



NHEK (NB) 分化誘導における遺伝子発現解析

1. 試薬

- 細胞 : NHEK(NB)(新生児包皮由来) (Cat No. KK-4009、Strain No. 06942)
培地 : ①増殖培地:Humedia-KG2, Ca²⁺濃度 0.15mM
②分化培地:Humedia-KG2, Ca²⁺濃度 1.5mM(増殖添加剤は BPE と抗菌剤のみ添加)

2. 目的と方法

表皮角化細胞に高濃度のカルシウムを作用させて分化誘導すると、細胞の増殖が抑制され形態が大きく変化することが知られている。このときの細胞内の遺伝子発現の変化を DNA マイクロアレイで解析する。取得データを分析し、発現量が大きく変動する遺伝子群と、それらの機能分類を実施する。

培地①を使い T-25 フラスコ 2 枚に上記表皮角化細胞を 2,500 個/cm² で播種し培養 6 日目に細胞を回収、残りの 1 枚については 6 日目から培地②に代えてさらに 5 日間培養後、細胞を回収した。

顕微鏡下で細胞の様子を観察し、写真撮影した。

細胞の回収方法は以下の通り。フラスコ内の培地を除き 4℃に冷却した PBS で洗浄、吸引除去した後、RNA 抽出用試薬の TRIzol Reagent (サーモフィッシャーサイエンティフィック、Cat. 15596-026) を 2ml 添加して細胞を溶解した。細胞溶解液の半量から試薬の取扱説明書に従ってトータル RNA を抽出した。残りの半量は-80℃で保管した (TRIzol 試薬溶解状態で数年の保管が可能)。

トータル RNA の定量と純度検査は吸光度測定により行い、品質(分解度)検査はキャピラリー電気泳動システム(アジレントテクノロジー、Bioanalyzer2100)を使用した。

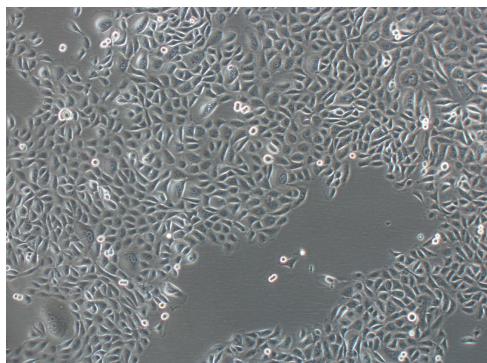
遺伝子発現解析は DNA マイクロアレイ (サーモフィッシャーサイエンティフィック、Clariom S Human Array, cat. 902927) を使用し、トータル RNA100ng を開始サンプルとしてメーカーのプロトコールに従って実施した。

3. 結果

- ・培地①では細胞は順調に増殖し、6 日目では敷石状のコロニーを形成し約 80%コンフルエンスとなっていた。培地②に代えて培養を継続すると、全体的に扁平で核が見えにくい状態へ変化し、一部の細胞は細胞質が抜けた繊維状物が互いにつながった網目状の形態が観察された。
- ・2 つの条件から回収したトータル RNA は、量・純度・品質のいずれについても DNA マイクロアレイ解析に十分であった。
- ・条件①と条件②の遺伝子発現パターンは大きく異なり、条件①と比較して条件②で 7,000 倍以上発現量が上昇した遺伝子や、200 分1程度に発現量が減衰した遺伝子が見られた。
- ・発現量が大きく上昇した遺伝子には、late cornified envelope や small proline-rich protein など角化細胞に特徴的なものがあった。一方、発現量が大幅に減衰した遺伝子には histone cluster 1 や cell division cycle 20 など細胞周期に関する遺伝子が含まれていました。
- ・発現変動遺伝子群について機能分類をしたところ、亢進群では角化・角質化やペプチドクロスリンク、表皮分化といった機能がリストアップされ、減衰群では有糸核分裂や DNA 複製、細胞分裂がリストアップされた。

＜細胞形態＞

① 増殖培地 6 日目



② 分化誘導 (増殖培養の後 5 日目)

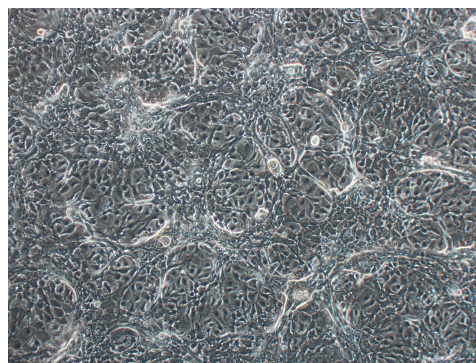
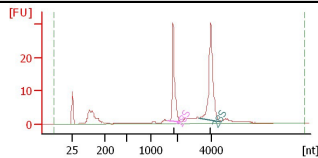
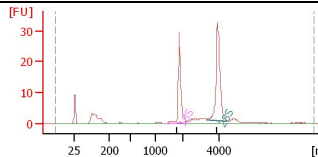


図1. 顕微鏡観察画像

＜RNA 抽出＞

培養条件	回収量(μg) 純度 (A260/A280) 純度 (A260/A230)	品質 (分解度)
培地 ① : HuMedia-KG2 植込み濃度: 2,500 個/cm ² 培地交換: 1, 3, 5 日目 6 日目に細胞回収。	32.5 (μg) 2.02 2.05	 RIN: 9.7
培地①で 6 日間培養後、 培地② (Ca ²⁺ 濃度 1.5mM、 増殖添加剤は BPE と抗菌 剤のみ) へ交換。 培地交換: 1, 4 日目 5 日目に細胞回収。	32.2 (μg) 2.04 1.86	 RIN: 10.0

*RIN: RNA Integrity Number RNA の品質を表す指標。1～10 まで小数点 1 桁

＜遺伝子発現解析＞

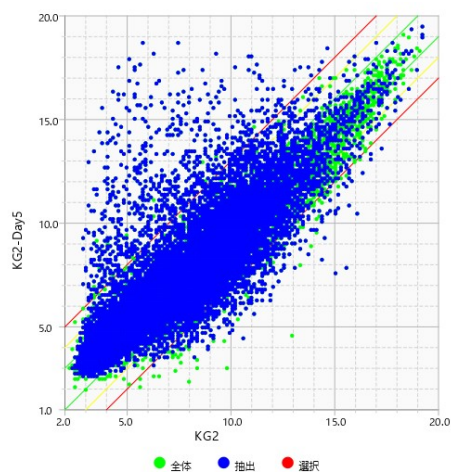


図2. スキャタープロット

横軸は①増殖培地で培養した時の遺伝子発現量を、縦軸は②分化誘導培地で培養したときの遺伝子発現量を表す。各点が遺伝子に相当し、DNA マイクロアレイの蛍光シグナルを投影している。

表 1. 発現変動遺伝子リスト

条件①を対照として条件②の発現量を相対比 (Log₂) で算出した。

発現変動の倍率が 4 倍以上の遺伝子数は、解析総数 21,448 のうち亢進が 1,269 個、減衰が 1,595 個であった。亢進および減衰の上位 20 遺伝子を以下に示した。

亢進遺伝子

遺伝子名	変動比 (Log ₂)
Homo sapiens late cornified envelope 3D (LCE3D), mRNA	12.9
Homo sapiens heat shock 22kDa protein 8 (HSPB8), mRNA.	12.9
Homo sapiens cysteine-rich C-terminal 1 (CRCT1), mRNA.	12.8
Homo sapiens small proline-rich protein 3 (SPRR3), transcript variant 2, mRNA.	12.1
Homo sapiens late cornified envelope 3E (LCE3E), mRNA.	12.1
Homo sapiens filaggrin (FLG), mRNA.	12.0
Homo sapiens late cornified envelope 6A (LCE6A), mRNA.	11.9
Homo sapiens ribonuclease, RNase A family, 7 (RNASE7), mRNA.	11.9
Homo sapiens suprabasin (SBSN), transcript variant 1, mRNA.	11.9
Homo sapiens small proline-rich protein 2G (SPRR2G), mRNA.	11.8
Homo sapiens late cornified envelope 2C (LCE2C), mRNA.	11.7
Homo sapiens ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal 42kDa, V1 subunit C2 (ATP6V1C2), transcript variant 1, mRNA.	11.6
Homo sapiens family with sequence similarity 180, member A (FAM180A), mRNA.	11.3
Homo sapiens keratinocyte proline-rich protein (KPRP), mRNA.	11.3
Homo sapiens iron/zinc purple acid phosphatase-like protein (PAPL), mRNA.	11.3
Homo sapiens small proline-rich protein 2E (SPRR2E), mRNA.	11.2
Homo sapiens late cornified envelope 2A (LCE2A), mRNA.	10.9
Homo sapiens solute carrier family 6 (amino acid transporter), member 14 (SLC6A14), mRNA.	10.7
Homo sapiens late cornified envelope 1A (LCE1A), mRNA.	10.7
Homo sapiens keratin 23, type I (KRT23), transcript variant 2, mRNA.	10.7

減衰遺伝子

遺伝子名	変動比 (Log ₂)
Homo sapiens histone cluster 1, H2bm (HIST1H2BM), mRNA.	-7.6
Homo sapiens lectin, galactoside-binding, soluble, 1 (LGALS1), mRNA.	-7.5
Homo sapiens interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1 (IFIT1), transcript variant 2, mRNA.	-6.2
Homo sapiens FK506 binding protein 5 (FKBP5), transcript variant 2, mRNA.	-6.1
Homo sapiens tissue factor pathway inhibitor 2 (TFPI2), transcript variant 2, mRNA.	-5.6
Homo sapiens SAM domain and HD domain 1 (SAMHD1), mRNA.	-5.6
Homo sapiens fatty acid desaturase 2 (FADS2), transcript variant 2, mRNA.	-5.5
Homo sapiens cell division cycle 20 (CDC20), mRNA.	-5.3
Homo sapiens polo-like kinase 1 (PLK1), mRNA.	-5.3
Homo sapiens lymphocyte antigen 6 complex, locus E (LY6E), transcript variant 2, mRNA.	-5.3
Homo sapiens chromosome 14 open reading frame 1 (C14orf1), mRNA.	-5.2
Homo sapiens primase, DNA, polypeptide 1 (49kDa) (PRIM1), mRNA.	-5.2
Homo sapiens EGF containing fibulin-like extracellular matrix protein 1 (EFEMP1), transcript variant 2, mRNA.	-5.2
Homo sapiens interferon-induced protein 44-like (IFI44L), mRNA.	-5.2
Homo sapiens transmembrane protein 97 (TMEM97), mRNA.	-5.1
Homo sapiens thioredoxin interacting protein (TXNIP), transcript variant 1, mRNA.	-5.0
Homo sapiens alanyl (membrane) aminopeptidase (ANPEP), mRNA.	-5.0
Homo sapiens ubiquitin-conjugating enzyme E2T (UBE2T), transcript variant 2, mRNA.	-5.0
Homo sapiens centrosomal protein 55kDa (CEP55), transcript variant 2, mRNA.	-5.0
Homo sapiens selenoprotein N, 1 (SEPN1), transcript variant 1, mRNA.	-4.9

表2. 機能分類リスト

条件①に対して条件②で発現量が 4 倍以上変動した遺伝子群について、Gene Ontology に基づく遺伝子分類を行った。分析は公開ツールである DAVID Bioinformatics Resources (<https://david.ncifcrf.gov/>)を使用した。

発現亢進した遺伝子群に特徴的な生物プロセス

Term	Count	%	List Total	Pop Hits	Pop Total	FDR
GO:0030216~keratinocyte differentiation	43	3.5	1076	76	16792	6.9.E-27
GO:0031424~keratinization	34	2.8	1076	48	16792	2.0.E-25
GO:0018149~peptide cross-linking	31	2.5	1076	50	16792	1.8.E-20
GO:0008544~epidermis development	35	2.8	1076	85	16792	3.5.E-16
GO:0061436~establishment of skin barrier	13	1.1	1076	18	16792	4.4.E-08
GO:0006915~apoptotic process	76	6.2	1076	567	16792	9.1.E-07
GO:0043065~positive regulation of apoptotic process	44	3.6	1076	300	16792	3.0.E-04
GO:0045944~positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	98	8.0	1076	981	16792	4.6.E-03
GO:0000122~negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	77	6.3	1076	720	16792	4.6.E-03
GO:0016579~protein deubiquitination	20	1.6	1076	99	16792	5.5.E-03
GO:0006687~glycosphingolipid metabolic process	13	1.1	1076	45	16792	6.2.E-03
GO:0048661~positive regulation of smooth muscle cell proliferation	15	1.2	1076	60	16792	6.2.E-03
GO:0046513~ceramide biosynthetic process	9	0.7	1076	25	16792	3.1.E-02

発現減衰した遺伝子群に特徴的な生物プロセス

Term	Count	%	List Total	Pop Hits	Pop Total	FDR
GO:0007067~mitotic nuclear division	76	4.9	1409	248	16792	3.31E-20
GO:0051301~cell division	91	5.9	1409	350	16792	1.64E-19
GO:0006260~DNA replication	55	3.6	1409	155	16792	1.56E-17
GO:0007062~sister chromatid cohesion	36	2.3	1409	103	16792	1.85E-10
GO:0000722~telomere maintenance via recombination	20	1.3	1409	32	16792	2.87E-10
GO:0006281~DNA repair	56	3.6	1409	235	16792	1.02E-09
GO:0006335~DNA replication-dependent nucleosome assembly	18	1.2	1409	32	16792	4.15E-08
GO:0051290~protein heterotetramerization	20	1.3	1409	42	16792	1.02E-07
GO:0000731~DNA synthesis involved in DNA repair	18	1.2	1409	35	16792	1.87E-07
GO:0006303~double-strand break repair via nonhomologous end joining	24	1.6	1409	63	16792	1.87E-07
GO:0031145~anaphase-promoting complex-dependent catabolic process	27	1.8	1409	79	16792	1.87E-07
GO:0000724~double-strand break repair via homologous recombination	26	1.7	1409	74	16792	1.96E-07
GO:0006271~DNA strand elongation involved in DNA replication	12	0.8	1409	15	16792	4.04E-07