

DOJIN NEWS

ドージンニュース

2018 No.167

ISSN 0385-1516

老化・代謝

—総説—

個体老化、細胞老化研究の最近の進歩

神戸医療産業都市推進機構先端医療研究センター 鍋島 陽一

—注目の研究—

ミトコンドリア代謝と解糖系を介した 抹茶によるがん幹細胞の増殖阻害

株式会社同仁化学研究所 小松 恭佳

新製品

細胞老化プレートアッセイキット P.8

DNAダメージ検出キット P.8

グルコース定量キット P.11

細胞数ノーマライゼーションキット P.11

ヒストン修飾検出キット P.12

ミトコンドリア膜電位測定キット P.12

お役立

[細胞機能解析]製品一覧冊子 第二版のご案内 P.6





表紙撮影：菊池市 菊池渓谷黎明の滝近く
photo：永島俊介氏

CONTENTS

Review

個体老化、細胞老化研究の最近の進歩 ●———— [1]

神戸医療産業都市推進機構先端医療研究センター 鍋島 陽一

Topics on Chemistry

ミトコンドリア代謝と解糖系を介した抹茶による
がん幹細胞の増殖阻害 ●—— [7]

株式会社同仁化学研究所 小松 恭佳

Commercial

細胞老化検出用試薬・キット ●———— [8]

細胞内代謝測定キット ●———— [10]

ミトコンドリア研究用試薬 ●———— [13]

オートファジー検出試薬 ●———— [14]

抗体標識キット ●———— [17]

新製品

細胞老化プレートアッセイキット ●———— [8]

DNA ダメージ検出キット ●———— [8]

グルコース定量キット ●———— [11]

細胞数ノーマライゼーションキット ●—— [11]

ヒストン修飾検出キット ●———— [12]

ミトコンドリア膜電位測定キット ●—— [12]

脂肪滴染色蛍光試薬 ●———— [16]

お知らせ

〔細胞機能解析〕製品一覧冊子第二版のご案内 ●———— [6]

リポファジー研究の紹介 ●———— [15]

第29回フォーラム・イン・ドージン開催後記 ●———— [18]

個体老化、細胞老化研究の最近の進歩

Recent progress of aging research – Integration of systemic aging and cellular aging –



鍋島 陽一

公益財団法人神戸医療産業都市推進機構
先端医療研究センター センター長
京都大学名誉教授
科学技術振興機構研究開発戦略センター
(JST/CRDS) 特任フェロー
東京大学ニューロインテリジェンス国際
研究機構 PO

Abstract

Aging can be generally defined as the functional deterioration of physiological mechanisms which are strictly dependent on the passage of time. Aging is the greatest risk factor for dysfunction and disease onset and is extremely problematic in the world. Indeed, functional decline constitutes the key risk for age-related diseases such as cancer, cardiovascular diseases and neurodegenerative disorders. Therefore, humankind has been interested in understanding the processes of aging to achieve healthy aging and long life since ancient times. Today, aging is the biggest challenge that mankind has to deal with in this century.

Aging has long been considered to be a process of degradation occurring in a random fashion that would lead to the accumulation of cellular damage in a stochastic fashion and, consequently, tissue decline and death. However, it is now known that aging can be modulated by genetic pathways and

biochemical processes which are evolutionarily conserved.

In this paper, recent progresses of aging and longevity research are summarized. The first topic is A) the gene cascade that delays in mortality and age-associated pathologies in animals. This contains (1) caloric restriction, the first evidence that delays disease onset and mortality in diverse species, (2) the role of insulin/IGF-1 signaling in the longevity and aging disease onset, (3) the role of sirtuins and NAD⁺ in the longevity and aging associated pathologies, and (4) the role of mTOR signal in the longevity and aging disease onset. The second topic is B) the role of cellular senescence in aging and SASP in aging associated pathologies. This includes (1) the stimuli which can provoke irreversible cell-cycle arrest, (2) accumulation of senescent cells in various tissues and organs with aging, (3) cell-cycle arrested cells have two fates; Apoptosis and Senescence, (4) senescent cells secrete SASP (senescence associated secretory phenotype) factors, and (5) the accumulation of senescent cells drives age-related pathology through the harmful effects of SASP factors. The third topic is C) the methods for counteracting aging and rejuvenation. This includes (1) the elimination of senescent cells can prevent or delay tissue dysfunction and extend health span, and (2) the effects of parabiosis suggest the presence of unknown soluble factors involving rejuvenation and aging acceleration.

The recent achievements of aging research created new directions/goals that were (1) delaying aging; (2) realization of the healthy longevity; and (3) suppression of dysfunctions caused by aging. To achieve these goals, it is necessary to elucidate the fundamental mechanisms of aging and longevity at systemic and organ/tissue/cell levels.

1. はじめに一老化研究の変遷一

有史以来、若さを保ち、老化を免れることは人類の夢であった。しかし、何人も老い、死から逃れることはできない。ちなみに、旧約聖書に「彼の歳は120年である。私は長く彼の中に留まらない、彼は肉に過ぎないのだ」とある。人類は老いと死、120年の寿命をどのように受け入れ、どのように立ち向かってきたのだろうか。

2015年、本邦における平均寿命は男性80.21歳、女性86.61歳であり世界一の長寿国となった。老化はガン、血管障害、認知症、サルコペニア、フレイルなどの加齢に伴う疾患群の最大の要因であり、老化のメカニズムを解明し老化を制御することは、多くの老化関連疾患の治療につながると期待される。高齢化は先進国のみならず発展途上国においても急速に進行しており、老化は人類が21世紀に対処すべき最大の課題と言える。

老化は加齢に伴う生理機構の減退と定義されている¹⁾。老化は、多年にわたリストカスティックにおこる細胞障害の蓄積が結果として組織機能の減退、個体の死をもたらすランダムな現象と捉えられてきた。研究が停滞した要因は老化現象に潜む隘路である。すなわち、(1)老化は、遺伝的(先天的)要因、環境的(後天的)要因が絡み合う複雑な現象であること、(2)老化にともなう変化

が徐々に起こり、しかも個体差が大きく、(3)老化による機能低下(生理的老化)と疾患による機能低下(病気)の切り分けが困難であること、また(4)老化は分子、細胞、組織、臓器、個体の各階層におよび、かつ(5)長期的解析、集団の解析が必要であることの困難性である。ところが、90年代後半から今世紀にかけての分子遺伝学的研究により(1)寿命、老化遺伝子が同定され、突破口が切り開かれた。次いで(2)同定された遺伝子(進化的に保存された)を共通言語として酵母、線虫、ハエからほ乳類、ヒトへと研究が展開され、同時に(3)分子と組織・器官、個体老化を繋ぐ統合的な理解が進み、老化研究は急速に進展した。即ち、カロリー制限²⁾による老化遅延、寿命延長のメカニズムが種を超えて確認され、また、インスリン様増殖因子³⁾、サーチュイン⁴⁾、mTOR⁵⁾などの老化制御シグナルが発見され、同時にクロト一変異マウスの発見⁶⁾、引き続き遺伝子改変技術によって開発された老化(疾患)モデルの解析が進み、老化研究は著しく進展した。一方、個体老化における細胞老化の意義が見直され、SASP (senescence associated secretory phenotype) の発見など、新たな発展を遂げている。さらに老化がゲノム、エピゲノム、腸内細菌叢や環境などの影響を受けていることも明らかにされつつある。これらの最近の知見から老化は進化的に保存された遺伝

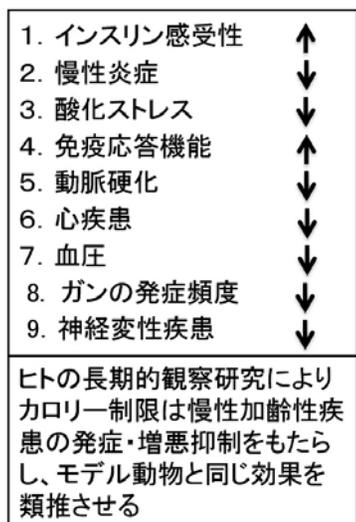


図1 カロリー制限は寿命延長、老化遅延をもたらす
サル、マウス、ラットなどのほ乳類のカロリー制限の効果を取りまとめている。
詳細な解析については進行中であり、今後、多様な現象とその分子メカニズム
が解明されると期待される。文献8を参照

学的、生化学的な過程であり、その分子機構は酵母、線虫から霊長類に至るまで保存されていると考えられるに至っている。さらに最近の老化研究の進展は、老化を遅らせ、寿命を延ばすことも夢ではないことを示唆しており、今や健康長寿は実現可能な目標となっている。

2. 個体老化・寿命研究の進展

2.1. カロリー制限による老化遅延、寿命延長

1935年、McCay⁷⁾は、カロリー制限により平均寿命、最長寿

命を延ばし、加齢関連病変の発症を遅らせることができると報告した。驚くべき事実であったが、分子機構の解明が進まず、長らくこの研究は顧みられなかった。90年代に入り、分子遺伝学的手法により老化遺伝子が発見され、この発見がカロリー制限による寿命延長機構解明に結び付き、研究は急展開し、カロリー制限は老化遅延/寿命延長を解析するための最も広く利用されるモデルシステムとなった。例えば、70%カロリー制限食でサルを飼育すると外見上の若さの保持のみならず、加齢による死亡率が減少し、糖尿病、ガン、心血管障害、神経変性疾患などの加齢疾患の発症年齢が明らかに遅れる⁸⁾(図1)。また、ヒトの長期的観察研究によりカロリー制限は慢性加齢性疾患の発症・増悪抑制をもたらした。よって、カロリー制限はヒトを含む多様な生物の加齢疾患の発症遅延、寿命延長をもたらすと推定される。近年、カロリー制限の老化遅延、寿命延長に関わるシグナル経路の解析が進められ、インスリン/IGF-1、サーチュイン、mTORシグナル経路とのオーバーラップが浮かび上がっている(図4)。

2.2. 老化遅延、寿命延長をもたらすインスリン/IGF-1シグナル

線虫の寿命延長変異体(Daf2⁹⁾)の解析でインスリン/IGF受容体の機能低下が同定された⁹⁾。インスリン様増殖因子は受容体に結合し、そのリン酸化を誘導するが、Daf2変異では受容体と基質との結合が低下し、PI3-Kinase(PIP2をPIP3に変換)の機能の低下によりPIP3レベルが低下する。PIP3レベルの低下はPDK1、AKT1の機能低下をもたらす。フォークヘッド型転写因子であるDAF16/FOXOの機能上昇、核内への移動を誘導する¹⁰⁾(図2)。核内に移動したDAF2/FOXOは、アポトーシス(Bim-1、Fas-1)、ROS活性の抑制(Catalase、MnSOD)、DNA修復(GADD45、DDB1)、細胞周期の停止(P27、p130、GADD45、CyclinG2)、糖代謝の改善(G6Pase、PERCK)、エネルギー代謝の改善に繋がる遺伝子群、すなわち長寿に貢献する遺伝子群の発現を誘導し、老化遅延、寿命の延長をもたらす(図2)¹¹⁾。なお、この経路は

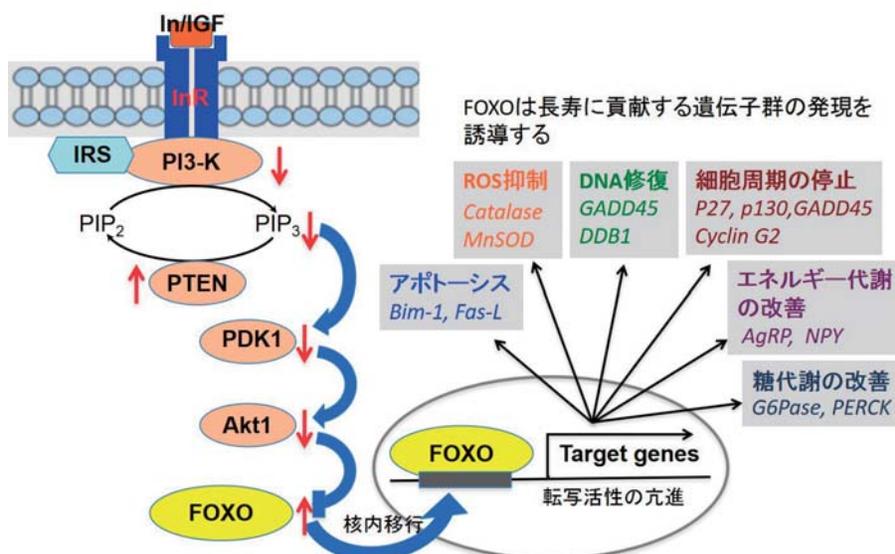


図2 老化遅延、寿命の延長をもたらすインスリン/IGF1シグナル経路
インスリン様増殖因子は受容体のリン酸化を誘導、PI3-Kinaseを活性化し、PI3の合成促進、PDK1、AKT1の機能促進をもたらす。フォークヘッド型転写因子であるDAF16/FOXOの機能を抑制する。長寿命変異体はこの経路が抑制されており、DAF16/FOXOの核内移動を誘導し、長寿に貢献する遺伝子群の発現を誘導し、老化遅延、寿命の延長をもたらすと推定されている。文献9、10、11、12を参照。

	コントロール	NMN投与
1)加齢に伴う体重増加の抑制	↑	↓
2)エネルギー代謝の促進	↓	↑
3)身体活動の上昇	↓	↑
4)インスリン感受性の亢進	↓	↑
5)脂質代謝の改善	↓	↑
6)骨格筋ミトコンドリア機能の改善	↓	↑
7)老化に伴う遺伝子発現変化の抑制	↑	↓
8)眼機能の改善、ドライアイの改善	↓	↑
9)骨密度の上昇	↓	↑
10)免疫細胞の数の改善	↓	↑
毒性、副作用は認められていない	老化	抗老化

図3 NAD⁺の前駆体、NMNの投与の抗老化作用
マウスにNMNを1年間、投与し、コントロールと比較検討し、NMNの抗老化作用を示す。

進化的に保存されており、ヒトの成長ホルモン（GH）、IGF-1受容体の機能、並びにこれらの遺伝子のポリモルフィズム/遺伝子変異と老化、寿命との関連を解析したデータは、インスリン受容体、あるいはその下流因子群がヒトの寿命制御に関わるとの考えを支持している¹²⁾。

2.3. 加齢疾患の発症、寿命制御におけるサーチュイン/NAD⁺の役割

2000年、Imaiらは酵母よりNAD⁺に依存した脱アセチル化酵素、Sir-2を同定し、Sir2の発現増加は酵母の寿命延長をもたらすと報告した¹³⁾。ついで、ほ乳類のSir-2ホモログとして7個のサーチュイン遺伝子（SIRT1-7）が同定され、現在、その発現組織、細胞内局在、ターゲット蛋白の違いなど、個体における機能の解明が

進められている⁴⁾。Imaiは老化遅延、寿命制御におけるSIRT1/NAD⁺の機能を解析、その基本概念をNAD⁺ World 2.0として提唱している¹⁴⁾。“NAD⁺ World 2.0”では、SIRT1とNAMPT（nicotinamide phosphoribosyl transferase、NAD⁺合成の主要酵素）が担う全身性のNAD⁺合成系が、視床下部、脂肪組織、骨格筋からなる臓器連関の中核を担う。即ち、視床下部（コントロール・センター）は交感神経系を介して骨格筋にシグナルを送り、脂肪組織（モジュレーター）は全身性のNAD⁺合成系を調節することにより（NAMPTの発現臓器）視床下部の機能を遠隔的に制御し、そして骨格筋（エフェクター）はマイオカインなどを分泌することでさまざまな組織・臓器の代謝応答の制御に関わる。なお、NAMPTによるNAD⁺合成は各種の組織・臓器において加齢とともに低下し、サーチュインの活性低下を介してさまざまな生理・病理学的変化、老化、加齢関連疾患発症のトリガーとなると推定される。とりわけ、臍β細胞と、中枢性ニューロンは、NAMPTの発現が低く全身性のNAD⁺合成の減弱が大きな機能障害となる¹⁵⁾。例えば、臍β細胞特異的にSIRT1遺伝子の発現を誘導すると臍β細胞の機能は一旦顕著に改善するが、その効果は老化とともに減弱、消失する¹⁵⁾。ところが上記のSIRT1発現増強マウスにNAD⁺の前駆体であるnicotinamide mononucleotide（NMN）を投与すると機能改善が持続する¹⁶⁾。この事実は、たとえSIRT1の機能を高めても回復には限度があり、NAD⁺合成能の維持が重要であることを示唆している。一方、脳特異的にSIRT1を強制発現したマウスは雌雄ともに顕著な老化遅延と寿命延長を示した¹⁷⁾。また老齢となっても身体活動量、体温、酸素消費量、骨格筋ミトコンドリアの機能、睡眠の質などの生理学的形質がコントロールに比べて高く保たれていた。更に、Imaiら、Caiらは、脳の部位特異的にSIRT1を活性化したマウスを解析し、視床下部が哺乳類における老化・寿命制御のコントロール・センターであることを示唆した^{18, 19)}。上記の結果に基づき、Imaiらは1年間にわたるNMNの飲水投与の効果を解析、加齢に伴う体重増加の抑制、エネルギー代謝の促進、身体活動の上昇、インスリン感受性

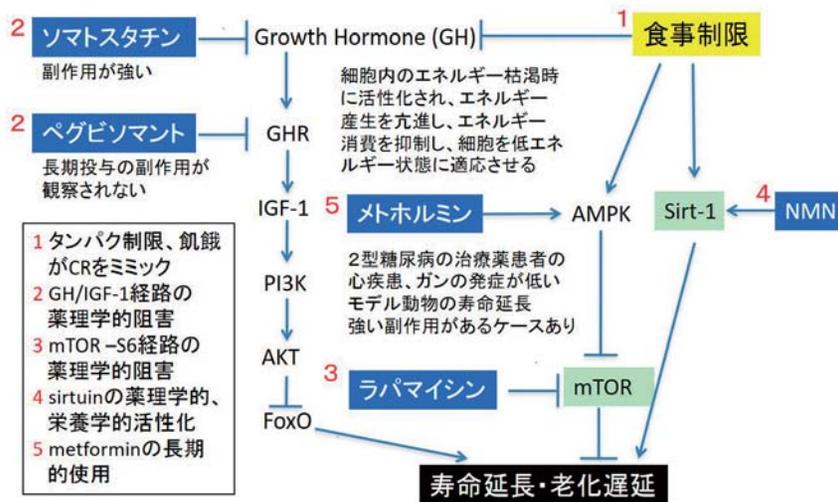


図4 栄養/食事制限のシグナル経路に作用する既存の薬物は有効か？
カロリー制限、インスリン/IGF1シグナル、サーチュインのシグナル経路の解明が進み、mTORC1などのシグナル経路分子が老化遅延・寿命制御のターゲット分子として注目されている。これらの分子に作用する薬剤が開発されており、mTORC1の阻害剤であるラパマイシン、mTORC1の機能低下をもたらすAMP-Kinaseの機能を高めるメトホルミン、成長因子とその受容体に作用するソマトスタチン、ペグビソマントなどの抗老化作用の解析が進められている。この図は宇野雅晴、西田栄介の総説：寿命制御シグナル（Medical Science Digest 2016年12月臨時増刊号）を参考に改変した

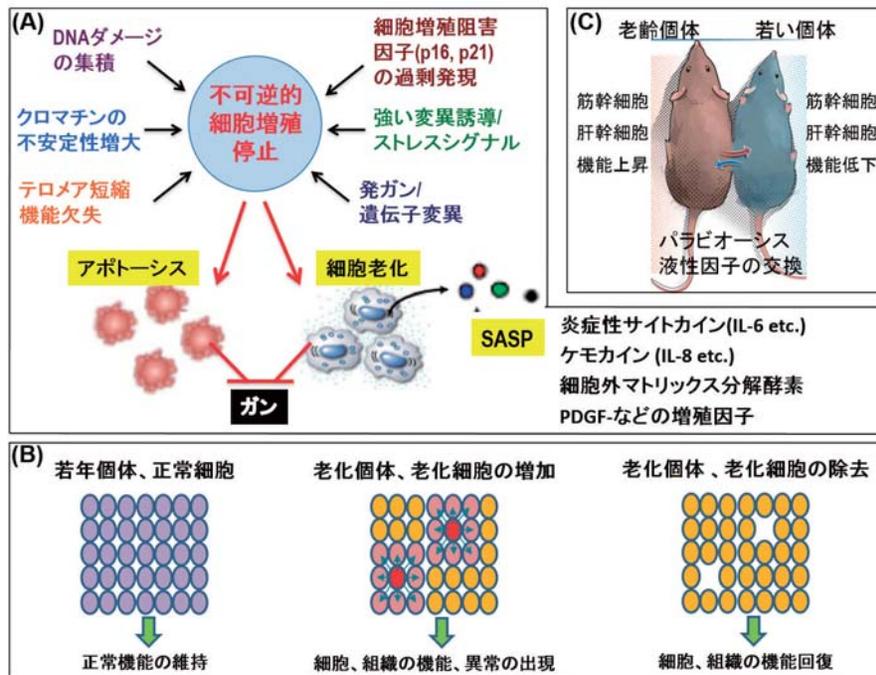


図5 老化細胞、SASP/液性因子による老化制御
 老化細胞は加齢に伴い見られるようになる。また、様々なストレスによって細胞は不可逆的細胞増殖停止状態となり、細胞はアポトーシスを起こすか、細胞老化への運命を辿る。さらに老化細胞は炎症性物質などのSASP因子を分泌し、ガン、老化関連疾患の発症を促進していると推定されている(5A)。遺伝子改変技術により老化細胞を取り除くとマウスの健康寿命が延伸することが報告され、老化細胞の除去を目指す開発的研究に浸きを削っている(5B)。液性因子による個体老化の制御はパラビオーシスによっても示されている(図5C)。

の亢進、脂質代謝の改善、骨格筋ミトコンドリア機能の改善、老化に伴う遺伝子発現変化の抑制、眼機能の改善、骨密度の上昇、免疫細胞の数の改善などの多様な効果をもたらすことを見いだした²⁰⁾(図3)。また、毒性、副作用は認められず、NMN投与による老化遅延が現実の課題となり、日米で臨床試験が開始されている。

2.4. 老化、寿命制御における mTOR 経路の機能

mTOR (mechanistic Target of Rapamycin) はラパマイシンによって阻害される serine/threonine protein kinase である。mTOR は細胞内の栄養状態を感知する分子センサー経路のキー因子として機能しており、蛋白合成や脂質合成を亢進させ、オートファジーを阻害する⁵⁾。mTOR には mTORC1、mTORC2 の2つの複合体があり、異なるターゲットをリン酸化する。なお、ラパマイシンは mTORC1 を強く阻害するが、mTORC2 に対する阻害活性は極めて低い。遺伝子操作による mTOR の機能阻害が線虫、ショウジョウバエの寿命延長をもたらすことが発見され、老化における mTOR シグナルの役割が注目されることとなった²¹⁾。次いで、mTOR の阻害剤であるラパマイシンを投与すると酵母、線虫、ショウジョウバエ、そしてマウスの寿命が延長することが明らかとなり、同様に mTOR シグナルが低下するマウス、すなわち、S6K1 遺伝子欠損マウス、機能が低下した mTOR を発現するマウス、mTOR、mLST8 のダブルヘテロマウスにおいても寿命の延長が確認された⁵⁾。これらの結果は、mTOR シグナルの活性を低下させると種を越えて寿命が延長することを示している。カロリー制限、インスリン/IGF1 シグナルの下流で誘導される mTORC1 の機能低下が寿命延長、老化遅延をもたらすとの多くの報告があ

り、mTORC1 は老化遅延・寿命制御の重要なターゲットと言える²²⁾(図4)。なお、ラパマイシンの投与は寿命の延長のみならず、ガンやアルツハイマー病、加齢に伴う認知障害などの加齢疾患モデルの発症を予防、あるいは遅延させるとも報告されているが、ラパマイシンには免疫抑制作用(ウイルス、カビに感染し易くなる)や、高脂血症、インスリン感受性の低下などの副作用が起こるとの報告があり、抗老化剤としての利用は疑問である。一方、カロリー制限は、AMP-Kinase の機能亢進は mTOR の機能低下を介して寿命延長、老化遅延をもたらすと考えられており、AMP-Kinase の機能を高めるメトホルミンの抗老化作用が注目されている²³⁾。メトホルミンは長期間にわたり2型糖尿病の治療薬として多数の患者が服用しており、服用患者では心疾患、ガンの発症率が低いと報告されている。現在、老化・寿命制御のシグナル伝達経路の制御分子をターゲットとする抗老化方法論の開発が注目されている(図4)。

3. 老化細胞、SASP/液性因子による老化制御

3.1. 分裂寿命による細胞老化

ヘイフリックは、ヒトより採取した細胞を培養し続けることにより、細胞の分裂回数には限界があり、一定の回数になると増殖を停止すると報告した。また、胎児、若い個体、老齢個体から採取した細胞の分裂回数を比較し、採取した個体の加齢に伴い分裂回数が減少することを見だし、個体、試験管内で同じ仕組みで分裂回数が数えられているのではないかと推定した。いわゆる「ヘイフリックの分裂限界」である²⁴⁾。このコンセプトはなかなか

か受け入れられず、紆余曲折の末、分裂毎に染色体末端のテロメア配列が短くなることで一種の寿命時計／細胞分裂の回数券として機能していることやテロメア配列がある長さ以下になると分裂が停止することなどが明らかとなつて、ようやく受け入れられることとなつた²⁵⁾。なお、限界まで分裂し、増殖を停止した細胞を老化細胞と捉えている。

テロメア長の短縮が個体老化を促進するかを検討する目的でテロメアの延長に関与する遺伝子のノックアウトマウスが解析されたが老化促進を示唆する現象は観察されなかった。しかし、マウスのテロメア長がヒトより長く、また、マウスは寿命が短いことから、F1ではテロメア長短縮の影響が現れないのではとの議論があり、F2、F3、F4、F5と飼育を続けたところ、F5において老化促進を示唆する結果が得られた²⁶⁾。この事実の評価は難しいが、細胞老化は個体老化に関わらないとの主張が支配的となった。しかし、最近の知見は個体老化における細胞老化の位置づけの見直しを支持している。

3.2. 不可逆的に増殖停止した細胞の運命

細胞老化はヒトの正常な体細胞を継代培養した際に起こる不可逆的な増殖停止状態として発見されたため、生体内でも起こりうる現象なのか懐疑的な意見も多かった。しかし、細胞老化の特徴を示す細胞が加齢に伴って様々な組織や臓器に見られるようになることや、様々なストレス（DNAダメージの集積、クロマチンの不安定性増大、テロメア短縮／機能欠失、発ガン遺伝子変異／異常活性化、酸化ストレス、細胞増殖阻害因子（p16、p21）の過剰発現、放射線など）によっても細胞は不可逆的な増殖停止状態となることが示され、現在では、細胞老化は個体でも起こる現象と考えられている。なお、不可逆的に増殖を停止した細胞はアポトーシスを起こすか、細胞老化への運命を辿る²⁷⁾（図5A）。

3.3. SASP 因子／液性因子による個体老化の制御

合目的論的見地から、アポトーシスは修復困難な細胞を除去し、細胞のリサイクル、組織リモデリングを導く仕組みとして理解され、細胞老化は細胞の異常増殖を防ぎ、ガンの発生を予防する生体の防御機構と考えられてきた。しかし、(1) 老化細胞が加齢により様々な組織や臓器で見られるようになることや (2) 老化細胞が炎症性物質などの様々な分子を分泌し（SASP 因子と言う）²⁸⁾、ガンを含めた老化関連疾患の発症を促進している可能性が高いことが明らかとなり、さらに、(3) 遺伝子改変により老化細胞を取り除くとマウスの健康寿命が延伸することが報告され²⁹⁾、加齢に伴い体内に老化細胞が増えることが個体老化と老化関連疾患の発症を促進する重要な要因と考えられるようになった（図5B）。

上記の観察は老化細胞から分泌される液性因子が老化を促進することを示唆しているが、パラビオーシスによっても液性因子の重要性が示された³⁰⁾。パラビオーシスとは、例えば若い個体と老齢個体の腹部を切開し、腹部どうしを繋ぎあわせて体液を相互に行き来させ、その影響を解析する実験手法である。驚いたことに、パラビオーシスにより若い個体の老化が促進し、老齢個体の機能回復／若返り？が観察された（図5C）。この現象は以前より解っていたが、その分子機構が全く解らず、長らく放置されてきた。しかし、最近のマス解析などの分析技術の発達により老化促進、機能回復に関与する分子の解析が可能となり、ケモカインとして知られている CCL11 が老化促進因子の候補と報告された³¹⁾。とは言え、解析は緒についたところであり、今後の展開が興味深い。

4. 終わりに一我が国の老化研究の展開一

老化・寿命の制御機構の理解は大きく進展した。とはいえ、分子機構の解明は依然として限定的であり、細胞老化との関係についても多くの解明すべき課題が残されている。一方、NMN の投与や老化細胞の除去、SASP 現象の制御、老化促進分子の解析など、抗老化方法論の開発を巡って凌ぎを削っており、健康長寿は実現可能な目標となってきたことを示唆している。

欧米では多年にわたり老化疾患の病態解明と治療法の開発と共に老化の基本メカニズムの解明に取り組んできたが、近年の老化・寿命制御研究の急速な進展を背景に新たな方向、すなわち、“老化遅延、健康長寿を実現し、老化疾患の発症、老化に伴う機能低下を抑える”との方向性を打ち出した。一方、我が国においては、これまで老化関連疾患研究は支援されてきたが、基盤となる老化研究の振興とその成果に根ざした健康長寿の実現を支援するプロジェクトは支援されてこなかった。老化メカニズムの解明・制御プロジェクトが立ち上がったのは昨年（2017年）のことである³²⁾。老化は、各種要因が複雑に絡み合う現象であり、徐々に起こり、しかも個体差が大きい。また、研究対象が分子、細胞、組織、臓器、個体の各階層におよび、しかも長期的解析、集団の解析が必要である。全ての研究者の叡智を結集し、長期的な視点に立って総合的に研究を推進し、健康長寿を実現しなければならない³³⁾。

[参考文献]

- 1) Robert Arking, 老化のバイオロジー, 鍋島陽一、北 徹、石川冬木監訳, メディカルサイエンスインターナショナル, 2000 年発行
- 2) B. K. Kennedy, K. K. Steffen and M. Kaeberlein, Ruminations on dietary restriction and aging, *Cell Mol. Life Sci.*, 2007; 64: 1323.
- 3) L. Guarente and C. Kenyon, Genetic pathways that regulate ageing in model organisms, *Nature*, 2000; 408: 255.
- 4) S. Imai and L. Guarente, NAD⁺ and Sirtuins in Aging and Disease, *Trends Cell Biol.*, 2014; 24(8): 464.
- 5) B. K. Kennedy and D. W. Lamming, The mechanistic Target of Rapamycin: The grand conductor of metabolism and aging, *Cell Metab.*, 2016; 23(6): 990.
- 6) M. Kuro-o, Y. Matsumura, H. Aizawa, H. Kawaguchi, T. Suga, T. Utsugi, Y. Ohyama, T. Kaname, E. Kume, H. Iwasaki, A. Iida, T. Shiraki-Iida, S. Nishikawa, N. Ryozyo and Y. Nabeshima, Mutation of the mouse Klotho gene leads to a syndrome resembling ageing, *Nature*, 1997; 390: 45.
- 7) C. M. McCay, M. F. Crowell and L. A. Maynard, The effect of retarded growth upon the length of life span and upon the ultimate body size, *Nutrition*, 1935; 5(3): 155.
- 8) R. J. Colman, R. M. Anderson, S. C. Johnson, et al., Caloric restriction delays disease onset and mortality in rhesus monkeys, *Science*, 2009; 325(5937): 201.
- 9) C. Kenyon, A Conserved Regulatory System for Aging, *Cell*, 2001; 105: 165.
- 10) R. Martins, J. Gordon and L. Wolfgang, Long live FOXO: unraveling the role of FOXO proteins in aging and longevity, *Aging Cell*, 2016; 15: 196.
- 11) A. Dervis, M. Salih and A. Brunet, FoxO transcription factors in the maintenance of cellular homeostasis during aging, *Curr. Opin. Cell Biol.*, 2008; 20(2): 126.
- 12) A. Bartke, Somatic growth, aging, and longevity, *npj Aging and Mechanism of Disease*, 2017; 14.
- 13) S. Imai, C. M. Armstrong, M. Kaeberlein and L. Guarente, Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase, *Nature*, 2000; 403: 795.
- 14) 今井真一郎, 哺乳類の老化・寿命制御に関する NAD World 2.0 の概念 - SIRT1/NAMPT によって制御される組織・臓器間コミュニケーションの重

要性一, 月刊糖尿病, 2017; 9(3): 12.

- 15) L. R. Stein and S. Imai, Specific ablation of Nampt in adult neural stem cells recapitulates their functional defects during aging, *EMBO J.*, **2014**; 33(12): 1321.
- 16) K. M. Ramsey, K. F. Mills, A. Satoh and S. Imai, Age-associated loss of Sirt1-mediated enhancement of glucose-stimulated insulin secretion in beta cell-specific Sirt1-overexpressing (BESTO) mice, *Aging Cell.*, **2008**; 7(1): 78.
- 17) A. Satoh, C. S. Brace, N. Rensing, et al., Sirt1 extends life span and delays aging in mice through the regulation of Nk2 homeobox 1 in the DMH and LH, *Cell Metab.*, **2013**; 18(3): 416.
- 18) A. Satoh and S. Imai, Systemic regulation of mammalian ageing and longevity by brain sirtuins, *Nat. Commun.*, **2014**; 5: 4211.
- 19) G. Zhang, J. Li, S. Purkayastha, Y. Tang, et al., Hypothalamic programming of systemic ageing involving IKK- β , NF- κ B and GnRH, *Nature*, **2013**; 497(7448): 211.
- 20) K. F. Mills, S. Yoshida, L. R. Stein, et al., Long-Term Administration of Nicotinamide Mononucleotide Mitigates Age-Associated Physiological Decline in Mice, *Cell Metab.*, **2016**; 24(6): 795.
- 21) T. Vellai, K. Takacs-Vellai, Y. Zhang, et al., Genetics: influence of TOR kinase on lifespan in *C. elegans*, *Nature*, **2003**; 426: 620.
- 22) D. W. Lamming, Inhibition of the mechanistic target of rapamycin (mTOR)-Rapamycin and beyond, *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, **2016**; 6(5): a025924.
- 23) K. Burkewitz, Y. Zhang and W. B. Mair, AMPK at the Nexus of Energetics and Aging, *Cell Metab.*, **2014**; 20(1): 10.
- 24) L. Hayflick and P. S. Moorhead, The serial cultivation of human diploid cell strains, *Exp. Cell Res.*, **1961**; 25: 585.
- 25) A. G. Bodnar, M. Ouellette, M. Frolkis, et al., Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells, *Science*, **1998**; 279: 349.
- 26) K. L. Rudolph, S. Chang, H. W. Lee, et al., Longevity, stress response, and cancer in aging telomerase-deficient mice, *Cell*. **1999**; 96(5): 701.
- 27) B. G. Childs, D. J. Baker, J. L. Kirkland, et al., Senescence and apoptosis: dueling or complementary cell fates?, *EMBO reports*, **2014**; 15(11): 1139.
- 28) T. Tchkonina, Y. Zhu, J. V. Deursen, et al., Cellular senescence and the senescent secretory phenotype: therapeutic opportunities, *J. Clin. Invest.*, **2013**; 123(3): 966.
- 29) D. J. Baker, B. G. Childs, M. Durik, et al., Naturally occurring p16Ink4a-positive cells shorten healthy lifespan, *Nature*, **2016**; 530: 184.
- 30) M. Scudellari, Ageing research: Blood to blood, *Nature*, **2015**; 517(7535): 426.
- 31) S. A. Villeda, J. Luo, K. I. Mosher, et al., The ageing systemic milieu negatively regulates neurogenesis and cognitive function, *Nature*, **2011**; 477(7362): 90.
- 32) 村松哲行、永井雅規, 我が国における老化研究の方向性について—老化メカニズムの解明・制御プロジェクトの推進—, 実験医学増刊号 総力戦で挑む老化・寿命研究, **2017**, 35(20): 188.
- 33) 鍋島陽一, 老化研究の道筋を示す旗印 Geroscience Initiative Japan の設立, 実験医学増刊号 総力戦で挑む老化・寿命研究, **2017**, 35(20): 148.

[著者プロフィール]

氏名：鍋島 陽一 (Yo-ichi Nabeshima)

所属：公益財団法人神戸医療産業都市推進機構先端医療研究センター センター長

京都大学名誉教授

科学技術振興機構研究開発戦略センター (JST/CRDS) 特任フェロー

東京大学ニューロインテリジェンス国際研究機構 PO

専門分野：分子生物学、分子病態学

研究テーマ：生物の形成原理の解明、時間軸の生物学

[略歴]

- 1972年3月 新潟大学医学部卒業
- 1976年3月 新潟大学大学院医学研究科博士課程修了 医学博士
- 1976年4月 新潟大学医学部助手 (生化学)
- 78年 同講師
- 1984年9月 癌研究会癌研究所研究員
- 87年 主任研究員
- 1987年11月 国立・精神神経センター 神経研究所遺伝子工学研究部長
- 1998年4月 大阪大学細胞生体工学センター 教授
- 1998年11月 京都大学大学院医学研究科 教授
- 2005年10月 日本学術会議第20期期会員、21期会員
- 2005年10月 京都大学医学研究科副研究科長 (2007年9月まで)
- 2005年10月 京都大学付属ゲノム医学センター長 (2007年9月まで)
- 2007年4月 京都大学生命科学系キャリアパス形成ユニット長
- 2010年3月 京都大学医学研究科 定年退職
- 京都大学名誉教授
- 2010年4月 現職

[細胞機能解析] 製品一覧冊子第二版のご案内

ミトコンドリア解析用試薬を含む、細胞機能解析関連の製品を一冊に集約。新製品を追加しました。

[掲載製品]

細胞老化、細胞内代謝、脂質、ミトコンドリア、オートファジー、細胞増殖、細胞毒性

試薬パンフレットダウンロード 同仁化学 検索



Topics on Chemistry

ミトコンドリア代謝と解糖系を介した抹茶によるがん幹細胞の増殖阻害

株式会社同仁化学研究所 小松 恭佳

日本人における死亡原因の第1位は「がん」である。多くのがんは、外科手術や化学療法、放射線療法を用いて治療されるが、がんが進行した段階では、治療抵抗性のために治療が困難となり完治が難しくなる。また、多くの場合、がんが再発、転移してしまうことが大きな問題となっている。この腫瘍の再発、転移を媒介しているものとしてがん幹細胞の存在が挙げられており、近年ではがん幹細胞を標的とした治療法の検討が増えてきている。最近の研究において、日本の緑茶に含まれる成分の抗がん活性が調査され、その有効性が検証されているが、その中でも、緑茶の主要成分の1つであるエピガロカテキンガレート (EGCG) は、がん幹細胞の機能を抑制することが報告されている¹⁾。また、健康補助食品として使用されている天然化合物の「抹茶」も同様に、抗がん活性を有している可能性があるが、その潜在的な分子メカニズムはほとんど知られていない。

本稿では、ヒト乳がん由来細胞である MCF-7 細胞をモデルに、M. P. Lisanti らが明らかにした、matcha green tea (MGT) によるがん幹細胞の細胞代謝阻害について紹介する²⁾。

彼らは、がん幹細胞への薬剤効果を評価する Sphere

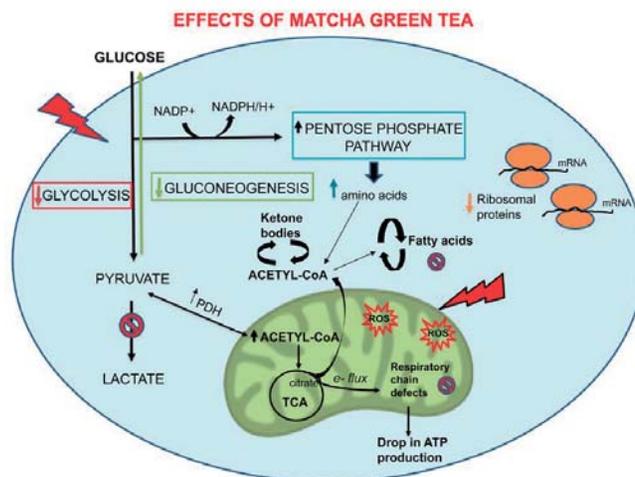


図3 MGTによる影響を受ける代謝経路図
参考文献²⁾より引用

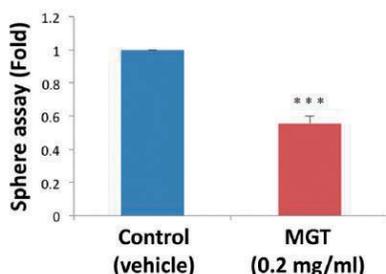


図1 Sphere Formation Assay 結果
参考文献²⁾より引用

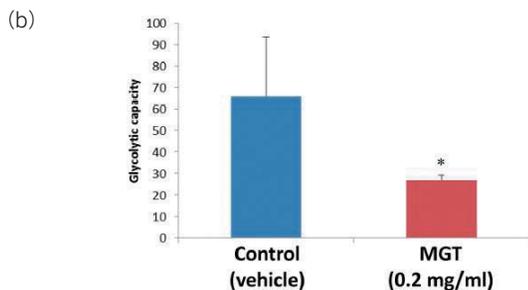
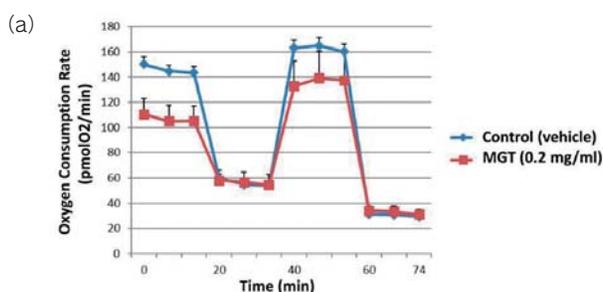


図2 (a) 酸素消費速度および (b) 解糖能解析結果
参考文献²⁾より引用

Formation Assay によって、MCF-7 細胞を 0.2 mg/ml の MGT で処理すると細胞の増殖能が 50% 阻害されることを確認している (図1)。

がん幹細胞の増殖は、ミトコンドリアの代謝に大きく依存していることが知られていることから、この結果は、MGT がミトコンドリア代謝を抑制する可能性を示唆している。さらに、Seahorse XF Analyzer を用いた酸素消費率 (OCR) および解糖活性の指標である細胞外酸化速度 (ECAR) の測定結果から、MGT 処理した MCF-7 細胞は、ミトコンドリア呼吸の減少によって ATP 産生が低下し、さらに解糖能が抑制されていることが明らかとなった (図2)。

これらの結果は、MGT が細胞内代謝経路のうち、酸化的リン酸化および解糖系を阻害することを示しており、がん幹細胞の増殖が停止することに一致する結果となっている。一方で、MCF-7 細胞が MGT に暴露されると、ペントースリン酸経路が活性化される結果が得られている。これは、MGT が抗酸化剤として作用するだけでなく、抗酸化物質の補因子である NADPH の産生を誘導することを示唆している。その他、MGT による阻害を受ける代謝経路として mTOR 経路が挙げられている。これは、ラパマイシンのような化学物質の代わりに、天然化合物である MGT が mTOR の阻害剤として利用できる可能性があることを提起している。

これらの結果より、MGT はミトコンドリア代謝および解糖系を含む細胞内代謝の抑制を介することにより、がん幹細胞の増殖を阻害する作用を有しているといえる (図3)。本研究が更に進むことにより、MGT が、腫瘍の再発および転移を予防する、抗がん療法の1つとなることが期待される。

[参考文献]

- H. Fujiki, E. Sueoka, A. Rawangkan and M. Suganuma, "Human cancer stem cells are a target for cancer prevention using (-)-epigallocatechin gallate", *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **2017**, *143*, 2401-2412.
- G. Bonuccelli, F. Sotgia and M. P. Lisanti, "Matcha green tea (MGT) inhibits the propagation of cancer stem cells (CSCs), by targeting mitochondrial metabolism glycolysis and multiple cell signaling pathways", *Aging*, **2018**, *10*, 1867-1883.

細胞老化検出用試薬・キット

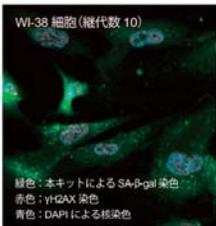
アポトーシス、ネクローシス、オートファジーおよび細胞老化は、細胞の生存および死をコントロールする機能として知られています。中でも細胞老化は、近年がん化因子として知られる SASP の発見や、幹細胞で老化現象の発見が認められるなど、各分野で重要視されてきています。小社では、細胞老化の評価方法および評価目的に応じて選択できるように 4 種類のキットおよび試薬をご用意しました。

製品ラインナップ

細胞老化検出キット

Cellular Senescence Detection Kit - SPiDER-βGal
蛍光顕微鏡、FCM※による高感度解析

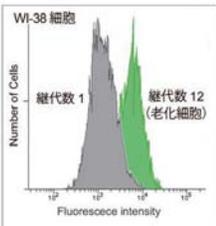
- ・ X-gal では困難だった定量解析が容易に
- ・ 生細胞、固定化細胞の SA-β-gal 活性を検出



WI-38 細胞 (継代数 10)

緑色: 本キットによる SA-β-gal 染色
赤色: γH2AX 染色
青色: DAPI による核染色

蛍光イメージング (多重染色)



WI-38 細胞

継代数 1 継代数 12 (老化細胞)

Number of Cells

Fluorescence Intensity

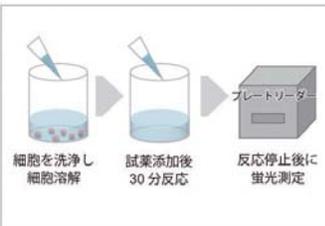
フローサイトメトリー定量解析

老化細胞のモデルとして継代培養を繰り返した WI-38 細胞を用い解析。
 ※ FCM: フローサイトメトリー

[新製品] 細胞老化プレートアッセイキット

Cellular Senescence Plate Assay Kit - SPiDER-βGal
プレートリーダーによる簡便なアッセイ

- ・ 簡便な操作で SA-β-gal 活性を数値化
- ・ マイクロプレートによる多検体処理



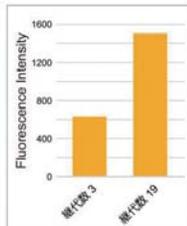
細胞を洗浄し
細胞溶解

試薬添加後
30分反応

反応停止後に
蛍光測定

プレートリーダー

測定操作



Fluorescence Intensity

継代数 3 継代数 19

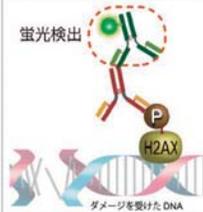
プレートリーダー解析

継代数の異なる WI-38 細胞を用い SA-β-gal 活性を数値化。

[新製品] DNA ダメージ検出キット

DNA Damage Detection Kit - γH2AX
DNA ダメージの変化を老化細胞で解析

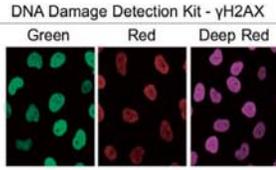
- ・ γH2AX を指標に DNA ダメージを可視化
- ・ 蛍光波長の異なる 3 色をラインナップ



蛍光検出

ダメージを受けた DNA

検出方法



DNA Damage Detection Kit - γH2AX

Green Red Deep Red

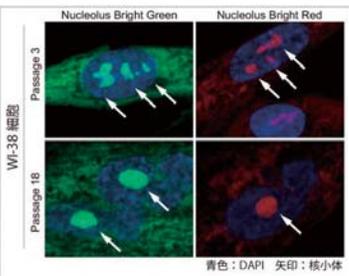
Doxorubicin 処理した細胞の評価

Doxorubicin 添加により、DNA ダメージを受けた細胞を解析

核小体染色試薬

Nucleolus Bright Green/ Nucleolus Bright Red
核小体の変化を老化細胞で解析

- ・ RNA 選択的な色素で核小体を可視化
- ・ 固定化細胞への添加で多重染色できる



Nucleolus Bright Green Nucleolus Bright Red

WI-38 細胞

Passage 3 Passage 18

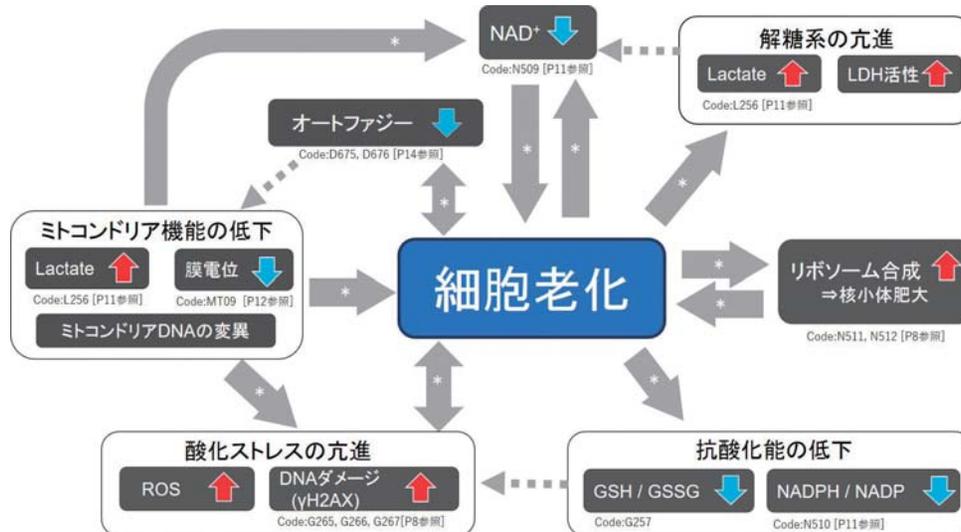
青色: DAPI 矢印: 核小体

継代数が少ない細胞に比べ、継代数の多い細胞では核小体が肥大化あるいは一つに凝集しているものを多く観察。

製品名	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
Cellular Senescence Plate Assay Kit - SPiDER-β Gal	20 tests 100 tests	11,000 32,000	SG05
Nucleolus Bright Green	60 nmol	28,000	N511
Nucleolus Bright Red	60 nmol	28,000	N512
DNA Damage Detection Kit - γ H2AX- Green	1 set	34,000	G265
DNA Damage Detection Kit - γ H2AX- Red	1 set	34,000	G266
DNA Damage Detection Kit - γ H2AX- Deep Red	1 set	34,000	G267

細胞老化の特徴

近年がん化因子として知られる SASP の発見や、幹細胞で老化現象の発見が認められるなど、細胞老化は各分野で重要視されてきています。引用文献数の高い最新の論文情報を基に、細胞老化の特徴をまとめました。

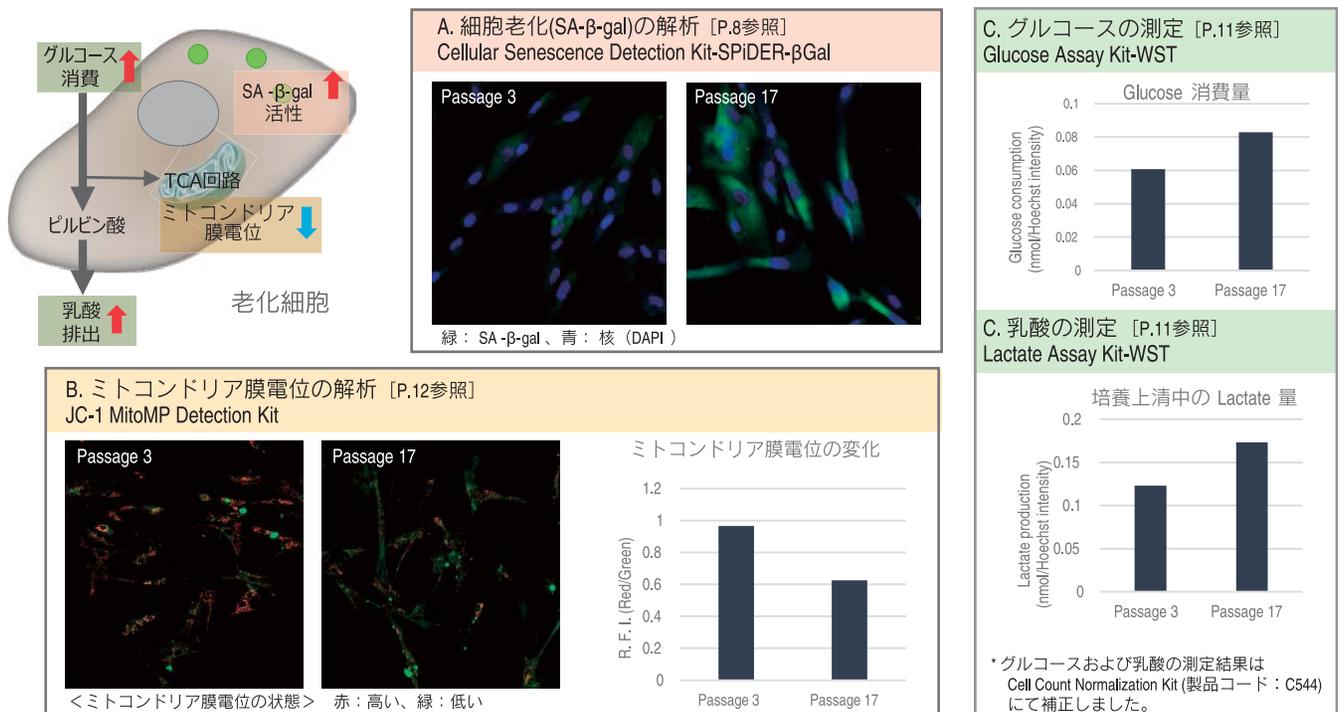


* 論文情報の詳細は HP よりご覧いただけます。

老化マップ 同仁 [検索](#)

様々な指標での老化細胞評価例

継代数の異なる WI-38 細胞を用い、A. 細胞老化 (SA-β-gal)、B. ミトコンドリア膜電位および C. 代謝 (グルコース、乳酸) を指標に各キットにて評価しました。結果、老化細胞においては SA-β-gal 活性が亢進し、ミトコンドリア膜電位は低下する結果が得られました。また代謝の指標として測定したグルコース消費量は増大し、培養上清中に排出された乳酸量も増大する結果が得られました。



操作の詳細は HP よりご覧いただけます。

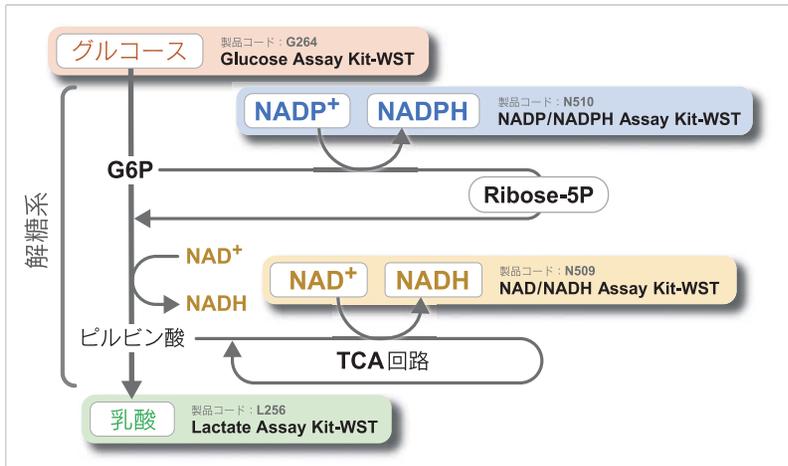
製品コード 同仁 [検索](#)

新製品

細胞内代謝測定キット

細胞内の代謝システムである、解糖系やTCA回路、ペントース-リン酸経路の解析は、細胞状態を理解する上で重要であり、グルコース、乳酸および、NAD(P)⁺/NAD(P)Hなどのエネルギーおよび代謝産物を指標に評価されています。

細胞内代謝関連マップと疾患サンプルの評価例で理解が深まる



お客様の声

(2018年生化学会、癌学会)

- 代謝はよく理解できてなかったが、報告例がまとめがあると手を出しやすい。
- 各代謝指標の変化で何が言えるか? 分からなかったので役立つ。
- 引用文献が一緒にあるので便利!
- 研究室内で展開する!

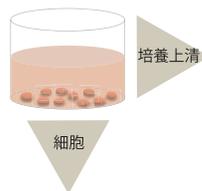
代謝と疾患の関連性を示した報告例

代謝への影響因子	NAD ⁺ /NADH 比		サンプル
解糖系阻害による変化(上記データ)	↓	↑	HeLa 細胞(解糖系阻害剤処理)
ミトコンドリア機能低下	n/a	↓	哺乳動物細胞(mtDNA 突然変異モデル)
	↑	n/a	個体老化マウスの脳
高インスリン血症	↑	(↓ NAD ⁺ 量)	がん細胞
高インスリン血症	↑	n/a	早期ヒト糖尿病患者の血漿
NAMPT*(NAD ⁺ 合成酵素)量低下による変化	n/a	(↓ NAD ⁺ 量)	個体老化マウス

上記詳細が記載されている論文情報は小社 HP よりご覧いただけます。

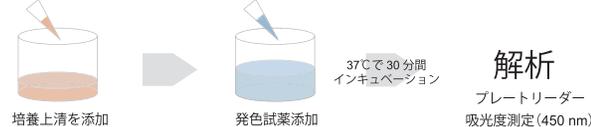
簡単な操作で測定

細胞を準備



グルコース、乳酸の測定手順

- ・培養上清をプレートに移し発色試薬と混合するだけの簡便操作
- ・培養上清を2つに分け、Glucose および Lactate の両キットでの同時評価が便利



*細胞をサンプルとしても使用可能です。詳しくは製品 HP へ。

NAD⁺/NADPH、NAD⁺/NADH の測定手順

- ・前処理をより簡便にするため、細胞溶解バッファーと除タンパク質チューブをキットに同梱*
- ・NAD(P)H と NAD(P)⁺ の測り分けは、サンプルの加温操作のみで完結

同仁化学だけ!



* 検量線の作成およびサンプルの測定をそれぞれ n=3 で行った場合、12 サンプルの測定が可能です。そのため本キットには、除タンパク質用チューブを 12 本同梱しています。

<細胞を用いた評価例>

新製品

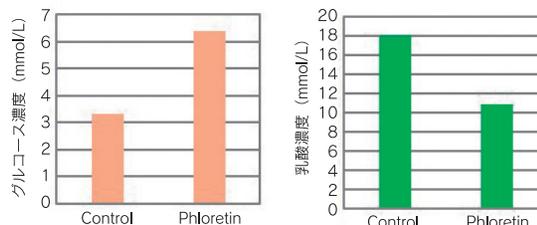
Glucose Assay Kit-WST

Lactate Assay Kit-WST

グルコーストランスポーター阻害剤である Phloretin を Jurkat 細胞に添加し、培養後の上清を用いて、培地中のグルコース量と乳酸量を測定しました。

その結果、Phloretin 添加によりグルコースの取り込みが阻害され、培地中のグルコース量は増加、乳酸量は減少する結果が得られました。

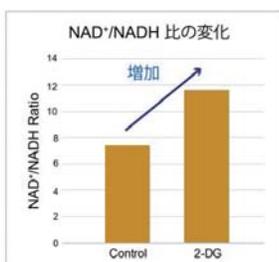
Phloretin の添加実験による培養上清中のグルコースと乳酸量の変化



NAD/NADH Assay Kit-WST

解糖系の阻害剤である 2-Deoxy-D-glucose(2-DG) を添加し NAD⁺/NADH を定量しました。

その結果、2-DG を添加すると、解糖系が阻害され、NAD⁺/NADH の比率が増加しました。

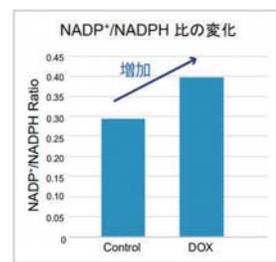


NADP/NADPH Assay Kit-WST

抗がん剤である Doxorubicin(DOX) を添加し NADP⁺/NADPH を定量しました。

その結果、DOX 添加により NADP⁺/NADPH が増加しました。これは、ROS 消去により減少したグルタチオン酸化型 (GSSG) を還元する機構が働き NADPH の消費量が増えたことによるものと考えられます。

※ DOX 処理による ROS 発生と消去機構の詳細は小社 HP よりご覧いただけます。



実験の詳細は小社 HP よりご覧いただけます。

細胞内代謝 同仁 検索

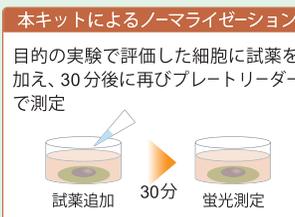
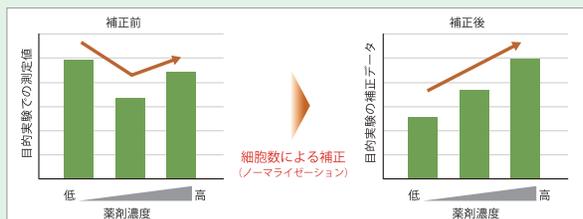
新製品

細胞数ノーマライゼーションキット

Cell count Normalaization Kit
代謝キットとの併用でデータ信頼性を向上

Normalization 同仁 検索

マイクロプレートを用いた細胞の解析では、得られた結果をウェル中の細胞数で補正することが必要となります。補正には細胞数計測の他総タンパク量や NAD 量が使用されます。本キットでは、試薬を細胞培養液に添加するだけで、細胞内の核を染色し得られる蛍光強度から、細胞数を簡便に評価することができます。



品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
Glucose Assay Kit-WST	50 tests	18,000	G264
	200 tests	38,000	
Lactate Assay Kit-WST	50 tests	29,000	L256
	200 tests	68,000	
NAD/NADH Assay Kit-WST	100 tests	54,000	N509
NADP/NADPH Assay Kit-WST	100 tests	54,000	N510
Cell Count Normalaization Kit	200 tests	8,000	C544
	1000 tests	20,000	

新製品

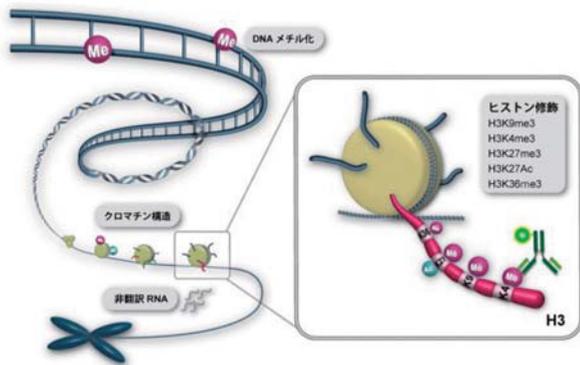
ヒストン修飾検出キット

Anti H3KX antibody - Green
X=9me3, 4me3, 27me3, 27AC, 36me3

- ・ヒストン修飾を一細胞レベルで解析
- ・検出に必要な試薬がセットに

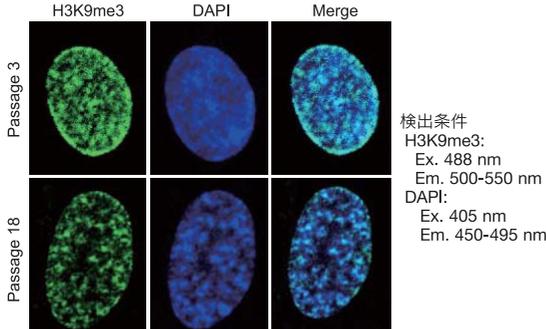
クロマチンの基本単位であるヌクレオソームを構成するコアヒストンは、翻訳後修飾を受けることが知られており、特にヒストンH3のリジン残基のアセチル化、メチル化、ユビキチン化は遺伝子発現制御において主要な役割を果たしています。

小社では、特に遺伝子発現の促進・制御に関わる5種の修飾ヒストンを解析するためのツールとして、蛍光標識ヒストン修飾抗体5種を準備しました。本製品に含まれる蛍光標識修飾ヒストン抗体はモノクローナル抗体研究所製の抗体を使用しています。



<細胞での評価例>

継代数の異なるWI-38細胞を用い、本製品(H3K9me3)及びDAPI染色より細胞老化に伴うH3K9me3の変化を解析しました。



その結果、継代を繰り返した老化細胞において、H3K9me3の局在が変化する現象が観察されました。

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
Anti H3K9me3 antibody - Green	1 set	42,000	H419
Anti H3K4me3 antibody - Green	1 set	42,000	H420
Anti H3K27me3 antibody - Green	1 set	42,000	H421
Anti H3K27AC antibody - Green	1 set	42,000	H422
Anti H3K36me3 antibody - Green	1 set	42,000	H423

新製品

ミトコンドリア膜電位測定キット

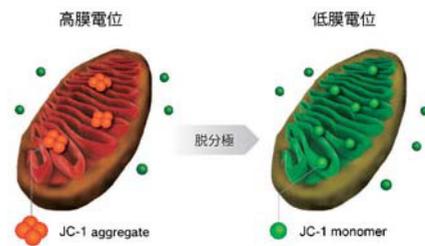
JC-1 MitoMP Detection Kit

ミトコンドリアは、ATP等のエネルギー産生の際であり、その活性の変化や機能障害ががんや老化、神経変性疾患などと密接に関連しています。そのため、ミトコンドリアの状態を理解することは重要であり、その指標としてエネルギー産生に伴い生じる膜電位差が評価されています。

本キットは、一般的なミトコンドリア膜電位感受性色素であるJC-1を用いており、はじめての方でも使い易いよう、難溶性色素の溶解プロトコルをはじめ様々なアプリケーションをご用意しております。

測定原理

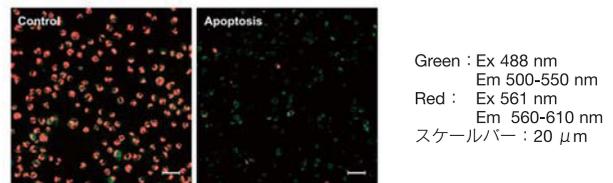
ミトコンドリアが正常で膜電位が保たれた状態ではJC-1が凝集し赤色の蛍光を発生し、膜電位が低下するとJC-1が単量体として存在し緑色の蛍光を発生します。この赤色と緑色の蛍光強度比より、ミトコンドリア膜電位の変化を評価することができます。



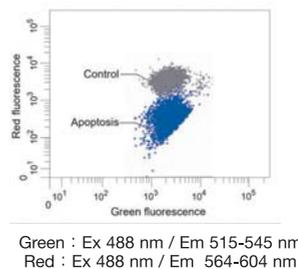
汎用装置を用いた細胞での解析例

Jurkat細胞をアポトーシス誘導剤であるStaurosporineで処理し本キットを用いて染色した後、蛍光顕微鏡、フローサイトメトリ、プレートリーダーにより解析しました。

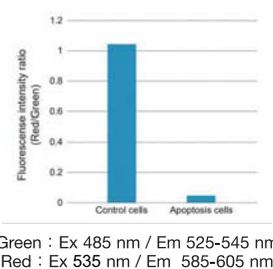
<蛍光顕微鏡>



<フローサイトメーター>



<プレートリーダー>

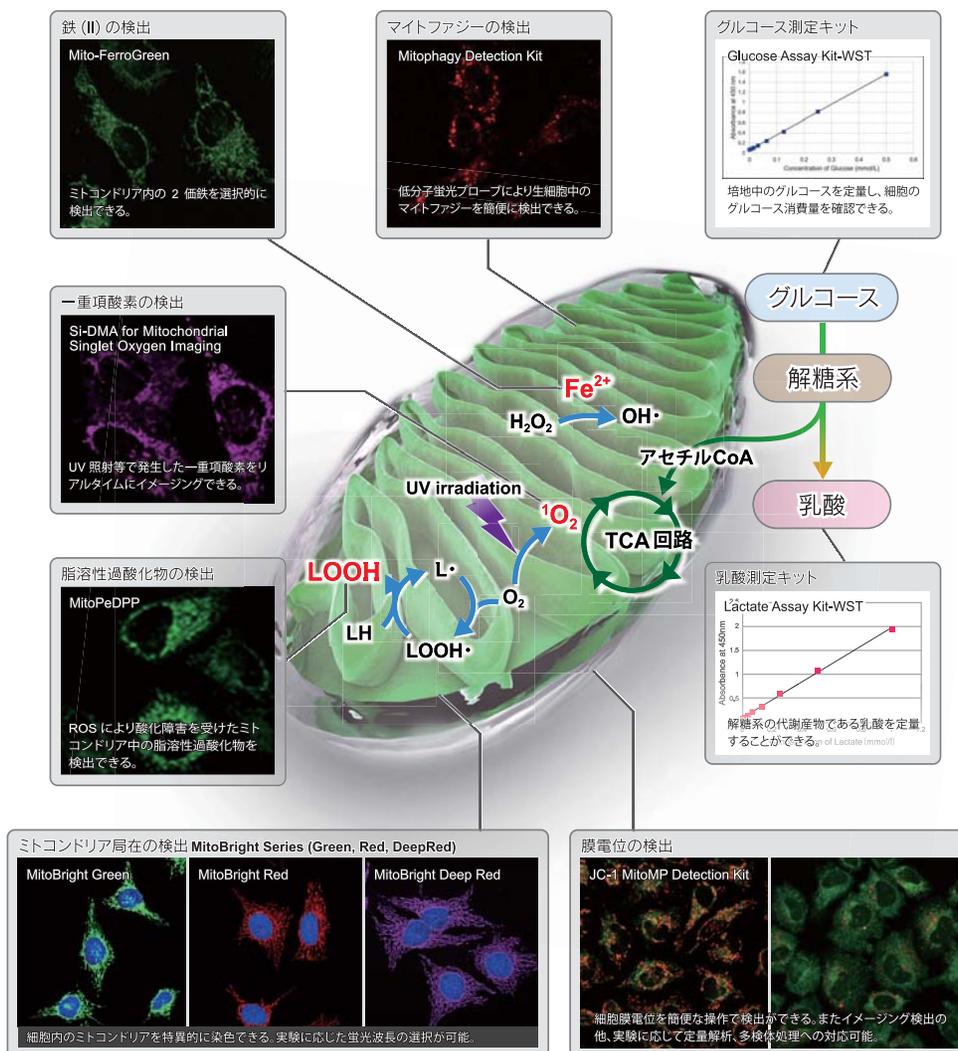


品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
JC-1 MitoMP Detection Kit	1 set	23,000	MT09

ミトコンドリア研究用試薬

小社では、ミトコンドリア研究用試薬を各種取り揃えています。
各製品の測定例やプロトコルについては、小社HPにてご覧いただけます。

ミトコンドリア 比較 同仁 検索



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
Mito-FerroGreen	50 µg×2	25,000	M489
MitoPeDPP	5 µg×3	18,600	M466
Si-DMA for Mitochondrial Singlet Oxygen Imaging	2 µg	20,000	MT05
MitoBright Green	50 µg×3	9,800	MT06
MitoBright Red	50 µg×3	9,800	MT07
MitoBright Deep Red	50 µg×3	9,800	MT08
Lactate Assay Kit-WST	50 tests	29,000	L256
	200 tests	68,000	
Glucose Assay Kit-WST	50 tests	18,000	G264
	200 tests	38,000	

オートファジー検出試薬

DAPGreen-Autophagy Detection
DALGreen-Autophagy Detection

オートファジーは、細胞内の不要なタンパク質・細胞小器官等の再利用や代謝のための分解機構としての様々な疾患への関与が示唆されています。DAPGreen, DALGreen は試薬を培養細胞に添加するだけで簡単にオートファジーを検出できる蛍光試薬です。

DAPGreen はオートファゴソーム膜に取り込まれ蛍光を発します。一方、DALGreen は凝集タンパク質等が分解されるオートリソソーム段階で蛍光を発します。この様に DAPGreen, DALGreen は、“オートファゴソーム形成およびリソソームとの融合・内容物の分解”の過程を試薬の添加だけでモニタリングすることができる試薬です。

＜操作は試薬の添加だけ＞

遺伝子導入は不要です。細胞に試薬を添加するだけの簡単操作で蛍光イメージングによる解析が可能です。



＜検出試薬の概要＞

	対応装置			蛍光特性	容量 / 使用回数の目安	既存検出法
	蛍光顕微鏡	フローサイトメーター	プレートリーダー			
DAPGreen	○	○	○	Ex. 425-475 Em. 500-560 ※ 共焦点顕微鏡では488 nmにて励起可能	5 nmol x 1 / 35 mm dish: 25 枚分 (0.1 μmol/l で使用時)	LC3-GFP MDC Cyto-ID など
DALGreen	○	○	×	Ex. 350-450 Em. 500-560 ※ 共焦点顕微鏡では488 nmにて励起可能	20 nmol x 1 / 35 mm dish: 10 枚分 (1.0 μmol/l で使用時)	LC3-GFP-RFP など

※ 励起・蛍光スペクトル図は小社 HP にてご覧いただけます。
※ DAPGreen と DALGreen の共染色イメージングはできません。

＜各種装置での解析例＞

DAPGreen **DALGreen**

蛍光顕微鏡

検出波長: Ex. 488 nm / Em. 500-563 nm
スケールバー: 20 μm

DALGreen で染色後の HeLa 細胞を、アミノ酸不含培地にて 6 時間培養し、蛍光顕微鏡にてイメージングにより解析しました。

タイムラプス動画は HP よりご覧いただけます。

DAPGreen **DALGreen**

フローサイトメーター

DAPGreen で染色後の HeLa 細胞を、アミノ酸不含培地にて 0、3、6 時間培養し、フローサイトメーターにて検出しました。

DAPGreen

プレートリーダー

DAPGreen で染色後の HeLa 細胞を、アミノ酸不含培地にて 0、2、4、6 時間培養し、プレートリーダーにて検出しました。

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
DAPGreen-Autophagy Detection	5 nmol	36,000	D676
DALGreen-Autophagy Detection	20 nmol	28,000	D675

本製品を使用した論文がオープンアクセスになりました。詳細は、小社 HP よりご覧いただけます。

オートファジー 同仁 **検索**

〈オートファジーとの関連性〉

オートファジーと関連性が報告されている“細胞老化”、“がん・細胞死”“酸化ストレス”、“脂質代謝”について被引用件数の多い注目の論文を紹介します。

細胞老化

T. Yamamoto et al., *Autophagy*, **2016**, *12*, 801

オートファジー欠損マウスにおいて、ミトコンドリアの機能障害や DNA 損傷など細胞老化と同様の現象を示した。

ミトコンドリア, SA-β-gal, LC3, γ H2AX

がん転移と細胞死

Zhenyi Su et al., *Molecular Cancer*, **2015**, *14*.

オートファジーは、がん細胞のアポトーシスやネクローシスを制御し、がん転移を誘発するケースと逆にアポトーシス誘導や抗がん免疫の活性などによるがん転移を抑制するケースがある。

マクロオートファジー, ATGs, アポトーシス, ネクローシス

酸化ストレス

G Filomeni et al., *CELL DEATH D.*, **2015**, *22*, 377

ROS や RNS がオートファジーの抑制に関与しており、またオートファジーの欠損は ROS を産生しオルガネラが DNA を損傷させ腫瘍形成を誘導する。

ROS, RNS, DNA ダメージ, タンパク質チオール

脂質代謝

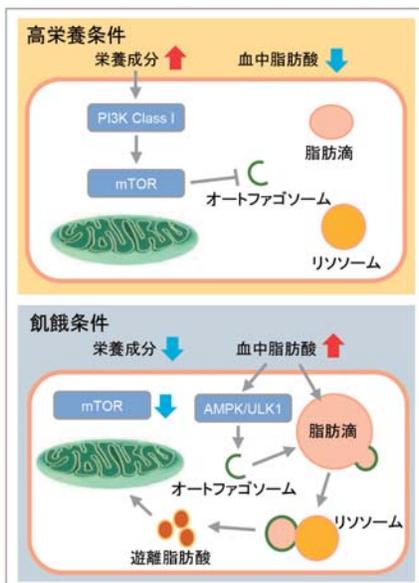
Angelika S. Rambold et al., *Dev Cell*, **2015**, *32*, 678

飢餓状態では、オートファジーにより脂肪酸を脂肪滴に蓄積させ、リパーゼにより脂肪滴から分解された脂肪酸はミトコンドリアにてβ酸化される。

脂肪酸, 脂肪滴, ミトコンドリア, 飢餓

リポファジー研究の紹介

リポファジーは、オートファジーの1種であるマイクロオートファジーに分類され、細胞内の小器官である脂肪滴選択的な分解機構として注目を集めています。脂肪滴はエネルギー代謝をコントロールする重要な器官であり、脂肪肝や肥満、動脈硬化症との関連性が分かっています。本稿では、リポファジー研究について解説した被引用件数の多い総説と最近の注目論文を紹介します。



異なる栄養条件下でのリポファジー (視床下部)

小社では、オートファジーおよび脂肪滴に対する選択的な蛍光プローブを製品化しており、リポファジー研究のさらなる発展に寄与していきたいと考えております。ご要望等ありましたら、小社カスタマーリレーション部までご連絡ください。(脂肪滴検出プローブについては本冊子 P16 をご覧ください)

リポファジー研究論文のレビューとして多数引用されている文献です。細胞内の重要なエネルギー源として利用される脂肪滴中のトリグリセリドは、これまで理解されていたリパーゼによる経路だけでなく選択的オートファジーであるリポファジーが発見されました。本論文ではリポファジーの役割と関連する疾患として脂肪肝、肥満、加齢による代謝障害について解説しています。

Rajat Singh and Ana Maria Cuervo, "Lipophagy: Connecting Autophagy and Lipid Metabolism", *International Journal of Cell Biology*, **2012**, DOI: 10.1155/2012/282041

肝臓におけるオートファジーおよびリポファジーの誘導には肝臓脂質トリグリセリドリパーゼ (ATGL) を必要とし、またそれらは長寿遺伝子として知られる SIRT1 が仲介していることを示しています。

Aishwarya Sathyanarayan, Mara T. Mashek and Douglas G. Mashek, "ATGL Promotes Autophagy/Lipophagy via SIRT1 to Control Hepatic Lipid Droplet Catabolism.", *Cell Rep.*, **2017**, *19* (1), 1. doi: 10.1016/j.celrep.2017.03.026.

PI3K: Phosphoinositide 3-kinase
mTOR: Mechanistic target of rapamycin

AMPK: AMP-activated protein kinase
ULK1: Unc-51 Like Autophagy Activating Kinase 1

新製品

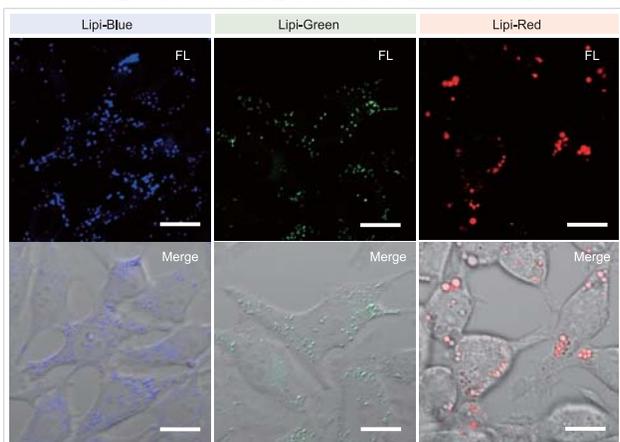
脂肪滴染色蛍光試薬

Lipi シリーズ (Blue, Green, Red)

Lipi シリーズは、脂肪親和性の高い低分子蛍光試薬であり、疎水性環境下で蛍光が増強します。そのため、試薬を添加するだけで生細胞および固定化細胞中の脂肪滴を明瞭に観察することができます。

< 脂肪滴の染色例 >

HeLa 細胞にオレイン酸を添加することで脂肪滴を形成させ、Lipi シリーズの各色素にて染色しました。



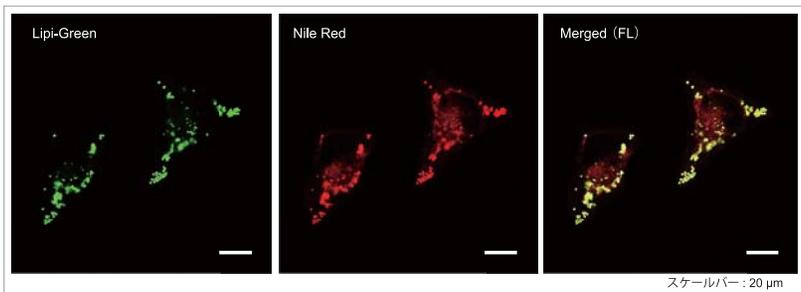
< 染色条件 >
HeLa 細胞の培養液中に 200 μ mol/l オレイン酸を添加、一晚培養後に細胞を PBS で洗浄し Lipi シリーズの各色素 1 μ mol/l にて 15 分間染色し観察。

< 検出条件 >
Lipi-Blue : Ex. 405 nm / Em. 450 - 500 nm
Lipi-Green : Ex. 488 nm / Em. 500 - 550 nm
Lipi-Red : Ex. 561 nm / Em. 565 - 650 nm

< 脂肪滴への高い選択性 >

オレイン酸を添加した HeLa 細胞を生細胞の状態 で Lipi-Green および Nile Red にて染色しました。

その結果、Lipi-Green と Nile Red で相関する局在 (黄色) はみられたものの、Nile Red では脂肪滴以外の細胞質も染色されました。



< 染色条件 >
オレイン酸を添加した HeLa 細胞を 100 nmol/l Lipi-Green および 100 nmol/l Nile Red にて染色。

< 検出条件 >
Lipi-Green: Ex. 488 nm / Em. 500-600 nm
Nile Red : Ex. 561 nm / Em. 565-650 nm
スケールバー : 20 μ m

< 市販試薬との性能比較 >

Lipi シリーズでは、既存の脂肪滴染色試薬の課題 (選択性、フィルター適応性、滞留性) を大幅に改善しました。また色素ラインナップの充実により、多重染色時の色素選択が容易に行えるようになりました。

	同仁化学製品			市販品 (T 社)		
	Lipi-Blue	Lipi-Green	Lipi-Red	Oil Red O (比色)	Nile Red	試薬 B
生細胞の染色	○	○	○	×	○	○
固定化細胞の染色	○	○	○	○	○	○
脂肪滴への選択性 (低バックグラウンド)	○	○	○	×	×	△
汎用フィルターへの適応	○	○	○	n/d	×*	○
生細胞内での滞留性	○	○	×	n/d	×	×

*GFP フィルターに漏れ込む
n/d : not applicable

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
Lipi-Blue	10 nmol	18,000	LD01
Lipi-Green	10 nmol	18,000	LD02
Lipi-Red	100 nmol	18,000	LD03

※ 35 mm dish : 10 ~ 50 枚分

アプリケーションデータは小社 HP よりご覧いただけます。

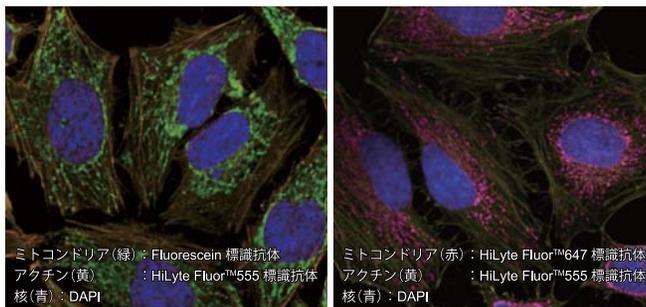
脂肪滴 同仁 [検索](#)

抗体標識キット

Dojindo Ab-10 Labeling Kit シリーズは、お手持ちの一次抗体に直接蛍光色素や酵素を標識できるキットです。一次抗体法は、以下のような利点があります。

<p>ステップが減る 免疫反応</p> <p>ステップ1 ブロッキング ステップ2 一次抗体反応</p> <p>二次抗体反応は必要ありません。</p>	<p>気にしないでいい交差性</p> <p>二次抗体法 一次抗体法</p> <p>同種の一次抗体が使えない.. 同種の一次抗体が使える！</p>	<p>解決する 共免疫沈降</p> <p>免疫グロブリンの影響を回避</p> <p>二次抗体法 一次抗体法</p> <p>分子量 50,000 25,000</p> <p>免疫グロブリンのバンドと重なる可能性あり 目的のタンパク質のみを検出</p>
--	---	---

〈細胞を用いた多重染色例〉



Ab-10 Rapid Fluorescein または HiLyte Fluor 647 Labeling Kit を用いて蛍光標識した抗ミトコンドリア抗体と、Ab-10 Rapid HiLyte Fluor 555 Labeling Kit を用いて蛍光標識した抗アクチン抗体及び DAPI を固定化後の HeLa 細胞に添加し免疫染色しました。

■一次抗体法を試してみたい方へ

一次抗体に直接標識することで、様々な利点がありますが、抗体によっては標識により抗原認識能が低下することがあります。そこで気軽にお試し頂ける 1 サンプル包装をご用意しました。



品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
Ab-10 Rapid Fluorescein Labeling Kit	New 1 sample	9,800	LK32
	3 samples	24,000	
Ab-10 Rapid HiLyte Fluor™ 555 Labeling Kit	New 1 sample	9,800	LK35
	3 samples	24,000	
Ab-10 Rapid HiLyte Fluor™ 647 Labeling Kit	New 1 sample	9,800	LK36
	3 samples	24,000	
Ab-10 Rapid R-Phycoerythrin Labeling Kit	New 1 sample	9,800	LK34
	3 samples	28,000	
Ab-10 Rapid Peroxidase Labeling Kit	New 1 sample	9,800	LK33
	3 samples	19,000	
Ab-10 Rapid Biotin Labeling Kit	New 1 sample	9,800	LK37
	3 samples	18,000	

第 29 回フォーラム・イン・ドージン開催後記 「細胞と個体の老化生物学－科学は不老長寿に迫れるか－」

小春日和となった 11 月 22 日、熊本ホテルキャッスルで第 29 回フォーラム・イン・ドージンが開かれた。当社代表の挨拶に続いて代表世話人の一人である熊本大学の富澤一仁先生から、熊本県の健康寿命と平均寿命の差が長いことや健康指標が全国平均を下回ることを示すデータと大学における老化研究の取組が紹介された後、午前の部がスタートした。

神戸医療産業都市推進機構先端医療研究センターの鍋島陽一先生は、冒頭、不透明な未来に対する為政者や市民、科学者の役割を問ひかけ、科学者においては老化の仕組みを明らかにしたいという欲求が健康長寿社会の実現に寄与するとし、発生から始まっている老化のプロセス全体を理解する必要性について触れられた。その後、 α -Klotho 変異マウスの発見から老化研究の進展、薬剤による抗老化の可能性、歴史上の偉人たちの老化に関する格言にまで話が及んだ。東京大学医科学研究所の中西真先生は、老化研究は緒に就いたばかりであること、生物ごとに多様な老化があり、がんは老年病の一種で共通の要因はあるが生物ごとに違いがあること、微小慢性炎症は老化の原因であるという考えに基づく老化や疾病発症制御の可能性、細胞老化の二面性、代謝阻害により老化細胞を除去できる可能性が示された。熊本大学発生医学研究所の中尾光善先生は、加齢と老化について、ゲノム、エピゲノム因子の観点から細胞老化の分子機構について紹介された。その中でエピゲノムの記憶はメチル化であること、ミトコンドリア由来の代謝物がエピゲノムを選択的に調節すること、老化細胞のミトコンドリアは増大しており、無理な状態でエネルギー代謝を行っていることなどが紹介された。

午後の部は、広島大学大学院医歯薬保健学研究科の田原栄俊先生のご講演から始まった。先生が立ち上げられたミルテルの起業理由と社会実装へ向けた取組紹介の後、テロメア G テール長が細胞老化や酸化ストレス性疾患において短縮すること、また、エクソソームなどの細胞外小胞の加齢性疾患への関与や、老化を誘導するマイクロ RNA ががん抑制に重要な役割を果たしていることが示された。大阪市立大学大学院医学研究科の大谷直子先生は、老化細胞の SASP（細胞老化に伴う炎症性サイトカインを分泌する現象）が発がんに関与している可能性があること、肥満による肝がん発症機構における腸内細菌代謝物の関与、老化細胞の SASP 制御の重要性に触れられた。長崎大学大学院医歯薬総合研究科の下川功先生のご講演では、カロリー制限（CR）による抗老化機構の研究から、保存された寿命コントロールシグナルが存在すること、CR による抗老化機構はミトコンドリアの機能制御として理解することができること、低体温、低インシュリン濃度、高 DHEAS 濃度は長寿化に関連することなどが示された。熊本大学大学院先端機構／大学院生命科学部研究部の三浦恭子先生は、ハダカテバネズミの生育環境や特性を紹介され、がん抑制遺伝子が高発現していること、がん遺伝子の変異により失活していること、グルコース消費量が少ないこと、ミトコンドリアレベルで活性が低く酸素消費量が少ないことなど、厳しい環境において、あ



の手この手で代謝を抑制していることが示された。

世話人の山本哲郎先生による閉会の挨拶では、「さて、科学は不老長寿に迫ることができたでしょうか？」の問いかけの後、「以前、老人性の記憶障害・認知機能障害は自然現象のようなもので病気とは考えられていなかったが、病気として認知されるようになった。老化と思われていたことが病気へと分離されていく。老化現象の一つが病気として認知され、その治療ができない場合どうケアしていくのかに社会的関心が高まっている。老化研究が進展していくことで分かってくるのではないかと」と締めくくられた。

フォーラム後のミキサーにも多くの方々にご参加いただいた。鍋島先生によるご挨拶と乾杯のご発声の後、フォーラム演者と参加者との間で活発な意見交換が行われた。鍋島先生のご講演の中で「私の霊は長く人の中にとどまらない。彼は肉にすぎないのだ。彼の歳は 120 年であろう。」という聖書の一節が紹介された。それに従うように長寿者の記録は 120 年程度であるが、その歳まで生きる人はほとんどおらず、健康のまま長寿を全うする人も多くはない。人が子育ての年齢を過ぎてなお長く生き続けることや老化や死を考えると、個人としては哲学や倫理、宗教が頭をめぐるが、種にとって重要で意味のあることであろう。今回のフォーラムが、健康長寿社会になっていくためのきっかけの一つとなることを期待したい。

(志賀匡宣)



要旨集をご希望の方は小社カスタマーリレーション部までお問い合わせ下さい。

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
フリーダイヤル

0120-021557
0120-489548

(受付時間：平日 9:00～17:00)
(土・日・祝日は除く)