

流れずり応力による
内皮前駆細胞の分化誘導に関する研究

所属：生体物理医学専攻

指導教員：阿部裕輔准教授

申請者：小尾正太郎

目次

1. 要旨	4
2. 序文	
2-1. 血管内皮細胞	5
2-2. 動静脈内皮細胞の特異性	5
2-3. 血管におけるメカニカルストレス	7
2-4. 血管内皮前駆細胞	9
2-5. EPC の臨床応用	10
2-6. メカニカルストレスの内皮前駆細胞への影響	11
2-7. 本研究の目的・概要	12
3. 実験方法	
3-1. 細胞培養	14
3-2. 流れ負荷実験	16
3-3. 細胞機能解析	17
3-4. 蛋白定量法	18
3-5. 遺伝子解析	19
3-6. 統計解析	23
4. 結果	
4-1. 流れずり応力が末梢血由来 EPC の動静脈分化に及ぼす効果	
4-1-1. 動静脈内皮マーカーの遺伝子発現変化	24
4-1-2. 流れ負荷による ephrinB2 と EphB4 の発現変化におけるずり応力依存性	25
4-1-3. ずり応力による ephrinB2 蛋白の発現変化	26
4-1-4. ずり応力による ephrinB2 遺伝子の発現調節機構	26
4-2. 流れずり応力が臍帯血由来 EPC に及ぼす効果	

4-2-1. EPC の接着と遊走、増殖、抗アポトーシス	31
4-2-2. 臍帯血由来 EPC の分化に及ぼす流れずり応力の効果	33
5. 考察	
5-1. 流れずり応力による EPC の動脈化	35
5-2. 流れ刺激はずり応力依存性か、ずり速度依存性か？	35
5-3. ephrinB2 遺伝子の転写制御機構	36
5-4. ずり応力が臍帯血由来 EPC に及ぼす効果	37
5-5. 血管新生療法における末梢血由来 EPC と臍帯血由来 EPC	38
5-6. ずり応力を負荷した EPC の臨床的意義	39
5-7. 回転円盤型ずり応力負荷装置の特徴	39
6. 結論	41
7. 謝辞	42
8. 引用文献	43

1. 要旨

血管内皮前駆細胞 (EPC) は骨髄から末梢血に動員され、既存の内皮細胞に接着し、組織に遊走、増殖、分化して、新たな血管を構築する。この過程で EPC は血流や組織液の流れに起因したメカニカルストレスである流れずり応力を受ける。先行研究により、ヒト末梢血由来 EPC がずり応力に反応して増殖や管腔形成能が亢進し、成熟内皮細胞への分化も促進されることが示された。そこで本研究はずり応力がヒト末梢血由来 EPC を動脈内皮細胞あるいは静脈内皮細胞のどちらに分化を誘導するかについて検討した。EPC に回転円盤型流れ負荷装置で定量的なずり応力を作用させると動脈内皮マーカーの発現が増加し、一方、静脈内皮マーカーの発現は低下した。このことからずり応力は EPC を動脈内皮細胞に分化誘導することが明らかになった。ずり応力により動脈内皮マーカー ephrinB2 の発現が増加したが、その機序はずり応力で活性化した転写因子 Sp1 が ephrinB2 遺伝子のプロモーターにある Sp1 モチーフに結合することによる転写亢進であった。また、細胞移植治療の細胞ソースとして期待されているヒト臍帯血由来 EPC がずり応力に応答するかについても検討を加えた。その結果、ずり応力が EPC の細胞機能（接着、遊走、増殖、抗アポトーシス）を亢進し、さらに成熟内皮細胞への分化を促進することが判明した。以上の研究結果から、メカニカルストレスである流れずり応力は環境因子として EPC の細胞機能や分化を修飾し、成体や胎児の循環系における血管形成や血管新生を調節する一つの因子として働くと考えられた。さらに、今回の結果はメカニカルストレスで EPC の増殖を含む細胞機能や分化を人工的に操作することは EPC を使った細胞治療や再生医療におけるツールとして応用しうることを示唆している。

2. 序文

2-1. 血管内皮細胞

血管内面を覆う上皮を血管内皮といい、血管内皮は一層の内皮細胞で構成される。内皮細胞は多彩な機能を発揮して循環系の機能の恒常性を維持している。血管内皮細胞は、胚の発生段階だけでなく成体においても細胞分裂能と遊走能を持っている。血管内皮の一部が傷害されて剥がれると、周囲の内皮細胞が増殖、遊走し、血流に暴露した表面を覆う。さらには、内皮細胞は絶えず代謝し、虚血部位では新しい血管が作られる。内皮細胞の他の働きとして、血液中の物質を選択的に透過させたり、血圧を維持するための血管のトーンスを調整したり、血液の凝固や線溶の調節を行っている (1)。

2-2. 動静脈内皮細胞の特異性

胚の発生段階で血管芽細胞から血管内皮細胞への分化が決定した後、局所での集合や接着により互いに融合し、大小不同のない血管網である原始血管叢を形成する。この過程は脈管形成 (vasculogenesis) と呼ばれる。原始血管叢から血管内皮細胞が様々な血管新生刺激に対して発芽 (sprouting)、分枝 (branching)、融合 (fusion)、挿入 (intussusception)、退縮 (pruning/regression) などにより新たな管腔を形成する。この過程は血管新生 (angiogenesis) と呼ばれる。この時期から管径の変化や動静脈への分化が始まり、血管の退縮と新生を繰り返す (リモデリング)、階層性を持った大小血管からなる vascular tree の形成、基底膜の形成、壁細胞による血管細胞周囲の裏打ち構造の形成 (血管成熟) により新生血管が形成される。動静脈の並行した走行は、動脈内皮に発現するエフリン B2 (ephrinB2) と静脈内皮に発現するその受容体 EphB4 の結合が内皮細胞同士の反発する運動性を持たせることにより生じると考えられている (2)。

動脈は内膜、中膜、外膜の3層からなる。内膜は管腔側から血管内皮細胞、血管基底膜、内弾性板、中膜は平滑筋細胞、弾性線維、細胞外マトリックス、外膜は外弾性

板からなる。静脈も内膜、中膜、外膜からなるが、動脈ほどはっきりしていない。動静脈の解剖学的な相違は、静脈には弁があるが動脈にはないこと、静脈には平滑筋細胞が内膜にも外膜にも存在することである。動脈と静脈の間には毛細血管が存在する。毛細血管は直径 5-10 μm で、周囲に平滑筋を持たず、内皮細胞と基底膜から構成される。血液と組織間で炭酸ガス、栄養、老廃物などの物質交換が行われる。毛細血管は常に新生したり退縮したりしており、毛細血管の血管新生は内皮細胞の発芽によることが知られている。

最近の研究から、動静脈内皮細胞に特異的に発現するいくつかの分子があることが示されている。例えば、Eph ファミリー膜貫通型リガンドである ephrinB2 は動脈内皮細胞を特徴付ける (2-4)。一方、ephrinB2 の受容体である EphB4 は静脈内皮細胞を特徴付ける (図 2-1)。動脈内皮細胞に選択的に発現する遺伝子には、ephrinB2 のほかに Dll4、Jagged2、Notch1-4、Hey1 (hairy/enhancer of split-related with YRPW motif 1) といった Notch シグナル、ニューロピリン 1 (neuropilin 1; NRP1)、ALK1 (activin receptor-like kinase 1、ACVRL1 ともいう)、コネクシン 37 (Connexin 37)、コネクシン 40 (Connexin 40)、CXCR4 (C-X-C chemokine receptor type 4) などがある (5-12)。

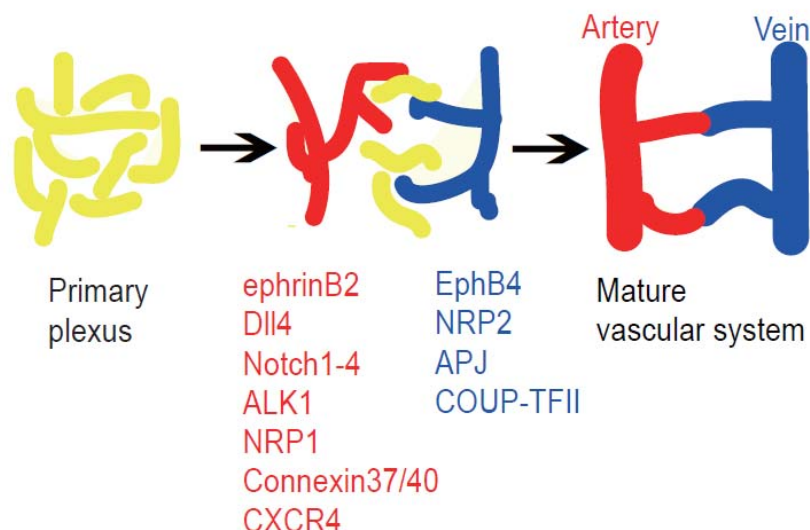


図 2-1. 血管の分化において動静脈内皮細胞に特異的に発現する分子
動脈内皮には ephrinB2、Dll4、Notch、ALK1、NRP1、Connexin37/40、CXCR4 などが発現する。
一方、静脈内皮には EphB4、NRP2、APJ、COUP-TFII などが発現する。

静脈内皮細胞に選択的に発現する遺伝子には EphB4 のほかにニューロピリン 2 (neuropilin 2; NRP2)、APJ (putative receptor protein related to angiotensin receptor)、HeyL (hairy/enhancer of split-related with YRPW motif-like protein)、COUP-TFII (chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor II) などが知られている (13-15)。COUP-TFII は核内オーファン受容体であり、NRP1 の発現を抑制して Notch シグナルを抑制することにより静脈内皮への分化を制御している。しかし、これらの動静脈特異的発現パターンの機能的関連は明らかでない。

2-3. 血管におけるメカニカルストレス

心血管系は全身の臓器・組織・細胞に必要な酸素・栄養を供給し、二酸化炭素およびその他の老廃物を回収する、動物の生命維持に不可欠な臓器である。血管を流れる血液は、液体成分である血漿と細胞成分である赤血球、白血球、血小板で構成されており、物理的には一定の流動的性質を持った液体として全身各臓器を循環している。そのため、血管壁には、血流に起因する流れずり応力、血圧に基づく伸展張力と貫壁性圧力などのメカニカルストレスが常時作用する (図 2-2)。

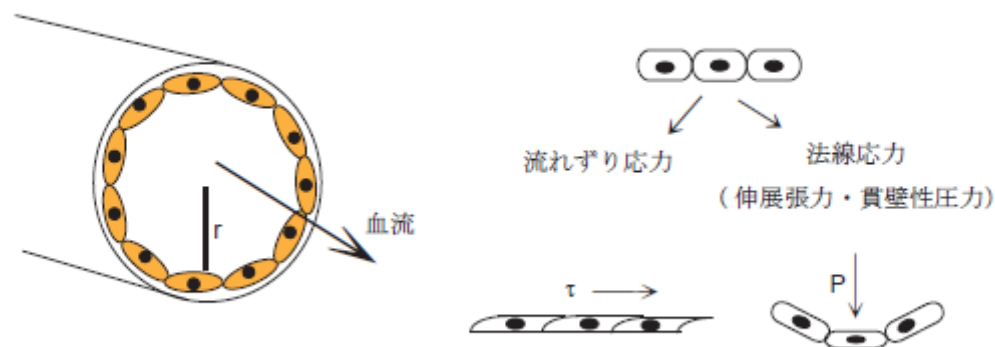


図 2-2. 血管にかかるメカニカルストレス

血管には流体である血液が血管壁の表面を流れることにより生じる流れずり応力、血圧・拍動に起因して血管壁を外側に押し広げる貫壁性圧力、血管壁が外周方向に引っ張られる伸展張力が作用する。

流れずり応力は、血管壁の内面を一層に覆う内皮細胞を血流の方向に歪ませる力である (16)。流れずり応力 τ は、半径 r の血管内を粘性 μ 、流量 Q の血液が、血流速度 u で定常的に流れているとき、ずり速度(du/dr)により次の式で表される。

$$\tau = \mu \, du/dr = 4uQ/\pi r^3$$

ヒトの生理条件下の大動脈では 10-20 dynes/cm²、細動脈には 5 dynes/cm²、毛細血管には 2.5 dynes/cm²、静脈系には 1-5 dynes/cm² の流れずり応力が作用する (17)。

法線応力は血圧により血管壁を垂直に押し広げようとする力である。法線応力には血圧により心拍動に伴って血管内皮細胞を周期的に円周方向へ引っ張る力である伸展張力と、血圧と血管外の組織圧との圧較差により細胞を押しつぶそうとする力である貫壁性圧力がある。これらは、表面の血管内皮細胞だけではなく、それを支える血管平滑筋細胞、血管周囲細胞などの壁細胞にも加わる。特に動脈系では、拍動により周期的に血管壁を伸展させる力 (cyclic strain) が加わる。伸展張力 T は血圧 P 、血管中心からの半径 r 、壁の厚さ h とすると、次の式で表される。

$$T = Pr/h$$

心拍動に伴い血管径が伸展する割合は、ヒトの大動脈で 9-12%、頸動脈で 1-2%、大腿動脈で 2-15%、肺動脈で 6-10%、イヌの大動脈で 1-8%、ネコの大動脈で 15%程度と報告されている (18)。

多くのタイプの細胞がその環境下でメカニカルストレスに応答することは広く知られている。例えば、血管内皮細胞は血流により生じる流れずり応力に応答して細胞機能を変化させる。この細胞応答が血管の恒常性を維持するうえで重要な役割を果たす (16)。生体内で血流が増加すると急速に血管が拡張し、血流増加が長期に及ぶと血管構造の変化を伴い血管径が増大することはかなり以前から知られている (19,20)。この現象は血管径を調整することで血管壁にかかる流れずり応力を一定に保とうとする適応反応であることが実験的に証明された (21)。血管内皮細胞を予め剥離しておくところの血流変化による血管径の変化は起こらないことから、この反応が内皮細胞依存性であると考えられている (22)。

このような血流と血管内皮細胞との相互作用は、動脈硬化を主とする血管障害の面からも重要であり、特に動脈硬化との関連については多くの知見が示されている。例えば、ヒトの粥状動脈硬化巣の好発部位は血管の湾曲部や分岐部、血管内腔の狭窄部であるが、この部位では局所的に血流の停滞や渦巻流が生じ、内皮細胞には乱流や比較的低い流れずり応力が作用している (24-31)。したがって、こうした乱流性のずり応力が内皮細胞の正常な機能を障害し、白血球の接着、コレステロールの蓄積、内膜肥厚、血栓形成といった病的状態を惹起すると考えられている。このような背景から近年、メカニカルストレスに対する細胞応答を解析するため培養細胞に制御可能なメカニカルストレスを作用させる装置を用いたバイオメカニクス研究が盛んに行われるようになってきた。

2-4. 血管内皮前駆細胞

近年、成体の血管再生に血管内皮前駆細胞 (endothelial progenitor cell; EPC) が重要な役割を果たしていることが発見された (32)。EPC は骨髄から末梢血に動員され、虚血部の既存の血管に接着し、組織に遊走、増殖、分化し、さらには血管新生物質を分泌して、新たな血管を構築する (33-35)。マウスの下肢虚血モデルや心筋梗塞モデルに EPC を移植すると既存の内皮細胞に EPC が取り込まれ血管新生が促進されることより、EPC が成体の vasculogenesis に重要であることが解明された (36,37)。

EPC は血管芽細胞と成熟内皮細胞の間の幅広い分化過程に存在するため、EPC を同定し精製する様々な方法が用いられてきた。EPC を精製する方法として主に 2 種類ある (38-40)。すなわち、新鮮な血液中からフローサイトメトリーで精製する方法と細胞を培養する方法である。

フローサイトメトリーでは、少なくとも 1 つの未分化なマーカーと内皮系のマーカーを組み合わせて EPC を精製する。典型的な未分化マーカーとしては、シアル化糖タンパク質様接着分子であり血液幹細胞抗原の CD34 や細胞膜 5 回貫通型糖タンパク質である CD133 (prominin 1 ともいう) が用いられ、内皮マーカーとしては血管内皮増

殖因子受容体 2 (vascular endothelial growth factor 2; VEGFR2、kinase insert domain receptor; KDR ともいう) や CD31 (platelet endothelial cellular adhesion molecule-1; PECAM-1) が使われる。EPC が分化すると、CD34 は減少し、CD133 は消失する一方、KDR、VE カドヘリン (VE-cadherin)、Tie2 (protein receptor tyrosine kinase, epithelial-specific)、E セレクチン (E-selectin) が増加する。血球幹細胞も CD34、CD133、KDR を発現するが、分化すると CD133 や KDR は消失する。このため CD133 陽性細胞は未分化な EPC として研究されている (41,42)。

細胞培養では、ファイブロネクチンでコートした培養皿に接着した末梢血由来単核球を EPC として精製する。接着細胞を培養すると early EPC と late EPC と呼ばれる 2 種類の EPC が出現する (43)。Early EPC は培養後 3 日ぐらいで集族を成して出現し、増殖するが、2 週間ぐらいで消失する。Late EPC は 2、3 週間以上生存し、増殖も盛んであり敷石状の細胞層を形成する。Early EPC と late EPC はともにアセチル化 LDL を取り込み、Ulex lectin に結合する。また、接着細胞ではなく浮遊細胞を putative EPC として colony forming unit-endothelial cells (CFU-ECs) を精製する方法もある (44)。

EPC に用いられる細胞源としては、末梢血以外に骨髄や臍帯血がある。特に臍帯血は末梢血より単位血液当たり多くの EPC を得ることができ、さらには血管新生能が高いという特徴がある (45-50)。最近、臍帯血由来 CD133 陽性細胞を培養増殖させた EPC が増殖前の新鮮な EPC に比べてマトリゲルでの脈管形成能を促進し、ラットの心筋梗塞モデルへの移植において心機能をより改善したことが報告された (51)。しかし、EPC の分化を制御している遺伝的要因や環境因子の詳細についてはまだよく分かっていない。

2-5. EPC の臨床応用

臨床では狭心症、心不全、糖尿病や高血圧、脂質異常症、喫煙、老化といった動脈硬化の患者は EPC の数が減少しており、また EPC の血管新生能も低下している (34)。このことは EPC の数と機能が心血管病の危険性を反映していることを示唆している。

現在、EPC を使った様々な臨床治験が行われており、EPC が安全で有効な治療手段であることが報告されている。心筋梗塞の患者に末梢血あるいは骨髄由来培養 EPC を移植すると心駆出率が改善し、左心室収縮末期容積の減少や梗塞巣の縮小を認めた (52)。同様に、狭心症や心筋梗塞後の患者に末梢血あるいは骨髄由来の CD34 陽性細胞あるいは CD133 細胞を移植すると、心駆出率や心筋血流分布が改善し、左心室収縮末期容積の減少や梗塞巣の縮小を認めた (53-58)。また、慢性閉塞性動脈硬化症の患者に末梢血由来 CD34 陽性細胞あるいは CD133 陽性細胞を移植すると、血流や疼痛が改善して歩行距離が延長し、下肢の切断を回避できた (59,60)。これらのことは EPC を用いた細胞治療が心血管の再生に有効であることを意味する (33,61,62)。しかしながら、このような患者では EPC の数が減少し EPC の機能も低下していることより、EPC の数を増やし、かつ EPC の機能も回復させる生体外細胞培養した EPC を移植する治療が求められている。

2-6. メカニカルストレスの内皮前駆細胞への影響

EPC は骨髄から末梢血に動員され、既存の血管の内皮細胞に接着あるいは内皮層を通り抜けて組織に遊走した後、増殖・分化して、血管形成を起こす。この過程において EPC は血流や組織液の流れに起因するずり応力を受けると考えられる (図 2-3)。

EPC がずり応力にどの様に反応するかについての最初の報告は東大の山本らによって行われた (63)。ヒトの末梢血由来 EPC に流れ負荷装置で定量的なずり応力を作用させる実験により、EPC がずり応力に反応して形が類円形から細長く変わり、その長軸を流れの方向に向けて配列することや細胞増殖能が促進されることが示された。また、EPC が成熟型の血管内皮細胞へ分化する過程がずり応力により格段に加速されることやコラーゲンゲル内での管腔形成が促進されることも判明した。その後、ずり応力に対する EPC の力学応答に関する多くの研究が行われ、ずり応力が EPC の一酸化窒素やプロスタグランディン $F1\alpha$ などの血管拡張物質の産生や抗血栓活性を有するトロンボモデュリンの発現を増加させることや、線溶作用のある組織型プラスミノ

ーゲン・アクチベータの放出や活性酸素の消去に関わるスーパーオキシドディスムターゼの活性と遺伝子発現を増加させることなどが明らかにされた (64-68)。

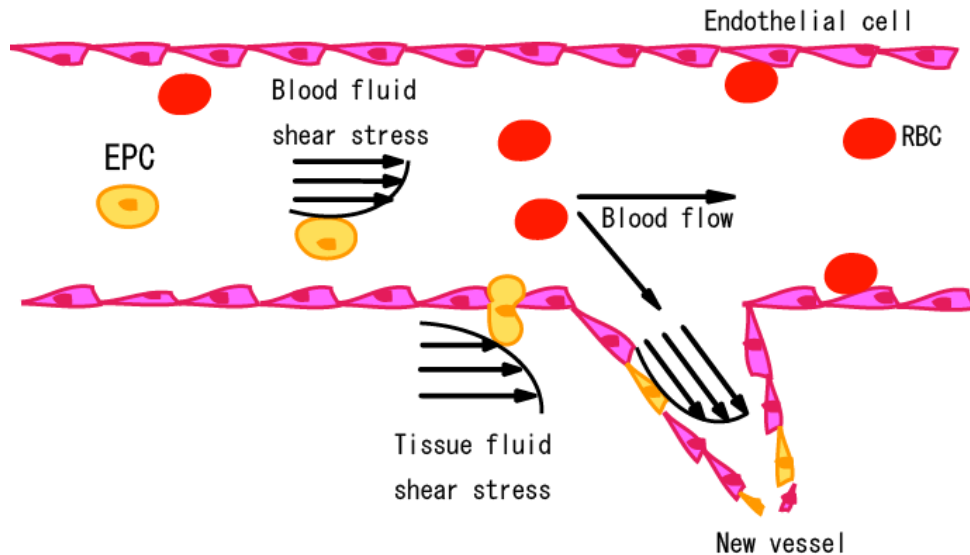


図 2-3. 流れずり応力の影響を受ける EPC

EPC は分化の過程で絶えず血流や組織流に起因した流れずり応力に暴露されている。

2-7. 本研究の目的・概要

臨床において、ステントや人工血管を移植した後の開存率を改善するために EPC を捕捉する分子をコーティングしたステントや人工血管が研究されている。また、自家血管移植において静脈より動脈を使用した方が開存率が高い。このため動脈に分化を運命付けられた EPC を移植することは治療効果が高いと考えられる。これまでに流れずり応力が EPC の内皮細胞への分化を促進することが明らかにされているが、それが最終的に動脈内皮に分化を誘導するのか、それとも静脈内皮に分化させるかについてはまだ解明が進んでいない。そこで本研究では、ヒト末梢血由来 EPC の動静脈内皮細胞分化に対するずり応力の効果について解析した。

また、近年、細胞治療や再生医療に使う細胞ソースとなるヒト臍帯血中に存在する EPC が末梢血 EPC より血管新生能が高いことが報告されている。しかしながらヒト

臍帯血由来EPCが末梢血由来EPCと同じようにずり応力に反応するかは不明である。そこで、ヒト臍帯血由来 EPC がずり応力に応答して細胞機能や分化を促進させるかどうかについても検討を加えた。

3. 方法

3-1. 細胞培養

ヒト末梢血由来 EPC の単離と培養

末梢血を被験者 5 人から採取した。以下の研究はヘルシンキ宣言に則り、被験者のインフォームド・コンセントを得て行った。ヒト末梢血 200 ml から単核球を Histopaque-1077 (Sigma-Aldrich) を使って密度勾配遠心法により単離した。その後、細胞を 100 $\mu\text{g/ml}$ のヒトファイブロネクチン (Sigma) でコーティングした培養皿に 5×10^5 cells/cm² の密度で播種し、37°C、5%CO₂ 下で vascular endothelial growth factor (VEGF)、fibroblast growth factor-2 (FGF2)、epidermal growth factor (EGF)、insulin-like growth factor-1 (IGF1)、アスコルビン酸を含む EGM2 (Clonetics) に 5% fetal bovine serum (FBS) を加えた培地で培養した。播種後 5 日目に 10%以下の細胞は培養皿に接着したが、90%は接着しないままであった。非接着細胞を phosphate buffered saline (PBS) で洗浄して取り除き、接着細胞を EPC として上記培地で 6 日目まで培養した。

ヒト末梢血由来 EPC の特徴

EPC の表現形を確認するために、接着した単核球に 10 $\mu\text{g/ml}$ の 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate 標識アセチル化 LDL (DiI-acLDL、Biomedical Technologies) を加えて 37°C で 1 時間培養した。その後、細胞を 2%ホルムアルデヒドで 10 分間固定し、10 $\mu\text{g/ml}$ の FITC 標識 *Ulex europaeus* agglutinin (lectin、Sigma) で 1 時間培養した。染色後、倒立蛍光顕微鏡 (Nikon) で観察し、2 重染色陽性の細胞を EPC と同定した。95%以上の細胞は、DiI-acLDL と *Ulex*-lectin 共に陽性であった。

ヒト臍帯血由来EPCの分離

以下の実験は、東海大学研究倫理委員会と東海大学臍帯血バンクで承認され、全ての臍帯血提供者から同意を得て行った。ヒト臍帯血からHistopaque-1077を用いて比重

分離法により単核球を分離した。CD133陽性細胞は磁性マイクロビーズで標識したCD133抗体 (Miltenyi Biotec) を用いて磁性細胞分離機 (auto-MACS、Miltenyi Biotec) により精製した。CD133陽性細胞の純度をフローサイトメーター (BD Biosciences) を用いて検討したところ、精製した細胞ではCD133の発現率は99%であった。精製したCD133陽性細胞は凍結溶液 (CELLBANKER、Zenoaq) に入れて液体窒素内で保管した。

EPCの増幅培養と分化培養

CD133陽性細胞の生体外培養方法は以下の通りである。3 x 10⁵のCD133陽性細胞を無血清で50 ng/ml VEGF (R&D Systems)、20 ng/ml interleukin-6 (R&D Systems)、100 ng/ml stem cell factor (SCF) (Kirin)、20 ng/ml thrombopoietin (TPO) (Wako)、100 ng/ml fms-related tyrosine kinase 3 (Flt-3) ligand (Wako) と1% Penicillin/Streptomycin (Invitrogen) を加えたStem Span溶液 (StemCell Technologies) に入れて37°C、5%CO₂ インキュベーター内で7日間培養した。その後細胞を回収し、以下の分化培地で培養した。細胞は100 µg/ml ヒトファイブロネクチン (GIBCO) でコートしたM199培地 (GIBCO) に5% FBS (JRH) とEGM2、10% dextran (MW 100,000-200,000、Sigma-Aldrich) を加えて培養した。

ヒト臍帯血由来 EPC の特徴

ヒト臍帯血由来 CD133 陽性細胞を 1 週間培養した EPC は 99%以上浮遊している細胞であった。フローサイトメトリーで細胞表面抗原の発現率を解析すると、未分化マーカーである CD133、CD34、c-Kit はそれぞれ 40.0%、50.2%、46.9%であり、内皮マーカーである PECAM-1、KDR、VE-cadherin の発現率は 88.7%、0.97%、0.70%であった。また CD34/CD133、KDR/CD133、PECAM-1/CD133 の発現率は 30.2%、0.28%、34.7%であった。この細胞を分化培地でさらに 2 日間培養すると CD133、CD34、c-Kit の発現はいずれも減少し、一方 KDR、VE-cadherin は増大した。これらの所見は、生体外

で増幅・培養した EPC は内皮細胞に分化する能力を持っていることを示している。

3-2. 流れ負荷実験

回転円盤型流れ負荷装置を用いて層流性のずり応力を細胞に負荷した (図 3-1)。培養 EPC を含んだ培養皿を装置の台座に置き、ステンレス製の円盤を培養皿の培養液中に沈めた。円盤を回転させると培養液が同心円状に流れ、それによって細胞にずり応力が負荷される。ずり応力の強さ (τ) は、 $\tau = \mu r \omega / d$ で計算される (69)。ここで、 μ は粘度を、 r は培養皿の中心からの距離を、 ω は回転角速度を、 d は回転円盤と培養皿との距離を表す。細胞には培養皿の中心からの距離に依存したずり応力がかかるが、本論文では培養皿の中心と辺縁との中間地点でのずり応力を示した。なお、全ての流れ負荷実験は CO₂ インキュベーター内 37°C で行なった。

灌流液の粘度を変えると同じ流速でも異なる強さのずり応力を細胞に負荷することができる。今回は低粘度の灌流液として培養液そのものを、高粘度の灌流液として培養液に 5%あるいは 10% dextran を加えた液を用いた。それらの灌流液の粘度はそれぞれ 0.0095、0.0378、0.0794 Poise であった。

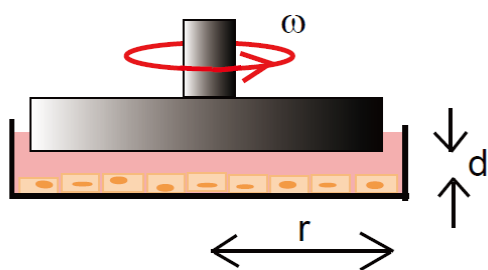


図 3-1. 回転円盤型流れ負荷装置

円盤を回転させると培養液に同心円状の流れが生じ、それによって細胞に層流性のずり応力が負荷される。

3-3. 細胞機能解析

接着能

2×10^4 の EPC をヒトファイブロネクチンでコートした 96 ウェル培養皿に 1% FBS と 10% dextran を加えた M199 培地で培養した。37°C、5%CO₂ インキュベーター内で培養 5 時間後に接着していない細胞を PBS で 2 回除去し、接着した細胞を光学顕微鏡で観察し接着細胞数を測定した。

遊走能

改良型 Boyden chamber 法により細胞の遊走能の解析を行った。ヒトファイブロネクチンでコートした多孔 (5 μ m) を有する polycarbonate membrane がついた 24 ウェルのトランスウェル (Corning Costar) を用いた。10% dextran 入りの M199 培養液を下部チャンバーに入れ、 5×10^4 の EPC を上部チャンバーに入れて 37°C、5%CO₂ インキュベーター内で培養した。上部チャンバーからメンブレンを通して遊走した細胞をジエチルアミノフェニルインドール (DAPI) を含んだ VECTASHIELD (Vector) で固定し、蛍光顕微鏡 (IX70、Olympus) で遊走細胞数を測定した。

増殖能

増殖能の評価にはミトコンドリア脱水素酵素によるテトラゾリウム塩のホルマザン色素への変換を ELISA で測定する方法を用いた。簡潔に述べると、 1×10^5 の EPC をヒトファイブロネクチンでコートした 96 ウェルに播種し、5% FBS と 10% dextran を加えた M199 培地で 24 時間培養した。その後、細胞増殖溶液 WST8 (Roche Applied Science) を加えて培養し、5 時間後に SpectraMax 250 microplate reader (Molecular Devices) を用いて 450 nm の吸光度を測定し、Softmax Pro (Molecular Devices) で増殖能を解析した。

アポトーシス能

5% FBSと10% dextranを加えたM199に0.3mM H₂O₂を添加した培地中でEPCを培養した。24時間後にcell death detection ELISAPLUS kit (Roche Diagnostics) を用いてアポトーシスによって断片化されたDNA量をELISAで定量した。

3-4. 蛋白定量法

フローサイトメトリー

EPCを冷PBSで洗浄後、1% FcR blocking溶液 (MACS) 、2mM EDTAと0.2% FBSを含んだPBSに4°Cで30分間固定した。以下の細胞表面抗原に対するモノクローナル抗体を加えて4°Cで30分間細胞を染色した。CD31 (PECAM-1) (Becton Dickinson) 、CD34 (Becton Dickinson) 、CD117 (c-Kit) (MACS) 、CD133 (MACS) 、CD144 (VE-cadherin) (Beckman Coulter) 、CD202b (Tie2) (R&D)、CD309 (KDR) (R&D)、Flt1 (R&D) 。2mM EDTAと0.2% FBSを含んだPBSで2回洗浄後、細胞表面の蛋白発現率をフローサイトメトリーとCellQuest (Becton Dickinson) で解析した。

ウェスタンブロット解析

EPC を冷 PBS で洗浄後、Protease inhibitor cocktail (Sigma) を含んだ CellLytic (Sigma) に溶解し、26,000x g で 30 分間遠心し上清を使用した。上清に SDS sample buffer (0.2mM Tris·HCl 、 pH 8.8 、 18% glycerol 、 4% SDS 、 0.01% bromphenol blue 、 10% beta-mercaptoethanol) を加えて SDS ポリアクリルアミドゲルで電気泳動した。その後ゲルを Immobilon polyvinylidene difluoride membrane (Millipore) に転写し、5% skim milk と 0.1% Tween 20 を含んだ Tris-buffered saline で固定した。その後 ephrinB2 抗体 (Santa Cruz Biotechnology)、β アクチン抗体 (Abcam) を用いて室温、1 時間インキュベーションした。その後メンブレンを 0.05% Tween 20 を含んだ PBS で洗浄し、HRP 標識抗体 (Amersham) を用いて室温で 1 時間インキュベーションした。洗浄後、HRP 反応は enhanced chemiluminescence kit (Amersham) を用い、GS525 Molecular Imager System (Bio-Rad) で解析した。相対的なシグナルの定量は、ephrinB2 のシグナルを β アク

チンのシグナルで標準化することで行った。

3-5. 遺伝子解析

ヒト ephrinB2 DNA のクローニングとシーケンス

ヒト ephrinB2 遺伝子のエクソン 1 を含む 583 塩基の cDNA を random primer labeling kit (Takara) を用いて [α - 32 P] dCTP で標識した。1.2 \times 10⁶ 個のファージを含んだヒトゲノムライブラリー (Clontech) を Hybond-N nylon membrane (Amersham) に転写した。5 \times saline-sodium phosphate-EDTA、5 \times Denhardt solution、0.5% SDS、10% dextran sulfate、0.25 mg/ml salmon testis DNA で 65 $^{\circ}$ C、4 時間プレハイブリ後、放射性物質で標識した ephrinB2 プローブを加えて 65 $^{\circ}$ C、24 時間ハイブリした。陽性クローンを X 線フィルムに感光することにより同定した。陽性クローンから DNA を精製し、NheI と NsbI で制限酵素処理し、NheI と SmaI で pGL3-enhancer vector (Promega) にサブクローニングした。塩基配列は DNA sequencer (373S-36、Applied Biosystems) で決定し、Genbank (accession number AL442127) で確認した。その DNA は転写開始点から上流 3940 塩基を含んでいた (-3940 luc)。

Sp1 変異配列の合成

Sp1 結合部位に変異を持つ 112 塩基のオリゴヌクレオチド (-106~-1)
(5'-CGCGTGACCGGCCGTCCAACCAGCGCGCGGCCGCGGAGCCGCGGGCCAATG
GGCTTCGCGCGGCGGTTCGGGGCCCCGCGTTTATAGCGCTCTGACAGCGCGGCGG
CCGCA-3') をアニーリングし、MluI と BglII で pGL3-enhancer に遺伝子導入した (Sp1 mut)。変異配列はシーケンスにより確かめた。

リアルタイム PCR

RNeasy Mini Kit (Qiagen) あるいは ISOGEN (Nippon Gene) を用いて細胞から Total RNA を抽出し、PrimeScript RT reagent Kit (Takara) あるいは Transcriptor First Strand

表3-1. リアルタイムPCR用プライマーとプローブ

遺伝子	オリゴヌクレオチド配列、5'-3'
Flt1	Fwd: GCATGATGGGAATAGGGAGACA
	Rev: CCAAGGCCCACTTGATCTTTAG
	Prb: AGGAAAGGGCGCCTACTCTTCAGG
GAPDH ¹	Fwd: GGTGGTCTCCTCTGACTTCAACA
	Rev: GTGGTCGTTGAGGGCAATG
	Prb: ACACCCACTCCTCCACCTTTGACG
ephrinB2	Fwd: AGATGTTCCGGCGTTTATTTT
	Rev: GGAGCCACAGCTAAATCGTCA
Notch1	Fwd: CACGCGGATTAATTTGCATCTG
	Rev: TCTTGGCATACACACTCCGAGAAC
Notch3	Fwd: TCCCAGTGAGCACCTTACCT
	Rev: GCGTGGATTCCGACCAGTCT
Hey1	Fwd: CAAACTGTTGGTGGCCTGAA
	Rev: ACCTAACCTATCAGCGGTCTC
Hey2	Fwd: ATGGACCGTACCATCCAGCA
	Rev: CCTAAGCTCAGGCACTTACGAAAC
ALK1	Fwd: GGACTGACATCTGGGCCTTTG
	Rev: TCATTGGGCACCACATCATAGAA
EphB4	Fwd: AGAGGCCGTACTGGGACATGAG
	Rev: TCCAGCATGAGCTGGTGGAG
NRP2	Fwd: ATCACTGCTGTGGAAGCCAGAG
	Rev: TCGGATGTCAGGGGTGTCATAG
GAPDH ²	Fwd: GCACCGTCAAGGCTGAGAAC
	Rev: ATGGTGGTGAAGACGCCAGT

Fwd, forward; Rev, reverse; Prb, probe, 5'-FAM, 3'-BHQ.

GAPDH¹はTaqMan Fast Universal PCR Master Mix用であり

GAPDH²はTakara EX Taq R-PCR kit用である。

cDNA Synthesis Kit (Roche) で逆転写して cDNA を作成した。リアルタイム PCR には 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) あるいは Smart Cycler (Cepheid) を用いた。PCRはTaqMan Fast Universal PCR Master Mix と SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) あるいは Takara EX Taq R-PCR kit (Takara) を使用し、プライマーと TaqMan プローブは以下の通りである。KDR、VE-cadherin、Tie2 のプライマーとプローブは Applied Biosystems から購入し、Flt1、ephrinB2、Notch1、Notch3、Hey1、Hey2、ALK1、EphB4、NRP2、glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) は表 3-1 のように作成した。温度設定は、95°C20 秒間あるいは 30 秒間の最初の DNA 解離後、95°C3 秒あるいは 5 秒の解離と 62°C30 秒のアニーリング・伸長反応を 40 サイ

クル行い、60°Cあるいは85°Cで蛍光値をモニターした。増幅反応の特異度は定量曲線解析と融解曲線解析を行なうことにより決定した。相対的なシグナルの定量は、それぞれの遺伝子のシグナルを GAPDH のシグナルで標準化することにより得られた。

mRNA 安定化

EPC を静的条件あるいは 1.25 dynes/cm² の流れずり応力を 24 時間負荷した後に 5 µg/ml アクチノマイシン D で処理した。その後 ephrinB2 の mRNA 濃度の変化を競合的 PCR で測定した。

ルシフェラーゼアッセイ

ephrinB2 プロモーターを含むリポータープラスミドを転写アッセイに使用した。デリーションアッセイは、ephrinB2 遺伝子の 5'側配列を制限酵素処理して pGL3-enhancer vector にサブクローンし、以下のコンストラクト (-1434 luc、-478 luc、-252 luc、-106 luc) を得た。-1434 luc : SpeI と Bgl II で ephrinB2 上流領域の 1484 塩基 (-1434~+49) を消化し、NheI と Bgl II で pGL3-enhancer に遺伝子導入した。-478 luc : SacI と HindIII で ephrinB2 上流領域の 528 塩基 (-478~+49) を消化し、pGL3-enhancer に遺伝子導入した。-252 luc : SmaI と HindIII で ephrinB2 上流領域の 302 塩基 (-252~+49) を消化し、pGL3-enhancer に遺伝子導入した。-106 luc : CpoI と HindIII で ephrinB2 上流領域の 156 塩基 (-106~+49) を消化し、SmaI と HindIII で pGL3-enhancer に遺伝子導入した。コンストラクトは、LipofectAMINE PLUS (GIBCO) を使用して培養ウシ内皮細胞に遺伝子導入し、導入効率を標準化するために phRL-TK vector (Promega) を一緒に遺伝子導入した。24 時間後、静的条件あるいは流れずり応力を 6 時間細胞に負荷し、dual-luciferase reporter assay system (Promega) と luminometer (Berthold) でルシフェラーゼ活性を測定した。

ランオンアッセイ

EPC から得た核抽出物を $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ を含む反応溶液で反応させ、 ^{32}P で標識した RNA を抽出した。ephrinB2 あるいは β アクチン遺伝子 (Clontech) を含むプラスミドをナイロンメンブレンにスポットし、その DNA を標識 RNA にハイブリさせ、GS525 Molecular Imager System (Bio-Rad) で解析した。

ゲルシフトアッセイ

ゲルシフトアッセイは EPC から得た核抽出物を使用して行なわれた。Sp1 共通配列を含むオリゴヌクレオチド (5'-GCGGCGGGGCGGGGCCCGCG-3') あるいは Sp1 変異配列を含むオリゴヌクレオチド (5'-GCGGCGGTTCGGGGGCCCGCG-3') を T4 polynucleotide kinase と $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ で標識した。放射性物質で標識したオリゴヌクレオチドと 2.5 μg の核抽出蛋白との結合反応を、計 10 μl の binding buffer [10 mM Tris·HCl、50 mM NaCl、1 mM MgCl_2 、0.5 mM EDTA、4% glycerol、0.5 mM DTT、0.05 mg/ml poly(dI-dC)]、22°C で進行させ、反応混合物を 0.5x Tris·HCl-boric acid-EDTA buffer (45 mM Tris·HCl、45 mM boric acid、1 mM EDTA; pH 8.3) を加えた 4.7% PAGE で 350V、1 時間 4°C で分離した。蛋白-DNA 複合体は GS525 molecular imager system (Bio-Rad) で解析した。スーパーシフトアッセイでは、Sp1 抗体 (Santa Cruz Biotechnology) を結合反応に加えてゲルシフトアッセイを行った。

クロマチン免疫沈降

1×10^6 個の細胞を 1%ホルムアルデヒドで室温、10 分間固定した後、細胞を冷 PBS で洗浄して遠心し、溶解液 (1% SDS、10 mM EDTA、1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride、1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ leupeptin、1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ aprotinin、50 mM Tris·HCl; pH 8.1) で溶解し、超音波処理を 10 秒間 4 回行なった。遠心した後に上澄みを回収し、10 倍量の dilution buffer (0.01% SDS、1.1% Triton X-100、1.2 mM EDTA、167 mM NaCl、1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride、1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ leupeptin、1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ aprotinin、16.7 mM Tris·HCl; pH 8.1) に溶解した。非特異的なバックグラウンドをなくすために、75 μl の protein A-Agarose/salmon sperm

DNA を 30 分間 4°C でインキュベーションした。上澄み液 20 μ l 分を Input (ポジコン) としてクロマチン免疫沈降 (ChIP) 前に分注した。Sp1 抗体 (Santa Cruz Biotechnology) で一昼夜、4°C で回転しながら免疫沈降を行なった。ビーズを遠心してペレットにし、以下の溶液で順次洗浄した。low-salt buffer (0.1% SDS、1% Triton X-100、2 mM EDTA、150 mM NaCl、20 mM Tris·HCl; pH 8.1)、high-salt buffer (0.1% SDS、1% Triton X-100、2 mM EDTA、500 mM NaCl、20 mM Tris·HCl; pH 8.1)、LiCl wash buffer (0.25 mM LiCl、1% IGEPAL-CA630、1% sodium deoxycholate、1 mM EDTA、10 mM Tris·HCl; pH 8.1)。沈降したビーズを Tris·HCl-EDTA buffer (1 mM EDTA、10 mM Tris·HCl; pH 8.0) で 2 回洗浄後、1% SDS/0.1 M NaHCO₃ に溶解し、ホルムアルデヒド固定を解除するために 4 時間 65°C で温めた。上澄み液に 20 μ g/ml proteinase K を加えて 1 時間、45°C でインキュベーション後、ゲノム DNA 断片を回収した。Ex Taq polymerase (Takara) と、Sp1 結合部位を含む ephrinB2 プロモーター部位を増幅するプライマー (5'-ACCCAATGTCGGGAGGGGATG-3'、5'-AGCGAGGAGCTGCGCACGCAG-3') で PCR を施行した。Mock サンプルはクロマチンの代わりに dilution buffer を使用した。

3-6. 統計解析

全ての結果は平均 \pm 標準偏差として表記した。統計学的有意は ANOVA で計算し、Bonferonni 補正は SPSS ソフトウェアで行なった。Student *t*-test の結果、0.05 未満の *P* 値を統計学的に有意であるとした。

4. 結果

4-1. 流れずり応力が末梢血由来 EPC の動静脈分化に及ぼす効果

4-1-1. 動静脈内皮マーカーの遺伝子発現変化

EPC が流れずり応力の影響を受けて最終的に動脈内皮あるいは静脈内皮のどちらかに分化していくのかをヒト末梢血由来 EPC を用いて検討した。培養 EPC を 1.25 dynes/cm² の流れずり応力で 6 時間あるいは 24 時間負荷し、動脈内皮マーカーである ephrinB2、Notch1/3、Hey1/2、ALK1 と静脈内皮マーカーである EphB4、NRP2 の mRNA レベルの変化をリアルタイム PCR で解析した。ずり応力の負荷時間による反応の違いは見られるが、動脈内皮マーカーの mRNA 発現レベルはいずれも増加した。一方、静脈内皮マーカーの EphB4 はずり応力負荷 6 時間、24 時間とも、NRP2 は 24 時間で mRNA レベルは減少した (図 4-1-1)。

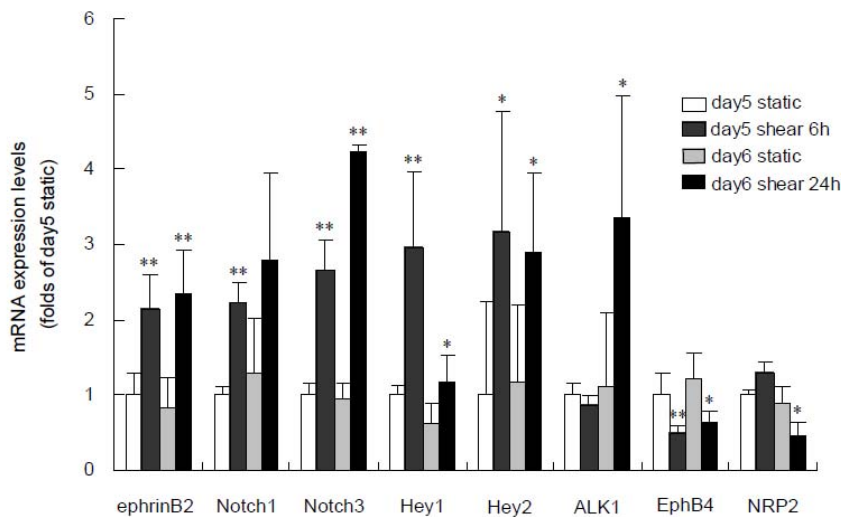
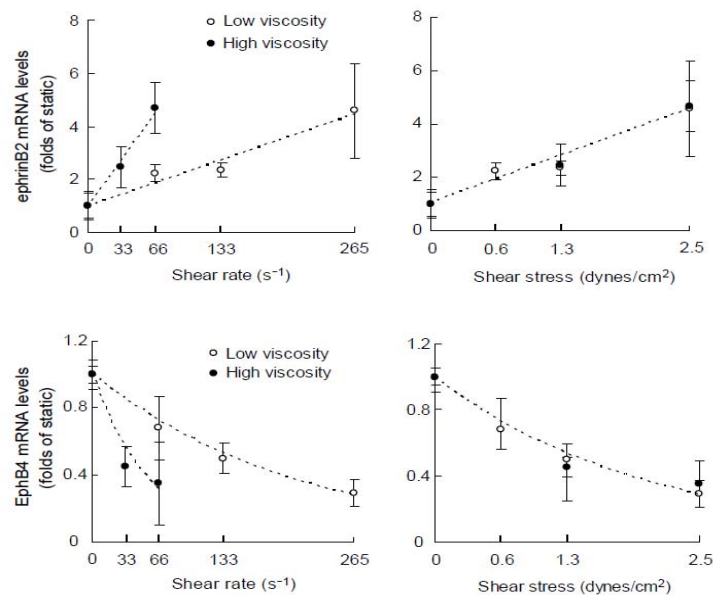


図 4-1-1. 流れずり応力が動静脈内皮マーカーの遺伝子発現レベルに及ぼす効果

EPC を静的条件下 (day5 static、day6 static) あるいは 1.25 dynes/cm² の流れずり応力で 6 時間 (day5 shear 6h) あるいは 24 時間 (day6 shear 24h) 負荷しながら培養し、リアルタイム PCR で mRNA の発現レベルの変化を定量した。流れずり応力により動脈内皮マーカーである ephrinB2、Notch1/3、Hey1/2、ALK1 の遺伝子発現レベルはいずれも増大し、一方、静脈内皮マーカーである EphB4 と NRP2 の遺伝子発現レベルは減少した。数値は平均±標準偏差である (n = 5、**P < 0.01, *P < 0.05 vs. 静的条件)。

4-1-2. 流れ負荷による ephrinB2 と EphB4 の発現変化におけるずり応力依存性

ephrinB2 と EphB4 の遺伝子発現に及ぼすずり速度とずり応力の効果を区別するために EPC に異なる粘度を持つ 2 種類の培養液で流れを負荷した。ずり速度が増加するにしたがって ephrinB2 の mRNA レベルは増加し、一方、EphB4 の mRNA レベルは減少した (図 4-1-2. パネル左)。しかし粘度の高い培養液と低い培養液で反応の大きさが異なり、常に粘度の高い培養液の方が、すなわち流れずり応力の大きい方が ephrinB2 の mRNA の増加と EphB4 の mRNA の減少の度合いが大きくなった。他方、横軸にずり応力をとると粘度の高い培養液と低い培養液で ephrinB2 と EphB4 の mRNA の発現レベルに違いは見られなかった (図 4-2. パネル右)。これらの結果は流れ負荷による ephrinB2 および EphB4 の遺伝子応答はずり速度より流れずり応力に依存する事を示している。



4-1-2. 流れ負荷による ephrinB2 と EphB4 の発現変化におけるずり応力依存性

上段は ephrinB2、下段は EphB4 の mRNA の発現変化を示している。左列はずり速度を横軸に、右列はずり応力を横軸にとり、縦軸は mRNA の発現変化をプロットした。ずり速度が増大するにつれて ephrinB2 の mRNA レベルは上昇し、EphB4 のそれは低下したが、同じずり速度ではその変化は高粘度の方が大きかった。一方、流れずり応力を横軸にすると粘度の違いに関わらず mRNA の変化は同じ曲線を描いた。曲線はマイクロソフト社のマイクロソフト・エクセル・ソフトウェアの近似曲線で描いた。数値は平均±標準偏差 (n = 3)。

4-1-3. ずり応力による ephrinB2 蛋白の発現変化

EPC に 1.25 dynes/cm^2 のずり応力を 12 時間あるいは 24 時間負荷し、ephrinB2 蛋白の発現変化をウェスタンブロットで解析した。ephrinB2 蛋白レベルはずり応力開始 12 時間後に増加し始め、流れ負荷 24 時間後には約 3 倍に増加した (図 4-1-3、A と B)。

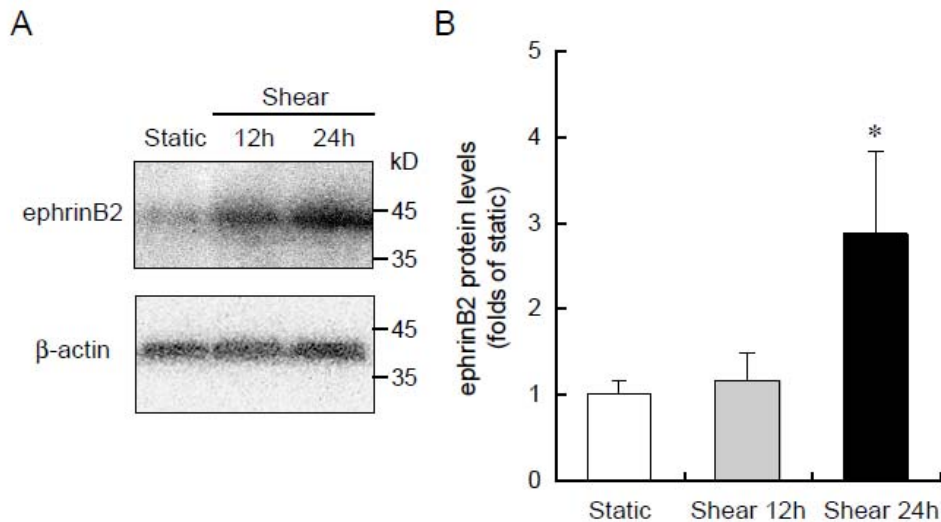


図 4-1-3. 流れずり応力が ephrinB2 の蛋白発現レベルに及ぼす効果

A. ウェスタンブロッティング。上段は ephrinB2 のバンドを示し、下段は β アクチンのバンドを示す。B. デンシトメトリーによる定量評価。ephrinB2 バンドの濃度を内部標準の β アクチンで補正した。流れずり応力は ephrinB2 の蛋白発現レベルを増加させた。数値は平均 \pm 標準偏差 ($n = 5$, $*P < 0.01$ vs. 静的条件)。

4-1-4. ずり応力による ephrinB2 遺伝子の発現調節機構

ずり応力が ephrinB2 の転写に影響を及ぼすかどうかを検討するためにランオンアッセイを行った。細胞に 1.25 dynes/cm^2 のずり応力を 24 時間負荷すると、ephrinB2 の転写は静的条件と比較して有意に増加したが、 β アクチンの転写レベルには影響しなかった (図 4-1-4、A と B)。

次いで、ずり応力が ephrinB2 の mRNA の安定化に影響するかについてアクチノマイシン D 処理後の細胞における ephrinB2 の mRNA レベルの変化を競合的 PCR で測定

する方法で検討した。その結果、ずり応力は ephrinB2 の mRNA 分解速度に影響を及ぼさないことが示された (図 4-1-4C)。

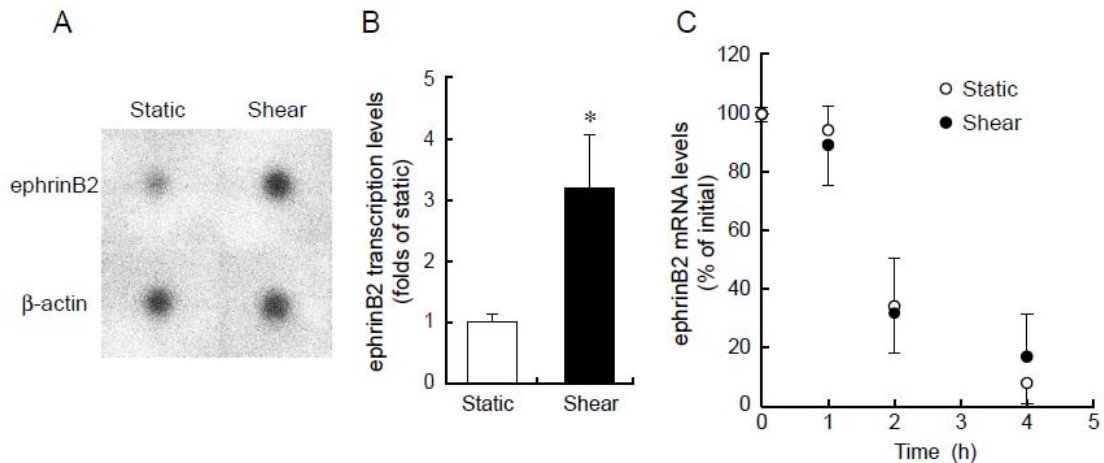


図 4-1-4. 流れずり応力が ephrinB2 遺伝子の転写と mRNA の安定化に及ぼす効果

A. 静的条件下あるいは 1.25 dynes/cm^2 のずり応力を 24 時間負荷した EPC から核蛋白を抽出し、ランオンアッセイで ephrinB2 遺伝子と β アクチン遺伝子の転写活性を解析した。ずり応力は ephrinB2 遺伝子の転写を増大させたが内部標準の β アクチンの転写には変化を及ぼさなかった。B. ephrinB2 遺伝子の転写活性の定量化。数値は平均 \pm 標準偏差 ($n = 3$, $*P < 0.01$ vs. 静的条件)。C. 静的条件下あるいは 1.25 dynes/cm^2 のずり応力を 24 時間負荷した EPC をアクチノマイシン D 処理した。1、2、4 時間後に細胞を回収して競合的 PCR で ephrinB2 の mRNA の発現変化を定量した。静的条件とずり応力負荷では ephrinB2 の mRNA の分解速度に違いを認めなかった。数値は平均 \pm 標準偏差 ($n = 3$)。

さらに ephrinB2 の転写に及ぼすずり応力の影響を確認するためにルシフェラーゼアッセイを行った。ずり応力を負荷するとルシフェラーゼ活性が静的条件より明らかに上昇した (図 4-1-5、-3940 luc)。ランオンアッセイとルシフェラーゼアッセイの 2 つの実験結果からずり応力が ephrinB2 の転写を促進することが示された。

次に ephrinB2 遺伝子のプロモーター上に存在すると思われるずり応力応答配列を同定するために deletion analysis を行なった。ephrinB2 プロモーターの長さを短くしたコンストラクト (-1434 luc、-478 luc、-252 luc、-106 luc) を作製し、それらを使った

ルシフェラーゼアッセイを実施した。その結果、全てのコンストラクトにおいてずり応力による転写促進効果が観察された（図 4-1-5）。この事はずり応力応答配列が転写開始点より 5'上流 106 塩基内にある事を示唆している。その領域内の転写開始点 5'上流-51~-31 塩基にある転写因子 Sp1 の結合モチーフに変異を入れてルシフェラーゼアッセイを行なったところ、basal な転写とずり応力による転写の亢進がともに消失するのが観察された（図 4-1-5、Sp1 mut）この結果は Sp1 結合モチーフが ephrinB2 の basal な転写に必須な役割を果たすとともに、ずり応力応答配列としても働いている事を示している。

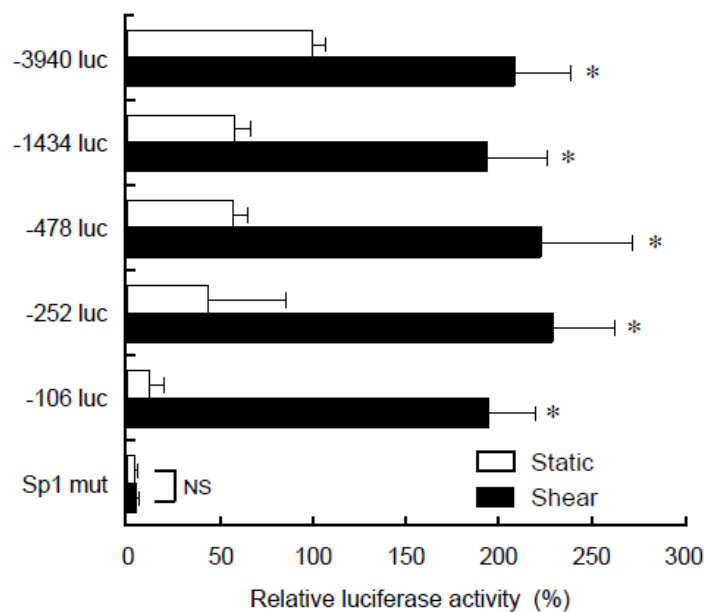


図 4-1-5. ephrinB2 遺伝子のルシフェラーゼアッセイによる転写解析

ヒト ephrinB2 プロモーターを含むリポータープラスミドを導入したウシ内皮細胞にずり応力を負荷して培養し転写活性をルシフェラーゼアッセイで解析した。横軸は静的条件下の -3940 luc に対するルシフェラーゼ活性を表す。ずり応力は全てのコンストラクトで転写活性を増大させた (-3940 luc、-1434 luc、-478 luc、-252 luc、-106 luc)。転写開始点 5'上流-51 bp と-31 bp の間にある Sp1 結合配列 (Sp1 mut) に変異を入れると基本転写とずり応力による転写促進は消失した。数値は平均±標準偏差 (n = 3、*P < 0.01 vs. 静的条件下-3940 luc)。NS は有意差なし。

ずり応力を負荷した細胞で、この Sp1 結合モチーフに結合する転写因子を同定するためにゲルシフトアッセイを行なった。静的条件あるいは流れずり応力を負荷した細胞から得た核蛋白と放射性同位元素で標識した Sp1 結合モチーフを含むオリゴヌクレオチドを反応させたところ、ずり応力負荷で明瞭な蛋白-DNA 複合体が形成された (図 4-1-6)。こうした蛋白-DNA 複合体は Sp1 の結合モチーフに変異を入れると形成されなかった。また、Sp1 の抗体は蛋白-DNA 複合体のバンドシフトを引き起こした。

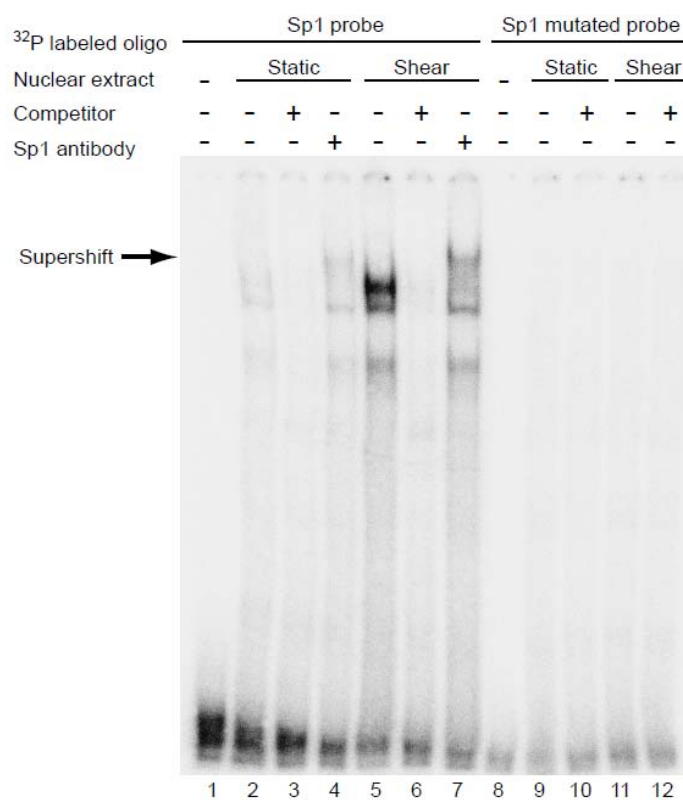


図 4-1-6. ゲルシフトアッセイによる転写因子の解析

Sp1 認識配列 (レーン 1~7) あるいは Sp1 変異配列 (8~12) を含むオリゴヌクレオチドと、静的条件下の EPC (レーン 2、3、4、9、10) あるいは 1.25 dynes/cm² の流れずり応力を 24 時間負荷した EPC (レーン 5、6、7、11、12) から抽出した核蛋白が複合体を形成するかどうかを検討した。レーン 1 と 8 には核蛋白を加えず、レーン 3、6、10、12 には競合反応として 500 倍量の非標識塩基 (Competitor) を加え、レーン 4 と 7 には Sp1 抗体をそれぞれ加えた。矢印は蛋白 DNA 複合体を表すバンドの遷移を示す。流れずり応力は蛋白 DNA 複合体 (レーン 2 対 5) のバンド量を増加させた。Sp1 抗体を加えると、静的条件 (レーン 2) と流れずり応力を負荷した (レーン 5) 細胞で認められるバンドが遷移した (レーン 4 と 7)。Sp1 認識配列の変異は蛋白 DNA 複合体 (レーン 9 と 11) のバンドを消失させた。同様の実験を 3 回行ない同様の結果を得た。

さらに Sp1 が実際に ephrinB2 遺伝子のプロモーターにある Sp1 モチーフに結合しているかを確認するためにクロマチン免疫沈降法を行った。静的条件下あるいは 1.25 dynes/cm² の流れずり応力を 24 時間負荷した EPC の染色体 DNA から Sp1 抗体で免疫沈降したものをテンプレートとして Sp1 モチーフの塩基配列に対応したプライマーを使って PCR 増幅した。その結果、Sp1 が結合している部位は ephrinB2 プロモーターにある Sp1 モチーフであることが示された (図 4-1-7)。これらの所見は流れずり応力により Sp1 が ephrinB2 遺伝子のプロモーターにある Sp1 モチーフに結合することで ephrinB2 の転写が促進されることを示している。

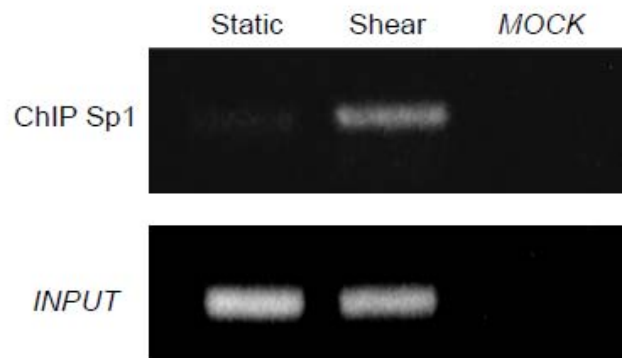


図 4-1-7. クロマチン免疫沈降法による転写因子 Sp1 の結合プロモーター部位の決定
静的条件下あるいは 1.25 dynes/cm² の流れずり応力を 24 時間負荷した EPC から得たクロマチン抽出物を Sp1 抗体で免疫沈降 (ChIP) した。最終的な DNA 抽出物は Sp1 モチーフを含む ephrinB2 プロモーターの塩基配列のプライマーで増幅された。INPUT はクロマチン溶解液による positive control で、Mock はクロマチンの代わりに dilution buffer を使用した negative control である。全ての実験は 3 回行ない、同様の結果を得た。

4-2. ヒト臍帯血由来 EPC に及ぼす流れずり応力の効果

4-2-1. EPC の接着と遊走、増殖、抗アポトーシス

ヒト臍帯血由来 EPC の接着能、遊走能、増殖能、抗アポトーシスに及ぼす流れずり応力の影響について解析した。2.5 dynes/cm² の流れずり応力を 24 時間負荷した EPC (Flow) を静的条件下の EPC (Static) と比較した。

接着能に関しては、顕微鏡による観察で、ずり応力負荷を受けた EPC は接着数が増え、一部の細胞では形態が丸形から紡錘形に変化する、すなわち spreading する細胞が認められた (図 4-2-1. A)。定量的に評価するとずり応力負荷を受けた EPC の接着数が静的条件下の EPC と比較し有意に増加していた (図 4-2-1. B)。

遊走能に関しては、Boyden chamber を用いた解析で、ずり応力負荷を受けた EPC は静的条件下の EPC に比べて遊走した細胞数が多く、定量的評価では約 3 倍の増加を示した (図 4-2-1. C と D)。

増殖能に関しては、ミトコンドリア脱水素酵素によるテトラゾリウム塩のホルマザン色素への変換を ELISA で定量する方法で検討した。その結果、ずり応力を受けた EPC は静的条件下の EPC と比べて増殖能が明らかに増大することが示された (図 4-2-1. E)。

抗アポトーシスに関しては、H₂O₂ でアポトーシスを誘導して生じる断片化 DNA 量を定量することで解析した。静的条件下の EPC では H₂O₂ 負荷で約 3 倍アポトーシスが誘導されたが、ずり応力を負荷した EPC ではアポトーシスは増加しなかった (図 4-2-1. F)。

以上の結果から、臍帯血由来 EPC も末梢血由来 EPC と同様に流れずり応力に応答することと、ずり応力により接着・遊走能や増殖能およびアポトーシスを防ぐ機能が高まることが示された。

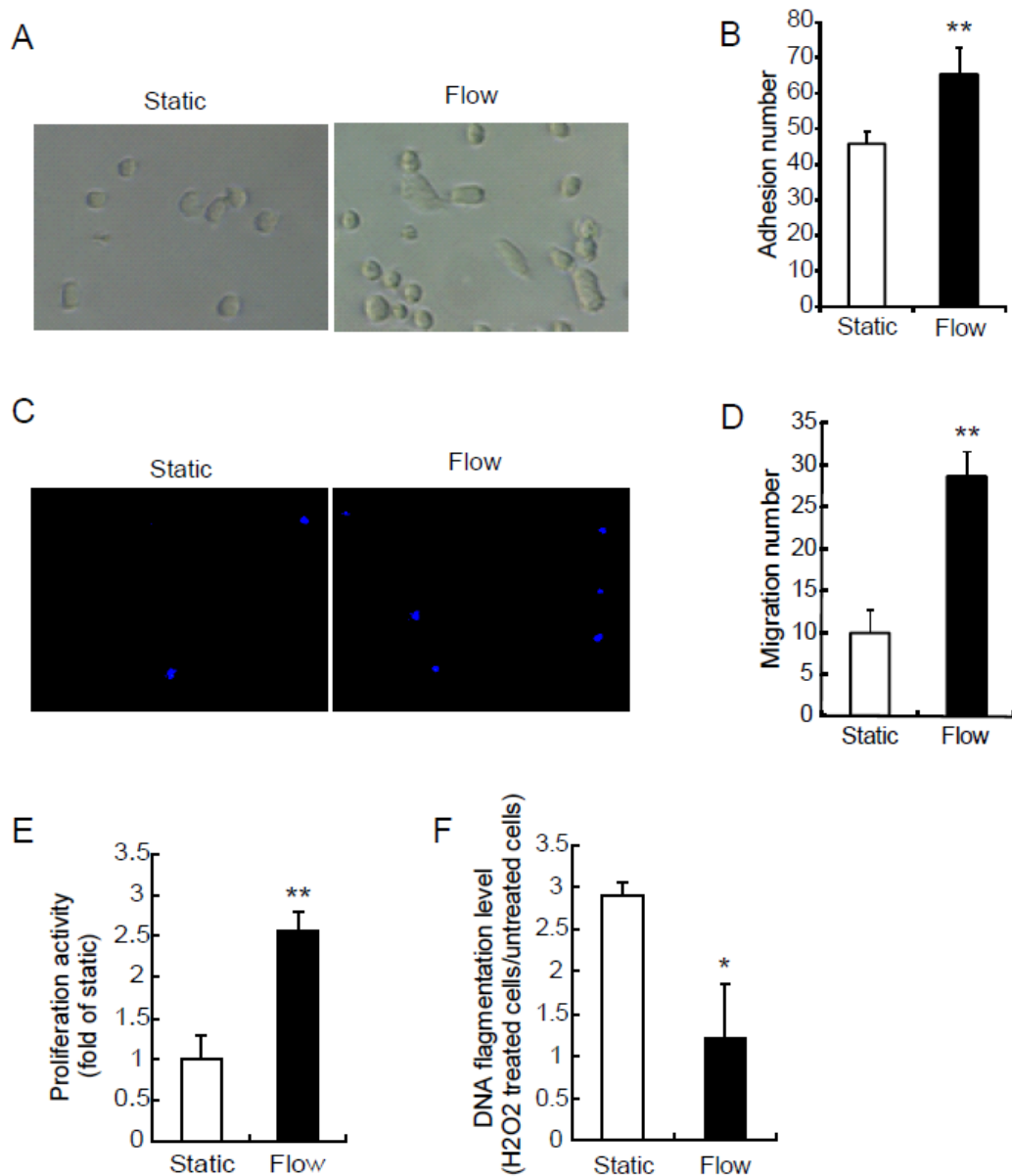


図 4-2-1. 臍帯血由来 EPC の接着、遊走、増殖、抗アポトーシスに及ぼす流れずり応力の効果
 A. 播種 6 時間後の位相差顕微鏡写真。B. 接着細胞数。ずり応力 (2.5dynes/cm^2) を 24 時間負荷した EPC は静的条件下で培養した EPC よりも接着数が増加していた。C. Boyden chamber のフィルターを抜けて遊走した細胞の核を DAPI で染色した蛍光顕微鏡写真。D. 遊走細胞数。ずり応力 (2.5dynes/cm^2) を 24 時間負荷した EPC は静的条件下で培養した EPC よりも遊走数が増加していた。E. 増殖能。ずり応力 (2.5dynes/cm^2) を 24 時間負荷した EPC は静的条件下で培養した EPC よりも増殖能が明らかに亢進した。F. 抗アポトーシス。EPC に $0.3\text{mM H}_2\text{O}_2$ を負荷して 24 時間培養し DNA 断片量を定量した。静的条件の EPC は H_2O_2 負荷により DNA 断片量が約 3 倍に増加したが、ずり応力 (2.5dynes/cm^2) を 24 時間負荷した EPC は H_2O_2 負荷でも DNA 断片量は増加しなかった。数値は平均±標準偏差 (n = 3-5, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ vs. 静的条件)。

4-2-2. 臍帯血由来 EPC の分化に及ぼす流れずり応力の効果

ずり応力が EPC の内皮細胞への分化に及ぼす効果を検討した。静的条件下で培養あるいは流れずり応力 (2.5 dynes/cm²) を 24 時間あるいは 48 時間負荷した EPC の内皮マーカー蛋白の発現の変化をフローサイトメトリーで計測した。その結果、ずり応力を負荷した EPC では、静的条件下の EPC と比べて 24 時間では蛋白の発現は変わらなかったが、流れずり応力を 48 時間負荷した EPC では KDR、Flt1、VE-cadherin、Tie2 の蛋白発現はいずれも増加を示した (図 4-2-2. A)。EPC に 0.25 から 2.5 dynes/cm² の流れずり応力を 48 時間負荷して KDR、Flt1、VE-cadherin、Tie2 の蛋白発現を計測したところ、ずり応力の強さに応答する程度は各蛋白間で異なるが、いずれの蛋白もずり応力の強さに依存した増加を示した (図 4-2-2. B)。

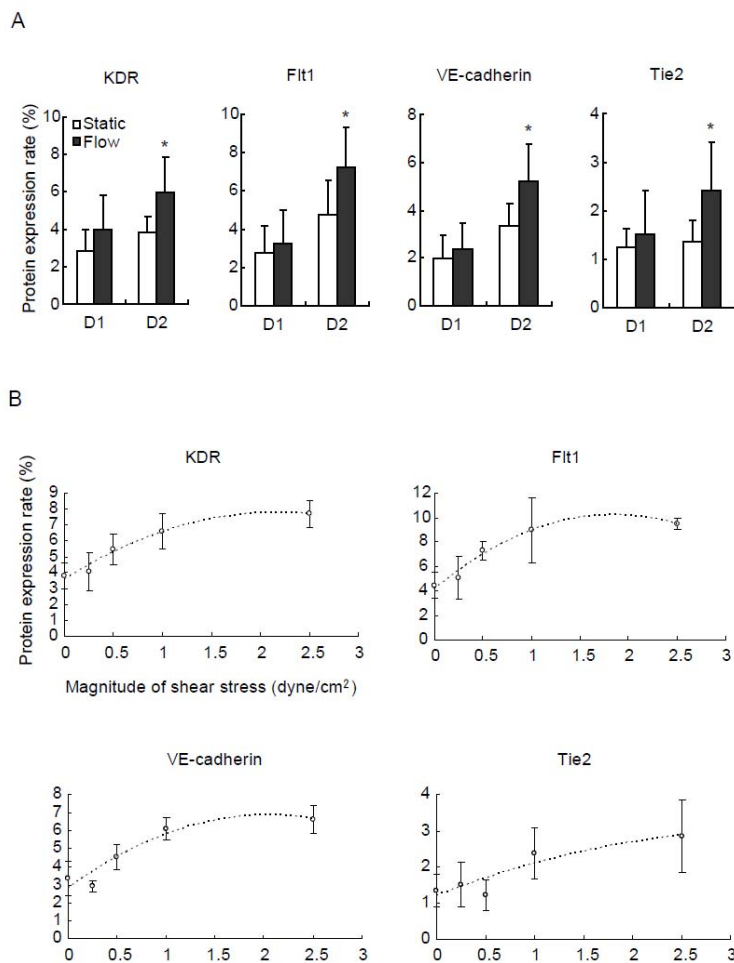


図 4-2-2. 臍帯血由来 EPC の分化に及ぼす流れずり応力の効果
A. 内皮細胞マーカー蛋白の発現の変化。静的条件下の EPC (Static) とずり応力 (2.5 dynes/cm²) を 24 時間あるいは 48 時間負荷した EPC (Flow) の内皮マーカー蛋白の発現をフローサイトメトリーで定量した。ずり応力は KDR、Flt1、VE-cadherin、Tie2 の発現を増加させた。B. ずり応力依存性。ずり応力の強さを段階的に大きくしたときの内皮マーカー蛋白の発現変化を計測した。いずれの蛋白もずり応力の強さに依存した増加を示した。数値は平均±標準偏差 (n = 3-5、**P < 0.01, *P < 0.05 vs. 静的条件)。

次にずり応力が内皮細胞マーカーの遺伝子発現に影響を及ぼすかについてリアルタイム PCR で検討した。その結果、ずり応力 (2.5 dynes/cm²) を 48 時間負荷した EPC では、静的条件下の EPC と比べて KDR、Flt1、VE-cadherin、Tie2 の mRNA 発現レベルがいずれも上昇することが示された (図 4-2-3)。このことから、ずり応力は内皮マーカーの遺伝子発現レベルに影響を及ぼすことで細胞表面の蛋白発現を増加させること、すなわちずり応力には臍帯血由来 EPC を成熟した血管内皮細胞へ分化誘導する作用があると考えられた。

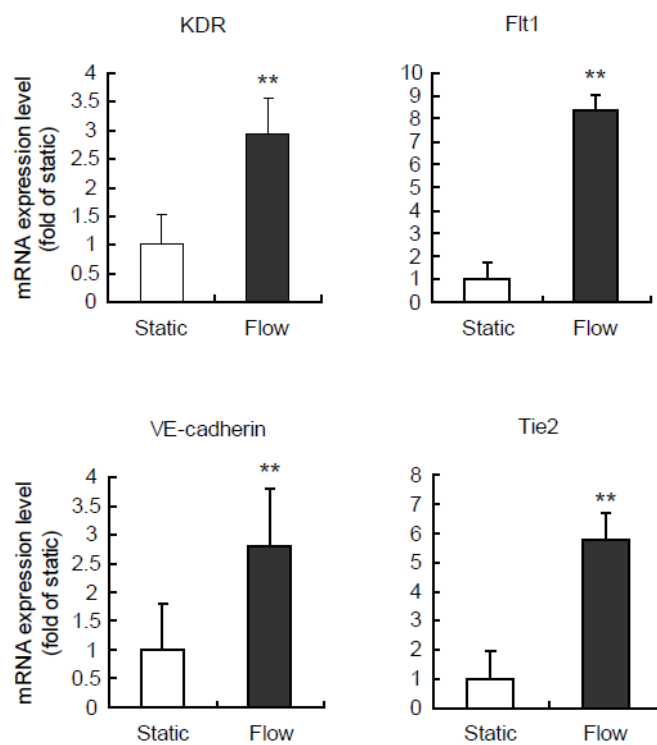


図 4-2-3. 内皮マーカー遺伝子の発現に及ぼす流れずり応力の遺伝子の効果

静的条件下 (Static) あるいはずり応力 (2.5 dynes/cm²) を 48 時間負荷した EPC (Flow) における内皮マーカーの mRNA の発現変化をリアルタイム PCR で検討した。ずり応力を負荷した EPC では、静的条件下の EPC と比べて KDR、Flt1、VE-cadherin、Tie2 の発現がいずれも有意な増加を示した。数値は平均±標準偏差 (n = 5、***P* < 0.01, **P* < 0.05 vs. 静的条件)。

5. 考察

5-1. 流れずり応力による EPC の動脈化

今回の結果はヒト末梢血由来培養 EPC に流れずり応力が作用すると動脈内皮のマーカである ephrinB2、Notch1/3、Hey1/2、ALK1 の発現が増加し、一方、静脈内皮のマーカである EphB4 と NRP2 の発現が減少する事を示した。EPC を静的条件で培養すると時間の経過に伴って成熟内皮細胞のマーカである KDR、Flt-1、VE-cadherin の発現が増加していくが、流れずり応力はこれらのマーカの発現増加をより早期に起こすこと、すなわち成熟内皮細胞への分化を促進する事が報告されている (63,70,71)。これらを併せると、流れずり応力には EPC を成熟した内皮細胞へ、そして静脈ではなく動脈の内皮細胞へ分化を誘導する作用があると考えられる。流れずり応力が細胞の分化に影響を及ぼす事は EPC 以外の細胞でも観察されている。Flk-1 陽性胚性幹細胞や胚性間葉系前駆細胞 (72-74) に流れずり応力が作用すると、両者とも血管内皮細胞へ分化が誘導されることが報告されている。対照的に、HUVEC やヒト冠動脈内皮細胞に流れずり応力が作用すると ephrinB2 遺伝子の発現は減少する (75)。ずり応力というメカニカルストレスによる ephrinB2 遺伝子の発現調節は、成熟した内皮細胞と未分化な細胞では異なるのかもしれない。また、マウスの動脈や HUVEC に伸展張力を負荷すると ephrinB2 遺伝子と蛋白の発現が増加することが報告されている (76)。今回の結果を含め、これまでに得られた研究成果から、胎児や成体における EPC による血管の形成や動静脈分化に生理的環境要因であるメカニカルストレスが重要な役割を果たしていると思われる。

5-2. 流れ刺激はずり応力依存性か、ずり速度依存性か？

内皮細胞に対する流れの効果には 2 つある。1 つは、流速に依存した物質拡散の変化である (77)。ある細胞活性化物質が灌流液に存在すると、その細胞表面への拡散は流速が増加するに従って増加し、細胞をより刺激する効果が生まれる。もう 1 つの

効果は、流れずり応力による物理的な細胞の変形刺激である。2つの効果を区別するには流体の粘性を変える実験が有効である(78)。流れずり応力の強さは流体の粘性とずり速度の積で決まるので、流体の粘性を変えると同じ速度でも異なった強さの流れずり応力を細胞に作用させることができる。流れ刺激による効果がずり速度に依存する場合は、その反応は粘性が異なっても同じであるか、高粘度の場合より低粘度の方が大きいであろう。なぜなら拡散効果は粘性が高くなると低くなるからである。一方、流れ刺激による効果が流れずり応力に依存する場合は、その反応は低粘度より高粘度の方が大きくなる。今回の結果は、後者と一致していた。すなわち、流れ刺激による ephrinB2 mRNA レベルの増大と EphB4 の mRNA レベルの減少の度合いは、同じずり速度では低粘度より高粘度の方が常に大きかった。この事は、流れ刺激による ephrinB2 と EphB4 の mRNA の変化はずり速度よりもずり応力により依存していることを示している。

5-3. ephrinB2 遺伝子の転写制御機構

今回の検討で EPC における流れずり応力による ephrinB2 遺伝子の発現増加は mRNA の安定化ではなく転写の促進に基づいていることが明らかになった。この転写の促進に ephrinB2 遺伝子のプロモーターの転写開始点より 5'上流-51bp~-31bp にある Sp1 結合モチーフ (GGGGCGGGGC) がずり応力応答配列として働いていることが示された。この配列に変異を入れるとずり応力に対する ephrinB2 の転写促進反応は消失した。ゲルシフトアッセイとクロマチン免疫沈降法よりこのモチーフに結合する転写因子 Sp1 がずり応力で増加することが示された。

流れずり応力は成熟した内皮細胞の多くの遺伝子の転写に影響を及ぼすことが知られているが、ずり応力による転写制御に関わる応答配列と転写因子は遺伝子により異なっている(79)。Sp1 は ephrinB2 だけでなく流れずり応力に応答する他の遺伝子の転写調節にも関わっている。例えば流れずり応力による tissue factor (TF)、KDR、PAI-1 の遺伝子発現増加や(80-83)、purinoceptor P2X₄、membrane type 1-matrix

metalloproteinase、toll-like receptor 2 の遺伝子発現抑制を引き起こす転写反応に Sp1 が働いている (84-86)。しかし、現時点で流れずり応力が Sp1 を活性化する分子機構についてはまだよく分かっていない。流れずり応力に加えて、ウイルス感染、成長因子、薬物、サイトカインなどの刺激が p38、Akt、ERK1/2、DNA-PK、PKA、PKC- ζ 、casein kinase II、CDK2 などの様々なシグナル伝達因子やキナーゼを介して Sp1 をリン酸化させることが報告されている (87)。流れずり応力以外では、低酸素刺激が Sp1 を介して ephrinB2 の遺伝子と蛋白の発現を増大させることが報告されている (88)。今後、Sp1 の活性化につながる流れずり応力のメカノトランスダクションと情報伝達経路を明らかにしていくことは EPC の分化に及ぼす流れずり応力の作用を理解するうえで重要と思われた。

5-4. ずり応力が臍帯血由来 EPC に及ぼす効果

今回の研究により、臍帯血由来 EPC にずり応力を負荷すると接着・遊走・増殖・抗アポトーシスといった細胞機能に変化が現れることが示された。なお、これらの細胞応答がずり応力による VEGF などの生理活性物質のパラクライン効果によるかどうか培養液中のヒト VEGF₁₆₅ 量を検討したところ、静的条件下の EPC と 2.5 dynes/cm² のずり応力を 30 分間負荷した EPC では VEGF 分泌量は同じであった。一方、EPC に 5、15、25 dynes/cm² のずり応力を 20 分間負荷するとずり応力依存性に NO の産生量は増加することより、ずり応力によるパラクライン効果も一部あると考えられた (64)。今回の結果は、臍帯血由来 EPC も成熟内皮細胞と同じく、ずり応力を刺激として認識し、その情報を細胞内部に伝達することで細胞機能の変化を起こす性質のあることを意味している。これまで、血管以外の組織・器官を構成する多くの細胞、例えば気道上皮細胞、尿細管上皮細胞、骨細胞にずり応力に応答する性質のあることが報告されており、こうした性質は生体の細胞に普遍的に備わっているのかもしれない (89-92)。

EPC は成熟内皮細胞に分化する能力を有しているが、今回の検討でずり応力が臍帯

血由来 EPC の内皮細胞への分化を促進することが示された。臍帯血由来 EPC にずり応力を負荷すると、内皮マーカーである KDR、Flt1、VE-cadherin、Tie2 の蛋白および遺伝子発現レベルがずり応力の強さ依存性に増加した。この結果は末梢血由来 EPC で観察されたずり応力の効果と一致していた。EPC よりもさらに未分化な Flk-1 陽性胚性幹細胞や胚性間葉系前駆細胞においてもずり応力がそれらの細胞を内皮細胞へ分化誘導することが報告されている (72-74)。今回の結果と合わせると、環境因子である流れずり応力は成体に留まらず、胚の発生段階や胎児においても循環系の分化プログラムを調節する役割を果たしていると考えられる。興味深いことに、最近、Flk-1 陽性胚性幹細胞ではずり応力が作用すると内皮細胞へ、一方、伸展張力が作用すると平滑筋細胞へ分化が誘導されること、すなわちメカニカルストレスの種類の違いにより、誘導される分化の方向が異なることが明らかにされた (93)。このとき、ずり応力の効果には細胞膜に発現する VEGF 受容体 (Flk-1) の、伸展張力の効果には PDGF 受容体のリガンド非依存性のリン酸化がそれぞれの分化誘導に必須であることが示された。今後、EPC に対する伸展張力の作用をずり応力と比較し、その各々のシグナルトランスダクションを解明していくことは、EPC のメカニカルストレス応答を理解するうえで重要と思われる。

5-5. 血管新生療法における末梢血由来 EPC と臍帯血由来 EPC

臨床において EPC を血管新生療法の細胞ソースとして用いる場合、末梢血由来 EPC は自家細胞のために拒絶反応がなく全ての患者に使用できる利点がある。一方、得られる EPC 数は少なく、患者由来の EPC は血管新生能力が低下しており、臨床的効果が低くなる。他方、臍帯血由来 EPC は若い固体由来の細胞であるために血管新生能力が高く、EPC マーカーである CD34 陽性細胞や CD133 陽性細胞の含有率も高い。しかし、ヒト白血球抗原 (HLA) が適合した患者にしか移植できない。したがって今後は、個々の患者の状態に合わせて末梢血由来 EPC あるいは臍帯血由来 EPC を使い分けていくべきであろう。

5-6. ずり応力を負荷した EPC の臨床的意義

今回の研究により、EPC にずり応力を負荷すると接着・遊走・増殖・抗アポトーシスといった細胞機能が促進し、より成熟した内皮細胞、さらには動脈内皮細胞に分化することが示された。EPC を使った血管新生療法において、狭心症、心不全、糖尿病や高血圧、脂質異常症、喫煙、老化の危険因子を有する閉塞性動脈硬化症の患者では、得られる EPC の数が少なく、細胞の活性も低下していることが示されている (34)。

したがって、生体外で細胞培養した EPC にあらかじめ流れずり応力を負荷し、細胞数を増幅かつ細胞機能を賦活化した後に患者に移植することは、治療効果の上昇につながると思われる。また、狭心症や大動脈解離、動脈瘤、閉塞性動脈硬化症の患者や透析シャント用にステントや人工血管が移植されているが、代替部が長く細い場合に狭窄や閉塞が生じやすく問題となる。この解決方法として、血管内を循環している EPC を捕捉する分子をコーティングしたステントや人工血管が研究されている。これらを移植することにより EPC を血流から捕捉して人工血管内を自己の細胞で内皮化し、血栓の形成を防止し、血管内の狭窄を防止することが期待される (94)。

また、冠動脈バイパス術 10 年後の開存率において、移植血管が大伏在静脈 (50-60%) より内胸動脈 (90%) や橈骨動脈 (84%) などの動脈の方が高いことが知られている (95)。

EPC にずり応力を負荷して動脈に分化を誘導したうえで移植することは、ステントや人工血管の再狭窄率を改善することにもつながると考えられる。

5-7. 回転円盤型ずり応力負荷装置の特徴

培養細胞に流れずり応力を負荷する装置には、回転円盤型、平行平板型、チューブ型の装置がある。回転円盤型装置は、培養皿の底に細胞を直接付着させるか、あるいは細胞を付着させたカバースリップを設置して培養液中に円盤を浸す。この円盤をモーターで回転させると培養液が同心円状に流れ、細胞にずり応力がかかる。表面が平らな円盤 (平盤) を使用すると、細胞にかかるずり応力の強さは円盤の中心からの距

離に依存するが、円錐盤では培養皿の全ての場所で一様なずり応力がかかる。しかし、円錐盤では平盤ほど強いずり応力を負荷できない。平行平板型装置は、プラスチックあるいはガラスでできた平板に対向してある厚さのガスケットを挟み、細胞の付着したカバースリップあるいはガラス板を置く。培養液の出口と入り口をつけてシリコンチューブと連結し、リザーバーからポンプで液を灌流する。特徴は、細胞全体に均一かつ高いずり応力を負荷することができる。チューブ型装置は、細胞付着性の良いシリコンチューブの内面に細胞を培養し、チューブの中に培養液を灌流することで細胞に流れ刺激を加える。シリコンチューブは弾性があるので流れを起こすと内圧が増加してチューブが伸展し、細胞にはずり応力とともに伸展張力が働く。

今回は、EPC の希少性と実験操作の簡素化を考慮して回転円盤型ずり応力負荷装置を使用した。また、ずり応力の強さは培養皿の中心と辺縁との中間地点のずり応力として表記した。すなわち、中間地点でのずり応力(τ)は、培養液の粘性を μ 、円盤の半径を r 、円盤の回転角速度を ω 、円盤と細胞との距離を d とすると、 $\tau = \mu r \omega / 2d$ で計算される。一方、ずり応力の異なる全ての細胞の総ずり応力を培養皿の面積で割った平均ずり応力(τ)は、 $\tau = 2\mu r \omega / 3d$ で計算される (96)。この平均ずり応力で表記することもできるが、今回は中間地点でのずり応力で表記した。」

6. 結論

EPC は骨髄から末梢血に動員され、既存の内皮細胞に接着し、組織に遊走、増殖、分化して、新たな血管を構築する。この過程で EPC は血流や組織流に起因した流れずり応力の影響を受ける。本研究では、流れずり応力がヒト末梢血由来 EPC を静脈内皮よりはむしろ動脈内皮に分化誘導することを明らかにした。流れずり応力により動脈のマーカー ephrinB2 の発現が増加するが、その機序は流れずり応力で活性化した転写因子 Sp1 が ephrinB2 遺伝子のプロモーターにある Sp1 モチーフに結合することで転写が亢進するというものであった。また、ヒト臍帯血由来 EPC が流れずり応力に応答するかについても検討を加えたところ、流れずり応力は臍帯血由来 EPC の細胞機能（接着、遊走、増殖、抗アポトーシス）を亢進し、さらに成熟内皮細胞への分化を促進する作用のあることが判明した。以上の結果から、メカニカルストレスである流れずり応力は環境因子として EPC の細胞機能や分化を修飾し、成体や胎児の循環系における血管形成や血管新生を調節する一つの因子として働くと考えられた。さらに、今回の結果はメカニカルストレスで EPC の増殖を含む細胞機能や分化を人工的に操作することは EPC を使った細胞治療や再生医療におけるツールとして応用しうることを示唆している。

7. 謝辞

本論文の作成にあたり、貴重なご指導とご助言を賜りました独協医科大学・安藤譲二教授（元システム生理学教室教授）に深く感謝の意を表します。また、直接実験のご指導を賜りましたシステム生理学教室・山本希美子講師に心より感謝いたします。

日々の研究生生活を共にしながら学ぶ喜びを分かち合ったすばらしい同僚、曾我部隆彰氏、大浦紀彦氏、中塚英樹氏、Qin Kairong 氏、清水信隆氏、熊谷晋一郎氏、島野靖正氏、榊村智美氏に感謝いたします。

英語のご指導を賜りました Mark Tofflemire 氏、研究室で実験のサポートをしていただきました澤田優子氏、事務のサポートをしていただきました鈴木節子氏に深く感謝いたします。

本研究の全般的なご指導をいただきました生体機能制御学教室・阿部裕輔准教授および東海大学医学部生理学教室・浅原孝之教授、増田治史准教授に深く感謝の意を表します。

個人的な面では、私の教育の基礎を築いてくれた両親に声を大にして感謝の意を表します。両親は私の生涯のお手本であり、師でもあります。そして、よき妻であり、無条件に私を支え、いつも励ましてくれる妻の小尾真弓に感謝します。

8. 引用文献

1. Aird WC. Phenotypic heterogeneity of the endothelium. *Circ Res* **100**: 158-190, 2007.
2. Wang HU, Chen ZF, Anderson DJ. Molecular distinction and angiogenic interaction between embryonic arteries and veins revealed by ephrin-B2 and its receptor Eph-B4. *Cell* **93**: 741-753, 1998.
3. Yancopoulos GD, Klagsbrun M, Folkman J. Vasculogenesis, angiogenesis, and growth factors: ephrins enter the fray at the border. *Cell* **93**: 661-664, 1998.
4. Torres-Vazquez J, Kamei M, Weinstein BM. Molecular distinction between arteries and veins. *Cell Tissue Res* **314**: 43-59, 2003.
5. Shawber CJ and Kitajewski. Notch function in the vasculature: insights from zebrafish, mouse and man. *Bioessays* **26**: 225-234, 2004.
6. Lawson ND, Scheer N, Pham VN, Kim CH, Chitnis AB, Campos-Ortega JA, Weinstein BM. Notch signaling is required for arterial-venous differentiation during embryonic vascular development. *Development* **128**: 3675-3683, 2001.
7. Yurugi-Kobayashi, Itoh H, Schroeder T, Nakano A, Narazaki G, Kita F, Yanagi K, Hiraoka-Kanie M, Inoue E, Ara T, Nagasawa T, Just U, Nakano K, Nishikawa S, Yamashita JK. Adrenomedullin/cyclic AMP pathway induces Notch activation and differentiation of arterial endothelial cells from vascular progenitors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **26**: 1997-1984, 2006.
8. Lawson ND, Vogel AM, Weinstein BM. Sonic hedgehog and vascular endothelial growth factor act upstream of the Notch pathway during arterial endothelial differentiation. *Dev Cell* **3**: 127-136, 2002.
9. Soker S, Takashima S, Miao HQ, Neufeld G, Klagsbrun M. Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell* **92(6)**: 735-745, 1998.
10. Urness LD, Sorensen LK, Li DY. Arteriovenous malformations in mice lacking activin receptor-like kinase-1. *Nature Genet* **26**: 328-331, 2000.
11. Haefliger JA, Nicod P, Meda P. Contribution of connexins to the function of the vascular wall. *Cardiovasc Res* **62(2)**: 345-356, 2004.
12. Grunewald M, Avraham I, Dor Y, Bachar-Lustig E, Itin A, Jung S, Chimenti S, Landsman L, Abramovitch R, Keshet E. VEGF-induced adult neovascularization: recruitment, retention, and role of accessory cells. *Cell* **124(1)**: 175-189, 2006.
13. Kidoya H, Ueno M, Yamada Y, Mochizuki N, Nakata M, Yano T, Fujii R, Takakura N. Spatial and temporal role of the apelin/APJ system in the caliber size regulation of blood vessels during angiogenesis. *EMBO J* **27(3)**: 522-534, 2008.
14. Kasai A, Shintani N, Oda M, Kakuda M, Hashimoto H, Matsuda T, Hinuma S, Baba A. Apelin is a novel angiogenic factor in renal endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **325(2)**: 395-400, 2004.
15. You LR, Lin FJ, Lee CT, DeMayo FJ, Tsai SY. Suppression of Notch signaling by the

- COUP-TFII transcription factor regulates vein identity. *Nature* **435**: 98-104, 2005.
16. Davis PF. Flow-mediated endothelial mechanotransduction. *Physiol Rev* **75**: 519-560, 1995.
 17. Kamiya A, Bukhari R, Togawa T. Adaptive regulation of wall shear stress optimizing vascular tree function. *Bull Math Biol* **46**: 127-137, 1984.
 18. Dorbin PB. Mechanical properties of arteries, in "The Mechanics of the Circulation" (eds. By Caro CG, Pedley TJ, Schroter RC, Seed WA.) *Oxford University Press* 397-460, 1978.
 19. Holman E. Conditions controlling collateral circulation in the presence of an arteriovenous fistula, following the ligation of an artery. *Surgery* **26**: 889-917, 1949.
 20. Reid MR. Abnormal arterio-venous communications acquired and congenital. *Arch Shrg* **11**: 25-42, 1925.
 21. Kamiya A, Togawa T. Adaptive regulation of wall shear stress to flow change in the canine carotid artery. *Am J Physiol* **239**: H14-H21, 1980.
 22. Langille BL, O'Donnell F. Reductions in arterial diameter produced by decrease in blood flow are endothelium-dependent. *Science* **231**: 405-407, 1986.
 23. Caro CG, Fitz-Gerald JM, Schroter RC. Atheroma and arterial wall shear. Observation, correlation and proposal of a shear-dependent mass transfer mechanism for atherogenesis. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **177**: 109-159, 1971.
 24. Caro CG. Mechanical factors in atherogenesis. In Cardiovascular flow dynamics and measurements (eds. By Hwang, N.H.C. and Normann, N.A.) *University Park Press* : 473-487, 1977.
 25. Legerfo GW, Nowak MD, Quist WC, Cranshaw HM, Bharadvaj BK. Flow studies in a model carotid bifurcation. *Atherosclerosis* **1**: 235-241, 1981.
 26. Kjaemes M, Avindland A, Walloe L, Wille SO. Localization of early atherosclerotic lesions in an arterial bifurcation in humans. *Acta Pathol Microbiol Scand* **89**: 35-40, 1981.
 27. Bomberger RA, Zarins CK, Talor KE, Glagov S. Subcritical arterial stenosis enhances distal atherosclerosis. *J Shrg Res* **30**: 205-212, 1981.
 28. Grottum P, Svindland A, Walloe L. Localization of atherosclerotic lesions in the bifurcation of the main left coronary artery. *Atherosclerosis* **47**: 55-62, 1983.
 29. Svindland A. The localization of sudanophilic and fibrous plaques in the main left coronary bifurcation. *Atherosclerosis* **48**: 139-145, 1983.
 30. Zarins CK, Giddens DP, Bharadvaj BK, Sottiurai VS, Mabon RG, Glagov S. Carotid bifurcation atherosclerosis. Quantitative correlation of plaque localization with flow velocity profiles and wall shear stress. *Circ Res* **53**: 502-514, 1983.
 31. Sabbah HN, Khaha F, Brymer JF, Hawkins ET, Stein PD. Blood velocity in the right coronary artery: Relation to the distribution of atherosclerotic lesions. *Am J Cardiol* **53**: 1008-1012, 1984.
 32. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* **275**:

964-967, 1997.

33. Jujo K, Ii M, Losordo DW. Endothelial progenitor cells in neovascularization of infarcted myocardium. *J Mol Cell Cardiol* **45(4)**:530-544, 2008.
34. Leone AM, Valgimigli M, Giannico MB, Zaccone V, Perfetti M, D'Amario D, Rebuzzi AG, Crea F. From bone marrow to the arterial wall: the ongoing tale of endothelial progenitor cells. *Eur Heart J* **30(8)**: 890-899, 2009.
35. Kirton JP, Xu Q. Endothelial precursors in vascular repair. *Microvasc Res* **79 (3)**: 193-199, 2010.
36. Takahashi T, Kalka C, Masuda H, Chen D, Silver M, Kearney M, Magner M, Isner JM, Asahara T. Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nature Medicine* **5(4)**: 434-438, 1999.
37. Ii M, Nishimura H, Iwakura A, Wecker A, Eaton E, Asahara T, Losordo DW. Endothelial progenitor cells are rapidly recruited to myocardium and mediate protective effect of ischemic preconditioning via "imported" nitric oxide synthase activity. *Circulation* **111(9)**: 1114-1120, 2005.
38. Fadini GP, Baesso I, Albiero M, Sartore S, Agostini C, Avogaro A. Technical notes on endothelial progenitor cells. *Atherosclerosis* **197**: 496-503, 2008.
39. Yoder MC. Defining human endothelial progenitor cells. *J Thromb Haemost* Suppl 1: 49-52, 2009.
40. Pearson JD. Endothelial progenitor cells--an evolving story. *Microvasc Res* **79(3)**:162-168, 2010.
41. Gehling UM, Ergün S, Schumacher U, Wagener C, Pantel K, Otte M, Schuch G, Schafhausen P, Mende T, Kilic N, Kluge K, Schäfer B, Hossfeld DK, Fiedler W. In vitro differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells. *Blood* **95(10)**: 3106-3112, 2000.
42. Urbich C, Dimmeler S. Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology. *Circ Res* **95(4)**: 343-353, 2004.
43. Hur J, Yoon CH, Kim HS, Choi JH, Kang HJ, Hwang KK, Oh BH, Lee MM, Park YB. Characterization of two types of endothelial progenitor cells and their different contributions to neovascularogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **24**: 288-93, 2004.
44. Hill JM, Zalos G, Halcox JP, Schenke WH, Waclawiw MA, Quyyumi AA, Finkel T. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med* **348**: 593-600, 2003.
45. Nieda M, Nicol A, Denning-Kendall P, Sweetenham J, Bradley B, Hows J. Endothelial cell precursors are normal components of human umbilical cord blood. *Br J Haematol* **98(3)**: 775-777, 1997.

46. Crisa L, Cirulli V, Smith KA, Ellisman MH, Torbett BE, Salomon DR. Human cord blood progenitors sustain thymic T-cell development and a novel form of angiogenesis. *Blood* **94(11)**: 3928-3940, 1999.
47. Murohara T, Ikeda H, Duan J, Shintani S, Sasaki K, Eguchi H, Onitsuka I, Matsui K, Imaizumi T. Transplanted cord blood-derived endothelial precursor cells augment postnatal neovascularization. *J Clin Invest* **105(11)**:1527-1536, 2000.
48. Kang HJ, Kim SC, Kim YJ, Kim CW, Kim JG, Ahn HS, Park SI, Jung MH, Choi BC, Kimm K. Short-term phytohaemagglutinin-activated mononuclear cells induce endothelial progenitor cells from cord blood CD34+ cells. *Br J Haematol* **113(4)**: 962-969, 2001.
49. Naruse K, Hamada Y, Nakashima E, Kato K, Mizubayashi R, Kamiya H, Yuzawa Y, Matsuo S, Murohara T, Matsubara T, Oiso Y, Nakamura J. Therapeutic neovascularization using cord blood-derived endothelial progenitor cells for diabetic neuropathy. *Diabetes* **54(6)**: 1823-1828, 2005.
50. Finney MR, Greco NJ, Haynesworth SE, Martin JM, Hedrick DP, Swan JZ, Winter DG, Kadereit S, Joseph ME, Fu P, Pompili VJ, Laughlin MJ. Direct comparison of umbilical cord blood versus bone marrow-derived endothelial precursor cells in mediating neovascularization in response to vascular ischemia. *Biol Blood Marrow Transplant* **12(5)**: 585-593, 2006.
51. Senegaglia AC, Barboza LA, Dallagiovanna B, Aita CA, Hansen P, Rebelatto CL, Aguiar AM, Miyague NI, Shigunov P, Barchiki F, Correa A, Olandoski M, Krieger MA, Brofman PR. Are purified or expanded cord blood-derived CD133+ cells better at improving cardiac function? *Exp Biol Med* (Maywood) **235(1)**: 119-129, 2010.
52. Schächinger V, Assmus B, Britten MB, Honold J, Lehmann R, Teupe C, Abolmaali ND, Vogl TJ, Hofmann WK, Martin H, Dimmeler S, Zeiher AM. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction: final one-year results of the TOPCARE-AMI Trial. *J Am Coll Cardiol* **44(8)**:1690-1699, 2004.
53. Bartunek J, Vanderheyden M, Vandekerckhove B, Mansour S, De Bruyne B, De Bondt P, Van Haute I, Lootens N, Heyndrickx G, Wijns W. Intracoronary injection of CD133-positive enriched bone marrow progenitor cells promotes cardiac recovery after recent myocardial infarction: feasibility and safety. *Circulation* **112**: 178-183, 2005.
54. Li ZQ, Zhang M, Jing YZ, Zhang WW, Liu Y, Cui LJ, Yuan L, Liu XZ, Yu X, Hu TS. The clinical study of autologous peripheral blood stem cell transplantation by intracoronary infusion in patients with acute myocardial infarction (AMI). *Int J Cardiol* **115(1)**: 52-56, 2007.
55. Stamm C, Westphal B, Kleine HD, Petzsch M, Kittner C, Klinge H, Schümichen C, Nienaber CA, Freund M, Steinhoff G. Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. *Lancet* **361(9351)**: 45-46, 2003.
56. Stamm C, Kleine HD, Westphal B, Petzsch M, Kittner C, Nienaber CA, Freund M, Steinhoff G. CABG and bone marrow stem cell transplantation after myocardial infarction.

Thorac Cardiovasc Surg **52(3)**: 152-158, 2004.

57. Boyle AJ, Whitbourn R, Schlicht S, Krum H, Kocher A, Nandurkar H, Bergmann S, Daniell M, O'Day J, Skerrett D, Haylock D, Gilbert RE, Itescu S. Intra-coronary high-dose CD34+ stem cells in patients with chronic ischemic heart disease: a 12-month follow-up. *Int J Cardiol* **109(1)**: 21-27, 2006.

58. Losordo DW, Schatz RA, White CJ, Udelson JE, Veereshwarayya V, Durgin M, Poh KK, Weinstein R, Kearney M, Chaudhry M, Burg A, Eaton L, Heyd L, Thorne T, Shturman L, Hoffmeister P, Story K, Zak V, Dowling D, Traverse JH, Olson RE, Flanagan J, Sodano D, Murayama T, Kawamoto A, Kusano KF, Wollins J, Welt F, Shah P, Soukas P, Asahara T, Henry TD. Intramyocardial transplantation of autologous CD34+ stem cells for intractable angina: a phase I/IIa double-blind, randomized controlled trial. *Circulation* **115(25)**: 3165-3172, 2007.

59. Kawamoto A, Katayama M, Handa N, Kinoshita M, Takano H, Horii M, Sadamoto K, Yokoyama A, Yamanaka T, Onodera R, Kuroda A, Baba R, Kaneko Y, Tsukie T, Kurimoto Y, Okada Y, Kihara Y, Morioka S, Fukushima M, Asahara T. Intramuscular transplantation of G-CSF-mobilized CD34(+) cells in patients with critical limb ischemia: a phase I/IIa, multicenter, single-blinded, dose-escalation clinical trial. *Stem Cells* **27(11)**: 2857-2864, 2009.

60. Burt RK, Testori A, Oyama Y, Rodriguez HE, Yaung K, Villa M, Bucha JM, Milanetti F, Sheehan J, Rajamannan N, Pearce WH. Autologous peripheral blood CD133+ cell implantation for limb salvage in patients with critical limb ischemia. *Bone Marrow Transplant* **45(1)**: 111-116, 2010.

61. Krenning G, van Luyn MJ, Harmsen MC. Endothelial progenitor cell-based neovascularization: implications for therapy. *Trends Mol Med* **15(4)**:180-189, 2009.

62. Asahara T, Kawamoto A, Masuda H. Concise review: circulating endothelial progenitor cells for vascular medicine. *Stem Cells* **29(11)**: 1650-1655, 2011.

63. Yamamoto K, Takahashi T, Asahara T, Ohura N, Sokabe T, Kamiya A, Ando J. Proliferation, differentiation, and tube formation by endothelial progenitor cells in response to shear stress. *J Appl Physiol* **95(5)**:2081-8, 2003.

64. Tao J, Yang Z, Wang JM, Tu C, Pan SR. Effects of fluid shear stress on eNOS mRNA expression and NO production in human endothelial progenitor cells. *Cardiology* ;**106(2)**:82-8, 2006.

65. Yang Z, Wang JM, Wang LC, Chen L, Tu C, Luo CF, Tang AL, Wang SM, Tao J. In vitro shear stress modulates antithrombotic potentials of human endothelial progenitor cells. *J Thromb Thrombolysis* **23(2)**:121-7, 2007.

66. Brown MA, Wallace CS, Angelos M, Truskey GA. Characterization of umbilical cord blood-derived late outgrowth endothelial progenitor cells exposed to laminar shear stress. *Tissue Eng Part A* **15(11)**:3575-87, 2009.

67. Yang Z, Tao J, Wang JM, Tu C, Xu MG, Wang Y, Pan SR. Shear stress contributes to t-PA mRNA expression in human endothelial progenitor cells and nonthrombotic potential of

- small diameter artificial vessels. *Biochem Biophys Res Commun* **342(2)**:577-84, 2006.
68. Tao J, Yang Z, Wang JM, Wang LC, Luo CF, Tang AL, Dong YG, Ma H. Shear stress increases Cu/Zn SOD activity and mRNA expression in human endothelial progenitor cells. *J Hum Hypertens* **21(5)**:353-8, 2007.
69. Nomura H, Ishikawa C, Komatsuda T, Ando J, Kamiya A. A disk-type apparatus for applying fluid shear stress on cultured endothelial cell. *Biorheology* **25**: 461-470, 1988.
70. Rössig L, Urbich C, Brühl T, Dernbach E, Heeschen C, Chavakis E, Sasaki K, Aicher D, Diehl F, Seeger F, Potente M, Aicher A, Zanetta L, Dejana E, Zeiher AM, Dimmeler S. Histone deacetylase activity is essential for the expression of HoxA9 and for endothelial commitment of progenitor cells. *J Exp Med* **201(11)**:1825-35, 2005.
71. Zeng L, Xiao Q, Margariti A, Zhang Z, Zampetaki A, Patel S, Capogrossi MC, Hu Y, Xu Q. HDAC3 is crucial in shear- and VEGF-induced stem cell differentiation toward endothelial cells. *J Cell Biol* **174(7)**:1059-69, 2006.
72. Yamamoto K, Sokabe T, Watabe T, Miyazono K, Yamashita JK, Obi S, Ohura N, Matsushita A, Kamiya A, Ando J. Fluid shear stress induces differentiation of Flk-1-positive embryonic stem cells into vascular endothelial cells in vitro. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **288**: H1915-H1924, 2005.
73. Masumura T, Yamamoto K, Shimizu N, Obi S, Ando J. Shear stress increases expression of the arterial endothelial marker ephrinB2 in murine ES cells via the VEGF-Notch signaling pathways. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **29(12)**: 2125-2131, 2009.
74. Wang H, Riha GM, Yan S, Li M, Chai H, Yang H, Yao Q, Chen C. Shear stress induces endothelial differentiation from a murine embryonic mesenchymal progenitor cell line. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **25**: 1817-1823, 2005.
75. Goettsch W, Augustin HG, Morawietz H. Down-regulation of endothelial ephrinB2 expression by laminar shear stress. *Endothelium* **11**: 259-265, 2004.
76. Korff T, Braun J, Pfaff D, Augustin HG, Hecker M. Role of ephrinB2 expression in endothelial cells during arteriogenesis: impact on smooth muscle cell migration and monocyte recruitment. *Blood* **112(1)**: 73-81, 2008.
77. Caro CG, Nerem RM. Transport of 14 C-4-cholesterol between serum and wall in the perfused dog common carotid artery. *Circ Res* **32**: 187-205, 1973.
78. Ando J, Ohtsuka A, Korenaga R, Kawamura T, Kamiya A. Wall shear stress rather than shear rate regulates cytoplasmic Ca⁺⁺ responses to flow in vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **190**: 716-723, 1993.
79. Resnick N, Gimbrone MA Jr. Hemodynamic forces are complex regulators of endothelial gene expression. *FASEB J* **9**: 874-882, 1995.
80. Abumiya T, Sasaguri T, Taba Y, Miwa Y, Miyagi M. Shear stress induces expression of vascular endothelial growth factor receptor Flk-1/KDR through the CT-rich Sp1 binding site. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **22**: 907-913, 2002.
81. Lin MC, Almus-Jacobs F, Chen HH, Parry GCN, Mackman N, Shyy JY, Chien S. Shear

- stress induction of the tissue factor gene. *J Clin Invest* **99**: 737-744, 1997.
82. Nakatsuka H, Sokabe T, Yamamoto K, Sato Y, Hatakeyama K, Kamiya A, Ando J. Shear stress induces hepatocyte PAI-1 gene expression through cooperative Sp1/Ets-1 activation of transcription. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **291**: G26-G34, 2006.
83. Urbich C, Stein M, Reisinger K, Kaufmann R, Dimmeler S, Gille J. Fluid shear stress-induced transcriptional activation of the vascular endothelial growth factor receptor-2 gene requires Sp1-dependent DNA binding. *FEBS Lett* **535**: 87-93, 2003.
84. Dunzendorfer S, Lee HK, Tobias PS. Flow-dependent regulation of endothelial toll-like receptor 2 expression through inhibition of Sp1 activity. *Circ Res* **95**: 684-691, 2004.
85. Korenaga R, Yamamoto K, Ohura N, Sokabe T, Kamiya A, Ando J. Sp1-mediated downregulation of P2X4 receptor gene transcription in endothelial cells exposed to shear stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **280**: H2214-H2221, 2001.
86. Yun S, Dardik A, Haga M, Yamashita A, Yamaguchi S, Koh Y, Madri JA, Sumpio BE. Transcription factor Sp1 phosphorylation induced by shear stress inhibits membrane type 1-matrix metalloproteinase expression in endothelium. *J Biol Chem* **277**: 34808-34814, 2002.
87. Chu S, Ferro TJ. Sp1: Regulation of gene expression by phosphorylation. *Gene* **348**: 1-11, 2005.
88. Sohl M, Lanner F, Farnebo F. Sp1 mediate hypoxia induced ephrinB2 expression via a hypoxia-inducible factor independent mechanism. *Biochem Biophys Res Commun.* **391(1)**: 24-27, 2010.
89. Tarran R, Button B, Boucher RC. Regulation of normal and cystic fibrosis airway surface liquid volume by phasic shear stress. *Annu Rev Physiol* **68**: 543-561, 2006.
90. Cabral PD, Garvin JL. Luminal flow regulates NO and O₂(-) along the nephron. *Am J Physiol Renal Physiol* **300(5)**: F1047-F1053, 2011.
91. Weinbaum S, Duan Y, Satlin LM, Wang T, Weinstein AM. Mechanotransduction in the renal tubule. *Am J Physiol Renal Physiol* **299(6)**: F1220-F1236, 2010.
92. Riddle RC, Donahue HJ. From streaming-potentials to shear stress. *J Orthop Res* **27(2)**: 143-149, 2009.
93. Shimizu N, Yamamoto K, Obi S, Kumagaya S, Masumura T, Shimano Y, Naruse K, Yamashita JK, Igarashi T, Ando J. Cyclic strain induces mouse embryonic stem cell differentiation into vascular smooth muscle cells by activating PDGF receptor beta. *J Appl Physiol* **104(3)**: 766-772, 2008.
94. Avci-Adali M, Perle N, Ziemer G, Wendel HP. Current concepts and new developments for autologous in vivo endothelialisation of biomaterials for intravascular applications. *Eur Cell Mater* **21**: 157-176.
95. Kobayashi J. Radial artery as a graft for coronary artery bypass grafting. *Circ J* **73(7)**: 1178-1183, 2009.
96. Sill HW, Chang YS, Artman JR, Frangos JA, Hollis TM, Tarbell JM. Shear stress increases hydraulic conductivity of cultured endothelial monolayers. *Am J Physiol* **268(2 Pt**

2): H535-543, 1995.