

## 論文内容の要旨

報告番号		氏名	岡村 建祐
RT-qPCR analyses on the osteogenic differentiation from human iPS cells: An investigation of reference genes (和 訳) ヒトiPS細胞の骨分化誘導における逆転写-定量的リアルタイムPCR (RT-qPCR) で用いる参照遺伝子についての検討			

### 論文内容の要旨

逆転写-定量的リアルタイム PCR (RT-qPCR) 法は、遺伝子発現の定量によく用いられるが、その正確な評価には参照遺伝子による標準化が不可欠である。慣習的には glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) や  $\beta$ -actin (ACTB) が参照遺伝子として使用されている。本研究では、ヒト人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) の骨分化誘導実験における RT-qPCR の適切な参照遺伝子について検証した。ヒト iPS 細胞を未分化維持培地で培養し、confluent に達した時点から 28 日間骨分化誘導培地で培養した。培養中のサンプルから RNA を抽出し、未分化マーカー・骨芽細胞および骨細胞分化マーカー・参照遺伝子候補である 14 種類の内在性コントロール遺伝子についての RT-qPCR を行った。各内在性コントロール遺伝子の発現安定性は、異なる 4 つのアルゴリズムに従い解析を行った。また、最終的な骨分化を確認するために Alizarin Red S 染色および alkaline phosphatase (ALP) 染色を行った。RT-qPCR の結果から、それぞれのアルゴリズムで各内在性コントロール遺伝子の発現安定性を評価し、それらの順位を相乗平均し総合順位を算出したところ、安定性の高いものから順に、TATA box binding protein (TBP), transferrin receptor (TFRC), ribosomal protein, large, P0 (RPLP0) となり、最も低いものは beta-2-microglobulin (B2M) となった。TBP を参照遺伝子として他のマーカーの発現量を標準化した結果や、Alizarin Red S 染色および ALP 染色の結果は、ヒト iPS 細胞からの骨分化が進んだことを示唆した。この結果から、ヒト iPS 細胞の骨分化誘導実験における RT-qPCR の参照遺伝子として、TBP・TFRC・RPLP0 を単一または組み合わせて用いるべきであることが示唆された。また、慣習的に使用されてきた遺伝子の中には発現安定性が低いものもあったため、各々の組織・細胞・実験デザインごとに適した参照遺伝子を選択するために、参照遺伝子候補の発現安定性の評価をその都度行う必要があると考えられる。