

表 7.
 図16中のピークの糖鎖構造、分子量理論値、及び実測値

Peak No.	Carbohydrate composition ^a	Sugar type ^b	Theoretical mass ^c	Observed <i>m/z</i>	
				M ⁺	M ²⁺
1	[Fuc][Hex] ₅ [HexNAc] ₄ [NeuAc]	FucBiNA	2080.9	2081.1	1041.5
	[Fuc][Hex] ₆ [HexNAc] ₅ [NeuAc]	FucTriNA, FucBiLacNA	2446.3		1224.1
2	[Fuc][Hex] ₅ [HexNAc] ₄ [NeuAc]	FucBiNA	2080.9	2080.1	1041.6
3	[Fuc][Hex] ₄ [HexNAc] ₃ [NeuAc]	FucBi(1)NA	1715.6	1716.7	
	[Fuc][Hex] ₅ [HexNAc] ₄ [NeuAc] ₂	FucBiNA ₂	2372.2	2373.3	1187.4
	[Fuc][Hex] ₆ [HexNAc] ₅ [NeuAc] ₂	FucTriNA ₂ , FucBiLacNA ₂	2737.5		1369.9
4	[Fuc][Hex] ₄ [HexNAc] ₃ [NeuAc]	FucBi(1)NA	1715.6	1716.6	
	[Fuc][Hex] ₅ [HexNAc] ₄ [NeuAc] ₂	FucBiNA ₂	2372.2	2373.0	1186.9
	[Fuc][Hex] ₆ [HexNAc] ₅ [NeuAc] ₂	FucTriNA ₂ , FucBiLacNA ₂	2737.5		1369.6
5	[Fuc][Hex] ₅ [HexNAc] ₄ [NeuAc] ₂	FucBiNA ₂	2372.2	2373.0	1186.9
	[Fuc][Hex] ₆ [HexNAc] ₅ [NeuAc] ₂	FucTriNA ₂ , FucBiLacNA ₂	2737.5		1369.7
	[Fuc][Hex] ₆ [HexNAc] ₅ [NeuAc] ₃	FucTriNA ₃	3028.8		1515.7
6	[Fuc][Hex] ₄ [HexNAc] ₃ [NeuAc]	FucBi(1)NA	1715.6	1716.5	
	[Fuc][Hex] ₅ [HexNAc] ₄ [NeuAc] ₂	FucBiNA ₂	2372.2	2372.9	1187.8
	[Fuc][Hex] ₆ [HexNAc] ₅ [NeuAc] ₃	FucTriNA ₃	3028.8		1515.9
7	[Fuc][Hex] ₆ [HexNAc] ₅ [NeuAc] ₃	FucTriNA ₃	3028.8		1516.4
	[Fuc][Hex] ₅ [HexNAc] ₄ [NeuAc] ₂	FucBiNA ₂	2372.2	2372.2	1187.5
8	[Fuc][Hex] ₇ [HexNAc] ₆ [NeuAc] ₃	FucTriLacNA ₃ , FucTetraNA ₃	3394.1		1698.3

^a Fuc, fucose; Hex, hexose; HexNAc, *N*-acetylhexsamine; NeuAc, *N*-acetylneuramic acid.

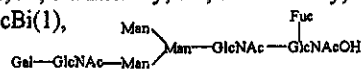
^b Bi, biantennary; Tri, Triantennary; Tetra, tetraantennary; Lac, *N*-acetyllactosamine; NA, NeuAc; FucBi(1),

表 8

図19中のピークのアミノ酸残基、糖鎖構造の帰属と理論値、及び実測値

Peak in Fig. 1	Peptide No.	Amino acid residues	Carbohydrate structure ^a	Theoretical mass ^b	Observed <i>m/z</i> value				
					M ⁺	M ²⁺	M ³⁺	M ⁴⁺	M ⁵⁺
1	K17	298-304		809.9	810.6				
2	K10	104-106		431.5	432.3				
	K22	457-466		1090.1	1090.5	546.0			
3	K8	84-88		554.7	555.6				
4	K2	39-45		813.0	813.6	407.4			
5	K15	247-260		1476.5	1476.9	739.2			
6	K9 ^c	89-103	FucBiNA ₂	4084.0		2043.4	1362.3		
			FucBiNA	3792.7		1897.8	1265.2		
			FucBi	3501.4		1751.5	1168.7		
			FucBiLacNA ₃ , FucTriNA ₃	4740.5			1582.1		
			FucBiLacNA ₂ , FucTriNA ₂	4449.3			1484.6		
			FucBiLacNA, FucTriNA	4158.0			1387.7		
			FucBi(1)NA	3427.4		1714.6			
7	K18	305-321		2093.1	2093.7	1047.3			
8	K14	220-246		2886.0		1444.1	963.1		
9	K16 ^c	261-297	Glc	4516.5		2259.3	1506.3		
10	K19 ^d	322-353	OH	3916.0		1958.8	1306.2		
	K6	68-82		1651.9	1652.2	826.9			
11	K20 ^c	354-385	FucBiNA ₂	6204.3			2069.7	1552.7	1242.0
			FucBiNA	5913.0			1972.2	1479.3	
			FucBiLacNA ₂ , FucTriNA ₂	6569.6				1643.7	1315.0
			FucBiLacNA, FucTriNA	6278.3				1570.9	
			FucBi(1)	5256.4				1315.0	
			Bi	5475.6			1826.7		
12	K13	183-219		3704.2		1853.7	1235.9		
	K1 ^c	1-38	FucBiNA ₂	6487.6		2164.4	1623.0		
			FucBiNA	6196.3		2067.0	1550.4		
			FucBiLacNA ₂ , FucTriNA ₂	6852.9		2286.0			
			FucBi(1)NA	5831.0		1945.1			
13	K3	46-65		1900.1	1901.7	951.4			
14	K11	107-143		4042.4		2023.3	1348.9		
	K12	144-182		4113.6		2057.6	1371.5		

^a Fuc, fucose; Glc, glucose; Bi, biantennary; Tri, Triantennary; Tetra, Tetraantennary; NA, *N*-acetylneuramic acid; Lac, *N*-acetyllactosamine; FucBi(1),



^b Average mass value.

^c Glycopeptide.

^d Hydroxylated peptide.

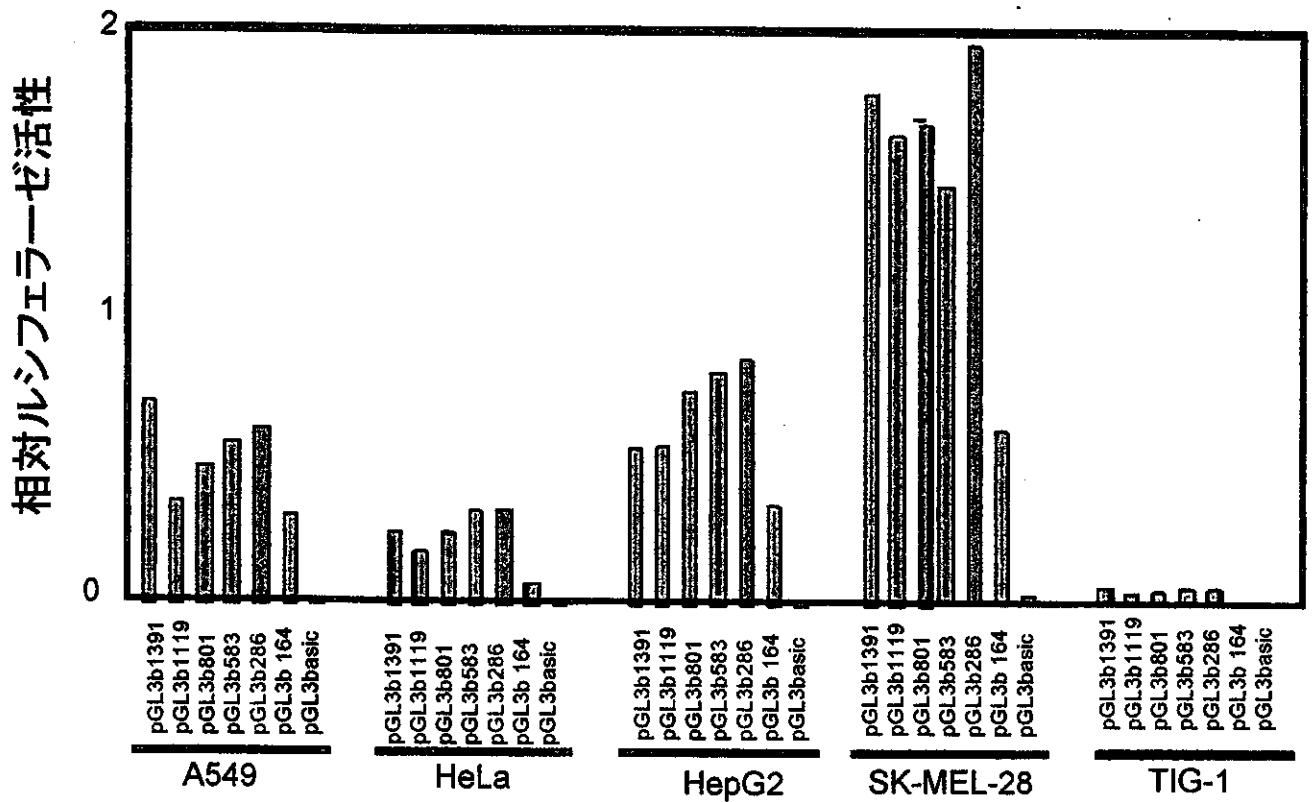
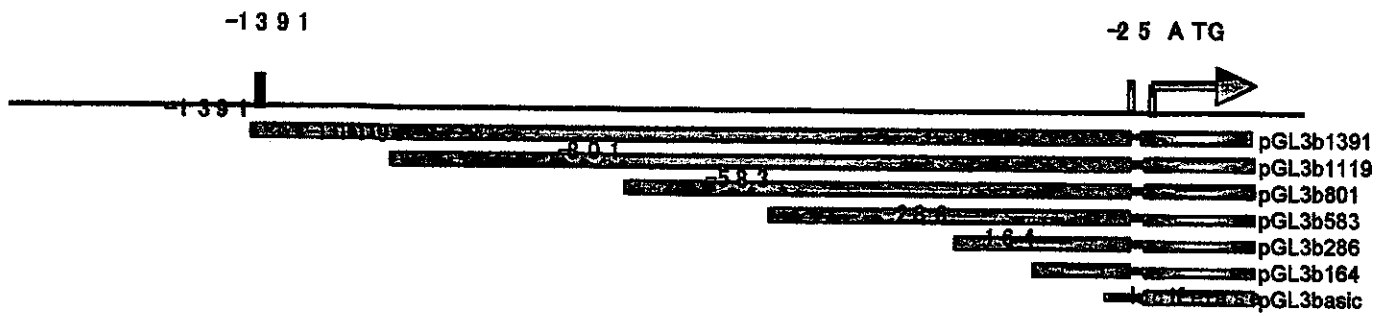
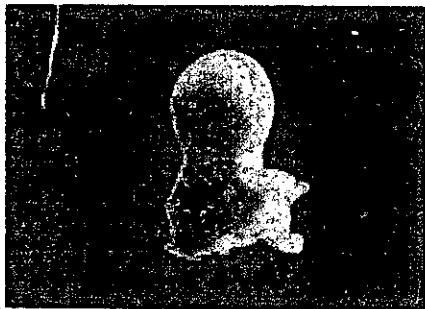
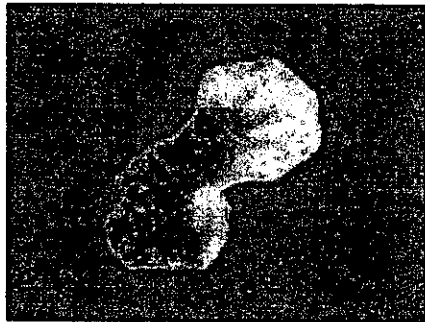


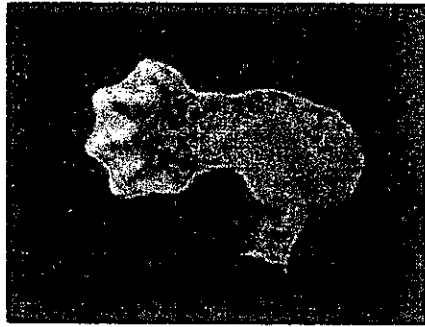
図20. hTERTプロモーターのがん細胞特異的活性化



13th



14th



15th



16th



17th

図21. ラット胎児の肢器官のアルシアンブルー染色標本

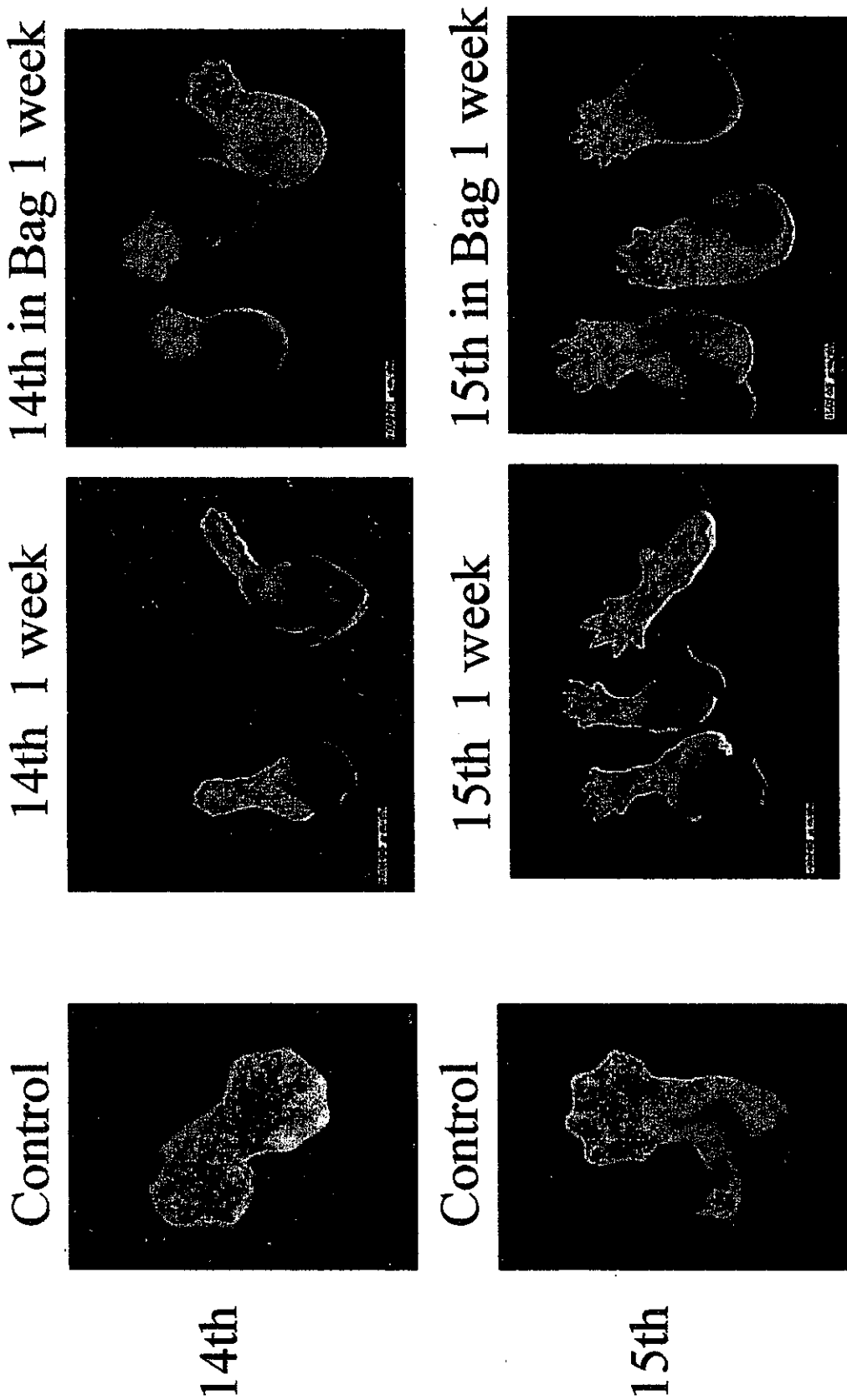


図22. 肢芽に動的ストレスを与えて培養した際の形態変化と軟骨分化能

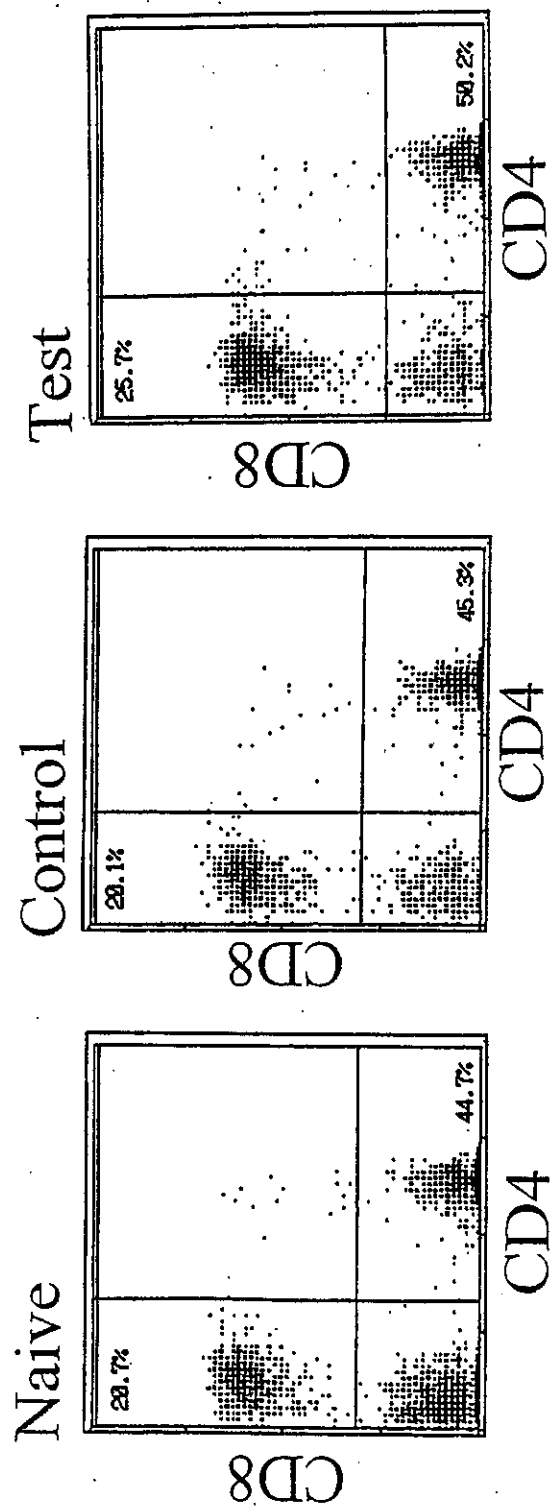
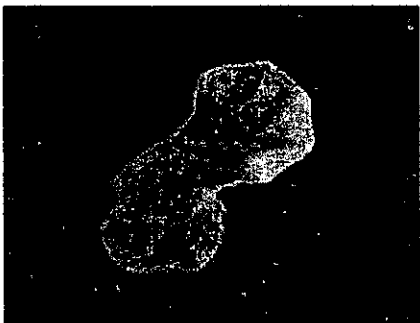
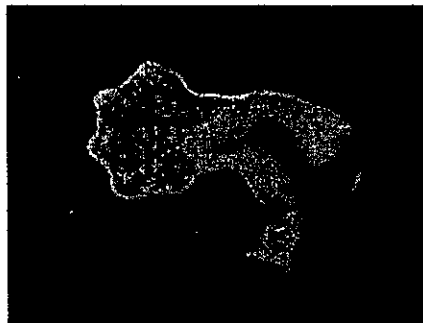


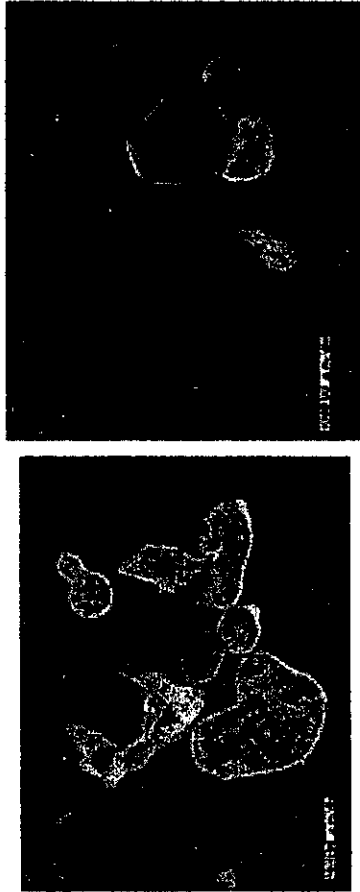
図23 肢芽埋入群とコントロール群の末梢血 T リンパ球のサブセットの割合の比較。



14th

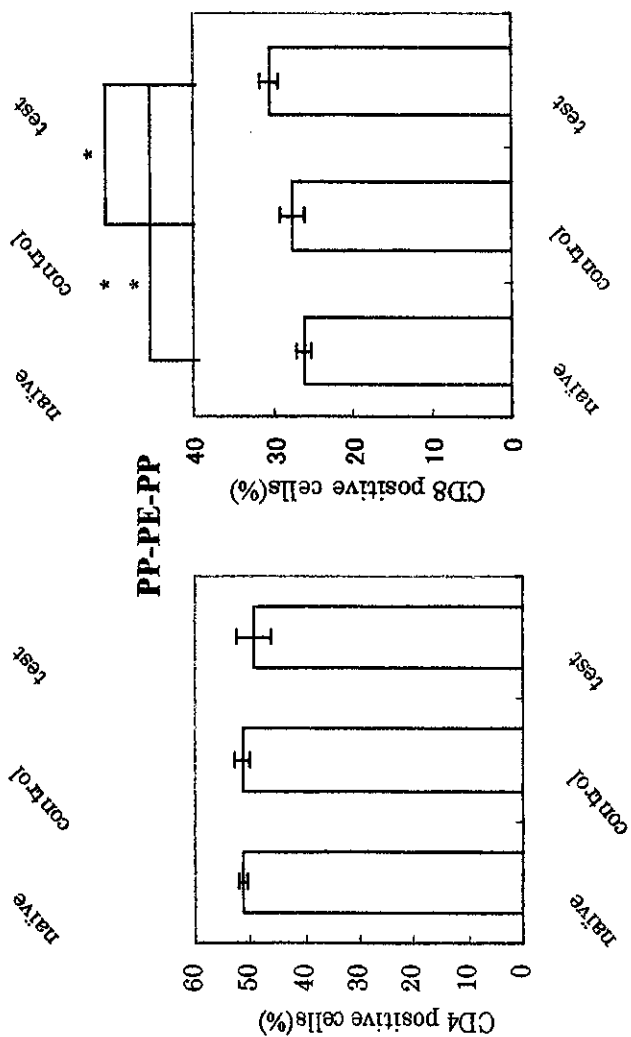
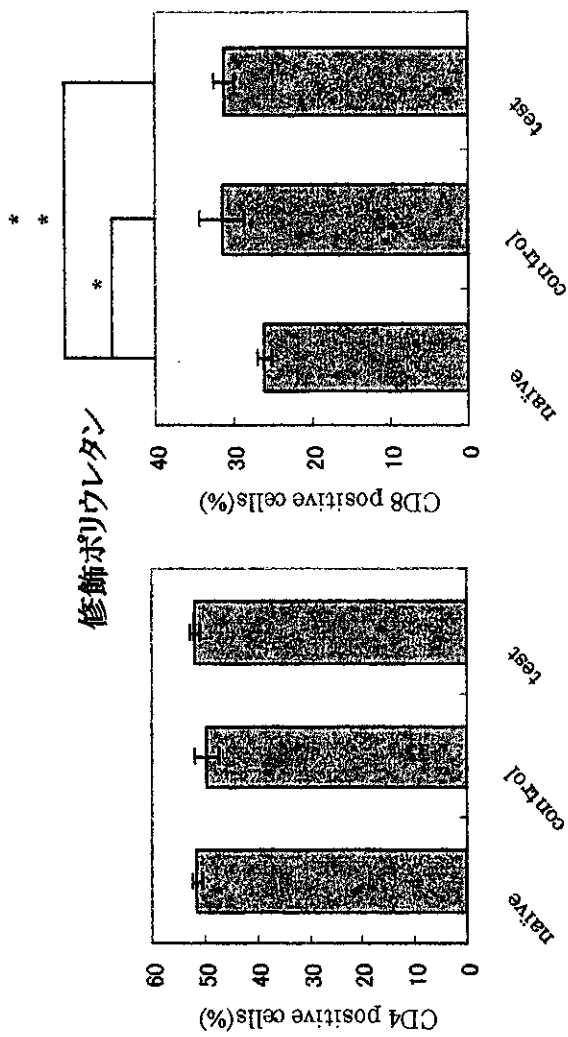


15th



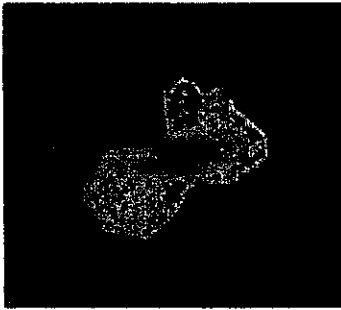
14th Limb buds in bags for 1 week

図24. マイクロメンブレン・バッグに入れ1週間腹腔内培養した肢芽と、胎齡14日及び15日目の肢芽との比較



*P<0.05 **P<0.01

図25 異系ラット肢芽埋入群とコントロール群の末梢血Tリンパ球サブセットの割合の比較

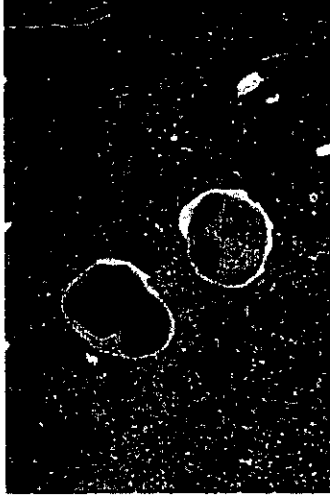


14th
Limb bud
BN rat

修飾ポリウレタン

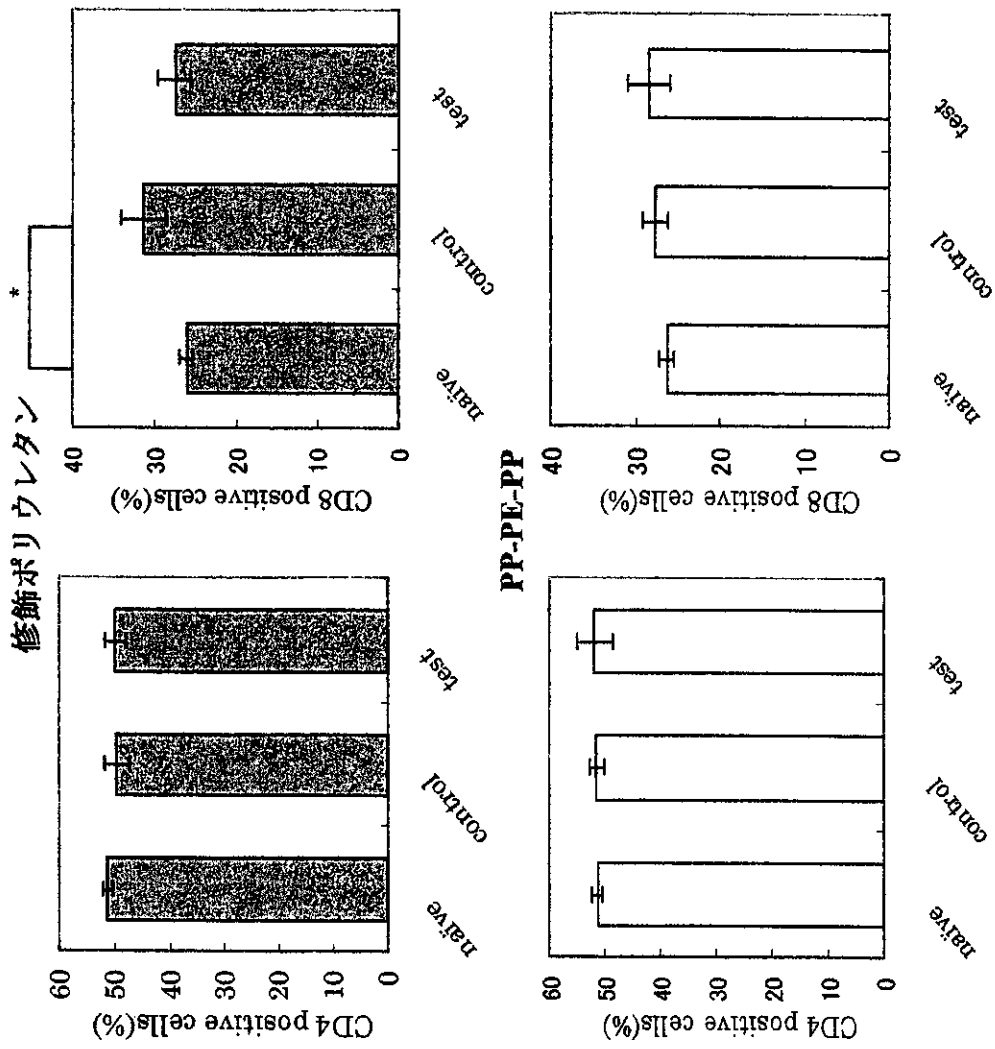


PP-PE-PP



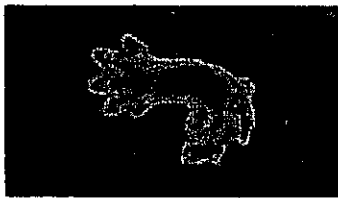
14th Limb buds in bags for 1 week
BN rat

図26. 異系ラット肢芽をバッグに入れ1週間腹腔内培養した場合の肢芽と、胎齡14日目の肢芽との比較



*P<0.05

図27. 異種であるICRマウスの肢芽埋入群とコントロール群の末梢血Tリンパ球サブセットの割合の比較



13th

修飾ポリウレタン



14th

PP-PE-PP



13th Limb buds in bags for 1 week

図28. 異種であるマウスの肢芽をバッグに入れ1週間腹腔内培養した場合の肢芽と、胎齡13日目の肢芽との比較

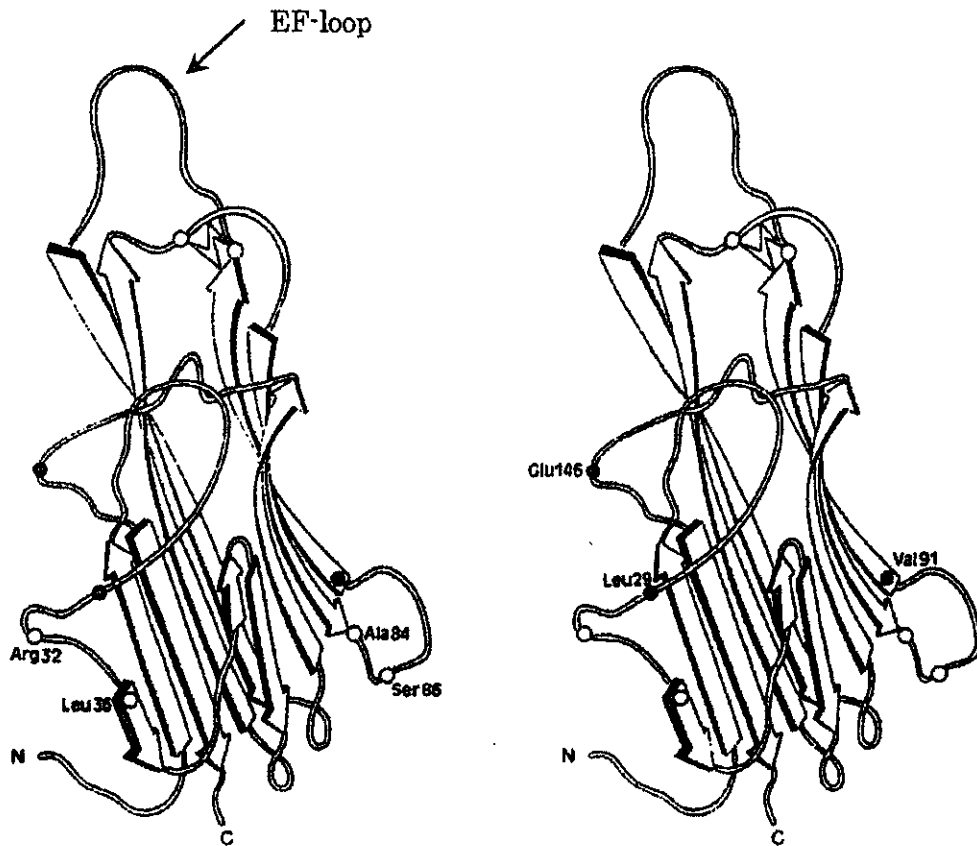


図29. ヒト TNF- α の構造

図中に示されたアミノ酸残基は、point mutationの実験より、TNF- α が三量体化して活性を示す際、あるいはレセプターの結合に必要なとされるアミノ酸と考えられている。

MSTESMIRDVELAEEAIPKKTGGPQGSRRCLFLSLFSFLIVAGATTLFCLLHFG
VIGPQREEFPRDLSLISPLAQAVRSSSRTPSDKPVAVHVVANPQAEGQLQWLNR
 RANALLANGVELRDNQLVVPSEGLYLIYSQVLFKGGQCPSTHVLLTHTISRIAV
 SYQTKVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAKPWYEPIYLGGVFQLEKGDRLSAEINR
 PDYLDFAESGQVYFGIHAL**AEAAAREACCRECCARA**

図30. FAsH 結合性のタグペプチドを融合させたヒト TNF- α の設計

N-末端の下線部分はシグナルペプチドである。したがって N-末端にタグペプチドを付加すると分泌、あるいはその後のシグナルペプチドの切断への影響が考えられた。したがって C-末端に FAsH 結合性タグペプチド (ボールドイタリック) を結合させることとした。

TNF- α : atg agc act gaa agc atg atc cgg gac gtg gag ctg gcc gag gag gcg ctc ccc aag aag
aca ggg ggg ccc cag ggc tcc agg cgg tgc ttg ttc ctc agc ctc ttc tcc ttc ctg atc gtg gca ggc gcc
acc acg ctc ttc tgc ctg ctg cac ttt gga gtg atc ggc ccc cag agg gaa gag ttc ccc agg gac ctc tct
cta atc agc cct ctg gcc cag gca gtc aga tca tct tct cga acc ccg agt gac aag cct gta gcc cat gtt
gta gca aac cct caa gct gag ggg cag ctc cag tgg ctg aac cgc cgg gcc aat gcc ctc ctg gcc aat
ggc gtg gag ctg aga gat aac cag ctg gtg gtg cca tca gag ggc ctg tac ctc atc tac tcc cag gtc
ctc ttc aag ggc caa ggc tgc ccc tcc acc cat gtg ctc ctc acc cac acc atc agc cgc atc gcc gtc tcc
tac cag acc aag gtc aac ctc ctc tct gcc atc aag agc ccc tgc cag agg gag acc cca gag ggg gct
gag gcc aag ccc tgg tat gag ccc atc tat ctg gga ggg gtc ttc cag ctg gag aag ggt gac cga ctc
agc gct gag atc aat cgg ccc gac tat ctc gac ttt gcc gag tct ggg cag gtc tac ttt ggg atc att gcc
ctg tga**ggtacc**

FIAsH: c att gcc ctg gcc gag gcc gcc gcc agg gag gcc tgc tgc agg gag tgc tgc gcc agg gcc
taa agg **tac c**

図 3 1. TNF- α 遺伝子への FIAsH 結合性タグペプチド DNA の付加

TNF- α の C-末端は特に機能調節に係らないとされているので、TNF- α 配列の 3'末端
近くにある BsrDI 部位 (と KpnI 部位の間) に FIAsH の配列を挿入することとした。

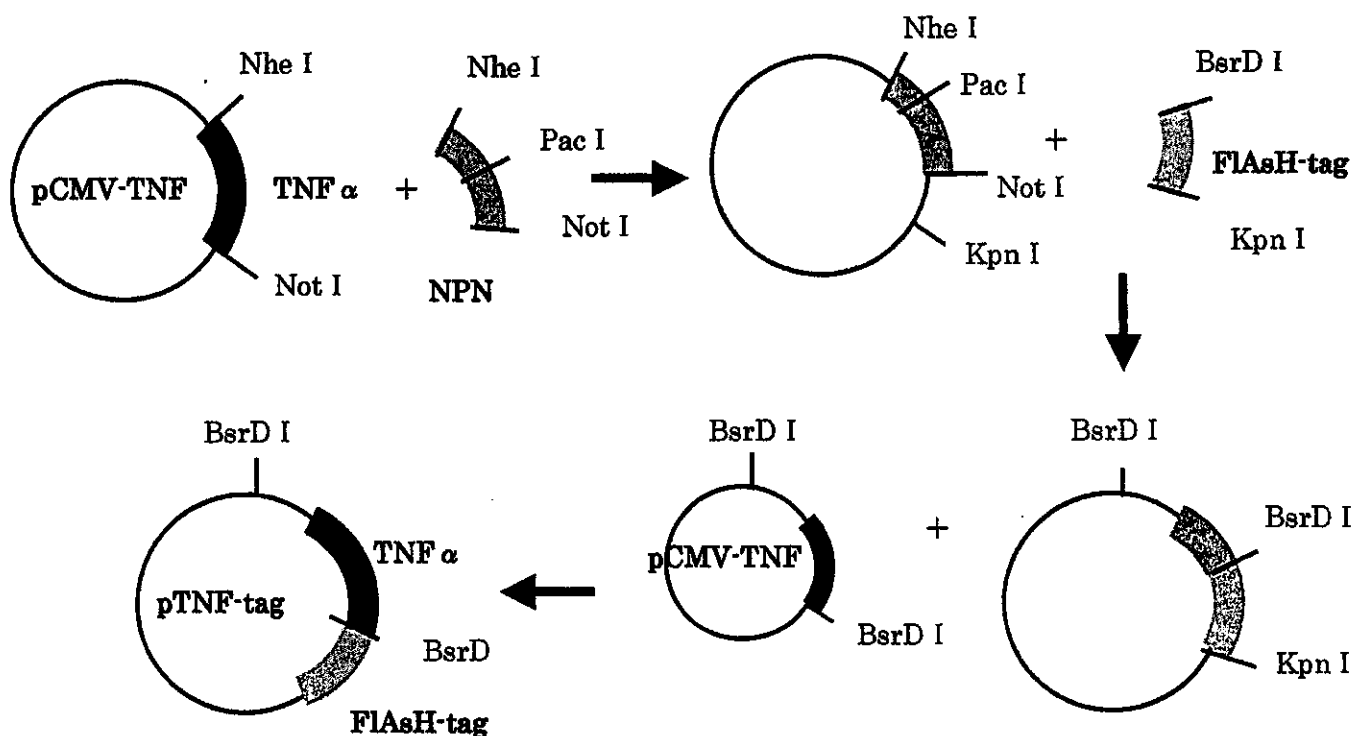


図 3 2. TNF- α -tag 発現用プラスミド pTNF-tag の作成図

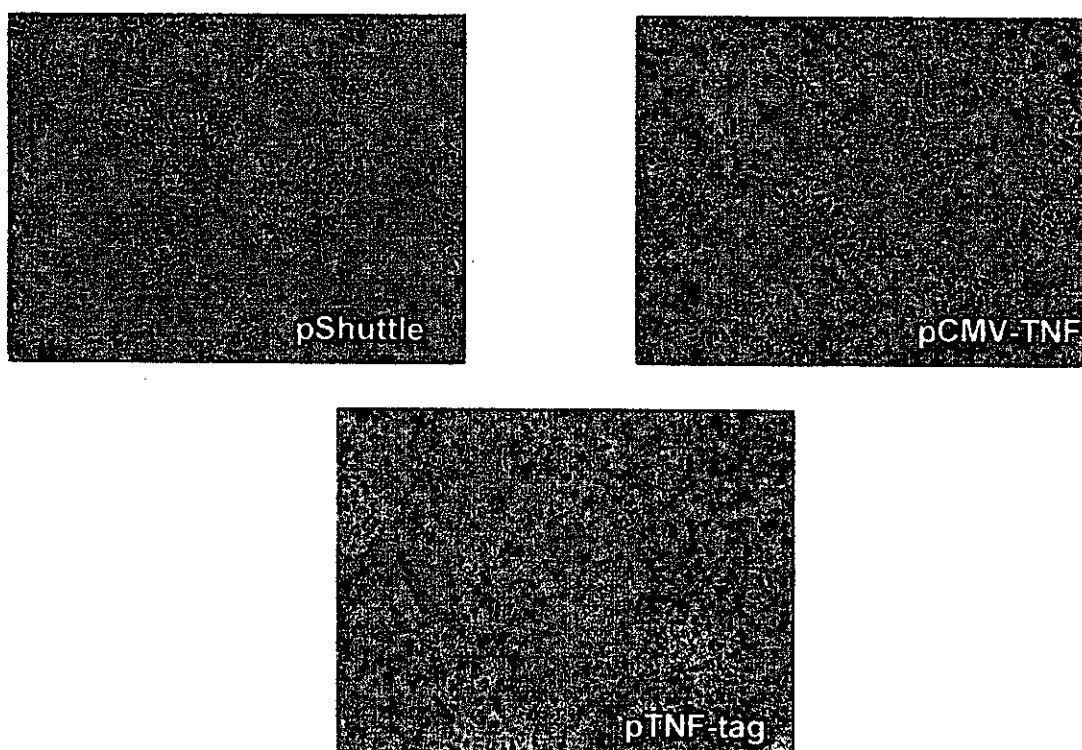


図 3 3. 作製した発現プラスミドをトランスフェクトした HeLa 細胞の位相差顕微鏡像 (トランスフェクト 24 時間後)
 pTNF-tag を発現させた細胞は死んで浮き上がった細胞が数多く観察された。

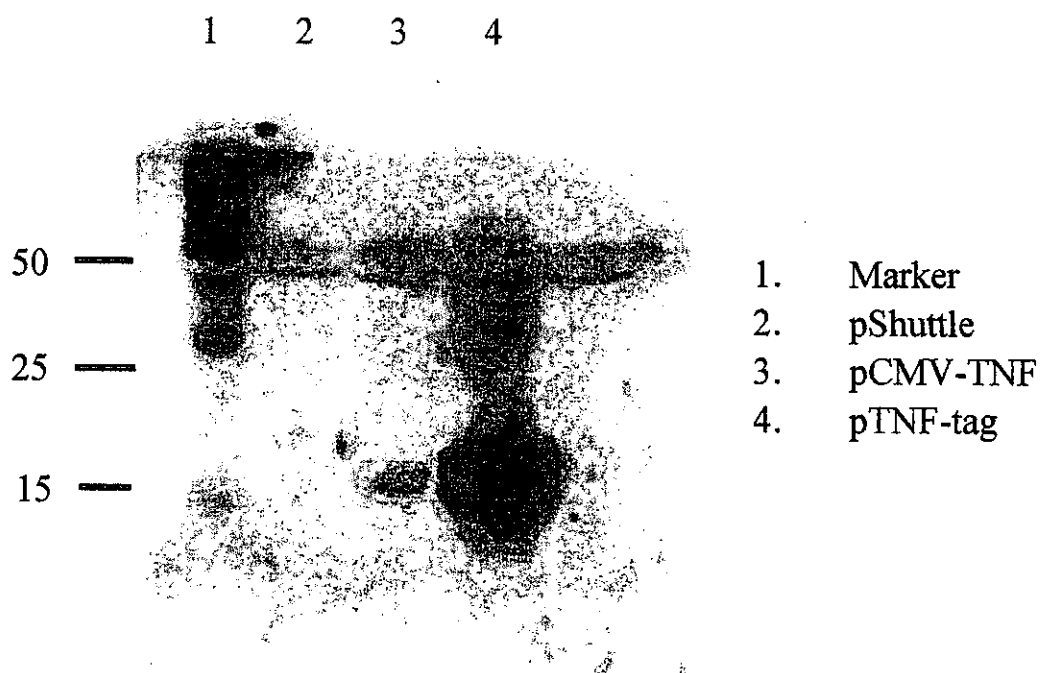


図 3 4. pTNF-tag によって発現したタンパク質の TNF- α 抗体を用いたウェスタンブロットによる確認

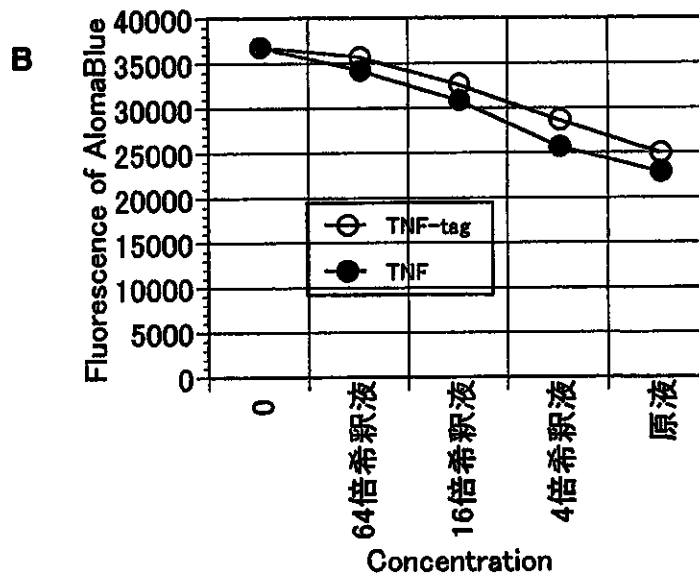
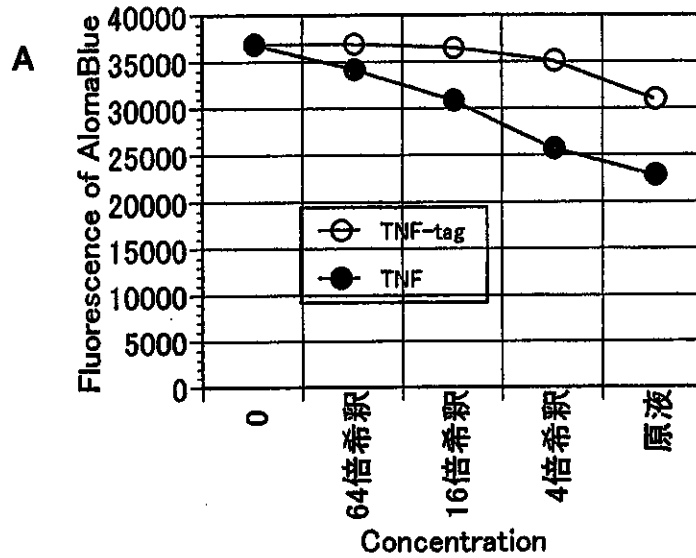


図35. 各プラスミドをトランスフェクトした細胞の培養液上清のL929マウス細胞に対する細胞壊死作用

A: TNF-tag は pTNF-tag をトランスフェクトした細胞の培養液上清。TNF は pCMV-TNF をトランスフェクトした細胞の培養液、B: TNF-tag は pTNF-tag をトランスフェクトした細胞の培養液上清。TNF は pShuttle をトランスフェクトした細胞の培養液上清に 5ng/ml TNF- α を添加した溶液

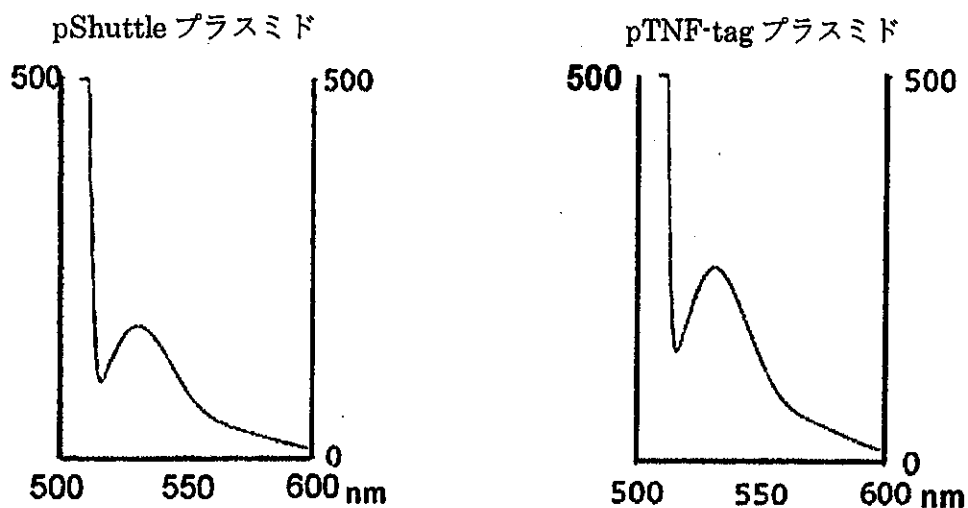


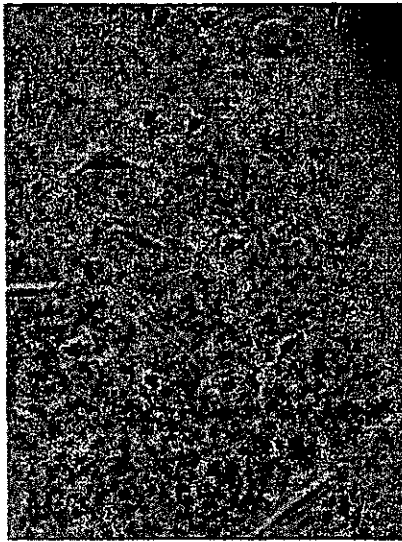
図 3 6 . pTNF-tag をトランスフェクトした細胞の培養液の FIAsh による蛍光標識

508nm の励起光で 500-600nm の蛍光スペクトル測定を行った。pTNF-tag プラスミドをトランスフェクトさせた細胞の培養液上清では 538nm 付近にピークを示す蛍光スペクトルが得られたが、pShuttle プラスミドをトランスフェクトさせた細胞の培養液上清においても、同様なスペクトルが得られた。

図37. ヒト末梢血AC133陽性細胞とCD34陽性細胞の血管内皮細胞への分化能の比較

(a)位相差顕
微鏡観察

AC133 Positive Cells

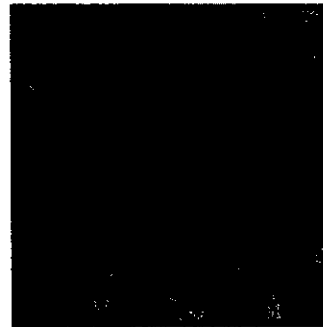


CD34 Positive Cells

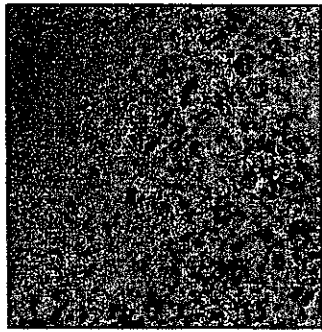
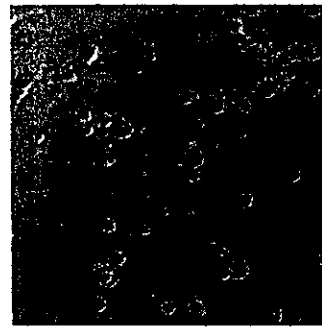
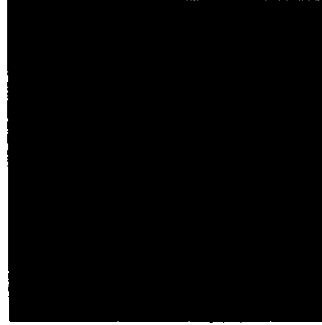


(b)蛍光染色
による分化指
標の観察

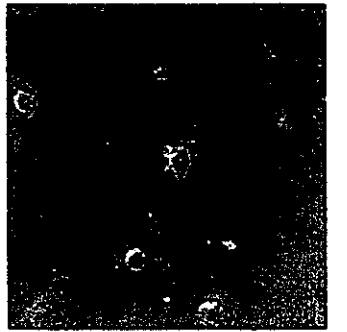
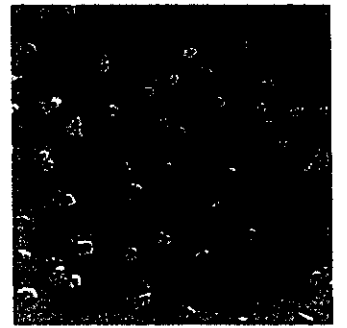
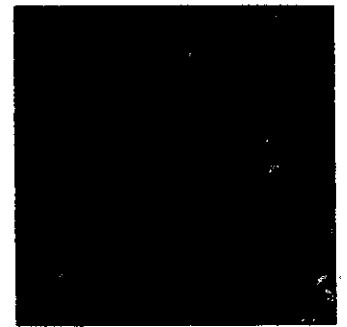
AC133 Positive Cells



CD34 Positive Cells



Acetyl-LDL



Von
Willebrand
Factor

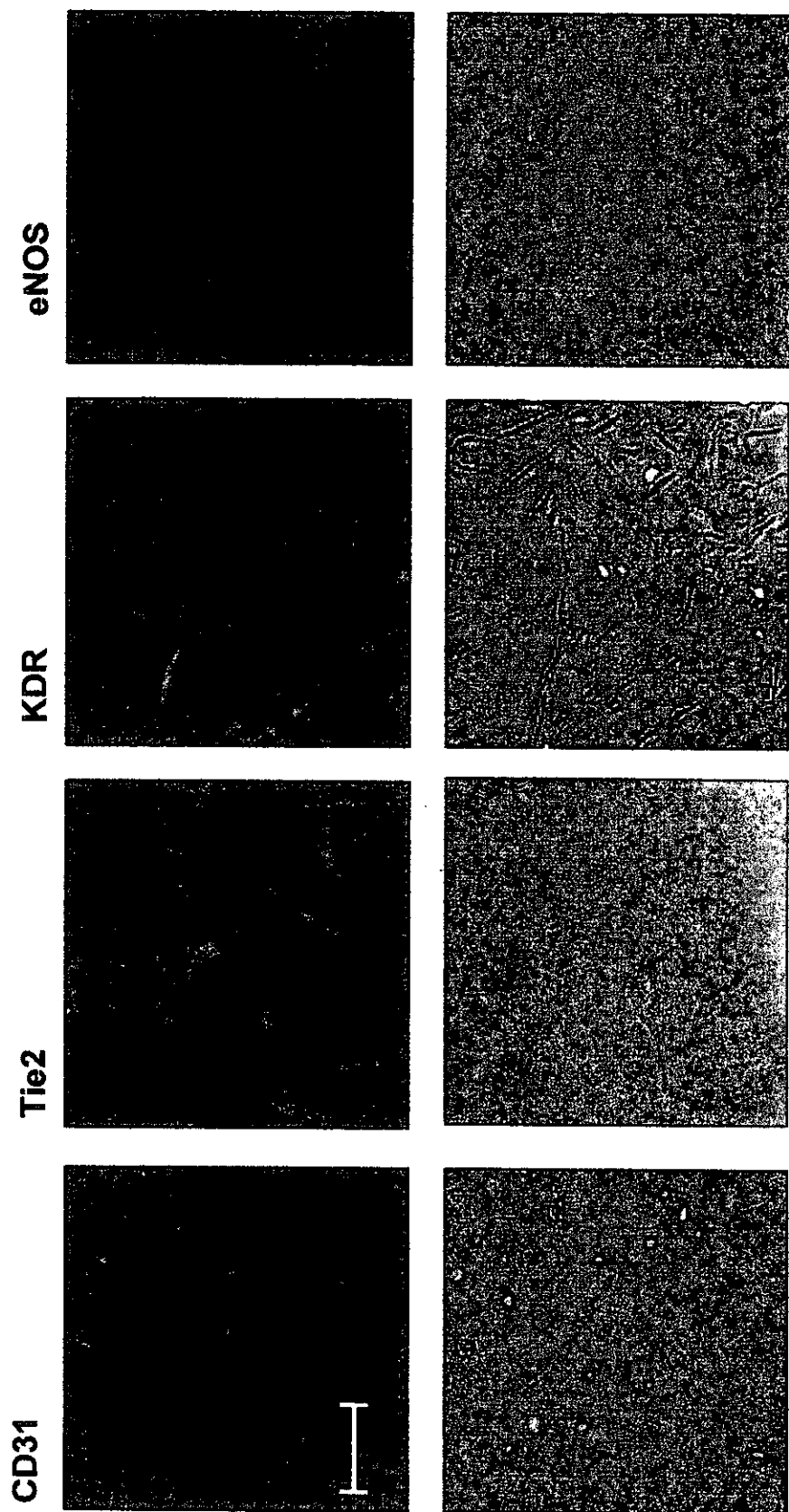


図38. ヒト末梢血AC133陽性細胞の血管内皮細胞への分化能
ヒトAC133陽性細胞をVEGF存在下に2週間培養した後、各抗体を用いて蛍光染色した。

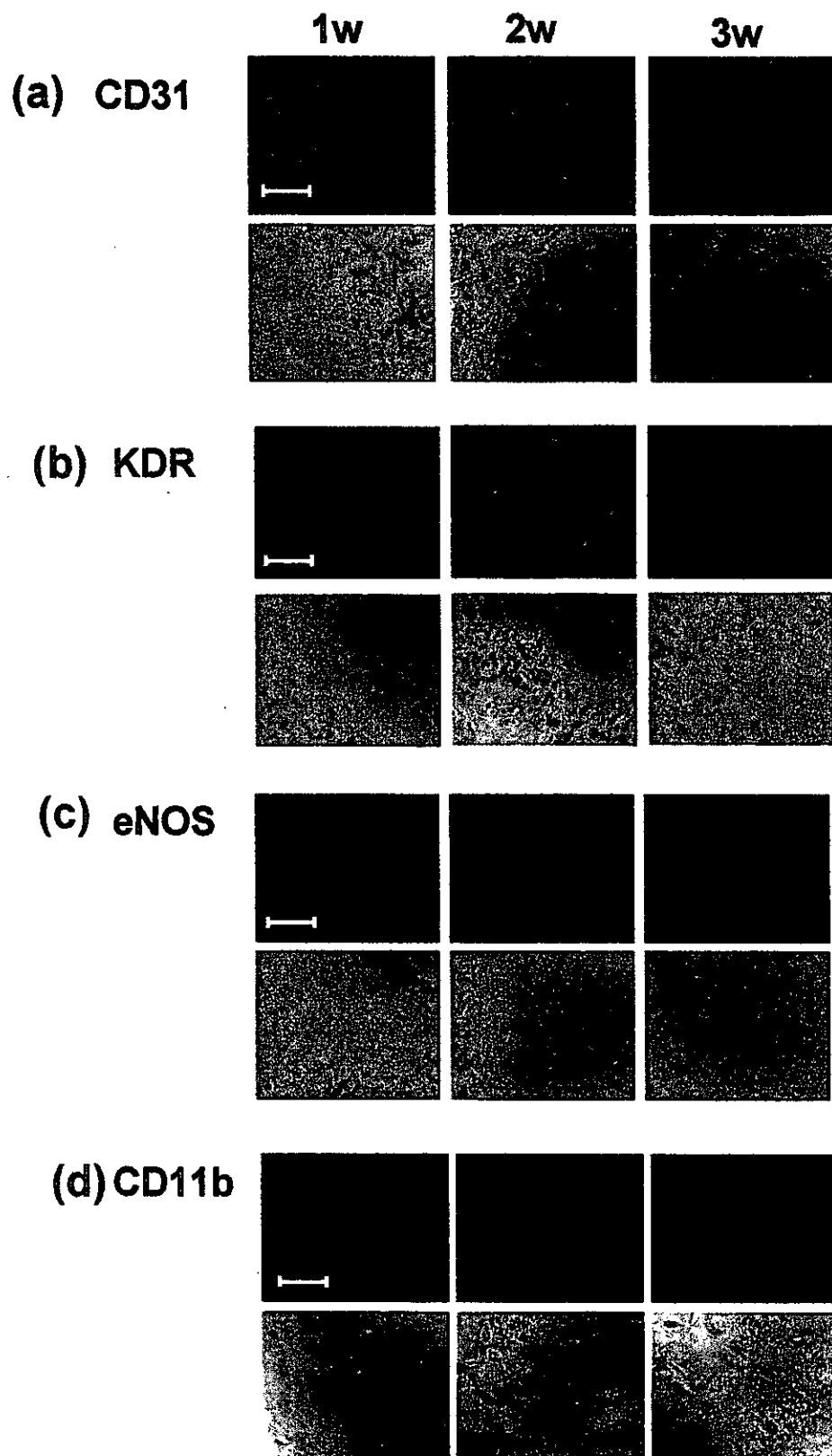


図39. 末梢血AC133陽性細胞から血管内皮細胞への分化過程における各種マーカーの経時的変化

図40 -a 臍帯血AC133⁺細胞から血管内皮細胞への分化過程における
CD31発現の経時的変化

