

Hypoxic preconditioning reinforces cellular functions of
autologous peripheral blood-derived cells
in rabbit hindlimb ischemia model

中型動物（ラビット）下肢虚血モデルにおける
自己末梢血単核球を用いた
低酸素プレコンディショニングの効果

工藤 智明

山口大学大学院医学系研究科

応用医工学系専攻 器官病態外科学分野

平成 26 年 6 月

目次

| | |
|---|----|
| 第 1 章 緒言 | 3 |
| 第 2 章 方法 | 5 |
| 2.1 倫理 | 5 |
| 2.2 実験動物 | 5 |
| 2.3 rPBMNCs の分離と低酸素プレコンディショニング | 5 |
| 2.4 細胞接着能の検証 | 5 |
| 2.5 半定量的 RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction) による遺伝子発現解析 | 5 |
| 2.6 酸化ストレスに対する抵抗性の解析 | 6 |
| 2.7 アポトーシス、細胞生存分析 | 6 |
| 2.8 下肢虚血モデルの作成と自己細胞移植 | 6 |
| 2.9 レーザードップラーによる下肢血流の測定 | 7 |
| 2.10 下肢虚血モデルにおける血流回復の評価 | 7 |
| 2.11 毛細血管密度の評価 | 7 |
| 2.12 統計学的分析 | 7 |
| 第 3 章 結果 | 8 |
| 3.1 低酸素プレコンディショニング後のラビット末梢血単核球 (rPBMNCs) の機能増強の評価 | 8 |
| 3.2 ラビット自己末梢血単核球 (rPBMNCs) 移植による下肢血流改善の評価 | 11 |
| 3.3 低酸素プレコンディショニング後のラビット自己末梢血単核球 (rPBMNCs) 移植による血管新生の評価 | 13 |
| 第 4 章 考察 | 15 |
| 第 5 章 謝辞 | 18 |
| 第 6 章 参考文献 | 19 |

第1章 緒言

冠動脈疾患、脳血管障害、末梢動脈疾患と死亡率との相関性は高く、これらの虚血性疾患の罹患率は、年齢、高血圧、糖尿病および脂質異常症などの生活習慣病患者において増加する[1]。また、安静時疼痛、潰瘍および壊疽を伴った重症下肢虚血患者の予後は悪く、血管内治療や手術といった治療法は、このような患者にとって効果がないことがある[2]。細胞移植により虚血部位に血管成長因子が誘導されることによって引き起こされる血管新生療法は、虚血性疾患に対して効果的な治療法の一つである[3]。しかし、骨髓由来細胞や末梢血由来細胞を使った動物実験や臨床試験では、細胞移植治療による血管新生効果は不十分であり[4,5,6]、その理由として、レシピエント組織の虚血が影響していると考えられる。虚血状態では、組織内の酸素含有量が少なく、炎症性サイトカインが増加し、活性酸素（ROS）の過剰な産生が起こる[7,8,9]。虚血組織におけるこのROS蓄積は、移植細胞のアポトーシスおよびネクローシスを引き起こすことから、虚血組織内でのROS蓄積が、移植細胞の生存率低下の一要因であると考えられている[10,11]。ROSが大量に存在する虚血組織において、細胞生存性を高める方法として、ストレス抵抗性の遺伝子を導入した細胞を移植したという報告があるが[12,13]、遺伝子を組み換えた特殊な細胞を実臨床で用いるには制約があり、別のアプローチの必要が叫ばれている。また、実臨床で血管新生治療を行うために、倫理面をクリアし、低コストであり、簡単な方法で移植細胞の機能を増強させる必要がある。我々は、移植細胞の細胞機能増強と虚血部位における生存率を上昇させるために”低酸素プレコンディショニング”という、臨床応用を視野に入れた新たなプロトコルを開発してきた。低酸素処理されたマウス末梢血単核球細胞（PBMNCs）は、虚血組織内で生存率が向上し、マウス虚血下肢モデルにおいて、未処理の細胞を移植した動物よりも高い血管新生効果を認めた[14,15]。また低酸素プレコンディショニングの効果は、間葉系幹細胞を含む骨髓細胞でも認められ、細胞接着能、遊走および細胞生存率においてもPBMNCsと同様の効果が認められている[16,17]。現在までのところ正確な分子機構は解明されていないが、低酸素プレコンディショニングによるCXCR4、c-Met、pAktおよびHIF-1 α の発現増加によって細胞生着性や生存性が増強したものと考えられる。また、我々の先行研究において、CXCR4のリガンドであるSDF-1が、虚血下肢の筋肉で発現が増加することにより、低酸素プ

レコンディショニング処理された細胞が虚血組織内で長期間生存することが示されており[18]、一連の研究から、我々は低酸素プレコンディショニング処理した細胞を移植することにより、虚血下肢における血管新生を効果的に誘導し、重症下肢虚血患者に対する有効な治療法となり得ると考えた。しかし、これまでの研究では、小動物モデルを用いた検討であった。

そこで本研究では、中型動物（ラビット）の下肢虚血モデルを用いて、低酸素プレコンディショニング法の自己細胞移植における効果を検証することとした。また、臨床において頻発する慢性の下肢虚血障害を想定して、亜急性期下肢虚血モデルを作成し、本法の有効性を検証した。

第2章 方法

2.1 倫理

臨床研究は、山口大学医学部 Medical Ethics Committee の承認を得て行った (MECYUSM; No. H23-44-4)。MECYUSM のガイダンスに従って、全ての患者にインフォームドコンセントを行い、登録後に血液サンプルを得た。

2.2 実験動物

雄の New Zealand white rabbits (3.0–3.5 kg body weight, KBT Oriental, Tosu, Saga, Japan) を動物実験に用いた。全ての動物実験は、山口大学 Animal Care and Use Committee の承認を得て行い (IACUC; No. 31-084)、本研究はヘルシンキ宣言に従って行った。

2.3 rPBMNCs の分離と低酸素プレコンディショニング

ラビット末梢血から PBMNCs (rPBMNCs) を分離する方法は、これまでに報告されている方法で行った[8]。これまでの報告と同様に、rPBMNC を 33°C、O₂ 2%、CO₂ 5% の条件で 24 時間培養した群を、低酸素プレコンディショニング (hypoxia) 群とし[7]、コントロール群を、33°C、O₂ 20%、CO₂ 5% の条件で 24 時間培養した (normoxia) 群とした。

2.4 細胞接着能の検証

Hypoxia、normoxia それぞれの条件で 24 時間培養後、1 穴あたり 2×10^6 個の rPBMNCs をフィブロネクチンでコーティングした 24 穴の培養プレートに入れ、通常の細胞培養条件で再度 24 時間培養した。24 時間後に、培養皿に 4', 6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) を 10 分間浸漬し、細胞核を可視化した。接着細胞数を、1 穴あたりランダムに選んだ 5 つの視野 (200 倍) で計測し、データは 1 視野当たりの細胞数として表示した。

2.5 半定量的 RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction) による遺伝子発現解析

CXC ケモカイン受容体 4 遺伝子 (*cxcr4*) 発現に関して、低酸素プレコンディショニングの効果を調べるために、我々は半定量的な RT-PCR を実行した。特

異的プライマーは、以下の通りに設計した：*cxcr4*；forward 5'-GGTGGTCTACGTCGGTGTCT-3'、reverse 5'-TGGAGTGTGACAGCTTGAG-3'、glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*gapdh*) ；forward 5'-CGCCTGGAGAAAG CTGCTAA-3'、reverse 5'-CGACCTGGTCCTCGGTGTAG-3'。ImageJ ソフトウェアを使用しバンドを定量化し、*cxcr4* 発現量は *gapdh* により基準化した。

2.6 酸化ストレスに対する抵抗性の解析

低酸素プレコンディショニングが rPBMNCs の酸化ストレスに対する耐応能を向上させるかどうかを調べるために、我々は hypoxia と normoxia それぞれの条件で培養した rPBMNCs に、 H_2O_2 を $100 \mu M$ 加えて 24 時間培養した。これまでの報告と同様に、細胞内活性酸素 (ROS) を 6-carboxyl-20,70-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCF) (Lambda Fluorescence Technology, Graz, Austria) を用いて測定し[7]、データは normoxia の条件で培養した rPBMNCs の DCF 値を基準とし、hypoxia の条件で培養した rPBMNCs の DCF 値を算出した。

2.7 アポトーシス、細胞生存分析

アポトーシス分析は、Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) を用いて行った。酸化ストレス負荷は、hypoxia、normoxia それぞれの条件で培養した細胞に H_2O_2 を $100 \mu M$ 、24 時間加えることによって行った。フローサイトメトリーで Annexin V 陽性細胞と propidium iodide (PI)陽性細胞の分析を行い、生存細胞は Annexin V 陰性、PI 陰性細胞とした。

2.8 下肢虚血モデルの作成と自己細胞移植

麻酔下に、ラビット左大腿動脈、膝窩動脈およびその枝を切除し、下肢虚血モデルを作成した。下肢虚血作成後 6 日目に rPBMNCs を採取し、hypoxia と normoxia それぞれの条件で 24 時間培養した。そして、rPBMNCs は赤色蛍光色素 (PKH26;Sigma, St. Louis, MO, USA) で標識し、1 カ所に付き 1×10^7 個もしくは $10 \mu l$ の PBS を 6 カ所に移植した。実験群を以下の 4 つの群に分けた：PBS 群 (PBS のみを移植、 $n = 6$)；Fresh 群 (分離したのみの rPBMNCs を移

植、n = 6) ; Normoxia 群 (normoxia 条件下で培養した rPBMNCs を移植、n = 6) ; Hypoxia 群 (hypoxia 条件下で培養した rPBMNCs を移植、n = 6)。

2.9 レーザードップラーによる下肢血流の測定

下肢血流測定は、麻酔下に Laser Doppler perfusion imaging system (PeriScan System; Perimed AB, Stockholm, Sweden) を用いて、下肢虚血作成前・後、下肢虚血作成後 3、7、14、28 日目に行った。健常肢 (右) と虚血肢 (左) の血流量を測定した。下肢虚血の血流回復は、健常肢の値を基準とし、虚血下肢の値を算出した。

2.10 下肢虚血モデルにおける血流回復の評価

下肢虚血作成後 28 日目に、 6×10^5 個の eosin Dye-Trak microspheres (Triton Technology, Loughborough, UK) を麻酔下に腹部大動脈から注入した。注入 30 秒後にラビットを犠牲にし、健常肢および虚血肢の筋肉を採取した。マイクロスフェアを回収するために、16 N KOH に筋肉を 60°C で 48 時間浸漬し、完全に融解した。ジメチルホルムアミドを用いて蛍光色素をマイクロスフェアから抽出し、spectrophotometer (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) を用いて、吸光度 (OD) を測定した。虚血下肢の血流回復は、健常肢、虚血肢の吸光度と筋肉量を計算し算出した (虚血肢 OD/健常肢 OD \times 健常肢筋肉量/虚血肢筋肉量) (n = 4) [8]。

2.11 毛細血管密度の評価

下肢虚血作成後 28 日目に、大腿四頭筋と内転筋を採取した。毛細血管を視覚化するために、凍結した筋肉を厚さ 7 μ m の切片にし、アルカリホスファターゼ染色をした[7]。ランダムに選んだ 20 視野 (200 倍) で、毛細血管数と筋線維数を計測した。毛細血管密度は、毛細血管数と筋線維数の比で評価した (n = 4)。

2.12 統計学的分析

全てのデータは平均値 \pm 標準誤差で表し、統計的有意差は対応のある t 検定を用いて評価した。統計分析ソフトは SPSS software (IBM, Chicago, IL, USA) を用い、 $p < 0.05$ を統計的有意差とした。

第3章 結果

3.1 低酸素プレコンディショニング後のラビット末梢血単核球 (rPBMNCs) の機能増強の評価

低酸素プレコンディショニング (33°C、O₂ 2%、CO₂ 5%の条件で 24 時間培養) 処理したラビット末梢血単核球 (rPBMNCs) の接着能を評価するために、処理後 24 時間培養し、培養皿に接着した細胞数を計測した。接着細胞数は、低酸素プレコンディショニング処理をした群で有意に増加していた ($p < 0.01$: 図 1A)。また、*cxcr4* 遺伝子発現量は、低酸素プレコンディショニング処理した rPBMNCs で有意に増加していた ($p < 0.05$: 図 1B)。

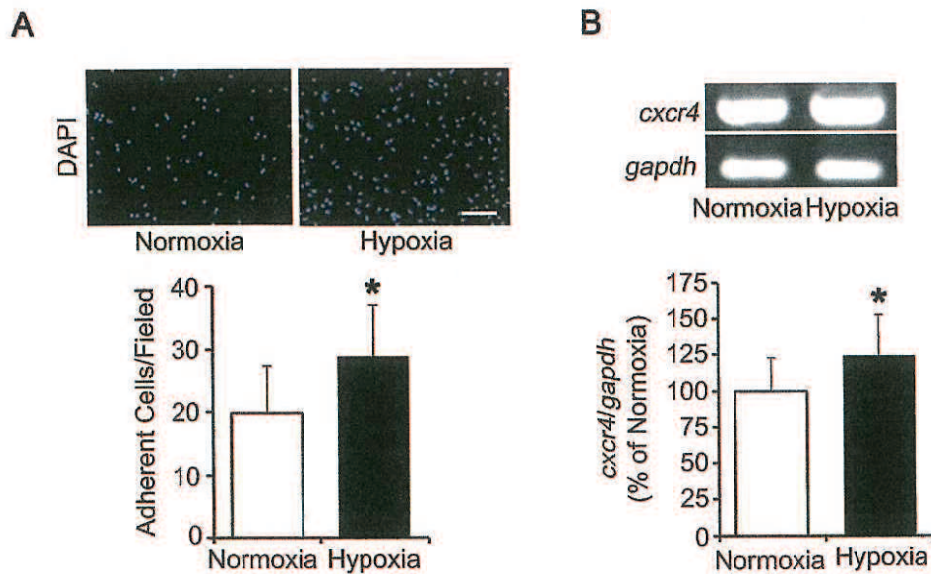
図 1. 接着能評価 (n=9)

A. 接着細胞数 (DAPI 染色)

接着細胞数は、低酸素プレコンディショニング処理をした群で有意に増加していた ($*p < 0.01$, scale bar : 200 μ m)。

B. *cxcr4* 遺伝子発現量 (RT-PCR)

cxcr4 遺伝子発現量は、低酸素プレコンディショニング処理した rPBMNCs で有意に増加していた ($*p < 0.05$)。



続いて、低酸素プレコンディショニングした rPBMNCs の酸化ストレス抵抗性に対する機能増強を検証した。低酸素プレコンディショニング処理した rPBMNCs と normoxia (33°C、O₂ 20%、CO₂ 5%の条件で 24 時間培養) の条件で培養した rPBMNCs に H₂O₂ を加えて 24 時間培養した後に、細胞内の ROS 含有量を測定した。低酸素プレコンディショニング処理した細胞内の ROS 含有量は、normoxia の条件で培養した細胞と比較し、有意に低値であった ($p < 0.05$: 図 2A)。また、酸化ストレス状況下における細胞生存率も向上していた ($p < 0.05$: 図 2C)。対照的に、酸化ストレスのない条件下で培養した細胞の細胞内 ROS 含有量および細胞生存率は、有意差を認めなかった (図 2B と D)。また、酸化ストレスの有無にかかわらず、アポトーシス細胞数は有意差を認めなかった (図 2E と F)。これらの結果は、小動物のみならず中型動物においても低酸素プレコンディショニングが有効であることを示している。そこで、ヒト静脈血より単離した PBMNCs における細胞機能の増強について *in vitro* で検証したところ、小型・中型動物と同様に接着性、生存率、VEGF 産生が亢進していた[7,8]。

図 2. 酸化ストレス抵抗性評価 (n=9)

A. B. 細胞内 ROS 含有量

A. 酸化ストレス状況下において、低酸素プレコンディショニング処理した細胞内の ROS 含有量は有意に低値であった (* $p < 0.05$)。

B. 酸化ストレスのない条件下で培養した細胞の細胞内 ROS 含有量は、有意差を認めなかった。

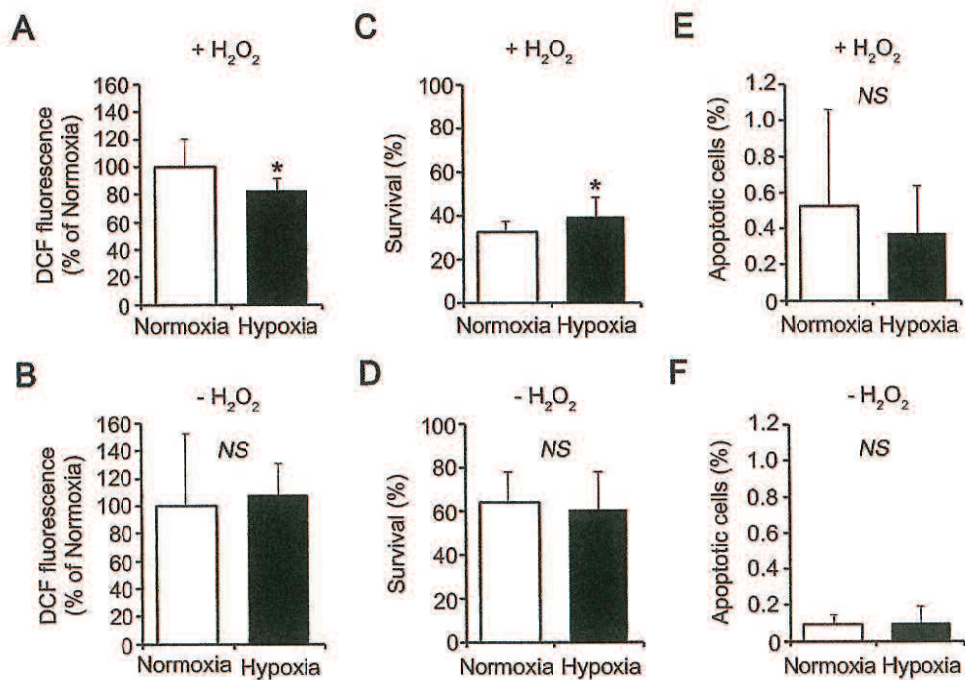
C. D. 生存率

C. 酸化ストレス状況下において、低酸素プレコンディショニング処理した細胞の生存率は向上していた (* $p < 0.05$)。

D. 酸化ストレスのない条件下で培養した細胞の生存率は、有意差を認めなかった。

E. F. アポトーシス

酸化ストレスの有無にかかわらず、アポトーシス細胞数は有意差を認めなかった。



3.2 ラビット自己末梢血単核球 (rPBMNCs) 移植による下肢血流改善の評価

低酸素プレコンディショニング処理した自己 rPBMNCs が、下肢虚血を改善するかどうかを評価するために、低酸素プレコンディショニング処理した自己 rPBMNCs を虚血下肢に移植した。この際、よりヒトの病態に近づけるために下肢虚血作成後 7 日目に細胞を移植する亜急性モデルを用いて実験を行った。下肢虚血作成後 6 日目に、耳静脈から採血し rPBMNCs を分離した後、24 時間 hypoxia の条件で培養した。低酸素プレコンディショニング処理した rPBMNCs を赤色蛍光色素 (PKH26) で標識した後に、下肢虚血部位に移植した。下肢虚血作成後 28 日目に、蛍光標識した rPBMNCs が下肢虚血部の筋肉内に存在していることを確認した (図 3A)。このことは、移植した PBMNCs が少なくとも 28 日間は虚血部位に存在していることを示している。

続いて、Laser Doppler perfusion imaging system を用いて、下肢虚血作成前・後、下肢虚血作成後 3、7、14、28 日目に経時的に下肢血流測定を行った。その結果、細胞移植して 21 日目 (下肢虚血作成 28 日目) において、hypoxia 群における有意な血流増加が認められた (図 3B と C)。また、下肢虚血作成後 28 日目における hypoxia 群の血流回復率は、他の 3 群と比較して有意に高かった ($46.6 \pm 5.8\%$ 、 $p < 0.05$; 図 3D)。

図 3. 下肢血流改善評価 (Laser Doppler perfusion imaging system, n=6)

A. 生存細胞 (← ; PKH26、scale bar : 50 μ m)

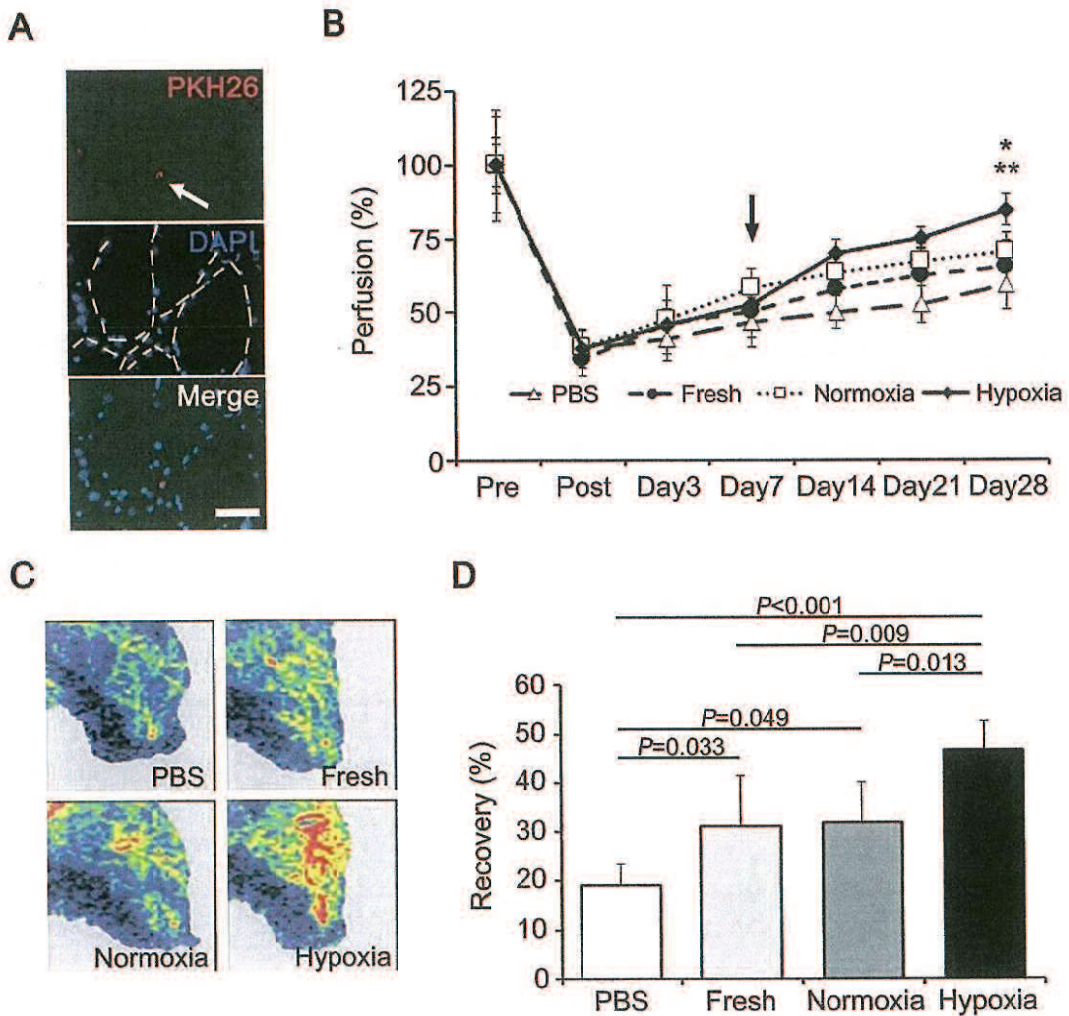
B. 下肢血流変化 (← ; 細胞移植)

Hypoxia 群における有意な血流増加が認められた (* $p < 0.05$, vs Normoxia 群、** $p < 0.001$, vs PBS 群と Fresh 群)

C. イメージ図

D. 血流回復率

Hypoxia 群の血流回復率は、他の 3 群と比較して有意に高かった ($p < 0.05$)。



3.3 低酸素プレコンディショニング後のラビット自己末梢血単核球 (rPBMNCs) 移植による血管新生の評価

次に、自己 rPBMNCs 移植によって虚血下肢に血管新生が生じるか否かを検証した。下肢虚血作成後 28 日目に採取した大腿部筋肉から薄切切片を作成し、切片中の毛細血管密度を計測したところ、hypoxia 群において有意な血管新生を認めた ($p < 0.05$)。一方で、normoxia 群、fresh 群、PBS 群間で有意差を認めなかった (図 4A と B)。続いて、新たに形成された毛細血管の機能を評価するために、腹部大動脈にマイクロスフィアを注入した。マイクロスフェア回収後に吸光度を算出した。Hypoxia 群の血流量は、他の 3 群よりも多かったが、normoxia 群、fresh 群、PBS 群間で有意差を認めなかった ($p < 0.05$: 図 4C)。これらの結果から、低酸素プレコンディショニング処理された自己 rPBMNCs は、虚血部位において、新生血管の形成を促していることが明らかとなった。また、マイクロスフィア注入実験の結果から、機能的な血管の新生を促していることも明らかとなり、低酸素プレコンディショニングによる PBMNCs の機能増強効果とその有用性が中型動物においても証明された。

図 4. 血管新生評価 (n=4)

A. アルカリフォスファターゼ染色 (scale bar : 200 μ m)

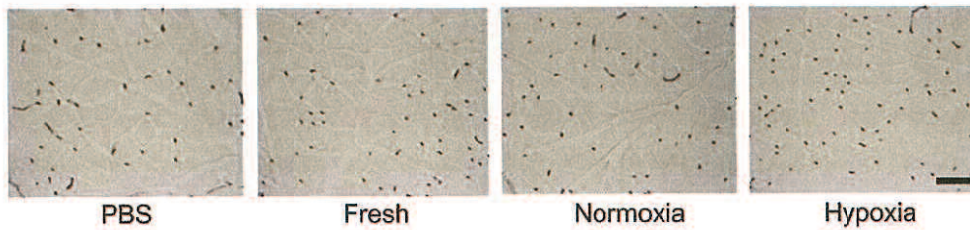
B. 毛細血管密度

Hypoxia 群において有意な血管新生を認めた ($p < 0.05$)。

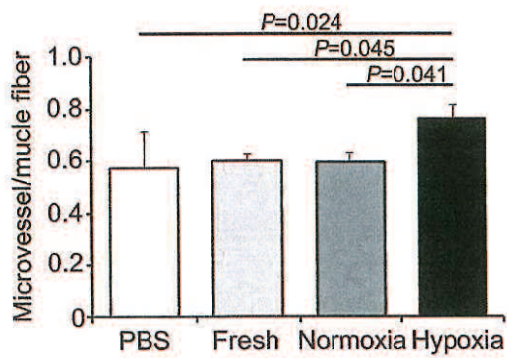
C. 下肢血流

Hypoxia 群において有意な血流増加を認めた ($p < 0.05$)。

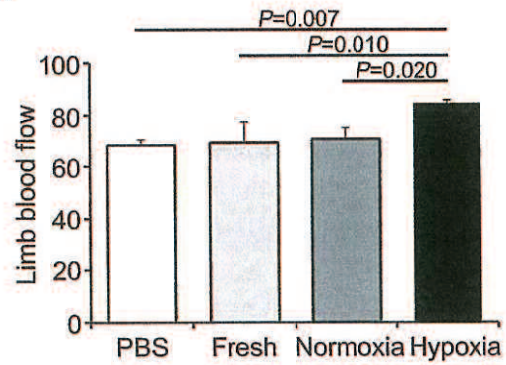
A



B



C



4. 考察

どの細胞がより有効であるかという議論は依然として続いているが、PBMNCs と骨髄細胞が虚血下肢において血管新生療法に効果的であり、臨床応用可能であることに疑いはない[19,20,21]。しかし、細胞治療による血管新生効果は患者によって様々であり、効果がない例も散見される。その理由の一つとして、虚血組織内の環境が関係している可能性があげられる。末梢血管障害を生じた虚血組織内では、酸素含有量が著しく低下しており、また、炎症性サイトカイン量が増加しているため、移植細胞の生存率は著しく低下し、血管新生療法の効果が減少してしまうと考えられている[10,22]。さらに、糖尿病のような生活習慣病に罹患している患者において、組織内の酸素含有量およびサイトカイン量は様々であることから細胞移植後の治療効果にばらつきが生じてしまうと考えられる[23,24]。本研究において、我々は低酸素プレコンディショニング処理を行うことで自己 PBMNCs が細胞機能増強され、この細胞を虚血部位に移植することにより、血管新生療法の効果が向上することを中型動物を用いて証明した。特に、低酸素プレコンディショニングによる移植細胞の酸化ストレス抵抗性の獲得は、虚血組織内で移植細胞の生存率を向上させるため、下肢虚血患者において移植した自己 PBMNCs の生存率向上が期待できる。従って、本方法は、虚血性疾患患者の自己細胞を用いた血管新生療法の成功率を上昇させるきわめて効果的な方法となる可能性がある。

低酸素プレコンディショニングの効果は、様々な細胞機能に及び、本研究では、低酸素プレコンディショニングが rPBMNCs における細胞生着率、血管新生能、酸化ストレス抵抗性を向上させることが明らかとなった。我々のグループの先行研究をふまえて考えると[7,8,14]、細胞移植後、低酸素プレコンディショニング処理によって増強された様々な細胞機能が協調し合いながら、虚血部位における血流回復を誘導しているものと考えられ、すなわち低酸素プレコンディショニング処理が **multiple-targets** を持っていることが、結果的に血流増加を誘導すると推察している。今後、作用機序に関する詳細な研究が必要である。

低酸素プレコンディショニング処理した自己 rPBMNCs 移植は、分離したのみの rPBMNCs (Fresh) を移植した群、normoxia 条件下で培養した rPBMNCs を移植した群 (Normoxia) と比較して有意な血流回復を促し、高い血管新生効

果を認めた。この結果から、低酸素プレコンディショニング処理した rPBMNCs を移植することにより、従来広く用いられてきた PBMNCs の直接移植 (Fresh) よりも、高い血管新生効果が得られることが示された。一方で、毛細血管密度評価では先行研究と異なる結果も得ており、先行研究では、Fresh 群、Normoxia 群においても血流回復および毛細血管密度の増加を認めていたが [7,18,20,25]、本研究では、Fresh 群、Normoxia 群においても血流回復を認めた一方で、毛細血管密度の増加を認めなかった。その理由として、下肢虚血作成後の細胞移植時期が先行研究と異なっているためではないかと考えた。本研究では、下肢虚血作成後 7 日目に自己 rPBMNCs を移植する移植するプロトコルを用いており、より臨床に近い条件で得られた結果であると考えられる。これに対して、全ての先行研究では下肢虚血作成後 2-3 日以内に細胞を移植する急性期モデルを用いている [7,8]。我々は、本研究で得られた先行研究と異なる結果が、細胞移植時の虚血部位における毛細血管ネットワークの成熟度の違いに起因していると考えている。すなわち、低酸素プレコンディショニング処理した rPBMNCs を下肢虚血となった初期の段階で移植していれば、血管新生治療の効果がより得られた可能性がある。しかしながら、マウスを用いた先行研究において、血管成熟に関係する VEGF 受容体発現のピークが虚血作成後 9 日目であったことから [26]、VEGF 分泌が亢進した細胞を移植する我々のプロトコルでの移植時期は適切であったと考えられる。加えて、通常下肢虚血に対する細胞治療は慢性期に行われることが多く、その時期には毛細血管のネットワークはすでにある程度形成されていると予想されることから、少なくとも臨床試験をイメージした細胞移植のタイミングを考慮する必要がある。このような問題点を考えて本研究では、血流量がある程度回復した亜急性期に自己 rPBMNCs を移植するプロトコルを採用した。齧歯類の血管新生ネットワークの構築機能や時期はヒトとは異なると思われ、臨床と全く同一条件で研究をすることは困難であるが、本研究で得られた成果は今後の臨床試験において重要な知見を提供していると思われる。

本研究において我々は、低酸素プレコンディショニング処理のプロトコルが自己 PBMNCs 移植に応用できること、また機能増強した PBMNCs が虚血下肢血流を改善することを中型動物を用いた前臨床試験において明らかにした。さらに本研究では、低酸素プレコンディショニング処理した自己 PBMNCs 移植によって、腫瘍が発生しなかったプレリミナリーデータも得ており (未発表デ

ータ)、安全性の面においてもその有用性が証明された。小動物を用いた一連の先行研究と中型動物を用いた本研究の成果から、本研究の次のステップはこのプロトコールを臨床試験に移すことである。PBMNCs 移植のみでは、透析中の末梢性動脈疾患 (PAD) のような患者に対しては効果がほとんど期待できないため[25]、我々は低酸素プレコンディショニング処理した PBMNCs を移植することで、このような患者の重症下肢虚血を改善できるのではないかと考えている。

第5章 謝辞

稿を終えるにあたり、ご指導を賜った山口大学大学院器官病態外科学講座（第一外科）、濱野公一教授に感謝致します。また、実験のご指導を頂きました李桃生教授（長崎大学大学院 医歯薬学総合研究科 幹細胞生物学）、細山徹先生（山口大学大学院器官病態外科学講座）に感謝申し上げます。

第 6 章 参考文献

- [1] P.G. Steg, D.L. Bhatt, P.W. Wilson, R. D'Agostino, Sr., E.M. Ohman, J. Rother, C.S. Liao, A.T. Hirsch, J.L. Mas, Y. Ikeda, M.J. Pencina, S. Goto, R.R. Investigators, One-year cardiovascular event rates in outpatients with atherothrombosis, *JAMA* 297 (2007) 1197-1206.
- [2] L. Norgren, W.R. Hiatt, J.A. Dormandy, M.R. Nehler, K.A. Harris, F.G. Fowkes, T.I.W. Group, Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease (TASC II), *J Vasc Surg* 45 Suppl S (2007) S5-67.
- [3] D.W. Losordo, S. Dimmeler, Therapeutic angiogenesis and vasculogenesis for ischemic disease. Part I: angiogenic cytokines, *Circulation* 109 (2004) 2487-2491.
- [4] T. Asahara, T. Murohara, A. Sullivan, M. Silver, R. van der Zee, T. Li, B. Witzenbichler, G. Schatteman, J.M. Isner, Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis, *Science* 275 (1997) 964-967.
- [5] K. Esato, K. Hamano, T.S. Li, A. Furutani, A. Seyama, H. Takenaka, N. Zempo, Neovascularization induced by autologous bone marrow cell implantation in peripheral arterial disease, *Cell Transplant* 11 (2002) 747-752.
- [6] K. Hamano, M. Nishida, K. Hirata, A. Mikamo, T.S. Li, M. Harada, T. Miura, M. Matsuzaki, K. Esato, Local implantation of autologous bone marrow cells for therapeutic angiogenesis in patients with ischemic heart disease: clinical trial and preliminary results, *Jpn Circ J* 65 (2001) 845-847.
- [7] M. Kubo, T.S. Li, R. Suzuki, B. Shirasawa, N. Morikage, M. Ohshima, S.L. Qin, K. Hamano, Hypoxic preconditioning increases survival and angiogenic potency of peripheral blood mononuclear cells via oxidative stress resistance, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294 (2008) H590-595.
- [8] T.S. Li, K. Hamano, K. Suzuki, H. Ito, N. Zempo, M. Matsuzaki, Improved angiogenic potency by implantation of ex vivo hypoxia prestimulated bone marrow cells in rats, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283 (2002) H468-473.
- [9] T.S. Li, H. Ito, M. Hayashi, A. Furutani, M. Matsuzaki, K. Hamano, Cellular expression of integrin-beta 1 is of critical importance for inducing therapeutic angiogenesis by cell implantation, *Cardiovasc Res* 65 (2005) 64-72.

- [10] M. Zhang, D. Methot, V. Poppa, Y. Fujio, K. Walsh, C.E. Murry, Cardiomyocyte grafting for cardiac repair: graft cell death and anti-death strategies, *J Mol Cell Cardiol* 33 (2001) 907-921.
- [11] S.W. Ryter, H.P. Kim, A. Hoetzel, J.W. Park, K. Nakahira, X. Wang, A.M. Choi, Mechanisms of cell death in oxidative stress, *Antioxid Redox Signal* 9 (2007) 49-89.
- [12] H. Iwaguro, J. Yamaguchi, C. Kalka, S. Murasawa, H. Masuda, S. Hayashi, M. Silver, T. Li, J.M. Isner, T. Asahara, Endothelial progenitor cell vascular endothelial growth factor gene transfer for vascular regeneration, *Circulation* 105 (2002) 732-738.
- [13] D. Zhang, G.C. Fan, X. Zhou, T. Zhao, Z. Pasha, M. Xu, Y. Zhu, M. Ashraf, Y. Wang, Over-expression of CXCR4 on mesenchymal stem cells augments myoangiogenesis in the infarcted myocardium, *J Mol Cell Cardiol* 44 (2008) 281-292.
- [14] M. Kubo, T.S. Li, H. Kurazumi, Y. Takemoto, M. Ohshima, T. Murata, S. Katsura, N. Morikage, A. Furutani, K. Hamano, Hypoxic preconditioning enhances angiogenic potential of bone marrow cells with aging-related functional impairment, *Circ J* 76 (2012) 986-994.
- [15] M. Kubo, T.S. Li, R. Suzuki, M. Ohshima, S.L. Qin, K. Hamano, Short-term pretreatment with low-dose hydrogen peroxide enhances the efficacy of bone marrow cells for therapeutic angiogenesis, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292 (2007) H2582-2588.
- [16] H. Liu, W. Xue, G. Ge, X. Luo, Y. Li, H. Xiang, X. Ding, P. Tian, X. Tian, Hypoxic preconditioning advances CXCR4 and CXCR7 expression by activating HIF-1alpha in MSCs, *Biochem Biophys Res Commun* 401 (2010) 509-515.
- [17] I. Rosova, M. Dao, B. Capoccia, D. Link, J.A. Nolte, Hypoxic preconditioning results in increased motility and improved therapeutic potential of human mesenchymal stem cells, *Stem Cells* 26 (2008) 2173-2182.
- [18] M. Kubo, T.S. Li, T. Kamota, M. Ohshima, S.L. Qin, K. Hamano, Increased expression of CXCR4 and integrin alphaM in hypoxia-preconditioned cells contributes to improved cell retention and angiogenic potency, *J Cell Physiol* 220 (2009) 508-514.
- [19] S. Inaba, K. Egashira, K. Komori, Peripheral-blood or bone-marrow mononuclear cells for therapeutic angiogenesis?, *Lancet* 360 (2002) 2083; author reply 2084.
- [20] T. Minamino, H. Toko, K. Tateno, T. Nagai, I. Komuro, Peripheral-blood or bone-marrow mononuclear cells for therapeutic angiogenesis?, *Lancet* 360 (2002) 2083-2084; author reply 2084.

- [21] E. Tateishi-Yuyama, H. Matsubara, T. Murohara, U. Ikeda, S. Shintani, H. Masaki, K. Amano, Y. Kishimoto, K. Yoshimoto, H. Akashi, K. Shimada, T. Iwasaka, T. Imaizumi, I. Therapeutic Angiogenesis using Cell Transplantation Study, Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial, *Lancet* 360 (2002) 427-435.
- [22] M. Hayashi, T.S. Li, H. Ito, A. Mikamo, K. Hamano, Comparison of intramyocardial and intravenous routes of delivering bone marrow cells for the treatment of ischemic heart disease: an experimental study, *Cell Transplant* 13 (2004) 639-647.
- [23] K. Lunde, S. Solheim, S. Aakhus, H. Arnesen, M. Abdelnoor, T. Egeland, K. Endresen, A. Ilebakk, A. Mangschau, J.G. Fjeld, H.J. Smith, E. Taraldsrud, H.K. Groggaard, R. Bjornerheim, M. Brekke, C. Muller, E. Hopp, A. Ragnarsson, J.E. Brinchmann, K. Forfang, Intracoronary injection of mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction, *N Engl J Med* 355 (2006) 1199-1209.
- [24] V. Schachinger, S. Erbs, A. Elsasser, W. Haberbosch, R. Hambrecht, H. Holschermann, J. Yu, R. Corti, D.G. Mathey, C.W. Hamm, T. Suselbeck, B. Assmus, T. Tonn, S. Dimmeler, A.M. Zeiher, R.-A. Investigators, Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction, *N Engl J Med* 355 (2006) 1210-1221.
- [25] J. Moriya, T. Minamino, K. Tateno, N. Shimizu, Y. Kuwabara, Y. Sato, Y. Saito, I. Komuro, Long-term outcome of therapeutic neovascularization using peripheral blood mononuclear cells for limb ischemia, *Circ Cardiovasc Interv* 2 (2009) 245-254.
- [26] Y. Hamada, K. Gonda, M. Takeda, A. Sato, M. Watanabe, T. Yambe, S. Satomi, N. Ohuchi, In vivo imaging of the molecular distribution of the VEGF receptor during angiogenesis in a mouse model of ischemia, *Blood* 118 (2011) e93-e100.