

図4 心筋細胞シートの皮下移植

aは皮下に移植したシートの外観を示し、b~eはその組織像を示した。b,cはHE染色、dはAzan染色、eは免疫蛍光染色を示す。緑はアクチニン、赤はconnexin43、青はTOTO-3で核を示す。
(文献⁹⁾より引用)

に対し間葉系幹細胞であるCMG細胞を移植した群では、梗塞巣にGFP陽性アクチニン染色陽性の心筋細胞が確認された。これらの解析の結果の示すところは、心筋梗塞などの心筋組織の壊死を伴うような障害の際には骨髄より間葉系幹細胞が動員されること、そしてこの間葉系幹細胞

は梗塞巣において心筋細胞に分化し得るものであるということである。われわれは、骨髄から幹細胞が動員される際にサイトカインであるG-CSFを投与しているが、非投与群とG-CSF投与群の間で再生心筋細胞の数は大きく異なることより、G-CSFは従来知られているように造血幹細胞

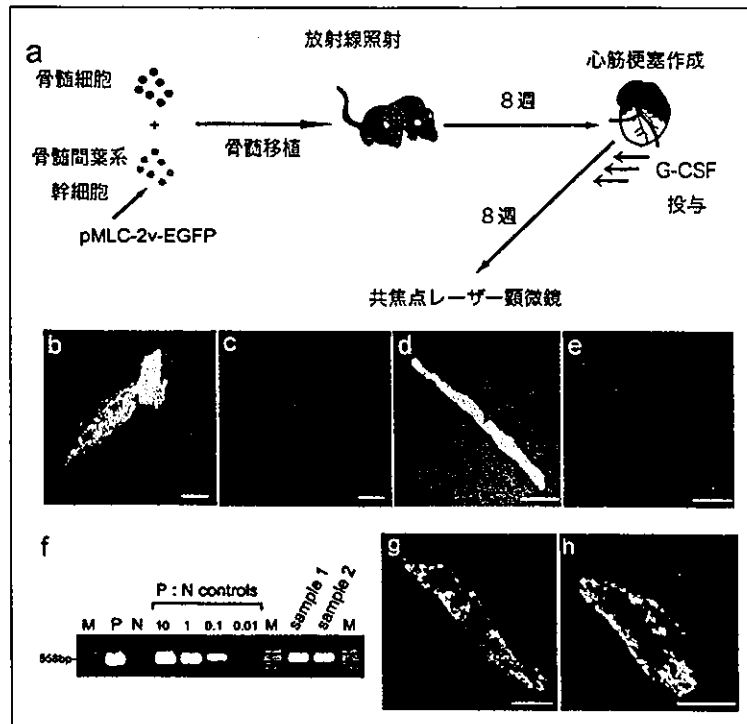


図5 骨髄間葉系幹細胞の生体内における心筋分化
 骨髄間葉系幹細胞に図2で紹介したプラスミドを遺伝子導入し、致死量の放射線を照射したマウスの脛骨内に骨髄内骨髄移植を行った。骨髄が再構築した3か月後にマウスに心筋梗塞を作成し、梗塞巣を観察した。梗塞部にはGFP陽性の心筋細胞が観察された。これより、心筋細胞を再生するのは間葉系幹細胞であることが証明された。(文献⁹⁾より引用)

胞を流血中に動員するだけでなく、間葉系幹細胞も動員できるものであることが明らかとなった(図5)。

G-CSFはすでに一部の臨床でも使用されているが、その評価ははまだ定まっていない。ヒトでもマウスと同様に間葉系幹細胞を動員し、梗塞巣の再生に有用であるか否かは明らかとなっていない。われわれは、心筋梗塞症例にむやみにこうしたサイトカインを使用するのではなく、その分子メカニズムを同時に明らかにするような研究も平行して進めなければならないと考えている。

おわりに

心不全の心筋再生療法というものは言葉としては美しい。しかし、その根底には大地に根を張ったしっかりとした基礎研究が裏打ちしたも

のでなくてはならないし、その効果の評価も主観的なものであってはならない。幹細胞研究は日進月歩で進んでおり、胚性幹細胞、間葉系幹細胞のいずれかあるいは両者から心筋細胞を大量に生産できる日もそう遠い先ではないであろう。また、サイトカインを用いた治療はより近い将来臨床で行われるものと推測される。かかる現状をみた時、より深い理解が必要な時代になってきたと痛感する毎日である。

文 献

- 1) Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, et al. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells *in vitro*. J Clin Invest 1999; 103 : 697-705.
- 2) Hakuno D, Fukuda K, Makino S, et al. Bone marrow-derived cardiomyocytes (CMG cell) expressed functionally active adrenergic and muscarinic re-

G-CSFによる 骨髄筋前駆細胞の動員

Mobiligation of the Cardiomyocyte Precursor Cells
From Bone Marrow by G-CSF

福田 恵一

慶應義塾大学医学部呼吸循環器内科

Key Words

G-CSF, cardiomyocyte,
mesenchymal stem cell,
bone marrow,
hematopoietic stem cell

Abstract

我々はこれまで骨髄中の間葉系幹細胞が*in vitro*で心筋細胞に分化できることを報告してきた。骨髄細胞の多分化能に関して最近さまざまな議論が為されてきた。造血幹細胞の多分化能には否定的な見解が示され、細胞融合が問題をさらに複雑にしている。我々は*in vitro*において骨髄の心筋分化能のある細胞を同定するため、GFPで標識した細胞を用いて3種の骨髄移植（全骨髄細胞、単一造血幹細胞、間葉系幹細胞移植）を行った。その結果、間葉系幹細胞が*in vivo*においても心筋分化能を有することを明らかにした。その過程の中で、サイトカインであるG-CSFがこれまで知られているように骨髄より顆粒球や造血幹細胞を末梢血中に動員するだけでなく、間葉系幹細胞の動員にも深く関わっていることが明らかとなった。心筋梗塞や創傷など治療などG-CSFの新たな臨床への応用が視野に入ってきたといえるであろう。

はじめに

よく知られているように骨髄には造血幹細胞を頂点とした血液系の細胞が多数存在する。その比率は99%以上であるが、血液細胞以外にも造血を助ける働きを持つ間質細胞（ストローマ）と呼ばれる細胞があり、造血の微小環境を保っている。1990年代初頭より、この間質細胞の一部の細胞に骨や軟骨、脂肪細胞に分化するものが存在することが知られ、間質細胞とは分けて間葉系幹細胞と呼ばれるようになった。

Keiichi Fukuda
Cardiopulmonary Division, Department of Internal
Medicine, Keio University School of Medicine

1. 骨髄において心筋に分化可能な幹細胞

我々は1990年代中頃よりこの間葉系幹細胞が多様な分化能を有することに着目し、心筋細胞に分化するのではないかと考え、研究を行った。その結果、分化誘導剤を用いることによって自律拍動能を有する心筋細胞が分化誘導できることを明らかにした。同時期に浅原らが血管内皮前駆細胞も骨髄から得られることを証明し、骨髄細胞を用いた再生医学が注目され、大きな研究の流れができた。その後の研究で血管内皮細胞が心筋細胞に分化したとする報告や造血幹細胞がいろいろな細胞に分化できるとの報告、細胞融合の報告などがなされ、混沌とした状況が続いたが、*in vitro*で心筋細胞との共培養によることなく完全に心筋に分化可能であることが証明されているのは間葉系幹細胞だけであろう。

2. G-CSFによる末梢血幹細胞移植の発展

白血病などの血液疾患に対し、従来は骨髄移植が中心に行われてきた。しかし、近年はサイトカインであるG-CSF（顆粒球コロニー形成因子）を用いた末梢血幹細胞移植が行われるようになった。末梢血幹細胞移植は全身麻酔で骨髄を穿刺する必要が無く、侵襲度が低い。このためG-CSFは本来、抗癌剤などの影響で白血球が減少している症例に使用されるサイトカインであるが、同時に骨髄から造血幹細胞を末梢血中に強力に誘導することが

報告され、末梢血幹細胞移植に用いられるようになった。

■ 3. G-CSFによる骨髄細胞の動員

我々は生体内で造血幹細胞と同様に間葉系幹細胞がendosteal nicheと呼ばれる部位に存在することよりG-CSFが間葉系幹細胞を末梢血中に誘導するのではないかと考えた。また、最近様々に報告されている骨髄内の細胞の内、我々が報告したように間葉系幹細胞が心筋分化能を有するのか、それとも造血幹細胞も心筋分化能を有するかという問題に決着を付けるため、マウスを用いて3種類の骨髄移植の実験を行った。骨髄ドナーマウスにはGFPトランスジェニックマウスを使用した。図に示すように致死量の放射線を照射したレシビエントマウスに(1)全骨髄細胞(造血幹細胞+間葉系幹細胞)を移植した群、(2)KSL-SP法という特殊な方法を用いて、GFPマウスから造血幹細胞のみを1個のみ単離し、当座の造血を助ける非標識の少量の骨髄細胞(放射線保護細胞)と混合して

移植したもの(単一造血幹細胞移植)、(3)我々が骨髄より単離した間葉系幹細胞(CMG細胞)を心筋細胞に分化するとGFPを発現するように遺伝子導入した細胞(CMG-ME細胞)と非標識の少量の骨髄細胞(放射線保護細胞)を脛骨内に骨髄内骨髄移植したもの(間葉系幹細胞移植群)、の3群に分けて骨髄移植を行った。造血能の回復を待ち心筋梗塞を作成し、直後にG-CSFを10日間投与し、2ヶ月後に梗塞巣を観察した。(1)全骨髄細胞移植群ではGCFを使用しない場合には梗塞巣にGFP陽性細胞(白血球あるいは線維芽細胞)は散在するものの、GFP陽性の心筋細胞はごく稀に観察される程度であった。これに対し、GCFを使用した場合には梗塞部および境界部領域に多くのGFP陽性が存在し、またGFP陽性の心筋細胞も多数観察された。(2)単一造血幹細胞移植ではGFP陽性細胞は梗塞巣内に認められるものの、GFP陽性心筋細胞はほとんど観察されなかった。GFP陽性の心筋細胞は全実験を通じて3個だけしか観察されず、最近報告されている細胞融合の頻度と同程度であ

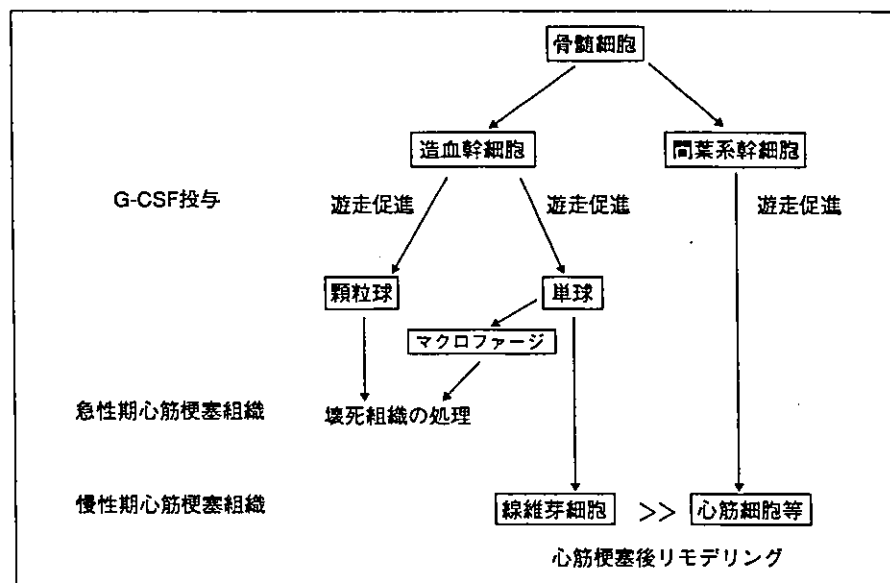


図 GFPを発現する骨髄細胞の移植実験から、骨髄中の造血幹細胞由来の細胞は心筋梗塞巣中の線維芽細胞になり、間葉系幹細胞が心筋細胞に分化することが示された。また、G-CSFは造血幹細胞だけでなく間葉系幹細胞を流血中に動員することが明らかとなった。

心筋の再生

下地顕一郎*, 福田恵一*

SHIMOJI Kenichiro, FUKUDA Keiichi

* 慶應義塾大学医学部呼吸循環器内科

KEY WORDS

骨髄間葉系幹細胞, 胚性幹細胞, 再生医学, 心筋細胞, 心不全

POINTS

- 重症難治性心不全に対する根治療法として再生医療が期待される。
- 利用できる細胞の候補として, 胚性幹細胞, 骨髄間葉系幹細胞, 心筋内組織幹細胞があげられる。
- 工学的手法の発達により個々の細胞を組織として移植する技術も発達してきた。
- 神経再支配, 催不整脈性などの問題は残されている。
- 倫理上の議論が十分になされて初めて臨床応用が可能になる。

はじめに

心臓疾患への治療に関しては, 近年, カテーテル治療や植え込み型除細動機の開発, アンジオテンシンIIレセプター遮断薬の一般臨床への普及, マルチスライスCTによる画像診断の進歩など, そのめざましい発展を遂げてきた。しかし難治性重症心不全に関しては, これらの領域ほどの進歩は残念ながらみられなかった。

難治性重症心不全の根治的治療としてはこれまで心臓移植が唯一とされてきた。しかしドナーの不足の問題から, その恩恵にあずかる例はごく一部にかぎられる。これに対し, 細胞生物学, 遺伝子工学の発達は新たな展開をもたらそうとしている。つまり, 再生医学, すなわち未分化な幹細胞を心筋細胞に分化誘導してこれを移植するという試みが現実味を帯びてきた。本稿ではとくに心筋細胞に分化可能な多能性幹細胞に焦点をあて, 心筋再生の現状を解説する。

心筋細胞に分化する多能性幹細胞

近年の精力的な研究により, 心筋細胞に分化すること

が明らかにされている幹細胞のうち, 将来的に臨床応用が可能と思われるものとして胚性幹細胞 (ES 細胞), 骨髄間葉系幹細胞, 心筋内組織幹細胞があげられる。それぞれに利点・欠点を有しており, 現時点ではどの細胞が有望であるかについて結論は出ていない。以下にそれぞれの細胞の特徴について概説する。

ES 細胞の利用

ES 細胞は, 受精卵が胚盤胞に分化した段階の内部細胞塊から得られた細胞である。内部細胞塊は将来胎児になる部分であり, ここから得た ES 細胞は *in vivo* ではすべての組織の細胞に分化しうる。この意味で万能幹細胞ともよばれるが, *in vitro* で実際に分化が誘導できるのは胎生早期の段階で分化する細胞である。心筋細胞は胎児期の早期に分化する細胞であり, ES 細胞からは比較的得られやすい。マウスの場合には培養液中に白血病抑制因子 (leukemia inhibitory factor : LIF) を入れておくことによって未分化状態が維持されることが知られている。多くの細胞株ではフィーダーレイヤーとしてマウス胎児線維芽細胞 (mouse embryonic fibroblasts :

61(313)

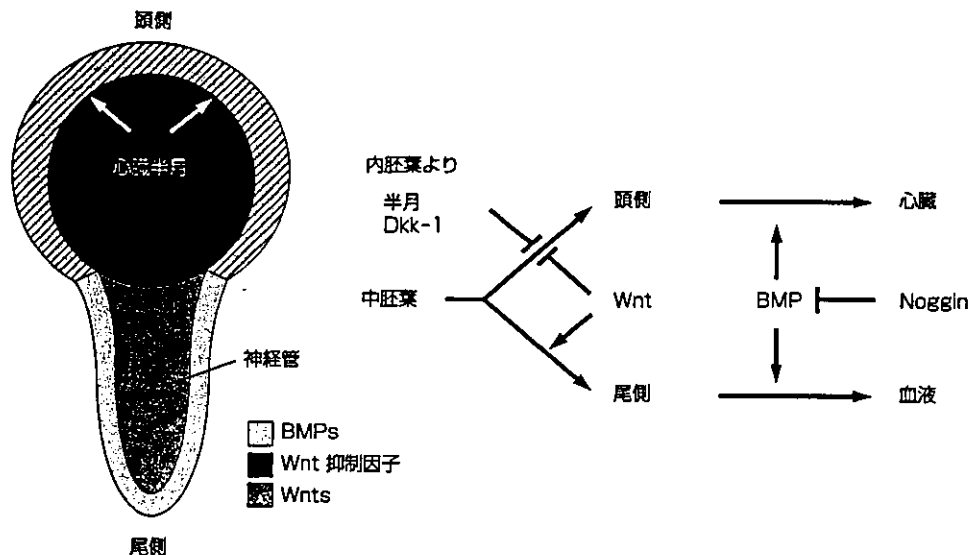


図1 中胚葉から心臓への分化経路

MEF) のうえに ES 細胞を重層して培養することが多いが、近年は技術の向上によりフィーダーレイヤーを必要としない培養も可能になった。ヒトの ES 細胞もすでに多数樹立され、わが国においても京都大学再生医科学研究所の中辻 憲夫教授により 3 株ほど ES 細胞が樹立されている。ヒトの ES 細胞は LIF により未分化機構が維持されることはなく、MEF との共培養が必須であるとされている。また、マウスと同様にヒトの ES 細胞からも心筋細胞に分化することがすでに報告されている。ES 細胞から心筋細胞への分化には BMP 2 や Wnt といったシグナル伝達経路が重要であるとされている (図1)。

ES 細胞の臨床応用上の利点は①大量培養が可能で、②分化を誘導する方法が確立している点である。逆に欠点は、まず手技的には、①ヒトで未分化維持のために MEF との共培養が必要であり、② ES 細胞から心筋細胞への選択的分化誘導法の確立が必要であり、また臨床的には、③未分化細胞が混入して移植後に奇形腫が生じてしまう可能性があり、④同種移植であるため移植後の免疫抑制剤の長期使用が必要となり、さらに、⑤倫理的問題が残されている点、などがあげられる。

近年、韓国よりヒトクローン胚の形成に成功したことが報じられた。しかし、その場合でも 100 個以上の卵を用いて 1 個成功した程度とされている。先進諸国のほとんどでクローン人間の作成は禁止されているが、臓器作

成を目的としたクローン ES 細胞は一部の国でおこなわれる可能性はある。この点に関しては今後国民的な議論がなされるべきである。技術革新により、卵細胞を用いずに ES 細胞レベルでのクローン化ができれば倫理的にはハードルが低くなって臨床応用される可能性もあり、更なる研究が望まれる。

② 骨髄間葉系幹細胞の利用

骨髄は造血の主たる場であり、骨髄中の細胞のほとんどは造血幹細胞に由来する血液細胞である。しかし骨髄中には造血幹細胞に由来する細胞以外にも、一部間質細胞とよばれる接着系の細胞が存在し、造血幹細胞の機能維持にはたっている。これら間葉系の細胞は *in vitro*, *in vivo* で骨芽細胞、軟骨芽細胞、脂肪細胞、骨格筋細胞、心筋細胞などの中胚葉系の細胞に分化するが、近年では一部外胚葉系の神経細胞に分化することが知られるようになり、体性幹細胞とよばれるようになった。なお、一時期造血幹細胞にも多分化能を有することが報告され、造血幹細胞の多分化能が誇張された。これは心臓移植後の剖検心臓を用いた研究よりはじまった。すなわち、女性ドナーから提供された心臓が男性レシピエントに移植され、一定時間後に別の理由で死亡し剖検したところ、心臓内に Y 染色体陽性の心筋細胞が観察されたと報告された。この現象は男性骨髄から多能性幹細胞が心臓に移

動し、心筋に分化したものであろうとされた。しかし、その後細胞融合という現象が報告され、造血幹細胞のみかけの多能性に関しては細胞融合が原因ではないかという否定的な見解が多く示された。

われわれの GFP トランスジェニックマウスを用いた骨髄移植モデルによる検討でも造血幹細胞の多能性に関しては否定的な所見が得られている。すなわち、骨髄移植モデルで心筋細胞に分化する細胞は間葉系幹細胞であると考えられる。

最近のトピックスは骨髄内の成人多能性幹細胞 (multipotent adult progenitor cell : MAPC) であろう。MAPC はミネソタ大学の Verfeillie 教授らのグループ²⁾が報告した多分化能を有する細胞で、あらゆる種類の細胞に分化誘導可能な細胞であると報告されている。MAPC を別のマウスの受精卵の胚盤胞に注射してキメラマウスを形成させると、MAPC は胚性幹細胞と同様にほぼすべての細胞に分化することが報告された。しかし、MAPC の培養法はきわめて細胞密度の薄い条件で培養しないと細胞が分化するとされ、再現性も乏しいことから細胞を *in vitro* で長期間培養することによるアーチファクトではないかとする声もある。MAPC に関しては今後の研究をみたくて慎重に判断されるべきであろう。

④ 心筋内の幹細胞の利用

Anversa らのグループ³⁾は心筋細胞中の幹細胞因子 (stem cell factor : SCF) レセプターである c-kit 陽性の小型細胞を単離して培養すると心筋、平滑筋、内皮細胞に分化すると報告した。この c-kit 陽性細胞は心尖部と心房内に存在、心筋梗塞の発症に伴って梗塞巣に移動し心筋細胞に分化することによって梗塞巣の修復に関与しているのではないかとしている。

また、Schneider らのグループ⁴⁾は心臓に幹細胞抗原-1 (stem cell antigen-1 : Sca-1) 陽性の細胞が存在し、これらの細胞を DNA 脱メチル化剤の 5-アザシチジンを用いて心筋細胞に分化が可能であることを示し、これらが心筋細胞の前駆細胞ではないかとしている。この Sca-1 陽性細胞は尾静脈より注射すると心筋梗塞部にホーミングするという。さらに Goodell らのグループ⁵⁾は心臓内に存在する side population (SP) 細胞を採取し

てくると一部の細胞が心筋細胞に分化すると報告した。SP 細胞は Mulligan らのグループ⁶⁾が骨髄の造血幹細胞を濃縮する方法として開発したもので、DNA 結合色素の Hoechst 33342 の細胞外へのくみ出し能力を指標として幹細胞を分離する方法である。Hoechst 33342 を細胞外にくみ出すポンプは ABC トランスポーターである MRD 1 が関与しているとされ、この蛋白を発現する細胞に幹細胞としての能力が高いとされる。c-kit, Sca-1, MRD 1 自体の構造、機能、発現する細胞をまとめたものを表①に示す。これらの c-kit 陽性細胞、Sca-1 細胞、MRD 1 陽性の SP 細胞は一部重複する性質をもつが、基本的には異なる細胞であると思われ、その存在頻度、生体での機能と存在意義は今後の解決すべき問題であろう。

これらの心臓内に存在する幹細胞が心筋細胞として存在するとして、これらを生体外に取り出して大量培養し、*in vitro* で心筋細胞に分化させて、再移植するには *in vitro* での大量培養法の確立と心筋分化誘導法が必要不可欠のものとなる。むしろ、生体内で増殖・分化させるほうが現実的である。今後の更なる研究の発展が期待される。

⑤ 再生心筋の移植方法

これまでの心臓への再生心筋細胞移植は、*in vivo* で心臓に直接細胞を注射するという方法がとられた。しかし、この方法では生着率が低く、また、移植できる細胞数もかぎられていた。

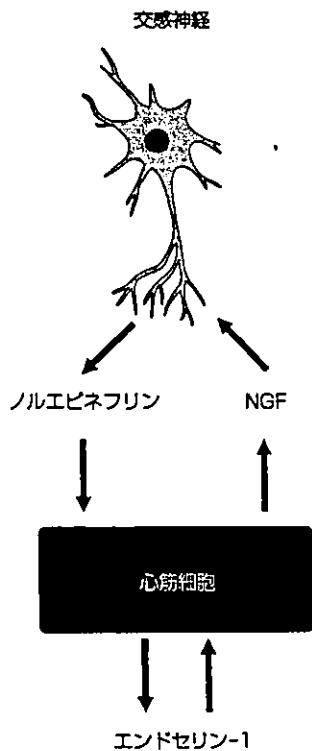
これに対し、東京女子医科大学の岡野 光夫教授らは温度により分子形態が変化し、脂溶性・水溶性が変化する化合物 poly-*N*-isopropylacryl-amide (PIPAAM) という化合物を用いた。この化合物を培養皿の表面にコーティングして温度感受性培養皿を作成し、これを用いて培養細胞をシート状に回収することに成功した。Shimizu ら⁷⁾はこの培養皿を用いて心筋細胞シートを作成し、ラット皮下に長期間生着して拍動をつづける層状の心筋組織の開発に成功した。しかし器官としての心臓を再生するには血管や神経支配、催不整脈性などクリアすべき問題も多く、今後の研究を待つことになる。

⑥ 心臓の交感神経支配の形成

心臓は交感神経の分布密度が高い臓器の 1 つである。

表① c-kit/MRD1/Sca-1の構造・分布および機能

	c-kit	MRD1	Sca-1
構造	<p>Ig様ドメイン チロシンキナーゼドメイン キナーゼ挿入部位</p>	<p>ATP</p>	<p>フォスファチジルイノシールアンカー</p>
分布	メラノサイト 肥満細胞 生殖細胞 幹細胞	肝細胞, 胆管細胞 刷子縁細胞 腎尿管細胞, 癌細胞 脳血管内皮細胞 幹細胞	血管壁 腎皮質細胞 胸腺, 脾臓 Tリンパ球 幹細胞
機能	増殖 遊走 分化 分泌	膜に存在する排出ポンプ アポトーシスの抑制	細胞接着 シグナル伝達 T細胞活性化



図② 心臓と交感神経

交感神経の刺激は心臓に心拍数上昇, 房室伝導の上昇, 陽性変力作用などをもたらす。心臓を支配する交感神経は主として星状神経節の神経細胞の支配を受ける。われわれの近年の解析では, 心臓への交感神経支配は胎性後期に心筋細胞から分泌される神経成長因子 (nerve

growth factor : NGF) を指標にして星状神経節細胞から軸索が伸長してくる。このときに心筋細胞がオートクリンに分泌するエンドセリン-1が心筋細胞自身に作用してET-Aレセプター, Giβγを介して経路でNGFを分泌させることが明らかとなった(図②)。このエンドセリン-1/NGF経路が存在しない場合には心筋細胞に交感神経が伸長せず, さらに星状神経節の交感神経細胞体自身がアポトーシスを起こすことも明らかとなった。上述の問題点をクリアするために, 再神経支配に関しても今後の研究が待たれる。

おわりに

上述のように骨髄間葉系幹細胞やES細胞などを用いた心筋細胞の分化誘導が可能になり, また, シート状にした再生心筋の作成も可能となってきた。しかし器官レベルで機能するためにはさらにクリアすべき問題が山積しており, これらが解決されなければ治療に利用できる心筋は作成できない。

しかし近年の進歩はめざましいものがあり, これらがクリアできたとき, 再生心筋の臨床応用の具現化も可能であると確信している。



文献

- 1) Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL *et al* : Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418 : 41-49, 2002
- 2) Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D *et al* : Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell* 114 : 763-776, 2003
- 3) Oh H, Bradfute SB, Gallardo TD *et al* : Cardiac progenitor cells from adult myocardium : homing, differentiation, and fusion after infarction. *Proc Natl Acad Sci USA* 100 : 12313-12318, 2003
- 4) Jackson KA, Majika SM, Wang H *et al* : Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest* 107 : 1395-1402, 2001
- 5) Goodell MA, Rosenzweig M, Kim H *et al* : Dye efflux studies suggest that hematopoietic stem cells expressing low or undetectable levels of CD34 antigen exist in multiple species. *Nat Med* 3 : 1337-1345, 1997
- 6) Shimizu T, Yamamoto M, Akutsu T *et al* : Electrically communicating three-dimensional cardiac tissue mimic fabricated by layered cultured cardiomyocyte sheets. *J Biomed Mater Res* 60 : 110-117, 2002

6. 間葉系幹細胞を用いた心筋再生

板橋 裕史*・福田 恵一*¹⁾

Itabashi Yuji Fukuda Keiichi

*慶應義塾大学医学部循環器内科 ¹⁾講師

Summary

各種の心疾患の終末像である重症心不全に対する唯一の治療法は、心臓移植しか存在しないが、ドナー不足や免疫抑制療法の副作用等の問題点は克服されていない。近年の研究により、骨髄細胞より心筋細胞が分化誘導されることが報告されてきており、さらにその由来として、骨髄間質細胞中の多能性幹細胞が注目されている。これらの分化誘導された心筋細胞を心臓へ移植したり、分化を促進するサイトカインを投与したりすることによって、心機能を改善させようとする試みがなされている。

はじめに

心筋梗塞や拡張型心筋症などの広範囲に及ぶ、心筋障害を原因とした各種の心疾患の最終病像は、心筋細胞の喪失や機能低下に伴う収縮力不足による心不全である。種々の薬物療法では十分な心機能の改善が望めない程の重篤な心不全では、現時点では、心臓移植以外に確立された治療法は存在しない。しかし、米国においても数多くの心臓移植対象患者がいるものの、移植の恩恵にあずかれるのはその中の極一部にとどまっており、心臓移植療法においても慢性的なドナー不足が深刻な問題となっている。また、心臓移植には免疫拒絶、感染症、発癌などの解決せねばならない問題

も存在する。移植に変わる治療方法の開発が切望される中で、各種の多能性幹細胞を用いた再生医学に大きな期待が寄せられている。しかし、心筋細胞は生体内で最終分化した細胞であり、それ自体が増殖しない細胞であると考えられ、今日に至るまで心筋細胞の再生は極めて困難であるとされてきた。近年、骨髄細胞や胚性幹細胞 (embryonic stem cell : ES 細胞) をはじめとした、各種の幹細胞から心筋細胞を分化誘導する報告が相次いでなされるようになり、中でも我々は、骨髄間葉系幹細胞を用いることにより心筋細胞が再生されることを報告している。本稿では、心筋梗塞による心不全への治療として期待される、様々な幹細胞を用いた心筋再生、再生心筋細胞移植の実際

【略語一覧】

ES 細胞 (embryonic stem cell ; 胚性幹細胞)

について、今後の展望を踏まえ述べる。

1. 心筋細胞再生のための治療戦略

心筋細胞は生後2週間くらいまで分裂増殖し、その後は細胞分裂を行わず、個々の細胞が増大する事によって心臓全体が大きくなり成人の心臓が形成される。骨格筋細胞の研究において、MyoDという転写因子が発生の段階で発現し、骨格筋細胞の形成に重要な役割を果たしていることが判明している¹⁾。この遺伝子は、他の細胞に導入し強制発現させると、その細胞が骨格筋細胞に形質転換するという性質を持つことから、マスター遺伝子と呼ばれた。MyoDの発見以来、心筋細胞におけるマスター遺伝子を単離する試みがなされたが、その結果、マスター遺伝子こそ単離されはしなかったものの、心筋細胞の発生に重要な遺伝子として *Nkx-2.5*, *GATA4*, *MEF2C*, *eHAND*, *TEF-1* などの心筋組織の形成において重要な役割を果たす遺伝子が次々に発見され²⁻⁴⁾、心筋細胞の発生メカニズムの解明へ大きく貢献した。これらの遺伝子の導入により生理的な心筋細胞発生分化のプログラムを再現できれば、非心筋細胞の心筋細胞への分化誘導が実現できるのではないかと期待されている。

他の心筋再生の方法として、細胞の分裂増殖をつかさどる遺伝子を導入することにより、一度最終分化に至り増殖する能力を失った心筋細胞に、再び細胞分裂能を獲得させるという試みがある。細胞の分裂増殖にはサイクリン、サイクリン依存性キナーゼ (cyclin-dependent kinase: CDK) などの細胞周期調節遺伝子、癌抑制遺伝子などの細胞周期にかかわる遺伝子が関与しているが、これまで細胞周期調節遺伝子や発癌ウィルスの腫瘍抗原 (SV40 large T 抗原など) を心筋細胞に遺伝子

導入する事で、分裂増殖可能な心筋細胞を作成する研究がなされている⁵⁾。

そして第3の方法として、各種の多能性幹細胞から心筋細胞を分化誘導させる方法が挙げられるが、その際に用いられる幹細胞としては、体性幹細胞としての骨髄間葉系幹細胞とES細胞に期待が寄せられている。ES細胞の増殖能は著しく、心筋細胞へ効率的に分化誘導を行う技術が確立されれば、細胞供給源として極めて有用となる可能性を秘めている。しかし、ES細胞を作成する際に倫理的問題が生じること、移植後の拒絶を回避するためには、宿主と同一の遺伝子を持ったES細胞を用いる必要があるが、そうしたES細胞を作成するのにあたり、表現形に異常をきたさず核移植を行う手法が確立されるまでには、まだしばらく時間を要するであろうことなどが、現在の障害となっている。こうした背景の中で、宿主由来の間葉系幹細胞を用いて心筋細胞を再生させる手法は倫理的問題がなく、拒絶の心配もないことから臨床への応用を考えた際に理想的な方法といえる(表1)。

2. 心筋細胞の再生

1) 体性幹細胞を用いた心筋細胞の再生

近年の研究により、成人の組織においても様々な臓器において、未分化幹細胞が残存していることが明らかになった。間葉系の幹細胞としては、骨髄中の幹細胞が注目されている。骨髄の細胞は、将来血球に分化する造血幹細胞とこれに由来する各種の血球系細胞、そしてこの血球系細胞を支持するための骨髄間質細胞より構成される。骨髄間質細胞は多彩なサイトカイン・細胞増殖因子等を分泌し、また造血幹細胞が生存・機能している微小環境を構築し、血球系細胞の再生・増殖・

【略語一覧】

CDK (cyclin-dependent kinase; サイクリン依存性キナーゼ)

表1 心筋細胞再生のための戦略

<p>心筋細胞特異的転写因子の遺伝子導入</p>	<p>マスター遺伝子の導入</p>	<p>心筋細胞分化過程の解明 心筋のマスター遺伝子の単離 遺伝子導入のためのベクターの開発</p>
<p>心筋細胞の細胞分裂能獲得</p>	<p>細胞周期調節遺伝子</p>	<p>心筋細胞の終末分化機序の解明 遺伝子導入のためのベクターの開発</p>
<p>未分化幹細胞から心筋細胞への分化誘導</p>	<p>分化誘導</p>	<p>未分化幹細胞の単離 効率的な分化誘導法の確立 (分化に必要な細胞増殖因子などの同定)</p>

分化を補佐するという機能を持つ。最近の研究によれば、骨髄間質細胞中には間葉系の多能性幹細胞が含まれており、骨芽細胞、軟骨芽細胞、脂肪細胞、骨格筋細胞、靭帯、腱などの中胚葉系の様々な細胞に分化することが報告されている。

我々はマウス骨髄の初代培養を行い、付着系の細胞である骨髄間質細胞を分離した後、これを長期培養することで不死化した細胞株を作成した。この多クローン細胞株にDNAの脱メチル化剤である5-アザシチジンを追加し、さらに2週間程度培養を続けると少ない確率ではあるが、自己拍動する細胞が得られた。こうして得られた細胞株のなかで自己拍動する割合の高いクローンをcardiomyogenesis (CMG) 細胞株として樹立した。CMG細胞は5-アザシチジンにより最終的に分化誘導を行うと約30%の細胞が自己拍動を開始するようになった⁹⁾。

2) 骨髄由来の心筋細胞の特徴

CMG細胞は最終分化誘導を行う前には線維芽細胞様の形態を示している(図1)。5-アザシチジンによる最終分化により形態は著しく変化し、分化誘導1週目頃より一部の細胞の細胞質が大きくなり、円形あるいは棒状を呈するようになる。分化誘導後2週になると、こうした細胞は互いに連結しあい、筋管細胞様となる。3週以後には、多くの細胞が縦に一列に並び、同期して収縮する。分化誘導4週以後には、培養皿の上の連結される細胞はすべて同期して収縮し心筋組織様になる。

心筋細胞は横紋筋であるが、CMG細胞も電子顕微鏡で観察すると典型的な横紋構造が観察され、また心房性ナトリウム利尿ペプチドを含有する心房顆粒と思われる高密度顆粒を多数認めた。遺伝子レベルでの解析では、CMG細胞は心筋細胞特異的とされる心房性ナトリウム利尿ペプチド(artial natriuretic polypeptide: ANP) および脳

【略語一覧】

CMG (cardiomyogenesis)

ANP (artial natriuretic polypeptide ; 心房性ナトリウム利尿ペプチド)

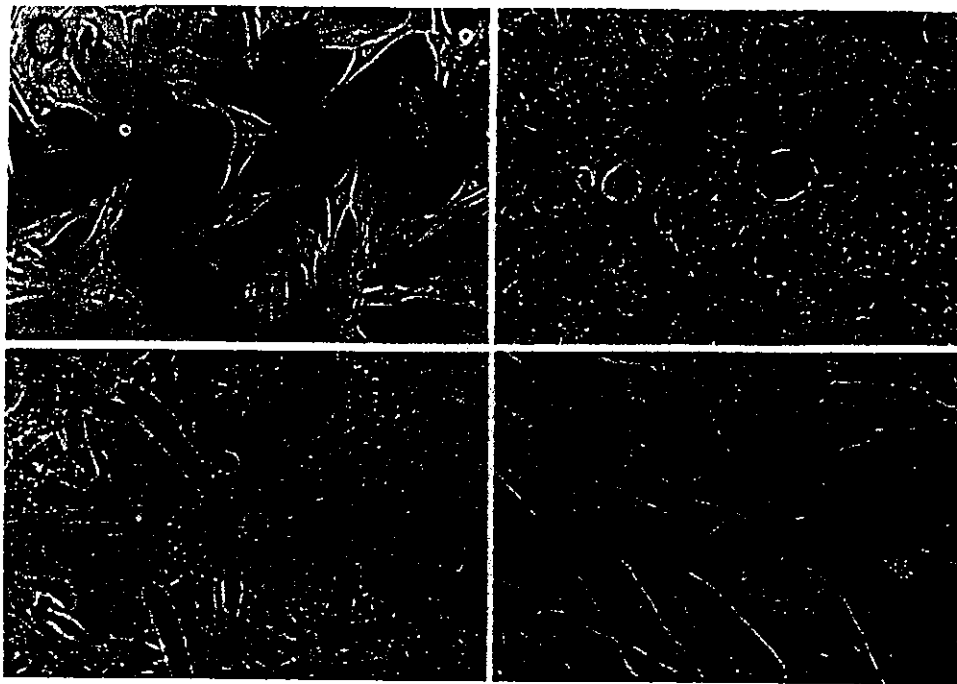


図1 最終分化誘導におけるCMG細胞の位相差顕微鏡写真

5-アザシチデンによる、最終分化誘導後のCMG細胞像。(左上) 5-アザシチデン投与前のCMG細胞。線維芽細胞に似た様相を呈する。(右上) 5-アザシチデン投与後1週間後のCMG細胞。(左下) 5-アザシチデン投与後2週間後のCMG細胞。棒状に形態変化した細胞が認められる。(右下) 5-アザシチデン投与後3週間後のCMG細胞。ネットワークを形成した細胞が同期した自律収縮を示す。(パネル内の線は100 μ mを示す。)

性ナトリウム利尿ペプチド (brain natriuretic peptide: BNP) を発現していた。

心筋細胞は筋肉が収縮するための蛋白として α -アクチン、ミオシン重鎖、ミオシン軽鎖などを持っているが、これらの収縮蛋白にはいくつかのアイソフォームが存在しているが、それは胎児(胎仔)期と成人(成獣)期、あるいは心房と心室などで筋肉の収縮速度、エネルギー効率などが異なり、それぞれに都合の良い条件を整えるためと考えられている。生体内の心筋細胞とCMG細胞の収縮蛋白のアイソフォームを表2に示した。

心筋細胞に分化したCMG細胞の場合、上記の様にアイソフォームの発現様式は α -アクチンの場合 Skeletal 型 > Cardiac 型、ミオシン重鎖の場合

合 β 型 > α 型であった。ミオシン軽鎖では2v型が発現しているのに対し、2a型の発現はみられなかった。また、CMG細胞では分化誘導後にはナトリウム利尿ペプチドであるANP、BNPの発現が観察された。心筋収縮蛋白質の発現様式より判断すると、CMG細胞の心筋細胞としての表現型は、胎仔型心室筋細胞の形質をもつと考えられた。

心筋細胞は自律神経の作用により、心拍数の変動、心収縮力の調整、興奮伝播速度の調節が行われる。交感神経と副交感神経は神経終末よりノルエピネフリンとアセチルコリンを分泌する。一方、心筋側はノルエピネフリンの $\alpha 1$ 、 $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 受容体、アセチルコリンのムスカリン型 M1、

《略語一覧》

BNP (brain natriuretic peptide; 脳性ナトリウム利尿ペプチド)

表2 心筋収縮蛋白のアイソフォームから見たCMG細胞の表現型

	心房筋		心室筋			CMG細胞
	胎仔型	成獣型	胎仔型	新生仔型	成獣型	
α -アクチン	skeletal	cardiac	skeletal > cardiac	skeletal	cardiac	skeletal > cardiac
ミオシン重鎖	α 型 > β 型	α 型	β 型 > α 型	α 型 > β 型	α 型	β 型 > α 型
ミオシン軽鎖	2a	2a	2v	2v	2v	2v

表3 CMG細胞由来再生心筋細胞の受容体発現と受容体刺激による効果

受容体の種類	α 受容体			β 受容体		ムスカリン受容体	
	α 1A	α 1B	α 1D	β 1	β 2	M1	M2
受容体のサブタイプ							
発現時期	最終分化誘導前より(漸増)	最終分化誘導前より(不変)	最終分化誘導前より(漸減)	最終分化誘導後1週より	最終分化誘導後1週より	最終分化誘導後1週より	最終分化誘導後1週より
シグナル伝達機構の検証	ERK 活性化	ERK 活性化	ERK 活性化	cAMP 上昇	cAMP 上昇	IP3 上昇	IP3 上昇
確認出来る作用	肥大作用			心拍数上昇, 心収縮力増強			

M2受容体を発現し、神経とシナプスを形成する。CMG細胞ではノルエピネフリンの α 1受容体を最終分化前より発現し、ノルエピネフリンの β 1, β 2受容体、アセチルコリンM1, M2受容体を心筋細胞の形質獲得後には発現していた。また、これらの受容体は細胞内シグナル伝達機構も有していた⁹⁾(表3)。

3) サイトカインを用いた心筋細胞再生の促進
骨髄由来の幹細胞が、心筋細胞に分化することが判明してから、様々なサイトカインを用いて心筋再生を促進する試みがなされてきた。なかでも顆粒球コロニー増殖因子 (granulocyte-colony-stimulating factor: G-CSF) は、骨髄から末梢血中への幹細胞の動員を促進することによって、障害心筋領域での心筋再生が増加する作用があると

期待された。G-CSFが心筋再生に及ぼす影響を確認するために、我々は共同研究により致死量の放射線照射を行い、宿主の骨髄細胞を死滅させたマウスにEGFP (enhanced green fluorescence protein) を発現する全骨髄細胞を移植した後に心筋梗塞を作成し、G-CSFの投与の有無により骨髄細胞から再生される心筋細胞がどのように変化するかを調査した。その結果、心筋梗塞作成後10日間G-CSFを投与したマウスでは、梗塞巣周辺においてEGFPを発現する心筋細胞、すなわち骨髄由来の再生心筋細胞が166倍に増加していた。また、骨髄中の幹細胞から心筋細胞が分化誘導されることが報告されて以来、造血幹細胞と骨髄間質細胞のどちらが再生心筋細胞の由来となっているかが、しばしば議論されてきた。我々は、再生心

(略語一覧)

G-CSF (granulocyte-colony-stimulating factor ; 顆粒球コロニー増殖因子)

EGFP (enhanced green fluorescence protein)

筋細胞へと分化した多能性幹細胞がいずれの由来であるかを調べるために放射線照射を行い、骨髄細胞を死滅させたマウスの骨髄中に、心筋細胞に分化した際にEGFPを発現するように遺伝子導入を行ったCMG細胞(骨髄間質細胞由来)を移植し、心筋梗塞を作成した後にG-CFSを投与したモデルでは、心筋梗塞巣の周囲に多くのEGFP陽性心筋細胞が認められた。これらの結果からG-CSFは心筋梗塞巣において、骨髄幹細胞からの心筋再生を促進し、心機能を改善する効果があること、これらの再生心筋細胞は造血幹細胞ではなく骨髄間質細胞より分化している可能性が高いことが示された¹⁰⁾。

おわりに

成人の組織内に存在する多能性幹細胞の分化能が研究されるに従い、これらは組織再生の有力な材料であり、これまで不可能と考えられていた心筋組織の再生が実現の可能性を帯びてきた。しかし、心筋の再生に関してはまだ動物モデルのみの報告も少なくなく、ヒトに臨床応用するにはまだ解決すべき課題も多く残されている。

循環器領域における再生医療の分野でも、心筋再生治療に関する研究は着実に進んでおり、実際に骨髄細胞、筋芽細胞などを用いた臨床試験が欧米では次々に行われている。これらの臨床試験においては心機能が改善されたなど、おおむね良好な結果が報告されているようである。しかし、これらの細胞移植研究において、心機能改善の機序に関してはリモデリングの防止や血管新生の促進など、さまざまなメカニズムが考えられており、心筋再生自体が心機能の改善に、どの程度貢献しているのかは未だ不明である。

原疾患を問わず、重篤な心不全に陥った心臓をよみがえらせるためには、心筋組織の再生が不可

欠である。今後、各種の多能性幹細胞から心筋が再生される機序がより詳細に解明され、臨床応用にたどり着く日が来ることが切望されている。

文献

- 1) Runicki MA, et al : MyoD or Myf-5 is required for the formation of skeletal muscle. *Cell* 75 : 1351-1359, 1993
- 2) Komuro I, Izumo S : Csx : a murine homeobox-containing gene specifically expressed in the developing heart. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:8145-8149, 1993
- 3) Lints TJ, et al : Nkx-2.5 : a novel murine homeobox gene expressed in early heart progenitor cell and their myogenic descendans. *Development* 119 : 969, 1993
- 4) Kuo CT, et al : GATA4 transcription factor is required for ventral morphogenesis and tube formation. *Genes Dev* 11 : 1061-1072, 1997
- 5) Lin Q, Schwarz J, Bucana C, Olson EN : Control of mouse cardiac morphogenesis and myogenesis by transcription factor MEF2C. *Science* 276 : 1404-1407, 1997
- 6) Firulli AB, et al : Heart and extra-embryonic mesodermal defects in mouse embryos lacking the bHLH transcription factor Hand1. *Nat Genet* 18 : 266-270, 1998
- 7) Lefterovich JM, et al : Heart regeneration in adult MRL mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 98 : 9830-9835, 2001
- 8) Makino S, et al : Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells *in vitro*. *J Clin Invest* 103 : 697-705, 1999
- 9) Hakuno D, et al : Bone Marrow-Derived Regenerated Cardiomyocytes (CMG Cells) Express Functional Adrenergic and Muscarinic Receptors. *Circulation* 105 : 380-386, 2002
- 10) Kawada H, et al : Nonhematopoietic mesenchymal stem cells can be mobilized and differentiate into cardiomyocytes after myocardial infarction. *Blood* 104 : 3581-3587, 2004

Proliferation, differentiation, and tube formation by endothelial progenitor cells in response to shear stress

Kimiko Yamamoto,¹ Tomono Takahashi,² Takayuki Asahara,³
Norihiko Ohura,¹ Takaaki Sokabe,¹ Akira Kamiya,⁴ and Joji Ando¹

¹Department of Biomedical Engineering, Graduate School of Medicine, University of Tokyo, 113-0033 Tokyo; ²Department of Internal Medicine, Tokyo Medical University, 160-8402 Tokyo;

³Department of Physiology, School of Medicine, Tokai University, 259-1193 Isehara; and ⁴Interdisciplinary Science Center, Nihon University, 102-0074 Tokyo, Japan

Submitted 5 March 2003; accepted in final form 1 July 2003

Yamamoto, Kimiko, Tomono Takahashi, Takayuki Asahara, Norihiko Ohura, Takaaki Sokabe, Akira Kamiya, and Joji Ando. Proliferation, differentiation, and tube formation by endothelial progenitor cells in response to shear stress. *J Appl Physiol* 95: 2081–2088, 2003. First published July 11, 2003; 10.1152/jappphysiol.00232.2003.— Endothelial progenitor cells (EPCs), circulating in peripheral blood, migrate toward target tissue, differentiate, and contribute to the formation of new vessels. In this study, we report that shear stress generated by blood flow or tissue fluid flow can accelerate the proliferation, differentiation, and capillary-like tube formation of EPCs. When EPCs cultured from human peripheral blood were subjected to laminar shear stress, the cells elongated and oriented their long axes in the direction of flow. The cell density of the EPCs exposed to shear stress was higher, and a larger percentage of these cells were in the G₂-M phase of the cell cycle, compared with EPCs cultured under static conditions. Shear stress markedly increased the EPC expression of two vascular endothelial growth factor receptors, kinase insert domain-containing receptor and fms-like tyrosine kinase-1, and an intercellular adhesion molecule, vascular endothelial-cadherin, at both the protein and mRNA levels. Assays for tube formation in the collagen gels showed that the shear-stressed EPCs formed tubelike structures and developed an extensive tubular network significantly faster than the static controls. These findings suggest that EPCs are sensitive to shear stress and that their vasculogenic activities may be modulated by shear stress.

blood vessels; angiogenesis; neovascularization; mechanical stress; vascular endothelial growth factor

THE FORMATION OF NEW BLOOD vessels in postnatal life has generally been considered to be mediated by the sprouting of endothelial cells (ECs) from preexisting vessels, a process referred to as angiogenesis. However, recent studies have indicated that a vasculogenesis process involving the in situ differentiation of endothelial precursor cells and their subsequent organization into new vessels is also responsible for postnatal neovascularization (10, 22, 27). The existence of bone marrow-derived endothelial progenitor cells (EPCs) circu-

lating in the peripheral blood has been demonstrated in adult humans (6, 26). EPCs have the capacity to circulate, proliferate, and differentiate into mature ECs in response to a variety of growth factors, including VEGF, and other cytokines (7, 16, 18). Transplantation studies have revealed that EPCs can be incorporated into sites of active neovascularization in ischemic hindlimbs and myocardium and contribute to both tumor growth and the formation of new blood vessels (5, 20, 40). However, the role of EPCs in supporting postnatal vasculogenesis is under intensive investigation, and the factors regulating the migration, proliferation, differentiation, and vessel formation of EPCs are not yet known.

During the process of EPC incorporation into tissues and neovascularization, the cells are exposed to fluid shear stress, a mechanical force generated by blood flow or interstitial fluid flow (42). Ample evidence has shown that shear stress modulates mature EC function and gene expression, playing important roles in the homeostasis of vascular functions and the mechanisms of blood flow-dependent phenomena, such as angiogenesis, vascular remodeling, and atherogenesis (12). Accordingly, the present study was designed to examine the effects of shear stress on EPCs. Using a flow-loading apparatus, we applied controlled levels of laminar shear stress to EPCs isolated from human peripheral blood and examined the changes in their morphology, proliferation, and expression of EC-specific marker proteins. We also examined the effect of shear stress on tube formation by EPCs in collagen gels.

METHODS

Mononuclear cell isolation and culture. Mononuclear cells were isolated from 100 ml of human peripheral blood by density gradient centrifugation by using Vacutainer CPT tubes (Becton Dickinson) containing Histopaque-1077 (Sigma), as previously described (6). Cells were then plated on culture dishes coated with 100 μ g/ml of human fibronectin (Sigma) at a density of 5×10^5 cells/cm² and cultured in EBM-2

Address for reprint requests and other correspondence: K. Yamamoto, Dept. of Biomedical Engineering, Graduate School of Medicine, Univ. of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, 113-0033 Tokyo, Japan (E-mail: k-yamamoto@umin.ac.jp).

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. The article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

(Clonetics) supplemented with 5% fetal bovine serum, human VEGF, human FGF-2, human epidermal growth factor, insulin-like growth factor-1, and ascorbic acid at 37°C in an atmosphere of 5% CO₂. Four days after seeding, ~10% of the cells had attached to the dishes, whereas the remaining 90% were nonadherent. Nonadherent cells were removed by washing with PBS, and the media were reapplied. The culture was maintained through days 4–21.

Identification of EPCs. To confirm the EPC phenotype, attached mononuclear cells were incubated with 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate-labeled acetylated LDL (DiI-acLDL; 10 µg/ml; Biomedical Technologies) at 37°C for 1 h. The cells were then fixed with 2% paraformaldehyde for 10 min and incubated with FITC-labeled *Ulex europaeus* agglutinin (lectin, 10 µg/ml; Sigma) for 1 h. After staining, the samples were viewed with an inverted fluorescent microscope (Nikon). Cells demonstrating double-positive fluorescence were identified as differentiating EPCs (7, 19, 20). Nearly all adherent cells (>95%) were DiI-acLDL(+) *Ulex*-lectin(+).

Shear stress experiments. Cells were exposed to laminar shear stress by using a rotating disk-type flow loading device, as previously described (4, 32). Briefly, a dish containing cultured EPCs was placed on the stage of the device, and a stainless steel disk was placed in the bottom of the dish. The rotation of the disk caused the media to flow in a concentric circle, thereby exerting a laminar shear stress on the cells. The intensity of the shear stress (τ) was calculated as $\tau = \mu \cdot r \omega / d$, where μ is the fluid viscosity, r is the distance from the center of the dish, ω is the angular velocity, and d is the distance between the disk and the dish. The device generates gradients of shear stress that are dependent on the distance from the center of the dish. In the majority of experiments, cells from a single dish were used, and the shear stress values were averaged. In some experiments, bands of cells at different radii were separately scraped from the same dish and studied. The shear stress used in this study ranged from 0.1 to 2.5 dyn/cm²; all experiments were performed at 37°C in a CO₂ incubator.

Flow cytometry. The expression of EC-specific marker proteins was measured by using a FACScan flow cytometer (Becton Dickinson). A total of 2×10^6 cells were incubated with monoclonal antibodies against VEGF receptors, such as kinase insert domain-containing receptor (KDR) and fms-like tyrosine kinase-1 (Flt-1) (Sigma), and adhesion molecules, such as vascular endothelial (VE)-cadherin (RDI), for 45 min at 4°C. The cells were then incubated with FITC-conjugated anti-mouse IgG (H+L) antibody (Amersham) for 30 min at 4°C and analyzed by FACS. The accumulated cells were segregated into monocyte-sized and lymphocyte-sized fractions by gating during a light-scatter analysis. Monocyte-sized, but not lymphocyte-sized, cells were positive for lectin and DiI-acLDL, whereas lymphocyte-sized, but not monocyte-sized, cells were positive for leukocyte common antigen CD45 (DAKO). Thus the gating of the monocyte-sized fraction was programmed to ensure the accumulation of EPCs. Cell number vs. logarithmic fluorescence intensity histograms were recorded for 20,000 cells per sample. Background fluorescence was obtained from the negative control cells stained with FITC-conjugated anti-mouse IgG (H+L) antibody and subtracted from the mean channel fluorescence of the specific staining patterns. The expression of each antigen was expressed as the mean channel fluorescence.

Cell cycle analysis. Cells were detached from dishes by incubating in PBS supplemented with 2 mM EDTA. The detached cells were then washed with PBS and fixed with 70% ethanol for 1 h at 4°C. After washing with PBS, the cells

were incubated with PBS containing 0.5% RNase (Sigma) for 30 min at room temperature and then stained with propidium iodide (50 µg/ml) for 15 min. The fluorescence intensity of this dye was measured in a sample containing 20,000 cells, and the cell cycle was analyzed by using ModFit LT Cell Cycle Analysis Software (Verity Software House).

RT-PCR analysis. RT-PCR was performed to determine the EC-specific marker mRNA levels, as previously described (23). Briefly, the reverse transcription of RNA was performed in a reaction mixture containing total RNA, moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (GIBCO), oligo(dT)_{12–18}, ribonuclease inhibitor, each dNTP mixture, and dithiothreitol in a first-strand buffer. The mixture was incubated at 37°C for 1 h, heated to 99°C for 5 min, and then chilled at 4°C for 5 min. The cDNA samples were then coamplified by PCR by using the following primer pairs: KDR forward: 5'-AGACC-AAAGGGGCACGATTC-3', reverse: 5'-CAGCAAACAC-CAAAAGACCAGAC-3'; Flt-1 forward: 5'-ATTTGTGATTTTGGCCTTGC-3', reverse: 5'-CAGGCTCATGAACTT-GAAAGC-3'; VE-cadherin forward: 5'-GCTGAAGGAA-AACCAGAAGAAGC-3', reverse: 5'-TCGTGATTATCCGTG-AGGGTAAAG-3'; GAPDH forward: 5'-ACATCATCCCTGC-TCTACTGG-3', reverse: 5'-AGTGGGTGTCGCTGTT-GAAGTC-3'. A solution containing *ExTaq* DNA polymerase (Takara), [α -³²P]dCTP, and each primer was added to each sample. Each temperature cycle consisted of 95°C for 30 s, 60°C for 30 s, and 72°C for 1 min. The amplified product was sampled every other cycle and electrophoresed on a 5% polyacrylamide gel. The PCR product sequences confirmed that each mRNA product had been correctly amplified by its primers.

For the quantification of PCR products, the radioactivity of each band was measured by using a GS363 Molecular Imager System (Bio-Rad) and plotted against the number of PCR cycles on a semilogarithmic scale, forming a sigmoid curve. From the curve, the cycle in which the operating range of the PCR was linear was selected, and the ratio of radioactivity between each target gene and GAPDH in the cycle was calculated as a parameter of relative mRNA levels.

Tube formation assay. Collagen gels were formed by adding Biocoat Matrigel (Becton Dickinson) into 24-well plates and incubating in a CO₂-free incubator at 37°C for 30 min. The same batch of Matrigel was used for all of the experiments. The gels were then overlaid with 1×10^6 cells suspended in culture medium and incubated at 37°C in an atmosphere of 5% CO₂. Gels were examined by using a phase-contrast microscope equipped with a digital camera PDMC (Polaroid); the images were then imported as TIFF files into National Institutes of Health (NIH) Image software. A second observer measured the total length of the tubelike structures (defined as those exceeding 200 µm in length) per each image.

Statistical analysis. All results are expressed as means \pm SD. The statistical significance was evaluated by using an ANOVA and a Bonferroni adjustment applied to the results of a *t*-test using SPSS (SPSS). A value of *P* < 0.01 was regarded as being statistically significant.

RESULTS

EPCs exhibit morphological changes in response to shear stress. EPCs attached, spread, and proliferated on tissue culture plastic coated with fibronectin and showed positive staining for both lectin and DiI-acLDL

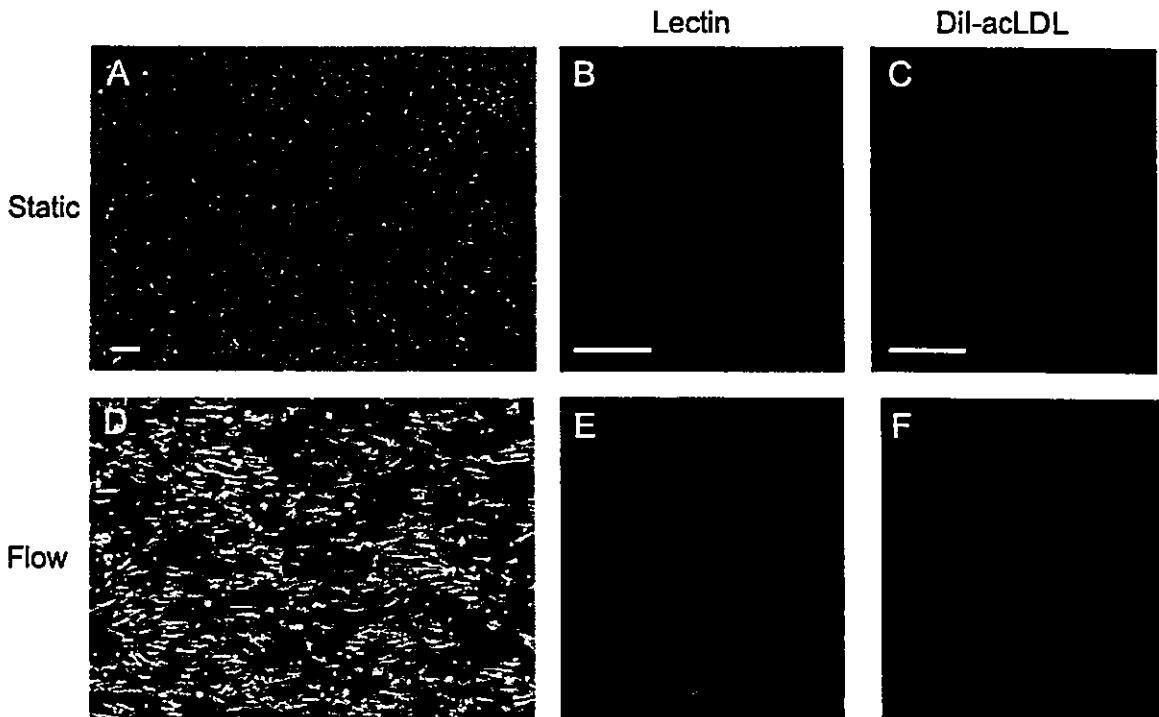


Fig. 1. Effect of shear stress on endothelial progenitor cell (EPC) morphology. *A* and *D*: phase-contrast photomicrographs of EPCs cultured under static conditions (Static) or exposed to shear stress (Flow, 0.1–2.5 dyn/cm² for 24 h). The cells shown were exposed to ~2 dyn/cm², which was calculated based on the distance of cells from the center of the dish. The EPCs became elongated and aligned in response to the shear stress. *B* and *E*: fluorescence images of lectin. *C* and *F*: fluorescence images of DiI-acLDL. All cells showed positive staining for both lectin and 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindo-carbocyanine perchlorate-labeled acetylated LDL (DiI-acLDL). Data from the day 10 culture are shown, but similar responses were obtained at other times on culture days 4 and 14. The direction of flow is left to right. The bar indicates 50 μm.

(Fig. 1, A–C). The EPCs showed no definite orientation under static conditions. When they were exposed to laminar shear stress for 24 h, they became elongated and oriented their long axes in the direction of flow (Fig. 1D). The elongated cells also showed positive staining for both lectin and DiI-acLDL (Fig. 1, E and F). When shear-stressed cells were returned to the static conditions, the changes reversed in ~24 h (data not shown), indicating the morphological response to shear stress to be reversible.

Shear stress augments EPC proliferation. EPCs were exposed to laminar shear stress for 24 h, and changes in cell density were determined on days 4, 6, 8, 10, and 14 (Fig. 2). Under static conditions, cell density increased with time but plateaued on day 10. Shear stress induced a much larger increase in cell density than occurred in static cells. Statistically significant differences were observed on days 8, 10, and 14 ($P < 0.001$).

Cell cycle analysis showed that the shear stress decreased the percentage of EPCs in the G₀ and G₁ phases of the cell cycle and increased the percentage of EPCs in the S, G₂, and M phases (Table 1).

These results indicate that laminar shear stress stimulates EPC proliferation.

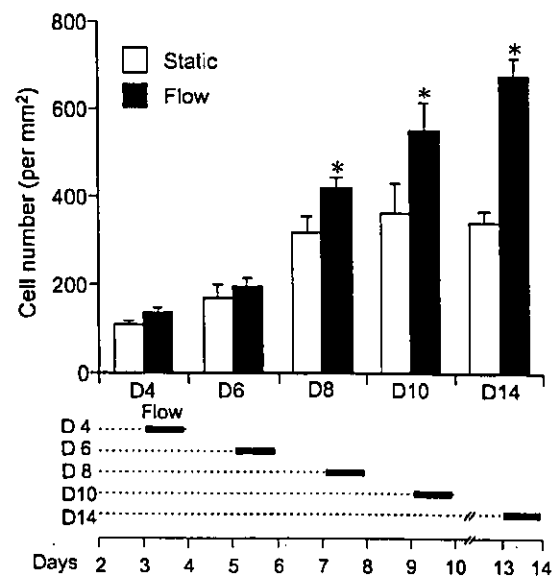


Fig. 2. Cell density as a function of time for control (Static) or shear-stressed (Flow, 0.1–2.5 dyn/cm²) EPCs. Cells were exposed to shear stress for 24 h on culture days (D) 3, 5, 7, 9, and 13, and the cell density (no. of cells positive for both lectin and DiI-acLDL per unit area) was measured by using photomicrographs obtained on D4, D6, D8, D10, and D14. Values are means ± SD for 5 separate samples. * $P < 0.001$ vs. static control.

Table 1. Effect of shear stress on cell cycle

Phase	D6		D10		D14	
	Static	Flow	Static	Flow	Static	Flow
G ₀ -G ₁	74.70 ± 3.29	60.79 ± 3.10	82.04 ± 2.80	56.85 ± 1.65*	88.83 ± 0.43	73.78 ± 3.41*
S	19.39 ± 2.68	22.99 ± 2.11	8.39 ± 0.23	26.36 ± 1.63*	8.28 ± 0.63	21.32 ± 2.88*
G ₂ -M	5.91 ± 2.03	16.22 ± 0.70*	9.57 ± 2.57	16.80 ± 2.00*	2.88 ± 0.58	4.90 ± 0.52*

Values are means ± SD of 4 separate samples. Endothelial progenitor cells either cultured under static conditions (Static) or exposed to shear stress (Flow, 0.1–2.5 dyn/cm² for 24 h) were stained with propidium iodide on culture days 6, 10, and 14; dye fluorescence was then evaluated by FACS. Cells were exposed to shear stress for 24 h on culture days 5, 9, and 13 and assayed on culture days 6, 10, and 14 (D6, D10, D14). The percentage of cells in each phase, as determined by cell cycle analysis software, is shown. *P < 0.01 vs. static control.

Shear stress modulates expression of EC-specific markers in EPCs. The cell surface expression patterns of various EC-specific markers were examined in EPCs that had been either cultured under static conditions or subjected to shear stress. Flow cytometric analysis showed a time-dependent increase in the expressions of KDR, Flt-1, and VE-cadherin in EPCs cultured under static conditions (static; Fig. 3). The levels of expression of KDR, Flt-1, and VE-cadherin increased by about six-, five-, and fivefold, respectively, on day 21, compared with the values on day 4.

Shear stress modulated the expression of these EC-specific markers in EPCs. Shear stress markedly increased the levels of expression of KDR, Flt-1, and VE-cadherin (flow; Fig. 3). The levels of KDR, Flt-1, and VE-cadherin expression on days 8, 10, and 14 in the EPCs exposed to shear stress were almost identical to those on day 21 in the EPCs cultured under static conditions.

The mRNA levels of KDR, Flt-1, and VE-cadherin were determined by using RT-PCR. Shear stress markedly increased the KDR, Flt-1, and VE-cadherin mRNA levels in a magnitude-dependent manner at day 6 (Fig. 4). These results indicate that shear stress accelerates the expression of EC-specific markers on EPCs at both the protein and mRNA levels.

Shear stress promotes tube formation by EPCs in collagen gels. To investigate whether shear stress affects the ability of EPCs to form capillary-like tubes, EPCs cultured under static conditions and EPCs exposed to shear stress for 24 h were seeded in collagen gels and examined for tube formation microscopically (Fig. 5A). Control EPCs cultured under static conditions were present in the form of individual cells or small cellular aggregates at 2 h and exhibited clustering on day 1. Tubelike structures were observed on day 4. By contrast, shear-stressed EPCs appeared to be spindle shaped, elongated, and interconnected and had formed tightly adherent cords of cells as early as 2 h after seeding. Formation of tubelike structures became more prominent on day 1, and an extensive tubular network was observed on day 4. Quantitative analysis with NIH Image showed the total length of the tubes at 2 h and on days 1, 4, and 7 to be significantly greater in shear-stressed EPCs than in static control EPCs (Fig. 5B). These findings suggest that shear stress enhances the ability of EPCs to form tubelike structures in collagen gels.

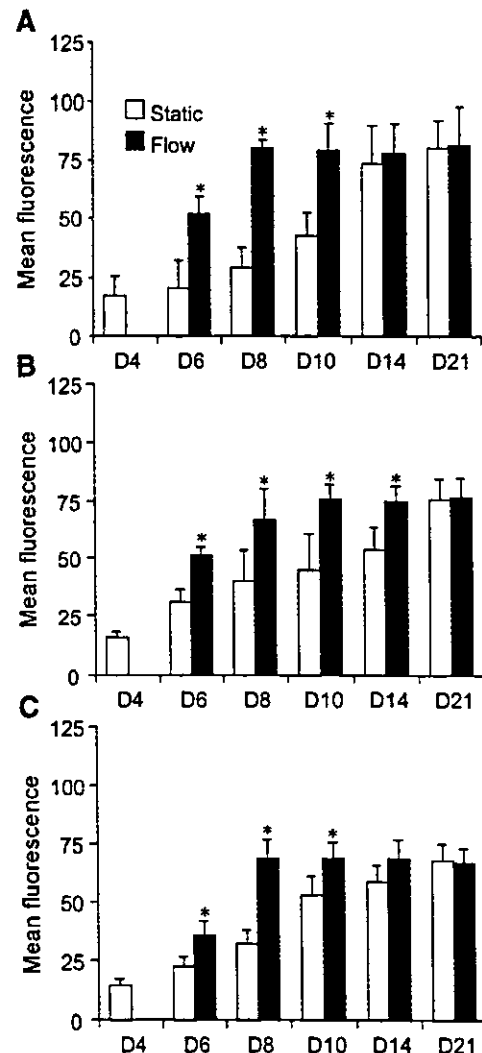


Fig. 3. Effect of shear stress on the expression of endothelial cell (EC)-specific marker proteins. EPCs cultured either under static conditions (Static) or exposed to shear stress (Flow, 0.1–2.5 dyn/cm²) were labeled with fluorescent antibodies to kinase insert domain-containing receptor (KDR; A), fms-like tyrosine kinase-1 (Flt-1; B), and vascular endothelial (VE)-cadherin (C), and the fluorescence intensity of 20,000-cell samples was measured by FACS. Cells were exposed to shear stress for 24 h on D5, D7, D9, D13, and D20, and assayed on D6, D8, D10, D14, and D21. D4, static control on culture day 4. Shear stress accelerated increases in the expression of KDR, Flt-1, and VE-cadherin. Values are means ± SD of 4 separate samples. Similar results were obtained in 3 separate experiments. *P < 0.01 vs. static control.

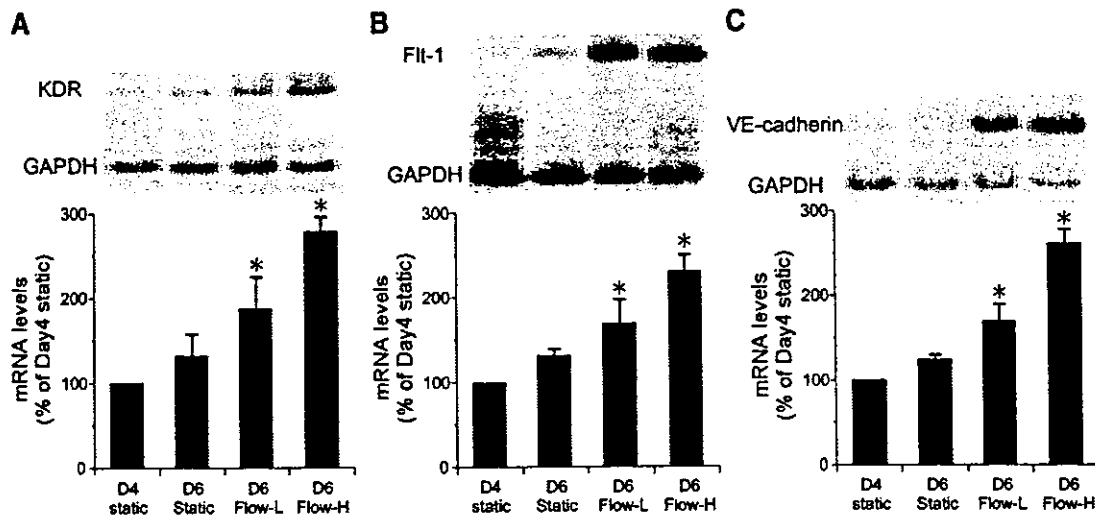


Fig. 4. Effect of shear stress on mRNA levels of EC-specific markers. A: KDR. B: Flt-1. C: VE-cadherin. Total RNA was extracted on D4 and D6 from EPCs that had been either incubated under static conditions (D4 static, D6 static) or exposed to shear stress for 24 h (D6 Flow-L, D6 Flow-H). Bands of cells at the inner or outer half of the same dish (Flow-L, 0.1–1.3 dyn/cm²; Flow-H, 1.4–2.5 dyn/cm²) were separately scraped out and analyzed. After reverse transcription of the RNA into cDNA, the cDNA was amplified by PCR using specific primers and electrophoresed on a polyacrylamide gel. Top: bands show the amplification products for each EC-specific marker and GAPDH mRNA. Bottom: bar graphs (means \pm SD) represent the percent changes relative to static controls (D4 static), in band density normalized to GAPDH mRNA levels. Shear stress dose-dependently increased KDR, Flt-1, and VE-cadherin mRNA levels. Similar results were obtained for at least 3 separate experiments. **P* < 0.01 vs. static control.

DISCUSSION

The present study demonstrated EPCs to be sensitive to shear stress, i.e., that EPCs change morphologically and functionally in response to shear stress. EPCs elongated and oriented their long axis in the direction of flow when exposed to shear stress (0.1–2.5 dyn/cm²) for 24 h. These morphological changes were observed in mature ECs, such as bovine aortic ECs and human umbilical vein ECs (13, 14). Mature ECs, however, align in the direction of flow in response to shear stress of >8–10 dyn/cm², but not to such low shear stress as 0.1–2.5 dyn/cm² (24). This indicates that, in terms of morphological responses to shear stress, EPCs are more sensitive than mature ECs.

Shear stress stimulated EPC proliferation. The effect of shear stress on mature EC proliferation, however, remains controversial. Laminar shear stress has been shown to inhibit DNA synthesis in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) in a confluent monolayer (1, 25), but to stimulate DNA synthesis in bovine aortic ECs exposed to shear stress during regeneration after monolayer scraping (3). On the other hand, animal experiments using arteriovenous shunts have shown elevated shear stress to induce an increase in EC proliferation in arteries (28). In the present study, the EPCs did not reach confluence during the 21-day culture period. Thus the absence of cell growth contact inhibition may be related to the behavior difference between EPCs and confluent HUVECs. In this sense, EPCs may not assume a complete endothelial phenotype (at least, not within 21 days). Shear stress may also cause non-EPCs to slough off, causing the

EPCs to lose cell contact signals that inhibit proliferation and/or differentiation.

Expression of the VEGF receptors KDR and Flt-1 in EPCs gradually increased with the duration of cell culture. Shear stress markedly augmented the increases in KDR and Flt-1 expression in EPCs. These findings indicate that cells exposed to shear stress acquire enhanced responsiveness to endogenous VEGF. These cells may exhibit greater participation in ongoing angiogenesis. Shear stress has also been shown to cause tyrosine phosphorylation in KDR, without the participation of its ligand VEGF, and to trigger downstream signal transduction, including activation of ras and ERK (11). This means that shear stress activates KDR in the same manner as chemical stimulation with VEGF. Thus activation of KDR, as well as the increase in its expression, may be involved in the mechanism by which shear stress stimulates EPC proliferation.

VE-cadherin is present at endothelial adherens junctions and plays an important role in intercellular adhesion and cell differentiation, growth, and migration. Shear stress increased VE-cadherin expression in EPCs at both the protein and the mRNA level. Similar results were obtained in mature ECs (33). VE-cadherin has also been implicated in vasculogenesis and angiogenesis. A targeted null mutation in the VE-cadherin gene prevented the organization of vascular-like structures in mouse embryos (41). A targeted deficiency of the VE-cadherin gene in mice was also found to increase EC apoptosis and impair vascular remodeling and maturation, causing death on day 9.5 of gestation (9). In an in vitro model in which HUVECs were in-