

血流イメージング

山本 徳則 後藤 百万

抄 録

腎・泌尿器科領域の各臓器血流測定を造影超音波検査を用いて微小循環の観点から述べる。超音波造影剤（Sonazoid®）は安定した剤型なので、長期間の腎・泌尿器科領域の各臓器の血流測定を可能にした。具体的に、腎機能評価、腫瘍質的診断そして前立腺肥大症の血流評価、前立腺癌の質的診断と広く応用されている。新しい腎機能評価、腎細胞癌の診断率向上そして新しい前立腺肥大症の評価、前立腺癌の診断率の向上に寄与することが期待される。

Measurements of blood flow by ultrasound for urologic organs

Tokunori YAMAMOTO, Momokazu GOTOH

Abstract

Since the second-generation ultrasound contrast agent Sonazoid® has a stable shell, it enables visualization of the urologic vasculature for a long period of time. We therefore evaluated changes in contrast-enhanced ultrasound (CEUS) imaging of urological organs. It is used for the diagnosis of renal function by enhancing small normal blood vessels. Also, pathological changes in blood vessels are diagnosed by enhancing abnormal vessels. Furthermore, it is applied to spread of renal function and prostatic function and is used for graft function and pharmacological evaluation, respectively. The blood-flow distribution and tumor itself in the case of renal and prostatic tumors are also enhanced. It is expected that effective use of the ultrasound contrast agent will increase the diagnostic rate of renal cell carcinoma and the positive rate of prostate biopsy and lessen the number of biopsy sites.

Jpn J Med Ultrasonics 2014; 41 (6): 811-818

Keywords

microcirculation, contrast-enhanced ultrasound, kidney, prostate, urology

1. はじめに

泌尿器科臓器は症状が出現し難い上部尿路（腎臓）と、一方症状が出現し易い下部尿路（前立腺）に分かれるが、ともに臓器血流は豊富である。診断装置の性能、造影剤の開発により、その臓器血流評価を行うことで、腫瘍の鑑別や機能評価を行うことが、近年臨床イメージングで行うことができるようになってきた。泌尿器科臓器は毛細血管レベルの微小循環で栄養されており、あらゆる疾患の原因またはその結果として深く関わっている。以前より、我々は、生体顕微鏡を世界に先駆けて開発し、泌尿器科疾患を毛細血管レベルの微小循環¹⁾を直接リアルタ

イムで赤血球をバイオマーカーとしてプラズマポケットを利用した、時空間画像処理法を考案しイメージングしてきた¹⁾。しかしながら、生体顕微鏡を用いる検査は臓器表面を直視下に微小循環にアクセスしなければならないために臨床で広く普及することは困難である。今回の目的は、泌尿器科臓器（腎臓、前立腺）血流の腫瘍イメージングと機能について、第一世代²⁾から第二世代に改良された造影超音波検査を用いた臨床研究について我々の取り組みを概説する。

2. 超音波造影剤の特徴

第一世代の造影剤である Levovist® を用いる場合、

名古屋大学医学系研究科泌尿器科

Department of Urology, Nagoya University Graduate School of Medicine, 65 Tsurumai Showa, Nagoya, Aichi 466-8550, Japan

Received on February 17, 2014; Accepted on June 4, 2014 J-STAGE. Advanced published. date: September 2, 2014

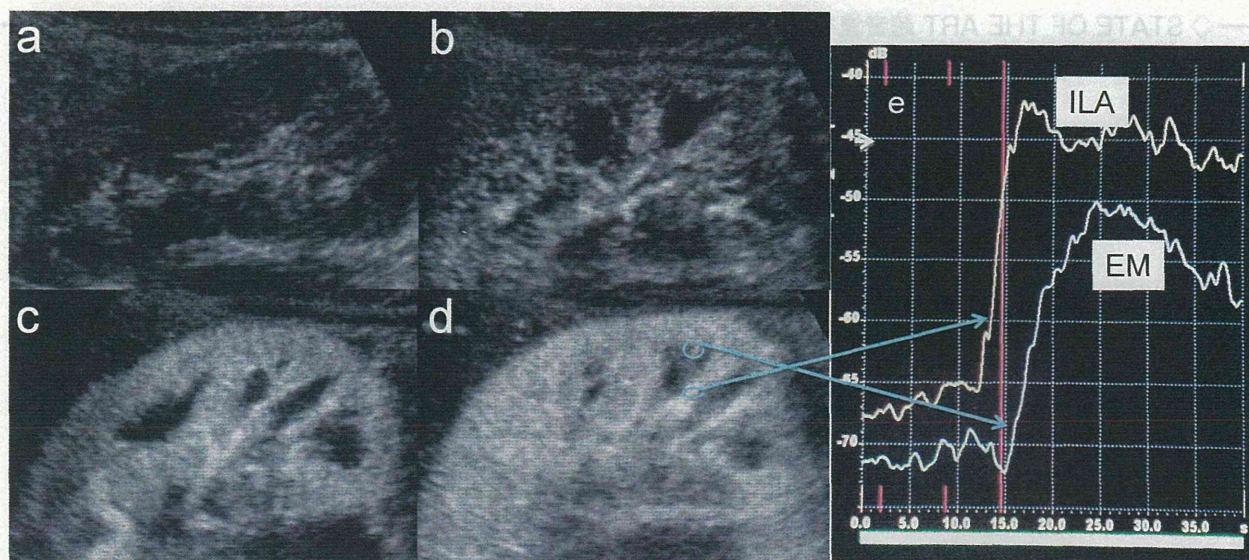


Fig. 1 正常腎機能を有する移植腎に対する造影超音波検査腎臓イメージングと時間-濃度曲線から算出する葉間動脈-髓質外層通過時間 (文献3から引用改変). **a** 造影前, **b** 造影早期, **c** 造影中期, **d** 造影ピーク, **e** 葉間動脈と髓質外層に関心領域を設定して, 葉間動脈-髓質外層通過時間を算出した. ILA: 葉間動脈, EM: 髓質外層

高い音圧の超音波で気泡が崩壊される時の信号を捉えることにより造影イメージングを得る. そのため, 造影剤の生体内での移動を経時的に観察するには, 新しい気泡が再流入してくるまで待って, 再び壊すという撮影タイミングの工夫が必要であった.

具体的には, 1) 造影効果の時間が短い, 2) 再現性に乏しい, 3) 注入に手間がかかる, 4) 音圧に弱く造影効果が弱い, の理由で, 泌尿器科臓器微小循環の微細な観察解析を行うには限界があった.

上記の欠点を改良した第二世代の造影剤 Sonazoid[®] が開発されたが, 日本での肝細胞癌の保険適応を得ているのみで, 泌尿器疾患を含めた他疾患での十分な検討ができていない. そこで本教室は名古屋大学医学部附属病院の倫理委員会の承認を得て, 泌尿器科臓器に対する超音波造影剤 Sonazoid[®] を延べ200症例以上行っている.

3. 超音波造影剤の造影効果の原理と血行動態

超音波造影剤による造影効果は, 1) エコー反射造影, 2) 共鳴によるハーモニック信号の発生, 3) 破壊による広帯域ドプラ信号の発生である. 今回は1, 2) の原理を利用して, 時間-濃度曲線から微小循環の評価を行った. また, 他の画像検査との比較では大きなシステムが必要な造影CT断層検査と比較して, 1) 造影剤が血管外にすること, 2) 時間分解能が高いこと, 3) 腎機能障害症例にも検査可能である.

前腕の経静脈的にボラスに注入された Sonazoid[®] は赤血球の約1/2の4 μ ほどの微気泡として心臓から肺を通過し, 大循環に入りそのうちの約20%は腎臓に流入する. この気泡血中濃度はグレースケール表示され, 1) 時間-濃度曲線として, 2) この気泡によって信号が増強されたカラー, パワーフローマッピングとの画像信号として表される.

今回我々は, 前者で腎実質または髓質に測定部位を設定して超音波造影剤の流入動態に着目し, 時間-濃度曲線を解析した. 第一世代超音波造影剤の Levovist[®] 静脈内ボラス注入では約30秒前後に最大輝度値を取るのに対して, 第二世代の造影剤の Sonazoid[®] では正常組織においては10.9 \pm 3.1秒で最大輝度値を取り徐々に減弱していく. この強い造影効果を利用して時間-濃度曲線を解析するために直後, 3分後そして5分後の画像を記録している.

4. 腎臓

4.1 移植腎グラフト機能

Benozzi Lらは移植腎グラフト機能を時間-濃度曲線とパルスドプラ波形から予測因子になることを報告している⁴⁾. 腎血流は中心の葉間動脈から糸球体の後抵抗細動脈としての輸出細動脈を通過して, 深部の末梢の髓質外層に流れている. 我々は, この血流の通過経路を応用し, その間に病変が生じると赤血球の通過時間が延長される仮説を立て移植腎グラフト機能評価の研究を行っている. 正常腎機能を

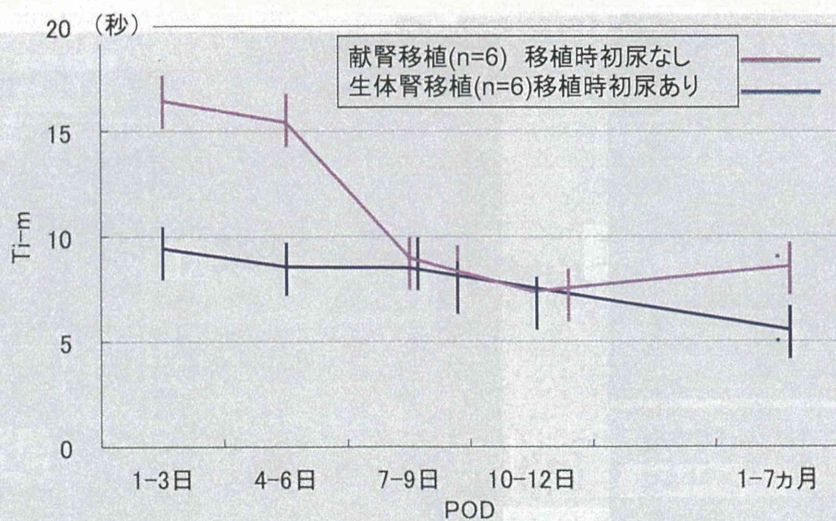


Fig. 2 生体腎移植と献体移植の葉間動脈-髓質外層通過時間の比較 (文献3から引用改変)

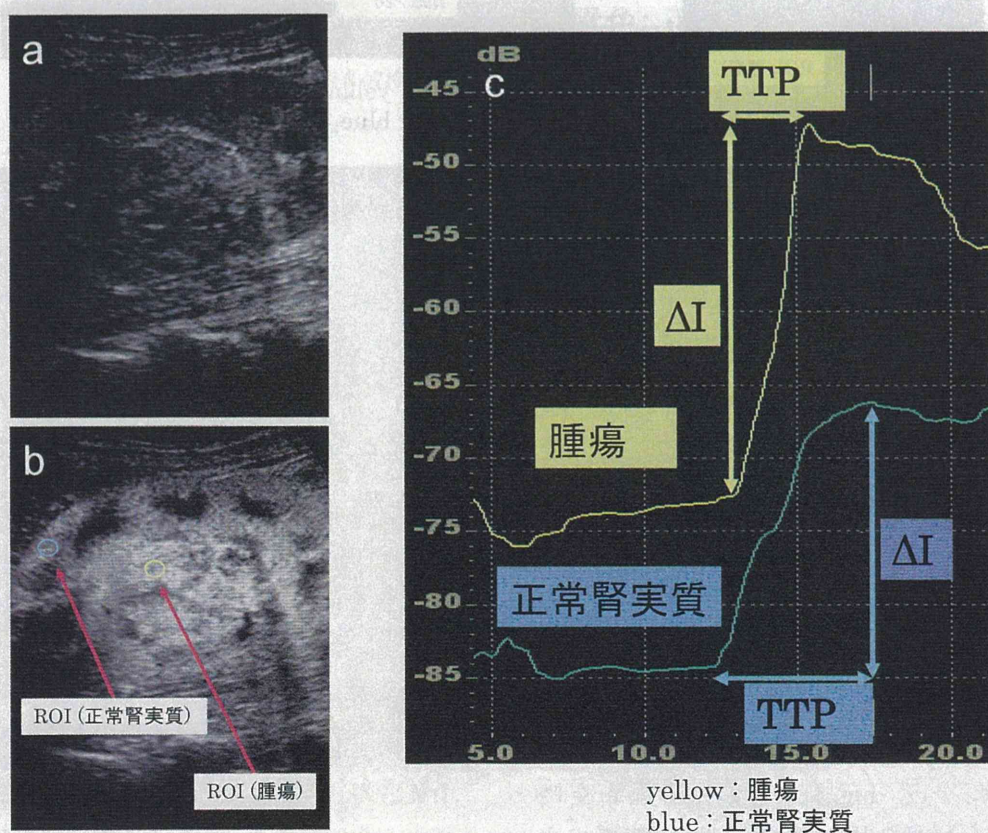


Fig. 3 腎細胞癌症例の造影超音波検査イメージと時間-濃度曲線 (文献5から引用改変) を示す. a 造影前, b 造影ピーク, c 正常組織と腫瘍の時間-濃度曲線

有する移植腎に対する造影超音波検査腎臓イメージングと時間-濃度曲線から算出する葉間動脈-髓質外層通過時間 (Fig. 1) を比較検討した. 生体腎移植症例 (n = 6) は全症例移植時初尿があり, 献腎移植症例は全症例無尿であった. 生体腎移植症例は全症例葉間-髓質外層通過時間が10秒以内であっ

たのに対して, 献腎移植症例の無尿の時期は10秒以上であった. 腎機能が回復する, すなわち初尿が出る10日目前後に10秒以内になっている (Fig. 2). すなわち, 移植腎グラフト機能が無尿期から予測するバイオマーカーとなる可能性を示唆した³⁾.

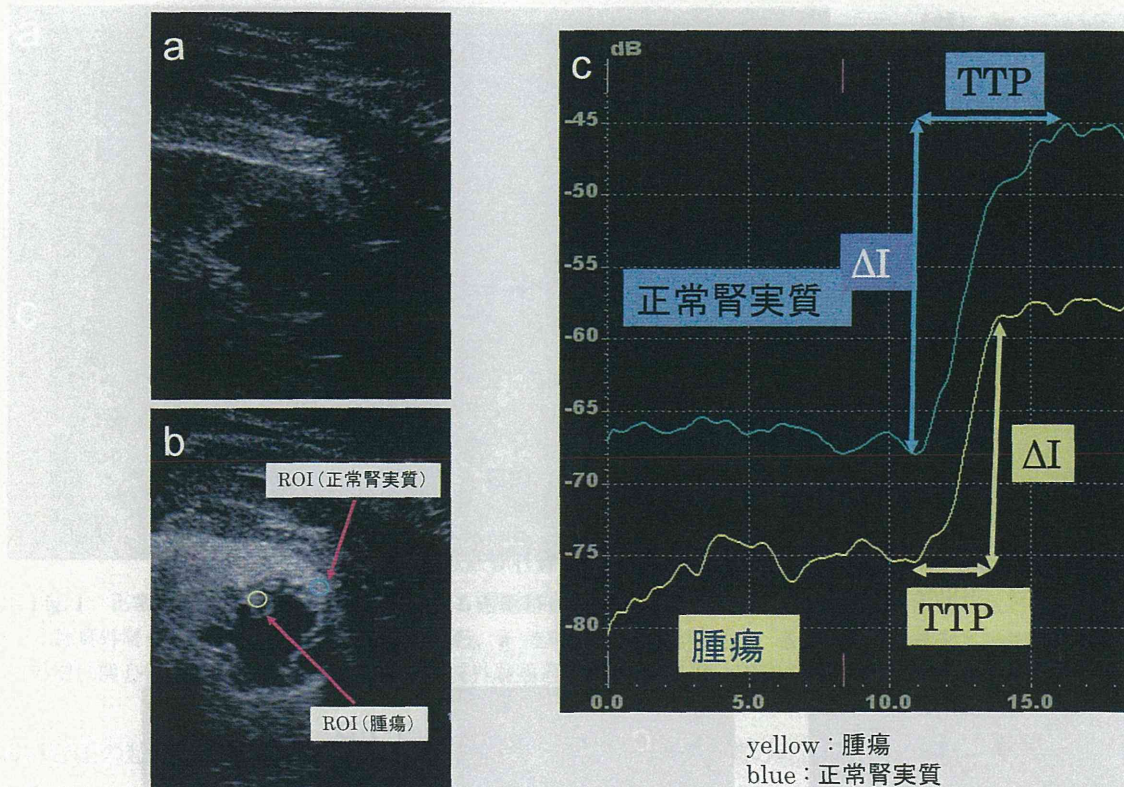


Fig. 4 腎細胞癌腫瘍症例の造影超音波検査イメージと時間-濃度曲線 (文献5から引用改変) を示す。a 造影前, b 造影ピーク, c 正常組織と腫瘍組織の時間-濃度曲線

4.2 腎細胞癌

腎嚢胞との鑑別については、造影超音波検査も有望である。近年、超音波検査装置の進歩に加え、造影剤を用いた検査法が導入され、腎病変の診断精度が向上している。Quaia Eらは40例の腎嚢胞性病変を単純超音波、造影超音波、造影CTを用いて評価した結果、複雑性腎嚢胞の評価では造影超音波検査が最も優れていたと報告している⁶⁾。

我々は、病理組織で確認された腎細胞癌、腎嚢胞性腺癌そして出血性嚢胞症例を対象に腎イメージングと時間-濃度曲線を腫瘍と正常組織で比較検討した。腎細胞癌症例 (Fig. 3)、腎嚢胞性腺癌症例 (Fig. 4) は、正常組織と比較して悪性腫瘍病変の造影剤のピークまでの時間が有意に早いことを明らかにした⁵⁾。一方、出血性嚢胞では造影効果が認められなかった (Fig. 5)。この特徴的な血流パターンは、腎細胞癌手術前の呼吸性の影響のない術中Sonazoid®造影超音波検査でコンシステントであることを確認している。

5. 前立腺

5.1 前立腺肥大症

前立腺血流については、臨床薬理効果 (phosphodiesterase-5: PDE-5 inhibitors) を時間-濃度曲線から算出した血流 (area under the curve: AUC) で評価することが報告されている⁷⁾。

我々は、前立腺肥大症 (中葉肥大) 症例に対するTRUS (経直腸的) 造影超音波検査とMRIの同時表示と経時的リアルタイムイメージングでCMA (プロスタール) 投与前後のAUCを比較した。前立腺中葉肥大の中心から、両側の腺腫、全体的に造影される。その造影イメージとMRIを同時画面にリアルタイムに表示されるハイブリッドイメージング技術を用いて行った⁸⁾ (Fig. 6)。前立腺肥大症の中葉肥大症例に対して、CMA血流を時間-濃度曲線の面積で比較した。IPSS、最大尿流速、残尿量は、投与12週、16週ともに投与開始前より改善を示した。前立腺容積はCMA投与12週で減少がみられ、16週で約23%減少していた。一方で、前立腺血流は、投与12週で約18%減少し、プラトーに達し、前立腺容積は投与継続でさらに縮小した (Fig. 7)。この

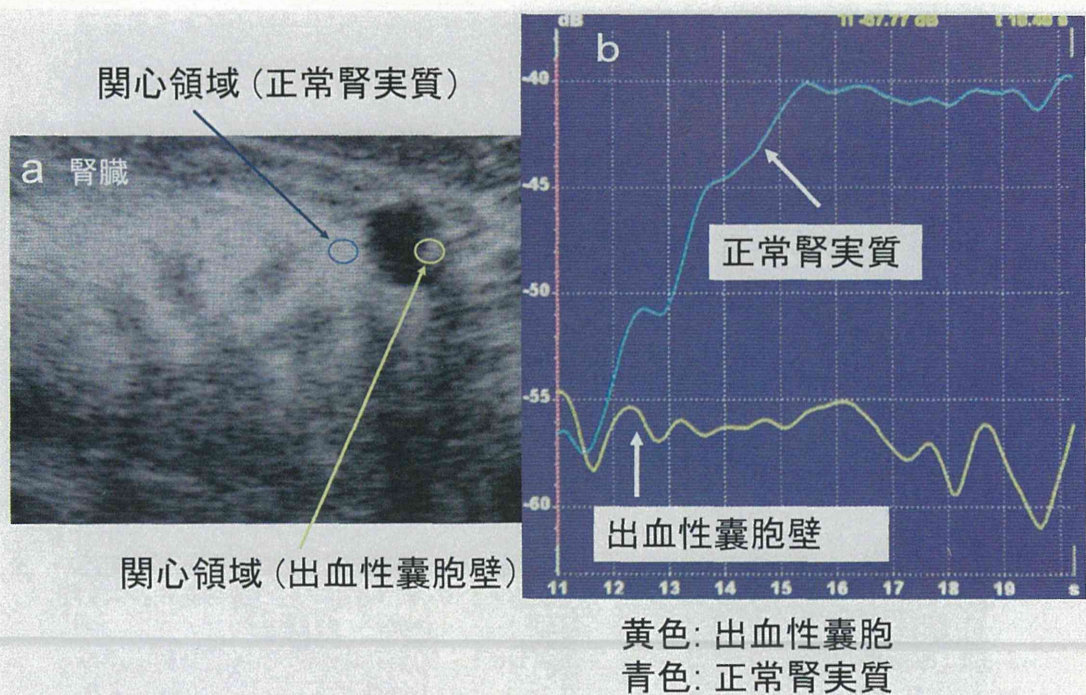


Fig. 5 出血性嚢胞の造影超音波検査イメージと時間-濃度曲線 (文献5から引用改変)

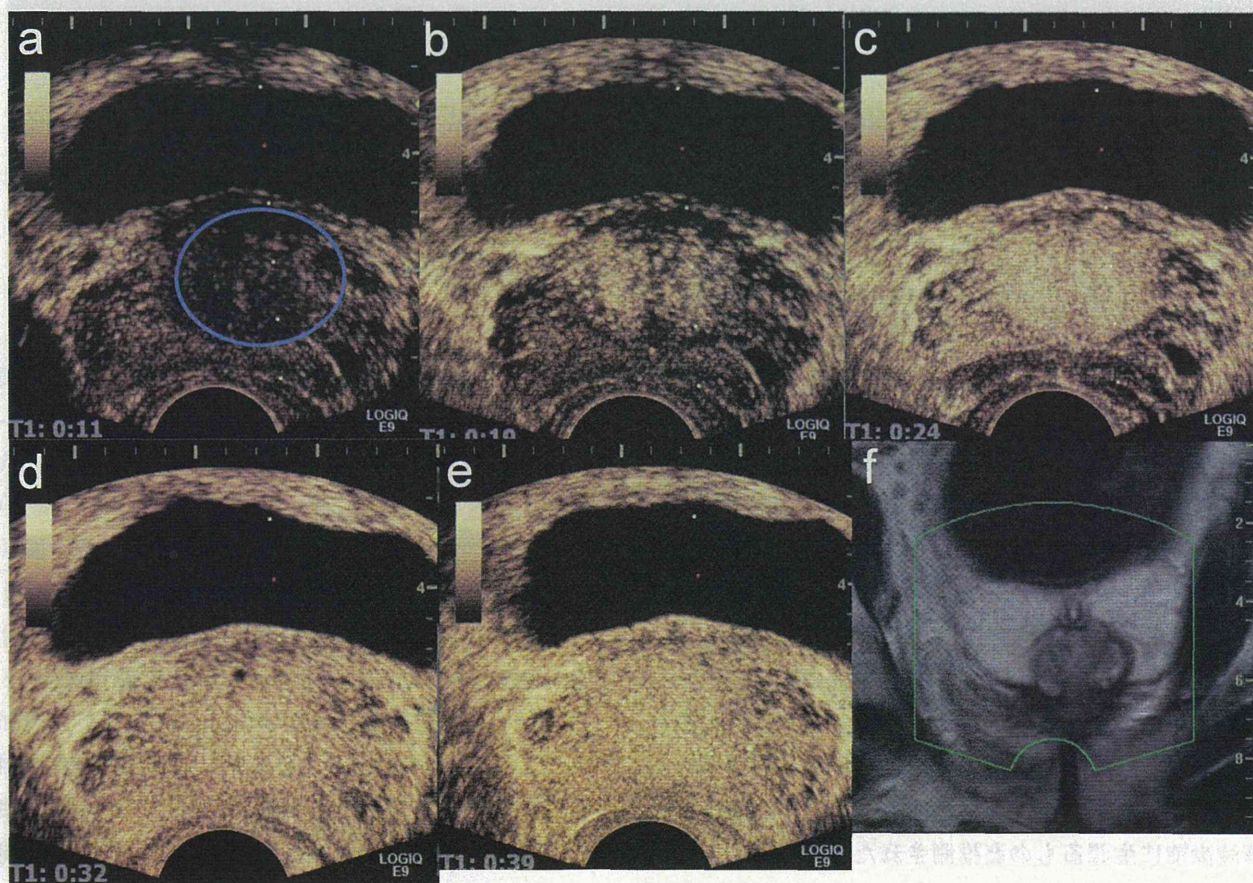


Fig. 6 前立腺肥大症 (中葉肥大) 症例に対する TRUS 造影超音波検査と MRI の同時表示と経時的リアルタイムイメージング. a 造影前, b 造影早期, c 造影中期, d 造影ピーク, e 造影ピークを過ぎ, 外線の造影が低下, f 同期した MRI イメージ. リングは中葉肥大の腺腫に関心領域に設定したことを表す

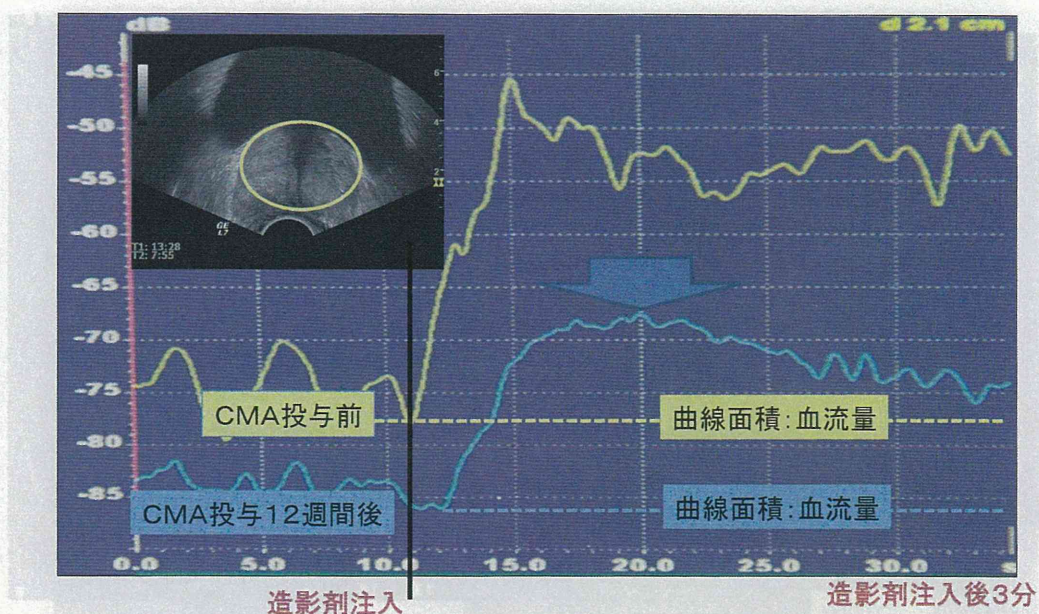


Fig. 7 前立腺肥大症（中葉肥大）症例に対する TRUS 造影超音波検査で CMA 投与前（上段）と後（下段）の時間－濃度曲線の変化

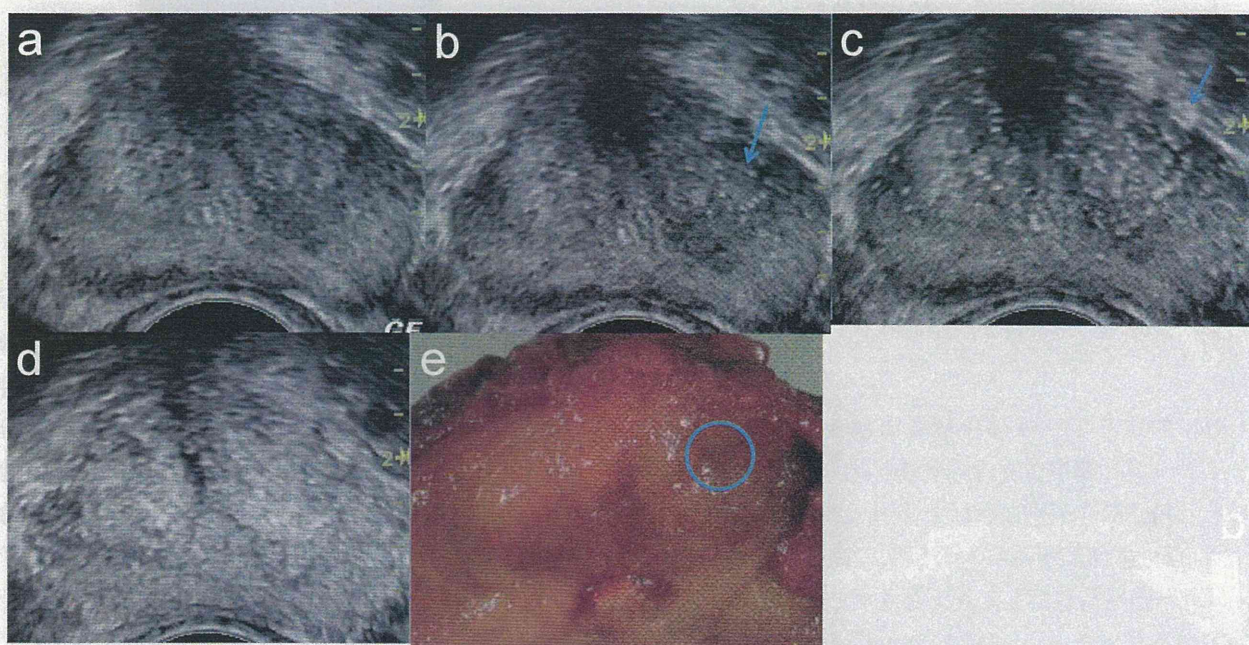


Fig. 8 結節形成前立腺癌（左葉）と前立腺肥大症腺腫（右葉）症例に対する TRUS 造影超音波検査の経時的前立腺イメージ。a 造影前, b 早期, c 中期, d 造影ピークと e 摘出前立腺病理組織（T2aN0M0 G3+4）肉眼的所見。矢印またはリングは癌病変を示す。

ことから前立腺微小循環での血流減少は、前立腺容積減少前に生じるものと推測された。

5.2 前立腺癌

B モードで示される前立腺癌の病変の大きさよりも造影 TRUS での大きさが病理組織との一致性が高く、造影超音波検査では前立腺癌の病変を正確に表すことが報告されている^{9,10}。また上村らは、統

計的生検と超音波造影下生検と比較し、その診断率が高いことを報告している。癌病変については早期に造影されることもあり、造影パターンは hypervascular, hypovascular, irregular と様々であると報告されている¹¹。そこで我々は、一つの前立腺臓器内で良性病変と悪性病変の比較を行うために結節形成前立腺癌（左葉）と前立腺肥大症腺腫（右葉）症

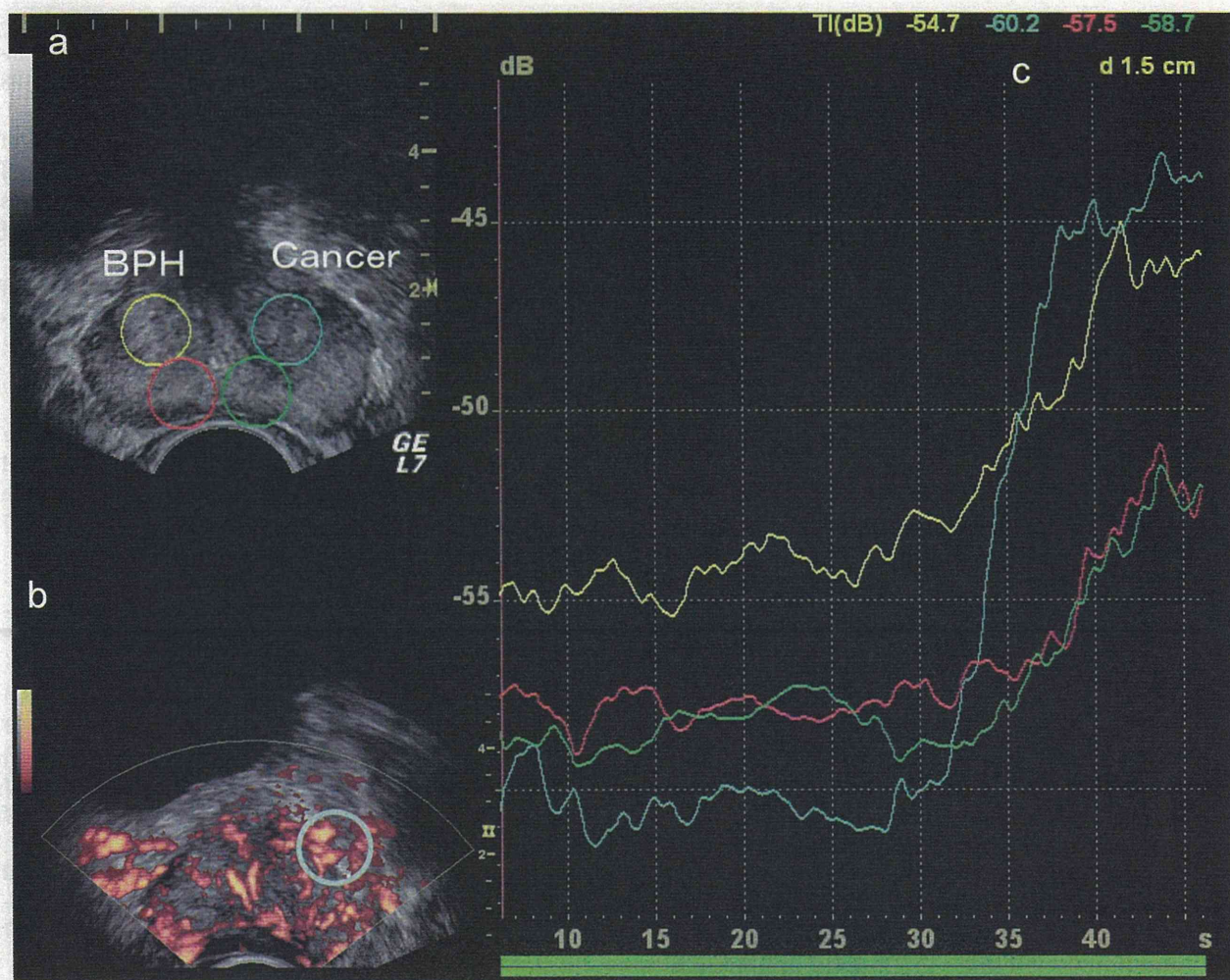


Fig. 9 結節形成前立腺癌（左葉）と前立腺肥大症腺腫（右葉）症例に対する。a TRUSのBモードイメージ、b 造影後パワードプラインメージング、c 造影超音波検査の時間-濃度曲線

例に対する TRUS 造影超音波検査の経時的前立腺イメージと摘出前立腺病理組織肉眼的所見を比較した (Fig. 8)。病理組織で示される結節形成前立腺癌 (左葉) の部位が明らかに早期に造影される。また、時間-濃度曲線でも立ち上がり早く、造影後パワードプラインメージングでも hypervascular lesion を示していた (Fig. 9)。浮村らは、この造影超音波検査と MRI を組み合わせて、同期させる質的、解剖学的局在診断を高める画像技術を開発し、さらなる応用研究が進行中である⁸⁾。

6. 腫瘍微小循環特性

正常組織と比較して非常に早期に造影剤が流入する理由として腫瘍血管新生によるものと考えられる。すなわち、比較的太い腫瘍血管新生はその末梢の毛細血管血流流入を早める。また、微小循環を制御する重要な役割を果たす細動脈レベルでの腫瘍新生血

管では、平滑筋の欠如による構築異常機能異常と微小循環調節機構の欠陥のある腫瘍新生血管が造影剤の流入を早め、早期の造影効果または時間-濃度曲線での早期の立ち上がり示し、微小循環血管特性を示したものと考えられた¹²⁾。

7. ま と め

今回、泌尿器科微小循環を生体顕微鏡で、臓器毛細血管血流をリアルタイムイメージングし解析しているバックグラウンドを基に、泌尿器科の延べ 200 症例以上の造影超音波検査経験からの知見を基にレビューを行った。安全性が高く、造影能力が高い超音波造影剤 Sonazoid[®] の出現により臨床での泌尿器科臓器イメージングの重要性が高まったと確信した。現在のところ、超音波造影能は高い反面、Late phase での腫瘍検出は困難で、肝臓のように網内系細胞に取り込まれる特性も有さないため、早期

の造影イメージ，時間濃度曲線での解析が主流である。また現在，肝腫瘍の造影のみにおいて保険診療認可されている現状であるが，前立腺癌の臨床治験も進んでおり¹¹⁾，泌尿器科領域の適応拡大により新知見が蓄積され，泌尿器科臓器の血流イメージングの意義が深まることを望みたい。Sonazoid[®] 造影超音波検査は多断面でリアルタイムに微小血管造影画像を作り出す強みを生かし，初期診断ばかりでなく臓器微小循環の評価を可能にする画像検査として位置付けられることが予測された。さらに，MRIやCTと同期したイメージを将来的には，臓器生検組織学や微小循環病態生理学を基に超音波造影剤Sonazoid[®] イメージングでの泌尿器科臓器微小循環臨床意義を明らかにして，診断・治療効果判定に応用されていくものと思われる。

文 献

- 1) 山本徳則，後藤百万. 画像診断イメージングアプローチ 急性虚血性腎不全と微小血管循環障害 - 尿細管周囲毛細血管イメージングからのアプローチ-. *Nephrology Frontier* 2011;10(1):62-7.
- 2) 沼田功. 造影超音波法による泌尿器診断の進歩. *超音波医学* 2006;33(5):565-74.
- 3) 山本徳則，舟橋康人，服部良平. 画像診断イメージングアプローチ 移植腎に対する造影超音波検査イメージング 葉間動脈-髄質外層血管通過時間定量の試み. *Nephrology Frontier* 2010;9(4):51-4.
- 4) Benozzi L, Cappelli G, Granito M, et al. Contrast-enhanced sonography in early kidney graft dysfunction. *Transplant Proc* 2009;41(4):1214-5.
- 5) Aoki S, Hattori R, Yamamoto T, et al. Contrast-enhanced ultrasound using a time-intensity curve for diagnosis of renal cell carcinoma. *BJU Int* 2011;108(3):349-54.
- 6) Quaia E, Bertolotto M, Cioffi V, et al. Comparison of Contrast-Enhanced Sonography with Unenhanced Sonography and Contrast-Enhanced CT in the Diagnosis of Malignancy in Complex Cystic Renal Masses. *Am J Roentgenol*. 2008;191(4):1239-49.
- 7) Bertolotto M, Trincia E, Zappetti R, et al. Effect of Tadalafil on prostate haemodynamics: preliminary evaluation with contrast-enhanced US. *Radiol Med* 2009;114(7):1106-14. doi: 10.1007/s11547-009-0449-8. Epub 2009
- 8) Ukimura O, Hirahara N, Fujihara A, et al. Technique for a hybrid system of real-time transrectal ultrasound with preoperative magnetic resonance imaging in the guidance of targeted prostate biopsy. *Int J Urol* 2010;17(10):890-3.
- 9) Qi TY, Chen YQ, Jiang J, et al. Contrast-enhanced transrectal ultrasonography: measurement of prostate cancer tumor size and correlation with radical prostatectomy specimens. *Int J Urol* 2013;20(11):1085-91.
- 10) Yamamoto T. Editorial Comment to Contrast-enhanced transrectal ultrasonography for the measurement of prostate cancer tumor size in the peripheral zone and correlation with radical prostatectomy specimens. *Int J Urol* 2013;20. doi: 10.1111/iju.12164. [Epub ahead of print] No abstract available.
- 11) Sano F, Terao H, Kawahara T, et al. Contrast-enhanced ultrasonography of the prostate: various imaging findings that indicate prostate cancer. *BJU Int* 2011;107(9):1404-10.
- 12) 山本徳則，服部良平，後藤百万. 画像診断イメージングアプローチ 腎腫瘍特性微小循環に対する造影超音波検査. *Nephrology Frontier* 2010;9(3):80-4.

Research Article

Augmentation of Regenerative Potential of Mesenchymal Stem Cells by Granulocyte-colony Stimulating Factor (G-CSF) Induced Mobilization

Hirose Y^{1,2}, Murakami M¹, Hayashi Y^{1,3}, Osako Y¹, Yamamoto T², Gotoh M² and Nakashima M^{1*}

¹Department of Dental Regenerative Medicine, Center of Advanced Medicine for Dental and Oral Diseases, National Center for Geriatrics and Gerontology, Japan

²Department of Urology, Nagoya University Graduate School of Medicine, Japan

³Department of Pediatric Dentistry, Aichi Gakuin University, Japan

***Corresponding author:** Nakashima M, Department of Dental Regenerative Medicine, Center of Advanced Medicine for Dental and Oral Diseases, National Center for Geriatrics and Gerontology, 35 Gengo, Morioka, Obu, Aichi, 474-8511, Japan, Tel: +81-562-44-5651×5065; Fax: +81-562-46-8684; E-mail: misako@ncgg.go.jp

Received: July 18, 2014; **Accepted:** August 16, 2014;

Published: August 18, 2014

Abstract

The development of a safe and efficient method for isolation of mesenchymal stem cell (MSC) subsets is essential for optimal stem cell therapy. The potential utility of granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) induced mobilization method has been demonstrated in isolation of MSC subsets from dental pulp. The mobilized dental pulp stem cells (MDPSCs) were enriched for MSC subsets with higher regenerative potential compared with colony-derived dental pulp stem cells (DPSCs). This investigation aimed to examine the efficacy of the G-CSF-induced mobilization method for isolation of MSC subsets from other tissues such as bone-marrow and adipose tissue. The mobilized MSCs represented significantly higher rate of CXCR4⁺ and G-CSFR⁺ cells, higher proliferation and migratory activity and higher expression of Sox2 than corresponding colony-derived MSCs. Trophic effects of mobilized MSCs, including enhanced proliferation, migration, anti-apoptosis, angiogenesis and neurite extension, were also higher in mobilized MSCs compared to colony-derived MSCs, correlating with higher expression of trophic factors. Each of mobilized MSCs induced higher angiogenesis/vasculogenesis and pulp regeneration in ectopic tooth transplantation model. Thus, the G-CSF induced mobilization method for isolation of MSC subsets is efficient and appears to be a significant advance independent of tissue origin.

Keywords: Dental pulp stem cells; Bone marrow-derived stem cells; Adipose-derived stem cells; Granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF); Mobilization; Trophic factor; Pulp regeneration

Introduction

MSCs present a promising tool for cell therapy, and are currently evaluated in clinical trials for myocardial infarction, stroke, meniscus repair, limb ischemia, graft-versus-host disease and autoimmune disorders [1]. MSCs have been found in many other tissues, including peripheral blood, dental pulp, adipose tissue, umbilical cord blood and corneal stroma [2]. Among these cell sources, bone marrow-derived stem cells (BMSCs) have been known for potential therapeutic use [2]. However, adipose-derived stem cells (ADSCs) are becoming an attractive alternative to BMSCs due to easy accessibility and availability in the body [3]. Recently, to obtain the MSCs in a closed system, new methods have been developed, including a MSC separation device for bone marrow [4] and CelutionTM system for adipose tissue [5]. These devices have the advantage of direct application of the isolated MSCs without further expansion. Their stem cell properties, however, have been demonstrated to be similar to those of colony-derived MSCs [4,6]. Furthermore, a large amount of adipose tissue is necessary to isolate adipose MSCs by the CelutionTM system [5]. Age-related decrease in the number of BMSCs is known [7], and functionally active ADSCs is reduced in obesity [8] and aged patients [9].

MSCs are heterogeneous subsets of stromal stem/progenitor cells [10]. Potential utility of some MSC subsets have been demonstrated for enhanced regeneration, including Lin⁻/c-kit⁺ MSCs in infarcted

myocardium [11], STRO-1^{BRIGHT}VCAM-1⁺ population in bone formation [12], CD31⁻ side population (SP) cells in ischemic cerebrum and ischemic hindlimb [13] and CD105⁺ MSCs in pulpectomized tooth [14]. These MSC subsets, however, were isolated by flow cytometer, which has a risk of microbial contamination and unfavorable effects for clinical use [4]. CD34⁺ MSCs by use of CliniMACS[®] are only available for clinical application [15].

We have recently developed a novel, efficient and safe method, using G-CSF-induced mobilization to isolate a therapeutically active subset of dental pulp stem cells (DPSCs) from a small amount of pulp tissue in canine [16] and human [17]. The subset of DPSCs, named mobilized DPSCs (MDPSCs), were enriched for C-X-C chemokine receptor type 4 (CXCR4) and granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) receptor (G-CSFR) positive cells, and demonstrated higher regenerative potential compared with non-isolated colony-derived DPSCs (DPSCs). There has been no study, however, on isolation of BMSC and ADSC subsets by G-CSF induced mobilization method. G-CSF stimulates *in vitro* migration of BMSCs, dependent on their G-CSFR expression [18]. G-CSF enhances migration of intravenously infused MSCs to infarcted heart in rat [19]. G-CSF application also shows significantly higher migration of c-kit⁺ BMSCs towards ischemic heart tissue in an *in vitro* model [20]. A subpopulation, CD31⁻ SP cells were isolated from porcine dental pulp, bone marrow and adipose tissue of the same individual using the same isolation

and culture method [13]. The aim of this investigation is to evaluate the efficacy of the G-CSF-induced mobilization method for isolation of MSC subsets from bone-marrow and adipose tissue and compared with dental pulp tissue. Therefore, we compared the stem cell properties, trophic effects, and regenerative potential of mobilized MSCs with corresponding colony-derived MSCs, respectively.

Materials and Methods

This study was approved by the ethics committees and the animal care and use committees of the National Center for Geriatrics and Gerontology and Aichi Gakuin University. All experiments were conducted using the strict guidelines of the DNA Safety Programs.

Cell isolation and culture conditions

The pulp tissue from premolar teeth, the bone marrow and adipose tissue were isolated from the same individual porcine mandible. Then, primary cells were cultured from each tissue with slight modification of our previous method [21]. In brief, approximately 1 g of pulp tissue, 3 g of bone marrow, and 5 g of adipose tissue were minced into pieces and then enzymatically digested in 0.2% collagenase (Worthington, Lakewood, NJ) for 30 min at 37°C. The cells were passed through 70 µm nylon mesh (Cell Strainer; BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) and their viability was determined by trypan blue staining of the cells. The isolated cells were plated at colony-forming density ($\leq 1 \times 10^4$ cells/ml) on 35 mm dishes (BD Biosciences) in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Life Technologies, Carlsbad, CA). These colony-derived dental pulp, bone marrow and adipose MSCs were named DPSCs, BMSCs and ADSCs, respectively.

The mobilized subsets of DPSCs, BMSCs and ADSCs (MDPSCs, MBMSCs and MADSCs) were further isolated by G-CSF (NEUTROGIN[®]; Chugai Pharmaceutical Co., Ltd., Tokyo, Japan) induced stem cell mobilization [16,17]. Briefly, the upper chamber, Costar Transwell[®] (Corning, Lowell, MA) which was chemically pretreated to prevent cell attachment, was inserted into 24-well tissue culture plate (BD Biosciences) as the lower chamber. The colony-derived MSCs (DPSCs, BMSCs and ADSCs) (1.5×10^4 cells/100 µl in DMEM) at the second passage of culture were added to the upper chambers and DMEM supplemented with 10% FBS and G-CSF (100 ng/ml) was added to the lower chambers. After 48 h of incubation, the medium was changed into DMEM supplemented with 10% FBS without G-CSF. Isolated mobilized MSCs and colony-derived MSCs were detached at 60-70% confluence by incubation with 0.05% Trypsin-EDTA (Life Technologies) and subcultured at a 1:4 dilution under the same conditions. In this study, all cells were cultured in a humidified 37°C, 5% CO₂ incubator (Panasonic, Osaka, Japan). To evaluate the colony-forming efficiency of each mobilized MSCs and colony-derived MSCs, 5×10^2 cells/ml were seeded at the 5th passage of culture on 6 cm dish in DMEM supplemented with 10% FBS. After 4 days of culture, aggregates of ≥ 10 cells were scored as colonies.

Flow cytometric analysis

The mobilized MSCs were characterized at the 6-7th passage of culture, in comparison with colony-derived MSCs by flow cytometry (FACS Canto II; BD Biosciences). They were immunolabeled for 60 min at 4°C with a rabbit IgG negative control (Alexa488) (#4340) (Cell Signaling technology, Beverly, MA), a mouse IgG2a negative

control (FITC) (RTK4530) (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Germany), a mouse IgG2b negative control (Alexa488) (MCA928PE) (Abcam, Cambridge, UK), and the antibodies against CD105 (Alexa488) (orb10285) (Biobyte, Cambridge, UK), CXCR4 (FITC) (12G5) (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN), G-CSFR (Alexa488) (S1390) (Abcam). Only viable cells as determined by propidium iodide (PI) exclusion were gated and analyzed.

Real-time RT-PCR for stem cell makers, and angiogenic/neurotrophic factors

Total RNA was extracted with Trizol (Life Technologies) from each of the stem cell sources. First-strand cDNA syntheses were performed on the total RNA of these cells by reverse transcription using the ReverTra Ace-α (Toyobo, Tokyo, Japan) at 30°C for 10 min, 42°C for 20 min and 99°C for 5 min after DNase I treatment (Roche Diagnostics, Pleasanton, CA) at 37°C for 20 min and 0.2 M EDTA treatment (Toyobo) at 70°C for 20 min. Real-time RT-PCR was performed at 95°C for 10 s, 65°C for 15 s and 72°C for 8 s. Amplified cDNA were labeled with Light Cycler-Fast Start DNA master SYBR Green I (Roche Diagnostics) in a Light Cycler (Roche Diagnostics). As stem cell markers, *Sox2* and *chemokine (C-X-C motif) receptor 4 (CXCR4)* were examined. The mRNA expression of the angiogenic and neurotrophic factors, *matrix metalloproteinase (MMP)-3*, *vascular endothelial growth factor (VEGF)*, *granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF)*, *brain-derived neurotrophic factor (BDNF)*, *glial cell derived neurotrophic factor (GDNF)*, and *neuropeptide Y (NPY)* were also performed. The primers were used as demonstrated previously [14,22,23] except *G-CSF* (Forward: 5' CTGGACTGGGAGGTAGTTG 3'; Reverse: 5' CTTAGGGTAGGGGTTCACTC 3'). The mRNA expression was normalized with *β-actin*. The RT-PCR product of *G-CSF* was subcloned into the pGEM-T easy vector (Promega, Madison, WI) and confirmed by sequencing.

Migration and proliferation assays

The migratory activity of each of mobilized MSCs to G-CSF was compared with corresponding colony-derived MSCs by horizontal chemotaxis assay using TAXIScan-FL (ECI, Inc., Kanagawa, Japan) as described previously [14]. Each of MSCs (1×10^5 cells/ml) was placed into the single hole, and 10 µg/ml of chemotactic factor (1 µl) was placed into the contra-hole. The video images of cell migration were taken for 24 h.

The proliferation activity in response to FBS of each of mobilized MSCs was compared with corresponding colony-derived MSCs at the 6-7th passage of culture at 1×10^3 cells per 96 well in the presence of 10% FBS. Cell Counting Kit-8 (Dojindo, Kumamoto, Japan) was added to the 96-well plate (BD Biosciences) and the cell numbers were measured at 2, 12, 24, 36 and 48 h of culture by Appliskan (Thermo Scientific, Waltham, MA) with the excitation filter set at 450 nm.

Endothelial cell differentiation and neuronal differentiation *in vitro*

The differentiation potential into endothelial cell [23] and neuron [22] was performed with slight modification of our previous method. In endothelial cell differentiation, each of MSCs at the 6-7th passage of culture 1.0×10^4 cells/50 µl were seeded on a 96-well plate spread out the matrigel (BD Biosciences) in inducer medium. Network formation was observed after 9 h cultivation. The mean lengths of