

- 小型肝細胞の分離と無血清培養」第13回肝細胞研究会、旭川、2006年6月30日
8. 大栄秀和、陳其潔、今純子、三高俊広. 「ラット小型肝細胞の無血清培養と遺伝子発現解析」第13回肝細胞研究会、旭川、2006年6月30日
  9. 大島秀紀、大栄秀和、今純子、佐々木寿誉、平田公一、三高俊広. 「Eisai Hyperbilirubinemic Rat (EHBR)由来小型肝細胞における有機アニオントランスポーターの発現と機能」第13回肝細胞研究会、旭川、2006年6月30日
  10. 吉川大和、高橋直哉、今純子、水口徹、平田公一、三高俊広. 「ヒト肝細胞癌におけるラミニン $\alpha$ 鎖の発現」第13回肝細胞研究会、旭川、2006年6月30日
  11. Sasaki K, Kon J, Chen QJ, Ooe H, Oshima H, Mizuguchi T, Hirata K, Mitaka T. Proliferation of Hepatic Progenitor Cells Isolated from Adult Human Livers. FASEB Summer Research Conferences, Snowmass, Colorado, U.S.A. 2006, July22-27.
  12. Kon J, Ooe H, Oshima H, Kikkawa Y, Mitaka T. CD44 expression in rat small hepatocytes. . FASEB Summer Research Conferences, Snowmass, Colorado, U.S.A. 2006, July22-27.
  13. 市戸義久、塩田博之、関康夫、久保木芳徳、田畑泰彦、三高俊広. 「徐放化bFGFの組み合わせによるチタン不織布の骨再生誘導の増強」第9回日本組織工学会、京都、2006年9月7, 8日
  14. 深澤一知、橋本渉、須藤亮、三高俊広、池田満里子、谷下一夫. 「初代培養ラット胆管上皮細胞による Large Bile Duct形成と機能解析」第9回日本組織工学会、京都、2006年9月7, 8日
  15. 須藤亮、三高俊広、池田満里子、谷下一夫. 「ラット初代培養肝細胞の三次元積層培養による形態形成と機能維持」第9回日本組織工学会、京都、2006年9月7, 8日
  16. 今純子、佐々木寿誉、大島秀紀、三高俊広. 「ラット小型肝細胞の増殖及び分化機構の解析」第39回北海道病理談話会、札幌(ムトウビル)、2006年9月10日
  17. 大栄秀和、陳其潔、今純子、佐々木寿誉、三高俊広. 「ラット小型肝細胞の網羅的遺伝子発現解析」第89回北海道癌談話会、札幌(札幌医大)、2006年9月17日
  18. 佐々木寿誉、今純子、陳其潔、大栄秀和、大島秀紀、水口徹、柴田稔人、信岡隆幸、木村康利、桂巻正、平田公一、三高俊広. 「成人ヒト肝組織に存在する肝前駆細胞の分離と無血清培養法の確

- 立」第89回北海道癌談話会、札幌  
(札幌医大)、2006年9月17日
19. 三高俊広 シンポジウム3「消化器疾患の再生医療」「ヒト小型肝細胞の分離培養とその再生医療への応用」DDW-Japan 第10回日本肝臓学会、札幌、2006年10月11日
  20. 吉川大和、今純子、平田公一、三高俊広。「ヒト肝細胞癌におけるラミニンa鎖の発現とその役割」第65回日本癌学会学術総会、横浜、2006年9月28日
  21. 大栄秀和、今純子、大曾根義泰、二宮真一、三高俊広。「凍結ラット小型肝細胞におけるCytochrome P450及びその核内受容体の発現解析」第21回日本薬物動態学会年会、東京江戸川区総合区民ホール、2006年11月29日
  22. 深澤一知、橋本渉、須藤亮、三高俊広、池田満里子、谷下一夫。「初代培養ラット胆管上皮細胞の管腔形成に伴う分化の進展」第46回日本生体医工学会大会、2007年
  23. 三高俊広、佐々木寿誉、今純子、陳其潔、大栄秀和、柴田稔人、水口徹、平田公一。「ヒト肝前駆細胞の分離と無血清培養の確立」第6回日本再生医療学会総会雑誌、6巻 Suppl p192、2007年3月13、14日、横浜
  24. 今純子、大栄秀和、陳其潔、佐々木寿誉、三高俊広。「肝障害モデルラットにおける完全くさい棒の分化機序の解析」第6回日本再生医療学会総会雑誌、6巻 Suppl p261、2007年3月14日、横浜
  25. 陳其潔、今純子、大栄秀和、佐々木寿誉、三高俊広。「小型肝細胞におけるfollistatinとactivinAの役割」第6回日本再生医療学会総会雑誌、6巻 Suppl p264、2007年3月14日、横浜
  26. Sasaki K, Kon J, Chen Q, Ooe H, Oshima H, Shibata T, Mizuguchi T, Hirata K, Mitaka T. Proliferation of hepatic progenitor cells isolated from resected adult human liver specimens 2007 Asia Pacific Association for the Study of Liver (APASL) March 27-30, 2007

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許等

1. 今純子、三高俊広。「ヒアルロン酸を用いた小型肝細胞の選択的培養法及び分離法」(PCT/JP2005/11915) 各国移行
2. 今純子、三高俊広。「特異的抗体を用いる小型肝細胞の分離法」(PCT/JP2005/11914) 各国移行

別紙 1

表1 抗体のリスト

抗体	一次抗体/免疫動物	希釈倍率	二次抗体	希釈倍率
<b>Oatp2</b>	Santa Cruz sc18436/goat	X50	Alexa 488 donkey anti-goat	X500
<b>MRP2</b>	Alexis 801—016-C250/mouse	X100	Alexa 488 goat anti-mouse	X500
<b>MRP3</b>	SIGMA M-0318/rabbit	X200	Alexa 488 goat anti-rabbit	X500
<b>Albumin</b>	Dako A0001/rabbit	x100	Alexa 488 goat anti-rabbit	x500
<b>Transferrin</b>	Dako A0061/rabbit	x100	Alexa 488 goat anti-rabbit	x500
<b>Cytokeratin 8</b>	Progen/mouse	x200	Alexa 488 goat anti-mouse	x500
<b>Cytokeratin 19</b>	Dako M0888/mouse	x200	Alexa 488 goat anti-mouse	x500
<b>CD 44</b>	CHEMICON MAB2137/rat	x200	FITC anti-rat	x100
<b>BrdU</b>	Dako M0744/mouse	x400	Biotinylated anti-mouse	x200

表2 RT-PCR 用 Primer Sequence (Rat)

Primer name		Primer sequence (5'-3')	Annealing temp. (°C)	Amplicon size (bp)
<b>Oatp1</b>	sense	AAGCGAAGAAGCTGGAAACA	54	297
	anti-sense	CACCACAGGTCTGTGCAGTT		
<b>Oatp2</b>	sense	TGCACACTTAGCATTCTGGC	54	495
	anti-sense	TGCATGTAACCCAACCTCAA		
<b>Oatp4</b>	sense	GCCCAACCTTCACGATCAAA	56	604
	anti-sense	GCCAAGGATTGGTCCAATCAT		
<b>Ntcp</b>	sense	ATGCCCTTCTCTGGCTTTCT	56	499
	anti-sense	GCTCCATGGTTCTGATGGTT		
<b>Mrp1</b>	sense	TTCTAGTGTTGGACGAGGCT	58	208
	anti-sense	TGGCCATGCTATAGAAGACG		
<b>Mrp2</b>	sense	ACCTTCCACGTAGTGATCCT	56	1085
	anti-sense	GATTTCCCAGACCCTACAGT		

<b>Mrp3</b>	sense anti-sense	CAGCGACAACGGGTGAGTTT TCGGTGTCTGTCAGGTCTGTGT	58	382
<b>Mdr1b</b>	sense anti-sense	GAAATAATGCTTATGAATCCCAAAG GGTTTCATGGTCGTCGTCTCTTGA	54	302
<b>Mdr2</b>	sense anti-sense	AAGAATTTGAAGTTGAGCTAAGTCA TGGTTTCCACATCCAGCCTAT	54	1085
<b>Bcrp</b>	sense anti-sense	CAGGTAGGCAATTGTGAGGAAGA AATCAGGGCATCGATCTGTCA	56	270
<b>Bsep</b>	sense anti-sense	GTTTCAGTTCCTCCGTTCAAA AAGCTGCACTGTCTTTTTCAC	54	328
<b>HNF1<math>\alpha</math></b>	sense anti-sense	AGCTGCTCCTCCATCATCAGA TGTTCCAAGCATTAAAGTTTTCTATTC TAA	63	118
<b>HNF3<math>\beta</math></b>	sense anti-sense	CCTACTCGTACATCTCGCTCATCA CGCTCAGCGTCAGCATCTT	58	43
<b>HNF4<math>\alpha</math></b>	sense anti-sense	GTGAACTTCTTCTGGATGAG TTGGCAACTATGACATTGGT	57	572
<b>CAR</b>	sense anti-sense	ATGACAGCTACTCTAACACTAGAG CAGCTGCAAATCTCCCAAGCAGC	56	1076
<b>RXR</b>	sense anti-sense	ACCCCGTGAGCAGCAGTGAGG CCCAATGGATCGCAGTGCAGG	60	992
<b>AhR</b>	sense anti-sense	CCGTCCATCCTGGAAATTCGAACC CCTTCTTCATCCGTTAGCGGTCTC	60	350
<b>PXR</b>	sense anti-sense	ATGAGACCTGAGGAGAGGTGGAAC TCCTCCTCACGCAGCTGTAGCTTC	60	1007
<b>CYP2B1</b>	sense anti-Sense	GGGACACCCAAAGTCCCGTGG GGAAACCATAGCGGAGTGTGG	56	867
<b>G3PDH</b>	sense anti-sense	ACCACAGTCCATGCCATCAC TCCACCACCCTGTTGCTGTA	56	451

---

表3 RT-PCR 用 Primer Sequence (Human)

Primer name		Primer sequence (5'-3')	Annealing temp. (°C)	Amplicon size (bp)
<b>Albumin</b>	sense	ATT CCA GGG GTG TGT TTC GTC	55	635
	anti-sense	TTG GAG ACT GGC ACA CTT GAG		
<b>Transferrin</b>	sense	TCT ATG GGT CAA AAG AGG ATC C	55	612
	anti-sense	GAG ACT GAA TAG TTG GAA TTC		
<b>α1-Antitrypsin</b>	sense	TCC GTA CCC TCA ACC AGC CAG	55	630
	anti-sense	TAG TGA TGC CCA GTT GAC CCA G		
<b>Fibrinogen</b>	sense	TCT GCC TGG TCC TAA GTG TGG	55	542
	anti-sense	AGC CCT ACT GCA TGA CCC TCG		
<b>Glutamine synthetase</b>	sense	GTC AAG ATT GCG GGG ACT AA	55	397
	anti-sense	TAC GAT TGG CTA CAC CAC CA		
<b>AFP</b>	sense	TGC CAA CTC AGT GAG GAC AA	55	356
	anti-sense	TCC AAC AGG CCT GAG AAA TC		
<b>CYP1A1</b>	sense	GGA AAG AAC CCG CAC CTG GCA C	45	673
	anti-sense	CCC GGA TGT GGC CCT TCT CAA A		
<b>CYP2A6</b>	sense	AGG CTA TGG CGT GGT ATT CA	55	521
	anti-sense	ACT CCG TGT TGG GGT TCT TC		
<b>CYP2B6</b>	sense	ATG GGG CAC TGA AAA AGA CTG A	55	283
	anti-sense	AGA GGC GGG GAC ACT GAA TGA C		
<b>CYP2C9</b>	sense	CTC AAA GGT CTA TGG CCC GGT G	45	749
	anti-sense	TCA GGG TTG TGC TTG TCG TCT C		
<b>CYP2D6</b>	sense	CTA AGG GAA CGA CAC TCA TCA C	55	289
	anti-sense	CTC ACC AGG AAA GCA AAG ACA C		
<b>CYP2E1</b>	sense	ACA GAG ACC ACC AGC ACA ACT	55	580
	anti-sense	ATGAGCGGGGAATGACACAGA		
<b>CYP3A4</b>	sense	CCT TAC ATT ACA CAC CCT TTG GAA GT	55	382
	anti-sense	AGC TCA ATG CAT GTA CAG AAT CCC CGC TTA		
<b>CYP3A5</b>	sense	GAA GAA AAG TCG CCT CAA C	55	679
	anti-sense	AAG AAG TCC TTG CGT GTC TA		
<b>β-Actin</b>	sense	GGG TCG GAA GGA TTC CTA	55	256
	anti-sense	GGT CTC AAA CAT GAT CTG CG		

<b>HNF-3<math>\alpha</math></b>	sense	CAG CAA ACA AAA CCA CAC AAA	55	289
	anti-sense	TAA ATA ACC CTC CAC AAA CTA		
<b>HNF-4<math>\alpha</math></b>	sense	GCG CCC TGT GTG CCA TCT GCG	55	632
	anti-sense	GCG TAT GGA CAC CCG GCT CAT C		
<b>C/EBP<math>\alpha</math></b>	sense	GTG GAG ACG CAG CAG AAG	55	450
	anti-sense	TTC CAA GGC ACA AGG TTA TC		
<b>C/EBP<math>\beta</math></b>	sense	CTC GCA GGT CAA GAG CAA G	52	271
	anti-sense	CTA GCA GTG GCC GGA GGC GAG C		
<b>Cytokeratin 8</b>	sense	GGA GGC ATC ACC GCA GTT AC	55	612
	anti-sense	GGC AAT ATC CTC GTA CTG TGC C		
<b>Cytokeratin 18</b>	sense	GAG ATC GAG GCT CTC AAG GA	55	357
	anti-sense	CAA GCT GGC CTT CAG ATT TC		
<b>Cytokeratin 7</b>	sense	GGT GGA TGC CCT GAA TGA TG	55	352
	anti-sense	CTT GGC ACG CTG GTT CTT GAT G		
<b>Cytokeratin 19</b>	sense	TCC AGA TGA GCA GGT CCG AGG TTA	55	281
	anti-sense	GCT GCG GTA GGT GGC AAT CTC C		
<b>CD44</b>	sense	CTT CAT CCC AGT GAC C	52	446
	anti-sense	TGC CAC TGT TGA TCA C		
<b>CO-029</b>	sense	TTG CTG TAG GTG CCA TCA TCA T	52	532
	anti-sense	TTG TTC CCG ATC TGG CAA TAC A		
<b>BRI-3</b>	sense	CTC AGT GGG CGG CGT GTG CTA C	52	567
	anti-sense	CGC TTG TTG ATC CGC CTC CGC		
<b>EpCAM</b>	sense	CAG GAA GAA TGT GTC TGT G	52	956
	anti-sense	CCA CGC ACA CAC ATT TGT AA		
<b>ICAM1</b>	sense	GTC CCC CTC AAA AGT CAT CC	52	943
	anti-sense	AAC CCC ATT CAG CGT CAC CT		
<b>Thy1</b>	sense	AAC GGC CTG CCT AGT GGA C	55	614
	anti-sense	CCA GAG GTG TGC GGA GAG		
<b>GAPDH</b>	sense	GCT GGG GCT CAT TTG CAG GGG	55	569
	anti-sense	GCG TCA AAG GTG GAG GAG TGG G		

---

表4 研究に使用したヒト肝組織の原疾患

No.	Age	Sex	Primary disease	Tissue weight (g)
1	60's	M	Hilar bile duct carcinoma	4.0
2	50's	M	Liver metastasis (colon)	10.8
3	60's	M	Common bile duct carcinoma	11.0
4	40's	F	Liver metastasis (ovary)	20.0
5	60's	M	Cholangiocellular carcinoma	6.2
6	60's	M	Liver metastasis (colon)	20.3
7	50's	M	Liver metastasis (colon)	9.6
8	60's	M	Liver metastasis (colon)	15.0
9	80's	M	Gallbladder carcinoma	16.2
10	60's	M	Hepatocellular carcinoma	14.1
11	70's	M	Hilar bile duct carcinoma	14.4
12	40's	M	Liver hemangioma	15.4
13	50's	F	Hilar bile duct carcinoma	27.6
14	60's	M	Hilar bile duct carcinoma	17.4
15	50's	M	Liver metastasis (colon)	10.1
16	70's	M	Hilar bile duct carcinoma	18.3

## 別紙2

### 審査結果通知書

平成13年8月1日

申請者 所 属 第一外科  
職・氏名 教授 平田 公一 様

札幌医科大学倫理委員会  
委員長 神 保 孝 一

課 題

ヒト肝細胞分離・培養による臓器再生・細胞移植に関する研究

平成13年6月22日付けで申請のあった上記課題に係る実施計画について、  
当委員会は、審査の結果次のとおり判定したので通知します。

記

- 1 審査結果  
承認する
- 2 備 考

## 別紙3

別記第2号様式

### 審 査 結 果 通 知 書

第17-9-2号  
平成17年11月 8日

申請者 所 属 がん研究所病理病態部門  
職・氏名 教授 三高 俊広 様

札幌医科大学倫理委員会委員長  
医学部長 佐藤 昇志

課題 ヒト肝臓より分離した細胞から肝前駆細胞を純粋培養する方法の確立とその薬物代謝能の検定及び遺伝子発現解析

平成17年 9月27日付けで申請のあった上記課題に係る実施計画について当委員会は、審査の結果次のとおり判定したので通知します。

なお、研究（臨床応用）が終了したときは、遅滞なく別紙研究（臨床応用）結果報告書により報告してください。

記

- 1 判 定  
承認する
- 2 備 考

## 測定結果報告書

ラット小型肝細胞の核内受容体の発現解析

2007年 3月 9日  
株式会社 環境研究センター

## 1. 測定試料

ラット成熟肝細胞由来 total RNA	1 検体
培養ラット小型肝細胞(-FBS)由来 total RNA	1 検体
培養ラット小型肝細胞(+FBS)由来 total RNA	1 検体
凍結保存後培養ラット小型肝細胞(-FBS)由来 total RNA	1 検体
凍結保存後培養ラット小型肝細胞(+FBS)由来 total RNA	1 検体
合計	5 検体

## 2. 測定項目

- 1) RT-PCR による CAR(Constitutive Androstane Receptor)遺伝子発現測定
- 2) RT-PCR による AhR(Aryl hydrocarbon Receptor)遺伝子発現測定
- 3) RT-PCR による PXR(Pregnane X Receptor)遺伝子発現測定
- 4) RT-PCR による RXR(Retinoid X Receptor)遺伝子発現測定
- 5) RT-PCR による G3PDH(Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)遺伝子発現測定

### <RNA 試料の定量、評価>

発現解析に先立ち試料中の RNA 濃度や RNA 純度を測定し、解析に十分であるか確認する。試料中の RNA 濃度は分光光度計により測定し、OD<sub>260</sub>=1 のときに 40 µg/ml として RNA 濃度を算出する。また、OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> も同様に測定し、RNA 試料の精製度が十分に高いことを確認する。

### <逆転写反応>

細胞から抽出された全 RNA を逆転写し PCR を行うことで、目的の遺伝子の発現量を測定する。試料のうち 2 µg の全 RNA から oligo dT Primer を用いて cDNA を合成する。反応には OmniScript RT Kit(Qiagen)を用いる。以下に示す試薬を混合して 37°C で 1 時間逆転写反応を行う。

• Total RNA	2 µg
• 10× Buffer	2 µl
• 5 mM dNTP mix	2 µl
• 50 µM Oligo dT primer (Invitrogen)	1 µl
• 逆転写酵素	2 µl
• 40 U/µl RNase Inhibitor	0.5 µl
• Nuclease Free H <sub>2</sub> O	to 20 µl

### <PCR>

得られた cDNA 溶液 20  $\mu\text{l}$  のうち 1  $\mu\text{l}$  を用いて PCR を行い、目的の遺伝子断片を増幅する。反応には Fermentus 社の Taq polymerase を用いる。以下に示す試薬を混合する。

・ cDNA solution	1 $\mu\text{l}$
・ 10 $\times$ Buffer	2.5 $\mu\text{l}$
・ 25 mM MgCl <sub>2</sub>	2 $\mu\text{l}$
・ 10 mM dNTP mix	0.5 $\mu\text{l}$
・ 10 $\mu\text{M}$ Sense primer	2.5 $\mu\text{l}$
・ 10 $\mu\text{M}$ Anti-sense primer	2.5 $\mu\text{l}$
・ DNA Taq polymerase	0.25 $\mu\text{l}$
・ BSA (Fermentus)	0.25 $\mu\text{l}$
・ H <sub>2</sub> O	to 25 $\mu\text{l}$

反応はサーマルサイクラーを用いて以下のプログラムで行う。使用するプライマー、アニーリング温度、サイクル数及び増幅される DNA 断片の大きさは表に示す。

- ・ Denature 94°C, 1 min
- ↓
- ・ Denature 94°C, 30 second
- ・ Annealing x°C, 30 second
- ・ Extension 72°C, 1 min
- x cycle
- ↓
- ・ Extension 72°C, 5 min
- ・ Stop 4°C

(PCR 反応に用いたプライマーと PCR 反応条件)

Primer Name		Sequence (5'-3')	Cycle	Annealing Temp. (°C)	Amplicon size (bp)
CAR	Sense	ATGACAGCTACTCTAACACTAGAG	27	56	1076
	Anti-sense	CAGCTGCAAATCTCCCCAAGCAGC			
RXR	Sense	ACCCCGTGAGCAGCAGTGAGG	32	60	992
	Anti-sense	CCCAATGGATCGCAGTGCAGG			
AhR	Sense	CCGTCCATCCTGGAAATTCGAACC	30	60	350
	Anti-sense	CCTTCTTCATCCGTTAGCGGTCTC			
PXR	Sense	ATGAGACCTGAGGAGAGGTGGAAC	30	60	1007
	Anti-sense	TCCCTCCTCACGCAGCTGTAGCTTC			
G3PDH	Sense	ACCACAGTCCATGCCATCAC	22	56	451
	Anti-sense	TCCACCACCCTGTTGCTGTA			

< PCR 産物の電気泳動 >

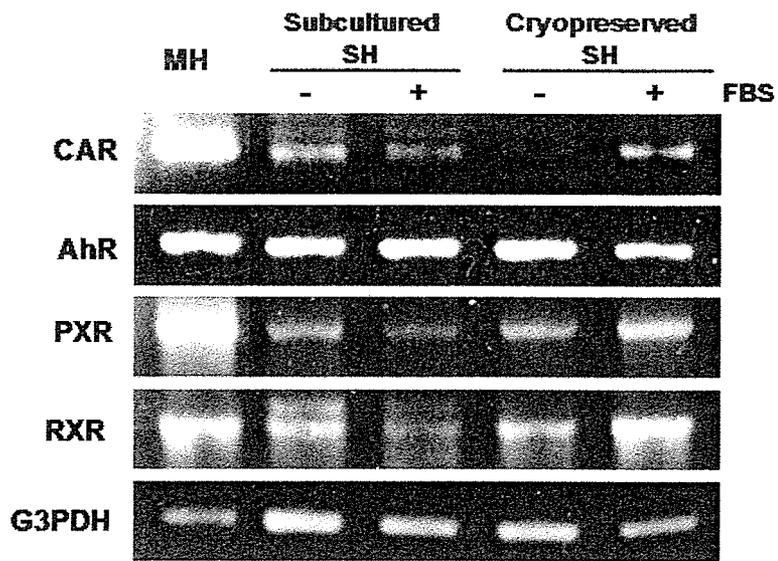
PCR 産物 25  $\mu$ l のうち 5  $\mu$ l をアガロースゲル電気泳動にて分離し、増幅された DNA 断片の測定を行う。PCR 産物 5  $\mu$ l に 1  $\mu$ l の Loading Buffer を加えて攪拌し、0.5 $\times$ TAE-1% アガロース-エチジウムブロマイドゲルにアプライして電気泳動を行う。泳動バッファーには 0.5 $\times$ TAE を用いて 100V で 30 分間泳動を行ったのち、ゲルを UV トランスイルミネーター上で観察し写真撮影を行う。検体と同時に DNA サイズマーカーも泳動し、増幅された DNA 断片が予想されるサイズと同じかどうか確認する。

### 3. 測定結果

< RNA 濃度測定の結果 >

検体名	RNA 濃度( $\mu$ g/ $\mu$ l)	OD <sub>260</sub> /OD <sub>280</sub>
MH	2.65	1.54
Sub-SH	0.88	1.51
Sub-SH(+FBS)	0.74	1.49
Cryo-SH	1.24	1.50
Cryo-SH(+FBS)	1.14	1.51

<RT-PCR 産物の電気泳動結果>



## 測定結果報告書

甲状腺ホルモン添加条件下におけるラット小型肝細胞の  
CAR, CYP2B1 の発現解析

2007年 3月 9日  
株式会社 環境研究センター

## 1. 測定試料

ラット成熟肝細胞由来 total RNA	3 検体
ラット小型肝細胞由来 total RNA	3 検体
ラット小型肝細胞(+5×10 <sup>-14</sup> M T <sub>3</sub> )由来 total RNA	3 検体
ラット小型肝細胞(+5×10 <sup>-12</sup> M T <sub>3</sub> )由来 total RNA	3 検体
ラット小型肝細胞(+5×10 <sup>-10</sup> M T <sub>3</sub> )由来 total RNA	3 検体
ラット小型肝細胞(+5×10 <sup>-8</sup> M T <sub>3</sub> )由来 total RNA	3 検体
ラット小型肝細胞(+5×10 <sup>-14</sup> M T <sub>4</sub> )由来 total RNA	3 検体
ラット小型肝細胞(+5×10 <sup>-12</sup> M T <sub>4</sub> )由来 total RNA	3 検体
ラット小型肝細胞(+5×10 <sup>-10</sup> M T <sub>4</sub> )由来 total RNA	3 検体
ラット小型肝細胞(+5×10 <sup>-8</sup> M T <sub>4</sub> )由来 total RNA	3 検体
合計	30 検体

## 2. 測定項目

- 1) RT-PCR による CAR(Constitutive Androstane receptor)遺伝子発現測定
- 2) RT-PCR による CYP2B1(Cytochrome P450 2B1)遺伝子発現測定
- 3) RT-PCR による G3PDH(Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)遺伝子発現測定

### <RNA 試料の定量>

発現解析に先立ち試料中の RNA 濃度を測定し、解析に十分であるか確認する。試料中の RNA 濃度は分光光度計により測定し、OD<sub>260</sub>=1 のときに 40 µg/ml として RNA 濃度を算出する。

### <逆転写反応>

細胞から抽出された全 RNA を逆転写し PCR を行うことで、目的の遺伝子の発現量を測定する。試料のうち 2 µg の全 RNA から oligo dT Primer を用いて cDNA を合成する。反応には OmniScript RT Kit(Qiagen)を用い、以下の試薬を混合して 37°C で 1 時間逆転写反応を行う。

・ Total RNA	2 µg
・ 10× Buffer	2 µl
・ 5 mM dNTP mix	2 µl
・ 50 µM Oligo dT primer (Invitrogen)	1 µl
・ 逆転写酵素	2 µl
・ 40 U/µl RNase Inhibitor	0.5 µl
・ Nuclease Free H <sub>2</sub> O	to 20 µl

<PCR>

得られた cDNA 溶液 20  $\mu$ l のうち 1  $\mu$ l を用いて PCR を行い、目的の遺伝子断片を増幅する。反応には Fermentus 社の Taq polymerase を用いる。以下に示す試薬を混合する。

- cDNA solution 1  $\mu$ l
- 10 $\times$  Buffer 2.5  $\mu$ l
- 25 mM MgCl<sub>2</sub> 2  $\mu$ l
- 10 mM dNTP mix 0.5  $\mu$ l
- 10  $\mu$ M Sense primer 2.5  $\mu$ l
- 10  $\mu$ M Anti-sense primer 2.5  $\mu$ l
- DNA Taq polymerase 0.25  $\mu$ l
- BSA (Fermentus) 0.25  $\mu$ l
- H<sub>2</sub>O to 25  $\mu$ l

反応はサーマルサイクラーを用いて以下のプログラムの通りを行う。使用するプライマー、アニーリング温度、サイクル数及び増幅される DNA 断片の大きさを表に示す。

- Denature 94°C, 1 min
- ↓
- Denature 94°C, 30 second
- Annealing x°C, 30 second
- Extension 72°C, 1 min
- x cycle
- ↓
- Extension 72°C, 5 min
- Stop 4°C

(PCR 反応に用いたプライマーと PCR 反応条件)

Primer Name		Sequence (5'-3')	Cycle	Annealing Temp. (°C)	Amplicon size (bp)
CAR	Sense	ATGACAGCTACTCTAACACTAGAG	27	56	1076
	Anti-sense	CAGCTGCAAATCTCCCAAGCAGC			
CYP2B1	Sense	GGGACACCCAAAGTCCCGTGG	27	56	867
	Anti-sense	GGAAACCATAGCGGAGTGTGG			
G3PDH	Sense	ACCACAGTCCATGCCATCAC	22	56	451
	Anti-sense	TCCACCACCCTGTTGCTGTA			

#### <PCR産物の電気泳動>

PCR産物 25  $\mu$ l のうち 5  $\mu$ l をアガロースゲル電気泳動にて分離し、測定を行う。PCR産物 5  $\mu$ l に 1  $\mu$ l の Loading Buffer を加えて攪拌し、0.5 $\times$ TAE-1%アガロース-エチジウムブロマイドゲルにアプライして電気泳動を行う。泳動バッファーには 0.5 $\times$ TAE を用い、100V で 30 分間泳動を行ったのち、ゲルをトランスイルミネーター上で観察し写真撮影を行う。検体と同時に DNA サイズマーカーも泳動し、増幅された DNA 断片が予想されるサイズと同じかどうか確認する。

#### <遺伝子発現量の数値化と評価>

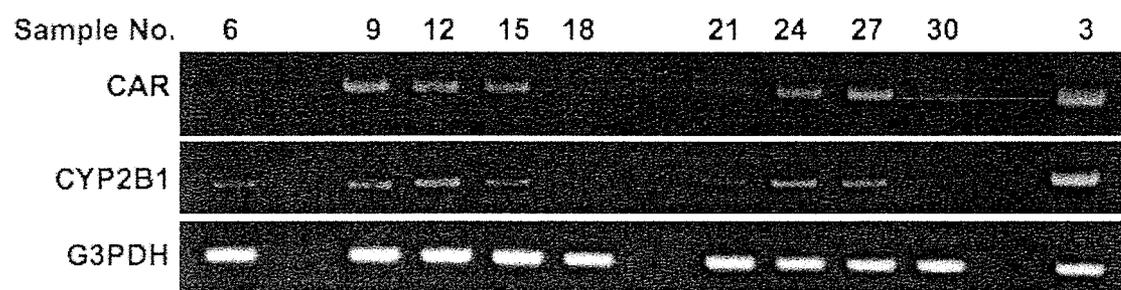
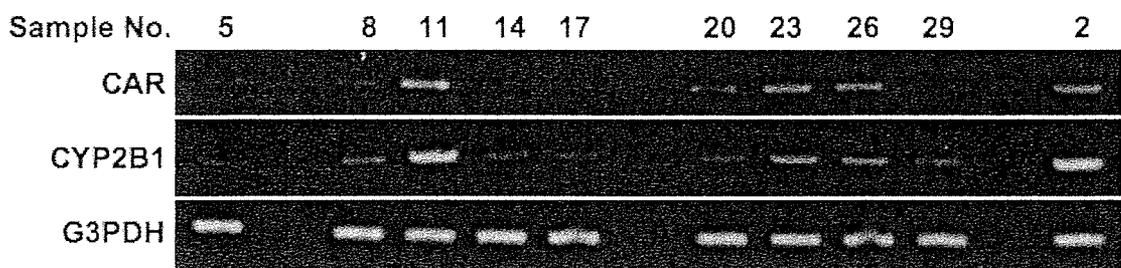
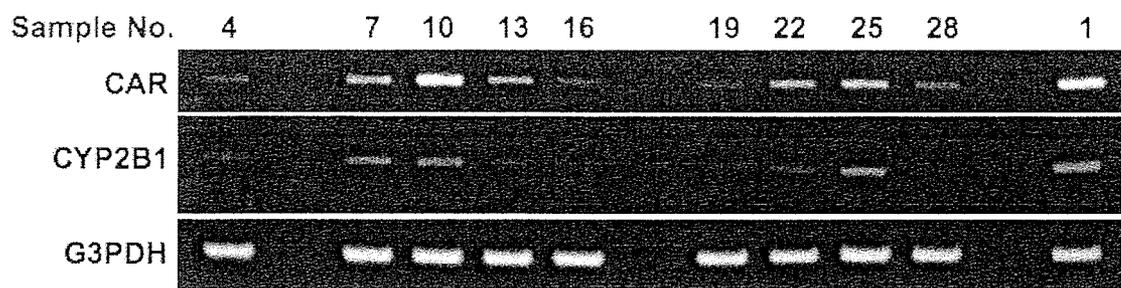
電気泳動結果をデジタルデータとして取り込み、増幅された遺伝子断片の蛍光強度を画像解析ソフトで数値化する。シグナル強度はバンドを含む領域から算出された蛍光強度から、バンド上部の領域から算出されたバックグラウンド蛍光強度を引いた値とする。各試料の CAR, CYP2B1 発現量は G3PDH 発現量で標準化し、成熟肝細胞の発現量を 1 として相対値化する。3 検体の結果から平均値と標準偏差を算出し、甲状腺ホルモン添加条件下で培養した小型肝細胞の結果と非添加条件下で培養した小型肝細胞の結果を Student's *t*-test を用いて比較検定し、*P* value を算出する。これらの結果をまとめてグラフを作成し、甲状腺ホルモンにより発現誘導が起こった結果にアスタリスクを付ける。

### 3. 測定結果

#### <RNA濃度測定の結果>

試料名	RNA( $\mu$ g/ $\mu$ l)	試料名	RNA( $\mu$ g/ $\mu$ l)
(1)MH-A	2.65	(16)SH-T3-8-A	0.42
(2)MH-B	3.11	(17)SH-T3-8-B	0.24
(3)MH-C	2.50	(18)SH-T3-8-C	0.36
(4)SH-A	0.69	(19)SH-T4-14-A	0.74
(5)SH-B	0.63	(20)SH-T4-14-B	0.63
(6)SH-C	0.40	(21)SH-T4-14-C	0.68
(7)SH-T3-14-A	0.54	(22)SH-T4-12-A	0.49
(8)SH-T3-14-B	0.63	(23)SH-T4-12-B	0.60
(9)SH-T3-14-C	0.42	(24)SH-T4-12-C	0.82
(10)SH-T3-12-A	0.48	(25)SH-T4-10-A	0.57
(11)SH-T3-12-B	0.51	(26)SH-T4-10-B	0.72
(12)SH-T3-12-C	0.69	(27)SH-T4-10-C	0.39
(13)SH-T3-10-A	0.38	(28)SH-T4-8-A	0.14
(14)SH-T3-10-B	0.43	(29)SH-T4-8-B	0.44
(15)SH-T3-10-C	0.60	(30)SH-T4-8-C	0.77

#### <RT-PCR産物の電気泳動>



<遺伝子発現解析結果の数値化>

添付の図に記載しました。

<遺伝子発現解析結果の評価>

試料	CAR		CYP2B1	
	Mean	P value	Mean	P value
SH	0.224 ± 0.150		0.310 ± 0.073	
SH(T <sub>3</sub> -5 × 10 <sup>-14</sup> M)	0.474 ± 0.160	0.060	0.404 ± 0.123	0.159
SH(T <sub>3</sub> -5 × 10 <sup>-12</sup> M)	0.780 ± 0.265	0.017	0.668 ± 0.295	0.045
SH(T <sub>3</sub> -5 × 10 <sup>-10</sup> M)	0.340 ± 0.188	0.225	0.257 ± 0.044	0.173
SH(T <sub>3</sub> -5 × 10 <sup>-8</sup> M)	0.159 ± 0.044	0.255	0.154 ± 0.065	0.025
SH(T <sub>4</sub> -5 × 10 <sup>-14</sup> M)	0.274 ± 0.191	0.370	0.244 ± 0.049	0.132
SH(T <sub>4</sub> -5 × 10 <sup>-12</sup> M)	0.681 ± 0.163	0.012	0.481 ± 0.068	0.020
SH(T <sub>4</sub> -5 × 10 <sup>-10</sup> M)	0.651 ± 0.085	0.006	0.508 ± 0.128	0.040
SH(T <sub>4</sub> -5 × 10 <sup>-8</sup> M)	0.244 ± 0.100	0.431	0.214 ± 0.140	0.176
MH	1		1	

<測定結果のグラフ>

