

Fig.2 P19由来細胞の心筋細胞分化

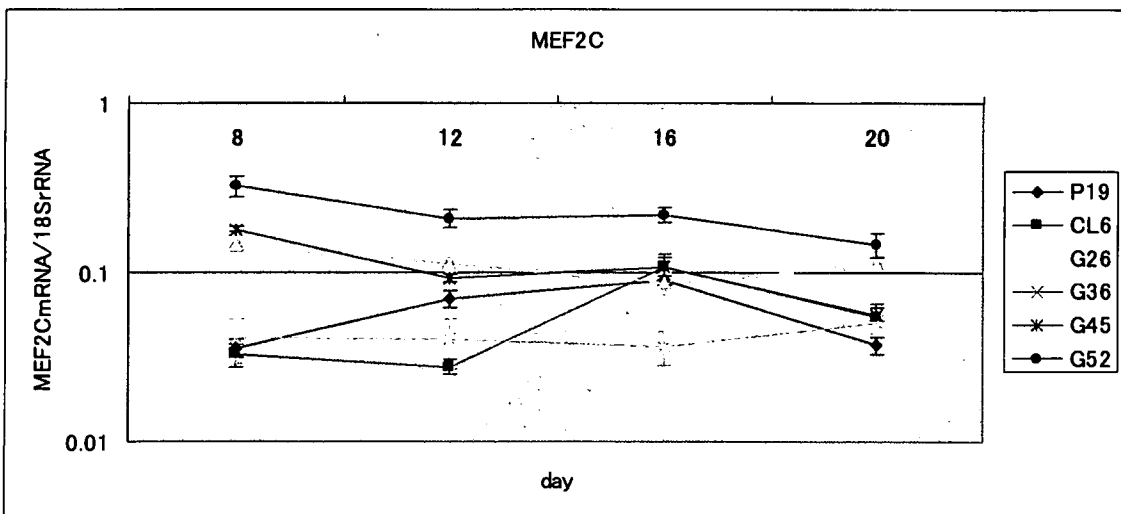
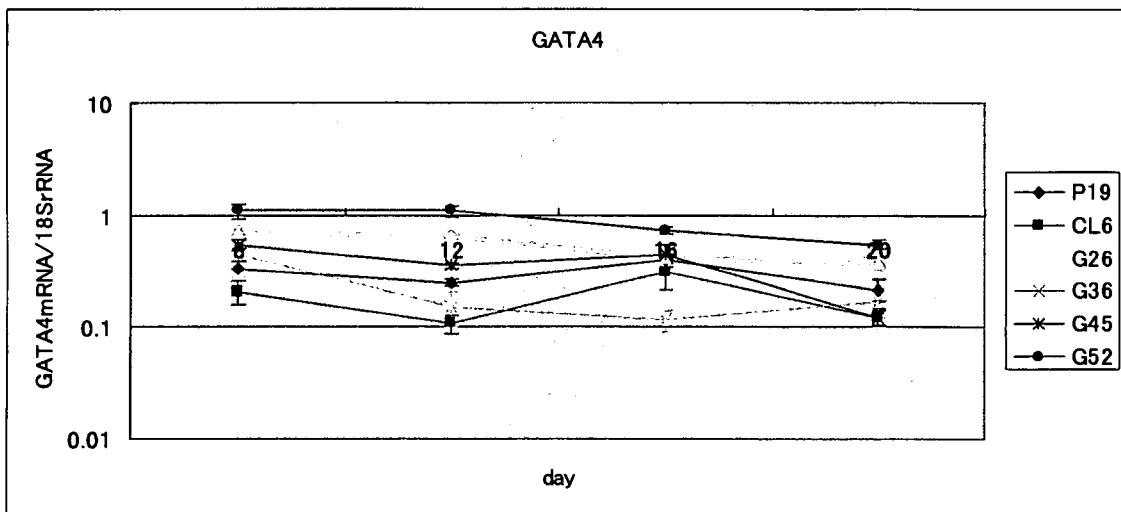
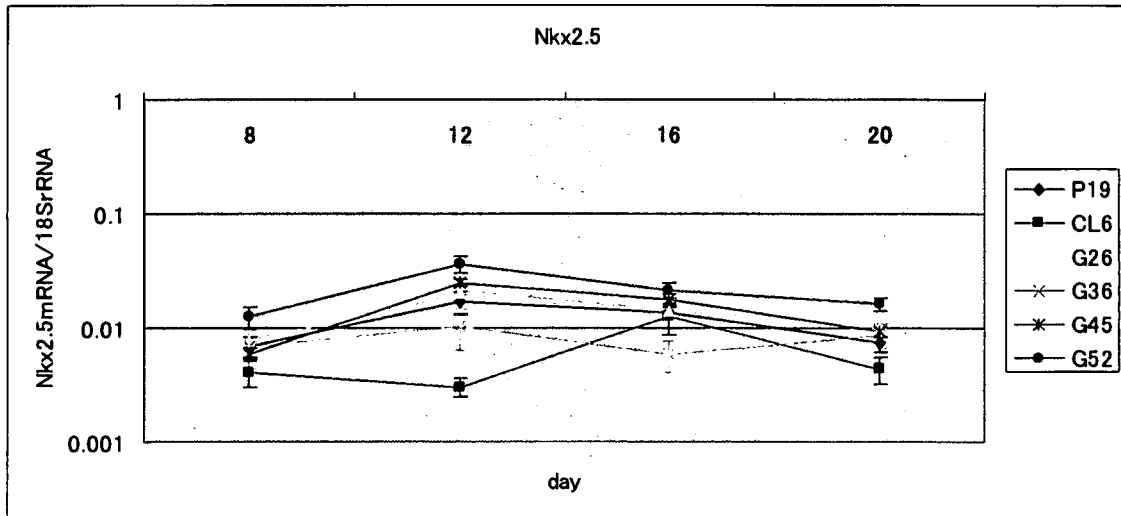
CL6G52細胞の心筋細胞分化 (×10、BZ-8000 (KEYENCE)を用いて撮影した)

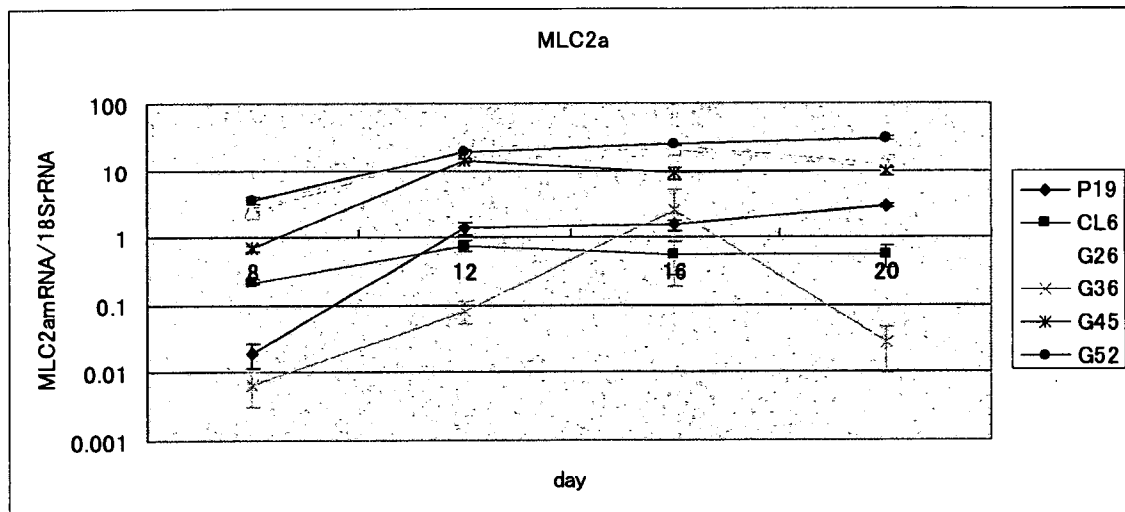
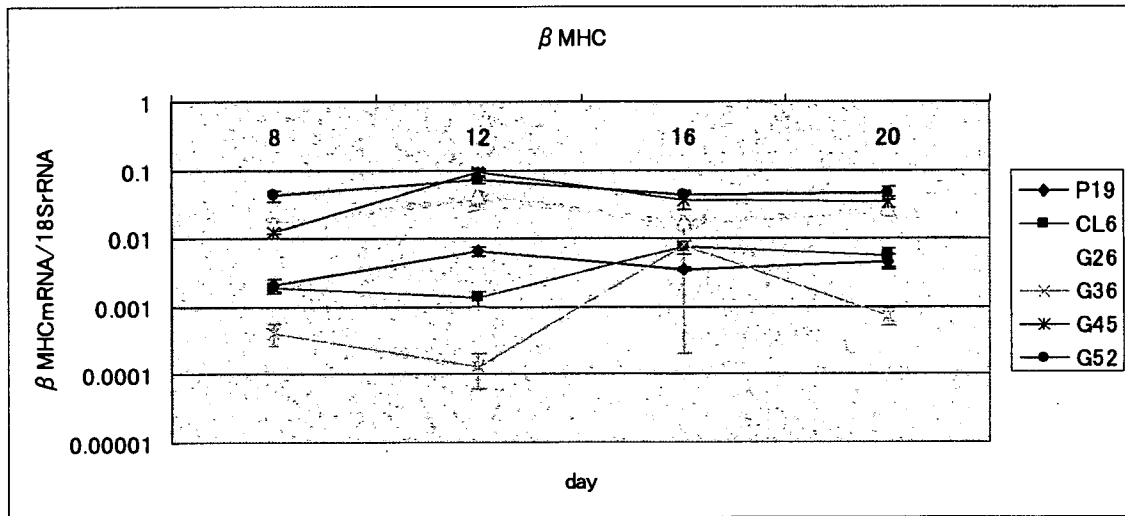
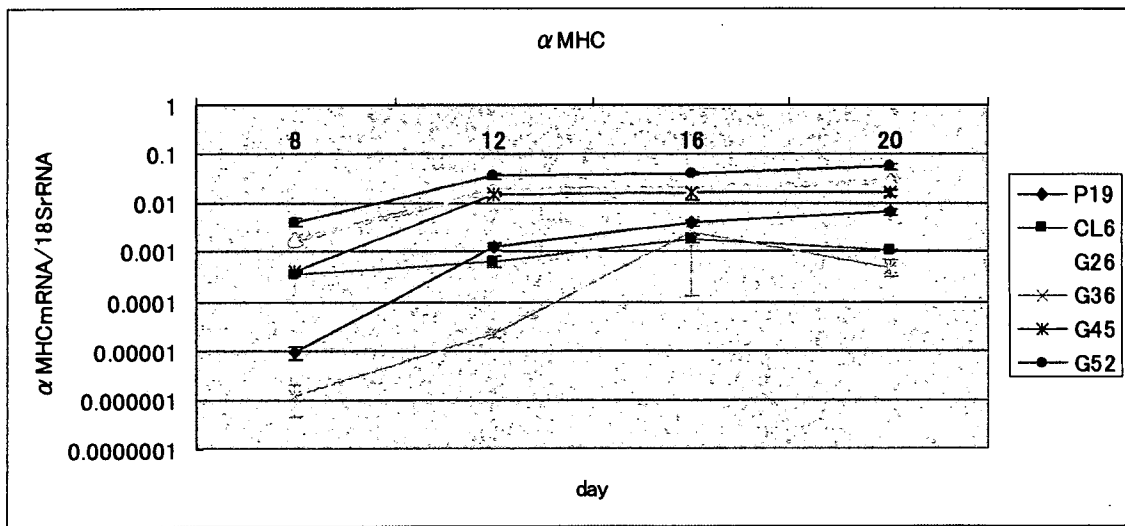
A: 分化誘導後8日目。自律拍動する小さな結節が認められた。

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。





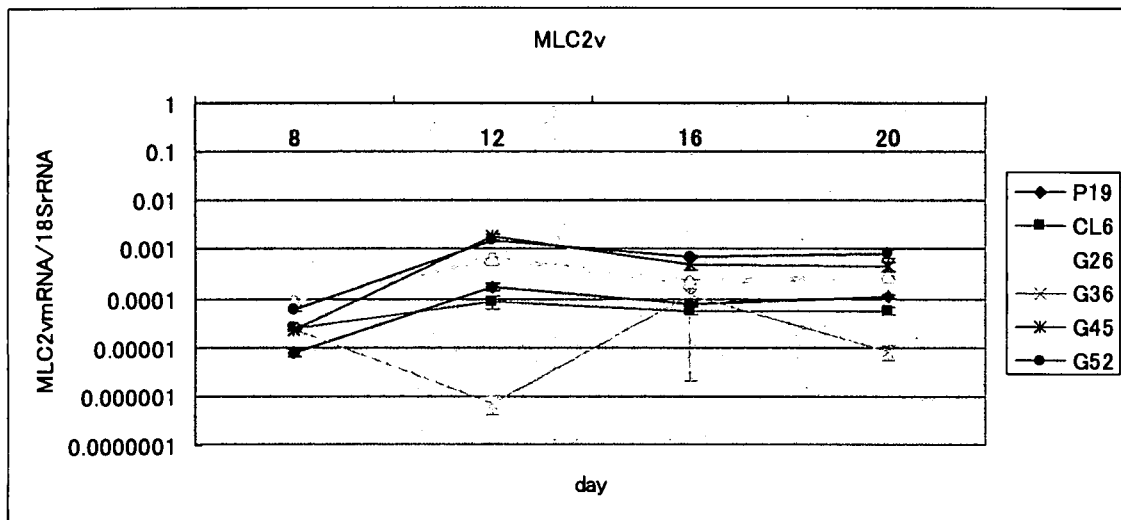


Fig.3 定量性リアルタイムRT-PCRによる心筋細胞特異的マーカー遺伝子測定

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)〕

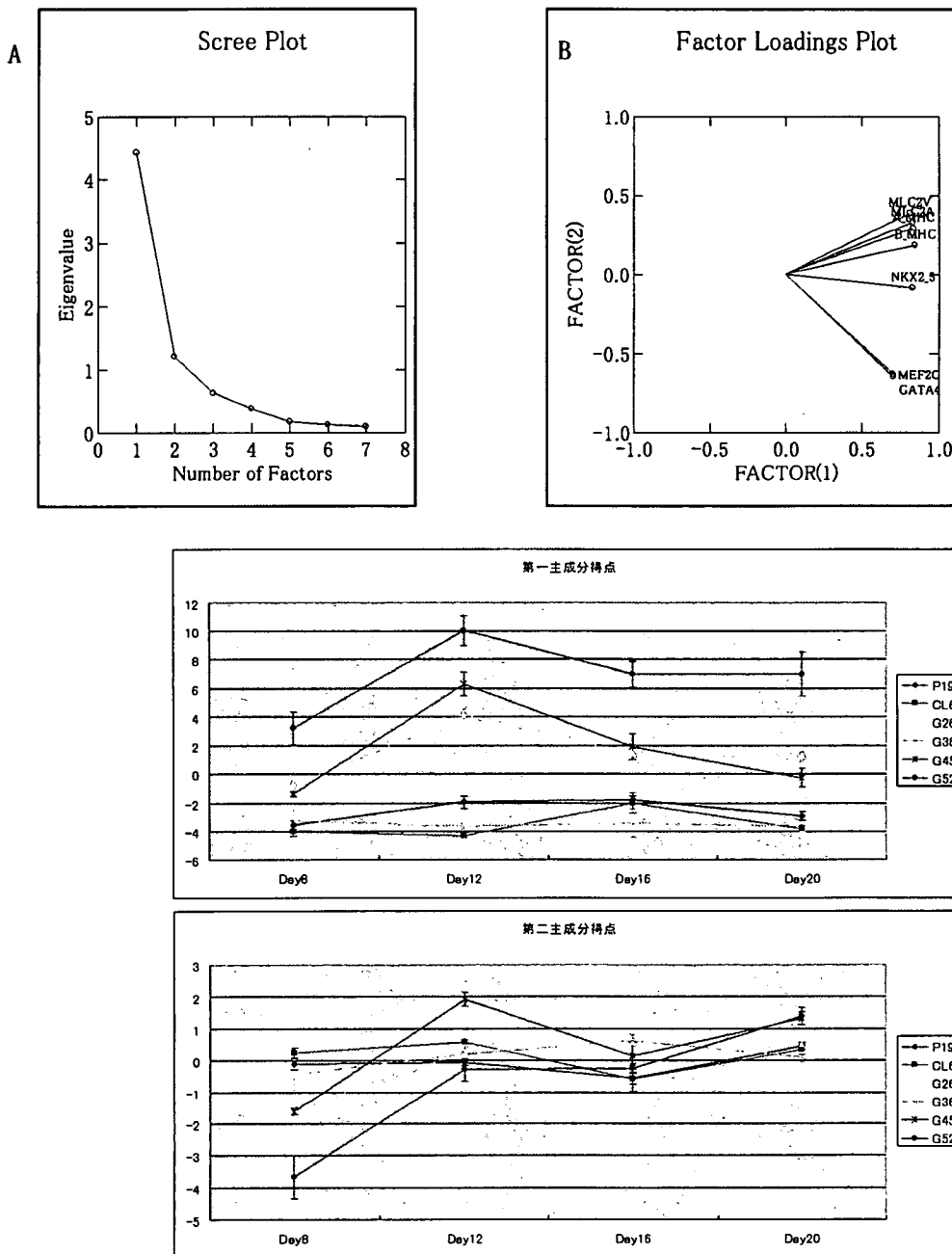


Fig.4. 主成分分析

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、比較的后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 2 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

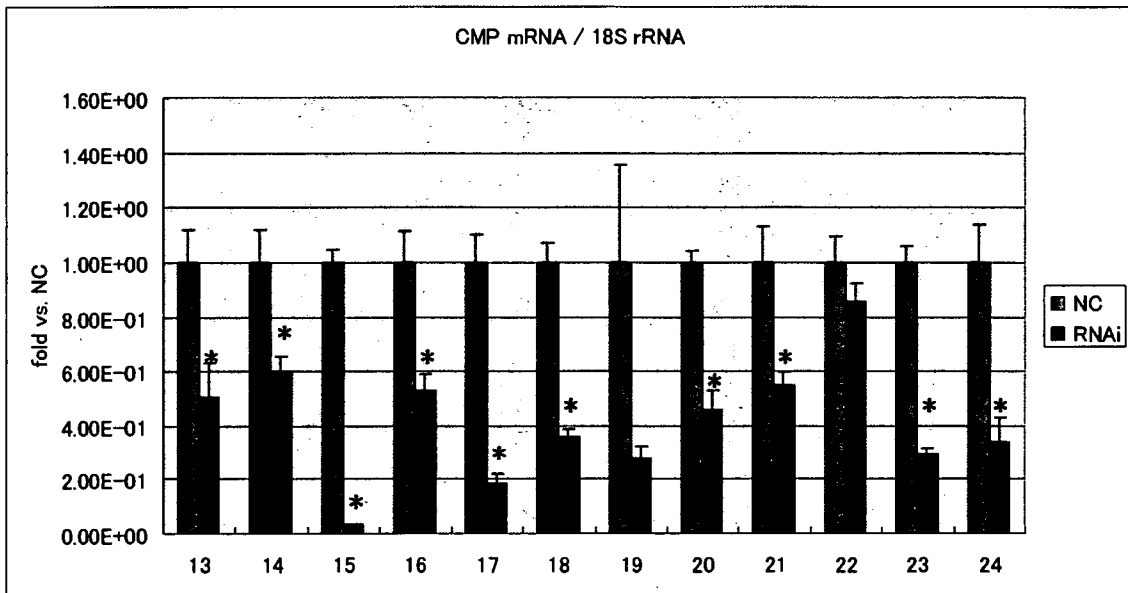
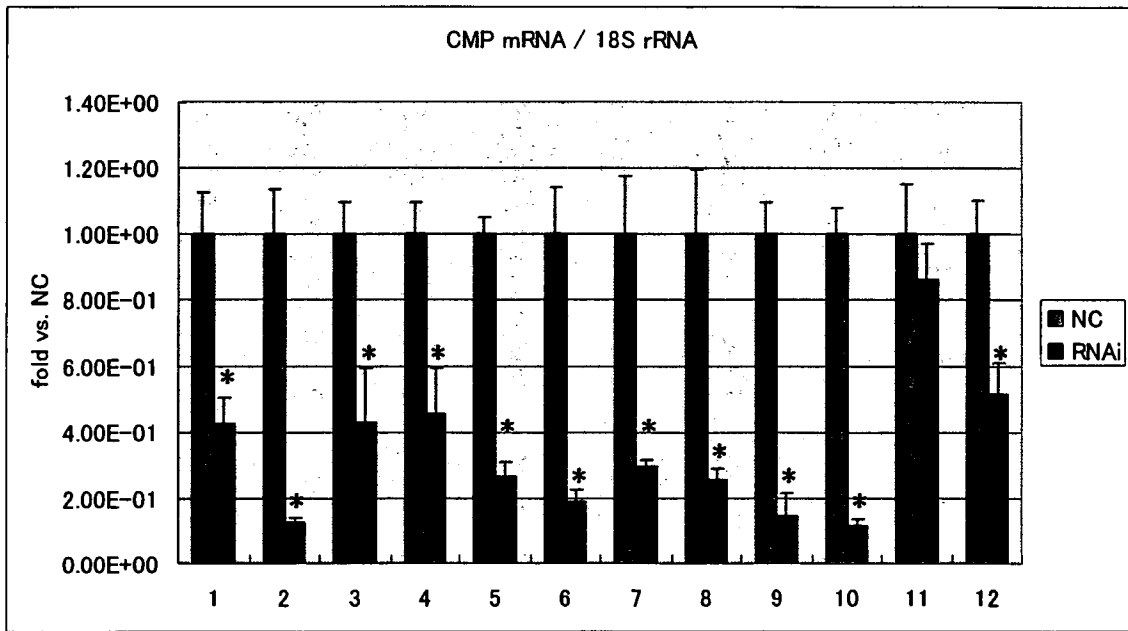
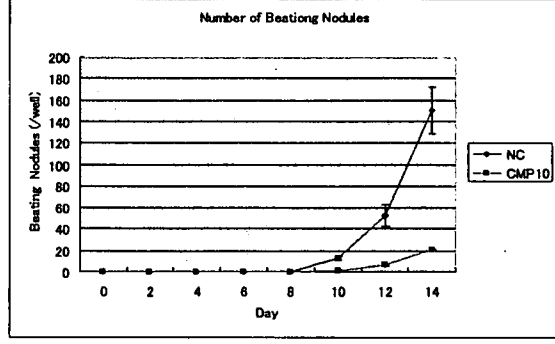
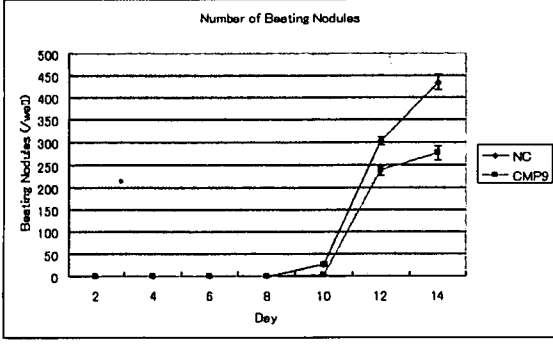
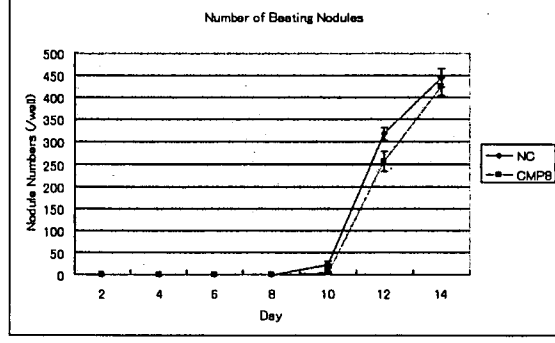
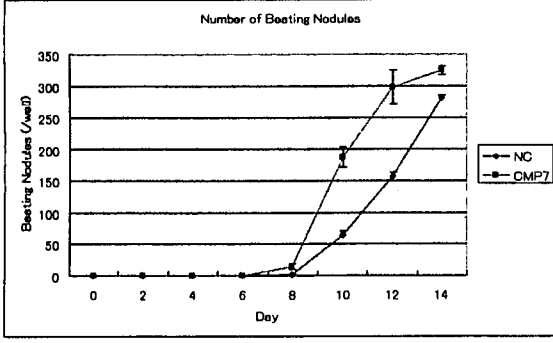
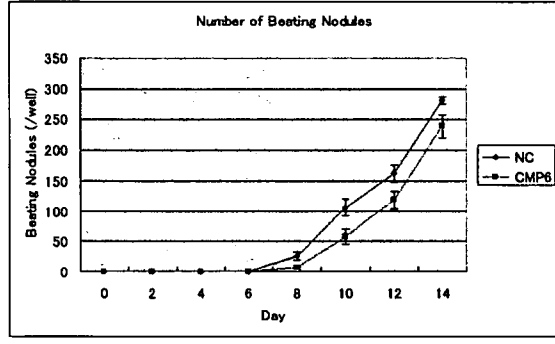
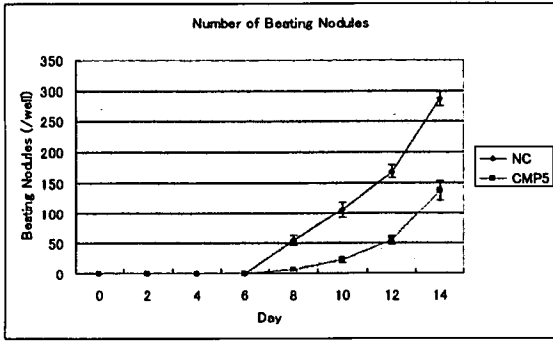
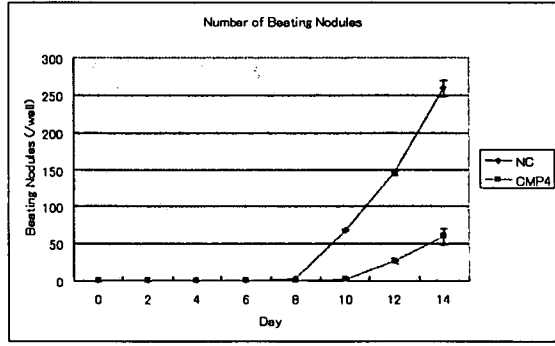
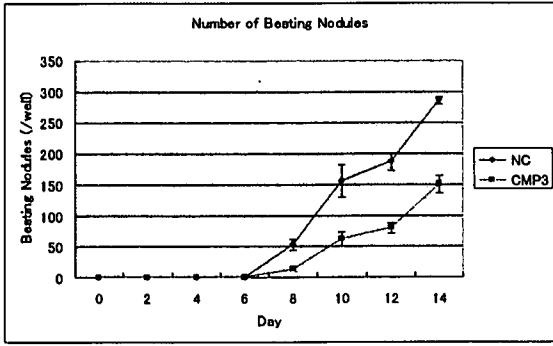
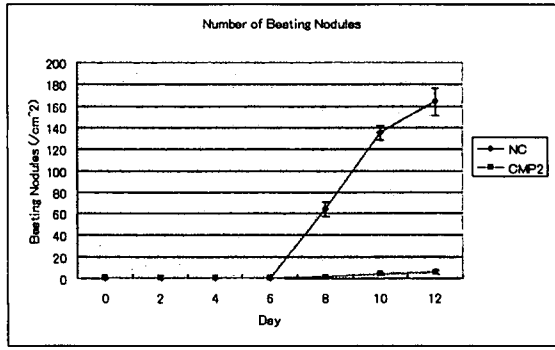
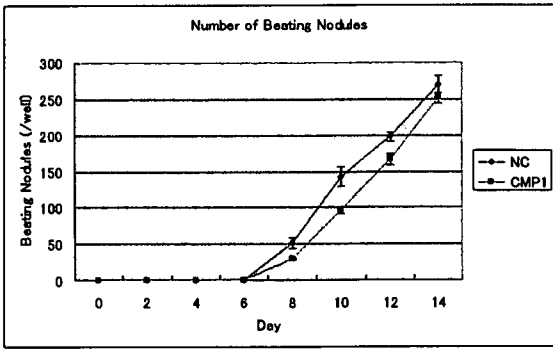
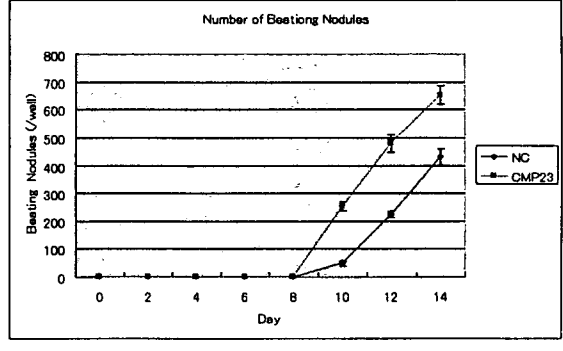
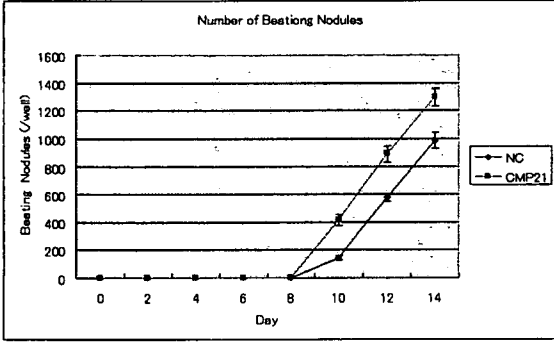
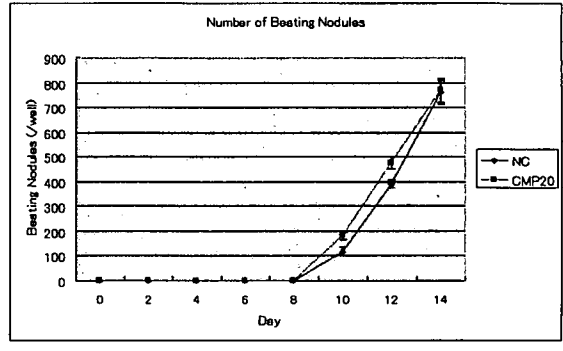
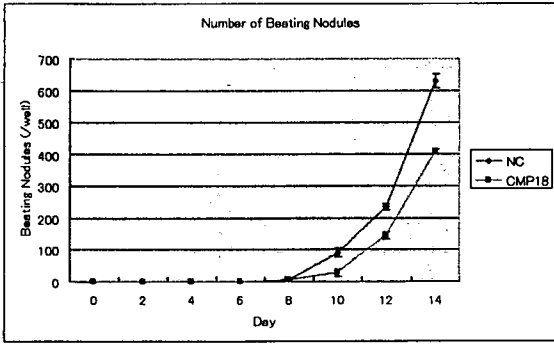
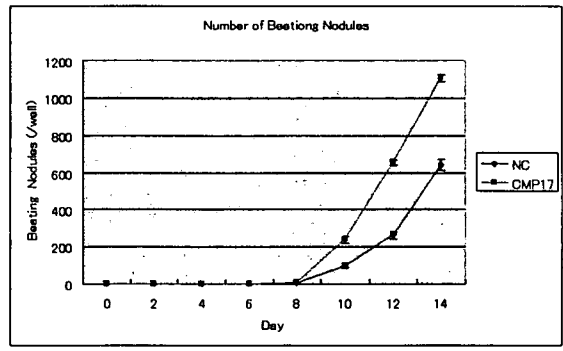
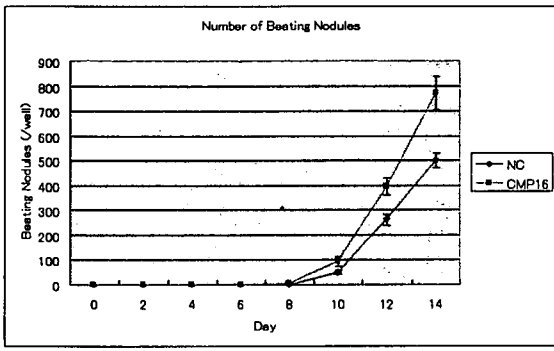
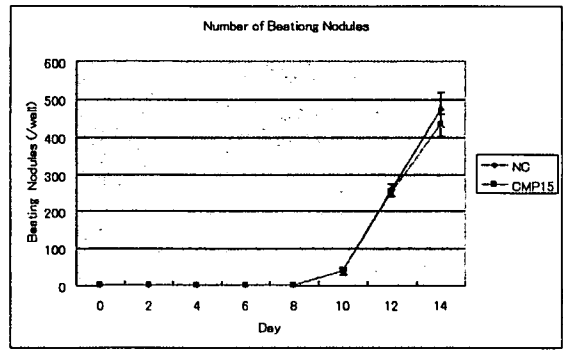
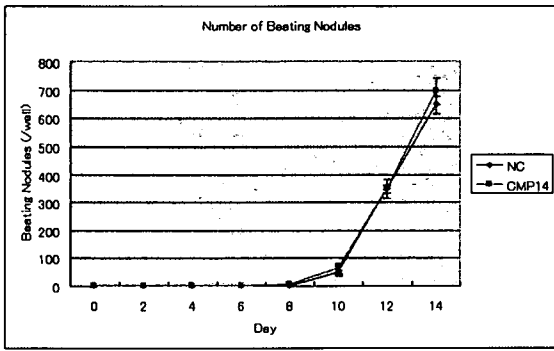
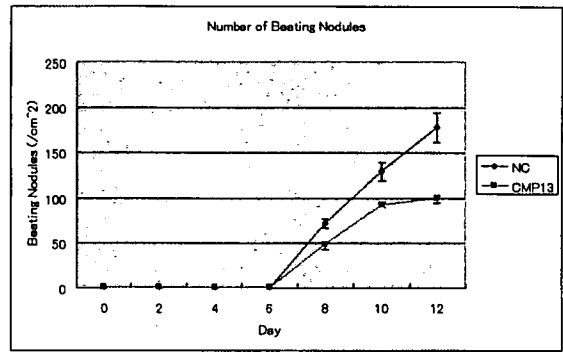
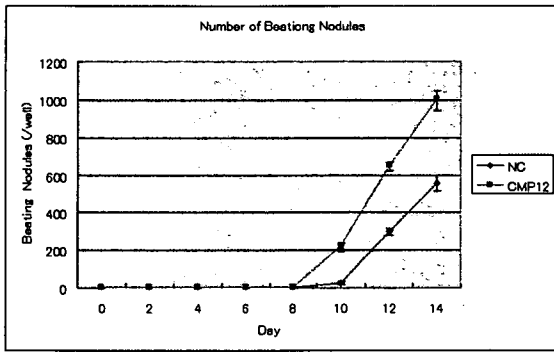


Fig.5 各CMP遺伝子のノックダウン効率

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





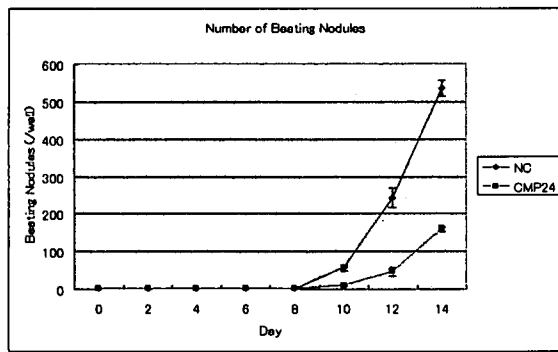


Fig.6 自律拍動する小結節数の時間変化

RNAiを用いて各CMP遺伝子の機能阻害した後における自律拍動する小結節数を測定した。機能阻害により、CMP1、CMP2、CMP3、CMP4、CMP5、CMP6、CMP9、CMP10、CMP13、CMP18、CMP24では有意な減少が、CMP7、CMP12、CMP16、CMP17、CMP21、CMP23では有意な増加が認められた。p < 0.05 vs. Negative Control、n=4

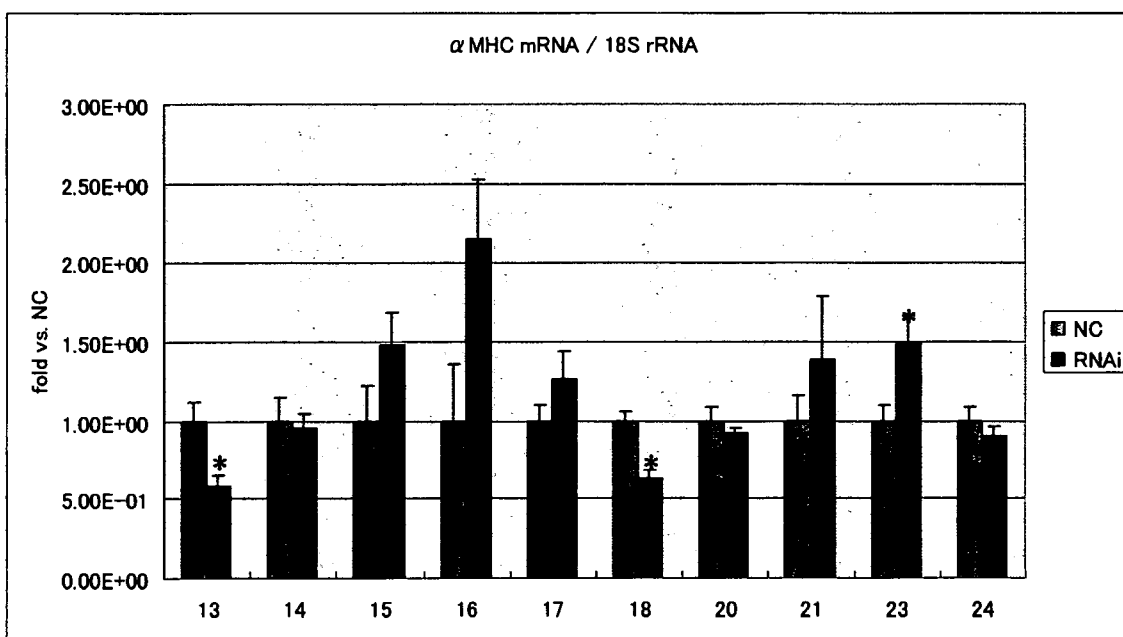
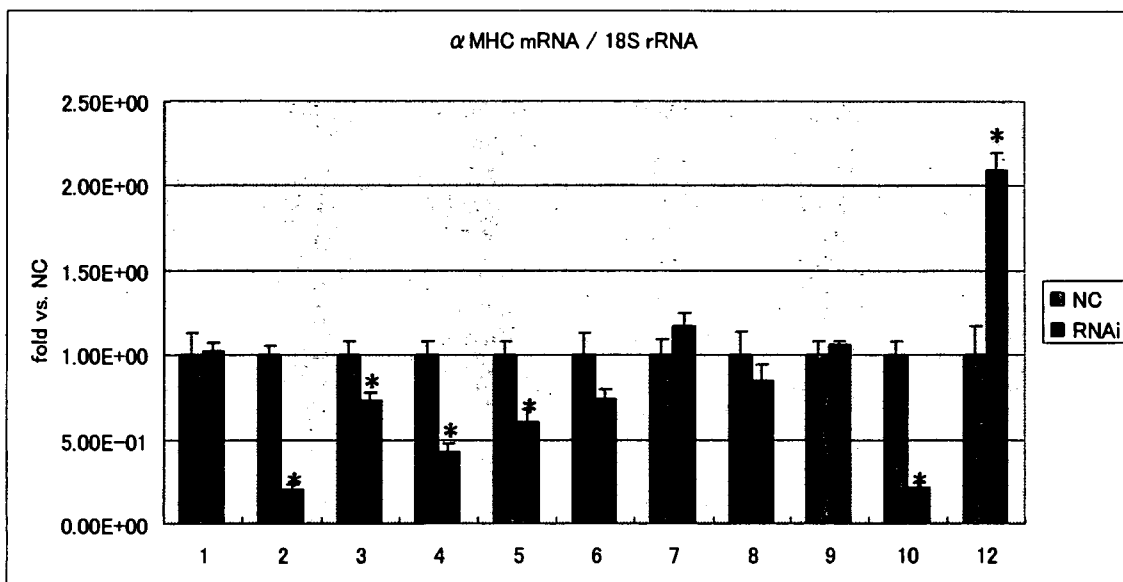


Fig.7 分化誘導後14日目における心筋細胞特異的マーカー遺伝子の測定

RNAiを用いて各CMP遺伝子の機能阻害した後における α MHC発現量を測定した。縦軸は、 α MHC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遺伝子の番号を示す。〔平均値 \pm SEM (n=4)〕、*p < 0.05 vs. Negative Control

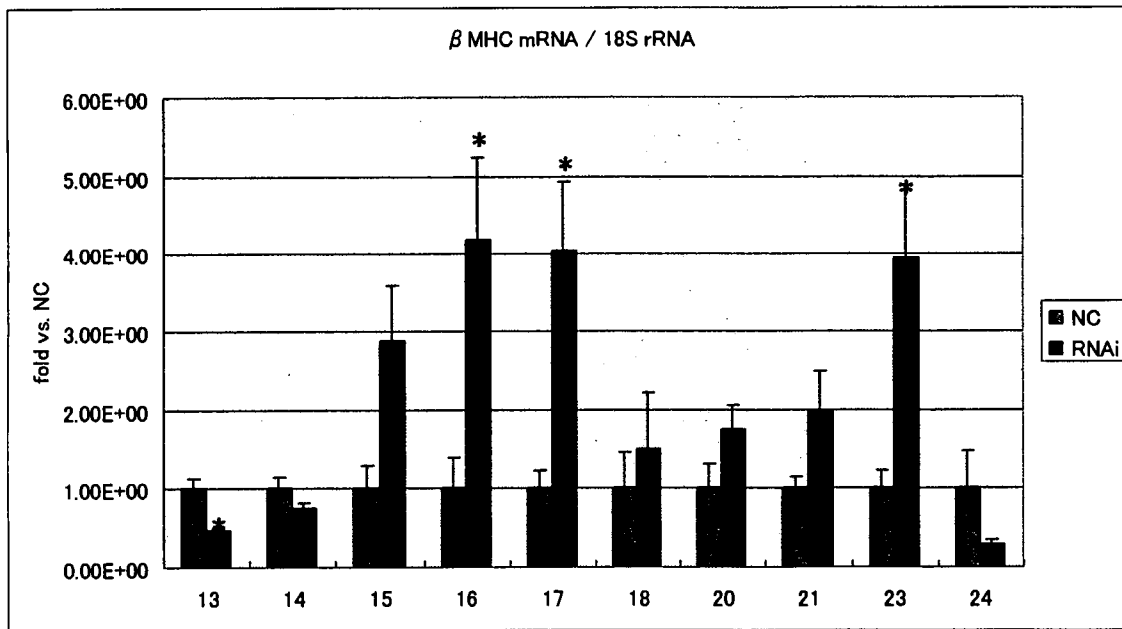
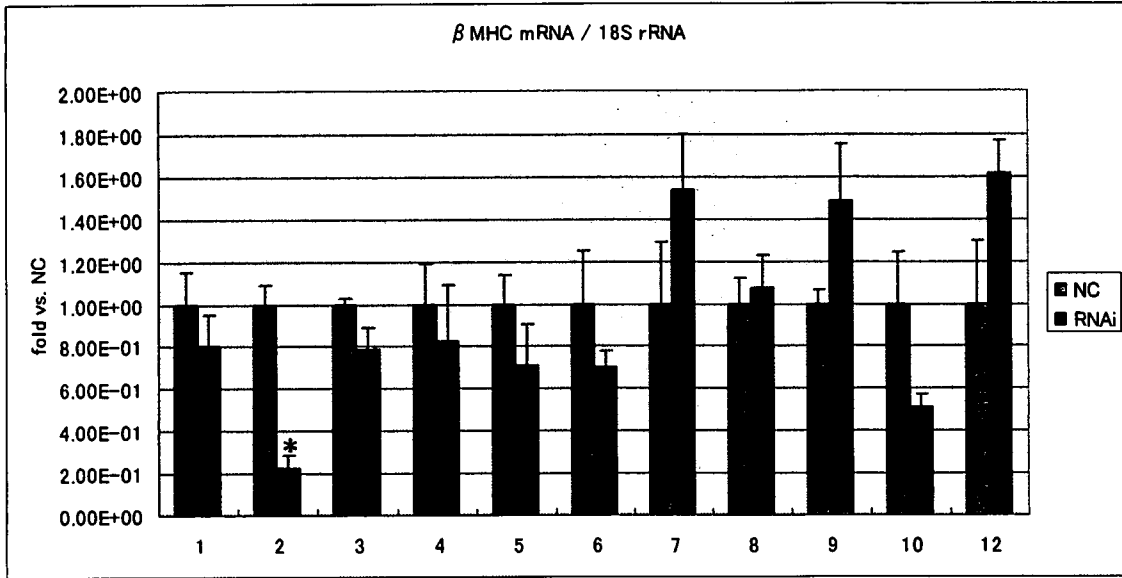


Fig.8 分化誘導後14日目における心筋細胞特異的マーカー遺伝子の測定

RNAiを用いて各CMP遺伝子の機能阻害した後におけるβMHCの発現量を測定した。縦軸は、βMHC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遺伝子の番号を示す。〔平均値±SEM (n=4)〕、*p < 0.05 vs. Negative Control

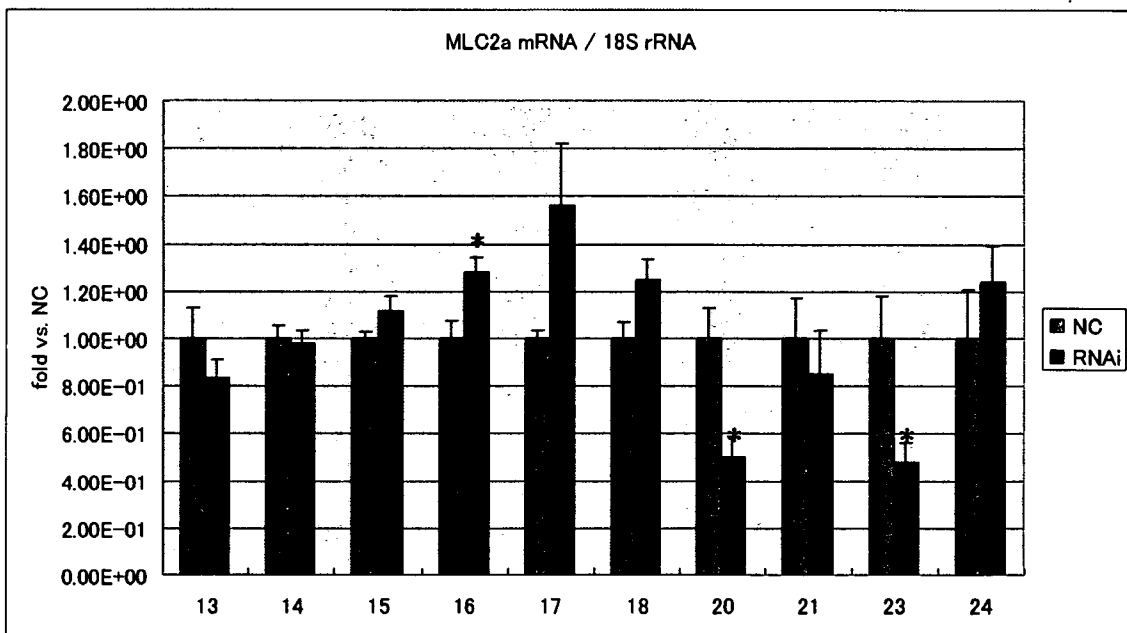
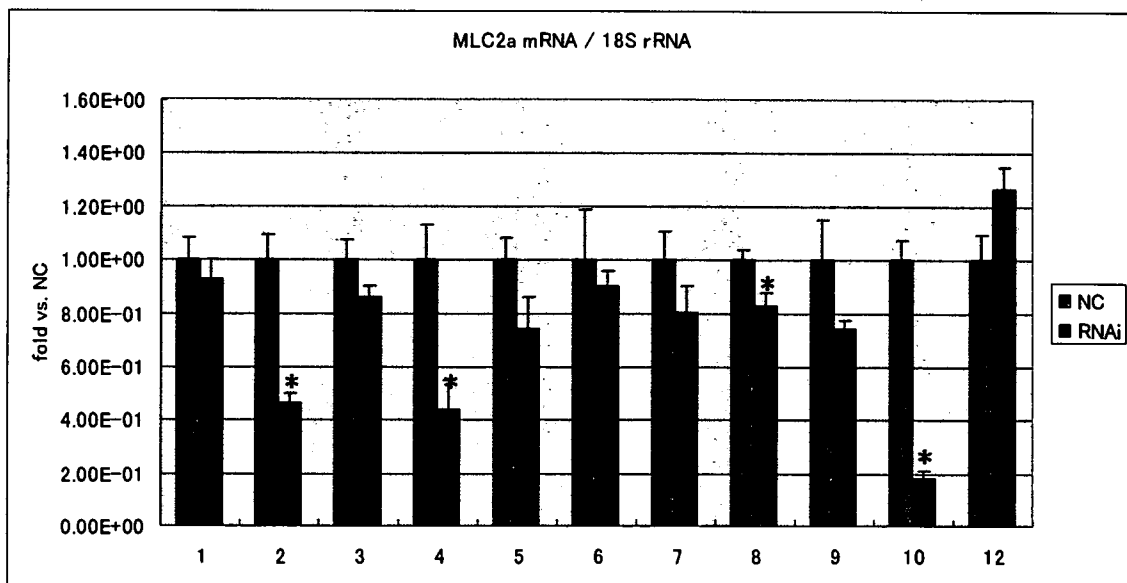


Fig.9 分化誘導後14日目における心筋細胞特異的マーカー遺伝子の測定

RNAiを用いて各CMP遺伝子の機能阻害した後におけるMLC2aの発現量を測定した。縦軸は、MLC2a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遺伝子の番号を示す。〔平均値±SEM (n=4) 、*p < 0.05 vs. Negative Control

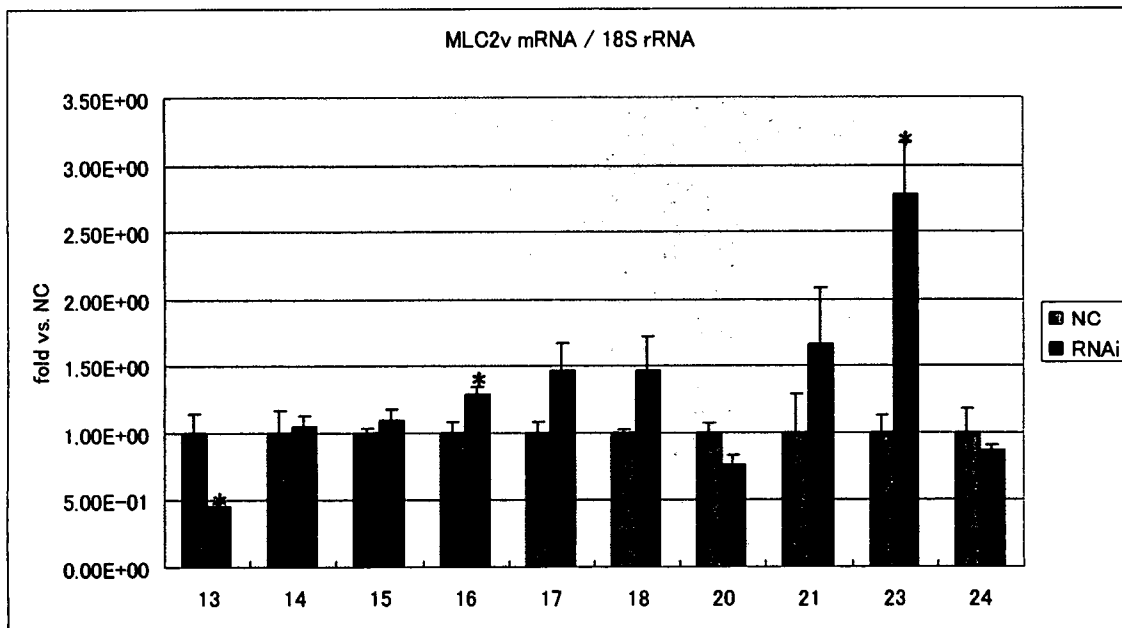
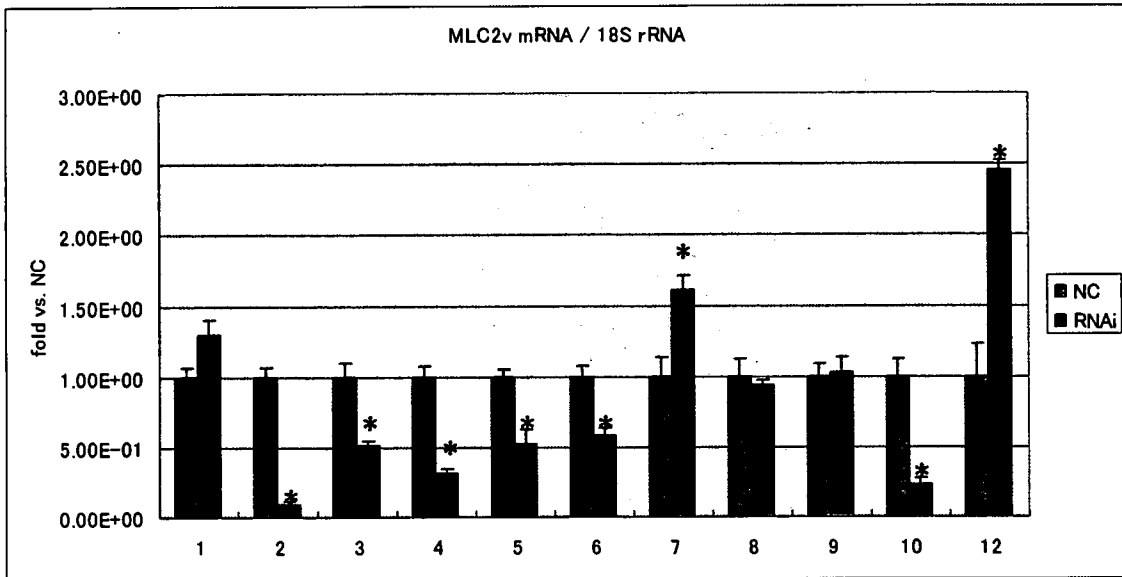


Fig.10 分化誘導後14日目における心筋細胞特異的マーカー遺伝子の測定

RNAiを用いて各CMP遺伝子の機能阻害した後におけるMLC2vの発現量を測定した。縦軸は、MLC2v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遺伝子の番号を示す。〔平均値±SEM (n=4)〕、*p < 0.05 vs. Negative Control

Table 3 各CMP遺伝子の機能阻害試験

No	knock down	Nodule Number	α MHC	β MHC	MLC2a	MLC2v
1	*	↓	NS	NS	NS	NS
2	*	↓	↓	↓	↓	↓
3	*	↓	↓	NS	NS	↓
4	*	↓	↓	NS	↓	↓
5	*	↓	↓	NS	NS	↓
6	*	↓	NS	NS	NS	↓
7	*	↑	NS	NS	NS	↑
8	*	NS	NS	NS	↓	NS
9	*	↓	NS	NS	NS	NS
10	*	↓	↓	NS	↓	↓
12	*	↑	↑	NS	NS	↑
13	*	↓	↓	↓	NS	↓
14	*	NS	NS	NS	NS	NS
15	*	NS	NS	NS	NS	NS
16	*	↑	NS	↑	↑	↑
17	*	↑	NS	↑	NS	NS
18	*	↓	↓	NS	NS	NS
20	*	NS	NS	NS	↓	NS
21	*	↑	NS	NS	NS	NS
23	*	↑	↑	↑	↓	↑
24	*	↓	NS	NS	NS	NS

各CMP遺伝子のノックダウン効率とノックダウン後の心筋細胞分化の変化を示している。*: RNAiにより有意にノックダウンされた ($p < 0.05$ vs. Negative Control); ↓: ノックダウン後に有意に減少した ($p < 0.05$ vs. Negative Control); ↑: ノックダウン後に有意に増加した ($p < 0.05$ vs. Negative Control); NS: 有意差なし。

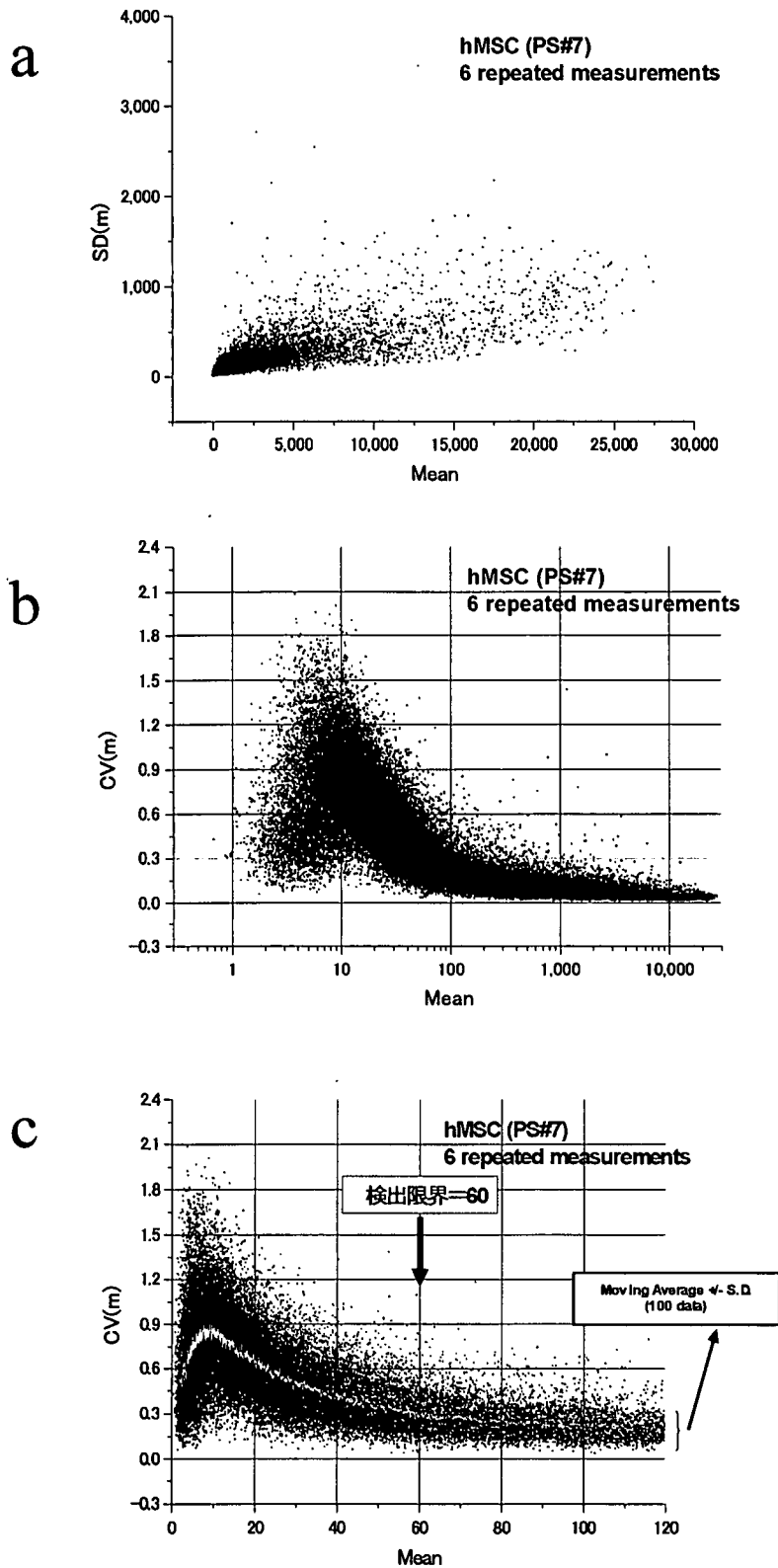


Fig.11 同一cRNAサンプルの繰り返し測定 (6回) における測定シグナルの平均値とデータのばらつきの関係 a)平均値と標準偏差 (S.D.) の関係。発現シグナルの平均値が高いほどS.D.値が高い。b)平均値と変動係数 (CVm) の関係。c) b)のグラフの横軸を線形目盛りとし、平均値の低い部分を拡大したもの。CVm値の移動平均値が0.3を通過するのは測定シグナルの平均値が60のとき。図は継代数7のヒト骨髄間葉系幹細胞のデータ。継代数9の場合も同様であった (データ省略)。

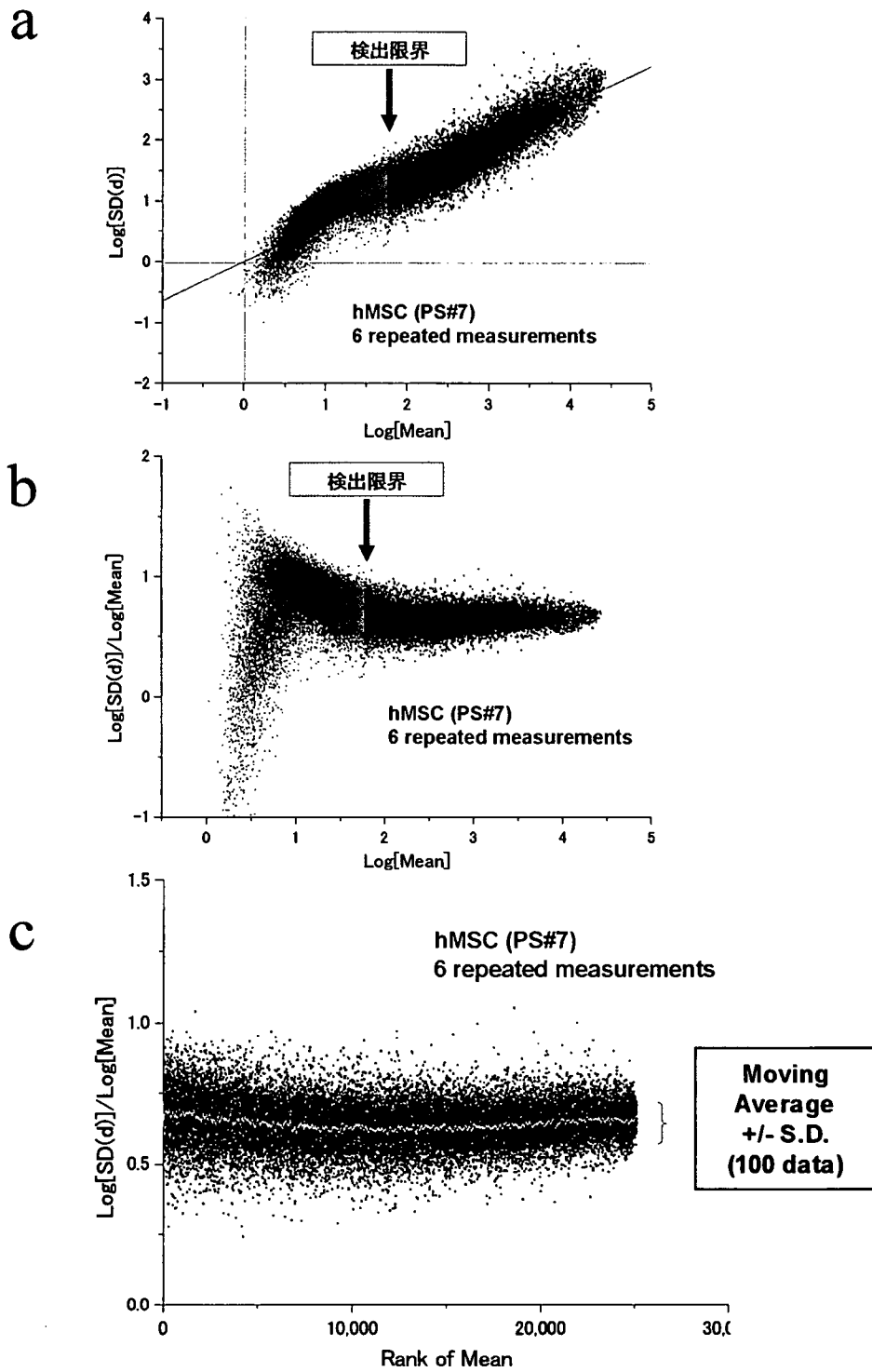


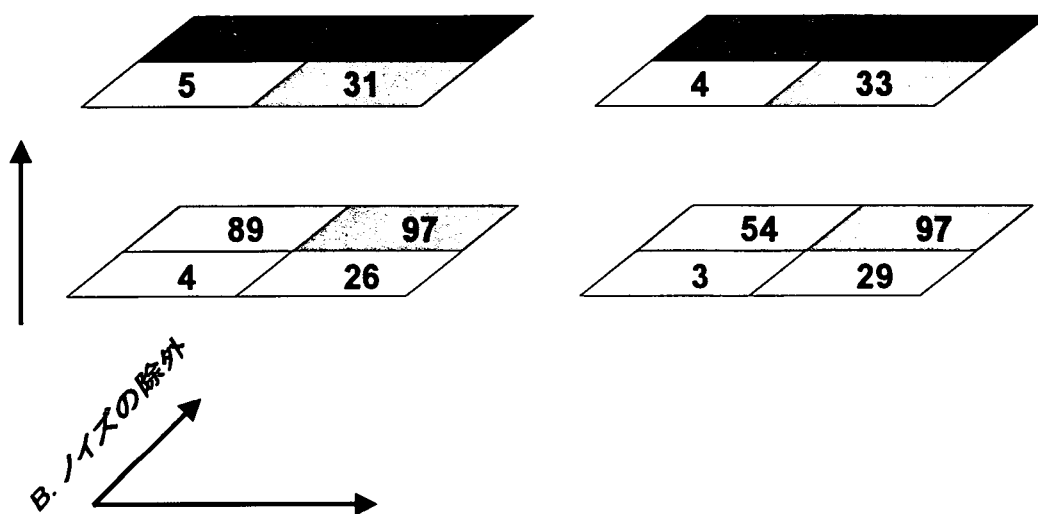
Fig.12 同一cRNAサンプルの繰り返し測定 (6回) における測定シグナルの平均値とS.D.の関係 a)検出限界以上のS.D.値の対数 (青) には平均値の対数との比例関係があるように見える (赤線)。b)検出限界以上では「S.D.値の対数と平均値の対数の比」が平均値に依存しないように見えることを示す。c)横軸は検出限界以上における測定値の平均値の「順位」を示す。検出限界以上の「S.D.値の対数と平均値の対数の比」は平均値に依存しないことを示す。図は継代数7のヒト骨髄間葉系幹細胞のデータ。継代数9の場合も同様であった (データ省略)。

CV値のtop1000の共通性(%)

C. 観測値のCVでなく、サンプルのCVを使用

継代数 7

継代数 9



A. 非特異的ハイブリダイゼーションに由来するシグナルの除外

Fig.13 複数ロットの遺伝子発現測定におけるCV_m値に対するアーチファクト除去の効果をCV_mの順位のtop 1000の共通性で評価
「非特異的ハイブリダイゼーションによるシグナル」と「検出限界以下のシグナル」の影響が大きい。

Gene Ontology Tree: Biological Process

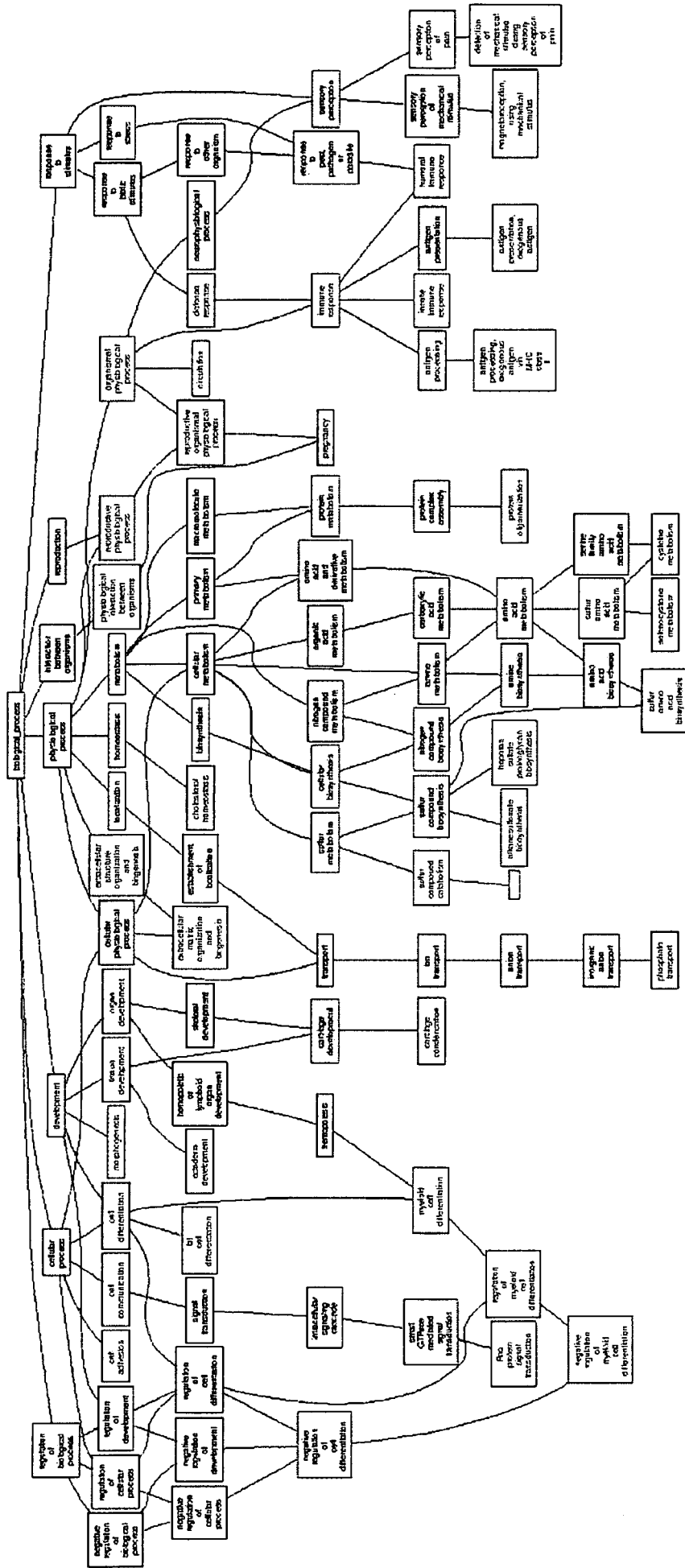


Fig.14a. 複数ロットのヒト骨髄由来間葉系幹細胞の間のばらつき (CV値) の大きい遺伝子に関するオントロジー解析 (Biological Process) 6ロット (継代数7または9) のCV値の高い top 1000 Probe Setsを抽出、継代数9の細胞についても top 1000を抽出し、継代数7と9の top 1000に共通して含まれる428 Probe Setsを抽出した。GOTM* (Vanderbilt Univ)を用い、上記Probe Setの集団に有意($P < 0.01$)に濃縮される生理機能を探査した。赤: 有意($P < 0.01$)に濃縮されるオントロジークラスター

Gene Ontology Tree: Molecular Function

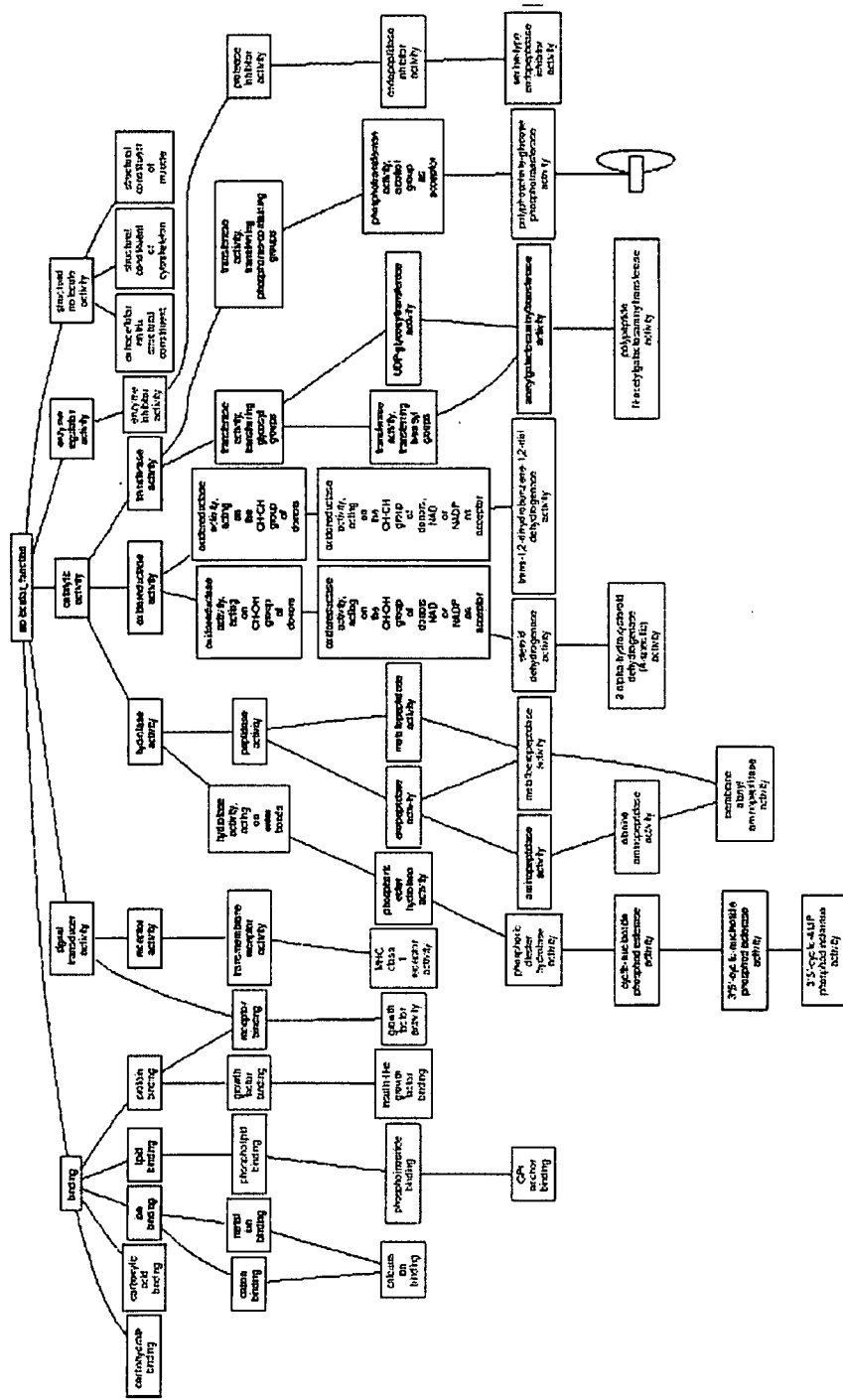


Fig.14b 複数ロットのヒト骨髄由来間葉系幹細胞の間のばらつき (CV値) の大きい遺伝子に関するオントロジー解析 (Molecular Function) 6ロット (継代数7または9) のCV値の高いtop 1000 Probe Setsを抽出、継代数9の細胞についてもtop 1000を抽出し、継代数7と9のtop 1000に共通して含まれる428 Probe Setsを抽出した。GOTM* (Vanderbilt Univ.)を用い、上記Probe Setの集団に有意(P<0.01)に濃縮される生理機能を探索した。赤:有意(P<0.01)に濃縮されるオントロジークラスター