

분화 유도된 근육줄기세포의 내막증식 억제 효과

¹서울대학교 의과대학 외과학교실, ²서울대학교 보라매병원 외과,
³분당서울대학교병원 외과, ⁴서울대학교병원 외과, ⁵삼성서울병원 외과

정인목^{1,2} · 한소리^{1,3} · 최금희^{1,3} · 권유진^{1,3} · 이태승^{1,3}
민승기^{1,4} · 박양진⁵ · 정중기^{1,2} · 하종원^{1,4} · 김상준^{1,4}

Differentiated Muscle-derived Stem Cells Attenuate Intimal Hyperplasia after Carotid Balloon Injury in Rat

In Mok Jung, M.D.^{1,2}, So Rhee Han^{1,3}, Keum Hee Choi^{1,3}, Yujin Kwon, M.D.^{1,3},
Taeseung Lee, M.D.^{1,3}, Seung-Kee Min, M.D.^{1,4}, Yang Jin Park, M.D.⁵,
Jung Kee Chung, M.D.^{1,2}, Jongwon Ha, M.D.^{1,4}, Sang Joon Kim, M.D.^{1,4}

Department of Surgery, ¹Seoul National University College of Medicine, ²Seoul National University Boramae Hospital, Seoul,
³Seoul National University Bundang Hospital, Seongnam, ⁴Seoul National University Hospital, ⁵Samsung Medical Center, Seoul, Korea

Purpose: Although progenitor cells may contribute to intimal hyperplasia (IH) after arterial injury, positive contribution of IH is variable with type of injury or cells. This study was designed to examine whether differentiated muscle derived stem cells (MDSC) attenuate IH in rat.

Methods: MDSCs were retrieved using preplate techniques from rat calf muscle and MDSCs (preplate 6th culture fraction, pp6) were exposed to VEGF (50 ng/ml) for endothelial differentiation prior to injection. Male rats were divided into two groups (cell treated vs. control) and underwent carotid balloon injury with 2-Fr catheter. The virus containing Green fluorescent protein (GFP) gene was transfected into cells for monitoring. Cells (5×10^6) were indwelled into carotid artery for 30 minutes after injury and then blood flow was restored. Arteries were harvested at various intervals (1, 2 and 4 weeks) after injury. The intima to media thickness ratio (IMTR) was calculated with morphometric analysis.

Results: Endothelial surface markers such as VE-CADHERIN were strongly expressed on differentiated MDSCs. At 4 weeks after injury, IH was predominantly observed in control group compared to cell treated group. The intensity of GFP was strongly observed at 1 week and declined at 4 weeks in carotid artery wall at MDSC group. CD31(+) endothelial cells were observed at MDSC group compared to control. The mean IMTR in cell treated groups were significantly lower than control at 2 weeks ($P=0.005$) and 4 weeks ($P \leq 0.001$).

Conclusion: Our study demonstrates that MDSCs therapy promotes re-endothelialization and leads to attenuation of IH after balloon injury in rat. (J Korean Surg Soc 2010;79:S7-15)

Key Words: Intimal hyperplasia, Stem cell therapy, Muscle derived stem cell
중심 단어: 내막 증식증, 줄기세포 치료, 근육유래 줄기세포

책임저자: 이태승, 경기도 성남시 분당구 구미동 300

☎ 463-707, 분당서울대학교병원 외과

Tel: 031-787-7092, Fax: 031-787-4055

E-mail: tslee@snubh.org

접수일: 2010년 4월 29일, 게재승인일: 2010년 7월 28일

이 논문은 2006년 정부의 재원으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 수행된 연구임(KFR-2006-331-E00155).

서론

동맥 폐색질환 환자들에서 시행되는 많은 동맥 우회술
혹은 혈관 내 치료들이 초기의 우수한 성공률에도 불구하고

고 장기간 추적관찰 시 재협착 혹은 폐색을 흔히 보인다. 주요한 폐색원인으로 알려진 내막 증식증 내막손상 후 혈관 평활근 세포의 내막이동 및 증식과 결합조직의 침착으로 혈관내강의 협착이 초래되어 발생하며 상기 치료들의 실패요인으로 이해되었다.(1) 그러나 최근에 혈관전구세포의 발견 및 관련된 많은 연구를 통해서 내막 증식증을 초래하는 병태생리 개념이 새롭게 대두되었다. 즉 혈중, 조직, 혹은 골수 내에 존재하는 전구세포들이 혈관손상부위로 원격 이동하여 내막증식을 초래하는 주 세포원이라는 주장이 제기되고 있다. 그러나 전구세포들에 의한 내막증식연구는 손상모델에 따라서 혹은 전구세포들의 종류에 따라서 내막증식의 억제 혹은 촉진 등의 다양한 결과를 나타내고 있다.(2) 저자들은 근육 내 존재하는 줄기세포를 내피세포로의 유도 후 백서 경동맥 손상부위에 투여하여 내막증식억제 여부를 분석하고 그 기전을 규명하고자 본 연구를 시행하였다.

방 법

1) 근육줄기세포 분리, 표식자 주입 및 내피세포 분화유도

Sprawley-Drew (SD) male rat (250 g) 가자미 근에서 채취한 조직을 잘게 썰어 triple enzyme를 처리하여 근육세포를 분리한 후 세포들이 플라스틱에 붙는 접착 정도의 차이를 이용하여 일정시간 간격으로 콜라겐을 코팅한 플라스크를 사용하는 전 플라스크 방법(pre-plate technique)을 사용하였다. 근육 내 존재하는 세포 군들이 collagen 부착 플라스크에 붙는 친화성 차이를 이용하여 1시간 배양 후 부유세포들을 새로운 플라스크에 계속 옮겨 가면서 6번째 플라스크에서 최종 배양된 세포들(pp6)을 이용한다. 이 세포들을 1주일 간 분리, 배양 후 MiniMACS® (Miltenyi Biotec Inc., Auburn, CA, USA)를 이용하여 CD34(+)인 세포를 추출하여 면역염색을 통해 근육줄기세포의 특성을 확인하였다. 분리된 근육줄기세포는 green fluorescent protein (GFP)을 발현하는 lentivirus (Microgen, Seoul, Korea)를 감염시킨 후 세포의 이동 및 생존여부를 형광현미경을 이용하여 확인하였다. 내피세포로의 분화유도를 위해서 VEGF 50 ng/ml (Sigma, St. Louis, Mo, USA) 배양한 후 내피세포 특이 표식자인 VE-cadherin primer를 이용하여 중합효소연쇄반응 후 과발현 여부를 측정하였다.

2) 실험동물 및 경동맥 손상

체중 550~600 g Sprague-Dawley rat을 대상으로 세포 투여군(n=15)과 식염수 투여군(n=15)으로 나누었고 수술 1주, 2주, 4주 후 각각의 경동맥 조직을 회수하였다. 백서를 Forane를 사용한 흡입 마취 하에 우측 경동맥을 노출시킨 후 외경동맥을 통하여 2 Fr. Fogarty catheter (Edwards Lifescience, Irvine, CA, USA)를 삽입하여 3 cm 정도의 총 경동맥부위를 3회에 걸쳐 풍선내막손상을 가하였다. 손상부위를 생리식염수로 세척 후 위에 준비한 MDSCs (5×10^6 , 300 ul suspension with normal saline)를 동맥내강으로 주입하여 30분간 배양시킨 후 혈류를 복원하였다.

3) 조직검사 및 형태학적 계측(morphometric analysis)

마취 후 경동맥을 박리하고 심장을 통해 3% 완충 paraformaldehyde 25 ml를 주입하여 생체 내 고정하였다. 약 45분 후에 경동맥 조직을 채취하여 4°C 고정액에 5시간 동안 더 고정하였다. 조직은 파라핀 포매 후 위치에 따라 2등분하여 5 μ m 두께로 잘라 조직검사를 실시하였다. Hematoxylin-Eosin (H&E) 염색해서 Leica application suite (Leica Microsystems, Heerbrugg, Switzerland)를 이용하여 내막-중막 비를 측정하였다. 내막-중막 비는 한 조직절편에서 100배 현미경 시야의 12시 방향을 기준으로 시계 반대방향으로 돌아가며 60° 간격으로 측정한 후 평균한 값을 사용하였다.

4) 세포 및 조직염색

세포에 대한 면역형광염색은 일차항체인 SCA-1 (1 : 100 Abcam, Cambridge, United Kingdom), CD34 (1 : 100 Abcam), CD45 (1 : 100 Abcam), Desmin (1 : 100 Abcam)을 이차항체는 rodamin이 붙은 goat antibody (1 : 100, Abcam)를 이용하였다. 회수된 조직을 4 μ m 박절 표본을 만든 뒤 면역조직화학 염색을 위해 silane 코팅에 부착된 박절 표본을 37°C 세포 배양기에 하룻밤 방치한 후 10분간 3번 histoclear 용액에 담가 파라핀을 제거하고 100%, 95%, 90% 알코올과 증류수에 단계적으로 함수하였다. 그 후 포르말린 고정으로 조직 내 감추어진 항원을 노출시키기 위하여 pH 9.0 Tris/EDTA 완충액에 담가 decloaking chamber에서 125°C에서 3분간 가열하였다. 실온에서 20분 가량 식힌 뒤 흐르는 물에 수세하였다. 조직 내에 존재하는 내인성 페록시다아제를 차단하기 위해 메탄올과 과산화수소가 7 : 3 (3% H_2O_2)의 비율로 섞인 용액에서 10분간 처리하고 흐르는 물에 수세 후 TBS

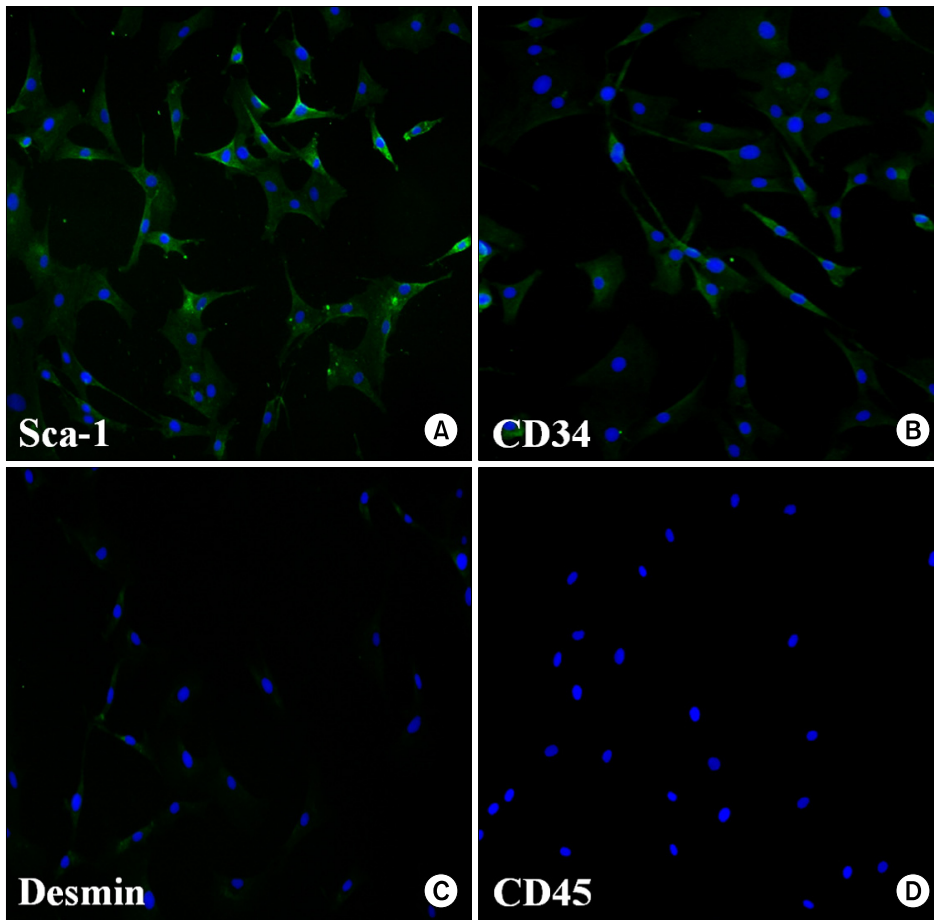


Fig. 1. Muscle-derived stem cells (pp6) using preplate technique from rat calf muscle show positive staining with anti-Sca-1 antibody (A), anti-CD34 (B), indeterminate staining with anti-desmin (C) and negative staining with anti-CD45 (D) with immunohistochemical staining ($\times 400$).

Tween-20 (Tris- buffered saline and tween 20: pH 7.6)에 수세하였다. 일차항체로 CD31 (1 : 100)을 실온에서 1시간 반응시켰다. TBS Tween-20으로 5분간 3회 수세 후 이차항체로 anti-mouse peroxidase (DAKO K4001, Produktionsvej, Denmark)를 가하여 30분간 반응시킨 후 TBS Tween 20으로 수세하고 DAB (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride)로 3 ~ 10분간 실온에서 발색시키고 Mayer's hematoxylin으로 대조 염색을 실시하여 광학현미경에서 관찰하였다. 음성 대조군으로는 일차항체 대신에 TBS를 사용하여 동일한 방법으로 면역조직화학 염색을 시행하였다.

5) 통계처리

모든 값은 평균값 \pm 표준편차로 표시하였다. 두 군 간 평균값의 비교는 Mann-Whitney U test를 사용하였다. 통계적 계산은 SPSS for Windows version 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 프로그램을 사용하였으며, P값이 0.05 미만인 경우 통계적으로 유의하다고 판단하였다.

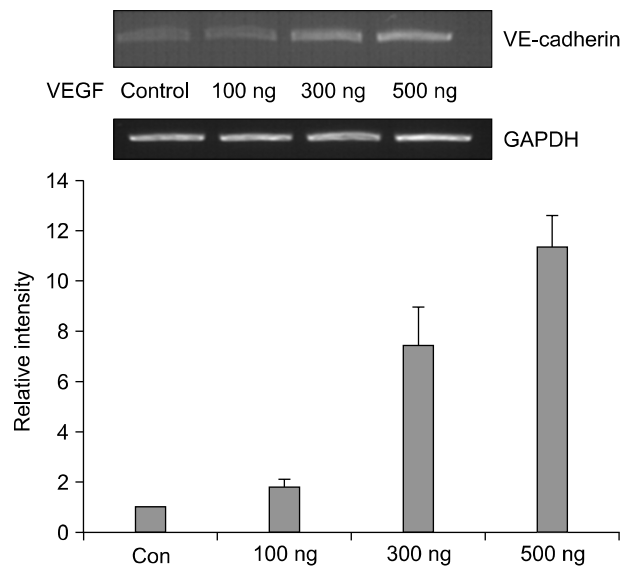


Fig. 2. MDSCs (pp6) are exposed to VEGF for endothelial differentiation. VE-cadherin is up-regulated in dose dependent manner. Values are the mean \pm SD of three separated experiments.

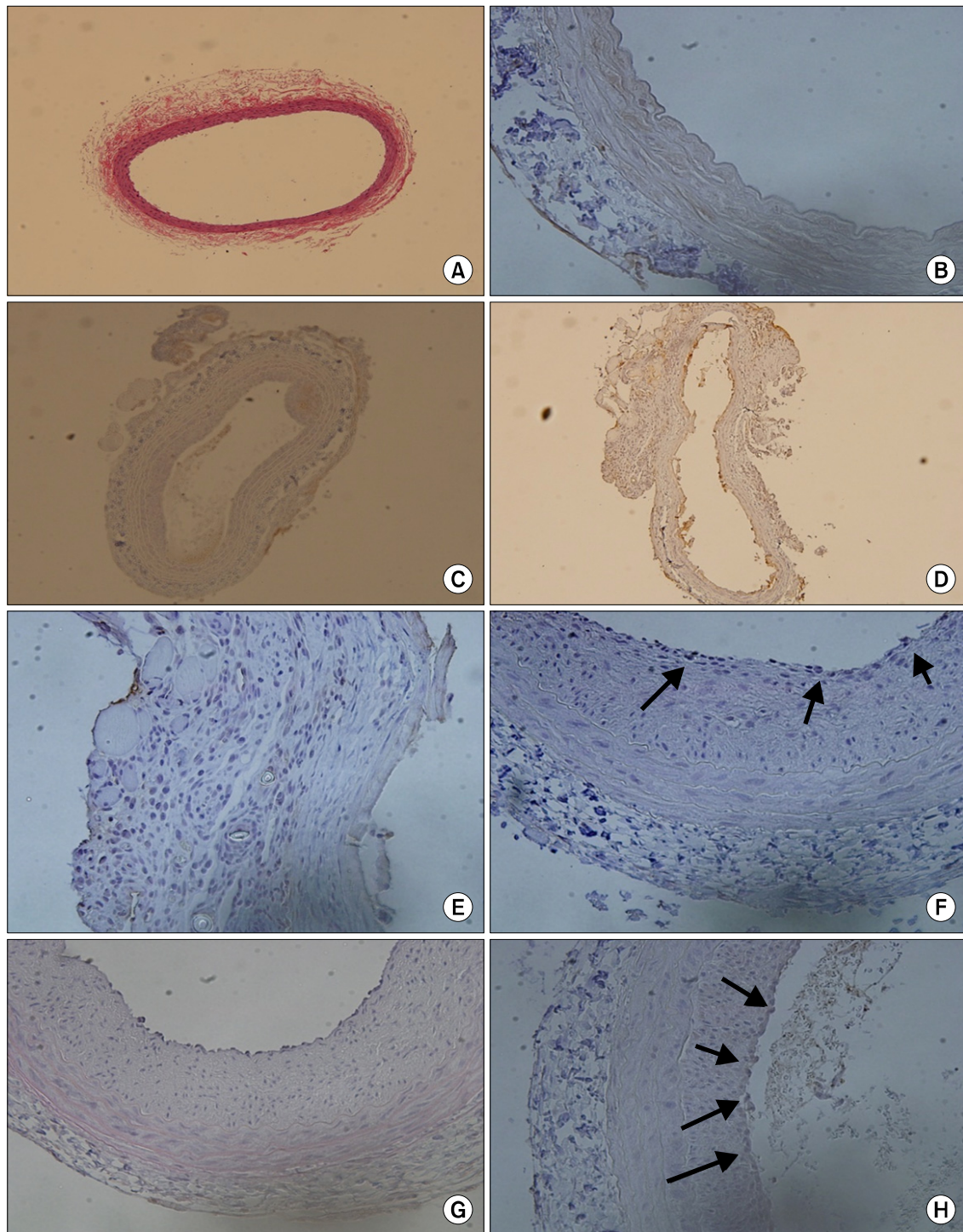


Fig. 3. Endothelial denudation and intimal hyperplasia are observed in difference following rat carotid balloon injury; Intimal denudation is confirmed in immediately harvested tissue in H&E staining ($\times 100$)(A), and in anti-CD31 immunohistochemical staining ($\times 400$)(B). Endothelial cell coverage rate in intima is less than 10% in control (C) and 50% in cell-treated group at 1week (D), 30~40% in control (E) and more than 80% in cell-treated group (F) at 2 weeks, 50~70% in control (G) and 90~100% in cell-treated group (H) at 4 weeks after carotid balloon injury. Arrows indicate CD31(+) endothelial cells.

결 과

1) 근육줄기세포의 특성 및 내피세포분화

전플라스크 방법으로 분리 배양된 최종 세포(pp6)들을 대상으로 면역세포 화학염색상에서 줄기세포 표지자 sca-1

(+), 내피전구세포 표지자 CD34 (+), hematogenous marker CD45 (-), 근육성 표지자 Desmin (\pm)를 보였다(Fig. 1). 내피세포의 분화유도를 위한 VEGF투여 시 내피세포의 특이 표지자인 VE-cadherin 발현이 농도에 따라 증가하였다(Fig. 2).

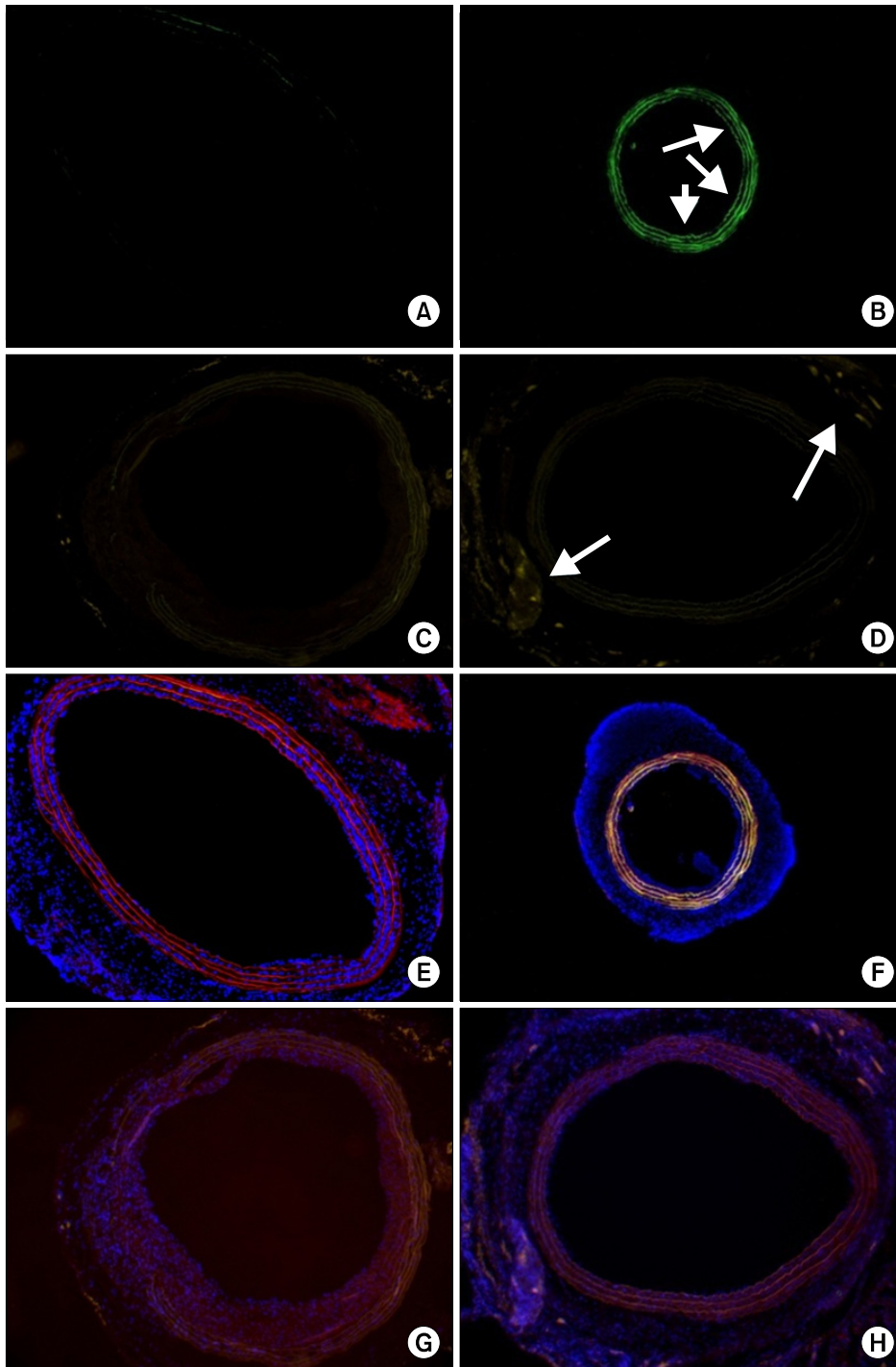


Fig. 4. Contribution of MDSC to intimal hyperplasia. MDSCs infected with lenti-hCMV-GFP were delivered into carotid artery lumen for 30 minutes after carotid balloon injury. MDSCs with GFP (green fluorescent protein) are strongly expressed at 1 week (B) and reduced at 4 weeks in carotid artery (D) compared to controls (A, B). Arrows indicate GFP(+) endothelial cells. MDSCs with CD31 are weakly expressed at 1 week (F) and strongly expressed at 4 weeks in the intima of carotid artery (H) compared to controls (E, G). All sections were viewed at $\times 100$.

2) 경동맥 내피세포의 재생

경동맥 내막손상 후 바로 채취된 조직을 대상으로 Hematoxylin-Eosin염색 및 CD31 면역조직화학 염색에서 내피세포의 탈락을 관찰하였다(Fig. 3A, B). 손상 후 1주에서 시행된 면역조직화학 검사에서 대조군에서는 내피세포가 드물게 관찰되었으나 세포 치료군에서 내막 내 내피세포 부착율이 50%로 관찰되었다(Fig. 3C, D). 2주 후 대조군에서는 30~40%로 관찰되었으며 세포치료군에서는 80% 이상으로 관찰되었다(Fig. 3E, F). 4주에 대조군에서는 50~70% 정도인 반면 치료군에서는 90~100%로 관찰되었다(Fig. 3G, H).

3) Lenti-hCMV-GFP 바이러스에 감염된 근육유래 줄기세포

Lenti-hCMV-GFP 바이러스에 감염된 근육유래 줄기세포를 동맥손상 후 내피세포 탈락부위에 30분간 배양시켰다. 1주군과 4주 대조군에서는 GFP 발현 줄기세포의 형광발현을 전혀 관찰할 수 없었으나(Fig. 4A, C), 세포치료군에서는 경동맥 내막에서 발현이 강하게 관찰되었고(Fig. 4B), 4주군에서는 GFP발현 정도가 감소되었다(Fig. 4D). 내피세포특이 항원인 CD31 염색 시 세포 치료군에서는 1주에 신생내막에서 약하게 발현되고 있었으나(Fig. 4F), 4주에서는 CD31의 강한 발현이 관찰되었다(Fig. 4H). 반면에, 대조군에서는 CD31(+) 내피세포의 발현이 1주군에서는 거의 없

었고(Fig. 4E), 4주군에서는 약하게 관찰되었다(Fig. 4G).

4) 광학 현미경을 이용한 형태학적 계측

실험군의 모든 표본에서 내측 탄력소층(internal elastic lamina)이 잘 유지되고 있어 동맥손상 깊이가 일정함을 보여주었다. 1주 대조군 및 치료군에서는 내막증식의 정도가 약하게 관찰되었으며 내막과 중막의 두께 비에 있어서 두 군간에 차이는 없었다(0.59 ± 0.16 vs. 0.56 ± 0.19 , $P=0.65$)(Fig. 5). 2주 대조군과 비교해서 세포 치료군에서는 의미 있게 내막증식의 억제를 관찰할 수 있었으며(1.66 ± 1.0 vs. 0.89 ± 0.52 , $P=0.005$)(Fig. 5), 4주군에서도 뚜렷한 내막증식 억제 효과를 관찰할 수 있었다(2.28 ± 0.35 vs. 1.18 ± 0.35)(Fig. 6).

고 찰

내막 증식증은 동맥 폐색성 질환환자를 대상으로 시행되는 혈관 내 치료(풍선확장술, 스텐트 삽입술) 및 외과적 치료(내막절제술, 동맥우회술) 시 동반되는 혈관벽의 기계적 자극이나 혈액학적 변화(허혈 및 재관류, 산성 부조화) 등에 의해 발생하는 손상에 대한 혈관조직의 창상치유 과정으로 이해할 수 있다. 따라서 혈관벽에 받는 손상 정도에 따라 내막증식 기전 차이가 예상되며 5/0 nylon loop를 이용하여 경동맥 중막층의 손상 없이 내피세포의 손상을 가한 군과 본 실험과 같이 2 Fr. Fogarty catheter를 이용한 풍선확장술 및 내피세포 탈락을 동반한 군으로 비교하였을 때 내피 손상군에서는 평활근 세포의 증식이 미미하였으나 풍선군에서는 심한 평활근 증식반응을 보고하였다. 또한 양군에서 내피세포 손상에 따른 혈소판부착 및 활성화 인자인 platelet-derived growth factor (PDGF) 및 PDGF receptor mRNA 발현 정도는 차이가 없이 양군에서 높게 관찰되었다.(3) 이는 내막 증식증이 초래되는 기전은 단순한 내피세포의 손상 외에도 중막층의 손상 정도가 관여함을 암시한다. 반면 손상된 내막의 내피세포가 조기에 복구되면 중막층 손상으로 초래되는 평활근 세포의 증식반응은 급격히 완화되는 것으로 보고하였다.(1)

Asahara 등(4)은 시간에 따른 전자현미경 추적관찰을 이용한 혈관손상 실험에서 혈관손상 표면에 많이 붙어 있는 세포들 중 CD34(+) 세포가 간헐적으로 붙어 있는 것을 관찰하고 이러한 세포는 손상 변연부 주위의 내피세포로부터 자라오는 것이 아니라 골수에서 나와서 말초 혈액 내로 순환하는 내피전구세포에서 유래되었을 가능성을 제시하였

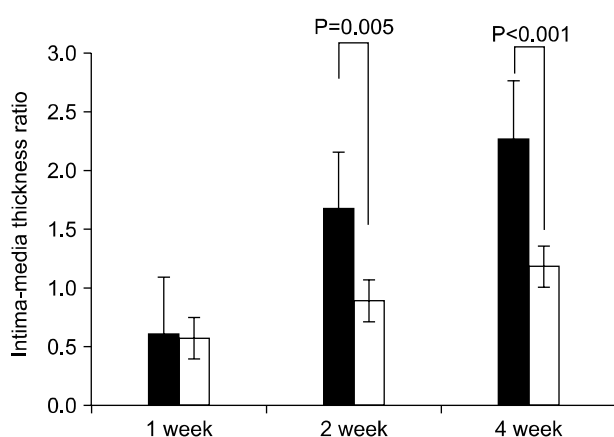


Fig. 5. The intima to media thickness ratio (IMTR) is calculated with morphometric analysis. The mean IMTR in cell treated groups are significantly lower than control at 2 weeks ($P=0.005$) and 4 weeks ($P \leq 0.001$). Black bar indicates control and white bar indicates cell treated group. Values are the mean \pm SD of five separated experiments.

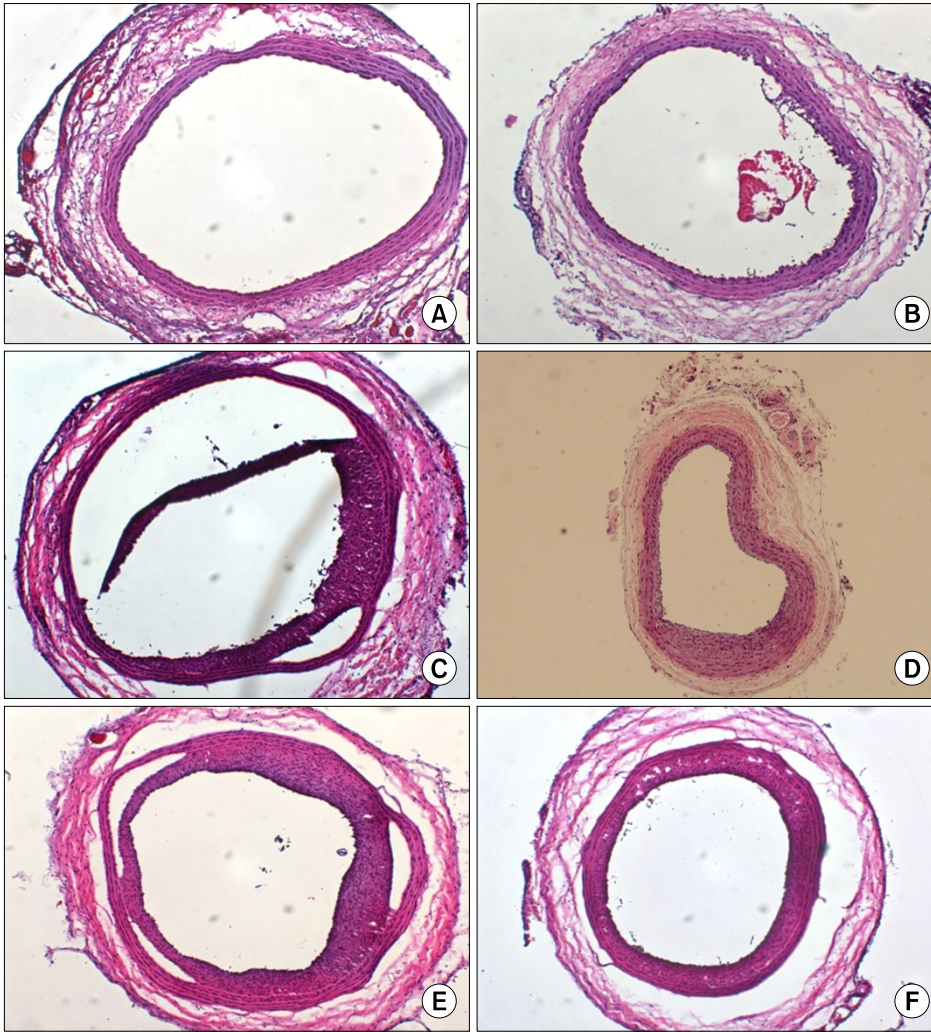


Fig. 6. Intimal hyperplasia is inhibited in cell-treated group compared to control group; Intimal hyperplasia is minimally observed in both cell-treated (A) and control group (B) at 1 week. Suppression of intimal hyperplasia is more prominent in cell-treated group (D) than control group (C) at 2 weeks and 4 weeks (E, F). All sections were viewed at $\times 100$.

다. 이후로 골수 유래 전구세포가 동맥손상 후 내막 증식증 유발에 직, 간접으로 기여한다는 연구가 보고되고 있다.(5,6) 또한 간엽 줄기세포가 혈관손상부위로 이동하여 유사 내피세포 혹은 혈관 평활근 세포로 분화되는 것이 보고되고 있다.(7)

내피세포는 혈관활성물질인 prostacyclin (PGI₂)과 nitric oxide (NO)를 분비하여 혈소판의 활성화, 유착 및 응집을 억제하는 기능이 있다. 혈관손상부위에 활성화되는 혈소판 및 염증 세포 등이 분비하는 granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF), stromal derived-1, VEGF, PDGF 등과 같은 다양한 사이토카인 등이 강력한 mitogen으로 작용하여 전구세포나 평활근 세포의 활성을 초래하게 한다. 따라서 손상된 내막을 조기 복구시키기 위한 여러 연구가 진행되어 특정 유전자를 넣은 내피전구세포, 혹은 내피전구세포를 골수에 서 혈중으로 유도하는 G-CSF 혹은 statin을 투여하여 조기

내막을 복구하여 내막증식을 억제하는 결과가 보고되고 있다.(8-10)

근육 유래 줄기세포(muscle-derived stem cell, MDSC)의 분리 Qu-Petersen 등(11)이 백서의 근육 내 존재하는 다양한 세포군들에서 preplate technique을 이용하여 sca-1(+), CD34(+), CD4(-) 표면항원을 보이는 특정 세포군을 분리하였고 이 세포군이 200번의 계대 배양 후에도 같은 세포형태 및 증식 능력을 보유하며 심근, 신경, 내피세포, 골 조직 등 다양한 세포조직으로 체내 및 체외에서 분화됨을 보고하였다.(12) MDSC의 특징은 근육성이지만 내피세포의 특성을 갖고 있어 간엽계 세포로서 hematopoietic cell maker인 CD34(+)를 발현한다. Okada 등(13)은 인체의 근육에서 myogenic endothelial cell을 분리하여 심근경색 부위로 주사하여 심근기능 향상 및 혈관신생을 보고하였다. 그러나 저자들의 선행 연구(unpublished data)에서는 naïve MDSC를 주

입하였을 때 쥐의 뒷다리 허혈 모델에서 혈관신생 정도는 뚜렷하게 관찰되지 않았다. 본 실험에서는 naïve MDSC에 VEGF를 투여했을 때 vWF 및 VE-cadherin이 과발현된 유사 내피세포로의 분화를 유도하였고 이를 사용하여 증강된 체외 혈관 신생능을 입증하였다(결과는 기술 안 함). VEGF투여에 의한 다른 간엽줄기세포의 혈관내피세포로의 분화유도는 이미 보고된 바가 있다.(14,15) 내피세포에 특이적인 CD31염색에서 대조군에 비해 세포 주입군에서 강하게 염색됨이 관찰되는 것은 먼저 부착된 MDSC의 paracrine effect로 내피세포의 이동이나 생착을 촉진하는 것으로 추정할 수 있다. 한편 술 후 4주군에서는 MDSC의 발현이 매우 약하게 관찰되어 초기 부착되었던 MDSC의 탈락이나 사멸이 추정되었고, 내막증식부위에 CD 31(+) 신생내피세포로 대체되었다. 형태학적 계측에서도 대조군과 비교해서 MDSC 투여군이 2주, 4주군에서 통계적으로 의미 있게 내막증식 억제 효과를 보여서 조기 내막 재생 정도와 밀접한 연관을 추정하게 한다. 동물시험이 아닌 임상에서 전구세포를 뽑아서 내막억제여부를 수행한 선행연구가 있는데, 이들은 G-CSF를 투여하여 골수로부터 말초혈액으로 전구세포를 동원한 후 세포를 뽑아서 관상동맥 스텐트 치료 후 동맥 내로 주입하였다. 이 MAGIC cell trial에서 세포투여 후 심근경색이 되었던 심근기능이 심장 초음파에서 기능적 향상은 발견하였으나 추적검사상 스텐트 재 협착률이 높음을 보고하였다.(16) 이들의 연구와 본 연구와의 차이는 세포를 직접 병변 부위에 투여한 치료전략은 유사하지만 본 실험에서 이용된 MDSC는 정제된 단일 줄기세포 군으로 유사 내피세포로 분화시켜 이용한 장점이 있다고 생각되며, 내피세포가 아닌 평활근 세포로 분화된다면 오히려 내막증식을 악화시킬 수 있는 가능성이 추정된다고 하겠다. 본 연구의 단점은 어떤 기전에 의해서 투여된 MDSC가 신생내피세포를 유도하는지에 의문과 MDSC의 시간적, 기계학적 (mechanistic) 조망이 부족하다는 점이다. 다만 투여된 MDSC가 4주까지도 신장 및 간 조직에 발견되는 것으로 보아 세포 외 기질이 풍부한 조직에서는 상당기간 생존하는 것으로 추정되었다(결과는 기술 안 함). 그 동안 내막증식을 억제하기 위한 많은 약물, 방사선, 유전자, 약물 용출 스텐트 치료 등(17)이 대부분 실패로 돌아간 현시점에 전구세포를 활용한 치료전략에 대한 가능성을 확인하였으며 향후 과감한 연구가 필요한 시점이라고 사료된다.

결론

본 연구는 실험적 내막손상 후 유사내피세포로의 분화된 근육유래 줄기세포를 이용하여 내막손상부위에 세포를 주입하여 내막증식을 의미 있게 억제하였다. 중, 대 동물을 대상으로 내막증식억제에 대한 추가 연구가 필요하리라 생각된다.

REFERENCES

- 1) Clowes AW, Clowes MM, Fingerle J, Reidy MA. Regulation of smooth muscle cell growth in injured artery. *J Cardiovasc Pharmacol* 1989;14(Suppl 6):S12-5.
- 2) Tsai S, Butler J, Rafii S, Liu B, Kent KC. The role of progenitor cells in the development of intimal hyperplasia. *J Vasc Surg* 2009;49:502-10.
- 3) Fingerle J, Au YP, Clowes AW, Reidy MA. Intimal lesion formation in rat carotid arteries after endothelial denudation in absence of medial injury. *Arteriosclerosis* 1990;10:1082-7.
- 4) Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997;275:964-7.
- 5) Sata M, Saiura A, Kunisato A, Tojo A, Okada S, Tokuhisa T, et al. Hematopoietic stem cells differentiate into vascular cells that participate in the pathogenesis of atherosclerosis. *Nat Med* 2002;8:403-9.
- 6) Tanaka K, Sata M, Hirata Y, Nagai R. Diverse contribution of bone marrow cells to neointimal hyperplasia after mechanical vascular injuries. *Circ Res* 2003;93:783-90.
- 7) Wang CH, Cherng WJ, Yang NI, Kuo LT, Hsu CM, Yeh HI, et al. Late-outgrowth endothelial cells attenuate intimal hyperplasia contributed by mesenchymal stem cells after vascular injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;28:54-60.
- 8) Walter DH, Rittig K, Bahlmann FH, Kirchmair R, Silver M, Murayama T, et al. Statin therapy accelerates reendothelialization: a novel effect involving mobilization and incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *Circulation* 2002;105:3017-24.
- 9) Kong D, Melo LG, Mangi AA, Zhang L, Lopez-Ilasaca M, Perrella MA, et al. Enhanced inhibition of neointimal hyperplasia by genetically engineered endothelial progenitor cells. *Circulation* 2004;109:1769-75.
- 10) Griesse DP, Ehsan A, Melo LG, Kong D, Zhang L, Mann MJ, et al. Isolation and transplantation of autologous circulating endothelial cells into denuded vessels and prosthetic grafts: implications for cell-based vascular therapy. *Circulation* 2003;108:2710-5.
- 11) Qu-Petersen Z, Deasy B, Jankowski R, Ikezawa M, Cummins

- J, Pruchnic R, et al. Identification of a novel population of muscle stem cells in mice: potential for muscle regeneration. *J Cell Biol* 2002;157:851-64.
- 12) Huard J. Regenerative medicine based on muscle stem cells. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2008;8:337.
- 13) Okada M, Payne TR, Zheng B, Oshima H, Momoi N, Tobita K, et al. Myogenic endothelial cells purified from human skeletal muscle improve cardiac function after transplantation into infarcted myocardium. *J Am Coll Cardiol* 2008;52:1869-80.
- 14) Huss R, Lange C, Weissinger EM, Kolb HJ, Thalmeier K. Evidence of peripheral blood-derived, plastic-adherent CD34 (–/low) hematopoietic stem cell clones with mesenchymal stem cell characteristics. *Stem Cells* 2000;18:252-60.
- 15) Tomanek RJ, Schatteman GC. Angiogenesis: new insights and therapeutic potential. *Anat Rec* 2000;261:126-35.
- 16) Kang HJ, Kim HS, Zhang SY, Park KW, Cho HJ, Koo BK, et al. Effects of intracoronary infusion of peripheral blood stem-cells mobilised with granulocyte-colony stimulating factor on left ventricular systolic function and restenosis after coronary stenting in myocardial infarction: the MAGIC cell randomised clinical trial. *Lancet* 2004;363:751-6.
- 17) Na BG, Jang JH. Clinical study for inhibition of intimal hyperplasia: past & present. *J Korean Soc Vasc Surg* 2008;24:155-62.