

表1. プライマー及びプローブ

---

Sindbis virus

5'-CAGGACGTCTATAACGCTCC-3'

5'-GAGAACCTGAACTGGGTGGTGTC-3'

HSV-1

5'-GCGTCATGGTACTGGCAAG-3'

5'-TTGACTCTACGGAGCTGGCC-3'

5'-TGGAGCTGATGCCGTAGTCGG-3' (TaqMAN Probe)

SV-40

5'-GACATTCCTAGGCTCACCTCAC-3'

5'-ACCTTGCCAAACTGTCCCTTAAA-3'

5'-CTTGAAAGAAGAACCCTTAAAGA-3' (TaqMAN Probe)

Adenovirus

5'-TCCGGTCCTTCTAACACACCTC-3'

5'-ACGGCAACTGGTTTAATGGG-3'

TGAGATACACCCGGTGGTCCCGC-3' (TaqMAN Probe)

Poliovirus

5'-CCCGAGAAATGGGACGACTA-3'

5'-TGGAGCTGTTCCGTAGGTGTAA-3'

5'-ACATGGCAAACCTCATCAAATCCATCAATC-3' (TaqMAN Probe)

PPV

5'-AACAACTACGCAGCAACTCCAATA-3'

5'-ACGGCTCCAAGGCTAAAGC-3'

5'-AGGAGGACCTGGATTT-3' (TaqMAN Probe)

---

Real-time PCR/TR-PCR で用いたプライマーとプローブ。Sindbis virus の場合は Syber green を用いた。

表2. PEI 磁気ビーズによって濃縮されるウイルス

ウイルス	宿主	ウイルス ゲノム	脂質膜	PEI磁気 ビーズ濃縮
ヘルペスウイルス1型(HSV-1)	ヒト	DNA	+	+
ポリオウイルス	ヒト	RNA	-	-
ブタパルポウイルス(PPV)	ブタ	DNA	-	-
水疱性口内炎ウイルス(VSV)	ウシ	RNA	+	+
Sindbisウイルス	ヒト	RNA	+	+
SV-40ウイルス	サル	DNA	-	+
サイトメガロウイルス	サル	DNA	+	+
マウス白血病ウイルス	マウス	RNA	+	+
アデノウイルス	ヒト	DNA	-	+
B型肝炎ウイルス(HBV)	ヒト	DNA	+	+
C型肝炎ウイルス(HCV)	ヒト	RNA	+	+
ヒト免疫不全ウイルス(HIV)	ヒト	RNA	+	+
A型肝炎ウイルス(HAV)	ヒト	RNA	-	-

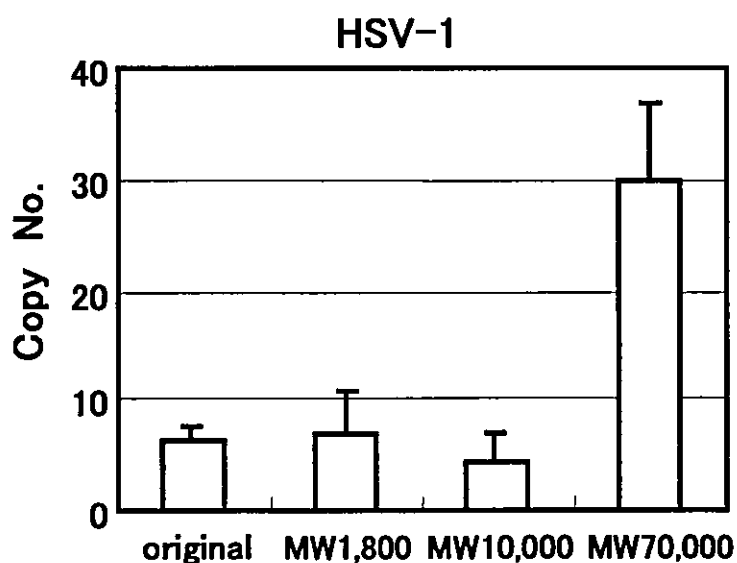


図1 ポリエチレンイミンの分子量とウイルス濃縮効率

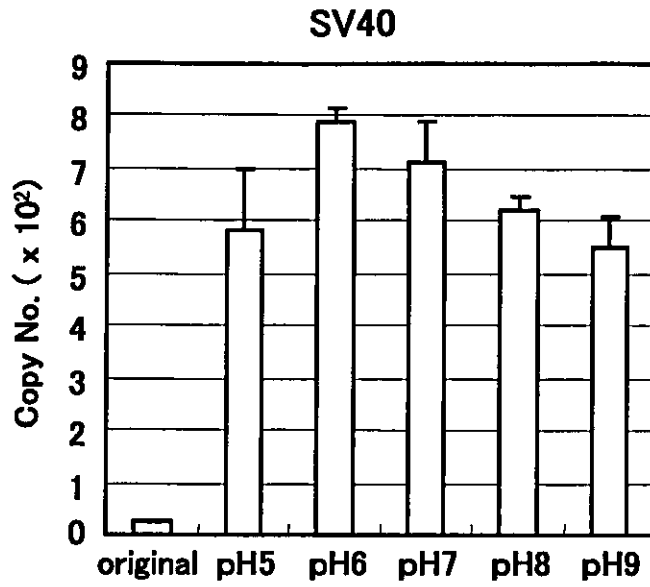


図2. PEI 磁気ビーズによるウイルス濃縮効率の pH による変化

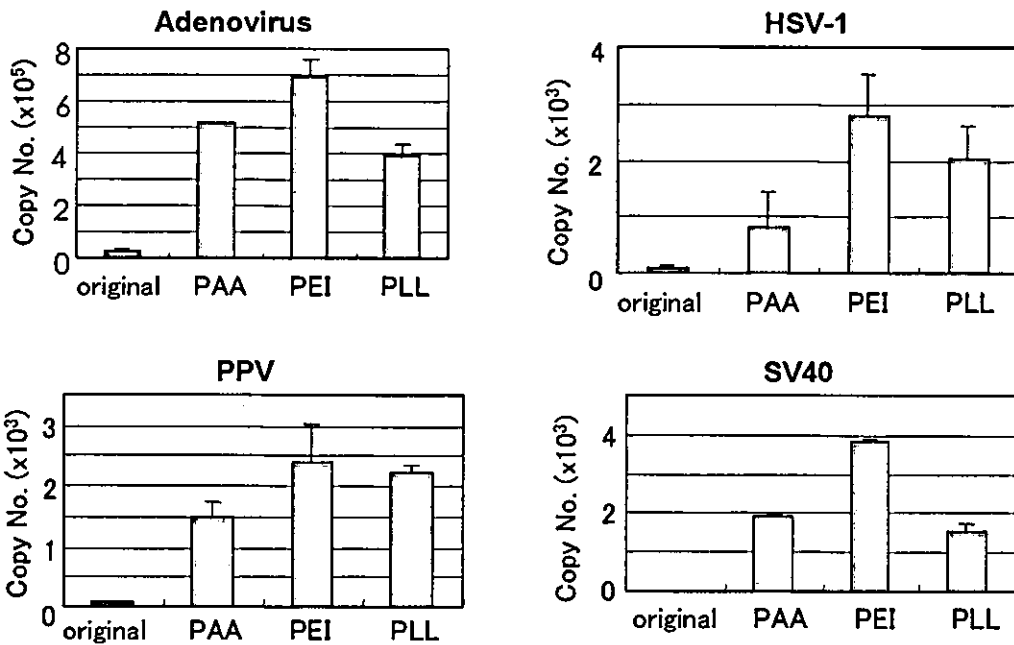


図3. 磁性粒子に結合するカチオン性ポリマーの違いによるウイルス濃縮効率の変化

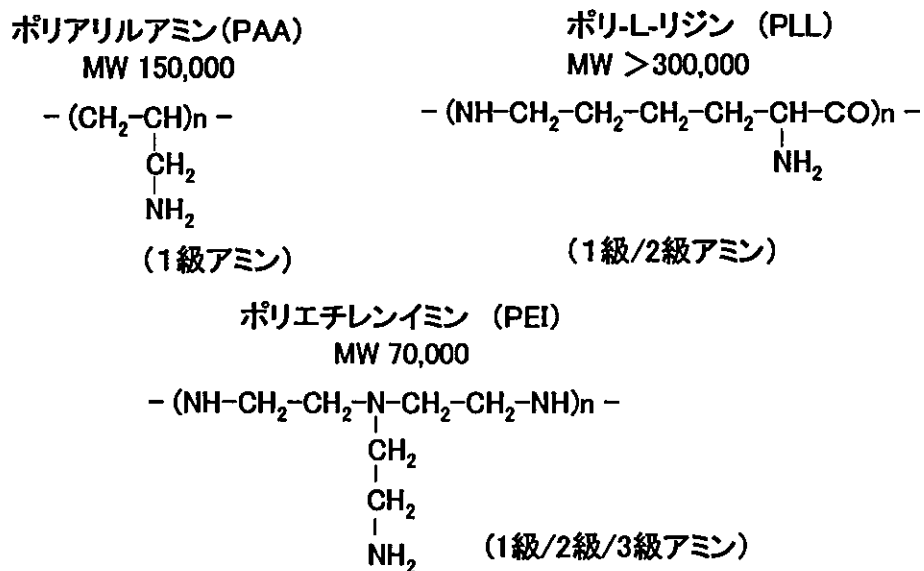


図4. ウイルス濃縮に用いたカチオン性ポリマーの構造式

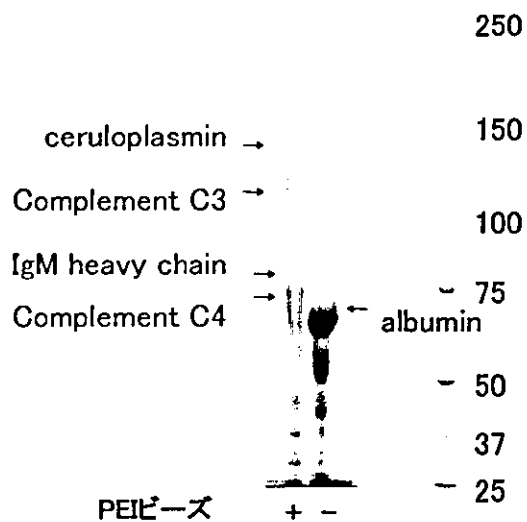
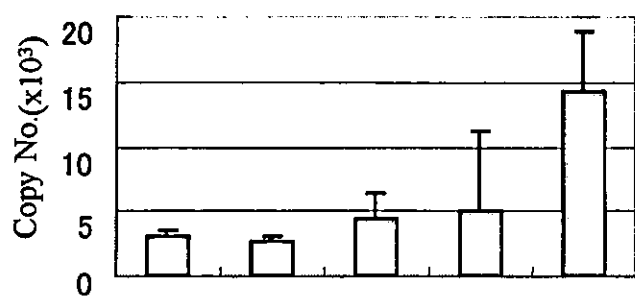
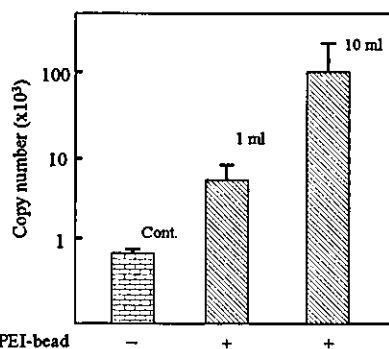


図5. PEI磁気ビーズにウイルスとともに濃縮される血清成分中の蛋白質のMS/MSによる同定



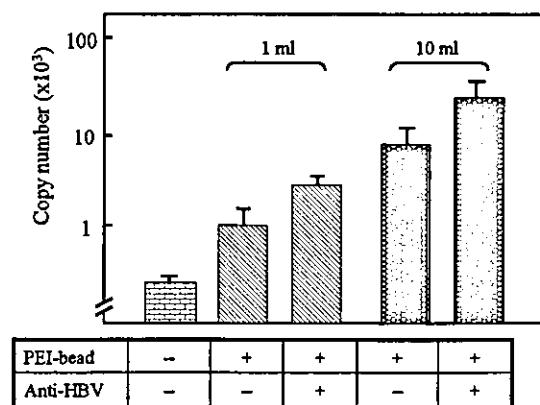
PEI-beads	-	+	+	+	+
Anti Poliovirus MoAb	-	-	+	-	+
Anti mouse Ig GP IgM	-	-	-	+	+

図6. 抗体存在下での PEI 磁気ビーズによるポリオウイルスの濃縮



PEI-bead

図7. PEI 磁気ビーズによる HCV の濃縮



PEI-bead	-	+	+	+	+
Anti-HBV	-	-	+	-	+

図8. PEI 磁気ビーズによる HBV の濃縮と抗 HBV 抗体の影響

表 3. アレイ上のサイトカインの位置と名称

position	cytokines	
1A	Pos	positive control
1B	Pos	positive control
1C	Pos	positive control
1D	Pos	positive control
1E	Neg	negative control
1F	Neg	negative control
1G	ENA-78	Epithelial neutrophil-activating protein 78
1H	GCSF	Granulocyte-colony stimulating factor
1I	GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony stimulating factor
1J	GRO	Growth Related Oncogene
1K	GRO- $\alpha$	Growth Related Oncogene-Alpha
2A	I-309	I-309
2B	IL-1 $\alpha$	Interleukin 1 Alpha
2C	IL-1 $\beta$	Interleukin 1 Beta
2D	IL-2	Interleukin 2
2E	IL-3	Interleukin 3
2F	IL-4	Interleukin 4
2G	IL-5	Interleukin 5
2H	IL-6	Interleukin 6
2I	IL-7	Interleukin 7
2J	IL-8	Interleukin 8
2K	IL-10	Interleukin 10
3A	IL-12	Interleukin 12
3B	IL-13	Interleukin 13
3C	IL-15	Interleukin 15
3D	IFN- $\gamma$	Interferon gamma
3E	MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein 1
3F	MCP-2	Monocyte Chemoattractant Protein 2
3G	MCP-3	Monocyte Chemoattractant Protein 3
3H	MCSF	Macrophage-colony Stimulating Factor
3I	MDC	Macrophage-derived Chemokine
3J	MIG	Monokine induced by gamma interferon
3K	MIP-1 $\beta$	Macrophage Inflammatory Protein 1 Beta
4A	MIP-1 $\delta$	Macrophage Inflammatory Protein 1 Delta
4B	RANTES	regulated upon activation, normal T-cell expressed, and presumably

		secreted
4C	SCF	Stem Cell Factor
4D	SDF-1	Stromal cell-derived factor
4E	TARC	Thymus and Activation-Regulated Chemokine
4F	TGF- $\beta$ 1	Transforming growth factor-beta 1
4G	TNF- $\alpha$	Tumor necrosis factor-alpha
4H	TNF- $\beta$	Tumor necrosis factor-beta
4I	EGF	Epidermal growth factor
4J	IGF-I	Insulin-like growth factor-1
4K	Ang	Angiogenin
5A	OSM	Oncostatin M
5B	TPO	Thrombopoietin
5C	VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
5D	PDGF-B	Platelet-derived Growth Factor-B
5E	Leptin	Leptin
5F	BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
5G	BLC	B-lymphocyte chemoattractant
5H	Ck $\beta$ 8-1	Chemokine-beta-8
5I	Eotaxin	Eotaxin
5J	Eotaxin-2	MPIF-2 (Myeloid progenitor inhibitory factor-2)
5K	Eotaxin-3	MIP-4-alpha (macrophage inflammatory protein-4-alpha)
6A	FGF-4	Fibroblast growth factor-4
6B	FGF-6	Fibroblast growth factor-6
6C	FGF-7	Fibroblast growth factor-7
6D	FGF-9	Fibroblast growth factor-9
6E	Flt-3 Ligand	fms-like tyrosine kinase-3 ligand
6F	Fractalkine	Fractalkine
6G	GCP-2	Granulocyte Chemotactic Protein-2
6H	GDNF	Glial-derived Neurotrophic Factor
6I	HGF	hepatocyte growth factor
6J	IGFBP-1	Insulin-like growth factor binding proteins-1
6K	IGFBP-2	Insulin-like growth factor binding proteins-2
7A	IGFBP-3	Insulin-like growth factor binding proteins-3
7B	IGFBP-4	Insulin-like growth factor binding proteins-4
7C	IL-16	Interleukin 16
7D	IP-10	Interferon gamma inducible protein-10
7E	LIF	Leukemia Inhibitory Factor

7F	LIGHT	LIGHT
7G	MCP-4	Monocyte Chemoattractant Protein 4
7H	MIF	mesoderm inducing factor
7I	MIP-3 $\alpha$	Macrophage Inflammatory Protein-3 alpha
7J	NAP-2	Neutrophil Activating Peptide 2
7K	NT-3	neurotrophin-3
8A	NT-4	neurotrophin-4
8B	Osteoprotegerin	Osteoprotegerin
8C	PARC	Pulmonary and Activation-Regulated Chemokine
8D	PIGF	Placenta growth factor
8E	TGF- $\beta$ 2	Transforming growth factor-beta 2
8F	TGF- $\beta$ 3	Transforming growth factor-beta 3
8G	TIMP-1	tussue inhibitor of metalloproteinases-1
8H	TIMP-2	tussue inhibitor of metalloproteinases-2
8I	Neg	negative control
8J	Pos	positive control
8K	Pos	positive control



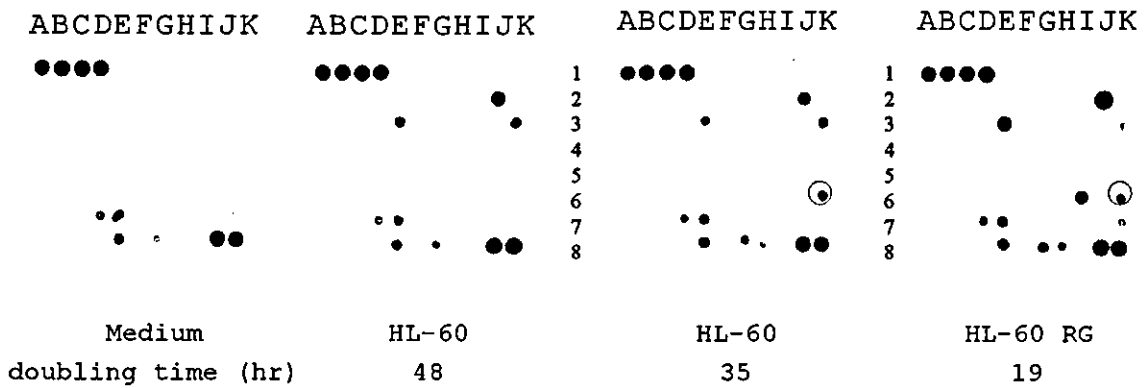


図9. HL-60 と HL-60RG の培養上清のサイトカインアレイによる解析

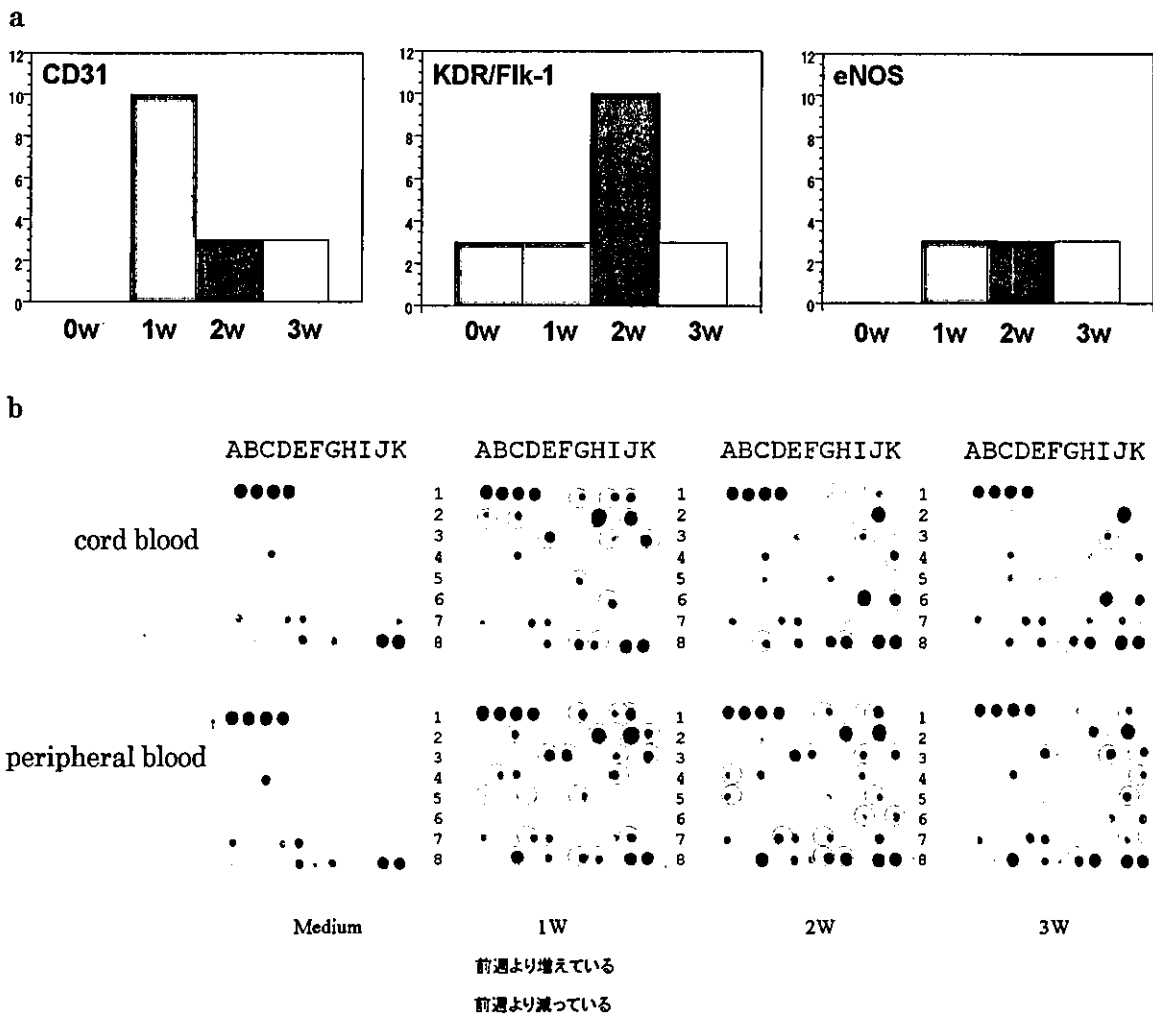
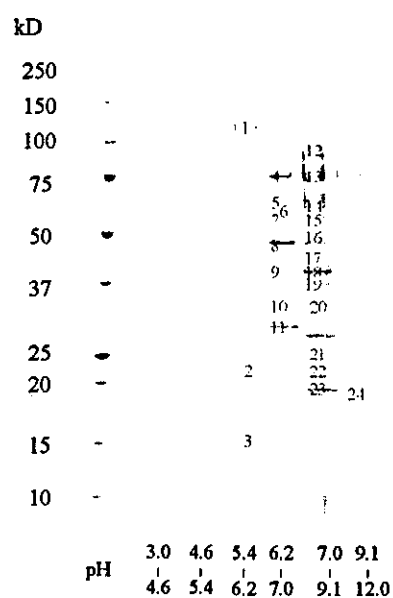


図10. 臍帯血、末梢血由来の AC133 陽性細胞の培養上清のサイトカインアレイによる解析

表4. ELISAによるHL-60細胞及びHL-60RG細胞の産生する各種サイトカインの定量

	IL-2	IL-4	IL-5	IL-6 (pg/ml)	IL-8 (pg/ml)	IL-10	HGF (pg/ml)	VEGF (pg/ml)	TNF- $\alpha$	IFN- $\gamma$	M-CSF	GM- CSF
HL-60RG細胞	ND	ND	ND	15.8 $\pm$ 3.2	139 $\pm$ 30	ND	4560 $\pm$ 672	389 $\pm$ 26	ND	ND	ND	ND
HL-60細胞	ND	ND	ND	ND	286 $\pm$ 12	ND	ND	185 $\pm$ 6	ND	ND	ND	ND



1	Calsyntenin-1	13	myeloperoxidase
2	AP endonuclease 1	14	myeloperoxidase, chain c
3	translation initiation factor eIF-5A	15	Protein disulfide-isomerase A3
4	moesin	16	NCL protein
5	ezrin	17	phosphoglycerate kinase
6	coronin 1A	18	fructose-bisphosphate aldolase A
7	Protein disulfide-isomerase A3	19	BC002338
8	PA2G4 protein	20	Myeloblastin *
9	Azurocidin *	21	CTCL tumor antigen HD-CL-08
10	Actin-related protein 2/3 complex subunit 2	22	Elongation factor 1-alpha 2
11	High mobility group protein 1	23	cyclophilin b, chain A
12	myeloperoxidase, splice form H17	24	peptidylprolyl isomerase B

図 1 1. 無担体等電点電気泳動/SDS-PAGE による細胞由来タンパク質の分離と同定

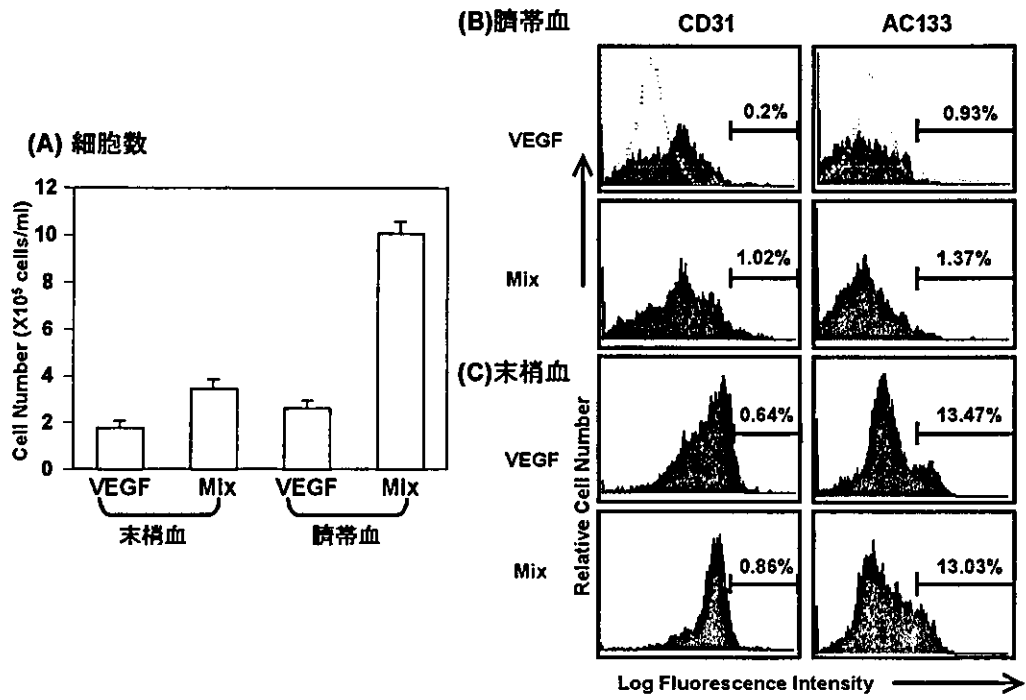


図 1 2. AC133 陽性細胞を SCF や TPO 存在下で培養した時に一週間後に出現する CD31 強陽性細胞と AC133 陽性細胞

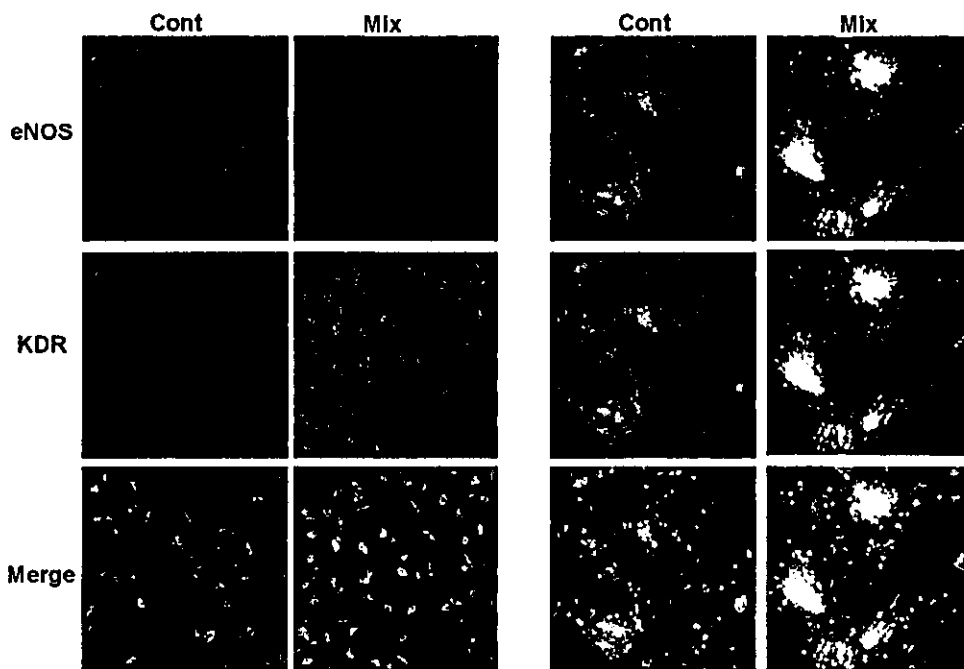


図 1 3. AC133 陽性細胞を SCF や TPO 存在下に培養した時に出現してくる接着細胞

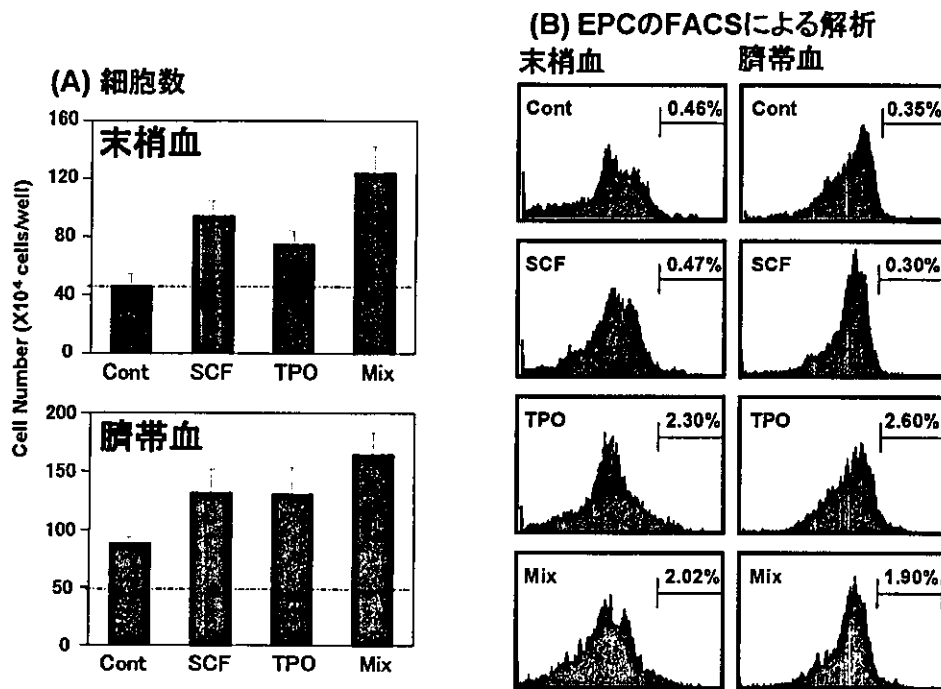


図 1 4. AC133 陽性細胞を SCF や TPO 存在下に培養した時の細胞増殖と出現してくる CD31 強陽性細胞の比率

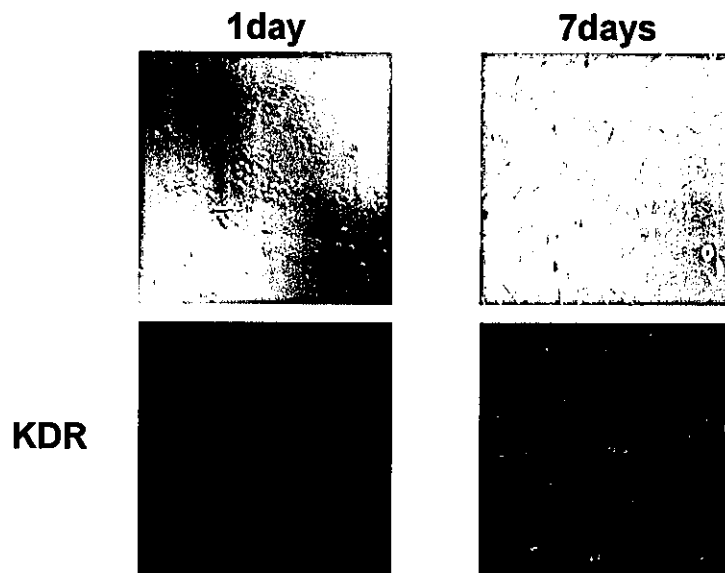


図 1 5. ファイブロネクチン上で培養した末梢血由来血管内皮前駆細胞の KDR 発現の変化

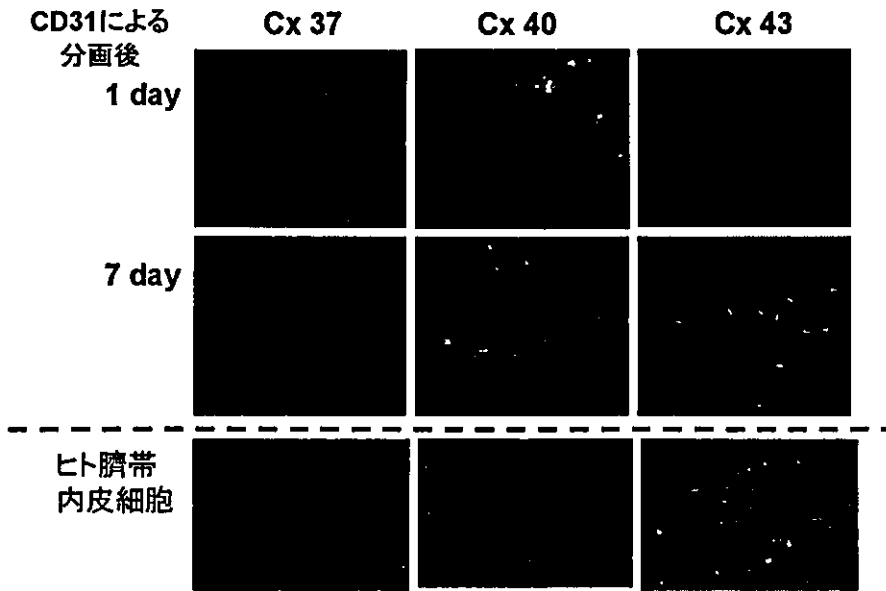


図 16. 末梢血由来血管内皮前駆細胞の培養 1 日目と 7 日目における Cx37、Cx40、Cx43 の発現

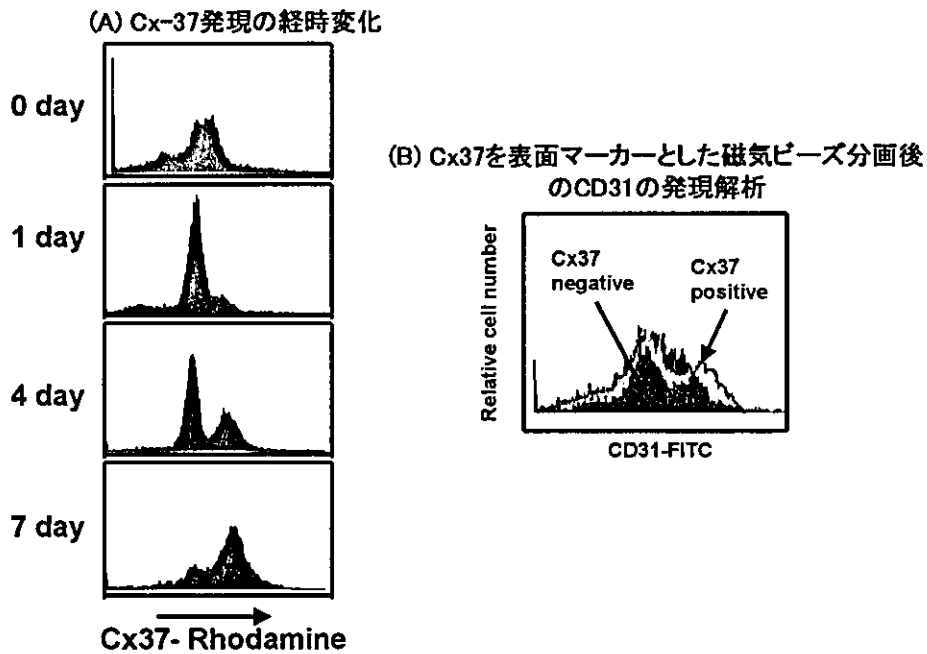


図 17. 末梢血由来 AC133 陽性細胞における Cx37 発現の経時変化と Cx37 を表面マーカーとした磁気ビーズ分画後の CD31 発現解析

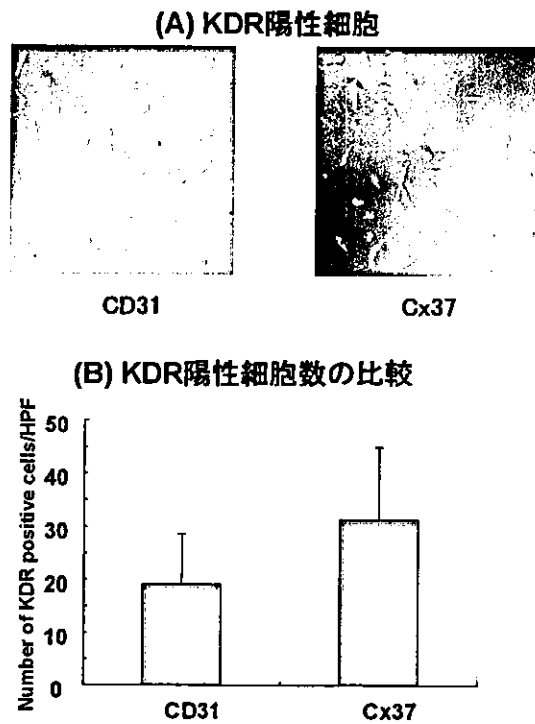


図18. AC133由来CD31及びCx37陽性細胞を培養した時のKDR陽性接着細胞

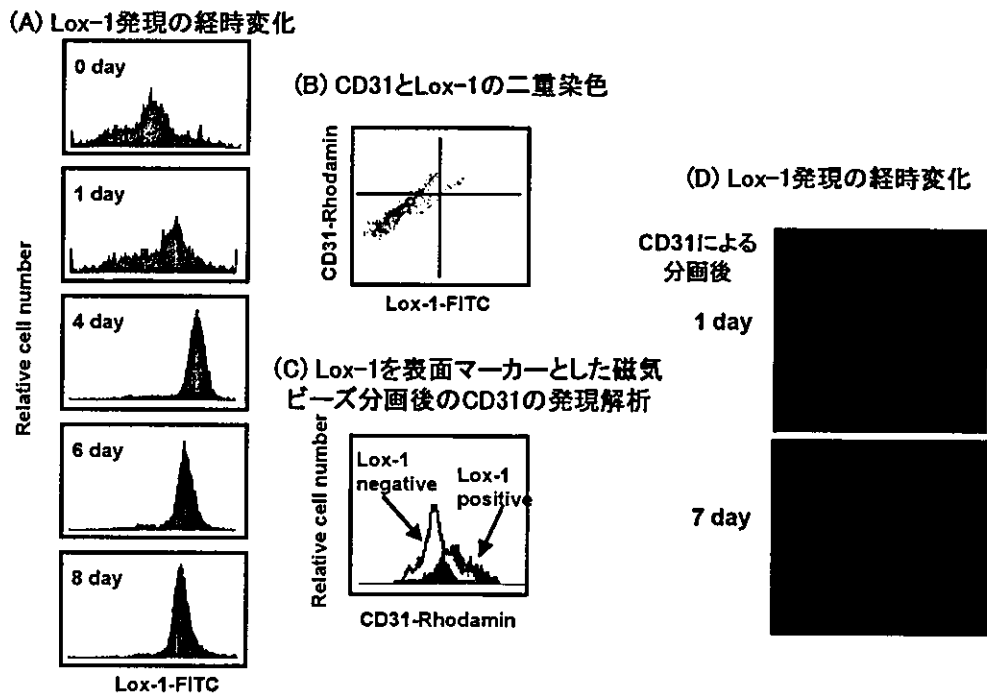


図19. 臍帯血AC133陽性細胞を培養したときのLox-1発現の経時変化とLox-1陽性細胞を磁気ビーズ分画後のCD31の発現解析

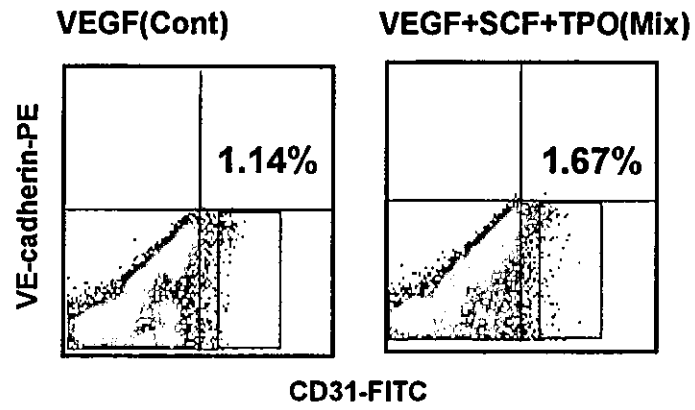


図 20. EPC の CD31 と VE-cadherin の二重染色



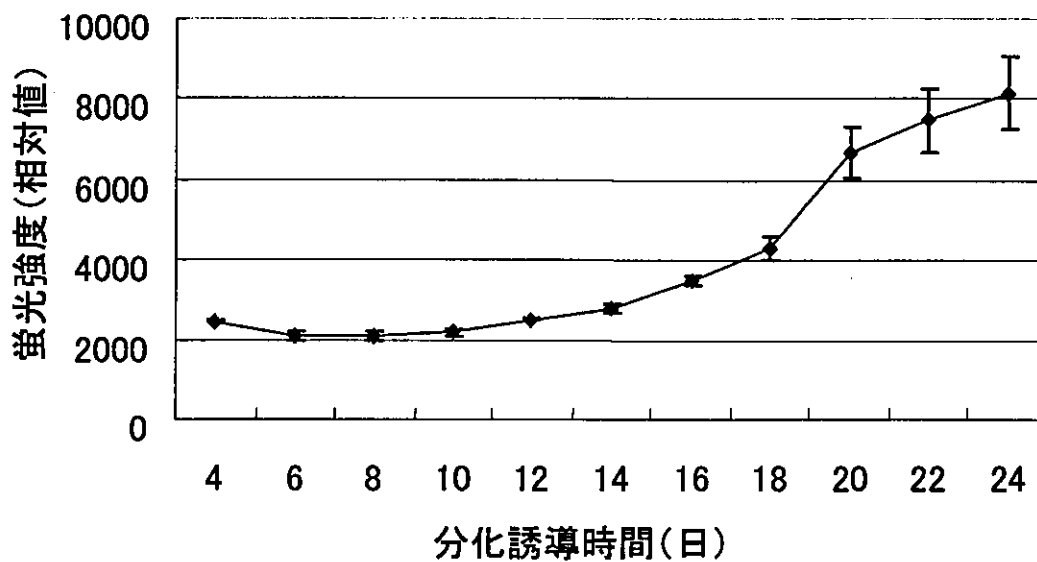
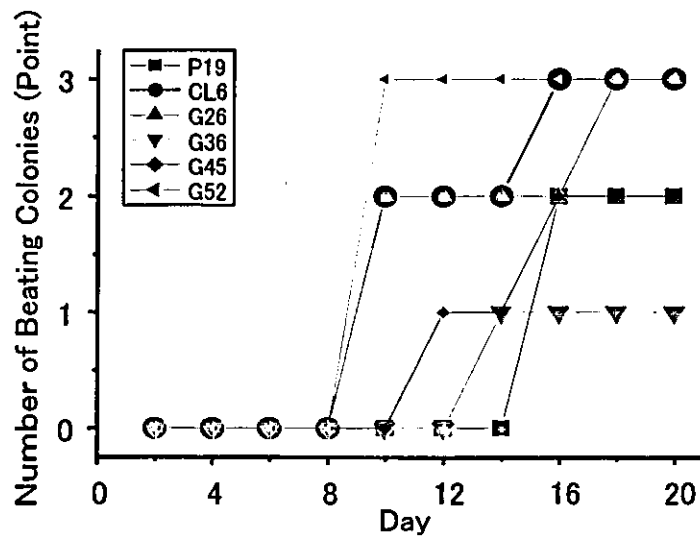


図21. CL6G52株の蛍光強度の時間変化

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 $\alpha$ 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

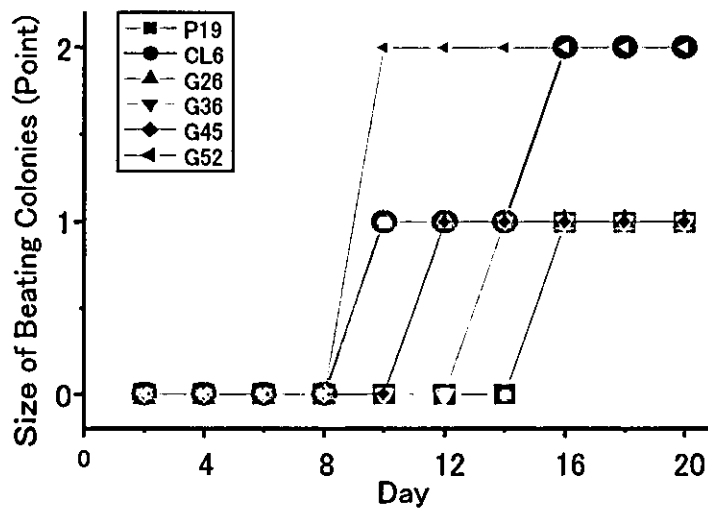


図22. P19由来細胞株の心筋細胞分化の定性的時間経過

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 $\alpha$ 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。

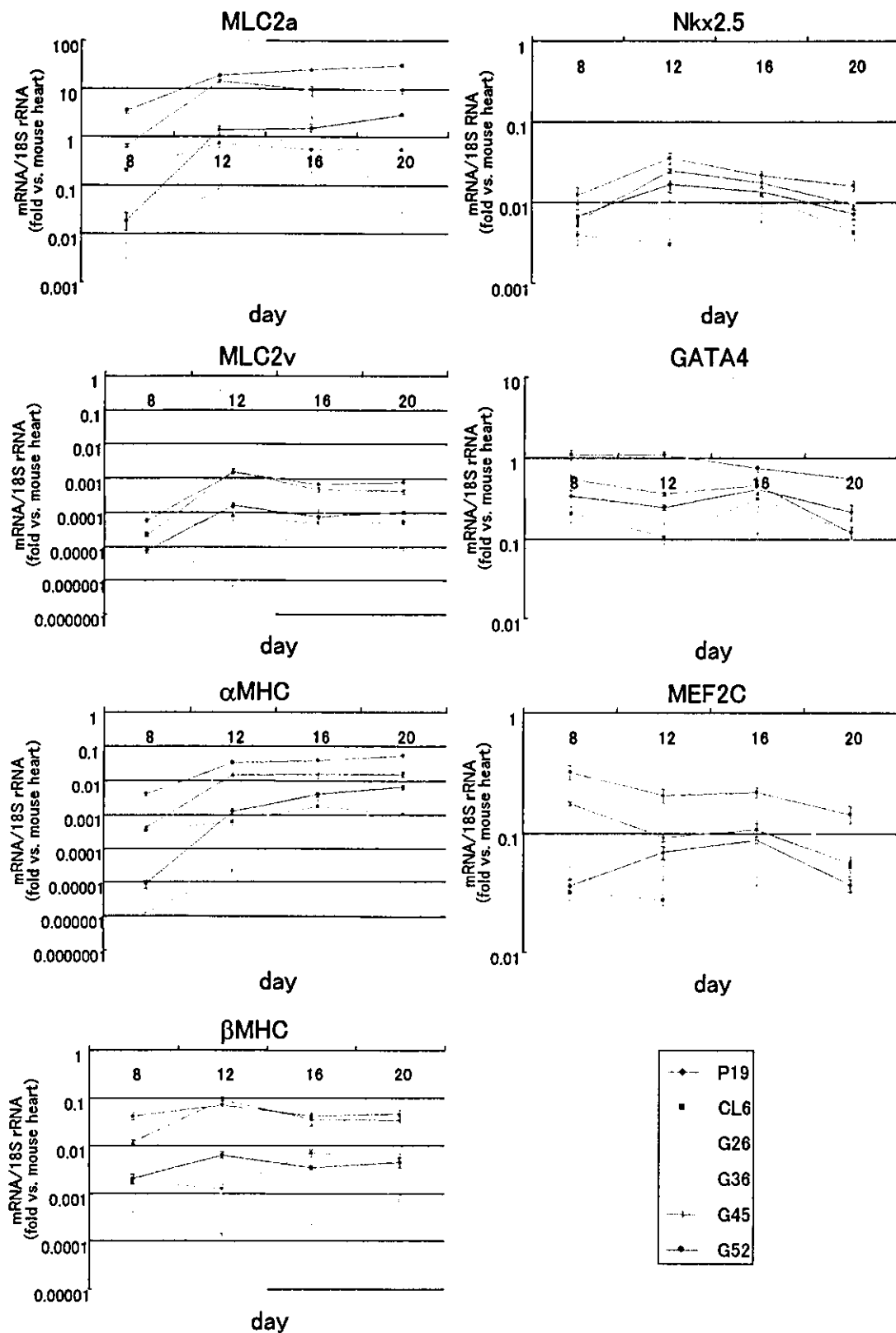
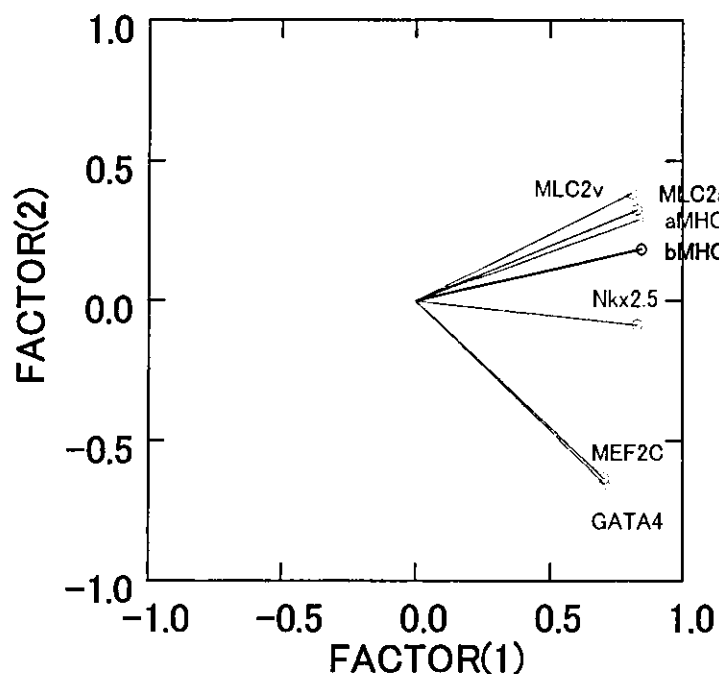


図23. P19由来細胞株における心筋細胞マーカー遺伝子の発現の時間経過  
 サブコンフルエントのP19由来細胞株をトリプシン-EDTA処理により分散した後、1% DMSOを含むMEM $\alpha$ 溶液中で培養して心筋細胞分化を誘導した。分化誘導開始から8, 12, 16, 20日目にtotal RNAを回収し、心筋細胞マーカー遺伝子の発現をリアルタイムRT-PCRで定量した。縦軸はmRNA/18S rRNAの値を成体マウス心筋と比較した場合の相対値。値は平均値 $\pm$ S.E.M. (n=6)で示す。

### A. Factor Loadings Plot



### B. Scree Plot

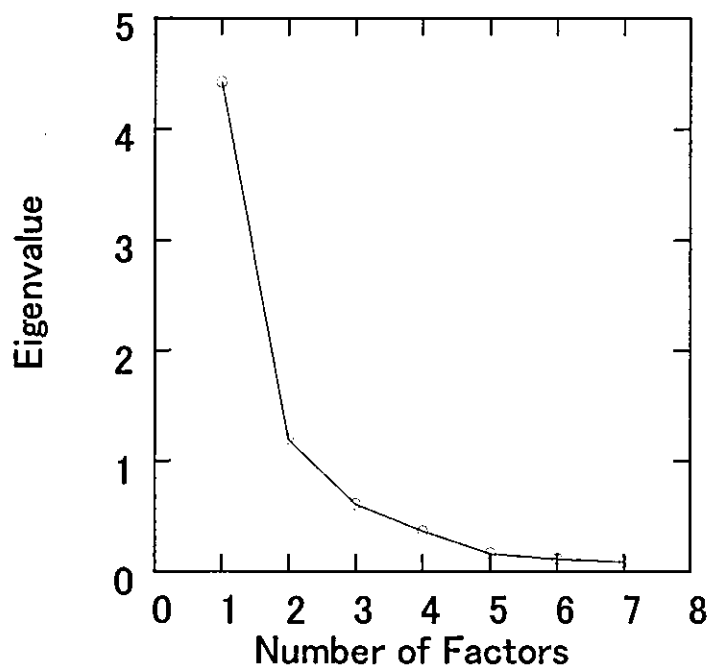


図24. P19由来細胞株の心筋細胞マーカー遺伝子の主成分分析

1% DMSOを含むMEM  $\alpha$  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。