

201006004A

# 厚生労働科学研究費補助金

再生医療実用化研究事業

末梢血単核球移植による血管再生治療と  
次世代の再生治療を目指した基盤研究

(H20-再生-一般-004)

平成 22 年度 総括研究報告書

研究代表者 小室 一成

平成 23 (2011) 年 3 月

## 目 次

I. 総括研究報告書	
末梢血単核球移植による血管再生治療と次世代の再生治療を目指した基盤研究-----	1
小室 一成	
II. 分担研究報告書	
1. 末梢性血管疾患に対する治療・基礎研究-----	5
南野 徹	
2. 虚血性心疾患に対する治療-----	8
宮内 秀行	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表-----	10
IV. 研究成果の刊行物・別刷-----	12

## 研究要旨

末梢血中に骨髄由来の血管内皮前駆細胞が存在し、成体においても胎児期同様に血管の分化形成、すなわち *vasculogenesis* が起こるということが報告されて以来、ヒト虚血性心血管疾患に対して骨髄細胞を用いた細胞治療が、主にアジアとヨーロッパで盛んに行われ、その有効性を検証する研究が始まっているがまだ不確定な点が多い。このような中、我々は独自に末梢血単核球を用いた血管新生治療について基礎研究を重ねてきた。その結果、末梢血単核球は高度な血管新生効果を持つこと、その効果は骨髄由来の単核球と比較して、勝るとも劣らないことを見出した。そこで我々は、十分な血管新生効果がより安全に期待できる、自家末梢血単核球移植を臨床応用する方針とし、本学倫理委員会承認のもと、重症末梢性動脈疾患（安静時疼痛や虚血性潰瘍あり）を対象とした臨床研究を2002年7月より開始し、以後これまでに90例以上に対して本治療を行っている。その結果、約60-70%の症例において治療効果を認めた。さらに臨床データや基礎的検討の結果、末梢血単核球移植によって虚血肢の筋組織の再生がおり、その再生過程において筋組織が分泌する血管増殖因子が持続的に虚血肢に作用し、血管再生を誘導することによって筋組織の再構築を促進しているという新しい作用メカニズムを明らかにした。そこで本研究では、末梢血単核球を用いた血管新生治療の有効性をさらに確認するため、重症間欠性跛行症例、重症虚血性心疾患症例に対してプラセボをコントロールとした2重盲験試験を行う。さらに動物モデルを用いた基礎的な研究を進めることによって、次世代の血管再生治療の開発を行う。本年度、重症虚血肢に対する末梢血単核球移植による血管再生治療と重症虚血性心疾患に対する末梢血単核球細胞移植による血管再生治療の臨床研究登録を開始した。

### （研究代表者）

小室一成 大阪大学大学院医学系研究科  
循環器内科学 教授

### （研究分担者）

南野 徹 千葉大学大学院医学研究院  
循環病態医科学 講師  
宮内秀行 千葉大学大学院医学研究院  
循環病態医科学 助教

### A. 研究目的

我々はこれまでに末梢血単核球を用いた血管新生治療について基礎研究を重ねてきた。その結果、末梢血単核球は高度な血管新生効果を持つこと、その効果は骨髄由来の単核球と比較して、勝るとも劣らないことを見出した。重症末梢性動脈疾患

を対象とした臨床研究を2002年7月より開始し、以後これまでに80例以上に対して本治療を行い、その安全性と有効性を確認した。そこで本研究では、末梢血単核球を用いた血管新生治療の安全性や有効性をさらに確認するため、重症間欠性跛行症例、重症虚血性心疾患症例に対してプラセボをコントロールとした2重盲験試験を行う。さらに動物モデルを用いた基礎的な研究を進めることによって、次世代の血管再生治療の開発、治療効果の予想指標の解明を行う。

### B. 研究方法

(1) 重症虚血肢に対する末梢血単核球移植による血管再生治療

これまでは、安静時疼痛や虚血性潰瘍のある重症下肢虚血患者を対象にパイロット研究を行ってきた。これらの対象者においては、倫理的に二重盲験とし難いため、本研究における対象は、末梢性血管疾患による重症間欠性跛行（Fontaine 2B相当）を有するが、従来の内科および外科的治療にても症状が改善せず、将来的に虚血症状の悪化が見込まれる患者とした。インフォームドコンセントを得た後、症例は細胞移植群とプラセボコントロール群の2群に無作為に分類する。治療前と移植治療6ヶ月後に、トレッドミル検査による最大歩行距離（一次評価項目）、跛行出現距離、下肢血圧回復時間、ABPI、レーザードップラー、下肢シンチ、MRI、下肢動脈造影、QOLによる判定（二次評価項目）を行い、治療効果を詳細に評価する。

## (2) 重症虚血性心疾患に対する末梢血単核球細胞移植による血管再生治療

我々はウサギなどを用いた動物実験を重ね、慢性心筋虚血において、末梢血単核球を開胸下に心筋内に注射すると筋注部位の血管数の増加及び著明な血流改善を認め、その結果心機能の改善が得られることを確認した。また、同時に行ったテレメトリーを用いた心電図解析においても、単核球の心筋内注射に伴う有害不整脈の出現を認めなかった。以上の結果より、虚血性心疾患における末梢血単核球細胞移植は安全かつ有益であると考えた。特に冠動脈バイパス術との併用療法は従来の外科的治療では治療し得なかった心筋虚血を有する症例に対して効果的である可能性がある。このような背景から今回我々は従来の治療法にても虚血症状が改善しない重症虚血性心疾患患者を対象として、自家末梢血単核球細胞移植による血管新生治療を実施することを計画した。対象は、重症虚血性心疾患を有し、冠動脈バイパス術を施行予定であるが、バイパス術施行後も残存する心筋虚血領域があることが予測される患者とした。

(3) 次世代の血管再生治療を目指した基礎研究  
我々は既に本治療の作用メカニズムの一部を解明した。予備実験では、その作用機序に Notch シグナルが重要であることも確認している。本研究では、次世代の再生治療を目指すため、そのシグナルの強弱と臨床効果との相関を検証するとともに、そのシグナルを増強することによって治療効果を増幅する方法を開発していく。

（倫理面への配慮）

(1) 動物を用いた研究は、千葉大学動物実験指針に基づき行う。遺伝子改変マウスの取り扱いや、拡散防止などについては、その指針に従って、十分注意を払いながら実験を行う。

### (2)-1 研究対象個人の人権の庇護

患者自らの意志にて本申請医療を希望する場合のみ施行する。患者本人の意志を尊重するとともに、マスメディアからは可能な限り隔離し臨床成績発表の際にも患者のプライバシーに関わる情報の公表は避けるなど、最大限人権保護を優先するように努める。

### (2)-2 同意を求める方法

添付説明文書にて末梢血単核球移植で発生する医学的合併症・効能・不利益・利益を十分に説明し、患者自らの意志にて移植医療を希望する場合のみ施行する。また細胞移植の実施中に患者さんより医療中断の意志が表明された際には即座に中止する。

### (2)-3 個人への不利益ならびに危険性への配慮

本治療に同意を得られた患者については治療に不利益となる他疾患の有無をスクリーニングするための検査を治療前に全例について行う。治療後は入院中・外来通院を通じて合併症の早期発見とその早期対応に努める。

## C. 研究結果

末梢性血管疾患による重症間欠性跛行（Fontaine

2B相当)を有するが、従来の内科および外科的治療にても症状が改善せず、将来的に虚血症状の悪化が見込まれる症例に対する臨床試験については、その登録を開始した。初期の12症例の検討では、本治療の有効性が示唆された。

次世代の血管再生治療を目指した基礎研究については、遺伝子改変マウスモデルを用いて、Notchシグナルの重要性について検証した。その結果、本治療により虚血組織に置けるNotchシグナルは活性化したが、その活性阻害によって本治療の効果は著しく低下した。さらに、Notch活性化抗体の投与によって、本治療の効果が増強されたことから、本治療におけるNotchシグナルの活性化の重要性が示唆された。

重症虚血性心疾患に対する末梢血単核球細胞移植による血管再生治療に関しては、プラセボコントロール試験に先駆けて、まず用量エスカレーション試験を施行することが、臨床研究の評価委員会で決定されたため、プロトコールの一部を変更した。全例において、細胞移植を行う方針とし、登録を開始した。初期の18症例の検討では、本治療と因果関係の疑われる有害事象の報告はなかった。

#### D. 考察

初期の症例の検討では、本治療の安全性と有効性が示唆された。本研究により重症虚血性心血管疾患に対する有効性が確定すれば、エビデンスのある血管再生治療として多施設において臨床応用を進めることができる。また、末梢血単核球移植による筋組織再生メカニズムが解明されれば、その鍵分子を用いた新たな血管再生医療やレスポンドの選別方法の開発にもつながる。

#### E. 結論

重症虚血肢に対する末梢血単核球移植による血

管再生治療と重症虚血性心疾患に対する末梢血単核球細胞移植による血管再生治療の臨床研究登録が開始された。初期の症例の検討では、本治療の安全性と有効性が示唆された。

#### F. 健康危険情報

該当なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

・ Minamino T. Role of Cellular Senescence in Lifestyle-Related Disease. *Circ J* 74:2527-2533, 2010.

・ Shimizu I, Minamino T., Toko H, Okada S, Ikeda H, Yasuda N, Tateno K, Moriya J, Yokoyama M, Nojima A, Koh GY, Akazawa H, Shiojima I, Kahn CR, Abel ED, Komuro I. Excessive cardiac insulin signaling exacerbates systolic dysfunction induced by pressure overload in rodents. *J Clin Invest* 120:1506-1514, 2010.

・ Naito AT, Okada S, Minamino T., Iwanaga K, Liu ML, Sumida T, Nomura S, Sahara N, Mizoroki T, Takashima A, Akazawa H, Nagai T, Shiojima I, Komuro I. Promotion of CHIP-mediated p53 degradation protects the heart from ischemic injury. *Circ Res* 106:1692-1702, 2010.

・ Toko H, Takahashi H, Kayama Y, Okada S, Minamino T, Terasaki F, Kitaura Y, Komuro I. ATF6 is important under both pathological and physiological states in the heart. *J Mol Cell Cardiol* 49:113-120, 2010.

・ Ueda K, Takano H, Niitsuma Y, Hasegawa H, Uchiyama R, Oka T, Miyazaki M, Nakaya H, Komuro I. Sonic hedgehog is a critical mediator of erythropoietin-induced cardiac protection in mice. *J Clin Invest* 120:2016-2029, 2010.

・Toko H, Takahashi H, Kayama Y, Oka T, Minamino T, Okada S, Morimoto S, Zhan DY, Terasaki F, Anderson ME, Inoue M, Yao A, Nagai R, Kitaura Y, Sasaguri T, Komuro I. Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent kinase IIdelta causes heart failure by accumulation of p53 in dilated cardiomyopathy. *Circulation* 122:891-899, 2010.

・Ikeda H, Shiojima I, Oka T, Yoshida M, Maemura K, Walsh K, Igarashi T, Komuro I. Increased Akt-mTOR signaling in lung epithelium is associated with respiratory distress syndrome in mice. *Mol Cell Biol* 31:1054-1065, 2011.

・Aoki A, Ozaki K, Sato H, Takahashi A, Kubo M, Sakata Y, Onouchi Y, Kawaguchi T, Lin TH, Takano H, Yasutake M, Hsu PC, Ikegawa S, Kamatani N, Tsunoda T, Juo SH, Hori M, Komuro I, Mizuno K, Nakamura Y, Tanaka T. SNPs on chromosome 5p15.3 associated with myocardial infarction in Japanese population. *J Hum Genet* 56:47-51, 2011.

・Shioyama W, Nakaoka Y, Higuchi K, Minami T, Taniyama Y, Nishida K, Kidoya H, Sonobe T, Naito H, Arita Y, Hashimoto T, Kuroda T, Fujio Y, Shirai M, Takakura N, Morishita R, Yamauchi-Takahara K, Kodama T, Hirano T, Mochizuki N, Komuro I. Docking Protein Gab1 Is an Essential Component of Postnatal Angiogenesis After Ischemia via HGF/c-Met Signaling. *Circ Res* 18:108:664-75, 2011.

## 2. 学会発表

(国内学会)

・小室一成. 第53回日本腎臓学会学術講演会(平成22年6月16日、兵庫)「心腎連関を考えたARBによる降圧療法の重要性」

・小室一成. 第58回日本心臓病学会学術集会(平成22年9月17日~9月19日、東京)「心房細動発生の新しい機序をエビデンス」

・小室一成. 第33回日本高血圧学会総会(平成22年10月15日~10月17日、福岡)「高血圧治療の新たな治療戦略—ARB/CCB 配合剤への期待—心肥大の形成を抑制するにはどうしたらよいか」

・小室一成. 第18回日本血管生物医学会(平成22年12月3日、大阪)「降圧は心血管病の最高の予防である~併用療法を必要とする高血圧患者の治療戦略~」

・小室一成. 第18回日本血管生物医学会(平成22年12月3日、大阪)「老化から診た心血管病」

・小室一成. 第18回日本血管生物医学会(平成22年12月3日、大阪)“Angiogenic Therapy for heart failure”

・Minamino T. 第16回日本遺伝子治療学会学術集会(平成22年7月1日~3日、栃木)シンポジウム“Another phase of therapeutic angiogenesis for cardiovascular disease”

・Minamino T. 第51回日本脈管学会総会(平成22年10月14日~16日、北海道)シンポジウム「分子標的医薬による血管新生治療の開発」

(国際学会)

・Komuro I. Basic Cardiovascular Sciences Scientific Sessions 2010 (Jul 19-22, 2010, Rancho Mirage, USA) Wnt Signaling and Age-Associated Diseases.

・Komuro I. Keystone Symposia (Feb 22 - 27, 2011, Keystone, USA) p53 as a Mediator of Cardiovascular Diseases.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 該当なし

2. 実用新案登録 該当なし

3. その他 該当なし

## 研究要旨

末梢血中に骨髄由来の血管内皮前駆細胞が存在することが報告されて以来、骨髄単核球細胞を用いた虚血性心血管疾患の治療は著しい早さでヒトへと臨床応用された。しかし未だにその明確な作用メカニズムは不明である。これに対して我々は、独自に末梢血単核球細胞の有用性について基礎的な検討を行った。その結果、末梢血単核球細胞は骨髄由来の単核球と比較して血管新生効果が勝るとも劣らないことなどを明らかにし、末梢血単核球細胞を用いたヒト重症末梢性動脈疾患に対する治療について臨床研究を開始した。これまでに 90 数例に対して本治療を行い、70%以上の症例に有用性を認めた。レスポナーとノンレスポナーとの臨床データの比較から、その治療効果は単核球移植により惹起される虚血組織における血管増殖因子の産生によることが明らかとなりつつある。そこで本研究では、末梢血単核球を用いた血管新生治療の有効性をさらに確認するため、重症間欠性跛行症例に対してプラセボをコントロールとした 2 重盲験試験を行う。さらに動物モデルを用いた基礎的な研究を進めることによって、次世代の血管再生治療の開発を行う。末梢性血管疾患による重症間欠性跛行（Fontaine 2B 相当）を有する症例に対する臨床試験については、その登録を開始した。次世代の血管再生治療を目指した基礎研究も平行して進め、Notch シグナルの重要性について検証した。

### A. 研究目的

我々はこれまでに末梢血単核球を用いた血管新生治療について基礎研究を重ねてきた。その結果、末梢血単核球は高度な血管新生効果を持つこと、その効果は骨髄由来の単核球と比較して、勝るとも劣らないことを見出した。重症末梢性動脈疾患を対象とした臨床研究を 2002 年 7 月より開始し、以後これまでに 90 例以上に対して本治療を行い、その安全性と有効性を確認した。

そこで本研究では、末梢血単核球を用いた血管新生治療の安全性や有効性をさらに確認するため、重症間欠性跛行症例に対してプラセボをコントロールとした 2 重盲験試験を行う。さらに動物モデルを用いた基礎的な研究を進めることによって、次世代の血管再生治療の開発、治療効果の予想指標の解明を行う。

### B. 研究方法

#### (1) 重症虚血肢に対する末梢血単核球移植による血管再生治療

これまでは、安静時疼痛や虚血性潰瘍のある重症下肢虚血患者を対象にパイロット研究を行ってきた。これらの対象者においては、倫理的に二重盲験とし難いため、本研究における対象は、末梢性血管疾患による重症間欠性跛行（Fontaine 2B 相当）を有するが、従来の内科および外科的治療にても症状が改善せず、将来的に虚血症状の悪化が見込まれる患者とした。インフォームドコンセントを得た後、症例は細胞移植群とプラセボコントロール群の 2 群に無作為に分類する。治療前と移植治療 6 ヶ月後に、トレッドミル検査による最大歩行距離（一次評価項目）、跛行出現距離、下肢血圧回復時間、ABPI、レーザードップラー、下肢シンチ、MRI、下肢動脈造影、QOL による判定（二

次評価項目)を行い、治療効果を詳細に評価する。

## (2) 次世代の血管生再治療を目指した基礎研究

我々は既に本治療の作用メカニズムの一部を解明した。その作用機序に Notch シグナルが重要であることも確認している。本研究では、次世代の再生治療を目指すため、そのシグナルの強弱と臨床効果との相関を検証するとともに、そのシグナルを増強することによって治療効果を増幅する方法を開発していく。

### (倫理面への配慮)

(1) 動物を用いた研究は、千葉大学動物実験指針に基づき行う。遺伝子改変マウスの取り扱いや、拡散防止などについては、その指針に従って、十分注意を払いながら実験を行う。

### (2)-1 研究対象個人の人権の庇護

患者自らの意志にて本申請医療を希望する場合のみ施行する。患者本人の意志を尊重するとともに、マスメディアからは可能な限り隔離し臨床成績発表の際にも患者のプライバシーに関わる情報の公表は避けるなど、最大限人権保護を優先するように努める。

### (2)-2 同意を求める方法

添付説明文書にて末梢血単核球移植で発生する医学的合併症・効能・不利益・利益を十分に説明し、患者自らの意志にて移植医療を希望する場合のみ施行する。また細胞移植の実施中に患者さんより医療中断の意志が表明された際には即座に中止する。

### (2)-3 個人への不利益ならびに危険性への配慮

本治療に同意を得られた患者については治療に不利益となる他疾患の有無をスクリーニングするための検査を治療前に全例について行う。治療後は入院中・外来通院を通じて合併症の早期発見とその早期対応に努める。

## C. 研究結果

本年度は、末梢性血管疾患による重症間欠性跛行 (Fontaine 2B 相当) を有するが、従来の内科および外科的治療にても症状が改善せず、将来的に虚血症状の悪化が見込まれる症例に対する臨床試験について、その登録を開始した。

すでに初期の 12 例については、6 ヶ月後の評価が終了している。これらの症例においては、これまでのところ、有害事象の報告はなかった。最大歩行距離は、プラセボ群において悪化、もしくは不変である症例が多かったのに対して、治療群では、すべての症例において改善傾向を示した。跛行出現距離、下肢血圧回復時間についても、同様の傾向がみとめられた。ABPI については、両群間に差はみとめられなかった。

次世代の血管生再治療を目指した基礎研究については、遺伝子改変マウスモデルを用いて、Notch シグナルの重要性について検証した。その結果、本治療により虚血組織における Notch シグナルは活性化したが、その活性阻害によって本治療の効果は著しく低下した。さらに、Notch 活性化抗体の投与によって、本治療の効果が増強されたことから、本治療における Notch シグナルの活性化の重要性が示唆された。

## D. 考察

初期の 12 症例の結果により、本治療の安全性と有効性が示唆された。今後、登録症例数を増やすことによって、本治療の有効性について、検証することが可能であると考えられた。

次世代の血管生再治療を目指した基礎研究では、Notch シグナルの重要性を確認することができた。今後は、Notch シグナルを活性化させるというストラテジーを用いて、より有効性の高い治療法を開発していく。

## E. 結論



本治療は、末梢性血管疾患による重症間欠性跛行 (Fontaine 2B 相当) に対しても、安全かつ有効である可能性がある。また、Notch シグナルを標的とした、より有効性の高い治療法の開発が可能である。

#### F. 健康危険情報

該当なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

・Minamino T. 第 16 回日本遺伝子治療学会学術集会 (平成 22 年 7 月 1 日～3 日、栃木) シンポジウム “Another phase of therapeutic angiogenesis for cardiovascular disease”

・Minamino T. 第 51 回日本脈管学会総会 (平成 22 年 10 月 14 日～16 日、北海道) シンポジウム「分子標的医薬による血管新生治療の開発」

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 該当なし

2. 実用新案登録 該当なし

3. その他 該当なし

## 研究要旨

再生医療は多くの臓器・病態の分野において目覚ましい発展を遂げているが、虚血性疾患も例外ではない。虚血性心疾患、重症下肢虚血に対する血管再生治療が世界規模で行われているが、その安全性・有用性についてのエビデンスは不十分である。これに対して我々は、独自に末梢血単核球細胞の有用性について基礎的な検討を行った。その結果、末梢血単核球細胞は骨髄由来の単核球と比較して血管新生効果が勝るとも劣らないことなどを明らかにし、末梢血単核球細胞を用いたヒト重症末梢性動脈疾患に対する治療について臨床研究を開始した。これまでに 90 数例に対して本治療を行い、70%以上の症例に有用性を認めた。そこで本研究では、末梢血単核球を用いた血管新生治療の有効性をさらに確認するため、重症虚血性心疾患症例に対して用量エスカレーション試験を行う。当初は、プラセボをコントロールとした 2 重盲験試験を計画していたが、プロトコールを一部変更し、登録を開始した。

## A. 研究目的

我々はこれまでに末梢血単核球を用いた血管新生治療について基礎研究を重ねてきた。その結果、末梢血単核球は高度な血管新生効果を持つこと、その効果は骨髄由来の単核球と比較して、勝るとも劣らないことを見出した。重症末梢性動脈疾患を対象とした臨床研究を 2002 年 7 月より開始し、以後これまでに 90 例以上に対して本治療を行い、その安全性と有効性を確認した。

そこで本研究では、末梢血単核球を用いた血管新生治療の安全性や有効性をさらに確認するため、重症虚血性心疾患症例に対して用量エスカレーション試験とプラセボをコントロールとした 2 重盲験試験を行う。

## B. 研究方法

我々はウサギなどを用いた動物実験を重ね、慢性心筋虚血において、末梢血単核球を開胸下に心筋内に注射すると筋注部位の血管数の増加及び著明な血流改善を認め、その結果心機能の改善が得

られることを確認した。また、同時に行ったテレメトリーを用いた心電図解析においても、単核球の心筋内注射に伴う有害不整脈の出現を認めなかった。以上の結果より、虚血性心疾患における末梢血単核球細胞移植は安全かつ有益であると考えた。特に冠動脈バイパス術との併用療法は従来の外科的治療では治療し得なかった心筋虚血を有する症例に対して効果的である可能性がある。このような背景から今回我々は従来の治療法にても虚血症状が改善しない重症虚血性心疾患患者を対象として、自家末梢血単核球細胞移植による血管新生治療を実施することを計画した。対象は、重症虚血性心疾患を有し、冠動脈バイパス術を施行予定であるが、バイパス術施行後も残存する心筋虚血領域があることが予測される患者とした。初期の 15 症例に対しては低用量、後期の 15 症例に対しては高用量の治療を行い、その治療効果と安全性についてバイパス術 6 ヶ月後に評価する。

（倫理面への配慮）

(1) 研究対象個人の人権の庇護

患者自らの意志にて本申請医療を希望する場合のみ施行する。患者本人の意志を尊重するとともに、マスメディアからは可能な限り隔離し臨床成績発表の際にも患者のプライバシーに関わる情報の公表は避けるなど、最大限人権保護を優先するように努める。

#### (2) 同意を求める方法

添付説明文書にて末梢血単核球移植で発生する医学的合併症・効能・不利益・利益を十分に説明し、患者自らの意志にて移植医療を希望する場合のみ施行する。また細胞移植の実施中に患者さんより医療中断の意志が表明された際には即座に中止する。

#### (3) 個人への不利益ならびに危険性への配慮

本治療に同意を得られた患者については治療に不利益となる他疾患の有無をスクリーニングするための検査を治療前に全例について行う。治療後は入院中・外来通院を通じて合併症の早期発見とその早期対応に努める。

### C. 研究結果

重症虚血性心疾患に対する末梢血単核球細胞移植による血管再生治療に関しては、プラセボコントロール試験に先駆けて、まず用量エスカレーション試験を施行することが、臨床研究の評価委員会で決定されたため、プロトコールの一部を変更した。全例において、細胞移植を行う方針とし、登録を開始した。

すでに初期の18症例について、6ヶ月後の評価を終了した。冠動脈バイパス後、バイパス血管に対してステント治療を施行した1症例については、ドロップアウト症例とした。本症例以外の症例においては、バイパス術に関連する合併症はみとめたが、不整脈の増加など本治療と関連のある有害事象は報告されなかった。

### D. 考察

プラセボをコントロールとした2重盲験試験に先駆けて、用量エスカレーション試験を行うことにより、適切な用量を再確認するとともに、評価項目について妥当性についても検証することができると考えられた。

低用量群においては、現在まで本治療と因果関係の疑われる有害事象の報告はなく、現在高用量群のエントリーを進めている。

### E. 結論

重症虚血性心疾患に対する末梢血単核球細胞移植による血管再生治療の臨床研究登録が開始された。低用量群においては、本治療と因果関係の疑われる有害事象の報告はなかった。これまで行った高用量群（3例）においても本治療と因果関係の疑われる有害事象の報告はなかった。

### F. 健康危険情報

該当なし

### G. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
なし

### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 該当なし
2. 実用新案登録 該当なし
3. その他 該当なし

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
<u>Minamino T</u>	Role of Cellular Senescence in Lifestyle-Related Disease	Circ J	74	2527-2533	2010
Shimizu I, <u>Minamino T</u> , Toko H, Okada S, Ikeda H, Yasuda N, Tateno K, Moriya J, Yokoyama M, Nojima A, Koh GY, Akazawa H, Shiojima I, Kahn CR, Abel ED, <u>Komuro I</u>	Excessive cardiac insulin signaling exacerbates systolic dysfunction induced by pressure overload in rodents	J Clin Invest	120	1506-1514	2010
Naito AT, Okada S, <u>Minamino T</u> , Iwanaga K, Liu ML, Sumida T, Nomura S, Sahara N, Mizoroki T, Takashima A, Akazawa H, Nagai T, Shiojima I, <u>Komuro I</u>	Promotion of CHIP-mediated p53 degradation protects the heart from ischemic injury	Circ Res	106	1692-702	2010
Toko H, Takahashi H, Kayama Y, Oka T, <u>Minamino T</u> , Okada S, Morimoto S, Zhan DY, Terasaki F, Anderson ME, Inoue M, Yao A, Nagai R, Kitaura Y, Sasaguri T, <u>Komuro I</u>	Ca <sup>2+</sup> /calmodulin-dependent kinase II $\delta$ causes heart failure by accumulation of p53 in dilated cardiomyopathy	Circulation	122	891-899	2010
Ueda K, Takano H, Niitsuma Y, Hasegawa H, Uchiyama R, Oka T, Miyazaki M, Nakaya H, <u>Komuro I</u>	Sonic hedgehog is a critical mediator of erythropoietin-induced cardiac protection in mice	J Clin Invest	120	2016-2029	2010
Ikeda H, Shiojima I, Oka T, Yoshida M, Maemura K, Walsh K, Igarashi T, <u>Komuro I</u>	Akt-mTOR signaling in lung epithelium is associated with respiratory distress syndrome in mice	Mol Cell Biol	31	1054-1065	2011

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Toko H, Takahashi H, Kayama Y, Okada S, Minamino T, Terasaki F, Kitaura Y, <u>Komuro I</u>	ATF6 is important under both pathological and physiological states in the heart	J Mol Cell Cardiol	49	113-120	2010
Aoki A, Ozaki K, Sato H, Takahashi A, Kubo M, Sakata Y, Onouchi Y, Kawaguchi T, Lin TH, Takano H, Yasutake M, Hsu PC, Ikegawa S, Kamatani N, Tsunoda T, Juo SH, Hori M, <u>Komuro I</u> , Mizuno K, Nakamura Y, Tanaka T	SNPs on chromosome 5p15.3 associated with myocardial infarction in Japanese population	J Hum Gene	56	47-51	2011
Shioyama W, Nakaoka Y, Higuchi K, Minami T, Taniyama Y, Nishida K, Kidoya H, Sonobe T, Naito H, Arita Y, Hashimoto T, Kuroda T, Fujio Y, Shirai M, Takakura N, Morishita R, Yamauchi-Takahara K, Kodama T, Hirano T, Mochizuki N, <u>Komuro I</u>	Docking Protein Gab1 Is an Essential Component of Postnatal Angiogenesis After Ischemia via HGF/c-Met Signaling	Circ Res	108	664-675	2011



## Role of Cellular Senescence in Lifestyle-Related Disease

Tohru Minamino, MD, PhD

Epidemiological studies have shown that age is the chief risk factor for lifestyle-related diseases such as cardiovascular disease and diabetes, but the molecular mechanisms that underlie the increase in the risk of such diseases conferred by aging remain unclear. Recently, genetic analyses using various animal models have identified molecules that are crucial for aging. These include components of the DNA repair system, the tumor suppressor pathway, the telomere maintenance system, the insulin/Akt pathway, and other metabolic pathways. Interestingly, most of the molecules that influence the phenotypic changes of aging also regulate cellular senescence, suggesting a causative link between cellular senescence and aging. This review examines the hypothesis that cellular senescence might contribute to lifestyle-related disease. (*Circ J* 2010; **74**: 2527–2533)

**Key Words:** Atherosclerosis; Heart failure; Insulin resistance; p53; Telomeres

### Vascular Cell Senescence

Vascular cells have a finite lifespan in vitro and eventually enter a state of irreversible growth arrest called cellular senescence. Flattening and enlargement of vascular cells are their morphological characteristics of senescence.<sup>1</sup> Expression of negative regulators of the cell cycle (such as p53 and p16) increases with cell division and thereby promotes growth arrest.<sup>2</sup> Primary cultured cells that undergo senescence in vitro also show increased expression of  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -gal) activity at pH 6, which is distinguishable from the endogenous lysosomal  $\beta$ -gal activity that can be detected at pH 4. The activity at pH 6 is known as senescence-associated  $\beta$ -gal (SA $\beta$ -gal) activity, and because it shows a correlation with the aging of cells it is regarded as a biomarker of cellular senescence.<sup>3</sup> The in vitro growth of vascular cells obtained from human atherosclerotic plaques is impaired, and such cells develop senescence earlier than cells harvested from normal vessels.<sup>4,5</sup> The histology of human atherosclerotic lesions has been extensively studied, and it has been demonstrated that both vascular endothelial cells (ECs) and vascular smooth muscle cells (VSMCs) exhibit the morphological features of cellular senescence,<sup>6,7</sup> which suggests the occurrence of vascular cell senescence in vivo.

In fact, this hypothesis has been confirmed by in vivo cytochemical analysis of SA $\beta$ -gal activity. Fenton et al detected SA $\beta$ -gal-positive vascular cells in damaged rabbit carotid arteries.<sup>8</sup> After repeated endothelial denudation, accumulation of SA $\beta$ -gal-positive cells was markedly enhanced. My group have previously demonstrated SA $\beta$ -gal-positive vascular cells in atherosclerotic plaques obtained from the coronary arteries of patients with ischemic heart disease.<sup>9</sup> These SA $\beta$ -gal-positive cells were predominately localized on the

luminal surface of the atherosclerotic plaques and were identified as ECs, but in the same patients such cells were not observed in the internal mammary arteries where atherosclerotic changes were minimal. In advanced plaques, however, SA $\beta$ -gal-positive VSMCs have been detected in the intima and not in the media (Figure 1),<sup>10,11</sup> which may have been related to extensive cell replication in the lesions, as is observed in arteries subjected to double denudation. SA $\beta$ -gal-positive cells in human atheroma exhibit increased expression of p53 and p16, which is further evidence in favor of in vivo senescence. These cells also show various functional abnormalities, such as decreased expression of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and increased expression of pro-inflammatory molecules.<sup>10,12</sup> Thus, cellular senescence may contribute to the pathogenesis of vascular aging in humans.

### Telomere Shortening in Aged Arteries

Telomeres are non-nucleosomal DNA-protein complexes located at the ends of chromosomes, serving as protective caps and acting as the substrate for specialized replication mechanisms. As a consequence of semiconservative DNA replication, the extreme terminals of the chromosomes are not duplicated completely, resulting in successive shortening of the telomeres with each cell division. Telomerase is an enzyme that adds telomeres to the ends of chromosomes.<sup>13</sup> In contrast to stem cells, which have high telomerase activity and maintain telomere length, most somatic cells, including vascular cells, show progressive telomere shortening because of low telomerase activity. Critically short telomeres resemble damaged DNA and thus trigger cellular senescence via a p53-dependent pathway.<sup>14</sup> Recent studies have demonstrated that nuclear foci that contain markers of double-strand DNA

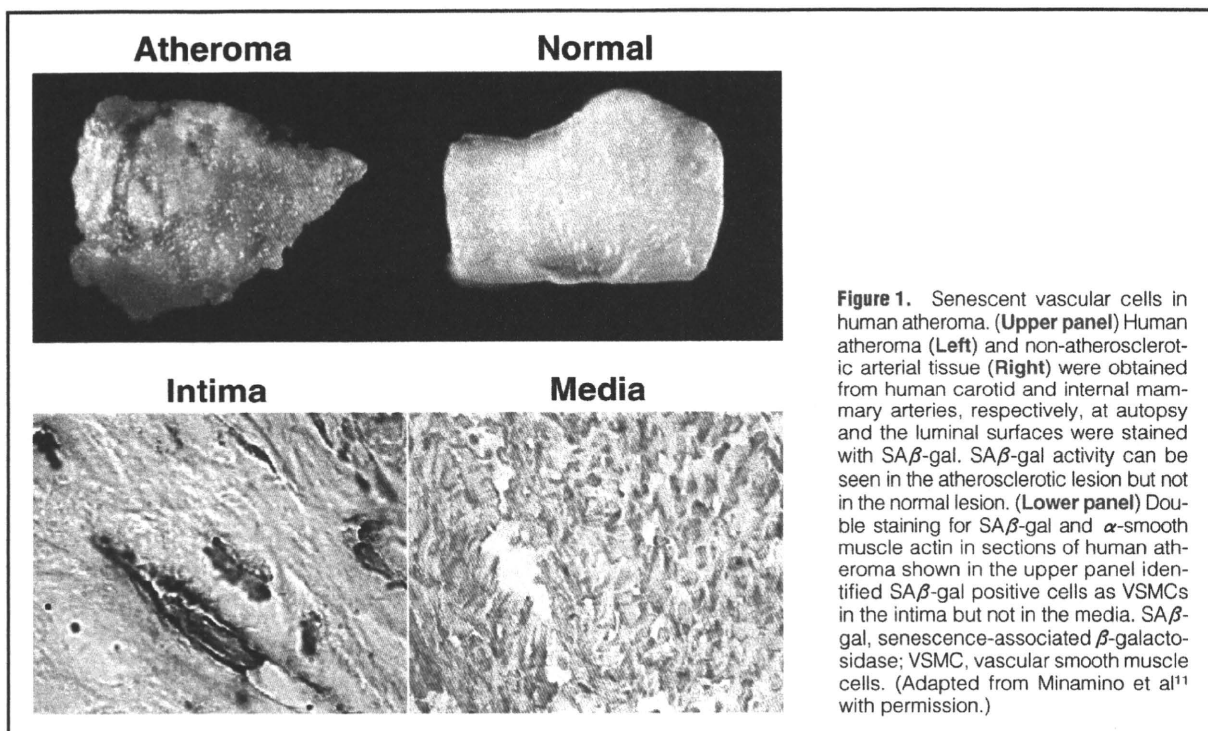
Received September 9, 2010; accepted October 19, 2010; released online November 12, 2010

Department of Cardiovascular Science and Medicine, Chiba University Graduate School of Medicine, Chiba; PRESTO, Japan Science and Technology Agency, Saitama, Japan

Mailing address: Tohru Minamino, MD, PhD, Department of Cardiovascular Science and Medicine, Chiba University Graduate School of Medicine, 1-8-1 Inohana, Chuo-ku, Chiba 260-8670, Japan. E-mail: [t\\_minamino@yahoo.co.jp](mailto:t_minamino@yahoo.co.jp)

ISSN-1346-9843 doi:10.1253/circj.CJ-10-0916

All rights are reserved to the Japanese Circulation Society. For permissions, please e-mail: [cj@j-circ.or.jp](mailto:cj@j-circ.or.jp)



**Figure 1.** Senescent vascular cells in human atheroma. (**Upper panel**) Human atheroma (**Left**) and non-atherosclerotic arterial tissue (**Right**) were obtained from human carotid and internal mammary arteries, respectively, at autopsy and the luminal surfaces were stained with SA $\beta$ -gal. SA $\beta$ -gal activity can be seen in the atherosclerotic lesion but not in the normal lesion. (**Lower panel**) Double staining for SA $\beta$ -gal and  $\alpha$ -smooth muscle actin in sections of human atheroma shown in the upper panel identified SA $\beta$ -gal positive cells as VSMCs in the intima but not in the media. SA $\beta$ -gal, senescence-associated  $\beta$ -galactosidase; VSMC, vascular smooth muscle cells. (Adapted from Minamino et al<sup>11</sup> with permission.)

breaks form in cells with critically short or dysfunctional telomeres,<sup>15,16</sup> and these telomere dysfunction-induced nuclear foci are increased in the fibroblasts of aging primates.<sup>17</sup>

It has been reported that telomere shortening occurs in human vessels and may be related to atherogenesis. Telomere length in ECs from the abdominal aorta and the iliac arteries shows a strong inverse correlation with age.<sup>18,19</sup> Interestingly, telomere shortening occurs faster in the endothelial cells of the iliac arteries than in those of the internal mammary arteries.<sup>18</sup> Thus, a high level of hemodynamic stress may enhance EC turnover in the iliac arteries compared with vessels subjected to less stress. Telomeres are shorter in coronary artery ECs from patients with coronary heart disease than in cells from healthy subjects.<sup>20</sup> A recent study demonstrated that endothelial telomere length was shorter in patients with a longer history of risk factors for cardiovascular disease,<sup>21</sup> suggesting that these factors override the effect of chronological aging on EC turnover by accelerating stress-induced damage. Identification of factors that accelerate endothelial telomere attrition will provide a novel target for the treatment of human atherosclerosis.

### Role of Telomeres in Vascular Senescence

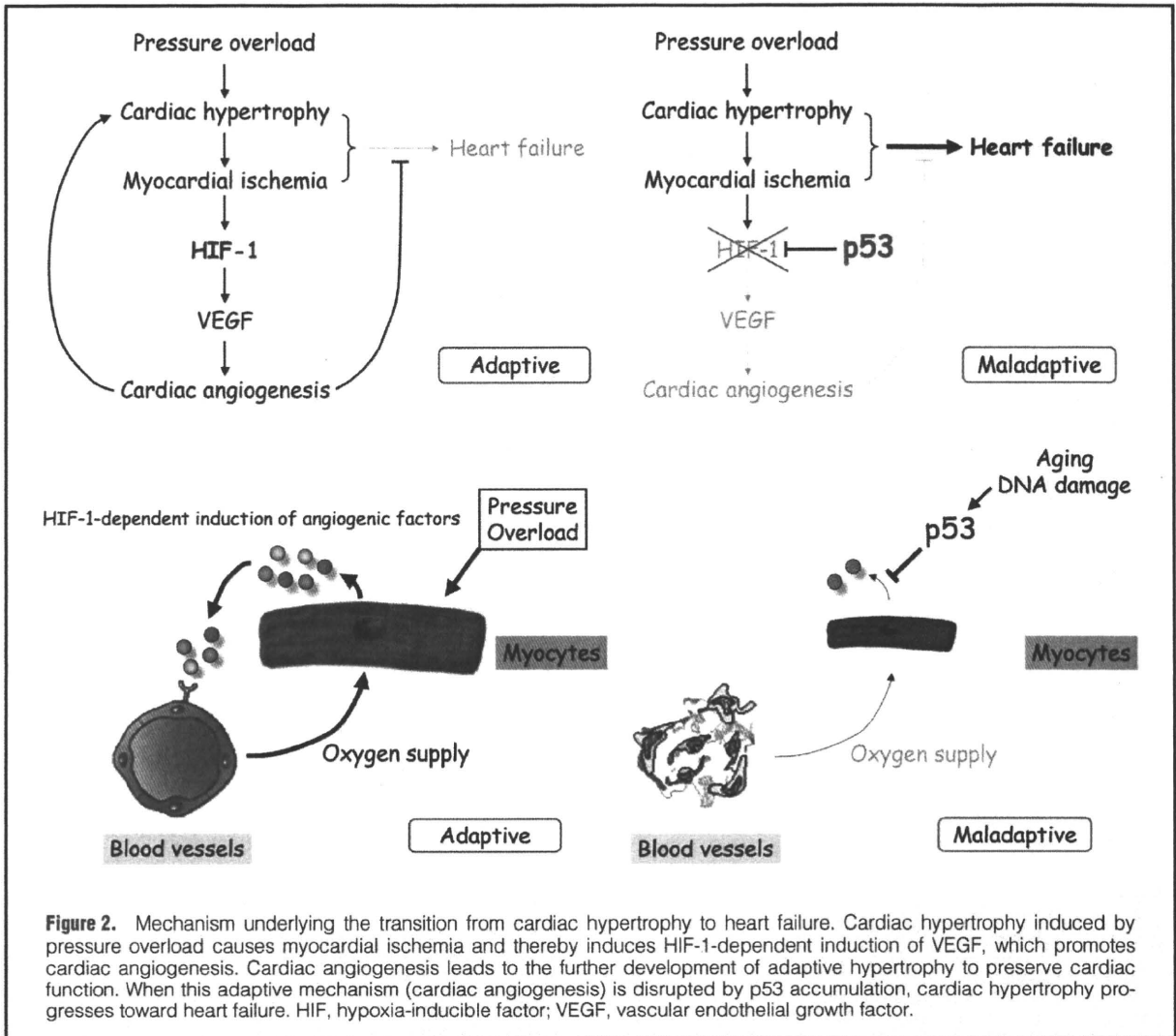
It has been demonstrated that disturbance of telomere integrity leads to endothelial dysfunction in vitro.<sup>9</sup> Human ECs and VSMCs express telomerase activity, which is markedly increased by mitogenic stimuli,<sup>22</sup> but this activity declines with aging because of decreased expression of the catalytic component of telomerase, leading to telomere shortening and cellular senescence.<sup>23</sup> Introduction of telomerase prevents endothelial dysfunction associated with senescence, including decreased eNOS activity and increased monocyte adhesion to ECs.<sup>9,24</sup> Immortalized human ECs have been established by introduction of telomerase, and these appear to retain EC

characteristics, including various cell surface markers.<sup>25</sup> When cultured in Matrigel, they form capillary-like structures as efficiently as ECs from an early passage.<sup>26</sup>

Telomerase-deficient mice have a normal phenotype in the first generation, presumably because mice possess very long telomeres.<sup>27,28</sup> However, their telomeres become shorter with successive generations, and the mice become infertile by the 6th generation because of impairment of the reproductive system.<sup>28</sup> Some of the abnormalities in the later generations of these mice mimic age-associated changes. For example, these animals have a shortened lifespan and a reduced capacity to respond to stresses such as wounds and hematopoietic ablation.<sup>29</sup> Neovascularization is also impaired in the later generations of telomerase-deficient mice,<sup>30</sup> and their decreased ability to form new vessels may be attributed to impaired function and replication of vascular ECs induced by telomere shortening. In a mouse model of atherosclerosis, telomere shortening has been shown to decrease the area of atherosclerotic lesions, presumably because of the reduced proliferation of macrophages.<sup>31</sup> However, telomerase-deficient mice develop atherosclerotic plaques with a thin fibrous cap, suggesting that shortening of the telomeres in vascular cells may lead to plaque rupture in human atherosclerosis. Mice lacking telomerase activity develop hypertension in the 1st and 3rd generations as a result of an increased plasma endothelin-1 level caused by an overexpression of endothelin-converting enzyme.<sup>32</sup>

### Stress-Induced Premature Senescence

In response to various stress signals, cells develop a phenotype indistinguishable from that of senescent cells at the end of their replicative life span. For example, the constitutive activation of mitogenic stimuli by expression of oncogenic Ras induces a senescent phenotype in vascular cells.<sup>10</sup> Cellu-

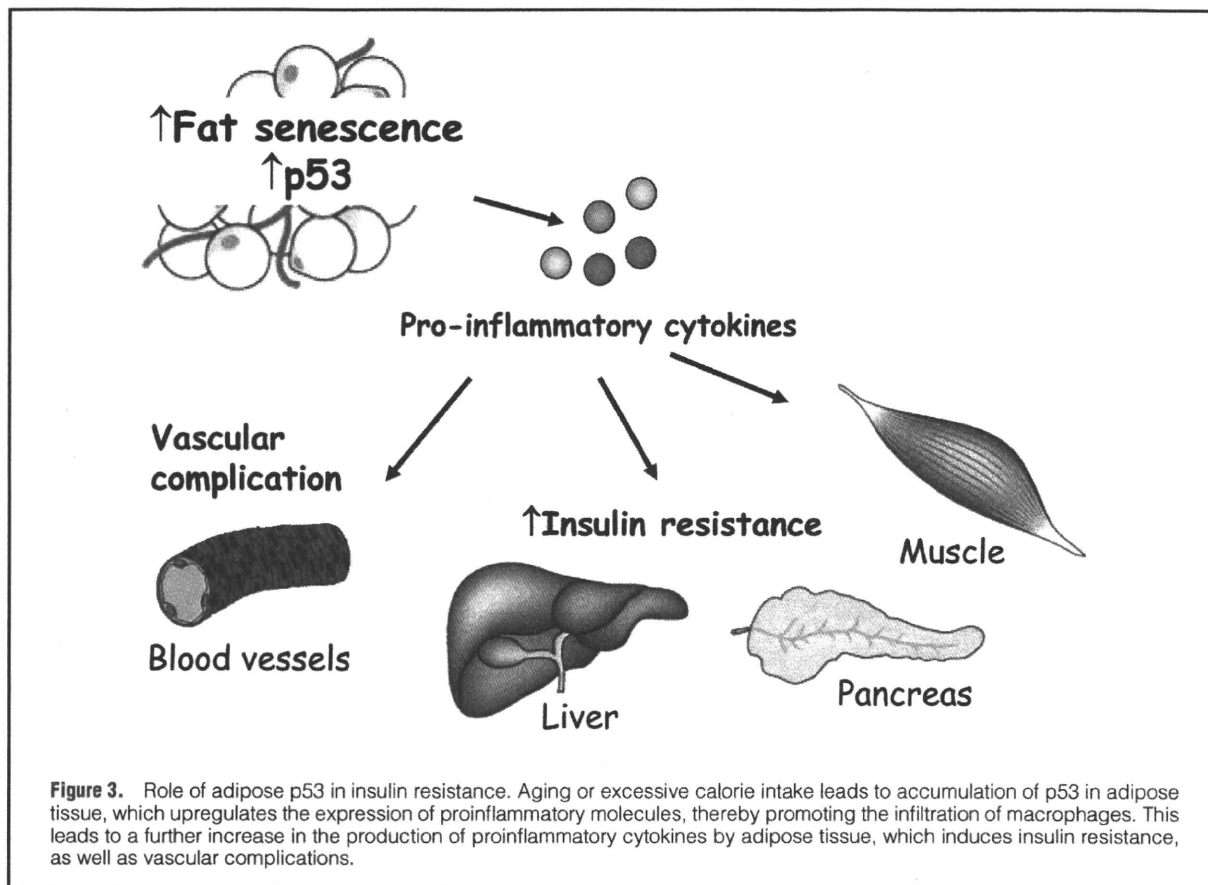


lar senescence triggered by mitogenic stimuli is independent of replicative age, and these signals act before the replicative limits of cells. Hence, it is apparently telomere-independent and thus termed 'stress-induced premature senescence'. Arterial components of the angiotensin II (Ang II) signaling cascade increase with aging and contribute to the pathogenesis of atherosclerosis, and inhibition of Ang II activity has been demonstrated to improve the morbidity and mortality of cardiovascular disease.<sup>33</sup> Ang II has been reported to induce the premature senescence of human VSMCs via the p53/p21-dependent pathway.<sup>34</sup> Ang II was shown to increase the number of senescent VSMCs and induce the expression of proinflammatory molecules, as well as p21, in a mouse model of atherosclerosis.<sup>34</sup> Loss of p21 markedly ameliorated the induction of proinflammatory molecules by Ang II, thereby preventing the development of atherosclerosis.

Oxidative stress and DNA damage have been shown to induce premature senescence in vascular cells and have been suggested to contribute to atherogenesis.<sup>34,35</sup> There is also evidence that exposure to chronic oxidative stress, including oxidized low-density lipoprotein, enhances telomere shortening and accelerates the onset of senescence in human ECs.<sup>36</sup>

Conversely, treatment with antioxidants preserves telomere length and extends the lifespan of ECs isolated from patients with severe coronary heart disease, unless the oxidative stress-induced damage becomes irreversible.<sup>37</sup> One of the cellular targets of oxidative stress is DNA. Many different types of oxidative DNA lesions have been described, ranging from base modifications to single- and double-strand breaks.<sup>38</sup> To cope with DNA damage, cells have evolved repair systems. Mice that lack components of these DNA repair systems exhibit the early onset of changes associated with aging, similar to their human counterparts,<sup>38</sup> and fibroblasts from these mice show accelerated senescence. Constitutive activation of p53<sup>39,40</sup> causes premature aging that is characterized by a reduced lifespan, osteoporosis, organ atrophy, and diminished stress tolerance. More importantly, cellular senescence has been detected in vivo by studies of mice with premature aging.<sup>41</sup> Together with the data from telomerase-deficient mice, these results provide in vivo evidence of a link between cellular senescence and aging of the organism.





### Cardiac Senescence

It has been reported that the number of myocytes declines with advancing age,<sup>42</sup> presumably because of apoptosis or necrosis, whereas human cardiomyocyte replication has been reported to occur in the failing heart, as well as in the infarcted heart,<sup>43,44</sup> suggesting that cardiac homeostasis could be regulated by the balance between myocyte loss and proliferation, and that aging impairs this equilibrium. In line with this notion, the number of myocytes with short telomeres is increased in the aging rat heart.<sup>45</sup> Likewise, telomere length is significantly reduced in the cells of the human failing heart compared with normal samples.<sup>46</sup> This reduction is enhanced with aging and associated with increased cardiac apoptosis, as well as activation of the DNA damage checkpoint kinase Chk2.<sup>46</sup> Later generations of telomerase-deficient mice show significant telomere shortening in myocytes, which is coupled with attenuation of myocyte proliferation and increased apoptosis.<sup>47</sup> These impairments are associated with ventricular dilatation and systolic dysfunction,<sup>47</sup> suggesting that telomere shortening with age could contribute to cardiac failure in the elderly. Cardiac telomerase activity declines with age, whereas forced expression of telomerase prevent age-associated telomere shortening, thereby promoting cardiomyocyte proliferation and survival.<sup>48</sup> Telomerase is detected mostly in cycling myocytes that express stem cell antigens, but also in proliferating myocytes without stem cell markers.<sup>49</sup> The number of these proliferative cardiomyocytes is increased in human cardiac hypertrophy<sup>49</sup> and ischemic heart failure,<sup>50</sup>

however; regeneration of myocytes appears to be insufficient, resulting in systolic dysfunction. Recently, a genetic fate-mapping study has demonstrated that cardiac progenitor cells (CPC) participate in the formation of new cardiomyocytes after injury, but do not contribute to refreshment of uninjured cardiomyocytes during normal aging in mice.<sup>51</sup>

Accumulating evidence has suggested that aging or pathological stimuli promotes both senescence and apoptosis of CPC, thereby decreasing the number of functionally competent CPC.<sup>52</sup> For example, the number of p53- or p16-positive CPC with short telomeres is increased in the aged animal heart,<sup>53</sup> as well as in the human chronic ischemic heart.<sup>50</sup> Senescence of CPC is more prominent in old patients with a diseased heart.<sup>54</sup> In the hearts of diabetic subjects, increased oxidative stress leads to telomere shortening, upregulation of p53 and p16, and apoptosis of CPC, thereby compromising cardiac structure and function.<sup>55</sup> Together with senescent CPC, old non-replicating p53/p16-positive myocytes with short telomeres are increased in the aged heart, and these cells exhibit impaired contractile function.<sup>53</sup> Thus, impaired function of senescent CPCs appears to affect the refreshment of myocytes, and therefore senescent myocytes with poor contractility accumulate, leading to the development of aging myopathy. Activation of CPC by growth factors, such as insulin-like growth factor-1 and hepatocyte growth factor, has been shown to promote regeneration of cardiomyocytes, restoring the cardiac dysfunction associated with aging, suggesting that treatment with these growth factors may become an effective therapeutic strategy for myocardial aging.<sup>53,56,57</sup>

Cardiac hypertrophy is an adaptive response to increased workload in order to maintain cardiac function.<sup>58</sup> However, prolonged cardiac hypertrophy causes heart failure,<sup>59–61</sup> and the mechanisms are largely unknown. It was recently demonstrated that cardiac angiogenesis is critically involved in the adaptive mechanism of cardiac hypertrophy and that p53 accumulation is crucial for the transition from cardiac hypertrophy to heart failure. Pressure overload initially promotes vascular growth in the heart as a result of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1)-dependent induction of angiogenic factors, and inhibition of angiogenesis prevents the development of cardiac hypertrophy and induced systolic dysfunction. Sustained pressure overload induces accumulation of p53, which inhibits HIF-1 activity and thereby impairs cardiac angiogenesis and systolic function. Conversely, promoting cardiac angiogenesis by introducing angiogenic factors or by inhibiting p53 accumulation further develops hypertrophy and restores cardiac dysfunction under chronic pressure overload. These results suggest that the anti-angiogenic property of p53 plays a critical role in the transition from cardiac hypertrophy to heart failure (Figure 2).

Accumulation of p53 in the heart has been reported in aging and several diseases, such as diabetes,<sup>47,62,63</sup> which may be the reason older people and diabetic patients are susceptible to heart failure when chronic pressure overload develops. Thus, inhibition of p53 or promotion of vascular growth in the heart may be a novel therapeutic strategy to prevent the transition from cardiac hypertrophy to heart failure in aged people and diabetic patients.

### Adipose Senescence and Diabetes

Aging is known to increase the prevalence of metabolic disorders such as diabetes. Therefore, it has been hypothesized that cellular aging might influence insulin resistance (IR) and accelerate the development of diabetes. Using various genetic models, including telomerase-deficient mice, it has been recently shown that p53 in adipose tissue is critically involved in IR, which underlies age-related cardiovascular and metabolic disorders.<sup>64</sup> Telomerase-deficient mice with short telomeres developed IR when fed a high-calorie diet. The adipose tissue of these mice showed senescence-like changes, such as increases in the activity of SA $\beta$ -gal, level of expression of p53, and production of proinflammatory cytokines. Resection of senescent adipose tissue improved IR in the telomerase-deficient mice, and implantation of senescent adipose tissue into wild-type mice led to impairment of insulin sensitivity and glucose tolerance in the recipients. Upregulation of p53 induced the expression of proinflammatory cytokines and accumulation of macrophages in adipose tissue. It was also found that excessive calorie intake led to the accumulation of oxidative stress in the adipose tissue of type 2 diabetic mice and promoted senescence-like changes, thereby increasing production of pro-inflammatory cytokines. Inhibition of p53 activity significantly ameliorated these senescence-like changes of adipose tissue, decreased the expression of proinflammatory cytokines, and improved IR in type 2 diabetic mice. Conversely, upregulation of p53 in adipose tissue caused an inflammatory response that led to IR. Adipose tissue from diabetic patients also shows senescence-like features. These findings indicate that cellular aging signals (particularly p53 in adipose tissue) upregulate the expression of proinflammatory molecules, thereby promoting the infiltration of macrophages into adipose tissue, which leads to a further increase in the production of proinflammatory cytokines by the adipose

tissue, which induces IR and glucose intolerance (Figure 3). Our results demonstrate a previously unappreciated role of adipose-related p53 in the regulation of IR and suggest that cellular aging signals in adipose tissue could be a novel target for the treatment of diabetes.

Recent studies have shown that longevity signals in adipose tissue plays a crucial role in regulating the lifespan of various species, ranging from worms to mice, and suggested the existence of cellular non-autonomous regulation of aging by adipose tissue.<sup>65–68</sup> Consistent with those reports, subcutaneous implantation of senescent adipose tissue from telomerase-deficient mice accelerated the senescence of epididymal fat in wild-type recipients (T. Minamino, unpublished data). The senescence of adipose tissue may increase the local production of proinflammatory molecules, but may also promote systemic inflammation via cellular non-autonomous mechanisms. Low levels of circulating insulin are generally associated with longevity, and activation of longevity signals in adipose tissue has been reported to reduce the circulating insulin level and extend the lifespan.<sup>69,70</sup> It has been found that inhibition of p53 activity in adipose tissue improves IR and thus decreases the plasma insulin level. Thus, p53 activation in adipose tissue may be a pro-aging signal that negatively regulates longevity, so inhibition of cellular aging may become a novel therapeutic strategy for aging and its associated diseases.

### Conclusions

Cell division is essential for the survival of multicellular organisms that contain renewable tissues, but places the organism at risk of developing cancer. Thus, complex organisms have evolved at least 2 cellular mechanisms to prevent oncogenic transformation: apoptosis and cellular senescence. In this regard, aging and age-associated diseases can be viewed as byproducts of the tumor suppressor mechanism known as cellular senescence. Consistent with this idea, the number of senescent fibroblasts increases exponentially in the skin of aging primates.<sup>17</sup> Conversely, extension of the lifespan by calorie restriction decreases biomarkers of cellular senescence in vivo.<sup>71</sup> We therefore need to identify the molecular mechanisms by which aging accelerates cellular aging in order to prevent the development of lifestyle-related diseases. Identification of such mechanisms could lead to a new treatment strategy for various age-associated diseases, such as neurodegenerative disease, as well as lifestyle-related diseases.

### References

1. Campisi J. The biology of replicative senescence. *Eur J Cancer* 1997; **33**: 703–709.
2. Bringold F, Serrano M. Tumor suppressors and oncogenes in cellular senescence. *Exp Gerontol* 2000; **35**: 317–329.
3. Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 9363–9367.
4. Kumazaki T, Kobayashi M, Mitsui Y. Enhanced expression of fibronectin during in vivo cellular aging of human vascular endothelial cells and skin fibroblasts. *Exp Cell Res* 1993; **205**: 396–402.
5. Bennett MR, Macdonald K, Chan SW, Boyle JJ, Weissberg PL. Cooperative interactions between RB and p53 regulate cell proliferation, cell senescence, and apoptosis in human vascular smooth muscle cells from atherosclerotic plaques. *Circ Res* 1998; **82**: 704–712.
6. Burrig KF. The endothelium of advanced arteriosclerotic plaques in humans. *Arterioscler Thromb* 1991; **11**: 1678–1689.
7. Ross R, Wight TN, Strandness E, Thiele B. Human atherosclerosis. I: Cell constitution and characteristics of advanced lesions of the superficial femoral artery. *Am J Pathol* 1984; **114**: 79–93.

8. Fenton M, Barker S, Kurz DJ, Erusalimsky JD. Cellular senescence after single and repeated balloon catheter denudations of rabbit carotid arteries. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; **21**: 220–226.
9. Minamino T, Miyauchi H, Yoshida T, Ishida Y, Yoshida H, Komuro I. Endothelial cell senescence in human atherosclerosis: Role of telomere in endothelial dysfunction. *Circulation* 2002; **105**: 1541–1544.
10. Minamino T, Yoshida T, Tateno K, Miyauchi H, Zou Y, Toko H, et al. Ras induces vascular smooth muscle cell senescence and inflammation in human atherosclerosis. *Circulation* 2003; **108**: 2264–2269.
11. Minamino T, Miyauchi H, Yoshida T, Tateno K, Kunieda T, Komuro I. Vascular cell senescence and vascular aging. *J Mol Cell Cardiol* 2004; **36**: 175–183.
12. Vanhoufte PM. Endothelial dysfunction: The first step toward coronary arteriosclerosis. *Circ J* 2009; **73**: 595–601.
13. Blasco MA. Telomeres and human disease: Ageing, cancer and beyond. *Nat Rev Genet* 2005; **6**: 611–622.
14. Herbig U, Jobling WA, Chen BP, Chen DJ, Sedivy JM. Telomere shortening triggers senescence of human cells through a pathway involving ATM, p53, and p21(CIP1), but not p16(INK4a). *Mol Cell* 2004; **14**: 501–513.
15. d'Adda di Fagagna F, Reaper PM, Clay-Farrace L, Fiegler H, Carr P, Von Zglinicki T, et al. A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature* 2003; **426**: 194–198.
16. Takai H, Smogorzewska A, de Lange T. DNA damage foci at dysfunctional telomeres. *Curr Biol* 2003; **13**: 1549–1556.
17. Herbig U, Ferreira M, Condel L, Carey D, Sedivy JM. Cellular senescence in aging primates. *Science* 2006; **311**: 1257.
18. Chang E, Harley CB. Telomere length and replicative aging in human vascular tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 11190–11194.
19. Aviv H, Khan MY, Skurnick J, Okuda K, Kimura M, Gardner J, et al. Age dependent aneuploidy and telomere length of the human vascular endothelium. *Atherosclerosis* 2001; **159**: 281–287.
20. Ogami M, Ikura Y, Ohsawa M, Matsuo T, Kayo S, Yoshimi N, et al. Telomere shortening in human coronary artery diseases. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; **24**: 546–550.
21. Voghel G, Thorin-Trescases N, Farhat N, Nguyen A, Villeneuve L, Mamarbachi AM, et al. Cellular senescence in endothelial cells from atherosclerotic patients is accelerated by oxidative stress associated with cardiovascular risk factors. *Mech Ageing Dev* 2007; **128**: 662–671.
22. Minamino T, Kourembanas S. Mechanisms of telomerase induction during vascular smooth muscle cell proliferation. *Circ Res* 2001; **89**: 237–243.
23. Minamino T, Mitsialis SA, Kourembanas S. Hypoxia extends the life span of vascular smooth muscle cells through telomerase activation. *Mol Cell Biol* 2001; **21**: 3336–3342.
24. Matsushita H, Chang E, Glassford AJ, Cooke JP, Chiu CP, Tsao PS. eNOS activity is reduced in senescent human endothelial cells: Preservation by hTERT immortalization. *Circ Res* 2001; **89**: 793–798.
25. Yang J, Chang E, Cherry AM, Bangs CD, Oei Y, Bodnar A, et al. Human endothelial cell life extension by telomerase expression. *J Biol Chem* 1999; **274**: 26141–26148.
26. Yang J, Nagavarapu U, Relloma K, Sjaastad MD, Moss WC, Passaniti A, et al. Telomerized human microvasculature is functional in vivo. *Nat Biotechnol* 2001; **19**: 219–224.
27. Blasco MA, Lee HW, Hande MP, Samper E, Lansdorp PM, DePinho RA, et al. Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA. *Cell* 1997; **91**: 25–34.
28. Lee HW, Blasco MA, Gottlieb GJ, Horner JW 2nd, Greider CW, DePinho RA. Essential role of mouse telomerase in highly proliferative organs. *Nature* 1998; **392**: 569–574.
29. Rudolph KL, Chang S, Lee HW, Blasco M, Gottlieb GJ, Greider C, et al. Longevity, stress response, and cancer in aging telomerase-deficient mice. *Cell* 1999; **96**: 701–712.
30. Franco S, Segura I, Riese HH, Blasco MA. Decreased B16F10 melanoma growth and impaired vascularization in telomerase-deficient mice with critically short telomeres. *Cancer Res* 2002; **62**: 552–559.
31. Poch E, Carbonell P, Franco S, Diez-Juan A, Blasco MA, Andres V. Short telomeres protect from diet-induced atherosclerosis in apolipoprotein E-null mice. *Faseb J* 2004; **18**: 418–420.
32. Perez-Rivero G, Ruiz-Torres MP, Rivas-Elena JV, Jerkic M, Diez-Marques ML, Lopez-Novoa JM, et al. Mice deficient in telomerase activity develop hypertension because of an excess of endothelin production. *Circulation* 2006; **114**: 309–317.
33. Najjar SS, Scuteri A, Lakatta EG. Arterial aging: Is it an immutable cardiovascular risk factor? *Hypertension* 2005; **46**: 454–462.
34. Kunieda T, Minamino T, Nishi J, Tateno K, Oyama T, Katsuno T, et al. Angiotensin II induces premature senescence of vascular smooth muscle cells and accelerates the development of atherosclerosis via a p21-dependent pathway. *Circulation* 2006; **114**: 953–960.
35. Matthews C, Gorenne I, Scott S, Figg N, Kirkpatrick P, Ritchie A, et al. Vascular smooth muscle cells undergo telomere-based senescence in human atherosclerosis: Effects of telomerase and oxidative stress. *Circ Res* 2006; **99**: 156–164.
36. Kurz DJ, Decary S, Hong Y, Trivier E, Akhmedov A, Erusalimsky JD. Chronic oxidative stress compromises telomere integrity and accelerates the onset of senescence in human endothelial cells. *J Cell Sci* 2004; **117**: 2417–2426.
37. Voghel G, Thorin-Trescases N, Farhat N, Mamarbachi AM, Villeneuve L, Fortier A, et al. Chronic treatment with N-acetylcysteine delays cellular senescence in endothelial cells isolated from a subgroup of atherosclerotic patients. *Mech Ageing Dev* 2008; **129**: 261–270.
38. Hastay P, Campisi J, Hoeijmakers J, van Steeg H, Vijg J. Aging and genome maintenance: Lessons from the mouse? *Science* 2003; **299**: 1355–1359.
39. Tyner SD, Venkatchalam S, Choi J, Jones S, Ghebranious N, Igelmann H, et al. p53 mutant mice that display early ageing-associated phenotypes. *Nature* 2002; **415**: 45–53.
40. Maier B, Gluba W, Bernier B, Turner T, Mohammad K, Guise T, et al. Modulation of mammalian life span by the short isoform of p53. *Genes Dev* 2004; **18**: 306–319.
41. Cao L, Li W, Kim S, Brodie SG, Deng CX. Senescence, aging, and malignant transformation mediated by p53 in mice lacking the Brca1 full-length isoform. *Genes Dev* 2003; **17**: 201–213.
42. Olivetti G, Giordano G, Corradi D, Melissari M, Lagrasta C, Gamber SR, et al. Gender differences and aging: Effects on the human heart. *J Am Coll Cardiol* 1995; **26**: 1068–1079.
43. Kajstura J, Leri A, Finato N, Di Loreto C, Beltrami CA, Anversa P. Myocyte proliferation in end-stage cardiac failure in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 8801–8805.
44. Beltrami AP, Urbanek K, Kajstura J, Yan SM, Finato N, Bussani R, et al. Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. *N Engl J Med* 2001; **344**: 1750–1757.
45. Kajstura J, Pertoldi B, Leri A, Beltrami CA, DePala A, Darzynkiewicz Z, et al. Telomere shortening is an in vivo marker of myocyte replication and aging. *Am J Pathol* 2000; **156**: 813–819.
46. Oh H, Wang SC, Prahara A, Sano M, Moravec CS, Taffet GE, et al. Telomere attrition and Chk2 activation in human heart failure. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; **100**: 5378–5383.
47. Leri A, Franco S, Zacheo A, Barlucchi L, Chimenti S, Limana F, et al. Ablation of telomerase and telomere loss leads to cardiac dilatation and heart failure associated with p53 upregulation. *EMBO J* 2003; **22**: 131–139.
48. Oh H, Taffet GE, Youker KA, Entman ML, Overbeek PA, Michael LH, et al. Telomerase reverse transcriptase promotes cardiac muscle cell proliferation, hypertrophy, and survival. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; **98**: 10308–10313.
49. Urbanek K, Quaini F, Tasca G, Torella D, Castaldo C, Nadal-Ginard B, et al. Intense myocyte formation from cardiac stem cells in human cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; **100**: 10440–10445.
50. Urbanek K, Torella D, Sheikh F, De Angelis A, Nurzynska D, Silvestri F, et al. Myocardial regeneration by activation of multipotent cardiac stem cells in ischemic heart failure. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; **102**: 8692–8697.
51. Hsieh PC, Segers VF, Davis ME, MacGillivray C, Gannon J, Molkentin JD, et al. Evidence from a genetic fate-mapping study that stem cells refresh adult mammalian cardiomyocytes after injury. *Nat Med* 2007; **13**: 970–974.
52. Hosoda T, Kajstura J, Leri A, Anversa P. Mechanisms of myocardial regeneration. *Circ J* 2010; **74**: 13–17.
53. Torella D, Rota M, Nurzynska D, Musso E, Monsen A, Shiraishi I, et al. Cardiac stem cell and myocyte aging, heart failure, and insulin-like growth factor-1 overexpression. *Circ Res* 2004; **94**: 514–524.
54. Chimenti C, Kajstura J, Torella D, Urbanek K, Heleniak H, Colussi C, et al. Senescence and death of primitive cells and myocytes lead to premature cardiac aging and heart failure. *Circ Res* 2003; **93**: 604–613.
55. Rota M, LeCapitaine N, Hosoda T, Boni A, De Angelis A, Padin-Iruegas ME, et al. Diabetes promotes cardiac stem cell aging and heart failure, which are prevented by deletion of the p66shc gene. *Circ Res* 2006; **99**: 42–52.

56. Urbanek K, Rota M, Cascapera S, Bearzi C, Nascimbene A, De Angelis A, et al. Cardiac stem cells possess growth factor-receptor systems that after activation regenerate the infarcted myocardium, improving ventricular function and long-term survival. *Circ Res* 2005; **97**: 663–673.
57. Gonzalez A, Rota M, Nurzynska D, Misao Y, Tillmanns J, Ojaimi C, et al. Activation of cardiac progenitor cells reverses the failing heart senescent phenotype and prolongs lifespan. *Circ Res* 2008; **102**: 597–606.
58. Frey N, Olson EN. Cardiac hypertrophy: The good, the bad, and the ugly. *Annu Rev Physiol* 2003; **65**: 45–79.
59. Levy D, Garrison RJ, Savage DD, Kannel WB, Castelli WP. Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study. *N Engl J Med* 1990; **322**: 1561–1566.
60. Ferrari R, Ceconi C, Campo G, Cangiano E, Cavazza C, Secchiero P, et al. Mechanisms of remodelling: A question of life (stem cell production) and death (myocyte apoptosis). *Circ J* 2009; **73**: 1973–1982.
61. Misra A, Mann DL. Treatment of heart failure beyond practice guidelines: Role of cardiac remodeling. *Circ J* 2008; **72**(Suppl A): A-1–A-7.
62. Fiordaliso F, Leri A, Cesselli D, Limana F, Safai B, Nadal-Ginard B, et al. Hyperglycemia activates p53 and p53-regulated genes leading to myocyte cell death. *Diabetes* 2001; **50**: 2363–2375.
63. Kajstura J, Fiordaliso F, Andreoli AM, Li B, Chimenti S, Medow MS, et al. IGF-1 overexpression inhibits the development of diabetic cardiomyopathy and angiotensin II-mediated oxidative stress. *Diabetes* 2001; **50**: 1414–1424.
64. Minamino T, Orimo M, Shimizu I, Kunieda T, Yokoyama M, Ito T, et al. A crucial role for adipose tissue p53 in the regulation of insulin resistance. *Nat Med* 2009; **15**: 1082–1087.
65. Kenyon C. The plasticity of aging: Insights from long-lived mutants. *Cell* 2005; **120**: 449–460.
66. Hwangbo DS, Gershman B, Tu MP, Palmer M, Tatar M. *Drosophila* dFOXO controls lifespan and regulates insulin signalling in brain and fat body. *Nature* 2004; **429**: 562–566.
67. Giannakou ME, Goss M, Junger MA, Hafen E, Leevers SJ, Partridge L. Long-lived *Drosophila* with overexpressed dFOXO in adult fat body. *Science* 2004; **305**: 361.
68. Blüher M, Kahn BB, Kahn CR. Extended longevity in mice lacking the insulin receptor in adipose tissue. *Science* 2003; **299**: 572–574.
69. Blüher M, Michael MD, Peroni OD, Ueki K, Carter N, Kahn BB, et al. Adipose tissue selective insulin receptor knockout protects against obesity and obesity-related glucose intolerance. *Dev Cell* 2002; **3**: 25–38.
70. Libina N, Berman JR, Kenyon C. Tissue-specific activities of *C. elegans* DAF-16 in the regulation of lifespan. *Cell* 2003; **115**: 489–502.
71. Krishnamurthy J, Torrice C, Ramsey MR, Kovalev GI, Al-Regaiey K, Su L, et al. Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging. *J Clin Invest* 2004; **114**: 1299–1307.