

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 断片の大きさは添付資料に示す。

- 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

(3) 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、増幅された DNA 断片の測定を行う。PCR 産物 5 μ l に 1 μ l の Loading Buffer を加えて攪拌し、0.5×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×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。また、GeneChip の結果との比較を行う。

<小型肝細胞の成熟化により発現変動を示す遺伝子の解析>

MH, M-SH, SH 間で発現変動を示す遺伝子に着目し、小型肝細胞の成熟化に伴い発現変動を示す遺伝子を抽出する。

(1) MH, M-SH, SH の発現プロファイルの詳細な比較

MH, M-SH, SH のいずれかの試料間で発現差が 2 倍以上であった Probe を抽出し、階層クラスタリングを行う。また、この Probe をどの組み合わせで発現差があるか分類し、Probe 数をカウントする。また、SH での発現がもっとも弱い Probe、SH での発現がもっとも強い Probe を抽出し、階層クラスタリングを行う。

(2) 成熟化に伴い発現変動を示す遺伝子のリストアップ

以下の条件に合致する Probe を抽出し、遺伝子名が付いていないものを除いて Heat map を作成する。

- SH での発現が、MH, M-SH と比較して 4 倍以上高い
- SH での発現が、MH, M-SH と比較して 8 倍以上低い

(3) GO に基づく遺伝子機能ごとの階層クラスタリング

9 種の試料のいずれかで発現している 25,093Probe から、特定の Gene Ontology に含

まれる Probe を抽出し、階層クラスタリングを行う。解析する GO term は以下の通りである。

GO	GO term	Probe 数
GO:0003824	Catalytic activity	2,975
GO:0006810	Transport	1,612
GO:0007165	Signal transduction	1,719
GO:0008283	Cell proliferation	393
GO:0030154	Cell differentiation	520
GO:0032502	Developmental process	704

(4) 発現変動により分類された Probe に含まれる遺伝子の機能についての解析

MH, M-SH, SH における発現変動から、以下の条件により Probe を分類する。発現比の threshold は 2 倍および 4 倍に設定する。

Probe 群	スクリーニング条件
Total	なし
M-SH>SH	成熟化小型肝細胞での発現が小型肝細胞より高い
MH>SH	成熟肝細胞での発現が小型肝細胞より高い
M-SH>SH, MH>SH	M-SH>SH かつ MH>SH
SH>M-SH	小型肝細胞での発現が成熟化小型肝細胞より高い
SH>MH	小型肝細胞での発現が成熟肝細胞より高い
SH>M-SH, SH>MH	SH>M-SH かつ SH>MH

それぞれの Probe 群の中で、特定の GO に分類される遺伝子数を Ermine J にて算出し、その割合をグラフ化する。検討する GO term は以下に示す。

GO	GO term	GO	GO term
GO:0006810	Transport	GO:0008152	Metabolism
GO:0006915	Apoptosis	GO:0008283	Cell proliferation
GO:0006955	Immune response	GO:0016477	Cell migration
GO:0007045	Cell cycle	GO:0030154	Cell differentiation
GO:0007154	Cell communication	GO:0045499	Regulation of transcription
GO:0007155	Cell adhesion	GO:0048513	Organ development
GO:0007165	Signal transduction	GO:0050896	Response to stimulus
GO:0007267	Cell-cell signalling		

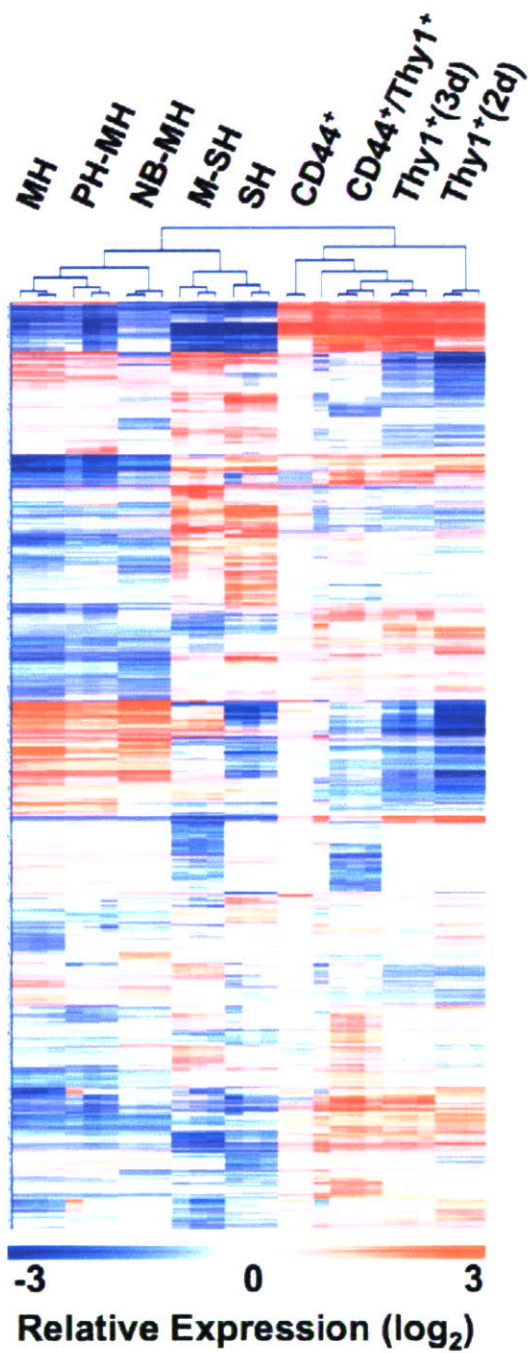
3. 測定結果

<遺伝子発現解析の結果>

GeneChip 上に存在する全 Probe 31,099 から、コントロール Probe を除き、さらに 9 種の試料全てにおいて発現していないと判断された Probe を除いた結果、25,093Probe が残

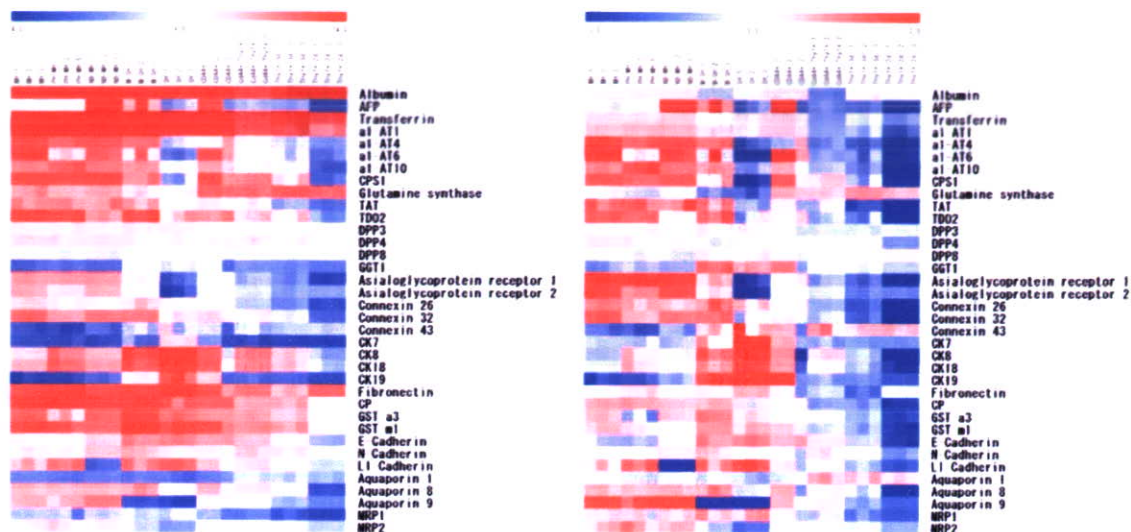
り、今後の解析の対象となった。また、9種の試料のうちいずれかの間で発現比が2倍以上であった Probe は 14,526 であった。

<全データの階層クラスタリング>

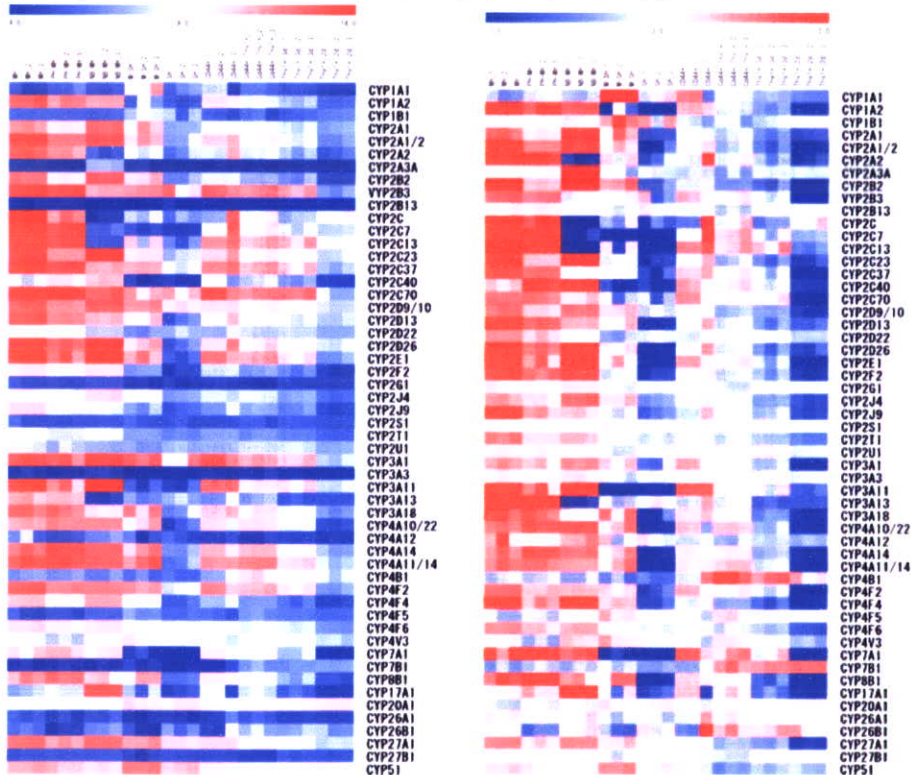


<肝細胞マーカー遺伝子の発現解析>

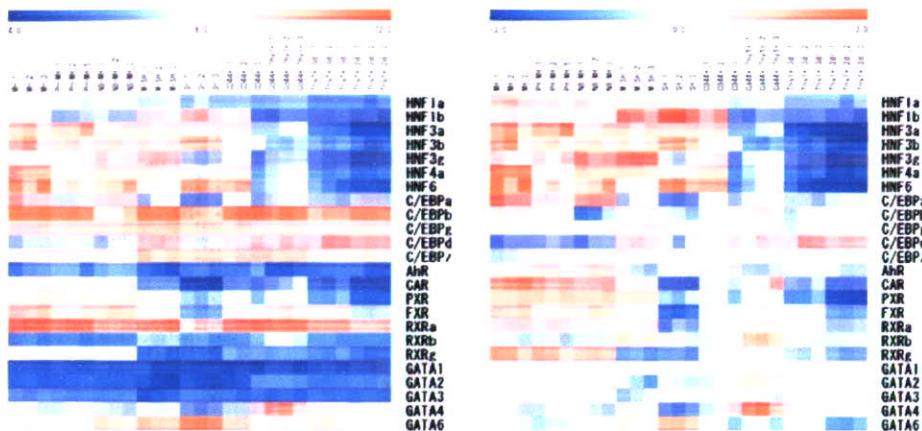
・肝細胞機能マーカー (左: 絶対値、 右: 相対値)



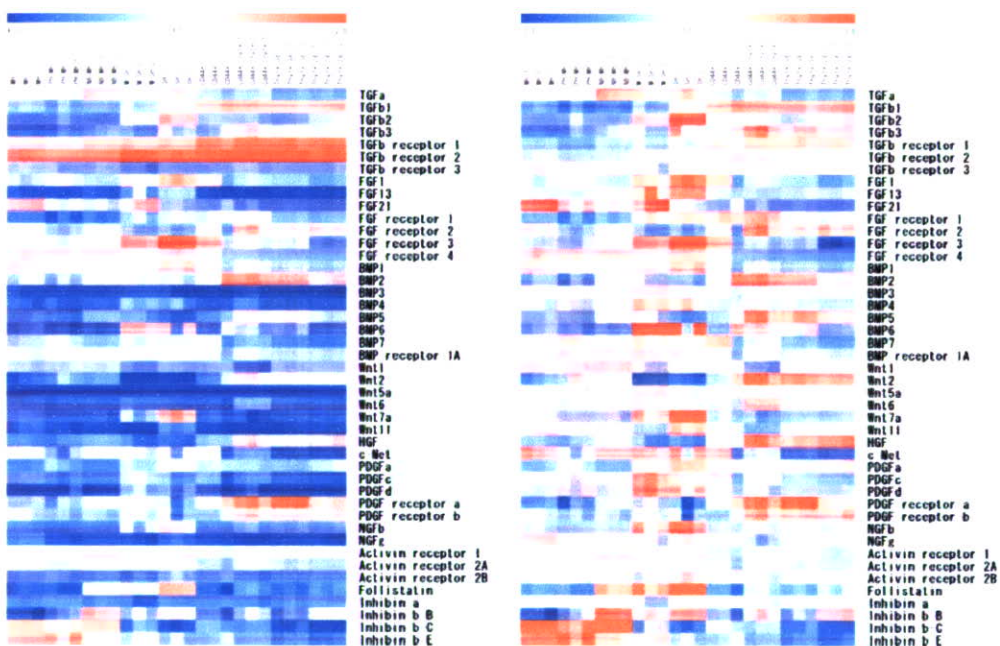
・Cytochrome P450 (左: 絶対値、 右: 相対値)



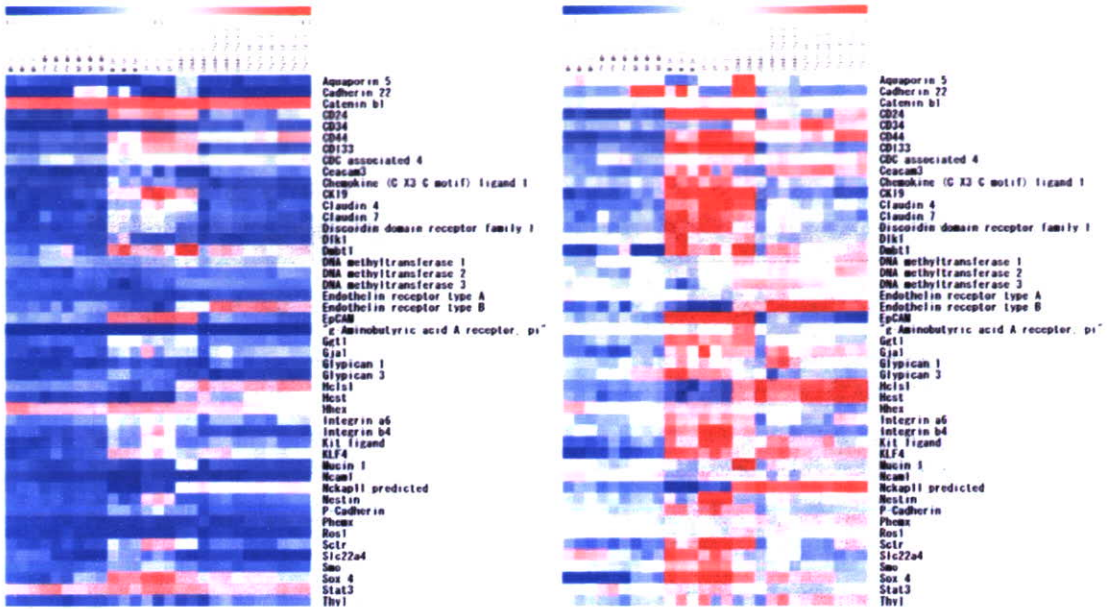
• 肝細胞関連転写因子 (左: 絶対値、 右: 相対値)



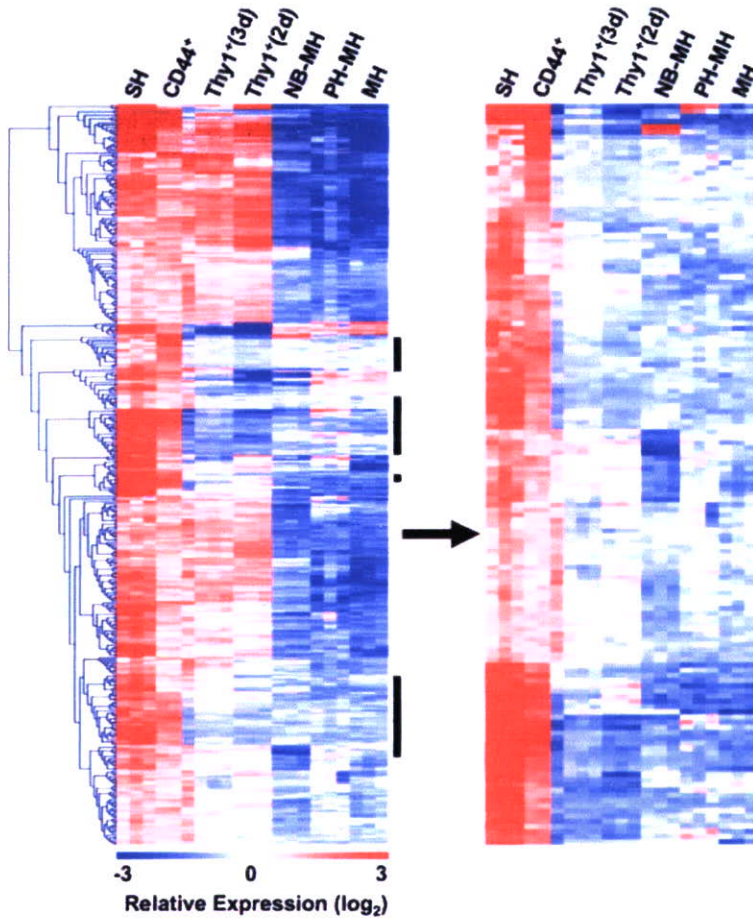
• 増殖関連遺伝子 (左: 絶対値、 右: 相対値)



・肝stem細胞マーカー (左: 絶対値、 右: 相対値)



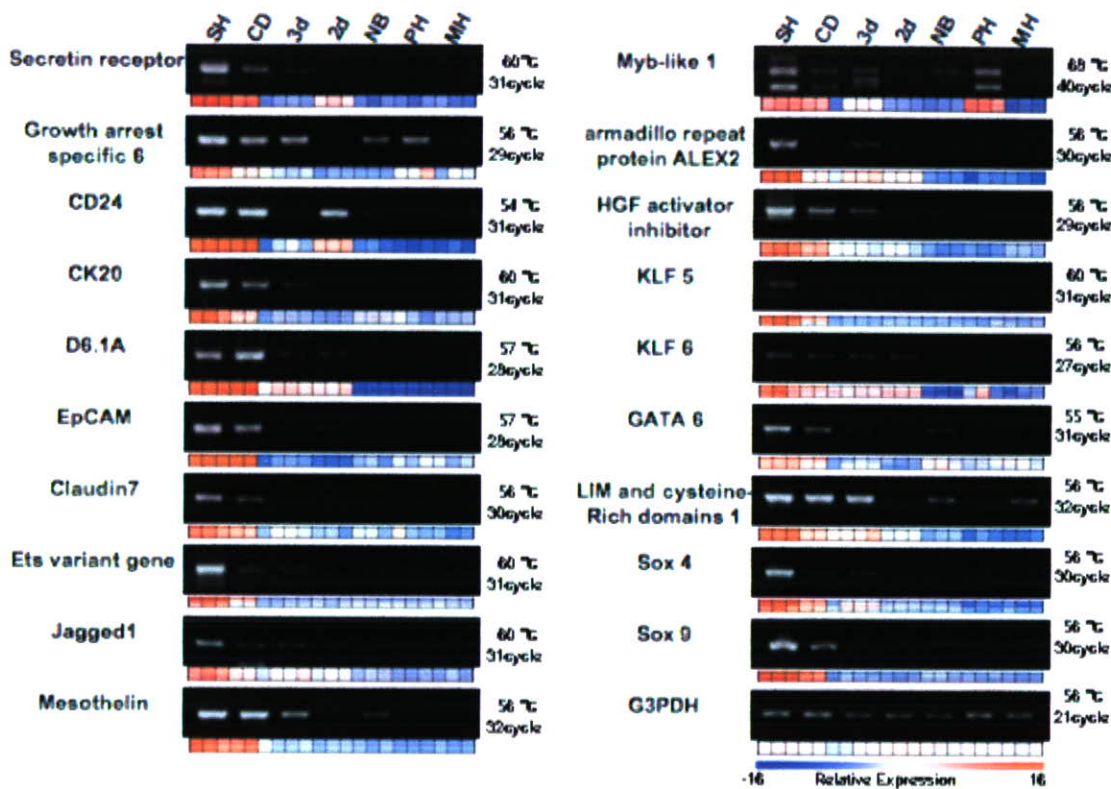
<小型肝細胞、CD44 陽性細胞特異的遺伝子の抽出>



<小型肝細胞、CD44 陽性細胞特異的遺伝子のリストアップ>

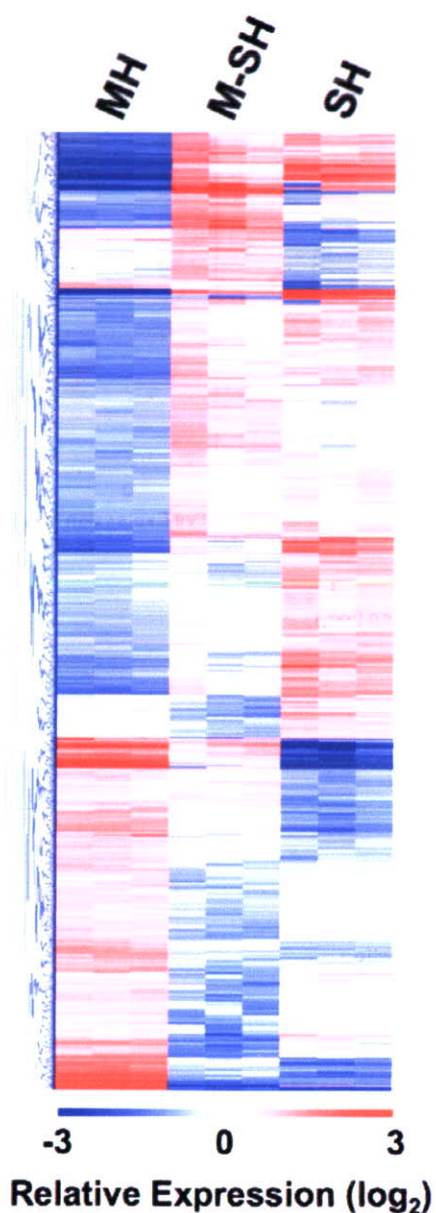
・添付資料に示す。

<小型肝細胞、CD44 陽性細胞特異的遺伝子候補の RT-PCR による検討>

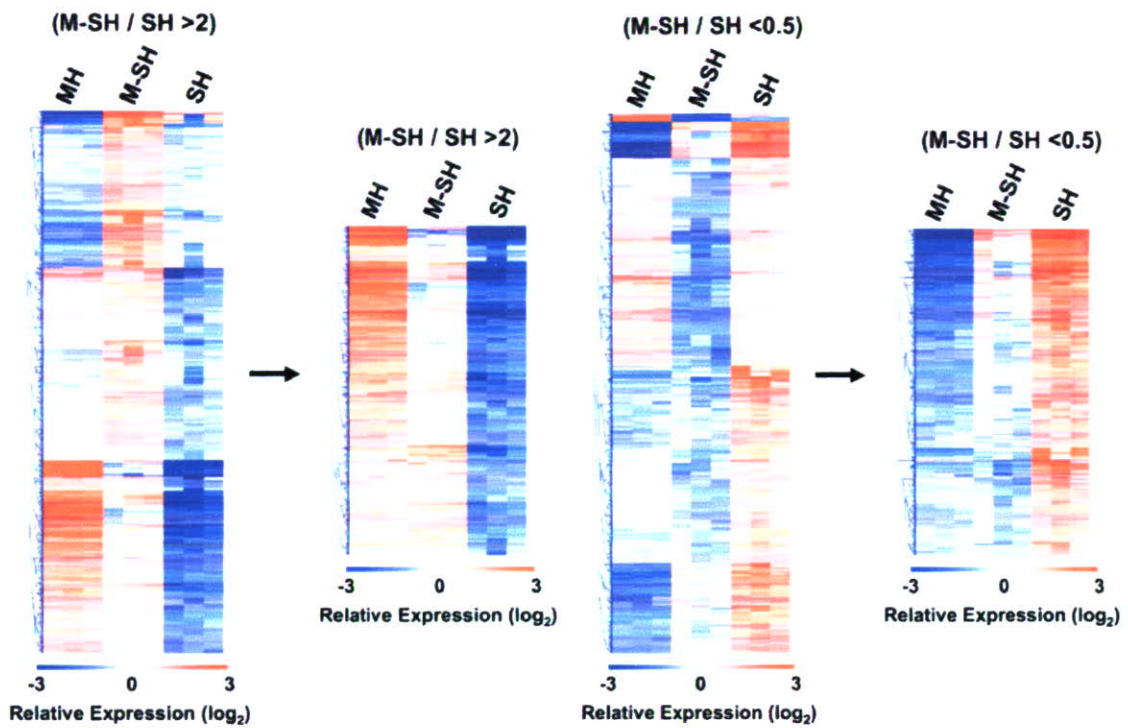


<小型肝細胞の成熟化により発現変動を示す遺伝子の解析>

(1) MH, M-SH, SH の発現プロファイルの詳細な比較

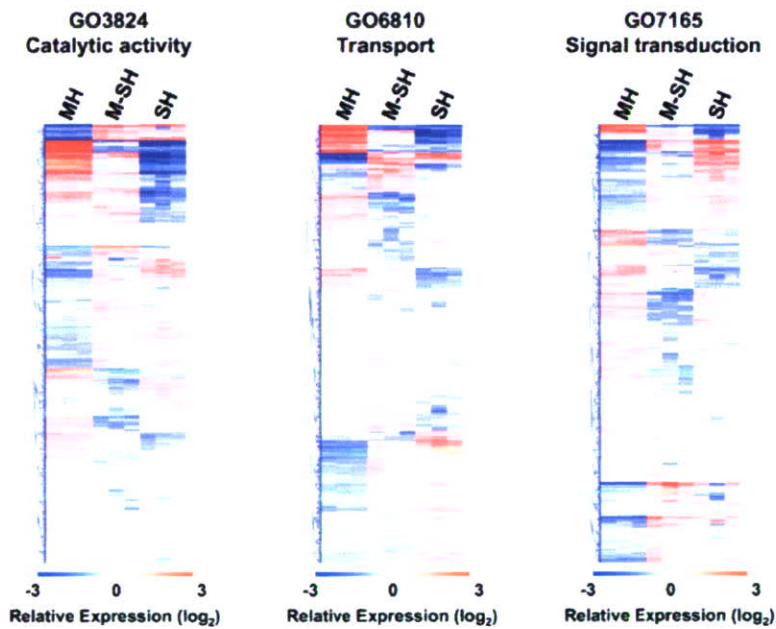


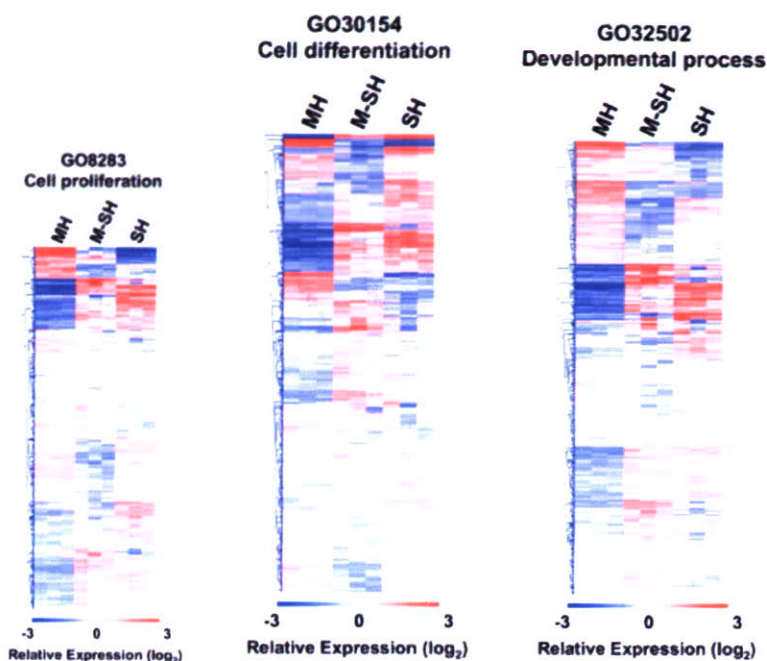
1 st screening	Probe	2 nd screening	Probe
M-SH>MH	3,723	SH>M-SH	342
		M-SH>SH	681
		SH>MH	2,405
		MH>SH	22
MH>M-SH	2,829	SH>M-SH	797
		M-SH>SH	364
		SH>MH	9
		MH>SH	1,205
SH>M-SH	2,073	M-SH>MH	342
		MH>M-SH	797
		SH>MH	944
		MH>SH	58
M-SH>SH	1,991	M-SH>MH	681
		MH>M-SH	364
		SH>MH	143
		MH>SH	997
SH>MH	4,077	M-SH>MH	2,405
		MH>M-SH	9
		SH>MH	944
		MH>SH	143
MH>SH	2,292	M-SH>MH	22
		MH>M-SH	1,205
		SH>M-SH	58
		M-SH>SH	997



(2) 成熟化に伴い発現変動を示す遺伝子のリストアップ
添付資料に記載しました。

(3) GO に基づく遺伝子機能ごとの階層クラスタリング

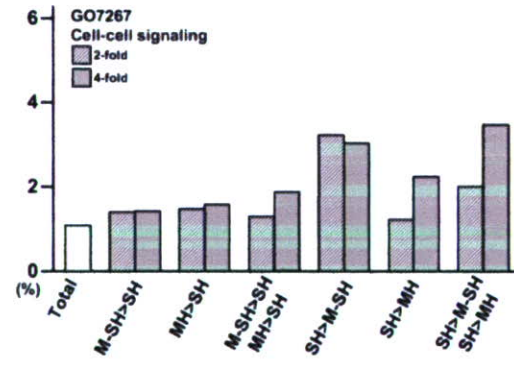
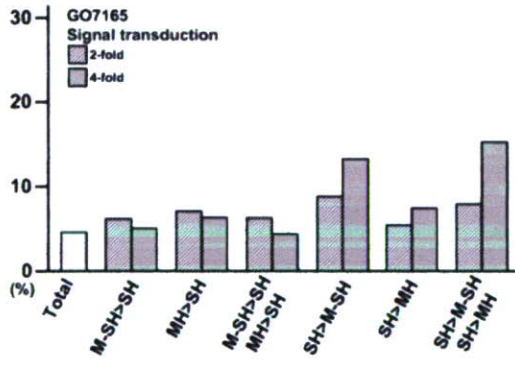
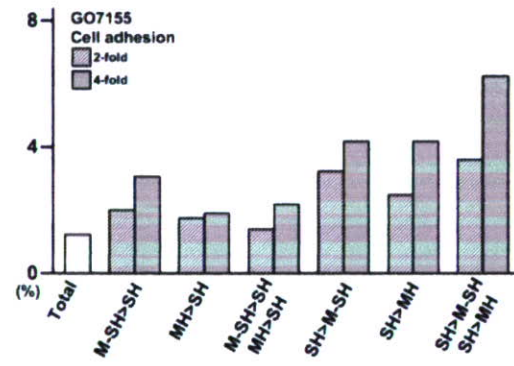
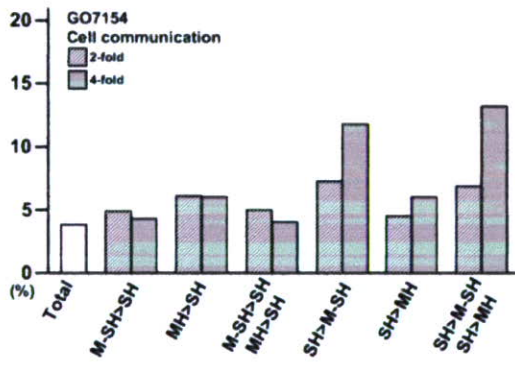
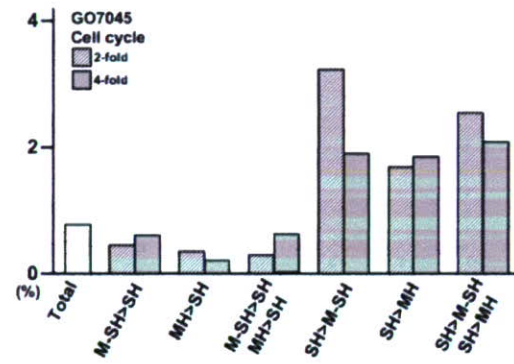
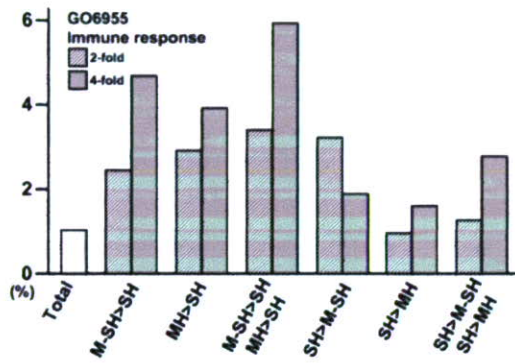
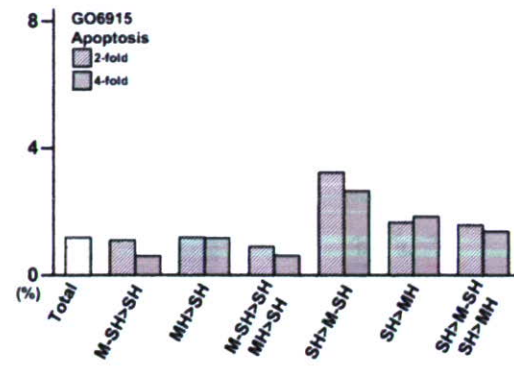
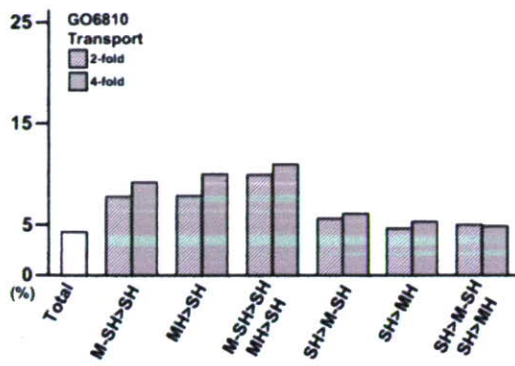


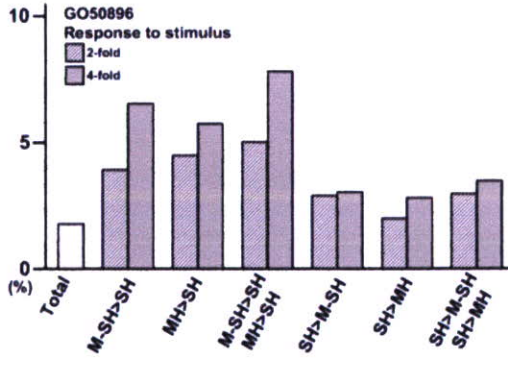
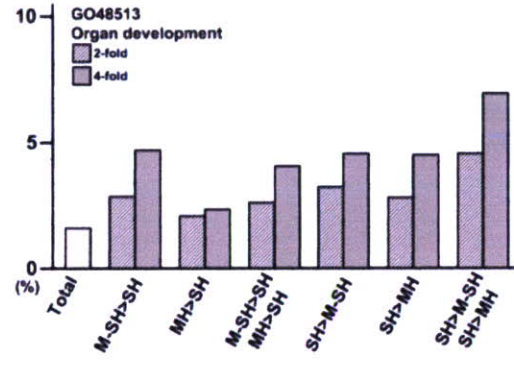
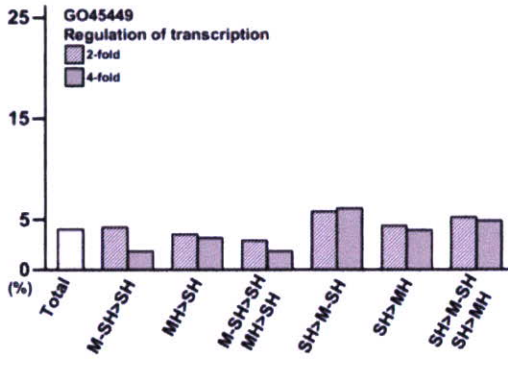
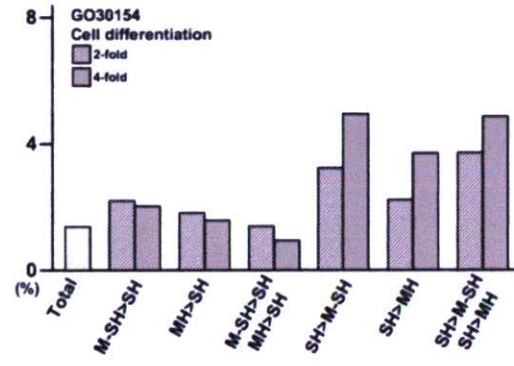
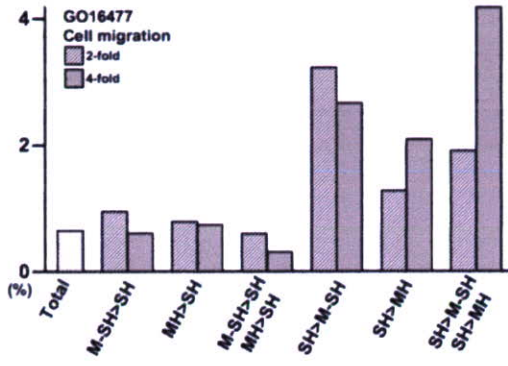
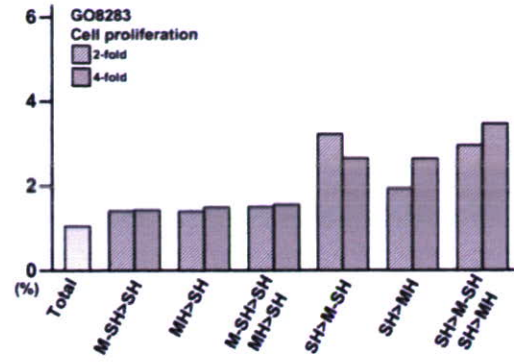
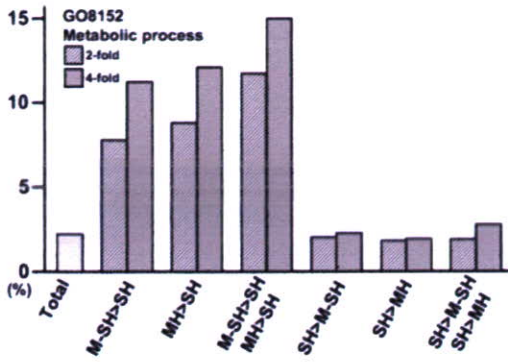


(4) 発現変動により分類された Probe に含まれる遺伝子の機能についての解析

Probe 群	スクリーニング条件	Threshold	Probe
Total	なし	-	25,093
M-SH>SH	成熟化小型肝細胞での発現が小型肝細胞より高い	2	1,991
		4	490
MH>SH	成熟肝細胞での発現が小型肝細胞より高い	2	2,292
		4	263
M-SH>SH, MH>SH	M-SH>SH かつ MH>SH	2	997
		4	320
SH>M-SH	小型肝細胞での発現が成熟化小型肝細胞より高い	2	2,073
		4	263
SH>MH	小型肝細胞での発現が成熟肝細胞より高い	2	4,077
		4	1,244
SH>M-SH, SH>MH	SH>M-SH かつ SH>MH	2	944
		4	144

・各 GO に含まれる遺伝子数は添付資料に示す。





測定結果報告書

ラット凍結小型肝細胞における CYP2B 1 の発現解析

2008 年 3 月 14 日
株式会社 環境研究センター

1. 測定試料

試料	略称	検体数
ラット成熟肝細胞由来 total RNA	MH	1
フェノバルビタール投与ラット成熟肝細胞由来 total RNA	MH(+PB)	1
培養ラット小型肝細胞(subculture)由来 total RNA	Sub-SH	1
凍結保存ラット小型肝細胞由来 total RNA	Frozen-SH	1
凍結保存後培養ラット小型肝細胞由来 total RNA	Cryo-SH	1
凍結保存後培養ラット小型肝細胞(PB 投与)由来 total RNA	Cryo-SH(+PB)	1
合計		6

2. 測定項目

- 1) RT-PCR による CYP2B1 遺伝子発現測定
- 2) 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 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 H₂O to 20 µl

<PCR>

得られた cDNA 溶液 20 μl のうち 1 μl 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 μl
• 10 \times Buffer	2.5 μl
• 25 mM MgCl ₂	2 μl
• 10 mM dNTP mix	0.5 μl
• 10 μM Sense primer	2.5 μl
• 10 μM Anti-sense primer	2.5 μl
• DNA Taq polymerase	0.25 μl
• BSA (Fermentus)	0.25 μl
• H ₂ O	to 25 μl

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

(RT-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)
CYP2B1	Sense	GGGACACCCAAAGTCCCGTGG	27	56	867
	Anti-sense	GGAAACCATAGCGGAGTGTGG			
G3PDH	Sense	ACCACAGTCCATGCCATCAC	22	56	451
	Anti-sense	TCCACCACCCTGTTGCTGTA			
Oligo-dT primer		AAACGACGGCCAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGCGCT TTTTTTTTTTTTTTT			

<PCR 産物の電気泳動>

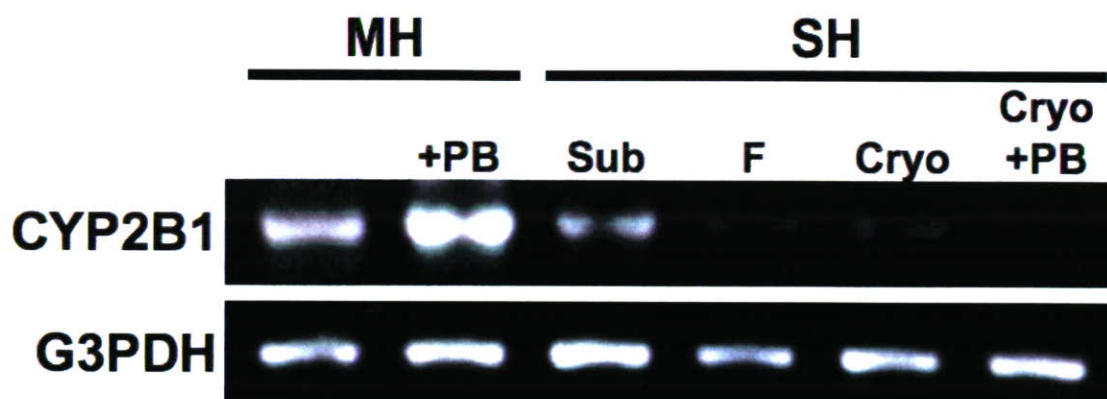
PCR 産物 25 μ l のうち 5 μ l をアガロースゲル電気泳動にて分離し、増幅された DNA 断片の測定を行う。PCR 産物 5 μ l に 1 μ l の Loading Buffer を加えて攪拌し、0.5 \times TAE-1% アガロース-エチジウムブロマイドゲルにアプライして電気泳動を行う。泳動バッファーには 0.5 \times TAE を用いて 100V で 30 分間泳動を行ったのち、ゲルを UV トランスイルミネーター上で観察し写真撮影を行う。検体と同時に DNA サイズマーカーも泳動し、増幅された DNA 断片が予想されるサイズと同じかどうか確認する。

3. 測定結果

<RNA 濃度測定の結果>

検体名	RNA 濃度(μ g/ μ l)	OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀
MH	4.66	1.58
MH(+PB)	4.12	1.56
Sub-SH	1.40	1.52
Frozen-SH	0.75	1.53
Cryo-SH	1.17	1.51
Cryo-SH(+PB)	1.09	1.53

<RT-PCR 産物の電気泳動結果>



測定結果報告書

ラット凍結小型肝細胞における CYP2B1 タンパク質の
Western blotting による発現解析

2008年3月14日
株式会社 環境研究センター

1. 測定試料

試料	略称	検体数
ラット成熟肝細胞由来タンパク質	MH	1
フェノバルビタール投与ラット成熟肝細胞由来タンパク質	MH(+PB)	1
培養ラット小型肝細胞(subculture)由来タンパク質	Sub-SH	1
凍結保存ラット小型肝細胞由来タンパク質	Frozen-SH	1
凍結保存後培養ラット小型肝細胞由来タンパク質	Cryo-SH	1
凍結保存後培養ラット小型肝細胞(PB投与)由来タンパク質	Cryo-SH(+PB)	1
合計		6

2. 測定項目

Western blotting による CYP2B1 タンパク質発現測定

<タンパク質試料の定量>

発現解析に先立ち試料中のタンパク質濃度を測定し、解析に十分であるか確認する。試料中のタンパク濃度は BCA protein Assay Kit (PIERCE)により測定し、BSA を標準タンパク質に用いてタンパク質濃度を算出する。

<タンパク質の泳動とメンブレンへのブロッティング>

タンパク質試料 5 µg を SDS-PAGE にて分離する。ゲルは 10%ポリアクリルアミドゲルを用い、泳動後にタンパク質を PVDF メンブレン(Immobilon P, MILLIPORE)に転写し、Membrane blocking agent(Amersham Biosciences)でブロッキングを行う。

<一次抗体、二次抗体との反応と検出>

メンブレンを 1,000 倍希釈一次抗体(Anti-rat CYP2B1, 第一化学薬品, Cat. No. 299148)と 1 時間、さらに 100,000 倍希釈二次抗体(Peroxidase-conjugated AffiniPure Rabbit Anti-Goat IgG, Jackson Immuno Research, Cat. No. 305-035-045)と 1 時間反応させる。反応はすべて 0.1% Tween 20, 2% Membrane blocking agent in PBS 中で行い、反応後は 0.1% Tween 20 in PBS でメンブレンを 5 回洗浄する。反応後、SuperSignal WestDura Extended Duration (PIERCE) による発光反応を行い、暗室にて Hyperfilm ECL(Amersham Biosciences)への露光及び現像を行う。

3. 測定結果

<タンパク質濃度測定の結果>

試料	タンパク質濃度 (μg/ul)
MH	10.89
MH(+PB)	8.54
Sub-SH	1.74
Frozen-SH	1.20
Cryo-SH	0.98
Cryo-SH(+PB)	1.33

<Western blotting の結果>

