

再生医療

—総説—

臓器置換を目指すオルガノイド研究の新展開

横浜市立大学 武部 貴則

—注目の研究—

ピロール-イミダゾールポリアミド (PIP) を用いた エピジェネティクス制御

株式会社同仁化学研究所 大内 雄也

新製品

オートファジー検出蛍光試薬 P.7

硫化水素検出蛍光試薬 P.8

安定化電子メディエーター P.8

ミトコンドリア内鉄検出蛍光試薬 P.9





表紙撮影：熊本県阿蘇市西湯浦 名もない木
photo：永島俊介氏

CONTENTS

Review

臓器置換を目指すオルガノイド研究の新展開 ●———— [1]

横浜市立大学 武部 貴則

Topics on Chemistry

ピロール-イミダゾールポリアミド (PIP) を用いた
エピジェネティクス制御 ●———— [5]

株式会社同仁化学研究所 大内 雄也

Commercial

新規容量 (100 tests) の追加

微生物増殖アッセイキット ●———— [8]

新製品

オートファジー検出蛍光試薬 ●———— [7]

硫化水素検出蛍光試薬 ●———— [8]

安定化電子メディエーター ●———— [8]

ミトコンドリア内鉄検出蛍光試薬 ●———— [9]

近日発売

日本薬局方対応 容量分析用標準液 ●———— [8]

生細胞・死細胞測定キット ●———— [9]

内胚葉分化モニタリングキット ●———— [4]

老化細胞検出キット ●———— [6]

マイトファジー検出蛍光試薬 ●———— [7]

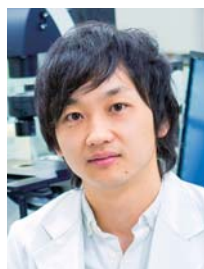
お知らせ

学会展示のご案内 ●———— [4]

販売中止予定製品のお知らせ ●———— [4]

28th フォーラム・イン・ドージン後記 ●———— [10]

臓器置換を目指すオルガノイド研究の新展開 State of the art of organoid based research



武部 貴則

横浜市立大学大学院 医学研究科
臓器再生医学 准教授
シンシナティ小児病院
消化器部門・発生生物学部門 准教授
シンシナティ小児病院
オルガノイドセンター 副センター長

Abstract

The self-organizing tissue-based approach coupled with induced pluripotent stem (iPS) cell technology is evolving as a promising field for designing organoids in culture and is expected to achieve valuable practical outcomes in regenerative medicine and drug development. Organoids show properties of functional organs and represent an alternative to cell models in conventional two-dimensional differentiation platforms; moreover, organoids can be used to investigate mechanisms of development and disease, drug discovery and toxicity assessment. Here, we review characters of emerging organoid technology focusing on liver bud as an example, and discuss their promise and challenges for the use regenerative medicine.

1. はじめに

臨床的有効性が明確である移植医療において、その最重要課題がドナー臓器の絶対的不足への対応であることは明らかである。例えば、米国における臓器移植の実施件数と待機人数との乖離は、1989年には数千名の範囲内に収まっていたにもかかわらず、その後の乖離状況は悪化の一途をたどっており、2013年には10万人近くに顕著に増大しているのが現状である (United Network for Organ Sharing ; UNOS)。すなわち、米国だけで、毎年、なんと10万人近くの臓器不全患者が移植手術を待ちながら移植を受けることが出来ない状況が厳然として存在しているのである (図1)。致死的な重症肝不全患者を対象とする肝臓移植においては、米国における1年間に新規発生する待機リスト登録者約17,000名のうち、じつに約4,000名の患者が臓器移植を待ちながら、ドナー肝臓が届くことなく死亡している。

このような臨床的な重要課題を解決するためには、進歩の著しい発生生物学 (developmental biology) や幹細胞生物学 (stem cell biology) の新知見を駆使して、臓器移植の代替治療法を実現するべくヒト臓器の人為的構成を可能とする革新的な細胞操作技術を開発する必要がある。特に近年、ヒト iPS 細胞などの多能性幹細胞

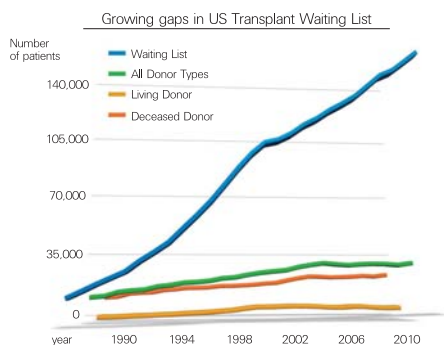
からオルガノイドと呼ばれる複雑組織を創出し、医療応用を目指す試みに注目が集まっている。

そこで本稿では、肝臓に焦点を当て、器官発生・再生機構の理解と制御に基づきオルガノイド創出を目指す研究の最新動向を紹介する。さらに、オルガノイド研究が拓く移植医療への展開について議論したい。

2. オルガノイドとは？

オルガノイド (Organoid) とは、人為的に創出された器官に類似した組織体といえる。一般にオルガノイドは、器官形成に寄与する前駆細胞の集合体から、生体内における発生や再生過程で生じる頑健な生物学的プロセスを人為的に模倣することにより創出される。オルガノイド形成は、多くは自己組織化 (Self-organization) と称される半自律的なプロセスをたどることにより創出されるものが多いが、自律性を引き出すためには「人為性」が重要な要素となる。後述するように、特にこの自律性を再現性良く引き出すためには、各種細胞材料のバリデーションが極めて重要となる。

近年の研究では、多能性幹細胞 (ES、iPS 細胞) や、生検サン



移植医療の代替手法の開発が必須！

United Network for Organ Sharing, OPTN Report, 2007 & World Health Organization (WHO) report, 2012
URL : <https://www.unos.org/>

図1 移植医療における課題：ドナー臓器の絶対的な不足を克服



Search Builder : pubmed - (organoid [title] OR organoids [title] OR organ bud [title]) NOT review

図2 オルガノイドに関連する原著論文推移

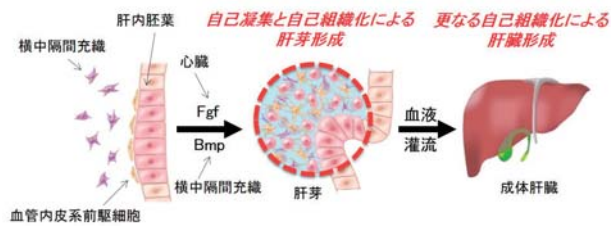


図3 肝臓における初期発生プロセス

プルを活用したプライマリ細胞などを活用し、ヒトを対象とした生物学研究 (Human Biology) が隆盛を極めていく (図2)。これにより、研究対象とすることが比較的困難であったヒトにおける様々な生命現象に迫ることが可能となった。また、疾患患者に由来するオルガノイドを用いることで、臨床試験に至る以前にヒトにおける反応を予測するための技術としての期待も膨らみつつある。一方、内分泌器官や、腸、肝臓などいくつかの代表的な臓器分野においては、オルガノイドを直接移植することにより治療応用を目指す有望な報告が広がりつつある。

3. 肝臓における発生機構

肝臓発生の最も初期の段階は、胚体内胚葉 (definitive endoderm) より分化誘導した腹側前腸内胚葉 (ventral foregut endoderm) が周辺からの Fgf や Bmp シグナルからの刺激を受けることで予定肝臓領域 (肝内胚葉、hepatic specified endoderm) が運命決定されることにより開始する^{1), 2)}。その後、肝内胚葉は血管内皮系前駆細胞と協調的に働きつつ、横中隔間充織と呼ばれる間葉系組織方向へと浸潤し、やがて立体的な肝芽 (liver bud) を形成する (図3)³⁾。一度、肝芽が形成されると、後に続く血液灌流を契機としてさらなる成熟刺激を受け、最終的に肝細胞索や胆管に加えて、門脈、肝動脈、中心静脈などの階層的な小葉構造をもったいわゆる肝臓へと発生が進展してゆく¹⁾。このように、

肝臓は最終的には極めて複雑な構造を構成するものであるが、その初期段階である肝芽形成段階においては比較的シンプルな細胞間相互作用にもとづき発生が進行すると考えられる。

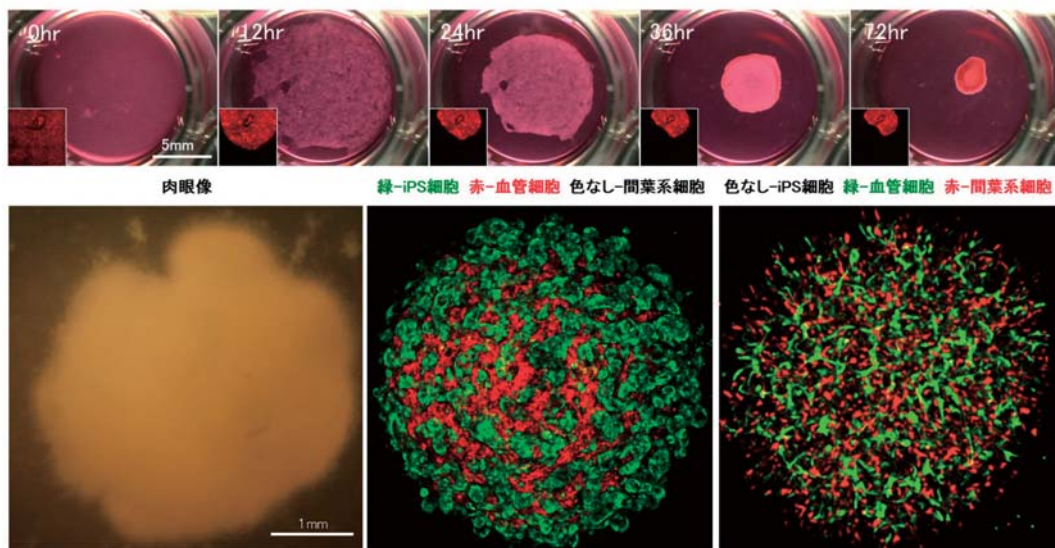
4. 肝芽オルガノイド創出

このように肝発生の初期プロセスの進行には、前腸内胚葉細胞と未分化血管内皮細胞と間葉系幹細胞との細胞間相互作用が必須である。そこで、我々は前腸からの肝臓原基 (肝芽) の出芽 (budding) という、肝発生において極めて重要なイベントを人為的に再現することを目指し、さまざまな培養条件を検討した結果、肝芽形成を模倣した新たな三次元培養系を確立することに成功した。すなわち、ヒト iPS 細胞由来肝内胚葉細胞、ヒト血管内皮細胞、ヒト間葉系細胞を至適な支持体上で共培養することにより、直径数 mm 大のボール状の3次元立体的組織が僅か48時間以内に自律的に形成されることを見いだした (図4)^{4), 5)}。さらに、微細構造の形態学的な解析、およびシングル・セル解析による包括的遺伝子発現プロファイルの解析などの結果から、形成された3次元構造体が、妊娠後期及び成体肝臓とは異なり、発生初期で形成される肝芽組織と極めて類似する特徴を有することが明らかとなったことから、試験管内で組織・臓器の元となる立体的な肝芽オルガノイド (Human iPSC-derived liver bud) を人為的に作製することに成功したと考えられた⁶⁾。従来のオルガノイド技術の多くは上皮構造のみからなる事例がほとんどであったが、本手法により、血管等を含むより複雑な多細胞相互作用を実現することの可能な全く新たなオルガノイドの創出手法が確立されたといえる。

5. 肝芽オルガノイド移植という治療原理の確立

iPS 細胞からヒト肝臓を創出するための第一のマイルストーンである肝芽オルガノイド (臓器の芽、肝芽、liver bud) を誘導す

立体的なヒト肝臓原基の形成過程



Nature, 2013; Cell Stem Cell, 2015; Nature, 2017

図4 iPS 細胞からヒト肝臓の原基 (肝芽) を創出することに成功

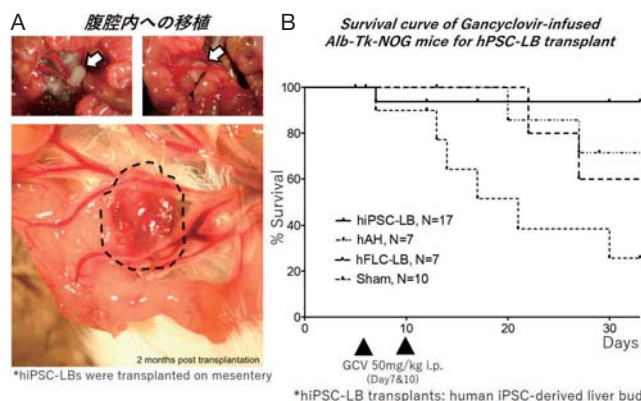


図5 Alb-Tk-NOG マウスを用いたヒト iPS 細胞由来肝芽移植の治療効果

るという開発目標が達成されつつあるいま、移植治療技術としての活用が期待が集まっている。我々のグループでは、ヒト iPS 細胞より作出した肝芽オルガノイドを免疫不全マウス体内へ移植することにより、血液灌流を通じたヒト臓器の分化誘導が可能であるか検証をすすめている。その結果、驚くべきことに移植後の極めて早い時期（48～72 時間以内）に、移植肝芽全域に血液灌流が効率良く生じることが判明した（図 5A）⁴⁾。移植片の辺縁部においては、マウス・ヒト血管が直接吻合し、内腔では血液が交通していることが示された。さらに、移植 45 日時点において、移植マウス静脈より血液を採取し、ヒト特異的にアルブミン検出を行った結果、成体肝細胞移植などの従来手法と比較して有意にアルブミン検出量が上昇することが確認された。これにより、ヒト iPS 細胞由来肝芽オルガノイドが異所的な移植部位の中でも、腹腔内において血液供給を受けることがその生着や機能発現において重要であることが示された。

以上の検討を踏まえ、この肝芽オルガノイド移植（liver bud transplantation）による治療効果を検証することを目的として、亜急性肝不全モデルに対する移植実験を実施した。免疫不全マウスを用いて作製した亜急性劇症肝炎モデルに移植肝芽を門脈近傍の腸間膜上へ移植した結果、30 日後の生存率は、非移植群では約 30%であったのに対し、移植群では 90%以上であり、著名に生存率が改善効果することが判明した⁵⁾。すなわち、肝芽オルガノイド移植という新しい治療概念が極めて有効であることが明らかとなった（図 5B）。

6. 治療用オルガノイドの超大量製造工程へ向けて

このようにオルガノイド研究は、急速な広がりを見せつつある一方で、実際の臨床応用に先立っては、ヒト肝芽オルガノイドの大量製造工程の構築が実用化上最大の課題となる。なぜならば、例えば肝不全症患者の治療に際しては、ヒト肝細胞に換算して $1 \times 10^8 \sim 10^9$ 個に相当する超大量のヒト肝芽オルガノイドを再現性良く製造可能とすることが必要となるからである。これらを実現するためには、GCTP（Good Gene, Cellular, and Tissue-based Products Manufacturing Practice）に適合したプロトコールの作製が重要となるわけであるが、とりわけオルガノイド創出に用いる細胞材料の均質化を担保する努力が重要となる⁷⁾。当研究室では、オルガノイド形成に用いるもっとも重要な成分である肝臓内

胚葉細胞の均質化を目指し、胚体内胚葉段階での培養上清中から Cerberus 1-ELISA[®] を検出することによりバリデーションが可能であることを見出しつつ有る。このような非侵襲的な細胞材料の品質保証手法を今後も充実させていくことで、均質な肝オルガノイドの超大量製造を実現する製造工程を実現していく。

7. おわりに

1963 年に故・Starzl らによって切り拓かれた臓器移植に基づく臓器置換術は、現在に至るまで末期臓器不全症に対する唯一無二の優れた治療法として実施されている。しかしながら、年々増大する臓器移植のニーズに対し、置換臓器の供給は絶対的に不足しており、それらに代わる治療法の開発は多くの患者救済のために急務である。筆者らは、組織・臓器再生を指向する研究の先に、その突破口が見いだせるものと確信している。ヒト iPS 細胞の開発以後、産官学界が一体となって研究が推進されている今、本稿で紹介した様な組織や臓器を誘導する技術開発は急速な展開を見せている。臓器再生に基づく治療技術が次世代の医療技術として産声をあげ、臓器移植を待つ患者を救済する日はそう遠くないのかもしれない。

【参考文献】

- 1) K. Si-Tayeb, F. P. Lemaigre and S. A. Duncan, "Organogenesis and Development of the Liver." *Dev. Cell*, **2010**, *18*, 175-189.
- 2) A. M. Zorn, *Liver development*, **2008**
- 3) K. Matsumoto, H. Yoshitomi, J. Rossant and K. S. Zaret, "Liver organogenesis promoted by endothelial cells prior to vascular function." *Science*, **2001**, *294*, 559-556.
- 4) T. Takebe, K. Sekine, M. Enomura, H. Koike, M. Kimura, T. Ogaeri, et al. "Vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant." *Nature*, **2013**, *499* (7459), 481-484.
- 5) T. Takebe, M. Enomura, E. Yoshizawa, M. Kimura, H. Koike, Y. Ueno, et al. "Vascularized and Complex Organ Buds from Diverse Tissues via Mesenchymal Cell-Driven Condensation." *Cell Stem. Cell*, **2015**, *16*, 556-565.
- 6) J. G. Camp, et al., "Multilineage communication regulates human liver bud development from pluripotency." *Nature*, **2017**, *546* (7659), 533-538.
- 7) T. Takebe, B. Zhang and M. Radisic. "Synergistic Engineering: Organoids Meet Organs-on-a-Chip." *Cell Stem. Cell*, **2017**, *21* (3), 297-300.
- 8) H. Iwashita, et al., "Secreted Cerberus1 as a marker for quantification of definitive endoderm differentiation of the pluripotent stem cells", *PLoS ONE*, **2013**, *8* (5), e64291.

【著者プロフィール】

氏名：武部 貴則（Takanori Takebe）

所属：横浜市立大学大学院 医学研究科 臓器再生医学
シンシナティ小児病院 消化器部門・発生生物学部門
シンシナティ小児病院 オルガノイドセンター

連絡先：〒 236-0004 神奈川県横浜市金沢区福浦 3-9

Tel, Fax : 045-787-8963

E-mail : ttakebe@yokohama-cu.ac.jp

出身大学：横浜市立大学

学位：医学士

専門分野：再生医学・発生生物学・広告医学

現在の研究テーマ：iPS 細胞、オルガノイド、移植

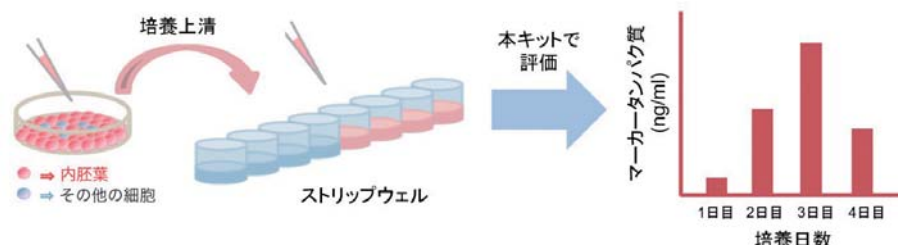
内胚葉分化モニタリングキット

ES/iPS Differentiation Monitoring Kit - Human Endoderm

<特長>

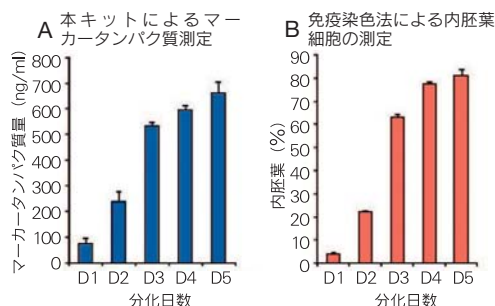
- ・内胚葉への分化を特異的に検出できる
- ・培養上清を使うことで、細胞の分化状態を非侵襲的にモニターすることができる

本キットを用いて培養上清中のマーカータンパク質を検出することで、ES/iPS 細胞から内胚葉細胞への分化度を測定することができます。このマーカータンパク質は内胚葉マーカーである Sox17、Foxa2 二重陽性細胞率と相関します。本キットでは培養上清を使用するため、細胞を損なわず継続培養しながら分化の状態をモニターすることが可能です。また、ELISA (Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay) 法により検出するため多検体の測定に用いることができ、分化誘導剤などの薬剤スクリーニングにも有用です。



本キットを用いた内胚葉細胞への分化状態の確認

<実験例①>

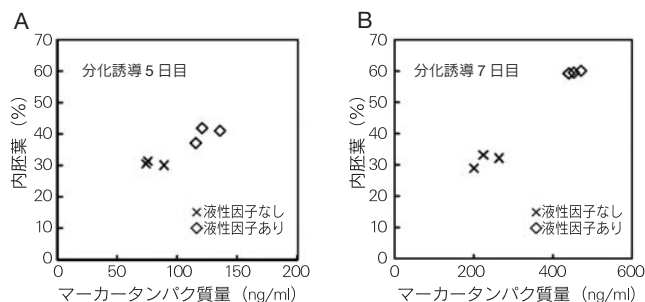


本キットと免疫染色法による分化状態の確認

ヒト iPS 細胞を用い 1 日から 5 日までの培養上清中のマーカータンパク質量を本キットで検出した (A)。また同じ条件下で分化誘導した細胞の Sox17 と Foxa2 を免疫染色し二重陽性細胞を分化細胞として内胚葉細胞の割合を確認した (B)。分化誘導 3 日目には双方の結果で内胚葉細胞が大きく増加した。また 5 日目まで内胚葉細胞が増加していることを確認した。

本製品は熊本大学発生医学研究所との共同研究成果です。

<実験例②>



本キットと免疫染色法との相関性

分化誘導 5 日目と 7 日目の細胞を用い、本キットにより確認したマーカータンパク質量を横軸に、Cxcr4 と E-Cadherin の免疫染色により二重陽性細胞となった内胚葉細胞の割合を縦軸にとった。結果、双方の測定法で相関する結果が得られた。

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
ES/iPS Differentiation Monitoring Kit - Human Endoderm	96 tests	95,000	ES01

学会展示のご案内

第 1 回 若手ミトコンドリア国際会議

期日：2018 年 4 月 20 日 (金) ~ 22 日 (日)

会場：ホテルコブイン京都

展示ブースにてお待ちしております。

本学会展示に関する詳細は、後日小社 HP にてご案内致します。

下記キーワードで検索し小社 HP へお越しください。

同仁化学

検索

販売中止予定製品のお知らせ

2018 年 2 月 1 日より、販売中止が決定した製品がございます。大変ご不便をおかけしますが、何卒ご了承頂けましたら幸いです。

販売中止予定の製品については、小社 HP よりご確認ください。

販売中止品 同仁化学

検索

Topics on Chemistry

ピロール - イミダゾールポリアミド (PIP) を用いたエピジェネティクス制御

株式会社同仁化学研究所 大内 雄也

iPS 細胞（人工多能性幹細胞）の樹立によって再生医療分野は大きな進展を見せている。iPS 細胞は、体細胞に特定の転写因子を導入することで得られる幹細胞であるが、初期化、増殖、分化、成熟といった過程においてエピジェネティックな制御が大きく関与していることは言うまでもない。そのため、エピジェネティクスは幹細胞の再生医療への応用だけでなく、疾病の診断や治療、薬剤開発、また生命現象の解明といった観点からも避けて通ることはできない。

エピジェネティクスとは、塩基配列の変化を伴わない遺伝子発現変化のことであり、主に DNA のメチル化やヒストン修飾（アセチル化、メチル化、リン酸化など）がその中心を担っている。最近、このようなエピジェネティック変化を人工的な化合物によって制御する試みが活発になっており、今回のトピックではピロール - イミダゾールポリアミド (PIP) を用いたエピジェネティクス制御について紹介したい。

この化合物はピロール (P) とイミダゾール (I) を、アミド結合を介して連結したポリマー物質であり、ピロールとイミダゾールの組み合わせを変えることで塩基配列特異的に結合することができる。C-G 結合は P/I、G-C 結合は I/P、A-T と T-A 結合は P/P の組み合わせであり、例えば GCTA（相補鎖 CGAT）の場合であれば IPPP（相補鎖に対して PIPP）となる（図 1）。この化合物はハイブリダイゼーションとは異なり、二本鎖 DNA のマイナーグруппに結合するため、変性操作を行うことなく目的の塩基配列に結合できる点で有用性が高い。

ヒストンアセチル化は、最も重要なエピジェネティクス機構の一つであり、生体内ではヒストンアセチル基転移酵素（HAT）によって触媒され、クロマチン構造の弛緩により遺伝子発現が活性状態となる。一方で、ヒストン脱アセチル化酵素（HDAC）によってアセチル基が脱離すると、遺伝子発現は抑制される。Sugiyama らの研究グループは、HDAC 阻害剤である SAHA（スベロイルアニリドヒドロキサム酸）を PIP に結合させることで、特定遺伝子近傍のヒストンアセチル化状態を維持し、遺伝子発現

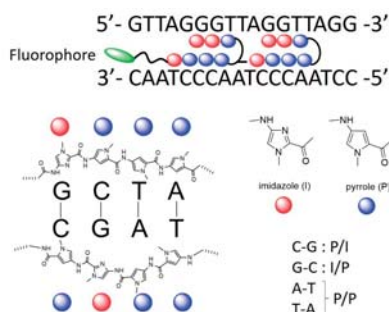


図 1 ピロール - イミダゾールポリアミド (PIP) の構造と DNA 認識

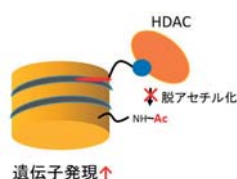


図 2 PIP を用いたヒストン脱アセチル化阻害

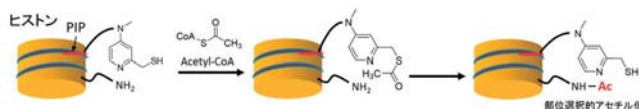


図 3 DMAP-SH 結合 PIP を用いたヒストンアセチル化

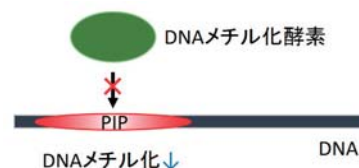


図 4 PIP を用いた DNA メチル化阻害

を活性化する方法を報告している（図 2）¹⁾。また Kanai らはアセチル化を触媒する部位（DMAP-SH）を付与することで特定部位のヒストンアセチル化を促進する手法を提案している（図 3）²⁾。この手法は、基質を変えることでさまざまな修飾（例えば、ピオチン化やユビキチン化など）を行える点で興味深い。

DNA メチル化はその結合タンパク質を介した強固なクロマチンを形成することで遺伝子発現を抑制しており、最も重要なエピジェネティックな DNA 修飾である。Kaneda らの研究グループは PIP を用いた特定配列の DNA メチル化阻害による遺伝子発現の活性化に（図 4）³⁾、また Sugiyama らはメチル化ではないが、DNA のアルキル化を介して遺伝子発現を抑制することに成功している⁴⁾。

エピジェネティクスは様々な生命現象の根源にあり、厳密に制御されている。そのため、人工的にエピジェネティクスを変化させるためには選択的に特定遺伝子にアプローチすることが重要である。PIP はその条件をクリアする有用なツールであり、再生医療分野を含むさまざまな領域での応用が期待できる。

【参考文献】

- 1) G. N. Pandian, J. Taniguchi, S. Junetha, S. Sato, L. Han, A. Saha, C. AnandhaKumar, T. Bando, H. Nagase, T. Vijayanthi, R. D. Taylor and H. Sugiyama, "Distinct DNA-based epigenetic switches trigger transcriptional activation of silent genes in human dermal fibroblasts", *Sci. Rep.*, **2014**, *4*, 3843.
- 2) Y. Amamoto, *et al.*, "Synthetic posttranslational modifications: Chemical catalyst-driven regioselective histone acylation of native chromatin", *J. Am. Chem. Soc.*, **2017**, *139*, 7568.
- 3) K. Shinohara, *et al.*, "Inhibition of DNA methylation at the MLH1 promoter region using pyrrole-imidazole polyamide", *ACS Omega*, **2016**, *1*, 1164.
- 4) G. Kashiwazaki, *et al.*, "Alkylation of a human telomere sequence by heterotrimeric chlorambucil PI polyamide conjugates", *Bioorg. Med. Chem.*, **2010**, *18*, 2887.

老化細胞検出キット

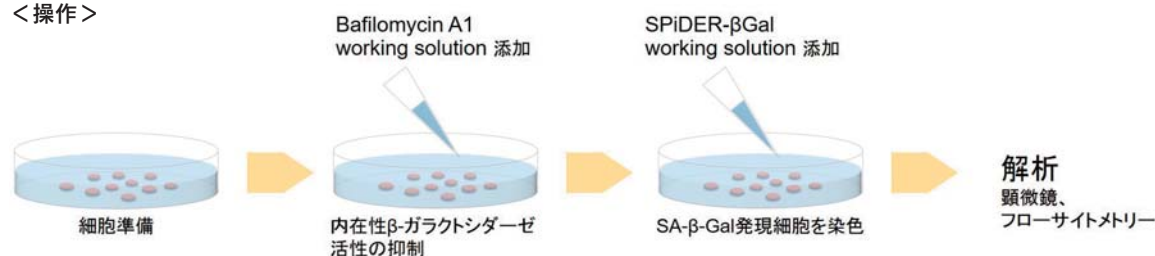
Cellular Senescence Detection Kit - SPiDER-β Gal

<特長>

- ・ 固定化せずに簡便に老化細胞を検出
- ・ 蛍光検出による定量解析が可能
- ・ 固定化細胞を用いた多重染色に適用できる

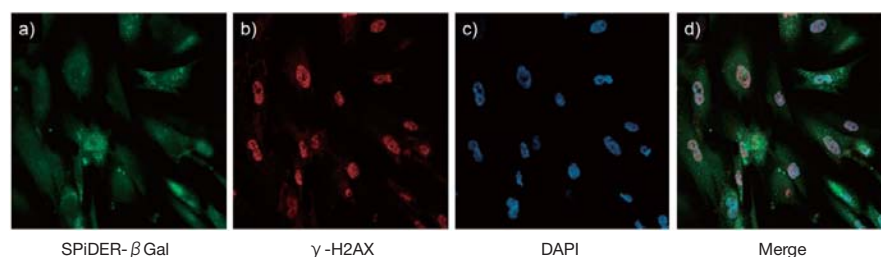
本製品は老化マーカーの1つとして広く用いられている SA-β-gal (senescence-associated β-galactosidase) を特異的に検出することができるキットです。キットに含まれる蛍光基質 (SPiDER-β Gal) は優れた細胞膜透過性を有し、内在性β-ガラクトシダーゼ活性を抑制する試薬と併用することで生細胞にも利用でき、フローサイトメトリーを用いた定量解析が可能です。

<操作>



細胞に Bafilomycin A1 を加え内在性β-ガラクトシダーゼを抑制後、SPiDER-β Gal を加え蛍光顕微鏡観察やフローサイト測定に利用します。固定化細胞を用いる場合は、バツファー置換により内在性β-ガラクトシダーゼの抑制を行います。詳細は小社 HP 掲載の取扱説明書をご覧ください。

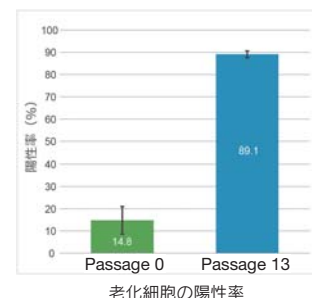
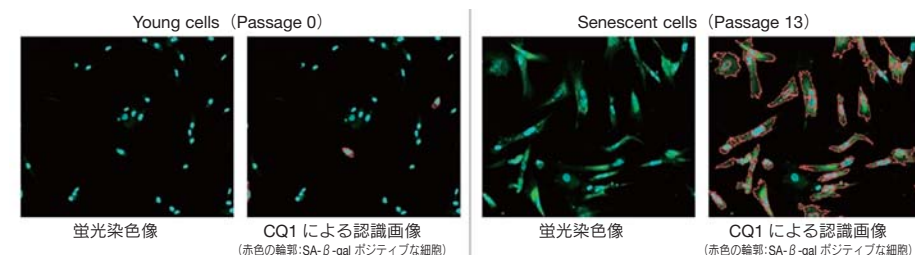
<異なる老化マーカーとの共染色>



SPiDER-β Gal Ex:488 nm, Em:500-600 nm γ-H2AX Ex:640 nm, Em:640-700 nm DAPI Ex:405 nm, Em:450-495 nm

老化細胞モデルとして継代培養を繰り返した WI-38 細胞 (Passage 10) を用い、本キットによる SA-β-gal の検出^{a)}、異なる老化マーカーとして γ-H2AX (DNA 損傷マーカー) の免疫染色^{b)}、更には全細胞の核染色 (DAPI)^{c)} を行いました。その結果、SA-β-gal と γ-H2AX の両老化マーカーで相関する結果が得られました^{d)}。

<老化細胞の陽性率解析>



共焦点定量イメージサイトメーターを用いた老化細胞の定量解析
(シアン: Hoechst 33342、緑: SPiDER-β Gal)

継代数の異なる WI-38 細胞を核染色試薬 (Hoechst 33342) で全細胞を染色し、SPiDER-β Gal で SA-β-gal を指標とした老化細胞を染色しました。その後、共焦点定量イメージングサイトメーター (横河電機株式会社 CQ1) を用い全細胞数に対し、SPiDER-β Gal で染色された老化細胞数の割合を算出し (左図)、陽性率として定量解析を行いました。その結果、継代数の多い WI-38 細胞においては高い陽性率となりました (右図)。

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
Cellular Senescence Detection Kit - SPiDER-β Gal	10 assays	38,000	SG03

最新のデータおよび FAQ は製品 HP でご確認ください

老化 同仁 検索

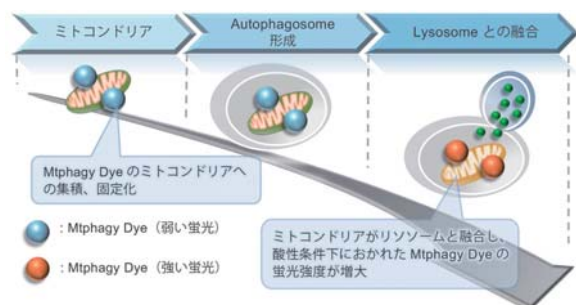
マイトファジー検出蛍光試薬

Mitophagy Detection Kit

<特長>

- ・低分子蛍光試薬を用いてマイトファジーを簡便に検出
- ・生細胞を用いたライブイメージングが可能
- ・培養細胞に試薬を添加するだけの簡単操作

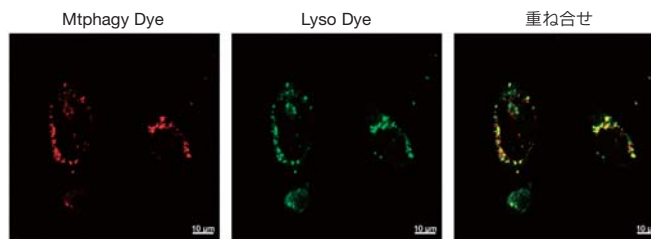
マイトファジーは酸化ストレスやDNA損傷等により不良化したミトコンドリアを選択的に除去するシステムです。本キットに含まれる Mtpagy Dye は、細胞内のミトコンドリアに集積し共有結合する pH 応答性の蛍光色素であり、マイトファジー誘導による不良ミトコンドリアとリソソームの融合によって蛍光が増大します。



本製品の測定原理・使用例が記載された論文が公開されました。

H. Iwashita, S. Torii, N. Nagahora, M. Ishiyama, K. Shioji, K. Sasamoto, S. Shimizu and K. Okuma, "Live Cell Imaging of Mitochondrial Autophagy with a Novel Fluorescent Small Molecule", *ACS Chem. Biol.*, **2017**, 12(10), 2546.

<実験例>



Parkin 発現細胞でのマイトファジー検出例

Parkin 発現 HeLa 細胞に Mtpagy Dye を添加後、CCCP(carbonyl cyanide *m*-chlorophenyl hydrazone) を添加しマイトファジーを誘導した。また観察前に本キットに含まれるリソソーム染色試薬 Lyso Dye を添加し蛍光像を確認した。マイトファジー誘導により蛍光が増大した Mtpagy Dye の局在(左図)は、リソソームと共局在(右図)する結果となった。

Mtpagy Dye (赤): 561 nm (Ex)、650 LP nm (Em)
Lyso Dye (緑): 488 nm (Ex)、502-554 nm (Em)

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
Mitophagy Detection Kit	1 set	36,000	MD01

最新のデータ、論文、および FAQ は、製品 HP にてご確認ください

マイトファジー 同仁 検索

新製品

オートファジー検出蛍光試薬

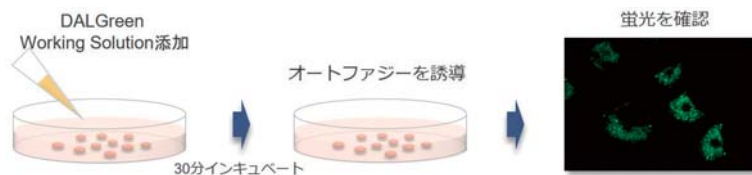
DALGreen - Autophagy Detection

<特長>

- ・オートファジーを蛍光でイメージング
- ・培養細胞に試薬を添加するだけの簡単操作
- ・オートリソソームを特異的に染色

DALGreen は、細胞内の不要なタンパク質・細胞小器官などの再利用や、代謝のための分解過程であるオートファジーを検出できる蛍光色素です。培養細胞に添加した DALGreen は生細胞膜を透過し、オートファジー誘導により形成されたオートファゴソーム内に取り込まれます。その後、リソソームと融合し酸性環境となったオートリソソームにおいて DALGreen の蛍光が増大します。

<測定操作>



品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
DALGreen - Autophagy Detection	20 nmol	28,000	D675

最新のデータおよび FAQ は、製品 HP にてご確認ください。

オートファジー 同仁 検索

新規容量(100 tests)の追加

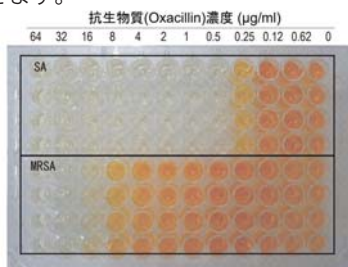
微生物増殖アッセイキット

Microbial Viability Assay Kit-WST

<特長>

- ・マイクロプレートを使った多検体処理が可能
- ・寒天培地法や微量液体希釈法に比べ短時間で検出できる

本キットを用いた評価では微生物のエネルギー代謝により生じた NAD(P)H 量に応じて、オレンジ色の色素が生成されます。この色素生成量は微生物のエネルギー代謝活性に比例するため、吸光度変化を確認することで微生物の生存率や代謝活性を確認することができます。



薬剤感受性試験

SA: *Staphylococcus aureus*, MRSA: *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
Microbial Viability Assay Kit-WST	100 tests	6,000	M439
	500 tests	20,600	M439

本製品は、福岡県工業技術センター生物食品研究所との共同開発により製品化しました。

近日発売

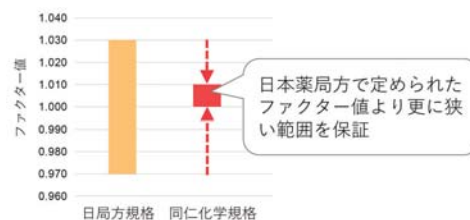
日本薬局方対応 容量分析用標準液

エチレンジアミン四酢酸二水素二ナトリウム液

<特長>

- ・日本薬局方に準じた滴定試験に使用できる
- ・規格ファクター：1.000 ~ 1.010

本品は EDTA・2Na の水溶液で、日本薬局方に準じ調製され規定の濃度域を保証した滴定用標準液です。標準液の濃度は 0.01 mol/l から 0.1 mol/l をご用意しており、試験項目に応じて標準液を選択頂けます。



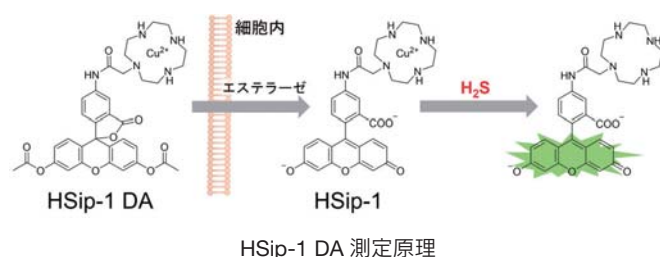
品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
0.01 mol/L エチレンジアミン四酢酸二水素二ナトリウム液	500 ml	4,000	JP01
0.02 mol/L エチレンジアミン四酢酸二水素二ナトリウム液	500 ml	5,600	JP02
0.05 mol/L エチレンジアミン四酢酸二水素二ナトリウム液	500 ml	4,000	JP03
0.1 mol/L エチレンジアミン四酢酸二水素二ナトリウム液	500 ml	4,000	JP04

新製品 DOJINDO MOLECULAR TECHNOLOGIES, INC.

硫化水素検出蛍光試薬

-SulfoBiotics- HSip-1 DA

硫化水素 (H_2S) が、血管拡張や細胞保護、インスリン分泌や神経伝達調節など様々な生理活性を示すことが明らかにされ、一酸化窒素 (NO) や一酸化炭素 (CO) に続く重要なシグナル分子として注目されています。-SulfoBiotics- HSip-1 DA は、細胞膜透過性と硫化水素への高い選択性を持ち、細胞内硫化水素の蛍光モニターを実現します。



HSip-1 DA 測定原理

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
-SulfoBiotics- HSip-1 DA	50 µg	18,000	SB22

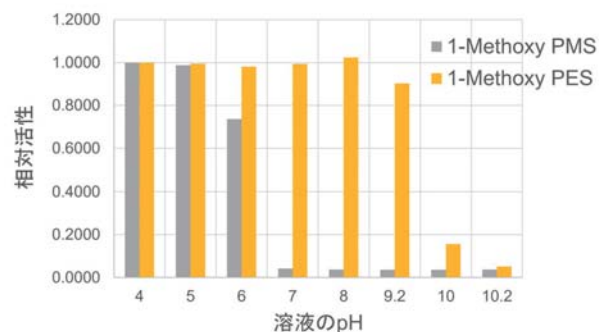
本製品は、東京大学大学院薬学系研究科 長野哲雄先生、花岡健二郎先生の指導の下、製品化しました。

新製品

安定化電子メディエーター

1-Methoxy PES

本品は酸化還元反応時の電子キャリアーとして利用可能な試薬です。従来の電子メディエーター (1-Methoxy PMS) に比べ、中性からアルカリ溶液中での化合物の安定性が大幅に向上しています。



溶液安定性試験 (30℃、30 日間)

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
1-Methoxy PES	50 mg	20,000	M470

新製品

ミトコンドリア内鉄検出蛍光試薬

Mito-FerroGreen

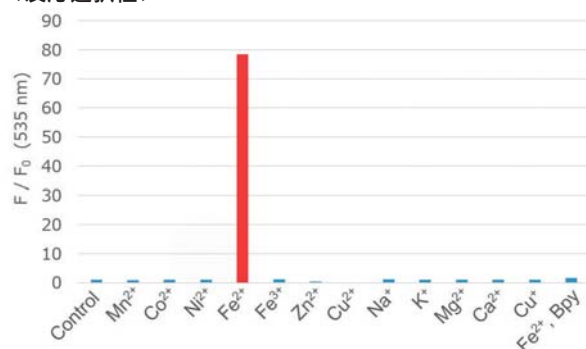
<特長>

- ・ Fe^{2+} への高い選択性
- ・ 生細胞中のミトコンドリアに局在する Fe^{2+} を検出
- ・ 励起波長 505 nm、蛍光波長 535 nm で測定可能

鉄は、生体内で最も多く存在する遷移金属元素であり、酸素の輸送体であるヘモグロビンや様々な酵素に含まれる必須の物質です。しかしながら、遊離の二価鉄 (Fe^{2+}) は過酸化水素と反応することによって強力な活性酸素であるヒドロキシラジカルを産生し、DNA 損傷や過酸化脂質、アポトーシスを引き起こすことが知られており、神経変性疾患や慢性炎症性疾患などの様々な疾病との関連が示唆されています。

Mito-FerroGreen は、FeS クラスタやヘム合成の場として知られるミトコンドリア内の遊離の二価鉄 (Fe^{2+}) と選択的に反応し、蛍光 ($\lambda_{\text{ex}} = 505 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 535 \text{ nm}$) を発する試薬で、ミトコンドリア内二価鉄 (Fe^{2+}) のライブセルイメージングが可能です。

<反応選択性>

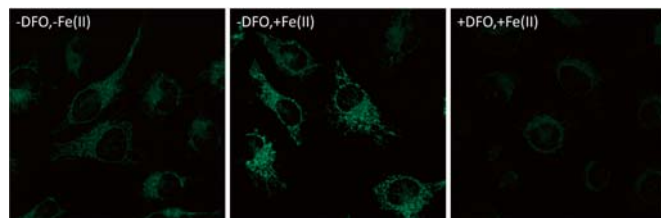


各金属種に対する反応選択性

フィルター: 500 nm (Ex) / 535 nm (Em)

50 mmol/l HEPES Buffer (pH 7.4) 1 ml 中に 1 mmol/l Mito-FerroGreen 2 μl 、10 mmol/l 各種金属 2 μl 及び 1 mg/ml Esterase 20 μl を加え室温にて 1 時間反応後の蛍光強度を測定した。

<実験例>



ミトコンドリア内鉄のライブイメージング

フィルター: 488 nm (Ex) / 500-565 nm (Em)

HeLa 細胞に Mito-FerroGreen を添加し、ミトコンドリアに内在する鉄を蛍光にて検出した (左図)。一方、鉄を添加した HeLa 細胞では、Mito-FerroGreen の強い蛍光がみられ (中央図)、鉄キレート試薬 Deferoxamine (DFO) と鉄を添加した細胞では、Mito-FerroGreen の蛍光はほとんど見られなかった (右図)。

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
Mito-FerroGreen	50 $\mu\text{g} \times 2$	25,000	M489

本製品は、岐阜薬科大学薬化学研究室 永澤秀子先生、平山祐先生のご指導の下、製品化しました。

近日発売

生細胞・死細胞測定キット

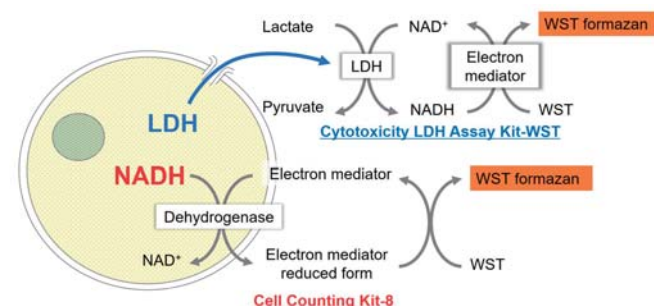
Viability/Cytotoxicity Multiplex Assay Kit

<特長>

- ・ 生細胞と死細胞をそれぞれ異なる指標で測定
- ・ プレートアッセイによる多検体処理に対応
- ・ 同じ培養細胞を用いて 2 つの測定ができる

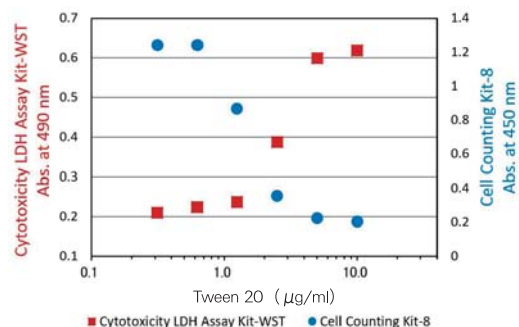
細胞毒性評価として、生存細胞数を指標とする方法または死細胞数を指標とする方法が汎用されています。近年、複数の指標を用いて評価することにより細胞毒性を総合的に判断するケースが増えてきています。Viability/Cytotoxicity Multiplex Assay Kit は、生存細胞数を指標とする Cell Counting Kit-8 (CCK-8) と、死細胞数を指標とする Cytotoxicity LDH Assay Kit-WST (LDH Assay Kit) を組合せたキットです。

<測定原理>



CCK-8 は生細胞内の脱水素酵素活性を、一方 LDH Assay Kit は細胞膜の傷害により細胞外へ漏れ出てきた乳酸脱水素酵素 (LDH) を指標とすることで、前者は生存細胞数を後者は死細胞数を算出します。LDH Assay Kit は、培養上清を用いて測定するノンホモジニアスアッセイが可能です。そのため CCK-8 と LDH Assay Kit のノンホモジニアスアッセイを組合せることで、同じ培養細胞を用いて二つの指標で細胞毒性評価を行うことができます。

<実験例>



Tween 20 を用いた細胞毒性試験

HeLa 細胞に Tween 20 を添加し 1 時間インキュベート後、CCK-8 及び LDH Assay Kit にて評価を行った。

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
Viability/Cytotoxicity Multiplex Assay Kit	500 tests	29,800	CK17

28th フォーラム・イン・ドージン開催後記

2017年11月17日、「D-アミノ酸生物学～右と左からみた生命の世界～」と題して、第28回のフォーラム・イン・ドージンが熊本市で開催された。昨年は熊本にもゆかりのあるエリスロポエチンがテーマだったが、今年のD-アミノ酸は熊本にも研究者がおらず、少しテーマとしてはマイナー過ぎるかなと危惧していたが、演者の先生方のプレゼンに対して熱のこもった議論が交わされ、時間も押し気味に進められた。確かに、分析技術の進歩も伴って、D-アミノ酸への関心が最近、高まってきているようだ。そもそも、生体は左に偏っている。ところが意外にも、右、すなわちD-アミノ酸がヒトの体からも多く見つかっているらしい。これらは何をしているのだろうか。それらの起源を含めて、何が不斉環境を生みだしているのか、多くの謎が存在している。

小社に硫化水素研究用の-SulfoBiotics-という製品群があるが、硫化水素産生経路の一つとして、(特に、脳や腎臓では)D-システインを利用する経路が知られている。D-システインは体内では作られてはおらず、何故、天然のL体ではなく、わざわざD体を利用しているのか不思議に思っていたが、今回のフォーラムで少しだけ見えてきたような気がした。脳ではD-セリンがNMDA受容体のco-agonistとして働いており、精神神経活動を調節している。その仕組みを解明することで、うつや統合失調症あるいは認知症の診断・治療への道が開かれる。



講演では、西川先生(東京医科歯科大)と福井先生(徳島大)が、この分野の最新の研究を紹介された。また、細菌の生存戦略としてD-アミノ酸の利用がよく知られているが、それらの役割を笹部先生(慶応大)が進化的な視点も交えて話された。L体に偏っていること自体、エネルギーコストがかかっている。生きていることは偏っていることであり、死がそれを解消する方向だと思えば、老化とともにラセミ化が起こることは理解しやすい。老化や疾病のマーカーの可能性については藤井先生(京都大)が紹介された。そして、これら午後のセッションに先立ち、午前中はD-アミノ酸研究の現状を吉村先生が総括的に紹介され、続いて本間先生(北里大)が、酸性D-アミノ酸の最新の研究内容を話された。

平成とともに歩んできたこのフォーラムも今年で28回を重ね、そろそろ三十路を迎えようとしている。はやりのテーマを追いかけ過ぎると、同仁らしさが失われ、かといって、流行からかけ離れたテーマは企業としても企画しづらい。数年前より発足した新たな世話人会で、半歩先をゆくテーマを楽しく議論している。今後とも期待ください。(佐々本一美)



なお、要旨集の残部がございますので、ご希望の方は小社マーケティング部までお問い合わせください。

ホームページアドレス

URL : <http://www.dojindo.co.jp/>

E-mail : info@dojindo.co.jp

フリーファックス

0120-021557

フリーダイヤル

0120-489548