

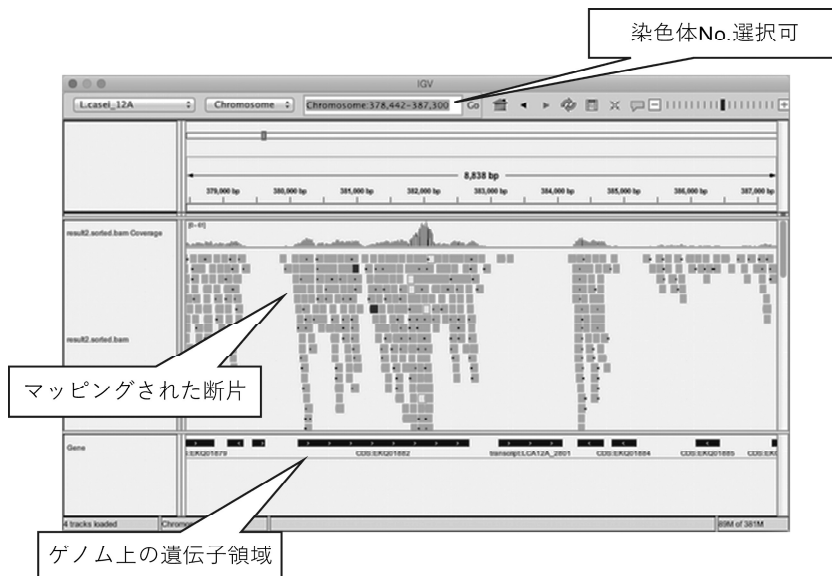


図3 IGVによるデータ表示

■設定手順

1. BAMトラックの左側（名前の部分）を右クリック
2. “Sashimi Plot” または “Splice Junctions” を選択
3. 表示レベルを調整（“Show Junctions” など）

これで、

- エクソン間をつなぐアーチ状の線
- その線の上に「何本のリードがまたいだか」の数字 が表示される。

■スプライシングの読み取り方

エクソンスキッピング (Exon skipping)

- あるエクソンにリードがほとんど乗らない
- そのエクソンを飛び越える大きなアーチが見える→ スキップされている可能性が高い

■イントロン保持 (Intron retention)

- 本来リードが乗らないイントロン領域に多数のリードがマッピング
- スプライスジャンクションが弱い（または消失）→イントロンが除去されず残っている可能性

■代替 5'/3' スプライスサイト

- エクソンの端に複数の異なるジャンクションが見える
- アーチが複数方向に分岐している→ alternative splice site の利用が示唆される

2.3 細胞培養

- ① 細胞種：新生児由来の正常ヒト表皮角化細胞（NHEK，クラボウ社）
- ② 細胞培養条件：細胞増殖培地を用いて，37℃，5% CO₂ 環境下で培養する。

2.4 試験操作

- ① トリプシン処理により回収した細胞を， 7.5×10^4 cells/mL になるように細胞増殖培地で懸濁し，200 μ L ずつ 48 穴コラーゲンコートプレートに播種し，一晚培養する。
- ② 細胞が定着したことを確認し，培地を試験培地 200 μ L ずつに交換し，24 時間培養する。
- ③ 培地を除去し，0.1 μ M MDA 相当量になるように調製した SQ-OOH 溶液および被験試料を溶解した試験培地を，400 μ L ずつ添加し，24 時間培養する。このとき，SQ-OOH 溶液や被験試料の無添加群も準備しておく。
- ④ 培養上清中の PGD₂ 量を PGD₂ ELISA Kit（Cayman Chemicals 社）を用いて定量する。
- ⑤ 細胞数測定のために，残りの培養上清を除去し，100 μ L の細胞固定液を添加し，室温で 30 分間静置する。
- ⑥ 細胞固定液を捨て洗浄後，100 μ L の核染色液を添加し，室温・遮光下で 30 分静置する。
- ⑦ 蛍光顕微鏡下で核数を計測し，細胞数とする。
- ⑧ 細胞当たりの PGD₂ 産生量を算出し，SQ-OOH 非刺激に対するパーセンテージとして表現し SQ-OOH 刺激による PGD₂ 産生量の変化を比較する（図 3）。

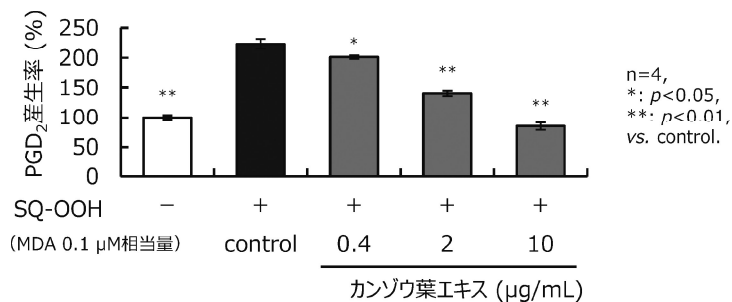


図3 SQ-OOH 刺激による PGD₂ 産生増加とカンゾウ葉エキスの抑制作用

を作製し、TJ形成能への影響をTEERにより評価する方法（図1）を紹介する。分化誘導時にNSCsへコルチゾールを処理するとTJ形成能は低下するが、事前に連続したコルチゾール処理を受けていたCSCsでは、TJ形成能がさらに低下する。この現象は同様にコルチゾール処理を受けているが、一過性であったTSCsでは認められない（図2）。よって、CSCsが慢性ストレスモデルとして有用であることが示唆され、コルチゾールによるTEERの低下を指標に慢性ストレスによるバリア機能低下を抑制する素材の評価が可能である。その一例として、CSCsの分化

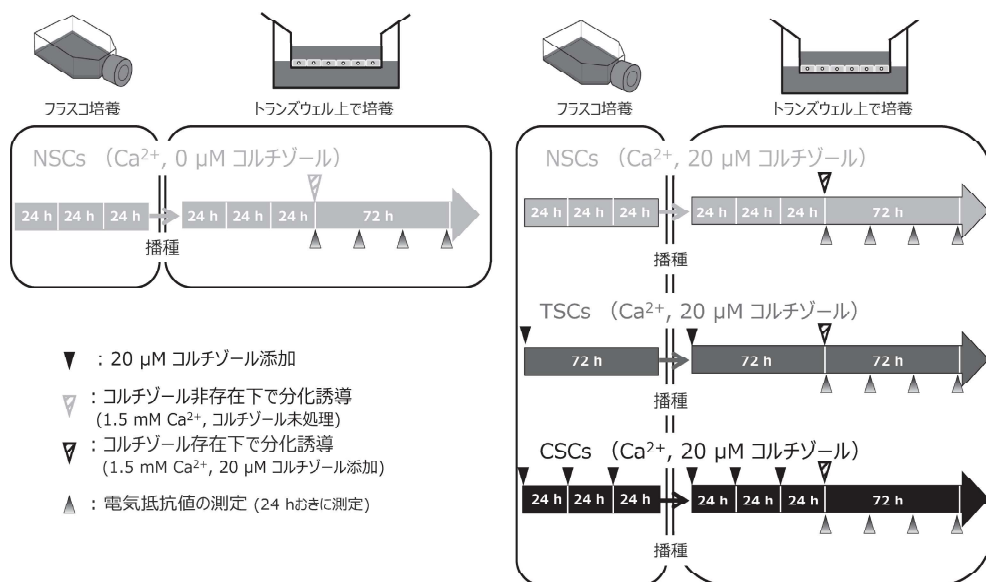


図1 コルチゾール処理頻度の差に基づいたストレス評価モデルの作成手順

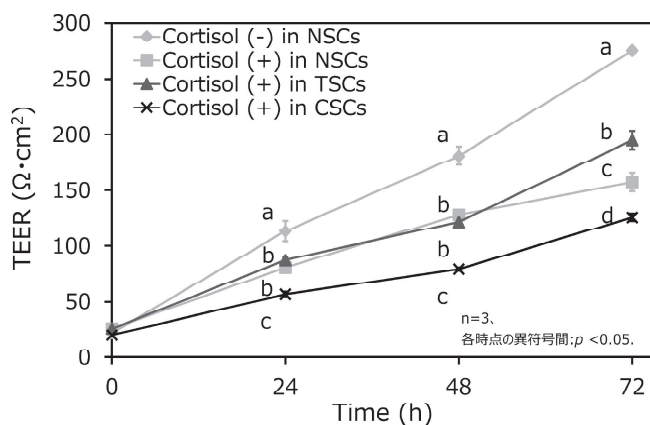


図2 各モデル細胞に対する分化誘導時のコルチゾール処理によるTEER変化