

定量 PCR 法による簡易肝発がん性予測法のためのプロトコール

Ver. 2016.03.30

目次

1. 遺伝解析用動物実験における留意事項	3
1.1 全般的事項.....	3
1.2 動物実験計画.....	3
1.3 用量設定.....	3
1.4 群構成・動物数.....	3
1.5 麻酔法.....	3
1.6 採材方法.....	3
1.6.1 採材時の留意事項.....	3
1.7 肝臓採材保存法.....	4
2. total RNA 抽出	4
2.1 使用機器及び試薬.....	4
2.2 抽出法.....	4
3. バイオアナライザによる RNA 品質 (分解度) の確認	5
3.1 使用機器及び試薬.....	5
3.2 RNA 品質の確認.....	5
3.3 判定.....	6
4. 定量 PCR 実験	6
4.1 使用機器及び試薬.....	6
4.2 定量 PCR.....	6
4.2.1 逆転写反応 (cDNA 合成).....	6
4.2.2 定量 PCR 反応.....	7
5. 発がん性予測	8
5.1 使用機器及びソフトウェア.....	8
5.2 データ解析及び判定.....	8
6. 参考文献	9

1. 遺伝解析用動物実験における留意事項

1.1 全般的事項

動物実験は毒性実験或いは薬理実験等様々な目的のために実施される。従来の動物実験はその目的によって基本的なプロトコールが定められ、検査法、採材臓器等も様々であるが、従来の動物実験に遺伝子発現解析を導入することにより、これまで得ることのできなかった網羅的な生体応答が検出可能である点で極めて貴重な情報を得ることができる。

本章では遺伝子発現量解析を実施する動物実験における基本的留意事項について述べる。

1.2 動物実験計画

遺伝子発現量解析はいかなる実験設計の動物実験にも適用可能であるが、目的の結果を得るためには、目的に応じて十分に検討された実験設計を用いる必要がある。本手順書で取り上げる発がん性予測、腎・肝毒性評価に関しては化審法 28 日反復毒性試験¹⁾或いは OECD TG407²⁾に従って、実験計画を作成する必要がある。

1.3 用量設定

用量設定は前述のガイドラインに準拠し、対照群に加え、最低 2 用量を設定する。

1.4 群構成・動物数

群構成は前述のガイドラインに準ずるが、遺伝子発現量変化に関して有意差検定を実施するため、各群最低 3 匹を遺伝子解析に供する必要がある。

1.5 麻酔法

遺伝子発現量解析に使用する動物に関しては、実験倫理上麻酔下で屠殺後、採材を行うことになるが、その際遺伝子発現量解析に影響を及ぼさない方法を選択する必要がある。現時点では CO₂/O₂ 麻酔法及びイソフルラン麻酔法は遺伝子発現解析に際し影響を与えないことが確認されている³⁾。

1.6 採材方法

遺伝子発現解析の対象となる RNA は極めて不安定であり、組織中或いは実験者由来の RNA 分解酵素によって容易に分解される。従って、遺伝子解析に用いる試料は採材後速やかに RNA 分解酵素を不活化した条件下、直ぐに RNA 抽出を行わない場合は -80℃ 以下の凍結保存により実験時まで保存する必要がある。

1.6.1 採材時の留意事項

RNA は極めて不安定であり、実験者の汗や唾液に含まれる RNA 分解酵素 (RNase) の混

入によって容易に分解し、目的とする実験結果に影響を与える可能性がある。したがって、RNase の混入を防ぐため RNA 実験に用いる試料の採取を行う際、作業中は清潔なマスクおよびディスポーザブルグローブを着用し RNA 調製専用の実験スペースを設けるなど細心の注意を払う必要がある。また、実験器具に関しては可能な限りディスポーザブルのプラスチック製品を使用し、実験スペース及び実験器具などは市販の RNase 除去剤或いは乾熱滅菌 (180℃、2 時間) によって RNase を不活化することが望ましい。

1.7 肝臓採材保存法

動物を麻酔下で腹部大動脈から放血して安楽死させ、重量を測定後、外側左葉の中央部から (門脈側とその反対側を結ぶ対角線に沿って) 2~3 mm 幅の組織片を採取し、遺伝子発現量解析用に供する。1 組織片の重量が 0.75 g 以下であることを確認した後、それぞれ重量の 5 倍量以上の保存液 (RNAlater、Thermo Fisher Scientific) に浸漬する。

2. total RNA 抽出

2.1 使用機器及び試薬

- ・精密電子天秤 (メトラートレド、AB104-S 等)
- ・TissueLyser (QIAGEN)
- ・NanoDrop1000 (Thermo Fisher Scientific)
- ・miRNeasy Mini Kit (QIAGEN、Cat.No. 217004)
- ・クロロホルム (和光純薬工業、038-02606)
- ・エタノール (和光純薬工業、057-00456)
- ・Nuclease-Free Water (Invitrogen、10977-015 等)

2.2 抽出法

RNAlater 保存した臓器からは、miRNeasy Mini Kit を用いて total RNA の抽出を行う。

- 1) -80℃保存した RNAlater 浸漬臓器サンプルを室温へ移動させ、RNAlater 液を溶解(15~30 分程度)
- 2) 臓器サンプル 5~30 mg を秤量後に分取し、2 mL チューブに入れ、ジルコニアビーズ (1 個) を添加
- 3) 750 µL の QIAzol を添加し、TissueLyser で、25 Hz で 5 分間破砕
ブロック内部を 180 度回転させて TissueLyser に装着し、25 Hz で 5 分間破砕
- 4) 室温に 5 分間放置後、クロロホルム 150 µL を添加
- 5) 15 秒以上ボルテックスし、2 分間放置
- 6) 4℃、13,000 rpm で 15 分間遠心
- 7) 沈殿を取らないよう上清 (400 µL) を新しい 1.5 mL チューブに移す

- 8) 70%エタノールを 400 μL 添加し、よくピペッティング
- 9) コレクションチューブをつけたままの miRNeasy Mini Spin Columns に 700 μL を移し、フタをして、13,000 rpm で 15 秒間遠心し、廃液を除去
- 10) 同じカラムに残りの液を移し、13,000 rpm で 15 秒間遠心後、廃液を除去
- 11) Buffer RW1 を 700 μL 添加し、13,000 rpm で 15 秒間遠心後、廃液を除去
- 12) Buffer RPE を 500 μL 添加し、13,000 rpm で 15 秒間遠心後、廃液を除去
- 13) Buffer RPE を 500 μL 添加し、13,000 rpm で 15 秒間遠心後、廃液を除去
- 14) 70%エタノールを 500 μL 添加し、13,000 rpm で 15 秒間遠心後、廃液を除去
- 15) 13,000 rpm で 2 分間遠心後、1.5 mL 溶出用チューブへカラムを移動
- 16) RNase free water を 30 もしくは 50 μL 添加し、1 分間静置
- 17) 8,000 rpm で 2 分間遠心し、total RNA を溶出

溶出した total RNA の一部については微量吸光度計 (NanoDrop 1000 等) で吸光度を測定し、RNA 濃度、A260/280 比、及び A260/230 比を算出する。RNA 濃度としては 100 ng/ μL 以上、A260/280 比は 1.8 以上、A260/230 比は 1.5 以上の場合を合格とし、溶出した total RNA 液は分注して一部を 100 もしくは 200 ng/ μL に調製した後、原液とともに -80°C で保存する。

3. バイオアナライザによる RNA 品質 (分解度) の確認

3.1 使用機器及び試薬

- BioAnalyzer 2100 (Agilent Technologies)
- RNA-6000 Nano reagent Kit (Agilent Technologies、PN:5067-1511)
- RNA 6000 Nano LabChip Kit (Agilent Technologies、PN:5067-1511)
- Nuclease-Free Water (Invitrogen、10977-015 等)

3.2 RNA 品質の確認

サンプル調製には、RNA 6000 Nano LabChip Kit を用い、測定には BioAnalyzer 2100 を用いる。

- 1) 100 もしくは 200 ng/ μL に調製した total RNA 溶液を 1 μL 分取し、1 μL の Nuclease-Free Water を加えて 2 倍希釈する
- 2) 550 μL の Nano gel matrix をスピンドリルターに移し、1,500g で 10 分間、室温で遠心
- 3) 65 μL の Nano gel matrix に 1 μL の Nano dye を加え、十分に攪拌 (Gel-Dye Mix の調製)
- 4) RNA ラダー及び供試検体 (2 μL)を 70°C で 2 分間熱変性させ、氷中で 5 分間放置
- 5) 9 μL の Gel-Dye Mix をラボチップの◎マーク(1ヶ所)にアプライし、Chip ステーションのプランジャーを 1 mL の目盛りまで下げ、30 秒間静置
- 6) プランジャーを外して 5 秒間待った後、ラボチップを取り出し、9 μL の Gel-Dye Mix

- を◎マーク(2ヶ所)にアプライ
- 7) 5 μL の Sample buffer を 12ヶ所と▲マーク (1ヶ所)にアプライ
 - 8) 1 μL の RNA Ladder(熱変性済み)を▲マーク (1ヶ所)にアプライ
 - 9) 1 μL の RNA サンプル(熱変性済み)を 12ヶ所にアプライ
 - 10) 専用のボルテックスミキサー (IKE) でラボチップを 2,400 rpm で 1 分間攪拌後、BioAnalyzer 2100 にラボチップを装着し、測定を開始 (約 30 分間)

3.3 判定

測定結果から、マイクロアレイ実験に供することができる基準である RIN (RNA Integrity Number) 値を算出し、7.0 以上であることを確認する。

4. 定量 PCR 実験

定量 PCR の手法は Saito F らの手法に従う⁴⁾。

4.1 使用機器及び試薬

- ThermoScript III Reverse Transcriptase (Life Technologies、SKU#12236-014)
- DNase/RNase-Free Distilled Water (Invitrogen、10-977-015) 等
- SYBR Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) (Takara bio、RR420S)
- Applied Biosystems 7000/7500 Real-time PCR system (Life Technologies) 等
- ヒートブロック (ASTEC BI-525A 等)

4.2 定量 PCR

4.2.1 逆転写反応 (cDNA 合成)

- 1) 氷上で 500 ng~5 μg の mRNA を 1.5mL の DNase-RNase free tube に入れ、DNase-RNase free water で 9.0 μL に調製する
- 2) 以下の試薬を混合して「プライマーMix」を作製し、全量を添加する

プライマーMix	1 反応
Oligo (dT) ₂₀ Primer	0.5 μL
Random-hexamer Primer 又は Random primer	0.5 μL
dNTP mix (10 mM)	2.0 μL
	3.0 μL

- 3) タッピングにより混合し、ヒートブロックで 65°C で 5 分間反応後、on ice で 3 分間冷却する

- 4) 以下の試薬を混合して「RT マスターMix」を作製し、全量を添加する

RT マスターMix	1 反応
5×First-Strand Buffer	4.0 μL
0.1M DTT	1.0 μL
RNaseOUT (40 unit/μL)*	1.0 μL
DEPC-treated water	1.0 μL
ThermoScript™ RT (15 units/μL)*	1.0 μL
*氷冷保存	8.0 μL

- 5) ヒートブロックで 25°C, 10 分→55°C, 60 分→85°C, 5 分で反応させた後、on ice で 5 分間以上冷却する

- 6) 使用時まで-20°C以下で保存する

4.2.2 定量 PCR 反応

4 種の予測遺伝子 (Abcb1b、Eprs、Map3k8 及び Igh-6) の特異的なプライマー 配列 (表 1) を用いて Real-time PCR を行う。なお、遺伝子発現量は CT (threshold cycle) 値を用いて、内部標準遺伝子である Gapdh の発現量に対する相対値を算出する。

- 1) cDNA の出発量は 50 pg~5 ng/μL として、DNase-RNase free water で濃度調製する (同一サンプルでは cDNA の出発量は測定対象遺伝子と内部標準遺伝子は同一濃度とする)

- 2) 96 well プレートに各サンプルの cDNA (1 μL/ well) を添加する

- 3) 以下の試薬を混合して「RT マスターMix」を作製し、全量を添加する

Q-PCR マスターMix	1 反応
SYBR Premix Ex Taq II (2×)*	10.0 μL
10 □□□ Forward Primer (終濃度: 0.4 μM)	0.8 μL
10 □□□ Reverse Primer (終濃度: 0.4 μM)	0.8 μL
ROX Reference Dye (50×)	0.4 μL
ddH ₂ O	7.0 μL
*氷冷保存	19.0 μL

4) 以下の定量 PCR 条件で反応させる

ステップ	温度	時間	回数
熱変性	95°C	00:30	1 回
定量 PCR 反応	95°C	00:05	35 回
	50~60°C*	00:34	
解離反応	95°C	00:15	1 回
	60°C	1:00	
	95°C	00:15	

* プライマーのアリーニング温度に応じて設定する.

5) [オプション] 融解曲線解析として「95 °C→55 °C」で反応させる

表 1 定量 PCR 測定に用いた遺伝子名及びプライマー配列

Gene symbol	GeneName	Gene ID	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Amplicon size (bp)
Abcb1b	ATP-binding cassette, subfamily B (MDR/TAP), member 1B	24646	TCATGAGCTGGGA GTATTTGAGG	GTCTCTGAAGG CTTCTCGTCTTG	130
Igh-6	immunoglobulin heavy chain 6	299357	GAATGGAACCTCCG GAGAGAC	GTGTGGGTTTA CCAGTGGAC	103
Eprs	glutamyl-prolyl-tRNA synthetase	289352	CCGATTGCCATCCG TCCTA	GCACCGATGGT TGAGCCTGA	102
Map3k8	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 8	116596	GCCCAGTCTGATG ACCATGTG	GCAGCGACTCT GAATGTTCCCTT	62
Gapdh	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	24383	GGCACAGTCAAGG CTGAGAATG	ATGGTGGTGAA GACGCCAGTA	143

5. 発がん性予測

5.1 使用機器及びソフトウェア

- ・ Microsoft Excel (Microsoft)

5.2 データ解析及び判定

4 種の予測遺伝子の CT 値の Gapdh の CT 値に対する相対値について媒体対照群及び化合物投与群の平均値を算出した後、各遺伝子について媒体対照群に対する化合物投与群の比率（発現比）を算出する。Abcb1b、Igh-6、Eprs の何れかで 2 倍以上もしくは Map3K8 で 0.5 倍以下の発現比を示した場合、動物試験に供した化合物は肝発がん性物質、何れの予測遺伝子も閾値（2 倍以上もしくは 0.5 倍以下）を越えない場合は非発がん性物質と判定する。

6. 参考文献

- 1) Ministry of Economy, Trade and Industry. Act on the Evaluation of Chemical Substances and Regulation of Their Manufacture, etc, Chemical Substances Control Law. 2009.
- 2) OECD. OECD GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS (TG 407) Repeated Dose 28-Day Oral Toxicity Study in Rodents. 2008.
- 3) Yamashita K, Matsumoto H, Saito F, Takeyoshi M. Differences in gene expression profiles in liver caused by different types of anesthesia: cases of CO₂-O₂ and isoflurane. J Toxicol Sci. 2015;40(6):829-36.
- 4) Saito F, Matsumoto H, Akahori Y, Takeyoshi M, Simpler alternative to CARCINOscreen® based on quantitative PCR (qPCR). J Toxicol Sci. (*in press*)