

(単位: copies/reaction)

	HEV panel	1/10 dilution	1/100 dilution	1/1000 dilution	1/10000 dilution
HEV swJR-P5	計算値	235.0	23.5	2.3	0.2
	実測値	284.9	1.8	6.3	—
HEV swJB-E10	計算値	126.2	12.6	1.3	0.1
	実測値	75.8	11.8	—	1.1
HEV swJB-E10cul	計算値	53.8	5.4	0.5	0.1
	実測値	31.4	—	1.8	—
HEV swJB-H7	計算値	162.6	16.3	1.6	0.2
	実測値	223.4	26.7	—	—
HEV swJB-M8	計算値	170.2	17.0	1.7	0.2
	実測値	92.5	3.7	1.5	0.6

検出頻度

: 3/3

: 2/3

図 12 異常を持つhMSC株での核型解析と CGH 解析結果

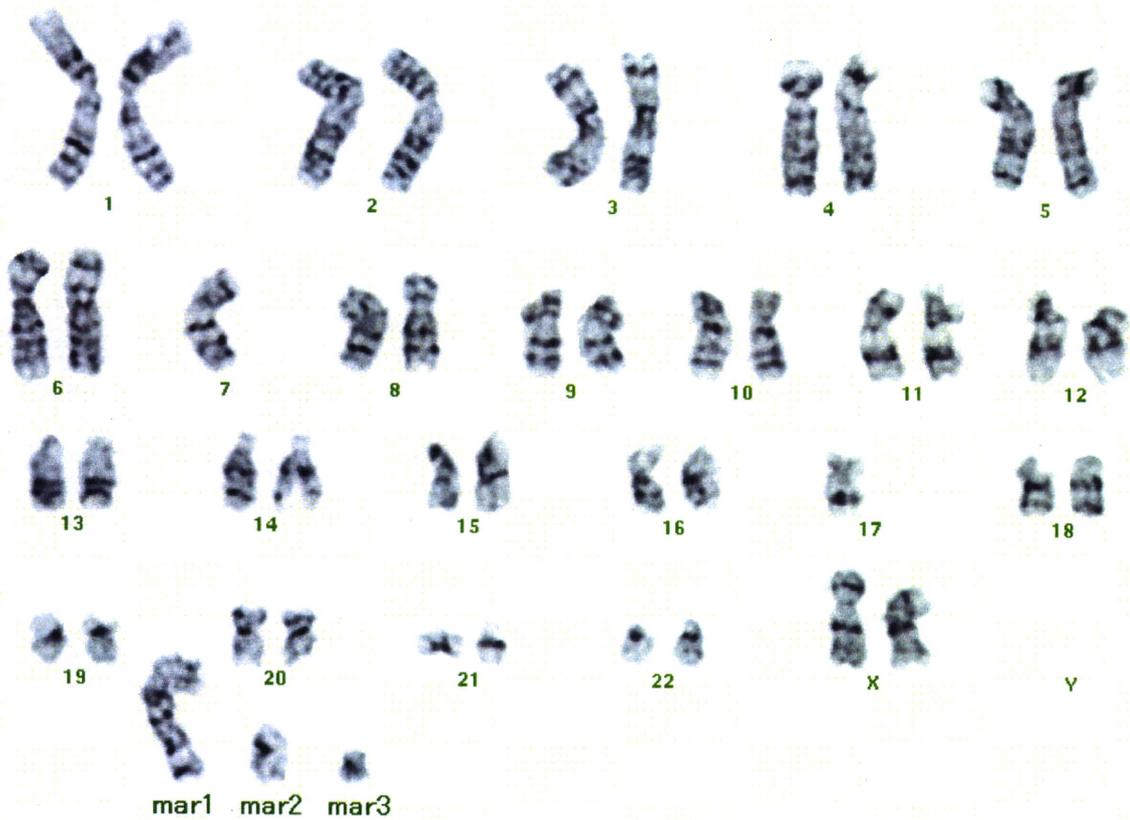
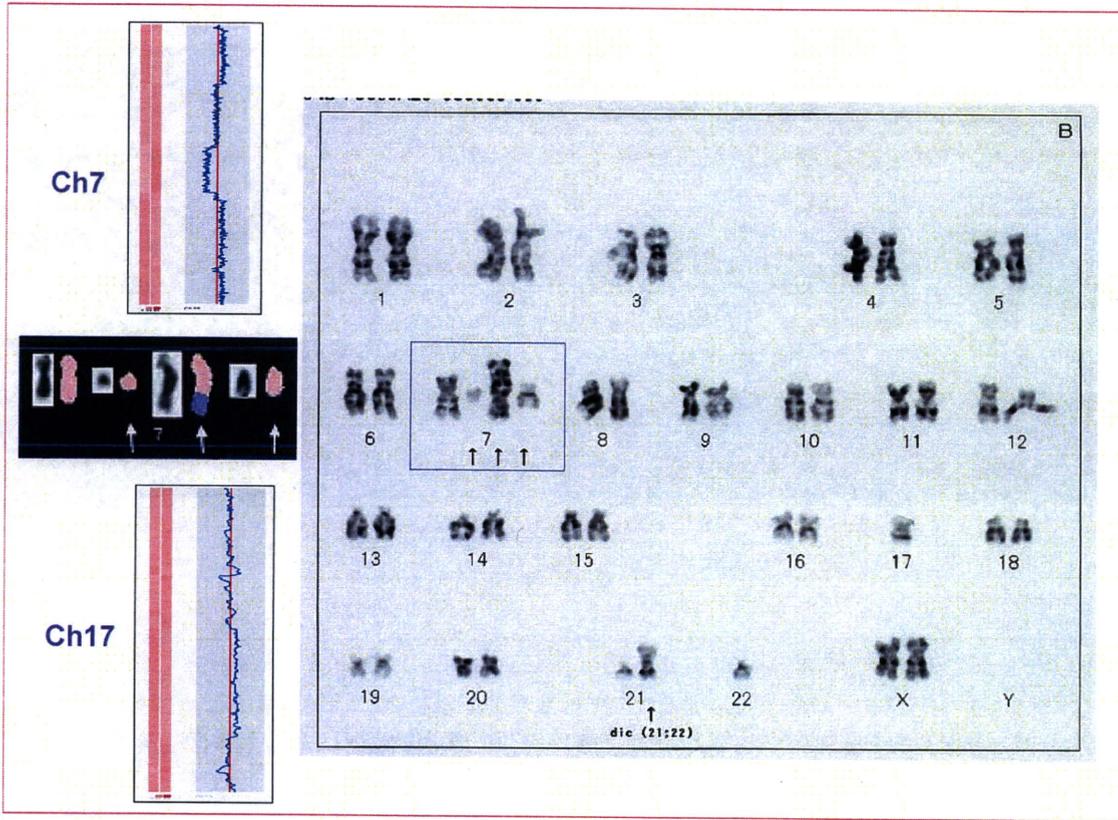


図 13 8番および17番染色体セントロメアプローブによる2重染色FISHによる異常検出例

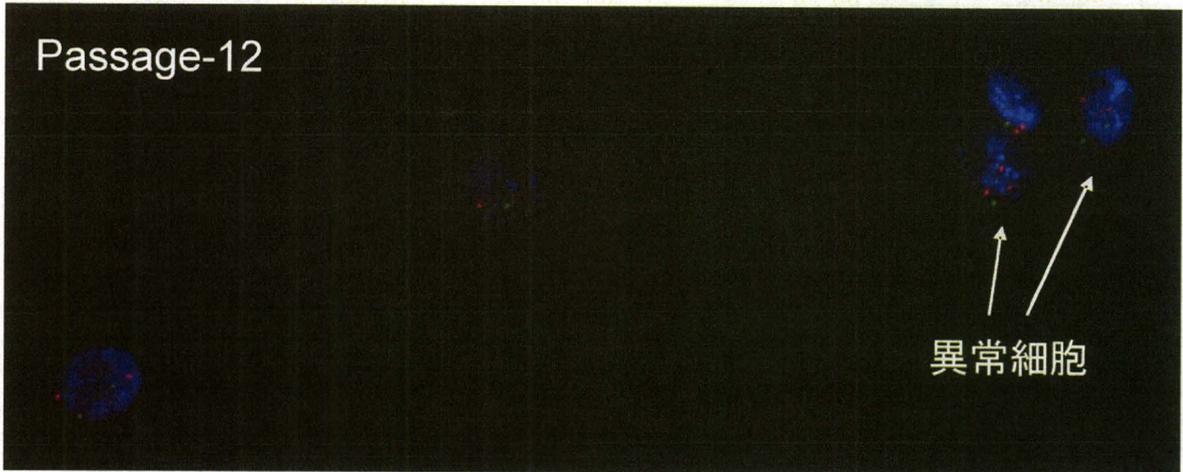


図 14 hMSC 細胞株の増殖曲線と異常ロット 4 F1560 の FISH 解析による異常頻度変化

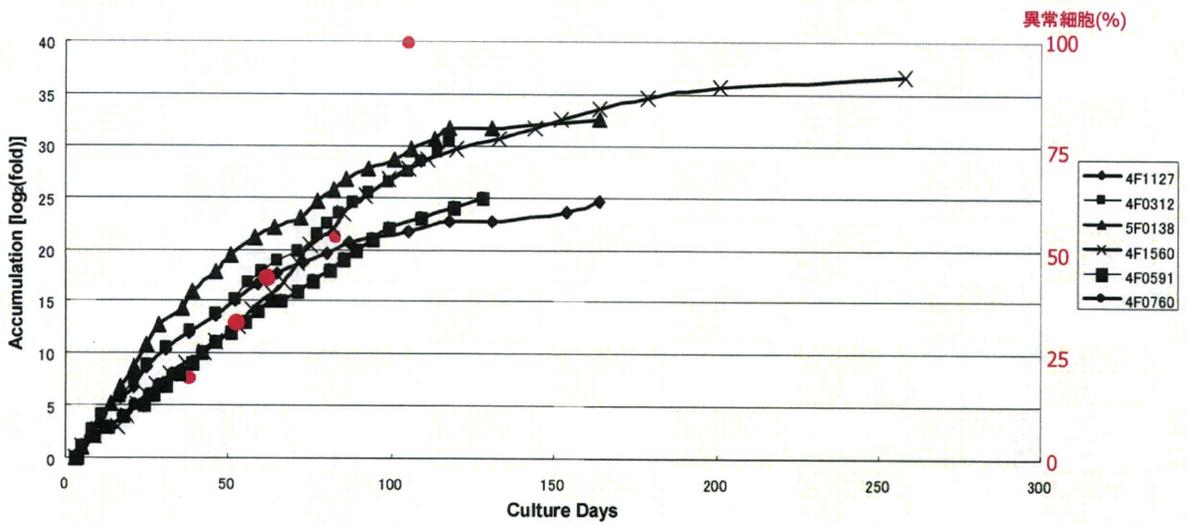


図 15 同一ロット別継代細胞のセントロメア FISH 解析 (入手後 11 継代)

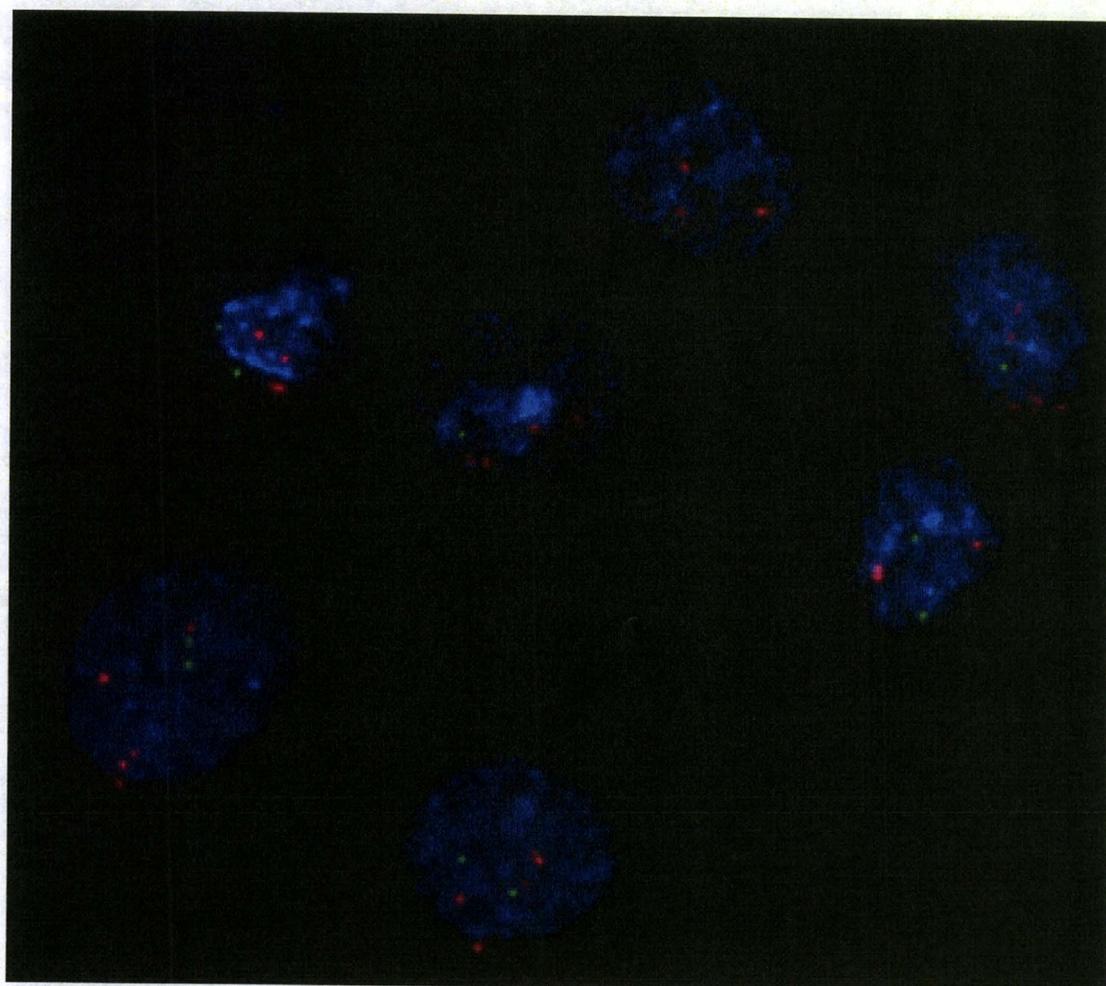
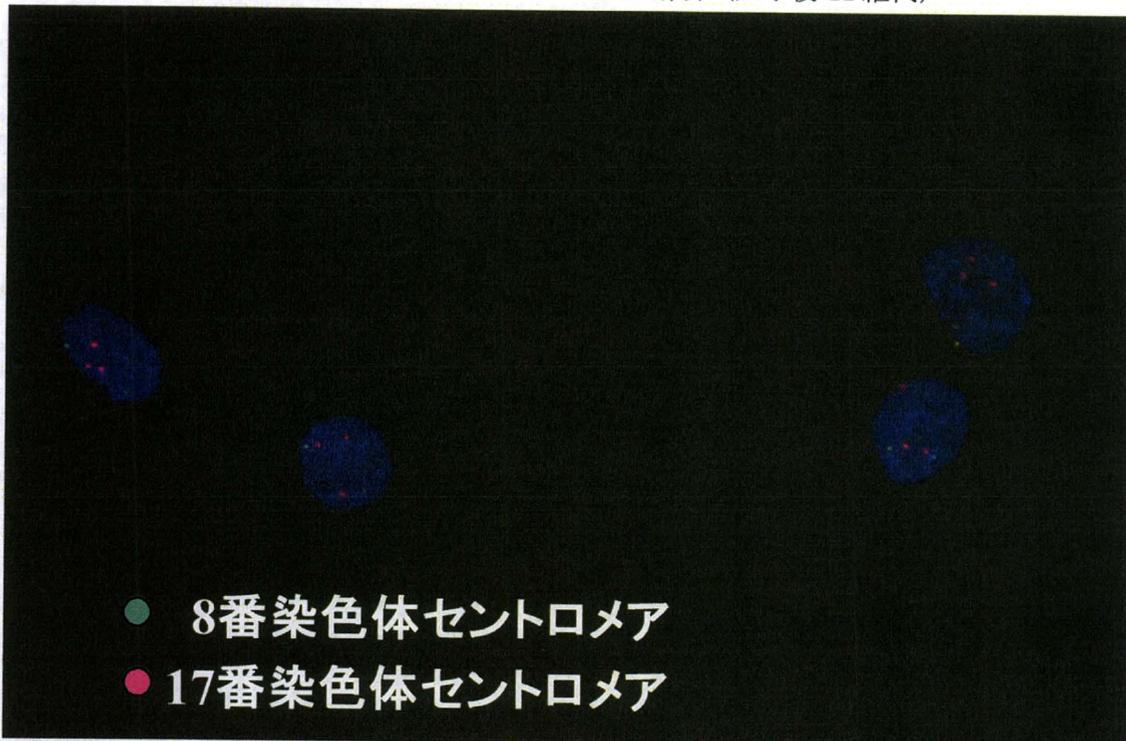


図 16 新しく入手した同一ロット hMSC 細胞の m-FISH 解析 (約 20 継代)

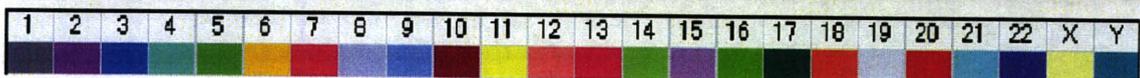
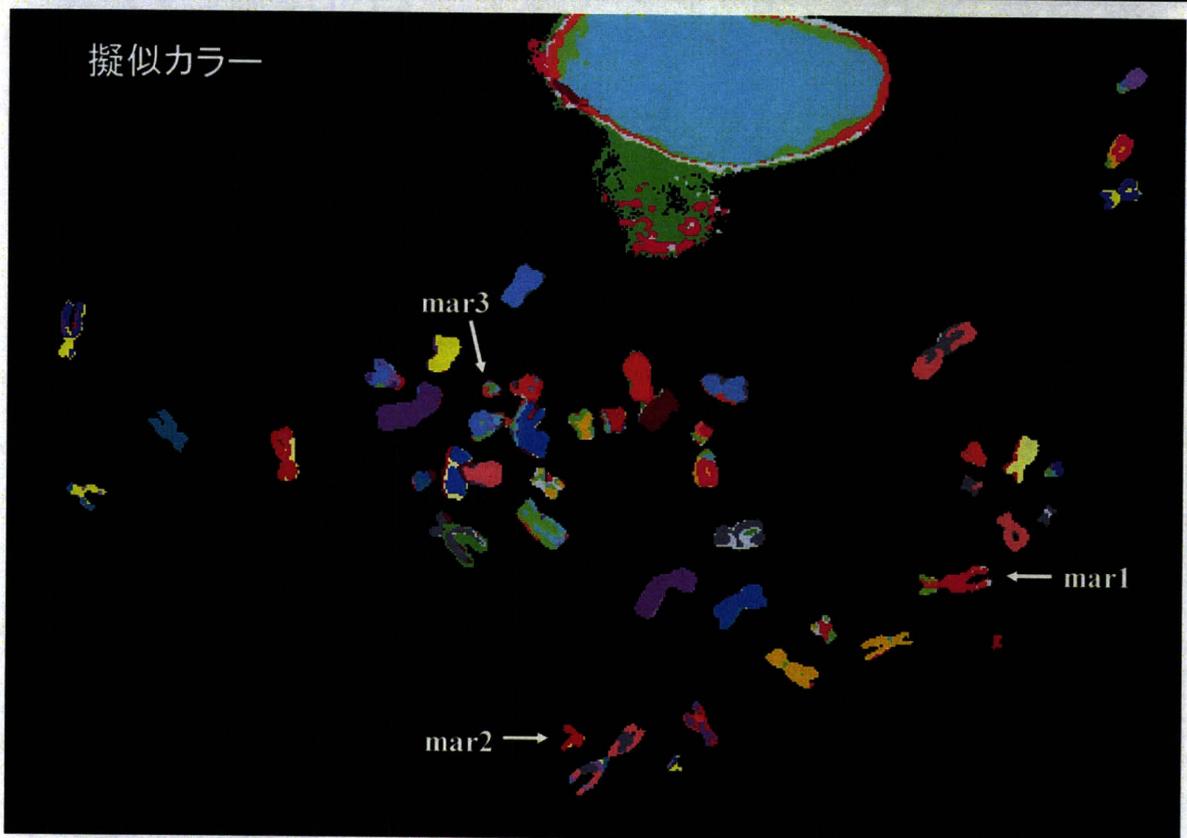
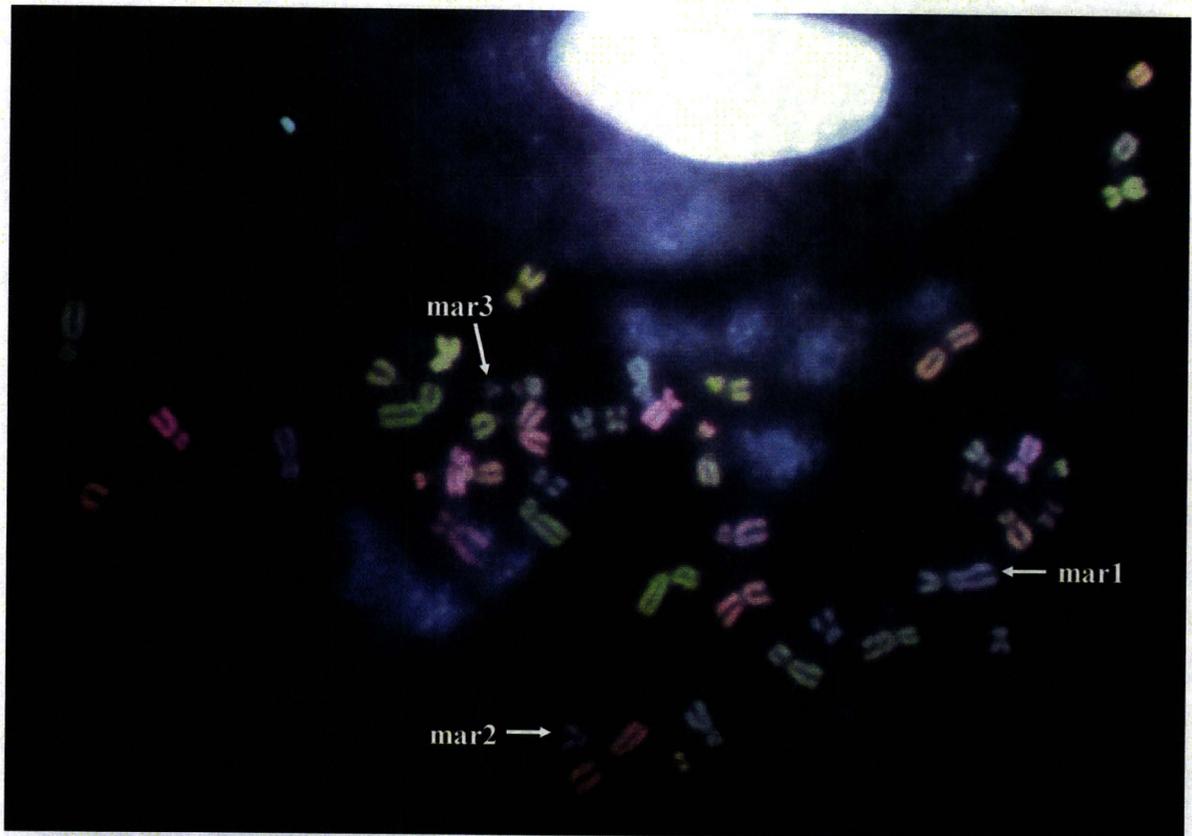


図 17 新しく入手した同一ロット hMSC 細胞のメタフェーズ FISH

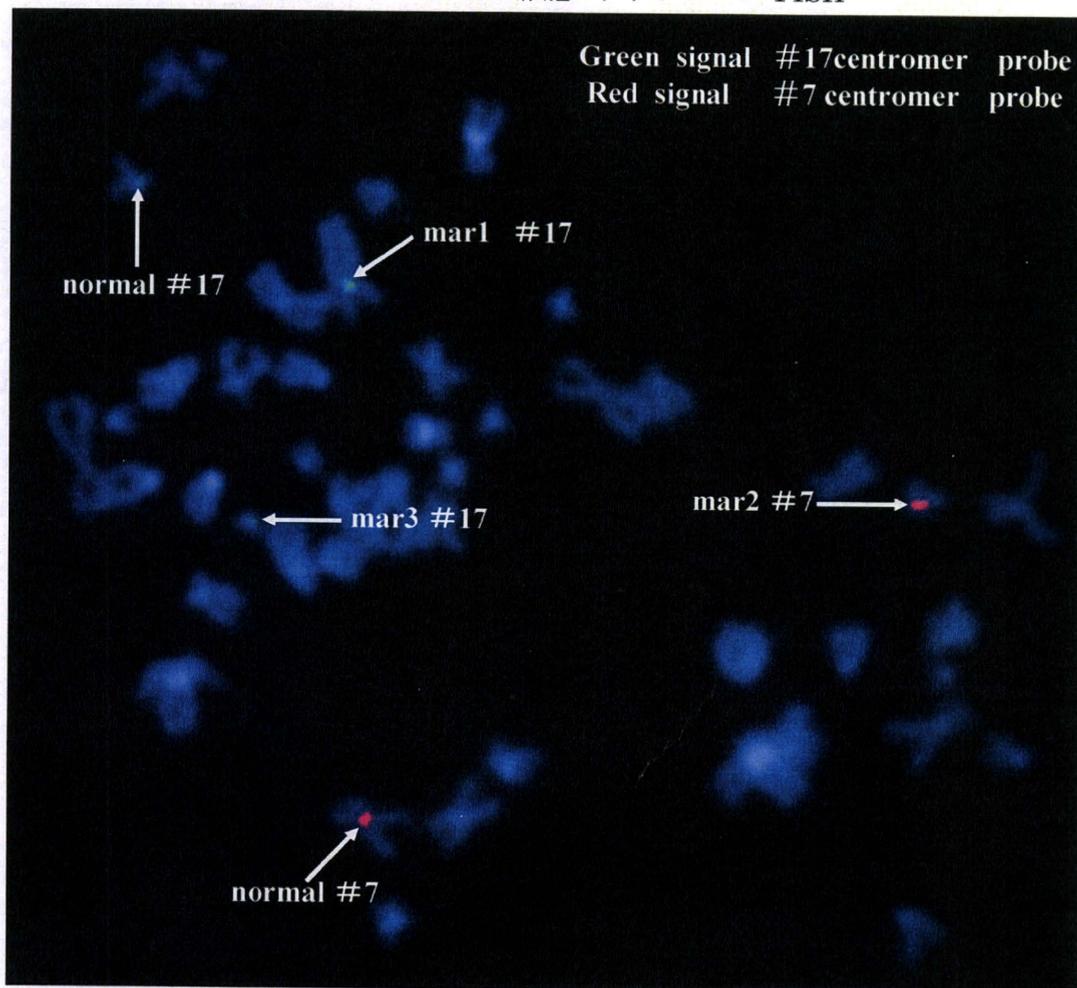


図 18 MSC の培養過程における遺伝子発現変化のクラスター解析

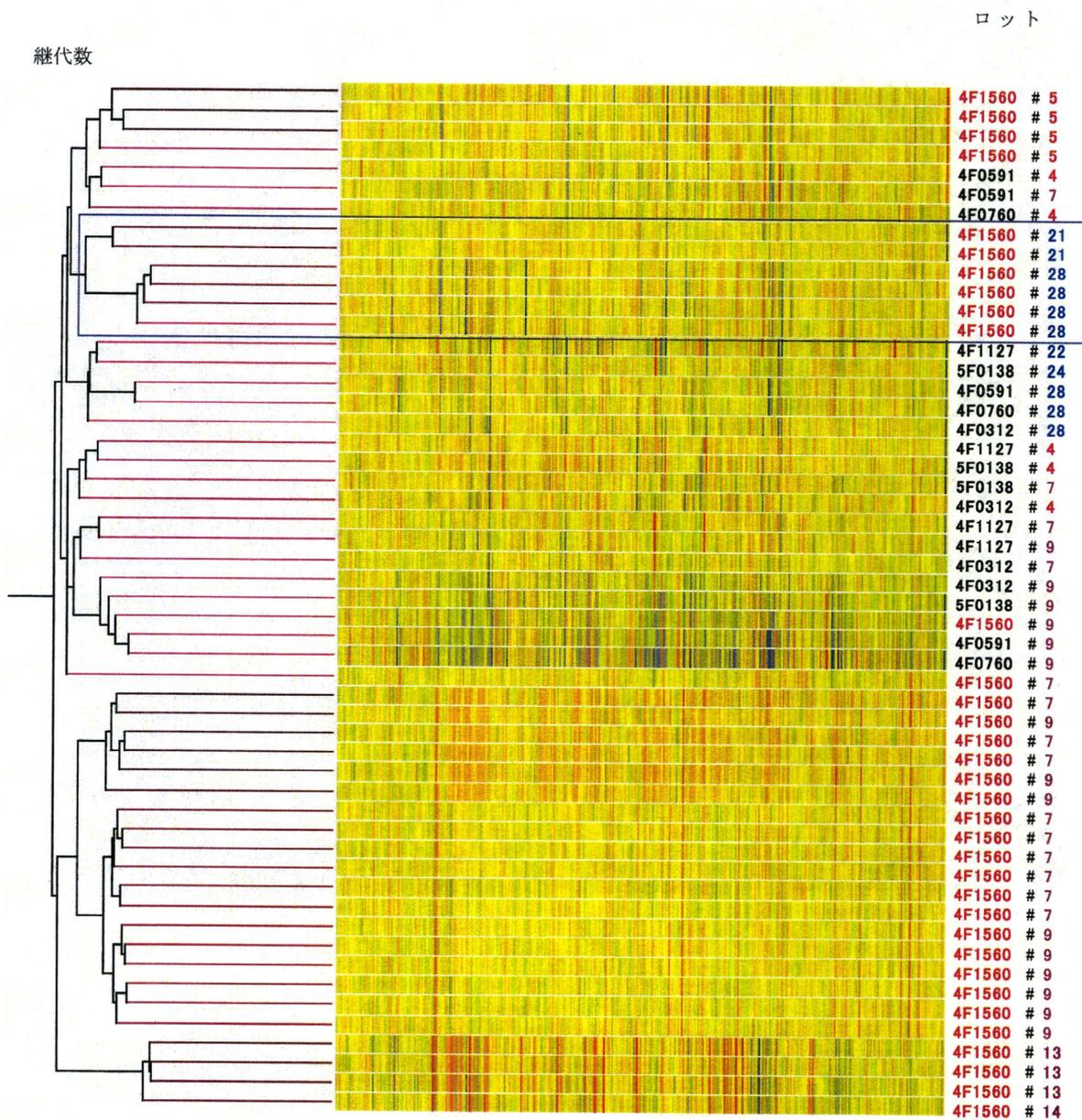


図 19 長期培養した異常ロット 4 F1560 に特徴的に変化した遺伝子の染色体上の位置

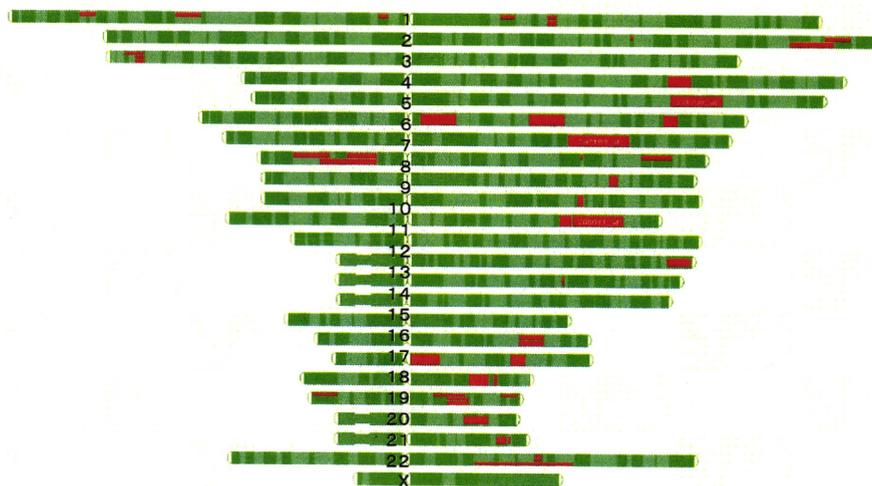
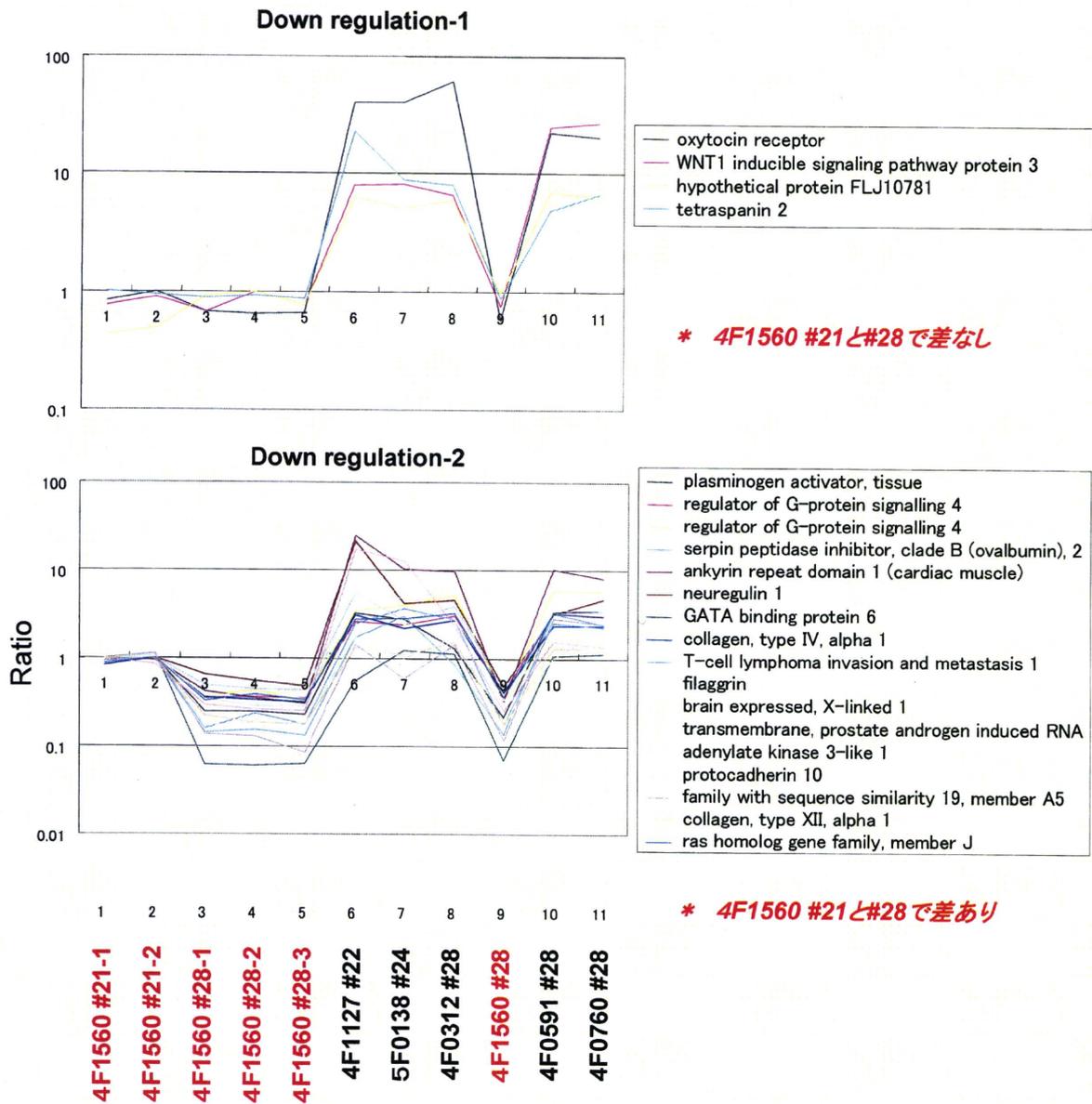


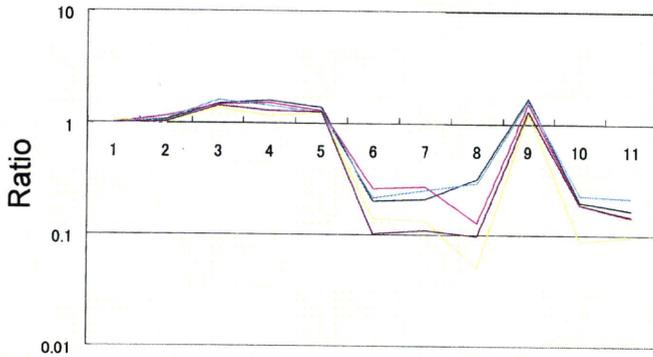
図 20 長期培養した異常ロット 4F1560 に特徴的に変化した遺伝子群とそのパターン分類

(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)

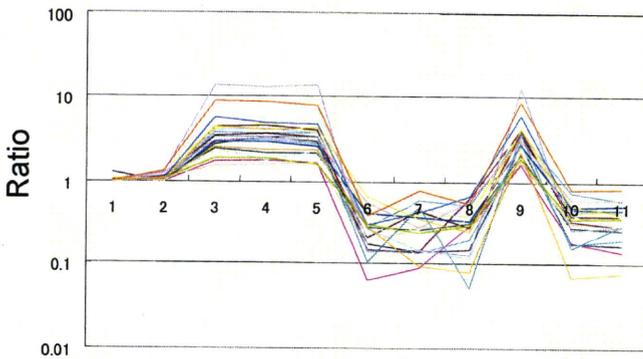
### Up regulation-1



- 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

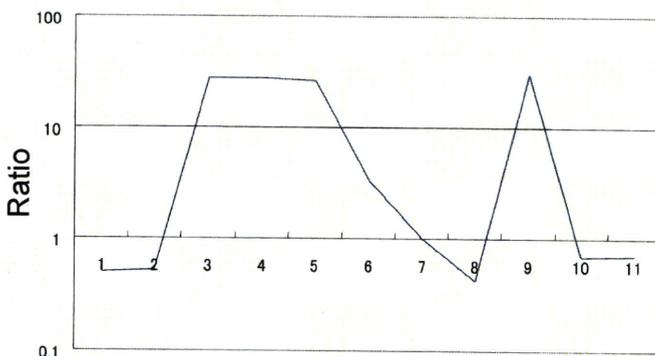
### Up regulation-2



- hypothetical gene supported by NM\_182582
- fibulin 1
- apolipoprotein E
- CD302 antigen
- fibulin 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 (SII)-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 21 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

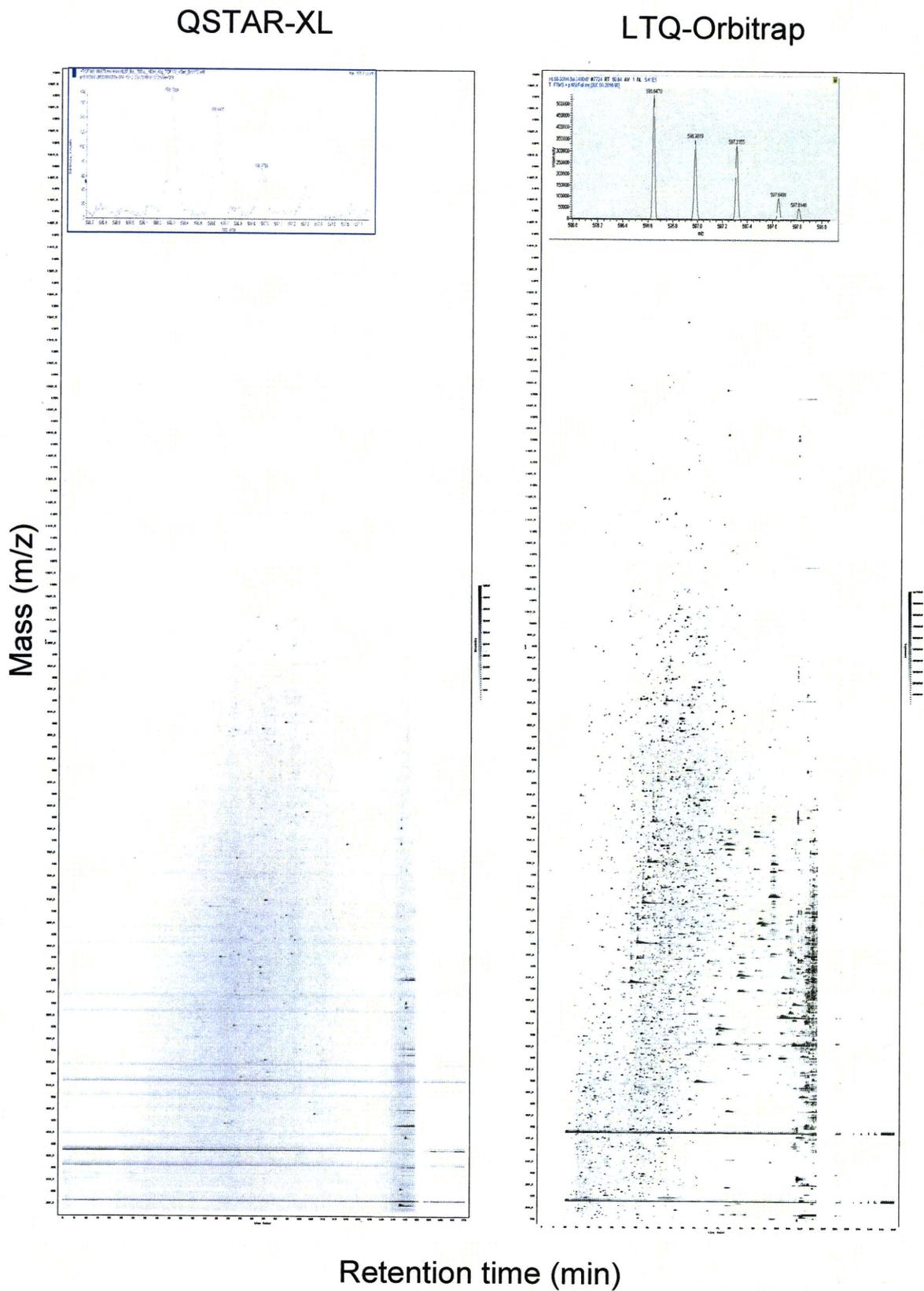


図 22 hMSC 細胞のプロテオーム解析

hMSC (4F1560 #18) Pep3D View

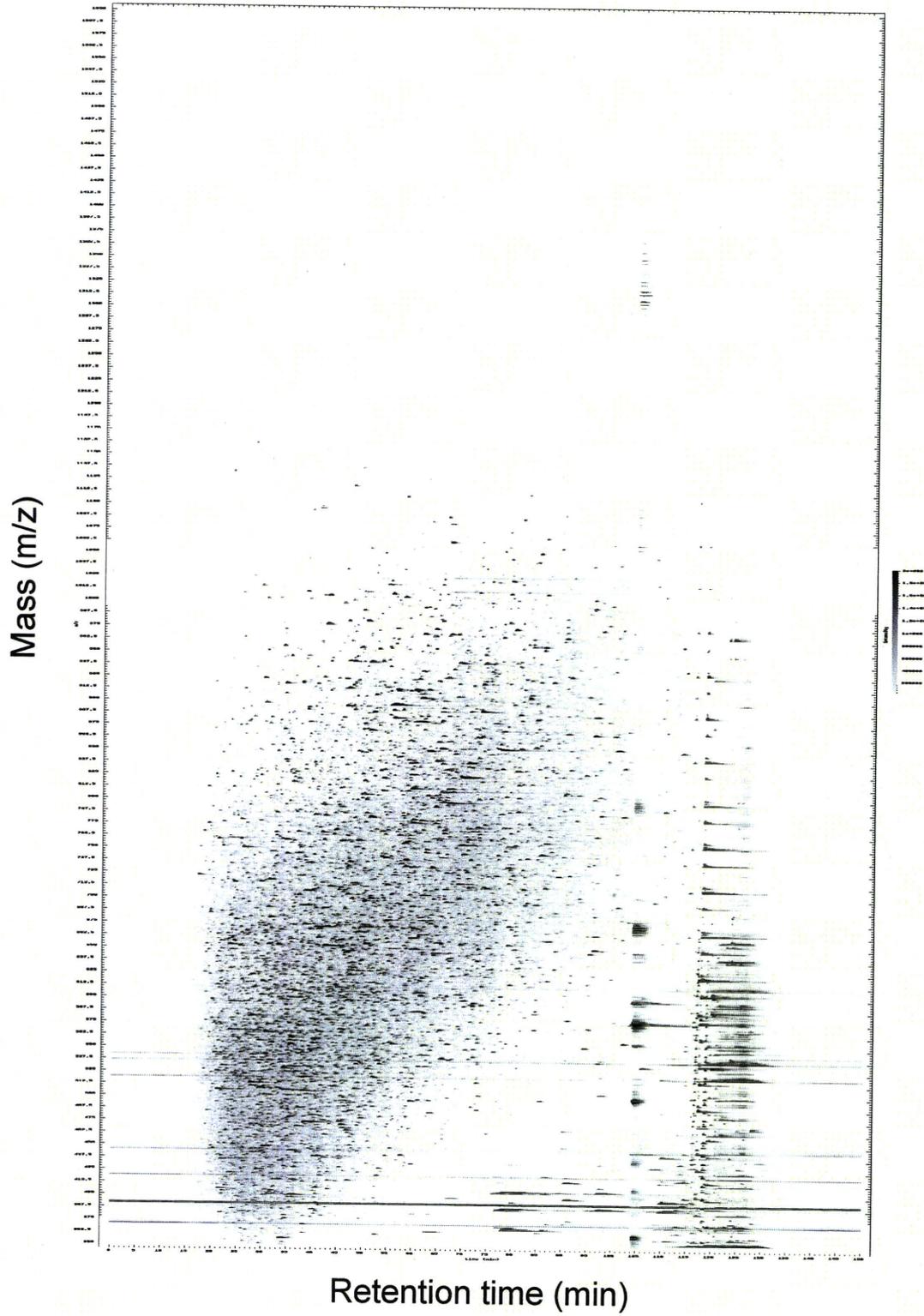


図 23 検出された間葉系幹細胞特異的 CD 抗原の 2 次元マップ上の位置

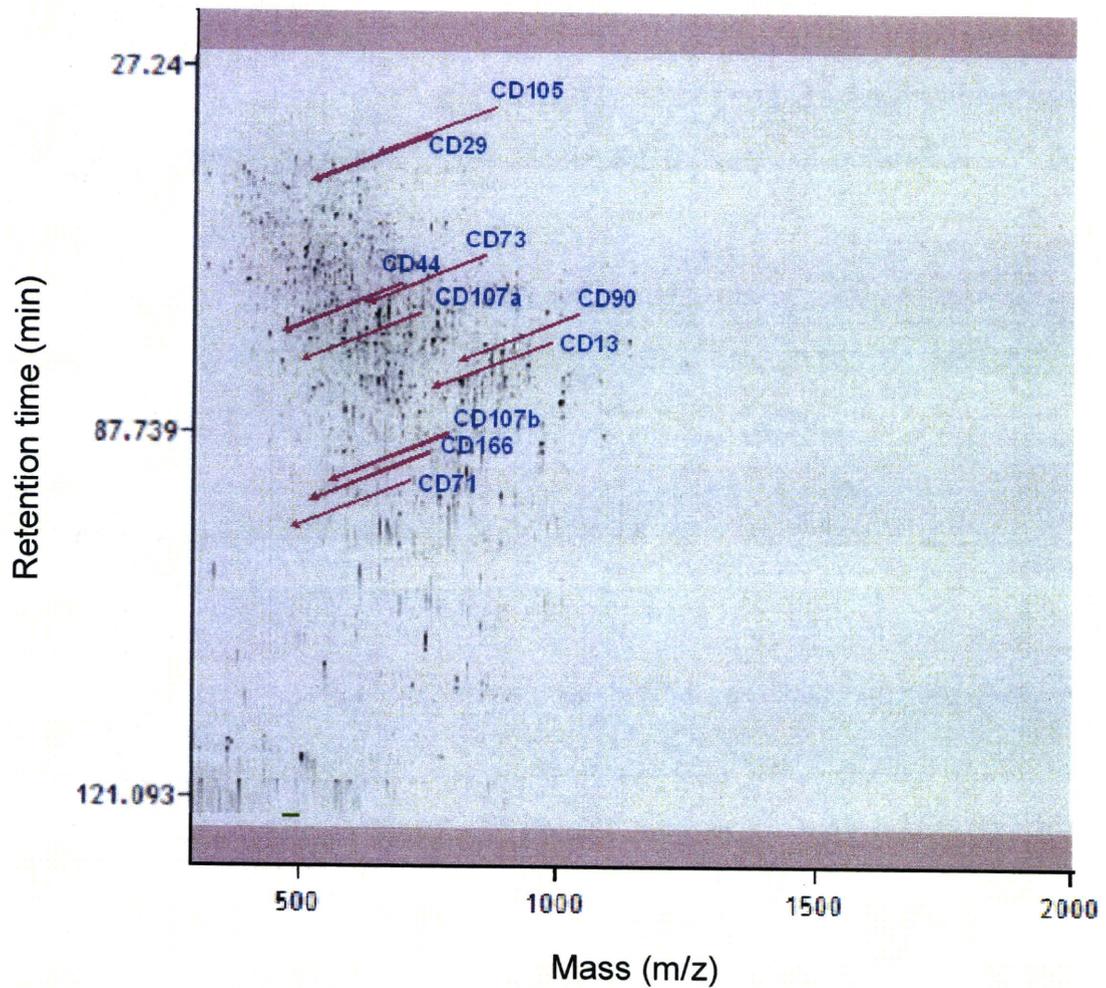


図 24 安定同位体ラベルペプチドのピークプロファイル

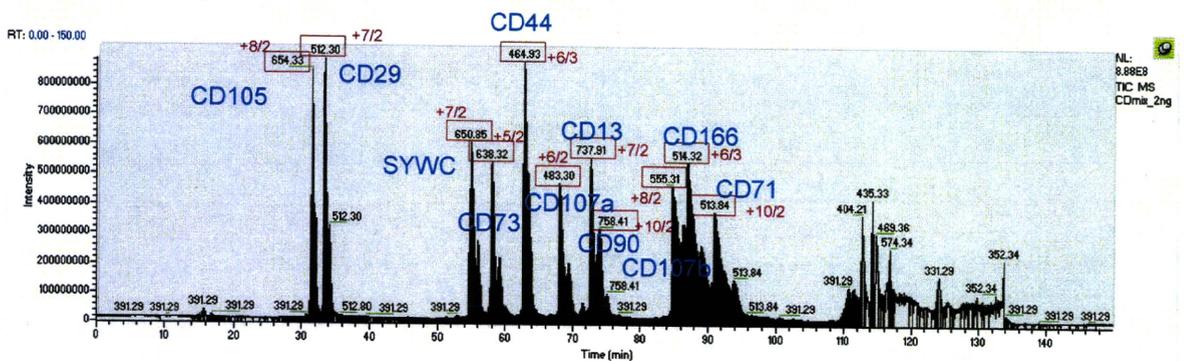


図 25 hMSC 由来ペプチドにラベル CDmix を添加した際の LC-MS ピークプロファイル

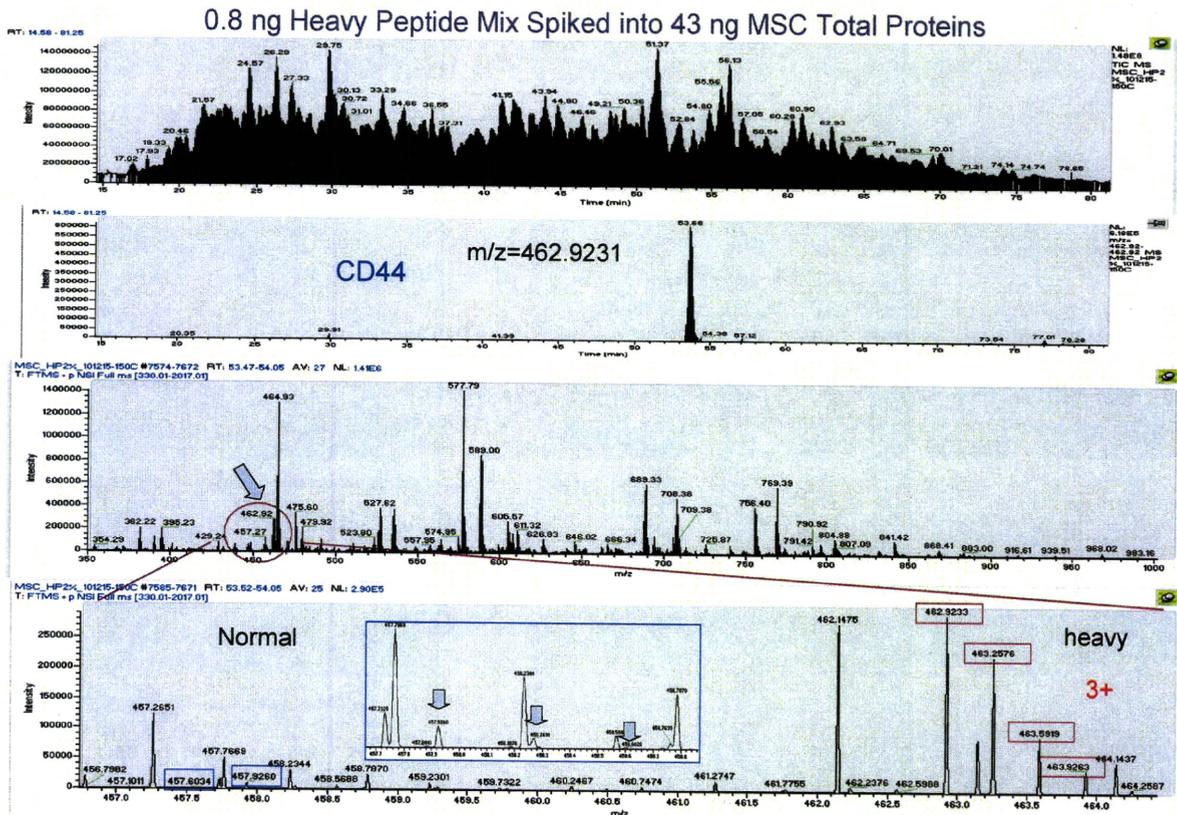


図 26 LTQ-Orbitrap により得られる LC-MS データの例

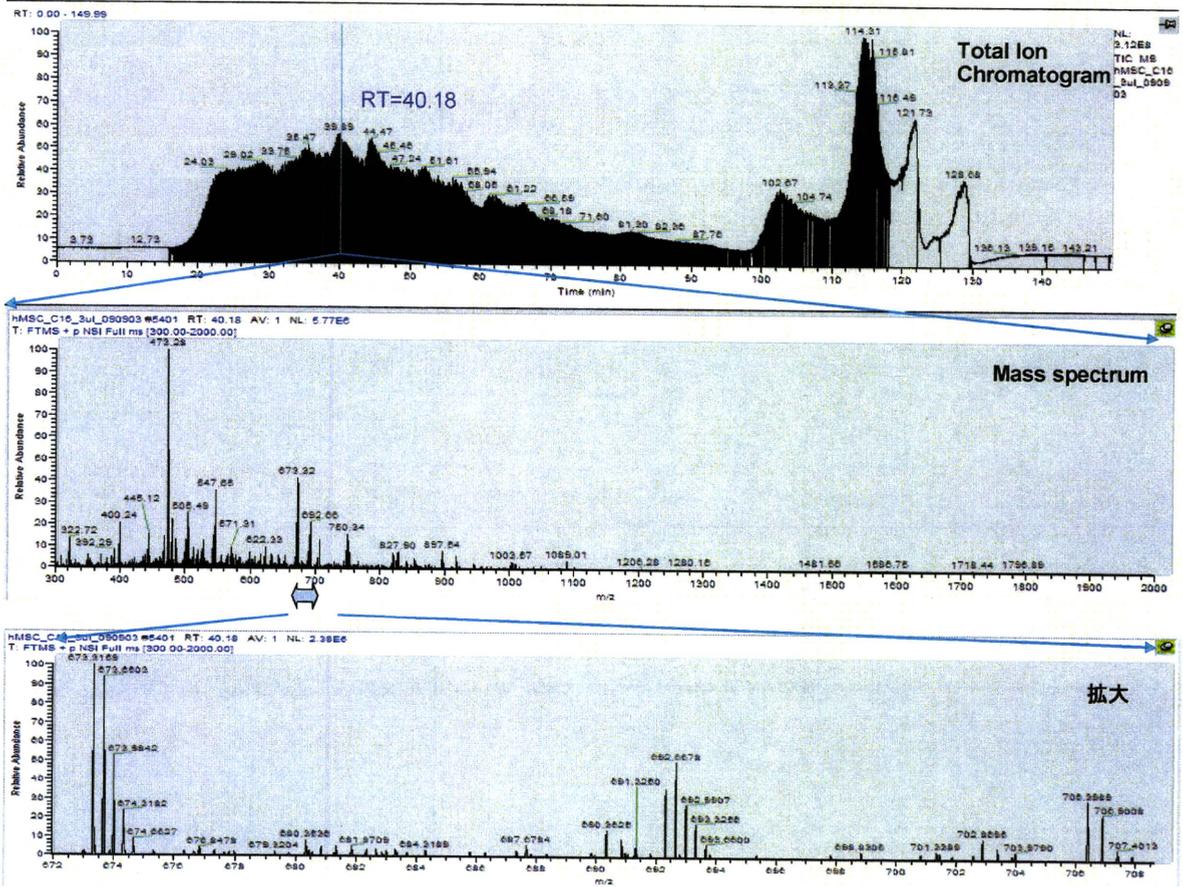


図 27 Progenesis による LC-MS データの可視化と定量比較のためのアラインメント

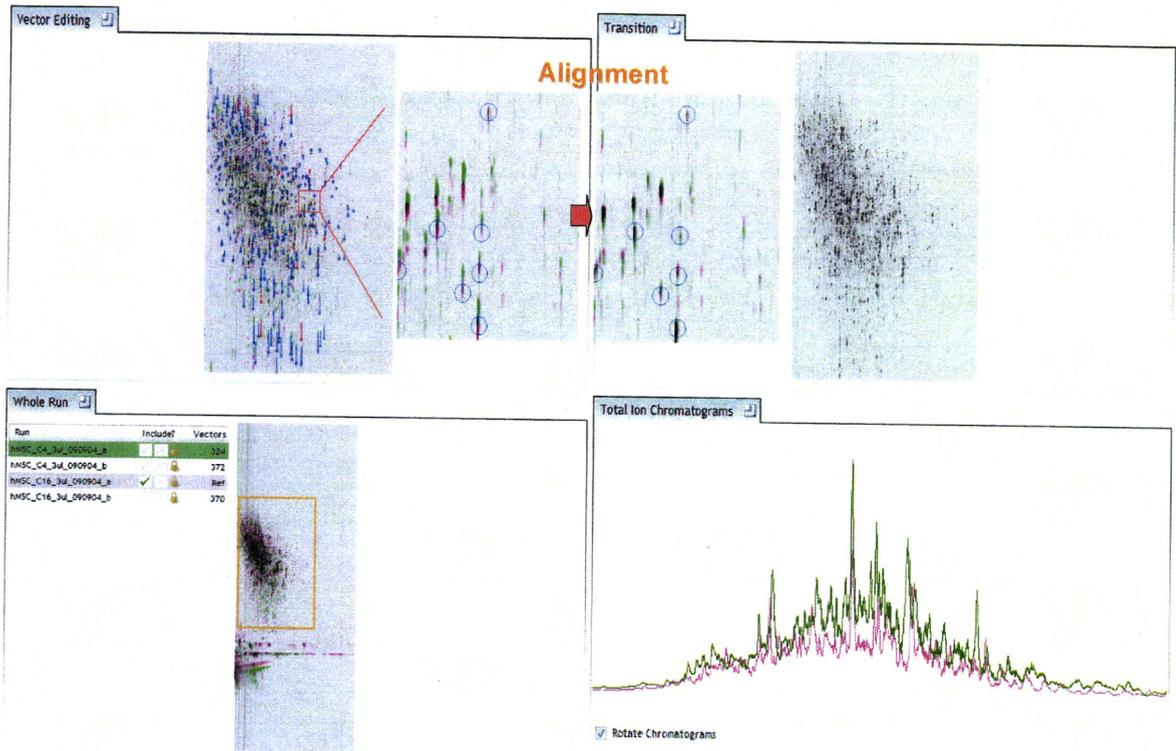


図 28 Progenesis におけるペプチドピーク検出と比較の例

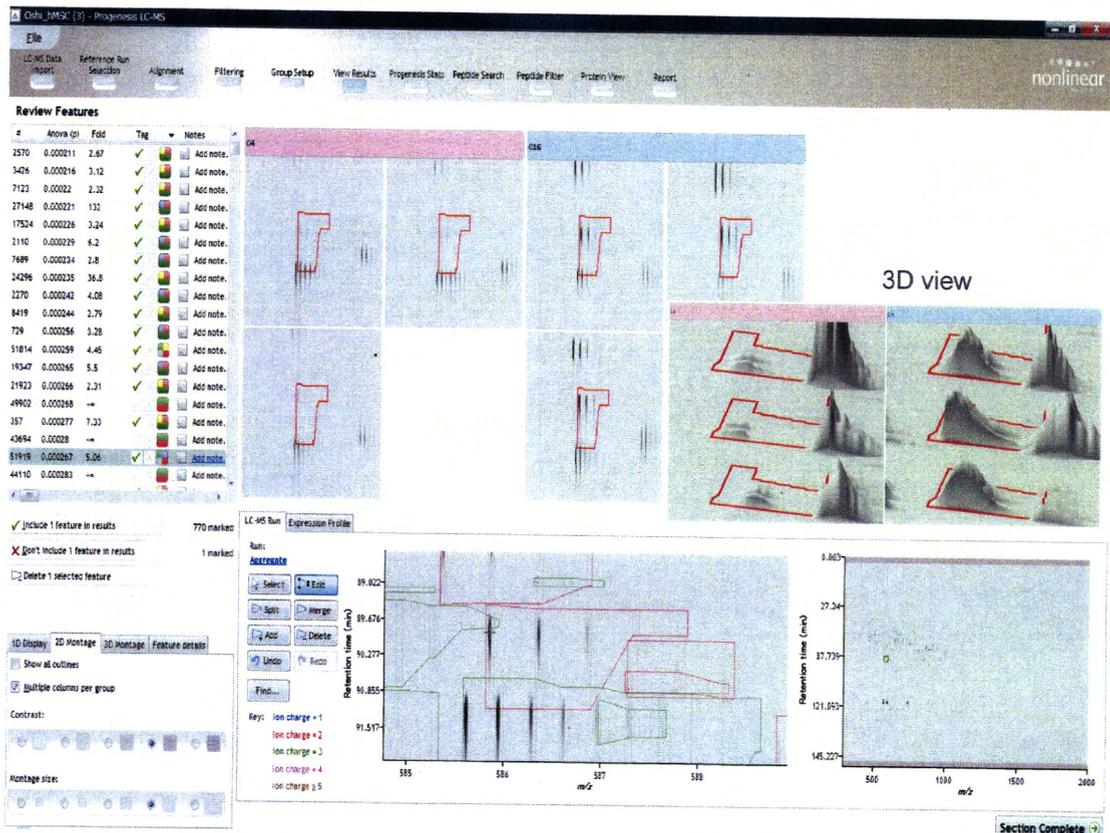


表 1 hMSC 細胞の培養過程における染色体変化の普遍性

Cell	hMSC										HSMM
	Lot#	4F1127		4F0312		5F0138		4F1560		4F0591	
Passage#	11	11	23	5	23	7	23	25	22	7	
LOH	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	
Copy Number Change	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	

表 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					療品部
Ch8	Ch17		#12	#15	#17	#21	#24	#14
1	2	正常	2	1	3	0	1	1
	3	異常	1	0	1	1	0	4
	6	異常	0	0	1	0	0	3
2	1	正常	1	3	2	0	0	0
	2	正常	75	60	48	41	0	13
	3	異常	11	28	34	33	73	47
	4	異常	5	5	9	13	15	28
	5	異常	0	0	0	4	5	2
	6	異常	0	0	0	1	2	0
	8	異常	0	0	0	0	1	0
3	2	正常	3	0	0	1	0	0
	3	正常	1	0	2	2	0	10
	4	正常	0	1	0	3	2	3
	5	異常	0	0	0	0	0	2
	6	異常	0	0	0	0	0	1
4	4	正常	1	1	0	0	0	1
	5	異常	0	0	0	0	0	1
	6	異常	0	1	0	0	1	0
	7	異常	0	0	0	1	0	0
合計		正常	83	66	55	47	3	28
		異常	17	34	45	53	97	84

今回のデータ

表3 hMSC 細胞の染色体解析用サンプル調整のための Nocodazole 処理の影響

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 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の表面抗原

CD antigen (description)		proteome解析	hMSCマーカー
CD13	alanyl (membrane) aminopeptidase	+	+
CD14	CD14 antigen	-	-
CD29	integrin; beta 1	+	+
CD34	CD34 antigen	-	-
CD44	CD44 antigen	+	+
CD45	protein tyrosine phosphatase; receptor type; C	-	-
CD51	integrin; alpha V	+	
CD59	CD59 antigen p18-20	+	
CD63	CD63 antigen (melanoma 1 antigen)	+	
CD71	transferrin receptor (p90; CD71)	+	+
CD73	5'-nucleotidase; ecto	+	+
CD81	CD81 antigen (target of antiproliferative antibody 1)	+	
CD90	Thy-1 cell surface antigen	+	+
CD91	low density lipoprotein-related protein 1	+	
CD98	solute carrier family 3; member 2	+	
CD105	endoglin	+	+
CD107a	lysosomal-associated membrane protein 1	+	+
CD107b	lysosomal-associated membrane protein 2	+	+
CD166	activated leukocyte cell adhesion molecule	+	+
CD225	interferon induced transmembrane protein	+	
CD280	mannose receptor; C type 2	+	
CD298	ATPase; Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> transporting beta 3 polypeptide	+	

表 7 同定した CD 分子種と安定同位体導入合成ペプチドの質量

CD分子種	タンパク名	アミノ酸配列(ラベル)	Original m/z	Heavy m/z
SYWC	継代で発現が上昇するタンパク質	PNSSIF (L) TDTAK	647.33 (+2)	650.85
CD13	alanyl (membrane) aminopeptidase	YLSYT (L) NPD LIR	734.40 (+2)	737.91
CD29	integrin; beta 1	SAVTTVVNP (K)	508.29 (+2)	512.30
CD44	CD44 antigen	YGFIEGH (V) VIPR	462.92 (+3)	464.93
CD71	transferrin receptor (p90; CD71)	ILNI (F) GVIK	508.83 (+2)	513.84
CD73	5'-nucleotidase; ecto	Y (P) FIVTSD DGR	635.83 (+2)	638.32
CD90	Thy-1 cell surface antigen	VTSLTACLVDQSL (R)	753.39 (+2)	758.41
CD105	endoglin	GEVTTYTTSQVS (K)	650.33 (+2)	654.33
CD107a	lysosomal-associated membrane protein 1	(P) SLVIAFGR	480.29 (+2)	483.30
CD107b	lysosomal-associated membrane protein 2	YLDFVFAV (K)	551.30 (+2)	555.31
CD166	activated leukocyte cell adhesion molecule	VLH (P) LEGAVVIFK	512.32 (+3)	514.32

<sup>13</sup>Cおよび<sup>15</sup>Nで標識

表 8 hMSC (Lot #E-9)の CD 抗原定量結果

antigen	Normal (m/z)	abundance	Heavy (m/z)	abundance	Ratio	Amount (pg/ng protein)
CD13	734.40	55500	737.90	287000	0.193	0.327
CD29	508.29	457000	512.30	5570000	0.082	0.139
CD44	462.92	253000	464.93	1190000	0.213	0.360
CD71	503.83	6450 *	513.84	260000 *	0.025	0.042
CD73	635.83	67100	638.32	1990000	0.034	0.057
CD90	753.39	966 *	758.41	47200 *	0.020	0.035
CD105	650.33	129000	654.33	3860000	0.033	0.057
CD107a	480.29	33400	483.29	125000	0.267	0.452
CD107b	551.30	9630	555.31	212000	0.045	0.077
CD166	512.32	27500	514.32	26900	1.022	1.729

\* measured by the peak height in raw data

表 9 4 継代と比べ 16 継代の hMSC 細胞で発現が 3 倍以上増加したタンパク質

Accession	Peptides	Score	Anova (p)*	Fold	Description	Average Normalised	
						C4	C16
NDUA5_HUMAN	1	32.83	5.95E-04	5.54	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1	7.26E+05	4.02E+06
SHQ1_HUMAN	2	69.91	5.16E-04	5.12	Protein SHQ1 homolog OS=Homo sapiens	8.25E+05	4.22E+06
EIF3C_HUMAN	3	94.54	6.58E-03	4.16	Eukaryotic translation initiation factor 3	3.14E+05	1.31E+06
HXA10_HUMAN	1	49.08	4.76E-04	3.95	Homeobox protein Hox-A10 OS=Homo	5.09E+04	2.01E+05
FADS3_HUMAN	1	41.46	0.02	3.84	Fatty acid desaturase 3 OS=Homo sapiens	2.38E+05	9.16E+05
RAB36_HUMAN	1	43	4.59E-03	3.54	Ras-related protein Rab-36 OS=Homo	2.55E+04	9.03E+04
RGS3_HUMAN	1	38	4.59E-03	3.54	Regulator of G-protein signaling 3	2.55E+04	9.03E+04
TM87A_HUMAN	2	85.64	1.79E-03	3.22	Transmembrane protein 87A OS=Homo	1.54E+06	4.95E+06
UBF1_HUMAN	3	59.13	0.03	3.13	Nucleolar transcription factor 1 OS=Homo	3.23E+05	1.01E+06