

Fig. 48 Mobilization of B cell progenitors from the bone marrow 5 days after injection of Ad-CXCL12.

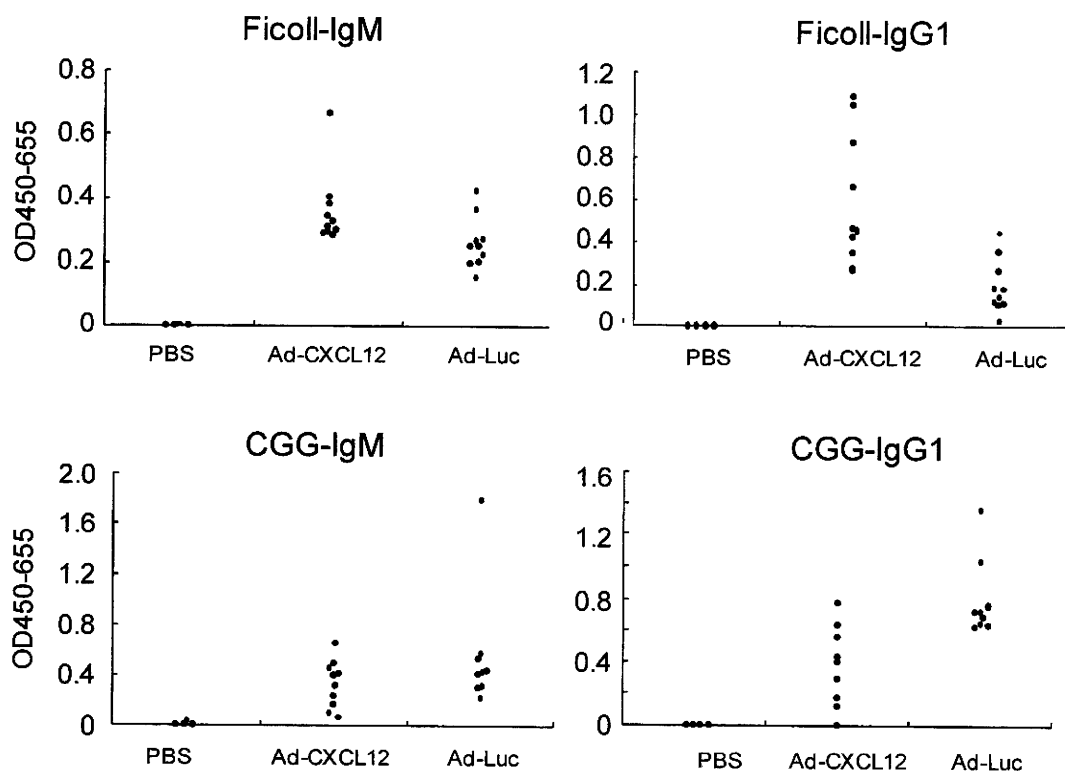


Fig. 49 The effect of Ad-CXCL12 on the antibody production.

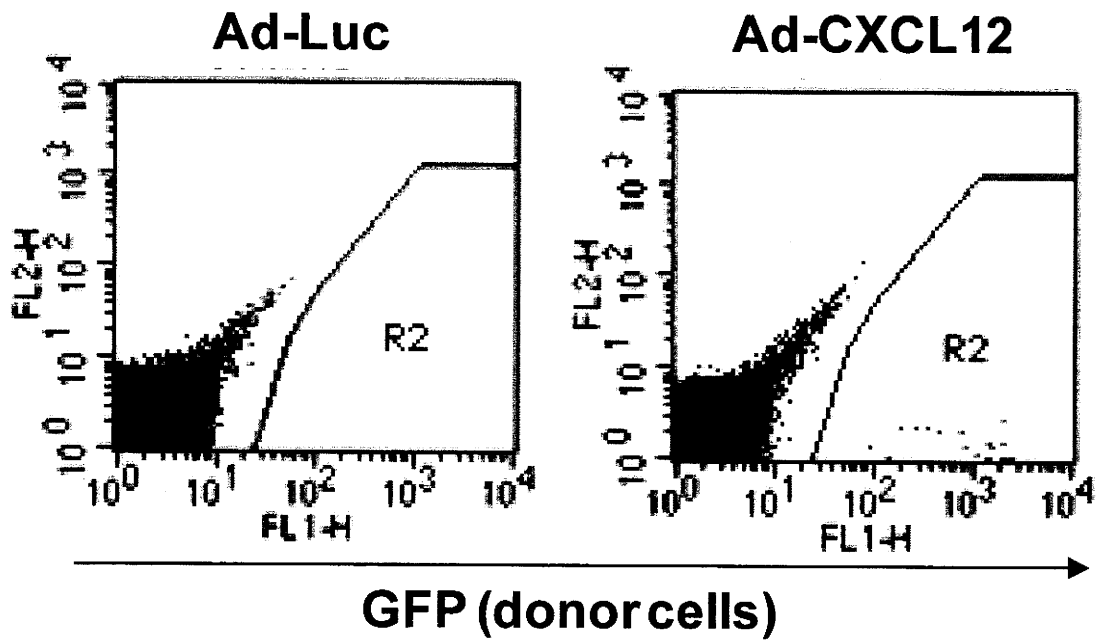


Fig. 50 GFP-expressing cells in bone marrow cells derived from Ad-CXCL12-injected mice before transplantation. R2 indicates GFP-expressing donor cells.

Table 21 Summary of transplantation study

	The number of mice which donor cells were detected	Chimerism
Ad-Luc	0/8	0%
Ad-CXCL12	7/12	0.06%

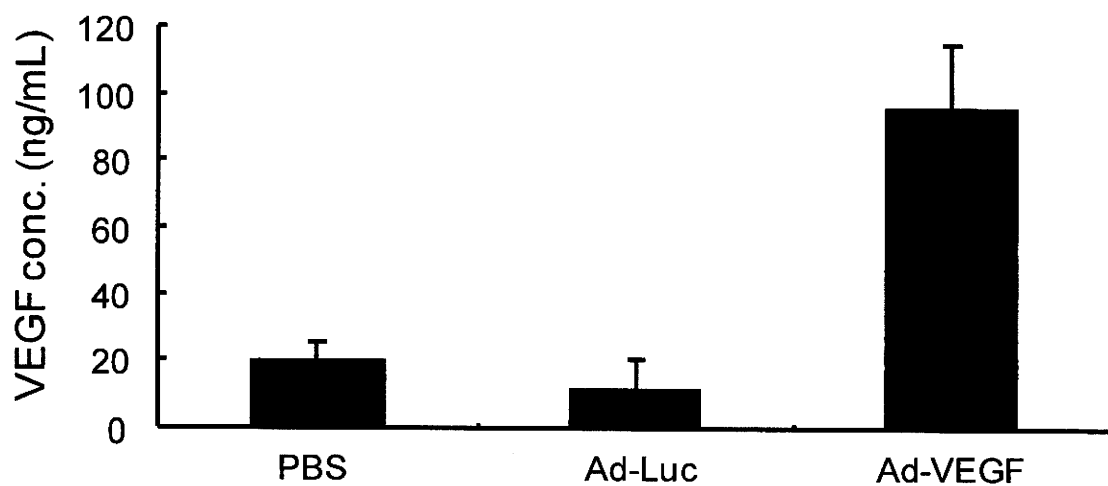


Fig. 51 Serum levels of VEGF.

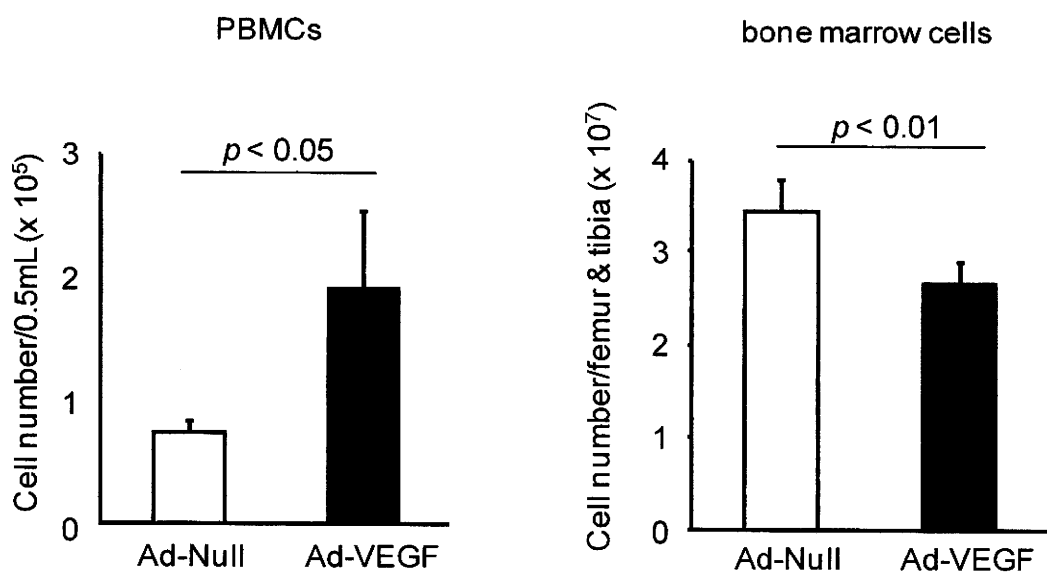


Fig. 52 Cell number of PBMCs and bone marrow cells 5 days after intravenous injection of Ad-CXCL12.

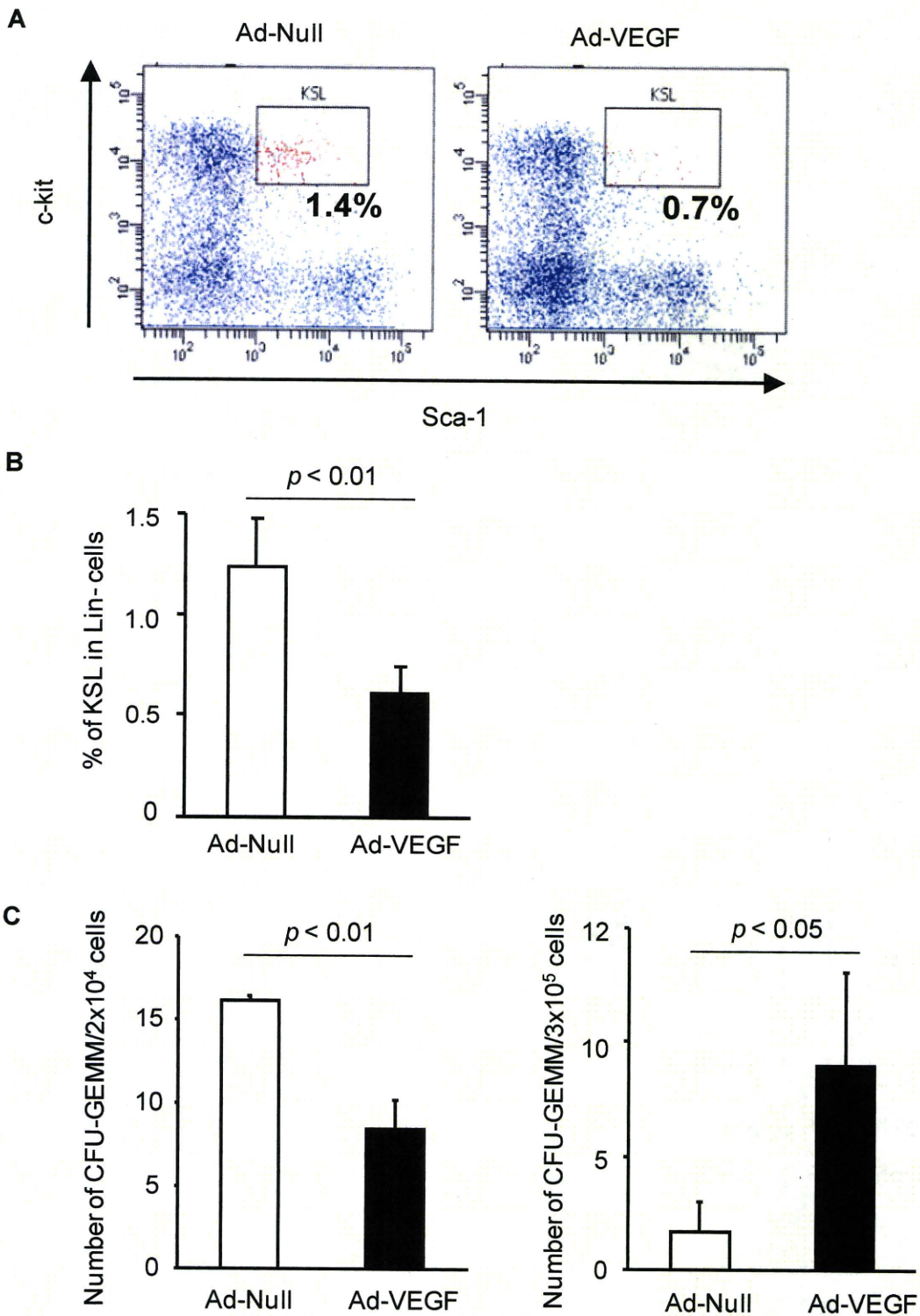


Fig. 53 Effect of VEGF on hematopoietic stem/progenitor cell mobilization.

(C) left, bone marrow cells; right, PBMCs.

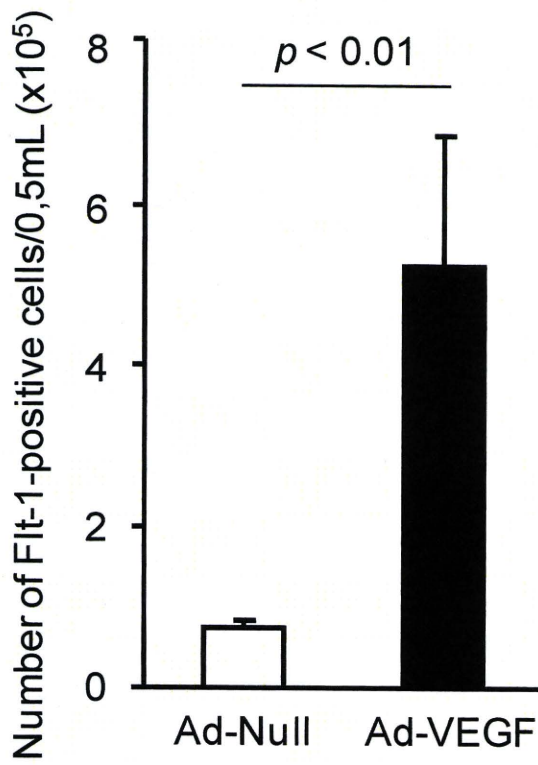
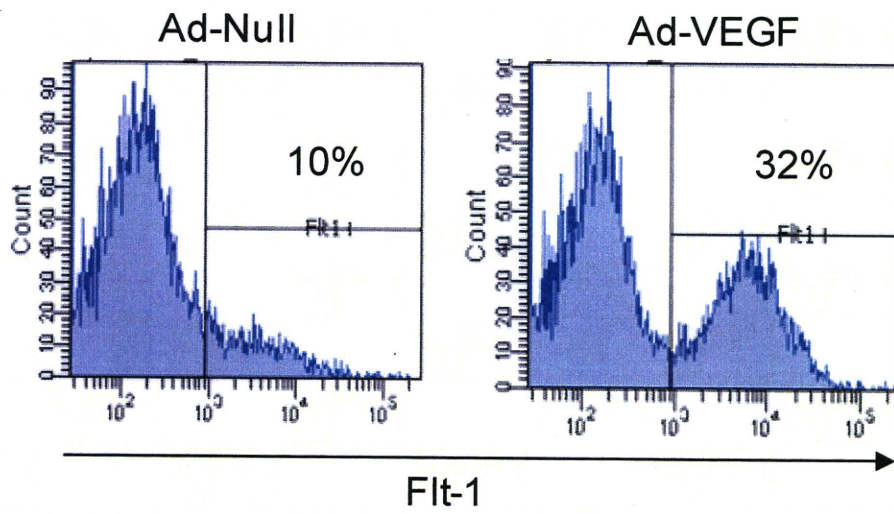


Fig. 54 Elevation of FIt-1-positive cells in PBMCs in Ad-VEGF-injected mice.

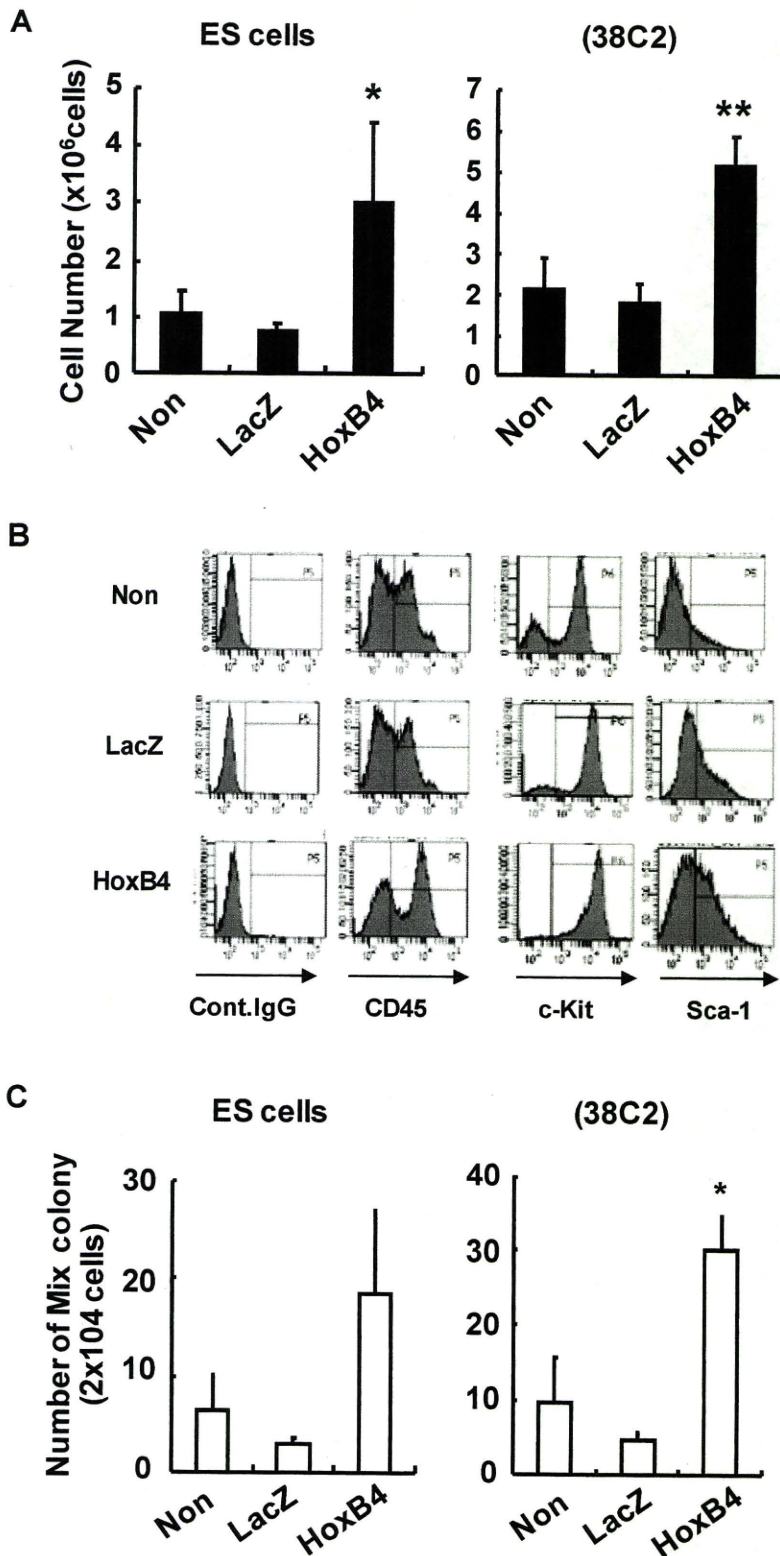


Fig. 55 Transient HoxB4 transduction augments the generation of hematopoietic cells from mouse ES and iPS cells.

Table 22 使用した hMSC のドナーに関する情報

ID	Lot# of Manufacturer	Age (Years)	Race	Sex
C	5F0138	19	Black	Male
B	4F0312	27	Black	female
H	4F0760	25	Caucasian	female

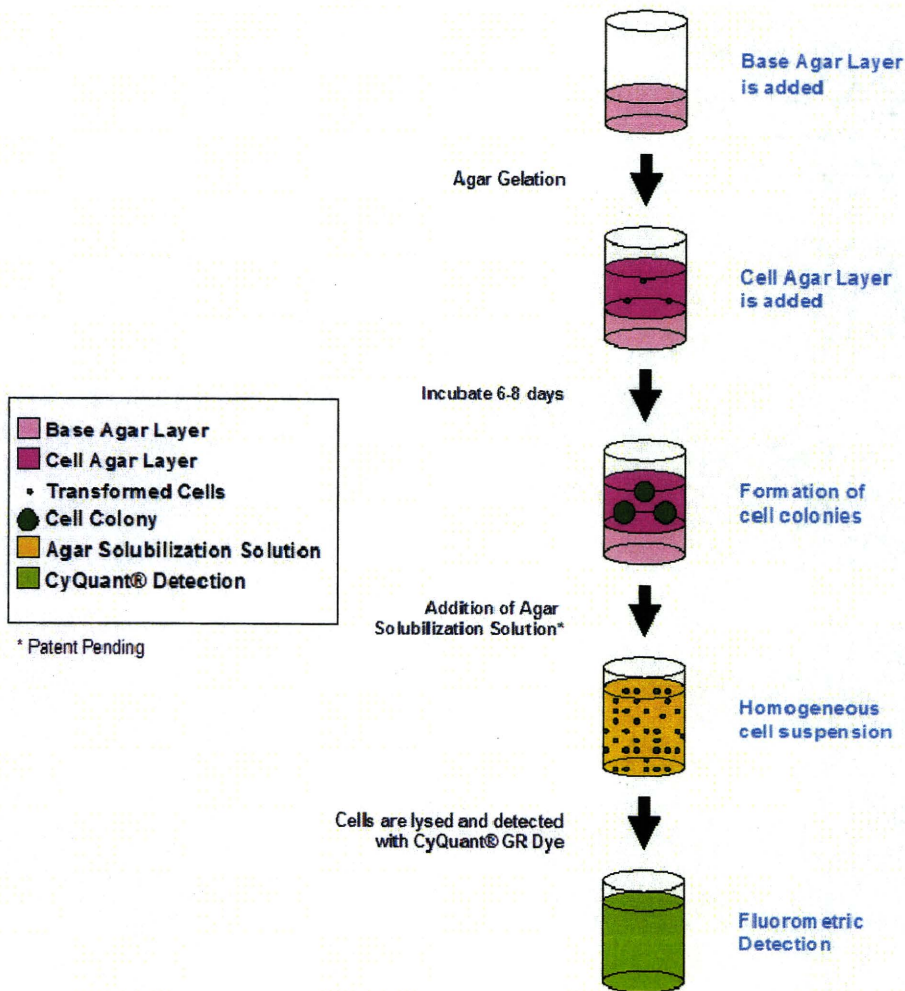


Fig. 56 CBA-130 CytoSelect Cell Transformation Assay の測定原理

CBA-130 では、軟寒天層を可溶化した際に細胞を生きたまま回収できない。細胞数の評価は CyQuant GR を使用した蛍光検出により行う。

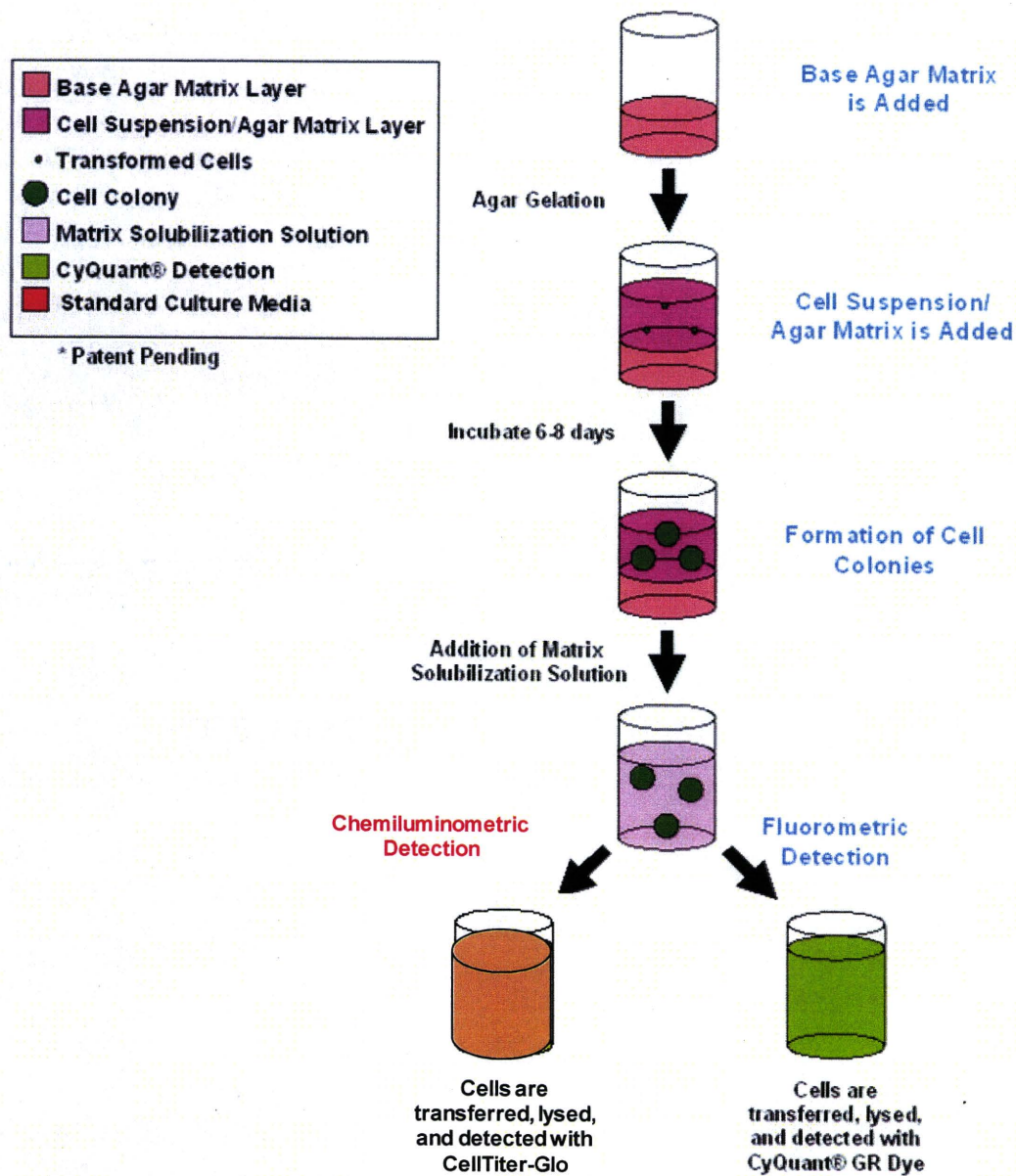


Fig. 57 CBA-140 CytoSelect Cell Transformation Assay (Cell Recovery) の測定原理
 軟寒天層を可溶化した際に細胞は生きたまま回収可能。オリジナルプロトコールでは CyQuant GR を使用した蛍光検出により細胞数を評価する（最下段右）。本研究ではこれに加え、CellTiter Glo による化学発光検出により細胞数を評価する系も検討した（最下段左）。

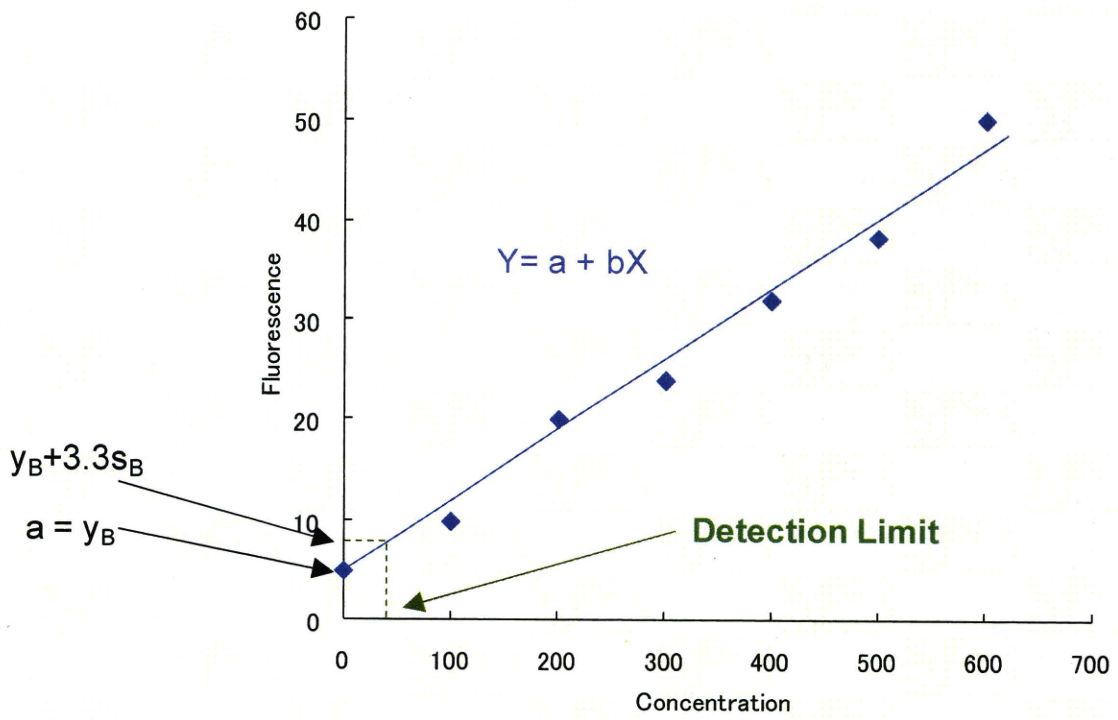


Fig. 58 本研究における「検出限界」の定義の概念図

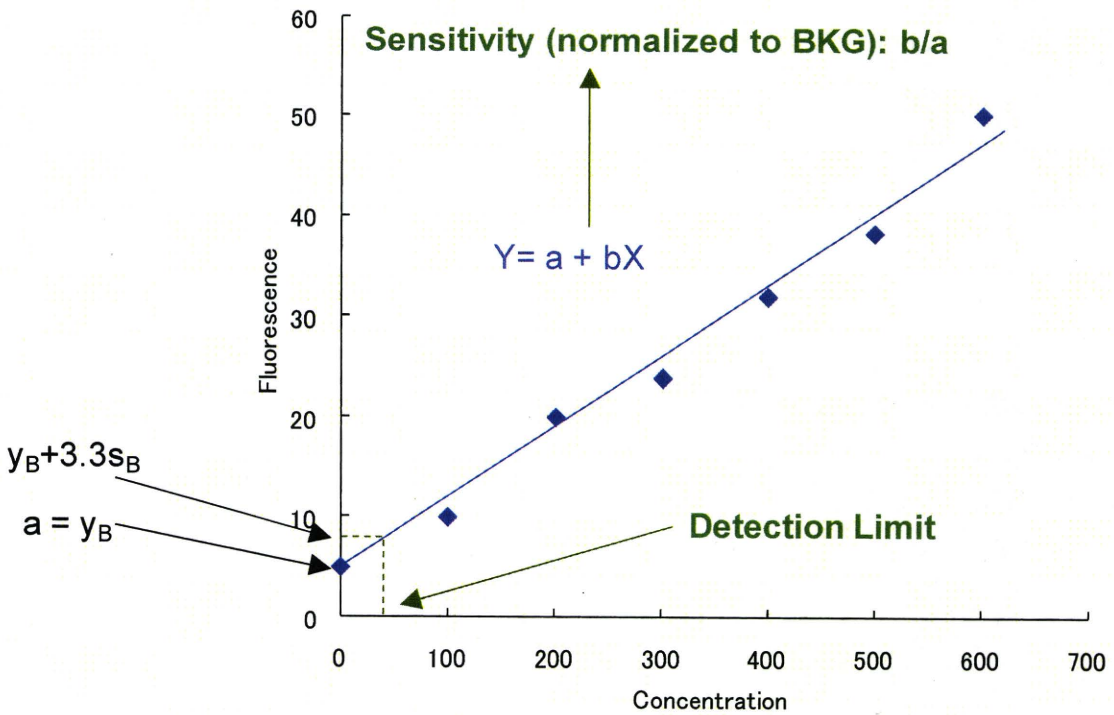


Fig. 59 本研究における「感度」の定義の概念図

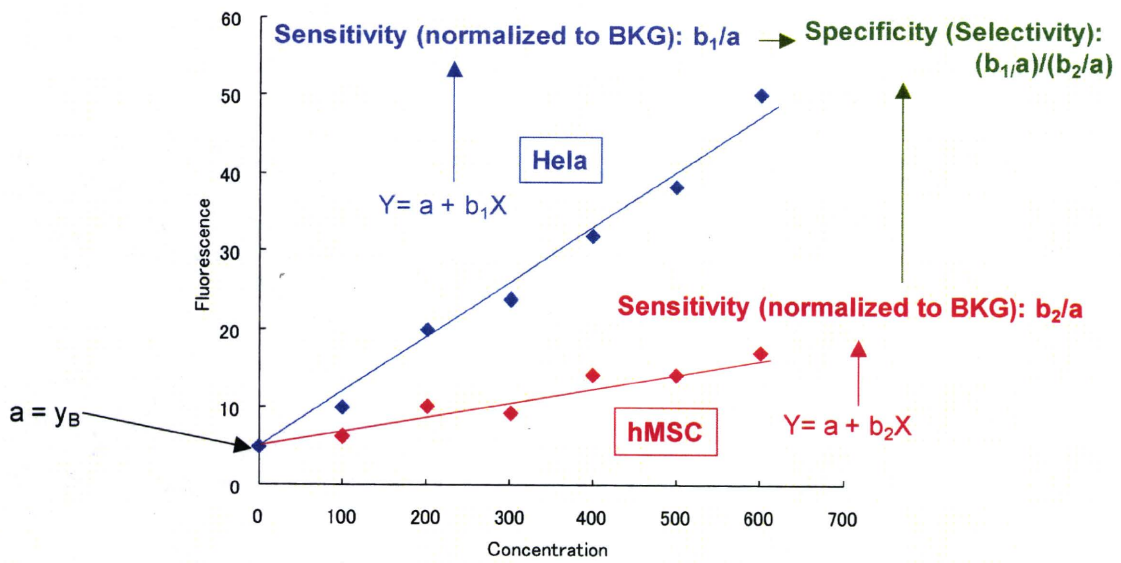


Fig. 60 本研究における「特異性（選択性）」の定義の概念図

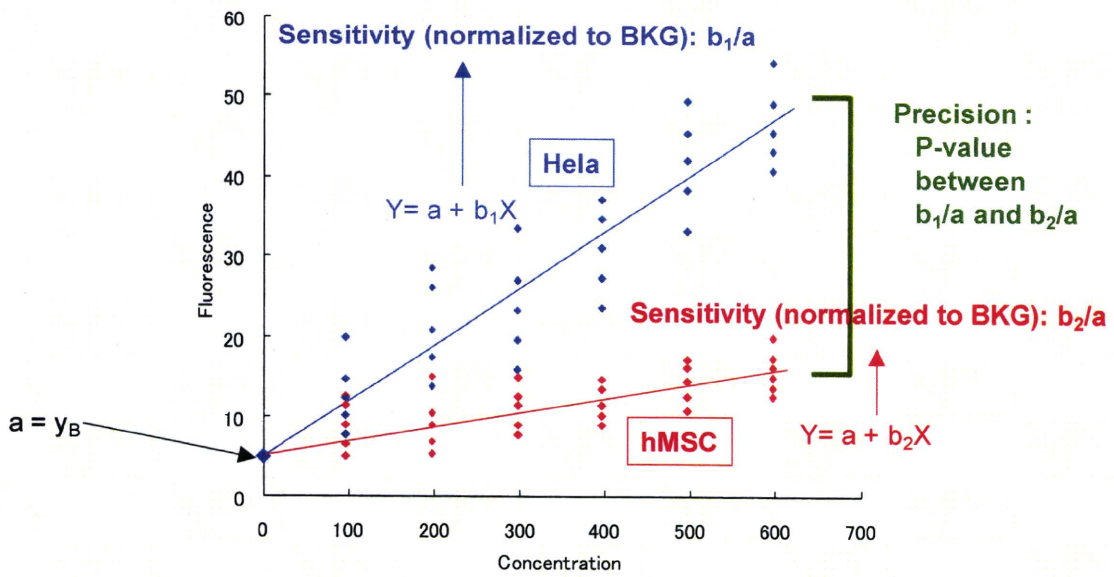


Fig. 61 本研究における「精度（併行精度）」の定義の概念図

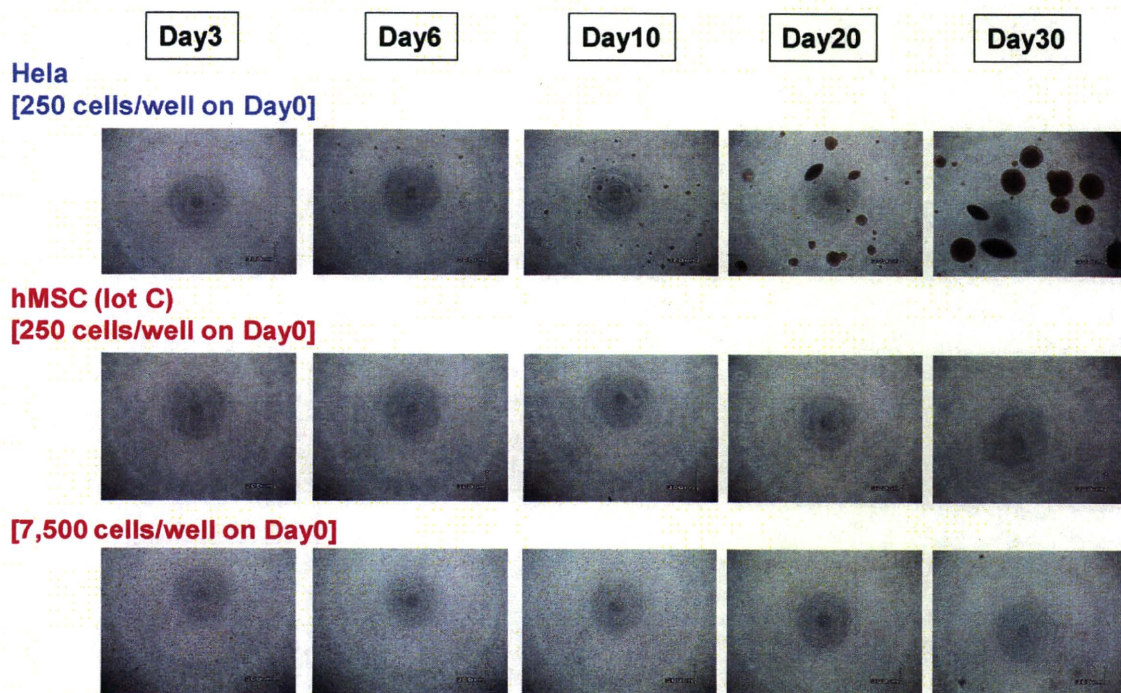


Fig. 62 軟寒天中のコロニー形成の時間経過

Hela 細胞は時間依存的にコロニーの形成・拡大が認められたが、hMSC (Lot C)では高密度に播種してもコロニー形成は認められなかった。

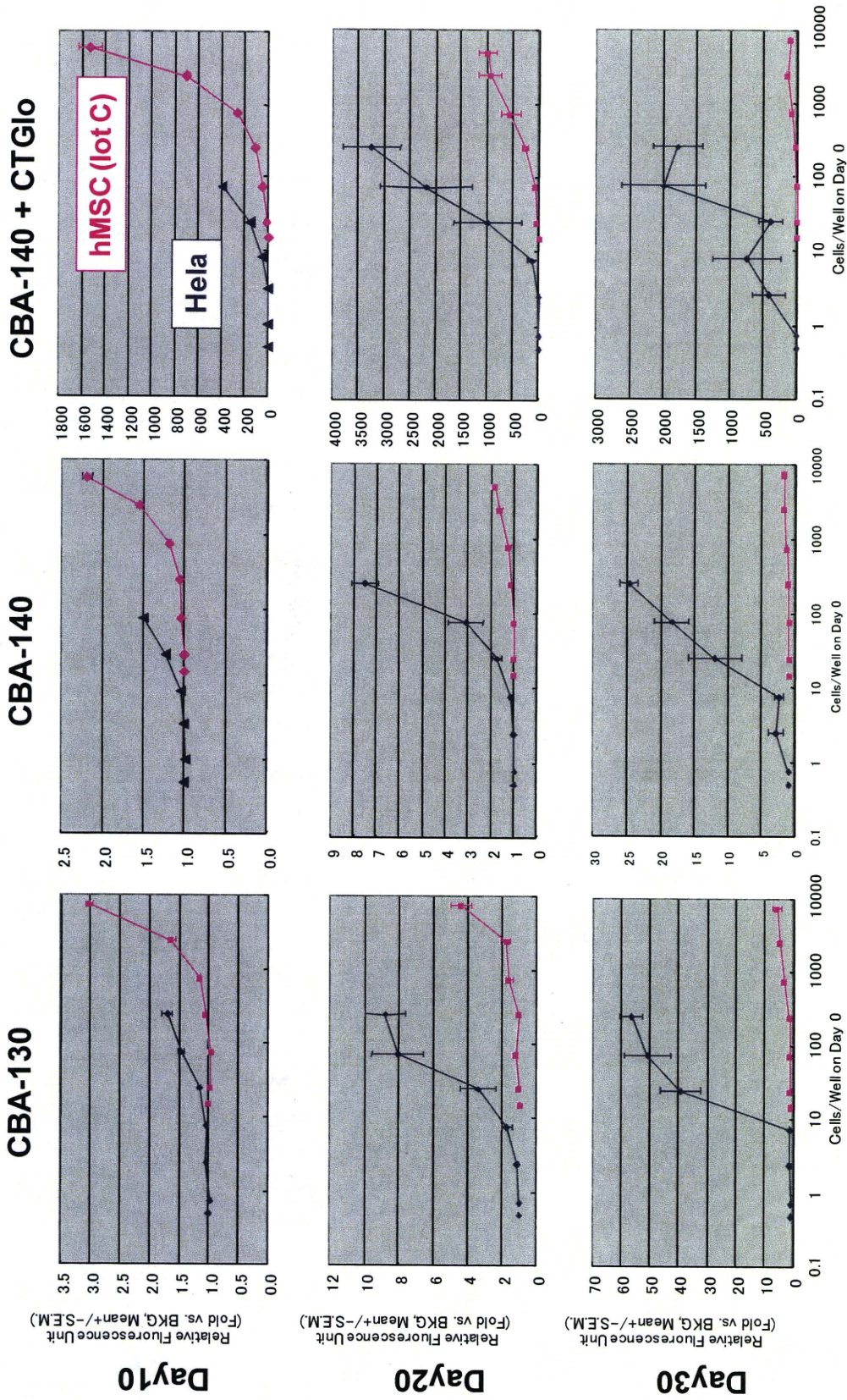


Fig. 63 細胞播種密度と測定時の細胞数シグナルとの間の用量作用関係

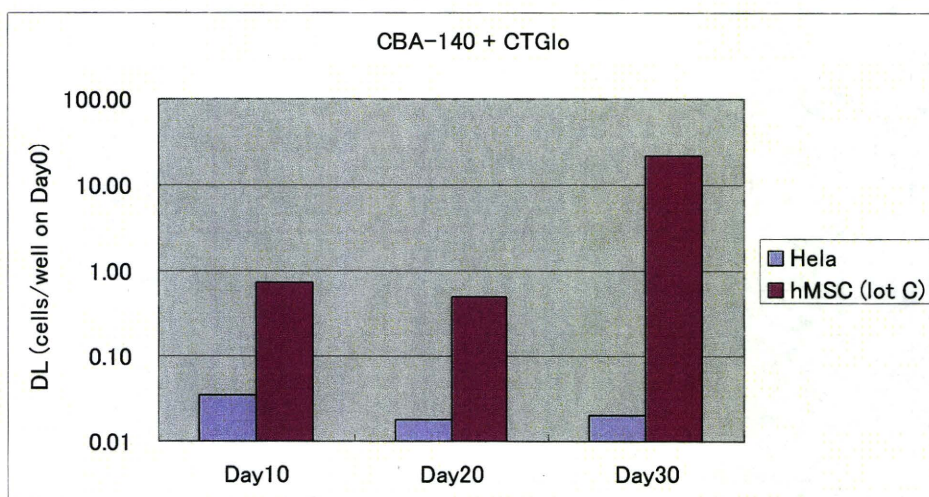
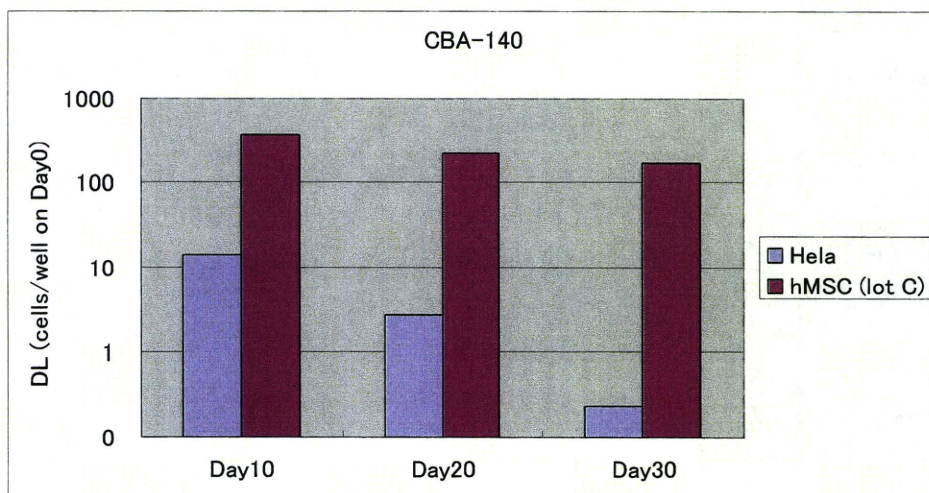
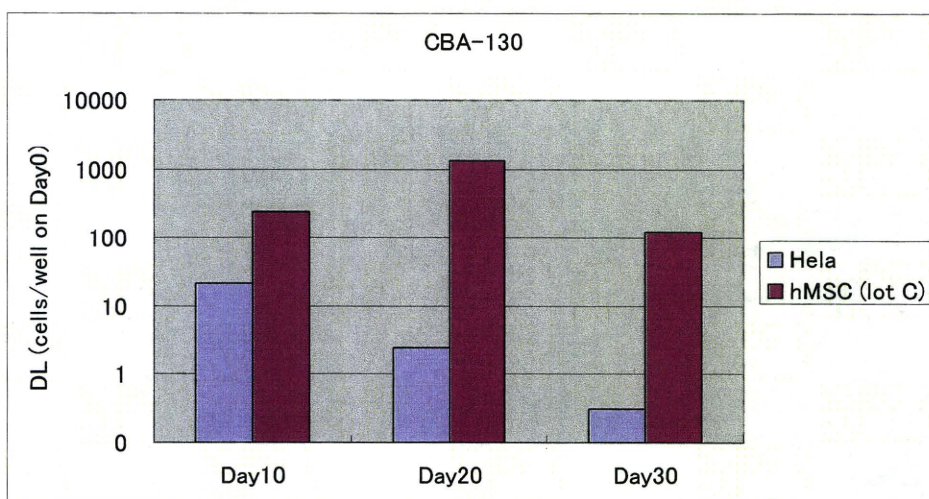


Fig. 64 三種のアッセイ系の検出限界

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。

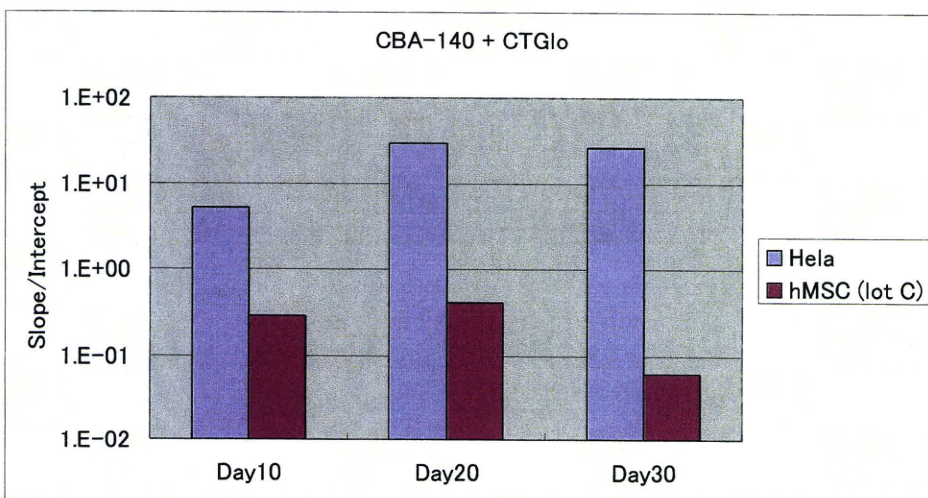
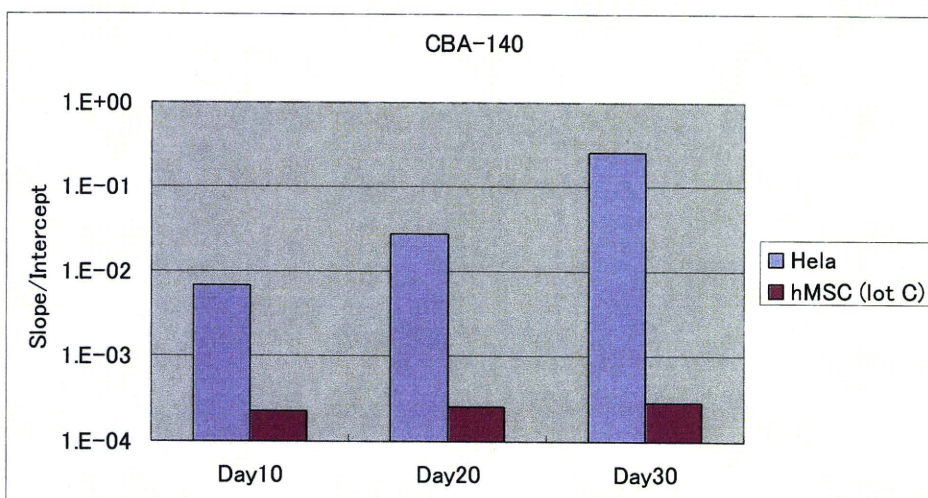
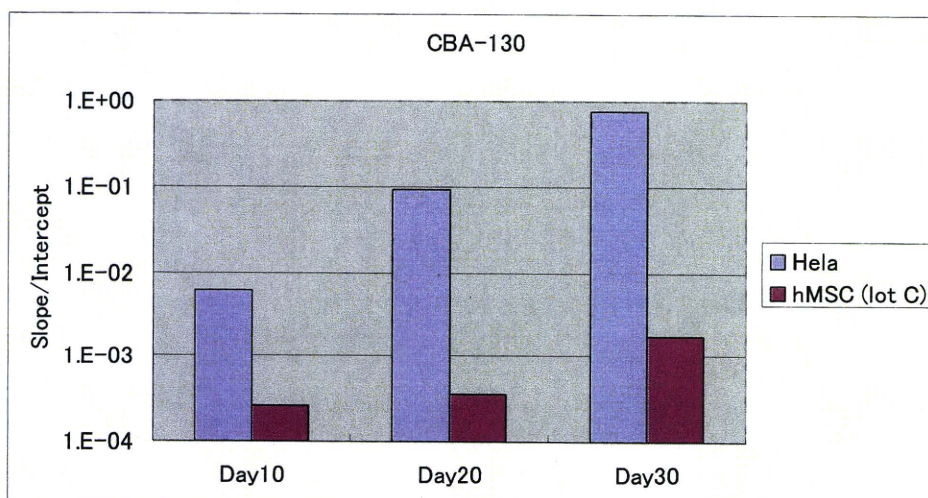


Fig. 65 三種のアッセイ系の感度

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。

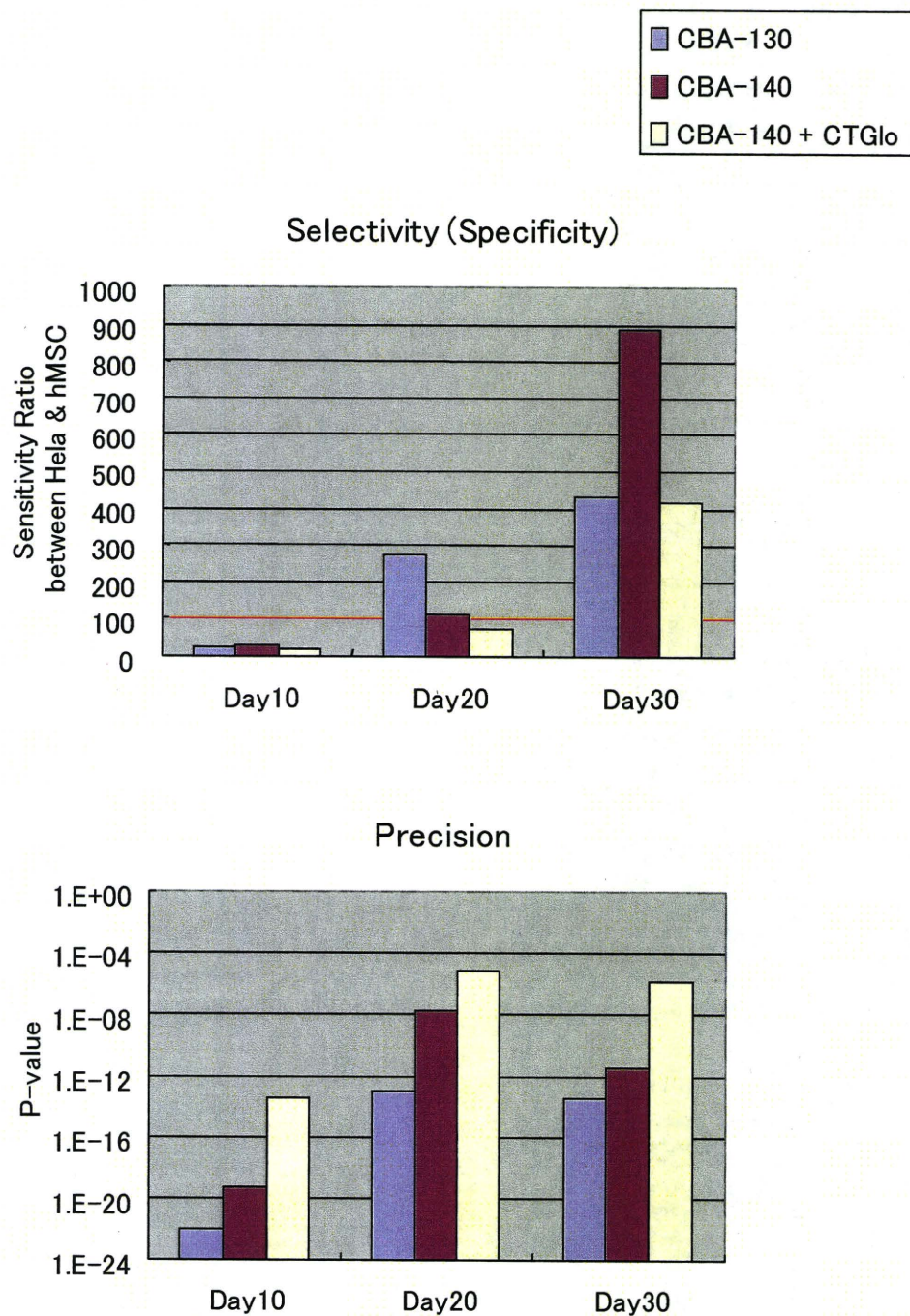


Fig. 66 三種のアッセイ系の HeLa 細胞に対する選択性（上）および精度（下）

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。

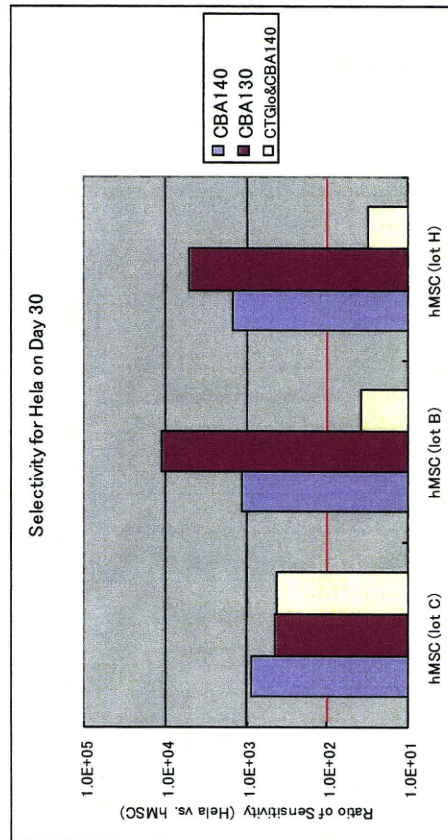
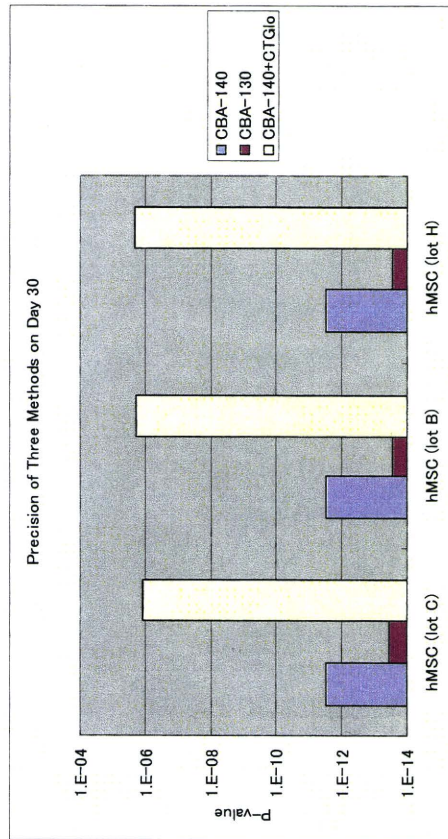
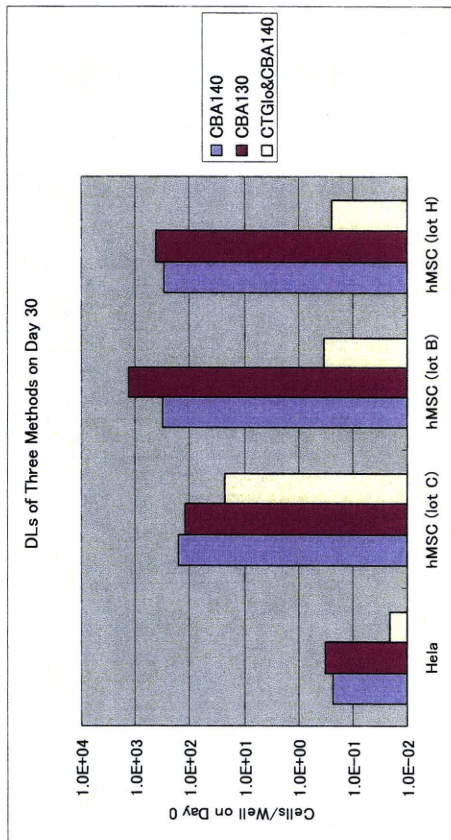
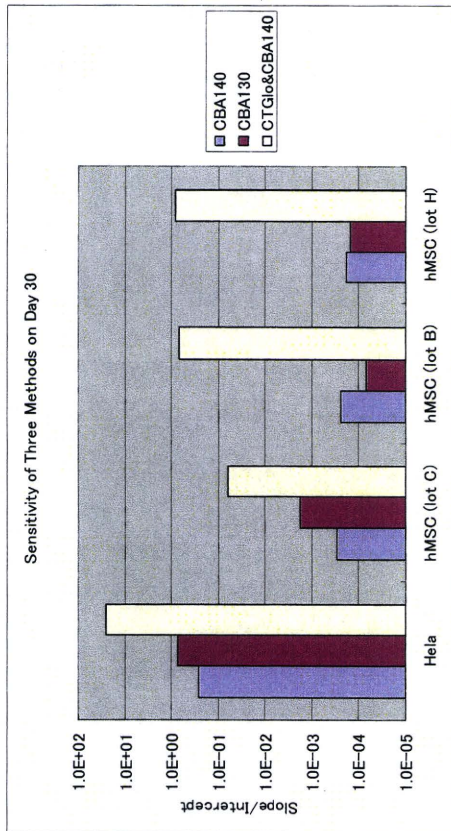


Fig. 67 hMSC の製造ロット（ドナー）の差による各アッセイ系の特性

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 のコンベンションが優れるが、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。

表 23 hMSC 各ロットのドナー情報

ロット番号		年齢	性別	人種*	ロット番号		年齢	性別	人種*
in house	製造元				in house	製造元			
A	4F1127	23	男	B	F	4F1560	23	女	B
B	4F0312	27	女	B	G	4F0591	32	男	C
C	5F0138	19	男	B	H	4F0760	25	女	C

*B:アフリカ系、C:コーカサス系

表 24 hMSC の *in vitro* 擬似的虚血処理条件

	通常条件 (コントロール群)	擬似的虚血条件 (虚血群)
インキュベータ	通常酸素濃度 37°C, 5% CO ₂ 機種名: MCO-175 [SANYO]	酸素濃度 = 1.0% 37°C, N ₂ :O ₂ :CO ₂ = 94.0%:1.0%:5.0%; 機種名: MCO-175M [SANYO]
培地	無血清 グルコース(+) 4.5g/dL DMEM [GIBCO, Invitrogen]	無血清 グルコース(-) DMEM [GIBCO, Invitrogen]
抗生物質	100 unit/mL ペニシリン G + 100µg/mL 硫酸ストレプトマイシン [GIBCO, Invitrogen]	100 unit/mL ペニシリン G + 100µg/mL 硫酸ストレプトマイシン [GIBCO, Invitrogen]

表 25 RT² Profiler PCR Array で発現を測定した血管新生関連遺伝子

Angiogenic Growth Factors and Related Genes:
Growth Factors: ECGF1, FGF1, FGF13, FGF2, FGF2BP1, FIGF, GRN, GRP, HGF, KITLG, LEP, MDK, PDGFB, PDGFD, PGF, PROK1, TGFA, VEGFA.
Cytokines and Chemokines: BMP2, CCL15, CCL2, CSF3, CXCL11, CXCL12, CXCL13, CXCL14, CXCL3, CXCL5, CXCL6, CXCL9, IL10, IL6, IL8, PPBP, PTN, TNF.
Other Positive Regulators of Angiogenesis: AGGF1, AMOT, ANG, ANGPT1, BTG1, EDIL3, EREG, FST, RHOB, RUNX1.
Angiogenesis Inhibitors and Related Genes:
Cytokines, Chemokines and Growth Factors: CXCL10, CXCL2, IFNG, IL12A, IL12B, IL17F, PF4, TGFB1.
Other Negative Regulators of Angiogenesis: ANGPT2, ANGPTL1, BAI1, CD55, CD59, CHGA, COL18A1, COL4A3, FN1, IFNA1, IFNB1, KLK3, MLLT7, NPPB, NPR1, PLG, PRL, RNH1, SERPINC1, SERPINE1, SERPINF1, SPINK5, STAB1, THBS1, TIE1, TIMP1, TIMP2, TIMP3, TNNI2, TNNI3.

表 26 RT² Profiler PCR Array 使用時のサーマルサイクラーの条件

ステージ	反応温度	反応時間	サイクル数
ステージ 1	95°C	10min	1Cycle
ステージ 2	95°C	15sec	40Cycles
	60°C	1min	

表 27 使用したサイトカイン ELISA キット

サイトカイン	ELISA Kit
レプチン	Human Leptin Immunoassay [R&D, cat# DLP00]
VEGF	Human VEGF Immunoassay [R&D, cat# DVE00]
PIGF	Human PIGF Immunoassay [R&D, cat# DPG00]
アンジオゲニン	Human ANG Immunoassay [R&D, cat#DAN00]
TGF- β 1	Human TGF- β 1 Immunoassay [R&D, cat#DB100B]

表 28 虚血後の VEGF 分泌と正の相関関係が得られた VSR 遺伝子 ($p < 0.01$)

Gene	Gene Title	Gene Symbol
VSR1	AF4/FMR2 family, member 3	AFF3
VSR2	ataxin 1	ATXN1
VSR3	chloride intracellular channel 3	CLIC3
VSR4	cytokine-like 1	CYTL1
VSR5	DiGeorge syndrome critical region gene 8	DGCR8
VSR6	endoplasmic reticulum aminopeptidase 2	ERAP2
VSR7	family with sequence similarity 101, member B	FAM101B
VSR8	gremlin 1, cysteine knot superfamily, homolog	GREM1
VSR9	hyaluronan and proteoglycan link protein 1	HAPLN1
VSR10	inhibin, beta E	INHBE
VSR11	keratin associated protein 1-1	KRTAP1-1
VSR12	hypothetical LOC339290	LOC339290
VSR13	M-phase phosphoprotein 6	MPHOSPH6
VSR14	poly(A) binding protein, cytoplasmic 4-like	PABPC4L
VSR15	programmed cell death 6 pseudogene	PDCD6
VSR16	pellino homolog 2 (Drosophila)	PELI2
VSR17	---	---

※VSR17 についての詳細は不明であった。