

## — 綜 説 —

整形外科学領域における逆転写一定量 PCR (RT-qPCR) 法で使用する  
安定な参照遺伝子選択の重要性渡部 寛<sup>1,2</sup> 石井 寛高<sup>2</sup> 大島 康史<sup>1</sup> 高井 信朗<sup>1</sup> 小澤 一史<sup>2</sup><sup>1</sup>日本医科大学大学院医学研究科整形外科学分野<sup>2</sup>日本医科大学大学院医学研究科解剖学・神経生物学分野Stable Reference Gene Selection for Reverse Transcription-Quantitative PCR (RT-qPCR) Analyses in  
Orthopaedic ResearchHiroshi Watanabe<sup>1,2</sup>, Hirotaka Ishii<sup>2</sup>, Yasushi Oshima<sup>1</sup>,  
Shinro Takai<sup>1</sup> and Hitoshi Ozawa<sup>2</sup><sup>1</sup>Department of Orthopaedic Surgery, Nippon Medical School<sup>2</sup>Department of Anatomy and Neurobiology, Nippon Medical School

## Abstract

Reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) is a simple and effective method to quantify RNA molecules. This technique has become an essential tool to determine gene expression profiles in target cells and tissues. Although RT-qPCR is highly sensitive and specific, it requires appropriate selection of optimal reference genes for normalization to assure accurate and reliable results. In our recent study, we assessed expression stability of the candidate reference genes for normalization in the synovium of knee osteoarthritis and evaluated the impacts of the reference gene choice on gene expression profiles. In the present manuscript, we will introduce our recent article, explain the way to select suitable reference genes for normalization of RT-qPCR data, and review the suitable reference genes for RT-qPCR analyses in orthopaedic research.

(日本医科大学医学会雑誌 2019; 15: 24-31)

**Key words:** normalization, orthopaedic surgery, osteoarthritis, reference gene, synovium

## 緒 言

定量PCR(quantitative polymerase chain reaction, qPCR)法は、簡便で正確かつ標的DNAを特異的に検出可能な定量法であり、すでに医学・生物学分野では広く普及している。さらに、逆転写反応を組み合わせた逆転写一定量PCR(reverse transcription-

qPCR, RT-qPCR)法は、簡便・正確かつ特異性の高いRNA定量法となり、遺伝子発現定量解析に欠かせない実験技術である。

遺伝子発現定量解析では、試料間のばらつきを補正するために組織・細胞間で発現が一定と考えられる参照遺伝子を選定する。そして、標的遺伝子と参照遺伝子との発現量比をとることで規格化を行う。RT-qPCR法を用いた遺伝子発現定量解析においても、細胞を構

Correspondence to Hirotaka Ishii, Department of Anatomy and Neurobiology, Nippon Medical School, 1-1-5 Sendagi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8602, Japan

E-mail: hirotaka@nms.ac.jp

Journal Website (<http://www2.nms.ac.jp/jmanms/>)

成し、多くの組織や細胞で共通に一定量発現する「ハウスキーピング遺伝子」を参照遺伝子として用い、規格化を行うことが一般的である。

しかし、qPCR法を用いてさらに正確な定量が可能となったことで、RT-PCR法による半定量的解析で従来使用してきた参照遺伝子の発現が、実は組織・細胞間で異なり、刺激・処置・病態等により変動することが判明してきた。例えば、従来から「ハウスキーピング遺伝子」として広く使用されるGAPDHにおいても、発現量が一定でなく状況により参照遺伝子として使用できないと報告されている<sup>1-3</sup>。そのため、RT-qPCR法を用いた信頼できる発現定量解析を行うには、対象となる組織・細胞、刺激・処置・病態等に応じた発現安定性を示す参照遺伝子の選択が必要となる。qPCR法の再現性を保証するMIQE (minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments) ガイドラインにおいても複数の候補遺伝子の中から発現安定性を示す参照遺伝子を慎重に選択することをRT-qPCR法における必須検討事項としている<sup>45</sup>。さらに、発現安定性などの正当な根拠がない参照遺伝子を使用した発現定量データは受け付けずと投稿規定に明記する学術誌も増加している。そのため、RT-qPCR法を用いた発現定量解析において、発現安定性を示す参照遺伝子の選択は、データの取得・解析と論文投稿に必須の検討項目となりつつある。

近年、われわれはヒト変形性膝関節症滑膜を対象に安定な参照遺伝子の選定を行い、参照遺伝子選択が定量データの解析において非常に重要であることを報告した<sup>6</sup>。そこで、本論説では最適な参照遺伝子の選択方法を概説するとともに、ヒト変形性膝関節症滑膜を例に安定な参照遺伝子選択の重要性を論じ、さらに、整形外科学領域が対象とする組織・細胞における最適な参照遺伝子を紹介する。

## 1. 最適な参照遺伝子の選択法

発現の規格化に最適な参照遺伝子は、対象となる条件下および標的試料において発現のばらつきが少なく、発現安定性を示す遺伝子である。しかし、RT-qPCR法で得られた定量結果には、内因性の発現変動の他に試料採取からPCR反応までの実験過程で生じるばらつきが含まれる。試料採取時の組織・細胞の偏り、採取・保存および抽出時におけるRNAの分解、逆転写反応効率やPCR溶液調製・反応効率などのばらつきが、実験過程で発現データに含有される。そのため、

RT-qPCR法で得られた定量結果のばらつきから発現安定性を直接解析することはできず、実験過程で生じるばらつきを除外して発現安定性を評価する必要がある。

現在、参照遺伝子の発現安定性評価のため、2遺伝子間の発現のばらつきを評価する方法、モデルベースの評価法、便宜的な代表値を設定する方法などが考案されている。発現安定性評価のアルゴリズムとしてgeNorm<sup>7</sup>、Normfinder<sup>8</sup>、BestKeeper<sup>9</sup>が幅広く用いられている。多くの論文ではgeNorm、NormFinder、BestKeeperの3つのアルゴリズムを用いて発現安定性の順位をそれぞれ作成し、それら順位から総合的検討を行い、最適な参照遺伝子を選出している。geNormとNormfinderは解析に絶対定量値を必要とし、BestKeeperでは相対定量値のみでも評価可能である。相対定量結果から便宜的にgeNorm、Normfinder、BestKeeperを用いて安定性を評価するRefFinderソフトウェア<sup>10</sup>も知られている。

以下では発現安定性解析に広く使用されるgeNorm、Normfinder、BestKeeperの3つのアルゴリズムおよびRefFinderソフトウェアの特徴とその使用方法に関する注意点を概説する。

### geNorm

geNormは、2つの参照遺伝子間の発現のばらつきを評価し、発現安定性の低いものを除外しながら安定な参照遺伝子を選択するアルゴリズムである。発現安定性測度Mは、発現のばらつきを反映し、測度の小さいものを安定な参照遺伝子として評価する。geNormでは、2つの参照遺伝子の比較を順に行うため、最終的に安定性の高い候補遺伝子が2つ選択される。さらに、複数の参照遺伝子を組み合わせることで安定性の評価が可能であり、その際は複数の参照遺伝子の幾何平均値を規格化に用いる。そのため、1参照遺伝子で十分な安定性を確保できない場合でも複数の参照遺伝子を組み合わせることで規格化因子の設定が可能である。

### Normfinder

Normfinderは、群内・群間変動を評価するモデルを設定し、発現のばらつきを評価するアルゴリズムである。Normfinderで使用する安定性測度は群内・群間変動を反映し、測度が小さいものを安定な参照遺伝子として評価する。

Normfinder解析では、サンプルサイズが大きい必要があり、少なくとも1群あたり8サンプル以上、参照遺伝子候補として5-10遺伝子を使用して安定性を

Table 1 Expression stability and ranking of seven candidate reference genes, evaluated by geNorm, NormFinder, and BestKeeper algorithms

Reference gene	Comprehensive ranking		geNorm		NormFinder		BestKeeper		
	Geometric mean of ranks	Rank	M value	Rank	Stability value	Rank	SD	Coefficient of correlation	Rank
<i>HPRT1</i>	1.260	1	0.326	1	0.039	1	0.819	0.882	2
<i>GAPDH</i>	2.466	2	0.326	1	0.051	3	0.680	0.813	5
<i>YWHAZ</i>	2.885	3	0.388	3	0.043	2	0.775	0.839	4
<i>SDHA</i>	3.271	4	0.477	5	0.101	7	0.998	0.959	1
<i>ACTB</i>	3.634	5	0.433	4	0.089	4	0.877	0.850	3
<i>RPL13A</i>	6.000	6	0.519	6	0.098	6	0.801	0.803	6
<i>B2M</i>	6.257	7	0.555	7	0.094	5	0.984	0.766	7

(quoted from Ref. [6])

評価することが推奨される。

### BestKeeper

BestKeeper は、2つの評価指標を用いる。まず、各参照遺伝子発現の  $C_q$  (quantification cycle) 値の標準偏差 (standard deviation, SD) を評価指標の1つとする。次に、各試料における参照遺伝子  $C_q$  値の幾何平均値を BestKeeper index として算出し、各参照遺伝子の  $C_q$  値と BestKeeper index 間で評価した Pearson 相関係数をもう1つの指標とする。参照遺伝子の SD 値が大きい場合は、必然的に BestKeeper index のばらつきも大きくなる。その際は、 $SD > 1$  以上を示す遺伝子は除外して再度 BestKeeper index を算出する。そして、 $SD < 1$  かつ相関係数が大きい遺伝子を安定な参照遺伝子として選出する。

geNorm と NormFinder は安定性測度が1つであるため、安定性の順位評価は容易であるが、BestKeeper では、順位評価に SD 値と相関係数の2値を勘案する必要がある。そのため、相関係数が大きく、SD 値も比較的大きい遺伝子では、容易に安定性評価を行えない場合もある。

### RefFinder

RefFinder は、 $C_q$  値から便宜的に geNorm, Normfinder, BestKeeper を実行し、各アルゴリズムにおける安定性の順位を作成した後に、各安定性順位から安定性の総合順位も決定するソフトウェアである。しかし、PCR 法の増幅効率を考慮しないため、元の geNorm と Normfinder アルゴリズムとは異なる結果が出ることもある。さらに、BestKeeper では SD 値を考慮に入れながら相関係数で順位付けを行うべきであるが、RefFinder では SD 値のみから順位を算出

するため、BestKeeper による安定性評価が正しく行われていない。また、RefFinder では総合順位の決定方法が明示されていない。そのため、RefFinder の結果は参考にとどめるべきである<sup>11</sup>。

## 2. 変形性膝関節症滑膜における安定な参照遺伝子選択

われわれは、変形性膝関節症滑膜を用い発現安定性を示す最適な参照遺伝子を選定した<sup>6</sup>。その過程と結果を以下で紹介する。

変形性膝関節症に対する人工膝関節置換術時に破棄される滑膜を採取した (本学倫理委員会承認番号: 26-01-418)。採取した滑膜から total RNA 抽出, cDNA 合成を行い、7個の参照遺伝子 (*ACTB*, *B2M*, *GAPDH*, *HPRT1*, *RPL13A*, *SDHA*, *YWHAZ*) 候補に対し、qPCR 法により、発現定量解析を行った。定量解析は絶対定量法で行い、定量結果を geNorm, NormFinder, BestKeeper の3つのアルゴリズムを用いて解析した (Table 1)。BestKeeper を用いた解析では、 $SD < 1$  を確認し、相関係数を評価指標とした。各アルゴリズムから算出された安定性測度から安定性順位を決定し、さらに、それら順位の幾何平均値から安定性の総合順位を決定した。

geNorm と NormFinder の結果ともほぼ同様の傾向を示した。BestKeeper では、*SDHA* の順位が高く見積もられている。これは、*SDHA* では相関係数と SD 値が高い値を示すからであり、本解析では BestKeeper による安定性順位を  $SD < 1$  を確認後は相関係数のみから判断しているために生じる。geNorm と NormFinder では、SD 値と発現相関の双方を安定性測度に組み込んでおり、SD 値が高い *SDHA* の安定

性順位は geNorm と NormFinder では低く算出される。3つのアルゴリズムから決定された順位の幾何平均値から総合順位を決定すると変形性膝関節症滑膜で最も安定な参照遺伝子は *HPRT1* であり、一方、最も不安定な参照遺伝子は *B2M* であった。

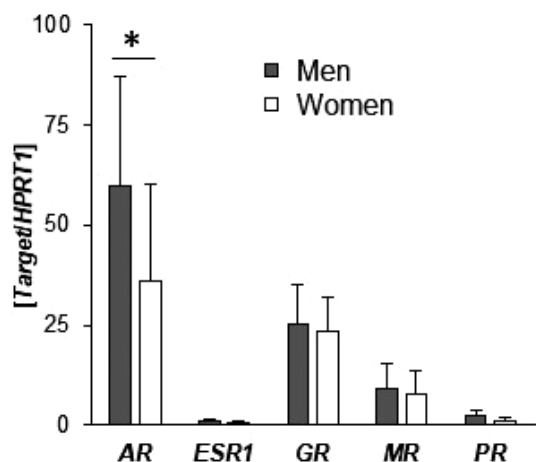


Fig. 1 Sexually dimorphic expression of the steroid receptor genes in the synovium  
Expression of the *AR*, *ESR1*, *ESR2*, *GR*, *MR*, and *PR* genes in the knee osteoarthritis synovium was quantitatively analyzed by RT-qPCR. The expression level of the *ESR2* gene was below the quantification limit (100 copies/40 ng of total RNA). *HPRT1* was used for normalization. Data are presented as the mean ± SD. Student's *t*-test: \*,  $P < 0.05$ . (quoted from Ref. [6])

### 3. 最適な参照遺伝子選択の重要性

変形性関節症は滑膜の炎症を伴い<sup>12-14</sup>、性（女性 > 男性）・肥満（高 BMI）・高齢が発症の危険因子である<sup>15-18</sup>。これらから、変形性膝関節症の発症に炎症性サイトカインや性・副腎皮質ステロイドホルモンの関与が想定される。そのため、変形性膝関節症滑膜に発現する炎症性サイトカイン (*IL1B*, *IL6*) およびステロイドホルモン受容体 (*AR*, *ESR1*, *ESR2*, *GR*, *MR*, *PR*) 遺伝子を対象に発現定量解析を行った。さらに、高い発現安定性を示す *HPRT1* と、不安定な *B2M* をそれぞれ参照遺伝子として規格化に用い、標的遺伝子の発現プロファイルを比較した。

変形性膝関節症滑膜では、ステロイドホルモン受容体遺伝子が  $AR > GR > MR > PR > ESR1$  の順で発現しており、*AR* のみ男性優位な性差が確認された (Fig. 1)。これら発現量の順位および性差は参照遺伝子選択の影響を受けなかった。女性において *AR* および *PR* は BMI と正の相関を示した (Fig. 2)。変形性膝関節症滑膜においてステロイド受容体遺伝子の発現は互いに正の相関を持つが、これら相関は参照遺伝子選択の影響を受け、参照遺伝子が不安定なものほど乖離が大きくなることが判明した。

変形性膝関節症滑膜において炎症性サイトカイン遺伝子の発現は性差を示したが、不安定な参照遺伝子である *B2M* で規格化すると *IL6* 遺伝子発現で観察された性差が消失した (Fig. 3)。*IL6* 遺伝子は、*IL-1β* により誘導される<sup>19</sup>。男性では *IL1B* と *IL6* 遺伝子で正の相関が観察されたが、女性ではその相関が観察されな

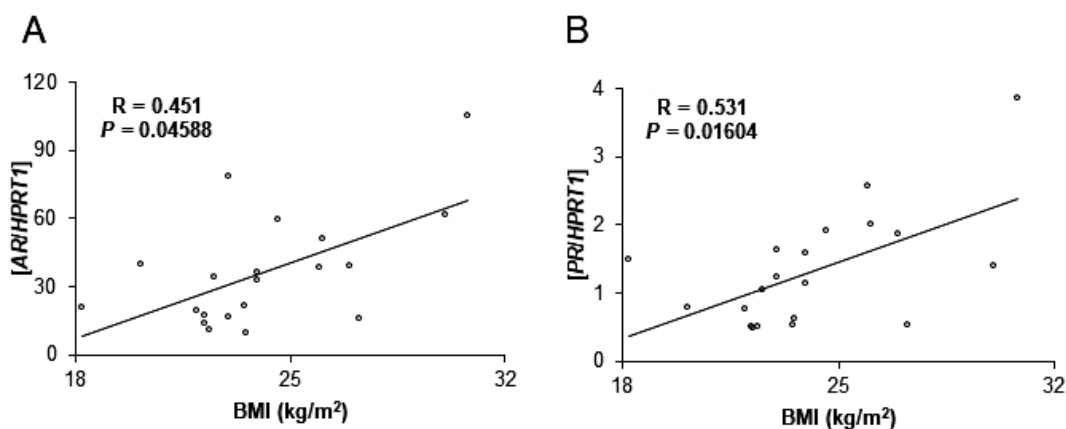


Fig. 2 Correlations between BMI and expression levels of the steroid receptor genes in the synovium  
Correlations between BMI and expression levels of the steroid receptor genes were evaluated in the knee osteoarthritis synovium. Expression levels of the *AR* (A) and *PR* (B) genes in the synovium from women were positively correlated with BMI. (quoted from Ref. [6])

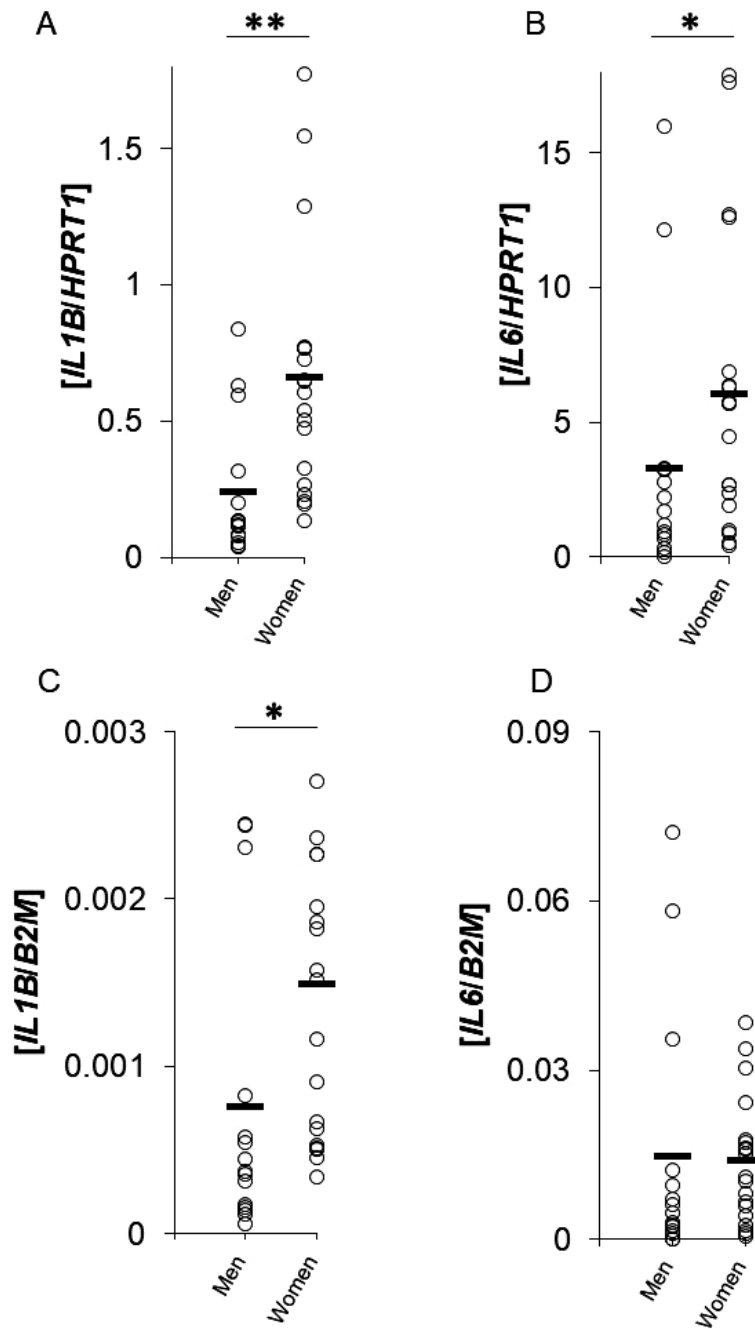


Fig. 3 Impacts of the reference gene selection on expression profiles of the inflammatory cytokine genes in the synovium  
 Expression of the *IL1B* (A and C) and *IL6* (B and D) genes in the knee osteoarthritis synovium was quantitatively analyzed by RT-qPCR. The most suitable and unsuitable reference genes, *HPRT1* (A and B) and *B2M* (C and D), respectively, were used for normalization. Horizontal bars indicate mean. Student's *t*-test: \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ . (quoted from Ref. [6])

かった。その一方で、女性特異的に *IL1B* と *IL6* 遺伝子とがステロイドホルモン遺伝子と負の発現相関を示した。これら相関を模式的に示すと Fig. 4A, 4C となり、これら相関は、他の細胞で解析されたステロイドホルモン作用の報告と一致する<sup>20-22</sup>。しかし、*B2M*

で規格化すると相関関係が Fig. 4B, 4D となり、プロゲステロンが示す抗炎症作用の報告<sup>23</sup>と矛盾する。すなわち、不安定な参照遺伝子 *B2M* で規格化すると、女性優位な *IL6* 遺伝子発現が偽陰性を示し、さらに、遺伝子間の発現相関関係が攪乱される。そのため、

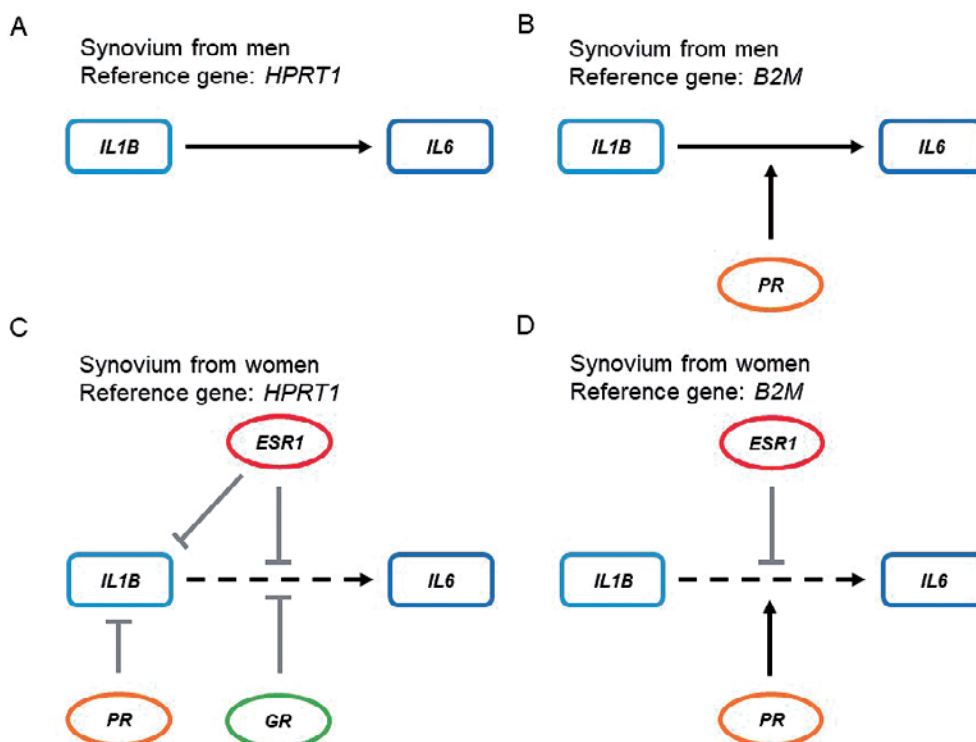


Fig. 4 Relations among the steroid receptor and inflammatory cytokine genes in the synovium

Relations among the steroid receptor and inflammatory cytokine genes in the knee osteoarthritis synovium were represented schematically. IL-1 $\beta$  is known to induce expression of the *IL6* gene. Expression levels of the *IL1B* and *IL6* genes were positively correlated in the synovium from men (A and B) (solid arrows), while no correlation between expression levels of the genes was observed in the synovium from women (C and D) (dashed arrows). *HPRT1* was used for normalization in panels A and C, whereas *B2M* was used in panels B and D. Arrows and T-bars indicate induction and inhibition, respectively.

変形性膝関節症滑膜においても安定な参照遺伝子の選択が適切な定量解析を行う上で重要であり、誤った参照遺伝子選択は発現相関解析において重篤な攪乱を与える。

滑膜における遺伝子発現定量解析では、従来、*GAPDH*が参照遺伝子として用いられている。Table 1から*GAPDH*も十分な発現安定性を示すため、参照遺伝子として使用可能である。実際に*GAPDH*で規格化を行った場合でも*AR*、*IL1B*と*IL6*遺伝子の発現量の性差は保持された。その一方で、より安定した参照遺伝子である*HPRT1*で規格化した際に観察される女性滑膜での*AR*および*PR*遺伝子発現量とBMI間の相関関係が消失した。そのため、遺伝子発現の相関解析をより厳格に行う際は、*GAPDH*よりも安定な*HPRT1*を参照遺伝子として使用することが望ましい。

#### 4. 整形外科学領域が対象とする組織・細胞に最適な参照遺伝子

発現安定性を示す参照遺伝子の選択には労力と費用がかかるため、対象とする組織・細胞、実験条件・病態においてすでに安定な参照遺伝子の報告がある場合は、それら報告を参照するのが現実的である。近年、整形外科学領域が対象とする組織・細胞において最適な参照遺伝子選択に関する報告が増加している。ヒトの関節包<sup>24</sup>、腱<sup>25</sup>、半月板<sup>26</sup>、靭帯<sup>27</sup>、関節軟骨<sup>28</sup>、滑膜<sup>6</sup>で推奨される参照遺伝子をTable 2にまとめた。表中でA+Bと記載されているものはA遺伝子とB遺伝子の発現量の幾何平均値を規格化に用いることを意味する。

主に線維芽細胞で構成される組織では*HPRT1*が安定な参照遺伝子であることが多い。実際、線維芽細胞由来培養細胞株を用いたgeNorm解析では*HPRT1*と

Table 2 Recommended reference gene(s) for normalization of RT-qPCR data in orthopaedic research

Tissue	Location	Clinical presentation	Reference gene(s)	Reference
Articular capsule	Glenohumeral joint	Shoulder instability	<i>HPRT1</i> <i>HPRT1 + B2M</i>	Leal MF et al. [24]
Tendon	Rotator cuff	Rotator cuff tear	<i>HPRT1 + TBP + ACTB</i>	Leal MF et al. [25]
Meniscus	Knee joint	Meniscal tear and others	<i>HPRT1 + TBP + GAPDH</i>	Leal MF et al. [26]
Ligament	Anterior cruciate ligament	Anterior cruciate ligament tear and others	<i>ACTB + TBP + 18S + HPRT1</i>	Leal MF et al. [27]
Articular cartilage	Hip and knee joints	Osteoarthritis	<i>TBP + PRL13A + B2M</i>	Pombo-Suarez M et al. [28]
Synovium	Knee joint	Osteoarthritis	<i>HPRT1</i>	Watanabe H et al. [6]

*GAPDH* が発現安定性を示す参照遺伝子として選出される<sup>7</sup>.

### おわりに

RT-qPCR法を用いた発現定量解析は、整形外科学領域でも病態発症・進行の分子機構解明に欠かせない研究手法となっている。しかし、定量解析結果が選択した参照遺伝子の発現変動の影響を受ける可能性もあり、安定な参照遺伝子選択は解析上の偽陰性・偽陽性を防ぐうえで重要である。特に遺伝子発現の相関解析では、参照遺伝子選択により結果が大幅に影響を受けることがあるため、注意を要する。さらに、参照遺伝子選定の根拠を論文中に記載するよう求める投稿規定を新たに追加する雑誌も増加している。実験の再現性を保証するうえでも参照遺伝子の選択は重要な検討過程である。そのため、RT-qPCR法を用いた遺伝子発現定量解析では、発現安定性を基準に参照遺伝子選択を慎重に行う必要がある。

### 文 献

- Barber RD, Harmer DW, Coleman RA, Clark BJ: *GAPDH* as a housekeeping gene: analysis of *GAPDH* mRNA expression in a panel of 72 human tissues. *Physiological Genomics* 2005; 21: 389-395.
- Glare EM, Divjak M, Bailey MJ, Walters EH: beta-Actin and *GAPDH* housekeeping gene expression in asthmatic airways is variable and not suitable for normalising mRNA levels. *Thorax* 2002; 57: 765-770.
- Radonić A, Thulke S, Mackay IM, Landt O, Siegert W, Nitsche A: Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 2004; 313: 856-862.
- Bustin SA, Benes V, Garson JA, et al.: The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry* 2009; 55: 611-622.
- Bustin SA, Wittwer CT: MIQE: A Step Toward More Robust and Reproducible Quantitative PCR. *Clinical Chemistry* 2017; 63: 1537-1538.
- Watanabe H, Ishii H, Takahashi K, Takai S, Ozawa H: Suitable reference gene selection for gene expression studies in knee osteoarthritis synovium using quantitative PCR analysis. *Connective Tissue Research* 2018; 59: 356-368.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, et al.: Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology* 2002; 3: RESEARCH0034.
- Andersen CL, Jensen JL, Ørntoft TF: Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Research* 2004; 64: 5245-5250.
- Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians TP: Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper-Excel-based tool using pairwise correlations. *Biotechnology letters* 2004; 26: 509-515.
- Xie F, Xiao P, Chen D, Xu L, Zhang B: miRDeepFinder: a miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs. *Plant Molecular Biology* 2012; 80: 75-84.
- De Spiegelaere W, Dern-Wieloch J, Weigel R, et al.: Reference gene validation for RT-qPCR, a note on different available software packages. *PLoS One* 2015; 10: e0122515.
- Berenbaum F: Osteoarthritis as an inflammatory disease (osteoarthritis is not osteoarthrosis!). *Osteoarthritis and Cartilage* 2013; 21: 16-21.
- Sellam J, Berenbaum F: The role of synovitis in pathophysiology and clinical symptoms of osteoarthritis. *Nature Reviews Rheumatology* 2010; 6: 625-635.
- Wluka AE, Lombard CB, Cicuttini FM: Tackling obesity in knee osteoarthritis. *Nature Reviews Rheumatology* 2013; 9: 225-235.
- Leung YY, Allen JC Jr, Noviani M, et al.: Association between body mass index and risk of total knee replacement, the SingaporeChinese Health Study.

- Osteoarthritis and Cartilage 2015; 23: 41-47.
16. Silverwood V, Blagojevic-Bucknall M, Jinks C, Jordan JL, Protheroe J, Jordan KP: Current evidence on risk factors for knee osteoarthritis in older adults: a systematic review and meta-analysis. *Osteoarthritis and Cartilage* 2015; 23: 507-515.
  17. Srikanth VK, Fryer JL, Zhai G, Winzenberg TM, Hosmer D, Jones G: A meta-analysis of sex differences prevalence, incidence and severity of osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage* 2005; 13: 769-781.
  18. Yoshimura N, Muraki S, Oka H, et al.: Prevalence of knee osteoarthritis, lumbar spondylosis, and osteoporosis in Japanese men and women: the research on osteoarthritis/osteoporosis against disability study. *Journal of Bone and Mineral Metabolism* 2009; 27: 620-628.
  19. Guerne PA, Zuraw BL, Vaughan JH, Carson DA, Lotz M: Synovium as a source of interleukin 6 in vitro. Contribution to local and systemic manifestations of arthritis. *Journal of Clinical Investigation* 1989; 83: 585-592.
  20. Morishita M, Miyagi M, Iwamoto Y: Effects of sex hormones on production of interleukin-1 by human peripheral monocytes. *Journal of Periodontology* 1990; 70: 757-760.
  21. Stein B, Yang MX: Repression of the interleukin-6 promoter by estrogen receptor is mediated by NF- $\kappa$ B and C/EBP $\beta$ . *Molecular and Cellular Biology* 1995; 15: 4971-4979.
  22. Waage A, Slupphaug G, Shalaby R: Glucocorticoids inhibit the production of IL6 from monocytes, endothelial cells and fibroblasts. *European Journal of Immunology* 1990; 20: 2439-2443.
  23. Cuchacovich M, Tchernitchin A, Gatica H, Wurgaft R, Valenzuela C, Cornejo E: Intraarticular progesterone: effects of a local treatment for rheumatoid arthritis. *Journal of Rheumatology* 1988; 15: 561-565.
  24. Leal MF, Belangero PS, Cohen C, et al.: Identification of suitable reference genes for gene expression studies of shoulder instability. *PLoS One* 2014; 9: e105002.
  25. Leal MF, Belangero PS, Figueiredo EA, et al.: Identification of suitable reference genes for gene expression studies in tendons from patients with rotator cuff tear. *PLoS One* 2015; 10: e0118821.
  26. Leal MF, Arliani GG, Astur DC, et al.: Cohen M: Comprehensive selection of reference genes for expression studies in meniscus injury using quantitative real-time PCR. *Gene* 2016; 584: 60-68.
  27. Leal MF, Astur DC, Debieux P, et al.: Identification of Suitable Reference Genes for Investigating Gene Expression in Anterior Cruciate Ligament Injury by Using Reverse Transcription-Quantitative PCR. *PLoS One* 2015; 10: e0133323.
  28. Pombo-Suarez M, Calaza M, Gomez-Reino JJ, Gonzalez A: Reference genes for normalization of gene expression studies in human osteoarthritic articular cartilage. *BMC Molecular Biology* 2008; 9: 17.

(受付 : 2018 年 8 月 31 日)

(受理 : 2018 年 10 月 25 日)