

(n=10 in all groups).

Supplementary Figure II

Left ventricular (LV) functional evaluation by echocardiography and a micromanometer-tipped conductance catheter.

a: Representative recording of M-mode echocardiography 28 days after cell or PBS administration. Lateral wall motion was well preserved following USSC transplantation (arrow: endocardium in the lateral wall).

b: Change in echocardiographic parameters during 23 days (between day 5 and day 28 after cell transplantation). FS, fractional shortening; RWMS, regional wall motion score. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$ (n=10 in all groups).

c: Invasive hemodynamic parameters following USSC, Fbr or PBS administration at day 28. + dP/dt and -dP/dt, Maximum and minimum derivative of LV pressure; EF, ejection fraction; LVEDP, LV end-diastolic pressure. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$. (n=10 in each group).

Supplementary Figure III

Representative immunofluorescent staining for immature cardiac markers and HMA in HD group at day 5 or 28.

a-d: Representative double immunofluorescent staining for for Nkx2.5 and HMA in HD

group at day 5 (x 400). *a*, Nkx2.5; *b*, HMA; *c*, DAPI; *d*, merge.

e-h: Representative double immunofluorescent staining for GATA4 and HMA in HD group at day 5 (x 400). *e*, GATA4; *f*, HMA; *g*, DAPI; *h*, merge.

i-l: Representative double immunofluorescent staining for cTn-I and HMA in HD group at day 28 (x 400). *i*, HMA; *j*, cTn-I; *k*, DAPI; *l*, merge.

Supplementary Figure IV

Histological evaluation of human CMC, EC and SMC development in rat ischemic myocardium at day 28.

a-e: Representative double immunofluorescent staining for cTn-I and human nuclear antigen (HNA) in HD USSC group at day 28. Human CMCs were identified as double-positive cells for cTn-I (green) and HNA (red). *a*, merge, x100; *b*, cTn-I, x400; *c*, HNA, x400; *d*, DAPI, x400; *e*, merge x400. White arrows show nuclei of human CMCs.

f-j: Representative double immunofluorescent staining for vWF (red) and HNA (green) in HD USSC group at day 28. Human ECs were identified as double positive cells for vWF and HNA. *f*, merge, x100; *g*, vWF, x400; *h*, HNA, x400; *i*, DAPI, x400; *j*, merge, x400.

k-o: Representative double immunofluorescent staining for smooth muscle actin (green) and HLA-ABC (red) in HD group at day 28. Human SMCs were identified as double

positive cells for SMA and HLA-ABC. *k*, merge, x100; *l*, SMA, x400; *m*, HLA-ABC, x400; *n*, DAPI, x400; *o*, merge, x400.

Supplementary Figure V

a-d: Representative double immunohistochemistry for HNA (red) and cTn-I (green) 4 weeks after MI in each group.

e: Percent ratio of human CMCs/ total HNA⁺ cells and that of human CMCs/ total CMCs in each group. *, P<0.05; **, P<0.01.

Supplementary Figure VI

Histological evaluation of regenerative and resident CMC proliferation in rat ischemic myocardium at day 7

a-d: Representative double immunofluorescent staining for cTn-I and Ki67 at day 7 in PBS (*a*), Fbr (*b*), LD (*c*) and HD (*d*) groups (x100). White arrows show nuclei of the double-positive cells indicating the proliferative CMCs in the ischemic myocardium.

e: Density of the proliferative CMCs at day 7 was dose-dependently increased in rat ischemic myocardium following USSC transplantation. **, P<0.01. (n=10 in all groups).

Supplementary Figure VII

Quantification of cell fusion vs differentiation by FISH analysis

a-f: Representative double FISH for rat genome (red) and human genome (green) in HD group at day 28. Fused cells were identified as double positive cells for rat genome and human genome (x400). *a*, rat genome; *b*, DAPI; *c*, human genome; *d*, merge of *a*, *b* and *c*, (x400); *e*, merge of *a* and *c*, x400; *f*, Higher magnification (x 800?) of the square in the image *d*. Arrow, fused nucleus; arrowhead, human cell-derived nucleus without cell fusion.

Supplementary Figure VIII

Molecular analyses of human-specific gene expression in USSCs pre transplantation and in LV tissue samples 4 weeks after the infusion of cells or PBS.

a: RT-PCR analysis for human-specific genes of CMC, SMC and EC lineage markers in Fbrs and USSCs before transplantation. lane 1, human heart (positive control); lane 2, Fbrs; lane 3, USSCs.

b: RT-PCR analysis to evaluate expression of human-specific genes of CMC (hBNP, hcTn-I, hMHC- β and hNkx 2.5), SMC (hsm22 α and hSMA) and EC (hKDR, heNOS and hCD31) lineages in rat ischemic myocardium at day 28. Human specific genes of CMC, SMC and EC markers were dose-dependently expressed in USSC-treated animals. lane 1, human heart (positive control); lane 2, PBS group; lane 3, Fbr group; lane 4, LD group; lane 5, HD group.

c: Real-time PCR for quantification of the expression of human-specific genes of CMC

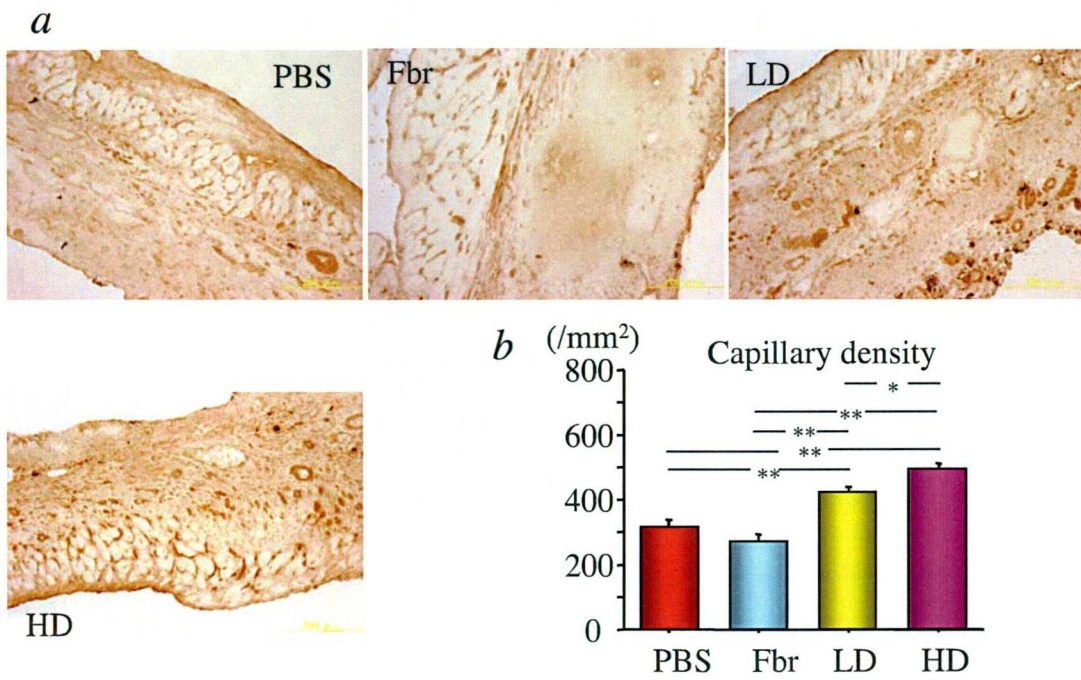
(cTn-I), SMC (α -smooth muscle actin) and EC (KDR) lineage markers in the rat ischemic myocardium at day 28. The human-specific cardiomyogenic and vasculogenic gene expression was significantly enhanced in USSC-transplanted groups compared with Fbr and PBS-treated groups. **, $P < 0.01$.

Supplementary Figure IX

Quantification of the human-specific angiogenic gene expression in the rat ischemic myocardium.

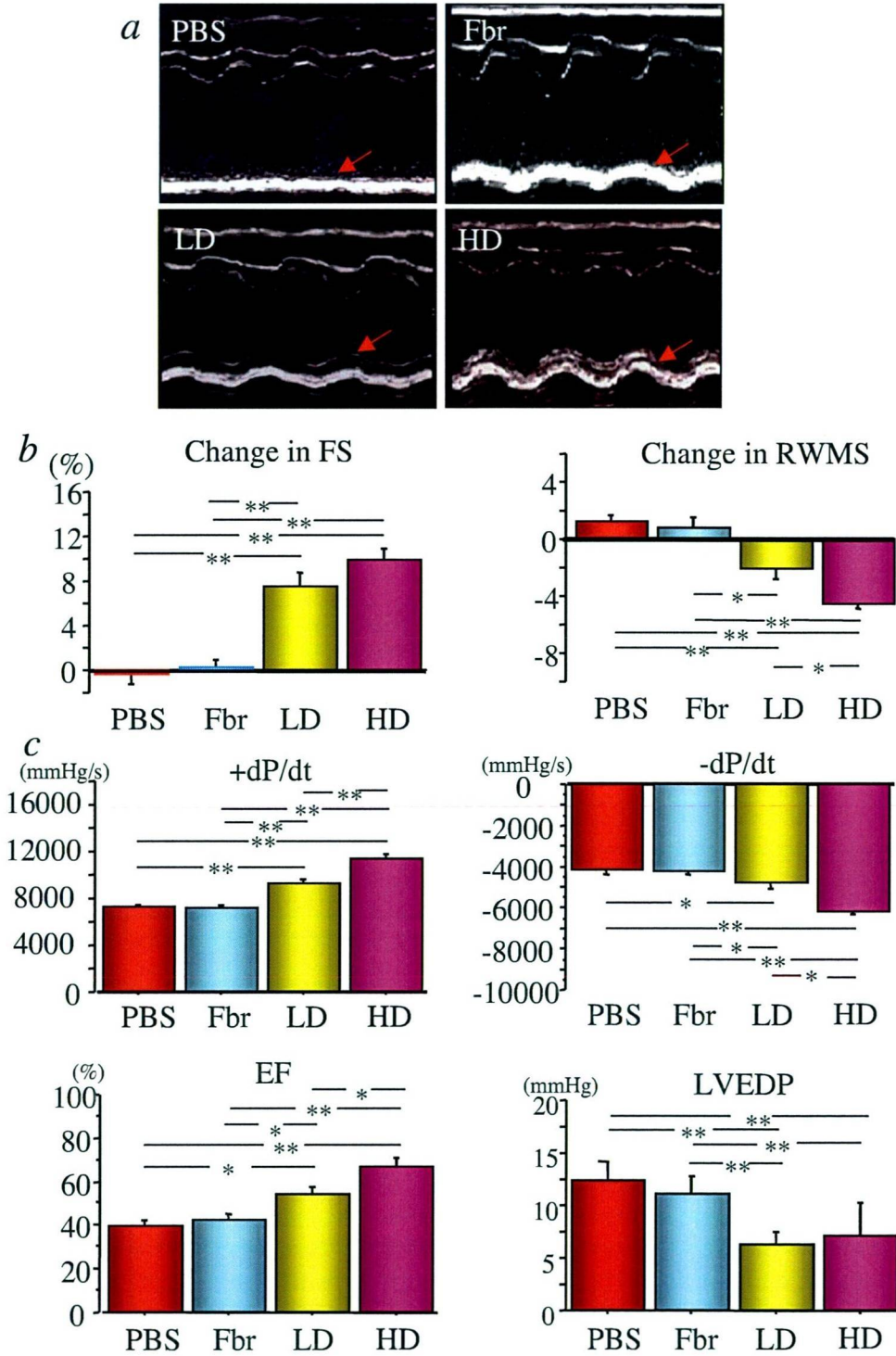
a-d: Real-time PCR for hVEGF (*a*), hbFGF (*b*), hHGF (*c*) and hSDF-1 (*d*) in infarct and peri-infarct areas. The human-specific angiogenic gene expression was significantly enhanced in USSC-transplanted groups compared with Fbr and PBS groups. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$.

Supplemental Material



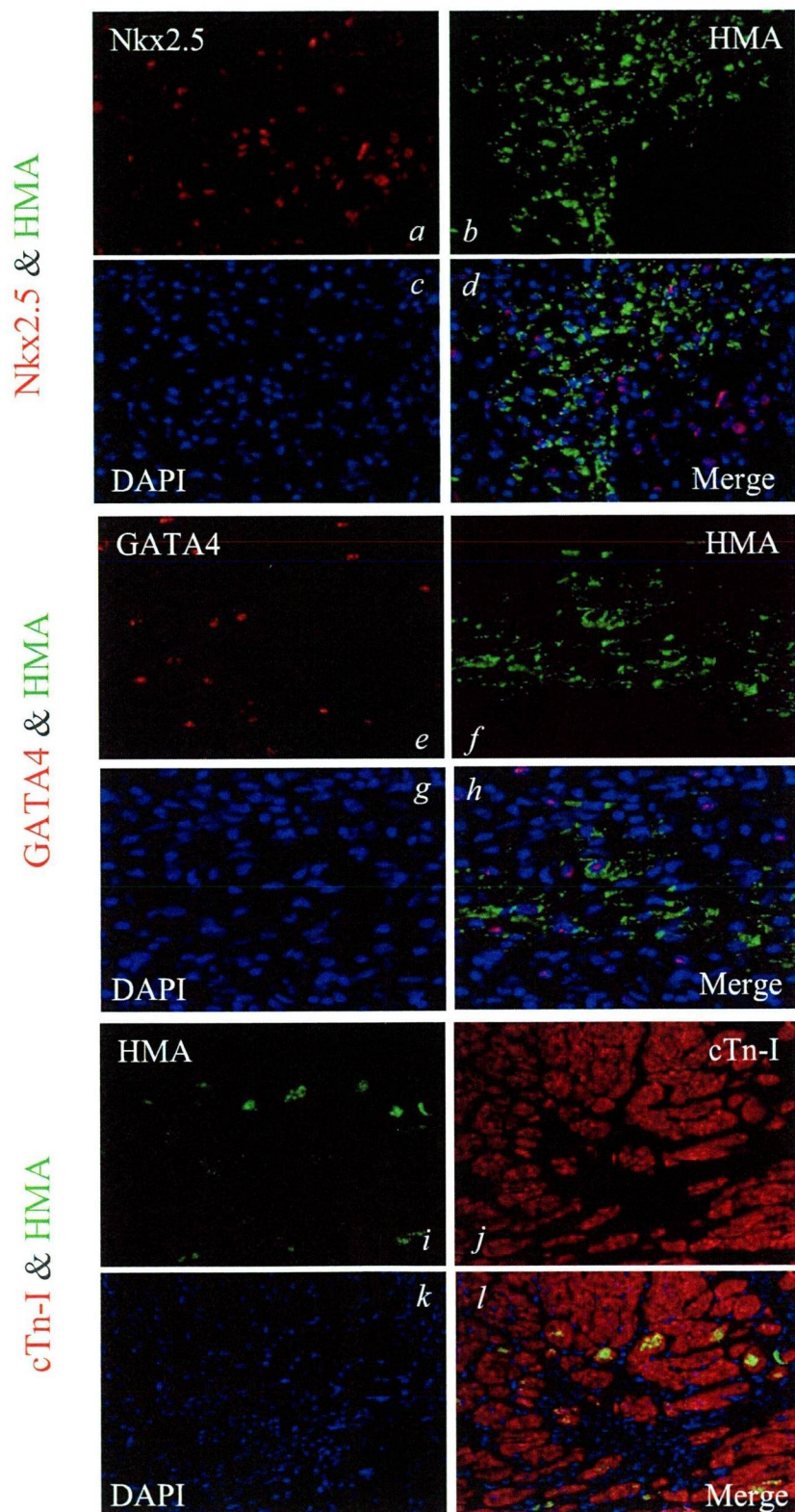
Supplementary Figure I

Supplemental Material



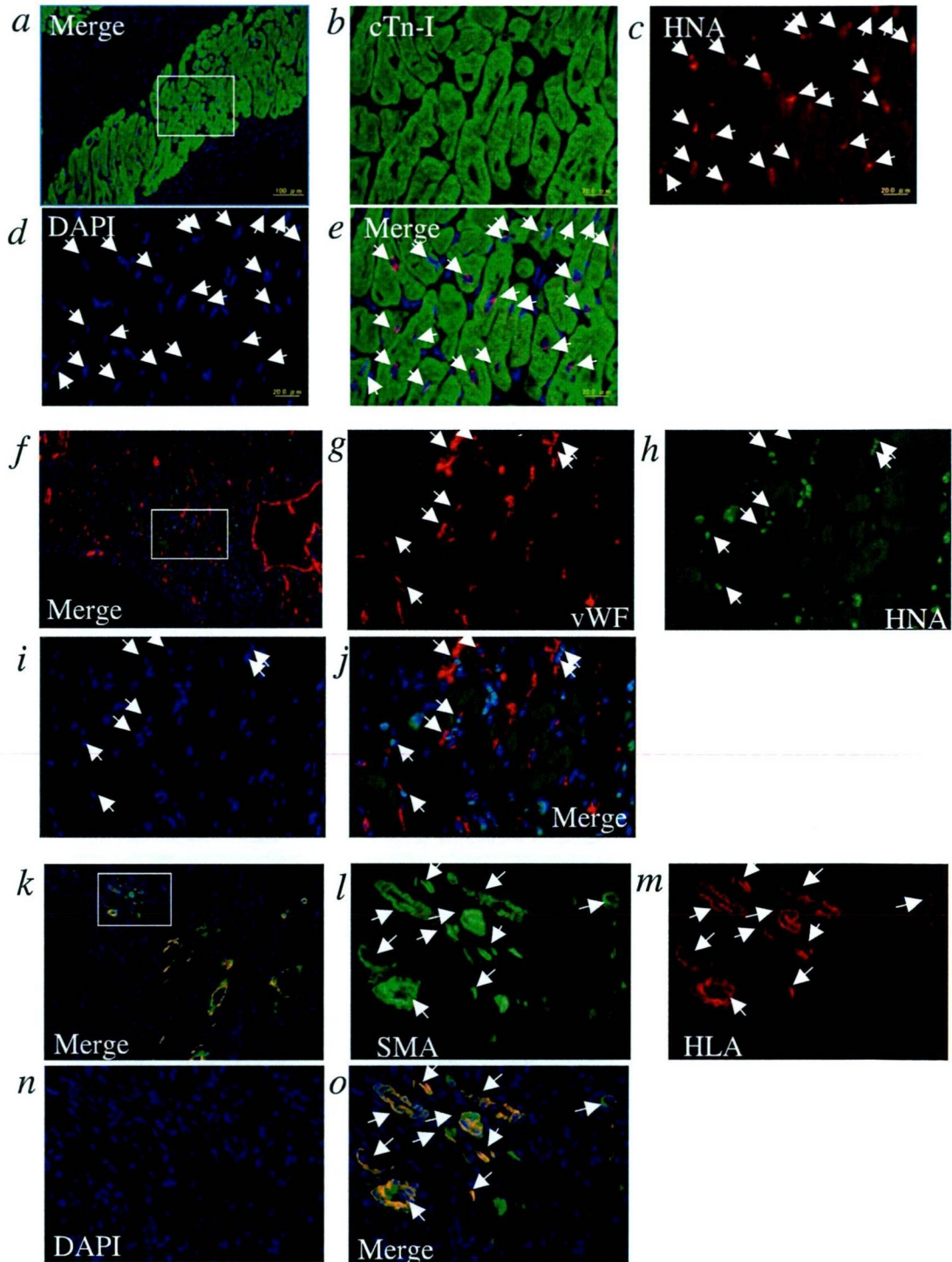
Supplementary Figure II

Supplemental Material



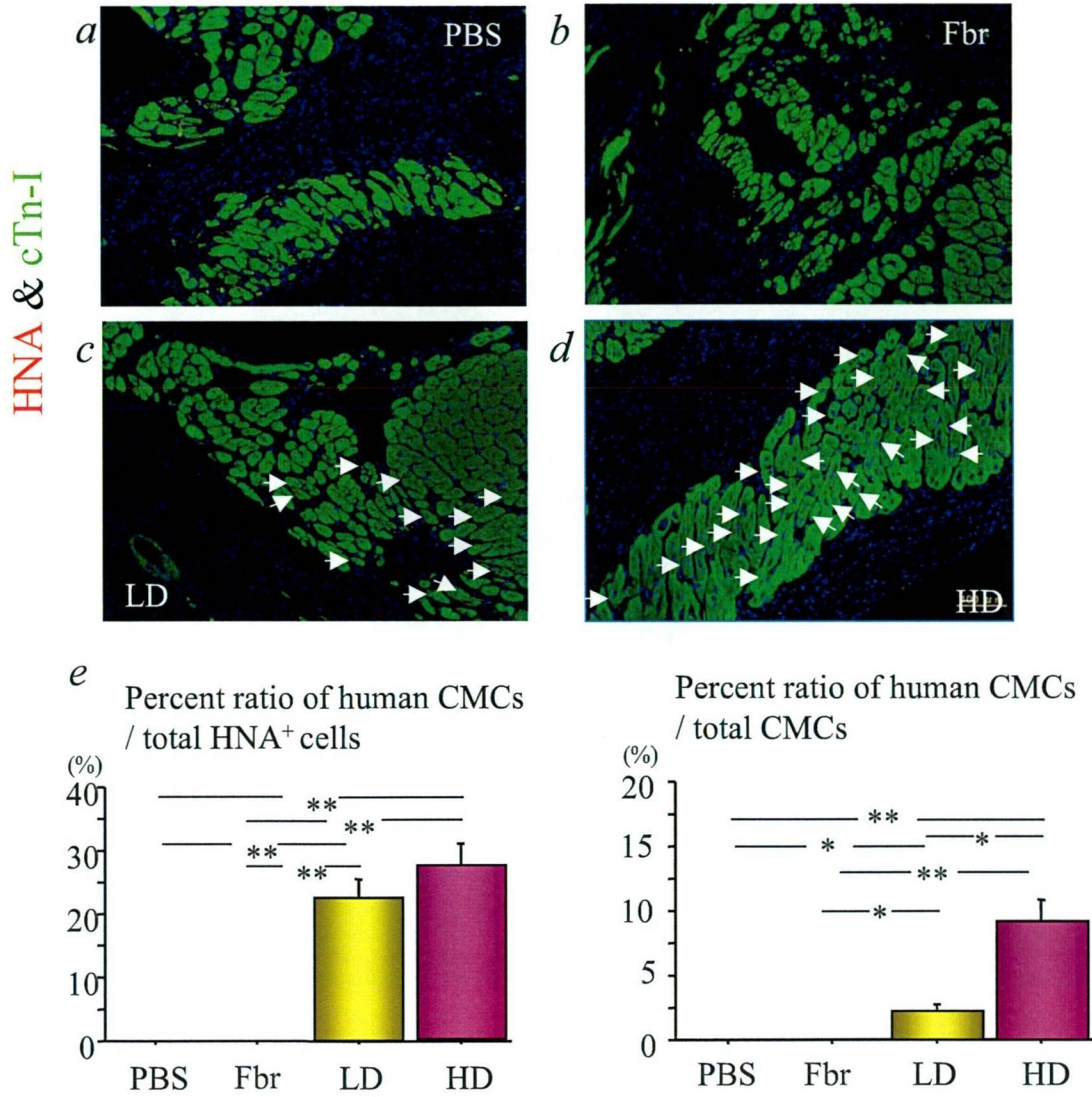
Supplementary Figure III

Supplemental Material



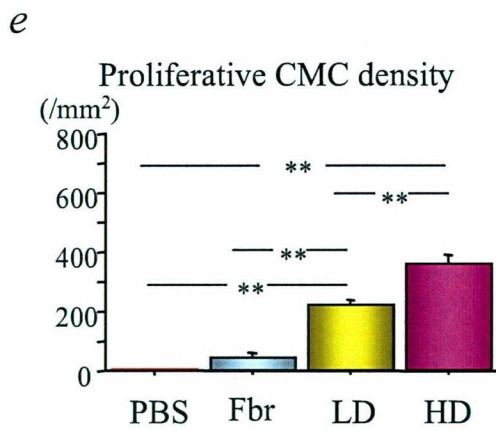
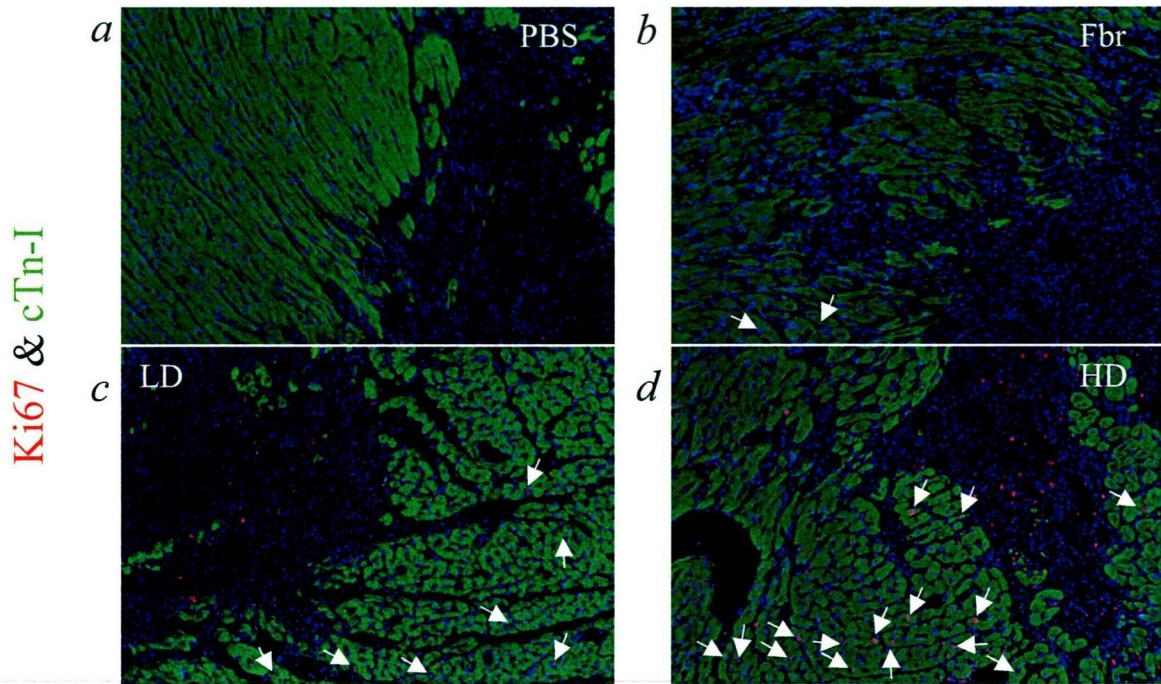
Supplementary Figure IV

Supplemental Material



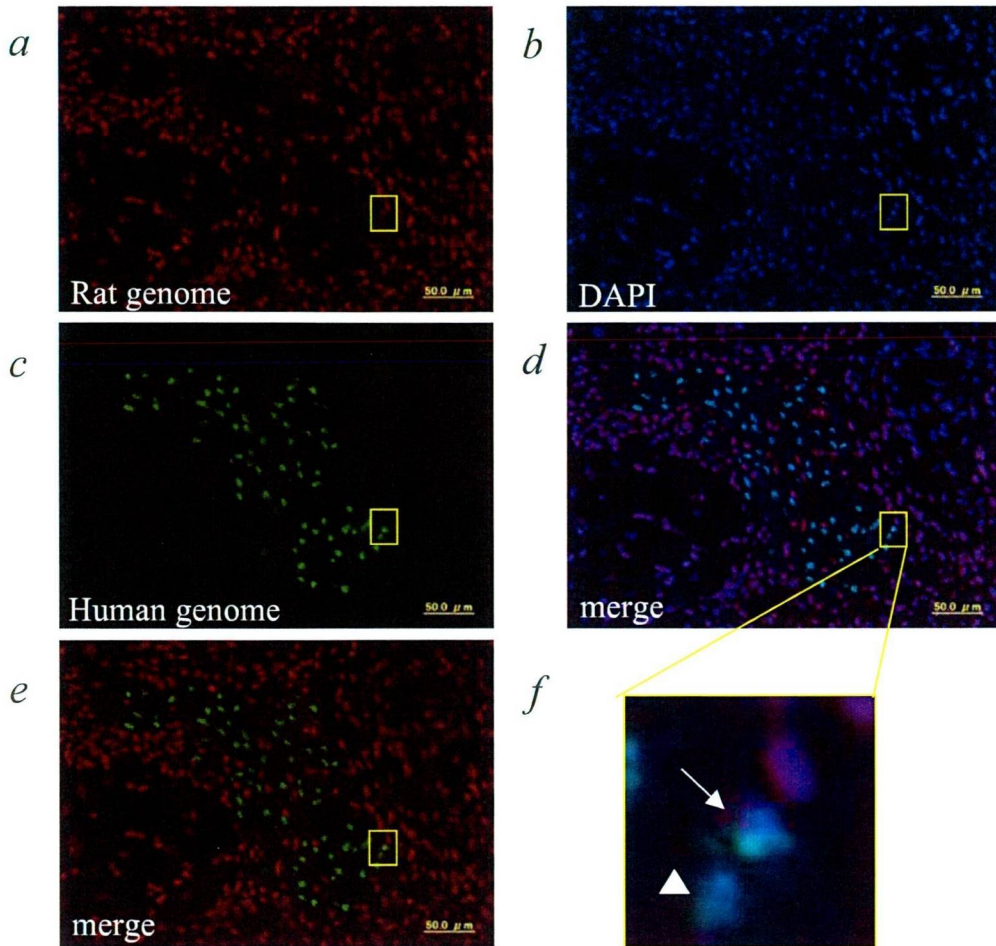
Supplementary Figure V

Supplemental Material



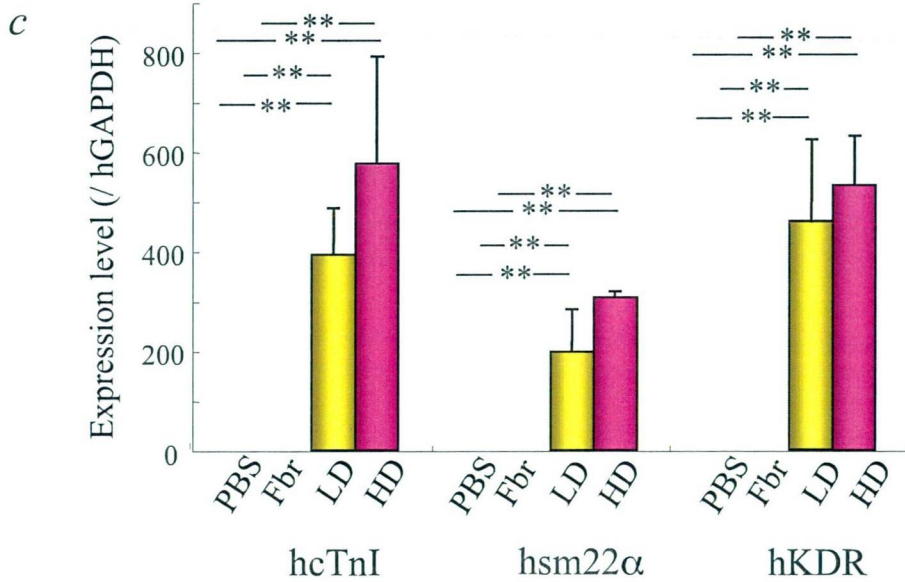
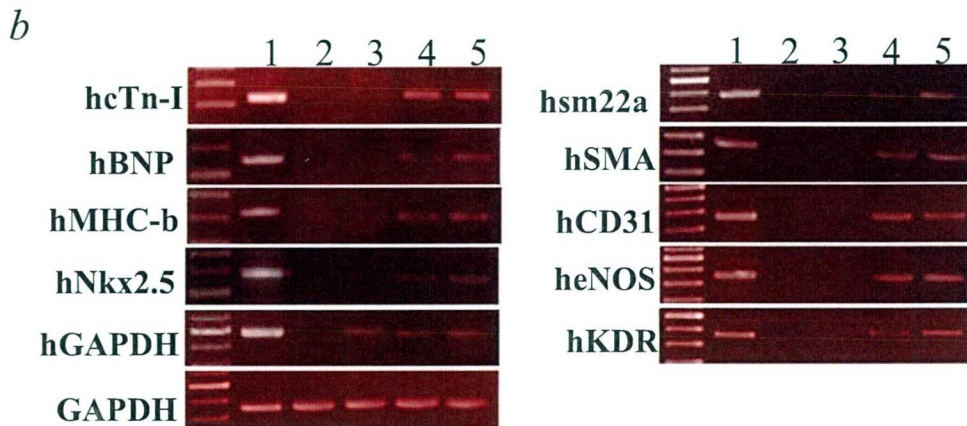
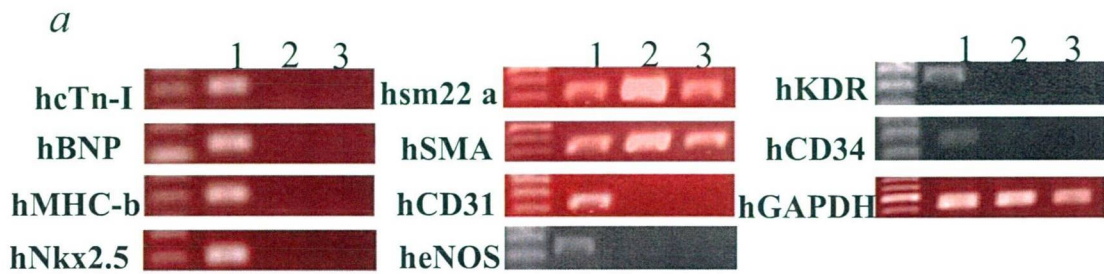
Supplementary Figure VI

Supplemental Material



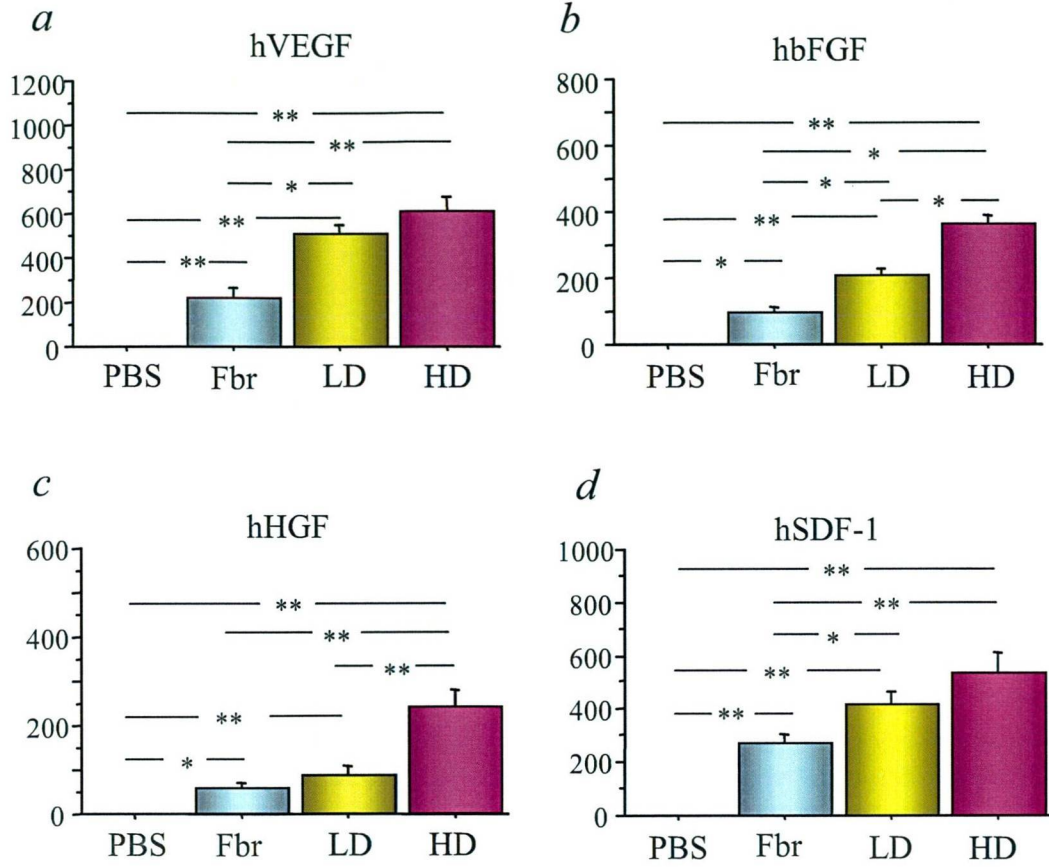
Supplementary Figure VII

Supplemental Material



Supplementary Figure VIII

Supplemental Material



Supplementary Figure IX

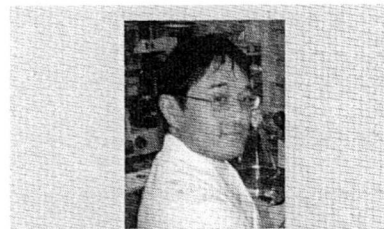
血管老化からみた Stem cell aging

酸化ストレスと血管内皮前駆細胞の老化

Oxidative stress and endothelial progenitor cell senescence

増田 治史・浅原 孝之

東海大学医学部基盤診療学系 再生医療科学



増田 治史 (ますだ はるちか)
1987年京都府立医科大学医学部医学科卒業。同大学第二内科学教室入局。'91~'95年同大学医学部大学院在籍。医学博士取得。'97~2001年 St. Elizabeth's Medical center in Boston (Jeffrey Isner教授)留学。'06年~東海大学医学部再生医療科学准教授現在に至る。研究テーマ：血管再生のメカニズム解明研究。血管内皮前駆細胞の細胞生物学的探求研究。

Key Words: endothelial progenitor cell, senescence, oxidative stress, 血管内皮前駆細胞, 老化, 酸化ストレス

■ Abstract ■

近年、糖尿病、高脂血症、高血圧症、喫煙、肥満等の心血管危険因子を有する患者において末梢血中血管内皮前駆細胞(Endothelial Progenitor Cell=EPC)の数及び機能低下との因果関係が報告され、EPCが血管のホメオスタシス維持機構にも重要な役割を担っており酸化ストレスによるEPC機能低下が血管のホメオスタシス維持の破綻をきたし動脈硬化の進行及び虚血性疾患の発症に至ると考えられる。この意味においてEPCは新たな心血管危険因子におけるバイオマーカーとして診断的有用性が期待される。一方、心血管危険因子がもとで活性酸素種の産生亢進により慢性的酸化ストレスへの暴露が原因でEPCが機能を発揮する上で重要な細胞内シグナル機構の破綻、老化促進シグナルの活性化が解明されつつあり、今後、これらのシグナルを制御するEPC機能改善、老化抑制作用を有する薬剤や因子による治療や新薬の開発が期待される。さらに虚血性疾患患者に対する自己EPC移植療法とそれらの薬剤との併用療法による血管再生療法の開発、有効性向上が期待される。

■はじめに

骨髄由来の血管内皮前駆細胞(Endothelial Progenitor Cell=EPC)は、血管再生能を有する細胞として1997年に発見された。以来、その血管生物学的動態解明の研究が盛んに行われ、虚血性心血管疾患患者を対象として自己EPC移植療法が臨床応用されている。近年、EPCの細胞特性として血

管再生能のみならず生体内血管修復能による血管機能のホメオスタシス維持にも関与すると考えられる。このようなEPCの機能は、加齢、糖尿病、高血圧症、高脂血症、肥満等の慢性的な酸化ストレスにより傷害され、EPCのアポトーシスや老化が促進されることが判明している。EPCの細胞レベルでの老化による機能低下は、成体における血管形成能、再生能の低下のみならず、生理的血管機能の低下を引き起こし動脈硬化が促進され、虚血性心血管疾患の顕在化に至る。本稿では、酸化ストレスによるEPCの老化の機序、現行の自己EPC移植療法の問題点、さらに考案される抗酸化ストレスEPC老化抑制療法につき述べる。

■酸化ストレスとEPC老化

1) EPCの細胞生物学的特性

従来骨髄由来血液幹細胞として認識されていた末梢血CD34陽性細胞がin vitro内皮細胞培養系において、血管網形成能やVEGFに対する増殖能、遊走能を有し、in vivo 虚血動物モデルにおいて本細胞を投与すると局所血管形成部位に集積し、新生血管構築に貢献することから、生体内EPCの存在が明らかとなった¹⁾。未分化EPCは、VEGF, SDF-1 α ,

■ Masuda Haruchika, Asahara Takayuki
Department of Regenerative Medicine Science, Tokai University School of Medicine

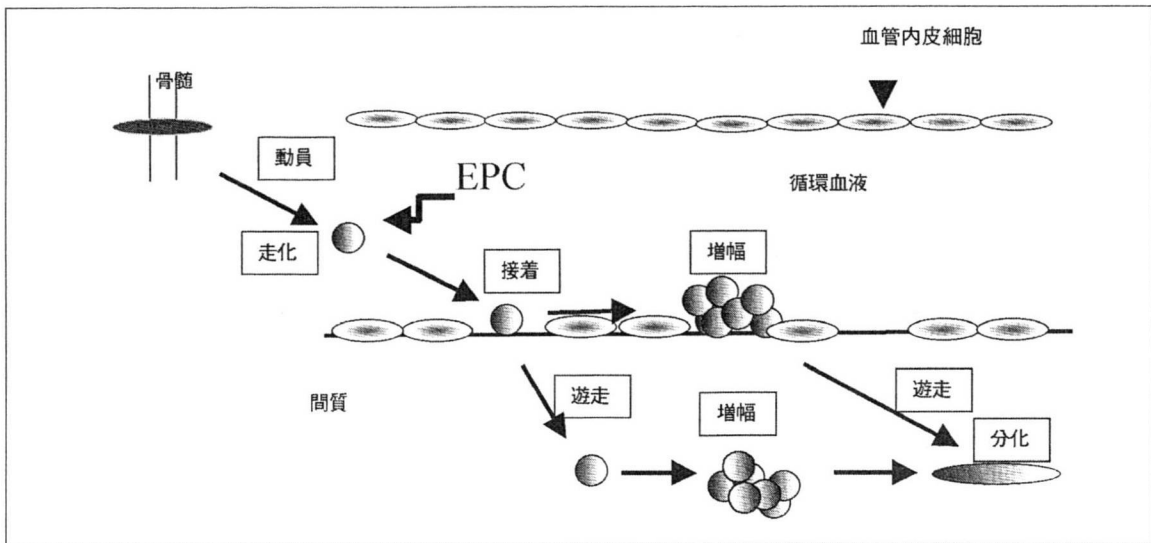


図1 血管内皮前駆細胞の生物活性

骨髓で産生されたEPCは末梢血へ動員され、血管傷害部位や血管再生局所から産生される走化性因子（VEGF, SDF-1等）により血管壁に到達し接着する。その後、遊走、増殖、さらに分化を遂げる。

G-CSF等の血管形成局所から産生されるケモカインや女性ホルモン（エストロゲン）により骨髓から動員され局所に到達し、接着、遊走、さらには増幅、分化を遂げ局所血管内皮細胞と協調して血管形成に貢献する²⁾。特に、局所EPCの細胞生物学的特性のなかで増幅能と分化能は新生血管数増加と機能獲得に重要であると考えられる（図1）。

2) 酸化ストレスによるEPCの老化機序

EPCの細胞生物活性として動員能、接着能、遊走能、増殖能、分化能が正常に機能することが血管のホメオスタシスや血管再生が円滑かつ効率的に進むためには必須である。しかし、加齢をはじめ、生活習慣病による糖尿病、高血圧症、高脂血症、肥満等のメタボリックシンドロームにおいては、血糖、酸化LDLの他、レムナントリポ蛋白、NADPH酸化酵素等の活性酸素種（ROS）産生促進因子が過剰となり、EPCは蓄積したROSによる酸化ストレスに暴露される^{3,4)}。その結果、EPC細胞活性が傷害されることになる。すなわち『EPCの老化』とは、上記の原因によって産生され細胞内に蓄積されたROSによりEPCの細胞活性が正常に発揮されなくなった現象と定義される。その結果、生体内の血管修復能および血管ホメオスタシスが破綻し、動脈硬化、虚血性疾患に至ると考えられる。

ROSは、EPC細胞活性において主役的役割を担うPI-3キナーゼ/Aktシグナル経路の活性化を抑制し、その結果、eNOSの活性化が抑制されることがEPC細胞活性の低下をもたらすと考えられる⁵⁾。また近年、EPCにおいても、このPI-3キナーゼ/Aktシグナル経路は細胞老化抑制のテロメア伸長反応を担うテロメラーゼ活性に重要であることが判明しており⁶⁻⁸⁾、酸化ストレスによるこのシグナル活性の低下によりテロメラーゼ活性を低下させ、テロメア短縮、DNA傷害を引き起こす。その結果、細胞分裂が停止しEPCの老化を促進することが考えられる。

一方、PI-3キナーゼ/Aktシグナル経路の持続的活性化はEPCの酸素消費を亢進しROSの細胞内蓄積を促進し、またスーパーオキシドディスムターゼ、カタラーゼ等のROSスカベンジャー酵素発現の促進性転写因子FOXOの発現を抑制することにより逆に老化を促進する⁵⁾。このようにPI-3キナーゼ/Aktシグナル経路はEPC老化のシグナルにおける『もろ刃の剣』として重要なシグナルとして位置づけられる。また細胞分裂に関与するサイクリン依存性キナーゼ抑制因子であるp16^{INK4a}の発現及びリン酸化がROSの作用により亢進し、細胞分裂が停止しEPCの老化及びアポトーシスが促進することもその機序として考えられる⁹⁾（図2）。

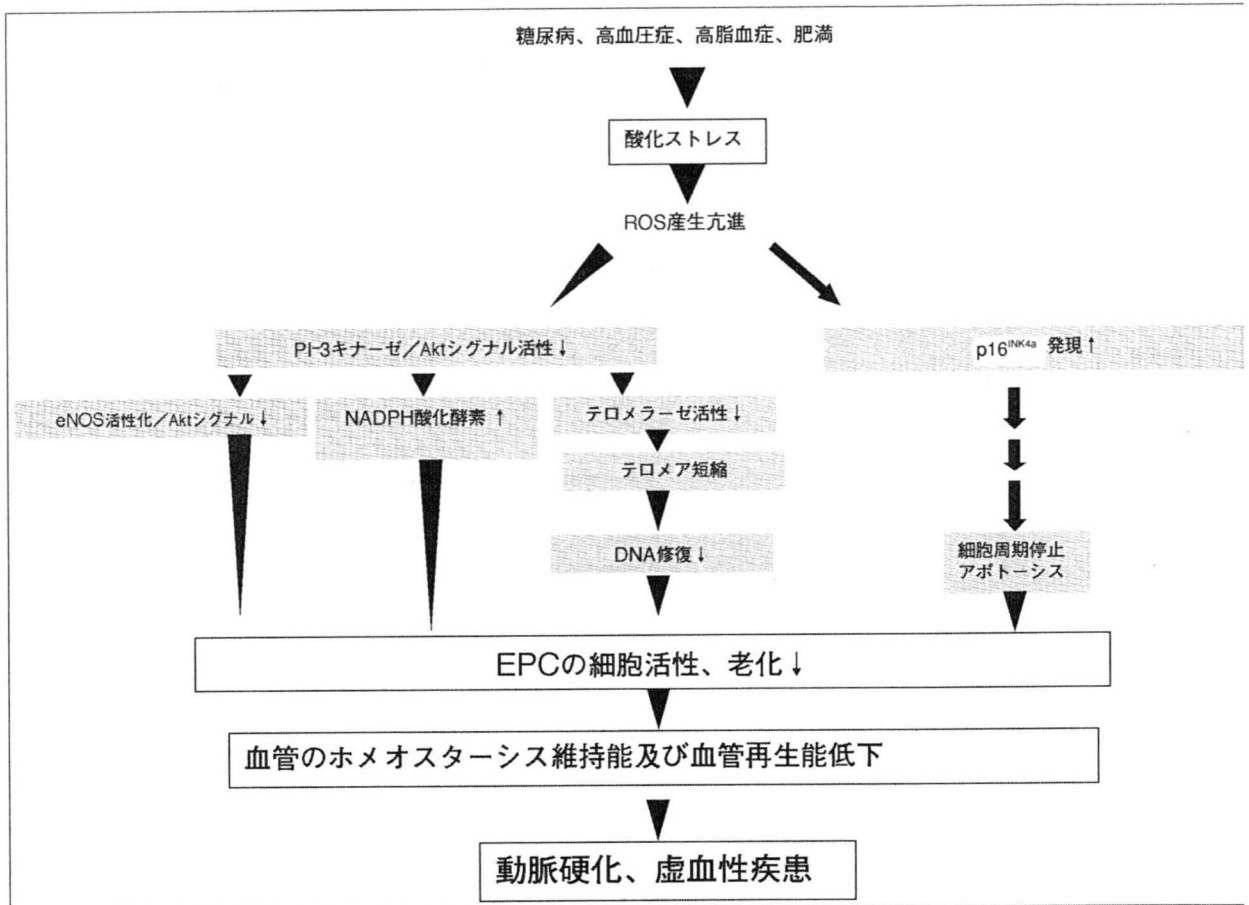


図2 酸化ストレスとEPCの老化機序

図1のEPCの細胞活性が酸化ストレスにより低下しEPCの老化が促進され、PI-3キナーゼ/Aktシグナル活性低下及びサイクリン依存性キナーゼ抑制因子p16^{INK4a}の発現亢進により細胞周期が停止しアポトーシスが起こる。これらの細胞内機序によりEPCの細胞活性が低下し老化が惹起される。その結果、血管のホメオスタシス維持能及び血管再生能が障害され、動脈硬化、虚血性疾患に至る。

■EPC移植による血管再生療法の現状及び その問題点

近年、EPCの細胞生物学的特性を基盤に、従来の投薬治療による改善が望めない心血管系虚血性疾患を対象としてEPC移植による血管再生療法が開発された。血管形成に伴う未分化EPCを病変局所へ移植し、EPCの増幅能、分化能を利用し、積極的に機能的血管形成を促進することによる局所血流を改善し組織機能を回復させることが治療概念である。現状では、患者末梢血から採取した未分化EPC (CD34+細胞) を虚血局所に移植する治療が臨床研究として実施され、その安全性は確認され統計学的な有効性は証明されているが¹⁰⁾、症例ごとの有効性の相違が指摘されている。これは、生活習慣病を基礎疾患に持つ患者において、循環

器疾患危険因子である前述の糖尿病¹¹⁾、喫煙¹²⁾、高脂質血症¹³⁾、肥満¹⁴⁾といった酸化ストレスや慢性炎症の環境下では、前述の細胞内老化機序により骨髄からのEPCの動員が減少し、局所におけるEPCの細胞機能が低下すると考えられる。すなわち元々、末梢血単核球中約0.5%以下である希少なEPCがさらに減少し機能低下が認められるので、移植用に採取された自己のEPC数が不十分な場合、あるいは十分量採取できても機能低下により、移植されたEPCによる血管再生治療効果が不十分になると考えられる。

従って今後、EPC移植療法の有効性を確実にするためには、移植EPCが血管形成能を十分に発揮できるようにその細胞機能を改善させる必要がある。

■抗酸化ストレス薬、因子によるEPC機能改善

抗酸化作用薬、因子を用いたROS産生抑制による酸化ストレスの軽減及び除去は、特に循環器領域においてEPCを介する成体内の血管ホメオスタシス維持及び血管修復能の改善や動脈硬化及び心血管虚血性疾患の予防、さらに移植自己EPCそのものの血管再生能の改善に繋がり、EPC移植療法の有効性向上が期待される。抗高脂血症薬のHMG-CoA変換酵素阻害剤(スタチン系薬剤)¹⁵⁾はPI-3キナーゼ/Aktシグナルを介してeNOSの発現を上昇させEPCの増幅分化を促進させる。また、糖尿病におけるインスリン抵抗性治療薬のペロキシソーム増殖因子活性化受容体- γ 作動薬(PPAR γ アゴニスト)であるピオグリタゾン¹⁶⁾は、PI-3キナーゼ/Aktシグナルを介してeNOS発現を上昇させ、NADPH酸化酵素活性を抑制しEPCの増幅分化能を改善させると考えられる¹⁶⁾。

また抗高血圧薬ではアンジオテンシンII-タイプI受容体拮抗剤はPPAR γ の発現を上昇させることにより同様の作用を有する¹⁷⁾。 β -ブロッカーや適度な運動¹⁸⁾はeNOS発現上昇作用、NADPH酸化酵素活性抑制作用によりEPC増幅分化活性を発揮する^{18, 19)}。アンジオテンシン変換酵素阻害剤は、EPCの動員促進作用が報告されているが²⁰⁾、eNOS発現上昇、NADPH酸化酵素活性抑制作用を有することから β -ブロッカーと同様の作用を有することが示唆される。また、HDLや赤ワインの成分であるポリフェノールのレスベラトロールもPI-3キナーゼ/Aktシグナルを介してeNOSの発現亢進及びテロメラーゼ活性上昇作用によりEPC老化を抑制する^{6, 7)}。

このような薬剤は、本来の対象疾患への薬効以外に前述の如く生体内酸化ストレスの除去をもたらすEPC機能の改善による抵抗動脈硬化作用、虚血性疾患の発症顕在化予防といった作用が期待される。従って、心血管危険因子のある患者への投薬はこの理由により有用と考えられる。また、EPC移植療法対象患者においても、自己EPC採取前にこれらの薬剤を服薬し自己生体内EPCの機能改善後に、採取したEPCを移植することはEPC移

植療法の有効性向上に繋がることを期待される。さらに、テロメラーゼ活性化作用薬、ROSスカベンジャー発現促進薬等も今後、EPC機能改善、老化抑制薬として開発が期待される。

■おわりに

EPCは血管機能のホメオスタシス及び血管修復能に重要な役割を担っている。近年、自然加齢以外に、特に循環器領域において酸化ストレスを惹起する心血管危険因子亢進とEPC機能と数の低下、老化との因果関係が報告されるようになった。今後益々、EPC機能動態は病態を正確に反映するバイオマーカーとして有用になることが期待される。また、さらに有効な抗酸化ストレスによるEPC機能改善療法の開発が期待される。

文 献

- Asahara T, Masuda H, Takahashi T, *et al.* *Circ Res.* Aug 6 1999; 85(3): 221-228.
- Isner JM, Asahara T. *J Clin Invest.* May 1999;103(9): 1231-1236.
- Fadini GP, de Kreutzenberg SV, Coracina A, *et al.* *Eur Heart J.* Sep 2006; 27(18): 2247-2255.
- Satoh M, Ishikawa Y, Takahashi Y, *et al.* *Atherosclerosis.* Jun 2008;198(2): 347-353.
- Nogueira V, Park Y, Chen CC, *et al.* *Cancer Cell.* Dec 9 2008;14(6): 458-470.
- Xia L, Wang XX, Hu XS, *et al.* *Br J Pharmacol.* Oct 2008;155(3): 387-394.
- Pu DR, Liu L. *Med Hypotheses.* 2008;70(2): 338-342.
- Zhu J, Wang X, Shang Y, *et al.* *Vascul Pharmacol.* Aug-Sep 2008; 49(2-3): 106-110.
- Yang DG, Liu L, Zheng XY. *Ageing Res Rev.* Apr 2008;7(2): 137-146.
- Kawamoto A, Katayama M, Handa N, *et al.* *Stem Cells.* Nov 2009; 27(11): 2857-2864.
- Tepper OM, Galiano RD, Capla JM, *et al.* *Circulation.* Nov 26 2002;106(22): 2781-2786.
- Michaud SE, Dussault S, Haddad P, *et al.* *Atherosclerosis.* Aug 2006;187(2): 423-432.
- Pirro M, Bagaglia F, Paoletti L, *et al.* *Ther Adv Cardiovasc Dis.* Oct 2008; 2(5): 329-339.
- Esposito K, Ciotola M, Maiorino MI, *et al.* *J Sex Med.* Jan 2009; 6(1): 107-114.
- Dimmeler S, Aicher A, Vasa M, *et al.* *J Clin Invest.* Aug 2001;108(3): 391-397.
- Werner C, Kamani CH, Gensch C, *et al.* *Diabetes.* Oct 2007; 56(10): 2609-2615.
- Honda A, Matsuura K, Fukushima N, *et al.* *Atherosclerosis.* Aug 2009; 205(2): 376-384.
- Yao EH, Fukuda N, Matsumoto T, *et al.* *Am J Hypertens.* Sep 2008; 21(9): 1062-1068.
- Jenkins NT, Witkowski S, Spangenburg EE, *et al.* *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* Nov 2009; 297(5): H1798-1805.
- You D, Cochain C, Loinard C, *et al.* *Hypertension.* Jun 2008; 51(6): 1537-1544.

