

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 の経時的発現解析

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
培養 0 日目ラット小型肝細胞由来 total RNA	3 検体
培養 3 日目ラット小型肝細胞由来 total RNA	3 検体
培養 6 日目ラット小型肝細胞由来 total RNA	3 検体
培養 10 日目ラット小型肝細胞由来 total RNA	3 検体
培養 14 日目ラット小型肝細胞由来 total RNA	3 検体
培養 3 日目ラット小型肝細胞(+5×10 ⁻¹² M T ₃)由来 total RNA	3 検体
培養 6 日目ラット小型肝細胞(+5×10 ⁻¹² M T ₃)由来 total RNA	3 検体
培養 10 日目ラット小型肝細胞(+5×10 ⁻¹² M T ₃)由来 total RNA	3 検体
培養 14 日目ラット小型肝細胞(+5×10 ⁻¹² M T ₃)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、OD₂₆₀=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 ₂ O	to 20 µl

<PCR>

得られた cDNA 溶液 20 μ l のうち 1 μ 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 μ l
- 10 \times Buffer 2.5 μ l
- 25 mM MgCl₂ 2 μ l
- 10 mM dNTP mix 0.5 μ l
- 10 μ M Sense primer 2.5 μ l
- 10 μ M Anti-sense primer 2.5 μ l
- DNA Taq polymerase 0.25 μ l
- BSA (Fermentus) 0.25 μ l
- H₂O to 25 μ 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に行う。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 断片の大きさを別表に示す。

- 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			
CYP2B1	Sense	GGGACACCCAAAGTCCCCTGG	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 μ l のうち 5 μ 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 μ l に 1 μ 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 分間泳動を行った後、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>

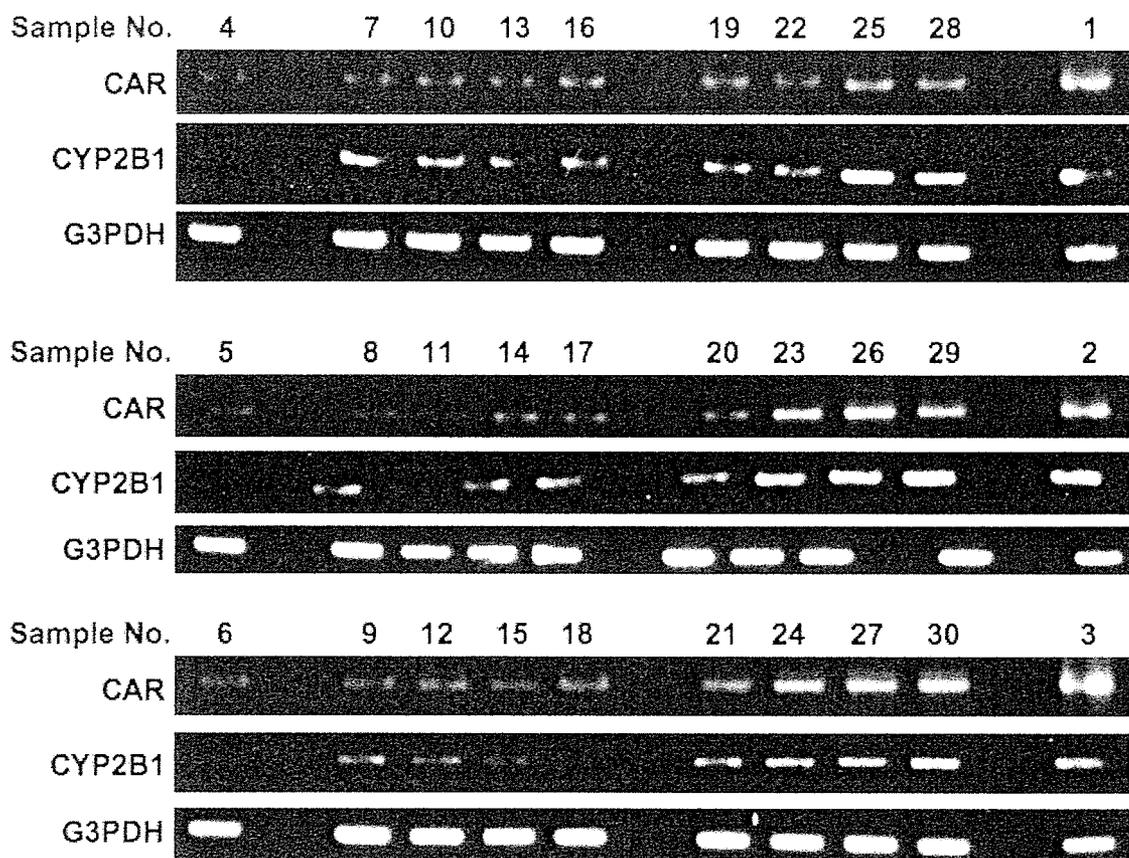
電気泳動結果をデジタルデータとして取り込み、増幅された遺伝子断片の蛍光強度を画像解析ソフトで数値化する。シグナル強度はバンドを含む領域から算出された蛍光強度から、バンド上部の領域から算出されたバックグラウンド蛍光強度を引いた値とする。各試料の CAR, CYP2B1 発現量は G3PDH 発現量で標準化し、成熟肝細胞の発現量を 1 として相対値化する。3 検体の結果から平均値と標準偏差を算出し、甲状腺ホルモン添加条件下で培養した小型肝細胞の結果と非添加条件下で培養した小型肝細胞の結果を、Student's *t*-test を用いて比較検定し *P* value を算出する。これらの結果をまとめてグラフ化を行い、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(μ g/ μ l)	試料名	RNA(μ g/ μ l)
(1)MH-A	2.65	(16)SH(14day)-A	0.97
(2)MH-B	3.11	(17)SH(14day)-B	0.77
(3)MH-C	2.50	(18)SH(14day)-C	0.95
(4)SH(0day)-A	1.71	(19)SH(3day+T)-A	0.46
(5)SH(0day)-B	1.17	(20)SH(3day+T)-B	1.13
(6)SH(0day)-C	2.54	(21)SH(3day+T)-C	0.42
(7)SH(3day)-A	0.33	(22)SH(6day+T)-A	0.65
(8)SH(3day)-B	0.34	(23)SH(6day+T)-B	0.44
(9)SH(3day)-C	0.41	(24)SH(6day+T)-C	0.74
(10)SH(6day)-A	0.39	(25)SH(10day+T)-A	0.69
(11)SH(6day)-B	0.74	(26)SH(10day+T)-B	0.69
(12)SH(6day)-C	0.33	(27)SH(10day+T)-C	0.90
(13)SH(10day)-A	0.75	(28)SH(14day+T)-A	1.23
(14)SH(10day)-B	0.90	(29)SH(14day+T)-B	1.20
(15)SH(10day)-C	0.78	(30)SH(14day+T)-C	1.15

<RT-PCR 産物の電気泳動>

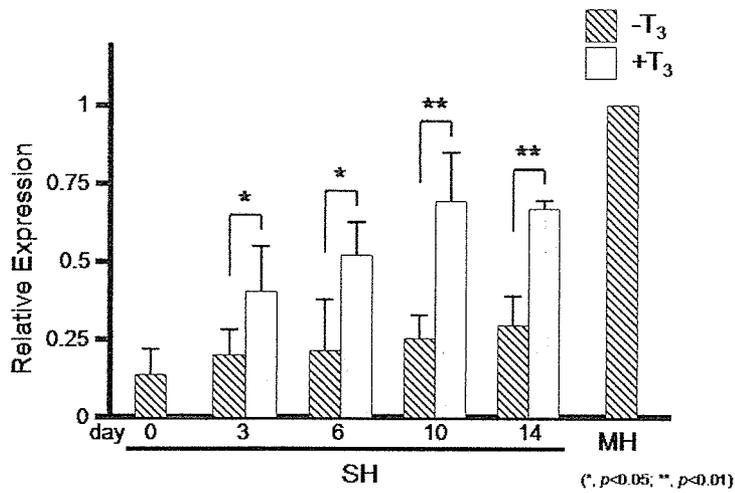


<遺伝子発現解析結果の数値化>
 添付の図に記載しました。

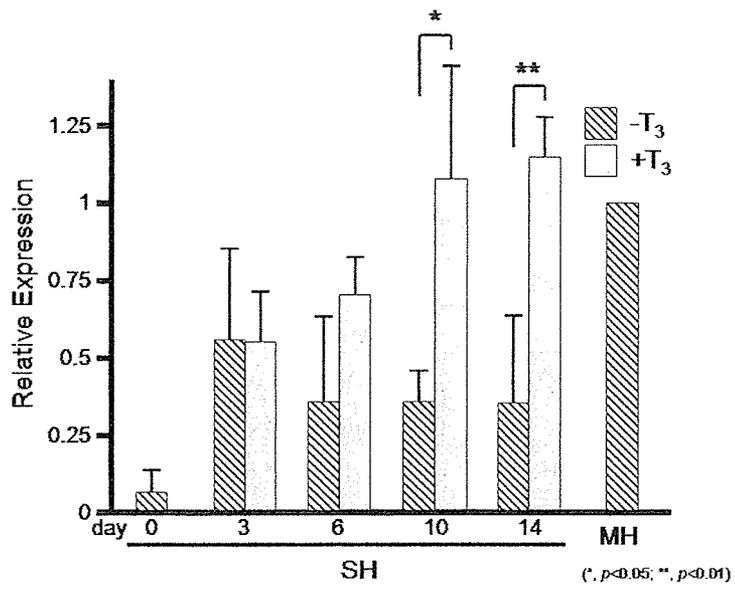
<遺伝子発現解析結果の評価>

試料	CAR		CYP2B1	
	Mean	P value	Mean	P value
SH(0day)	0.135 ± 0.084		0.068 ± 0.070	
SH(3day)	0.200 ± 0.082		0.559 ± 0.296	
SH(3day+T ₃)	0.406 ± 0.144	0.049	0.554 ± 0.162	0.492
SH(6day)	0.215 ± 0.164		0.361 ± 0.274	
SH(6day+T ₃)	0.520 ± 0.107	0.027	0.706 ± 0.121	0.058
SH(10day)	0.253 ± 0.075		0.358 ± 0.102	
SH(10day+T ₃)	0.695 ± 0.155	0.006	1.079 ± 0.365	0.015
SH(14day)	0.296 ± 0.093		0.356 ± 0.282	
SH(14day+T ₃)	0.669 ± 0.028	0.001	1.150 ± 0.129	0.006
MH	1		1	

<CAR 発現測定結果のグラフ>



<CYP2B1 発現測定結果のグラフ>



測定結果報告書

甲状腺摘出ラットの肝細胞における CAR, CYP2B1 遺伝子の発現解析

2007年 3月 9日
株式会社 環境研究センター

1. 測定試料

正常（偽施術）ラット成熟肝細胞由来 total RNA	1 検体
甲状腺摘出ラット成熟肝細胞由来 total RNA	1 検体
合計	2 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、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、OD₂₆₀=1 のときに 40 µg/ml として RNA 濃度を算出する。また、OD₂₆₀/OD₂₈₀ 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 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 ₂ O	to 20 µl

<PCR>

得られた cDNA 溶液 20 μ l のうち 1 μ 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 μ l
- 10 \times Buffer 2.5 μ l
- 25 mM MgCl₂ 2 μ l
- 10 mM dNTP mix 0.5 μ l
- 10 μ M Sense primer 2.5 μ l
- 10 μ M Anti-sense primer 2.5 μ l
- DNA Taq polymerase 0.25 μ l
- BSA (Fermentus) 0.25 μ l
- H₂O to 25 μ 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に行う。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 断片の大きさは別表に示す。

- 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	TCCACCACCCCTGTTGCTGTA			

<PCR 産物の電気泳動>

PCR 産物 25 μ l のうち 5 μ l をアガロースゲル電気泳動にて分離し測定する。PCR 産物 5 μ l に 1 μ 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 分間泳動を行った後、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どうか確認する。

<遺伝子発現量の数値化と評価>

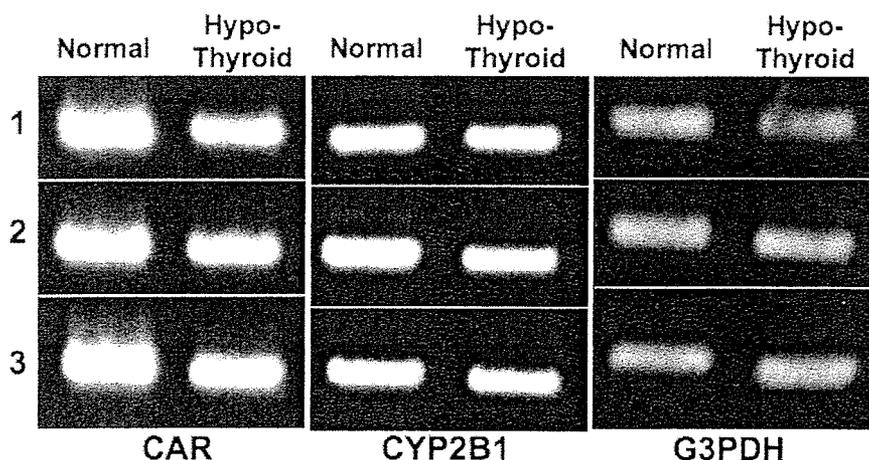
電気泳動の結果をデジタルデータとして取り込み、増幅された遺伝子断片の蛍光強度を画像解析ソフトで数値化する。シグナル強度はバンドを含む領域から算出された蛍光強度から、バンド上部の領域から算出したバックグラウンド蛍光強度を引いた値とする。各試料の CAR, CYP2B1 発現量は G3PDH 発現量で標準化し、成熟肝細胞の発現量を 1 として相対値化する。各検体の cDNA を用いて PCR を 3 回行い、その結果から平均値と標準偏差を算出する。

3. 測定結果

<RNA 濃度測定の結果>

検体名	RNA 濃度(μ g/ μ l)	OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀
Normal Rat MH	1.845	1.51
Hypothyroid Rat MH	2.71	1.52

<RT-PCR 産物の電気泳動>



<遺伝子発現解析結果の数値化>

G3PDH	Signal-1	Signal-2	Signal-3	Mean	補正值
Normal	364347	384911	298246	349168	1
Hypothyroid	328210	333451	335280	332313	1.0507

CAR	Signal-1	Signal-2	Signal-3	Mean
Normal	114146	90418	107711	104091
Hypothyroid	87744	50461	104010	80738

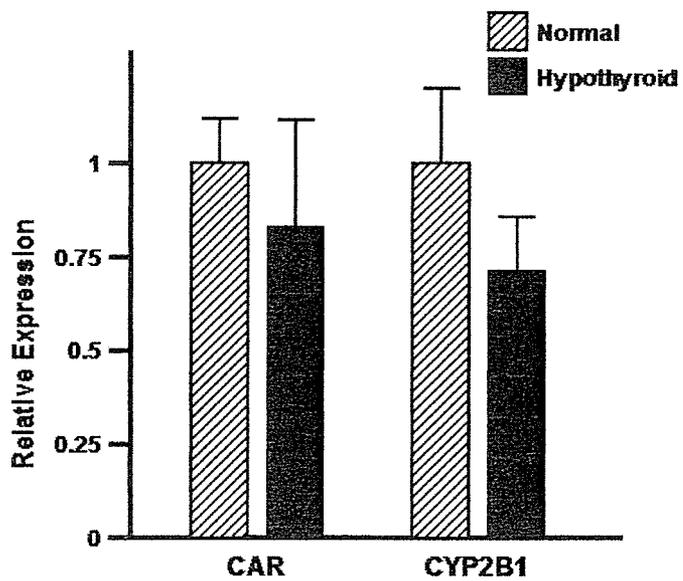
CYP2B1	Signal-1	Signal-2	Signal-3	Mean
Normal	126225	95462	87455	103047
Hypothyroid	75373	77928	53122	68808

<遺伝子発現解析結果の評価>

CAR	相対値-1	相対値-2	相対値-3	Mean	SD
Normal	1.0966	0.8686	1.0348	1	0.1179
Hypothyroid	0.9039	0.5198	1.0714	0.8317	0.2828

CYP2B1	相対値-1	相対値-2	相対値-3	Mean	SD
Normal	1.2249	0.9264	0.8487	1	0.1986
Hypothyroid	0.7843	0.8109	0.5528	0.7160	0.1420

<測定結果のグラフ>



測定結果報告書

GeneChip を用いたラット小型肝細胞における遺伝子発現解析結果

2007年 3月 9日
株式会社 環境研究センター

4. 測定試料

成熟肝細胞由来 total RNA (MH)	3 検体
肝切除後成熟肝細胞由来 total RNA (PH)	3 検体
培養小型肝細胞由来 total RNA (SH)	3 検体
CD44 陽性細胞由来 total RNA (CD44 ⁺)	3 検体
Thy1 陽性細胞(D-Gal 投与後 2 day)由来 total RNA (Thy1 ⁺ (2d))	3 検体
Thy1 陽性細胞(D-Gal 投与後 3 day)由来 total RNA (Thy1 ⁺ (3d))	3 検体
合計	18 検体

5. 測定項目

- 6) GeneChip による遺伝子発現の網羅的解析
- 7) 階層クラスタリング
- 8) Volcano plot による発現プロファイルの比較
- 9) Gene Ontology に基づく発現変動遺伝子の機能解析
- 10) 小型肝細胞、CD44 陽性細胞特異的遺伝子の抽出
- 11) 特定の機能に関与する遺伝子発現データの抽出
- 12) 経時的発現変動を示す遺伝子の抽出
- 13) Pathway 解析

<GeneChip による遺伝子発現の網羅的解析>

測定に必要な RNA 濃度、RNA 純度を試料が満たしているかどうかチェックを行う。試料中の RNA 濃度は分光光度計を用いて測定し、OD₂₆₀=1 のときに 40 ug/ml として RNA 濃度を決定する。また、OD₂₆₀/OD₂₈₀ より RNA 試料の精製度を確認し、さらに Bioanalyser 2100(Agilent)を用いて 28S/18S rRNA の分解度をチェックする。チェックをクリアした RNA から GeneChip One-Cycle Target Labeling and Control Reagents(Affymetrix)を使用して標識 cRNA を合成する。cRNA はテストアレイによる前実験を行ったのちに、Rat Genome 230 2.0 Array(Affymetrix)にハイブリダイズを行う。アレイスキャナーで取り込んだ全試料のデータをまとめ、RMA 法を用いて標準化を行う。3 検体のうち 2 検体以上で“Positive”と判断された Probe を発現陽性とし、各試料における陽性 Probe をカウントする。得られた全ての結果のうち、Affymetrix control probe および全種類の試料で Negative と判断された Probe の結果を除く。このデータから 3 検体間の発現プロファイルの相関係数およびその標準偏差を算出する。

<階層クラスタリング>

各試料における遺伝子発現プロファイルを比較分類するために、階層クラスタリングを行う。いずれかの試料間において 2 倍以上の発現変動を示した Probe を Excel 上でスクリ

ーニングし、これら Probe の発現量を用いて階層クラスタリングを行う。発現量の値を \log_2 スケールに変換したのち、全試料の平均値からの差を算出して相対発現値とする。解析は MeV ver. 4.0(Multi Experiments Viewer; TM4 software)を用い、ユークリッド距離を採用して average linkage clustering により行う。クラスタリングは 3 検体の平均を 1 グループとして解析するものと、3 検体を別々に解析するものの 2 種類を行う。

<Volcano plot による発現プロファイルの比較>

MHvsSH, MHvsCD44+, MHvsThy1+(3d), MHvsThy1+(2d), SHvsCD44+, SHvsThy1+(3d), SHvsThy1+(2d), CD44+vsThy1+(3d), CD44+vsThy1+(2d), Thy1+(3d)vsThy1+(2d)の組み合わせで volcano plot を行う。各検体の平均発現量の比、および比較検定の P value(Benjamini-Hochberg)を算出し、Excel にてグラフを作成する。縦軸には P value を \log_{10} スケールで取り、横軸には発現比を \log_2 スケールで取ってプロットを行う。また、発現比 4 倍以上かつ $P<0.05$ 、または発現比 8 倍以上かつ $P<0.01$ の条件に合致する Probe 数をカウントする。

<Gene Ontology に基づく発現変動遺伝子の機能解析>

各試料 3 検体の平均発現量を算出し、検体全体の平均発現量より 4 倍以上高いまたは低い Probe を発現変動遺伝子と定義する。それぞれの試料について発現変動遺伝子を Excel 上でスクリーニングし、リストアップする。Gene Ontology ブラウザ(Ermine J; University of British Columbia)を用いてこれら発現変動遺伝子群に定義されている GO term(Biological process)を対応付ける。いずれかの試料において多く含まれる(Corrected P value <0.01) GO term をスクリーニングし、リストアップする。

<小型肝細胞、CD44 陽性細胞特異的遺伝子の抽出>

小型肝細胞および CD44 陽性細胞において特異的な発現を示す遺伝子を抽出する。全データから、以下の全ての条件に合致する Probe を Excel 上でスクリーニングし、全試料での相対発現値をもとに MeV ver.4.0 にて階層クラスタリングを行う。小型肝細胞および CD44 陽性細胞において特異的な発現を示すクラスターを図として出力する。

(スクリーニング条件)

- ・ 小型肝細胞試料 3 検体の平均発現量が全検体の平均発現量の 4 倍以上である
- ・ CD44 陽性細胞試料 3 検体の平均発現量が全検体の平均発現量の 4 倍以上である

<特定の機能に関与する遺伝子発現データの抽出>

GeneChip に配置されている遺伝子のうち、肝細胞機能に関与する遺伝子(56 probe)、キトクロム P450(67 probe)、肝細胞や幹細胞に関与する転写因子(70 probe)、増殖因子(95 probe)、幹細胞マーカー(39 probe)を選出し、各試料における発現の絶対値および相対値を

抽出する。その結果を MeV ver.4.0 に入力し、図として出力する。

<経時的発現変動を示す遺伝子の抽出>

Thy1+(2d), Thy1+(3d), CD44+間での発現量の変動に着目し、経時的な発現変動を示す遺伝子を抽出する。Thy1+(3d)/Thy1+(2d)>4 かつ CD44+/Thy1+(3d)>4、あるいは Thy1+(3d)/Thy1+(2d)<0.5 かつ CD44+/Thy1+(3d)<0.5 のように時間依存的に発現変動する遺伝子を Excel 上でスクリーニングし、MeV ver.4.0 に相対的発現値を入力して図として出力する。

<Pathway 解析>

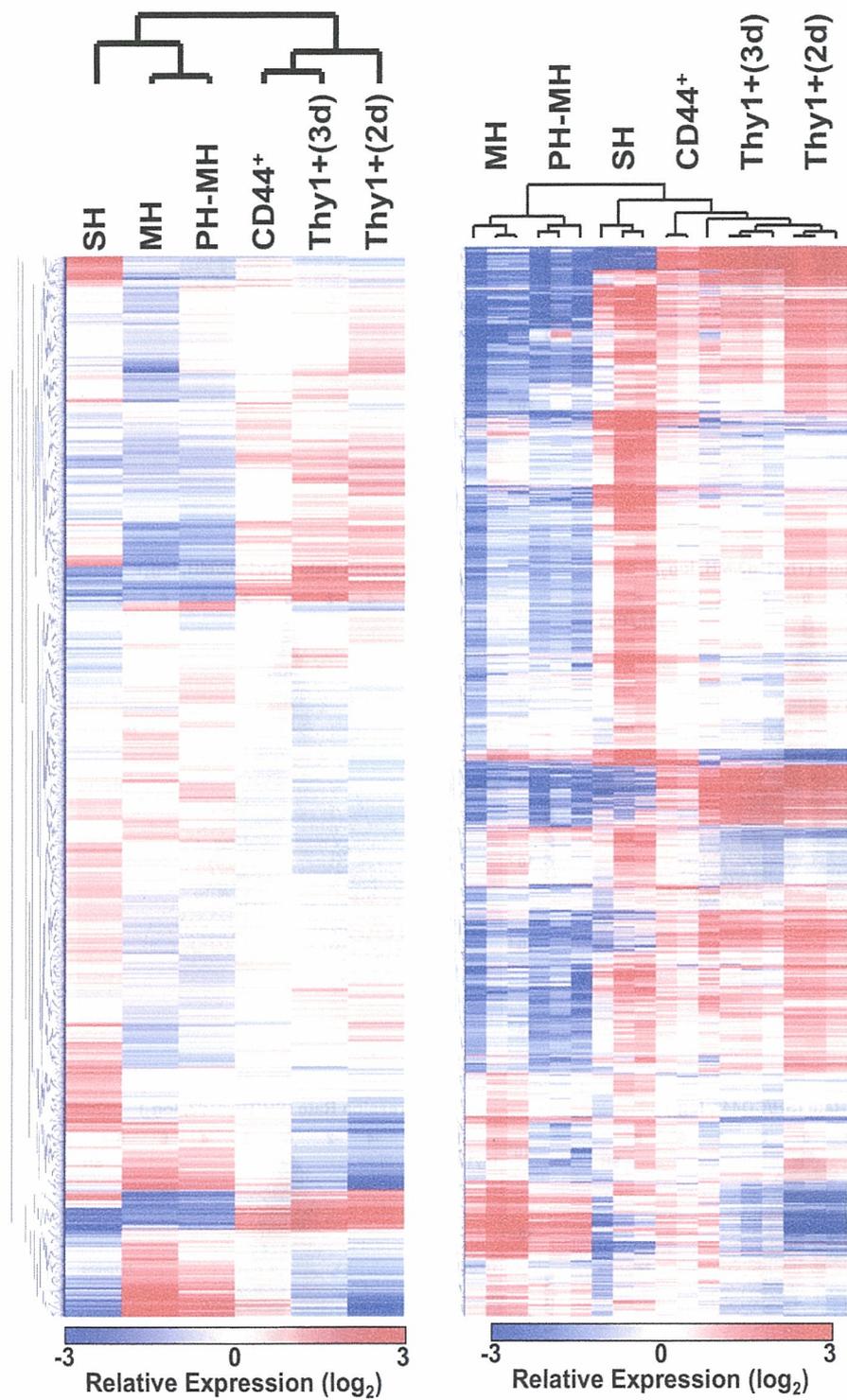
各試料の MH に対する発現比の平均値を算出し、Pathway 解析ソフト(GenMAPP ver.2.1;Gladstone Institutes)に入力する。MH と比較して発現が高い Probe を赤に、発現が低い Probe を青になるように可視化を行う。多くの遺伝子が発現変動している Pathway について図を出力する。

6. 測定結果

<GeneChip による遺伝子発現の網羅的解析>

試料	Positive Probe	3 検体間の相関係数
MH	14448	0.9820±0.0031
SH	18679	0.9546±0.0075
PH	14975	0.9675±0.0154
CD44+	19098	0.9350±0.0524
Thy1+(3d)	18001	0.9900±0.0047
Thy1+(2d)	18663	0.9948±0.0011
いずれかの試料	22006	
全ての試料	12173	

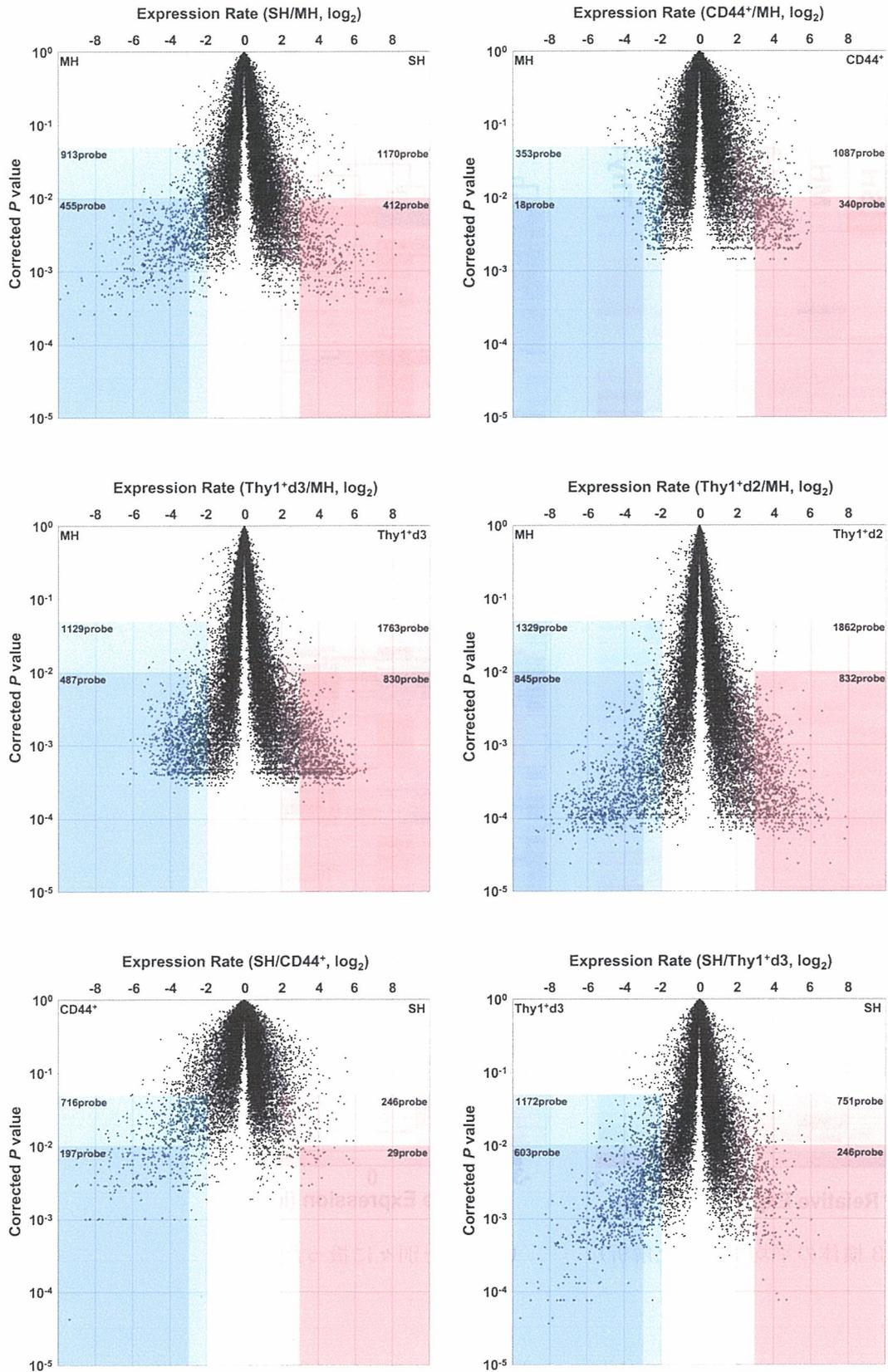
<階層クラスタリング>

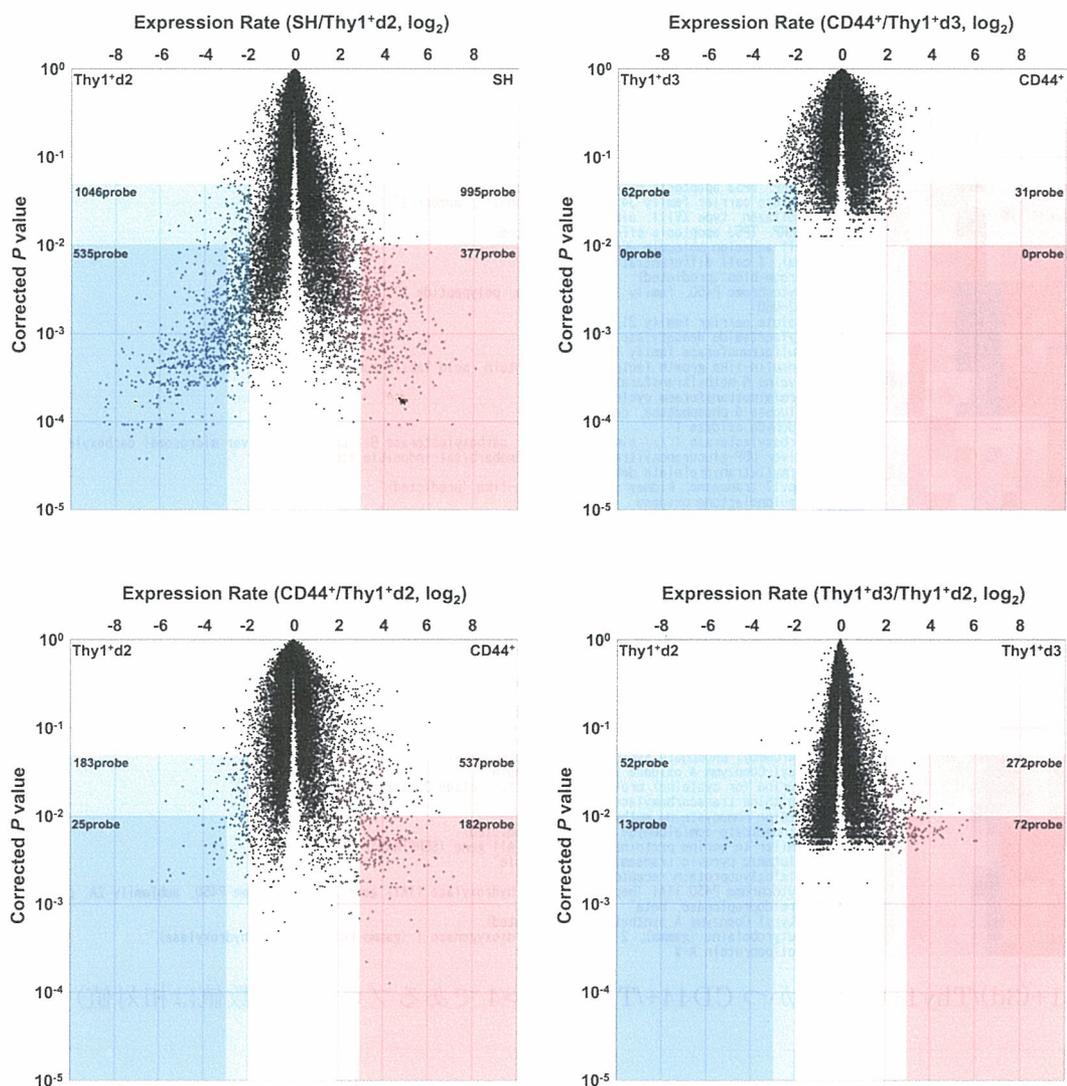


(3 検体の平均で行った解析)

(3 検体を別々に扱った解析)

<Volcano plot による発現プロファイルの比較>





< Gene Ontology に基づく発現変動遺伝子の機能解析 >
 添付書類 1 に記載しました。

< 小型肝細胞、CD44 陽性細胞特異的遺伝子の抽出 >
 添付書類 2 に記載しました。

< 特定の機能に関与する遺伝子発現データの抽出 >
 添付書類 3 に記載しました。