

# 赤芽球造血による血管新生作用

— 血管再生療法の治療成績向上を目指した基礎的研究 —

小澤拓也

新潟大学大学院医歯学総合研究科循環器分野

(主任：相澤義房教授)

## In Vitro Effects of Erythroid Cells on Angiogenesis

Takuya OZAWA

Division of Cardiology, Niigata University

Graduate School of Medical and Dental Sciences

(Director: Prof. Yoshifusa AIZAWA)

### 要 旨

【背景】 骨髄単核細胞移植治療 (BMI) による血管再生療法是重症下肢虚血に対して有効性が示されているが、さらなる治療成績の向上が望まれる。BMI で虚血組織に移植される成分は血管前駆細胞およびサイトカイン産生細胞を含有する。このうち赤芽球は遊走能をもたず、従って正常骨髄組織では液性因子を分泌し恒常的に新生血管を赤芽球島へ誘致することで末梢血流へ供給されることが推測される。この性質を利用しBMIにエリスロポエチン (EPO) 投与を併用することで移植片に含まれる赤芽球を活性化し血管再生効果を増強することを目的とし、赤芽球による *in vitro* での血管新生効果を検討した。

### 【方法と結果】

ヒト血管内皮細胞と線維芽細胞の共培養を行い、血管腔形成を観察した。これにヒト末梢血から作製した赤芽球コロニー (BFU-e) を添加したところ、BFU-e を中心に集簇した血管ネットワークの著しい形成がみられ、骨髄造血における赤芽球島への新生血管の誘致が再現された。この作用はEPOの添加により増強した。BFU-eはVEGFとPIGFを産生していた。白血球系コロニー (CFU-c) にはこれらの作用は見られなかった。

次にヒト骨髄細胞の血管新生因子産生を浮遊培養系で測定した。骨髄単核細胞はVEGFとPIGFを産生したが、主な分泌細胞は赤芽球であり、非赤血球系細胞による産生は弱く、特にPIGFは赤芽球のみが分泌していた。この作用はEPOの添加でさらに増強した。

【結語】 赤芽球系細胞はVEGF (内皮増殖) とPIGF (平滑筋増殖) を産生することで血管新生を誘導し、EPO添加によりその効果が増強することが示された。臨床応用として、EPO併用BMI治療は移植局所において赤芽球によるサイトカイン分泌を増強することで臨床効果を高める可能性が示された。

キーワード：再生医療、血管新生、赤芽球造血、骨髄細胞移植療法、エリスロポエチン

Reprint requests to: Takuya OZAWA  
First Department of Internal Medicine  
Niigata University School of Medicine  
1-757 Asahimachi-dori,  
Niigata 951-8510 Japan

別刷請求先：〒951-8510 新潟市旭町通り1-757  
新潟大学医学部内科学第一教室 小澤拓也

## 緒 言

再生医学研究は今世紀の医学の中心課題のひとつであり、特に死体よりの臓器移植が困難な我が国においては最重要の分野として位置づけられている。既に血管再生治療が循環器系虚血性疾患に対する先端的治療法として試みられ、現在では標準的治療法の開発競争の段階に至っている。血管新生療法には大きく2つの流れがある。すなわち血管新生サイトカインやその遺伝子を導入することで血管新生を促す「サイトカイン療法」と<sup>1)</sup>、末梢血単核細胞や骨髄細胞を虚血局所に移植することで血管前駆細胞およびサイトカイン産生細胞を供給する「細胞療法」<sup>2)</sup>である。

先進医療としての血管再生療法に道を開いた Isner らは血管内皮増殖因子 (VEGF) を始めとする各種の遺伝子治療を試みたが<sup>3)</sup>、遺伝子治療には社会的あるいは倫理的な制約が存在し、また調和のとれた血管新生に必要な解剖学的な位置情報および時間経過に即した各種サイトカインの供給の再現が困難である等の問題が推測されていた。実際に、臨床治験でもプラセボ効果を凌駕する臨床効果は得られなかった。

血管形成は新たに血管が新生される Vasculogenesis と、血管が発芽などによって伸長・分岐する Angiogenesis の2段階で行われる<sup>4)</sup>。創傷の治癒過程および悪性腫瘍・子宮内膜などで見られる血管新生は Angiogenesis によるものと考えられていたが、その後骨髄由来の血管内皮前駆細胞 (endothelial progenitor cells, EPC) が末梢血を介して常時流通していることや<sup>5)</sup>、生体内での新生血管の約10%が Vasculogenesis に由来することが見いだされた<sup>6)</sup>。また動物モデルで虚血部位に移植された骨髄単核細胞に含まれる CD34 陽性細胞の一部が EPC として機能し、同時に移植局所で VEGF・胎盤成長因子 (PlGF)・アンギオポエチン群などの様々なサイトカインを産生することが報告された<sup>2)7)</sup>。細胞治療の分野では本邦の「骨髄細胞移植を用いた虚血性心疾患・末梢血管疾患への血管新生治療」(TACT Study Group) が臨床研究の中心となっているが、骨髄単核細胞移

植 (BMT) 治療は標準的治療法として確立したのではなく、臨床成績の改善を目指したより効率の高い治療法の開発が模索されている。

正常骨髄造血においては、遊走能を有する白血球系細胞は分化増殖しつつ最終分化の後に血管内へ移動するが、一方、遊走能を持たない赤血球系細胞は血管リモデリングを引き起こし赤芽球島に新生血管を誘致することで全身循環へと入っていくことが予測される。実際、ヒト骨髄の赤血球系細胞は血管新生因子である VEGF および PlGF を産生分泌することが報告され<sup>8)</sup>、造血と血管の密接なクロストークが推測される。

エリスロポエチン (EPO) は赤血球系前駆細胞から赤芽球を誘導するだけでなく、未熟赤芽球に作用してその生存および分化成熟に必須である<sup>9)</sup>。BMT 治療では各成熟段階の赤芽球およびその前駆細胞も同時に移植されることから、EPO を BMT と併用して局所に投与することにより虚血局所での赤血球系細胞の生存および増殖を一時的に維持し間接的に血管新生を促進できることが予想される。既に我々は *in vivo* マウス下肢虚血モデルを用いて EPO 併用 BMT が有用であることを報告した<sup>10)</sup>。今回はその機序を推測する目的で、赤芽球を介した血管新生作用を *in vitro* で検討した。

## 方 法

### *in vitro* 血管新生モデル

同意を得た健康成人男性より末梢血 ( $n = 9$ , 25~31歳) および骨髄 ( $n = 4$ , 30~33歳) を採取し、リンフォプレップ (1.077, Nycomed Pharma, Oslo, Norway) を用いた比重遠心法によって単核球成分を分離し、赤芽球系コロニー (BFU-e) および白血球系コロニー (CFU-c) を作成した<sup>11)</sup>。14日後、滅菌ピペットでそれぞれのコロニーを採取し、血管新生キット (Kurabo, Osaka, Japan) に直接添加し血管新生効果を評価した。血管新生キットではヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) とヒト線維芽細胞の共培養系により管腔様構造が形成される<sup>13)</sup>。培養液を4, 7, 9日目に交換し、11

日目に70%氷冷エタノールで30分間固定した。培養液中のサイトカイン濃度は9日目に計測した。BFU-e, CFU-c, VEGF-A (10ng/ml, Kurabo), rhEPO (16 or 80IU/ml), PlGF-1 (10ng/ml, RD & Systems, Minneapolis, MN), PlGF-2 (10ng/ml, Relia Trch, Braunschweig, Germany), Angiopoietin-1 (Ang-1, 450ng/ml, R & D Systems)それぞれの血管新生効果を評価した。さらにVEGFおよびPlGFの活性を中和する目的でマウス抗ヒトPlGFモノクローナル抗体 (1 $\mu$ g/ml, Genzyme, Minneapolis, MN), 可溶性ヒトリコンビナントVEGFR1およびR2 (sFlt1, 500ng/ml, 及びsKDR, 250ng/ml, いずれもR & D Systems)を添加した。固定した細胞はマウス抗ヒトCD31モノクローナル抗体 (Kurabo) 及びアルカリフォスファターゼ標識ヤギ抗マウスIgG (Kurabo)と反応させ、BCIP/NBT (Kurabo)で発色させた。倒立顕微鏡 (Olympus IX 70, magnification  $\times$  12.5, Fujix HC-2000, Fujifilm, Tokyo, Japan)にて観察しデジタル画像を作成した。得られた画像はAngiogenesis Image Analyzer software (Kurabo)にてCD31陽性面積を計測した。さらにはBFU-eを添加した標本をウサギ抗ヒト第VIII因子関連抗原ポリクローナル抗体とマウス抗ヒトCD235aモノクローナル抗体 (glycophorin A (GPA), Immunotech, Marseille, France)を反応させ2次抗体にビオチン化ヤギ抗ウサギIgG抗体 (ニチレイ, Tokyo, Japan) 及びFITC標識ストレプトアビジンとTRITC標識ヤギ抗マウスIgG抗体 (Dako, Carpinteria, CA)を用いて蛍光2重染色を施行した。蛍光画像は共焦点レーザー顕微鏡 (Olympus IX 71, Olympus FV500) 及びFluoview software (Olympus)にて観察し画像化した。蛍光色素はマルチアルゴンレーザー (488nm, FITC) およびグリーンヘリウムネオン (543nm, TRITC)で励起し、フィルターはBA 505/525 (FITC) 及びBA5601F (TRITC)を用いて観察した。

#### 骨髄赤芽球分画の作成・培養

骨髄単核球をPE標識抗CD235a (Immunotech)抗体とMACS magnetic cell sorting systemを用いて赤芽球と非赤芽球細胞に分離した<sup>12)</sup> (n = 4)。

CD235a陽性細胞の純度は分離前 (MNC) 3.9  $\pm$  2.1%, 精製赤芽球 (GPA<sup>+</sup>) 90.3  $\pm$  9.7%, 非赤芽球細胞 (GPA<sup>-</sup>) 0.1  $\pm$  0.1%, であった。各分画1  $\times$  10<sup>6</sup>/mlを10% FBSを含むRPMI1640メディアウム2mlでrhEPO (10IU/ml) もしくはrhG-CSF (50ng/ml, キリン)を添加して4日間培養し、上清および細胞成分を回収しサイトカイン濃度およびmRNA発現レベルを測定した。VEGF及びPlGF濃度はいずれもQuantikine human immunoassay kits (RD System)を用いたELISA法によって測定した。

#### RT-PCR and 定量的RT-PCR法

赤芽球及び白血球系コロニー・骨髄赤芽球および非赤芽球分画における血管新生因子のmRNA発現をRT-PCR法で評価した<sup>14)</sup>。表1にVEGF-A, PlGF, 肝細胞成長因子 (HGF), アンジオポエチン-1 (Ang-1), ニューロピリン-1 (NP-1), 血小板由来成長因子 (PDGF), 線維芽細胞増殖因子 (bFGF),  $\beta$ -actinそれぞれのプライマー配列を示す。RT-PCRは94 $^{\circ}$ C 60秒, 58 $^{\circ}$ C 90秒, 73 $^{\circ}$ C 120秒を1サイクルとし計35サイクル施行した。QRT-PCRはVEGF-A及びPlGFのmRNAをLightCycler (Roche, Indianapolis, IN)にて測定した。

#### 統計

各群の測定値はmean  $\pm$  SDで表記した。多群間の比較 (ANOVA)はFisher法により差の検定を行い、In vitroの結果は対応のある2群間においてStudent t検定にて比較した。

## 結 果

#### in vitro血管新生モデルと造血細胞による血管新生因子産生

ヒト末梢血由来コロニー及びヒト骨髄単核球における血管新生因子の発現を図1に示す。PlGFは赤芽球系コロニー及び骨髄赤芽球に発現していた。VEGF, NP-1, PDGF, bFGFは赤芽球系及び白血球系コロニーの両方で発現していた。HGFとAng-1は骨髄中赤芽球系細胞にはみられたが、BFU-eには発現していなかった。

表1 Primers for RT-PCR

VEGF-A	5'-ATGAACCTTCTGCTGCTTGGGT 3'-GCTCTATCTTTCTTTGGTCTGCAT
PIGF	5'-GTCATGAGGCTGTTCCCTTG 3'-CAGAACGGATCTTTAGGAGCTG
HGF	5'-AATAAAGGACTTCCATTCACTTGC 3'-AGGATTTTCGACAGTAGTTTTCCTG
Ang-1	5'-GTTGGACACCTTAAAGGAAGAGAA 3'-ATTGACATCCATATTGCAAAACAC
NP-1	5'-GTTACTGTGGACAGAAAACACCAG 3'-CCCAAGTCTACCTGTATCCACTCT
PDGF-A	5'-GTAGGGAGTGAGGATTCTTTGGAC 3'-TGGACTTCTTTAATTTTGGCTTC
PDGF-B	5'-CGAGTTGGACCTGAACATGAC 3'-CCTTCTTAAAGATTGGCTTCTTCC
bFGF	5'-AAGCGGCTGTACTGCAAAAAC 3'-AAGTTTATACTGCCAGTTCGTTT
β-actin	5'-ATCATGTTTGAGACCTTCAA 3'-CATCTCTTGCTCGAAGTCCA

各種血管新生因子による *in vitro* 血管新生モデルにおける血管新生効果を図2, 3に示す。VEGF および Ang-1 には強力な血管新生効果を示したが、PIGF および EPO の効果は微弱であった。

BFU-e と CFU-c による血管新生効果を図3に示す。BFU-e の添加によって用量依存性に血管新生効果が増強し、EPO 添加によりさらに血管面積の増加を認めた。CFU-c にはこの作用はなかった。なおコロニー作成用の半固形培地を単独で添加しても血管新生には影響を与えなかった。血管新生キットの培養上清中 VEGF, PIGF 濃度は BFU-e 存在下では VEGF, PIGF とも増加し EPO の添加によってさらに増強した。CFU-c は VEGF, PIGF 産生に影響しなかった。抗 PIGF 抗体の添加は BFU-e による血管新生効果に影響しなかったが、可溶性 VEGF レセプターの添加では BFU-e による血管新生効果が消失した。*in vitro* 血管新生モデルでは BFU-e による内皮増殖効果は、主に赤芽球の分泌する VEGF によるものと考えられた。興味深いことに、BFU-e を中心に集簇した血管ネットワークの著しい造成が観察さ

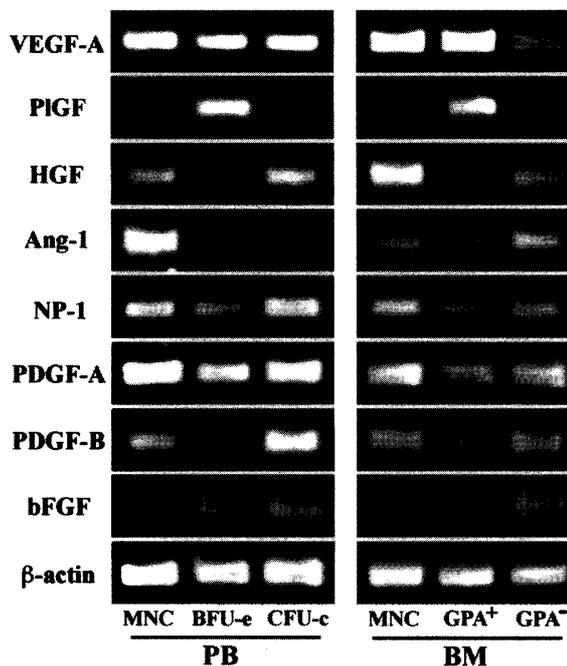


図1 ヒト骨髄単核細胞 (BM-MNC), 赤芽球分画 (GPA+), 非赤芽球分画 (GPA-), 及びヒト末梢血単核球 (PB-MNC) 由来赤芽球コロニー (BFU-e), 白血球系コロニー (CFU-c) における各種血管新生因子の mRNA 発現: VEGF, NP-1, PDGF, bFGF はいずれの細胞にも発現していたが PIGF は赤芽球に特異的であった。

れ、骨髄造血における赤芽球島への血管の誘致が *in vitro* で再現された (図2)。この効果は EPO の添加によりさらに増強した。

骨髄細胞の浮遊培養におけるサイトカイン産生の結果を図4に示す。VEGF は主に内皮増殖に活性を持ち、PIGF は平滑筋の増殖に寄与するサイトカインとして知られている。ヒト骨髄単核球は VEGF および PIGF を産生し、その主たる産生細胞は赤芽球であった。またこの作用は EPO の添加により増強した。

## 考 案

VEGF-A と PIGF はいずれも VEGF family に属し、その基本構造は PDGF と類似している<sup>15)</sup>。

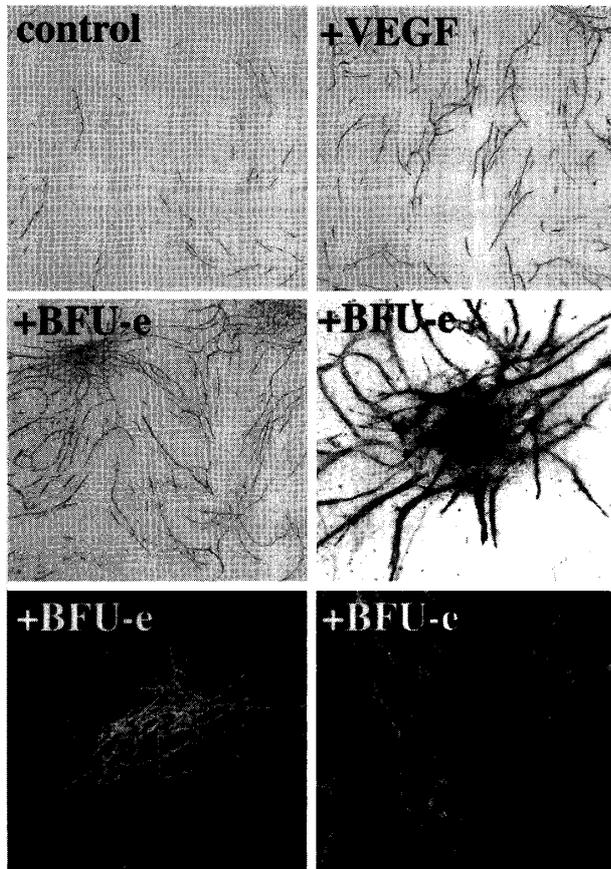


図2 in vitro 血管新生モデルにおける管腔構造の形成

上段4枚写真：抗CD31抗体で染色した血管内皮（ヒト臍帯静脈内皮細胞HUVEC），下段2枚写真：HUVEC（抗第8因子関連抗原-FITC：緑）および赤芽球（抗CD235a-TRITC：赤）。上段2枚と中段左は光学顕微鏡で20倍，中段右は100倍，下段は共焦点レーザー顕微鏡で100倍にて観察。BFU-e（風段では暗赤色：変性ヘモグロビン）に向かって血管内皮（紫）が集簇している。

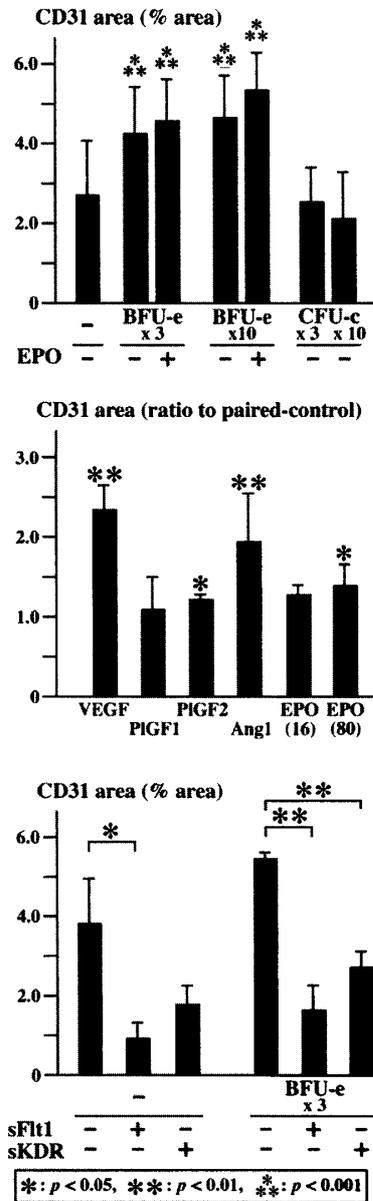
VEGFレセプターはVEGFR1 (Flt-1), VEGFR2 (Flk-1/KDR), VEGFR3 (Flt-4) が知られている<sup>16)</sup>。中でもVEGFR2は主として血管内皮細胞(EC)に発現していることから，VEGF-Aの主な作用は血管内皮の増殖・遊走・血管透過性亢進など血管新生の中心的役割を示す。主要なサブタイプであるVEGF-A165はNeuropilin-1と会合し

VEGF/VEGFR2のシグナルを増強する<sup>17)</sup>。この強力な血管新生作用を応用し，下肢虚血や心筋虚血に対するVEGF遺伝子治療が盛んに行われた<sup>1)</sup>が，その臨床効果は主にプラセボ効果であった。VEGFのみではペリサイトを伴った成熟した血管を誘導できないことを示すと解釈されている。

一方PIGFはVEGFR-1のみに作用するという特徴をもつ<sup>18)</sup>。VEGFR-1はEC，血管平滑筋(SMC)，単球などに発現しており，炎症ではさらに発現が増強する。当初VEGFR-1は単にVEGFのリザーバーとして認識されていたが，最近ではPIGF/VEGFR1シグナルは虚血心筋や下肢虚血においてangiogenesisを促進，成熟した血管形成を誘導すると報告された<sup>19)</sup>。その機序は①ECにおけるVEGF-Aの作用を増強<sup>20)</sup>，②SMCに作用しより成熟，安定化した血管形成arteriogenesisを引き起こす<sup>18)</sup>，③側副血行路の発達に重要な炎症細胞を動員する<sup>21)</sup>，④骨髄からの血管前駆細胞や造血系前駆細胞を誘導すること<sup>22)</sup>などが推定される。またECの増殖には影響を与えないが，ECの遊走を増強するという報告もある<sup>18)</sup>。

今回の研究では，骨髄赤芽球及び末梢血来BFU-eがVEGF, PIGFを強く発現し，EPOによりその発現が増強され，結果としてin vitroでの強力な血管新生効果が観察された。BFU-eによる血管新生増強効果の機序としてはおそらくVEGF産生と血管内皮と赤芽球の直接のコンタクトが考えられ，造血と血管形成の密接なクロストークが示唆される。

RT-PCRの結果からは骨髄細胞が多種の血管新生サイトカインを分泌することが示された。中でもPIGFの産生は赤芽球に特異的であった。サイトカイン中和実験の結果からはBFU-eによるEC増殖作用にはPIGFよりVEGFが重要と考えられた。我々はin vivo下肢虚血モデルにおいてEPO併用BMIが有用であることを報告したが<sup>10)</sup>，その報告でEPO併用BMIでは血管の数が増加しただけではなく，際だった特徴としてSMCの発達した太い血管が再生されることを組織学的に観察した。今回の結果でその機序を説明すれば次のようになる。すなわち虚血組織中でEPOによっ



上段グラフ：ヒト末梢血由来赤芽球系コロニー (BFU-e), 白血球系コロニーの EPO (16IU/ml) 添加による血管新生効果を示す (n = 6). 血管面積は BFU-e の存在下に増加したが, CFU-c にはそのような効果はなかった.

中段グラフ：各種サイトカイン (VEGF, PIGF1, PIGF2 : 10ng/ml, Ang1 : 450ng/ml, EPO 16 or 80IU/ml) 添加における血管新生効果の比較. (n = 5) VEGF および Ang-1 は強力な血管新生効果を示したが, PIGF および EPO の血管新生効果は微弱であった.

下段グラフ：サイトカインの活性の中和抗体による血管新生の抑制効果. sFlt1 (可溶性 VEGFR1, 500ng/ml) および sKDR (可溶性 VEGFR2, 250ng/ml) の添加によって BFU-e による血管新生効果が抑制された. 中和抗体を用いた PIGF の活性の中和では抑制が見られなかった (図は省略).

図3 in vitro 血管新生モデルにおける血管面積

て活性化された赤芽球が強力に分泌する VEGF によって EC の増殖が誘導され, また PIGF によって SMC の発達が促進されることで, 結果として血流の豊富な成熟した血管が再生される.

実際その後追加した in vivo 実験では, 赤芽球を除去した骨髓細胞の移植では下肢の生存が全く見られなかったことから, 赤芽球が血管新生に不可欠であることが分かる (投稿中). さらに実

際の BMI 臨床症例研究で, 移植骨髓細胞中の成熟好中球比率が ABI と組織酸素分圧の改善度と負の関係に, また赤芽球比率が正の関係にあることが報告されている<sup>23)</sup>.

EPO は 30kDa の糖蛋白で, 低酸素に応じ胎児期には肝臓で出生後は主に腎臓で産生され, 赤芽球造血に必須のサイトカインである<sup>24)</sup>. 最近では EPO 受容体が他の細胞にも発現していること

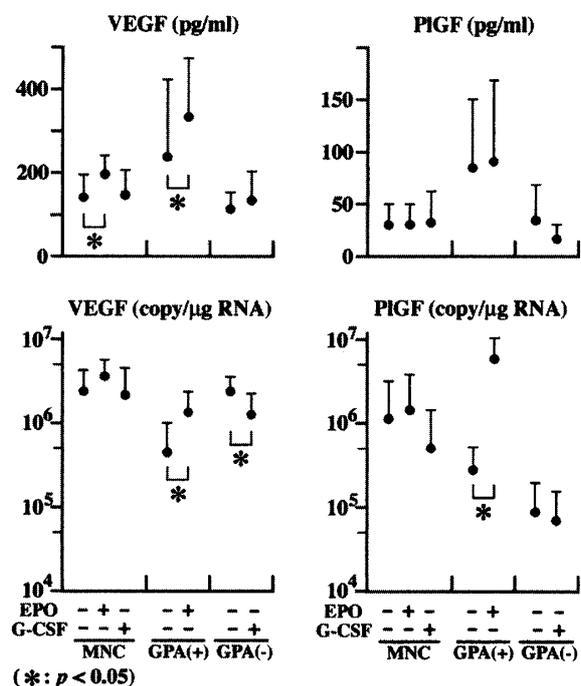


図4 ヒト骨髄単核細胞による VEGF および PlGF 産生。

上清中の蛋白濃度 (上段: ELISA) と細胞の mRNA 量 (下段: QRT-PCR). VEGF および PlGF は主に赤芽球によって産生され, EPO の共存によりさらに増強された。

が示され, EPO/EPO-R システムが造血作用以外の多面的効果として血管新生効果<sup>25)</sup>, 抗アポトーシス効果<sup>26)–28)</sup>, EPO の動員<sup>29)–30)</sup>, など報告され注目されている。しかし今回の研究の結果からは, EPO 併用による血管新生増強効果は EPO の直接的な血管新生作用ではなく, 赤芽球を介した強力な間接的作用であることがわかった。

EPO はすでに腎性貧血の治療に使われており, 副作用などは既知の事柄である。しかしながら EPO は親水性の強い糖蛋白で組織滞留時間が短いことが予測されるため<sup>37)</sup>, 虚血局所投与による血管新生作用を高めるために, 薬剤の徐放化や分子改変による組織親和性の増強などの工夫が考えられる。副作用としての多血症や高血圧の誘発に関しては, 真性多血症に準じて瀉血を行うなど, 対応は容易であると考えられる。当施設で審査, 許可ののちに実施している EPO 併用 BMI の治療

結果からは, 予測された副作用の出現はなく, また良好な血流改善が観察されている。症例数を増やして詳細な解析を行う予定である。

#### 謝辞

研究を指導して頂いた第一内科学教室の相澤義房教授, 鳥羽 健講師, 加藤公則助手, および協同で実験を行った西川 尚, 皆川史郎, 真木山八城の三人の先生方に心より深謝いたします。また本研究は, 第 52 回日本心臓病学会学術集会 (平成 16 年 9 月) において, Young Investigators Award (Y.I.A.) を受賞しました。

#### 文 献

- 1) Yla-Herttuala S and Alitalo K: Gene transfer as a tool to induce therapeutic vascular growth. *Nat Med* 9: 694–701, 2003.
- 2) Shintani S, Murohara T, Ikeda H, Ueno T, Sasaki K, Duan J and Imaizumi T: Augmentation of postnatal neovascularization with autologous bone marrow transplantation. *Circulation* 103: 897–903, 2001.
- 3) Isner JM: Therapeutic angiogenesis: a new frontier for vascular therapy. *Vasc Med* 1: 79–87, 1996.
- 4) Risau W: Mechanism of angiogenesis. *Nature* 386: 671–674, 1997.
- 5) Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G and Isner JM: Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 275: 964–967, 1997.
- 6) Crosby JR, Kaminski WE, Schatteman G, Martin PJ, Raines EW, Seifert RA and Bowen-Pope DF: Endothelial cells of hematopoietic origin make a significant contribution to adult blood vessel formation. *Circ Res* 87: 728–730, 2000.
- 7) Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T, Ikeda U, Shintani S, Masaki H, Amano K, Kishimoto Y, Yoshimoto K, Akashi H, Shimada K, Iwasaka T and Imaizumi T: Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a

- pilot study and a random - ized controlled trial. *Lancet* 360: 427 - 435, 2002.
- 8) Tordjman R, Delaire S, Plouet J, Ting S, Gaulard P, Fichelson S, Romeo PH and Lemarchandel V: Erythroblasts are a source of angiogenic factors. *Blood* 97: 1968 - 1974, 2001.
- 9) Koury MJ and Bondurant MC: Erythropoietin retards DNA breakdown and prevents programmed death in erythroid progenitor cells. *Science* 248: 378 - 381, 1990.
- 10) 西川 尚：下肢虚血モデルマウスを用いた骨髓細胞移植 (BMI) による血管新生の検討：新潟医学会雑誌 118: 402 - 410, 2004.
- 11) Toba K, Hanawa H, Fuse I, Sakaue M, Watanabe K, Uesugi Y, Higuchi W, Takahashi M and Aizawa Y: Difference in CD22 molecules in human B cells and basophils. *Exp Hematol* 30: 205 - 211, 2002.
- 12) Toba K, Hanawa H, Watanabe K, Fuse I, Masuko M, Miyajima S, Takahashi M, Sakaue M, Abo T and Aizawa Y: Erythroid involvement in CD36 deficiency. *Exp Hematol* 29: 1194 - 1200, 2001.
- 13) Saito M, Hamasaki M and Shibuya M: Induction of tube formation by angiopoietin - 1 in endothelial cell/fibroblast co - culture is dependent on endogenous VEGF. *Cancer Sci* 94: 782 - 790, 2003.
- 14) Hanawa H, Watanabe K, Nakamura T, Ogawa Y, Toba K, Fuse I, Kodama M, Kato K, Fuse K and Aizawa Y: Identification of cryptic splice site, exon skipping, and novel point mutation in type I CD36 deficiency. *J Med Genet* 39: 286 - 291, 2002.
- 15) Nagy JA, Dvorak AM and Dvorak HF: VEGF - A<sup>164/165</sup> and PlGF: Roles in angiogenesis and arteriogenesis. *Trends Cardiovas Med* 13: 169 - 175, 2003.
- 16) Ferrara N, Gerber HP and LeCouter J: The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 9: 669 - 676, 2003.
- 17) Yamada Y, Oike Y, Ogawa H, Ito Y, Fujisawa H, Suda T and Takakura N: Neuropilin - 1 on hematopoietic cells as a source of vascular development. *Blood* 101: 1801 - 1809, 2003.
- 18) Autiero M, Lutun A, Tjwa M and Carmeliet P: Placental growth factor and its receptor, vascular endothelial growth factor receptor - 1: novel targets for stimulation of ischemic tissue revascularization and inhibition of angiogenic and inflammatory disorders. *J Thromb Haemostasis* 1: 1356 - 1370, 2003.
- 19) Lutun A, Tjwa M, Moons L, Wu Y, Angelillo - Scherrer A, Liao F, Nagy JA, Hooper A, Priller J, De Klerck B, Compennolle V, Daci E, Bohlen P, Dewerchin M, Herbert JM, Fava R, Matthys P, Carmeliet G, Collen D, Dvorak HF, Hicklin DJ and Carmeliet P: Revascularization of ischemic tissues by PlGF treatment, and inhibition of tumor angiogenesis, arthritis and atherosclerosis by anti - Flt1. *Nat Med* 8: 831 - 840, 2002.
- 20) Autiero M, Waltenberger J, Communi D, Kranz A, Moons L, Lambrechts D, Kroll J, Plaisance S, De Mol M, Bono F, Kliche S, Fellbrich G, Ballmer - Hofer K, Maglione D, Mayr - Beyrle U, Dewerchin M, Dombrowski S, Stanimirovic D, Van Hummelen P, Dehio C, Hicklin DJ, Persico G, Herbert JM, Communi D, Shibuya M, Collen D, Conway EM and Carmeliet P: Role of PlGF in the intra - and intermolecular cross talk between the VEGF receptors Flt1 and Flk1. *Nat Med* 9: 936 - 943, 2003.
- 21) Pipp F, Heil M, Issbrucker K, Ziegelhoeffer T, Martin S, van den Heuvel J, Weich H, Fernandez B, Golomb G, Carmeliet P, Schaper W and Clauss M: VEGFR - 1 - selective VEGF homologue PlGF is arteriogenic evidence for a monocyte - mediated mechanism. *Circ Res* 92: 378 - 385, 2003.
- 22) Hattori K, Heissig B, Wu Y, Dias S, Tejada R, Ferris B, Hicklin DJ, Zhu Z, Bohlen P, Witte L, Hendriks J, Hackett NR, Crystal RG, Moore MA, Werb Z, Lyden D and Rafii S: Placental growth factor reconstitutes hematopoiesis by recruiting VEGFR1<sup>+</sup> stem cells from bone - marrow microenvironment. *Nat Med* 8: 841 - 849, 2002.
- 23) 磯 吉崇, 鈴木 洋, 大森康歳, 早田輝子, 佐藤貴俊, 角田史敬, 正司 真, 木庭新治, 下司映一, 片桐 敬：末梢動脈疾患への骨髓単核球移植術における移植細胞の細胞腫による検討. *J Cardiol* 44 (Supp I): 373, 2004.

- 24) Amith KJ, Bleyer AJ, Little WC and Sane DV: The cardiovascular effects of erythropoietin. *Cardiovasc Res* 59: 538 - 548, 2003.
- 25) Ribatti D, Vacca A, Roccaro AM, Crivellato E and Presta M: Erythropoietin as an angiogenic factor. *Eur J Clin Invest* 33: 891 - 896, 2003.
- 26) Parsa CJ, Matsumoto A, Kim J, Riel RU, Pascal LS, Walton GB, Thompson RB, Petrofski JA, Annex BH, Stamler JS and Koch WJ: A novel protective effect of erythropoietin in the infarcted heart. *J Clin Invest* 112: 999 - 1007, 2003.
- 27) Tramontano AF, Muniyappa RM, Black AD, Blendea MC, Cohen I, Deng L, Sowers JR, Cutaia MV and El-Sherif N: Erythropoietin protects cardiac myocytes from hypoxia-induced apoptosis through an Akt-dependent pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 308: 990 - 994, 2003.
- 28) Moon C, Krawczyk M, Ahn D, Ahmet I, Paik D, Lakatta EG and Talan MI: Erythropoietin reduces myocardial infarction and left ventricular functional decline after coronary artery ligation in rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 11612 - 11617, 2003.
- 29) Heeschen C, Aicher A, Lehmann R, Fichtlscherer S, Vasa M, Urbich C, Mildner-Rihm C, Martin H, Zeiher AM and Dimmeler S: Erythropoietin is a potent physiological stimulus for endothelial progenitor cell mobilization. *Blood* 102: 1340 - 1346, 2003.
- 30) Bahlmann FH, de Groot K, Spandau JM, Landry AL, Hertel B, Duckert T, Boehm SM, Menne J, Haller H and Fliser D: Erythropoietin regulates endothelial progenitor cells. *Blood* 103: 921 - 926, 2004.

(平成17年1月11日受付)