

間葉系幹細胞の遊走制御とメカニズム解明

平成 23 年度 修士論文

三重大学大学院工学研究科
博士前期課程分子素材工学専攻

大友 佳子

目次

1.緒言	1
1-1.組織再生と幹細胞	1
1-2.腹膜の傷害と修復	1
1-2-1.腹膜と腹膜中皮細胞	1
1-2-2.腹膜透析と腹膜傷害	3
1-2-2-1.腹膜透析	3
1-2-2-2.腹膜透析による傷害	3
1-2-3.腹膜の傷害修復	4
1-2-4.腹膜の傷害修復と細胞遊走	4
1-2-5.間葉系幹細胞	5
1-3.塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)	5
1-3-1.塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)	5
1-3-2. bFGF と腹膜傷害	6
1-3-3 bFGF と間葉系幹細胞遊走	7
2.目的	8
3.方法	9
3-1.間葉系幹細胞の培養	9
3-2.間葉系幹細胞の運動能試験	9
3-3.間葉系幹細胞の傷害修復試験	13
3-4.傷害修復における遊走修復・増殖修復割合の算出	13
3-5.PI3Kシグナル阻害試験	14
3-6. Cofilin・Thymosin β 4・MMP2 の mRNA 発現量測定	15
4.結果	16
4-1.間葉系幹細胞の運動能試験	16
4-1-1.移動の軌跡	18
4-1-2.移動速度	19
4-2.間葉系幹細胞の傷害修復試験	20
4-3.bFGF による傷害修復における遊走修復の割合	22
4-4.PI3K シグナル阻害試験	23
4-5. Cofilin・Thymosin β 4・MMP2 の mRNA 発現	24

5.考察	25
5-1.bFGF による運動能上昇	25
5-2. bFGF による傷害修復における遊走と増殖	27
5-3. bFGF による遊走能上昇メカニズム	30
6.総括・展望	36
7.参考文献	37
8.謝辞	39
9.Appendix	40
9-1.各種溶液の調製	40
9-2.細胞培養	43
9-3.細胞の凍結・解凍法	45
9-4.動画撮影	47
9-5.RT-PCR	50

1.緒言

1-1.組織再生と幹細胞

再生医療とは外傷によって失われた組織や病気によって機能不全を起こした臓器に対して体細胞を用いて修復、再生する医療のことである。組織が損傷を受けた時、現在は臓器移植や人工臓器などを用いた治療が行われているが、臓器提供者の不足や、人工臓器による生体機能の再現に限界があるといった問題を抱えている。そこで、幹細胞を用いた組織再生が注目を集めている。幹細胞とは自己複製能と多分化能を併せ持つ細胞であり、再生医療への利用が期待されている。

幹細胞を用いた損傷組織再生には大きく分けて以下の2つのアプローチが考えられている。^[1]

①体外で幹細胞を増殖分化して損傷部位へ移植:物理学的因子、化学的因子、生物学的因子を利用して体外で幹細胞を増殖させ、必要に応じて分化させてから移植する。

②損傷部近傍の細胞を活性化して損傷部へ誘導:損傷部分の周囲にある細胞を増殖因子などで刺激して損傷部への遊走や増殖を促すことにより、組織を再生する。(Fig1-1)

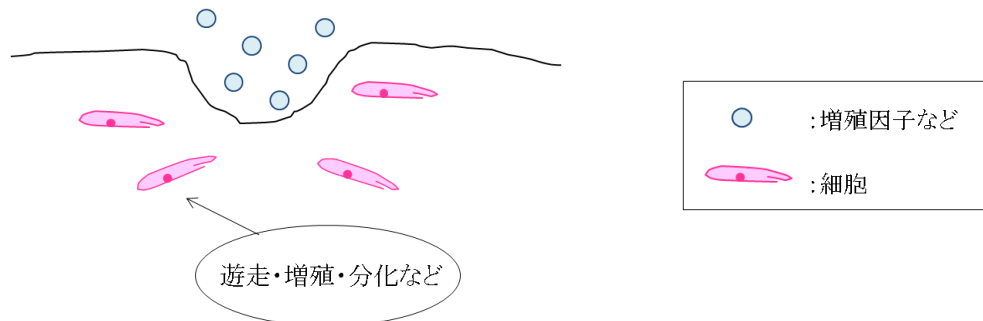


Fig.1-1 損傷組織の修復

1-2.腹膜の傷害と修復

1-2-1.腹膜と腹膜中皮細胞

腹膜とは胃や肝臓といった腹部の臓器の全体ないし一部及び腹壁を覆っている薄い漿膜組織である。この腹膜はたくさんの微絨毛を持つ一層の中皮細胞と、膠原繊維、弾性繊維、ヒアルロン酸などの細胞外マトリクスなどが存在する基底膜下の間質から構成された生体複合膜である。間質組織中に線維芽細胞、脂肪細胞、肥満細胞、マクロファージなどの細胞や毛細血管が散在する構造をとる (Fig.1-2A)。

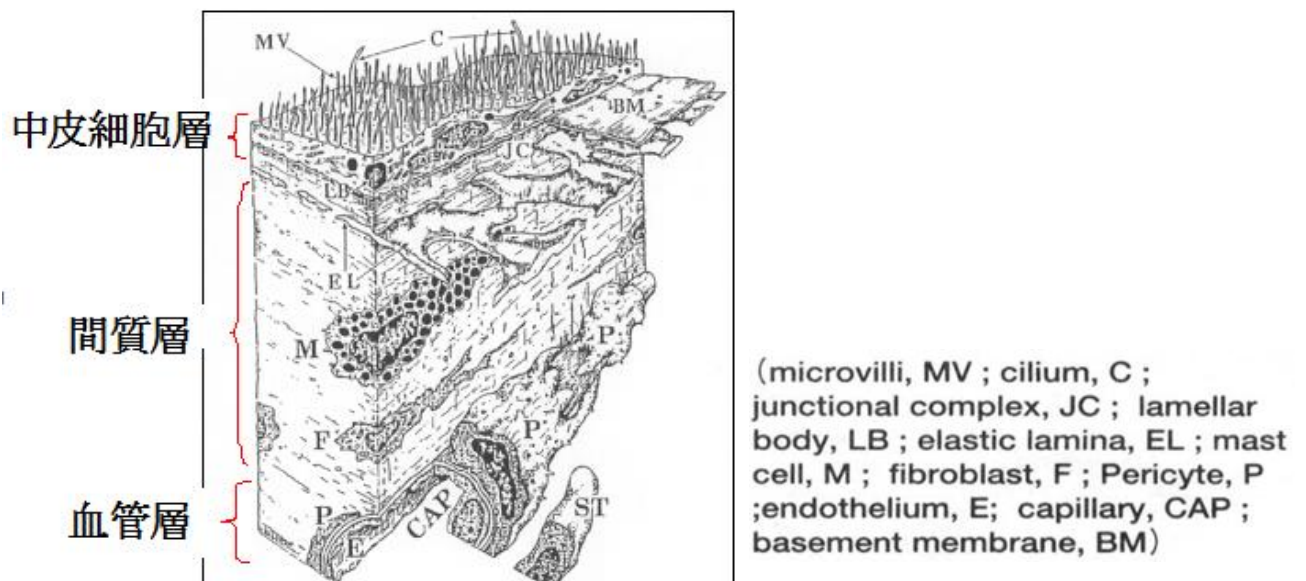


Fig.1-2A 正常な腹膜の形態学的模式図

腹膜の厚さは 50~150 μm で、壁側腹膜と臓側腹膜に囲まれた空間を腹腔と称す。

腹膜の機能

- ①腹部臓器が自由に動けるように滑面を提供する
- ②臓器・器官の癒着防止

腹膜中皮細胞は長さ 2~3 μm 、直径 0.08 μm の微絨毛の厚い外套に覆われていて、微絨毛は細胞表面一面に一様に広がっている(Fig.1-2B)。微絨毛はリン脂質を分泌し、臓器間の癒着を防ぐ働きをしている。中皮細胞同士は斜めに重なり合い、固く組み合うように接着している。

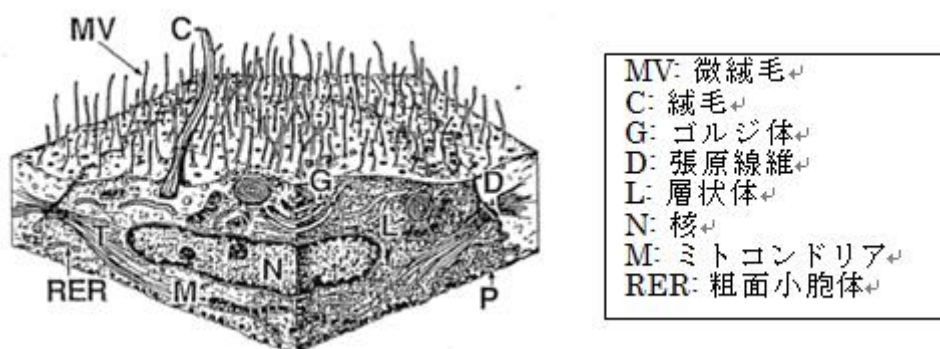


Fig.1-2B 正常中皮細胞の形態学的模式図

1-2-2.腹膜透析と腹膜傷害

1-2-2-1.腹膜透析

腹膜透析とは、腎臓のろ過機能が低下した患者の治療方法の一つであり、自宅で簡易に行うことができる透析療法であるため、血液透析よりも就労・通学といった社会生活がしやすいという利点がある。

腹膜透析では腹腔内に透析液を注入し、腹膜を半透膜として浸透圧差によって不要な老廃物や水分を体外へ除去している。(Fig1-2C) 一日に約 4 回(1 回あたり 30 分程度)の透析液交換を行う必要がある。

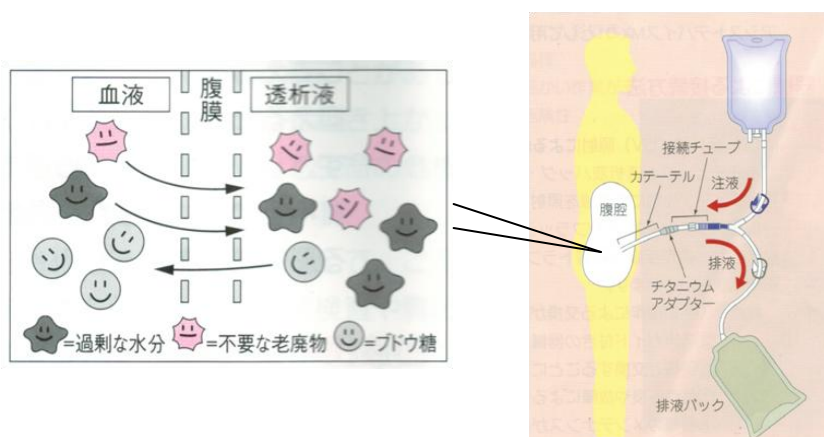


Fig.1-2C 腹膜透析^[2]

1-2-2-2.腹膜透析による傷害

日常生活のしやすさにおいては利点が多い腹膜透析であるが、長期間続けると腹膜に傷害が起こることがある。1-2-2-1 で述べたように腹膜透析は腹腔内に透析液を直接注入する透析方法であるため、腹膜表面は長時間透析液にさらされることになる。この結果、透析液による刺激で腹膜の表面から細胞が剥離してしまうことがある。

ある報告によれば透析排液中には多数の細胞が含まれており、そのうち腹膜中皮細胞の割合は約 3%にのぼる。^[3]透析排液中の全細胞数は透析期間が 34 か月以上の患者の平均で 7.1×10^6 cells 程であるため^[3]、約 15 万 cells の腹膜中皮細胞が剥離していることになる。正常な腹膜中皮細胞 1 個当たりの面積は $335.6 \pm 31.0 \mu\text{m}^2$ ほどであるので^[4]、これは面積に換算すると約 50mm^2 にもなる。透析液を 1 日 4 回交換するとして、1 日 200mm^2 (14mm 四方)以上もの腹膜中皮細胞の剥離が起こっている。この他にも上皮-間質系形質変換を起こして腹膜間質層に移動した細胞もあることを考慮するとさらに多数の腹膜中皮細胞が腹膜表面からなくなっていることになる。腹膜の総面積は $1.5 \sim 2.0\text{m}^2$ であるので重大な傷害となり得る。

1-2-3.腹膜の傷害修復

細胞が剥離し傷害を受けた場合、以下の2段階を踏まえて修復される。^[5]

①傷害部分への細胞遊走:細胞が剥離した部分へ向かって、周囲の正常な腹膜中皮細胞や腹膜間質層に存在する間葉系細胞が遊走する。

②細胞外マトリックス産生:傷害部分を埋めている細胞が細胞外マトリックスを産生することによって隙間が埋められ、修復が完了する。(Fig1-2D)



Fig.1-2D 腹膜の傷害修復

1-2-4.腹膜の傷害修復と細胞遊走

1-2-3 で述べたように細胞遊走は腹膜修復の重要なステップであるが、傷害部分へ遊走する細胞として2つの可能性がある。

①周囲の正常な腹膜中皮細胞:傷害部分の周囲に存在する細胞が傷害部分へ移動する。

②腹膜間質層に存在する間葉系細胞:コラーゲンを主成分とする間質層の中を移動して腹膜表面まで移動する。

以前、腹膜中皮細胞の傷害修復実験で移動速度が極めて速い細胞が観察された。^[6] ほとんどの細胞が $0.5\mu\text{m}/\text{min}$ 前後の速さで移動していたのに対し、倍以上の速さで動く細胞が観察された。(Fig1-2E)

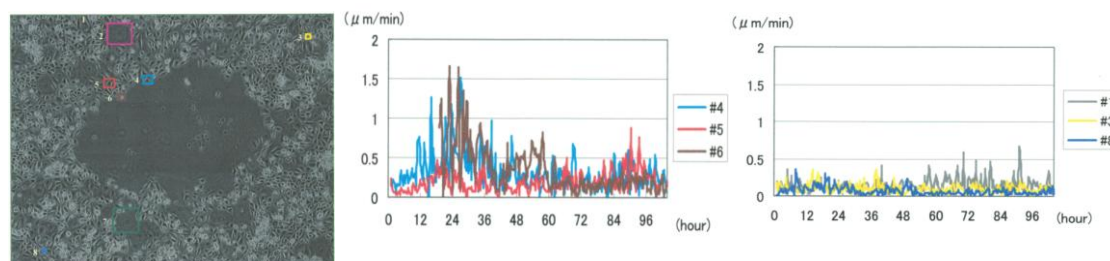


Fig.1-2E 腹膜中皮細胞の傷害実験結果

1-2-5.間葉系幹細胞

間葉系幹細胞とは成体組織中に存在する体性幹細胞の一種で、骨髄間質、真皮、骨格筋、脂肪組織など様々な結合組織に存在しており、主に骨細胞、脂肪細胞、軟骨細胞、骨格筋細胞、靱帯細胞、腱細胞、ストローマ細胞など、間葉系に属する細胞への分化能を有している。^[7]

組織幹細胞は基本的には同一胚葉系列の組織へ分化していくものであるが、由来する胚葉とは異なる胚葉系列組織以外の細胞にも分化するという報告が多数報告されている。^[1] 神経幹細胞を血中に移植すると血球系の細胞に分化する、骨髄の細胞を移植すると血球系以外の細胞にも分化するといった例が存在する。

間葉系幹細胞においても、上皮系の細胞に分化するという報告が多数されている。レチノイン酸添加^[8] や上皮細胞培養後の馴化培地による培養^[9] によって上皮様形態を獲得し Cytokeratin-18 を発現するといった報告がある。

これらの報告から、上皮系の細胞である腹膜の中皮細胞へ分化する可能性が存在すると考えられる。

1-3.塩基性線維芽細胞(bFGF)

1-3-1.塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)

bFGF(basic Fibroblast Growth Factor)は FGF-2 と呼ばれ、ヒトにおいてはそれぞれ、18、22、22.5、24、34 kDa の 5 種類の isoform が確認されている。bFGF は細胞膜上のレセプターを介し、MAPK カスケードを経て細胞の増殖、分化、細胞遊走の制御を行う(Fig.1-3A)^[10]。間葉系幹細胞の増殖課題に対して bFGF を使用した方法が用いられる場合がある^[11]。bFGF を添加下で間葉系幹細胞を培養することで増殖能の向上(老化の遅延化)と、長期培養後においても骨、軟骨、脂肪への分化能が確認されている(分化能の維持)。

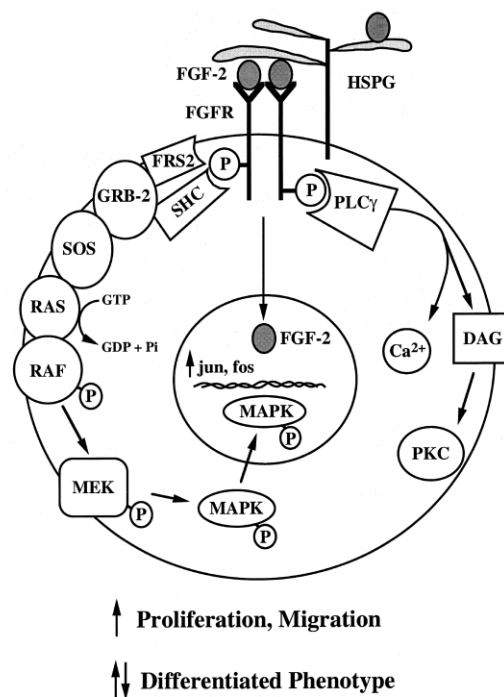


Fig.1-3A bFGF のシグナル^{[10],[11]}

1-3-2.bFGF と腹膜傷害

腹膜中皮細胞が傷害を受けた時、組織修復に役立つ様々なサイトカインを放出することが報告されており、その一つに bFGF が挙げられる。^[12] (Fig1-3B)

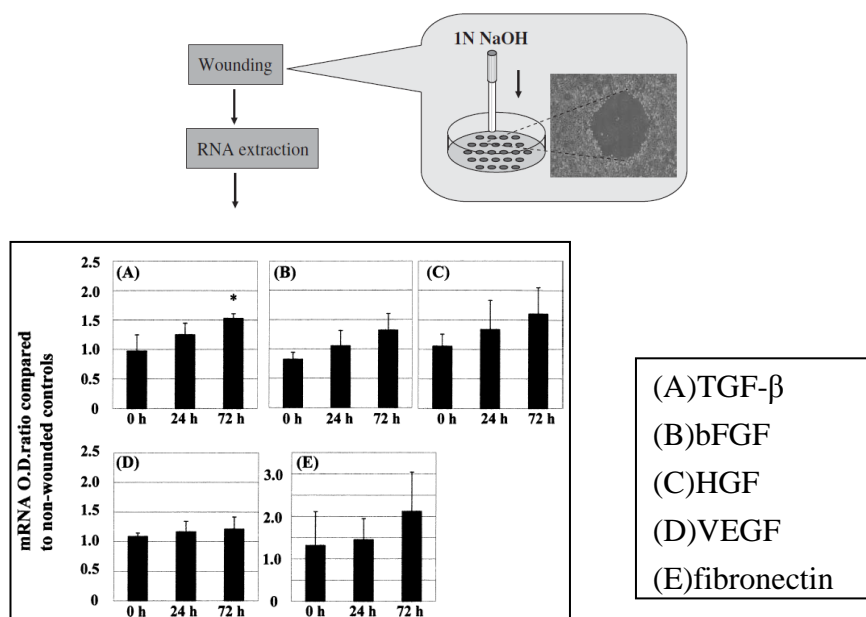


Fig.1-3B 腹膜中皮細胞の増殖因子発現^[12]

さらに、腹膜透析液の成分となっているグルコースを高濃度で添加して培養した腹膜中皮細胞は bFGF の mRNA、タンパク発現量が上昇することも報告されている。^[13] (Fig1-3C)

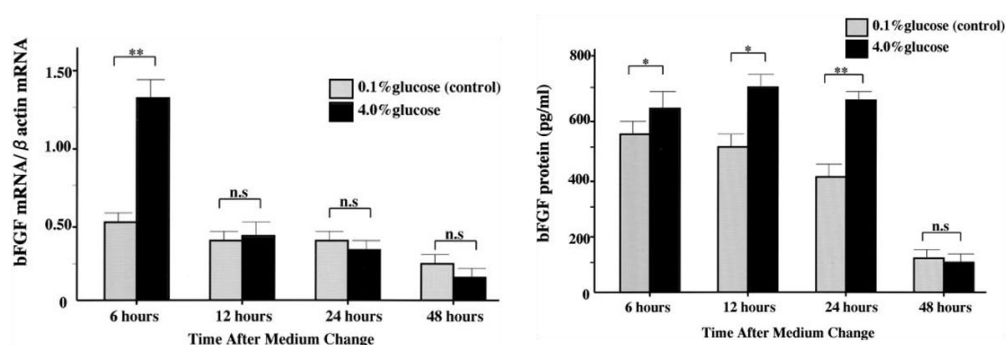


Fig.1-3C グルコースによる傷害^[13]

これらの報告から、腹膜透析液による腹膜中皮細胞の傷害部分の修復に対して、bFGF が関与していると考えられる。

1-3-3.bFGF と間葉系幹細胞遊走

1-3-1.で挙げた間葉系幹細胞の分化能・増殖能に対する影響以外に、間葉系幹細胞の遊走能に対する bFGF の影響も報告されている。^[14] bFGF 濃度の高い方へ間葉系幹細胞が遊走することや、bFGF 添加培地で間葉系幹細胞を培養することで遊走細胞数が増加することが示されている。(Fig.1-3D)

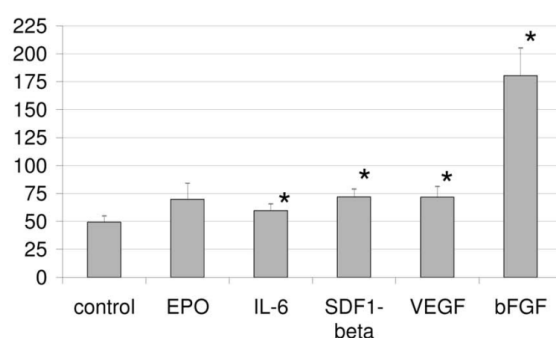


Fig.1-3D bFGF による間葉系幹細胞の遊走^[14]

これらの報告から、間葉系幹細胞の遊走方向・遊走速度などは bFGF によって制御できると考えられる。

2.目的

腹膜は腹膜透析液によって傷害を受けて腹膜中皮細胞が剥離することがある。本研究では傷害を受けた腹膜組織の再生を目指しており、特に組織再生過程における遊走に注目している。今回は特に再生医療用の材料として利用が期待されている間葉系幹細胞(MSC)の遊走に注目し、研究を行うこととした。

グルコースを含む腹膜透析液によって傷害を受けた腹膜中皮細胞からは塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)が発現することが知られており、bFGF は血管内皮細胞やその他様々な細胞の遊走を引き起こすことが知られており、間葉系幹細胞の遊走に対しても影響を与えることが報告されている。よって、bFGF により間葉系幹細胞の遊走制御が行えるのではないかと考え、bFGF による間葉系幹細胞の制御とそのメカニズム解明を目的として実験を行った。

3.方法

3-1. 間葉系幹細胞の培養

本研究に使用した間葉系幹細胞は理化学研究所バイオリソースセンター細胞材料開発室より購入した研究用ヒト間葉系幹細胞(30歳/男性/passage number:2-3/HMS0051)を使用した。

間葉系幹細胞は $5000\text{cells}/\text{cm}^2$ の密度で播種し、DMEM、10%FBS、3ng/ml bFGF(科研製薬, 日本)の培地を用いて培養し、sub-confluent に達したとき継代培養を行った。継代時には10%Trypsin/PBSを使用して間葉系幹細胞を剥離した。本実験においては継代数P=4-7のものを使用した。間葉系幹細胞の同定としてCD29、CD44、CD45、CD34、CD14(BECKMAN COULTER、America)の表面抗原をFlow cytometry にて解析を行った細胞を使用した⁽³⁷⁾。尚、実験に使用した試薬は特記するもの以外はSigma-Ardrich Japan 社製(日本)を使用した。詳細な細胞培養、継代プロトコルは Appendix に記した。

3-2. 間葉系幹細胞の運動能試験

bFGF が間葉系幹細胞の運動能に与える影響を確認するために、動画撮影を行って移動速度・軌跡の解析を行った。

播種密度 $1000\text{cells}/\text{cm}^2$ で接着細胞培養用 $\phi 35$ シャーレに細胞を播種し、各培地中での細胞の挙動を解析するために動画を撮影した。動画撮影方法は Appendix に記した。撮影は1枚/10min 間隔で行い、1h 毎の細胞の座標を画像解析した。解析した座標から移動の軌跡をグラフ化し、座標から計算によって移動速度を求めた。解析は写真中の全ての細胞において行った。

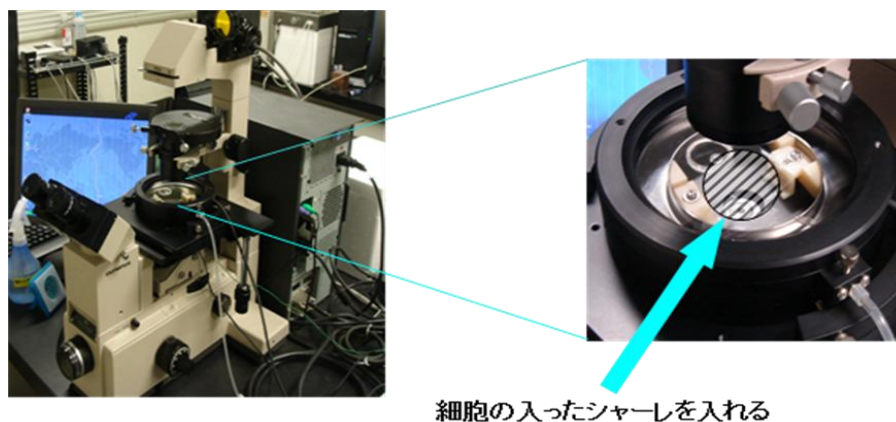
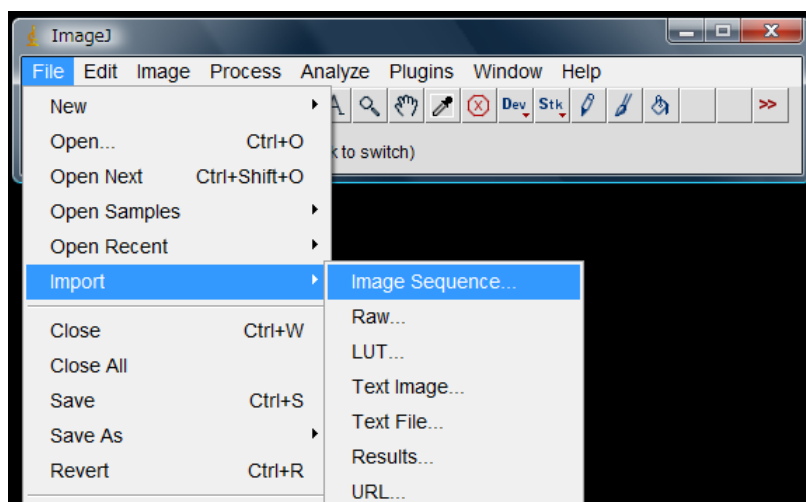


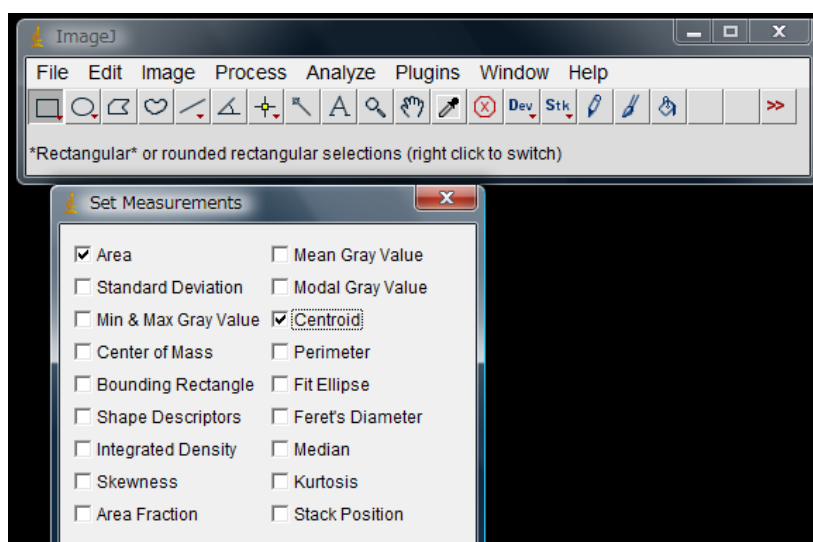
Fig.3-1 動画撮影の機械

画像解析には、画像解析ソフト ImageJ(ver 1.40g) を使用した。
使用方法は、

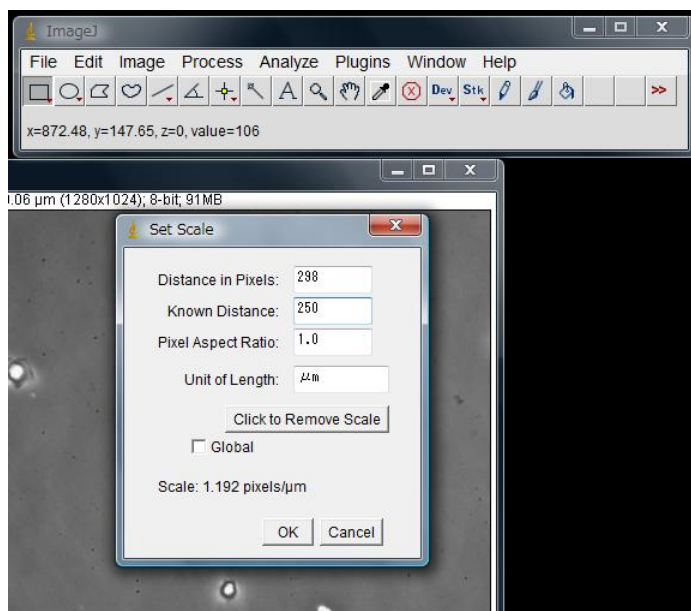
①まず ImageJ を起動させ、「File」から「Import」→「Image Sequence」開き、
解析を始めたい画像をクリックし、「OK」を押すと、画像が読み込まれる。



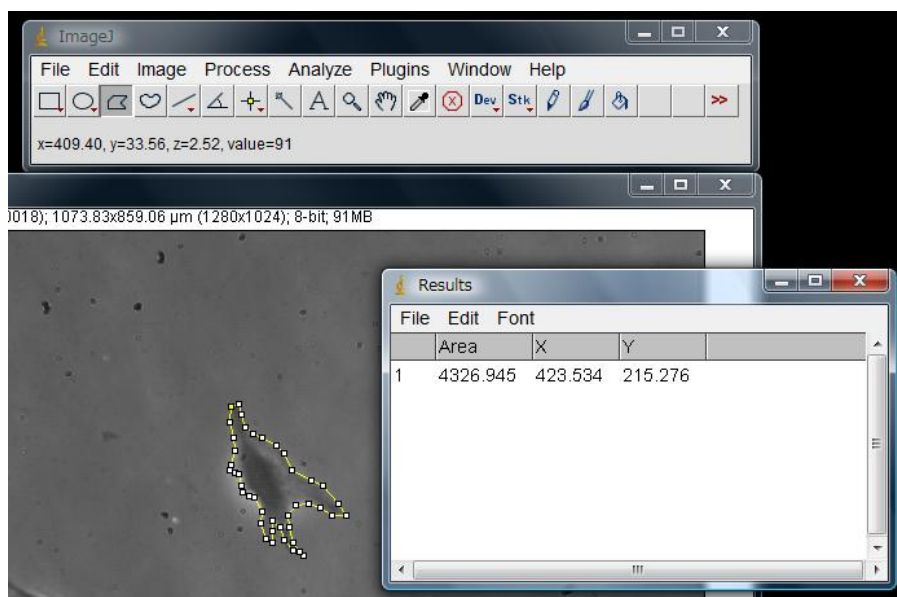
②「Analyze」から「Set Measurement」を開き、《Area》と《Centroid》にチェックを入れると、重心を表すことができる。



③再び、次に、「Analyze」から「Set Scale」を開き、《Distance in pixels》を『298』、《Known Distance》を『250』、《Unit of Length》を『 μm 』と数値等を入力する(撮影した画像の倍率により数値は異なる)。



④次に、「Polygon selections(左から 3 つ目)」を押して、解析したい細胞の輪郭を囲い、キーボードの「Ctrl」+「M」を押す。新しくウィンドウが開き、その X、Y 座標がその細胞の重心を示す。



⑤0h 目の(X,Y)座標を(0,0)として、各時間での細胞の重心座標を求める。

h 時間目の座標(X_h , Y_h):($x_h - x_0$, $y_h - y_0$)

$$\left(\begin{array}{l} x_h: h \text{ 時間の } X \text{ 座標解析値} \\ x_0: 0 \text{ 時間の } X \text{ 座標解析値} \\ y_h: h \text{ 時間の } Y \text{ 座標解析値} \\ y_0: 0 \text{ 時間の } Y \text{ 座標解析値} \end{array} \right)$$

⑥Excell で 0h から順に重心座標を追った散布図を作成する。横軸は X 座標、縦軸は Y 座標とし、細胞の遊走起動が示される。

⑦また、各時間での移動速度を重心座標から求める。

t 時間目の移動速度($\mu\text{m/h}$) : $\sqrt{[(x_t - x_{t-1})^2 + (y_t - y_{t-1})^2]} / \Delta t - \Delta t_{-1}$

$$\left(\begin{array}{ll} x_t: t \text{ 時間の } X \text{ 座標} & x_{t-1}: t-1 \text{ 時間の } X \text{ 座標} \\ y_t: t \text{ 時間の } Y \text{ 座標} & y_{t-1}: t-1 \text{ 時間の } Y \text{ 座標} \\ \Delta t: t \text{ 時間} & \Delta t_{-1}: t-1 \text{ 時間} \end{array} \right)$$

⑧写真中の全ての細胞において軌跡の解析を行い、全ての細胞の軌跡を重ね合わせたグラフの細胞の移動速度平均のグラフを作成した。

3-3.間葉系幹細胞の傷害修復試験

接着細胞培養用 φ35 シャーレに 5000cells/cm² の細胞を播種して DMEM+10%FBS+3ng/ml bFGF 培地で confluent まで培養し、DMEM+0.1%FBS 培地で growth arrest して 2 日間インキュベートした。その後、20μl ピペットマンチップの先で細胞をスクラッチして PBS で洗浄して試験用の培地に切り替えを行った。0,12,24,30,36h で、位相差顕微鏡とデジタルカメラによる写真撮影を行い Image J によって傷害面積を解析した。0h での傷害面積を S₀、h 時間での傷害面積を S_h とし、S_h/S₀×100(%)で傷害の割合を求めてグラフ化した。

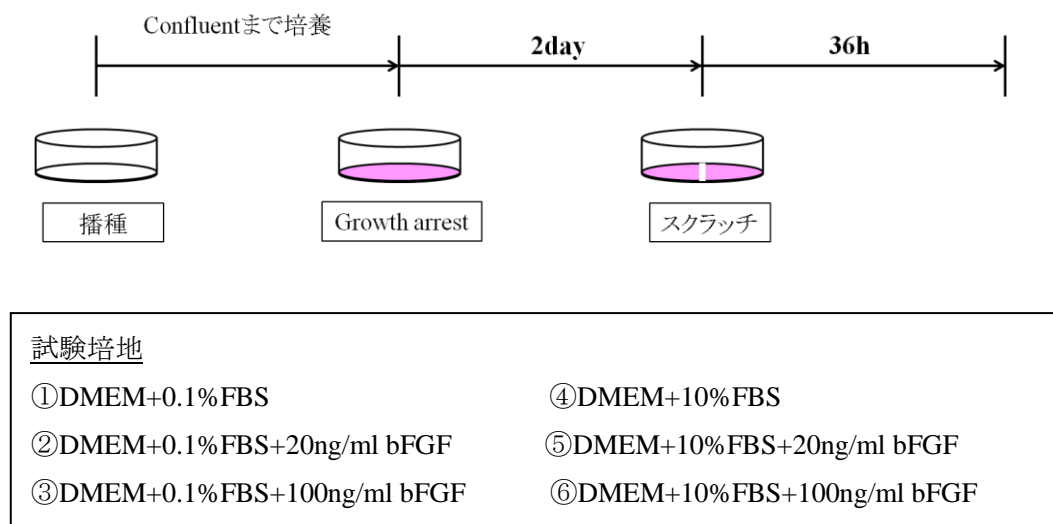


Fig.3-2 傷害修復試験の概要

3-4. 傷害修復における遊走修復・増殖修復割合の算出

障害修復時には細胞の遊走運動だけではなく細胞増殖が起こっている可能性が考えられる。傷害修復時の遊走挙動のみを知るために「遊走による修復」と「増殖による修復」に分けることを試みた。

総修復面積中の細胞数は、4 か所を四角形で囲んでその中の細胞数を数え、平均をとって 7cells/0.03cm²として計算した。増殖による修復細胞は増殖定数より算出した。

$$\text{増殖細胞数: } n = n_0 e^{kt}$$

n: 増殖細胞数
n₀: 初期細胞数
k: 増殖定数
t: 時間(日)

増殖による修復の割合は以下の式で算出し、残りを遊走による修復とした。

$$\text{増殖による修復} : (\text{増殖細胞数} / \text{修復面積中の総細胞数}) \times 100$$

3-5.PI3K シグナル阻害試験

bFGF による間葉系幹細胞遊走シグナル伝達経路を特定するために、候補として考えられる PI3K の阻害実験を行った。阻害剤は LY294002(Cayman Chemicals)を使用した。

3-3 の傷害修復試験と同様に、接着細胞培養用 $\phi 35$ シャーレに $5000\text{cells}/\text{cm}^2$ の細胞を播種して DMEM+10%FBS+3ng/ml bFGF 培地で confluent まで培養し、DMEM+0.1%FBS 培地で growth arrest して 2 日間インキュベートした。その後、20 μl ピペットマンチップの先端で細胞をスクラッチして PBS で洗浄して試験用の培地に切り替えを行った。0,12,24,30,36h で、位相差顕微鏡とデジタルカメラによる写真撮影を行い Image J によって傷害面積を解析した。

試験培地

- | | |
|--------------------------------------|-------------------------------------|
| ①DMEM+0.1%FBS | ④DMEM+10%FBS |
| ②DMEM+0.1%FBS+100ng/ml bFGF | ⑤DMEM+10%FBS+100ng/ml bFGF |
| ③DMEM+0.1%FBS+100ng/ml bFGF+LY294002 | ⑥DMEM+10%FBS+100ng/ml bFGF+LY294002 |

3-6.Cofilin,Thymosinβ4,MMP2 の mRNA 発現量測定

細胞内の単量体アクチンの濃度制御を行う Cofilin、単量体アクチンの保持を担う Thymosinβ4、細胞が移動時に放出する MMP2 の mRNA 発現量を RT-PCR によって確認した。φ35 シャーレに播種密度 1000cells/cm² で下記の培地条件の 0,1,2,3 日目のサンプルから mRNA を抽出し解析を行った。φ35 シャーレ 4 枚分を 1sample とした。(RT-PCR については Appendix を参照)

試験培地

- ①DMEM+10%FBS
- ②DMEM+10%FBS+20ng/ml bFGF

PCR primer

遺伝子	primer配列	PCRプログラム			cycle数
GAPDH	5'-GAT GTC ATC ATA TTT GGC AGG TT-3'	94℃ 30s	94℃ 30s	94℃ 40s	29
	5'-CCT GCA CCA CCA ACT GCT TAG CCC-3'	60℃ 1min 72℃ 1min	60℃ 1min 72℃ 1min30s	60℃ 10min	
Thymosinβ4	5'-CAT GTC TGA CAA ACC C-3'	94℃ 30s	94℃ 30s	94℃ 40s	28
	5'-TTC ACC AAC ATG CAA GTT CT-3'	60℃ 1min 72℃ 1min	60℃ 1min 72℃ 1min	60℃ 10min	
cofilin	5'-TTC TGC GGC TCT CGC TG-3'	94℃ 30s	94℃ 30s	94℃ 40s	28
	5'-GCT TCT CTG CCA GGG TG-3'	60℃ 1min 72℃ 1min	60℃ 1min 72℃ 1min	60℃ 10min	
MMP-2	5'-ACA GCC TGG CAT GGG GCA GT -3'	94℃ 5min	94℃ 1min		30
	5'-TTC TCC TCC ATC CAG TGG AG-3'		60℃ 1min 72℃ 1min		

Fig.3-3 PCR プライマー、サイクル表

4.結果

4-1. 間葉系幹細胞の運動能試験

まず初めに、間葉系幹細胞の運動能に対する bFGF の影響を動画撮影によって確認した。撮影した動画中で、培養 24h,48h,72h 目の細胞の写真を抜き出し、下図に示した。(Fig4-1A,B)

それぞれの時間で同色の丸で囲んだ細胞が同一細胞である。0.1%FBS、10%FBS 条件ともに bFGF を添加すると細胞が広範囲を移動しており、運動が活発に起こっていた。

①0.1%FBS 条件下

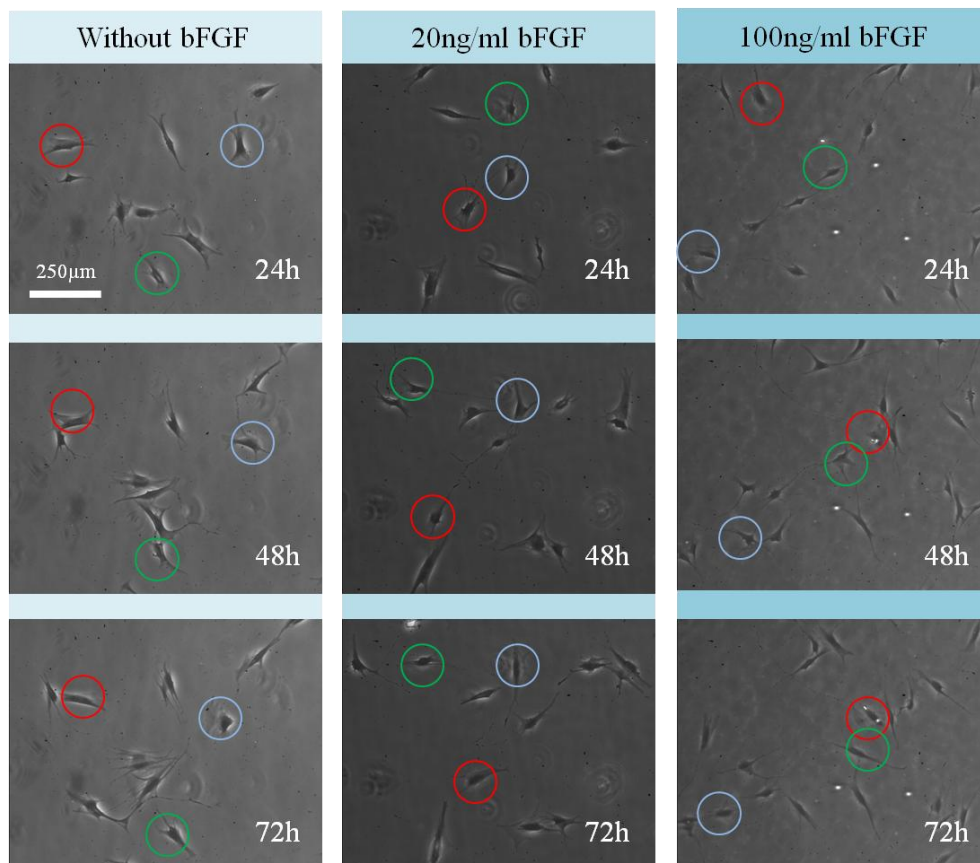


Fig.4-1A bFGF 添加による間葉系幹細胞の運動への影響(位相差顕微鏡写真)
0.1%FBS 条件

②10%FBS 条件下

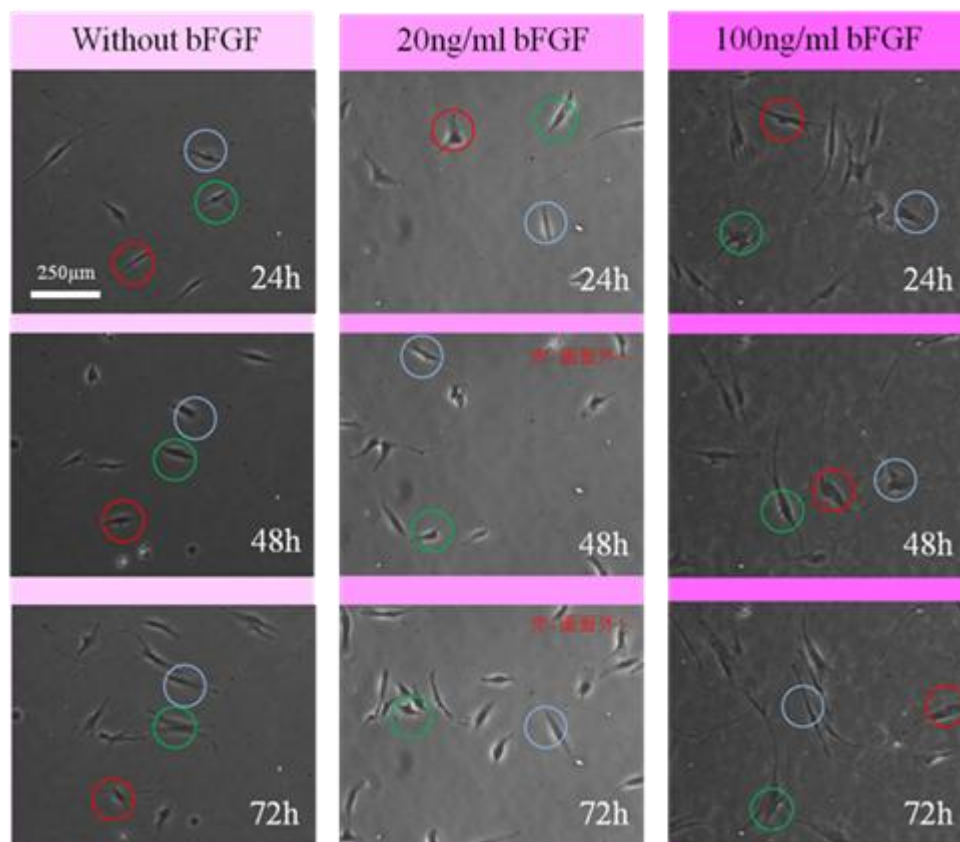


Fig.4-1B bFGF 添加による間葉系幹細胞の運動への影響(位相差顕微鏡写真)
10%FBS 条件

動画の結果より、bFGF によって細胞の移動範囲、移動速度に変化が出ていると考えられたため、細胞の移動の軌跡、移動速度の解析を行った。

4-1-1. 移動の軌跡

0.1%FBS 条件、10%FBS 条件ともに bFGF 濃度が高くなるにつれて細胞は広範囲を移動した。

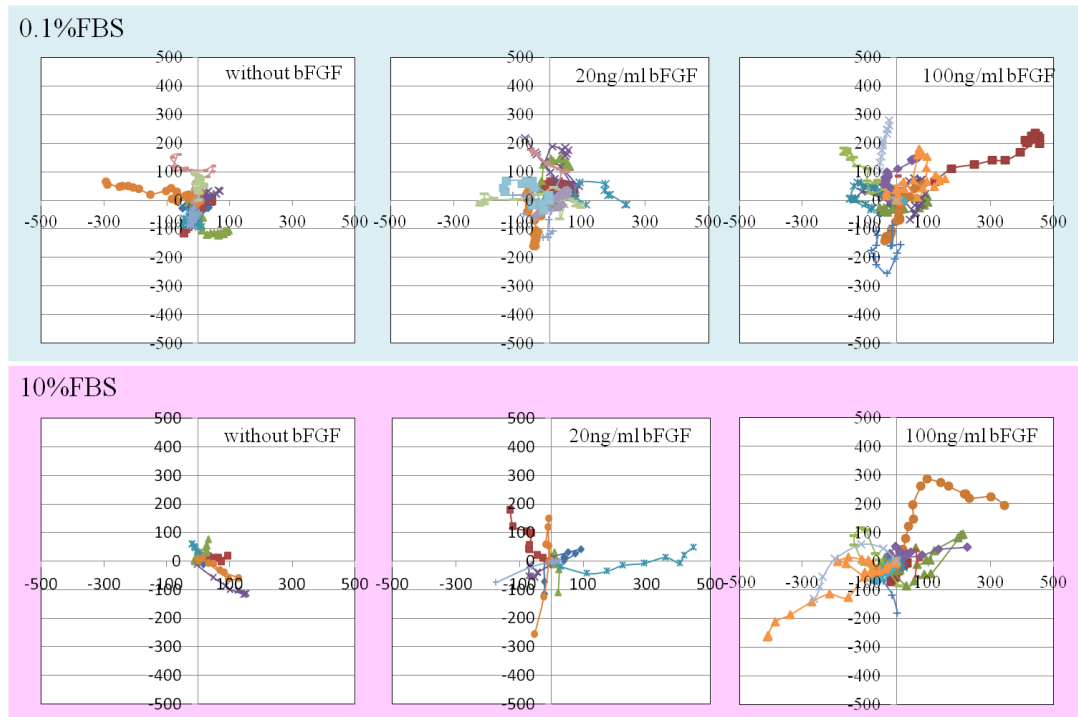


Fig.4-1C bFGF 添加による間葉系幹細胞の移動の軌跡への影響

4-1-2. 移動速度

また、移動速度の計算も行った。1h 毎の移動速度変化を表したグラフは以下のものである。

①0.1%FBS 条件下

bFGF 無添加時と比較して、20ng/ml bFGF、100ng/ml bFGF 添加時は移動速度が速めの傾向があった。

②10%FBS 条件下

20ng/ml bFGF 添加時に顕著に移動速度が速かった。しかし、100ng/ml bFGF 添加の場合は without bFGF の場合と同程度の移動速度になった。

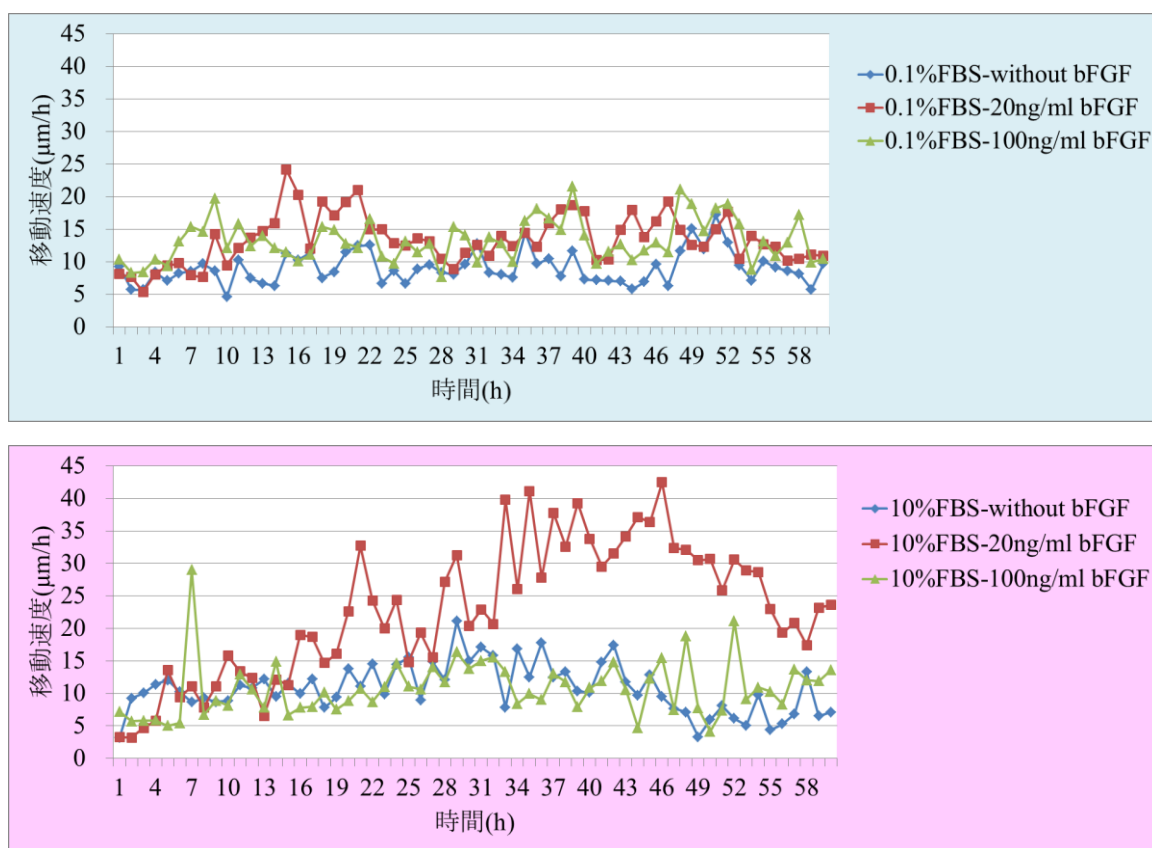


Fig.4-1D bFGF 添加による間葉系幹細胞の移動速度への影響
(上:0.1%FBS 条件、下:10%FBS 条件)

4-2. 間葉系幹細胞の傷害修復試験

次に間葉系幹細胞の傷害修復能に対する bFGF の影響を調べた。

下の写真は解析に使用した間葉系幹細胞の傷害写真である。(Fig4-2A) 写真中の白い領域が傷害面積である。

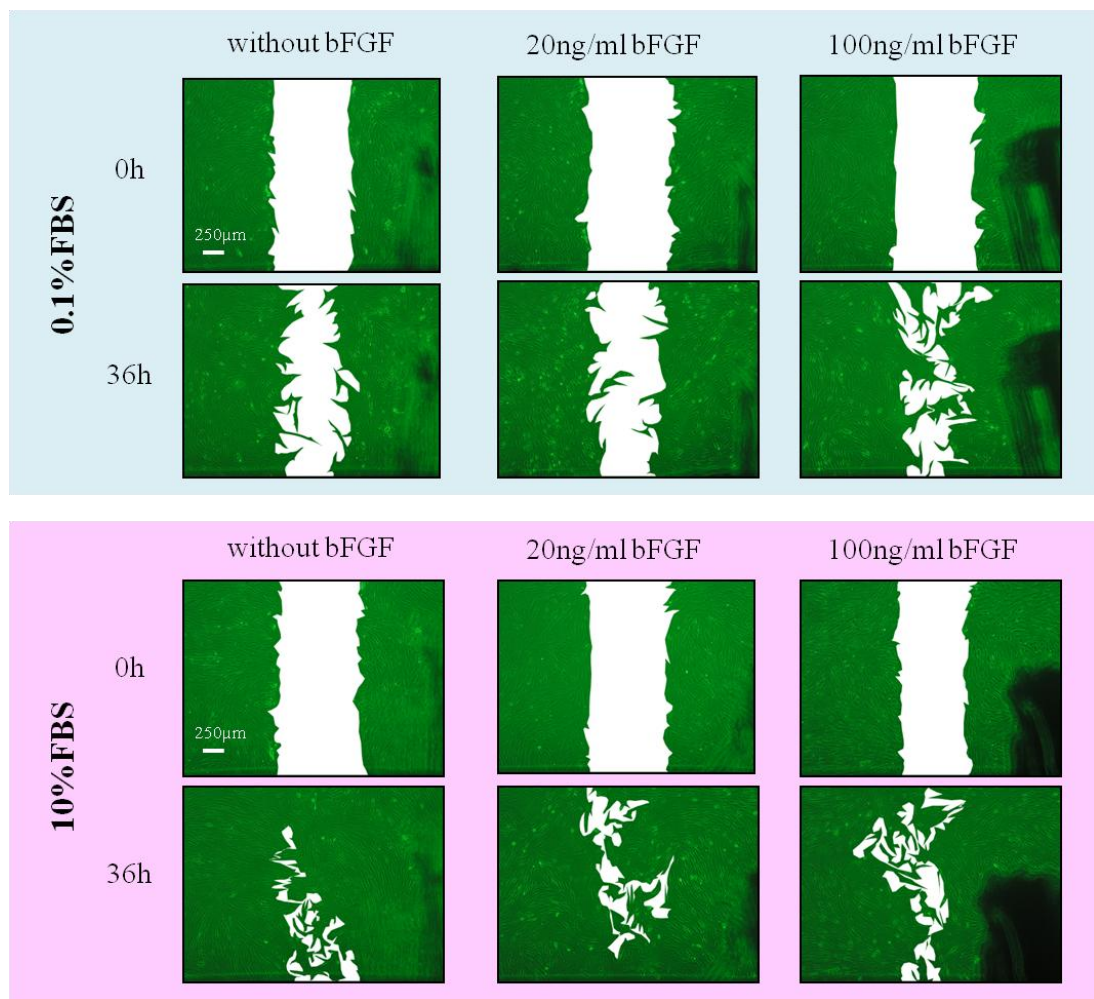


Fig.4-2A bFGF 添加による間葉系幹細胞の傷害修復への影響(位相差顕微鏡写真)

前ページの写真から算出した傷害割合のグラフが下のグラフである。

①0.1%FBS 条件下

20ng/ml bFGF 添加時における傷害修復能は bFGF 無添加時とほぼ同じになった。しかし、100ng/ml bFGF 添加時では傷害修復能が上昇した。(Fig4-2B)

②10%FBS 条件下

20ng/ml bFGF 添加時、100ng/ml bFGF 添加時ともに bFGF 無添加時と比べると傷害修復能が低下した。(Fig4-2B)

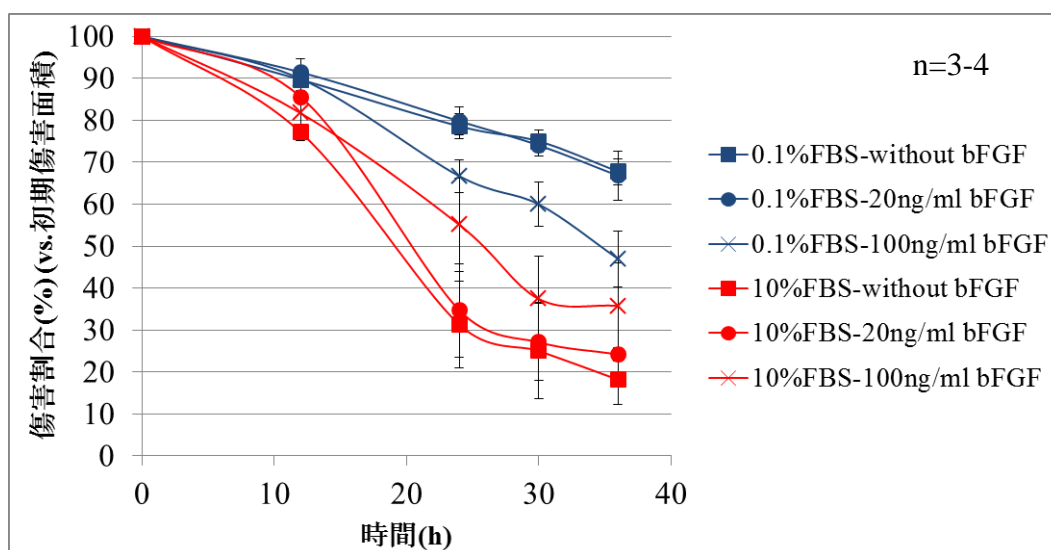


Fig.4-2B bFGF 添加による間葉系幹細胞の傷害修復への影響

4-3. bFGF による傷害修復における遊走修復の割合

傷害修復に関与した増殖細胞を増殖定数から算出し、修復細胞総数に対する割合を求めたグラフが下のグラフである。(Fig.4-4)

①0.1%FBS 条件下

bFGF 濃度が高くなるにつれて遊走による修復の割合が高くなった。

②10%FBS 条件下

0.1%FBS 条件下とは逆に、bFGF 濃度が高くなるにつれて遊走による増殖の割合が低くなった。

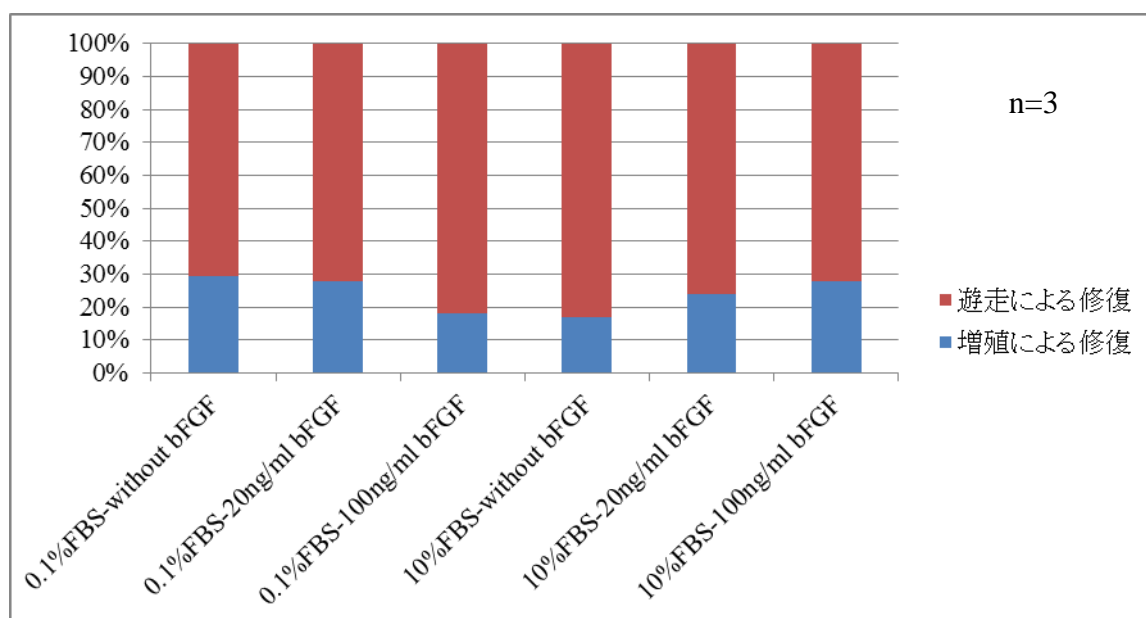


Fig.4-3 遊走による修復・増殖による修復の割合

4-4. PI3K シグナル阻害試験

次に PI3K シグナル経路の阻害実験を行い、bFGF による傷害修復に関連するシグナル経路かどうかを調べた。

①0.1%FBS 条件下

100ng/ml bFGF+阻害剤 LY294002 を添加した場合、100ng/ml bFGF 添加で阻害剤無添加の場合と比べて傷害修復が抑制された。抑制後の傷害割合は bFGF 無添加の場合と同程度になった。

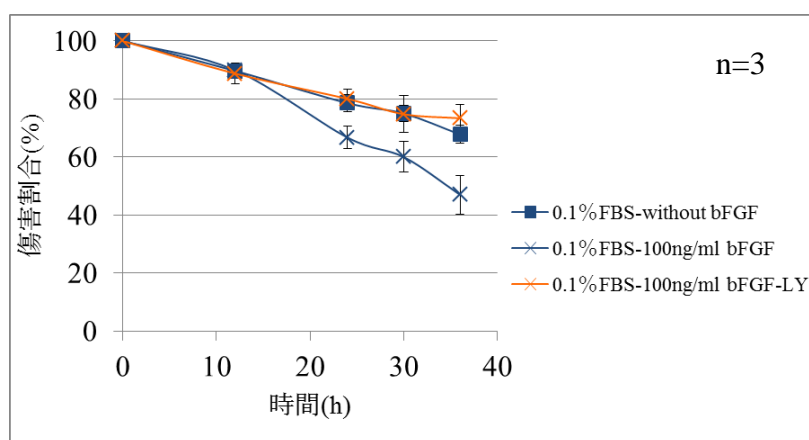


Fig.4-4A 傷害修復への PI3K 阻害剤の影響(0.1%FBS・100ng/mlbFGF)

②10%FBS 条件下

100ng/ml bFGF+阻害剤 LY294002 を添加した場合、100ng/ml bFGF 添加で阻害剤無添加の場合と比べて傷害修復が抑制された。bFGF 無添加の場合と比較しても傷害修復は抑制された。

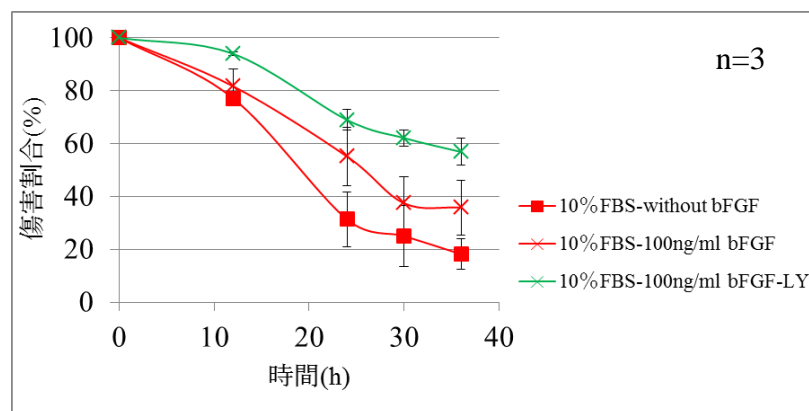


Fig.4-4B 傷害修復への PI3K 阻害剤の影響(10%FBS・100ng/mlbFGF)

4-5.Cofilin、Thymosin β 4、MMP2 の mRNA 発現

RT-PCR によって Cofilin、Thymosin β 4、MMP2 の mRNA 発現を調べた結果が以下のグラフである。

Cofilin

0day から 1、2day にかけて発現量が上がっていき、その後 3day にかけて発現量が下がっていく傾向が観察された。bFGF 添加による発現量の変化は観察されなかった。

Thymosin β 4

Cofilin とは逆に、0day 以降発現量が下がる傾向が観察された。bFGF 添加による発現量の変化は Cofilin 同様、観察されなかった。

MMP2

Thymosin β 4 と同様に、0day 以降発現量が下がる傾向が観察された。bFGF 添加による発現量の変化は他の 2 つの因子と同様、観察されなかった。

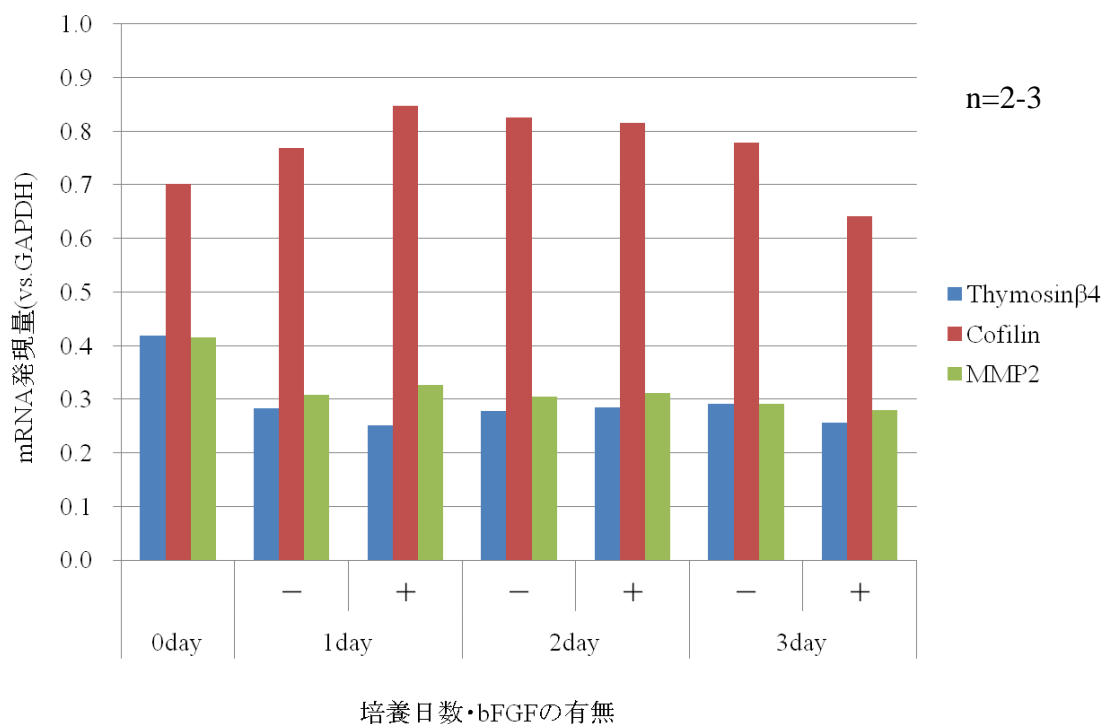


Fig.4-5 Cofilin、Thymosin β 4、MMP2 の mRNA 発現

5. 考察

5-1. bFGF による運動能上昇

今回の実験では bFGF 添加によって細胞の運動能が増したが、細胞内では細胞の運動を担うアクチンの状態が変化したと考えられる。

細胞の移動方向や細胞の形態維持と細胞内外の運動に関与する細胞内構造として細胞骨格系があり、細胞骨格系はアクチン系、微小管系、中間系フィラメントの 3 つに分けられる。微小管系は紡錘体形成や細胞内物質輸送、中間系フィラメントは機械的ストレスに対する細胞の安定化に関与しており、細胞の形態を支える骨格や細胞が運動する際に推進力を与える役割を担っているのは主にアクチン系である。^[15]

アクチンはすべての真核細胞に最も大量に存在するタンパク質であり、非筋細胞では 1~5%、筋肉細胞では 20%以上を占めており、^[16] 細胞内でアクチンは単量体の G-アクチンの状態か、重合してアクチンフィラメントになった F-アクチンの状態で存在している。図 5-1 に示すようにアクチンフィラメントの形態は、糸状仮足(フィロポディア)、葉状仮足(ラメリポディア)、ストレスファイバーの 3 種に大別される。フィロポディアは細胞膜周辺で形成される直線状のアクチン繊維、ラメリポディアは細胞膜周辺で形成されるメッシュ状のアクチンネットワークであり、ストレスファイバーは細胞中に見られるアクチンフィラメントの束である。

細胞の運動を起こす刺激がない場合、細胞内にはストレスファイバーがよく発達し大きく広がっている。細胞に運動を起こす刺激が入った時には、フィロポディアやラメリポディアが発達して細胞膜周辺部に突起を出しながら移動する。

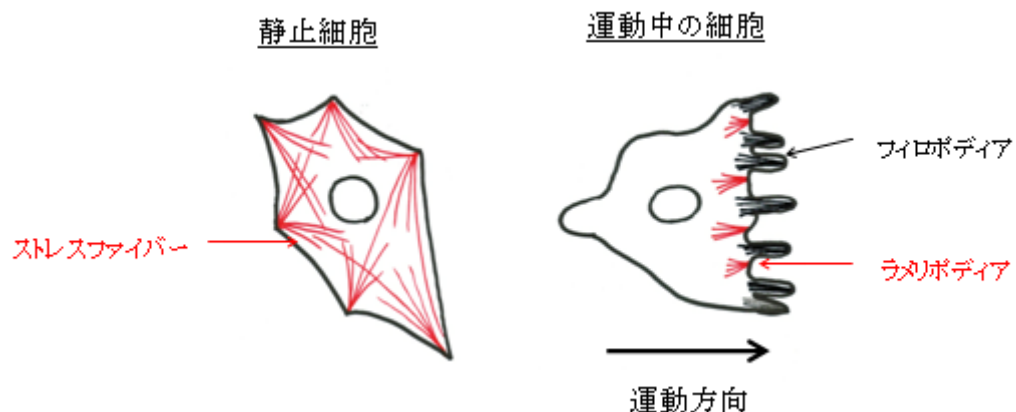


Fig.5-1 アクチンフィラメントの状態

アクチンフィラメント構築は Rho ファミリーの G タンパク質である Rho、Cdc42、Rac によって制御されており、Rho は ROCK を通してストレスファイバー、Cdc42 は N-WASP を通してフィロポディア、Rac は WAVE を通してラメリポディアの形成を制御している。^[17]

bFGF が細胞膜上の bFGF レセプターに結合することによってフィロポディア、ラメリポディアの発達を促進するシグナル、ストレスファイバーの発達を抑制するシグナルが伝達していたと考えられる。シグナルについての考察は、5-3 で述べる。

また、アクチンフィラメントの構築には Cofilin や Thymosin β 4 といったアクチン調節タンパクの働きも関与している。Cofilin は G アクチン、F アクチンどちらにもモル比 1:1 で結合して F アクチンの脱重合を促進し^[18]、Thymosin β 4 は G アクチンに結合してアクチンを単量体のまま保存(重合抑制)する働きを持っている。^[19] また、周囲の細胞外マトリックスを分解する働きを担う MMP も細胞の移動に重要な役割を担っている。特に腹膜の間質層から中皮細胞層への移動を考えるときには、基底膜の主成分である IV 型コラーゲンを溶かす MMP2、間質層の主成分である I 型コラーゲンを溶かす MMP9 が重要であると考えられる。(Fig5-2)

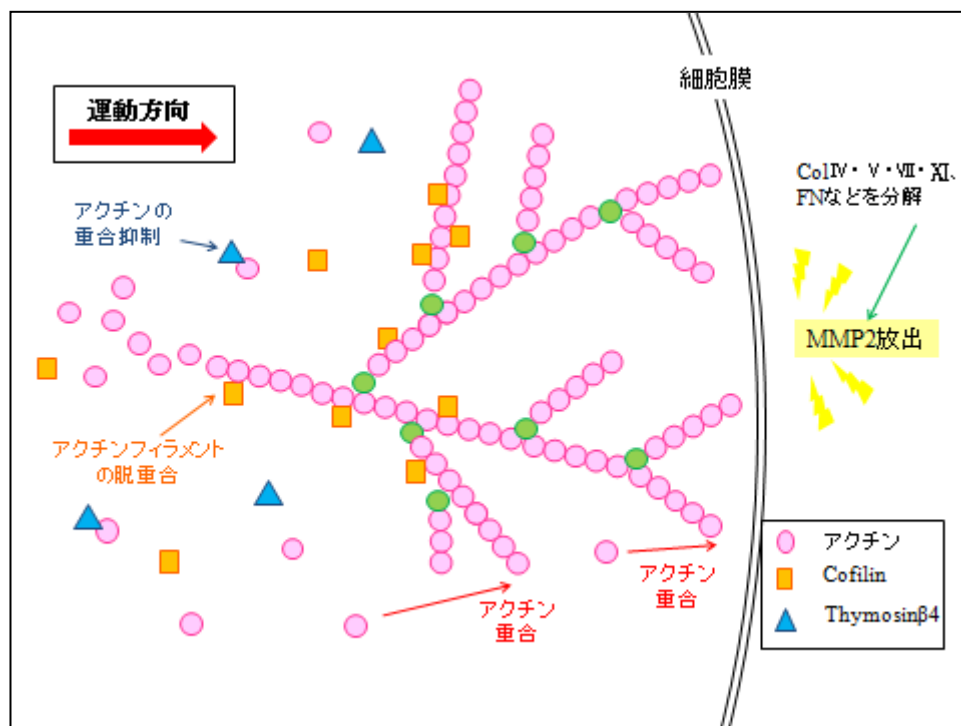


Fig.5-2 細胞運動と Cofilin・Thymosin β 4・MMP2

今回の実験では Cofilin、Thymosin β 4、MMP2 の mRNA 発現量は bFGF 添加に影響を受けないという結果であったが、これについては以下の3つの可能性が考えられる。

①bFGF は Cofilin、Thymosin β 4、MMP2 の発現には関係ない

今回の結果を素直に受け取るのであれば、これらの物質は bFGF 添加による影響を全く受けていないことになり、bFGF による運動能は別の因子によって制御されていると考えられる。

②mRNA レベルでの発現量変化はないが、タンパク質の活性化は起こっている

bFGF による刺激が各物質の総量を増やすものではなく、リン酸化を起こして働きを活性化させるだけのものである可能性が考えられる。この場合は、各物質は bFGF による細胞運動に関与しているが mRNA の発現には変化が出ないと考えられる。

③実験条件の設定によって出なかった

今回の実験では DMEM+10%FBS+20ng/ml bFGF という条件で mRNA の発現量を調べたが、この条件は FBS の添加量が多いためその影響が出てしまったと考えられる。よって、0.1%FBS 条件で実験を行えば mRNA レベルでの発現変化が見られた可能性もあると考えられる。

なお、今回の実験の 10%FBS 条件下で、100ng/ml bFGF 添加時に細胞の移動範囲が広範囲であったにも関わらず移動速度は bFGF 無添加の場合とほぼ同等であった。この理由としては、移動速度の解析方法が妥当でなかったことが考えられる。細胞の移動が正しく反映されていない可能性があるため、移動速度の解析時間間隔を狭めるなどの解析方法の検討が必要である。

5-2. bFGF による傷害修復における遊走と増殖

今回の実験では傷害修復における遊走修復と増殖修復の割合を算出するために、別の実験で算出した増殖定数を用いた。5000cells/cm² の播種密度で播種した間葉系幹細胞をそれぞれの培地で培養し、毎日、1 サンプルにつき写真4枚を撮影してカウントし、増殖定数を算出した。その増殖定数の値が、次の表である。(Fig5-3)

	0.1%FBS			10%FBS		
bFGF 濃度	0ng/ml	20ng/ml	100ng/ml	0ng/ml	20ng/ml	100ng/ml
増殖率	0.089	0.093	0.114	0.31	0.493	0.513

Fig.5-3 各培地条件での増殖定数

増殖定数を見ると、0.1%FBS 条件では bFGF 濃度によらず一定の値をとっている。つまり 0.1%FBS 条件下では、増殖は bFGF 濃度に依存していないことになる。このことから、0.1%FBS 条件下で bFGF 添加によって傷害修復が速くなったのは増殖ではなく遊走によるものであったと判断した。

10%FBS 条件においては、0.1%FBS 条件と比べて全体的に増殖率が大きかったが、それは血清中に含まれる増殖因子の影響も加味されていたからであると考えられる。bFGF 無添加の場合と bFGF 添加の場合(20ng/ml、100ng/ml)でも差があり、bFGF 添加群の方が増殖能が高かった。しかし、傷害修復は bFGF の濃度が高くなるにつれて遅くなった。このことから、傷害修復の際には遊走による修復が低くなっていたことが明らかとなった。

今回の運動能解析、修復試験から得られたデータは、次の図のようにまとめることができる。(Fig5-4)

	0.1%FBS	0.1%FBS 20ng/ml bFGF	0.1%FBS 100ng/ml bFGF	10%FBS	10%FBS 20ng/ml bFGF	10%FBS 100ng/ml bFGF
増殖	低	低	低	中	高	高
遊走	低	中	高	低	中	高

Fig.5-4 添加因子濃度と増殖・遊走の関係

この表から、次のように考えられる。

①接触障害によって遊走が抑制された

細胞の移動軌跡解析の結果では bFGF 添加時において移動範囲が広がったにも関わらず、傷害修復の結果では 10%FBS/bFGF 添加条件下で遊走修復が抑制されるという結果が得られた。これは、増殖細胞の増加に伴う接触障害が増した可能性が考えられる。傷害修復の実験では confluent まで培養した細胞をチップ先端でスクラッチして、傷の修復割合を測定している。このため、bFGF 添加時にはす

で細胞同士の隙間が少ない状態であると考えられる。細胞の増殖が活発に起きていたと考えられる条件下では、残っていたわずかな隙間が増殖によって埋められることによって遊走が阻害されてしまったと考えられる。

②:bFGF による増殖は FBS 中の他の因子との相互作用に関わっている

細胞の移動軌跡の結果から、細胞の移動に関しては FBS 濃度に関わらず bFGF 添加の影響が見られた。しかし増殖に関しては、0.1%FBS 条件では bFGF 添加による増殖への影響が見られず、10%FBS 条件では bFGF 添加によって増殖への影響が見られた。よって、bFGF による増殖には FBS 中の他の因子が関与していると考えられる。

bFGF が間葉系幹細胞の増殖を促進するという報告は以前にもある。^{[11],[20]} 1ng/ml bFGF を添加すると増殖能が上昇したという報告^[11] や 10ng/ml bFGF を添加して増殖能が上昇したという報告^[20] であるが、どちらも 10%FBS を加えて培養を行っていた。

③:傷害修復の速さには増殖と遊走の両方が関わっている

0.1%FBS 条件では bFGF 濃度が上がるにつれて傷害修復が速くなった。つまり、遊走能が上がるにつれて傷害修復が速くなったことになる。また、FBS 濃度を上げることによって傷害修復が速くなり、これは増殖細胞の増加によって傷害修復が速くなったと判断できる。よって、傷害修復の速さには増殖、遊走の両方が関与していると考えられる。

今回の実験からは 3 つのことが考えられたが 0.1%FBS 条件でも bFGF 濃度をさらに上げていけば増殖に影響が出る可能性も考えられる。今後、0.1%FBS 条件において bFGF の濃度範囲を広げて実験を行うことによって、傷害修復における増殖・遊走挙動への bFGF 単独の影響を知ることができると考えられる。

また、bFGF の濃度は間葉系幹細胞の分化能に影響を与えることも知られている^[21] ため、分化能も交えて bFGF の影響を調査していくことにより、傷害修復に対する bFGF の影響をより詳細に知ることができると考えられる。

5-3.bFGF による遊走能上昇メカニズム

今回の実験より、bFGF が細胞膜上のレセプターに結合した後、PI3K にシグナルが伝達していることが分かった。

まず bFGF の受容体について述べる。増殖因子のレセプターは、TGF- β 以外は受容体チロシンキナーゼである。^[22] タンパク質中でリン酸化されうるアミノ酸はセリン、スレオニン、チロシンの3つであるが、受容体チロシンキナーゼはチロシンをリン酸化する活性を持つ。ふつう一本の膜貫通部を持ち、増殖因子が結合していない状態では単量体であるが、増殖因子が結合すると二量体化する。^[23] 二量体化した受容体はお互いのチロシン側鎖をリン酸化しあう。(自己リン酸化) これによって受容体チロシンキナーゼは活性化され、他のタンパク質を活性化できるようになる。(Fig.5-5) リン酸化されたチロシンを認識する部位は Src ホモロジー2ドメイン(SH2ドメイン)と呼ばれるドメインであり、SH ドメインを持っていさえすればどんな分子でも結合できる。SH ドメインを持っている分子はアダプター分子とドッキングタンパク質に分けられる。(Fig5-6) アダプター分子は1つのリン酸化部位に対して1つのタンパク質しか仲介しないが、ドッキングタンパク質は1つのリン酸化部位に対して複数のタンパク質を仲介することができる。ドッキングタンパク質はチロシン残基をたくさん持つので、自身がリン酸化されると SH ドメインを持つ他のタンパク質を多数結合することができる。PI3K は SH ドメインを持っているアダプター分子であり、bFGF レセプターに直接もしくはドッキングタンパク質を介して結合できたと考えられる。よって、bFGF による刺激は PI3K を活性化したと考えられる。

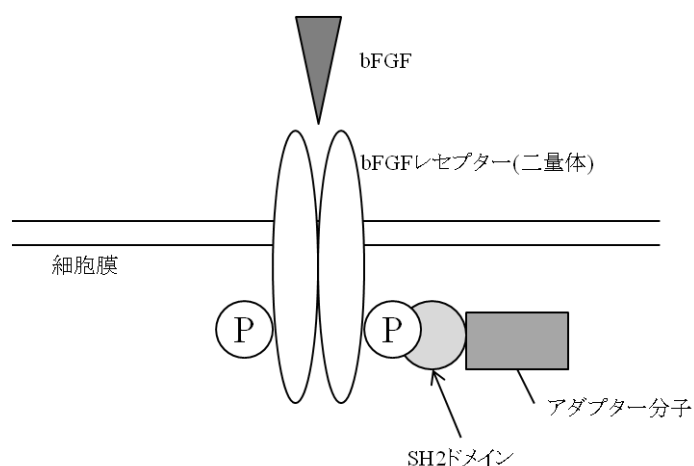


Fig.5-5 レセプターの二量体化とアダプター分子

分類	タンパク質名
アダプター分子	Grb2
	SHP-2
	PI3K
ドッキングタンパク質	IRS
	Dok
	P130 ^{cas}
	Shc
	SLP-76
	LAT

Fig.5-6 チロシンキナーゼ受容体に結合するアダプター分子・ドッキングタンパク質^[22]

今回の実験では PI3K の阻害剤である LY294002 を用いてシグナル経路の特定を行ったが、この阻害剤は SH2ドメインに存在する PI3K の活性化部位 p85 に結合することによって PI3K の活性化を抑制し、下流にシグナルが伝達しないようにしている。

PI3K は活性化されると、細胞膜に存在する PIP₂ をリン酸化して PIP₃ に変える。PIP₃ はプレクストリン相同ドメイン(PH ドメイン)を持つ分子と結合して相手を活性化する。^[24] PHドメインを持つものとしては Akt、PLCγ1、Sos、Ras-GAP、などがある。

しかし、PI3K はシグナルの上流で細胞が進む方向の制御を行うために細胞に極性を持たせる役割を果たしており、直接的に細胞の運動を起こす物質ではないと考えられている。一般的に PI3K が活性化すると、走化性因子の微妙な濃度勾配を感知して高濃度側へ移動するためのシグナルが増強される。^[25]

5-1 で述べたように、実質的に細胞の運動を担っているのはアクチンフィラメントである。アクチンフィラメント構築は Rho ファミリーの G タンパク質によって制御されていることは先にも述べたが、Rho ファミリーにシグナルが伝達するまでの上流経路には PI3K が関与している可能性が考えられる。

bFGFによる血管内皮細胞の遊走時にPI3Kが関与しているという報告は多数ある。^{[26],[27],[28]} PI3Kの阻害剤であるLY294002を添加した時、bFGF添加による遊走が抑制されていた。また、皮膚線維芽細胞の遊走においてはRhoキナーゼが関係しているという報告がされている。^[29] Rhoキナーゼの阻害剤であるを添加した時、bFGFによる遊走が抑制されていた。bFGFによる遊走シグナルでPI3KとRhoキナーゼは重要なものであり、一般的なシグナル経路を以下にまとめた。

①PI3K シグナル

増殖因子が細胞膜上のレセプターに結合することによりPI3Kが活性化され、活性化したPI3Kが細胞膜上に存在するPIP₂をリン酸化してPIP₃になる。PIP₃への親和性が高いPDK1は恒常的に細胞膜付近に存在して活性化状態にあり、PI3Kの活性化によって産生されたPIP₃に会合するために細胞膜付近に移行してきたAktを活性化する。^[30] 活性化されたAktが下流のシグナル分子をリン酸化して細胞遊走が起こる。

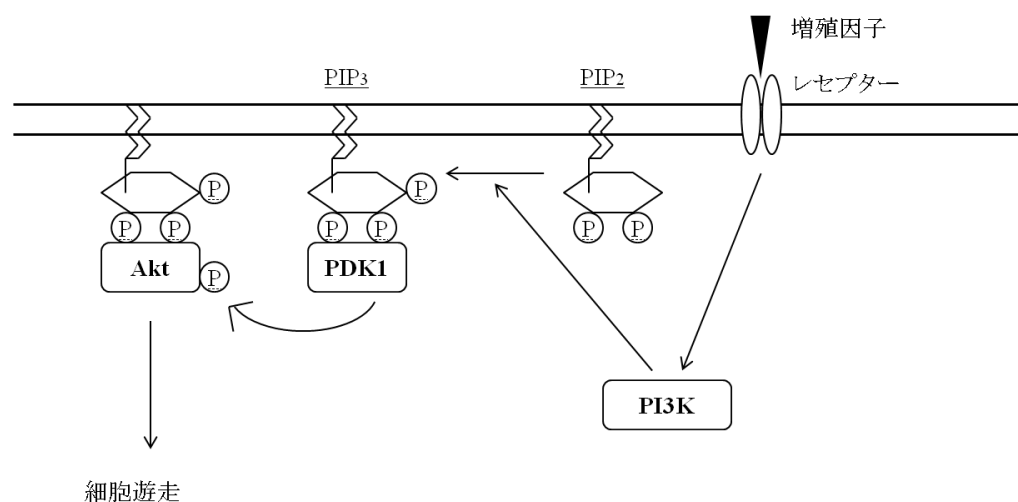


Fig.5-7 PI3K シグナル

②Rho キナーゼ

Rho キナーゼは活性型の Rho に特異的に結合するセリン/スレオニンキナーゼで、Rho キナーゼ/ROCK2/ROK α および ROCK1/ROK β の 2 種類の isoform が存在しており、脳を除く多くの組織にはROCK1/ROK β が強く発現している。^[31] Rhoシグナルの活性化は、三量体 G タンパク質共役受容体からのシグナルによっておこることが一般的に知られている。

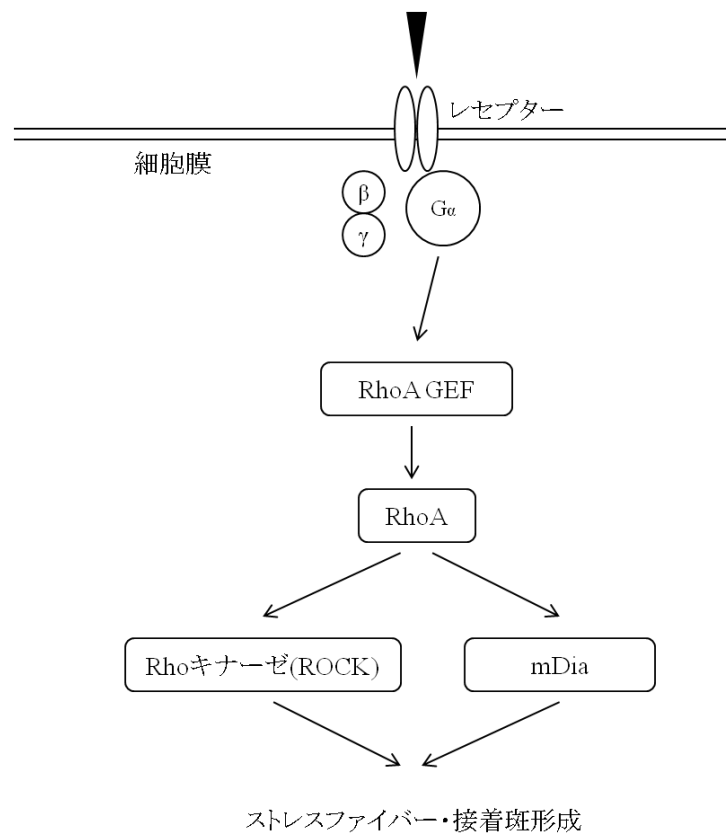


Fig.5-8 Rho キナーゼシグナル

角膜内皮細胞の傷害修復実験においては bFGF による傷害修復は PI3K を介した Cdc42 の活性化と Rho の不活性化を必要としていることが報告された。^[32] よって、アクチン重合の上流に PI3K が関与していると考えられる。この時、Akt の活性化も報告されているが、Cdc42 の活性化に Akt が必要であるかはわからない。

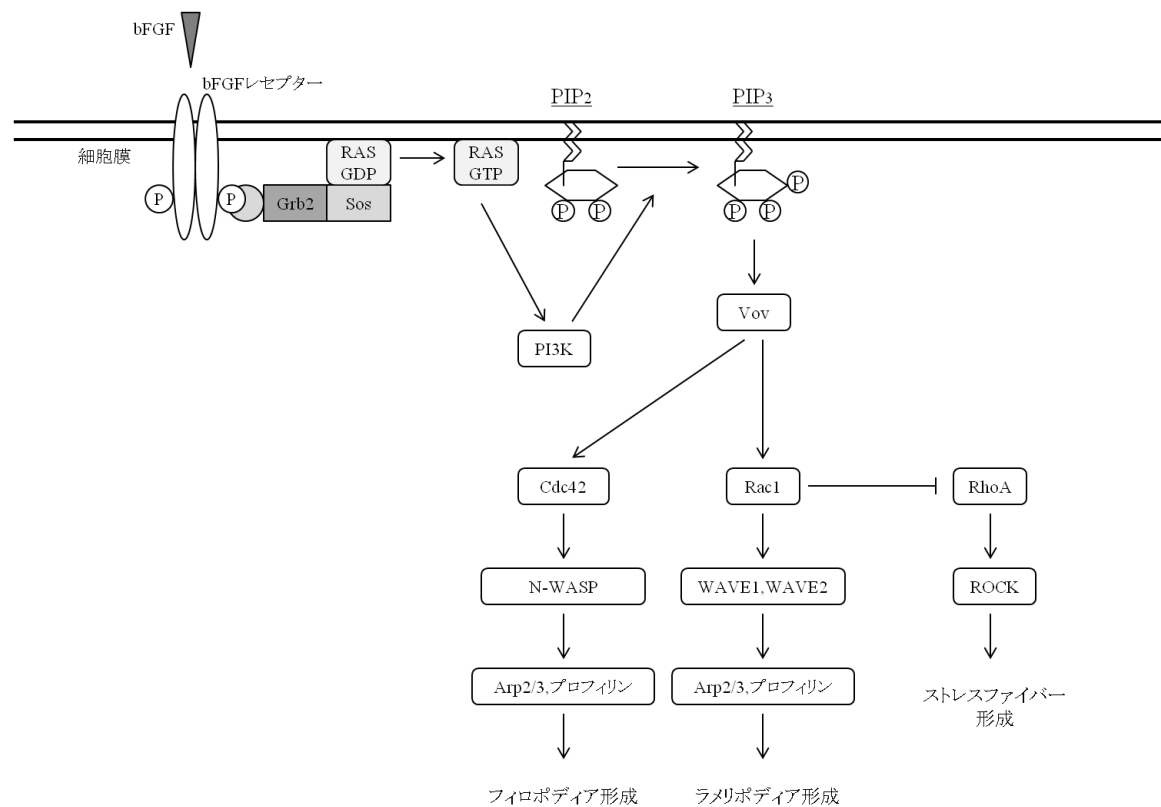


Fig.5-9 bFGF による PI3K 依存アクチンフィラメント形成シグナル

また、Rhoファミリーに関与するかはわからないが、Aktの下流に存在するGSK3- β やmTORが細胞遊走に関与しているとも考えられている。[33],[34]

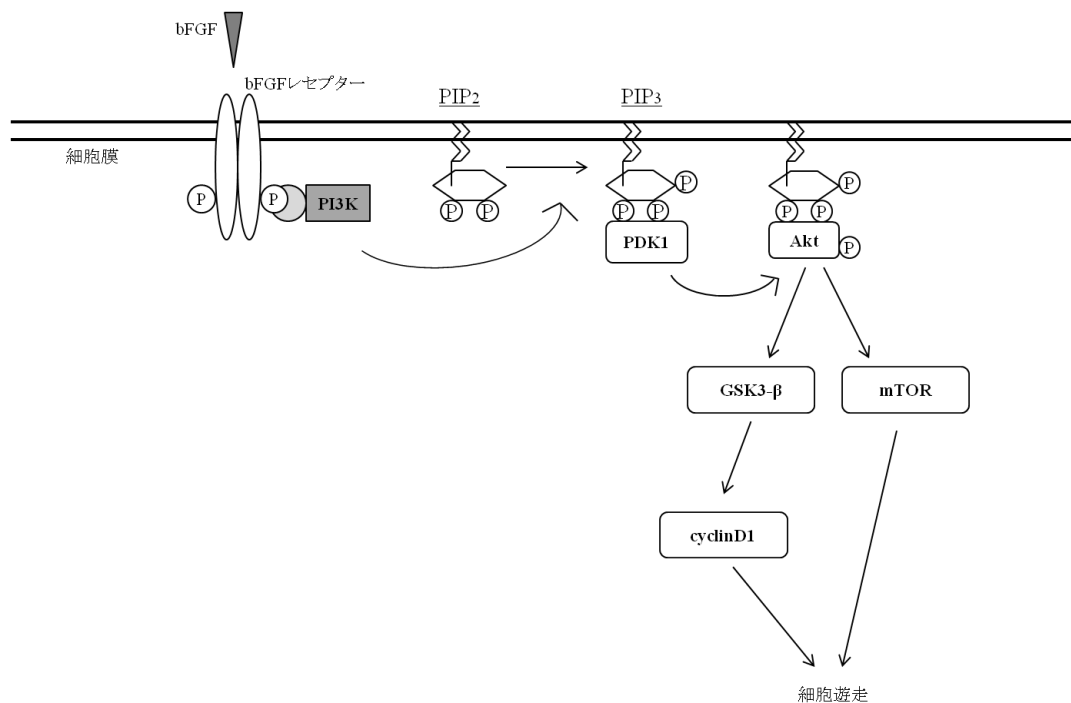


Fig.5-10 bFGF による PI3K、Akt を介したシグナル仮説

今回の実験では PI3K が関与していることまでしか確認できなかったのですが、仮説であるが、間葉系幹細胞以外の細胞で報告されている経路であるので、間葉系幹細胞の傷害修復においても十分に可能性がある経路であると考えられる。

6.総括・展望

本研究における総括は以下の点である。

- ①bFGF 添加による培養は間葉系幹細胞の運動能を上げ、傷害修復を速くする
- ②bFGF による傷害修復は PI3K によって制御されている
- ③Cofilin、Thymosin β 4、MMP2 の mRNA レベルの発現量は bFGF 添加によって変化しなかった

さらに今回の濃度範囲では、bFGF 単独では増殖に影響を与えておらず、他の因子との相互作用によって増殖に影響を与えている可能性が示唆された。加えて、今回は分化能に関する調査を行っておらず、bFGF 濃度が間葉系幹細胞の分化に及ぼす影響を知る必要がある。よって傷害修復における bFGF の影響をより詳細に知るためには、今後以下のような実験をしていく必要がある。

- ①0.1%FBS 条件において 100ng/ml 以上の bFGF 濃度範囲も含めて遊走、増殖、分化に対する影響を調査する。
- ②他の増殖因子(HGF、GDNF など)添加による増殖能、遊走能、傷害修復能を調査する。

また、今回の実験からは PI3K シグナルの下流の特定ができなかったためシグナル解明のためには以下のような実験をしていく必要がある。

- ①bFGF 添加による運動能への影響が最も出るポイントで Cofilin、Thymosin β 4、MMP2 の mRNA 発現並びにタンパク質の活性化を調査する。
- ②アクチンフィラメントを制御する Rho、Cdc42、Rac などの分子の mRNA 発現並びにタンパク質の活性化を調査していく。

7.参考文献

- [1] 朝比奈 欣治: 絵解き再生医学入門/羊土社(2004)
- [2] 川口 良人: 腹膜透析入門ーこれで安心！PD ライフ/東京医学社(2008)
- [3] Michiel G.H, *et al*: The Mesothelial Cells in CAPD Effluent and Their Relation to Peritonitis Incidence. *Peritoneal Dialysis International*, 1991; 11: 22-26
- [4] Yamamoto T, *et al*: Morphological studies of mesothelial cells in CAPD effluent and their clinical significance. *Am J Kidney Dis*, 1998; 32(6): 946-952
- [5] Gokal R, *et al*: The Text book of Peritoneal Dialysis/Kluwer Academic Publishers (1994)
- [6] Horiuchi T, *et al*: An image analysis algorithm for kinematics and morphology measurement of cells for the evaluation of tissue construction. *Kidney International*, 2003; 64: 2280-2290
- [7] 横田 崇: わかる実験医学シリーズ 再生医学がわかる/羊土社(2002)
- [8] Brzoska M, *et al*: Epithelial differentiation of human adipose tissue-derived adult stem cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2005; 330: 142-150
- [9] Baer P C, *et al*: Conditioned medium from renal tubular epithelial cells initiates differentiation of human mesenchymal stem cells. *Cell Prolif*, 2009; 42: 29-37
- [10] Nugent M A, *et al*: Fibroblast growth factor-2. *Int J Biochem Cell Biol*, 2000; 32: 115-120
- [11] Tsutsumi S, *et al*: Retention of multilineage differentiation potential of mesenchymal cells during proliferation in response to FGF. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001; 288: 413-419
- [12] Fujikawa K, *et al*: Expression of mRNA for growth factors and extracellular matrix proteins after injury to cultured peritoneal cells: does the healing process contribute to peritoneal ultrastructural alteration? *J Artif Organs*, 2003; 6: 253-259
- [13] Ogata S, *et al*: Glucose and Prednisolone Alter Basic Fibroblast Growth Factor Expression in Peritoneal Mesothelial Cells and Fibroblast. *J Am Soc Nephrol*, 2001; 12: 2787-2796
- [14] Schmidt A, *et al*: Basic Fibroblast Growth Factor Controls Migration in Human Mesenchymal Stem Cells. *STEM CELLS*, 2006; 24: 1750-1758
- [15] 竹縄 忠臣: 形と運動をつかさどる細胞のダイナミクス/羊土社(2006)
- [16] 三木 裕明: 細胞骨格・運動がわかる その制御と機構とシグナル伝達ネットワーク/羊土社(2004)

- [17]竹縄 忠臣: 細胞極性と細胞運動を制御するシグナリング. 実験医学, 2001; 19(4): 430-432
- [18]Bernstein B W *et al*, ADF/cofilin: a functional node in cell biology. *Trends Cell Biol*, 2010; 20(4): 187-195
- [19]Santis M D *et al*, β -thymosins and interstitial lung disease: study of a scleroderma cohort with a one-year follow-up. 2011; 12 (1): 22
- [20]Mimura S *et al*, Growth factor-defined culture medium for human mesenchymal stem cells. *Int J Dev Biol*. 2011; 55(2): 181-187
- [21]Sotiropoulou P A *et al*, Characterization of the optimal culture conditions for clinical scale production of human mesenchymal stem cells. *STEM CELLS*, 2006; 24: 462-471
- [22]ATOPY.COM: <http://allatopy.wakabagari.com/index.html>
- [23]Voet D: ヴォート基礎生化学第2版/東京化学同人(2000)
- [24]CTS ジャパン株式会社: <http://www.cstj.co.jp/>
- [25]佐々木 雅彦: 細胞遊走の制御とPI3K 実験医学, 2001; 19(4): 438-444
- [26]Nakashio A, *et al*: Topotecan inhibits VEGF- and bFGF-induced vascular endothelial cell migration via downregulation of the PI3K-Akt signaling pathway. *Int. J. Cancer*, 2002; 98: 36-41
- [27] Gao F, *et al*: L-5F, an apolipoprotein A-I mimetic, inhibits tumor angiogenesis by suppressing VEGF/basic FGF signaling pathways. *Integr Biol (Camb)*, 2011; 3(4): 479-489
- [28]Maffucci T *et al*: A phosphoinositide 3-kinase/phospholipase C γ pathway regulates fibroblast growth factor-induced capillary tube formation. *PLoS ONE*, 2009; 4 Issue 12: e8285
- [29]Abe M, *et al*: Evidence that PI3K, Rac, Rho, and Rho kinase are involved in basic fibroblast growth factor-stimulated fibroblast-Collagen matrix contraction. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2007; 102: 1290-1299
- [30]山本 雅: シグナル伝達イラストマップ/羊土社(2004)
- [31]竹縄 忠臣: 細胞骨格と細胞運動/Springer(2002)
- [32]Lee J G *et al*: FGF-2-induced wound healing in corneal endothelial cells requires Cdc42 activation and Rho inactivation through the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *IOVS*, 2006; 47(4): 1376-1386
- [33]Vemula s *et al*: ROCK1 functions as a suppressor of inflammatory cell migration by regulating PTEN phosphorylation and stability. *Blood*, 2010; 115(9): 1785-1796
- [34]難波克成: PTEN 変異と血管奇形

8.謝辞

本修士論文の作成及び日々の研究活動において、時に厳しくも適切な助言と情熱あふれる丁寧なご指導をいただきました三重大学工学部 堀内 孝 教授、宮本 啓一 准教授、本修士論文の副査を務めていただきました富田 昌弘 教授、に対し、心からの感謝を申し上げます。

また、実験に使用しましたヒト間葉系幹細胞を提供していただきました広島大学の加藤 幸夫先生、bFGF を提供して下さいました科研製薬株式会社、研究生活のサポートをしてくださった事務員の村上 節子さんに深く感謝致します。

実験や研究室での生活、後輩指導に関してまで様々な相談に乗ってくださった水谷 直紀先輩に深く感謝致します。また、真面目に研究室内の細かな仕事をこなしてくれたり、いつも優しく接して下さった神谷 歩君、葛本 智淳君、境 淳志君、塚本 真子さん、中村 雅広君、丹羽 一喜君、原 拓也君、伊藤 直人君、影山 聡志君、小山 直紀君、清水 佑典君、叢 秀娜さん、財部 龍太郎君、長谷川 まりなさんに感謝致します。

また、共に過ごしたのは1年間だけでしたが、今も様々な話を聞いてくださる塩崎 大介君、高橋 国宏君、原 吉彦君にも感謝致します。

そして、実験のことや研究室生活について一番身近で教えてくださった水本 健先輩、山崎 慎也先輩、実験や研究室生活をいつも全面的に支えてくださった田野 裕美さん、いつも熱心に話を聴いて素直に受け止めてくれた北村 早希さん、中町 信敏君には深く感謝致します。

最後に、3年間共に過ごしいつも気にかけてくれた同期の加藤 真司君、熊澤 雄基君、佐々木 剛君、野口 寛之君、東 洋君、山本 光則君、同期・同研究グループであり一番身近な存在として3年間一緒に研究のこと、グループのことを考えてきた堀井 貴司君には心からの感謝とともにこれからの社会でのご活躍を願っております。

平成 24 年 2 月
大友 佳子

9. Appendix

9-1. 各種溶液の調整

<使用機器・器具>

- ・吸引ポンプ(BR-21B/日機装)
- ・10 ml シリンジ(SS-10SZ/TERUMO®)
- ・注射針(NN-2432R/TERUMO®)
- ・MILLEX®GP(SLGP033RS/MILLIPORE)
- ・STERICUP™(SCGVU05RE/MILLIPORE)
- ・ウォーターバス(BT-15/Yamato)
- ・0.5ml アシストチューブ(A.050W/アシスト)
- ・5ml アシストチューブ(60.9921.523S/アシスト)
- ・15ml 遠沈管(725172-117/VIOLAMO)
- ・50ml 遠沈管(725172-217/VIOLAMO)
- ・1L メスフラスコ

<使用試薬>

- ・DMEM[Dulbecco's Modified Eagle's Medium](D6046/SIGMA、500 ml)
- ・FBS[Fetal Bovine Serum](500 ml)
- ・PBS[Phosphate Buffered Saline]作成用試薬
 - リン酸二水素カリウム[169-04245/Wako]
 - 塩化カリウム[163-03545/Wako]
 - リン酸水素二ナトリウム 12 水和物[196-02835/Wako]
 - 塩化ナトリウム[198-01675/Wako]
- ・TRYPsin-EDTA SOLUTION (10x)(T4174/SIGMA、100 ml)
- ・bFGF[FGF basic](科研製薬より提供していただいた)
- ・DTT[Dithiothreitol](1261627/Invitrogen、500 μ l)
- ・PS[Penicillin Streptomycin](P0781/SIGMA)
- ・LG[L-Glutamine](G7513/SIGMA)

1. 培地の調整

<DMEM の調製>

- ①ITS、LG それぞれ 5ml を 15ml 遠沈管に混ぜた。
 - ②0.22 μ m フィルターにて滅菌後、培地に加えた。
- ※実験で使用した DMEM はすべてこれを使用した。

<FBS の不活化・分注・保存>

- ① -20℃にて凍結保存されている FBS を 37℃のウォーターバスに浸し、振り混ぜながら解凍した。
- ② 完全に解凍し終わったら、数回振り混ぜた。
- ③ 55～56℃のウォーターバスで 30 分間加熱した。(非働化)
- ④ STERICUP™にてフィルター滅菌し、50ml チューブに 20～25ml ずつ分注した。作業はクリーンベンチ内、滅菌<操作>で行った。
- ⑤ -20℃の冷凍庫にて保存した。

※血清の非働化について

血清は血液を凝固させてその上澄みをとったもので、様々な細胞増殖促進物質、細胞障害保護因子、栄養因子などがふくまれる。血清に含まれる補体成分が活性化されると、細胞に障害を与える場合があるため、血清を 56℃で 30 分間加熱して補体成分を不活性化させる。

<各 supplement の保存>

・PS[Penicillin Streptomycin]

5ml ずつ分注し、-20℃で保存した。

・LG[L-Glutamine]

5ml ずつ分注し、4℃で保存した。

・bFGF[FGF basic]

め、チューブに分注し、-20 ～ -70℃で保存した。

2. PBS の作成

- ①リン酸二水素カリウム 0.2g、塩化カリウム 0.2g、リン酸水素二ナトリウム 12 水和物 2.90g、塩化ナトリウム 8g を量りとり、1L メスフラスコに入れた。
- ②脱イオン水を入れてメスアップし、粉末を溶解させた。
- ③500ml 耐熱ガラスビンに移した。
- ④蓋をきっちり締めた後、121℃/40 分にて高圧蒸気滅菌を行った。

3. TRYPSIN－EDTA SOLUTION の分注、保存

- ①納品後、凍結(-20℃以下)で保存した。
- ②5 ml アシストチューブに 4 ml ずつ分注し、-20℃にて保存した。

4. 滅菌水の作成

- ① 脱イオン水を密閉できる耐熱ガラスビン(1L メディウムビン)に入れた。
- ② 蓋をきっちり締めた後、滅菌テープで封印し 121℃/40 分にて高圧蒸気滅菌を行った。

5. LY294002 の調製

[試薬(メーカー名, コード No.)]

- ・ LY294002(Cayman chemical, 70920): 5mg
- ・ ジメチルスルホキシド: dimethylsulfoxide: DMSO(Sigma, D8418): 0.5ul

[調整試薬の濃度] ref:秋山徹. 阻害剤活用ハンドブック. 2006. 羊土社

保存時:5 mg/ml, -80℃保存

使用時:10μM

[調整方法]

DMSO をフィルター滅菌 (0.22μm) 後、LY294002 5mg に DMSO 1ml を添加する。培地添加時には最終濃度が 10μM となるように使用。(培地 1ml あたり 0.61 μl 添加)

9-2. 細胞培養

<試薬・器具・機器>

- ・ Phosphate Buffered Saline(PBS)(D-8537/SIGMA)
- ・ セルバンカー(日本全薬工業)
- ・ 75 cm² 培養フラスコ(MS-21250/住友ベークライト)
- ・ Φ35 シャーレ、各種プレート(住友ベークライト)
- ・ 各種遠沈管(Biologix)
- ・ Counting chamber(03-202-1/Erma)
- ・ CO₂ インキュベーター(池本理化工業)
- ・ KUBOTA 2010(RD3132/株式会社久保田製作所)
- ・ Vortex(S-100/TAITEC)
- ・ 恒温槽(BT-15/Yamato)

<間葉系幹細胞>

- ・ ヒト間葉系幹細胞(HMS: human mesenchymal stem cell、Cell No.:0043、Cell name:MSC-R36-2)
- ・ bFGF[FGF basic](科研製薬より提供して頂いた)
- ・ DMEM[Dulbecco's Modified Eagle's Medium](D6046/SIGMA、500 ml)
- ・ FBS[Fetal Bovine Serum](500ml)

<継代培養>

<操作>

① プレインキュベート

目的の培養フラスコ、シャーレ、プレートに選択した培地を入れ、37℃、5%CO₂ インキュベート内にプレインキュベートした。

② 細胞の洗浄

- 1) 培養フラスコの蓋を開け、口元を加熱殺菌した。
- 2) 滅菌済みパスツールで培養フラスコ内の培養液を吸引した。
- 3) PBS 溶液 10 ml/75cm² フラスコを添加し、前後左右に振り洗浄した。
- 4) 滅菌済みパスツールで培養フラスコ内の洗浄液(PBS)を吸引した。

③ 培養細胞の剥離方法

- 1) 融解した Trypsin-EDTA solution 1ml に PBS 9 ml を加え、ボルテックスをかけた(以下トリプシン溶液とした)。

- 2) トリプシン溶液 10 ml を 75cm² フラスコに加え、約 30 秒後、ゴムシートの上で 10 回を 2 セット叩いて細胞を剥離させた。
- 3) 顕微鏡で細胞の剥離を確認後、FBS 2ml を 75 cm² フラスコに加えた。
- 4) 滅菌済み 10 ml ピペットで培養フラスコ内の細胞懸濁液を吸引し、15 ml 遠心管に入れた。
- 5) 50 G(800 rpm5 分間原則 4℃)遠心分離した。
- 6) 遠心分離した上澄み液を 10 ml ピペットで吸引し、細胞に培養培地を 3 ml 加えて細胞懸濁液を作成した。
- 7) 10 回ピペッティングを行った後、細胞懸濁液(濃度 5×10^5 cells/ml)を取り、あらかじめ用意しておいた培養フラスコに適量播種した。37℃、5%CO₂ 条件下でインキュベート培養した。

※細胞懸濁液濃度は血球計算版にカバーガラスをのせ、その隙間に培養フラスコに播種する直前の細胞懸濁液 3μl を注入した。顕微鏡で細胞数を測定し、細胞懸濁液濃度を算出した。1mm² の面積の細胞を数えて、液の厚みを 0.1mm としたときの細胞懸濁液濃度は、細胞測定数 $\times 10^4$ cells/ml とした。

<培地交換と培地・懸濁液量>

培地交換

<操作>

- ① あらかじめ交換する培養培地を 37℃の温水で温めたものを使用した。
- ② 滅菌済みパスツールで細胞培養培地を吸引した。
- ③ 細胞培養に使用する各容器に対してそれぞれ適量の培養培地を加えた。

容器	培地量	懸濁液播種量
Φ35 シャーレ	2ml	0.2ml
75cm ² フラスコ	15ml	1ml
6 穴プレート(1 穴)	2ml	0.2ml
96 穴プレート(1 穴)	100μl	10μl
8 穴チャンバー(1 穴)	300μl	50μl
12 穴トランスウェル(1 穴)	0.5ml(apical)-1.5ml(basal)	50μl(apical)

表 9-1. 各容器に対する培地量と懸濁液播種量目安

9-3.細胞の凍結・解凍方法

培養細胞の凍結保存は、カビなどによるコンタミの防止や細胞株の保存のために必要不可欠の操作といえる。細胞を -80°C で凍結した細胞は長期間の保存が可能となる。

<使用機器・器具>

- ・2 ml クライオチューブ(72.693 S/アシスト)
- ・エルマ血球計算盤(Erma)

<使用試薬>

- ・DMEM[Dulbecco's Modified Eagle's Medium](D6046/SIGMA、500 ml)
- ・FBS[Fetal Bovine Serum](500ml)
- ・PBS
- ・TRYPsin-EDTA SOLUTION (10x)(T4174/SIGMA、100 ml)
- ・セルバンカー(637-0221/WAKO)

<操作>

① 細胞の凍結方法

- 1) 培養液を吸引後、PBS 溶液 5ml/25cm² フラスコ(10ml/75cm² フラスコ)を添加し、若干振動を加えて洗浄した。
- 2) 洗浄液を吸引後、10%trypsin/培地溶液を加え、37℃で5分間インキュベートした。
位相差顕微鏡を用いて細胞の剥離を確認後、FBSを所定量(25cm²フラスコに対して1ml、75cm²フラスコに対して2ml)添加した。
※細胞の剥離が十分でない場合は、セルスクレーパーを用いた。
- 3) フラスコ内の細胞懸濁液を15ml チューブに移し、50g/5分にて遠心分離を行った。
- 4) 上澄み液を除去後、10%FBS/培地溶液を5 ml 加えて50g/5分にて遠心分離を行った。
- 5) 上澄み液を除去後、Cell Pellet に細胞凍結保存液を1ml 加えた。
- 6) 細胞数($5\times 10^5 \sim 1\times 10^7$ cells/ml が目安)を測定し、クライオチューブに分注した後、 -80°C (ディープフリーザー)で凍結させた。

② 凍結細胞の解凍方法

- 1) 細胞培養用フラスコに10%FBS/培地溶液を5ml 加えて、37℃/5%CO₂ イン

キューベータ内 でプレインキューバートした。

- 2) -80°C で凍結保存しておいたクライオチューブのキャップを無菌下で 1/4 程度開けて、内部の減圧をし、再度閉めた。

※開栓前にチューブ表面をエタノール滅菌した。

- 3) チューブの底から 3/4 を限度に 37°C 恒温槽中に浸し、緩やかに揺らしながら解凍した。

※氷片がわずかに残った状態を取り出し、過度の加温は避けた。

- 4) チューブ表面をエタノール滅菌後、無菌下で細胞懸濁液を 15ml 遠沈管に入れ、さらに培地を 10ml を加えた。

- 5) 50g(750rpm、5 分間、原則 4°C)で遠心分離後、上澄み液をアスピレーションした。

- 6) 培地 1ml を加えて十分なピペッティング後、プレインキューバートしておいた細胞培養用フラスコに細胞懸濁液を加えた。

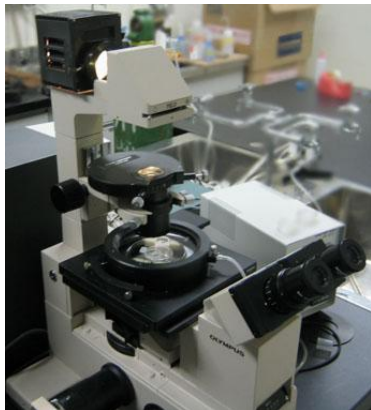
9-4.動画撮影

＜使用装置・器具＞

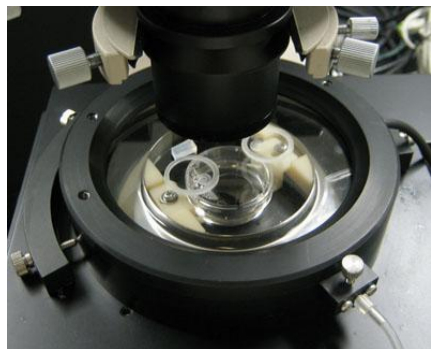
- ・接着細胞培養用 35φ シャーレ (住友ベークライト株式会社)
- ・落射蛍光顕微鏡 (OLYMPUS)

・動画撮影とは

ここでの動画撮影とは、実験サンプルの位置を顕微鏡下で固定して培養し、その映像をパソコンへと取り込み、一定時間ごとに静止画を連続して撮り続け、その画像を繋げることによって動画を作成することをいう。



動画撮影用顕微鏡



顕微鏡付属培養装置

・動画撮影のメリット・デメリット

Table 撮影方法の比較

	動画撮影	静止画撮影
特定細胞の経時変化	◎ 撮影位置が固定できる	△ 撮影位置の固定ができない
視野	△ 一視野のみ	◎ 複数の視野が可能
撮影間隔	◎ 短くできる	△ ある程度の間隔が必要

・動画撮影時の注意事項

- ・細胞を扱うため顕微鏡付近を清潔に保つ
- ・撮影中は顕微鏡と実験台にぶつからないよう注意する
- ・顕微鏡の周りに光を遮るものは置かない様にし、撮影中は実験室の電気は消さない

＜実験方法＞

I. 顕微鏡の準備

- ① 顕微鏡の周囲をエタノールで拭く
- ② ヒーターにミリ Q 水を注ぐ
- ③ ヒーターの温度を TOP、STAGE HEATER を共に 37℃に設定
- ④ CO₂ ガスボンベの栓を適度にあける
- ⑤ AIR を 200 ml/min、CO₂ を 10 ml/min に設定し 5 %CO₂培養装置にする

II. 撮影の開始

- ① シャーレを顕微鏡付属の 37 °C、5 % CO₂ インキュベーターにセットする
- ② 顕微鏡の電源を入れ、パソコンにて XCAP を起動する
- ③ XCAP で顕微鏡の映像を取り込み、ピント、撮影場所、明るさを調節する
※播種した直後の細胞の接着・伸展を観察する場合、ピントは浮遊細胞に合わせるのではなく、シャーレ表面に合わせる。
- ④ 撮影場所が決定したら撮影を開始する

III. 撮影の終了

- ① XCAP を終了する
- ② ヒーターを止め、ガスボンベの栓を閉める
- ③ ヒーターの水を捨て顕微鏡の周囲をエタノールで拭く
- ④ シャーレは CO₂ インキュベーター内に戻して培養する
- ⑤ 撮影した画像をパソコンソフト Virtual Dub を用いて動画を作成する

・ソフト使用方法

・画像取り込みソフト XCAP 使用方法

- ① パソコンで XCAP を起動する。メニューバーの「PIXCI」から「Open/Close」→「Multiple Devices」を選択しクリック
- ② 顕微鏡を 2 台同時に使用するならば「Use Common & Controls W.Cameras Synchronized」を、1 台ずつ使用するならば「Use Individual Format & Control」を選択し「OK」から「OPEN」をクリックする
- ③ 左にある絵文字メニューの右側上から 3 番目のボタンをクリックし画像をパソコンのモニターに映し出し、顕微鏡側でピント、撮影場所、画像の明るさの調整を行う
- ④ 撮影可能な状態になれば使用する顕微鏡の Unit 番号のメニューバーの「Capture」から「Sequence Capture」→「Video to Image File」をクリック
- ⑤ メニューバーの「File」から「Browse」で画像の取り込み名を決め、画像取り込み形式は Jpeg を選択する
- ⑥ メニューバーの「Capture」から「Image to Save」で撮影枚数、「Time Interval」で撮影の間隔を決定し、「Snap Video at Time」、「Linear Sequence」、「Event Free」がチェックされていることを確認する
- ⑦ 「Record」で撮影を開始する

・動画作製ソフト Virtual Dub の使用方法

- ① パソコンで Virtual Dub を起動する
- ② メニューバーの「ファイル」から「ビデオファイルを開く」を選択し、連番画像の最初のファイルを選択して「開く」をクリックする
- ③ メニューバーの「映像」から「フレームレート」を選択、「Change to frames persecond」をチェックし適当な値を入力する
- ④ メニューバーの「映像」から「フィルター」を選択、「add」をクリックしリストの中から「resize」を選択、画像サイズを 640×480 にする
- ⑤ メニューバーの「映像」から「Filters」を選択、「add」をクリックしリストの中から「grayscale」を選択し、「OK」をクリックする
- ⑥ 「映像」から「圧縮」を選択、「Cinepak Codec by Radius」を選択し「OK」をクリックする
- ⑦ 「ファイル」から「名前を付けて保存」を選択、ファイル名を入力して「OK」をクリックする⇒動画が作成される

9-5. RT-PCR

9-5-1. AGPC 法プロトコル

<原理>

RNA を構成するリボースは、DNA のデオキシリボースに比べて 2 位の炭素に水酸基が 1 つ多くある。このため DNA に比べて、次のような条件下では親水性が増すことが期待される。

核酸は、中性条件下ではリン酸基が解離して負の電荷を帯び、この部分が水和することによって高分子コロイドとして水中に分散している。ところが酸性条件下では、リン酸基の電離平衡が会合の方向に傾いてこの部分のチャージが失われるために、親水性が低下する。この状態でフェノール処理を行うと DNA は疎水性に勝るフェノール層に分配されるが、RNA はリボースの水酸基があるため水層に分配される。AGPC 法とはこの性質を利用して RNA を抽出する方法である。

一般的には、まず Guanidium thiocyanate(GTC)で RNase を失活させると同時に細胞のタンパク質を可溶化する。そして液性を酸性に保ちながらフェノール処理を行うと、タンパク質や脂質がフェノール層や中間層に移行するのみならず、DNA もフェノール層に分配される。こうして得られた水層(GTC 層)には RNA のみが溶け込んでいるので、これをアルコールで塩析することでほぼ純粋な RNA が得られるわけである。本実験では、市販の RNA-Bee™ ISOLATION OF RNA と呼ばれる試薬を用いて RNA の抽出を行っているが、その原理は基本的に同じである。

<RNA・DNA を扱う上での注意点>

細胞は原則的に受精卵が持つ全ての種類の遺伝子を持っているが、細胞の種類・状態に応じて、特定の遺伝子(DNA)を選択的に活性化して機能を発現している。この仲立ちをするのが mRNA である。したがって、細胞の状態をフレキシブルに変化させるためには、いつまでも古い mRNA が残っているのは具合が悪い。そこで細胞や組織液中には RNA を速やかに分解する酵素(RNase)が豊富に含まれている。我々が RNA の分析を行う際には、この RNase による RNA の変性・分解が最大の障害となる。RNase は抽出する細胞はもちろんのこと、我々の汗・唾液・皮膚など様々な所に存在し、また熱に対する安定性も極めて高く、なかなか失活しない(121℃の高圧蒸気滅菌にかけても活性が残る)。従って実験の成否はこの RNase の作用をいかに防ぐかにかかっている。このことを踏まえ、今後 RNA、DNA を扱う全ての実験において以下の点に気を付けること。

- 各チューブ・チップは、素手で触れたものは使用しないこと。
- 滅菌のために各チューブ・チップを詰め込む際は、ゴム手袋を着用し素手では絶対に触れないこと。
- 使用するガラス器具は乾熱滅菌(RNase free)を行うこと。
- 実験中は必ずゴム手袋(片手で良い)、マスク、帽子、白衣を着用し、無駄な会話は避けること。
- ゴム手袋を着用した側の手は、サンプルを扱うこと以外には使用しないこと。
- サンプルに直接触れるものを素手で扱わないこと。
- サンプルを吸う際は、常に細心の注意を払うこと。

また、AGPC 法に特有の注意点として、以下の点に気を付けること。

- 高速遠心機は予冷運転を行っておくこと
- <操作>は全体的に素早く行うこと

<使用機器・器具・試薬>

- 日立微量高速遠心機(日立/CR15B 型)
- DNA mini(HETO LAB EQUIPMENT/ID 872146)
- MINI CENTRIFUGE(COSTER/MVSS-06618)
- Vortex
- ウォーターバス
- 1.5ml チューブ(アシスト/72.690S)
- チューブ立て
- マイクロピペッター各種
- チップ各種
- タイマー
- Crash ice 用発泡スチロール
- PARAFILM®(Pechiney Plastic Packaging, Inc./PM-996)
- 注射針(TERUMO®/NN-2432R)
- RNA-Bee™ ISOLATION OF RNA(Tel-Test, Inc./CS-104B)
- chloroform-isoamylalcohol 24:1(SIGMA/C-0549)
- isopropanol(SIGMA/I-9516)
- PBS(SIGMA/D-8537)
- 75%EtOH/DEPC 処理水溶液(無水 EtOH を DEPC 処理水で希釈)
→ 無水 EtOH(Wako/321-00025)

- DEPC 処理水
→ Diethylpyrocarbonate(CALBIOCHEM®/298711)
- Crash ice

<AGPC 法(前半)>

- ① 細胞に刺激を与え、Φ35 シャーレから培地を吸引し、PBS を 1ml/well 入れて細胞を洗浄する。
洗浄後 PBS を吸引し、素早く RNA-Bee™を 1ml/well 入れる。
- ② 2 連にしたピペットチップの先端で well 内の細胞を剥がすように掻いた後、10 回程度ピペッティングを行い、その懸濁液を 1.5ml チューブに移し入れる。
- ※ ②と③の<操作>を 5 分間で行うこと。
- ※ チップは well 毎に交換すること。
- ③ チューブに入った各サンプルに chloroform-isoamylalcohol 24:1 を 200μl ずつ加え、しっかりと蓋を閉めた後 15 回程度上下に振り混ぜる。
- ④ 室温(R.T)にて 15 分間静置する。
- ⑤ 12000G/4℃/15 分にて遠心分離を行う。
- ⑥ 3 層に分離するので、最上層の溶液(透明な水層、ここに RNA が含まれる)を液面近傍よりそれぞれ 350μl ずつ採取し、別に用意した 1.5ml チューブに移し入れる。
- ⑦ 移し入れた各サンプルに isopropanol を 500μl ずつ加え、Vortex にて攪拌した後すぐに-80℃の冷凍庫に移し一晩保存する(Over Night)。

<AGPC 法(後半)>

【 全て氷上操作 】

- ① サンプルを解凍し、12000G/4℃/10 分にて遠心分離を行う。
- ※ このときチューブの継ぎ手を外側に向けて遠心を行うこと。
- ② チューブを傾け、ある程度の上澄みを慎重に取り除く。
- ※ 沈殿は肉眼では確認出来ないので、チューブの継ぎ手側に沈殿があると想定して上澄みを取り除くこと。
- ③ 各サンプルに 75%EtOH/DEPC 処理水溶液を 500μl ずつ加え Vortex にて攪拌した後、10000G/4℃/5 分にて遠心分離を行う。
- ④ チューブを傾け、より慎重に上澄みをぎりぎりまで取り除く。
- ⑤ チューブの口に 2.5cm 四方程度の PARAFILM®を張り、注射針にて 10 個程度の穴を開ける。
- ※ PARAFILM®は絶対に素手で触らないこと。

- ⑥ DNA mini にサンプルをセットし、減圧乾燥を行う。
- ※ サンプル残量によって乾燥の度合いが異なるため、乾燥し過ぎないように様子を見ながら行うこと(目安:1 セット 3～5 分)。
- ⑦ 各サンプルに DEPC 処理水を 10 μ l ずつ加え、Vortex による攪拌と MINI CENTRIFUGE による軽い遠心を 2 回繰り返す。
- ※ 減圧乾燥の際に RNA が陰圧で壁に付着する場合があるため、念入りに行うこと。
- ⑧ ウォーターバスにて 55°C/5 分加温後、冷蔵庫にて 4°C に冷却する。
- ⑨ 得られたサンプルは RNA の定量後、RT-PCR 法に使用する。

9-5-2.RNA の定量プロトコル

<意味>

ここでは、分光光度計を用いて吸光度 OD₂₆₀ および OD₂₈₀ の測定を行い、その値を基に全サンプルの RNA 濃度を一律に揃える。これにより、この後に行う PCR の反応生成物に定量性を持たせることが出来る。というのも、RT-PCR 法は mRNA を鋳型にして DNA の合成・増幅を行い、得られた DNA の定量を行うため、最初の鋳型 mRNA の量にばらつきがあると最終的な PCR 反応生成物量もばらついてしまい、定量性を失ってしまうからである。

<注意点>

核酸(この場合は RNA)由来の吸光度 OD₂₆₀ とそれ以外の物質(タンパク質など)由来の吸光度 OD₂₈₀ の比(OD₂₆₀/OD₂₈₀)は、サンプルの RNA 純度を表しており、一般的に 1.5 以上が望ましいとされる。但し、いくら比が大きいとしても吸光度が低いと RNA 濃度は低くなってしまうため、理想的なサンプル濃度 0.2～0.5 μ g/ μ l にするためには、少なくとも OD₂₆₀=0.085 以上は必要である。また、逆にサンプル濃度が高過ぎる場合は希釈して用いること。

<使用機器・器具・試薬>

- Smart Spec™ 3000 Spectrophotometer(BIO RAD/170-2501)
- Cuvette(BIO RAD/170-2505)
- MINI CENTRIFUGE(COSTER/MVSS-06618)
- Vortex
- 0.5ml チューブ(アシスト/72.699S)
- チューブ立て
- マイクロピペッター各種

- チップ各種
- キムワイプ® S-200(株式会社クレシア/62011)
- 廃液入れ
- 洗瓶(脱イオン水)
- 0.1N HCl aq
- DEPC 処理水

<RNA の定量>

- ① AGPC 法により得られた各サンプル 10 μ l より 1 μ l ずつ採取し、サンプル数分用意した 0.5ml チューブの底部にそれぞれ入れる。
- ② DEPC 処理水を 59 μ l ずつ①のチューブに加え、Vortex にて攪拌後 MINI CENTRIFUGE にて軽く遠心を行う。
- ③ 前日より HCl aq(0.1N)に浸け置いた Cuvette を、脱イオン水にてよく濯ぎ水気を切る。
- ④ マイクロピペッターを用いて Cuvette に DEPC 処理水を 60 μ l 入れ、Smart Spec™ 3000 Spectrophotometer にセットし、零点補正(Read Blank)を行う。
- ⑤ マイクロピペッターを用いて DEPC 処理水を抜き取り、1 つ目の測定サンプルを 60 μ l 入れ Smart Spec™ 3000 にセットし、3 回吸光度の測定(Read Sample)を行う。
- ⑥ 測定し終えたサンプルを、マイクロピペットを用いて抜き取り元のチューブに戻す(測定のやり直しができるようにするため)。
- ⑦ Cuvette を脱イオン水にてよく濯ぎ水気を切る。
- ⑧ ⑤～⑦をサンプル数分繰り返す。
- ⑨ 測定結果が異常であったサンプルを再測定する。
- ⑩ 得られたデータを出力し、データの処理を行う。

<データの処理>

得られたデータより、次の 2 つの計算を行う。

- i)各サンプルの濃度
- ii)全サンプルの濃度を最低のサンプル濃度に合わせるために必要なサンプルと DEPC 処理水の量

それぞれに必要な計算式を以下に示す。

- サンプル濃度(μ g/ μ l)=(OD₂₆₀) \times (換算係数) \times (希釈倍率)
- RNA の最低量(μ g)=最低のサンプル濃度(μ g/ μ l) \times サンプル残量(μ l)

- 必要サンプル量(μl)=RNA の最低量(μg)/希釈対象のサンプル濃度($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
- 必要 DEPC 処理水量(μl)=サンプル残量(μl)－必要サンプル量(μl)

※ 換算係数は RNA 測定の場合 $0.04(\mu\text{g}/\mu\text{l})$ 。

※ 本実験における希釈倍率は 60 倍。

※ 本実験におけるサンプル残量は、AGPC 法にて得られたサンプル $10\mu\text{l}$ から RNA の定量に用いた $1\mu\text{l}$ を差し引いた $9\mu\text{l}$ 。

9-5-3.RT-PCR プロトコル

<原理>

PCR は微量な DNA の存在を非常に鋭敏に検出できる方法であり、この方法を応用すれば極微量の mRNA の発現を検出することができる。しかし PCR 法に用いる DNA 合成酵素は、mRNA を鋳型として DNA を合成する活性を持たない。その問題の解決方法として重要となる反応が逆転写反応である。つまり、逆転写酵素を用いて mRNA を鋳型とした cDNA の合成反応(逆転写反応)を予め行えば、その cDNA を改めて鋳型として PCR を行うことができる。これが mRNA の発現を PCR 法によって検出する方法、すなわち RT-PCR 法である(図 9-3)。

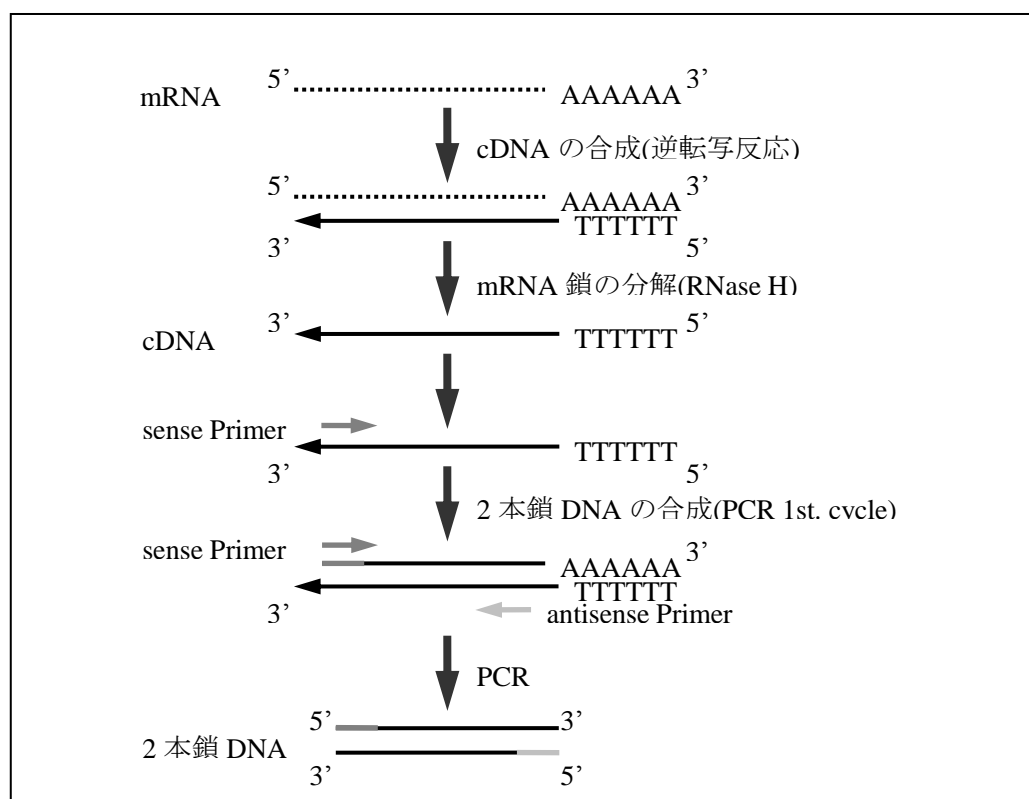


図 9-3 RT-PCR 法

9-4-3-1.Reverse Transcription

<原理>

細胞から発現した mRNA に Primer(Random Hexamer)を結合させ、逆転写酵素を用いて mRNA に相補的な 1 本鎖 DNA(cDNA)を逆転写反応により合成する。この時点では DNA と RNA が繋がった 2 本鎖の状態であり、安定性が高いため、PCR の熱変性(denature)時に十分に 1 本鎖にならないことがある。

そのため、DNA 鎖と対を成している mRNA 鎖を、RNA 分解酵素(RNase)を用いて分解する。これにより完全長 cDNA を合成することができる(図 9-3)。

<注意点>

注意すべきことは、とにかく RNase の混入を防ぐことである。詳しくは 9-6-1 AGPC 法プロトコルを参照のこと。また、RT 法に特有の注意点として以下の点に気を付けること。

- PROGRAM TEMP CONTROL SYSTEM に RT program 01/02 を予め入力しておくこと。
- Reaction Tube with Cap は必ず専用の滅菌缶に入れ滅菌しておくこと。その際も素手では触れないこと。
- Reaction Tube with Cap にラベルする際は、分かりやすく、かつ消えない箇所に記入すること。
- Reaction Tube with Cap は他のものと比べて脆く、力を入れ過ぎると破損する恐れがあるので注意すること。

<使用機器・器具・試薬>

- PROGRAM TEMP CONTROL SYSTEM(ASTEC/PC-708)
- MINI CENTRIFUGE(COSTER/MVSS-06618)
- Vortex
- Reaction Tube with Cap(Micro Amp/N801-0540)
- チューブ立て
- マイクロピペッター各種
- チップ各種
- Crash ice 用発泡スチロール
- Random Primers(Invitrogen/48190-011)
- dATP (Amersham Biosciences/27-2050-01)
- dTTP (Amersham Biosciences/272080)
- dCTP (Amersham Biosciences/272060)
- dGTP (Amersham Biosciences/272070)
- 10x PCR buffer(PERKIN ELMER/E12387)
- Recombinant RNasin® Ribonuclease Inhibitor(Promega/N2511)
- Super Script™ RNase H⁻ Reverse Transcriptase(Invitrogen/18053-017)
- DTT(Invitrogen/Y00147)
- DEPC 処理水

- Crash ice

<RT Master Mix>

【 全て氷上操作】

表 9-2 に従い、各試薬を混合し RT Master Mix を作製する。極微量を扱うため、サンプル数丁度の量では RT Master Mix が不足する恐れがある。そのためサンプル数が多い場合は 1、2 サンプル分余分に作製すること。また、表 9-3 に後で加える RNase inhibitor と Super Script™ の必要量も示す。

表 9-2 RT Master Mix(単位:μl)

Sample数	1	6(+1)	9(+2)	12(+2)	18(+3)	24(+4)
Random Primers(100mM)	1	7	11	14	21	28
dATP(2.5mM)	1	7	11	14	21	28
dTTP(2.5mM)	1	7	11	14	21	28
dCTP(2.5mM)	1	7	11	14	21	28
dGTP(2.5mM)	1	7	11	14	21	28
10x PCR buffer	2	14	22	28	42	56
DTT	2	14	22	28	42	56
合計	9	63	99	126	189	252

表 9-3 RNase inhibitor と Super Script™ の必要量(単位:μl)

Sample数	1	6(+1)	9(+2)	12(+2)	18(+3)	24(+4)
Rnase inhibitor	1	7	11	14	21	28
Super Script™	1	7	11	14	21	28
合 計	2	14	22	28	42	56

<Reverse Transcription>

【 全て氷上操作 】

- ① 各サンプルを扱う前に RT Master Mix を作製する。
- ② RNA の定量結果に基づき、AGPC 法により得られた各サンプル原液を Reaction Tube with Cap 内で希釈し、9 μ l とする。
- ③ 希釈後の各サンプル 9 μ l に、RT Master Mix を 9 μ l ずつ加え、Vortex による攪拌と MINI CENTRIFUGE による軽い遠心を行う。
- ④ PROGRAM TEMP CONTROL SYSTEM にサンプルをセットし、RT program 01 を実行する。
- ⑤ 各サンプルに RNase inhibitor と Super Script™ を 1 μ l ずつ加える。
※ 予め 2 液を混合したものを 2 μ l ずつ加えても良いが、その場合は混合液の量を 4 サンプル分程度多めに作製しておくこと。
- ⑥ PROGRAM TEMP CONTROL SYSTEM にサンプルをセットし、RT program 02 を実行する。
- ⑦ 作成した RT product は -20℃ の冷凍庫にて保存する(数ヶ月保存可)。

9-4-3-2.Polymerase Chain Reaction

<原理>

PCR の原理は 3 段階から成る DNA の合成反応を繰り返して行うことにある。まず、鋳型となる 2 本鎖 DNA を加熱して変性し、1 本鎖にする(denature)。次に、増幅したい特定部位の DNA 鎖の両端に相補的な 2 種類のオリゴヌクレオチドプライマーを反応系に過剰に加えた状態で温度を下げると、プライマーが DNA 鎖の相補的な部位と 2 本鎖を形成する(annealing)。この状態で DNA 合成基質のデオキシヌクレオシド 3 リン酸と DNA ポリメラーゼを作用させると、ポリメラーゼはプライマー部位から DNA 相補鎖を合成していく(extension)。ここで重要なのは、最初の 2 サイクルでは長さが不定な 2 本鎖 DNA が合成されるが、3 サイクル目からはプライマー対に挟まれた部位の長さの揃った 2 本鎖 DNA が合成され、その数が急速に増えていくということである。また、1 回目の合成反応で生成した DNA は次の反応の鋳型となるため、その名称の通り連鎖反応的に DNA が合成されることから、20~30 サイクルの反応の後には、もとの鋳型 DNA 中の必要な部分配列をもつ DNA 分子を莫大な数得ることが出来る(図 9-4)。

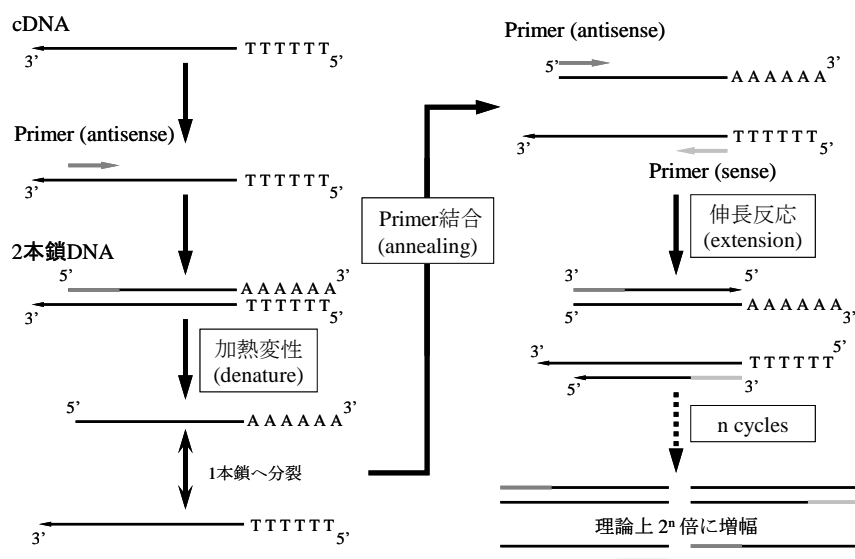


図 9-4 PCR の原理

<PCR のカイネティクスとサイクル数>

ここでは、PCR によって得られる反応生成物の量と PCR のサイクル数の関係について論ずる。PCR は 1 サイクルの反応によって目的とする DNA 断片が最大 2 倍に増えるため、初期鋳型量を I_0 とすると、n サイクル後の反応生成物量 I は、理想的には次式(Eq.A-5-1)に従って指数関数的に増加する。

$$I = I_0 \times 2^n \quad \dots\dots\dots (\text{Eq.A-5-1})$$

しかしサイクル毎の増幅は、プライマーのアニーリング効率や DNA 鎖の伸長反応の効率が 100% ではないことなどの要因によって、必ずしも 2 倍にならない。このことを考慮すると、n サイクル毎の瞬間増加率を E' とした場合は、反応速度を dI/dn とした次の微分方程式(Eq.A-5-2)で与えられる。

$$dI/dn = E' \times I \quad \dots\dots\dots (\text{Eq.A-5-2})$$

仮に E' がほぼ一定の値をとると考えて、 E' を定数として Eq.A-5-2 を解くと、単純に次式(Eq.A-5-3)が得られる。

$$I = I_0 \times E^n \quad (\text{※} E = e^{E'}) \quad \dots\dots\dots (\text{Eq.A-5-3})$$

これにより、PCR 反応生成物は増幅率を E として指数関数的に増加することが期待される。ここで、実際の PCR でも反応生成物がある程度蓄積するまでは、反応生成物は概ね指数関数的に増加しており、その指数関数的に増加している部分のデータを元に片対数で直線近似を行うと、図 9-5 のようなグラフが得られる。これによると反応生成物が蓄積するまでは、Eq.A-5-3 において増幅率 E を一定とみなしたモデルが妥当であることが分かる。

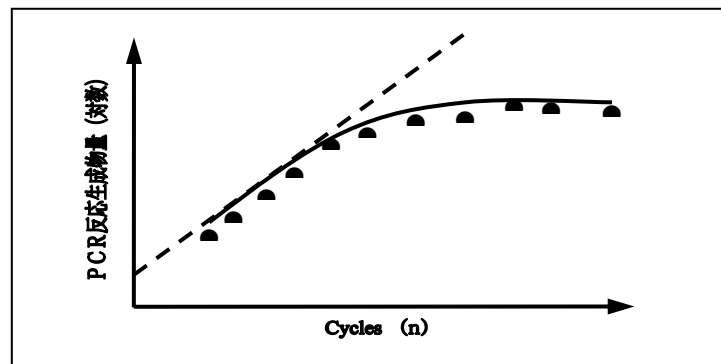


図 9-5 PCR 反応生成物量とサイクル数

しかし、反応が進んで生成物量が増加するにつれて増幅率は低下し、最終的には反応生成物量の増加は頭打ちとなり、一定の値をとるようになる。反応が停止する要因としては次の 5 つが挙げられる。

- i) Taq DNA polymerase の失活
- ii) 反応基質(デオキシヌクレオシド三リン酸)の枯渇
- iii) プライマーの枯渇
- iv) 反応副産物であるピロリン酸による合成反応阻害
- v) 生成した DNA 鎖同士の間によるプライミングの阻害

i) に関しては、同じサイクル数でも反応生成物量の増加が頭打ちになる場合とそうでない場合があることや、一度頭打ちになった反応液にさらに酵素を追加しても通常は反応が進行しないことから、通常の PCR サイクル数(25～30 サイクル)においては主たる限定要因にはなっていないものと考えられる。また、ii)～v)の限定要因については、その効果が反応生成物量に概ね比例するものと考えることが出来る。

以上のことを考慮すれば、一般的に PCR のサイクル数は 30 サイクル前後が良いと言える。もし 30 サイクルで十分な増幅が見られない場合は、35 サイクル程度までサイクル数を増やしてみると良い。

<反応温度と反応時間>

非常に繊細な反応である PCR は、わずかな温度やサイクル数の変化が反応の成否を分けると言っても過言ではない。ここでは、PCR の各段階における一般的な反応温度と反応時間について論ずる。

i) 熱変性(denature)の温度と時間

熱変性は 94℃×30 秒～1 分を標準とするが、液量が少ないために反応液の温度がすぐに高温に達するような場合は、30 秒以下でも十分な場合がある。ちなみに 93℃でも十分な場合が多いが、94℃まで上げておいた方が無難である。また、反応時間が長すぎると、酵素が失活してしまう点にも注意が必要である。

ii) アニーリング(annealing)の温度と時間

アニーリング温度はプライマーの T_m に留意して設定する。時間は通常 1 分で良い。目的とする標的配列以外の非特異的配列が増えるようなら、2℃間隔で温度を上げてみる。全く何も増幅されないようなら、2℃間隔で温度を下げてみると良い。

iii) 伸長反応(extension)の温度と時間

伸長反応は通常 72℃で行う。伸長時間は標的配列の長さによって異なり、1000bp 以下の場合は 1 分で十分だが、それよりも長い配列の場合には 1000bp につき 1 分の割合で長くする。

<Primer>

ここにプライマーの選択のための条件を挙げる。自らプライマーを設計する場合はこれらの点に気を付けなくてはならない。

i) プライマーの長さ

標準的なプライマーは 18～28 塩基対であり、中でも 20～24 塩基対が望ましいとされている。通常この位の長さであれば、鋳型 DNA との特異的なアニーリングに十分であると考えられている。

ii) CG 含有量

プライマー内で G/C 塩基と A/T 塩基がほぼ均一になるように設計することが望ましく、標準的な CG 含有量は 50%である。また、プライマーの 3'端での AT 含有量が多くならないようにする。

iii) T_m 値

T_m(Melting Temperature)とは、PCR において DNA の 2 本鎖が熱変性(denature)して 1 本鎖になる温度のことであり、標準的には 55～80℃である。合成する 2 つのプライマーの T_m 値は同じであることが望ましいと考えられている。T_m 値は A と T では 2℃、C と G では 4℃を目安に計算する。いくつかのプライマーの候補がある場合、通常 T_m の高いものを選ぶ。

iv) プライマー間の相補性

2 つのプライマーの、特に 3'端の間で相補性のないようにする。プライマー

同士ダイマー(2 量体)を形成すると、PCR の効率が低下するためである。

v)プライマー内の二次構造

プライマー内で二次構造をとらないようにする。これは PCR を阻害するばかりでなく、プライマーを独自に合成する際の効率にも影響すると考えられるからである。

< 注意点 >

注意すべきことは、とにかく RNase の混入を防ぐことである。詳しくは 9-6-1 AGPC 法プロトコルを参照のこと。また、PCR 法に特有の注意点として以下の点に気を付けること。

- PROGRAM TEMP CONTROL SYSTEM に各プライマーに対応した PCR program を予め入力しておくこと。
- サイクル数を上下させる場合は 4 サイクル刻みで増減させ、2 サイクル刻みで微調整すること。
- RT product 内に白い沈殿がある場合は、cDNA が壊れてしまっている可能性が高い。そのサンプルで PCR を行っても、結果が得られない場合が多いので注意すること。
- RT 法と同様、Reaction Tube with Cap の扱いに気を付けること。

< 使用機器・器具・試薬 >

- PROGRAM TEMP CONTROL SYSTEM(ASTEC/PC-708)
- MINI CENTRIFUGE(COSTER/MVSS-06618)
- Vortex
- Reaction Tube with Cap(MicroAmp/N801-0540)
- チューブ立て
- マイクロピペッター各種
- チップ各種
- Crash ice 用発泡スチロール
- dATP(Amersham Biosciences/27-2050-01)
- dTTP(Amersham Biosciences/272080)
- dCTP(Amersham Biosciences/272060)
- dGTP(Amersham Biosciences/272070)
- Primer (sense/antisense)各種
- AmpliTaq Gold™(Applied Biosystems/N808-0242)
- 10x PCR buffer(PERKIN ELMER/E12387)
- DEPC 処理水

- Crash ice

<PCR Master Mix>

【 全て氷上操作 】

表 9-4 に従い、各試薬を混合し PCR Master Mix を作製する。プライマーは目的に応じて変更する(3 方法の表 3-1 参照)。RT Master Mix と同様に、サンプル数が多い場合は 1、2 サンプル分余分に PCR Master Mix を作製すること。また、AmpliTaq Gold™は各サンプルに加える直前に添加すること。

表 9-4 PCR Master Mix (単位:μl)

sample数	1	6(+1)	9(+2)	12(+2)	18(+3)	24(+4)
dTP(2.5mM)	1	7	11	14	21	28
dTP(2.5mM)	1	7	11	14	21	28
dTP(2.5mM)	1	7	11	14	21	28
dTP(2.5mM)	1	7	11	14	21	28
Primer(sense)(20μ M)	1.25	8.75	13.75	17.5	26.25	35
Primer(antisense)(20μ M)	1.25	8.75	13.75	17.5	26.25	35
10x PCR buffer	5	35	55	70	105	140
DEPC処理水	36.25	253.75	398.75	507.5	761.25	1015
AmpliTaq Gold™	0.25	1.75	2.75	3.5	5.25	7
合 計	48	336	528	672	1008	1344

<Polymerase Chain Reaction>

【 全て氷上操作 】

- ① 各サンプルを扱う直前に PCR Master Mix(AmpliTaq Gold™抜き)を作製する。
- ② RT 法により作製した各 RT product から 2μl ずつ採取し、予め用意しておいた Reaction Tube with Cap に移し入れる。
- ③ PCR Master Mix に AmpliTaq Gold™を加え、Vortex による攪拌と MINI CENTRIFUGE による軽い遠心を行う。
- ④ ②で用意したチューブに PCR Master Mix を 48μl ずつ加え、Vortex による攪拌と MINI CENTRIFUGE にて 1 分間遠心を行う。

※ GeneAmp® PCR system 2400(サーマルサイクラー)を使用する場合、PCR 中にサンプルが蒸発して組成が変化するのを防ぐため、この時点で各サンプルの液面に MINERAL OIL(SIGMA/M5904)を 50μl ずつ壁伝いにゆっくりと流し込む。

⑤ PROGRAM TEMP CONTROL SYSTEM にサンプルをセットし、各プライマーに合った PCR program を実行する。

⑥ 作成した PCR product は-20℃の冷凍庫にて保存する(数ヶ月保存可)。

9-5-4.Gel Electrophoresis

<原理>

核酸やタンパク質などの生体高分子を分析する手段として、電気泳動法は極めて有効な技術の一つである。電解液を含むアガロースやポリアクリルアミドなどのゲルに電場をかけると、その中を荷電粒子が移動する。このとき荷電粒子の大きさ、形、荷電量などの違いによって、粒子の移動速度に差が生じる。この移動速度の差を利用して様々な分子を分離する方法が電気泳動法である。

核酸を構成しているヌクレオチドは、塩基とリン酸基が電離して電荷を帯び易い。2 本鎖 DNA の場合、塩基の電荷は相補鎖間の水素結合で互いに打ち消し合っているため、分子全体としてはリン酸基のマイナス電荷のみが主となる。また、このリン酸基の個数(荷電)はヌクレオチド数(DNA の分子量)に比例するため、全ての DNA 分子は質量あたり一定の力で引かれることになる。さらに、こうして 2 重螺旋構造をとっている DNA は塩基配列に関わらず同じ線状分子の形をしており、立体構造は泳動度にほとんど影響を与えない。即ち、唯一泳動度に影響を与えるのが分子の大きさ(長さ)ということになる。

鎖状分子の DNA はゲルマトリックスの網の目の隙間を移動する際、分子量の大きな長い分子ほどマトリックスへの引っ掛かり(マトリックス分子との相互作用)が増えるため泳動速度が遅くなる。従って、2 本鎖 DNA の電気泳動の場合、DNA の塩基配列に関係なく、DNA 鎖の長さのみに依存した電気泳動パターン(即ち、長いものほど泳動距離が短い)が得られる。

<注意点>

AGPC 法、RT 法、PCR 法に比べそれほど神経質にならなくても良いが、ゴム手袋(両手が better)と白衣は必ず着用すること。RNase の混入を防ぐ意味もあるが、ここではむしろ Ethidium Bromide から身を守るためにあると言っても良い。

☞ Ethidium Bromide

Ethidium Bromide は核酸のバンド検出に用いられる蛍光試薬であり、2 本鎖 DNA の鎖の間に挿入(インターカレーション)されるという性質上、DNA の正常な複製や転写を妨げ、突然変異誘起させるという効果から強力な発癌作用と毒性が生まれる。取り扱いには必ずゴム手袋をはめ、粉末の計量にはマスクを着用すること。また、Ethidium Bromide を含んだ泳動用 buffer などの廃液やアガロースゲル、廃チップや廃ビンには必ず他のものと区別して集め、適切な処置を施してから廃棄すること。もしくは業者に委託して廃棄してもらうこと。

また、電気泳動に特有の注意点として、以下の点に気を付けること。

- 使用する三角フラスコとメスシリンダーは口にアルミホイルで蓋をし、18 0℃、8 時間以上(Over Night)乾熱滅菌を行うこと。

<使用機器・器具・試薬>

- Wide Mini-Sub Cell® GT System(BIO RAD/170-4485)
- POWER PAC 300(BIO RAD/282 BR 11443)
- LIBROR(株式会社 島津製作所/AEL-200)
- 電子レンジ
- ゲル作成用三角フラスコ(100ml)
- メスシリンダー(100ml)
- マイクロピペッター各種
- チップ各種
- アルミホイル
- サランラップ
- PARAFILM®(Pechiney Plastic Packaging, Inc./PM-996)
- フライ返し
- NuSieve® GTG® Agarose(BMA/50080)
- Ultra Pure Agarose(Invitrogen/15510-019)
- 50x TAE buffer(INTERGEN/S4300)
- 10x TAE buffer(Invitrogen/15558-042)
- Ethidium Bromide(SIGMA/E-1510)
- Blue Juice™(Invitrogen/10816-015)
- 123 bp DNA Ladder(Invitrogen/15613-011)
- DEPC 処理水

<Agarose Gel(3% wt/vol)の作製>

- ① Wide Mini-Sub Cell® GT System の Gel caster にゲルトレイをセットし、水準器を用いてゲルトレイが地面に対し水平になるよう調整する。
 - ② NuSieve® GTG® Agarose と Ultra Pure Agarose を秤量し、乾熱滅菌済みのゲル作成用三角フラスコに入れる(表 9-5)。
- ※ 秤量には薬包紙ではなく、乾熱滅菌した三角フラスコの口を包んでいたアルミホイルを用いること。また、アルミホイルの内側は素手で触らないこと。
- ※ 秤量にはスパチュラを用いないこと。
- ③ 50x TAE buffer を乾熱滅菌済みのメスシリンダーに入れ、DEPC 処理水を所定量加えて 50 倍に希釈し 1x TAE buffer (from 50x)を作製する(表 9-5)。

表 9-5 Agarose Gel(3% wt/vol) 作製に必要な試薬の量

NuSieve® GTG® Agarose (g)	1.2	50x TAE buffer (ml)	1.2
Ultra Pure Agarose (g)	0.6	DEPC処理水 (ml)	58.8
合 計 (g)	1.8	合 計 (ml)	60

- ④ ②の三角フラスコに③で調整した 1x TAE buffer (from 50x)を加え、ゲルの塊が出来ないように振り混ぜた後、buffer の蒸発を防ぐためサラララップでフラスコの口を閉じ、電子レンジを用いて加熱しアガロースを溶解させる。
- ※ 細かい気泡が出なくなり、完全に透明になるまで加熱すること。
- ※ 急騰防止のため、様子を見ながら行うこと(目安:1 分毎に止める)。
- ※ 加熱し過ぎで buffer が多量に蒸発した場合、ゲルの濃度が変わってしまうため 1x TAE buffer(from 50x)を適量加えること。
- ⑤ 完全に溶解させたアガロース溶液に Ethidium Bromide を 6.5 μ l 加えてよく振り混ぜた後、ゲルトレイに気泡が出来ないようにゆっくりと流し入れ、気泡が付着しないようにコームをセットする。
 - ⑥ 10 分程度静置しゲルを固めた後、10x TAE buffer を DEPC 処理水で 10 倍に希釈して作製した 1x TAE buffer (from 10x)にてゲル表面を浸し、冷蔵庫に 10 分程度入れて完全に固める。

<Gel Electrophoresis>

- ① 水準器を用いて、地面に対して水平になるように調整した Wide Mini-Sub Cell® GT System の泳動槽に、1x TAE buffer (from 10x)を 600ml、Ethidium Bromide を 20 μ l 加える。
- ② 完全に固まったゲルからコームを慎重に抜き取り、サンプル側が陰極となるようゲルトレイごと泳動槽に移し入れる。
- ※ ゲル本体及び穴が崩れた場合は作り直すこと。
- ③ PARAFILM®を 20cm 程度切り出し、その上に Blue Juice™を 3 μ l ずつ滴下する。
- ※ Blue Juice™はすぐに乾燥してしまうため、1 度に全サンプル分を滴下しない方がよい。
- ④ 123 bp DNA Ladder(3 μ l)は、Blue Juice™(3 μ l)及び 1x TAE buffer (from 50x)(3 μ l)と混合し、ピペティング後にゲルの所定の穴に静かに流し込む。
- ⑤ 各 PCR product から 10 μ l ずつサンプルを採取し、Blue Juice™(3 μ l)に加えた後ピペティングを行い、ゲルの所定の穴に静かに流し込む。
- ⑥ Positive Control を 10 μ l 採取し、所定の位置の Blue Juice™(3 μ l)に加えた後ピペティングを行い、ゲルの所定の穴に静かに流し込む。
- ※ 混合後の溶液(13 μ l)は残さず吸い取り、流し込むこと。
- ⑦ 電流がゲル内を真直ぐに流れるようにゲルトレイの位置を調整する。
- ⑧ 電極を取り付け POWER PAC 300 に接続した後、80V 80mA 70 分の条件で泳動を開始する。

9-5-5.PCR 反応生成物の確認と定量化

<原理>

核酸は 280nm 付近の波長に吸収ピークがある。この核酸の UV 光を吸収する性質は、対象となる 2 本鎖 DNA の内部に Ethidium Bromide 分子を挿入(インターカレート)することで PCR 反応生成物の確認に応用することが出来る。即ち、核酸(ここでは 2 本鎖 DNA)に吸収された 280nm の UV 光が Ethidium Bromide 分子にエネルギー転移されると、励起されて 590nm の蛍光を放射する。Ethidium Bromide 本来の吸収は 300nm なので、この 300nm の波長をあまり含まず、280nm 付近の波長を豊富に含む UV 光で Ethidium Bromide 染色を行ったゲルを照らすと、遊離した Ethidium Bromide 分子は励起されず、インターカレートした分子のみが DNA からのエネルギー転移により励起されて蛍光を発する。つまり、ゲル中で 2 本鎖 DNA が存在する部分のみが光ることになる。この蛍光強度は概ねインターカレートした Ethidium Bromide 分子の

個数に比例し、また、インターカレーションは 2 本鎖 DNA の量(長さ×本数)に比例して起こるため、蛍光強度を測定することでゲル中の DNA 量を推定することが可能になる。但し、測定する 2 本鎖 DNA が全て十分量の Ethidium Bromide と結合し、飽和していなければ、その定量は意味を成さないので注意しなくてはならない。

< 内部標準 >

内部標準とは、それぞれ検出したサンプル量を補正するために必要となる基準のことである。定量的 PCR 一般において一義的に明らかにされることは、反応系に加えたサンプルに含まれる目的 DNA の相対量であり、絶対量ではない。その絶対量を知るためには、予め絶対量の分かっている DNA で標準サンプルを調整して PCR を行い、目的 DNA と標準サンプルとの相対量を比較する必要がある。この標準となるものを内部標準という。本研究で用いた GAPDH(グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素)は house keeping gene の一種であり、組織によって発現量に差がないため内部標準として用いることが出来る。また、GAPDH の他にも α -actin や β -actin など内部標準としてよく用いられる。

— 補正の具体例 —

2 つのサンプル A、B と遺伝子 X(目的物)、内部標準遺伝子 N を考える。
A と B それぞれにおける X の発現量を比較する場合

- i) 遺伝子 X の定量結果 $A : B = a : b$ だけでは A 中の X は B 中の X の a/b 倍多い(もしくは少ない)量が入っているという「相対量」しか分からない。
- ii) ところが、絶対量が分かっている内部標準遺伝子 N の定量結果 $A : B = m : n$ から A 中の N と B 中の N それぞれの絶対量 m, n を知ることが出来る。また、A 中の N と B 中の N それぞれの相対量(m/n 倍多い、少ない)も知ることが出来る。
- iii) そこで、) で分かった X の相対量を、ii) で分かった N の絶対量で補正すれば X の発現量の絶対量 a/m と b/n を求めることが出来る(表 9-6)。

表 9-6 目的遺伝子の相対量と絶対量

	A	B	量
目的遺伝子X相対値	a	b	相対量
内部標準遺伝子Nの相対値	m	n	絶対量
Nで補正したXの相対値	a/m	b/n	

< 注意点 >

ここでも Ethidium Bromide 汚染の危険性があるため、その扱いには十分注意すること。また、PCR 反応生成物の確認と定量化に特有の注意点として、以下の点に気を付けること。

- ゲルは折れやすいため、無理な力を加えないこと。
- ゲルをイメージアナライザーに付属のプレートに移す際は、隙間に気泡を入れないこと。
- フロッピーディスクに画像データ(jpeg 型式)を記録する際は、自動的にファイル名が連番の番号のみとなるため、大量に撮影する場合はどの画像がどの結果なのか確認できるようにしておくこと。

< 使用機器・器具・試薬 >

- ・ イメージアナライザー一式(TOYOBO/FAS-III)
- ・ Gel-Pro® Analyzer Version 3.1 for Windows™ (Media Cybernetics®/50N31000-11851)
- ・ パーソナルコンピュータ
- ・ フロッピーディスク (Windows®フォーマットのもの)
- ・ サランラップ
- ・ フライ返し

< PCR 反応生成物の確認 >

- ① 電気泳動終了後、ゲルをイメージアナライザーに付属のプレートに移してセットした後、モニタに写ったゲルの位置、被写体の大きさを調整し、カメラのフォーカスを合わせる。
- ② UV トランスイルミネーターより UV 光を照射し、バンドの確認を行う。
- ③ 鮮明なバンドの確認が出来た場合、露光時間を変えて数パターンの写真を撮影し、付属のドライブよりフロッピーディスクに画像データ(jpeg 型式)を記録する。

- ④ **Positive Control** を含め、バンドが確認できなかった場合は、作製したゲルや電気泳動<操作>に問題があったと考えもう一度やり直す。
- ⑤ 記録した画像データをパソコンに移し、画像解析ソフト **Gel-Pro® Analyzer Version 3.1 for Windows™**を用いてバンドの解析を行う。

<データの扱い・処理>

画像解析ソフト **Gel-Pro® Analyzer Version 3.1 for Windows™**を用いて以下の 2 点を解析する。尚、解析<操作>はソフトに付属の取扱説明書に従って行う。

- i)サイズマーカーと比較し、PCR 反応生成物の **Size(bp)**を解析する。
- ii)各泳動レーン内の目的のバンドを選定し、バンドの輝度(**max.OD**)を測定する。

得られた各データ値は内部標準のデータ値で除し、**control** を 1 として補正する。