels of Nrf2/DNA complex at the ARE of the γ -GCSI gene promoter (Fig. 4B). Consistent with these results, treatment of KCL22/SR cells with AA resulted in reduced GSH level and enhanced sensitivity to imatinib (Fig. 5C). Although we have no clinical data on the effect of ascorbic acid in imatinib-resistant patients, an in vitro experiment showed that treatment with AA and imatinib also suppressed growth of leukemia cells from a patient with CML in BC who had relapsed during

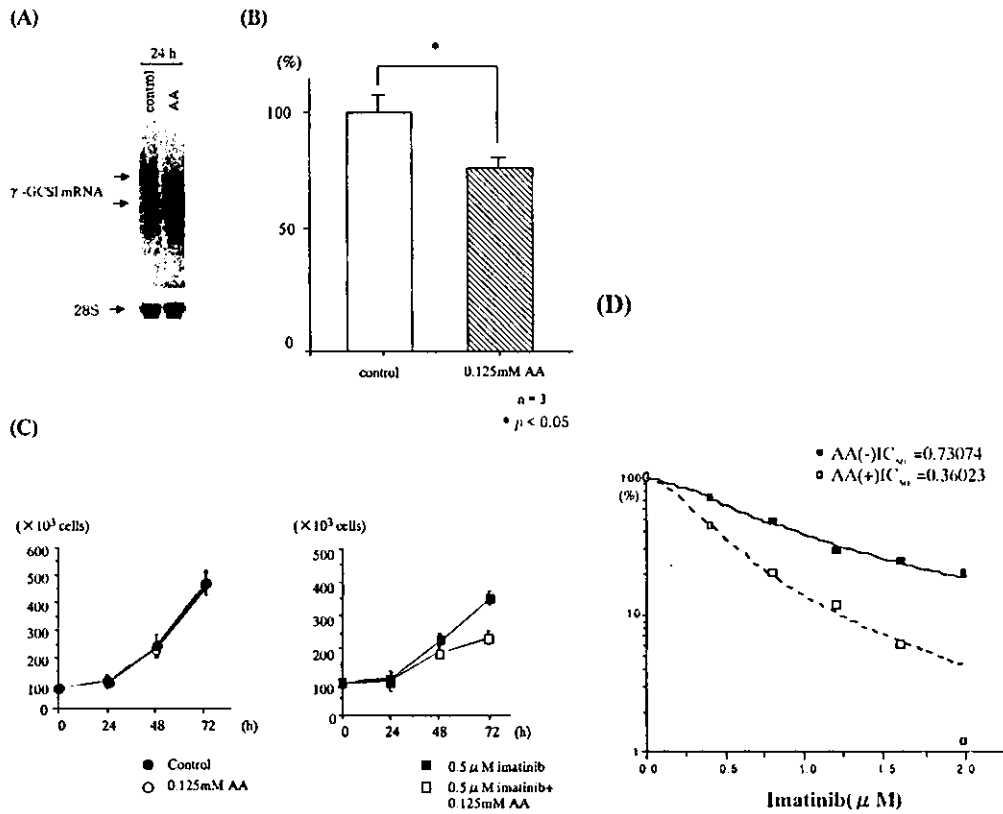


Figure 5. Effect of AA on GSH synthesis in KCL22/SR cells. (A,B): KCL22/SR cells were cultured in the presence of 0.125 mM AA for 24 hours. Changes in the levels of γ -GCS1 mRNA (A) and GSH concentration (B) were examined as described in Materials and Methods. (C): KCL22/SR cells were incubated with or without 0.125 mM AA in the absence or presence of 0.5 μ M imatinib for 72 hours. Viable cells were counted by trypan blue exclusion at various time points, as indicated in the figure. (D): KCL22/SR cells were incubated in the presence of various concentrations of imatinib with or without ascorbic acid. The IC_{50} values of imatinib are shown in the figure.

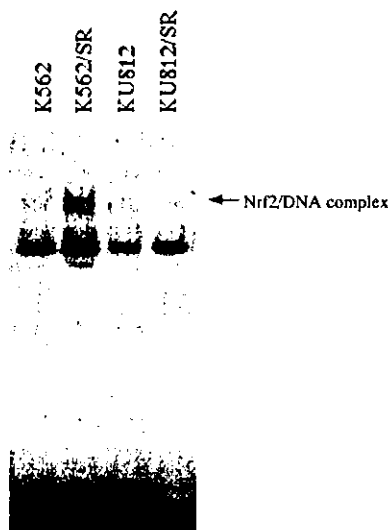


Figure 6. Formation of Nrf2/DNA complex at ARE in other imatinib-resistant cell lines. Nuclear extracts were prepared from K562, K562/SR, KU812, and KU812/SR cells. Gel mobility shift assay was performed using the end-labeled oligomers corresponding to ARE.

imatinib treatment (data not shown). We did not examine changes in Nrf2/DNA complex formation induced by AA in that case; however, it is possible that AA-induced inhibition of Nrf2 activity strengthened the effect of imatinib. It has been reported that reactive oxygen species could inhibit the activity of protein tyrosine phosphatases, resulting in the induction of protein tyrosine phosphorylation [32]. Thus, AA may also have other biological effects through phosphatase activation. Taken together, these results suggest that AA is an attractive molecular target reagent for overcoming resistance to imatinib in some imatinib-resistant CML cells.

Acknowledgments

This work was supported in part by Grants-in-Aid from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology, Japan. We wish to thank Ms. E. Yamakawa for her help in preparation of the manuscript.

References

1. Druker BJ, Talpaz M, Resta DJ, et al. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 2001;344:1031-1037.

2. Druker BJ, Sawyers CL, Kantarjian H, et al. Activity of a specific inhibitor of the BCR/ABL tyrosine kinase in the blast crisis of chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia with the Philadelphia chromosome. *N Engl J Med*. 2001;344:1038–1042.
3. Sawyers CL, Hochhaus A, Feldman E, et al. Imatinib induces hematologic and cytogenetic responses in patients with chronic myelogenous leukemia in myeloid blast crisis: results of a phase II study. *Blood*. 2002;99:3530–3539.
4. le Coutre P, Tassi E, Varella-Garcia M, et al. Induction of resistance to the Abelson inhibitor ST1571 in human leukemic cells through gene amplification. *Blood*. 2000;95:1758–1766.
5. Weisberg E, Griffin JD. Mechanism of resistance to the ABL tyrosine kinase inhibitor ST1571 in BCR/ABL-transformed hematopoietic cell lines. *Blood*. 2000;95:3498–3505.
6. Mahon FX, Deininger MW, Schultheis B, et al. Selection and characterization of BCR-ABL⁺ cell lines with differential sensitivity to the tyrosine kinase inhibitor ST1571: diverse mechanisms of resistance. *Blood*. 2000;96:1070–1079.
7. Gorre ME, Mohammed M, Ellwood K, et al. Clinical resistance to ST1571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation of amplification. *Science*. 2001;293:876–880.
8. Branford S, Rudzki Z, Walsh S, Grigg A, Aribur C, Taylor K. High frequency of point mutations clustered within the adenosine triphosphate-binding region of BCR/ABL in patients with chronic myeloid leukemia or Ph⁺ acute lymphoblastic leukemia who develop imatinib (ST1571) resistance. *Blood*. 2002;99:3472–3475.
9. Gambacorti-Passerini C, Barni R, le Coutre P, et al. Role of $\alpha 1$ acid glycoprotein in the in vivo resistance of human BCR-ABL⁺ leukemic cells to the Abl inhibitor ST1571. *J Natl Cancer Inst*. 2000;92:1641–1650.
10. Venugopal R, Jaiswal AK. Nrf1 and Nrf2 positively and c-Fos and Fra1 negatively regulate the human antioxidant response element-mediated expression of NAD(P)H:quinone oxidoreductase1 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93:14960–14965.
11. Venugopal R, Jaiswal AK. Nrf2 and Nrf1 in association with Jun proteins regulate antioxidant response element-mediated expression and coordinated induction of genes encoding detoxifying enzymes. *Oncogene*. 1998;17:3145–3156.
12. Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y, et al. Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes Dev*. 1999;13:76–86.
13. Itoh K, Chiba T, Takahashi S, et al. An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997;236:313–322.
14. Ishii T, Itoh K, Takahashi S, et al. Transcription factor Nrf2 coordinately regulates a group of oxidative stress-inducible genes in macrophages. *J Biol Chem*. 2000;275:16023–16029.
15. Richman PG, Meister A. Regulation of γ -glutamyl-cysteine synthetase by nonallosteric feedback inhibition by glutathione. *J Biol Chem*. 1975;250:1422–1426.
16. Meister A. Glutathione metabolism. *Methods Enzymol*. 1995;251:3–7.
17. Filomeni G, Rotilio G, Ciriolo MR. Glutathione disulfide induces apoptosis in U937 cells by a redox-mediated p38 MAP kinase pathway. *FASEB J*. 2003;17:64–66.
18. Kong AN, Yu R, Lei W, Mandlikar S, Tan TH, Ucker DS. Differential activation of MAPK and ICE/Ced-3 protease in chemical-induced apoptosis: the role of oxidative stress in the regulation of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) leading to gene expression and survival or activation of caspases leading to apoptosis. *Restor Neurol Neurosci*. 1998;12:63–70.
19. Haddad JJ. Redox regulation of pro-inflammatory cytokines and I κ B- α /NF- κ B nuclear translocation and activation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002;296:847–856.
20. Hayes JD, Pulford DJ. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 1995;30:445–600.
21. Iida T, Mori E, Mori K, et al. Co-expression of γ -glutamylcysteine synthetase sub-units in response to cisplatin and doxorubicin in human cancer cells. *Int J Cancer*. 1999;82:405–411.
22. Takemura H, Urasaki Y, Yoshida A, Fukushima T, Ueda T. Simultaneous treatment with 1- β -D-arabinofuranosylcytosine and daunorubicin induces cross-resistance to both drugs due to a combination-specific mechanism in HL60 cells. *Cancer Res*. 2001;61:172–177.
23. Moinova HR, Mulcahy RT. An electrophile responsive element (EpRE) regulates β -naphthoflavone induction of the human γ -glutamylcysteine synthetase regulatory subunit gene. Constitutive expression is mediated by an adjacent AP-1 site. *J Biol Chem*. 1998;273:14683–14689.
24. Kubonishi I, Miyoshi I. Establishment of a Ph1 chromosome-positive cell line from chronic myelogenous leukemia in blast crisis. *Int J Cell Cloning*. 1983;1:105–117.
25. Ohmine K, Nagai T, Tsurumoto T, et al. Analysis of gene expression profiles in an imatinib-resistant cell line. KCL22/SR. *Stem Cells*. 2003;21:315–321.
26. Anderson ME, Levy EJ, Meister A. Preparation and use of glutathione monoesters. *Methods Enzymol*. 1994;234:492–499.
27. Nagai T, Tsurumoto T, Miyoshi T, et al. Oxidative stress is involved in hydroxyurea-induced erythroid differentiation. *Br J Haematol*. 2003;121:657–661.
28. Chomezynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 1987;162:156–159.
29. Nagai T, Harigae H, Ishihara H, et al. Transcription factor GATA-2 is expressed in erythroid, early myeloid, and CD34⁺ human leukemia-derived cell lines. *Blood*. 1994;84:1074–1084.
30. Lassar AB, Davis RL, Wright WE, et al. Functional activity of myogenic HLH proteins requires hetero-oligomerization with E12/E47-like proteins in vivo. *Cell*. 1991;66:305–315.
31. Nagai T, Harigae H, Furuyama K, et al. 5-aminolevulinic synthase expression and hemoglobin synthesis in a human myelogenous leukemia cell line. *J Biochem (Tokyo)*. 1997;121:487–495.
32. Sattler M, Verma S, Shrikhande G, et al. The BCR/ABL tyrosine kinase induces production of reactive oxygen species in hematopoietic cells. *J Biol Chem*. 2000;275:24273–24278.

Letter to the Editor

Analysis of hematopoietic progenitors in bone marrow from patients with peripheral artery disease

Arteriosclerosis obliterans (ASO) is characterized by inadequate blood supply to the lower extremities [1]. Thromboangitis obliterans (Buerger's disease) is another peripheral artery disease that occurs more often in young males and cigarette smokers [2]. Some patients with ASO progressed to renal failure and receive hemodialysis. Anemia is the most typical finding in patients with end-stage renal disease caused by ASO and other such diseases. Although the pathogenesis of anemia associated with end-stage renal disease remains controversial, it has been shown that circulating hematopoietic progenitors decrease in that disease [3,4]. However, hematopoietic progenitor numbers in the bone marrow of patients with ASO and Buerger's disease have not been well examined. Recently, we have shown that transplantation of autologous bone marrow mononuclear cells into the affected extremities of patients with ASO and Buerger's disease promotes neovascularization of ischemic tissues, induces healing of ischemic ulcers and relieves ischemic pain [5,6]. Using these bone marrow samples, we compared hematopoietic progenitor numbers among ASO patients, Buerger's patients and healthy donors.

Seven patients with ASO and eight patients with Buerger's disease were enrolled in this study [5,6]. Nineteen healthy donors for bone marrow transplantation were incorporated as a control. The median age was 67.6 ± 8.4 years in patients with ASO, 51.5 ± 10.8 years in patients with Buerger's disease and 37.2 ± 8.6 years in healthy donors. The hemoglobin level was significantly lower in patients with ASO (12.0 ± 2.0 g/dl) than in healthy donors (13.8 ± 1.2 g/dl, $P = 0.031$). That level in patients with Buerger's disease remained to be nearly normal (13.1 ± 2.6 g/dl, $P = 0.39$). The serum creatinine level increased to 4.8 ± 5.0 mg/dl in patients with ASO, because three patients received hemodialysis due to renal failure. That level was normal in patients with Buerger's disease and healthy donors: 0.7 ± 0.3 and 0.7 ± 0.2 mg/dl, respectively. Collected bone marrow blood volume was 486 ± 107 ml in patients with ASO, 575 ± 71 ml in patients with Buerger's disease and 842 ± 199 ml in healthy donors. Flow cytometric analysis of bone marrow mononuclear cells did not show any significant differences in CD2, CD3, CD4, CD8, CD5, CD7, CD56, CD19 or CD20 expression between the ASO group and the Buerger's disease

group. Bone marrow mononuclear cells were cultured using a methylcellulose culture technique as described previously [7]. The cultures were incubated for 14 days at 37°C in a 5% CO_2 incubator. On day 14 of culture, colony-forming unit granulocyte-macrophage (CFU-GM) and burst-forming unit erythroid (BFU-E) numbers were scored. As shown in Fig. 1, CFU-GM numbers of patients with ASO was significantly lower than that in healthy donors. CFU-GM numbers of patients with Buerger's disease was also significantly lower than that of healthy donors. There was no significant difference in CFU-GM numbers between patients with ASO and Buerger's disease. Similar results were obtained in BFU-E numbers (Fig. 1): BFU-E numbers of patients with ASO as well as patients with Buerger's disease was significantly lower than that of healthy donors. There was no significant difference in BFU-E numbers between patients with ASO and Buerger's disease.

Our results suggest that hematopoietic progenitor numbers in the bone marrow of ASO and Buerger's disease are decreased, as compared with those in healthy subjects. Since in our study, three patients with ASO received hemodialysis due to renal failure caused by ASO. Therefore, decreased hematopoietic progenitor numbers in the bone marrow of patients with ASO may be partially explained as the result of end-stage renal disease. In renal failure, some substances such as spermine, spermidine and prostaglandins suppress both erythropoiesis and granulopoiesis [3]. Interestingly, Buerger's disease showed significant decrease in both CFU-GM and BFU-E numbers. Because patients with Buerger's disease had normal serum creatinine levels, decreased hematopoietic progenitors in the bone marrow of the patients are not associated with renal failure. We speculate that microcirculation in the bone marrow in both ASO and Buerger's disease is impaired and that the damaged bone marrow microenvironment results in decreased hematopoietic progenitor numbers in the bone marrow. Alternatively, decrease in hematopoietic progenitors in the bone marrow may only depend on aging [8]. The relationship between hematopoietic progenitor and endothelial cell progenitor numbers in the bone marrow has not yet been elucidated. If hematopoietic progenitor numbers and endothelial progenitor numbers in bone marrow are related to each other, colony-forming assay for hematopoietic progenitors may predict clinical outcomes of therapeutic angiogenesis using autologous bone marrow transplantation since a simple reliable assay for endothelial progenitors has not yet become available [9].

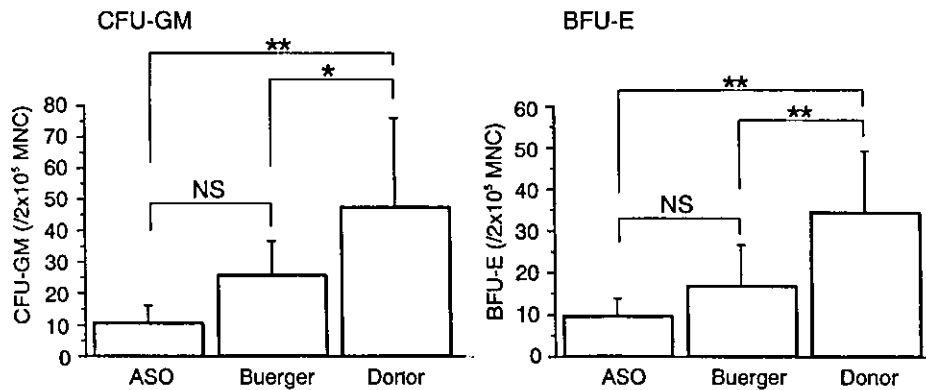


Fig. 1. Colony-forming cell numbers in the bone marrow. MNC: mononuclear cells; NS: not significant ($*P < 0.05$, $**P < 0.01$).

References

- [1] Ku A, Nagler W. Arteriosclerosis obliterans. Diagnostic and non-operative treatment options. *Postgrad Med* 1995;98:203–12.
- [2] Kurata A, Franke FE, Machinami R, Schulz A. Thromboangitis obliterans: classic and new morphological features. *Virchows Arch* 2000;436:59–67.
- [3] Matsuzaki Y, Mizuguchi T, Kosaka M, Saito S. Analysis of circulating hematopoietic progenitors in patients with chronic renal failure under hemodialysis. *Int J Hematol* 1996;63:33–40.
- [4] Eckardt KU. Anaemia in end-stage renal disease: pathophysiological considerations. *Nephrol Dial Transplant* 2001;16(Suppl 7):2–8.
- [5] Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T, Ikeda U, Shintani S, Masaki H, et al. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial. *Lancet* 2002;360:427–35.
- [6] Matusi K, Ikeda U, Murakami Y, Yoshioka T, Muroi K, Kasuda H, et al. Therapeutic angiogenesis by transplantation of autologous bone marrow and peripheral blood mononuclear cells in patients with peripheral arterial disease. *Int J Angiol*, in press.
- [7] Muroi K, Handa K, Amemiya Y, Hakomori S, Ozawa K, Miura Y. Expression profiles of I and sialosyl-I antigens on blood cells: the sialosyl-I antigen is expressed along the monocytic differentiation. *Leuk Res* 1998;22:1029–36.
- [8] Plante GE. Impact of aging on the body's vascular system. *Metabolism* 2003;52(Suppl 2):31–5.
- [9] Masuda H, Asahara T. Post-natal endothelial progenitor cells for neovascularization in tissue regeneration. *Cardiovasc Res* 2003;58:390–8.

Kazuo Muroi*
Chizuru Kawano-Yamamoto
Takahiro Nagashima
Masaki Mori
Keiya Ozawa

*Division of Cell Transplantation and Transfusion
Jichi Medical School, Minamikawachi
Tochigi 329-0498, Japan*

Keiji Matsui
Yoshiaki Murakami
*Division of Cardiovascular Medicine
Jichi Medical School, Minamikawachi
Tochigi 329-0498, Japan*

Uichi Ikeda
*Department of Organ Regeneration
Shinshu University Graduate School
of Medicine, Matsumoto, Nagano, Japan*

*Corresponding author. Tel.: +81-285-44-2111
fax: +81-285-44-5087.

*E-mail address: muroi-kz@jichi.ac.jp
(K. Muroi)*

22 December 2003

Available online 26 February 2004

ORIGINAL ARTICLE

Takayuki Eizawa · Uichi Ikeda · Yoshiaki Murakami
Keiji Matsui · Tohru Yoshioka · Chihiro Suzuki
Masafumi Takahashi · Kazuo Muroi · Osamu Kamisawa
Katsuo Fuse · Kazuyuki Shimada

Increase in circulating endothelial progenitor cells after aortic aneurysm repair

Received: July 30, 2003 / Accepted: November 8, 2003

Abstract Rapid endothelialization of prosthetic vessels is essential to avoid fatal complications. We hypothesized that there may be mobilization of endothelial progenitor cells (EPCs) in patients who received aortic aneurysm repair, and measured the number of CD34-expressing EPCs (CD34⁺ cells) in these patients. Blood samples were taken preoperatively, 6, 24, and 48 h, and 7 days after surgery in 13 patients with aortic aneurysm. Samples were also obtained from ten age-matched control subjects. The number of CD34⁺ cells in the peripheral blood was quantified by flow cytometry. The levels of serum vascular endothelial growth factor (VEGF) were measured using an enzyme-linked immunosorbent assay kit. Baseline CD34⁺ cell counts in the peripheral blood showed a tendency to be lower in patients with aortic aneurysm compared with healthy control subjects. The number of CD34⁺ cells did not change over 48 h after aortic aneurysm repair; however, it had doubled by the 7th day. On the other hand, the baseline serum VEGF levels did not differ between the patients and control subjects. The VEGF levels increased gradually after vascular repair with a significant elevation after 48 h, which was followed by an increase in CD34⁺ cell counts. In conclusion, the circulating CD34⁺ cell counts and serum VEGF levels are increased after vascular prosthesis replacement in patients with aortic aneurysm, which might contribute to the rapid endothelialization of prosthetic vessels.

Key words Aortic aneurysm · Endothelial cell · Vascular prosthesis · Growth factor

Introduction

Bone marrow-derived endothelial progenitor cells (EPCs) are considered to originate from hematopoietic stem cells, which are positive for CD34.^{1,2} Human CD34-expressing cells (CD34⁺ cells) injected into nude mice and rats undergoing neovascularization due to hindlimb ischemia are incorporated into the neovasculature and express endothelial antigens.³ We recently reported that transplantation of autologous bone marrow cells including CD34⁺ cells improved ischemia in patients with critical limb ischemia.⁴ Moreover, increased neovascularization by bone marrow-derived CD34⁺ cells was shown to improve cardiac function.^{5,6}

Recently, mobilization of EPCs into the circulation from bone marrow was reported in acute coronary syndrome,^{7,8} and vascular trauma secondary to burns or coronary artery bypass grafting.⁹ As rapid endothelialization of prosthetic vessels is essential to avoid fatal complications, we hypothesized that there may also be mobilization of EPCs after vascular prosthesis replacement. In the present study, we studied the kinetics of EPC mobilization in patients with aortic aneurysm who received vascular prosthesis replacement.

T. Eizawa · Y. Murakami · K. Matsui · K. Shimada
Division of Cardiovascular Medicine, Jichi Medical School, Tochigi, Japan

U. Ikeda (✉) · T. Yoshioka · C. Suzuki · M. Takahashi
Department of Organ Regeneration, Shinshu University Graduate School of Medicine, 3-1-1 Asahi, Matsumoto 390-8621, Japan
Tel. +81-263-37-3191; Fax +81-263-37-3195
e-mail: uikeda@sch.md.shinshu-u.ac.jp

K. Muroi
Division of Cell Transplantation and Transfusion, Jichi Medical School, Tochigi, Japan

O. Kamisawa · K. Fuse
Division of Cardiovascular Surgery, Jichi Medical School, Tochigi, Japan

Methods

Collection of peripheral blood samples

Peripheral blood (5 ml) was taken for patients (mean age 72.0 ± 1.3 years) with abdominal aortic aneurysm (*n* = 6) and thoracic aortic aneurysm (*n* = 7) who underwent aortic aneurysm repair with fluorinated ethylenepropylene grafts. Samples were taken preoperatively, and after surgery at 6, 24, and 48 h, and on the 7th day. Blood samples were also

obtained from age-matched healthy control subjects ($n = 10$; 69.4 ± 1.5 years). This clinical study was approved by the Medical Ethics Committee of Jichi Medical School, and all the patients gave their written informed consent to participate in the study.

Quantification of CD34⁺ cells

The number of CD34⁺ cell in the peripheral blood was quantified using flow cytometry (Cytron; Ortho Diagnostic Systems, Raritan, NJ, USA).¹⁰ In brief, white blood cells were dually stained with fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated CD45 (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA, USA) and phycoerythrin (PE)-conjugated CD34 (Becton). Progenitors were separated by the low levels of CD45 expression and right-angle light-scatter properties. Cells expressing CD34 were measured with gating on the progenitor population. For negative controls, cells were stained with FITC-conjugated CD45 and PE-conjugated mouse IgG₁ (Becton).

Measurement of vascular endothelial growth factor (VEGF) levels

The levels of serum VEGF were measured using a specific enzyme-linked immunosorbent assay kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), as reported previously.¹¹ The lower limit of detection for the VEGF assay was 31 pg/ml.

Statistical analysis

Values are expressed as mean \pm SEM. Significance was evaluated using analysis of variance combined with Scheffe's test. Linear regression analysis was used to compare the number of CD34⁺ cells and serum VEGF levels. Differences at a level of $P < 0.05$ were considered significant.

Results

Number of CD34⁺ cells

The number of CD34⁺ cells in the peripheral blood was determined by flow cytometry. As shown in Fig. 1, although not significant, the baseline CD34⁺ cell counts showed a tendency to decrease in patients with aortic aneurysm compared with control subjects. After aortic aneurysm repair, the number of CD34⁺ cells did not change over 48h; however, it had doubled by the 7th day (Fig. 2).

Levels of serum VEGF

As shown in Fig. 3, the baseline serum VEGF levels did not differ between the patients and control subjects. After aortic aneurysm repair, the VEGF levels increased

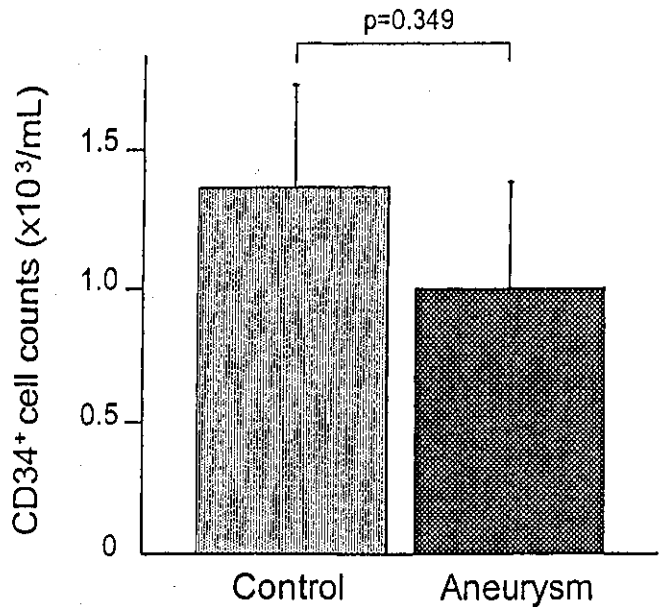


Fig. 1. Baseline CD34⁺ cell counts in the peripheral blood of patients with aortic aneurysm and control subjects. The CD34⁺ cell counts were determined by two-color flow cytometry. Results are shown as mean \pm SEM

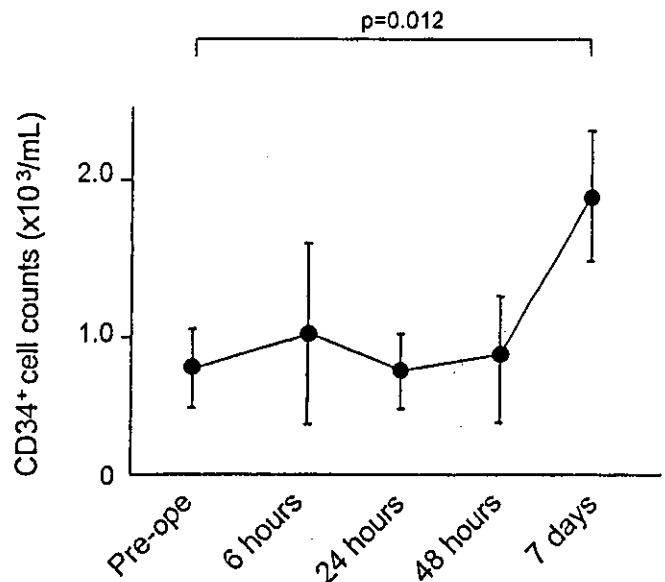


Fig. 2. Time course of the number of mobilized CD34⁺ cells in the peripheral blood of patients after vascular prosthesis replacement. Samples were taken preoperatively (*Pre-ope*), 6, 24, and 48 h, and on the 7th day after surgery. There was a significant increase in the number of CD34⁺ cells 7 days after surgery. Results are shown as mean \pm SEM

gradually with a significant elevation after 48 h (Fig. 4), which was followed by an increase in CD34⁺ cell counts.

Discussion

Emerging data have suggested that a subpopulation of bone marrow-derived EPCs may contribute to new blood vessel