

表1 リアルタイムRT-PCRに用いたプライマーの塩基配列

標的遺伝子	GenBank 登録番号	プライマーセット		PCR product length(bp)
<i>s29</i>	NM_009093	Sense: 5'-GGAGTCACCCACGGAAGTTCGG-3'	Anti-sense: 5'-GGAAGCACTGGCGGCACATG-3'	108
<i>alp</i>	JO2980	Sense: 5'-GCTCTCCCTACCGACCCTGTTC-3'	Anti-sense: 5'-TGCTGGAAGTTGCCTGGACCTC-3'	130
<i>ocn</i>	BC055868	Sense: 5'-CCAAGCAGGAGGGCAATAAGGTAG-3'	Anti-sense: 5'-CTCGTCACAAGCAGGGTCAAGC-3'	122
<i>lpl</i>	BC003305	Sense: 5'-GTCTGGCTGACACTGGACAA-3'	Anti-sense: 5'-TGGGCCATTAGATTCCTCAC-3'	96
<i>pparg</i>	NM_011146	Sense: 5'-GCCAAGGTGCTCCAGAAGATGA-3'	Anti-sense: 5'-CGGGTGGGACTTTCCTGCTAAT-3'	155
<i>il2</i>	BC116873	Sense: 5'-TTCTGAGGAGATGGATAGCC-3'	Anti-sense: 5'-TGTGTTGTAAGCAGGAGGTA-3'	81
<i>il10</i>	BC120612	Sense: 5'-ACTCCAGGACCTAGACAGA-3'	Anti-sense: 5'-TAGTTCACAGAGAAGCTCAGT-3'	84.8
<i>tgfb-1</i>	NM_011577	Sense: 5'-CCCTATTTAAGAACACCCACTT-3'	Anti-sense: 5'-GAGAAAGCAGCAGGAGTC-3'	117
<i>hgf</i>	NM_010427	Sense: 5'-TGGTTCTTGGTGTCATTGTT-3'	Anti-sense: 5'-CCTCTTCTATGGCTATTACAACTT-3'	137

表2 疾患活動度評価基準

DAI	体重	下痢	血便
0	減少なし	正常便	正常
1	5%以内の減少	軟便半固形 (湿っていて触ると容易に崩れる)	便潜血陽性
2	5-10%以内の減少	軟便(水分量の多い有形便)	目視で便に血液が混入
3	10-20%以内の減少	下痢便 (水分量の多い形の崩れた便)	肛門に血液が付着
4	20%を超える減少	水様便 (ほとんど無形の液状便)	肛門から常に出血

(DAI: disease Activity index)

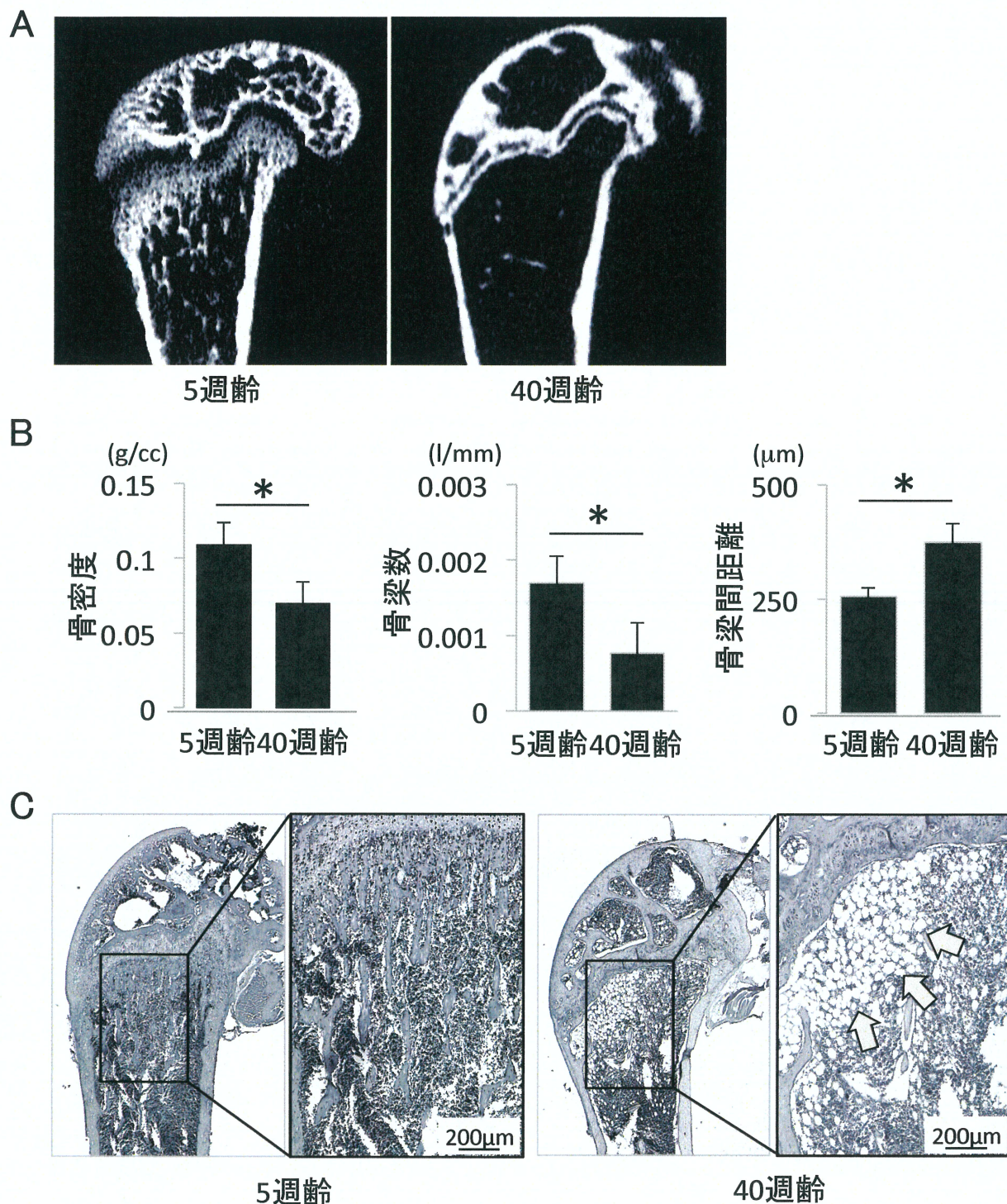


図1 5週齢，40週齢マウスにおける大腿骨の比較

(A) 5週齢，40週齢大腿骨mCT像を示す。40週齢大腿骨では，5週齢大腿骨と比較して骨髓腔内における海綿骨梁が著明に減少している像が観察された。

(B) mCT解析結果を示す。40週齢大腿骨は5週齢大腿骨と比較し，骨密度は有意に低く，海綿骨梁数は有意に少なかった。また，海綿骨梁間距離は有意に大きかった。骨密度，骨梁数，骨梁間距離それぞれの平均値±標準偏差をグラフに示す(*: $p < 0.05$, Unpaired-t検定)。

(C) HE染色による組織学的解析結果を示す。5週齢では，海綿骨梁像が多数観察されるのに対し，40週齢では観察されなかった。また，脂肪組織が多数観察された(矢印：脂肪組織，スケールバー：200 μm)。

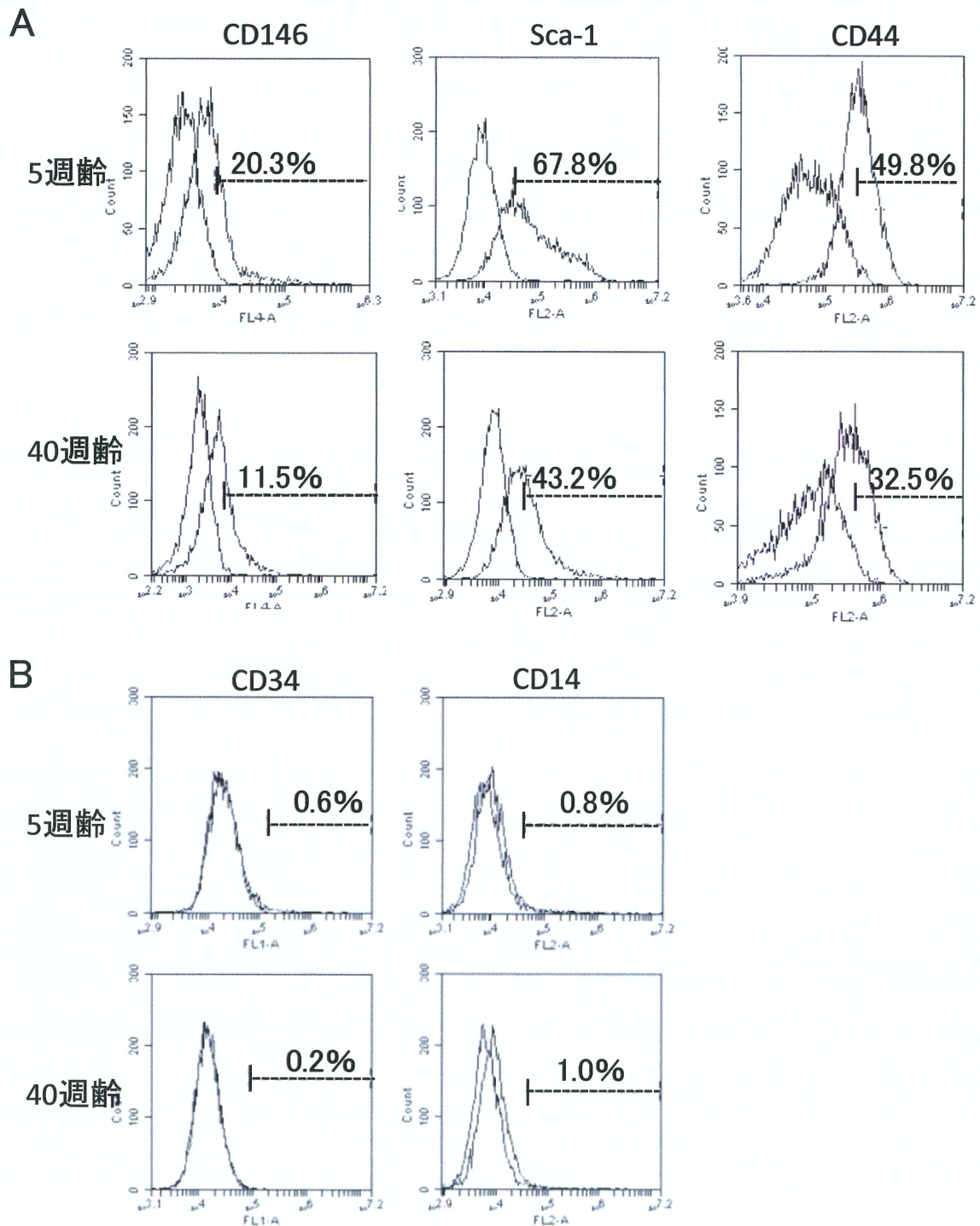


図2 5週齢，40週齢mBSCsの幹細胞性の比較

5週齢，40週齢mBSCsの表面抗原の発現解析結果を示す。

(A) 間葉系幹細胞陽性抗原であるCD146，Sca-1，CD144はいずれの週齢においても発現していたが，40週齢mBSCsは，5週齢mBSCsと比較し，それぞれの発現が低かった。

CD146，Sca-1，CD144それぞれの陽性細胞数を%で示す。

(B) 間葉系幹細胞陰性抗原であるCD34，CD14の発現は，いずれの週齢においても認められなかった。CD34，CD14それぞれの陽性細胞数を%で示す。

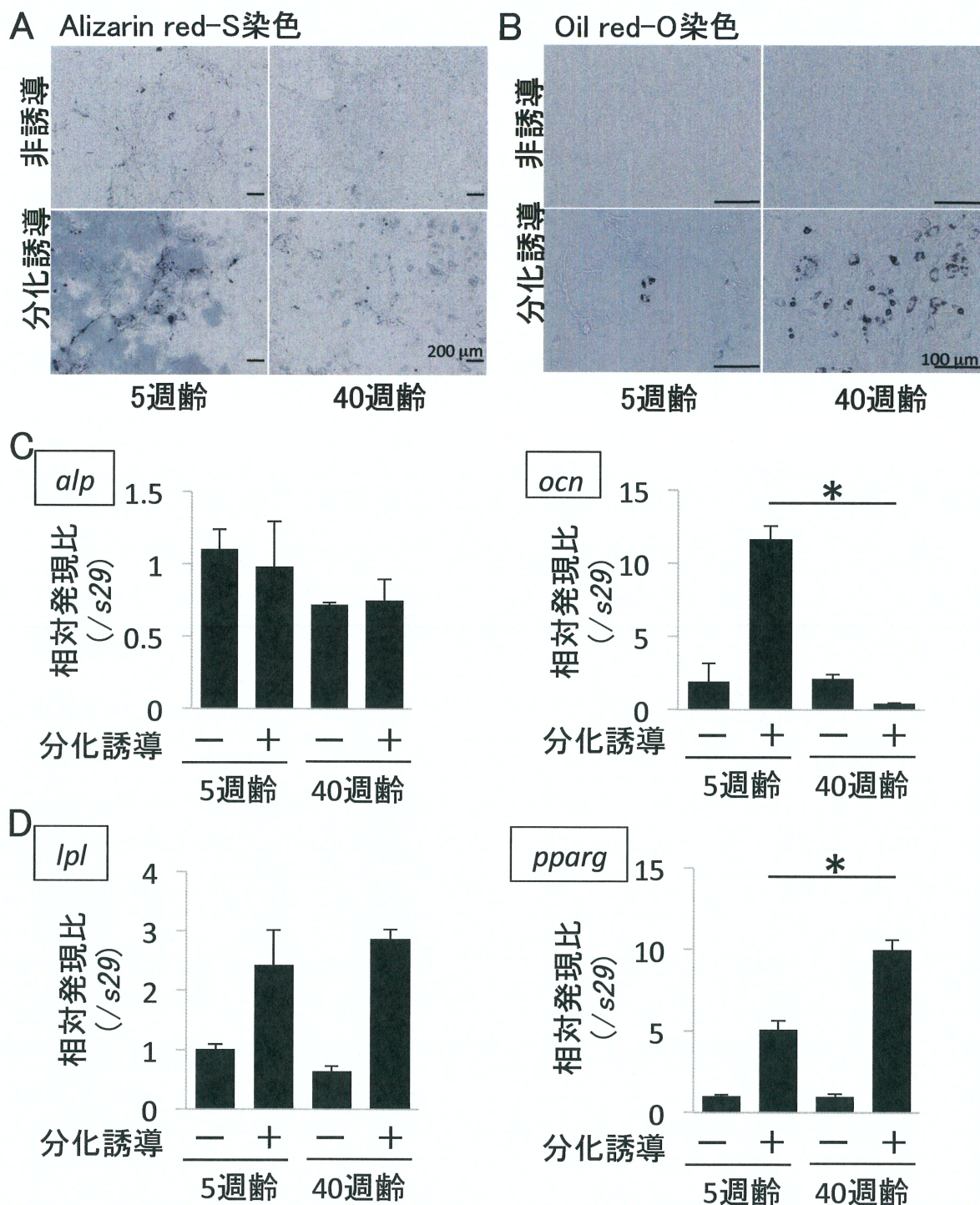


図3 5週齢, 40週齢mBMSCsの多分化能の比較

(A, C) Alizarin red-S染色ならびにリアルタイムRT-PCRの結果を示す. 40週齢mBMSCsは5週齢mBMSCsと比較して, カルシウム塩の沈着が少なく, *ocn*の発現が有意に低かった. 発現した*alp*, *ocn*の平均値±標準偏差をグラフに示す (スケールバー: 200 μ m, *: $p < 0.05$, one-way ANOVA/Tukey).

(B, D) Oil red-O染色ならびにリアルタイムRT-PCRの結果を示す.

40週齢mBMSCsは5週齢mBMSCsと比較して, 脂肪滴が多く, また, *pparg*の発現が有意に低かった. 発現した*lpl*, *pparg*の平均値±標準偏差をグラフに示す (スケールバー: 100 μ m, *: $p < 0.05$, one-way ANOVA/Tukey).

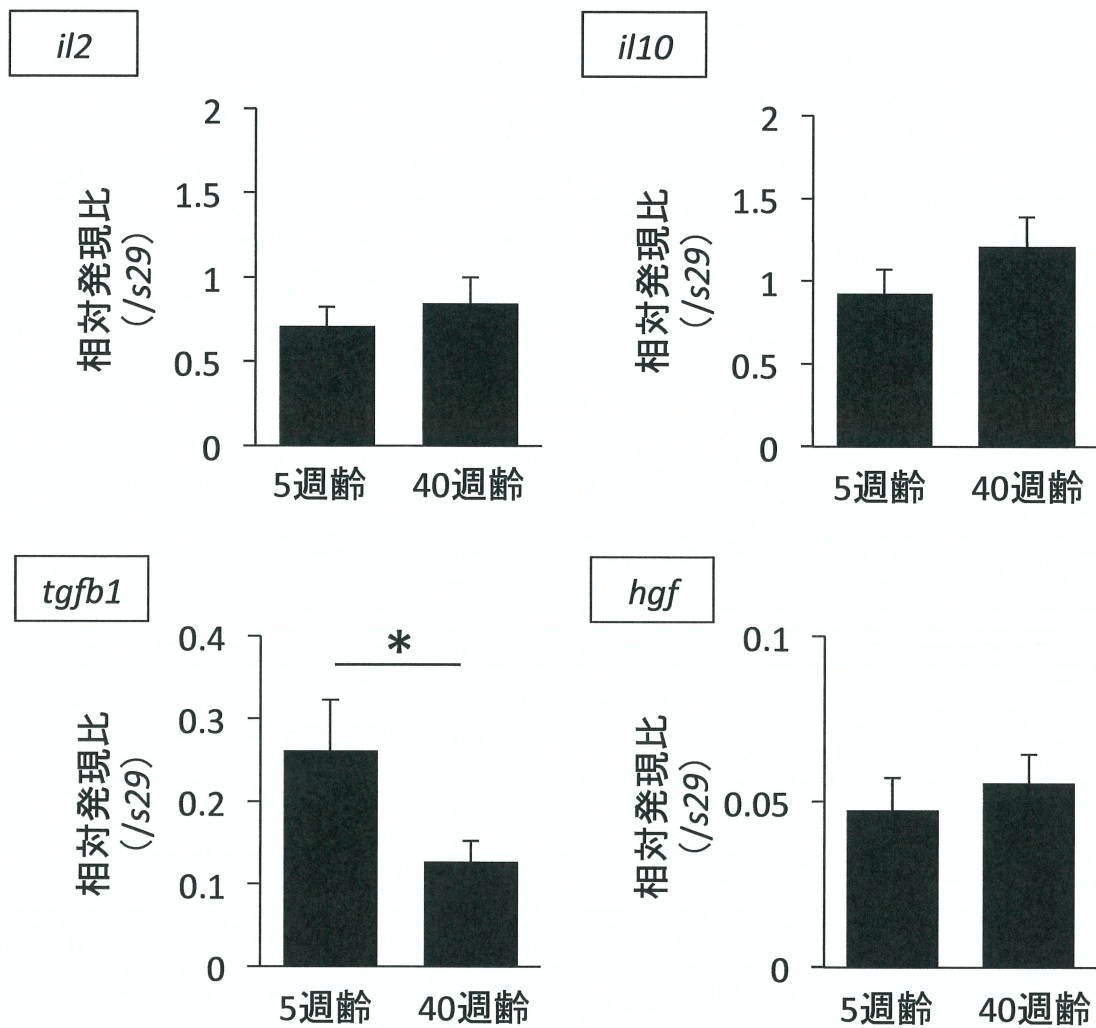


図4 5週齢, 40週齢mBMSCsの抗炎症性サイトカイン発現の比較

40週齢mBMSCsは, 5週齢mBMSCsと比較し, *il2*, *il10*, *hgf*の遺伝子発現に差は認められなかったが, *tgfb1*の発現が有意に低かった. 発現した*il2*, *il10*, *tgfb1*, *hgf*の平均値±標準偏差をグラフに示す (* : $p < 0.05$, Unpaired-t検定) .

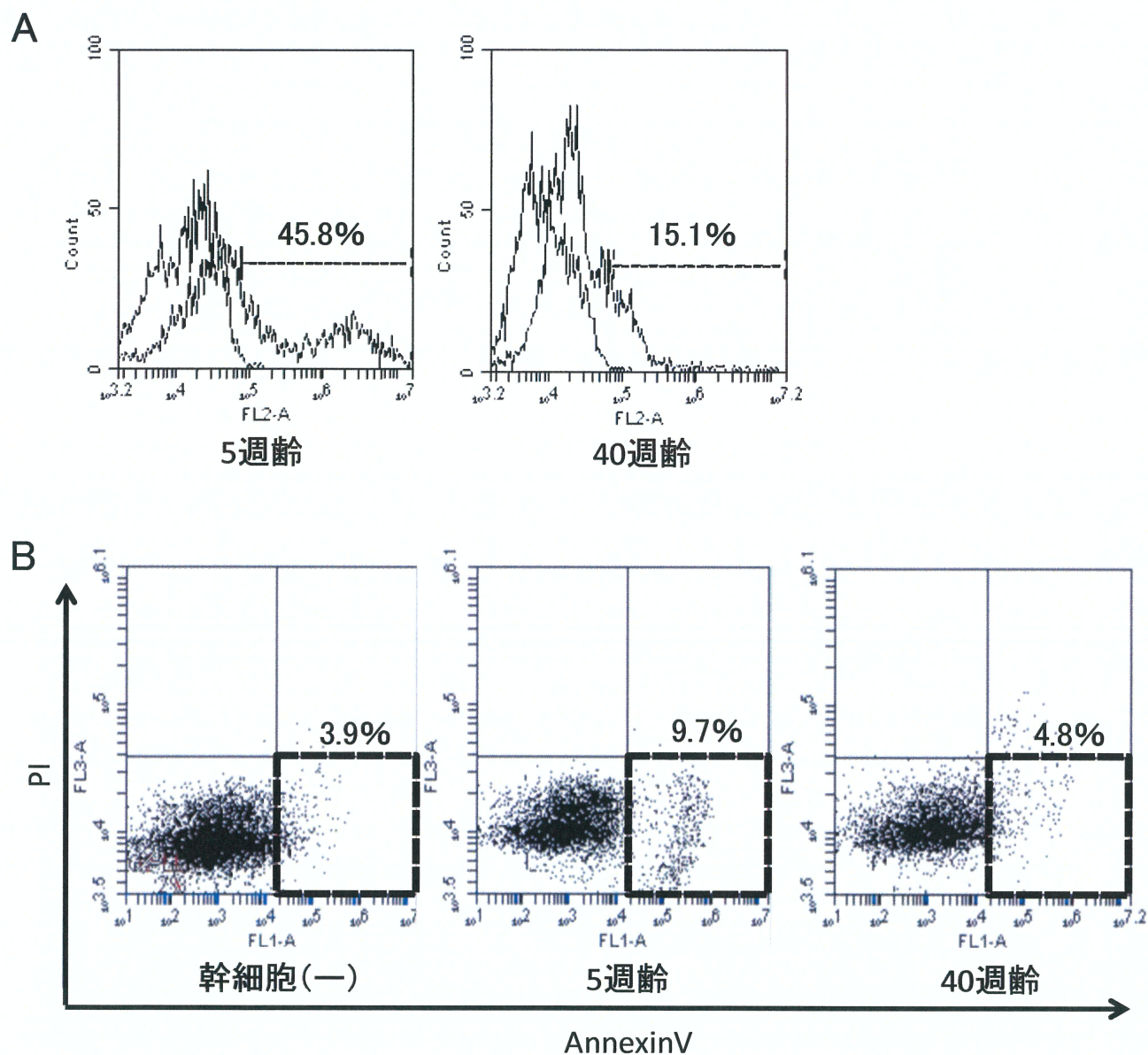
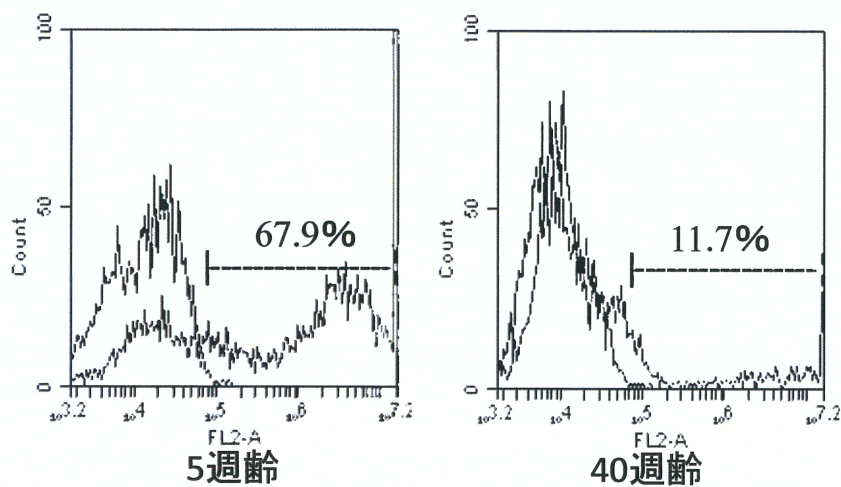


図5 5週齢，40週齢mBMsのFASLによるT細胞アポトーシス誘導の比較

(A) フローサイトメトリ解析によるFASL発現結果を示す．40週齢mBMsは，5週齢mBMsと比較してFASLの発現が低かった．FASL陽性細胞数を%で示す．

(B) T細胞との共培養結果を示す．40週齢mBMsとの共培養では，5週齢mBMsとの共培養と比較して，Annexin V陽性細胞の割合が低かった．

A



B

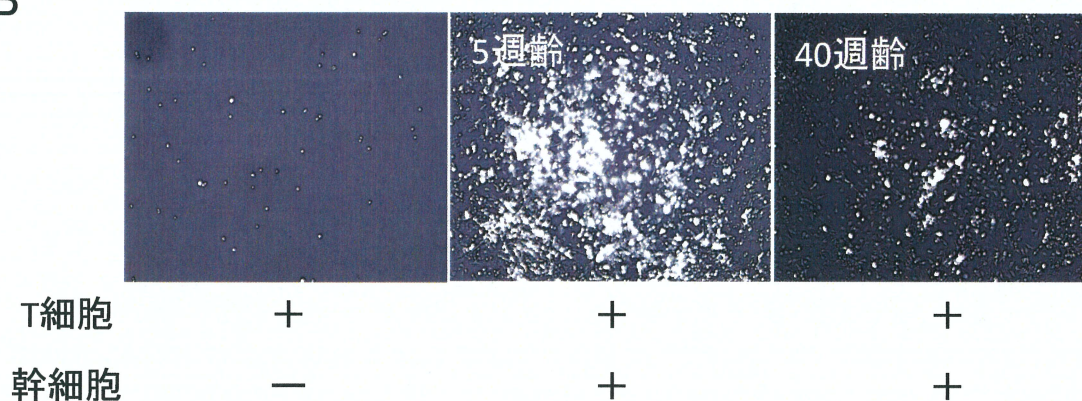


図6 5週齢, 40週齢mBMSCsのMCP-1によるT細胞遊走誘導の比較

(A) フローサイトメトリー解析によるMCP-1発現結果を示す. 40週齢mBMSCsは, 5週齢mBMSCsと比較して, MCP-1の発現が低かった. MCP-1陽性細胞数を%で示す.

(B) T細胞との共培養結果を示す. 40週齢mBMSCsとの共培養では, 5週齢mBMSCsと比較して, 遊走されたT細胞が少なかった.

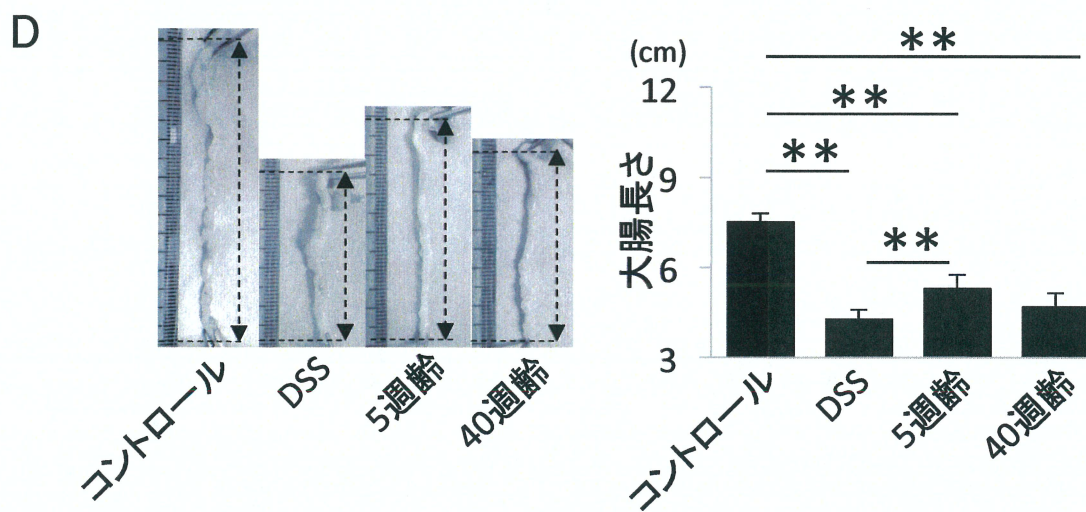
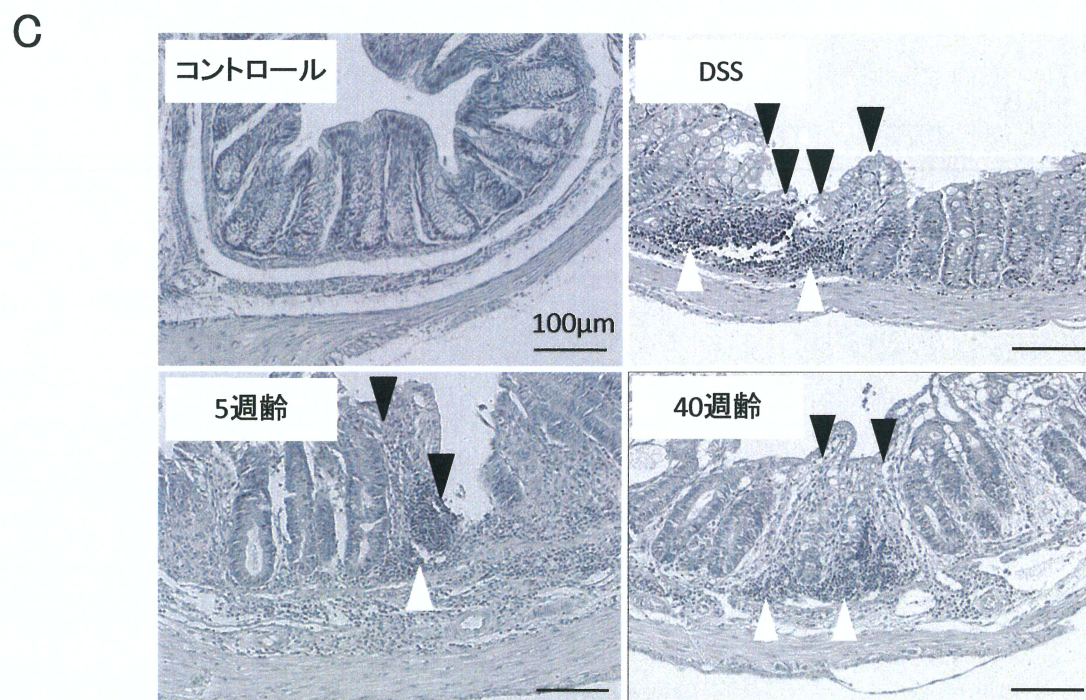
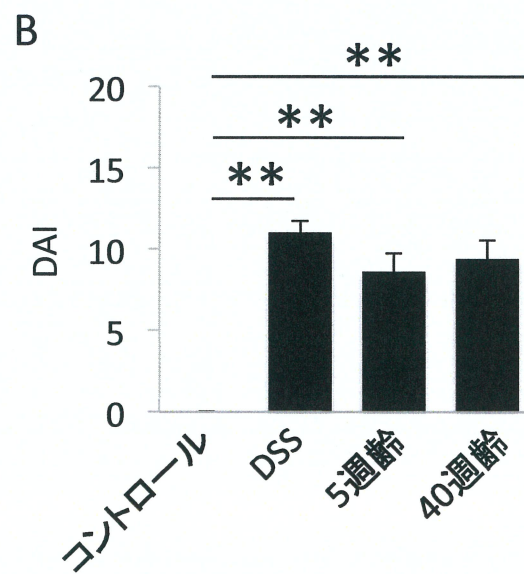
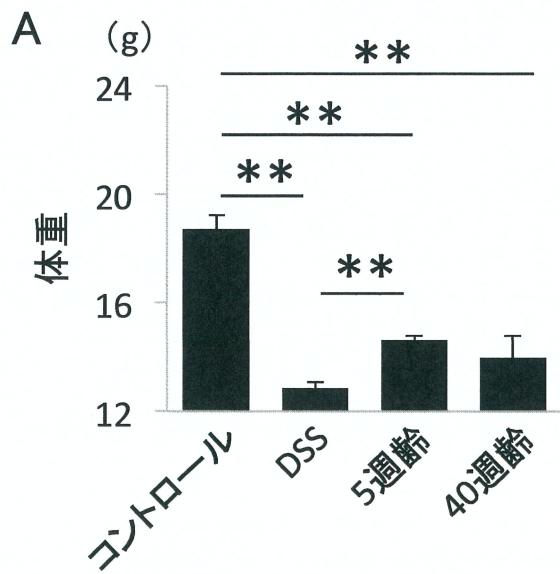


図7 5週齢, 40週齢mBMSCs全身投与による大腸炎モデルにおける治療効果の比較

(A) 誘導10日目の体重の比較を示す。DSS投与群は、非投与群であるコントロールと比較して著明な体重減少が観察された。また、5週齢mBMSCs移植群はDSS群と比べ、有意に体重減少を抑制していたものの、40週齢mBMSCs移植群では有意な体重減少抑制が認められなかった。体重の平均値±標準偏差をグラフに示す (** : $p < 0.01$, one-way ANOVA/Tukey)。

(B) DAIの結果を示す。DSS投与群において、著明な上昇を認めたDAIは、5週齢mBMSCsならびに40週mBMSCsの移植によって有意な減少を認めなかった。活動疾患度の平均値±標準偏差をグラフに示す (** : $p < 0.01$, one-way ANOVA/Tukey)。

(C) 大腸のHE染色像を示す。コントロールと比較し、DSS投与群では白矢頭で示す炎症性細胞の浸潤や、黒矢頭で示す上皮層の破壊が多く観察された。5週齢mBMSCs移植群では炎症性細胞の浸潤や上皮層の破壊は減少している像が観察されたが、40週齢mBMSCs移植群では、炎症性細胞の浸潤や上皮層の破壊が多く観察された (スケールバー : 100 μ m)。

(D) 大腸の長さの変化を示す。DSS投与群では大腸の短縮が観察され、5週齢BMSCs移植群では、DSS投与群と比較し、有意な短縮抑制効果が認められた。しかしながら、40週齢mBMSCs移植群では、短縮抑制効果は認められなかった。大腸の長さの平均値±標準偏差をグラフに示す (** : $p < 0.01$, one-way ANOVA/Tukey)。

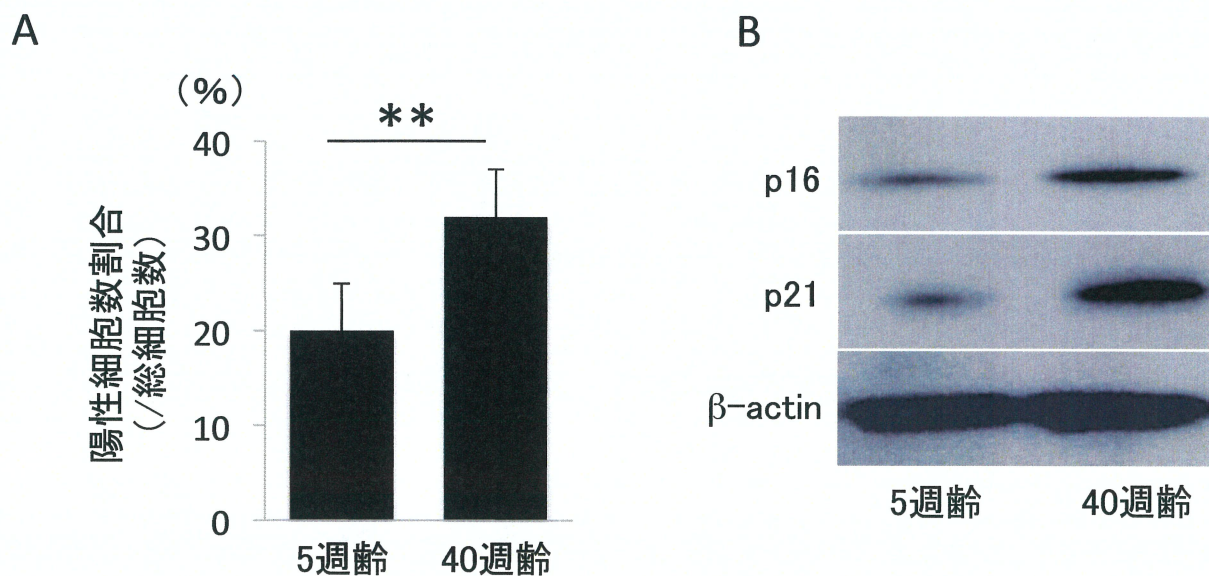


図8 5週齢，40週齢mBMSCsの細胞老化の比較

(A) 老化関連bga1染色結果を示す．40週齢mBMSCsは，5週齢mBMSCsと比較して，老化関連bga1陽性細胞の割合が有意に高かった．老化関連bga1染色陽性細胞の平均値±標準偏差をグラフに示す (**: $p < 0.01$, Unpaired-t検定)．

(B) p16, p21ウエスタンブロッティング解析の結果を示す．40週齢mBMSCsは，5週齢mBMSCsと比較して，p16, p21の発現が高かった．