

Shudo Y, Taniguchi K, Takeda K, Sakaguchi T, Funatsu T, Matsue H, Miyagawa S, Kondoh H, Kainuma S, Kubo K, Hamada S, Izutani H, <u>Sawa Y</u> .	Restrictive mitral annuloplasty with or without surgical ventricular restoration in ischemic dilated cardiomyopathy with severe mitral regurgitation.	<i>Circulation.</i>	24 (11 Suppl)	S107-14	2011
Imanishi Y, Miyagawa S, Maeda N, Fukushima S, Kitagawa-Sakakida S, Daimon T, Hirata A, Shimizu T, Okano T, Shimomura I, <u>Sawa Y</u> .	Induced adipocyte cell-sheet ameliorates cardiac dysfunction in a mouse myocardial infarction model: a novel drug delivery system for heart failure.	<i>Circulation.</i>	124 (11 Suppl)	S10-7	2011
Yang J, Ii M, Kamei N, Alev C, Kwon SM, Kawamoto A, Akimaru H, Masuda H, <u>Sawa Y</u> , Asahara T.	CD34+ cells represent highly functional endothelial progenitor cells in murine bone marrow.	<i>PLoS One.</i>	6(5)	[Epub]	2011
<u>Sawa Y</u> , Ye F, Urayama K, Takigawa T, Gimenez-Pinto V, Selinger RL, Selinger JV.	Shape selection of twist-nematic-elastomer ribbons.	<i>Proc Natl Acad Sci U S A.</i>	108(16)	6364-6368	2011
JCS Joint Working Group.	Guidelines for perioperative cardiovascular evaluation and management for noncardiac surgery (JCS 2008) --digest version.	<i>Circ J.</i>	75(4)	989-1009	2011

鳥羽健, 加藤公則, 小澤拓也, 相澤義房	Evaluation of the Prospective Observation of erythropoietin-administration for the treatment of Acute Myocardial Infarction (EPO/AMI-1) Study.	日本内科学会 雑誌	第100巻 第7号	2008-2011	2011
Ishii T, Asai T, Oyama D, Fukuta T, Yasuda N, Shimizu K, <u>Minamino T</u> , Oku N.	Amelioration of cerebral ischemia-reperfusion injury based on liposomal drug delivery system with asialo-erythropoietin.	<i>J Control Release.</i>	[Epub ahead of print]		2012
Nishikawa K, Asai T, Shigematsu H, Shimizu K, Kato H, Asano Y, Takashima S, Mekada E, Oku N, <u>Minamino T</u> .	Development of anti-HB-EGF immunoliposomes for the treatment of breast cancer.	<i>J Control Release.</i>	[Epub ahead of print]		2011
<u>Nakatani D</u> , Ako J, Tremmel JA, Waseda K, Otake H, Koo BK, Miyazawa A, Hongo Y, Hur SH, Sakurai R, Yock PG, Honda Y, Fitzgerald PJ.	Sex differences in neointimal hyperplasia following endeavor zotarolimus-eluting stent implantation.	<i>Am J Cardiol.</i>	108	912-917	2011

IV. 研究成果の刊行物・別刷

循環器再生医学の 現状と展望

室原豊明・編

名古屋大学大学院医学系研究科
循環器内科学教授



EPO

鳥羽 健

新潟大学大学院医歯学総合研究科生体機能調節医学専攻機能再建医学講座血液学分野

小澤拓也/相澤義房

新潟大学大学院医歯学総合研究科生体機能調節医学専攻器官制御医学講座循環器学分野

はじめに

エリスロポエチン(erythropoietin ; EPO)は、生物活性をマーカーにしたタンパク精製・クローニング・遺伝子組み換え製剤化という定型的な手順で開発に成功したサイトカイン製剤であり、腎性貧血治療薬として約20年の歴史をもつ。血管内皮増殖因子(vascular endothelial growth factor ; VEGF)や線維芽細胞増殖因子(fibroblast growth factor ; FGF)がそれぞれ創傷治癒の過程における血管新生・肉芽形成を制御するマスター因子であり、心臓・血管などの間葉系器官・組織の再生医学に直結するのに対し、EPOの本来の作用は赤血球造血の維持および促進である。それにもかかわらず、EPOの心・血管系への多面的作用を利用した虚血性心疾患に対する臨床応用が現実的となってきている。VEGFやFGFは、それぞれが構造・作用の類似した増殖因子ファミリーを形成し、受容体が典型的な膜型チロシンキナーゼ(tyrosine kinase ; TK)であるのに対し、EPO受容体(EPO receptor ; EPOR)は成長ホルモンを代表とするI型サイトカイン受容体(JAK/STAT経路の起動)に属し、その作用の基本は増殖ではない(表1)。軟体動物・節足動物などの開放血管系をもつ動物には赤血球は存在せず、ホヤ類などの脊索動物への進化に至って閉鎖血管系と赤血球造血を同時に獲得した。系統発生・個体発生のいずれにおいても、EPO/EPORシステムは心血管系に重要な役割をもつ。

表1 I型サイトカイン受容体

受容体サブタイプ	リガンド：受容体の組み合わせ
Type 1 (STAT5)	成長ホルモン(GH), プロラクチン(PRL), エリスロポエチン(EPO), トロンボポエチン(TPO)
Type 2 (STAT3)	顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF), 白血病抑制因子(LIF), IL-23 IL-6/LIF/cardiotrophin-1(CT-1)/oncostatin Mの受容体共通 β 鎖(GP130)
Type 3 (STAT3)	IL-6受容体 α 鎖, IL-11受容体 α 鎖, IL-12受容体 β 鎖, IL-27受容体 β 鎖
Type 4 (STAT5)	顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)/IL-3/IL-5の受容体共通 β 鎖(βc) IL-9受容体 β 鎖, IL-21受容体 β 鎖, IL-2受容体 β 鎖
Type 5 (STAT5)	GM-CSF受容体 α 鎖, IL-3受容体 α 鎖, IL-5受容体 α 鎖 IL-2/IL-4/IL-7の受容体共通 γ 鎖

STAT : signal transducer and activator of transcription

1

EPORからのシグナル

EPOによる細胞内シグナル伝達はEPORを発現した造血系細胞を用いた研究によってよく知られており、造血外の細胞でも類似していると考えてよい。主要な伝達経路はJAK2/STAT5系であり¹⁾、ほかにRas/MAPキナーゼ経路、PI3K/AKT経路などが活性化される。EPO、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(granulocyte macrophage-colony stimulating factor; GM-CSF)、IL-3などは、その受容体を発現している細胞に作用して、JAK(Janus kinase)2の活性化を介してSTAT(signal transducer and activator of transcription)5をリン酸化し、2量体化したSTAT5が核内へ移行しMGFボックス(mammary grand factor box)に結合して転写を制御する。したがって、その細胞で発現しているMGFボックスを有する遺伝子が何であるかによって転写制御を受ける遺伝子と、その結果としての作用が異なるわけであるが、この中でとくに重要なのは、抗アポトーシス作用をもつBcl-X(L)である²⁾。

また、他のI型サイトカイン受容体とは異なるEPORの際立った特徴として、細胞内ドメインC末端側におけるITIM(immune receptor tyrosine based inhibitory motif)配列の獲得がある。魚類ではYXXM(Xは任意のアミノ酸)であった配列が両生類では点突然変異によりYXXLとなりヒトまで保存されていることから、脊椎動物の上陸後にこのITIMが重要な働きを担ったことが理解される。ITIMは、タンパクチロシン脱リン酸化酵素(protein-tyrosine phosphatase; PTP)の1つであるSHP1を活性化し、造血や免疫反応における過度な活性化を抑制する働きをもつ。SHP1を欠損したmotheatenマウスは多血症および免疫不全となる。

一方、EPOとは対照的に、IL-6は受容体GP130/JAK複合体を介してSTAT3をリン酸化し³⁾、APRE(acute phase response element)を有する遺伝子の発現を制御し、その作用はEPOとは

異なるため、EPO 投与によって観察された作用が EPO の直接作用なのか、それとも IL-6(血管新生作用)あるいは CT-1(cardiotrophin-1:心筋保護作用および心筋細胞肥大化)を介した間接作用なのかを区別する目安となり得る。

2

EPOR の分布

造血系では幹細胞に近い前期前駆細胞の一部からヘモグロビン合成中の赤芽球にかけて EPOR の 2 量体が発現しており、EPO の存在下に EPOR の構造変化が起こり、細胞内ヘシグナルが伝達される。赤血球系細胞は前駆細胞から脱核による最終分化に至るまでのあいだに G_0 (休止)期が存在せず、成熟と増殖は休みなく同時に進行する。EPOR からのシグナルがないとアポトーシスに至り、赤血球造血が維持されない。したがって、EPO の作用の基本は Bcl-X(L) の誘導を介した生存シグナルにあるといえる²⁾。腎臓は貧血や低酸素に反応して EPO のサージ分泌を行うが、恒常的には骨髄未分化細胞から分泌されるわずかな量の EPO のパラクライン(傍分泌)によって造血が維持されている。

これに対し非造血系では、常態において細胞の連続性が保たれている機能型細胞では細胞接着因子と膜型あるいは細胞質型のチロシンフォスファターゼ(protein tyrosine phosphatase; PTP)の相互作用を介した増殖の抑制状態(G_0 期)にあり、虚血や炎症などの細胞ストレスによるオンコース(細胞死)が誘導されない限りは、赤芽球の場合のように常時生存シグナルにさらされている必要はない。この場合には、EPO は細胞ストレスによる細胞死からの保護作用を示すことになり、細胞ストレスによる EPO のパラクラインと EPO 感受性細胞の EPOR 発現増強を伴うと思われる。

EPO ポリペプチドのリシン残基をカルバミル化した人工 EPO 誘導體であるカルバミル EPO (carbaryl EPO; CEPO)を固相化したカラムを用いた研究で、脳および心臓に EPOR/ βc ヘテロ 2 量体が発現していることが示された⁴⁾。CEPO は EPOR ホモ 2 量体とは結合せず造血能を欠くが、脳や心臓の虚血モデルに対して CEPO 投与が臓器保護作用を示したことが示されている。 βc は GM-CSF/IL-3/IL-5 の受容体共通 β 鎖であり、アレルギー反応の制御に重要である。 βc の細胞内シグナルは EPOR と類似していて、STAT5 が中心となる。EPOR/ βc では EPOR が EPO 特異的な α 鎖として機能するわけであるが、EPOR のホモ受容体とヘテロ受容体を臓器によって使い分ける利便は不明である。細胞内シグナルのわずかな差、あるいは EPO 感受性(閾値)の調整に関与しているのかもしれない。中枢神経では神経細胞自体が EPOR を発現しているようであるが、心臓に存在する EPOR 陽性細胞の細胞系統についてはしばらく不明であった。また、造血系以外の系統がすべてヘテロ受容体を発現しているということにはならない。

後述のように、CEPO には血管内皮保護作用はなく、したがって、内皮では造血系と同様にホモ受容体を発現していると考えられる。個体発生の一次造血において、赤血球と内皮は共通

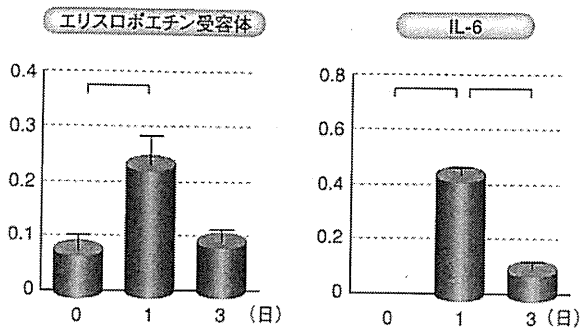


図1 急性心筋梗塞(AMI)ラット非再灌流モデルにおける心臓での mRNA 発現 AMI 急性期にエリスロポエチン受容体と IL-6 の発現が上昇する。縦軸は $\times 10^6$ copy/ μ g RNA.

の前駆細胞であるヘマンジオブラストの細胞集塊から位置情報に応じて分化する近縁種の細胞であることと関連があると思われる。

心臓の発生には EPO/EPOR システムが必須であり⁵⁾、胎児期における心筋細胞の増殖には心外膜から分泌される EPO とレチノイン酸が必要であるという報告があるが⁶⁾、いずれも EPO の直接作用とは限らない。また、急性虚血心で EPOR および IL-6 の発現量増加が観察されるが(図 1)、EPOR 陽性細胞の細胞系統については議論があった。これまで心筋細胞自体に EPOR が発現しているという報告はいずれも免疫組織化学によるものと、ランゲンドルフ法によって部分精製した心筋の mRNA 発現解析によるものである⁷⁾。元来、EPO の有効濃度は他のサイトカインよりも 1~2 オーダー低く、EPO/EPOR の発現量はきわめて少なく、その解析は造血系においてすら困難であった。実際、腎における EPO 産生細胞が同定されたのは 2008 年のことである⁸⁾。In situ ハイブリダイゼーション法や免疫組織染色法による検索はすべて失敗に終わり、180 kb に及ぶ EPO 遺伝子とその周辺制御領域に緑色蛍光タンパク質(green fluorescent protein ; GFP)を組み込んだ大腸菌人工染色体トランスジェニックマウスの作製が必要であった。

ランゲンドルフ法と短時間付着培養を用いた非付着成分の粗精製心筋細胞には線維芽細胞などの非心筋成分の混入が多く、PCR 法に耐えるサンプルとはいえない。そのため多くの文献では cardiomyocytes とはいわず cardiac cells という表現を用いている。実際にウェスタン法による EPOR タンパク質の解析を行った報告では、急性虚血心で EPOR を発現していた細胞は心筋細胞ではなく心線維芽細胞であり、EPO の心筋保護作用に線維芽細胞を介した間接作用が重要であることが示された⁹⁾。EPOR conditional ノックアウトマウスを用いた心筋梗塞再灌流モデルで、STAT3 のリン酸化が重要であることが示されていることと矛盾しない所見である¹⁰⁾。表 1 に示すとおり、STAT3 を活性化させる受容体は EPOR よりも GP130 である可能性が高い。

3

EPO の心・血管系への作用

植物性アルカロイドのモノクロタリンを 1 回腹腔内投与することで、ラットに持続進行性の

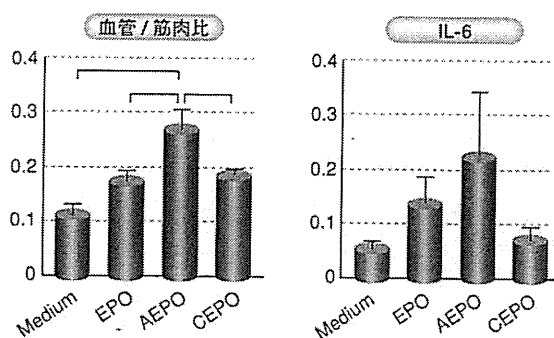


図2 C57/BL マウス下肢虚血モデルにおける血管新生

EPO : erythropoietin

AEPO : asialo EPO

CEPO : carbamyl EPO

マウス下肢虚血モデルを作成し、2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の EPO 誘導体を虚血下肢筋内に7日間投与した。8日目の血管数(左)と筋内での IL-6 の mRNA 発現量 (ratio/ γ アクチン) (右)。

肺細動脈血管内皮障害を作成することができる。この系では肺高血圧から右心不全に至るが、EPOの持続静脈内投与によって Bcl-X(L)の誘導と血管内皮障害の抑制、中膜肥厚に伴う肺高血圧および右心不全の改善が観察される。アシアロ EPO (asialo EPO; AEPO) や CEPO の投与にはこの効果がない。AEPO は後述のとおり血中濃度が上昇しない。CEPO が無効なのは、赤芽球と同様に内皮でも EPOR ホモ 2 量体を発現しているためと考えられる。

虚血に弱い白マウスおよび虚血から自然回復する黒マウスいずれにおいても、下肢虚血モデルに対する EPO の血管新生作用は強力とはいえ、骨髄細胞移植 (bone marrow implantation; BMI) より効果がかかなり弱い。EPO 投与によって毛細血管の新生が誘導されるが、細動脈の新生が弱いため、血流の回復にあまり寄与しない。これに対し自然型の EPO 誘導体である AEPO の *in vivo* 血管新生作用は強く、BMI の効果に匹敵する (図 2)。 *In vivo* 血管新生作用の強度は AEPO > EPO = CEPO である。

コンフルエントな培養ヒト皮膚線維芽細胞 (HDF) 上にヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) を播種すると、内皮の増殖とともに毛細血管のネットワーク様構造が再現される。IL-6 の添加は血管を増加させる。EPO の添加によっても血管が増加するが、この作用は抗 IL-6 抗体の添加によってキャンセルされる。 *In vitro* 血管新生作用の強度は VEGF > IL-6 > EPO = AEPO > CEPO であった。EPO 誘導体の血管新生作用に関する *in vivo* と *in vitro* の作用の乖離の原因は、後述のとおり組織親和性の違いによって説明できる。

ラットの心筋梗塞および心筋炎モデルを用いた実験で、心線維芽細胞での IL-6 の発現増強に伴って心筋細胞によるヘプシジン産生が増強されるが¹⁰⁾、この鉄代謝制御ホルモンであるヘプシジンは細胞外鉄イオンを網内系へ取容することによって活性酸素種 (reactive oxygen species; ROS) の増加を抑制し、臓器保護作用をもつと考えられる。急性心筋梗塞 (acute myocardial infarction; AMI) 患者の超急性期でも CPK (creatin phosphokinase) の上昇に先立ってヘプシジンの上昇が観察され、早期診断に利用価値がある¹²⁾。

また、心筋細胞が分泌する cardiotrophin-1 (CT-1) は IL-6 と同様に GP130/JAK 複合体を介して心筋細胞内にシグナルを伝えオートクライン (自己分泌) システムを形成し、心筋保護作用を示す¹³⁾。心筋障害においてはこれら多数のシステムが IL-6 軸を中心に同時発動することで、

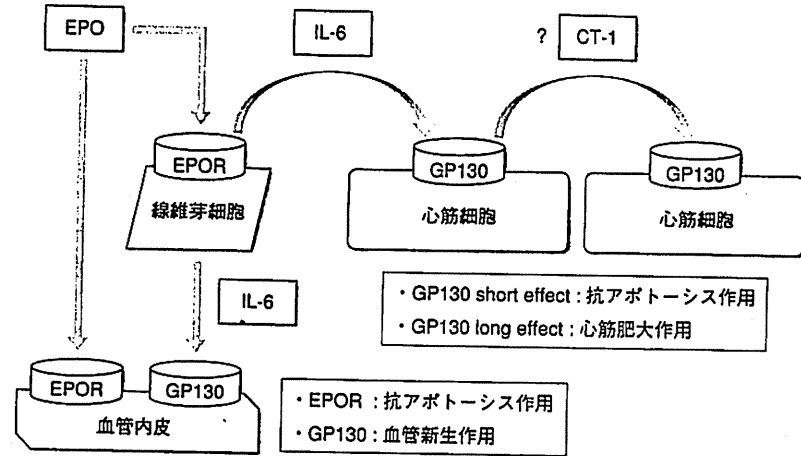


図3 EPOの直接作用と間接作用

血管内皮はEPORを発現し、EPOは抗アポトーシス効果を示す。虚血心では線維芽細胞におけるEPOR発現増強がみられるが、心筋細胞自体にはEPORは発現しない。EPOの*in vivo*投与による効果は血管保護・血管新生および心筋保護である。EPOの心筋への効果はEPORではなく、GP130の細胞内シグナルと一致する。IL-6およびCT-1は、いずれも心筋細胞に発現しているGP130のリガンドである。IL-6は非心筋細胞が分泌し、CT-1は心筋細胞・非心筋細胞のいずれも分泌する。
CT-1 : cardiotrophin-1

心筋保護と障害からの復旧を行っている。これらを総合すると、EPORを発現していない心筋細胞に対するEPOの作用は心筋のGP130を介した間接効果である可能性が高い。EPOの心筋保護作用が実際にどのサイトカインを介した作用なのか、ノックアウトマウスなどを用いて検証する必要がある(図3)。

4

EPOの各種誘導体

天然体に近いEPO誘導体およびHematideなどのEPORに作用するミミック小ペプチドなどを合わせてESA(erythropoiesis-stimulating agents)と総称する。天然体EPOのCHO由来リコンビナント製剤にはエポエチンアルファとエポエチンベータがあり、いずれも3つのN-型糖鎖と1つのO-型糖鎖を有するアミノ酸数165個の糖タンパクである。大腸菌由来のEPOは糖鎖を欠き、生物活性をもたない。EPO投与回数を減らすなどの目的で血中半減期を延長させたEPO誘導体には、ダルベポエチン(NESP)とPEG-EPOがある。NESPはEPOのペプチド配列にN-型糖鎖化配列を追加導入したものであり、PEG-EPOはポリエチレングリコール(PEG)を結合させたEPO製剤である。NESPはペプチド配列に変更を加えた場所がN-型糖鎖によって免疫系から認識されにくくなっているため、抗原性の変化が生じないと思われる。EPOとはペプチド配列に相同性のないアミノ酸14個からなる小ペプチド¹⁰⁾の2量体をPEG化したHematideもEPOと同じ活性を有し、またEPOと同じ抗原性を示す¹⁵⁾。Hematideを

はじめとする一連の EMP (EPO-mimetic peptides) は EPOR の構造・機能解析に寄与した¹⁶⁾。CEPO は既述のとおり、造血外臓器における EPOR の発見に貢献したが、抗原性に著しい変化が生じていることから、臨床応用は困難であると推測される。

AEPO は糖鎖末端にシアル酸を欠く EPO 糖タンパクである。ゴルジ体における EPO の糖鎖成熟の最終段階では、AEPO の糖鎖非還元末端のガラクトースが α (2, 3) シアル酸転移酵素の存在下にシアル酸を付加(シアル化)されて EPO に成熟する。また、成熟 EPO は脱シアル化しやすく、ガラクトースが露出した AEPO は肝臓のアシアロ糖タンパク受容体によってクリアランスされる。これは一般的な糖タンパク (glycoprotein ; GP) 活性物質の賞味期限設定のための仕組みであると考えられている。そのため AEPO は自然体 EPO の生理的誘導体でありながら、血中濃度が上昇せず造血活性を欠く。GP は一般に糖鎖末端がシアル酸で終止するため強く陰性に荷電する。

一方、組織外マトリックスの主成分であるヘパリン様物質などのグリコサミノグリカン (glycosaminoglycan ; GAG) は硫酸基による強い陰性荷電をもつため、GP のシアル酸と GAG は相互に反発し、GP は一般に組織親和性を欠く。これに対し AEPO は糖鎖末端のガラクトースが陽性に荷電しているため、意外に強い組織親和性を示し、パラクライン物質として好都合である。VEGF や FGF などの組織増殖因子はアルギニン/リシン (R/K) 繰り返し配列からなるヘパリン親和性モチーフによって GAG の硫酸基に結合し、分泌細胞を頂点とした組織親和性による濃度勾配を形成し、受容体をもつ細胞に増殖のための位置情報を提供する。ちなみに、エンドスタチンは強力な R/K リピートによって GAG の硫酸基を占拠し、VEGF などの濃度勾配を拡散均等化することで新生血管の侵入を阻止する。ヘパリンカラムを用いて測定した組織親和性の強度は VEGF > AEPO > EPO = 0 であった。このため、AEPO の組織濃度は高く維持され、EPO より格段に強い *in vivo* 血管新生作用および心筋保護作用を示す。多血症による副作用を誘発しないこと、生理的 EPO 誘導体であり抗体ができにくいことも AEPO の利点である。なお、CEPO は EPO と糖鎖構造が同じであり、したがって、組織親和性をもたない。

われわれは AEPO (特許第 4200509 号) のほかにヘパリン親和性 EPO : HEPO (特願 2008-323611 号) を開発した。HEPO は EPO の C 末端に胎盤増殖因子 (PLGF) のヘパリン親和性モチーフを導入したキメラ糖タンパクで、AEPO とは逆に血管新生抑制効果を示すことから、腫瘍性血管新生を誘導しない半減期の長い EPO 製剤として利用できる可能性がある。これは HEPO が VEGF よりも強いヘパリン親和性を有し、GAG のスルホ基を占拠するためと推測される。

5

EPO の心・血管系への臨床応用

EPO の *in vivo* での血管新生作用は不十分であり、慢性重症下肢虚血患者を EPO 単独投与で治療することは困難である¹⁷⁾。BMI による血管新生作用には移植した骨髄中に含まれている赤芽球が決定的な役割を果たしているが¹⁷⁾、患者から採取した比較的少量の骨髄幹細胞を EPO などのサイトカインを組み合わせて体外で増幅培養し、得られた大量の自己未分化赤芽

球を虚血下肢に移植すると強力な血管新生が誘導できる。われわれの施設で臨床応用を開始し、最重症型の下肢虚血患者にも有効であることを示した¹⁰⁾。

動物モデルを用いたAMIに対してEPO投与が有効であるという報告がいくつかあるが、その作用機序は、①急性虚血による心筋障害からの保護作用¹⁹⁾、②同じく冠血管の保護作用、③その後の血管新生作用²⁰⁾と、④リモデリングの抑制²¹⁾が挙げられる。これらの先行する前臨床研究の結果を踏まえ、われわれはAMI患者に対するEPO投与のパイロット臨床試験を計画した。対象患者および主評価項目の選定も重要ではあるが、以下に述べる理由によってEPO投与量の設定が試験計画において最重要な課題と考えられた。

慢性腎不全患者で、目標ヘモグロビン値を12 g/dL以上と高く設定してESAを投与した場合に、死亡や心血管イベントの増加が報告されたこと、また、放射線療法を受けていた頭頸部癌の患者において腫瘍の急速な増大が報告されたことを受け、2007年に米国食品医薬品局(FDA)から添付文書への枠組み警告(boxed warning)が追記された。EPOの過剰投与による心血管イベント増加の機序はいくつか考えられるが、最重要なものはEPOのトロンボポエチン(thrombopoietin; TPO)様活性であろう。TPOは前駆細胞から成熟血小板に発現しているTPO受容体(TPO receptor; TPOR)に作用し、血小板造血の亢進と成熟血小板のプライミング効果を示す。プライミングされた血小板は内皮障害局所において凝集能が亢進する。EPOとTPO、EPORとTPORは構造・作用ともにきわめて近縁であり、透析患者ではEPO投与によると思われる血小板増多が観察され、血小板機能亢進と心血管イベント増加の関連が指摘されている²²⁾。日常診療でも鉄欠乏性貧血のある若い女性では、高EPO血症による血小板増多がしばしば観察される。

われわれの臨床研究開始前後に欧州でも脳血管障害および心筋梗塞に対するEPO投与の臨床研究が開始された。脳卒中患者に対するrecombinant human erythropoietin(rhEPO)製剤(およそ0.2 IU/ng)の33,000 IU×3日間連日投与は安全かつ有効であった²³⁾。一方、経皮的冠動脈インターベンション(percutaneous coronary intervention; PCI)成功例のAMI患者に対するNESP 300 mg×1回投与では有効性が証明されず²⁴⁾、rhEPO 60,000 IU×1回投与を行うHEBE-III trialは現在進行中である²⁵⁾。PCI直後・24時間後・48時間後の3回それぞれに33,000 IUのrhEPOを投与したREVIVAL-3 studyでも有効性は確認されず、むしろEPO投与群での脳・心血管イベントの増加が懸念された²⁶⁾。

図1に示すとおり、急性虚血心でEPORの発現が増強する期間は短い。これらに対し、われわれは血小板プライミング効果および多血症誘発によるEPOの副作用を懸念し、EPOの大量投与あるいは複数回投与は行わないこととし、腎性貧血治療に使用されている12,000 IUをPCI直後に単回投与するEPO/AMI-Iパイロット研究を実施した。評価は急性期および慢性期(6カ月後)の^{99m}Tc-MIBI SPECTの比較で行った。左室機能に影響の強いLAD1枝病変患者でEPO投与によりLVEFが急性期 37.5 ± 13.0 から慢性期 52.7 ± 15.8 へ著明に改善したが($p < 0.01$)、Bull's eye imageによる心筋梗塞サイズ(%)には有意な変化が見られなかった²⁷⁾。

そこでSPECTの連続した短軸画像から3D再構築によりリアルな心筋梗塞容積(mL)を計算

する CardioVol software を開発し再評価した²⁰⁾。プラセボ投与群では心筋梗塞容積に変化がなかったが、EPO 投与群では急性期 $44.7 \pm 33.4 \text{ cm}^3$ から慢性期 $30.8 \pm 29.7 \text{ cm}^3$ に縮小していた ($p < 0.01$)。AMI 患者の PCI 治療に対する補助療法としての EPO の投与量は標準的な量で十分であることと、EPO 投与によって心筋梗塞容積の縮小と左室機能の改善がみられることが示された。

AEPO は血中濃度が上昇しないため血小板プライミングや多血症を誘発せず、組織親和性が強く *in vivo* の心血管活性が EPO の数倍ある。こうした面から AEPO の臨床開発が進めば、さらに心血管系への応用の期待が高まる。

References

- 1) Miura O, Nakamura N, Quelle FW, et al : Erythropoietin induces association of the JAK2 protein tyrosine kinase with the erythropoietin receptor *in vivo*. *Blood* 1994 ; 84 : 1501-1507.
- 2) Socolovsky M, Fallon AE, Wang S, et al : Fetal anemia and apoptosis of red cell progenitors in Stat5a^{-/-}5b^{-/-} mice : a direct role for Stat5 in Bcl-X(L) induction. *Cell* 1999 ; 98 : 181-191.
- 3) Heinrich PC, Behrmann I, Müller-Newen G, et al : Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem J* 1998 ; 334 : 297-314.
- 4) Brines M, Grasso G, Fiordaliso F, et al : Erythropoietin mediates tissue protection through an erythropoietin and common beta-subunit heteroreceptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004 ; 101 : 14907-14912.
- 5) Wu H, Lee SH, Gao J, et al : Inactivation of erythropoietin leads to defects in cardiac morphogenesis. *Development* 1999 ; 126 : 3597-3605.
- 6) Stuckmann I, Evans S, Lassar AB : Erythropoietin and retinoic acid, secreted from the epicardium, are required for cardiac myocyte proliferation. *Dev Biol* 2003 ; 255 : 334-349.
- 7) Wright GL, Hanlon P, Amin K, et al : Erythropoietin receptor expression in adult rat cardiomyocytes is associated with an acute cardioprotective effect for recombinant erythropoietin during ischemia-reperfusion injury. *FASEB J* 2004 ; 18 : 1031-1033.
- 8) Obara N, Suzuki N, Kim K, et al : Repression via the GATA box is essential for tissue-specific erythropoietin gene expression. *Blood* 2008 ; 111 : 5223-5232.
- 9) Parsa CJ, Kim J, Riel RU, et al : Cardioprotective effects of erythropoietin in the reperfused ischemic heart : a potential role for cardiac fibroblasts. *J Biol Chem* 2004 ; 279 : 20655-20662.
- 10) Tada H, Kagaya Y, Takeda M, et al : Endogenous erythropoietin system in non-hematopoietic lineage cells plays a protective role in myocardial ischemia/reperfusion. *Cardiovasc Res* 2006 ; 71 : 466-477.
- 11) Isoda M, Hanawa H, Watanabe R, et al : Expression of the peptide hormone hepcidin increases in cardiomyocytes under myocarditis and myocardial infarction. *J Nutr Biochem* 2010 ; 21 : 749-756.
- 12) Suzuki H, Toba K, Kato K, et al : Serum hepcidin-20 is elevated during the acute phase of myocardial infarction. *Tohoku J Exp Med* 2009 ; 218 : 93-98.
- 13) Calabrò P, Limongelli G, Riegler L, et al : Novel insights into the role of cardiotrophin-1 in cardiovascular diseases. *J Mol Cell Cardiol* 2009 ; 46 : 142-148.
- 14) Wrighton NC, Farrell FX, Chang R, et al : Small peptides as potent mimetics of the protein hormone erythropoietin. *Science* 1996 ; 273 : 458-464.
- 15) Stead RB, Lambert J, Wessels D, et al : Evaluation of the safety and pharmacodynamics of Hematide, a novel erythropoietic agent, in a phase 1, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation study in healthy volunteers. *Blood* 2006 ; 108 : 1830-1834.
- 16) Livnah O, Stura EA, Middleton SA, et al : Crystallographic evidence for preformed dimers of erythropoietin receptor before ligand activation. *Science* 1999 ; 283 : 987-990.
- 17) Ozawa T, Toba K, Kato K, et al : Erythroid cells play essential roles in angiogenesis by bone marrow cell

- implantation. *J Mol Cell Cardiol* 2006 ; 40 : 629-638.
- 18) Oda M, Toba K, Ozawa T, et al : Establishment of culturing system for ex-vivo expansion of angiogenic immature erythroid cells, and its application for treatment of patients with chronic severe lower limb ischemia. *J Mol Cell Cardiol* 2010 ; 49 : 347-353.
 - 19) Bogoyevitch MA : An update on the cardiac effects of erythropoietin cardioprotection by erythropoietin and the lessons learnt from studies in neuroprotection. *Cardiovasc Res* 63 : 208-216, 2004
 - 20) Hirata A, Minamino T, Asanuma H, et al : Erythropoietin enhances neovascularization of ischemic myocardium and improves left ventricular dysfunction after myocardial infarction in dogs. *J Am Coll Cardiol* 2006 ; 48 : 176-184.
 - 21) Schneider C, Jaquet K, Malisius R, et al : Attenuation of cardiac remodelling by endocardial injection of erythropoietin : ultrasonic strain-rate imaging in a model of hibernating myocardium. *Eur Heart J* 2007 ; 28 : 499-509.
 - 22) Vaziri ND : Thrombocytosis in EPO-treated dialysis patients may be mediated by EPO rather than iron deficiency. *Am J Kidney Dis* 2009 ; 53 : 733-736.
 - 23) Ehrenreich H, Hasselblatt M, Dembowski C, et al : Erythropoietin therapy for acute stroke is both safe and beneficial. *Mol Med* 2002 ; 8 : 495-505.
 - 24) Lipsic E, van der Meer P, Voors AA, et al : A single bolus of a long-acting erythropoietin analogue darbepoetin alfa in patients with acute myocardial infarction : a randomized feasibility and safety study. *Cardiovasc Drugs Ther* 2006 ; 20 : 135-141.
 - 25) Belonje AM, Voors AA, van Gilst WH, et al : Effects of erythropoietin after an acute myocardial infarction : rationale and study design of a prospective, randomized, clinical trial (HEBE III). *Am Heart J* 2008 ; 155 : 817-822.
 - 26) Cleland JG, Coletta AP, Clark AL, et al : Clinical trials update from the American College of Cardiology 2009 : ADMIRE-HF, PRIMA, STICH, REVERSE, IRIS, partial ventricular support, FIX-HF-5, vagal stimulation, REVIVAL-3, pre-RELAX-AHF, ACTIVE-A, HF-ACTION, JUPITER, AURORA, and OMEGA. *Eur J Heart Fail* 2009 ; 11 : 622-630.
 - 27) Ozawa T, Toba K, Suzuki H, et al : Single-dose intravenous administration of recombinant human erythropoietin is a promising treatment for patients with acute myocardial infarction - randomized controlled pilot trial of EPO/AMI-1 study -. *Circ J* 2010 ; 74 : 1415-1423.
 - 28) Yoshimura N, Toba K, Ozawa T, et al : A Novel Program to Accurately Quantify Infarction Volume by (99m) Tc MIBI SPECT, and Its Application for Re-Analyzing the Effect of Erythropoietin Administration in Patients With Acute Myocardial Infarction. *Circ J* 2010 ; 74 : 2741-2743.

日本臨牀 69 卷 増刊号 7 (2011 年 9 月 20 日発行) 別刷

冠動脈疾患 上

—診断と治療の進歩—

VI. 冠動脈疾患における血管新生・心筋再生療法

心筋再生療法

エリスロポエチンを用いた心血管疾患の治療

鳥羽 健 小澤拓也 加藤公則

VI. 冠動脈疾患における血管新生・心筋再生療法

心筋再生療法

エリスロポエチンを用いた心血管疾患の治療

Application of erythropoietin to cardiovascular diseases

鳥羽 健 小澤拓也 加藤公則

Key words : 血管新生, エリスロポエチン, 下肢虚血, 心筋梗塞

はじめに

そもそも心血管系は血液の輸送機関であり、循環器と血球は密接に関連しつつ発生する。尾索動物の段階で赤血球とともに毛細血管が系統発生し、開放循環系から閉鎖循環系に進化した。脊椎動物の成体型造血幹細胞は大動脈・生殖器・腎臓を形成するAGM領域で血球と血管内皮細胞の共通前駆細胞へマンジオブラストから発生する。単心室の魚類は全身酸素濃度のモニターに都合の良い心臓でエリスロポエチン(EPO)を分泌する。脊椎動物では造血のみならず心臓の発生においてもEPO/EPO受容体(EPOR)システムは必須であり¹⁾、胎児期における心筋細胞の増殖には心外膜から分泌されるEPOとレチノイン酸が必要である²⁾。血管内皮にEPORが発現していることは間違いないが、EPOの心臓に対する作用はEPOR陽性の線維芽細胞を介した間接作用である可能性がある³⁾。

1. エリスロポエチンの構造

EPOは熊本大学の宮家が純化精製に成功した赤血球造血ホルモンで⁴⁾、腎性貧血治療薬として20年の歴史をもつ。EPORはG-CSF受容体やIL-6受容体と同様にType-Iサイトカン受容体家系に属し、成長ホルモン受容体を分子進

化上のテンプレートとする。したがって、細胞内シグナルの基本はJAK/STAT系のリン酸化を利用するが、陽性シグナルは活性化したSHP-1によるJAKの脱リン酸化によって一過性で終息する。サイトカインとその受容体の多様性獲得に伴ってJAKおよびSTATも多様化し、細胞外情報を細胞内シグナルに翻訳する過程が複雑化した。Type-Iサイトカン受容体はtype-1~5の5群に分類される。

同じtypeに属する受容体同士は、細胞外ドメインも細胞内ドメインも類似した分子構造をもち、原則として同じ細胞内シグナル伝達系を利用するため作用が類似する。例えば成長ホルモン受容体とともにtype-1に属するEPORやトロポポエチン(TPO)受容体はJAK2/STAT5/MGFボックス配列を利用して転写制御を行い、type-2に属するIL-6受容体のGP130はJAK1/STAT3/APRE配列を用いる。骨髄系造血前駆細胞はTPO受容体とIL-6受容体を同時に発現しているが、異なるJAK/STAT系を利用することで細胞内情報伝達の混乱を避けていると考えられる。実際に、EPOは骨髄系造血前駆細胞の細胞株UT-7に生存因子として作用するのに対し、IL-6は増殖作用のみを示し生存はさせない⁵⁾。ちなみにEPOとTPOの作用は類似しており、EPOには血小板増加・活性化作用があ

VI

Ken Toba, Takuya Ozawa, Kiminori Kato: First Department of Internal Medicine, Niigata University Medical and Dental Hospital 新潟大学医歯学総合病院 第1内科

0047-1852/11/¥60/頁/JCOPY

るため、高リスク患者へのEPO投与においては脳心血管イベントの合併に注意を払う必要が生じる。

EPOは165アミノ酸残基に1つのO-型糖鎖と3つのN-型糖鎖が結合した糖タンパクで、4本の α -ヘリックスが2往復しN末端とC末端がS-S結合して閉じたラグビーボール様の形態をとる。小胞体でのポリペプチド伸長中に付加された糖鎖はゴルジ体で複雑な構造変化を受けた後、非還元末端のガラクトースにシアル酸が付加(シアル酸キャッピング)されて成熟する。分泌されたEPOのシアル酸は時間経過とともに自然に脱落し、脱シアル化したEPOは肝臓のガラクトース受容体によって除去される。したがってアシアロEPO(AEPO)は血中濃度が上昇せず造血活性を欠く。腎臓以外の臓器でEPOを産生している細胞が $\alpha(2,3)$ シアル酸転移酵素を発現していなければ、最初からAEPOを分泌する可能性がある。EPOは組織親和性をもたないためエンドクリンに適しているが、AEPOは組織親和性をもつためパラクリンに適していると推測される。

2. エリスロポエチンの造血以外の作用

血液脳関門によりエンドクリンから独立した独自の情報伝達系をもつ中枢神経系内部ではガラクトース受容体による不活性化がなく、アシアロ糖タンパクが細胞間情報伝達に重要な役割を果たしているとされている。EPO/EPORシステムの造血以外の作用が中枢神経系および心血管系で明らかとなってきた。脳の星状細胞や神経細胞は低酸素・虚血ストレスに反応してEPOを分泌し、EPORを発現している中枢神経系を各種のストレスから保護する⁹⁾。また全身性に投与されたrhEPOは脳毛細血管内皮のEPORを介して中枢神経系に到達し、神経保護作用を発揮する。心血管系においてもEPO/EPORパラクリンシステムが存在し、外因性のrhEPOが心筋を虚血・再循環障害から保護することはよく知られているが⁷⁾、心筋細胞と線維芽細胞をきれいに分離することは困難であり、細胞種を特定したうえでのEPOを介したクロ

ストークの厳密な証明はなされていない。

赤血球系細胞に発現しているEPO受容体はEPORのホモ2量体である。これに対し、EPOポリペプチドのリシン残基をカルバミル化した人工EPO誘導體であるカルバミルEPO(CEPO)を用いた研究で、脳・心臓およびその他の臓器にEPOR/ β cヘテロ2量体が発現していることが示された⁹⁾。CEPOはEPORホモ2量体と結合せず造血能を欠くが、脳や心臓の虚血モデルに対してCEPO投与は臓器保護作用を示し、また β cノックアウトマウスでは造血が正常であるがCEPO投与による脳・心臓保護作用が消失した。 β cはGM-CSF・IL-3・IL-5の受容体共通 β 鎖(cytokine receptor common β -chain)である。 β cの細胞内シグナルはEPORと同様STAT5が中心となる。心臓からEPOR/ β cヘテロ2量体が検出されたが、血管内皮はCEPOに反応せずEPORホモ2量体が発現していると思われるので、線維芽細胞がEPOR/ β cヘテロ2量体を発現している可能性がある。

EPORの細胞内シグナル伝達系はJAK/STAT系のほかにPI3K/Akt系およびRas/MAPK系を介することが知られているが、家兎を用いた冠動脈虚血再循環モデルでEPO投与がこれら3つの細胞内伝達系を介して心筋保護的に作用することが示された⁹⁾。その後ラットやマウスを用いた種々の動物モデルでEPOの心筋保護作用が追試されたが、EPO投与により心臓ではSTAT3とSTAT5の両者のリン酸化が観察される¹⁰⁾。大型動物を用いた冠動脈虚血再循環モデルでもEPOの心筋保護作用が観察されたが、EPO投与による血管保護・血管新生が重要な役割を担うことが示されている¹¹⁾。*in vitro*で線維芽細胞と血管内皮を共培養して毛細血管の新生を再現すると、EPOによる血管新生作用が観察されるが、線維芽細胞は恒常的にIL-6を分泌しており、この内因性IL-6を抗体で中和するとEPOの血管新生作用が消失することから、EPOによる血管新生には低濃度の内因性IL-6の存在が必要であることがわかる(図1)。体内で線維芽細胞が存在しない組織はまれであり、したがってEPOの作用は直接作用なのか内因

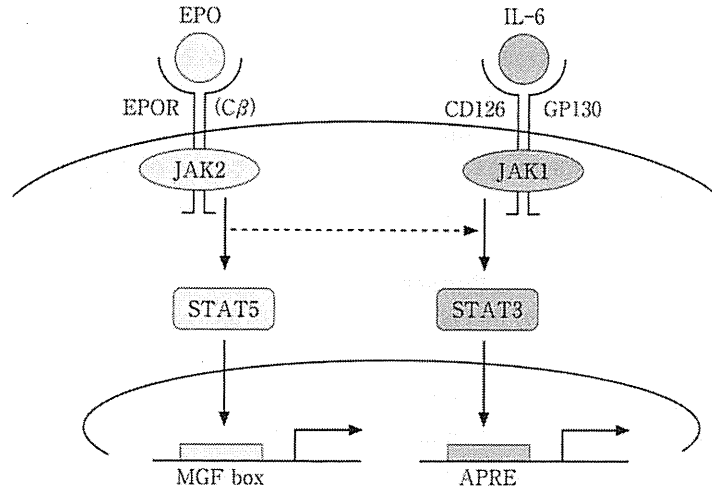


図1 EPOとIL-6の関連

EPORの細胞内ドメインの8つのチロシン残基がJAK2によってリン酸化される。これらのうち426YはSTAT5との結合に重要で、細胞膜に一番近い368YがSTAT5と相互作用・活性化する。454YはITIMの成分でSHP-1を介してJAK2の脱リン酸化にかかわる。一方456YはSTAT3の活性化に必須とされるが、EPOによるSTAT3のリン酸化には内因性IL-6の存在が必要である可能性がある。

性IL-6に依存した作用なのか判断が難しい。

3. エリスロポエチンの臨床応用

EPOの心血管系疾患への応用として、血栓性微小血管障害などに対する血管内皮保護治療、ASOやバージャー病などの慢性下肢虚血患者に対する血管新生療法、急性心筋梗塞患者に対する心筋保護治療、腎不全などが原因で起こる慢性心不全の治療などが考えられる。モノクロータリン誘発による実験的肺高血圧症モデルでEPOの投与が有効であった。経静脈的にEPOを投与したときの血管内皮保護作用は内皮がさらされている血中のEPO濃度に依存するため、AEPOは無効である。またCEPOが無効であることから、内皮はEPORホモ2量体を発現していることが推測される。

EPOの腫瘍血管新生作用やEPOR陽性腫瘍に対する増殖促進作用の有無についての議論が盛んであるが、結論は出ていない¹²⁾。とはいえ、EPOそれ自体の血管新生作用はVEGFやIL-6に比しはるかに微弱である¹³⁾。EPOの糖鎖末端のシアル酸はカルボキシル基が陰性に荷電し組織外マトリックスとの親和性を欠くが、AEPO

の糖鎖末端のガラクトースは生体内で陽性荷電を有し組織外マトリックスの主成分であるグリコサミノグリカンの硫酸基と相互作用するため組織親和性を示し、強い血管新生作用を有する(特許第4200509号)。AEPOのパラクリンホルモンとしての生理的な意義を暗示している可能性がある。慢性下肢虚血患者に対するVEGFのnaked plasmid投与臨床試験では十分な有効性が得られず、現段階では骨髓単核細胞移植治療や末梢血単核細胞移植治療などの細胞療法が盛んに行われているが、AEPOを用いることで低侵襲の血管新生治療が実現可能である。血管新生治療の意外なオプションとして、患者から採取した比較的少量の造血幹細胞・前駆細胞を、EPOを含むサイトカインカクテルを用いて体外増幅培養し、得られた未熟赤芽球をEPOとともに患者の虚血下肢に移植する方法がある¹⁴⁾。まだ実施症例数は少ないが、いまのところ重症例に対しても有効かつ安全に行われている。

前述のとおり、齧歯類や大型動物の虚血再循環を用いたモデルなどでEPOの心筋保護作用が認められたが^{7,9)}、障害組織でEPOが示す血管新生作用が大きな役割を果たしているようであ

VI

冠動脈疾患における血管新生・心筋再生療法

る^{10,11)}。これらの中で興味深いことは、貧血を合併した腎不全モデル動物で AEPO が EPO と同等の慢性期心不全改善効果を示していることである。貧血の改善なしに慢性心不全を改善したこと、血中濃度の上昇しない AEPO でも十分な心臓組織内濃度が得られていた可能性があることが特筆に値する。

EPO の心筋梗塞急性期に対する臨床試験が行われている。いずれも STEMI の PCI 成功後に投与されているが、ミュンヘンのグループによる REVIVAL-III 試験では 33,300 国際単位 of 3 日間連日投与 (計約 10 万単位) を行い、MRI による心筋梗塞サイズの有意な縮小を認めていない。オランダの HEBE-III 試験では 6 万単位の 1 回投与を行い、6 週間後の Tc-シンチでの EF

の有意な改善はなかったものの、EPO 投与群で心血管イベントの有意な減少と NT-proBNP の低下を観察している。我が国の EPO/AMI-I 試験では 12,000 単位の 1 回投与を行い、6 カ月後の Tc-シンチでの心筋梗塞の縮小と EF の改善が観察され、また同じく我が国の EPOC-AMI 試験では 6,000 単位の 3 日間連日投与 (計 1.8 万単位) を行い、やはり Tc-シンチでの EF の改善を報告している。EPO には至適投与量があって高用量 EPO が必ずしも有効ではないのか、それとも比較する時期や指標の問題なのか不明であるが、ラットの虚血再環流治療モデルでは EPO には至適投与量が存在することが示されている¹⁵⁾。我が国では多施設二重盲検臨床試験 EPO/AMI-II がまもなく開始される。

圖文 献

- 1) Wu H, et al: Inactivation of erythropoietin leads to defects in cardiac morphogenesis. *Development* 126: 3597-3605, 1999.
- 2) Stuckmann I, et al: Erythropoietin and retinoic acid, secreted from the epicardium, are required for cardiac myocyte proliferation. *Dev Biol* 255: 334-349, 2003.
- 3) Parsa CJ, et al: Cardioprotective effects of erythropoietin in the reperfused ischemic heart: a potential role for cardiac fibroblasts. *J Biol Chem* 279: 20655-20662, 2004.
- 4) Miyake T, et al: Purification of human erythropoietin. *J Biol Chem* 252: 5558-5564, 1977.
- 5) Komatsu N, et al: Establishment and characterization of a human leukemic cell line with megakaryocytic features: dependency on granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, interleukin 3, or erythropoietin for growth and survival. *Cancer Res* 51: 341-348, 1991.
- 6) Cerami A: Beyond erythropoiesis: novel applications for recombinant human erythropoietin. *Semin Hematol* 38(3 Suppl 7): 33-39, 2001.
- 7) Bogoyevitch MA: An update on the cardiac effects of erythropoietin cardioprotection by erythropoietin and the lessons learnt from studies in neuroprotection. *Cardiovasc Res* 63: 208-216, 2004.
- 8) Brines M, et al: Erythropoietin mediates tissue protection through an erythropoietin and common beta-subunit heteroreceptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 14907-14912, 2004.
- 9) Parsa CJ, et al: A novel protective effect of erythropoietin in the infarcted heart. *J Clin Invest* 112: 999-1007, 2003.
- 10) Ogino A, et al: Erythropoietin receptor signaling mitigates renal dysfunction-associated heart failure by mechanisms unrelated to relief of anemia. *J Am Coll Cardiol* 56: 1949-1958, 2010.
- 11) Hirata A, et al: Erythropoietin enhances neovascularization of ischemic myocardium and improves left ventricular dysfunction after myocardial infarction in dogs. *J Am Coll Cardiol* 48: 176-184, 2006.
- 12) Fandrey J, Dicato M: Examining the involvement of erythropoiesis-stimulating agents in tumor proliferation (erythropoietin receptors, receptor binding, signal transduction), angiogenesis, and venous thromboembolic events. *Oncologist* 14(Suppl 1): 34-42, 2009.
- 13) Ozawa T, et al: Erythroid cells play essential roles in angiogenesis by bone marrow cell implantation. *J Mol Cell Cardiol* 40: 629-638, 2006.
- 14) Oda M, et al: Establishment of culturing system for ex-vivo expansion of angiogenic immature erythroid cells, and its application for treatment of patients with chronic severe lower limb ischemia. *J Mol Cell Cardiol* 49: 347-353, 2010.
- 15) Baker JE, et al: Darbepoetin alfa protects the rat heart against infarction: dose-response, phase of action, and mechanisms. *J Cardiovasc Pharmacol* 49: 337-345, 2007.

Hypertension

American Heart
Association®



Learn and Live SM

JOURNAL OF THE AMERICAN HEART ASSOCIATION

Agonist-Independent Constitutive Activity of Angiotensin II Receptor Promotes Cardiac Remodeling in Mice

Noritaka Yasuda, Hiroshi Akazawa, Kaoru Ito, Ippei Shimizu, Yoko Kudo-Sakamoto, Chizuru Yabumoto, Masamichi Yano, Rie Yamamoto, Yukako Ozasa, Tohru Minamino, Atsuhiko T. Naito, Toru Oka, Ichiro Shiojima, Kouichi Tamura, Satoshi Umemura, Mona Nemer and Issei Komuro

Hypertension 2012, 59:627-633: originally published online January 30, 2012
doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.175208

Hypertension is published by the American Heart Association, 7272 Greenville Avenue, Dallas, TX 72514

Copyright © 2012 American Heart Association. All rights reserved. Print ISSN: 0194-911X. Online ISSN: 1524-4563

The online version of this article, along with updated information and services, is located on the World Wide Web at:

<http://hyper.ahajournals.org/content/59/3/627>

Data Supplement (unedited) at:

<http://hyper.ahajournals.org/content/suppl/2012/01/27/HYPERTENSIONAHA.111.175208.DC1.html>

Subscriptions: Information about subscribing to Hypertension is online at
<http://hyper.ahajournals.org//subscriptions/>

Permissions: Permissions & Rights Desk, Lippincott Williams & Wilkins, a division of Wolters Kluwer Health, 351 West Camden Street, Baltimore, MD 21202-2436. Phone: 410-528-4050. Fax: 410-528-8550. E-mail:
journalpermissions@lww.com

Reprints: Information about reprints can be found online at
<http://www.lww.com/reprints>