

Fig. 99 EPC誘導に対する血小板の影響

透過性メンブレン(ポアサイズ0.4 μm)

FN: Fibronectinコート
 PET: 通常のメンブレン
 HD: ポア 高密度

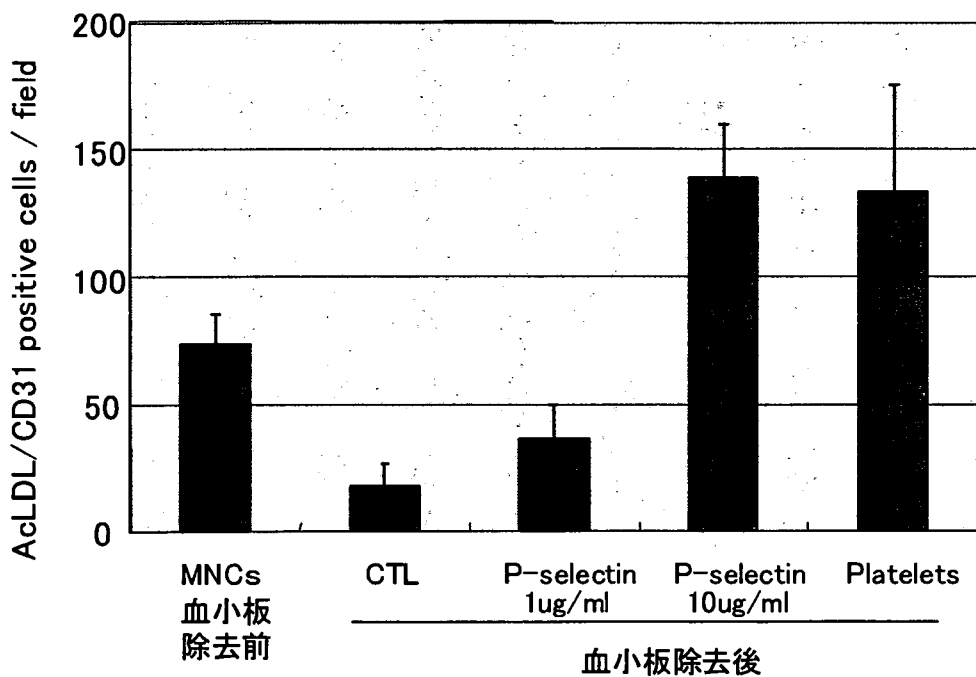


Fig. 100 EPC誘導に対する組換えP-selectin(可溶型)の効果

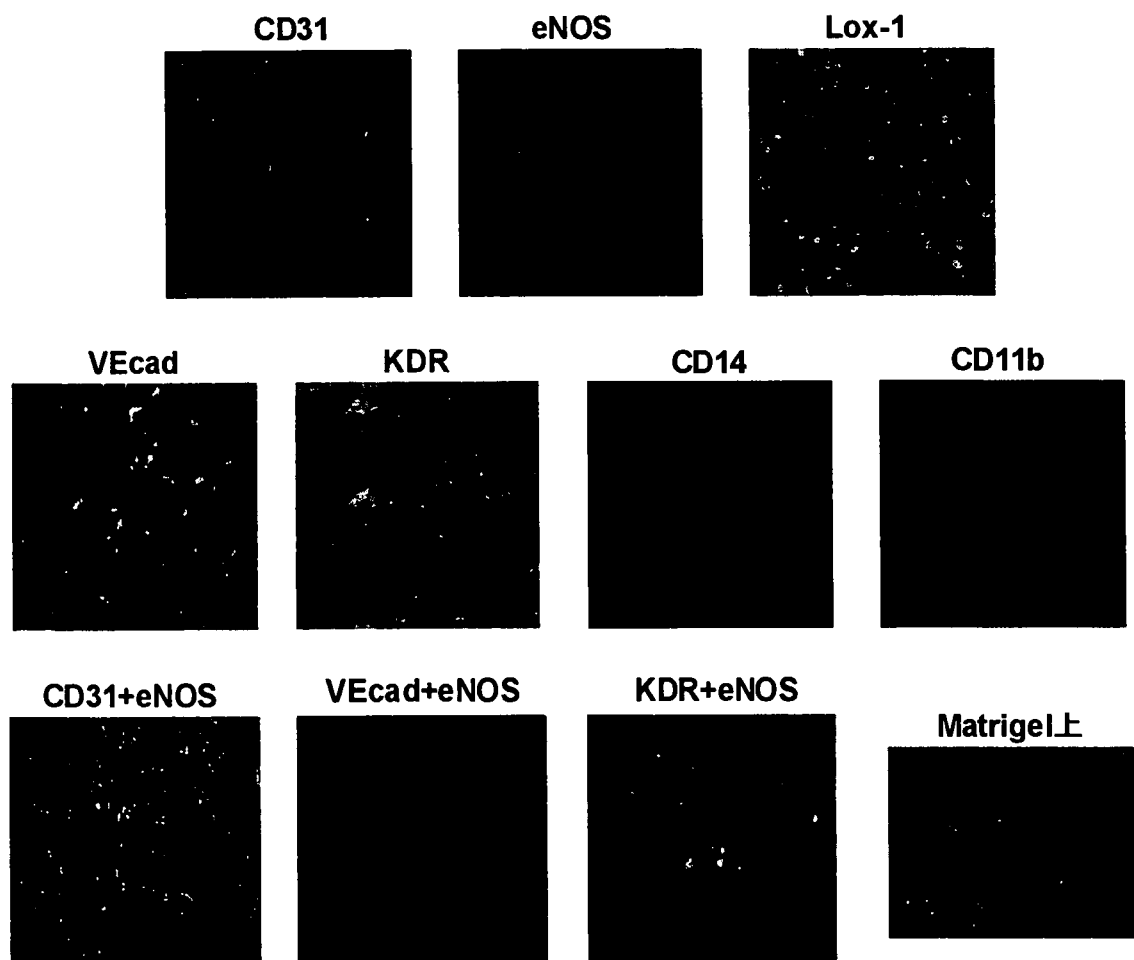


Fig. 101 臍帯血OECが血管内皮細胞である同定

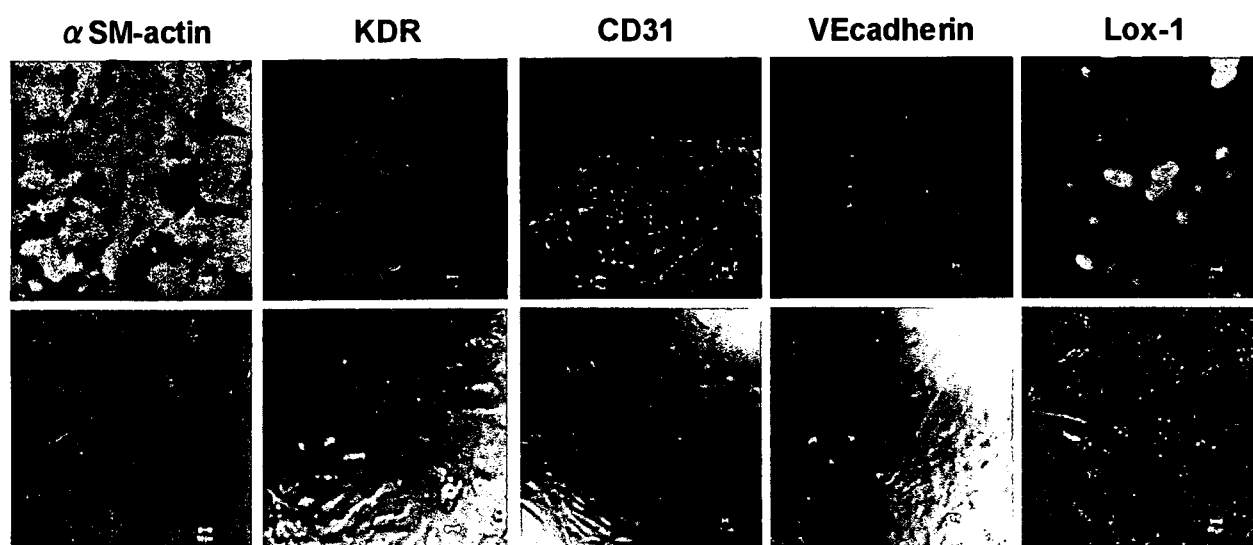
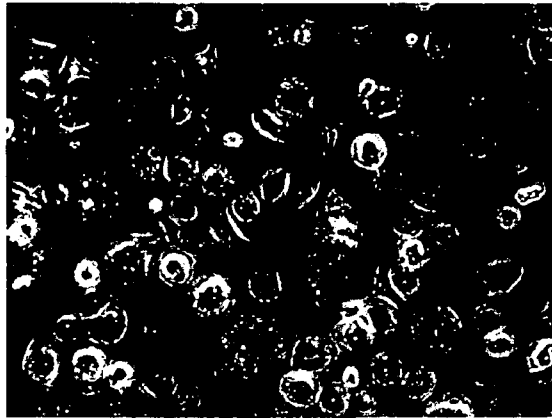
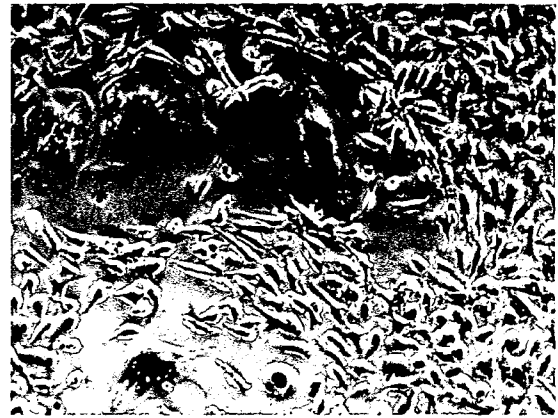


Fig. 102 臍帯血単核球由来OEC誘導条件下での培養時に出現した血管平滑筋細胞の同定



Oil Red O染色
(Adipocytes)



酒石酸耐性酸性ホスファターゼ活性染色
(Osteoclasts)

OECバッチ4
血小板を多量に添加したwell

Fig. 103 臍帯血単核球由来OEC誘導条件下での培養時に出現した
脂肪細胞および破骨細胞

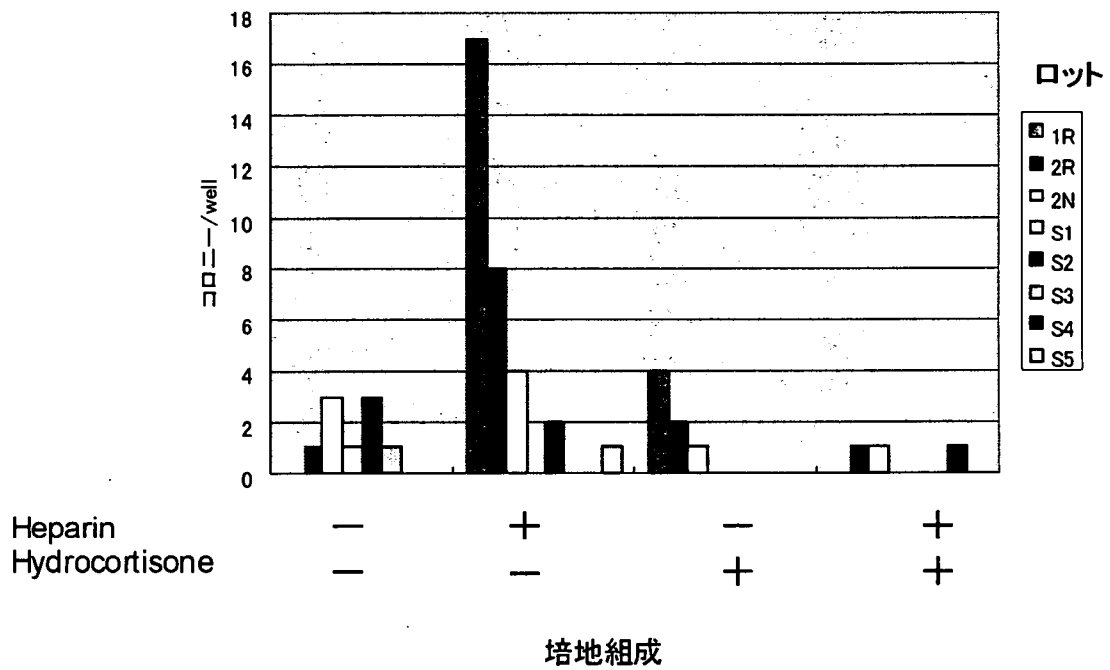


Fig. 104 OECコロニー出現に対するhydrocortisoneおよびheparinの影響

Table 13 分画した単核球から誘導されたOECコロニー数

		Exp. 1	Exp. 2	Exp.3	Exp.4	Exp.5	Exp. 6	Exp. 7
実験条件	Cord Blood	Frozen	Frozen	Frozen	Fresh	Frozen	Fresh	Frozen
	CD45・回収率	56%	34%	30%		28%	46.40%	30%
	HC添加 (day 7~)	-	-	-	-	+	+	+
OECコロニー数	MNC	1 12.5x10 ⁷	1 9.1x10 ⁷	0 6x10 ⁷	0 10x10 ⁷	63 6x10 ⁷	63 8x10 ⁷	2 6x10 ⁷
	CD45+	0 30x10 ⁷	0 23.9x10 ⁷	0 45x10 ⁷		0 30.6x10 ⁷	10 10x10 ⁷	0 24x10 ⁷
	CD45・		0 3.3x10 ⁷	0 2x10 ⁷		34 6x10 ⁷	127 13x10 ⁷	21 4x10 ⁷
	CD45・/CD34+		0 0.7x10 ⁷	0 0.55x10 ⁷		9 0.8x10 ⁷		5 3.25x10 ⁷
	CD45・/CD34・	0 6x10 ⁷	0 0.7x10 ⁷	5 1.4x10 ⁷		1 1.6x10 ⁷		3 0.84x10 ⁷

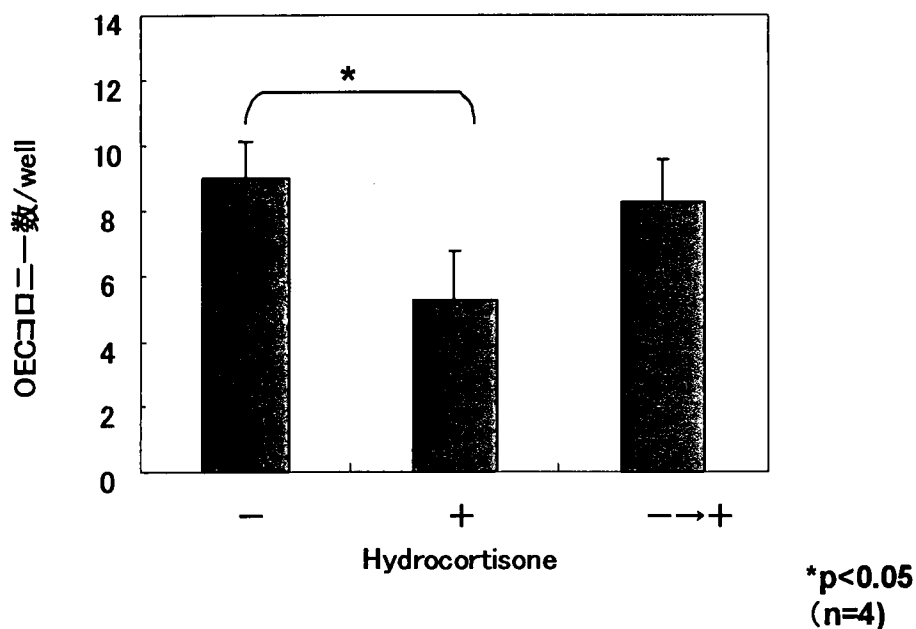


Fig. 105 Hydrocortisoneの添加とOECコロニー数の関連(単一ロットでの解析)

a)

2% FCS	拡大した ライン数	6cm dish まで拡大	10cm dishまで まで拡大	10cm dish で継代	60日ぐらいまで さらに継代
		×	△	○	◎
バッチ1	3	2	1	0	0
バッチ2R	7	2	0	3	2
バッチ2N	5	0	3	2	0
バッチ3	5	4	0	0	1
バッチ4	3	2	1	0	0
バッチ5	2	1	1	0	0
計	25	11	6	5	3
割合	100.0	44.0	24.0	20.0	12.0

FCS濃度を10%に変更

b)

10% FCS	拡大した ライン数	6cm dish まで拡大	10cm dishまで まで拡大	10cm dish で継代	60日ぐらいまで さらに継代
		×	△	○	◎
S1~S5	6	1	0	0	5
割合	100.0	16.7	0.0	0.0	83.3

Fig. 106 OEC拡大の成功率

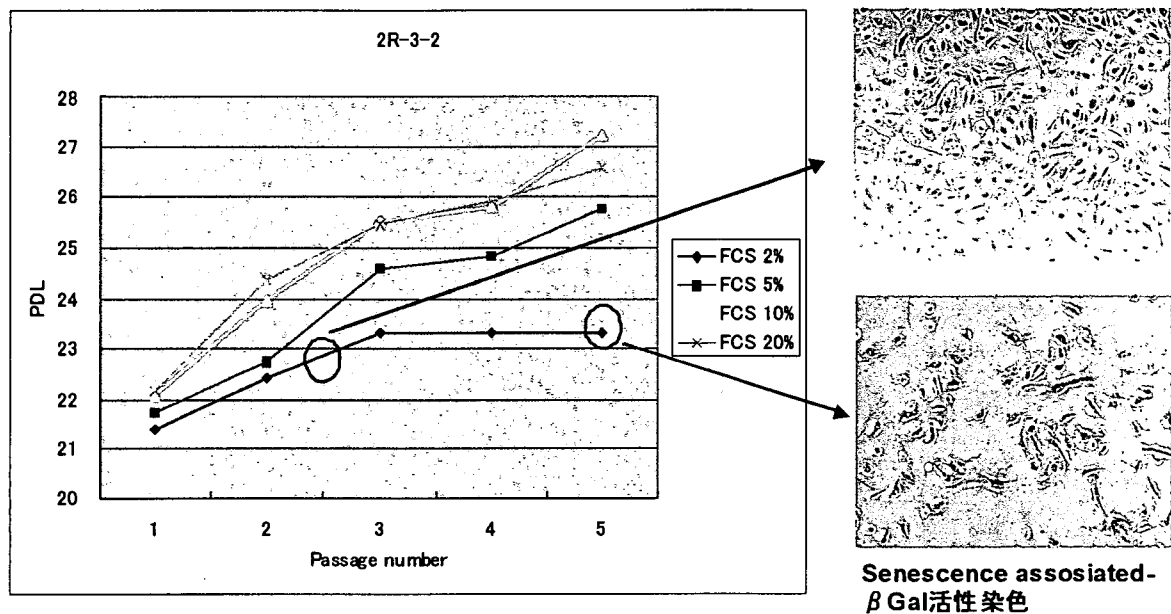
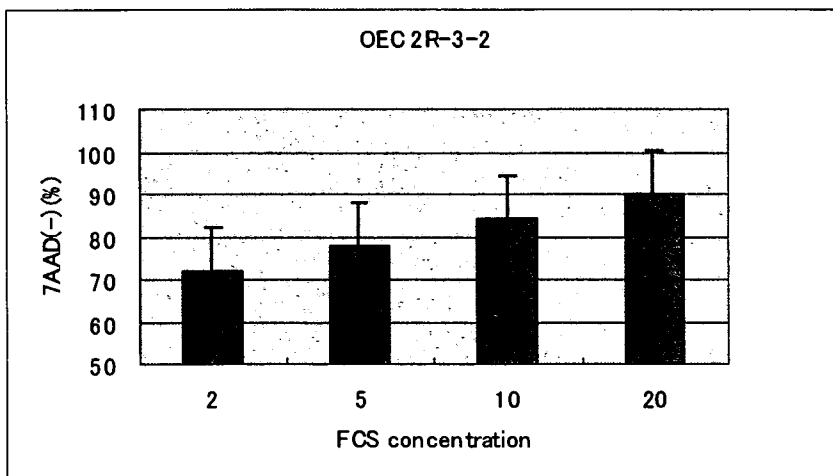
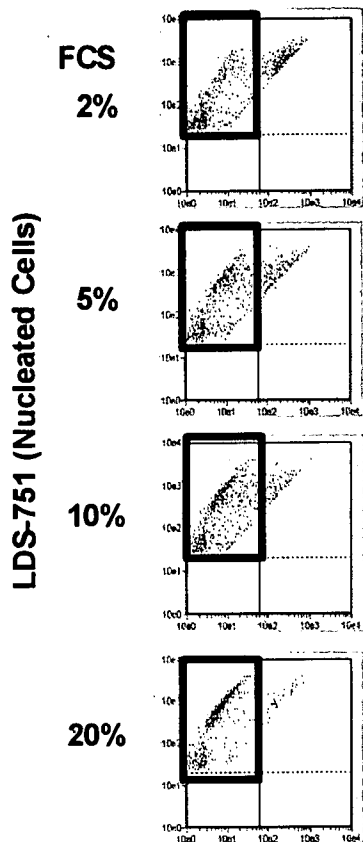


Fig. 107 OEC増殖に対する血清濃度の影響



FCS 濃度	P2 **	P3	P4	P5	P6	平均
2%	72	64.8	79.8			72
5%	76	74.7	82.6	80	84	78
10%	80.5	83.6	89.3	91.1	82.2	84
20%	84.7	94.9	90.5	86.5	93.3	90

7-AAD (Apoptotic cell)

** → Day46のOECストック起眠後のpassage number

Fig. 108 OECのviabilityに対する血清濃度の影響(7-AAD染色による評価)

維持培養中の
FCS濃度

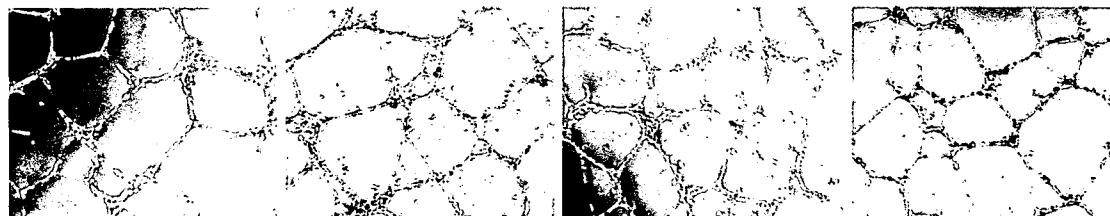
2%

5%

10%

20%

Matrigel



GFR-Matrigel

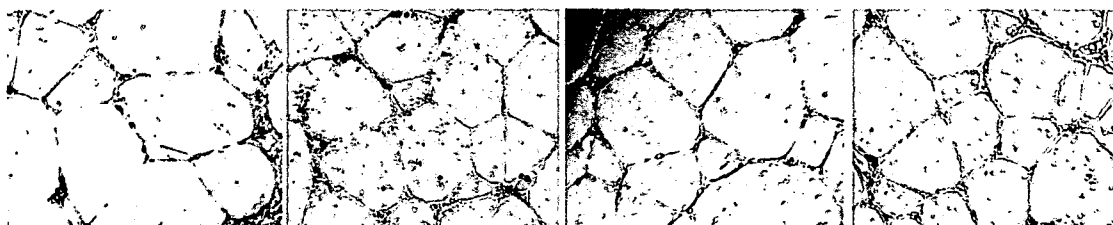


Fig. 109 OECの管腔形成能に対する培養中血清濃度の影響

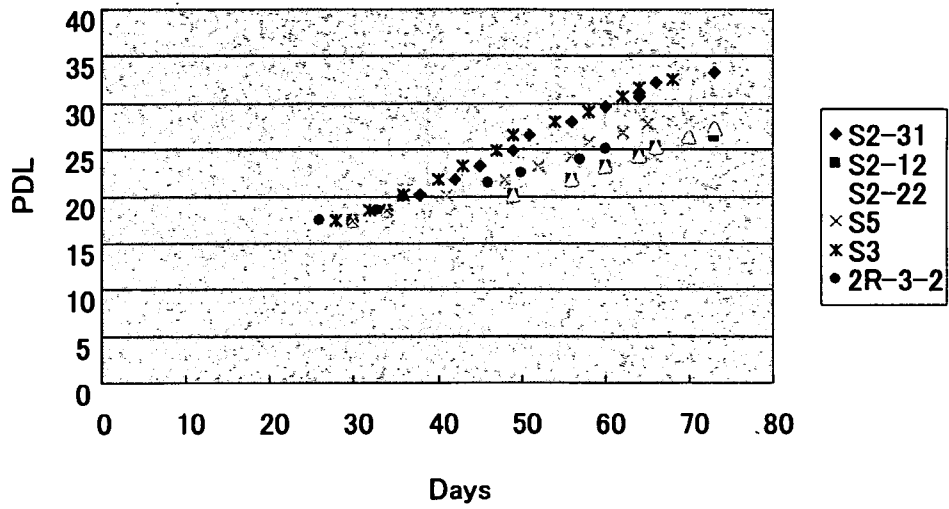


Fig.110 樹立したOEC株の増殖特性

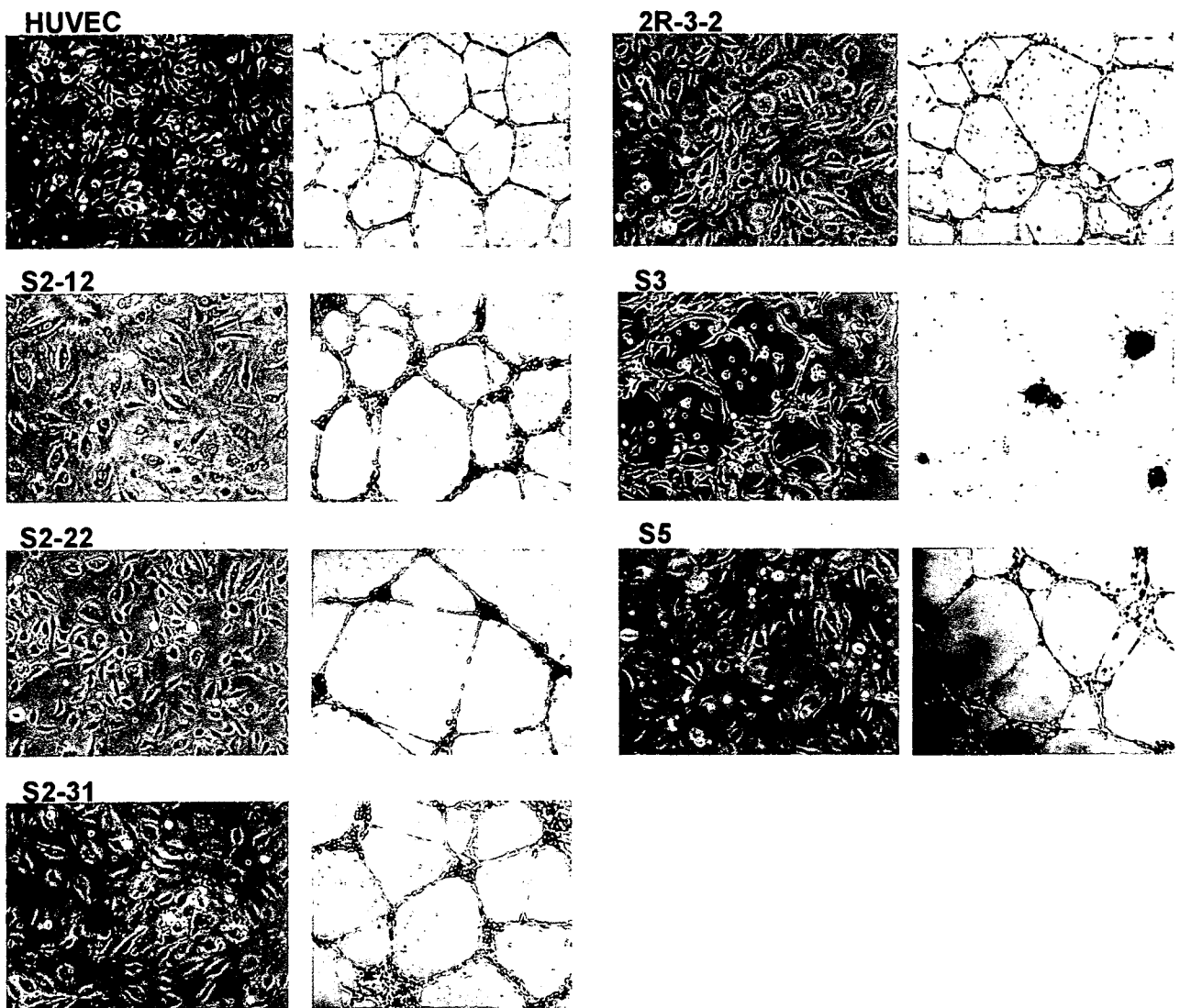


Fig.111 樹立したOEC株の形態とMatrigel上での管腔形成能

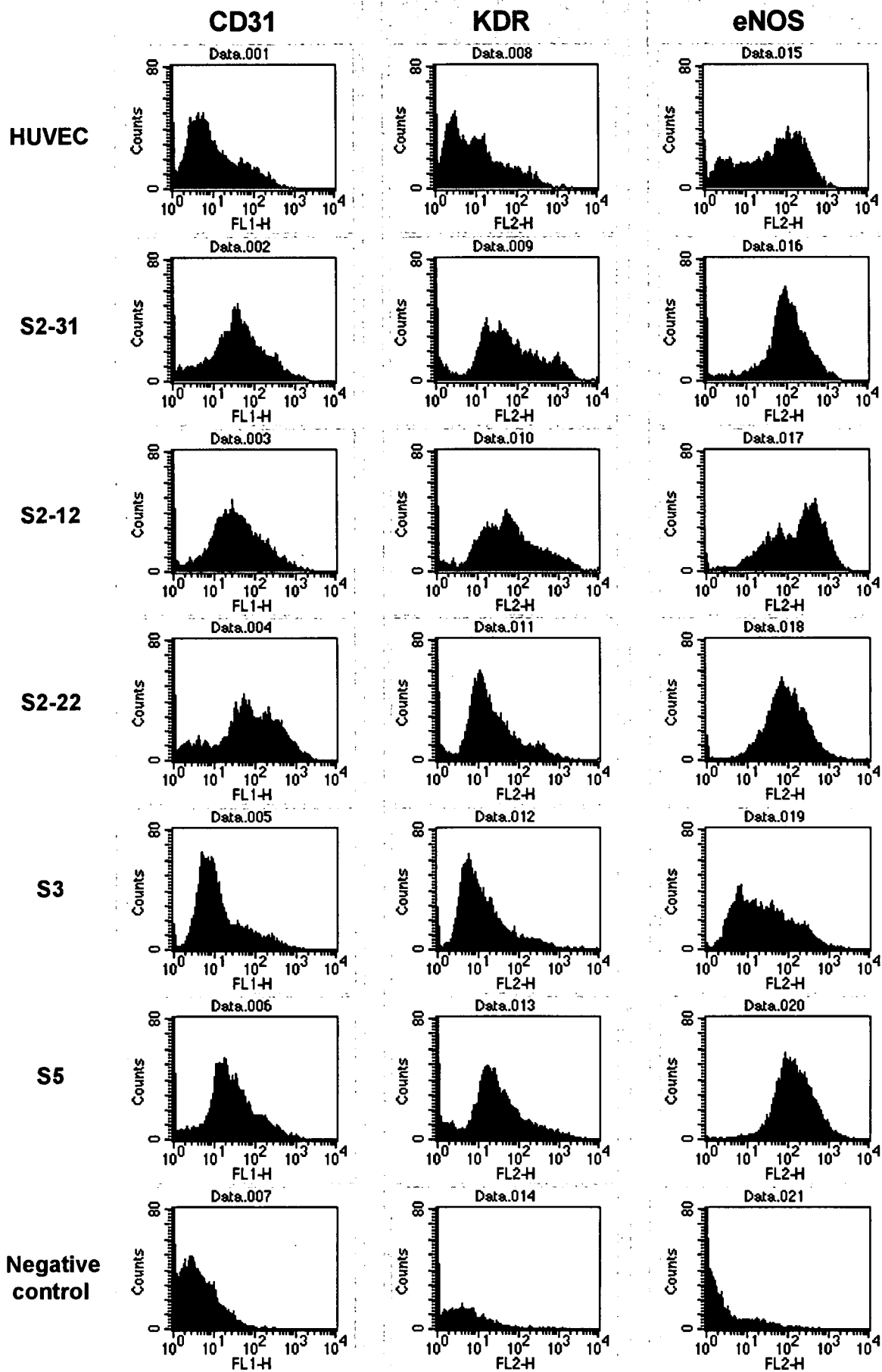


Fig. 112 樹立したOEC株における特性指標候補分子の発現

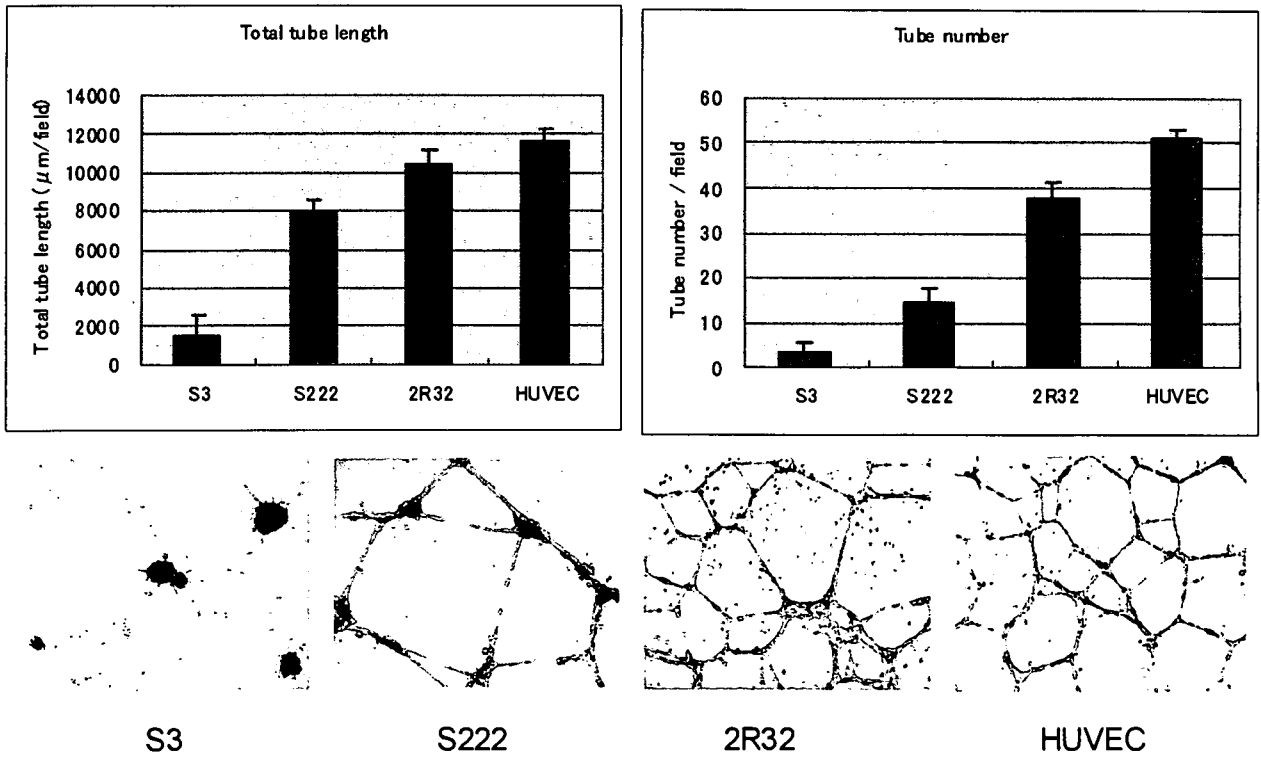


Fig. 113 特性指標の探索に用いたOEC3株およびHUVECの管腔形成能の定量評価

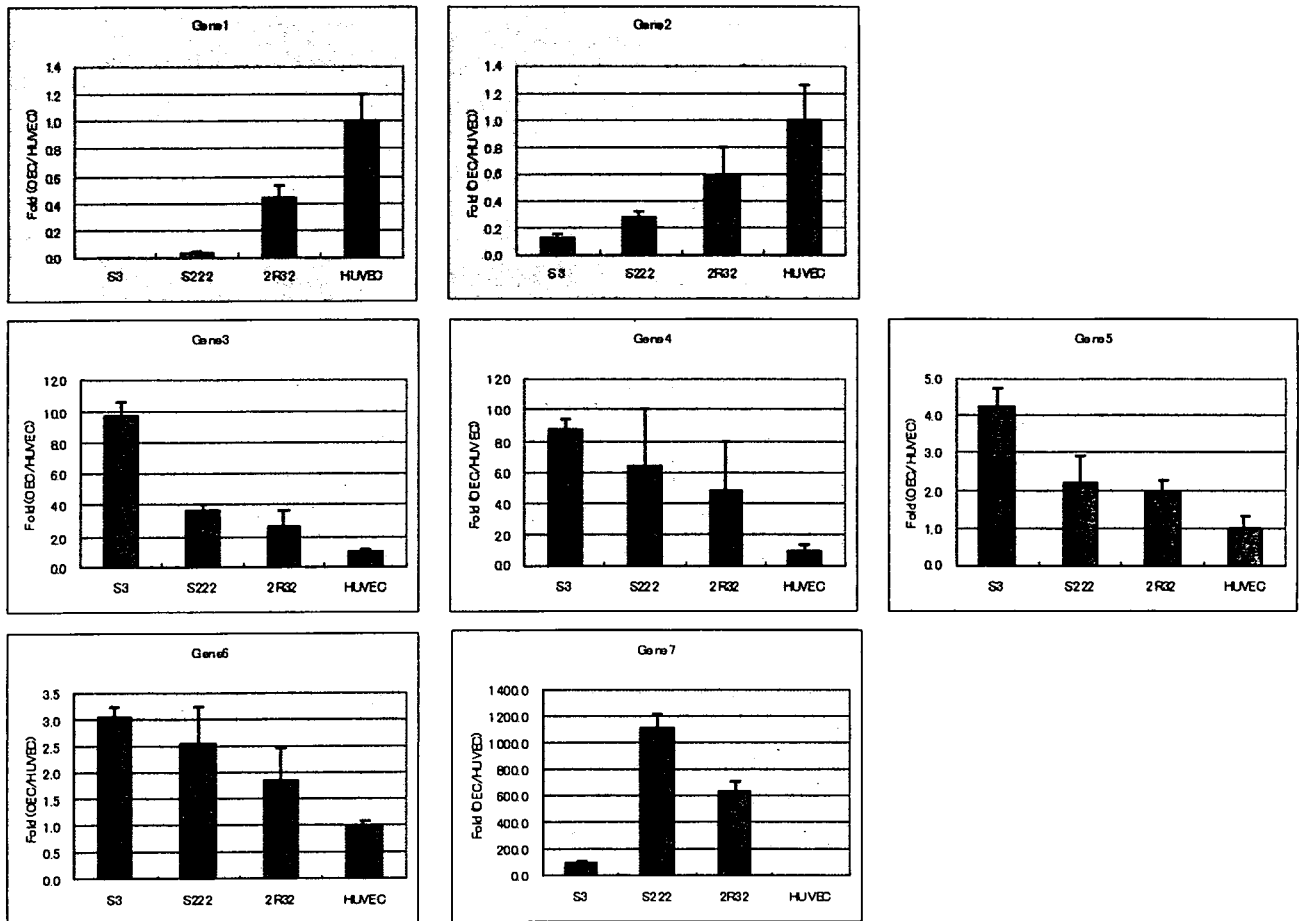
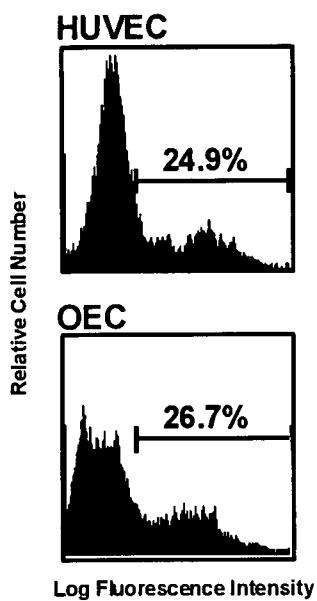


Fig. 114 特性指標候補と考えられる遺伝子の発現量の比較

a. IL-8受容体発現



b. IL-8による遊走促進

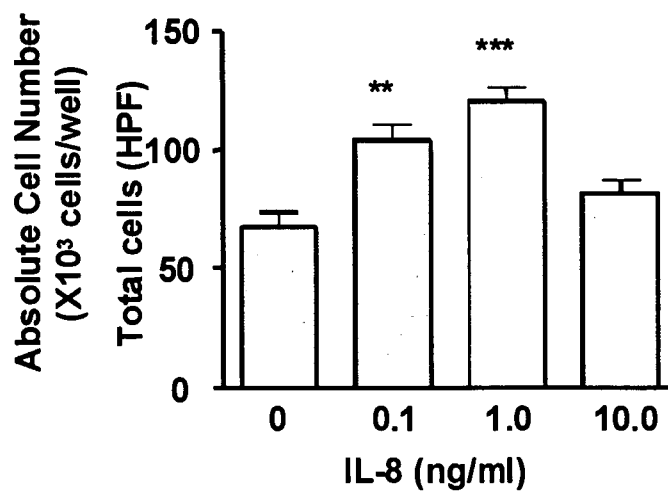


Fig. 115 臍帯血由来OECにおけるIL-8受容体発現とIL-8の遊走促進効果

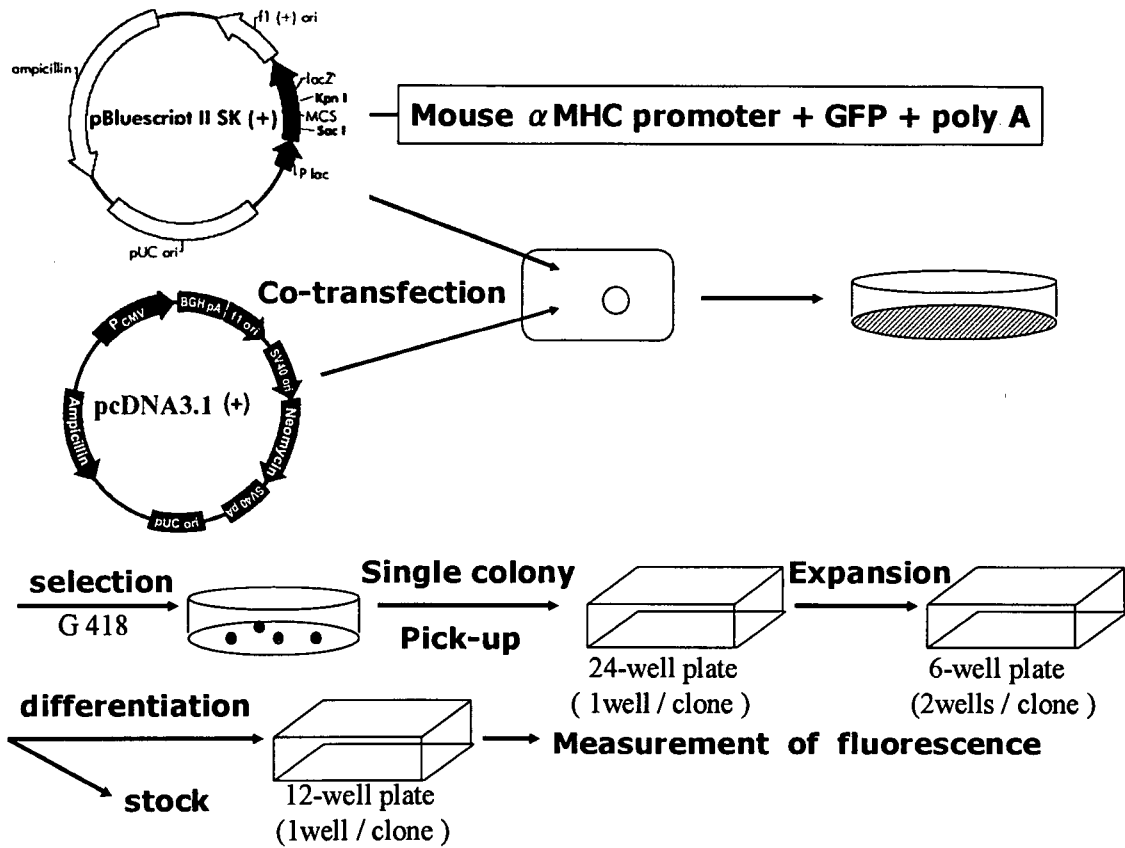


Fig.116 CL6 由来細胞株の作製

本研究で用いたCL6由来細胞株であるCL6G26、CL6G36、CL6G45、CL6G52は、以上のようにして作製されたものである。αMHC: alpha myosin heavy chain; GFP: green fluorescent protein; poly A: human growth hormone poly A signal; G418: Geneticine

Table 14 心筋細胞特異的マーカー遺伝子測定用のプライマーおよびプローブの配列

Gene	Name	Sequence
Nkx2.5	TaqMan probe mNkx2.5_T	TGCTGAAGCTCACGTCCACGCAG
	Forward primer mNkx2.5_F	CTTCAAGCAACAGCGGTACCT
	Reverse primer mNkx2.5_R	CGCTGTGCTTGCACCTTGTA
GATA4	TaqMan probe mGATA4_T	TGCATCTCCTGTCACTCAGACATCGCA
	Forward primer mGATA4_F	TGCTCTAAGCTGTCCCCACAA
	Reverse primer mGATA4_R	GTGATTATGTCCCCATGACTGTCA
MEF2C	TaqMan probe mMEF2C_T	CCAGTTACCATCCCAGTGTCCAGCCATAAC
	Forward primer mMEF2C_F	TCCACCTCCCAGCTTTGAGAT
	Reverse primer mMEF2C_R	TGACAGGATTGCTGTACACCAAAC
MLC2a	TaqMan probe mMLC2a_T	AAGGCCTTCAGCTGCATTGACCAGAAC
	Forward primer mMLC2a_F	AAGCCCAGATTCAGGATTCAAG
	Reverse primer mMLC2b_R	AGCTCTTCCTCCGGAACACTT
MLC2v	TaqMan probe mMLC2v_T	CATGGACCAGAACAGAGACGGCTTCA
	Forward primer mMLC2v_F	GGAGTTCAAGGAAGCCTTCACA
	Reverse primer mMLC2v_R	TGTGTCCCTTAGGTCATTCCTTGTC
α MHC	TaqMan probe m α MHC_T	TCTGCTGATACCGGTGACAGTGGTAAAGG
	Forward primer m α MHC_F	CATGGCTACACTCTTCTCTACCTATGC
	Reverse primer m α MHC_R	GGTGGAGAGCAGACACTGTTTG
β MHC	TaqMan probe m β MHC_T	ACCCCTACGATTATGCGTTCATCTCCCAA
	Forward primer m β MHC_F	TTTCTACCAAATCCTGTCTAATAAAAAGC
	Reverse primer m β MHC_R	GTCATCAATGGAGGCCACAGT

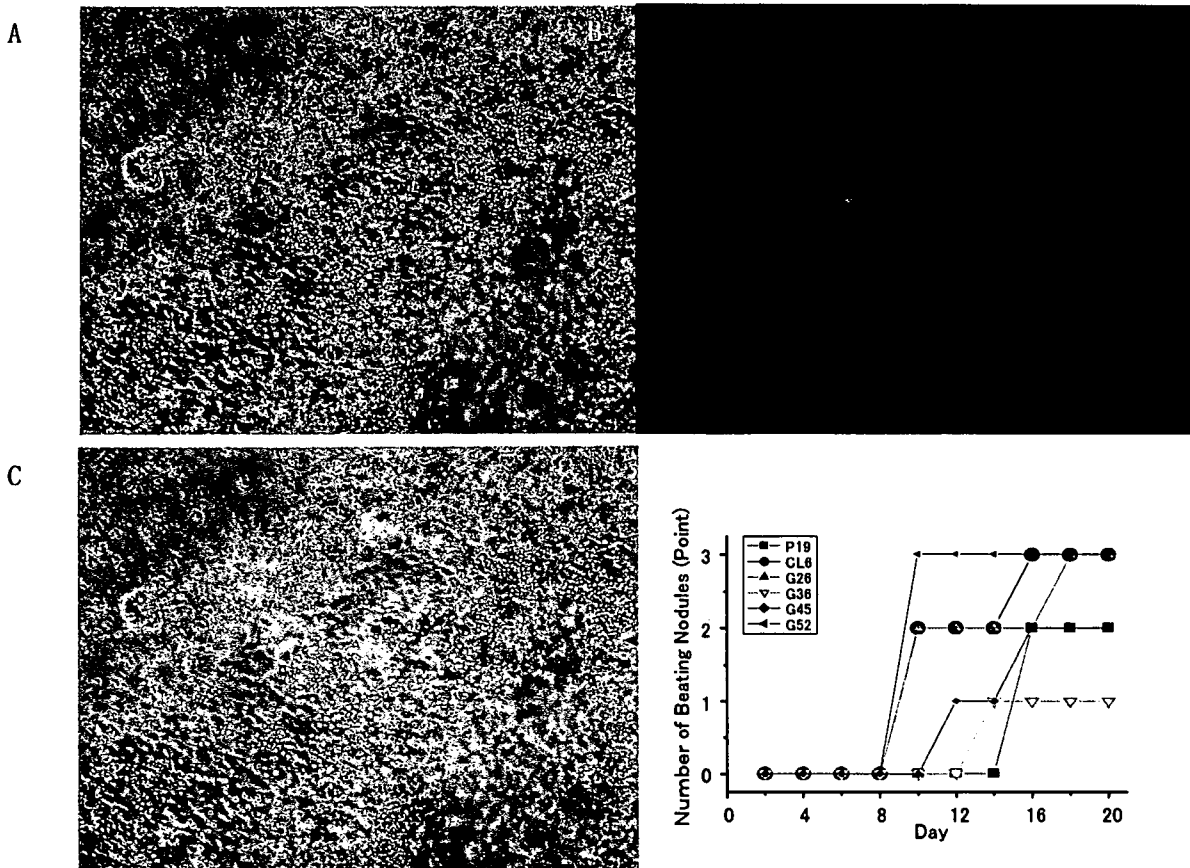


Fig.117 P19由来細胞の心筋細胞分化

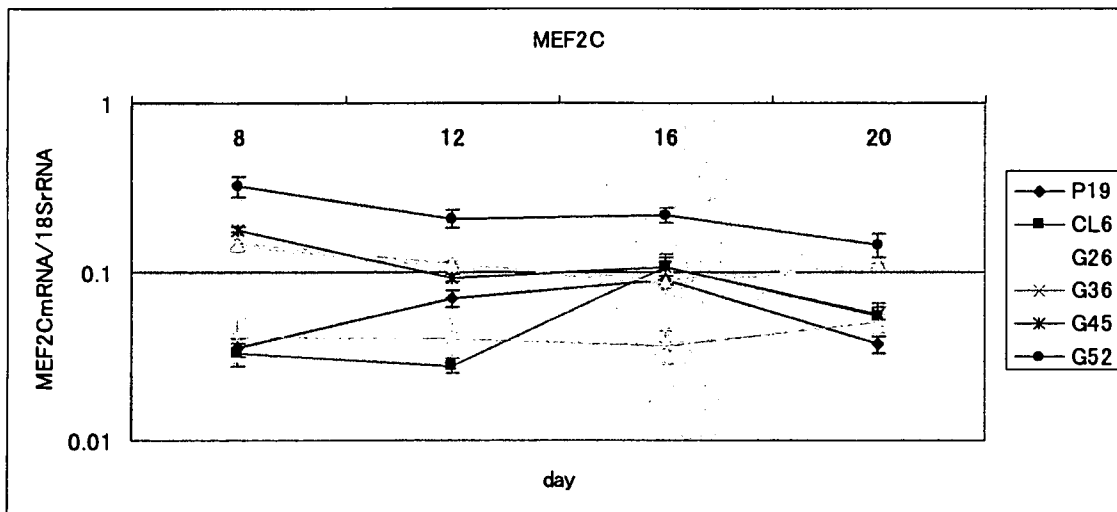
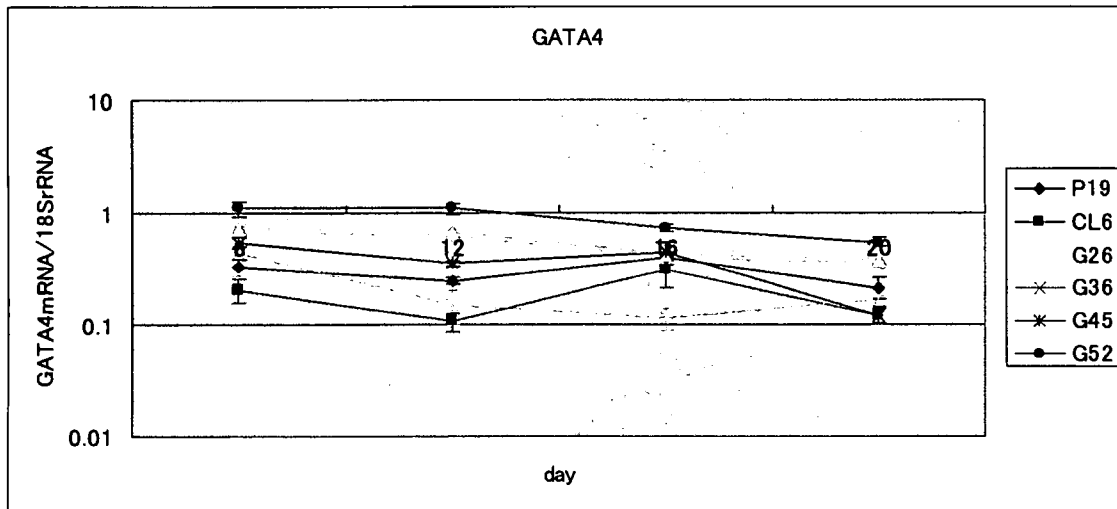
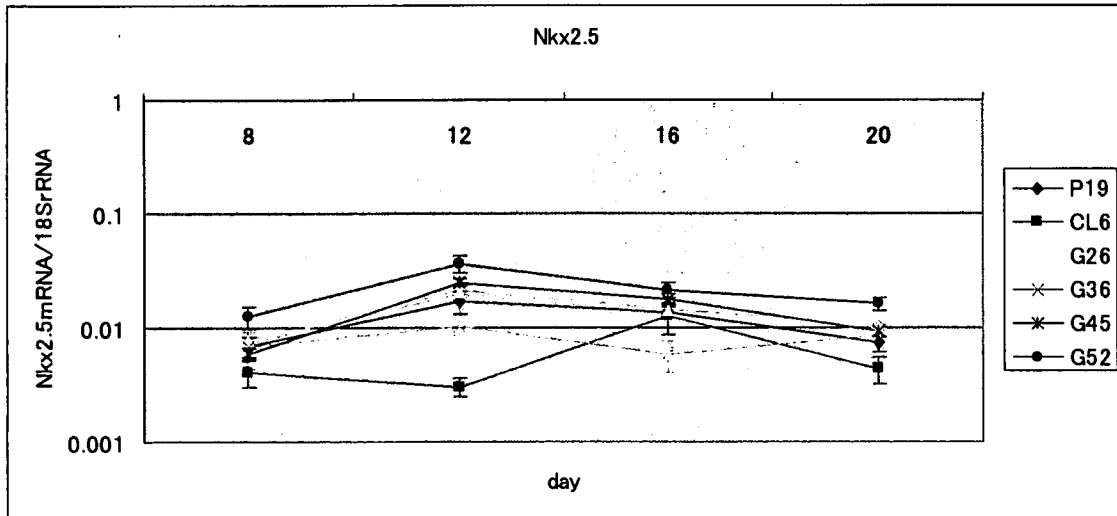
CL6G52細胞の心筋細胞分化 (×10、BZ-8000 (KEYENCE)を用いて撮影した)

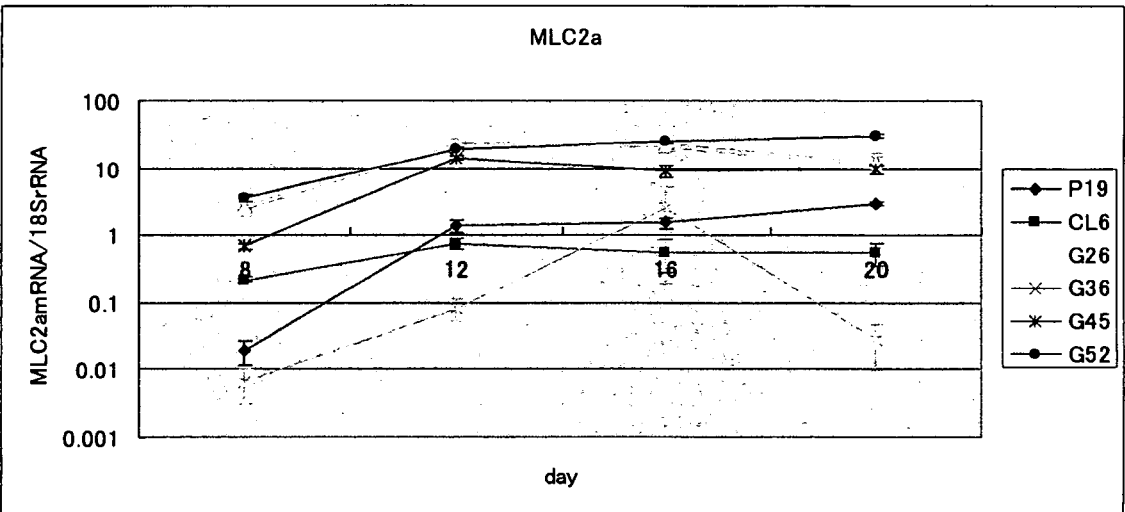
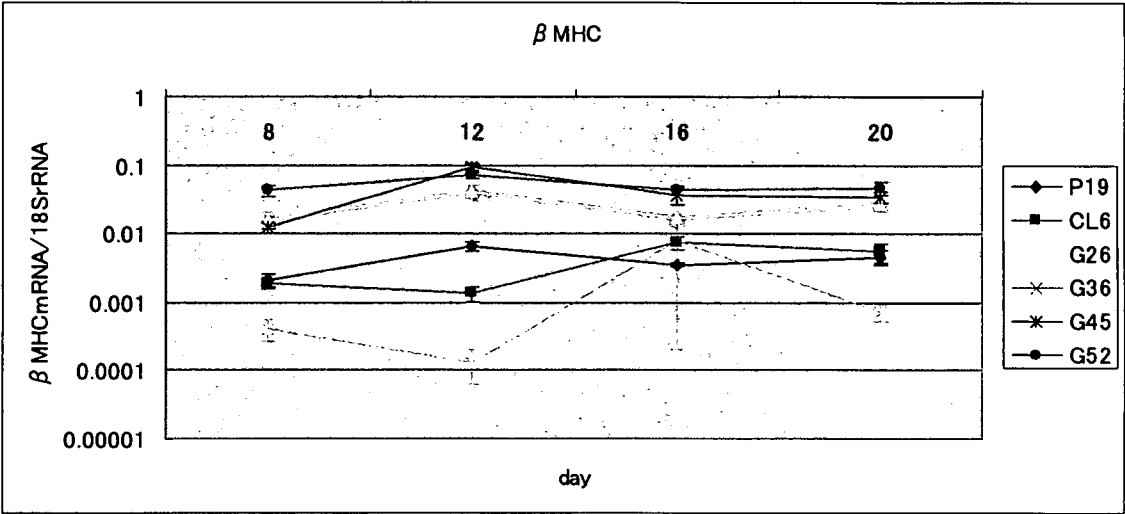
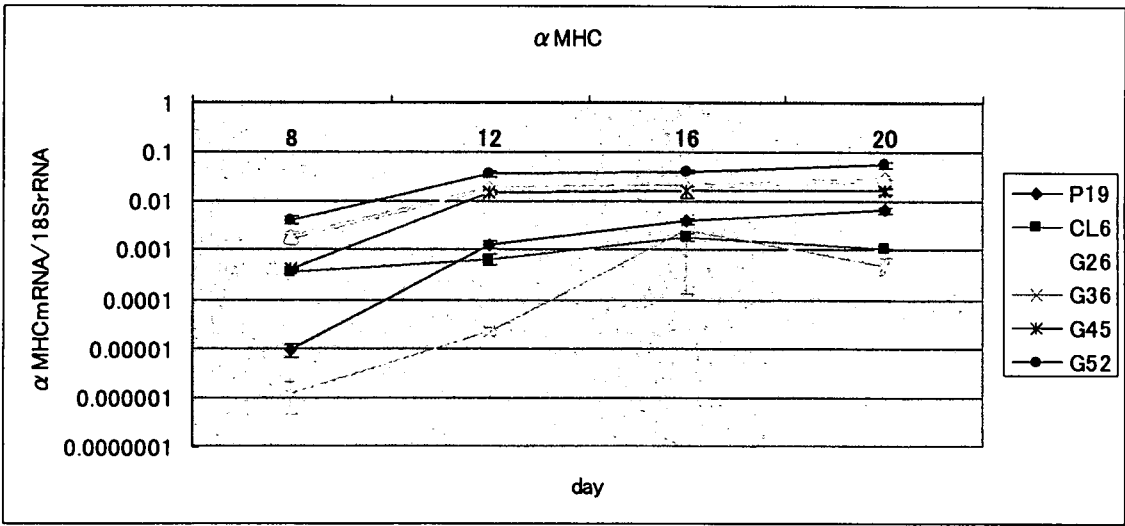
A: 分化誘導後8日目。自律拍動する小さな結節が認められた。

B: Aと同部位の蛍光像。GFPの発現が認められ、心筋細胞に分化していることが確認された。

C: AとBとの重ね合わせ像。

D: P19由来細胞株の心筋細胞分化の定性的時間経過。各細胞株の自律拍動する小結節数の時間経過を示す。小結節が見られないものを「0」、6穴細胞培養プレート1枚に対して1つ以上の小結節があるものを「1」、プレートのウェル1つに対して1つ以上の小結節があるものを「2」、顕微鏡の視野(×200)に対して1つ以上の小結節があるものを「3」とした。





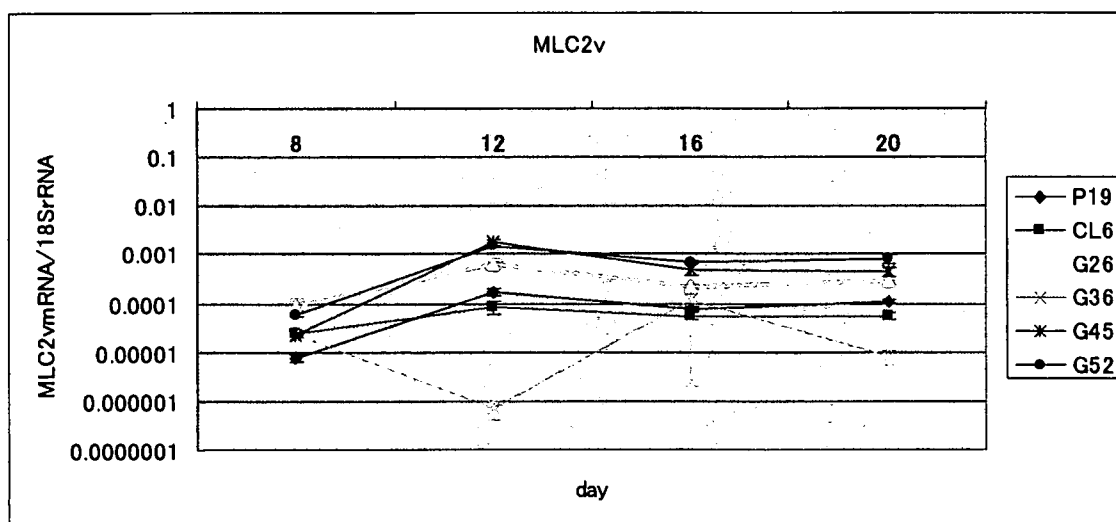


Fig.118 定量性リアルタイムRT-PCRによる心筋細胞特異的マーカー遺伝子測定

Nkx 2.5、GATA4、MEF2C、 α MHC、 β MHC、MLC2a、MLC2vの遺伝子発現の時間変化。細胞株により、心筋細胞分化に違いが認められた。〔平均値 \pm SEM (n=6)〕

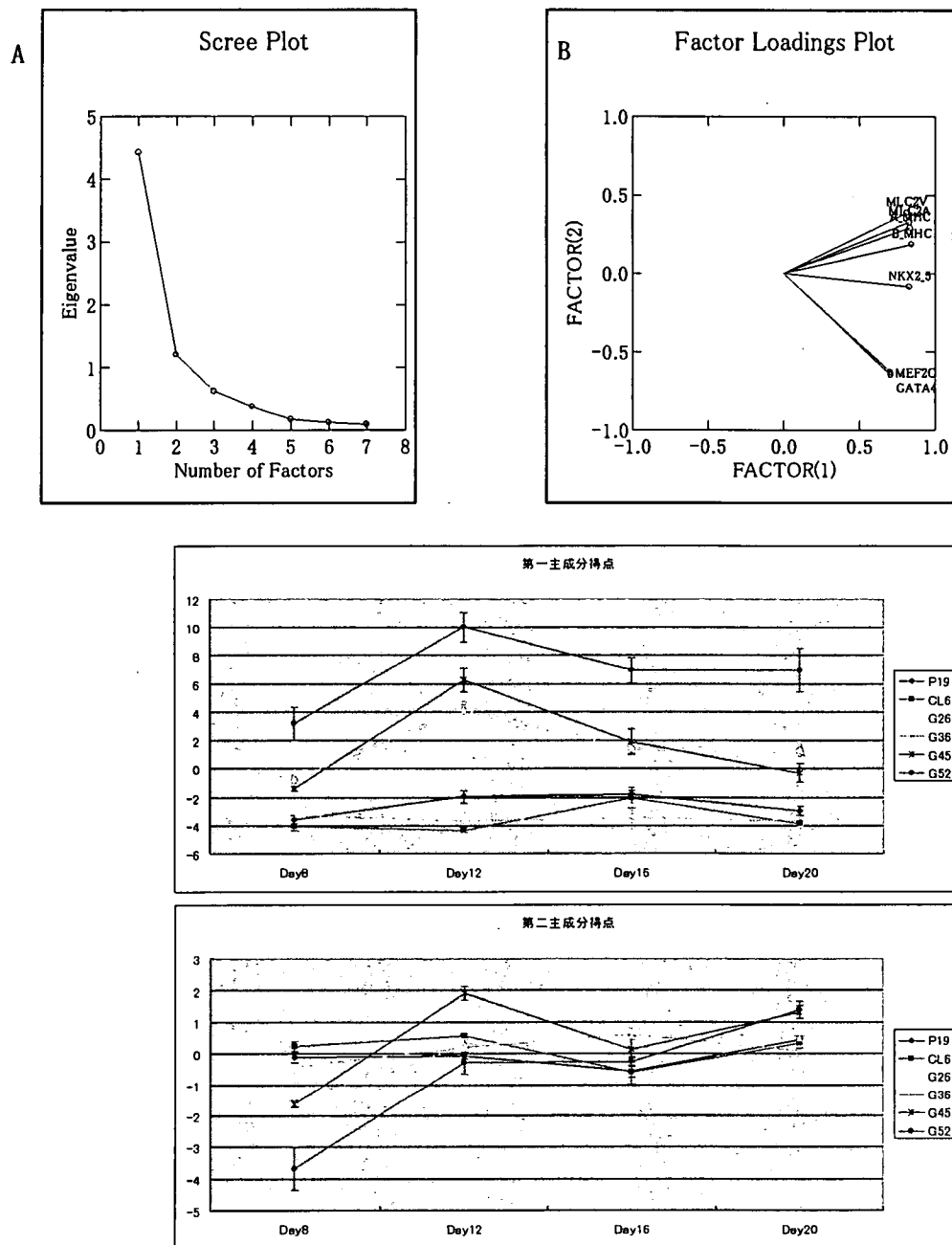


Fig.119 主成分分析

A: 主成分寄与率。第1主成分寄与率は63.2%、第2主成分寄与率は17.1%。

B: 変量プロット。横軸は第1主成分であり、全ての値が正となった。縦軸は第2主成分であり比較的初期に発現が見られるマーカーが負に、比較的後期に見られるマーカーが正の値となった。

C: 第1主成分得点の時間変化。細胞株により心筋細胞への分化能に違いが見られた。〔平均値 ±SEM (n=6)〕

D: 第2主成分得点の時間変化。細胞株により心筋細胞への分化能に違いが見られた。〔平均値 ±SEM (n=6)〕

Table 15 心筋細胞分化能とCMP遺伝子発現量の相関

Gene Name	Localization	1st Principal Component		2nd Principal Component		Time for Beating		Nodule Number	
		rs	p	rs	p	rs	p	rs	p
CMP1	Soluble	0.8237	2.26E-08	0.7368	3.44E-06	-0.4932	5.61E-03	0.4384	1.54E-02
CMP2	Soluble	0.7836	3.04E-07	0.7464	2.18E-06	-0.5419	1.98E-03	0.4153	2.25E-02
CMP3	Membran	0.7596	1.13E-06	0.4397	1.51E-02	-0.6333	1.73E-04	0.6455	1.17E-04
CMP4	Membran	0.7596	1.13E-06	0.6386	1.46E-04	-0.4859	6.48E-03	0.4202	2.08E-02
CMP5	Membran	0.7573	1.27E-06	0.466	9.44E-03	-0.6856	2.90E-05	0.6881	2.64E-05
CMP6	Membran	-0.7196	7.42E-06	-0.5235	2.99E-03	0.6771	3.97E-05	-0.5907	5.90E-04
CMP7	Membran	0.6589	7.52E-05	0.1282	5.00E-01	-0.492	5.75E-03	0.6004	4.52E-04
CMP2	Soluble	0.6521	9.46E-05	0.3798	3.85E-02	-0.8038	8.85E-08	0.7672	7.57E-07
CMP8	Membran	-0.6246	2.25E-04	-0.4588	1.08E-02	0.4177	2.16E-02	-0.3824	3.70E-02
CMP9	Soluble	-0.5903	5.96E-04	-0.3103	9.52E-02	0.503	4.61E-03	-0.5164	3.49E-03
CMP10	Soluble	0.5658	1.12E-03	0.2336	2.14E-01	-0.6151	2.98E-04	0.6455	1.17E-04
CMP11	Soluble	0.5651	1.14E-03	0.4277	1.84E-02	-0.6308	1.86E-04	0.5858	6.71E-04
CMP12	Membran	0.556	1.42E-03	0.4157	2.23E-02	-0.3982	2.93E-02	0.4165	2.21E-02
CMP13	Membran	0.5399	2.07E-03	0.3055	1.01E-01	-0.4299	1.77E-02	0.4323	1.70E-02
CMP13	Membran	0.5388	2.13E-03	0.1761	3.52E-01	-0.5858	6.71E-04	0.682	3.32E-05
CMP14	Soluble	0.5366	2.24E-03	0.2432	1.95E-01	-0.4671	9.26E-03	0.5012	4.78E-03
CMP15	Membran	0.485	6.59E-03	0.0012	9.95E-01	-0.6735	4.53E-05	0.7806	3.61E-07
CMP16	Membran	0.4685	9.02E-03	-0.1186	5.32E-01	-0.4744	8.08E-03	0.64	1.40E-04
CMP17	Soluble	-0.4559	1.13E-02	-0.0503	7.92E-01	0.7673	7.53E-07	-0.8313	1.28E-08
CMP18	Membran	0.453	1.19E-02	-0.0635	7.39E-01	-0.369	4.48E-02	0.548	1.72E-03
CMP19	Soluble	-0.4404	1.49E-02	-0.1066	5.75E-01	0.643	1.27E-04	-0.7124	1.00E-05
CMP20	Soluble	-0.4256	1.91E-02	0.0036	9.85E-01	0.4214	2.04E-02	-0.5395	2.09E-03
CMP21	Membran	0.397	2.99E-02	-0.0204	9.15E-01	-0.5809	7.63E-04	0.6832	3.17E-05
CMP22	Soluble	-0.3924	3.20E-02	-0.2839	1.28E-01	0.5249	2.90E-03	-0.4579	1.09E-02
CMP23	Soluble	-0.3924	3.20E-02	0.109	5.66E-01	0.6978	1.81E-05	-0.822	2.54E-08
CMP24	Soluble	-0.3856	3.53E-02	0.1414	4.56E-01	0.4623	1.01E-02	-0.603	4.20E-04

CMP2およびCMP13は2つのProbe Setで検出された。表中に黄色で示したものは、膜タンパクをコードする遺伝子であり、白で示したものは可溶性タンパクをコードする遺伝子である。rs: 順位相関係数、p: 有意確率

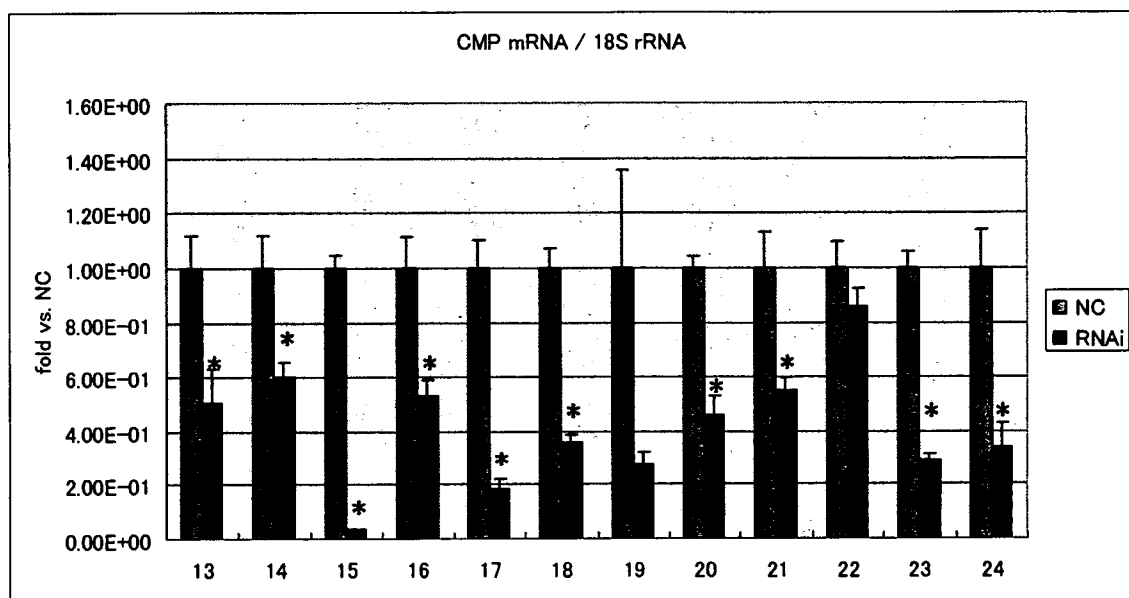
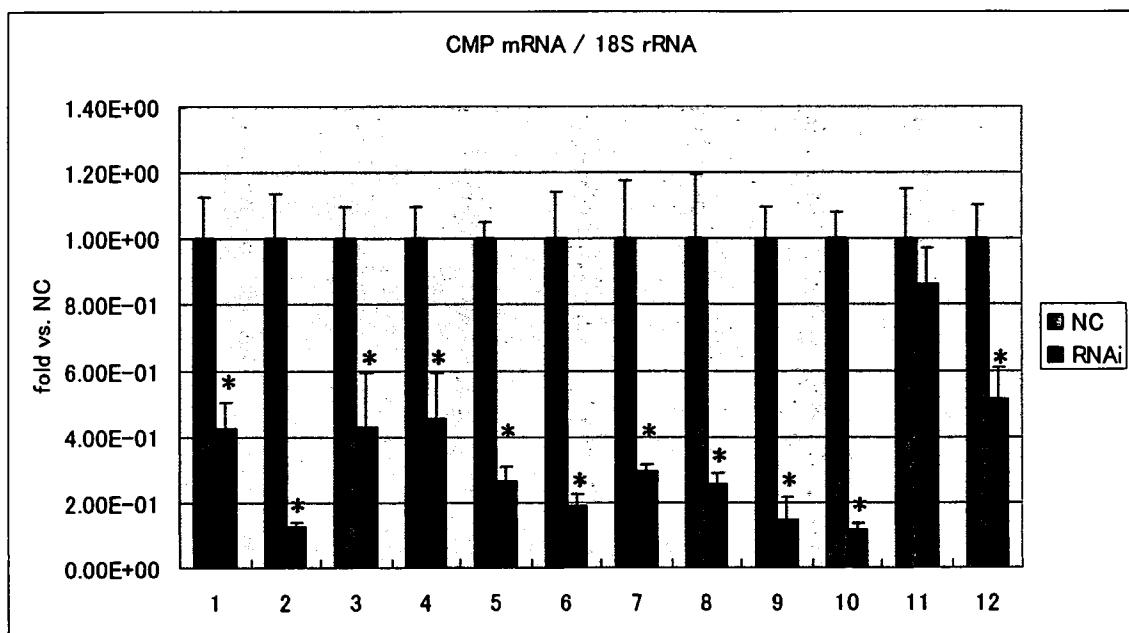


Fig.120 各CMP遺伝子のノックダウン効率

RNAiにより、各CMP遺伝子の発現がどの程度抑制されたかを示している。縦軸はCMP遺伝子の発現量のネガティブコントロールに対する比率、横軸はCMP遺伝子の番号を示している。11、19、22を除く19個のCMP遺伝子で有意な発現の抑制が認められた。

[平均値±SEM (n=6)]、*p < 0.05 vs. Negative Control

