

C FACScan determination of CD4+ and CD8+ cells

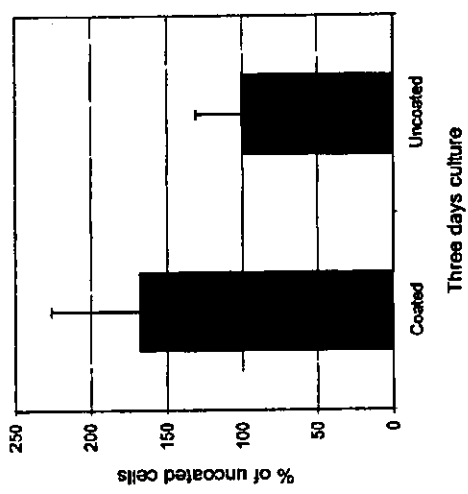
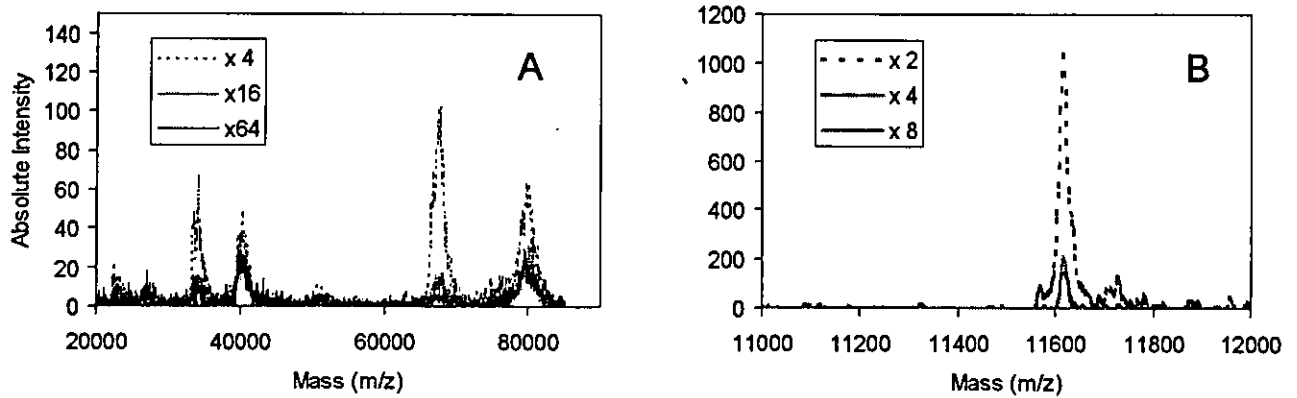
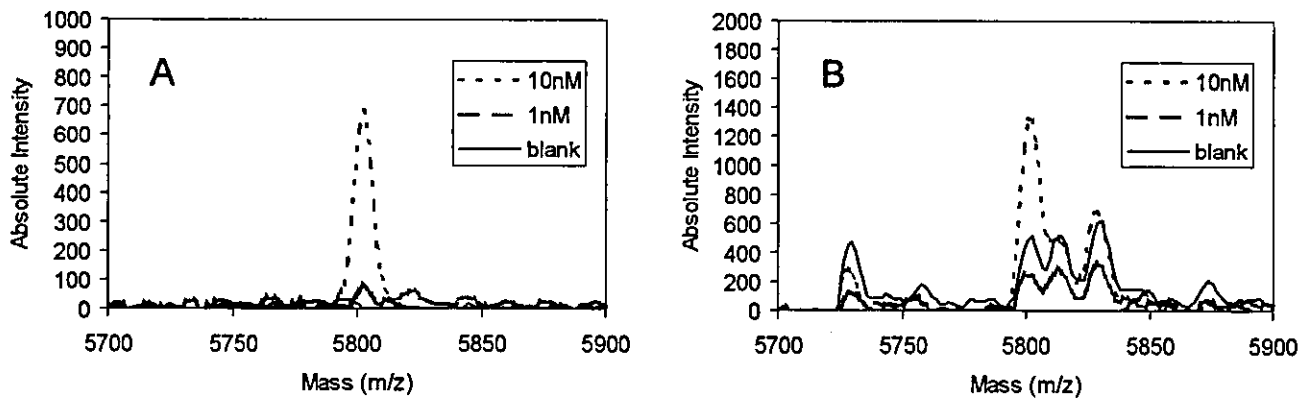


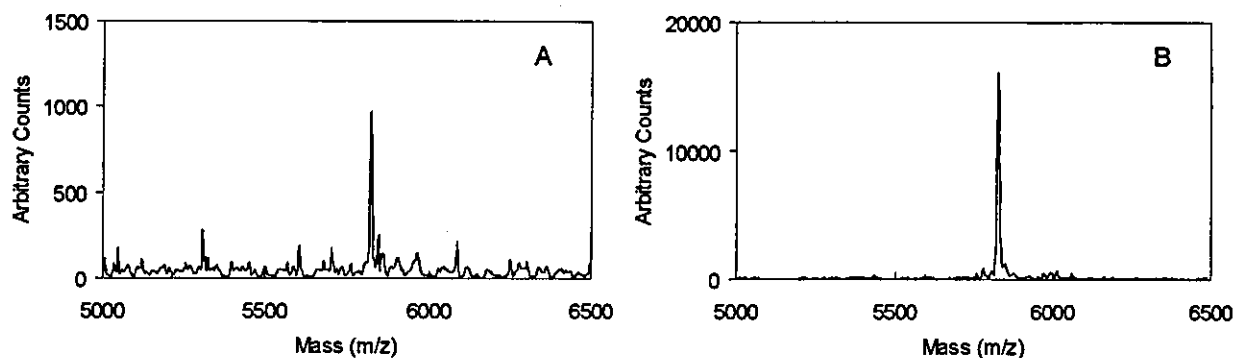
図58 リンパ球細胞中のCD4陽性細胞とCD8陽性細胞の測定



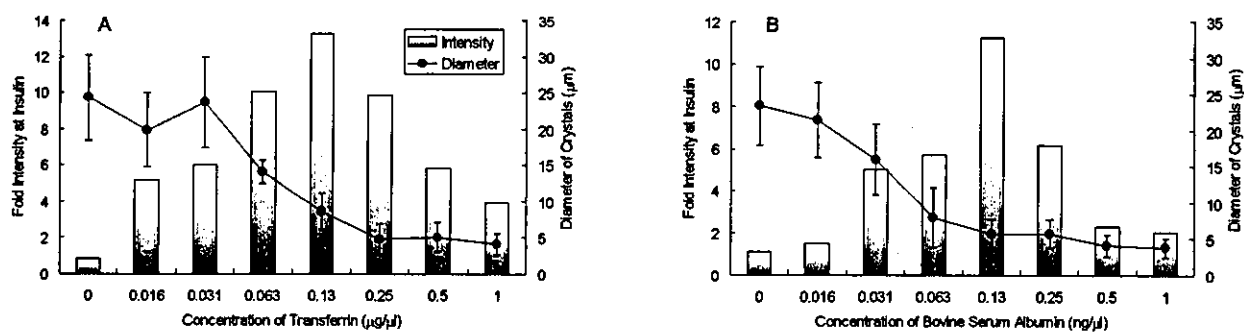
- 図59. (A) 抗トランスフェリン抗体または (B) 抗 β_2 ミクログロブリンモノクローナル抗体を結合した磁性マイクロ粒子で、希釈正常ヒト血清を精製した場合における結合画分のマススペクトル



- 図60. 抗インスリン抗体を結合した (A) 熱応答性磁性ナノ粒子または (B) 磁性マイクロ粒子で、インスリン添加ヒト血清を精製した場合における結合画分のマススペクトル



- 図6 1. (A) コントロールCHCAまたは (B) トランスフェリン添加CHCAをマトリックスとした場合におけるヒトインスリンのマススペクトル

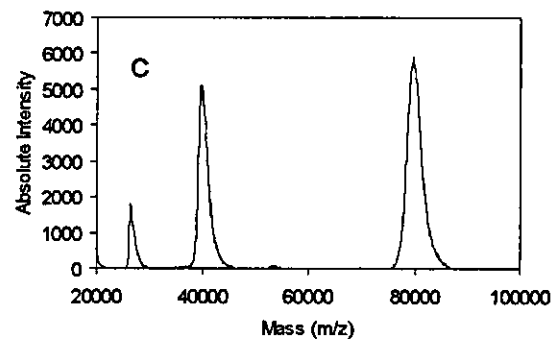
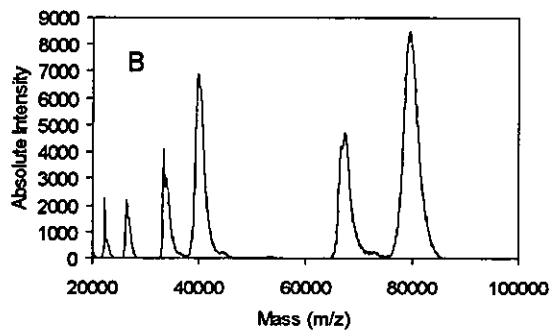
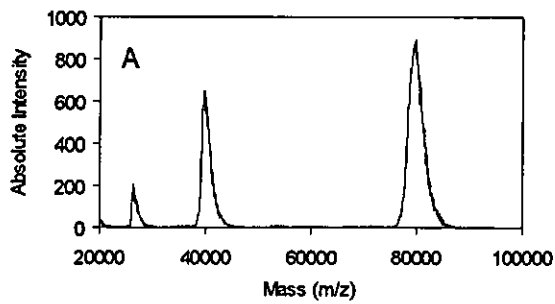


- 図6 2. (A)トランスフェリン添加CHCAまたは (B) BSA添加CHCAをマトリックスとした場合におけるインスリンシグナルの強度倍率と結晶径の添加物濃度に対する依存性
- 強度倍率は相当するコントロールに対するシグナル強度相対比の平均値 (N=3) 結晶径は平均値±標準偏差 (N=10)

表16. トランスフェリンまたはBSA添加CHCAマトリックスを用いたときのペプチドタンパク質混合試料に由来するシグナルの強度

	water		Tf		BSA	
[Angiotensin II] +	27834	± 10757	17057	± 5021	19755	± 11237
[P14R] +	41689	± 15289	30675	± 8588	29237	± 13330
[ACTH 18-39] +	4371	± 1586	3801	± 2246	5458	± 3826
[hANP] +	5158	± 1323	6889	± 2879	9523	± 6384
[human glucagon] +	435	± 183	674	± 324	978	± 566
[insulin B chain] +	367	± 257	997	± 251	715	± 479
[bovine insulin] +	639	± 100	6266	± 2736	7498	± 5331
[human insulin] +	1267	± 130	13321	± 5070	12982	± 6863
[equine cytochrome C] 2+	166	± 83	5668	± 1975	3460	± 1442
[human IGF-I] +	459	± 81	7667	± 1808	6263	± 2872
[equine apomyoglobin] 2+	nd		2249	± 994	2217	± 1087
[equine cytochrome C] +	114	± 43	7629	± 1804	4006	± 1981
[BSA] 4+	nd		52	± 14	2459	± 604
[equine apomyoglobin] +	nd		1347	± 700	2090	± 1316
[BSA] 3+	nd		155	± 13	3721	± 1426
[BSA] 2+	nd		114	± 27	3624	± 1681
[BSA] +	nd		25	± 8	634	± 433

Each entry is the average of the most intense signal from four samples. nd: no signal was detected



- 図63. (A) コントロールCHCA (B) BSA添加CHCAまたは (C) デキストラン添加CHCA をマトリックスとした場合におけるTfの質量分析スペクトル

表 1 7. 高分子添加CHCAマトリックスを用いたときの各種タンパク質に由来するシグナルの強度倍率

macromolecule	[Ft] +	[BSA] +	[Tf] +	[IgG] 2+
poly-L-lysine (MW 500-2,000)	3.30 ± 2.09	8.75 ± 4.24	7.90 ± 3.87	1.62 ± 0.47
poly-L-lysine (MW 1,000-4,000)	6.11 ± 1.92	6.55 ± 1.03	23.00 ± 6.03	1.53 ± 0.41
poly-L-lysine (MW 4,000-15,000)	4.60 ± 3.27	11.13 ± 2.09	7.72 ± 4.97	1.13 ± 0.49
poly-L-lysine (MW 15,000-30,000)	7.62 ± 0.32	10.20 ± 1.68	7.89 ± 1.73	1.44 ± 0.33
poly-L-lysine (MW 30,000-70,000)	4.89 ± 0.83	12.41 ± 1.22	9.87 ± 4.22	2.55 ± 0.55
poly-L-lysine (MW 70,000-150,000)	7.25 ± 4.05	13.54 ± 2.13	11.08 ± 3.23	1.08 ± 0.40
poly-L-lysine (MW 150,000-300,000)	4.65 ± 0.99	10.64 ± 3.20	13.11 ± 2.97	2.47 ± 0.20
poly-L-lysine (MW >300,000)	5.15 ± 2.38	9.79 ± 0.53	6.99 ± 2.05	3.50 ± 1.68
poly-L-glutamic acid (MW 50,000-100,000)	3.62 ± 0.86	1.55 ± 0.87	5.20 ± 2.88	0.22 ± 0.13
poly-L-arginine (MW 70,000-150,000)	4.91 ± 1.80	2.90 ± 0.48	8.60 ± 2.31	0.88 ± 0.11
polyvinyl alcohol (average MW 16,000)	4.30 ± 1.38	6.03 ± 2.85	14.35 ± 2.10	1.84 ± 0.38
polyvinyl alcohol (average MW 95,000)	1.09 ± 0.62	0.70 ± 0.46	1.30 ± 1.27	0.84 ± 0.16
polyvinylpyrrolidone (average MW 40,000)	0.01 ± 0.01	0.03 ± 0.02	0.02 ± 0.01	0.00 ± 0.00
polyvinylpyrrolidone (average MW 360,000)	0.01 ± 0.01	0.03 ± 0.02	0.05 ± 0.01	0.00 ± 0.00
polyethylenglycol (average MW 3,350)	8.51 ± 3.76	13.33 ± 4.50	42.59 ± 19.36	4.73 ± 1.73
polyethylenglycol (average MW 8,000)	1.17 ± 0.69	3.17 ± 1.58	24.34 ± 9.77	2.82 ± 0.38
polyethylenglycol (MW 15,000-25,000)	2.73 ± 0.40	3.41 ± 1.23	13.74 ± 4.26	2.00 ± 1.09
polyethylenglycol (MW 300,000-500,000)	0.73 ± 0.36	3.38 ± 1.76	6.99 ± 1.87	1.19 ± 0.47
polyethylenglycol (MW 1,500,000-2,000,000)	0.90 ± 0.34	4.14 ± 2.28	11.21 ± 2.85	0.60 ± 0.16
polyethylenglycol (MW 3,500,000-4,000,000)	0.88 ± 0.50	5.17 ± 2.19	2.43 ± 0.51	0.19 ± 0.06
dextran (average MW 10,000)	5.27 ± 1.50	8.67 ± 1.61	11.45 ± 4.41	1.12 ± 0.15
dextran (average MW 40,000)	2.66 ± 1.18	16.25 ± 4.60	11.87 ± 3.34	1.33 ± 0.25
dextran (average MW 70,000)	5.01 ± 0.91	10.75 ± 2.65	13.08 ± 4.85	1.53 ± 0.22
dextran (average MW 200,000)	9.89 ± 4.03	12.98 ± 4.05	17.27 ± 2.38	0.98 ± 0.36
dextran (average MW 500,000)	2.93 ± 0.73	11.73 ± 1.26	16.37 ± 1.73	0.79 ± 0.24
dextran (average MW 20,000,000)	11.24 ± 3.84	19.32 ± 8.11	5.43 ± 0.93	1.14 ± 0.14

Each entry is the average of the most intense signal from three samples. nd: not determined.

表 18. 高分子添加CHCAを用いたときのペプチドタンパク質混合試料に由来するシグナルの強度倍率

macromolecule	[ACTH 18-39] +	[insulin] +	[cytochrome C] +	[apomyoglobin] +
poly-L-lysine (MW 4,000-15,000)	1.76 ± 0.30	0.97 ± 0.05	12.89 ± 5.76	3.84 ± 0.58
poly-L-lysine (MW 15,000-30,000)	1.62 ± 0.21	1.98 ± 0.87	38.16 ± 18.19	27.50 ± 14.02
poly-L-lysine (MW 30,000-70,000)	1.49 ± 0.27	1.15 ± 0.38	20.26 ± 7.30	4.75 ± 1.72
poly-L-lysine (MW 70,000-150,000)	1.83 ± 0.09	4.29 ± 1.03	33.40 ± 6.55	15.58 ± 6.35
poly-L-lysine (MW 150,000-300,000)	2.25 ± 0.25	3.74 ± 0.30	15.21 ± 3.81	2.56 ± 0.76
poly-L-lysine (MW >300,000)	1.49 ± 0.16	5.14 ± 0.63	19.07 ± 8.49	9.33 ± 6.13
poly-L-glutamic acid (MW 50,000-100,000)	1.49 ± 0.74	2.77 ± 1.01	1.50 ± 0.48	9.05 ± 1.73
poly-L-arginine (MW 70,000-150,000)	0.68 ± 0.33	9.65 ± 3.42	7.07 ± 2.98	11.78 ± 7.14
polyvinyl alcohol (average MW 16,000)	0.87 ± 0.30	1.57 ± 0.24	0.60 ± 0.31	0.31 ± 0.22
polyvinyl alcohol (average MW 95,000)	0.57 ± 0.36	0.47 ± 0.14	0.93 ± 0.65	0.62 ± 0.39
polyethylenglycol (average MW 3,350)	0.64 ± 0.09	1.25 ± 0.35	1.92 ± 1.02	2.04 ± 0.96
polyethylenglycol (average MW 8,000)	0.23 ± 0.02	1.06 ± 0.17	0.73 ± 0.34	1.18 ± 0.46
polyethylenglycol (MW 15,000-25,000)	0.14 ± 0.05	1.30 ± 0.64	1.37 ± 0.54	1.32 ± 0.38
polyethylenglycol (MW 300,000-500,000)	0.07 ± 0.04	1.11 ± 0.56	1.94 ± 0.98	1.06 ± 0.23
polyethylenglycol (MW 1,500,000-2,000,000)	0.24 ± 0.14	1.60 ± 0.71	1.44 ± 0.46	1.20 ± 0.57
polyethylenglycol (MW 3,500,000-4,000,000)	0.12 ± 0.10	1.62 ± 0.74	2.35 ± 1.30	1.34 ± 0.71
dextran (average MW 10,000)	0.80 ± 0.12	2.13 ± 0.91	13.79 ± 5.48	2.50 ± 0.67
dextran (average MW 40,000)	1.27 ± 0.24	3.36 ± 0.88	5.81 ± 2.61	1.40 ± 0.43
dextran (average MW 70,000)	1.24 ± 0.13	3.49 ± 0.64	10.75 ± 4.01	2.82 ± 0.88
dextran (average MW 200,000)	1.05 ± 0.21	5.32 ± 0.79	12.66 ± 3.29	3.68 ± 1.61
dextran (average MW 500,000)	0.86 ± 0.12	7.50 ± 1.03	17.30 ± 3.13	11.21 ± 2.02
dextran (average MW 20,000,000)	0.87 ± 0.25	12.23 ± 3.69	20.38 ± 7.31	5.44 ± 1.99

Each entry is the average of the most intense signal from three samples. nd: not determined.

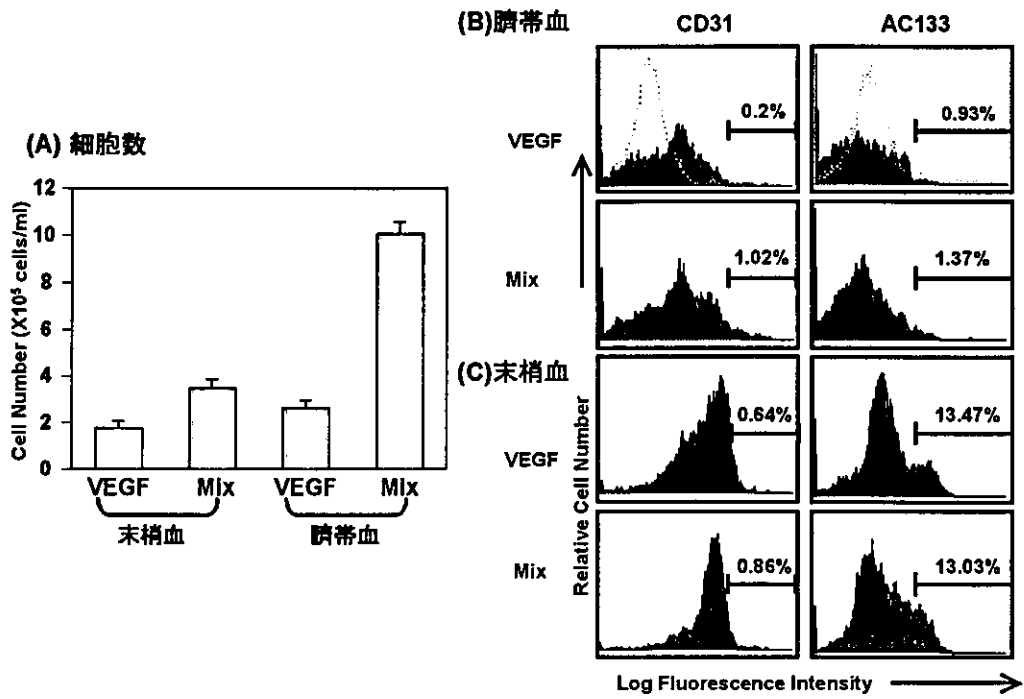


図 6.4. AC133 陽性細胞を SCF や TPO 存在下で培養した時に一週間後に出現する CD31 強陽性細胞と AC133 陽性細胞

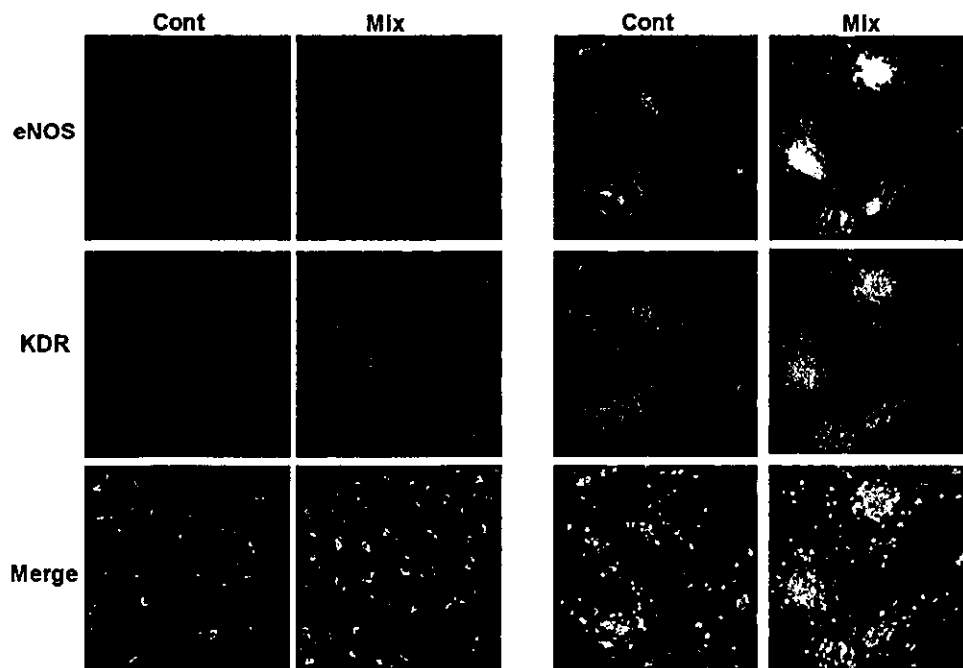


図 6.5. AC133 陽性細胞を SCF や TPO 存在下に培養した時に出現してくる接着細胞

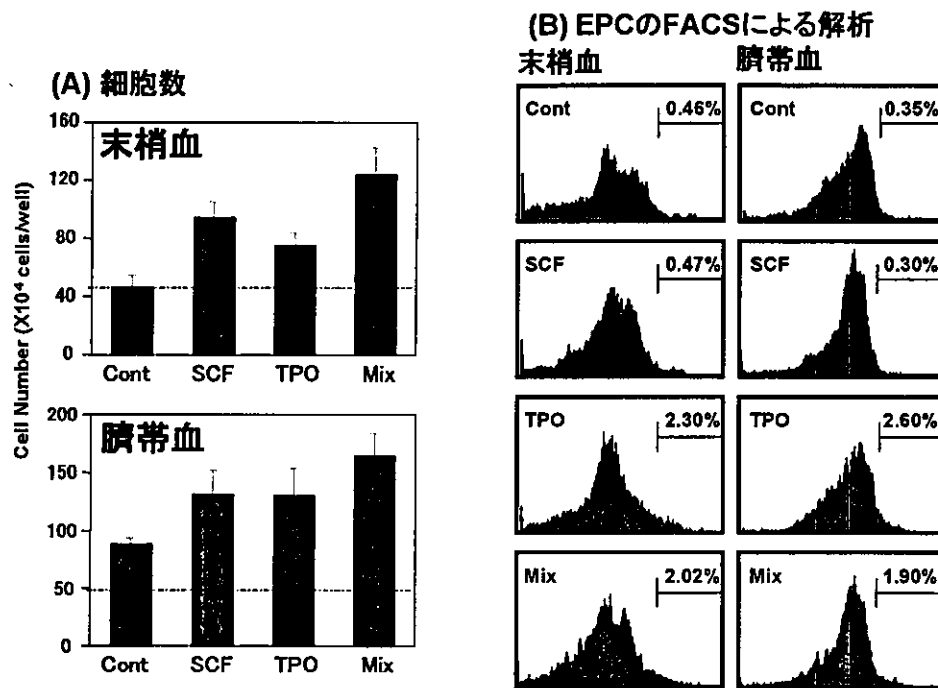


図 6 6. AC133 陽性細胞を SCF や TPO 存在下に培養した時の細胞増殖と出現してくる CD31 強陽性細胞の比率

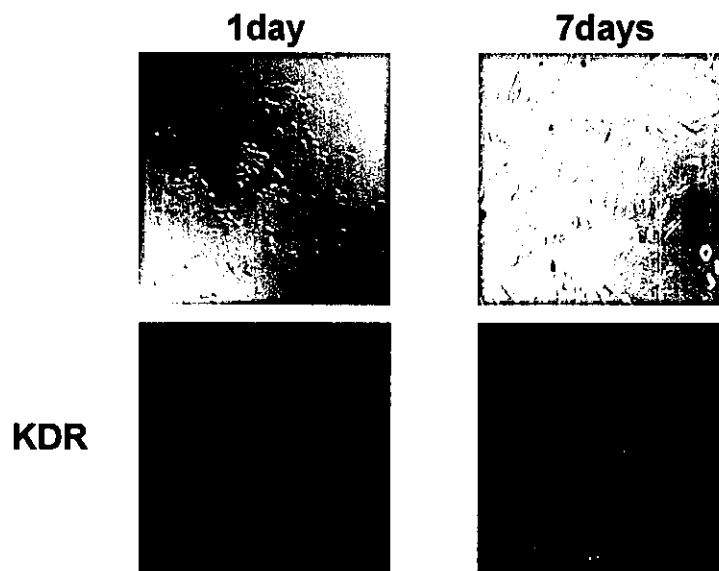


図 6 7. ファイブロネクチン上で培養した末梢血由来血管内皮前駆細胞の KDR 発現の変化

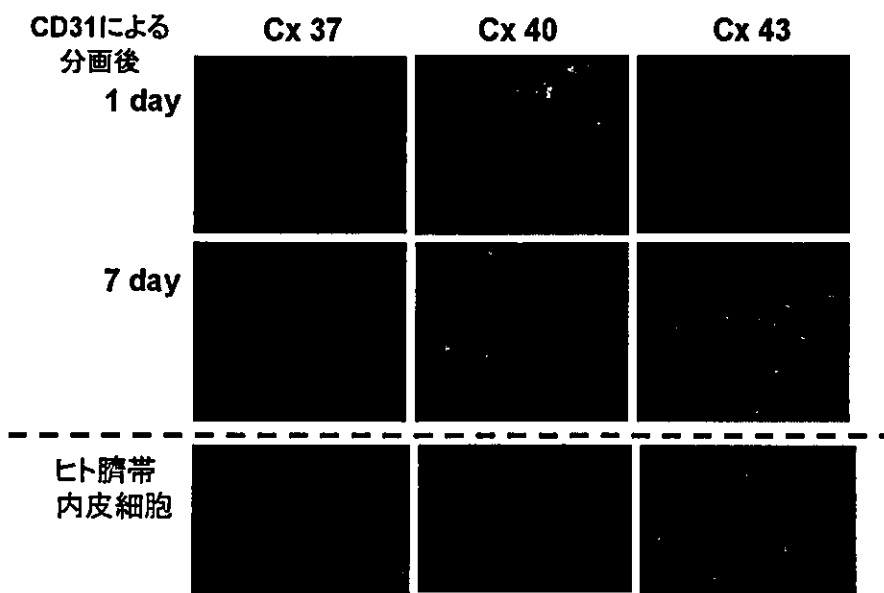


図 6 8 . 末梢血由来血管内皮前駆細胞の培養 1 日目と 7 日目における Cx37、Cx40、Cx43 の発現

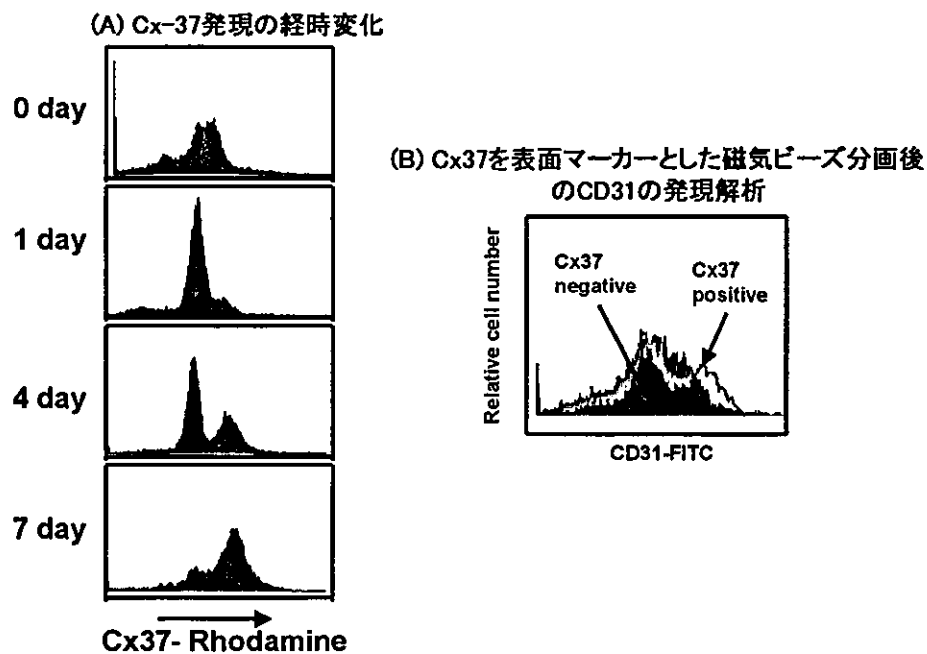


図 6 9 . 末梢血由来 AC133 陽性細胞における Cx37 発現の経時変化と Cx37 を表面マーカーとした磁気ビーズ分画後の CD31 発現解析

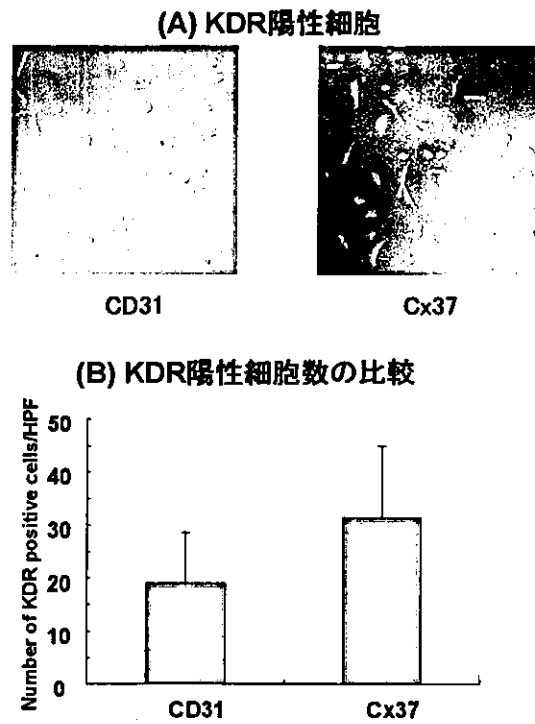


図 7 0. AC133 由来 CD31 及び Cx37 陽性細胞を培養した時の KDR 陽性接着細胞

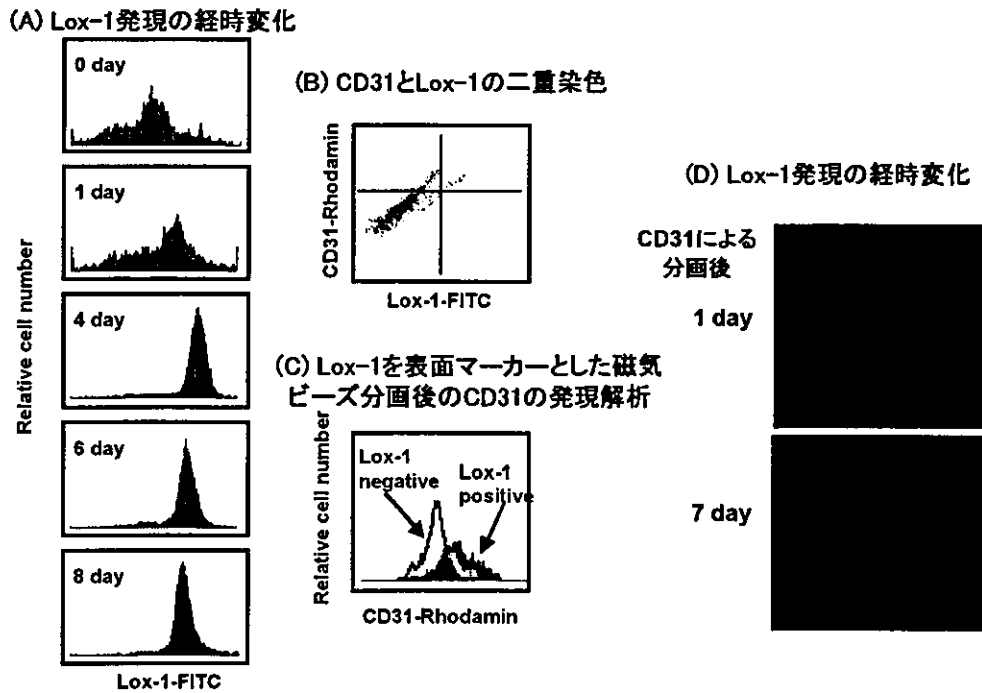


図 7 1. 臍帯血 AC133 陽性細胞を培養したときの Lox-1 発現の経時変化と Lox-1 陽性細胞を磁気ビーズ分画後の CD31 の発現解析

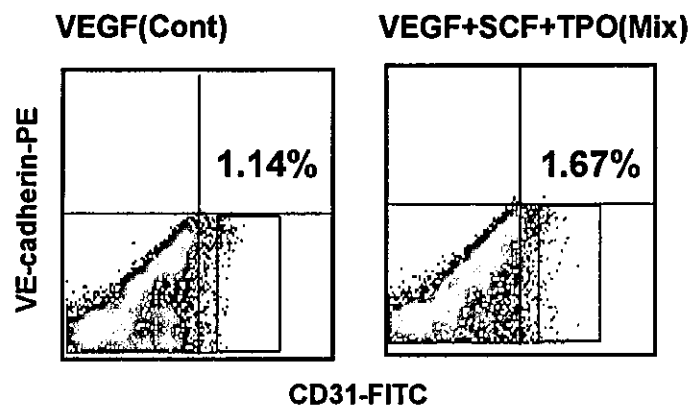


図72. EPCのCD31とVE-cadherinの二重染色

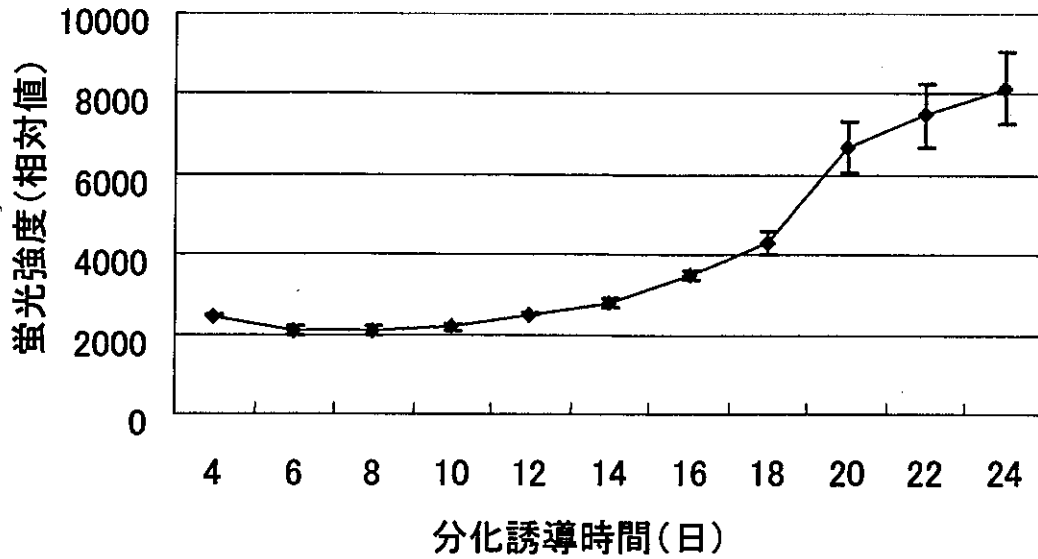
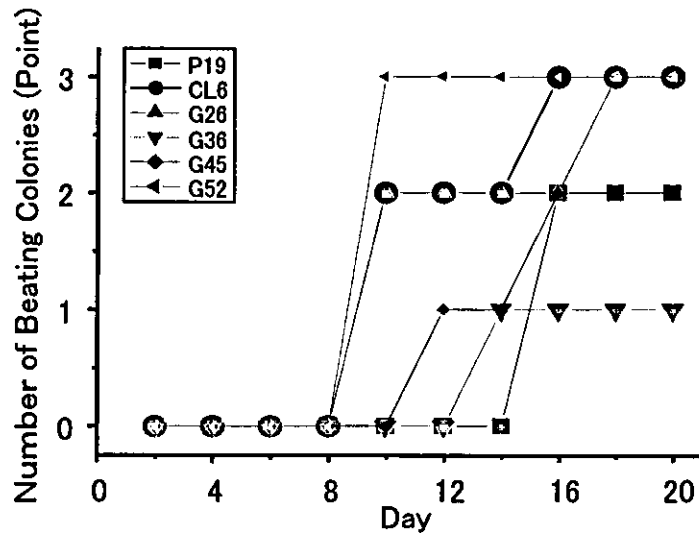


図73. CL6G52株の蛍光強度の時間変化

GFPの励起光によるCL6G52細胞の蛍光強度の時間変化を示す。サブコンフルエントのCL6G52株をトリプシン-EDTA処理により分散した後、1% DMSOを含むMEM α 溶液中で培養して心筋細胞分化を誘導した。分化誘導開始の約2週間後より蛍光強度が増加した。値は平均値 \pm S.E.M. (n=12)を示す。

A. 収縮コロニー数



B. 収縮コロニーサイズ

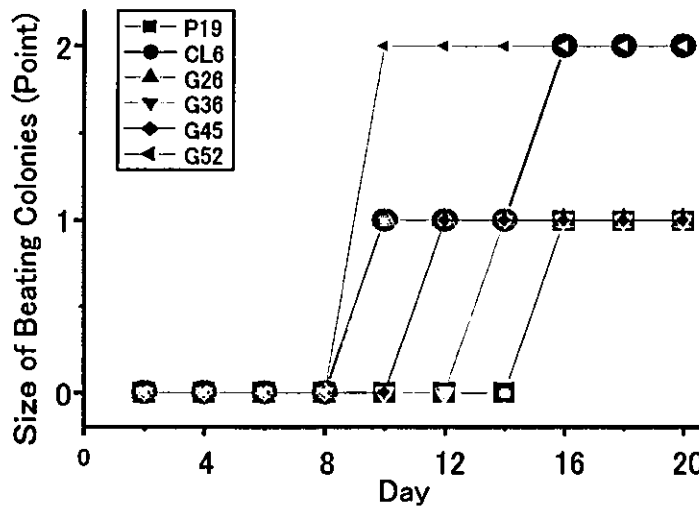


図74. P19由来細胞株の心筋細胞分化の定性的時間経過

サブコンフルエントのP19由来細胞株をトリプシン-EDTA処理により分散した後、1% DMSOを含むMEM α 溶液中で培養して心筋細胞分化を誘導した。A)各細胞株の収縮コロニー数の時間経過を示す。収縮が見られないものに「0」、6穴細胞培養プレート1枚に対して1つ以上の収縮があるものに「1」、プレートのウェル1つに対して1つ以上の収縮があるものに「2」、顕微鏡の視野($\times 200$)に対して1つ以上の収縮があるものに「3」のスコアを与えた。B)各細胞株の収縮コロニーサイズの時間経過を示す。収縮が見られないものに「0」、顕微鏡の視野($\times 200$)の1/100程度の大きさの点状の収縮に対して「1」、顕微鏡の視野($\times 200$)の1/2程度の大きさのシート状の収縮に「2」のスコアを与えた。横軸は心筋分化誘導後の日数を示す。CL6G52株の自動能はGFPの蛍光増加(図1)よりも4日ほど早くの出現している。

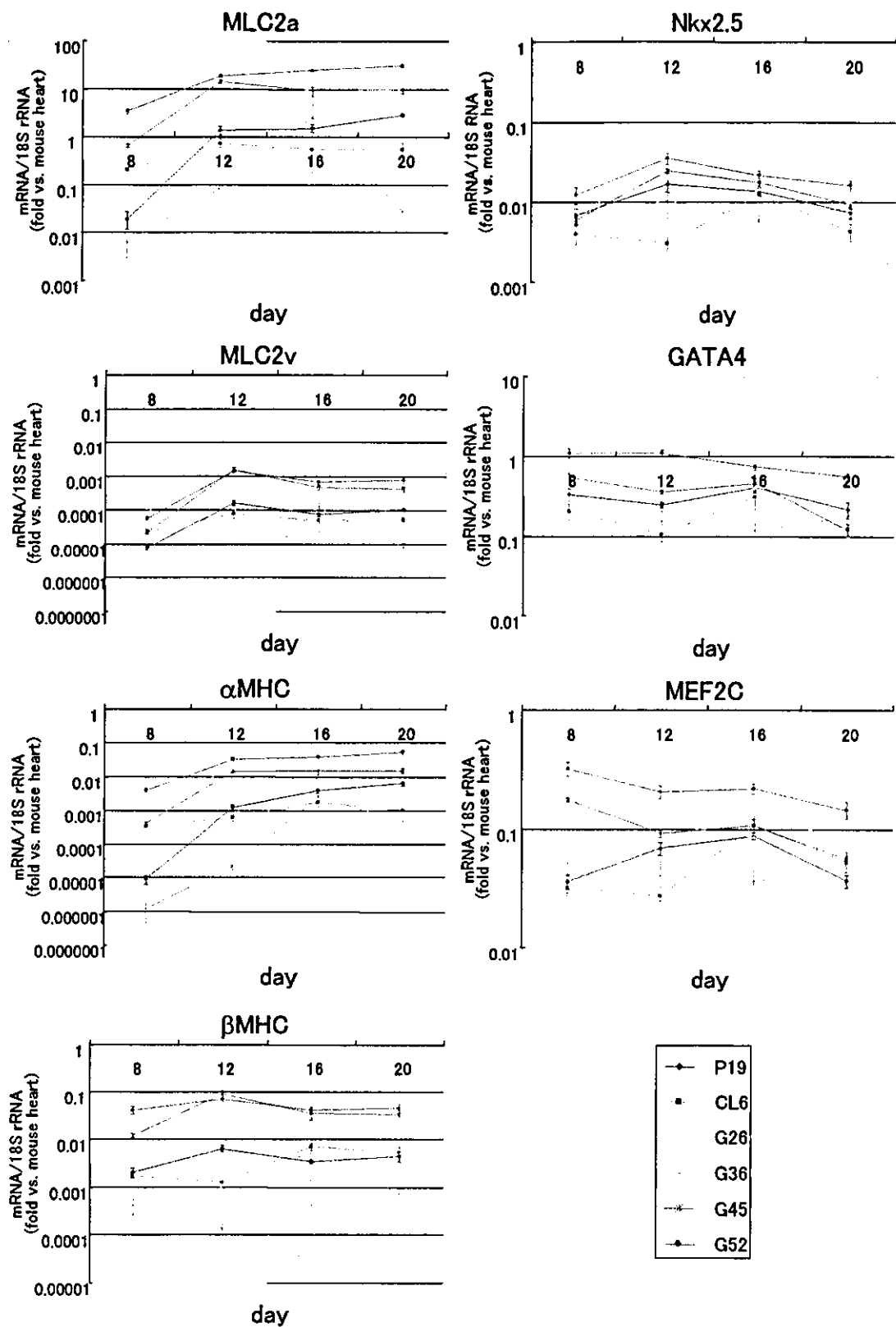
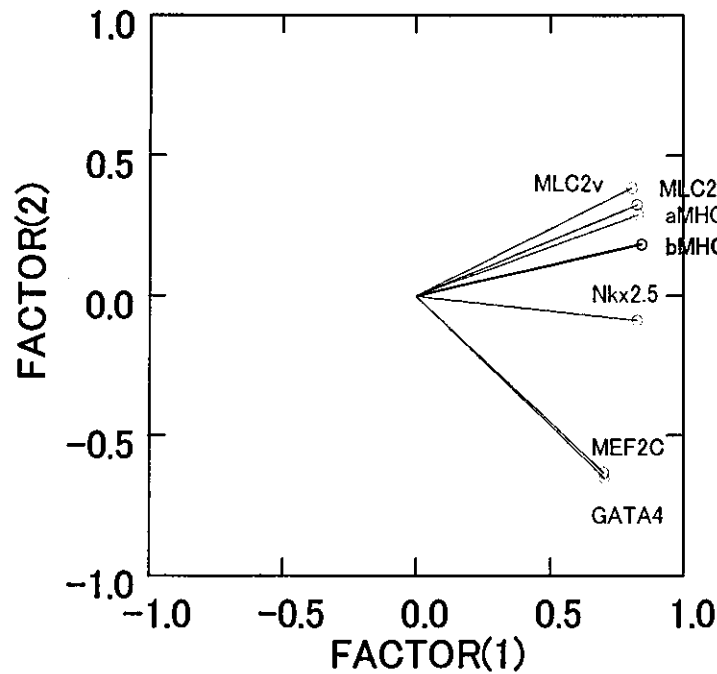


図75. P19由来細胞株における心筋細胞マーカー遺伝子の発現の時間経過
 サブコンフルエントのP19由来細胞株をトリプシン-EDTA処理により分散した後、1% DMSOを含むMEM α 溶液中で培養して心筋細胞分化を誘導した。分化誘導開始から8, 12, 16, 20日目にtotal RNAを回収し、心筋細胞マーカー遺伝子の発現をリアルタイムRT-PCRで定量した。縦軸はmRNA/18S rRNAの値を成体マウス心筋と比較した場合の相対値。値は平均値 \pm S.E.M. (n=6)で示す。

A. Factor Loadings Plot



B. Scree Plot

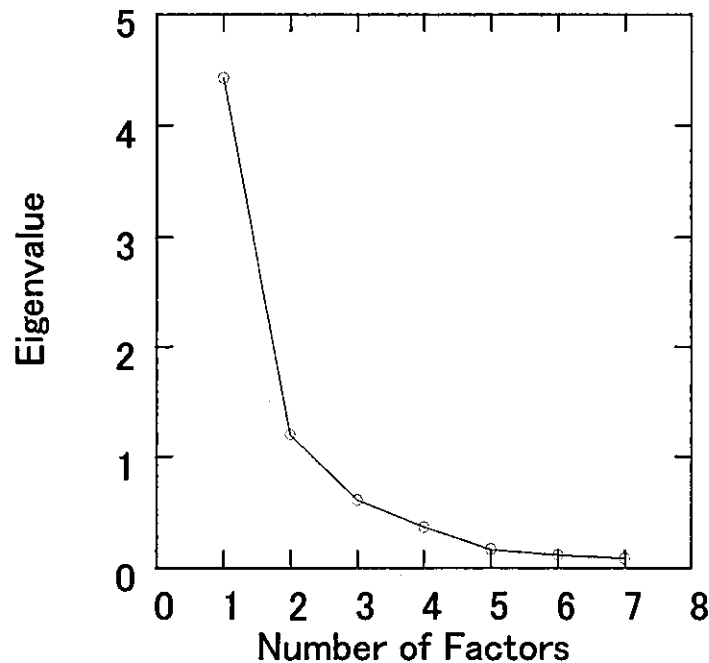


図76. P19由来細胞株の心筋細胞マーカー遺伝子の主成分分析

1% DMSOを含むMEM α 溶液中で培養して心筋細胞分化を誘導したP19由来細胞株における心筋細胞マーカー遺伝子のmRNA発現量(図3中の全データ)を平均値および標準偏差により統計的標準化した後、主成分分析した。A) 第1主成分と第2主成分の変量プロットを示す。係数の傾向から第1主成分は心筋分化の指標、第2主成分は心筋成熟の指標と考えられる。B) 主成分の寄与率を示す。第1主成分の寄与率は7パラメータの65%、第2主成分の寄与率は7パラメータの15%であり、この2つの主成分で資料の80%の情報量をもつことが分かる。

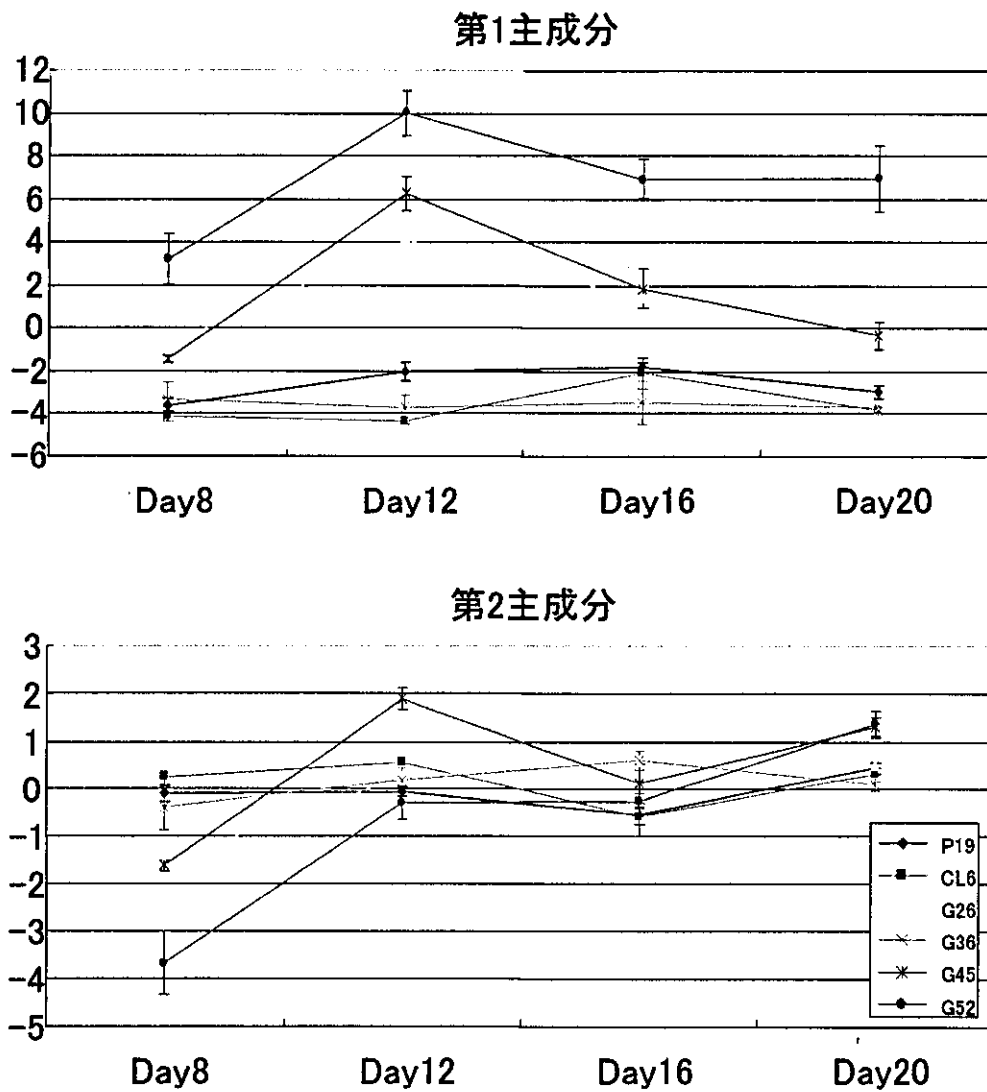


図77. P19由来細胞株の心筋細胞マーカー遺伝子の主成分得点

1% DMSOを含むMEM α 溶液中で培養して心筋細胞分化を誘導したP19由来細胞株における心筋細胞マーカー遺伝子のmRNA発現量データを主成分分析した際の第1主成分および第2主成分の主成分得点。主成分得点とは、求めた主成分から個々の資料の値を見たものである。

表19, 心筋細胞分化と有意な相関のある「心筋細胞分化予測マーカー」候補遺伝子

Gene Name	Localization	1st Principal Component		2nd Principal Component		Onset		Colony#	
		r_s	p	r_s	p	r_s	p	r_s	p
CPC1	Soluble Protein	0.824	0.000	0.737	0.000	-0.493	0.008	0.438	0.015
CPC2	Soluble Protein	0.784	0.000	0.746	0.000	-0.542	0.002	0.415	0.022
CPC3	Membrane Protein	0.760	0.000	0.440	0.015	-0.633	0.000	0.645	0.000
CPC4	Membrane Protein	0.760	0.000	0.639	0.000	-0.486	0.008	0.420	0.021
CPC5	Membrane Protein	0.757	0.000	0.466	0.009	-0.688	0.000	0.688	0.000
CPC6	Membrane Protein	-0.720	0.000	-0.524	0.003	0.677	0.000	-0.591	0.001
CPC7	Membrane Protein	0.659	0.000	0.128	0.500	-0.492	0.006	0.600	0.000
CPC2	Soluble Protein	0.652	0.000	0.380	0.038	-0.804	0.000	0.767	0.000
CPC8	Membrane Protein	-0.625	0.000	-0.459	0.011	0.418	0.022	-0.382	0.037
CPC9	Soluble Protein	-0.590	0.001	-0.310	0.095	0.503	0.005	-0.516	0.003
CPC10	Soluble Protein	0.566	0.001	0.234	0.214	-0.615	0.000	0.646	0.000
CPC11	Soluble Protein	0.565	0.001	0.428	0.018	-0.631	0.000	0.586	0.001
CPC12	Membrane Protein	0.556	0.001	0.416	0.022	-0.398	0.029	0.417	0.022
CPC13	Membrane Protein	0.540	0.002	0.305	0.101	-0.430	0.018	0.432	0.017
CPC13	Membrane Protein	0.539	0.002	0.176	0.352	-0.586	0.001	0.682	0.000
CPC14	Soluble Protein	0.537	0.002	0.243	0.195	-0.467	0.009	0.501	0.005
CPC15	Membrane Protein	0.485	0.007	0.001	0.995	-0.673	0.000	0.781	0.000
CPC16	Membrane Protein	0.469	0.009	-0.119	0.532	-0.474	0.008	0.640	0.000
CPC17	Not Predicted	-0.456	0.011	-0.050	0.792	0.767	0.000	-0.831	0.000
CPC18	Membrane Protein	0.453	0.012	-0.063	0.739	-0.369	0.045	0.548	0.002
CPC19	Not Predicted	-0.440	0.015	-0.107	0.575	0.643	0.000	-0.712	0.000
CPC20	Soluble Protein	-0.426	0.019	0.004	0.985	0.421	0.020	-0.540	0.002
CPC21	Membrane Protein	0.397	0.030	-0.020	0.915	-0.581	0.001	0.683	0.000
CPC22	Soluble Protein	-0.392	0.032	-0.284	0.128	0.525	0.003	-0.458	0.011
CPC23	Soluble Protein	-0.392	0.032	0.109	0.566	0.698	0.000	-0.822	0.000
CPC24	Soluble Protein	-0.386	0.035	0.141	0.456	0.462	0.010	-0.603	0.000

分化誘導前の発現量と誘導後の心筋細胞分化の程度に有意な相関の認められたP19由来細胞株中の「心筋細胞分化予測マーカー」候補遺伝子。心筋細胞分化は、分化誘導後の「心筋細胞マーカー遺伝子」の発現の第1主成分、自動能出現までの日数、自動能を有する細胞コロニー数により評価した。黄色は第2主成分とも有意な相関の認められた遺伝子。

r_s : スピアマンの順位相関係数、p: スピアマンの順位相関係数のp-値

図78 P19細胞をレチノイン酸存在下細菌用プレートで1日間培養し、凝集状態の細胞

Control (DMSO 0.1%)



Retinoic acid (1 μM)

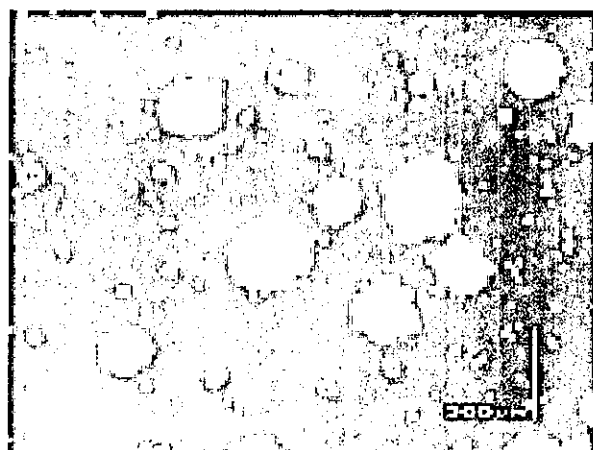
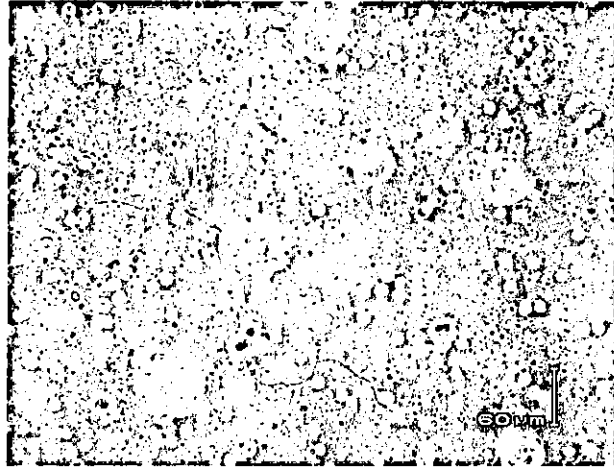


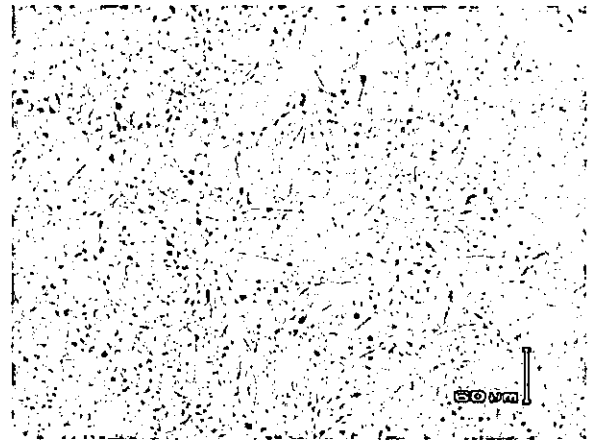
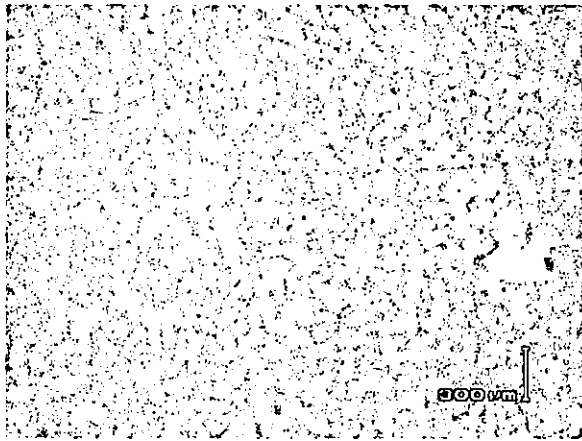
図79 P19細胞をレチノイン酸存在下4日間培養し、分化培地に移し3日目の分化した細胞



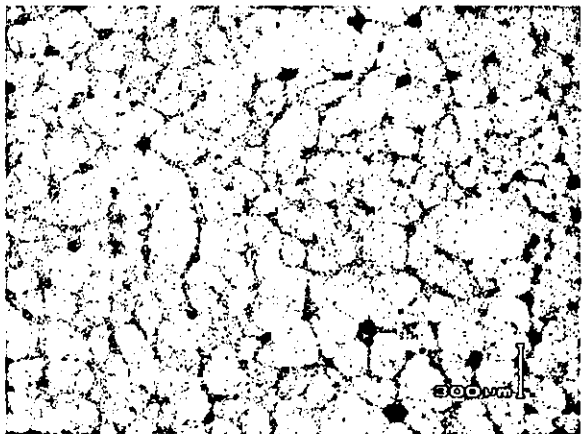
図80 分化誘導後細胞をトリプシンでばらし分化培地で培養した細胞



Control (レチノイン酸を加えないで培養したもの)



1日目 細胞が集まりはじめ、神経突起を伸ばす



3日目 密にネットワークを形成