

Fig. II-8 細胞播種密度と測定時の細胞数シグナルとの間の用量作用関係

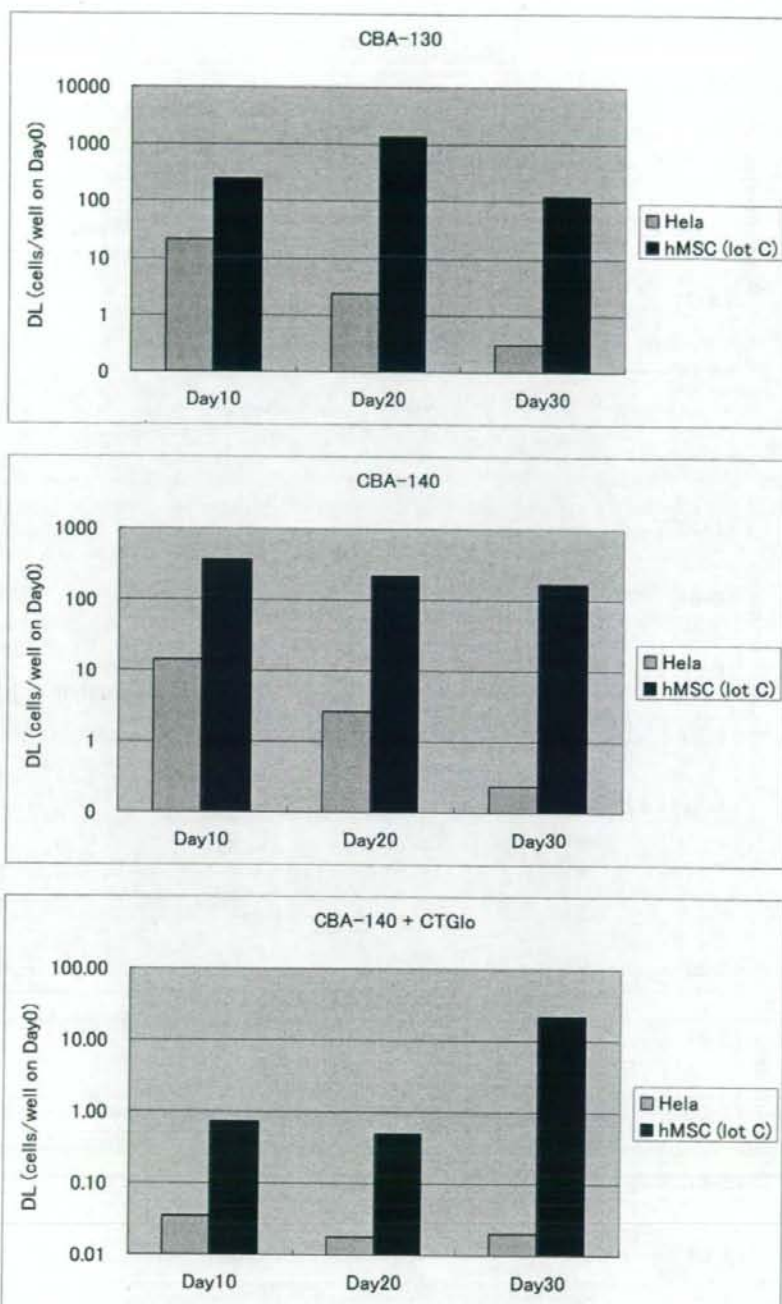


Fig. II-9 三種のアッセイ系の検出限界

培養期間依存的に HeLa 細胞の検出限界は低下した。CBA-140 は CellTiter Glo とのコンビネーションにより HeLa 細胞および hMSC (Lot C) の検出限界を顕著に下げた。

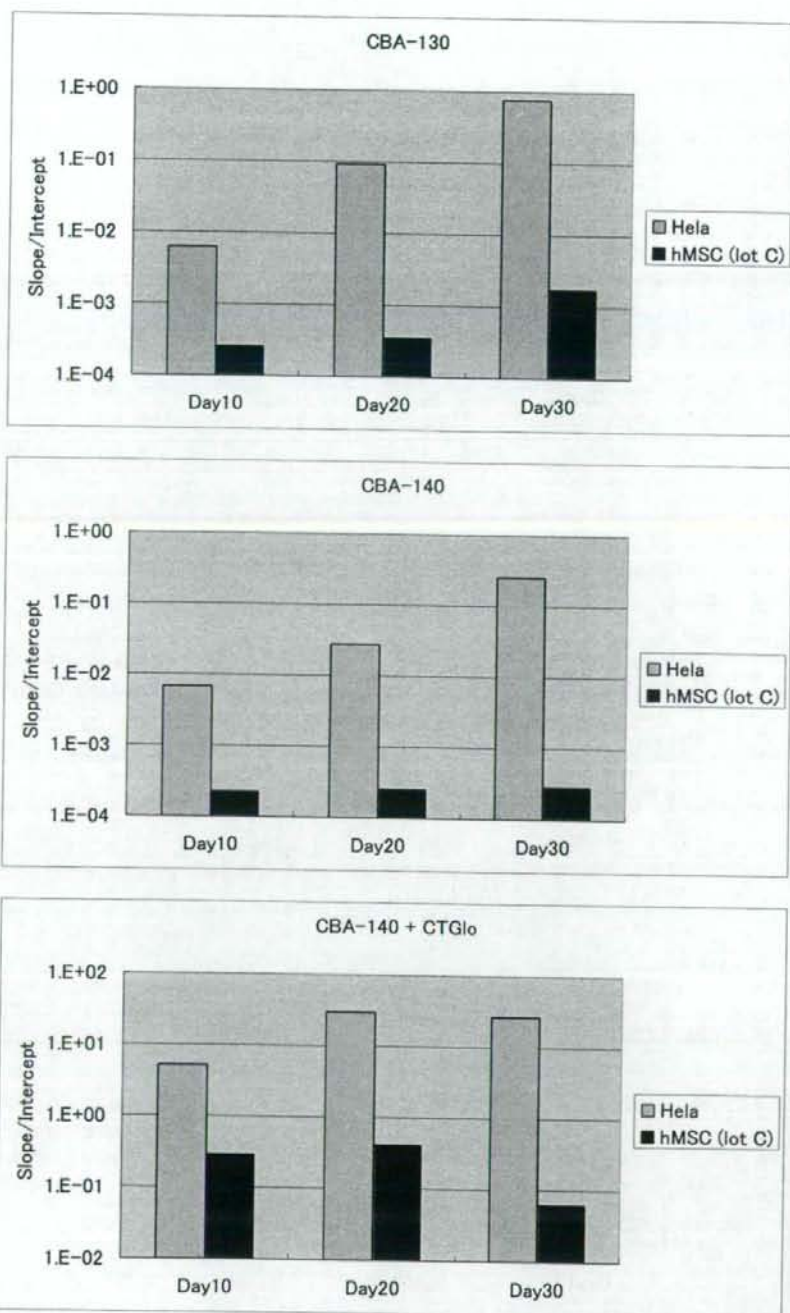


Fig. II-10 三種のアッセイ系の感度

培養期間依存的に HeLa 細胞の感度は増加した。CBA-140 は CellTiter Glo とのコンビネーションにより HeLa 細胞および hMSC (Lot C) の感度を顕著に上げた。

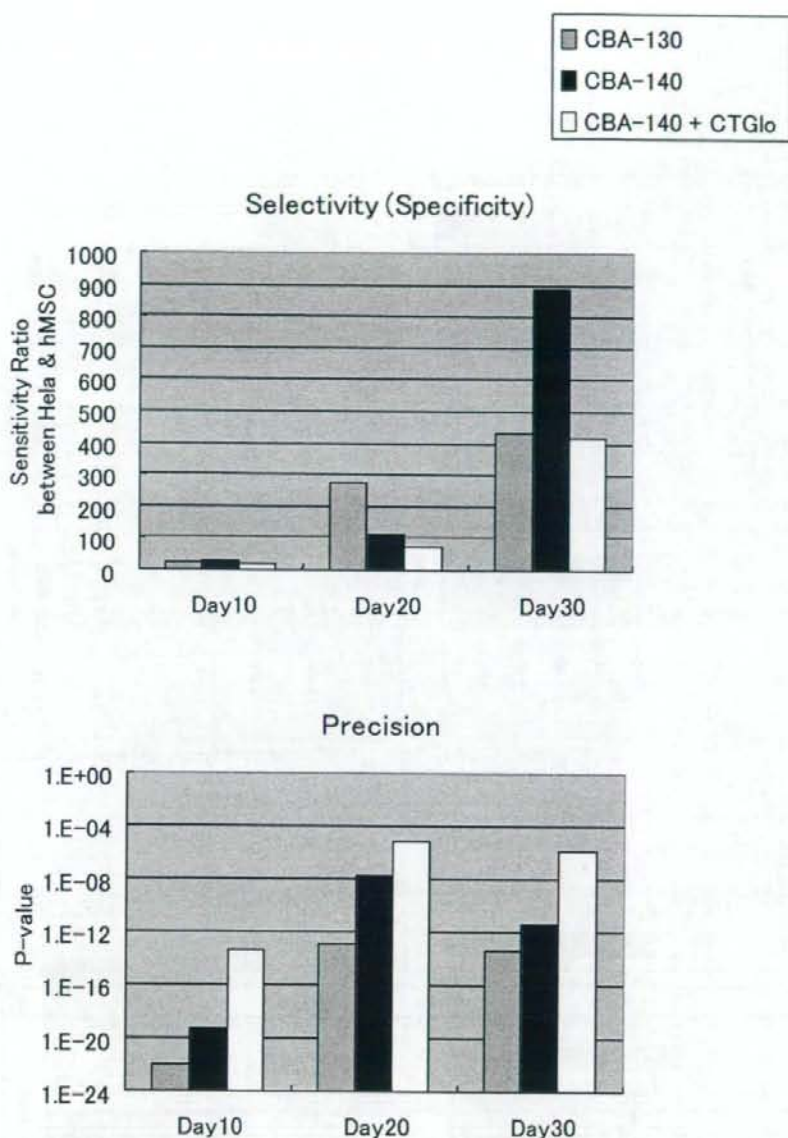


Fig. II-11 三種のアッセイ系の Hela 細胞に対する選択性 (上) および精度 (下)
 hMSC (Lot C)と比較した場合、培養期間依存的に Hela 細胞に対する選択性は増加した。100 倍以上の Hela 細胞選択性を実現するには、10 日以上培養が必要であった。また、Hela 細胞の検量線と hMSC (Lot C)の検量線との間では、培養 20 日目および 30 日目において、CBA-130 は CBA-140 および CBA-140 と CellTiter-Glo とのコンビネーションに比べて低い P 値を示した。

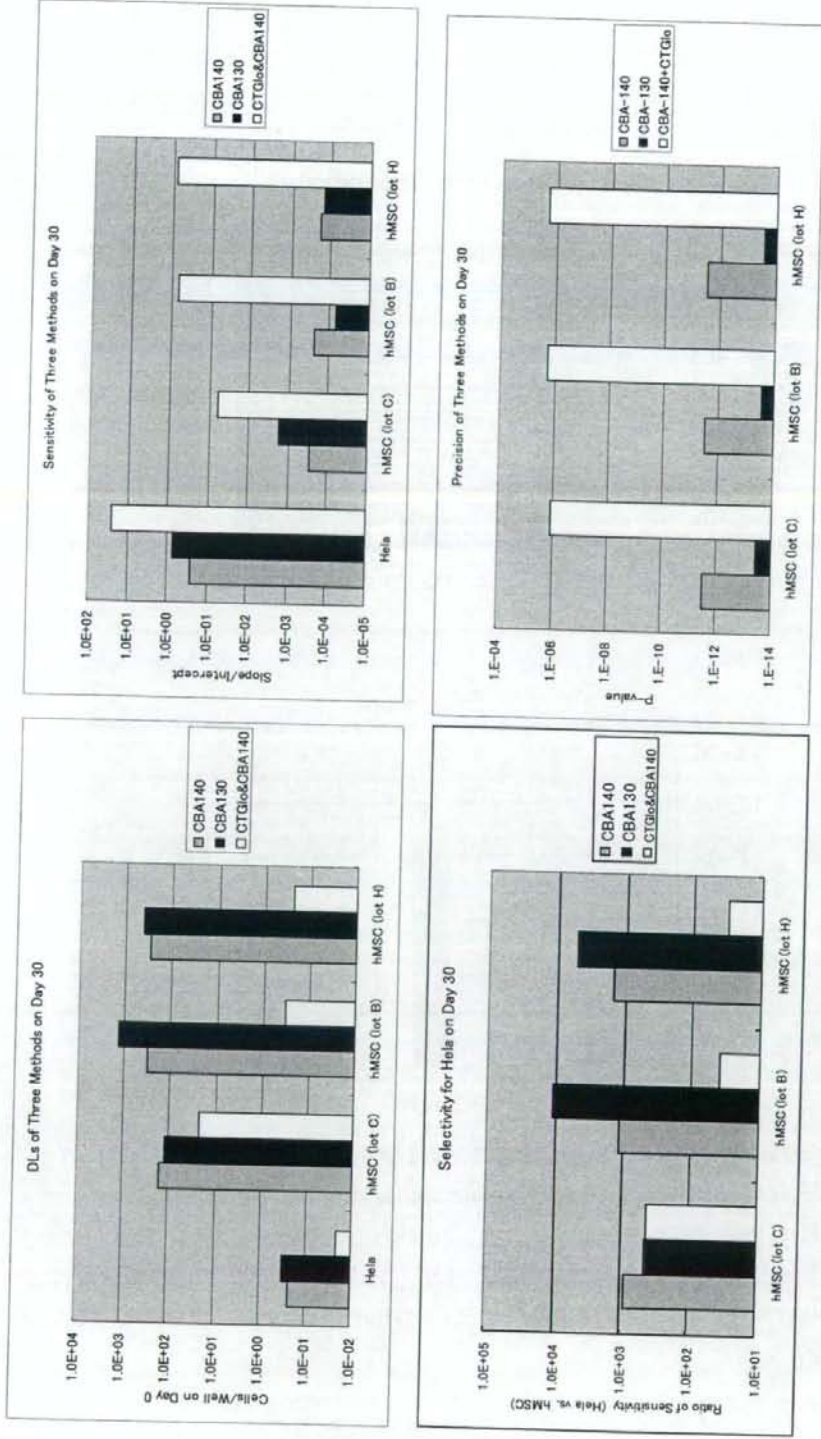


Fig. II-12 hMSCの製造ロット（ドナー）の差による各アッセイ系の特性

培養30日目において、Lot Cに加えて、Lot BおよびHで各アッセイ系の特性を検討した。検出限界と感度の点ではCBA-140とCellTiter-Gloのコンビネーションが優れるが、HeLa細胞への選択性および精度に関してはCBA-130が優れていた。

図 III-1 異常を持つ hMSC 株での核型解析と CGH 解析結果

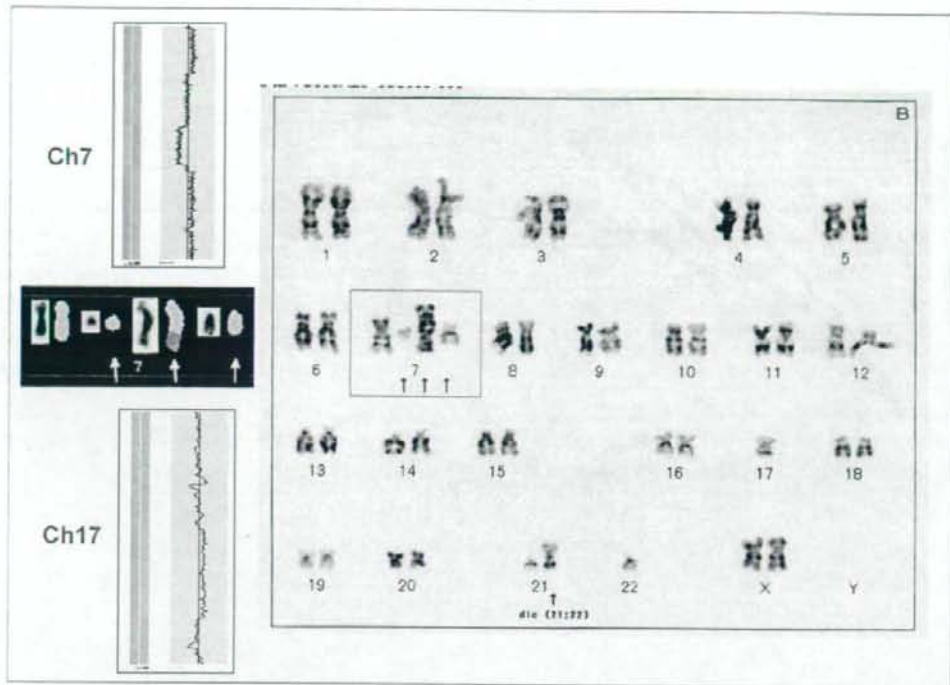


図 III-2 8 番および 17 番染色体セントロメアプローブによる 2 重染色 FISH による異常検出例



図 III-3 hMSC 細胞株の増殖曲線と異常ロット 4 F1560 の FISH 解析による異常頻度変化

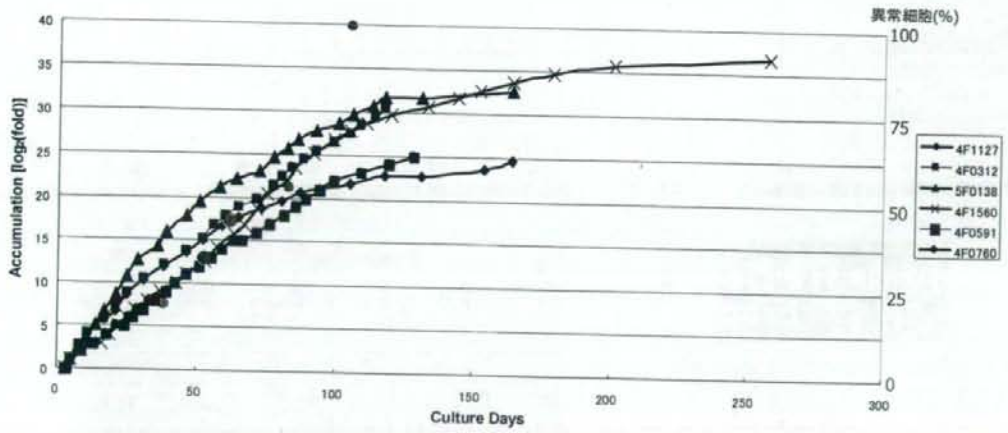


図 III-4 異常ロットの長期培養時の増殖曲線

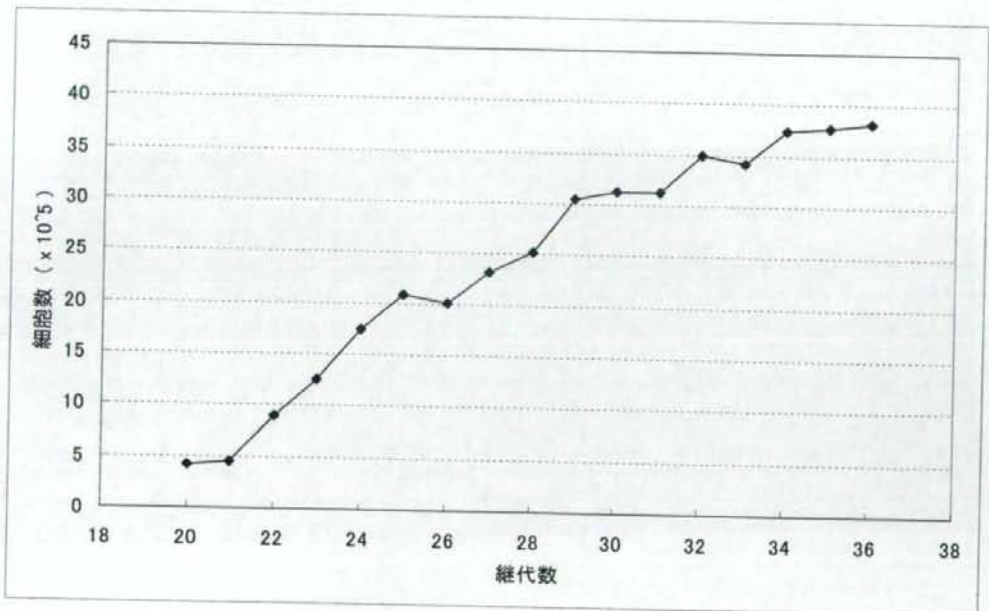


図 III-5 hMSC の培養過程における遺伝子発現変化のクラスター解析

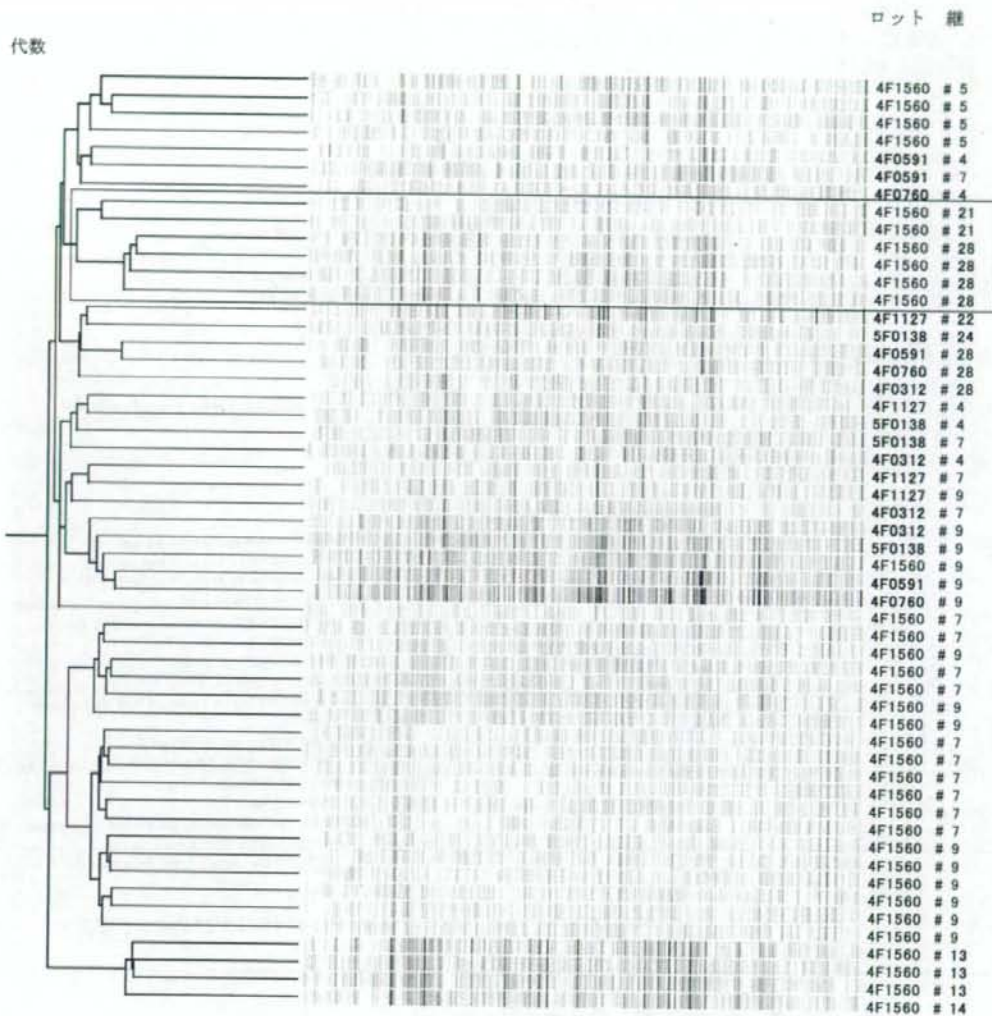
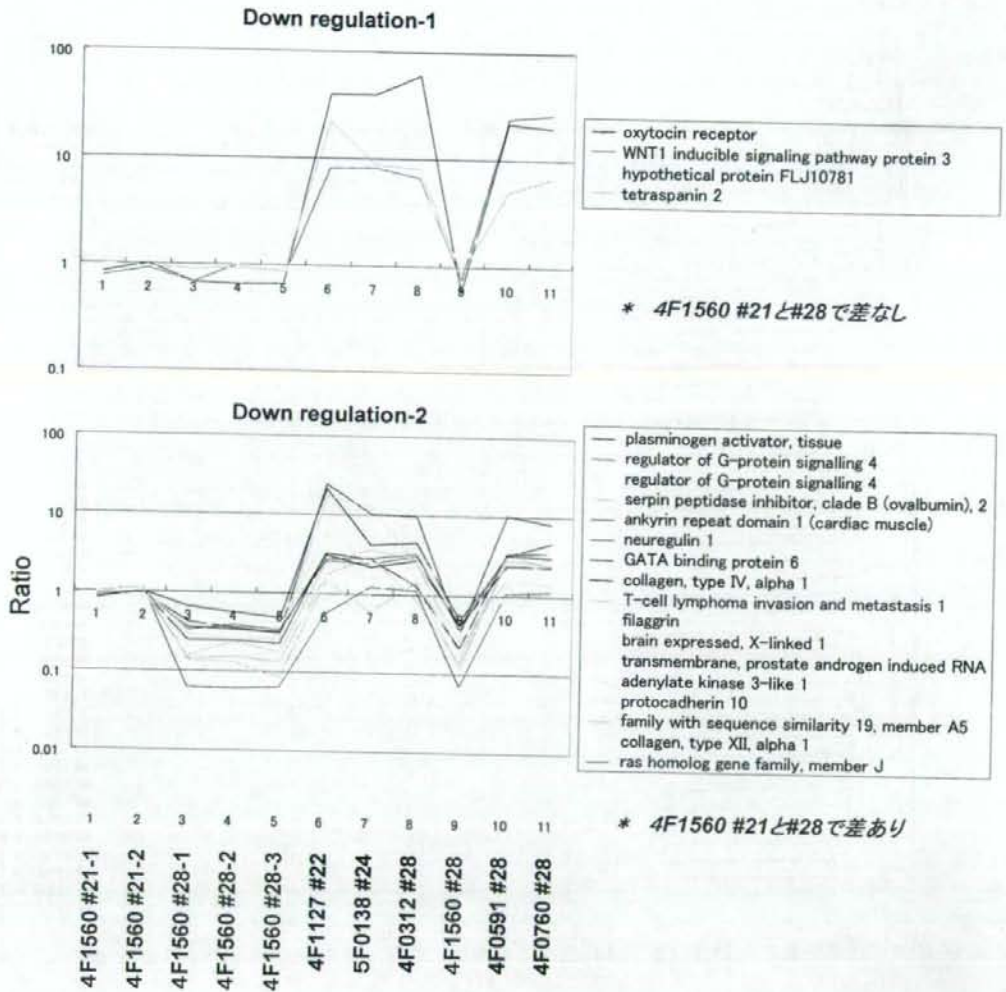


図 III-6 長期培養した異常ロット 4F1560 に特徴的に変化した遺伝子の染色体上の位置



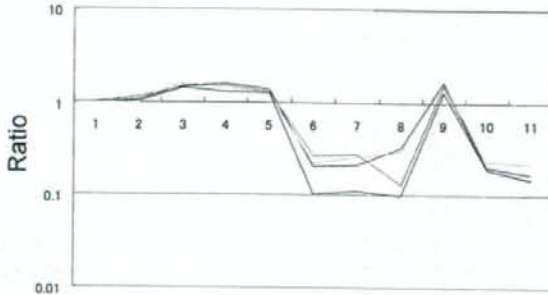
図 III-7 長期培養した異常ロット 4F1560 に特徴的に変化した遺伝子群とそのパターン分類

(異常ロットにおいて発現が低い遺伝子群)



(異常ロットにおいて発現が高い遺伝子群)

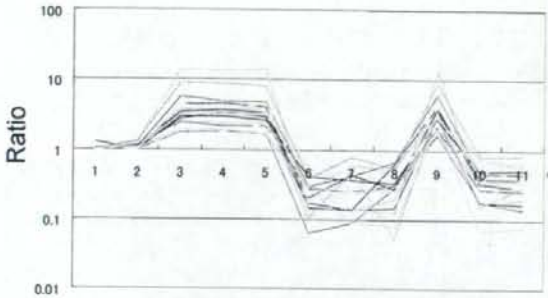
Up regulation-1



- adenosine deaminase
- platelet-derived growth factor receptor-like
- potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J2
- adenosine deaminase
- Potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J2

* 4F1560 #21と#28で差なし

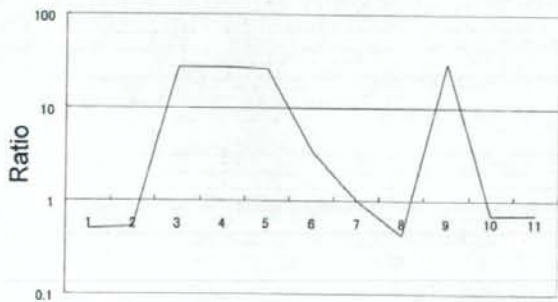
Up regulation-2



- hypothetical gene supported by NM_182582
- fibrin 1
- apolipoprotein E
- CD302 antigen
- fibrin 2
- nephroblastoma overexpressed gene
- G protein-coupled receptor associated sorting protein 1
- loss of heterozygosity, 11, chromosomal region 2 A
- 5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 2B
- potassium voltage-gated channel, Shal-related subfamily 2
- sushi, von Willebrand factor type A
- odd-skipped related 2 (Drosophila)
- CDNA FLJ42670 fis. clone BRAMY2022383
- mannosidase, alpha, class 1C, member 1
- lipopolysaccharide binding protein
- Clones 24632 and 24634 mRNA sequence
- platelet derived growth factor D
- transcription elongation factor A (SID)-like 7
- N-acetylgalactosaminyltransferase-like 2
- SAM domain containing 1
- Transcribed locus
- protocadherin beta 7

* 4F1560 #21と#28で差あり

Up regulation-3



- secretogranin II (chromogranin C)

* 他と少し違うパターン

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11

4F1560 #21-1
 4F1560 #21-2
 4F1560 #28-1
 4F1560 #28-2
 4F1560 #28-3
 4F1127 #22
 5F0138 #24
 4F0312 #28
 4F1560 #28
 4F0591 #28
 4F0760 #28

図 III-8 HL60 細胞のプロテオーム解析における装置間のパフォーマンス比較

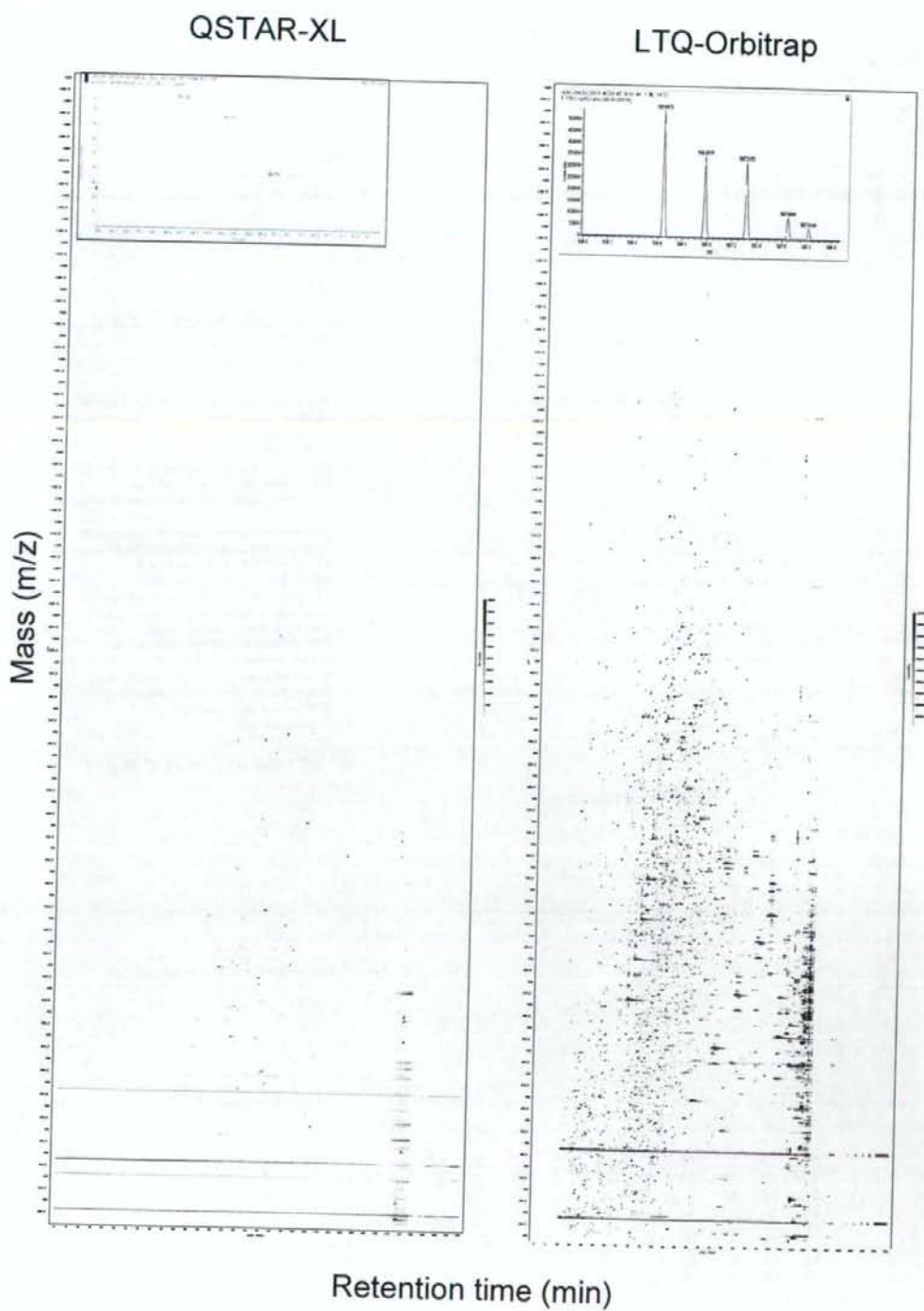


図 III-9 hMSC 細胞のプロテオーム解析

hMSC (4F1560 #18) Pep3D View

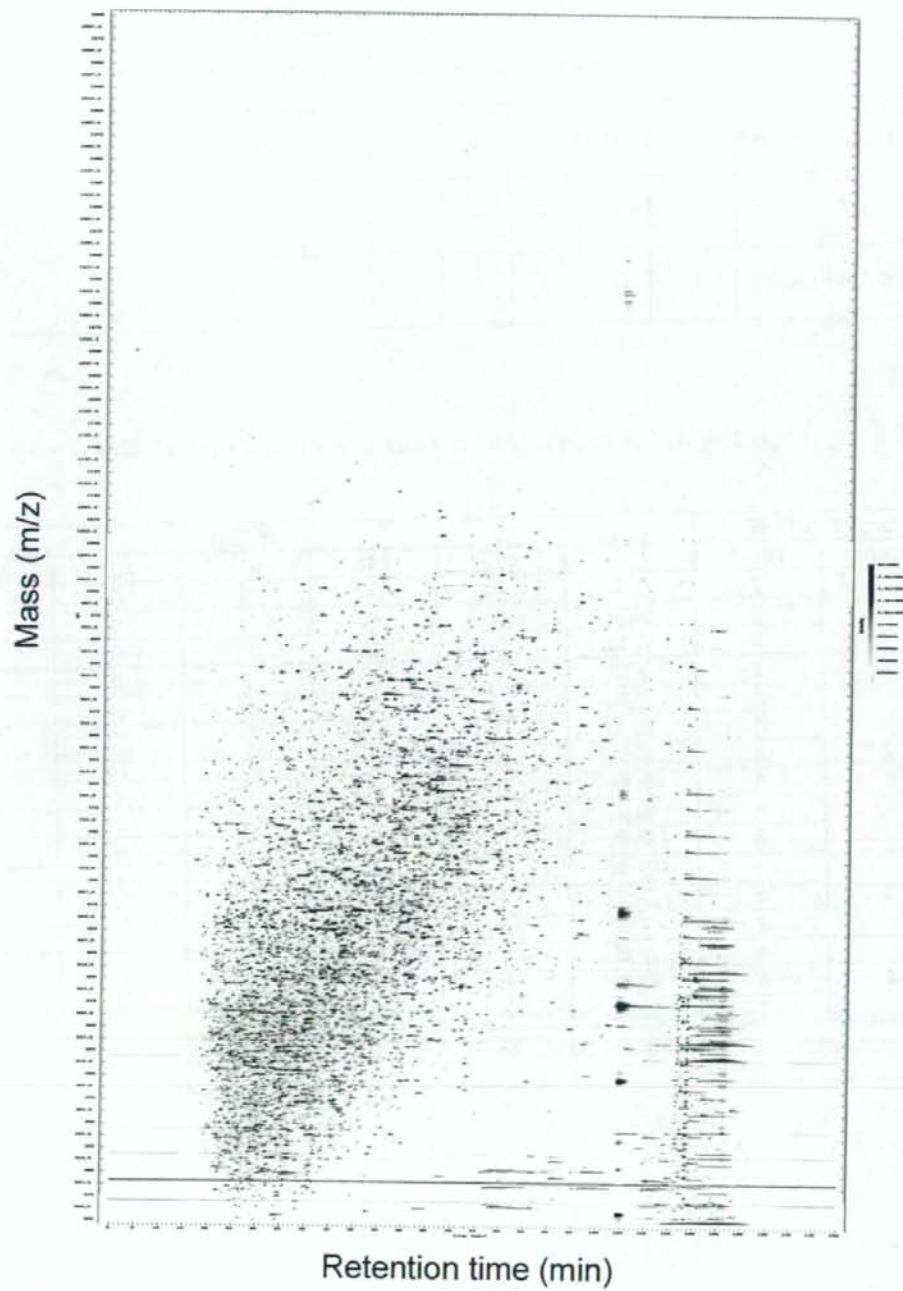


表 III-1 hMSC 細胞の培養過程における染色体変化の普遍性

Cell	hMSC										HSMM
	Lot#	4F0312			5F0138		4F1560		4F0591	4F0760	
<i>Passage#</i>	11	11	23	5	23	7	23	25	22	7	
LOH	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	
Copy Number Change	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	

表 III-2 ロット 4F1560 株の継代過程における FISH シグナル数変化と異常頻度

シグナル個数		判定	細胞数				
Ch8	Ch17		#12	#15	#17	#21	#24
1	2	正常	2	1	3	0	1
	3	異常	1	0	1	1	0
	6	異常	0	0	1	0	0
2	1	正常	1	3	2	0	0
	2	正常	75	60	48	41	0
	3	異常	11	28	34	33	73
	4	異常	5	5	9	13	15
	5	異常	0	0	0	4	5
	6	異常	0	0	0	1	2
	8	異常	0	0	0	0	1
3	2	正常	3	0	0	1	0
	3	正常	1	0	2	2	0
	4	正常	0	1	0	3	2
4	4	正常	1	1	0	0	0
	6	異常	0	1	0	0	1
	7	異常	0	0	0	1	0
合計		正常	83	66	55	47	3
		異常	17	34	45	53	97

表 III-3 ロット 4F1560 株の継代過程における FISH シグナル数変化と異常頻度

Conc.		Time (h)					
uM	ug/ml	1	3	6	24	48	
5	1.51	変化なし	細胞周辺が変化	細胞の端が剥がれる	細胞が剥れる(一部残る)	細胞が剥れる(一部残る)	
1	0.30	変化なし	細胞周辺が変化	細胞の端が剥がれる	細胞が剥れる(一部残る)	細胞が剥れる(一部残る)	
0.5	0.15	変化なし	変化なし	細胞周辺が変化	細胞が剥がれ始める	一部剥がれる	
0.1	0.03	変化なし	変化なし	変化なし	細胞周辺が変化	一部剥がれる	
0.75	0.02	変化なし	変化なし	変化なし	細胞周辺が変化	細胞周辺が変化	

表 III-4 hMSC の自然発生小核頻度に関する予備検討

	~1/3	1/3~1/2	Multi-MN	MN	total MN	分裂期細胞	多核細胞	変形核細胞	正常細胞	カウント細胞数
hMSC F #6	8	0	3	11	11	1	3	0	489	500
	6	2	2	8	10	2	4	0	492	500
hMSC F #26	5	0	0	5	5	1	5	0	495	500
	7	0	1	8	8	3	2	0	492	500

自然小核

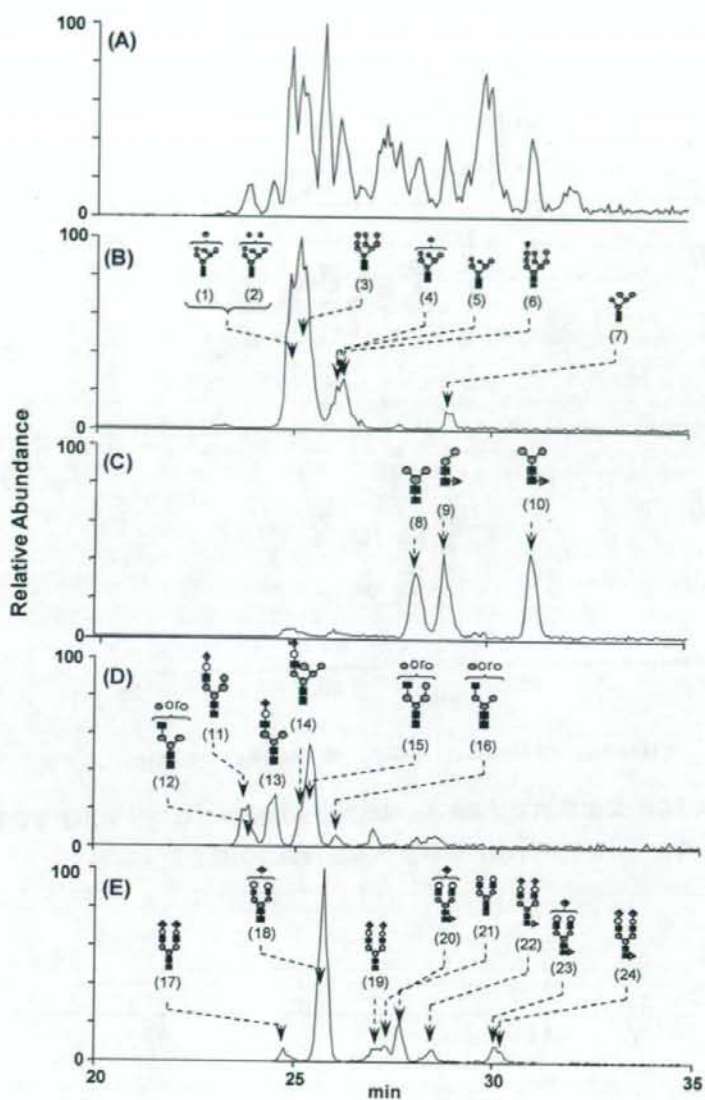
	~1/3	Multi-MN	total MN	カウント細胞数
hMSC F #6	14	5	19	1000
hMSC F #26	12	1	13	1000

表 III-5 つづき

481	482	483	484	485	486	487	488	489	490	491	492	493	494	495	496	497	498	499	500	501	502	503	504	505	506	507	508	509	510	511	512	513	514	515	516	517	518	519	520	521	522	523	524	525	526	527	528	529	530	531	532	533	534	535	536	537	538	539	540	541	542	543	544	545	546	547	548	549	550	551	552	553	554	555	556	557	558	559	560	561	562	563	564	565	566	567	568	569	570	571	572	573	574	575	576	577	578	579	580	581	582	583	584	585	586	587	588	589	590	591	592	593	594	595	596	597	598	599	600	601	602	603	604	605	606	607	608	609	610	611	612	613	614	615	616	617	618	619	620	621	622	623	624	625	626	627	628	629	630	631	632	633	634	635	636	637	638	639	640	641	642	643	644	645	646	647	648	649	650	651	652	653	654	655	656	657	658	659	660	661	662	663	664	665	666	667	668	669	670	671	672	673	674	675	676	677	678	679	680	681	682	683	684	685	686	687	688	689	690	691	692	693	694	695	696	697	698	699	700	701	702	703	704	705	706	707	708	709	710	711	712	713	714	715	716	717	718	719	720	721	722	723	724	725	726	727	728	729	730	731	732	733	734	735	736	737	738	739	740	741	742	743	744	745	746	747	748	749	750	751	752	753	754	755	756	757	758	759	760	761	762	763	764	765	766	767	768	769	770	771	772	773	774	775	776	777	778	779	780	781	782	783	784	785	786	787	788	789	790	791	792	793	794	795	796	797	798	799	800	801	802	803	804	805	806	807	808	809	810	811	812	813	814	815	816	817	818	819	820	821	822	823	824	825	826	827	828	829	830	831	832	833	834	835	836	837	838	839	840	841	842	843	844	845	846	847	848	849	850	851	852	853	854	855	856	857	858	859	860	861	862	863	864	865	866	867	868	869	870	871	872	873	874	875	876	877	878	879	880	881	882	883	884	885	886	887	888	889	890	891	892	893	894	895	896	897	898	899	900	901	902	903	904	905	906	907	908	909	910	911	912	913	914	915	916	917	918	919	920	921	922	923	924	925	926	927	928	929	930	931	932	933	934	935	936	937	938	939	940	941	942	943	944	945	946	947	948	949	950	951	952	953	954	955	956	957	958	959	960	961	962	963	964	965	966	967	968	969	970	971	972	973	974	975	976	977	978	979	980	981	982	983	984	985	986	987	988	989	990	991	992	993	994	995	996	997	998	999	1000
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	------

表 III-6 プロテオーム解析により検出された各種 CD 抗原と間葉系幹細胞特異的表面抗原

CD antigen	proteome解析	hMSCマーカー
CD13	+	+
CD14	-	-
CD29	+	+
CD34	-	-
CD44	+	+
CD45	-	-
CD51	+	
CD59	+	
CD63	+	
CD71	+	+
CD73	+	+
CD81	+	
CD90	+	+
CD91	+	
CD98	+	
CD105	-	+
CD107a	+	+
CD107b	+	+
CD166	+	+
CD225	+	
CD280	+	
CD298	+	



◆ NeuAc, Gal, ● Glc, ■ GlcNAc, ● Man, ▲ Fuc

Fig. IV-1 10% FCS 添加培地で培養した MSC 由来糖鎖のプロファイルと推定構造 (ポジティブイオンモード), (A) TIC, (B) 高マンノース型糖鎖, (C)パウチマンノース型糖鎖, (D)混成型糖鎖, (E)複合型 2 本鎖糖鎖

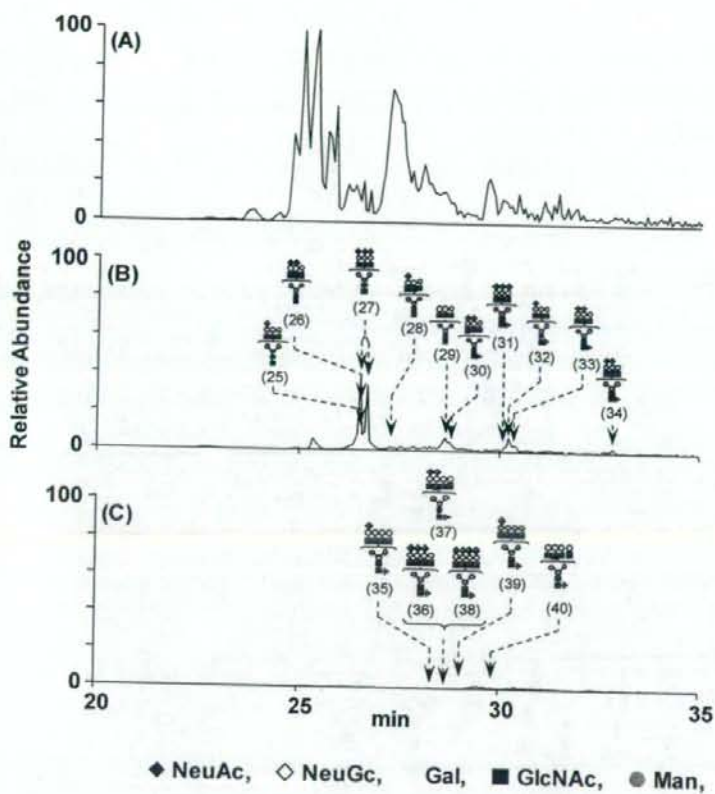


Fig. IV-2 10% FCS 添加培地で培養した MSC 由来糖鎖のプロファイルと推定構造 (ネガティブイオンモード), (A) TIC, (B) 複合型3本鎖糖鎖, (C)複合型4本鎖

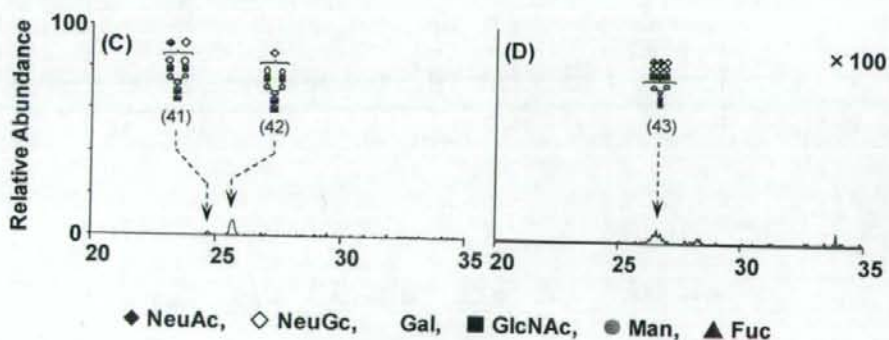


Fig. IV-3 10% FCS 添加培地で培養した MSC 由来 NeuGc 付加糖鎖のプロファイリング. (A) ポジティブイオンモード, (B) ネガティブイオンモード

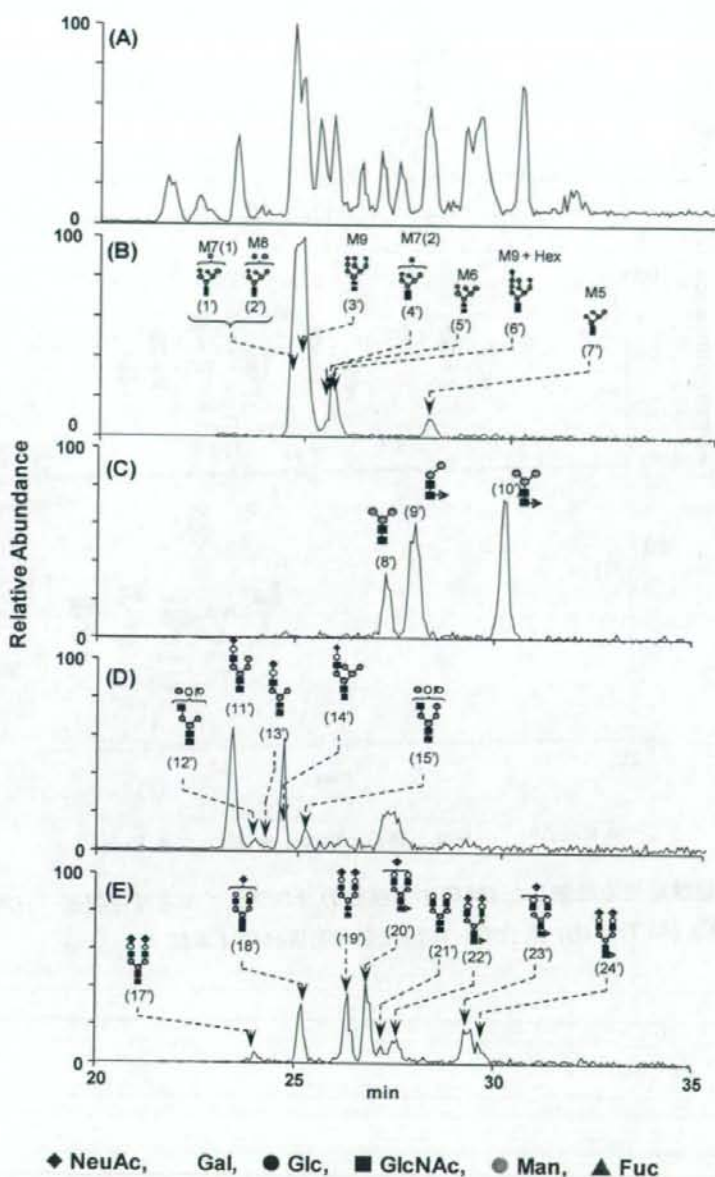


Fig. IV-4 無血清培地で培養した MSC 由来糖鎖のプロファイルと推定構造 (ポジティブオンモード), (A) TIC, (B) 高マンノース型糖鎖, (C)パウチマンノース型糖鎖, (D)混成型糖鎖, (E)複合型 2 本鎖糖鎖