

糖尿病における血管機能障害に関する基礎的および臨床的検討

所属機関 自治医科大学附属さいたま医療センター
研究者名 百村 伸一

《最終報告書概要》

本研究の目的は糖尿病における血管障害とくに血管内皮機能障害について基礎的および臨床的検討を加え、さらには糖尿病性血管障害の新たな治療法の評価をおこなうことであつた。この目的に迫るために、生理学的手法 (live cell imaging 法)、分子生物学的アプローチ、臨床的アプローチによる研究を行い多くの成果が得られたのでここに報告する。

安 隆則	琉球大学大学院 医学研究科薬物作用制御学助教	糖尿病患者における血管内皮機能、 血液レオロジーの臨床的研究
佐田 正隆	徳島大学 ヘルスバイオサイエンス研究部教授	糖尿病モデルにおける血管障害の分 子生物学的解析
杉浦 清了	東京大学大学院 新領域創成科学研究科教授	糖尿病モデルにおける Live cell imaging を用いた血管系の検討

A. Living cell image 法を用いた研究

1) 実施内容

まず初年度は共焦点顕微鏡を用いて生きたままの組織における細胞の蛍光染色による分類/同定および異なる細胞間の相互作用を観察する系を確立した (live cell imaging)。既にマウスの脂肪組織の増殖が血管新生とそれに伴う間葉系の細胞の浸潤と密接に関係していることを明らかにしたが (Nishimura et al. 2006 AHA)、本研究においてはこの技法を応用して血管内皮の形質変化と微小循環の血流動態との関係を検討した。糖尿病をはじめとする生活習慣病において内皮機能の異常が報告されているが、本研究によって従来転写・タンパク発現レベルで認識されてきた異常と機能変化との直接の関係が確立されれば病態の解明に役立つことが期待された。

第2年度は脂肪組織内の炎症に注目して研究を行った。糖尿病を含むメタボリック症候群の上流には内臓脂肪の蓄積があるが近年その病態形成、特に肥満における脂肪組織において炎症が深く関わっていることが注目されている。特に炎症に関わる微小循環 (内皮細胞) と炎症細胞 (白血球、マクロファージ、単球) に注目しそれらの細胞間相互作用を可視化することにより明らかにした。また肥満動物の内臓脂肪特異的に起こっている細胞相互作用および微小循環の変化を明らかにするとともにそれらを支える接着分子の動態を解析した。

第3年度はこれらをさらに発展させ詳細なメカニズムを明らかにすることを行った。この結果生活習慣病を引き起こす脂肪組織の炎症カスケードの上流には CD8+ のエフェクター T 細胞の脂肪組織への浸潤がありこれに引き続いてマクロファージの浸潤が生じることが示唆された。さらに CD8 に対する抗体の投与は T 細胞およびマクロファージの浸潤を抑え CD8+ T 細胞の浸潤が脂肪組織における炎症の引きがねとなっていると考えられた。こ

れと並行して心筋組織の観察を行い静止した状態での観察は成功したが冠循環の動態については拍動に伴う観察の障害を克服するまでにはいたらなかった。

これに関しては今後さらなる取り組みを行ってゆきたい。

2) 成果

糖尿病モデル動物 (Zucker rat) よりも肥満マウスを対象とした実験での成果が大きかった。肥満マウス (ob/ob) と対照群 (ob/+) の精巣上体脂肪組織を比較したところ脂肪細胞の大きさに明らかな差がありさらに肥満動物では血管新生と脂肪細胞とは明らかに異なる細胞の浸潤が認められたこれらの細胞の由来を明らかにする目的で免疫染色を行ったところマクロファージ由来、内皮細胞由来、小脂肪細胞などが同定された。さらに肥満マウスに抗 VEGF 抗体を投与したところ明らかな血管新生像の消失とさらに晩期においては小脂肪細胞の著明な減少が認められた。これらの結果は脂肪細胞の増生が血管新生と密接に関係していることを示している。血管新生の抑制による脂肪組織の減少は既に報告されているが、明らかな血管新生像の消退と細胞の種類および形態の変化を観察したのは本研究が最初であった。

第2年度には肥満マウス (ob/ob) を用い (ob/-) を対照とし生体内 (生きた状態) における脂肪組織内の微小循環を観察した。麻酔下のマウスの腹膜を切開し精巣上体白色脂肪組織を露出し倒立顕微鏡のステージにおいた後共焦点顕微鏡を用い以下の方法で微小循環を蛍光観察した。血流は FITC デキストランを静脈内投与することによって描出し、白血球はアクリジンオレンジによる核染色で、血小板は蛍光標識された抗 CD41 抗体により特異的に可視化した。この結果肥満動物の脂肪組織においては細静脈において血管壁への白血球の rolling (図 1) と adhesion (図 2) が増加し、これには活性化血小板の adhesion が伴っていること、脂肪組織中では血流の低下があり低酸素状態が起こっていること、血管内皮の透過性亢進 (蛍光色素の流出 図 3) などが認められ肥満状態の内臓脂肪組織に炎症反応が起こっていることが示唆された。また PCR 法、フローサイトメトリーによる表面マーカーの解析では内皮細胞とマクロファージが形質転換を起こしており ICAM1、P-selectin、L-selectin、PECAM1 などの接着分子の発現が亢進していた。また同様の所見が高脂肪食を与えたマウスにおいても観察されたが皮下脂肪や骨格筋ではこのような所見は得られず炎症性の細胞の変化は肥満動物の内臓脂肪特異的に起こっていることが示された。これらの結果から ICAM-1 に注目しその中和抗体を投与したところ急性には炎症に伴う細胞間相互作用を抑制し、慢性には脂肪組織のリモデリングを抑える効果が認められた。以上、メタボリック症候群の病態には炎症反応に伴う細胞間の相互作用が関与しておりそのネットワーク形成を支える接着分子が抗肥満治療の標的の一つとなる可能性が示唆された。

さらに高脂肪食で飼育したマウスの内臓脂肪組織をフローサイトメトリーで解析したところマクロファージ分画および CD31+の内皮細胞の増加がみられ後者は血管新生を反映するものと考えられた。また T 細胞については CD8+分画の増加と CD4+分画の減少が認められたが末梢血においてはこのような変化はなかった。次に免疫染色によって組織を観察したところやはりマクロファージと CD8+T 細胞の増加と CD4+T 細胞の減少が見られ CD8+T 細胞は既に報告した冠様構造と呼ばれる壊死脂肪組織を取り巻くマクロファージなどの細胞群の中に集積していた。さらにこの細胞は CD62L⁻、CD44⁺の性質を持っており活性化さ

れたエフェクターT細胞と考えられた。経時的な変化を調べたところ CD8+CD4⁻細胞の増加が CD80CD4⁺細胞および CD4+CD25+FoxP3+regulatory T細胞の減少に先行しておりエフェクターT細胞の増加が一連の変化の引きがねとなっていることが強く示唆された。この点を検証するために CD8 に対する中和抗体を腹腔内注射したマウスに高脂肪食を与え反応を観察したところ体重や脂肪組織の重量に変化は見られなかったものの CD8+CD4⁻細胞の減少およびマクロファージ浸潤の低下が認められ脂肪組織の炎症反応におけるエフェクターT細胞の重要性が証明された。またこの際流血中の CD8+CD4⁻細胞には変化は認められておらずエフェクターT細胞の活性化は脂肪組織に局在した現象であると考えられた。近年脂肪組織は不活性なものではなく様々なサイトカインを分泌し生活習慣病の病態形成に大きく関わっていることが明らかになっている。今回の結果は生活習慣病のメカニズム解明に貢献するものとする。

一方冠循環の観察についてはこれまでに確立した方法を用いて静止した状態では心筋組織内の微小血管を描出することが可能であった(図)。しかし血流を観察するために拍動状態での観察を試みたが運動による効果を除外し生理的な循環を評価することは実現できなかった。

B. 動脈硬化、血管傷害の動物モデルを用いた分子生物学的検討

1) 実施内容

初年度は多重蛍光染色と走査電子顕微鏡法を用い、また動物実験モデルとしては ApoE 欠損マウス (ApoE^{-/-}) に、ストレプトゾトシンを注射して、高度に進行した糖尿病性進行動脈硬化を作成した。これらによって血管の恒常性を維持するために重要であると注目されている血中血管前駆細胞の機能障害、血管前駆細胞の内皮様もしくは平滑筋様細胞への分化調節における液性、力学的因子、さらには糖尿病による血管前駆細胞異常の分子基盤についても検討を行った。

第2年度には動脈硬化、血管傷害の動物モデルを活用して、糖尿病性大血管合併症の病態を研究した。特に、血管外膜脂肪組織周囲と血管壁との物理的、機能的、生理的相互関係に注目し、糖尿病が病的血管リモデリングを助長するのかを検討した。また、糖尿病モデルマウスと野生型マウスを用いて、血管周囲脂肪組織の形質を比較検討した。機械的大腿動脈傷害後の内膜増殖、高脂血症にともなう粥状動脈硬化の質と量に対する糖尿病の影響を検討した。次に、野生型ならびに糖尿病マウス間で血管外脂肪組織を相互置換し、血管病変形成への影響を評価し、さらには、心臓手術時に心外膜脂肪組織を患者から採取して、糖尿病患者における心外膜脂肪組織のアディポカイン発現、脂肪のサイズ、炎症細胞浸潤の程度を比較検討した。また糖尿病患者における動脈硬化の進展と破綻における病変周囲脂肪組織の炎症細胞浸潤と遺伝子発現変化に注目し、糖尿病における動脈硬化プラーク破綻の分子機序を動物モデル、急性冠症候群患者から採取した血清、手術標本などを用いて検討した。

第3年度には脂質異常症による動脈硬化、血管傷害後による内膜増殖の動物モデルを活用して、糖尿病性大血管合併症の病態を研究した。特に、従来の動脈硬化研究で注目されてこなかった、血管外膜脂肪組織周囲と血管壁との物理的、機能的、生理的相互関係に注目し、糖尿病が病的血管リモデリングを助長する機序について検討した。血管外膜にお

る毛細血管の発達を蛍光標識技術、走査型電子顕微鏡など先端画像診断技術で判断した。血管外膜周囲に豊富に存在する脂肪組織の形質が、糖尿病によって変化するか、どのような影響を血管病変形成に及ぼすかに着目して、遺伝子発現の検討と免疫染色を行った。血管外膜周囲脂肪組織を残した場合と、除去した場合で、血管傷害を加えて病変の形成の程度を比較検討した。

心臓手術時に心外膜脂肪組織、皮下脂肪、内胸動脈周辺脂肪を患者から採取して、糖尿病患者におけるアディポネクチン、炎症性サイトカインの発現、脂肪のサイズ、炎症細胞浸潤の程度、マクロファージやT細胞といった炎症細胞のサブセットを健常者と比較検討した。

2) 成果

初年度には whole mount 多重蛍光染色と走査電子顕微鏡法を用い高度動脈硬化病変をもった 100 週齢 ApoE 欠損マウスの血管走行様式を検討し血管外膜脂肪組織と血管壁、動脈硬化プラークは微小毛細血管で直接交通していることが明らかとなった。また、血管拡張傷害により外膜周囲脂肪組織で炎症性アディポサイトカインの発現が亢進していることも明らかにした。

次年度には血管のホメオスタシスの維持とリモデリングに対する血管外周囲脂肪組織の意義を検討した。血管外膜周囲に豊富に存在する脂肪組織の形質を、皮下脂肪、内臓脂肪と比較した。血管外脂肪組織は通常は皮下脂肪に近いものの、血管傷害を契機に内臓脂肪型に形質を転換することが明らかとなった。特に、アディポネクチンの低下、IL-6、TNF α 、PAI-1 の増加が目立った。3T3L1 細胞を脂肪細胞に分化させたのち *in vitro* で進展しても同様の変化は認められなかったことから、血管拡張による外部からの進展刺激がアディポカインの発現変化を誘導するのではないことが明らかとなった。TNF α ノックアウトマウスでは炎症性サイトカインの誘導が抑制された。また TNF α の外部からの投与では、炎症性サイトカインの発現が誘導された。以上より、血管傷害により血管壁で発現した TNF α が外膜周囲脂肪組織の遺伝子発現変化に重要であると考えられた。

さらに、血管外膜周囲脂肪組織から遊離されるアディポサイトカインの血管リモデリングにおける生理的意義を、遺伝子改変マウスを用いて検討した。血管周囲脂肪組織を除去してワイヤー傷害を施行すると、新生内膜形成が促進されたが、他の野生型マウスから皮下脂肪組織を移植すると病変形成が抑制された。アディポネクチンノックアウトマウスから皮下脂肪を移植しても抑制効果を認めなかったが、同量のアディポネクチンを徐放製剤として外膜周囲に局所投与すると著明な抑制効果がみられた。

これらの結果より、外膜周囲脂肪組織は、通常ホメオスタシスの維持と病的血管リモデリングに対して防御的に機能することが明らかとなった。また、糖尿病をはじめとする代謝性疾患において、外膜周囲脂肪組織の形質が変化し、炎症が惹起され、病変形成が促進される可能性が示唆された。

第3年度には、糖尿病、肥満マウスの血管周囲脂肪を調べたところ、野生型マウスと比較して、アディポネクチン発現は減少し、IL-6、TNF α 、PAI-1 といった炎症性のサイトカインの発現が増加していた。このような、血管周囲脂肪組織の形質の変化に引き続き、外膜や血管周囲の炎症細胞浸潤が惹起された。糖尿病存在下では、この傾向は増悪し、ま

た血管傷害後の内膜増殖が促進していた。高脂血症による粥状動脈硬化モデルである ApoE 欠損マウスでも同様の傾向を観察することができた。

また、手術時に得られた心外膜脂肪組織の解析では、冠動脈疾患患者、特に糖尿病患者では、非冠動脈疾患患者に比較して、心外膜脂肪細胞の大型化、マクロファージ、CD8 陽性 T 細胞の浸潤、アディポネクチンの発現低下、IL-6、MCP-1、TNF α の発現亢進を認めた。マクロファージにおいても炎症惹起型の M1 マクロファージが炎症抑制型の M2 マクロファージに比して著明に増加していた。この傾向は、糖尿病患者で増悪しており、HbA1C と心臓周囲脂肪組織の炎症マーカーの発現には相関関係が認められた。

以上より、糖尿病において、血管壁自体のみならず、血管外膜ならびに周囲脂肪組織において、炎症と血管新生が惹起されて動脈硬化の病態が加速していることが明らかとなった。

C. 臨床的検討

1) 実施内容

臨床的検討としては初年度に糖尿病における血管障害の週末像の一つともいえる閉塞性動脈硬化症に焦点をあてて臨床的検討と治療法の検討を行った。動脈硬化の進展や心血管イベントの発症に血管内皮細胞の障害のみならず血液レオロジーの変化が重要な役割をはたしていることが報告されており、また血液中の骨髄由来内皮前駆細胞 (EPC) が血管内皮機能と良い相関を占め動脈硬化の抑制や血管申請、血管修復に寄与することも報告されている。初年度は運動+スタチンにより EPC の増加を介して新生血管が増加し、一方で血管内皮機能、酸化ストレス、血液レオロジーも改善することにより心血管イベント抑制につながることを予想し糖尿病患者における末梢動脈疾患に対して運動療法+スタチン併用療法が運動耐容能と QOL、EPC と内皮機能、酸化ストレス、血液レオロジーにあたる影響についても検討した。

実施内容および成果

心血管疾患のリスクである II 型糖尿病患者では、脂肪細胞由来の遊離脂肪酸血中濃度が上昇することが知られている。脂肪製剤とヘパリンの同時投与により血液中の遊離脂肪酸濃度を上昇させると、健常者においても再現性高く 1 時間後から血管内皮機能障害、さらに 2 時間後からインスリン感受性の低下が出現する。第 2 年度にはこのヒト脂肪負荷実験系と全身のレニン・アンジオテンシン系 (RAS) の関連を検討した。またジヒドロピリジン系カルシウム拮抗薬の白血球活性化や血液流動性と血管内皮機能に対する効果も検討した。糖尿病における血管障害の終末像の一つともいえる虚血性心血管疾患や閉塞性動脈硬化症に焦点をあてて臨床的検討と治療法の検討も行った。

第 3 年度には第 2 年度の研究をさらにすすめ、遊離脂肪酸上昇時 (メタボリック症候群擬似状態) におけるサロゲートマーカーでもある血管内皮機能と微小循環状態を把握し、内皮機能や微小循環改善薬のスクリーニングの目的で、RAS 系阻害薬をはじめとする心血管薬の薬効評価を実施した。血管内皮機能は、プレシスモグラフィを用いアセチルコリンによる前腕末梢抵抗血管拡張作用により測定した。経時的に採血を行い、ex vivo 毛細血管モデルを用いての血液流動性試験、白血球 (単核球成分と多核球成分) のアンジオテンシン II 産生酵素活性、血液中の酸化ストレスの指標として dROMs test (ヒドロペルオ

キシドを定量分析) を測定した。心筋微小循環評価法として薬剤を用いた反応性充血時の心筋微小循環をコントラストエコー法を用いて評価した。

また、遊離脂肪酸負荷によるインスリン抵抗性の機序の解明と抵抗性改善を目標とした薬物療法確立のためにアンジオテンシン II 受容体拮抗薬 (ARB) の薬効評価を二重盲検クロスオーバー法にしたがって、最も信頼度の高いグルコースクランプ法を用いて実施した

2) 成果

初年度の臨床的検討ではアセチルコリンによる末梢抵抗血管の血管内皮機能や平滑筋機能評価の系に脂肪負荷 (+ヘパリン) を行いその結果得られる血中遊離脂肪酸の上昇がアセチルコリンの用量反応曲線を右方偏位させること、すなわち血管内皮機能が低下すること、さらに末梢血レニン活性の上昇を伴わないにもかかわらずアンジオテンシン転換酵素阻害薬やアンジオテンシン II 受容体拮抗薬などのレニン・アンジオテンシン系抑制薬によってこの脂肪負荷惹起血管内皮機能低下が改善する現象を観察しえた。最近の安らの研究では (未発表) 遊離脂肪酸上昇時に末梢血レニン活性や ACE 活性とは解離して単核球でのアンジオテンシン産生系が亢進するデータを得ている。またこの遊離脂肪酸上昇は、インスリン感受性を 40-50% 減少させ、血漿ミエロペルオキシダーゼ濃度の著明な増加に示される白血球活性化 (30-70%) や毛細血管 *ex vivo* モデルである Microchannel Flow Analyzer での全血通過時間 (血液レオロジー) の延長をもたらすという知見を得ている。

第2年度はヒト脂肪負荷実験系において全身のレニン・アンジオテンシン系 (RAS) とは解離して単核球 RAS 活性が亢進し、白血球を活性化させるデータを得、これらの反応はアンジオテンシン II 受容体拮抗薬により予防可能であることを我々は報告した。またジヒドロピリジン系カルシウム拮抗薬も、有意にこの系での白血球活性化を抑え、血液流動性と血管内皮機能を改善したが、その主たる機序として抗酸化作用が有力と考えられた。

虚血性心血管疾患や閉塞性動脈硬化症に焦点をあてて臨床的検討と治療法の検討では心血管イベントのサロゲートマーカーである血管内皮機能が、虚血性心血管疾患患者において食前後とも健常者と比較して有意に低下していること、この血管内皮機能の低下をスタチン療法が主に抗酸化ストレス作用を介して改善させることを報告した。血液中の骨髄由来内皮前駆細胞 (EPC) は血管修復に寄与するが、急性心筋梗塞後に積極的運動リハビリテーションを施行した群では施行していない群と比較して EPC が増加し運動耐容能が改善することも報告した。

第3年度には、前年の研究をさらに推進した。脂肪製剤とヘパリンの同時投与により血液中の遊離脂肪酸濃度を上昇させると、健常者においても再現性高く1時間後から血管内皮機能障害、さらに2時間後からインスリン感受性の低下が出現し、擬似メタボリックシンドローム状態に一過性になる。このヒト脂肪負荷実験系では、全身のレニン・アンジオテンシン系 (RAS) とは解離して単核球と多核球 RAS 活性が亢進し、かつ白血球を活性化させるデータを得、これらの血管内皮機能障害と白血球活性化反応はアンジオテンシン II 受容体拮抗薬により予防可能であることを我々は報告した。またこの血液中の遊離脂肪酸濃度上昇モデルでは反応性充血時の心筋微小血管抵抗を上げ速度を減少させ、微小循環を悪化させることを心筋コントラストエコー法を用いて示した。この微小循環の悪化は RAS 阻害薬により予防することができ、さらにジヒドロピリジン系カルシウム拮抗薬も、有意に

この系での白血球活性化を抑え、血液動性と血管内皮機能を改善したが、その主たる機序として抗酸化作用が有力と考えられた。

血中の遊離脂肪酸濃度を上昇させるとインスリン感受性の指標であるM値は有意に低下した。(生食+ヘパリン: 10.7 ± 2.8 mg/kg/min、脂肪製剤/ヘパリン+プラセボ: 6.2 ± 2.1 mg/kg/min) これに対して、ロサルタン7日間内服投与は、用量依存性に遊離脂肪酸上昇時のインスリン感受性低下を予防した。本研究では、質の高い研究デザイン(二重盲検クロスオーバー法)かつもっとも信頼度が高いグルコースクランプ法でインスリン感受性を評価しその結果、脂肪毒性によるインスリン感受性低下病態におけるレニン-アンギオテンシン系の役割が明らかとなり、アンギオテンシンII受容体ブロッカーであるロサルタンのインスリン抵抗性改善薬、抗動脈硬化薬としての有用性が示された。

業績リスト

1. Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, Eto K, Yamashita H, Ohsugi M, Otsu M, Hara K, Sugiura S, Yoshimura K, Kadowaki T, Nagai R CD8+ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity Nat Med 15: 2009; 914-920
2. Enomoto, S., Sata, M., Fukuda, D., Nakamura, K., Nagai, R. Rosuvastatin prevents endothelial cell death and reduces atherosclerotic lesion formation in ApoE-deficient mice. Biomed Pharmacother. 2009. 63. 19-26.
3. Kusunose K, Yamada H, Todoroki T, Nishio S, Niki T, Yamaguchi K, Koshihara K, Yagi S, Iwase T, Soeki T, Wakatsuki T, Akaike M, Kitagawa T, Sata M. Platypnea-orthodeoxia syndrome associated with patent foramen ovale and aortic ectasia. Echocardiography. 2009. 26. 114-117.
4. Meguro K, Iida H, Takano H, Morita T, Sata M., Nagai R, Nakajima T. Function and Role of Voltage-Gated Sodium Channel (Nav1.7) Expressed in Aortic Smooth Muscle Cells. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2009. 296. H211-219.
5. Ono Y, Nakaya Y, Bando S, Soeki T, Ito S, Sata M. Telmisartan Decreases Plasma Levels of Asymmetrical Dimethyl-L-Arginine and Improves Lipid and Glucose Metabolism and Vascular Function. Int Heart J. 2009. 50. 73-83.
6. Nagata D, Kiyosue A, Takahashi M, Satonaka H, Tanaka K, Sata M., Nagano T, Nagai R, Hirata Y. A new constitutively active mutant of AMP-activated protein kinase inhibits anoxia-induced apoptosis of vascular endothelial cell. Hypertens Res. 2009. 32. 133-139.
7. Hanajiri K, Mitsui H, Maruyama T, Hashimoto N, Sata M., Omata M. Echographic detection of diethylnitrosamine-induced liver tumors in rats and the effect of the intratumoral injection of an inhibitor of c-Jun N-terminal kinase. J Gastroenterol Hepatol. 2009. 24. 866-871.
8. Fukuda D, Enomoto S, Nagai R, Sata M. Inhibition of renin-angiotensin system attenuates periaortic inflammation and reduces atherosclerotic lesion formation. Biomed Pharmacother. 2009. 63. 754-761.

9. Fukuda D, Enomoto S, Shirakawa I, Nagai R, **Sata M**. Fluvastatin accelerates re-endothelialization impaired by local sirolimus treatment. *Eur J Pharmacol.* 2009. 612. 87-92.
10. Sainz J, **Sata M**. When p66^{ShcA} is away, mice EPCs sweetly play. *Cardiovasc Res.* 2009. 82. 388-389.
11. Aihara K, Azuma H, Akaike M, Kurobe H, Takamori N, Ikeda Y, Sumitomo Y, Yoshida S, Yagi S, Iwase T, Ishikawa K, **Sata M**, Kitagawa T, Matsumoto T. Heparin Cofactor II is an Independent Protective Factor against Peripheral Arterial Disease in Elderly Subjects with Cardiovascular Risk Factors. *J Atheroscler Thromb.* 2009. 16. 127-134.
12. Huang PH, Chen YH, Wang CH, Chen JS, Tsai HY, Lin FY, Lo WY, Wu TC, **Sata M**, Chen JW, Lin SJ. Matrix Metalloproteinase-9 Is Essential for Ischemia-Induced Neovascularization by Modulating Bone Marrow-Derived Endothelial Progenitor Cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009. 29. 1179-1184.
13. Kusunose K, Yamada H, Nishio S, Tomita N, Niki T, Yamaguchi K, Koshiba K, Yagi S, Taketani Y, Iwase T, Soeki T, Wakatsuki T, Akaike M, **Sata M**. Clinical Utility of Single Beat E/e' Obtained by Simultaneous Recording of Flow and Tissue Doppler Velocities in Atrial Fibrillation with Preserved Systolic Function. *J Am Coll Cardiol Img.* 2009. 2. 1147-1156.
14. Iwata H, Nakamura K, Sumi M, Ninomiya M, Sakai Y, Hirata Y, Akaike M, Igarashi T, Takamoto S, Nagai R, **Sata M**. Local delivery of synthetic prostacycline agonist augments collateral growth and improves cardiac function in a swine chronic cardiac ischemia model. *Life Sci.* 2009. 85. 255-261.
15. Tokudome T, Kishimoto I, Yamahara K, Osaki T, Minamino N, Horio T, Sawai K, Kawano Y, Miyazato M, **Sata M**, Kohno M, Nakao K, Kangawa K. Impaired Recovery of Blood Flow Following Hind-Limb Ischemia in Mice Lacking Guanylyl Cyclase-A, a Receptor for Atrial and Brain Natriuretic Peptides. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009. 29. 1516-1521.
16. Tanaka K, **Sata M**. Role of vascular progenitor cells in cardiovascular disease. *Curr Pharm Des.* 2009. 15. 2760-2768.
17. Kim HJ, Yoo EK, Kim JY, Choi YK, Lee HJ, Kim JK, Jeoung NH, Lee KU, Park IS, Min BH, Park KG, Lee CH, Aronow BJ, **Sata M**, Lee IK. Protective Role of Clusterin / Apolipoprotein J Against Neointimal Hyperplasia via Antiproliferative Effect on Vascular Smooth Muscle Cells and Cytoprotective Effect on Endothelial Cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009. 29. 1558-1564.
18. Takaoka, M., Nagata, D., Kihara, S., Shimomura, S., Kimura, Y., Tabata, Y., Saito, Y., Nagai, R., **Sata, M**. Periadventitial adipose tissue plays a critical role in vascular remodeling. *Circ Res.* 2009. 105. 906-911.
19. Aihara KI, Azuma H, Akaike M, **Sata M**, Matsumoto T. Heparin Cofactor II as a

- Novel Vascular Protective Factor Against Atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb.* 2009. 16. 523-531.
20. Hirata Y, Soeki T, Akaike M, Sakai Y, Igarashi T, **Sata M**. Synthetic prostacycline agonist, ONO-1301, ameliorates left ventricular dysfunction and cardiac fibrosis in cardiomyopathic hamsters. *Biomed Pharmacother.* 2009. 63. 781-786.
 21. Enomoto S, Sumi M, Kajimoto K, Nakazawa Y, Takahashi R, Takabayashi C, Asakura T, **Sata M**. Long-term Patency of Small-diameter Vascular Graft Made from Fibroin, a Silk-based Biodegradable Material. *J Vasc Surg.* 2010. 51. 155-164.
 22. Sainz J, **Sata M**. When EPC says: I2 shall limit neointima formation! *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2010. 30. 457-458.
 23. **Sata M**, Fukuda D. Crucial role of renin-angiotensin system in the pathogenesis of atherosclerosis. *The Journal of Medical Investigation.* 2010. 57. 12-25.
 24. Yagi S, Akaike M, Aihara K, Iwase T, Ishikawa K, Yoshida S, Ueda Y, Kusunose K, Niki T, Yamaguchi K, Koshiba K, Hirata Y, Munkhbaatar D, Taketani Y, Tomita N, Yamada H, Soeki T, Wakatsuki T, Matsumoto T, **Sata M**. Ezetimibe ameliorates metabolic disorder and microalbuminuria in patients with hypercholesterolemia. *J Atheroscler Thromb.* 2010. 17. 173-180.
 25. Sainz J, **Sata M**. Is PIGF a Plaque Growth Factor? *Cardiovasc Research.* 2010. 86. 4-5.
 26. Huang PH, Chen YH, Tsai HY, Chen JS, Wu TC, Lin FY, **Sata M**, Chen JW, Lin SJ. Intake of Red Wine Increases the Number and Functional Capacity of Circulating Endothelial Progenitor Cells by Enhancing Nitric Oxide Bioavailability. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010. 30. 869-877.
 27. Yagi S, Akaike M, Aihara K, Ishikawa K, Iwase T, Ikeda Y, Soeki T, Yoshida S, Sumitomo-Ueda Y, Matsumoto T, **Sata M**. eNOS-independent Protective Action of Statin Against Angiotensin II-induced Atrial Remodeling via Reduced Oxidant Injury. *Hypertension.* 2010. 55. 918-923.
 28. Iwata H, **Sata M**, Ando J, Fujita H, Morita T, Sawaki D, Takahashi M, Hirata Y, Takanashi S, Tabata M, Hirata Y, Nagai R Takanashi S, Hirata Y, Nagai R. Impact of primitive cells in intracoronary thrombi on lesion prognosis: Temporal analysis of cellular constituents of thrombotic material obtained from patients with acute coronary syndrome. *Heart.* 2010; 96: 748-755
 29. Kusunose K, Yamada H, Tomita N, Nishio S, Niki T, Yamaguchi K, Koshiba K, Yagi S, Taketani Y, Iwase T, Soeki T, Wakatsuki T, Akaike M, **Sata M**. Serial Imaging Changes during Treatment of Takayasu Arteritis with Pulmonary Artery Stenosis. *Int J Cardiol.* in press.
 30. Nakazawa Y, Sato M, Takahashi R, Yamazaki S, Takabayashi C, Tamura T, Enomoto S, **Sata M**, Asakura T. Development of Small-Diameter Vascular Grafts Based on Silk Fibroin Fibers from *Bombyx mori* for Vascular Regeneration. *Journal of*

Biomaterials Science. 2010 in press

31. Niki T, Wakatsuki T, Yamaguchi K, Kusunose K, Koshiha K, Yagi S, Taketani Y, Iwase T, Tomita N, Yamada H, Soeki T, Akaike M, **Sata M**. Comparison of chronic-stage histopathological findings among 3 coronary stents implanted in the same patient. *Int J Cardiol.* in press
32. Yagi S, Akaike M, Fujimura M, Kimura T, Nishiuchi T, Iwase T, Aihara K, Yoshida S, Sumitomo-Ueda Y, Kusunose K, Niki T, Yamaguchi K, Koshiha K, Hirata Y, Dagvasumberel M, Taketani Y, Tomita N, Yamada H, Soeki T, Wakatsuki T, Matsumoto T, **Sata M**. Congenital ventricular aneurysm manifesting as monofocal premature ventricular contractions. *Intern Med.* in press
33. Yamada H, Mishiro Y, Kusunose K, **Sata M**. Effects of Additional Administration of Low-Dose Indapamide on Patients With Hypertension Treated With Angiotensin II Receptor Blocker. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 2010 in press
34. Kusunose K, Yamada H, Iwase T, Nishio S, Tomita N, Niki T, Yamaguchi K, Koshiha K, Taketani Y, Soeki T, Wakatsuki T, Akaike M, Takao S, Harada M, Kagawa N, Kudo E, **Sata M**. Cardiac Magnetic Resonance Imaging and 2D Speckle Tracking Echocardiography in Secondary Cardiac Amyloidosis. *Circ J.* in press
35. Sahara M, **Sata M**, Morita T, Nakajima T, Hirata Y, Nagai R. A Phosphodiesterase-5 Inhibitor Vardenafil Enhances Angiogenesis Through a Protein Kinase G-Dependent Hypoxia-Inducible Factor-1/Vascular Endothelial Growth Factor Pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* in press
36. Takaoka M, Suzuki H, Shioda S, Sekikawa K, Saito Y, Nagai R, **Sata M**. Endovascular injury induces rapid phenotypic changes in perivascular adipose tissue. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* in press
37. Azekosi Y*, **Yasu T*** (* co-first authors), Watanabe S, Tagawa T, Abe S, Yamakawa K Uehara Y, **Momomura S**, Urata H, Ueda S. FFA causes leukocyte activation and resultant endothelial dysfunction through enhanced angiotensin II production in mononuclear and polymorphonuclear cells. *Hypertens* (in press)
38. **Yasu T**, Ikeda N. Whole blood passage time is through microchannels reflects whole blood rheology in vivo. (Author's reply) *Circ J* (in press)
39. Sakakura K, Kubo N, Ako J, Wada H, Funayama H, Nakamura T, Ikeda N, Nakamura T, Sugawara Y, **Yasu T**, Kawakami M, **Momomura S**. Peak C-reactive protein level predicts long-term outcomes in type B acute aortic dissection. *Hypertens.* 2010; 55: 422-429.
40. Ikeda N, **Yasu T**, Tsuboi K, Sugawara Y, Kubo N, Umemoto T, Arao K, Kawakami M, **Momomura S**. Effects of submaximal exercise on blood rheology and sympathetic nerve activity. *Circ J.* 2010; 74: 730-734.
41. Arao K, **Yasu T**, Umemoto T, Jinbo S, Ikeda N, Ueda S, Kawakami M, **Momomura S**. Effects of pitavastatin on postprandial endothelial function, oxidative stress, and hemorheology in patients with stable angina pectoris. *Circ J* 2009; 73:

1523-1530.

42. Katayama T, Yasu T, Kinoshita N, Kakehashi A, Kubo N, Saito M, Momomura S, Kawakami M. Diabetes mellitus as a predictor of retinopathy associated with acute myocardial infarction. *Circ J* 2009; 73: 1278-1282.
43. Sakakura K, Kubo N, Ako J, Ikeda N, Funayama H, Hirahara T, Wada H, Sugawara Y, Yasu T, Kawakami M, Momomura S. Clinical Features of Early Recurrent Myocardial Infarction. *Heart and Vessels*. 2009; 24: 347-351.
44. Sakakura K, Kubo N; Ako J; Fujiwara N, Funayama H; Ikeda N; Sugawara Y; Yasu T; Kawakami M; Momomura S. Determinants of Long-term Mortality in patients with type B acute aortic dissection. *Am J Hypertens*. 2009; 22: 371-377.
45. Yasu T. Differentiation of endothelial progenitor cells: a useful biomarker? *Circ J* 2009; 73: 1199-1200.