

平成 26 年度業務担当報告

ヒト iPS 細胞由来心筋細胞株ごとのマーカー遺伝子の比較定量解析法の開発

担当責任者 古谷 和春
国立大学法人大阪大学
大学院医学系研究科 薬理学教室 助教

本業務項目は、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞株を利用して、in silico（インシリコ）でヒト心筋細胞のシミュレーションを行う技術を実現するための定量的データを取得することを目的とする。本研究計画の全期間を通じて、インシリコモデル技術に導入することに特化した実験系を構築する。

本年度は、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞の心筋マーカー遺伝子発現における株間差のばらつきを比較定量解析するために、定量性リアルタイム PCR 法を用いた遺伝子発現解析を行った。解析用の遺伝子は、インシリコモデルを参照しながら選定し、それぞれの分子のプライマーを設計した。市販されているヒト iPS 細胞由来心筋分化細胞を用いて実験プロトコルの検証を行い、マーカー遺伝子発現の比較定量法を確立した。このプロトコルを用いて、2つの細胞株を用いて比較定量の予備試験結果を得た。

業務分担者：黒川洵子（東京医科歯科大学）

業務分担者：安東朋子（東京医科歯科大学）

A. 研究目的

本研究の目的は、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞株を利用して、in silico（インシリコ）でヒト心筋細胞のシミュレーションを行う技術を実現するための定量的データを取得することを目的とする。本研究計画の全期間を通じて、インシリコモデル技術に導入することに特化

した実験系の構築を目指す。

ヒト iPS 細胞由来分化心筋細胞（ヒト iPS 心筋）を医薬品の副作用による催不整脈作用の評価に用いることが、国際的に検討されている。ヒト iPS 心筋は、現在用いられている非心筋細胞を用いた評価法より、イオンチャネルの特性やその制御因子の発現と言った面で有利であると期待されている。しかし、その実験的裏付けは十分されておらず、細胞の分化、成熟技術にも課題が残されている。ヒト iPS 心筋を用いた医薬品の催不整脈作用の評価に理

論的な裏付けを与え、ヒト iPS 心筋と臨床試験の結果の橋渡しを行なうためにも、インシリコ技術をヒト iPS 技術に融合したインシリコツールを開発することが極めて重要である。

ヒト iPS 心筋の電気生理学的特性および薬物への応答性の理解は十分進んでいない。これまでに報告されているデータをパラメーターとしてヒト成人心室筋モデルに導入しても、ヒト iPS 細胞の特性を再現出来てはいない。ヒト iPS 細胞の特性は、膜上にあるイオンチャンネルやトランスポーターといったイオン輸送体、それを制御する受容体やシグナル伝達蛋白質、さらにはそれらの細胞膜上での局在や選択的相互作用を総合的に反映するものであるため、目的（ヒト iPS 由来心筋の成熟化技術を利用した心毒性予測のためのインシリコツールの開発）に特化した実験データの取得が必要である。そのためには、細胞の分化、成熟技術、薬物評価法の開発を行っている研究者と連携し、組織で当該研究を実施することが求められる。

ヒト iPS 心筋の活動電位に関する数理モデルは、未完成であっても、シミュレーション研究は現在理解できていないことをどのように仮定すればよいか、理論的に無理の無い範囲が示唆される可能性がある。インシリコモデルを用いたシミュレーション研究の結果を参照しながら、解析用の心筋マーカーを選定することで、研究方法を最適化させる。未熟なヒト iPS 心筋で観察される株間のばらつきを指標に、ヒト

iPS 心筋の特性を規定するパラメータの定量的データを取得することが有効であると考えられる。

そこで本研究では、以下の研究により、株間差を補正し、ヒト iPS 細胞と臨床の結果化を橋渡しするインシリコツールにパラメータを導入することに特化した実験系の構築を目指す。

定量性リアルタイム PCR 法および電気生理学的実験によるヒト iPS 心筋細胞株ごとの心筋マーカーの比較定量データリストの構築

インシリコ iPS 細胞由来心筋細胞モデルを用いた株間差補正のためのインシリコツール開発のサポートとその妥当性の実験的検証

B. 研究方法

ヒト iPS 細胞由来心筋細胞の培養実験プロトコルは、CDI社マニュアルを参考に作成した（資料1）。2014年8月14日に、東京医科歯科大学で実施し、研究分担：古谷と技術を共有した。

定量性リアルタイムPCRはSYBR Green 法を用いた。プライマーは、文献およびPrimer3を参考にして設計した（表1）。非特異的なプライマー二量体等が検出されていないことを確認するために、コントロールのサンプルを用いて、融解曲線解析およびPCR産物のアガロースゲル電気泳動を行った。

今回の実験では、多くの分子の解析を行うので、通常の実験で用いている96ウェルプレート（StepOne

Plus or ABI7300, life technologies) だけではなく、384ウェルプレートも用いることとした(ABI7900)。384ウェルでは、ウェルごとの容量が少なくなることから、安定した計測が出来るかどうか実験者が確認する必要があると考え、マウス心室筋から調整したtotal RNAサンプルを用いてGAPDHの発現を調べた。

定量性PCRの標準遺伝子は、各サンプル間で変動しないことが望ましい。そこで、外因性刺激を与えた場合の発現変動を解析したDNAマイクロアレイデータからGAPDHの発現変動について調べた(図2, 3)。

CDI社のiCell-cardiomyocyte (CM)の3ロット およびAxiogenesis社のCor.4Uの2株のヒトiPS細胞由来心筋細胞からRNAを抽出し、41遺伝子の発現をリアルタイムPCRで解析した(図4)。

C. 研究結果

研究総括の報告書にまとめられた心筋マーカー40遺伝子リストに従い、定量性リアルタイムPCRのプライマーを設計し(表1)、その反応性及び特異性を評価した。表1のリストのうち、CACNA1H, KCNIP1, KCNE1については、アガロース電気泳動で非特異的バンドが検出され融解曲線解析のピークにも異常があった。また、ヒトiPS由来心筋細胞におけるKCNA5, KCNE2, ADRA1A, ADRB2遺伝子の発現は不検出であった。

本年は、GAPDH 遺伝子発現の解析

を通して、機械をおよび標準遺伝子の検証を終了し(図1-3)、実験プロトコルを決定した。そのプロトコルに従い、予備実験として、CDI社とAxiogenesis社から市販されている細胞の遺伝子発現を比較した。CDI社の3ロットはMYH6(心房型)とMYH7(心室型)の比に少しばらつきはあったものの、心筋イオンチャネルの発現比に大きなばらつきは見られなかった。一方、Axiogenesis社の2株では、MYH6やMYH7の発現比はさほど大きくないにも関わらず、NaチャネルとL型Caチャネルのサブユニットの遺伝子発現は細胞株1で特徴的に多いことが示された。

D. 考察

心筋マーカー遺伝子発現の比較定量のために作成した心筋マーカー40遺伝子のプライマーのうち、33遺伝子については現プロトコルにて使用可能であることを示した。この33遺伝子には、ヒトiPS由来心筋の電気生理的機能および心筋再分極に影響が大きいと考えられる分子はほとんど含まれるが、CACNA1H, KCNIP1, KCNE1については再検討が必要である。KCNA5, KCNE2, ADRA1A, ADRB2遺伝子については、RNAの増量や他のヒトサンプルでは検出できたため、ヒトiPS由来心筋では低発現であることが示唆された。今後は、ヒトiPS由来心筋の電気生理的機能および心筋再分極に影響が大きいと考えられるCACNA1HとKCNE1, KCNIP1を中心にプライマ

一の再設計を行う。しかし、永森らによる質量分析解析において、膜タンパク発現の比較定量が可能になった場合には、タンパク発現データを採用し、遺伝子発現解析の結果を待たずに機能解析を行うこととする。

CDI社とAxiogenesis社から市販されている細胞の遺伝子発現を比較したところ、CDI社 iCell-CM のロット間差よりもAxiogenesis社 Cor.4Uの細胞株間差のばらつきの方が大きいという傾向が見られたが、例数が少ないため今後は例数および細胞の種類を増やす必要がある。Cor.4Uは株が異なるから、NaチャンネルとL型Ca²⁺チャンネルのポア(孔)をもつサブユニットの遺伝子発現が大きくなばらついたことから、脱分極の立ち上がりとプラトー相に影響があるかどうか興味深い。今後は、この2遺伝子については、標本ごとに検量線を作成し定量解析を行う。また、それぞれのソースの細胞株ごとに3例を目指して、諫田らが調査した現在入手可能なヒトiPS由来心筋細胞のリストを基に順次解析していく。

E. 結論

ヒトiPS細胞由来心筋細胞培養および遺伝子発現解析に関する共通プロトコルを作成した。遺伝子発現比較のための心筋マーカー遺伝子と標準遺伝子を選定して、市販ヒトiPS由来心筋細胞株を用いた相対的比較解析法の系を確立した。Na⁺チャンネルとL型Ca²⁺チャンネルのポアをコード

する遺伝子(SCN5A, CACNA1C)の発現に大きな株間差が見られることを見出した。

G. 研究発表

論文

1. 黒川洵子、古谷和春、中谷晴昭、芦原貴司、久田俊明、杉浦清了、岡田純一、田保充康、吉永貴志(2014) 医薬品安全性評価におけるインシリコアプローチの可能性について考える、Japan. J. Electrophysiol. 心電図 34:326-329.

学会発表

1. 古谷和春：医薬品のインシリコ催不整脈リスク評価における現状と課題. 第41回日本毒性学会学術集会(2014, 7, 神戸)
2. Kazuharu Furutani, Kunichika Tsumoto, I-Shan Chen and Yoshihisa Kurachi : Effects of Class III Anti-Arrhythmic Agents with hERG Channel Block and Facilitation on Cardiac Action Potential: a Simulation Study. 17th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (2014, 7, Capetown, South Africa)
3. 古谷 和春 : CiPA が提案しようとする薬物催不整脈リスク予測のパラダイム.CBI学会2014年大会(2014, 10, 船堀)

資料1：実験プロトコル

iPS細胞由来心筋細胞 実験プロトコル (2014年7月14日採用)

CDI社プロトコルを参考に、黒川の研究室で採用しているプロトコルである。

2014年8月14日に、東京医科歯科大学で実施し、研究分担：古谷と技術を共有した。

iPS細胞由来心筋細胞 (CDI社、iCell cardiomyocyte) の到着、保管
準備するもの：液体窒素保存タンク

細胞の取り扱い

iCell心筋細胞は、1 mLクライオバイアルに入ったシングルセルの凍結細胞懸濁液として供給されている。受領後速やかに凍結バイアルをクライオボックスごと液体窒素保管容器へ移す。凍結バイアルを液体窒素保管容器へ移す際、室温に暴露することを出来るだけ避ける。液体窒素保管容器内では気相で保管する。

細胞用培地の取り扱い

心筋細胞用解凍用培地 (CDI社、iCell心筋細胞用解凍用培地 iCell Cardiomyocytes Plating Medium) と維持用培地 (CDI社、iCell心筋細胞用維持用培地 iCell Cardiomyocytes Maintenance Medium) は凍結した状態で提供されている。受領後、凍結培地を-20 冷凍庫で保管する。凍結後は4 で保管する。この状態で2週間まで保存できる。

iPS細胞由来心筋細胞の解凍の準備

解凍用培養の準備

iPS細胞の解凍に使用する培地 (CDI社、iCell心筋細胞用解凍用培地 iCell Cardiomyocytes Plating Medium) は実験日の前日に4 冷蔵庫に移し、一晩かけて解凍する。細胞の解答前に、解凍用培地を冷凍庫から取り出し、室温で2~4時間静置しておく。

プレートおよびカバースリップのゼラチンコート

iPS細胞由来心筋細胞を生着させるため細胞培養に用いるディッシュを0.1%ゼラチンでコーティングする。実験の目的に合わせて、6ウェルプレート、12ウェルプレート、24ウェルプレートを選択して用いる。12ウェルプレートには15 mmカバースリップを入れておく。オートクレーブ滅菌した0.1%ゼラチン溶液 (SIGMA-Aldrich社、タイプA、粉末、細胞培養用) を培養プレートに添加する。37 インキュベータで1時間以上整地する。使用する直前にゼラチン溶液を吸引除去する。

iPS細胞由来心筋細胞の解凍
準備するもの

- ・ 解凍用培地（準備に関しては で説明）
 - ・ 血球計算版
 - ・ ピペット
 - ・ ピペッターP1000、P20
 - ・ 50 mL 遠沈管
 - ・ トリパンプルー
 - ・ ストップウォッチ
 - ・ コーティング済みのデッシュ（準備に関しては で説明）
- * ベンチ内で必要な物をあらかじめ準備し、培地は蓋を軽くあけておく。
培地の使用量目安は、1バイアルで1.5本程度。

標準実験プロトコル

iPS細胞由来心筋細胞の解凍

1. 液体窒素保管容器から iCell 心筋細胞凍結バイアルを取り出す。
2. 37 °C に温めておいたウォーターバスで 4 分間加温する。このとき、フローターラックを使用し、バイアルが揺れないように固定する。バイアルのキャップ部分まで絶対に沈めない。
3. 4 分後、バイアルを出して綺麗に拭き、エタノールで消毒したのち、安全キャビネット内に移す。
4. iCell 心筋細胞懸濁液を P1000 マイクロピペットを用いて 50 mL の遠沈管の底にゆっくりと移す。
5. 培地 1 mL で、空のバイアルをリンスし、4 と同じチューブにゆっくり移す。
ピペットの先は液につけないようにして、1 滴ずつ(4~5 秒で 1 滴)滴下し、2 分以上かけて行う。1 滴滴下してはチューブをゆっくり揺らすようにする。
6. さらに 1 mL の培地で 5 と同様に空のバイアルをリンスし、P1000 マイクロピペットを用いてゆっくり 1 分間かけて 50 mL 遠心管に滴下する。
7. さらに 7 mL の培地を、10 mL ピペッターでとって、1 分間かけて滴下する。
8. 蓋をして 2~3 回やさしく転倒混和する。*絶対ピペッティングしない。
1 バイアルで総量 10 mL になる。

細胞数算出

1. 計算盤と、染色液のトリパンプルーを準備する。
2. PCR チューブにトリパンプルーを 10 μ L 入れる。
3. 再度細胞懸濁液を転倒混和させてから、10 μ L とって 2 のチューブに入れる。
4. 細胞をカウントして播種する細胞数に調整する。

iPS細胞由来心筋細胞の維持培養

1. iPS細胞の維持に使用する培地（CDI社、iCell心筋細胞用維持用培地 iCell Cardiomyocytes Maintenance Medium）は実験日の前日に4℃冷蔵庫に移し、一晩かけて解凍する。
2. 使用直前に維持用培地を37℃に温める。
3. 細胞播種後48時間後、解凍用培地を吸引除去し、適量の維持用培地で2回培地交換をおこなうことで非接着細胞や残骸を洗浄する。
4. 播種後は一日おきに培地交換を行なう。37℃、7%CO₂条件下で培養する。

iPS細胞由来心筋を用いた定量PCR実験

標準実験プロトコル

RNAの抽出

QIAGEN RNeasy Micro kit RNA (cat#74004) を使用して、RNAを抽出する。

操作の途中でDNase I処理を行い、DNAを除く。

1. 350 μLのRLTバッファーを各ウェルに加えホモゲナイズする。
2. 等倍量の70%エタノールを各可溶化液（サンプル）に加え、マイクロピペットで良く混和する。
3. サンプルを沈殿物とともに2 mLの回収（コレクション）チューブに装着したRNeasy MinEluteスピнкаラムに移す。チューブのフタを締め、8,000 g以上で15秒遠心する。通過画分は捨てる。
4. 350 μLのRW1バッファーをRNeasy MinEluteスピнкаラムにいれる。チューブのフタを締め、8,000 g以上で15秒間遠心する。通過画分は捨てる。
5. 10 μLのDNaseI stock溶液を70 μLのRDDバッファーに加え、転倒混和する。この80 μLのDNaseIインキュベーションMixをRNeasy MinEluteスピнкаラムの膜に直接滴下する。その後、室温で、15分間静置する。15分後、350 μLのRW1バッファーをRNeasy MinEluteスピнкаラムにいれる。チューブのフタを締め、8,000 g以上で15秒間遠心する。通過画分ごと回収チューブを捨てる。
6. 新しい12 mLの回収チューブにRNeasy MinEluteスピнкаラムを装着する。500 μLのRPEバッファーをRNeasy MinEluteスピнкаラムにいれる。チューブのフタを締め、8,000 g以上で15秒間遠心する。通過画分は捨てる。
7. 500 μLの80%エタノールをRNeasy MinEluteスピнкаラムにいれる。チューブのフタを締め、8,000 g以上で2分間遠心する。通過画分ごと回収チューブを捨てる。
8. 新しい12 mLの回収チューブにRNeasy MinEluteスピнкаラムを装着する。チューブのフタは開けた状態で出来るだけ高速で5分間遠心し、スピнкаラムの膜を乾燥させる。通過画分ごと回収チューブを捨てる。

9. 新しい1.5 mLの回収チューブにRNeasy MinEluteスピncラムを装着する。14 μ Lの RNase-free WaterをRNeasy MinEluteスピncラムの膜に直接滴下する。チューブのフタを締め、出来るだけ高速で1分間遠心し、RNAを溶出する。

*参考： 24well plate に播種したiCell (1x10⁵ cells/well) 2 well分からRNAを抽出した際にとれたRNA量は700 ng~1000ngだった。

cDNAの作成

RT-PCRによりcDNAを合成する。High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems #4368814)を使用する。以下の通り、反応をおこなう。

反応液

RNA	20 ng~2000 ng	
10x buffer		2.0 ul
25x dNTPs		0.8 ul
10x Randum Primer		2.0 ul
Multiscribe RTase		1.0 ul
MilliQ*	(MilliQ + RNA)	14.2 ul)
	total	20 ul

*MilliQ はオートクレーブしたものを使用する。

RT Program

サーマルサイクラーを使用して行う。

cDNAの希釈

cDNA は適宜希釈して定量 PCR に使用する。希釈する際は PCR 用のチューブを使って行う。RT-PCR 時の元の RNA 量が多い場合は 20 倍希釈、200ng RNA を使って RT した場合には 10 倍希釈している。

10 倍希釈例)

元の cDNA	10 μ L
Milli Q	90 μ L
Total	100 μ L

Standard (標準サンプル)

標準サンプルとして使う cDNA を以下のように希釈して、その仮の濃度から 試料の濃度を推定するために用いる。可能ならば、濃度既知の標準サンプルがあると目的の

試料の濃度を知ることができる。

標準サンプルの希釈 (例)

希釈系列	cDNA		MillQ
1/4	元 cDNA	10 μ L	30 μ L
1/20	1/4	10 μ L	40 μ L
1/100	1/20	10 μ L	40 μ L
1/500	1/100	10 μ L	40 μ L

測定サンプルの調整

定量 PCR は Triplicate で実施する。Triplicate で実施する場合、3.3well 分の pre-mix を作成する。

	<u>x1</u>	<u>x3.3</u>
2x SYBR	10 μ L	33.0 μ L
MillQ	8 μ L	26.4 μ L
Primer* (F&R mix μ M each)	1 μ L	3.3 μ L
<u>dil-cDNA</u>	1 μ L	3.3 μ L
	20 μ L	66.0 μ L

以上を 1 well ごとに 20 μ L ずつ分注し、測定する。

Standard cDNA は、同じ細胞を希釈して使用する。Housekeeping gene として GAPDH、Channel 関連の指標遺伝子に SCN5A、Channel 以外の指標には MYH6 を用いる。

定量PCR

準備

- リアルタイム PCR 装置 (ABI7300 もしくは ABI7900)
- 試薬: Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) #4367654 5 mL
- 目的の遺伝子用 Primer: forward and reverse 5 μ M each (pre-mix 下記のように希釈)
- 内部コントロール遺伝子用 primer: forward and reverse 5 μ M each
 - (GAPDH など) (pre-mix 下記のように希釈)
- MilliQ 水 (オートクレーブしたものを使用)

反応液

定量 PCR は Triplicate で実施する。Triplicate で実施する場合、3.3well 分の pre-mix を作成する。

	<u>x1</u>	<u>x3.3</u>
2x SYBR	10 μ L	33.0 μ L
MillQ	8 μ L	26.4 μ L
Primer* (F&R mix μ M each)	1 μ L	3.3 μ L
<u>dil-cDNA</u>	1 μ L	3.3 μ L
	20 μ L	66.0 μ L

RT Program

	50	2 min	
変性	95	10 min	
PCR	95	15 sec	40 サイクル
	60	1 min	
Dissociation curve	95	15 sec	
	60	30 sec	
	95	15 sec	

PCR 反応終了後、データを取り込み、解析を行う。

表 1 - 1 : 心筋マーカー34 遺伝子発現解析用のプライマーのリスト 1 .

グレーのカラムは、不検出もしくはプライマー2 量体や非特異バンドが見られたため、再検討を予定している。

Gene	上段: Sense primers, 下段: Antisense primers	Tm (°)	Size (bp)
SCN5A	TTACGCACCTTCCGAGTCCTCC	64	150
	GATGAGGGCAAAGACGCTGAGG	63.5	
SCN1B	GGCAGAGATGATTTACTGCTACAAGA	60.9	88
	GTGATGGCCAGGTATTCC	57.6	
CACNA1C	AAGGCTACCTGGATTGGATCAC	60	136
	GCCACGTTTTTCGGTGTTGAC	60	
CACNA1D	GGGCAATGGGACCTCATAAATAA	58.5	141
	TTACCTGGTTGCGAGTGCATTA	60	
CACNA2D1	AGTGGATGGCCTGTGAAAAC	58.4	178
	ACAAGTCCCAGTTCCAATGC	58.4	
CACNB1	CTGGCTAAGCGCTCAGTTCT	60.1	253
	GGGACTTGATGAGCCTTTGA	57.5	
CACNB2	CCACAACCACAGAGACGAGA	59.3	241
	AACACAAAAGGGCAAACTC	55.2	
CACNA1H	ACCGTGTTCCAGATCCTGAC	59	127
	TGAAGAGCACATAGTTGCCG	58	
HCN1	GGACGTCGTACTIONGCCAGTGTT	62.6	64
	TGTCCACGGAAAGTGAGTAAAGAC	60.7	
HCN2	GAGCGTGGACAACTTCAACGA	59.4	61
	AAGGCGAGCCGCATCAT	57	
HCN4	ACGCCAAGGCACCTGAAAC	61	115
	TGGATGGGAAGGAGGATGAA	57.7	
KCNA4	TGGCGGCTACAGTTCAGTC	59.7	571
	ATCATTCAACAACCCACCAT	55	
KCNA5	ACTTGCGGAGGTCCCTTTAT	58.7	201
	GGAGGGAGGAAAGGAGTGAA	58.3	
KCNA1B	AGGCTGCAGCTCGAGTATGT	61.3	197
	ACCGGTGGGATCATATTGAA	56.3	

表 1 - 2 : 心筋マーカー34 遺伝子発現解析用のプライマーのリスト 2 .

グレーのカラムは再検討予定。

Gene	上段: Sense primers, 下段: Antisense primers	Tm (°)	Size (bp)
KCNA2	TGGGCAATAAACCCCTACAGC	57.9	195
	CAGCGACTTGGGAGATCATT	57.7	
KCND3	GGCAGTTCGAATGCATACCT	58.3	211
	TGATGGTGGAGGTTTCGTACA	58.4	
KCNE1	AGATGCAAGCTTGGGTTTCGTG	61.5	184/32
	CTCGATAAAGGACCTGCAGC	58.4	
KCNE2	ACTTTGTGGCTGGTTTGTCC	58.9	247
	ATGGTCACCACACCATCCTT	58.9	
KCNE3	CGCCTGAACCGAGTAGAAGA	59.2	71
	TGAAGCATGTCGGTGATGAG	58	
KCNE4	GGCTCTCTCGGCATCTCAGA	61.1	79/107
	TCAGATAATGCCTTCCTCCAATG	58.3	
KCNE5	CAGAACAGCCTGGCTTTGGA	60.5	99
	TCCAGCGTCTGTGTGAAATTG	59.1	
KCNH2	TCAACTGCGAGATACCAACATG	58.7	128
	CTGGCTGCTCCGTGTCCTT	62.3	
KCNJ5	AGCGCTACATGGAGAAGAGC	59.9	118
	AAGTTGAAGCGCCACTTGAG	59	
KCNJ3	CTCTCGGACCTCTTCACCAC	59.5	80
	GCCACGGTGTAGGTGAGAAT	59.8	
KCNJ2	TGTCACGGATGAATGCCCAA	60	184
	CAAACACAGCTTGCCGTCTC	60	
SLC8A1	TGTGCATCTCAGCAATGTCA	57.8	191
	TGATGCCAATGCTCTCACTC	58	
ATP1A1	GGCTGTCATCTTCCTCATTGG	58.7	62
	CGGTGGCCAGCAAACC	58.5	
ATP2A2	ACCCACATTCGAGTTGGAAG	57.8	138
	CAGTGGGTTGTCATGAGTGG	58.5	

表 1 - 3 : 心筋マーカー34 遺伝子発現解析用のプライマーのリスト 3 .

グレーのカラムは再検討予定。

Gene	上段: Sense primers, 下段: Antisense primers	T _m (°)	Size (bp)
RYR2	ACAGCATGGCCCTTTACAAC	58.7	265
	TTGGCTTTCTCTTTGGCTGT	57.9	
PLN	ACAGCTGCCAAGGCTACCTA	60.9	191
	GCTTTTGACGTGCTTGTTGA	57.8	
MYH6	CGCATGAAGAAGAACATGGA	56.1	248
	CGCAGCAGGTTCTTTTTGTCT	59.7	
MYH7	GGCAAGACAGTGACCGTGAAG	58.2	133
	CGTAGCGATCCTTGAGGTTGTA	57.9	
MYL2	GGTGCTGAAGGCTGATTACGTT	59.2	382
	TATTGGAACATGGCCTCTGGAT	61.2	
MYL7	AAGGTGAGTGTCCCAGAGG	58.2	377
	ACAGAGTTTATTGAGGTGCC	57.9	
GJA1	TACCATGCGACCAGTGGTGCCT	68.8	293
	GAATTCTGGTTATCATCGGGGAA	58.3	
GJC1	CTCCCCCTGGCTATAACATT	56.3	232
	TGAGGGTTGTTTTGGTGACT	57.2	
ADRA1 A	ATCATCTCCATCGACCGCTACA	61.1	343
	TCACTTGCTCCGAGTCCGACTT	63.6	
ADRB1	CAGGTGAACTCGAAGCCCAC	61	101
	CTCCCATCCCTTCCCAAAC	59	
ADRB2	GCAAAGGGACGAGGTGTGG	61	114
	AGACGCTCGAACTTGGCAAT	60	
CHRM 2	CTCCAGCCATTCTCTTCTGG	57.7	211
	GCAACAGGCTCCTTCTTGTC	59	
GAPD H	GAGCCACATCGCTCAGACAC	61	150
	CATGTAGTTGAGGTCAATGAAGG	57.2	

GAPDH	template, mouse E6												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
A	17.38944	16.65757	17.96838	17.64475	17.41124	17.26345	17.65019	17.80836	16.83348	17.60857	17.54392	17.75317	17.88619
B	17.63425	17.91765	17.31954	17.69317	17.21334	17.24133	17.1966	16.70913	17.40989	16.90626	17.27176	17.12235	16.73552
C	17.56341	16.37825	16.99868	17.37204	16.74458	17.12092	16.99397	16.78695	17.223	17.34065	17.51979	17.06911	17.40822
D	16.73855	17.45645	15.48583	17.00678	16.93808	17.1871	17.46832	16.90244	17.14027	17.44596	17.34148	16.69724	16.95991
E	17.6596	17.42343	17.2631	16.78724	17.25938	17.21538	17.44288	17.0032	17.57017	17.32865	17.13888	17.47067	17.27183
F	17.29454	16.53581	17.39819	17.85456	15.70063	16.92605	17.35236	16.82679	17.40796	17.51705	15.53922	14.05367	16.35884
G	17.29826	16.77511	17.56629	13.62892	17.15272	17.92383	17.38328	16.86689	17.37669	16.84294	17.44155	17.23053	16.8908
H	17.52545	15.25462	16.83601	16.93286	17.27617	15.82357	16.9703	17.26514	16.86637	17.3578	17.48214	16.79935	16.91862
I	16.81874	17.15011	20.35057	14.11728	16.8778	17.32934	17.29207	17.03087	16.97376	16.44789	16.85548	16.78726	17.50595
J	16.69328	17.49182	17.41748	17.29985	17.29954	16.51901	17.37655	14.74048	17.07992	16.69572	16.96448	17.6671	17.20347
K	17.1525	15.69819	16.61518	17.30116	17.03097	17.23217	15.98879	17.1871	16.73511	16.77104	13.68412	17.44225	16.73348
L	16.82236	17.30028	17.21765	16.74621	17.17039	17.38627	17.01887	17.33009	13.99329	16.86064	17.71146	16.77177	17.46131
M	17.20908	17.37028	17.66676	16.86461	17.62129	21.04802	16.93485	17.27505	17.29435	16.95136	14.95753	16.67181	16.38012
N	16.47949	17.26284	17.37733	16.91753	17.32451	16.00745	15.20185	14.31733	15.10212	14.94328	15.17176	16.6142	21.13669
O	16.91581	17.49099	17.14999	17.00835	16.67972	17.35696	17.28242	17.19279	17.43218	16.24807	16.92032	17.45014	14.57167
P	17.7067	17.68158	16.31224	17.62479	17.64542	16.28071	15.07301	17.25649	16.99801	16.37208	15.68221	16.76011	16.41501
Average	17.18134	16.99031	17.30895	16.80001	17.08414	17.24135	16.91414	16.78119	16.83979	16.85237	16.57663	16.89754	17.11485

	CT値	
Average	GAPDH	
<20%	<13.6	
10-20%	13.6-15.3	
0-10%	15.3-17	
0-10%	17-18.7	
10-20%	18.7-20.4	
20%<	20.4<	

図 1：解析に用いるリアルタイム PCR 機の検証。

384 ウェルのうち解析に用いるウェル間における実験データのばらつきを検証した。C57/BL6J マウス心室筋組織から調整した total RNA を用いて、RT-PCR を行った。本実験におけるリアルタイム PCR のシステムは、ABI7900 機を用いた。ウェルごとの Ct 値の結果（208 ウェル）を記載しており、発現強度に応じてカラー表示（下段図）をした。

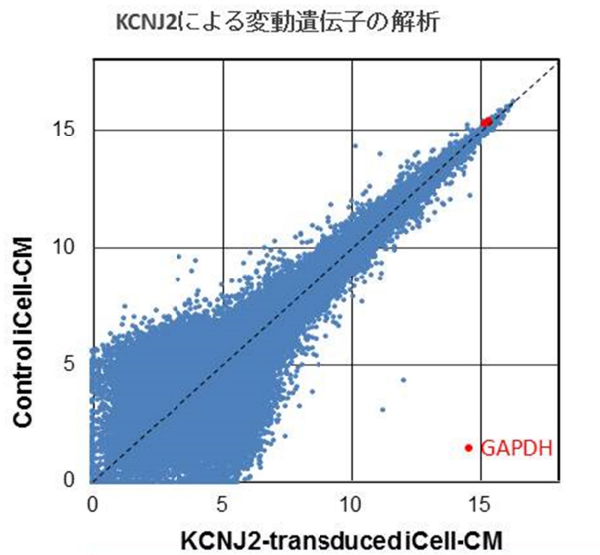


図 2 : 標準遺伝子 GAPDH の検証 1 (DNA microarray 解析)

市販ヒト iPS 細胞由来心筋細胞株 (iCell-CM, CDI 社) に、成熟化遺伝子 KCNJ2 を導入した際の変動遺伝子をプロットした (Y 軸: コントロールの発現レベル, X 軸: KCNJ2 導入後の発現レベル)。DNA マイクロアレイのプラットフォームは、Affymetrix 社の Affymetrix GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Array を使用した。GAPDH の位置を赤で示した。

ソフトゲル培養による変動遺伝子の解析

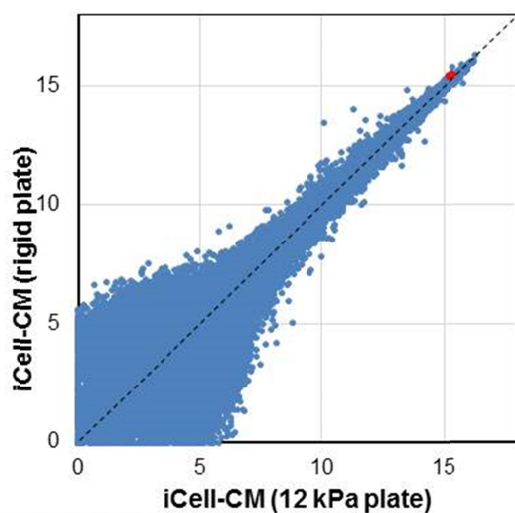
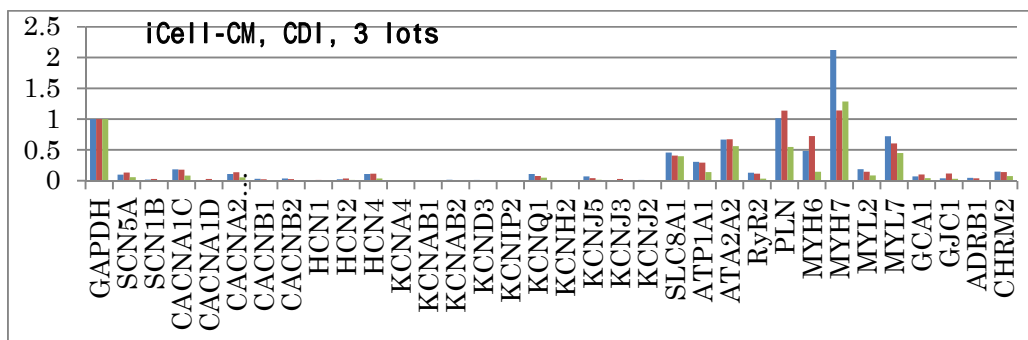


図 3 : 標準遺伝子 GAPDH の検証 2 (DNA microarray 解析)

市販ヒト iPS 細胞由来心筋細胞株 (iCell-CM, CDI 社) に、ソフトゲル基質上での培養した際の変動遺伝子をプロットした (Y 軸: 通常のプラスチックディッシュ上で培養したときの発現レベル, X 軸: ソフトゲル基質上での培養したときの発現レベル)。DNA マイクロアレイのプラットフォームは、東レ社の 3D-Gene 全遺伝子型 DNA チップを使用して、mRNA 発現を解析した。GAPDH の位置を赤で示した。

iCell-CM (CDI) ロット 1、 ロット 2、 ロット 3



Cor.4U (Axiogenesis) 細胞株 1、 細胞株 2

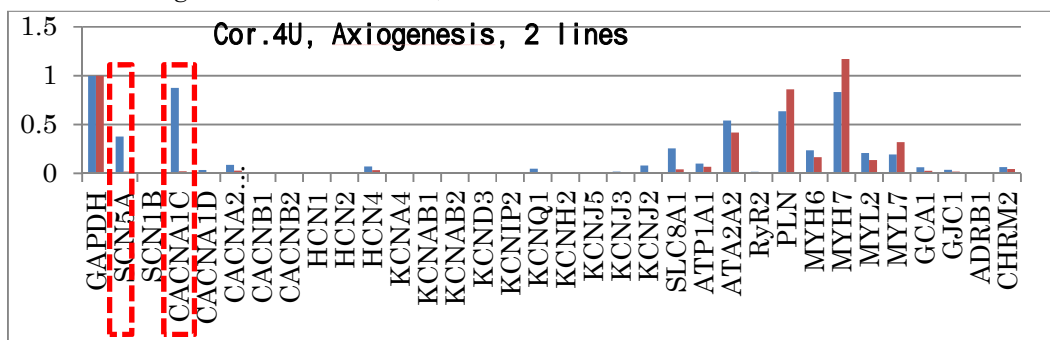


図 4：心筋マーカー遺伝子発現の比較定量解析の予備試験。

すべて同じ実験プロトコルで実験を行った。iCell-CM についてはロット間差、Cor.4U については株間差を示している。