

表 29 虚血後の VEGF 分泌と VSR 遺伝子発現量の相関

Gene	PS#9 遺伝子発現量 vs. VEGF 分泌量		PS#9 遺伝子発現量 vs. VEGF 分泌変化率		PS#7 遺伝子発現量 vs. VEGF 分泌量		PS#7 遺伝子発現量 vs. VEGF 分泌変化率	
	rs	<i>p</i>	rs	<i>P</i>	rs	<i>p</i>	rs	<i>p</i>
	VSR1	0.844	4.46E-09	0.600	4.57E-04	0.542	1.96E-03	1.00
VSR2	0.817	3.53E-08	0.543	1.94E-03	0.680	3.59E-05	0.600	4.57E-04
VSR3	0.518	3.40E-03	0.771	6.03E-07	0.646	1.15E-04	0.771	6.03E-07
VSR4	0.653	9.22E-05	0.771	6.03E-07	0.567	1.08E-03	0.886	7.80E-11
VSR5	0.707	1.26E-05	0.771	6.03E-07	0.707	1.26E-05	0.771	6.03E-07
VSR6	0.741	2.86E-06	0.771	6.03E-07	0.707	1.26E-05	0.771	6.03E-07
VSR7	0.817	3.53E-08	0.543	1.94E-03	0.817	3.53E-08	0.543	1.94E-03
VSR8	0.518	3.40E-03	0.771	6.03E-07	0.569	1.02E-03	0.657	7.98E-05
VSR9	0.619	2.66E-04	0.771	6.03E-07	0.757	1.32E-06	0.714	9.29E-06
VSR10	0.851	2.50E-09	0.714	9.29E-06	0.653	9.22E-05	0.771	6.03E-07
VSR11	0.757	1.32E-06	0.714	9.29E-06	0.903	8.61E-12	0.600	4.57E-04
VSR12	0.538	2.17E-03	0.543	1.94E-03	0.538	2.17E-03	0.543	1.94E-03
VSR13	0.684	3.04E-05	0.543	1.94E-03	0.903	8.61E-12	0.600	4.57E-04
VSR14	0.842	5.37E-09	0.600	4.57E-04	0.484	6.77E-03	0.771	6.03E-07
VSR15	0.538	2.17E-03	0.829	1.57E-08	0.538	2.17E-03	0.829	1.57E-08
VSR16	0.569	1.02E-03	0.714	9.29E-06	0.484	6.77E-03	0.829	1.57E-08
VSR17	0.484	6.77E-03	0.657	7.98E-05	0.518	3.40E-03	0.771	6.03E-07

rs : スピアマンの順位相関係数

*p* : 有意確率

表 30 虚血抵抗性と VSR 遺伝子発現量の相関

Gene	PS#9 遺伝子発現量		PS#7 遺伝子発現量	
	vs.		vs.	
	虚血抵抗性		虚血抵抗性	
	rs	<i>p</i>	rs	<i>p</i>
VSR1	-0.551	1.59E-03	-0.718	7.86E-06
VSR2	-0.696	1.97E-05	-0.585	6.82E-04
VSR3	-0.585	6.82E-04	-0.858	1.36E-09
VSR4	-0.527	2.80E-03	-0.608	3.68E-04
VSR5	-0.887	6.44E-11	-0.887	6.44E-11
VSR6	-0.736	3.52E-06	-0.887	6.44E-11
VSR7	-0.696	1.97E-05	-0.696	1.97E-05
VSR8	-0.585	6.82E-04	-0.655	8.55E-05
VSR9	-0.678	3.90E-05	-0.788	2.33E-07
VSR10	-0.666	5.82E-05	-0.527	2.80E-03
VSR11	-0.788	2.33E-07	-0.736	3.52E-06
VSR12	-0.204	2.79E-01	-0.204	2.79E-01
VSR13	-0.599	4.74E-04	-0.736	3.52E-06
VSR14	-0.707	1.26E-05	-0.736	3.52E-06
VSR15	-0.772	5.74E-07	-0.772	5.74E-07
VSR16	-0.330	7.46E-02	-0.412	2.39E-02
VSR17	-0.290	1.20E-01	-0.585	6.82E-04

rs : スピアマンの順位相関係数

*p* : 有意確率

▨ : *p* < 0.01 ではなかったもの

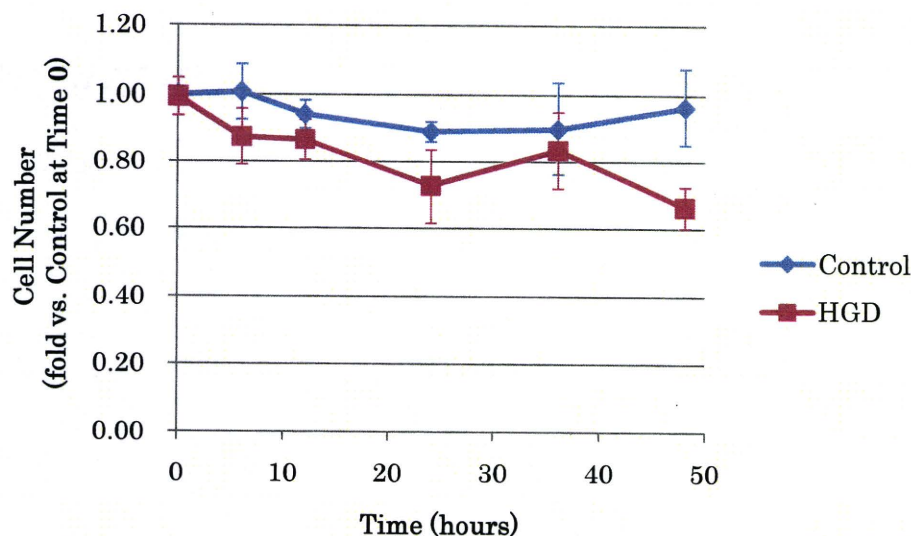


図 68 hMSC の生存に対する低酸素・グルコース欠乏環境の影響

無血清培地の下で通常酸素分圧でグルコース存在する環境にある hMSC に比べ、*in vitro* 虚血 (HGD, Hypoxia-Glucose Deprivation, 低酸素・グルコース欠乏) 処理した hMSC の生存率は低かった ( $P < 0.05$ , Repeated Measures One-way ANOVA)。*In vitro* 虚血による培養開始後が 48 時間になると生存率の差が明確となった。値は 6 ロットの平均値と標準誤差で示した。

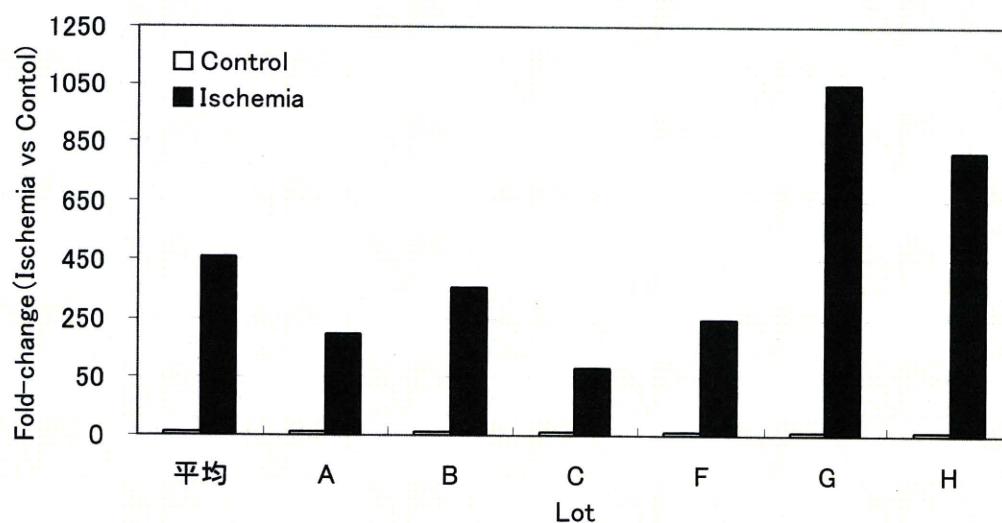


図 69 虚血後における hMSC のレプチン遺伝子発現変化

通常条件または擬似的虚血条件培養 24 時間後に回収した細胞より抽出した Total RNA を用いて遺伝子発現量を検討した。縦軸はコントロール群のレプチン遺伝子発現量に対する虚血群の比率を示しており、横軸はロットを示している。

虚血後における hMSC では、レプチン遺伝子の発現に有意な上昇が認められた。 [各ロット 1 例ずつ、計 6 ロットの平均値] \* $p < 0.01$  vs. Control

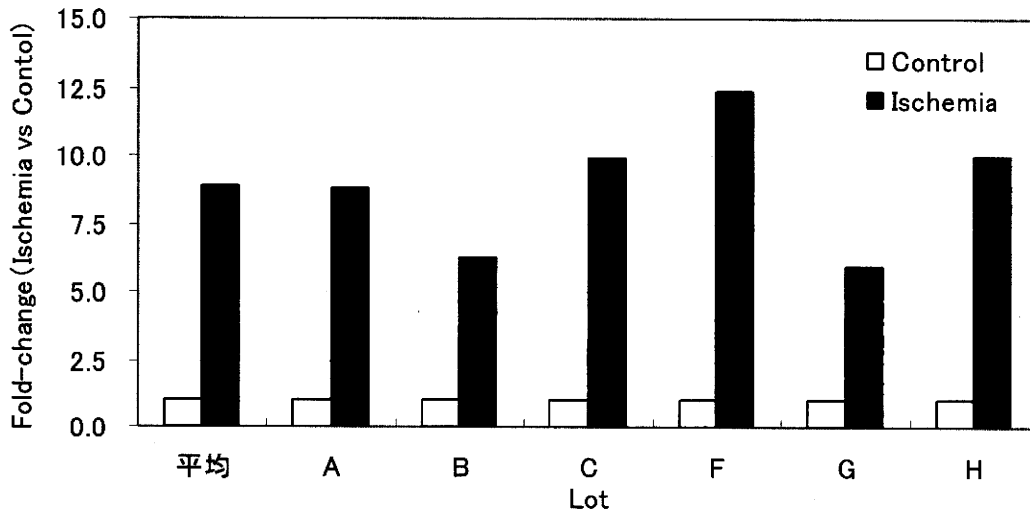


図 70 虚血後における hMSC の VEGF 遺伝子発現変化

通常条件または擬似的虚血条件培養 24 時間後に回収した細胞より抽出した Total RNA を用いて遺伝子発現量を検討した。縦軸はコントロール群の VEGF 遺伝子発現量に対する虚血群の比率を示しており、横軸はロットを示している。

虚血後における hMSC では、VEGF 遺伝子の発現に有意な上昇が認められた。

〔各ロット 1 例ずつ、計 6 ロットの平均値〕 \* $p < 0.01$  vs. Control

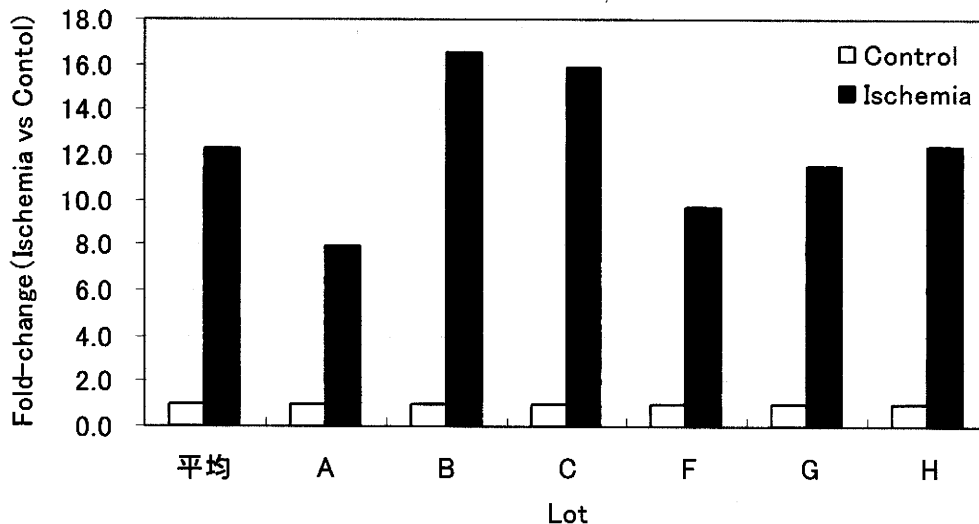


図 71 虚血後における hMSC の PlGF 遺伝子発現変化

通常条件または擬似的虚血条件培養 24 時間後に回収した細胞より抽出した Total RNA を用いて遺伝子発現量を検討した。縦軸はコントロール群の PlGF 遺伝子発現量に対する虚血群の比率を示しており、横軸はロットを示している。

虚血後における hMSC では、PlGF 遺伝子の発現に有意な上昇が認められた。

〔各ロット 1 例ずつ、計 6 ロットの平均値〕 \* $p < 0.01$  vs. Control

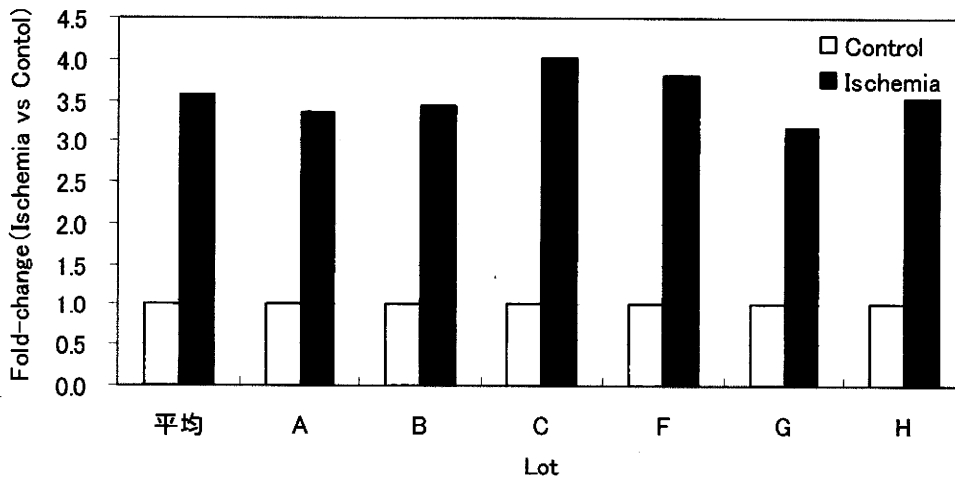


図 72 虚血後における hMSC のアンジオゲニン遺伝子発現変化

通常条件または擬似的虚血条件培養 24 時間後に回収した細胞より抽出した Total RNA を用いて遺伝子発現量を検討した。縦軸はコントロール群のアンジオゲニン遺伝子発現量に対する虚血群の比率を示しており、横軸はロットを示している。

虚血後における hMSC では、アンジオゲニン遺伝子の発現に有意な上昇が認められた。〔各ロット 1 例ずつ、計 6 ロットの平均値〕 \* $p < 0.01$  vs. Control

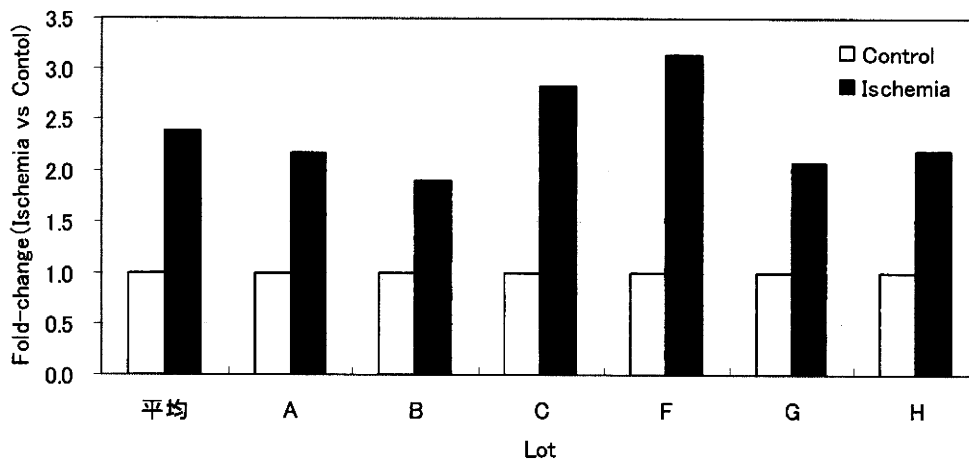


図 73 虚血後における hMSC の TGF-β1 遺伝子発現変化

通常条件または擬似的虚血条件培養 24 時間後に回収した細胞より抽出した Total RNA を用いて遺伝子発現量を検討した。縦軸はコントロール群の TGF-β1 遺伝子発現量に対する虚血群の比率を示しており、横軸はロットを示している。

虚血後における hMSC では、TGF-β1 遺伝子の発現に有意な上昇が認められた。

〔各ロット 1 例ずつ、計 6 ロットの平均値〕 \* $p < 0.01$  vs. Control

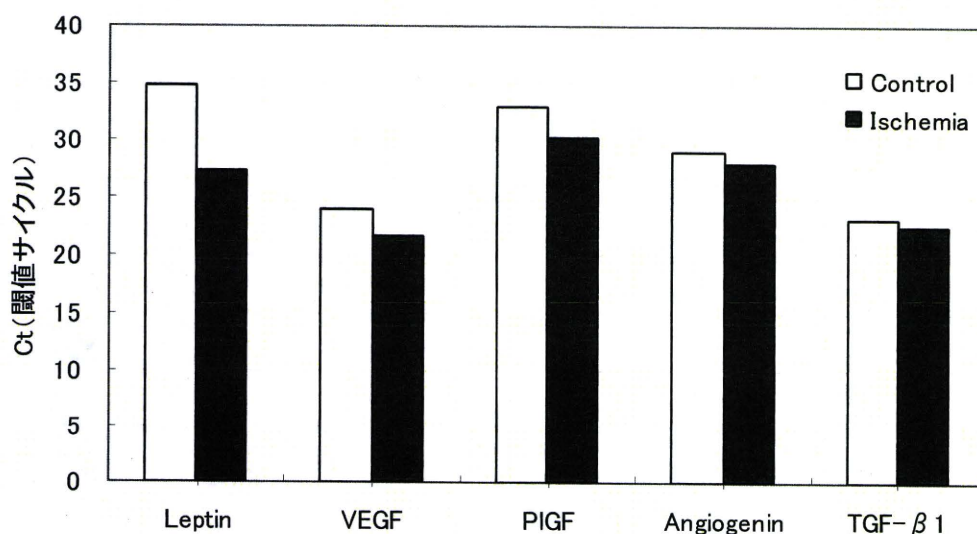


図74 虚血後のhMSCにおいて有意な上昇が認められたサイトカイン遺伝子のCt値  
 通常条件または擬似的虚血条件培養24時間後に回収した細胞より抽出したTotal RNAを用いて遺伝子発現量を検討した。  
 縦軸はシグナルの閾値に到達するサイクル数(Ct)を示しており、横軸は各サイトカインを示している。  
 [各ロット1例ずつ、計6ロットの平均値]

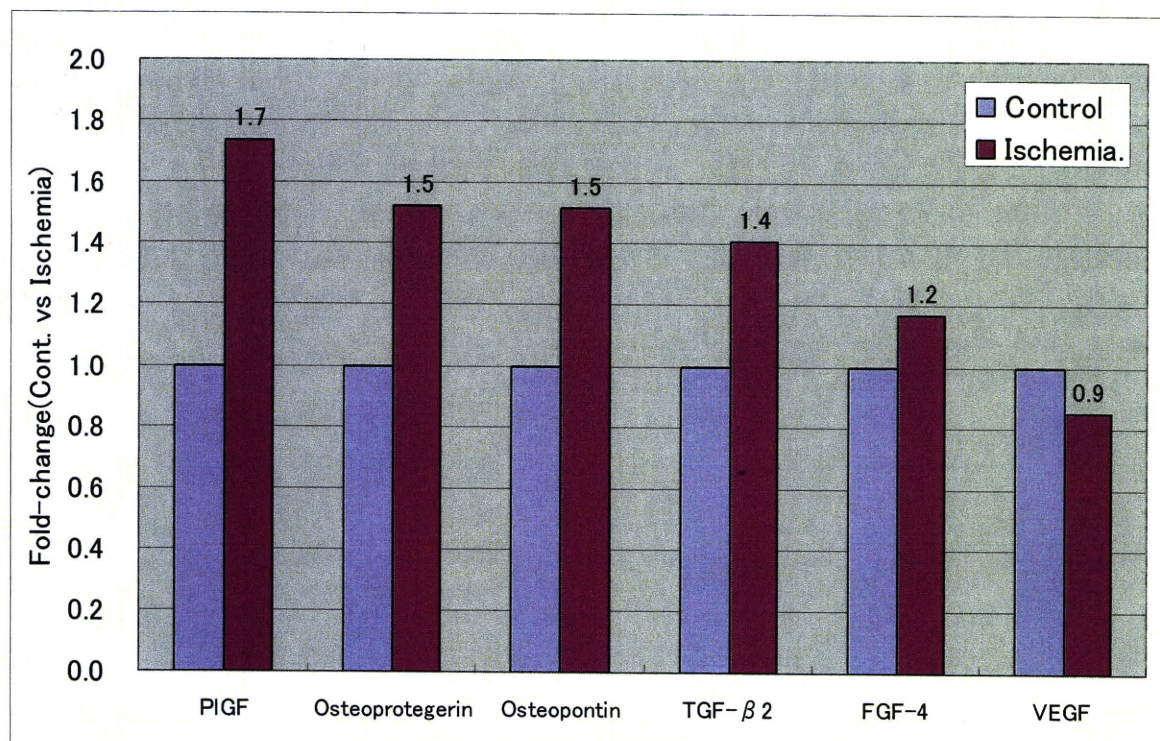


図75 サイトカイン抗体アレイを用いたhMSC由来サイトカイン類の分泌測定  
 無血清培地の下で通常酸素分圧でグルコース存在する環境にあるhMSCのコンディションドメディウムと、低酸素・グルコース欠乏の条件(Ischemia=HGD, Hypoxia-Glucose Deprivation)に暴露したhMSCのコンディションドメディウムとの間で、含有される各種サイトカイン濃度を、サイトカイン抗体アレイを用いて比較した。6ロットのhMSCに関してPaired t-testを行い、有意差(P<0.05)の認められたものは以上の6分子であった。値は平均値を表す。

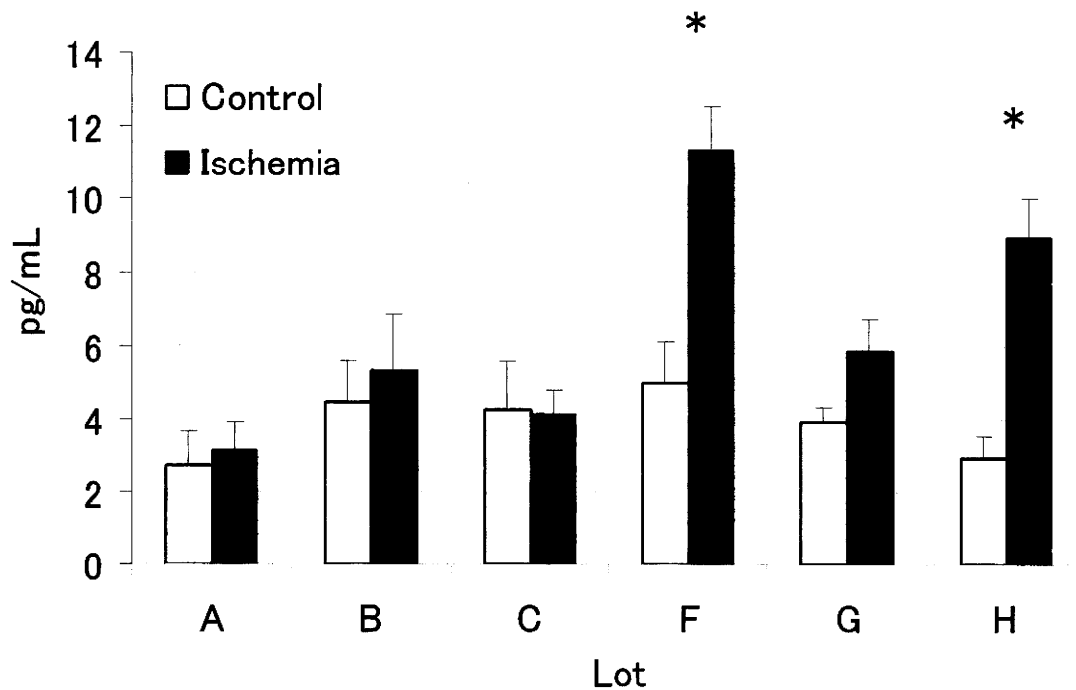


図 76 虚血後における hMSC のレプチン分泌量変化

通常条件または擬似的虚血条件培養 24 時間後における培養上清を用いてレプチン分泌を検討した。縦軸はレプチン濃度を示しており、横軸はロットを示している。

Two-way ANOVA によれば、レプチン分泌量は、hMSC のロット間で有意な差が認められた ( $p(\text{Lot}) < 0.05$ )。

また、虚血による有意なレプチン分泌増加が認められた ( $p(\text{Ischemia}) < 0.05$ )。

虚血とロットとの相互作用についても有意な差が認められ ( $p(\text{Lot} \times \text{Ischemia}) < 0.05$ )、虚血後のレプチン分泌量にはロット間の差がみられたと同時に、ロットFおよびHにおいて虚血によるレプチン分泌量の有意な増加が認められた ( $p < 0.05$ , Student-Newman-Keul test)。

[平均値 ± S.E.M. (n=5)] \* $p < 0.05$  vs. Control group of each lot

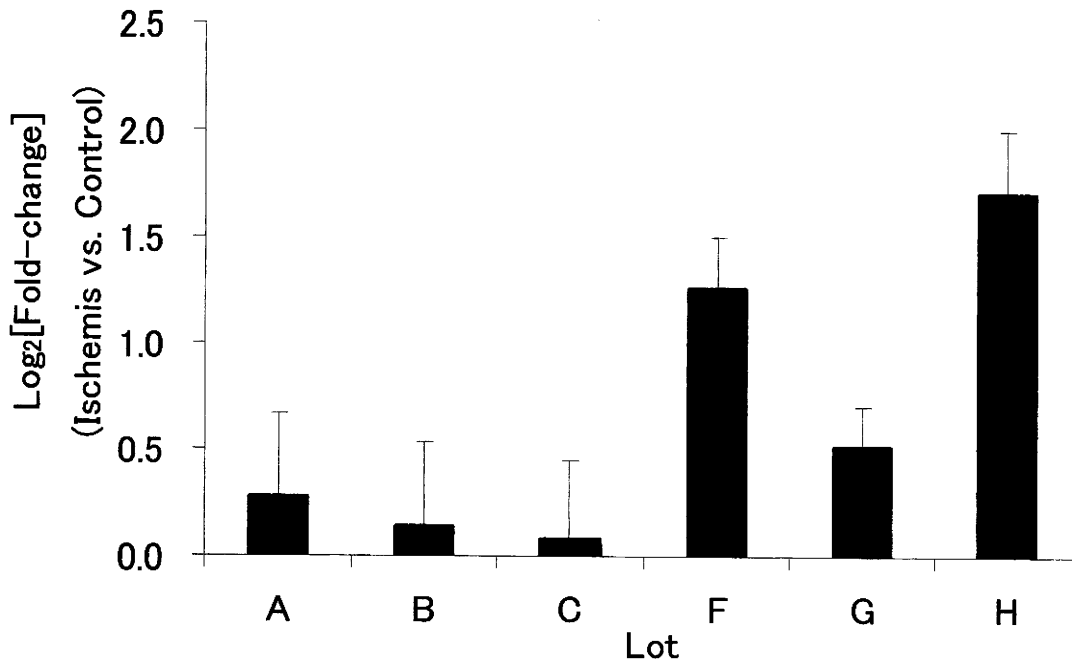


図 77 虚血後における hMSC のレプチン分泌変化率

通常条件または擬似的虚血条件培養 24 時間後における培養上清を用いてレプチン分泌を検討した。縦軸はコントロール群のレプチン濃度に対する虚血群の比率の対数を示しており、横軸はロットを示している。

One-way ANOVA によれば、虚血時のレプチン分泌変化率には有意なロット差が見られた ( $p < 0.05$ )。

[平均値 ± S.E.M. (自由度=8)]



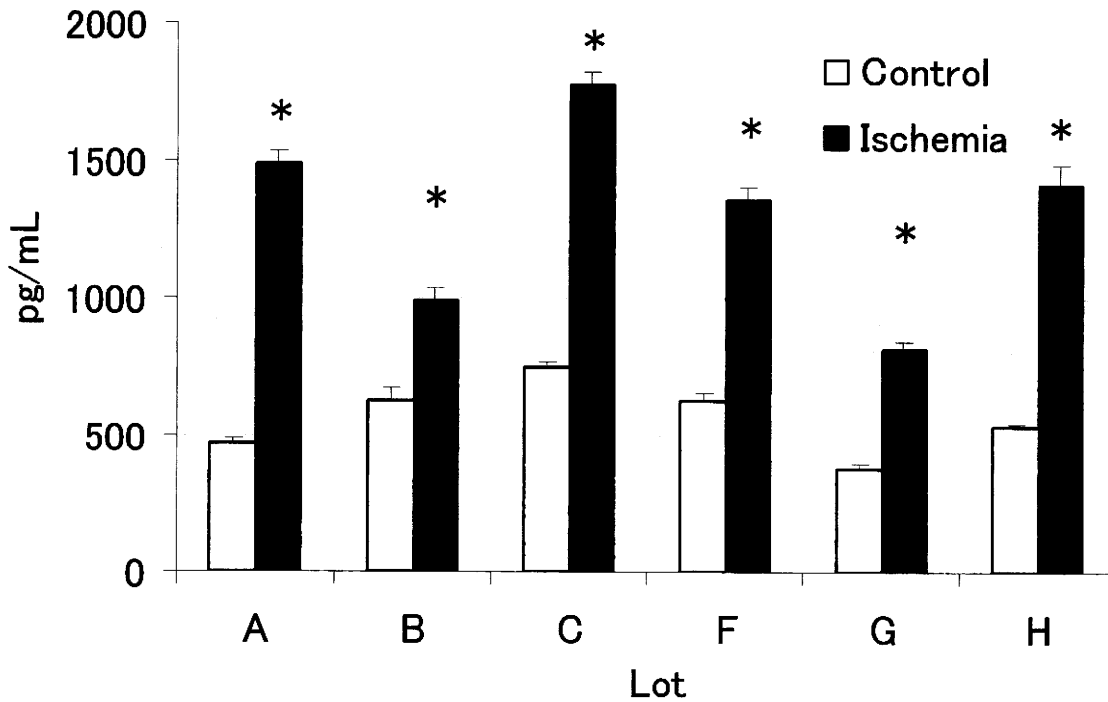


図 78 虚血後における hMSC の VEGF 分泌量変化

通常条件または擬似的虚血条件培養 24 時間後における培養上清を用いて VEGF 分泌を検討した。縦軸は VEGF 濃度を示しており、横軸はロットを示している。

Two-way ANOVA によれば、VEGF 分泌量は、hMSC のロット間で有意な差が認められた ( $p(\text{Lot}) < 0.05$ )。

また、虚血による有意な VEGF 分泌増加が認められた ( $p(\text{Ischemia}) < 0.05$ )。

虚血とロットとの相互作用についても有意な差が認められ ( $p(\text{Lot} \times \text{Ischemia}) < 0.05$ )、虚血後の VEGF 分泌量にはロット間の差がみられたと同時に、6 ロット各々において虚血による VEGF 分泌量の有意な増加が認められた ( $p < 0.05$ , Student-Newman-Keul test)。

[平均値 ± S.E.M. (n=5)] \* $p < 0.05$  vs. Control group of each lot

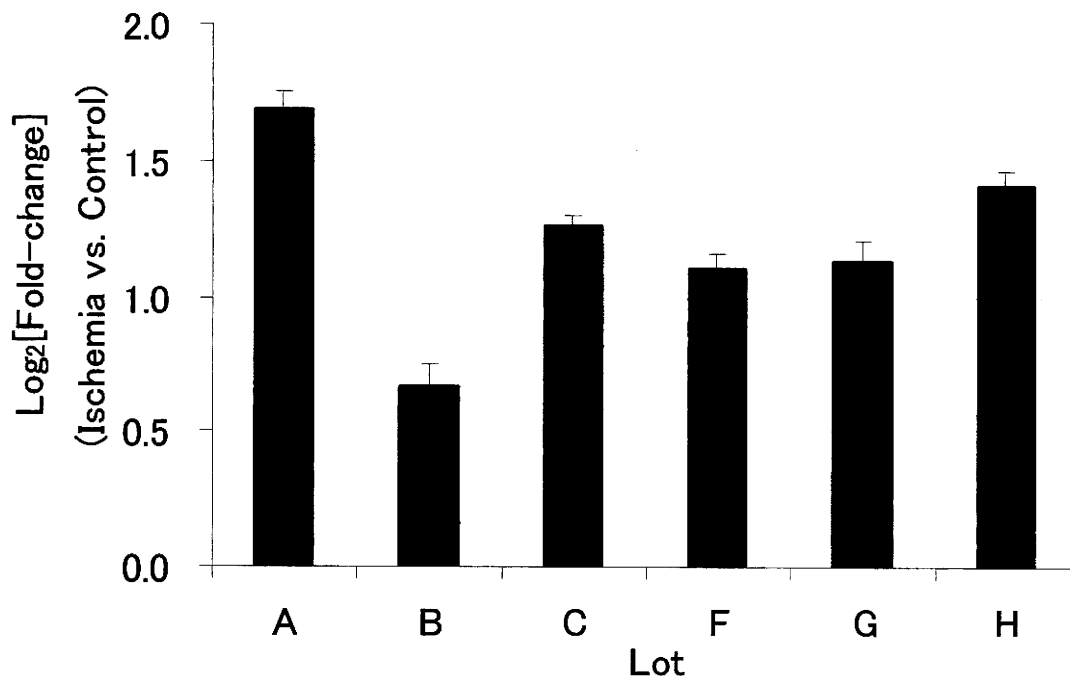


図 79 虚血後における hMSC の VEGF 分泌変化率

通常条件または擬似的虚血条件培養 24 時間後における培養上清を用いて VEGF 分泌を検討した。縦軸はコントロール群の VEGF 濃度に対する虚血群の比率の対数を示しており、横軸はロットを示している。

One-way ANOVA によれば、虚血時の VEGF 分泌変化率には有意なロット差が見られた ( $p < 0.05$ )。

[平均値 ± S.E.M. (自由度=8)]

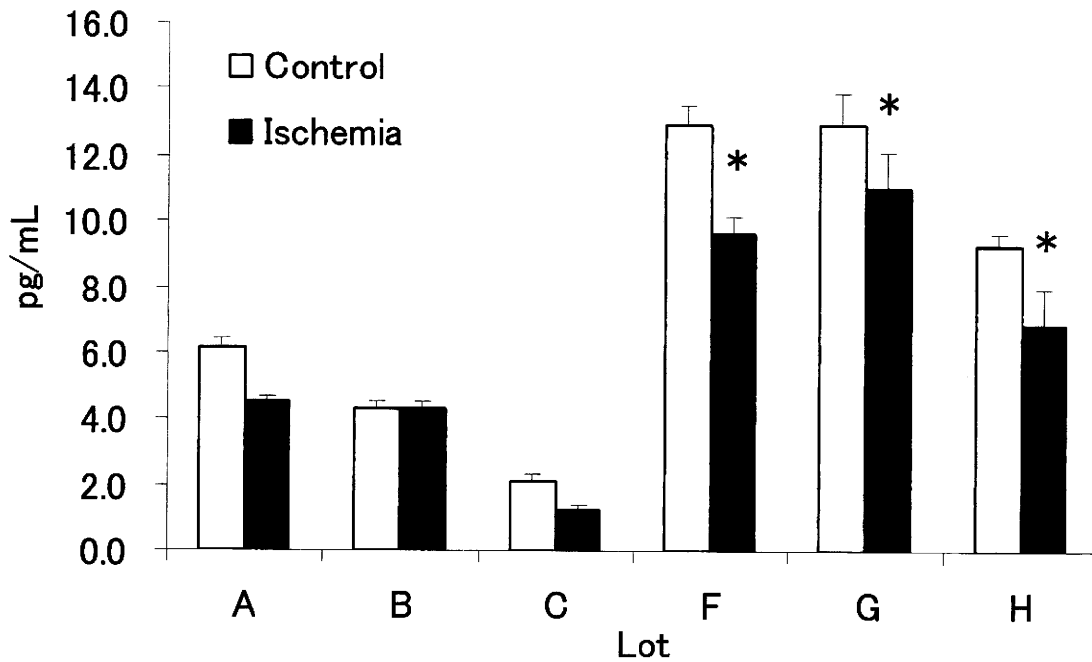


図 80 虚血後における hMSC の PIGF 分泌量変化

通常条件または擬似的虚血条件培養 24 時間後における培養上清を用いて PIGF 分泌を検討した。縦軸は PIGF 濃度を示しており、横軸はロットを示している。

Two-way ANOVA によれば、PIGF 分泌量は、hMSC のロット間で有意な差が認められた ( $p(\text{Lot}) < 0.05$ )。

また、ロット F、ロット G およびロット H については虚血による有意な PIGF 分泌減少が認められた ( $p(\text{Ischemia}) < 0.05$ )。

ただし、虚血とロットとの相互作用については有意な差は認められなかった ( $p(\text{Lot} \times \text{Ischemia}) = 0.117$ )。

[平均値  $\pm$  S.E.M. (n=5)] \* $p < 0.05$  vs. Control group of each lot

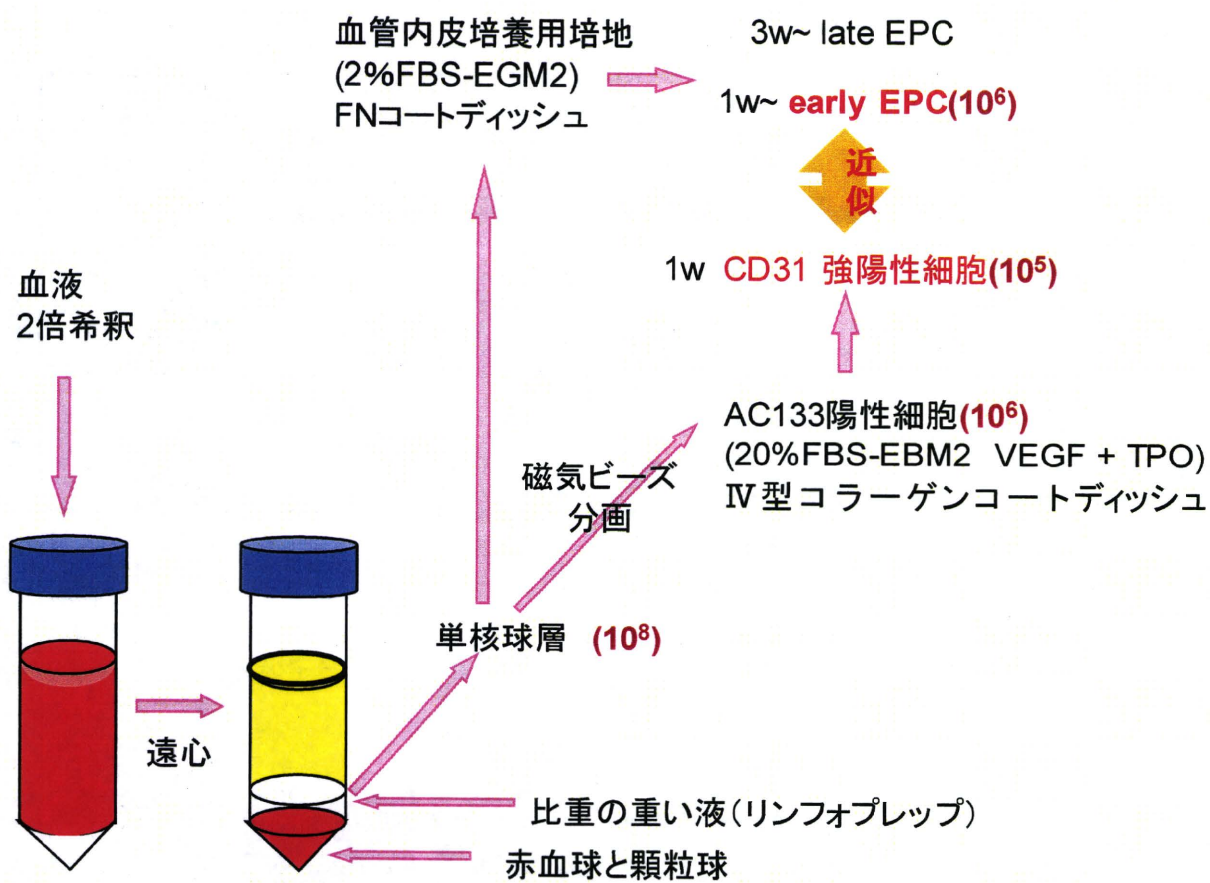


図 81. AC133 陽性細胞由来 early EPC、単核球細胞由来 early EPC および late EPC の分化・誘導

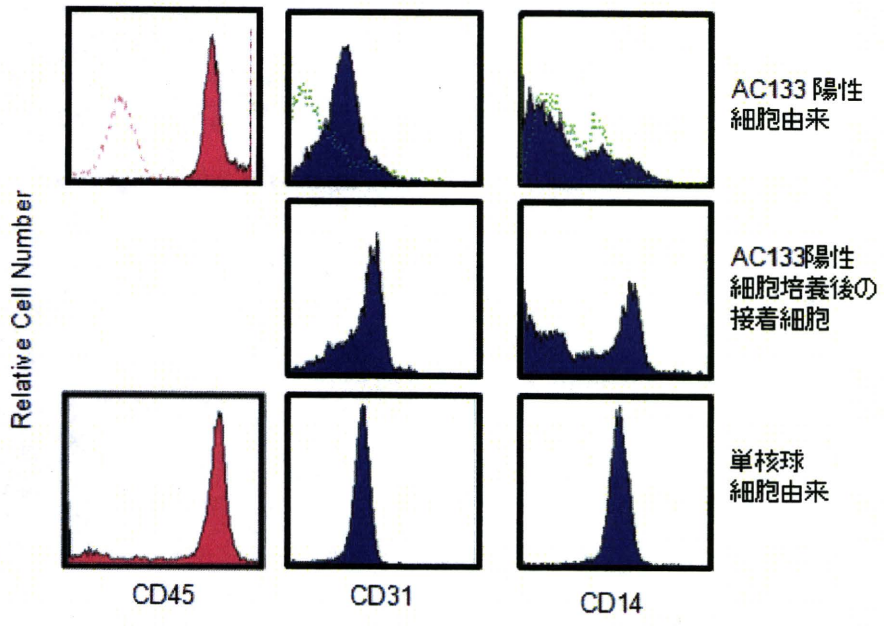
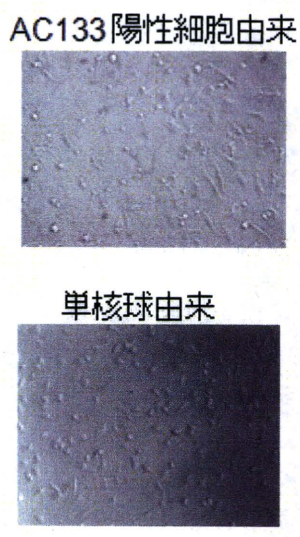


図 82. AC133 陽性細胞及び単核球由来 early EPC の顕微鏡画像

図 83. AC133 陽性細胞及び単核球由来 early EPC における細胞表面マーカー分子の発現

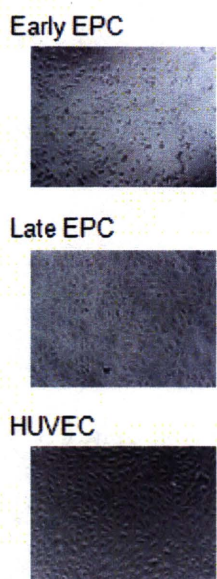


図 84. 単核球由来 early EPC、Late EPC および HUVEC の光顕画像

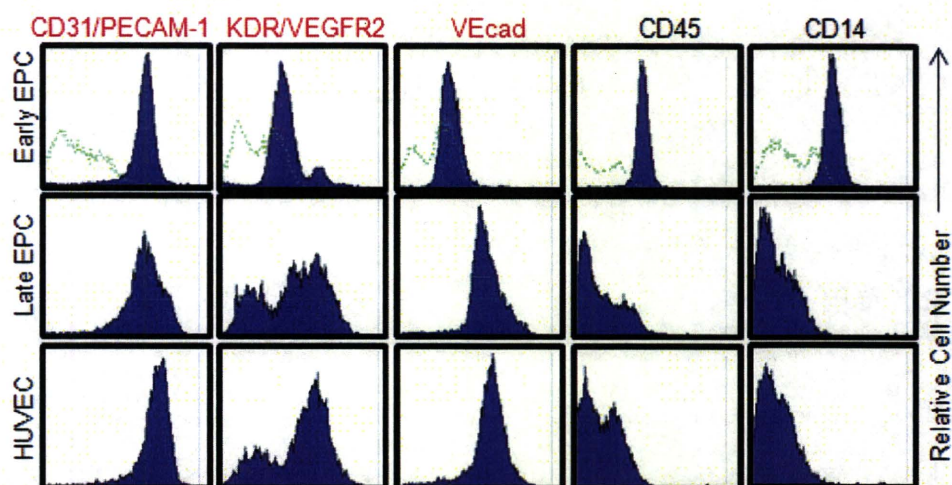


図 85. 単核球由来 early EPC、Late EPC および HUVEC における細胞表面マーカー分子の発現

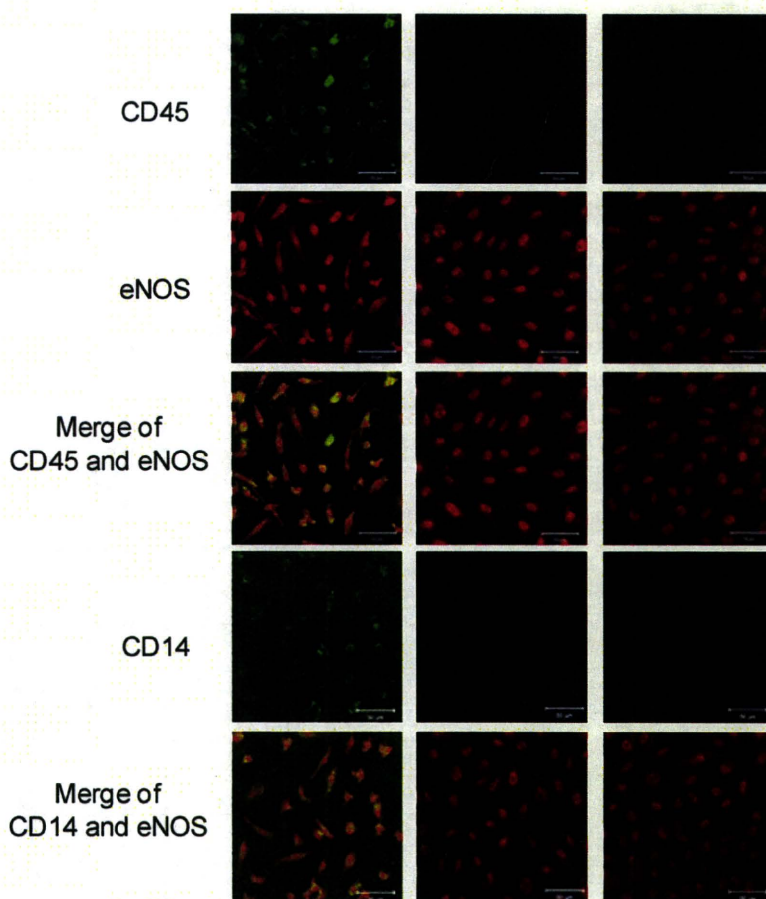


図 86. 単核球由来 early EPC、Late EPC および HUVEC におけるマーカー分子の発現

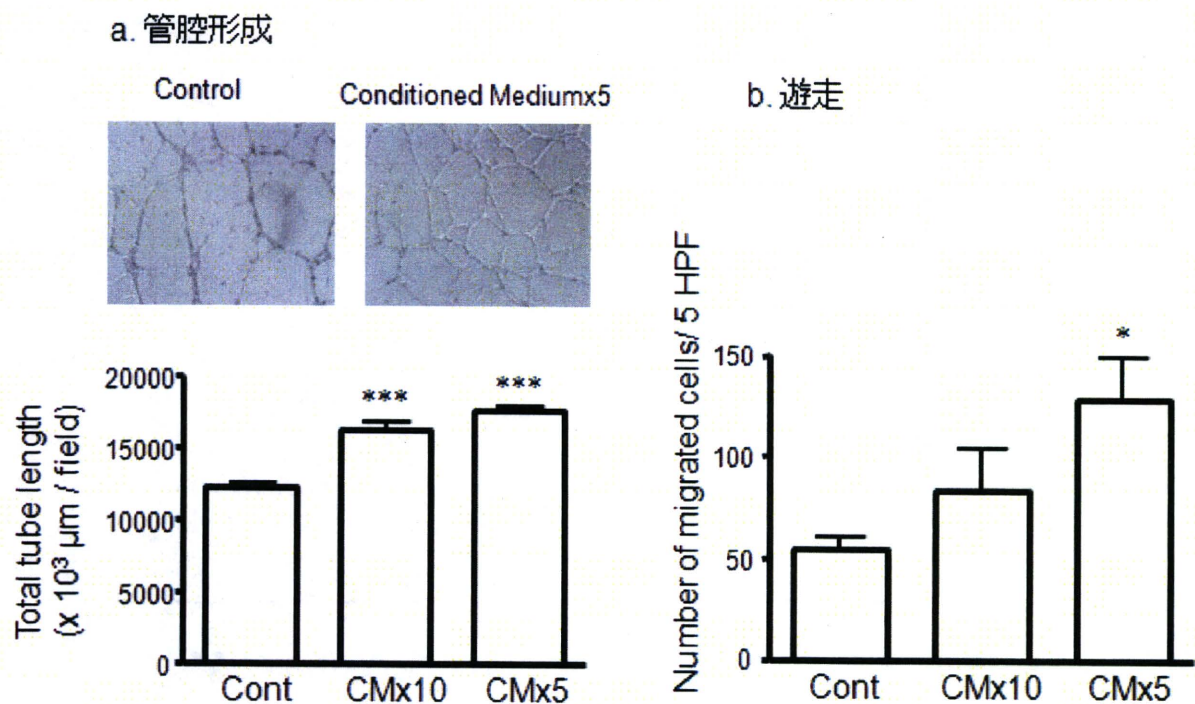


図 87. 冠状動脈内皮細胞の管腔形成・遊走に対する early EPC 培養上清の促進効果

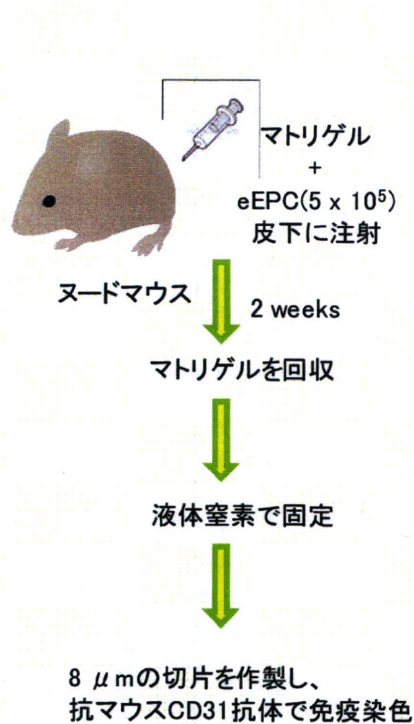


図 88. マトリゲルとともにヌードマウスに移植した eEPC の *in vivo*における血管形成促進効果

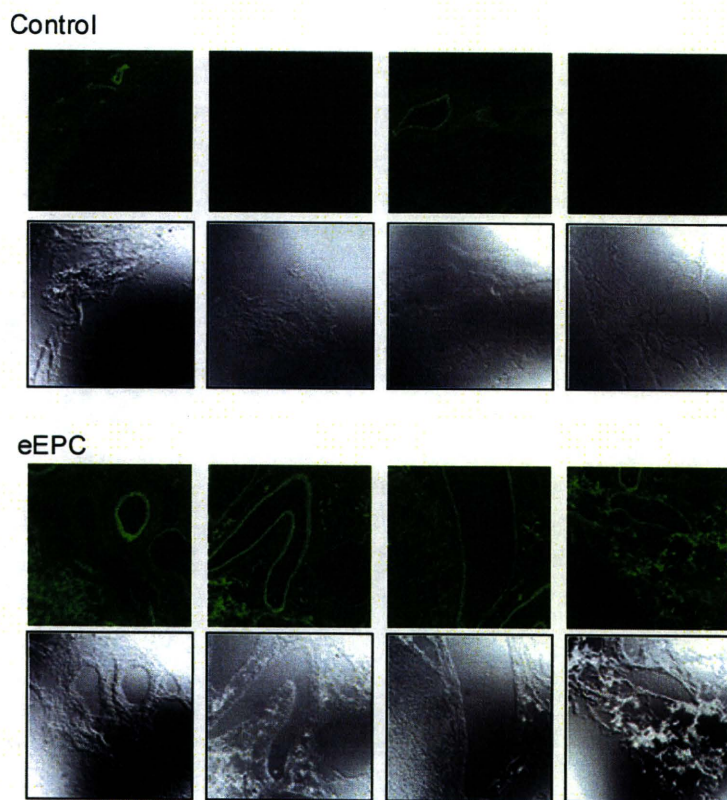


図 89. Early EPC とともに移植したマトリゲル内に観察される宿主マウス由来 CD31 陽性血管内皮細胞

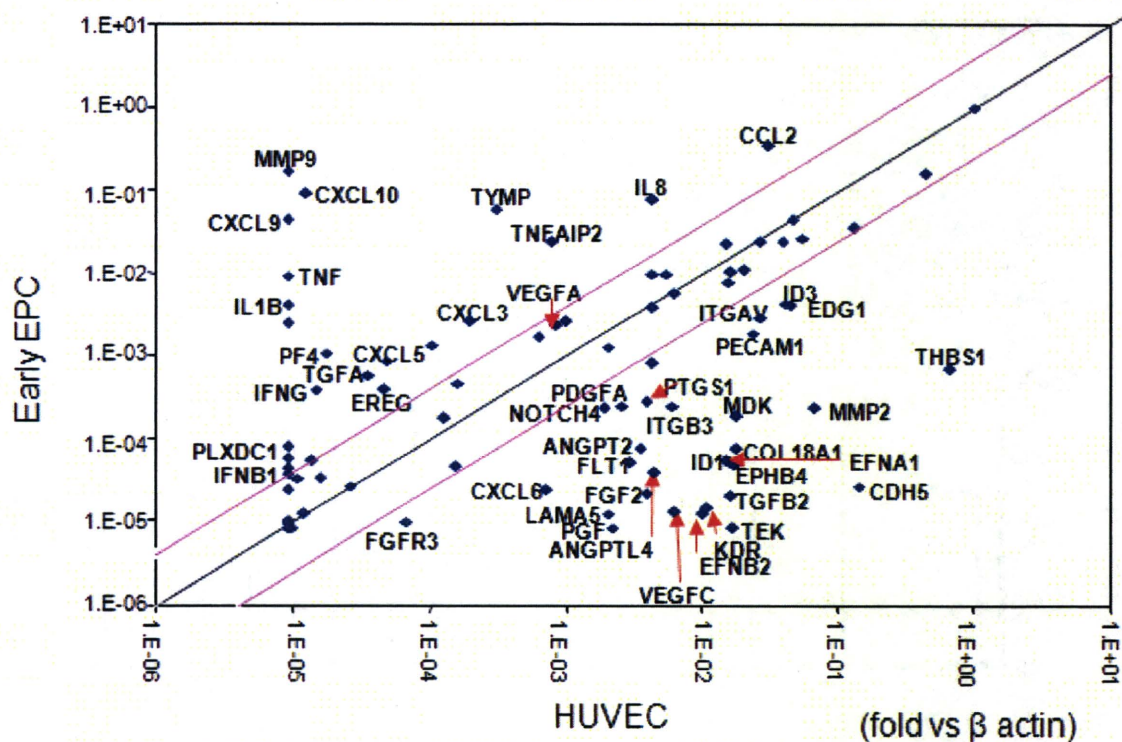


図 90. Early EPC 及び HUVEC における血管新生関連因子の遺伝子発現プロファイル比較

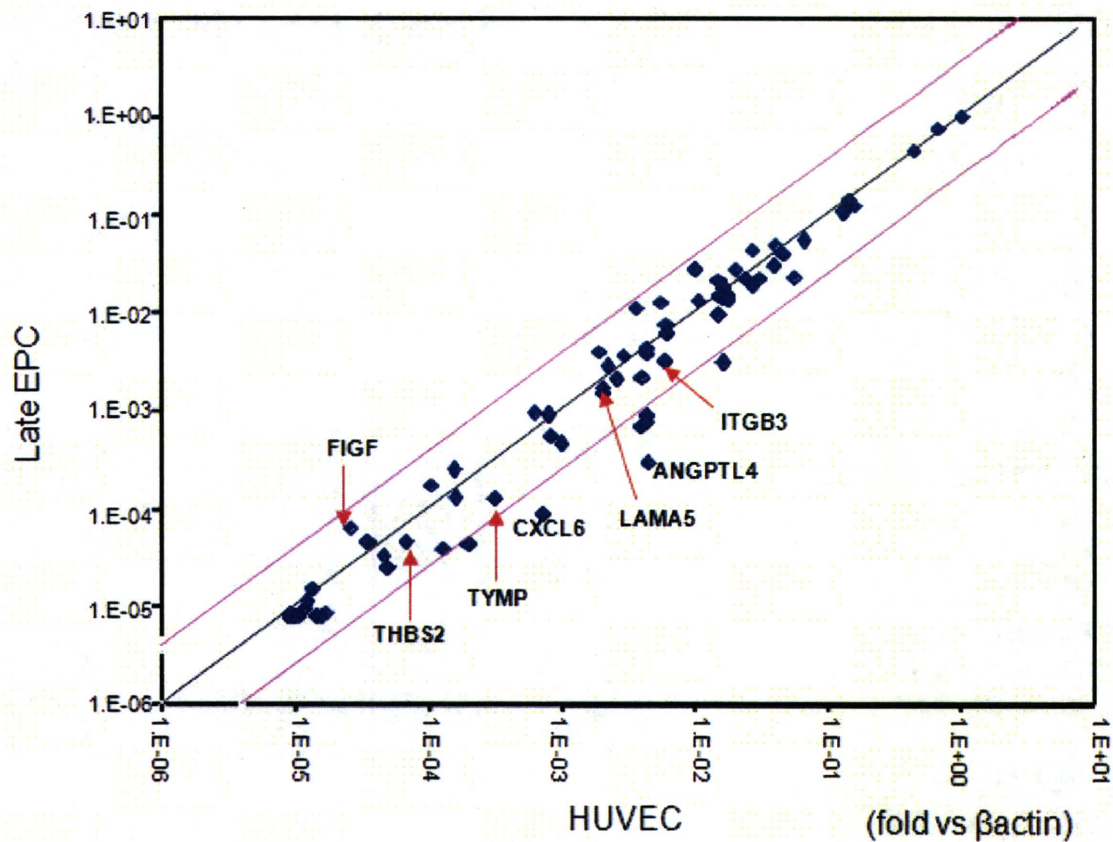


図 91. Late EPC 及び HUVEC における血管新生関連因子の遺伝子発現プロファイル比較

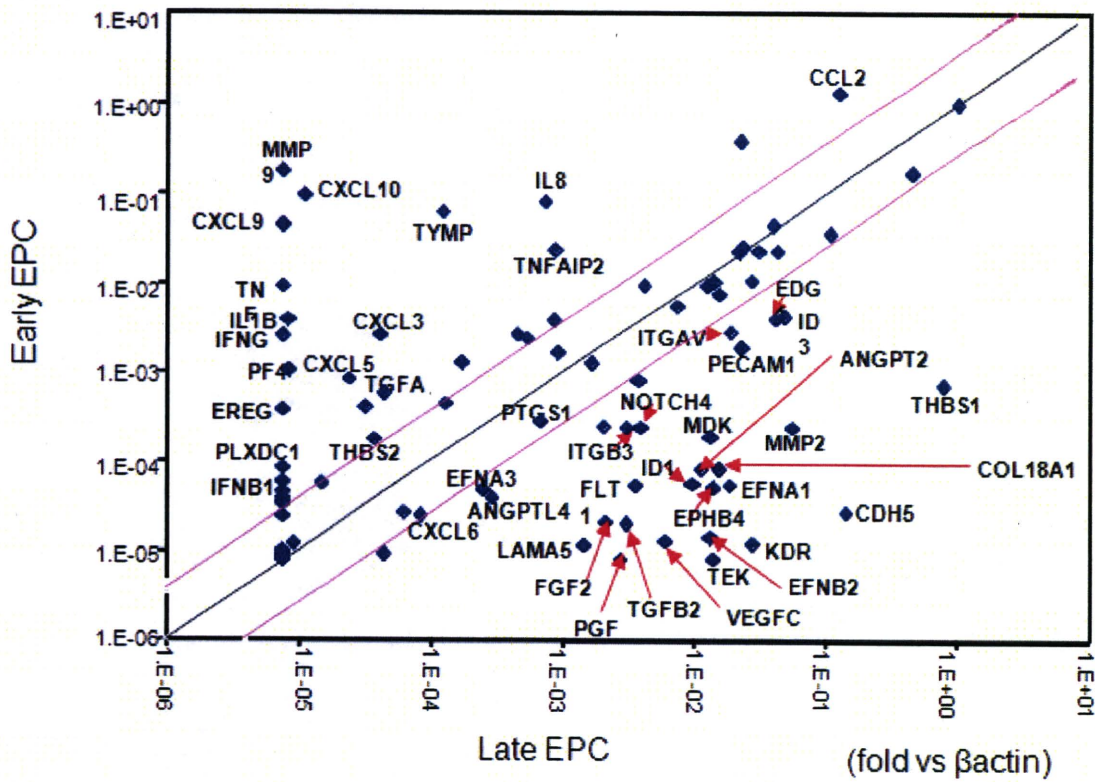


図 92. 単核球由来 early EPC 及び late EPC における血管新生関連因子の遺伝子発現プロファイル比較

ウエスタンブロッティング

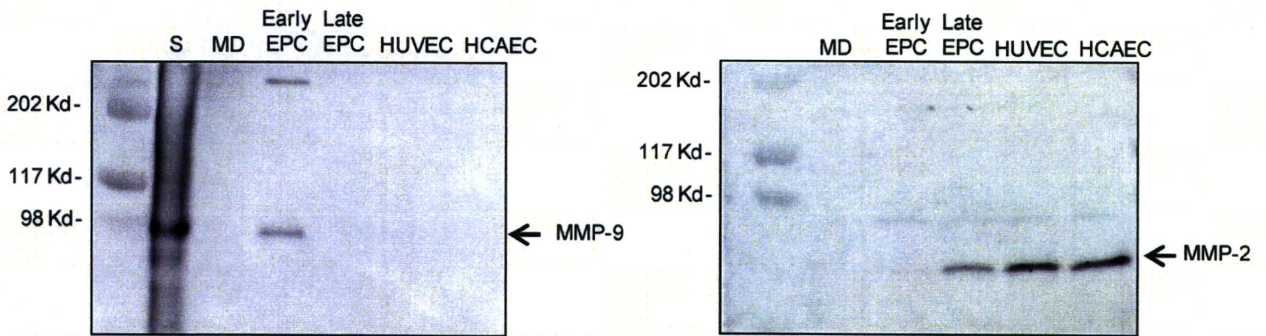


図 93. 種々の細胞の培養上清における MMP-9/MMP-2 タンパク質および活性の検出



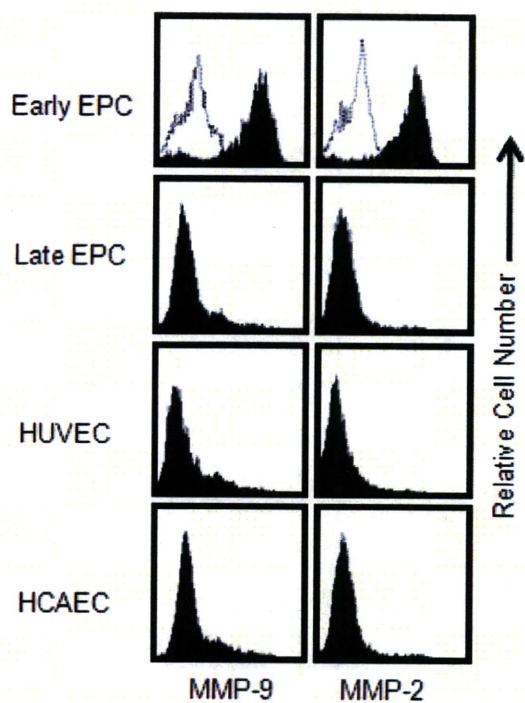


図 94. フローサイトメトリーによる細胞表面 MMP-9/MMP-2 の検出

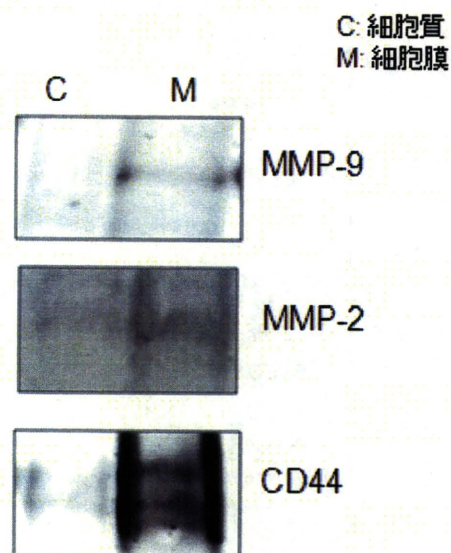


図 96. ウェスタンブロットによる MMP-9、MMP-2、及び CD44 の検出

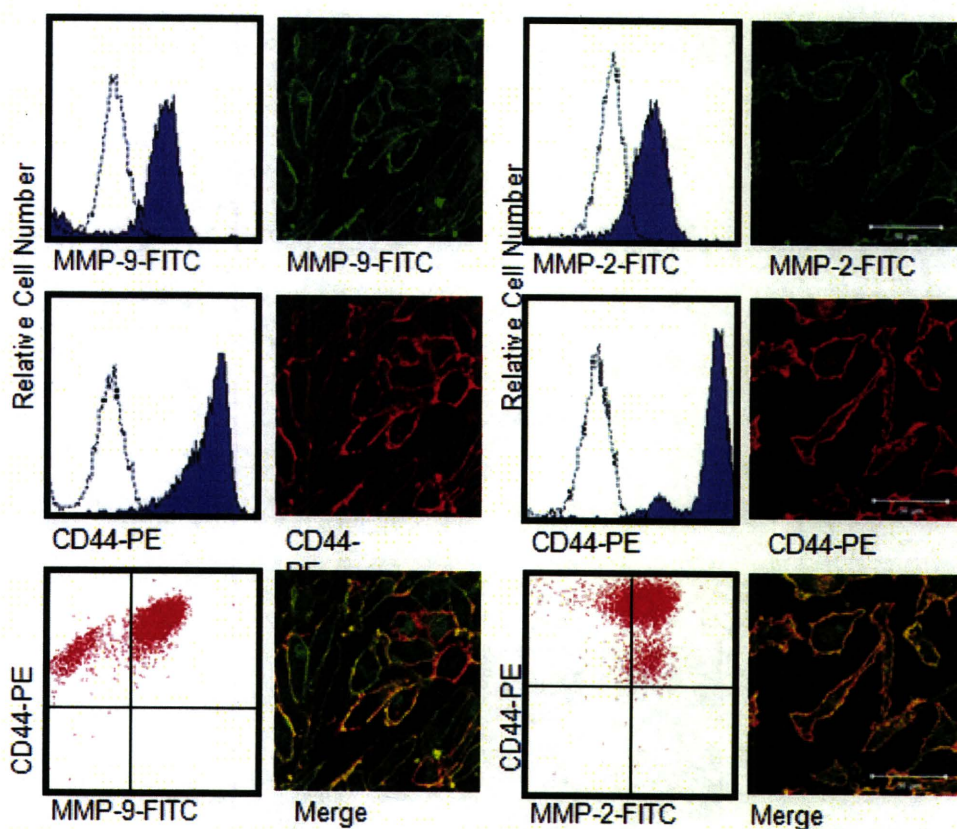


図 95. 共焦点レーザー顕微鏡を用いた MMP-9、MMP-2、及び CD44 の蛍光免疫染色解析

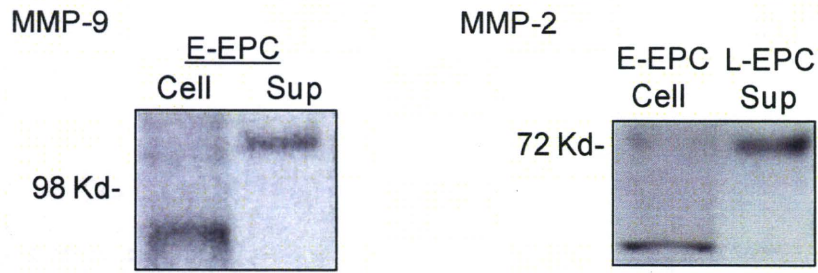


図 97. ウェスタンブロットによる細胞内と培養上清中 MMP-9 及び MMP-2 の分子量比較

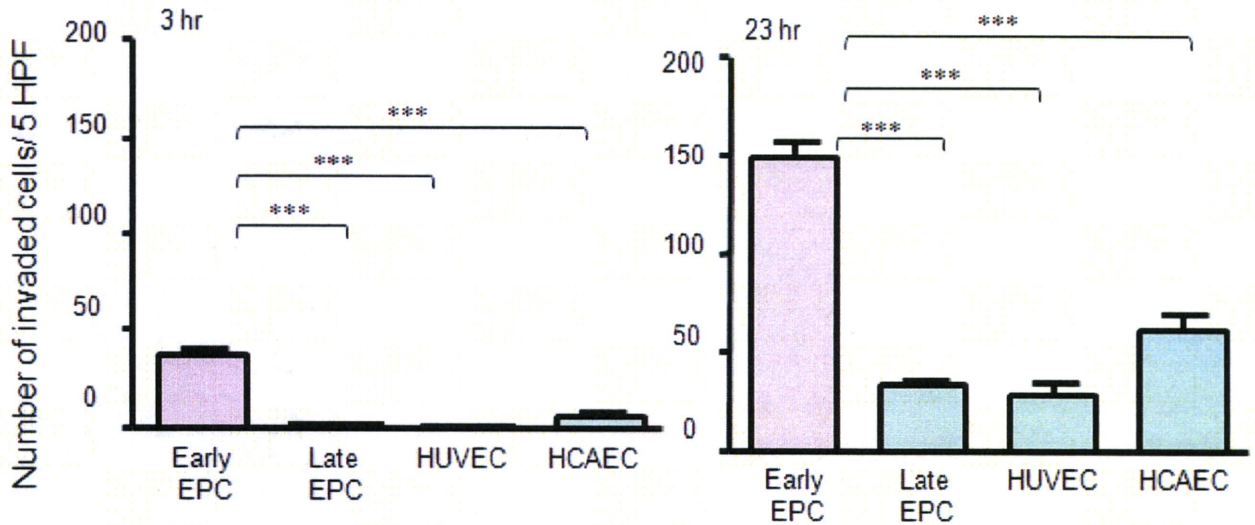


図 98. VEGF 刺激に応答した浸潤活性

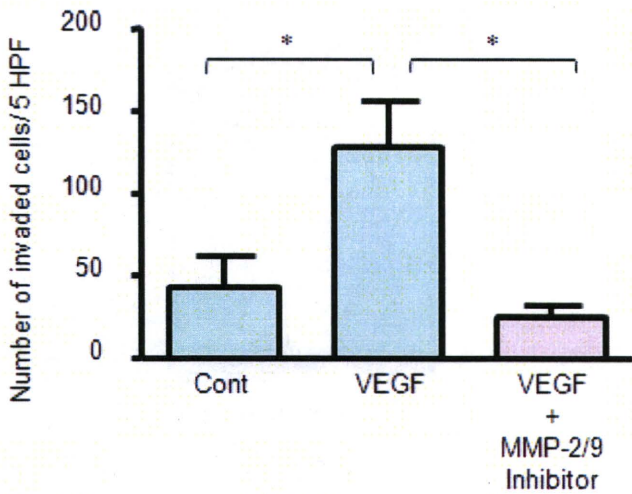


図 99. VEGF 刺激による early EPC の浸潤に対する MMP-2/9 阻害剤の効果

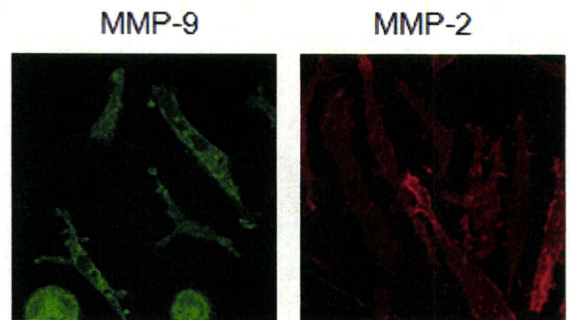


図 100. AC133 由来 Early EPC における MMP-9/MMP-2 の発現

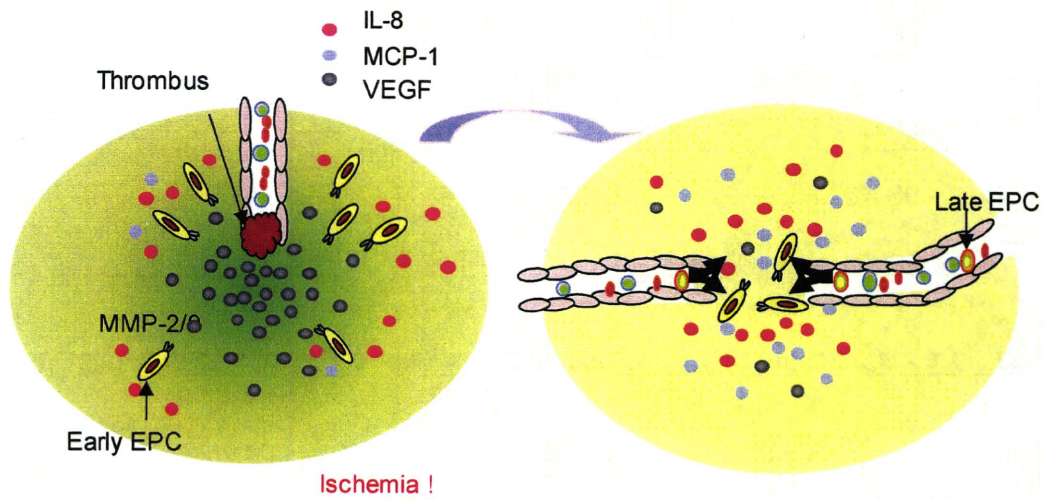


図 101. Early EPC が最も早く虚血部位に浸潤する と考える作業仮説

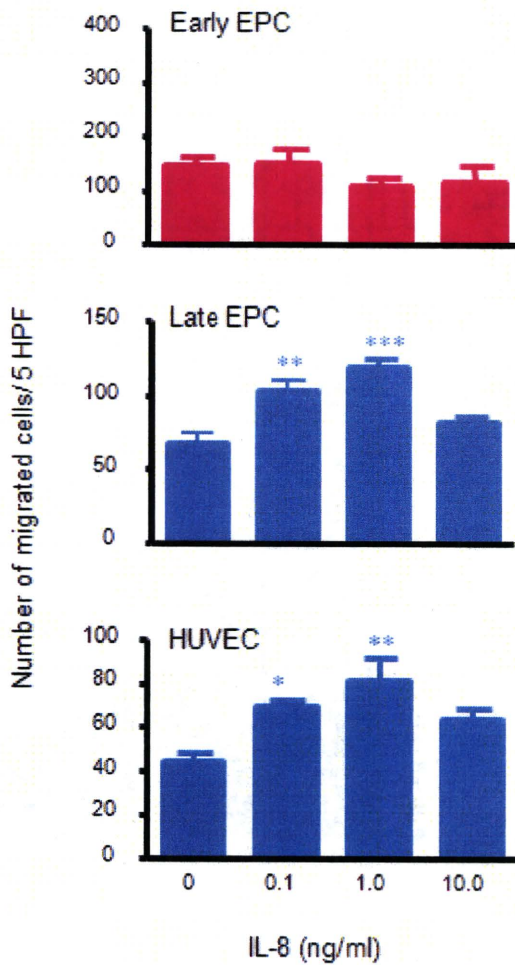


図 102. IL-8 に応答した EPC の遊走

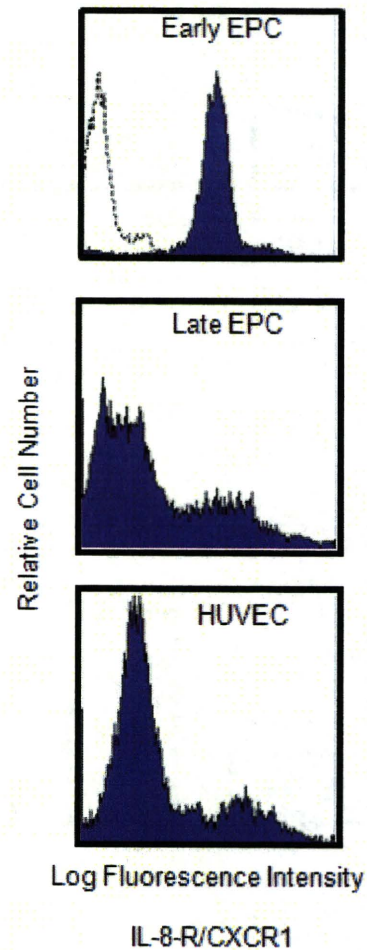


図 103. EPC における IL-8 受容体の発現

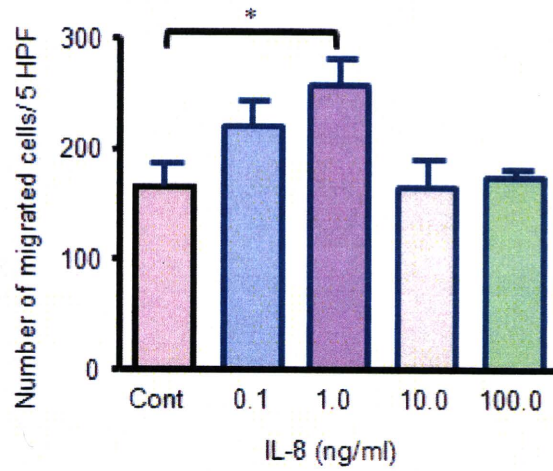


図 104. IL-8 に応答した CD14 陽性細胞の遊走

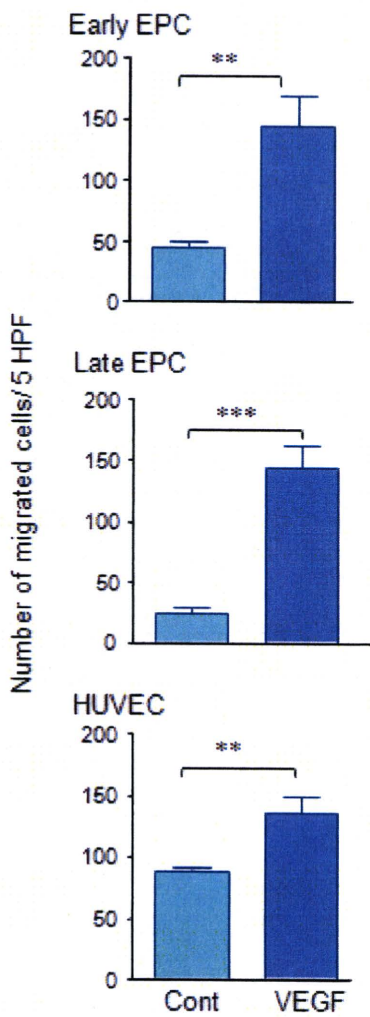


図 105. VEGF に応答した EPC の遊走

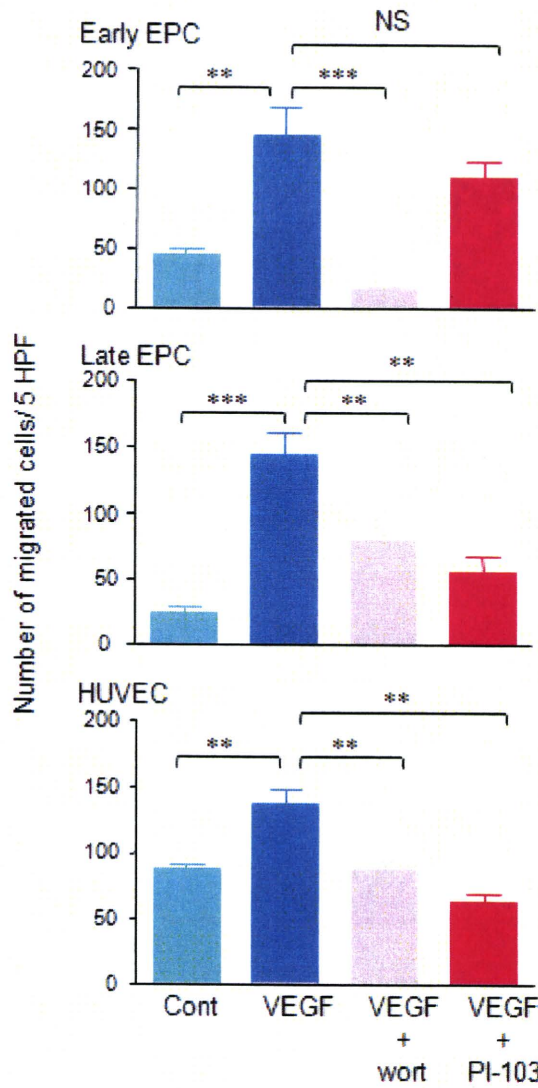


図 106. VEGF により惹起される遊走に対する PI3K 阻害剤の効果