DOJIN NEWS
ドージンニュース
2022 No.181
ISSN 0385-1516

がんの低酸素応答

—総 説—

低酸素応答 – 生存機構からがん幹細胞ニッチ形成へ

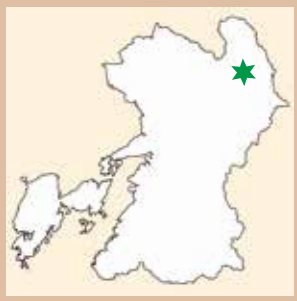
慶應義塾大学　サンペトラ・オルテア、佐谷 秀行

—注目の研究—

簡便かつ多検体処理可能なシスチン取り込み測定技術の開発

株式会社同仁化学研究所　髙橋 政孝、濵砂 柊人

DOJIN NEWS
2022 No.181 ドージンニュース



表紙：阿蘇　根子岳を城山展望台から草千里の撮影を終え大分へ移動する途中、雲海が消滅する時間帯に遭遇。阿蘇のシンボルである根子岳をバックに千枚田の上に雲が浮かぶ様子に感動してシャッターを切った。
photo：永島俊介氏

CONTENTS

お詫び
先号にてテーマを「シスチントランスポーター」とご案内しておりましたが、「がんの低酸素応答」に変更させて頂きました。
何卒ご理解を賜りますようお願い申し上げます。

※希望納入価格には消費税等は含まれておりません。

ツイッター
小社製品の最新情報や使用文献などをツイートしています。

フォロー
お願いします
@dojindoinfo

低酸素応答 – 生存機構からがん幹細胞ニッチ形成へ
Hypoxic response – from survival mechanism to cancer stem cell niche formation

サンペトラ・オルテア

慶應義塾大学
医学部先端医科学研究所
遺伝子制御研究部門

佐谷　秀行

慶應義塾大学
医学部先端医科学研究所
遺伝子制御研究部門

Abstract

Oxygen is a vital component of metabolism, energy production, and redox balance in mammalian cells. A robust response to hypoxia is thus essential to tissue homeostasis and survival. At cellular level, transcriptional and epigenetic responses converge to minimize the damage induced by lack of oxygen. However, the same response can be hijacked and used to support uncontrolled growth, as seen in certain types of cancer cells. Here we briefly review the hypoxic response and recent advances in our understanding of hypoxia in cancer.

1. はじめに

私たちの体内において、酸素はエネルギー産生と代謝、酵素反応と酸化還元などの礎となっており、生命維持に不可欠な要素である。したがって、低酸素状態をいち早く感知する機構と酸素不足による損傷を阻止する機構は組織のホメオスタシスを保つために必須である。これら二つの機構が連動することで「低酸素応答」が成立し、低酸素状態への適応が可能となる。低酸素応答の仕組みは長年研究されており、その一部の解明は 2019 年のノーベル生理学・医学賞の対象となった [1)]。一方、研究が進むにつれて、新しい課題も浮かび上がってきた。例えば、がん組織における低酸素応答は考えられてきたより複雑で、細胞増殖、浸潤のみならず、がん幹細胞のニッチ形成にも利用されることがある。本稿では低酸素応答について簡潔に述べ、がんにおける最近の知見について概説する。

2. 低酸素状態の発生

酸素の供給と消費のバランスが崩れると体全体、あるいはその一部が低酸素状態に陥る。その具体的な数値は体内部位や状況によって異なるが、例えば、臓器への酸素供給を維持するために、動脈を流れる血液の酸素分圧 PaO_2 が定常状態では 80-100 mmHg に保たれており、60 mmHg 以下の PaO_2 は低酸素血症とみなされる。組織中の酸素濃度は臓器の特性を反映して、ある程度異なっているが、2%以下の酸素濃度では、ほとんどの細胞が低酸素状態に陥ると考えられている [2)]。

必要とされている酸素と利用可能な酸素の不均衡は発生過程、高地での生活や運動などの生理的な状況でもみられ、虚血、貧血、細菌感染、炎症、線維化、がんなどの病的現象でも起きることが知られている（図 1）。しかし、前者では酸素不足を感知する機構及び供給と消費のバランスを修復する機構が正常に働く一方、

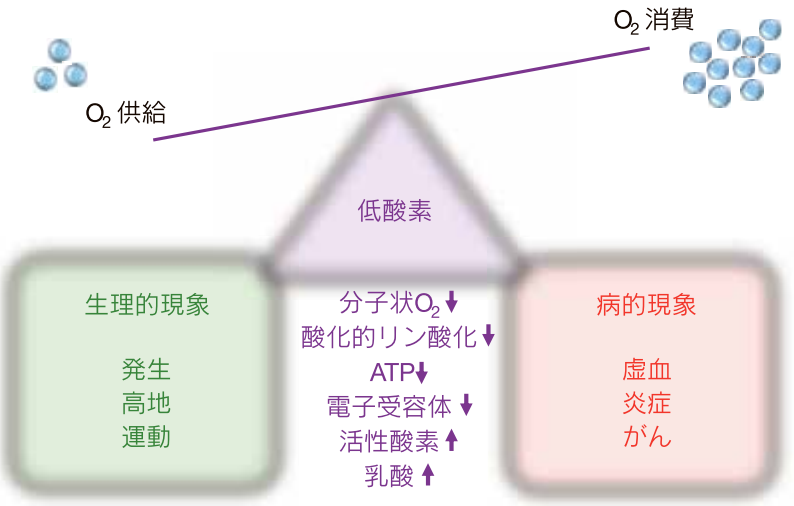


図 1　低酸素状態の発生と影響
必要な酸素の供給が低下したり、消費が増えたりした場合、低酸素状態が発生する。低酸素状態は生理的な状況でも、病的現象でも誘導されることがある。

後者ではどちらか、あるいは両方が破綻していることが多い。低酸素の環境では、電子受容体としても重要な分子状 O_2 自体の不足に加え、ミトコンドリア呼吸、酸化的リン酸化の低下、ATP の減少、代償的な解糖系亢進と乳酸蓄積、そして、一見逆説的な活性酸素の増加[3]まで誘導される。

3. 低酸素応答

酸素不足をできるだけ早期に感知するため、体内には複数のセンシング機構が備わっている。一番迅速な反応は秒単位で誘導され、末梢性の化学受容体を介した感知・応答に代表される。血液中の酸素レベルは睡眠から運動までの様々な状況で安定している。急な酸素分圧低下は頸動脈小体や大動脈小体などの化学受容体、酸素感受性イオンチャネルによって感知され、情報が呼吸中枢へと伝達され、呼吸の神経性調節、換気促進へとつながる[4),5)]（図 2）。この低酸素応答は 20 世紀前半から知られているが、近年では、ミトコンドリア複合体 I 由来の活性酸素と K^+ チャネルを中心とする緻密な分子基盤も明らかになった[6)]。

早い全身性の低酸素応答に加え、細胞レベルでは転写因子を介した応答が重要な役割を果たす。その代表的な経路はプロリン水酸化酵素 PHD（prolyl hydroxylase domain containing protein）とその基質である低酸素応答誘導因子 HIF（hypoxia-inducible factor）を中心とした HIF-PHD 経路である。分子状酸素 O_2 が存在する環境においては酸素添加酵素である PHD が HIF のαサブユニットである HIFαの一つか両方の特定のプロリン残基を水酸化する。その結果、HIFαがユビキチン化され、プロテアソームにおいて分解されるため、定常状態では HIF のタンパク発現及び転写因子としての働きが低い。一方、低酸素の環境では PHD の酵素活性が酸素濃度依存的に低下し、HIFαのプロリン水酸化、分解が抑制される。分解を免れた HIFαが HIF のβ- サブユニットである HIFβとヘテロダイマーを形成し、hypoxia-responsive element（HRE）を有し、低酸素状態への適応に必要な遺伝子の転写を促進する[7),8)]。その転写標的としてはすでに 2500 種類以上同定され[1)]、酸素運搬や血流上昇などの全身作用につながる遺伝子から、アポトーシス回避、オートファジー、血管新生、上皮間葉転換、解糖経路亢進などのように、局所の適応反応を誘導する現象も含まれている（図 2）。そして、近年では PHD 以外の酵素的酸素センサーと、転写を介さない調節機構も次々発見されている。

センサーとしてはチオール酸化酵素[9)]やヒストン脱メチル化酵素[10),11)]が報告されている。このような酵素的酸素センサーは、HIF-PHD システムによって伝達される転写応答よりも短い時間スケールで作用している。例えば、チオール酸化酵素である ADO（cysteamine（2-aminoethanethiol）dioxygenase）は、酸素依存的に G タンパク質シグナリングの制御因子である RGS4/5 や血管新生関連サイトカインであるインターロイキン 32 などのタンパク安定性を制御し、酸素センサーとしての役割も担っている[9)]。

また、低酸素時のクロマチン変化を解析した研究では、30 分間の短い低酸素曝露ですでに H3K4me3、H3K36me3 を含むヒストン H3 のメチル化が始まり、その結果、上皮間葉転換、細胞周期や酸化的リン酸化関連遺伝子の発現が調節されることが明らかになった[10)]。この変化はヒストン脱メチル化酵素の KDM5A を酸素センサーとしており、HIF 非依存性の変化であった。また、興味深いことに、ヒストンのメチル化は可逆的であり、1 時間の再酸素化によって元の状態に戻ることも明らかになった。

4. がんにおける低酸素及び低酸素応答

がん細胞の多くは酸素が存在する状況でも酸化的リン酸化より好気的解糖からエネルギーを得ている。ワールブルグ効果として知られているこの特徴をもつ腫瘍では、腫瘍径が 1 mm を超えると血管から拡散する酸素が足りなくなり、中心部が低酸素に陥ることが知られている。また、腫瘍細胞が血管の周囲に集積することで血管が破綻し、急な酸素不足につながる現象もがんにおける低酸素領域の発生機序として有名である。

低酸素領域が発生すると、腫瘍細胞は生存、増殖に適した環境を探すために正常の組織に浸潤する。また、分子状の酸素が不足する領域では活性酸素の減少に伴い、放射線治療の効果も減衰する。低酸素はがん細胞が免疫応答を回避する現象にも寄与すると報告されている。さらに、酸素が十分に存在する場合でも、例えば、がん遺伝子の影響で増殖因子産生、PI3K や MAPK 経路[12)]が異常亢進し、HIF の合成が促進されることがある。つまり、がんでは低酸素が感知されない状況でも低酸素応答の一部が常に ON となり、生存、増殖、血管新生などのシグナルが腫瘍増大の冗長につながる。そして、近年では酸素欠乏の新たな発生機序も明らかになってきた。

前述のとおり、多くのがん細胞は好気的解糖を利用する。しか

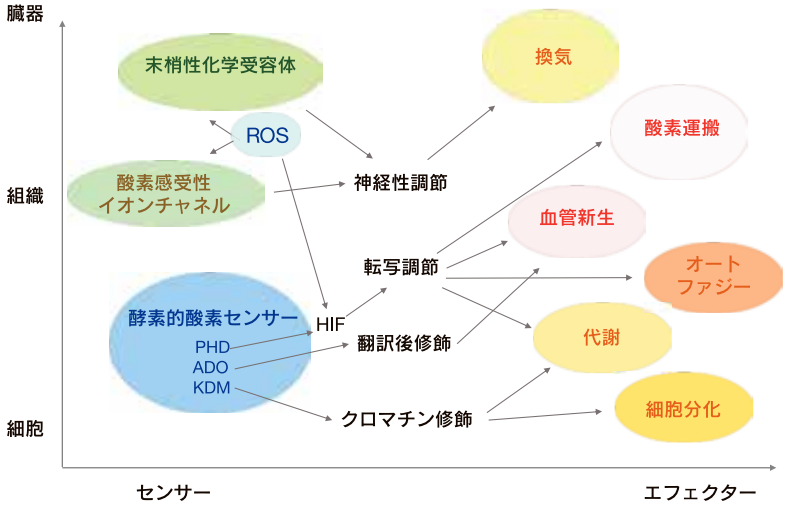


図 2　低酸素応答におけるセンサーとエフェクター

ホメオスタシスを維持するため、酸素不足を感知するセンサーは臓器、組織、細胞レベルで複数存在する。センサーからの情報は転写調節、翻訳後修飾やクロマチン修飾などを介して、細胞生存に必要な現象を誘導する。ROS: reactive oxygen species, HIF: hypoxia-inducible factor, PHD: prolyl hydroxylase domain containing protein, ADO: cysteamine (2-aminoethanethiol) dioxygenase, KDM: histone lysine demethylase.

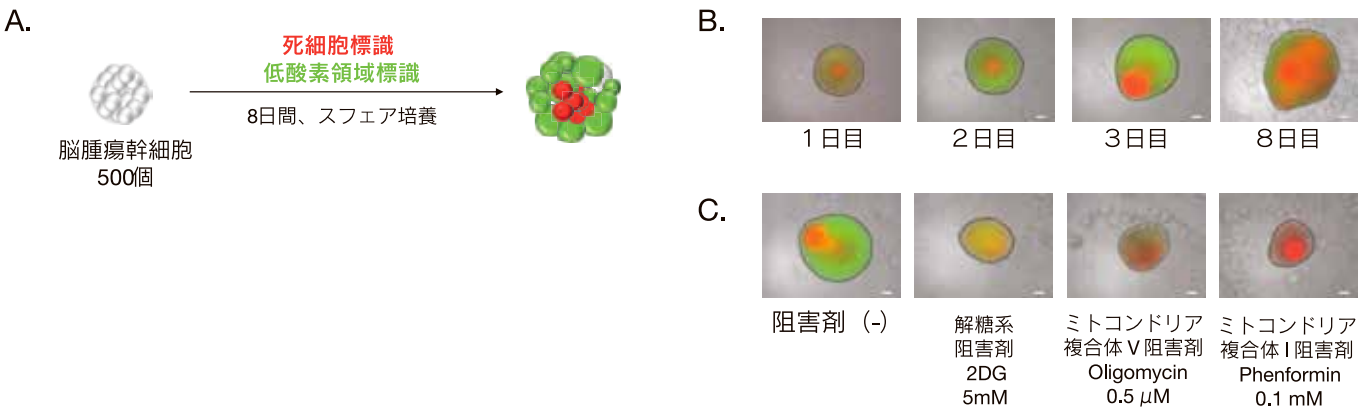


図3　脳腫瘍幹細胞スフェアにおける低酸素領域の観察

A. 酸化的リン酸化を利用する脳腫瘍幹細胞からスフェアを形成させ、8日間培養した。PI（propidium iodide）で死細胞を標識し、低酸素標識プローブを用いて低酸素領域を可視化した。B. スフェア増大に伴い、低酸素領域も死細胞も経時的に増える。C. コントロール群と比べ、解糖系阻害剤投与群では増殖抑制のみ観察されるのに対し、ミトコンドリア複合体阻害剤投与群では増殖に加え、低酸素の発生も抑制されている。スケール、100 μm。

し、最近では膵がん、メラノーマ、脳腫瘍などにおいて、酸化的リン酸化、ミトコンドリア呼吸を利用してエネルギーを産生するがん細胞の存在が示された[13), 14)]。このような細胞は解糖系を利用する細胞より酸素消費が高い結果、腫瘍径が数百μm から酸素欠乏が生じることも分かってきた。

筆者らが確立したマウスの誘導型脳腫瘍幹細胞モデルの解析でも、脳腫瘍を維持する役割を担うグリオーマ幹細胞（Glioma Stem Cell, GSC）には解糖系を利用する分画 GSC^{gly} と酸化的リン酸化を利用する分画 GSC^{mit} が存在することが分かった[15)]。両者は同程度の腫瘍形成能を持ち、病理組織像からは区別できない腫瘍を形成する。GSC^{gly} では HIF 及びその転写標的である解糖系酵素の HK2 や LDHA 等の発現が高く、低酸素領域はこのタイプの幹細胞にとってその自己複製能を担保する「ニッチ」と呼ばれる特別な環境に相当する。一方、GSC^{mit} はミトコンドリア複合体の発現が高く、酸素濃度が高い血管近傍をニッチとする。

そして、GSC^{mit} を 3 次元培養し、スフェアと呼ばれる小さな腫瘍塊を形成させ、低酸素領域を標識すると、前述のとおり、早い段階から酸素不足が進んでいることが明らかになった（図 3）。さらに、スフェアに解糖系阻害剤を投与した場合、増殖は抑制されたが、低酸素が発生した一方、ミトコンドリア複合体の阻害剤を投与した場合、低酸素がほとんど生じないことも確認できた。つまり、ミトコンドリア利用タイプのがん細胞を排除するには、HIF の阻害剤とまったく異なる戦略が必要であることが明らかになった。ミトコンドリア複合体阻害剤による低酸素の解消は同時に GSC^{gly} のニッチ形成予防にもつながると考えられ、またその放射線増感効果も期待されている[16)]。

5. 終わりに

本稿で紹介したように、私たちの体では酸素の濃度が常にモニタリングされている。そして、低下が認められた場合、急性期、慢性期において複数の応答機構が協調的に作動し、ホメオスタシスを維持する。その機構の解明は腎性貧血における PHD 阻害剤のように、すでに臨床応用につながっている。一方、がんにおいては単剤による低酸素の劇的な改善は難しく、低酸素応答の更なる解明により複数の機構を標的とした併用療法の開発が期待される。

[参考文献]
1） J. López-Barneo and M. C. Simon, *Nat. Commun.*, **2020**, *11*, 607.
2） P. Lee, N. S. Chandel and M. C. Simon, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2020**, *21*, 268-283.
3） R. D. Guzy and P. T. Schumacker, *Exp. Physiol.*, **2006**, *91*, 807-819.
4） E. K. Weir *et al*., *N. Engl. J. Med.*, **2005**, *353*, 2042-2055.
5） C. Peers, *Cell Metab.*, **2015**, *22*, 753-754.
6） M. C. Fernández-Agüera *et al*., *Cell Metab.*, **2015**, *22*, 825-837.
7） G. L. Wang *et al*., *Proc. Natl. Acad. Sci*, **1995**, *92*, 5510-5514.
8） W. G. Kaelin and P. J. Ratcliffe, *Mol. Cell*, **2008**, *30*, 393-402.
9） N. Masson *et al*., *Science*, **2019**, *365*, 65-69.
10）M. Batie *et al*., *Science*, **2019**, *363*, 1222-1226.
11）A. A. Chakraborty *et al*., *Science*, **2019**, *363*, 1217-1222.
12）G. L. Semenza, *Nat. Rev. Cancer*, **2003**, *3*, 721-732.
13）P. Sancho *et al*., *Cell Metab.*, **2015**, *22*, 590-605.
14）A. Roesch *et al*., *Cancer Cell*, **2013**, *23*, 811-825.
15）S. Shibao *et al*., *Neuro-Oncol*, **2018**, *20*, 343-354.
16）T. M. Ashton *et al*., *Clin. Cancer Res.*, **2018**, *24*, 2482-2490.

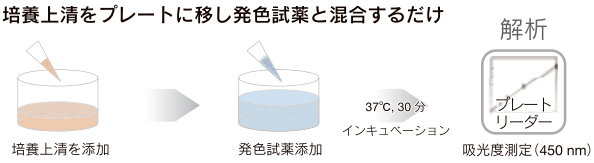
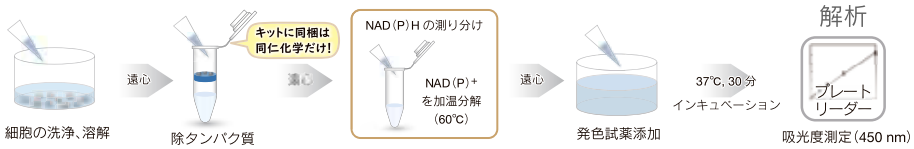
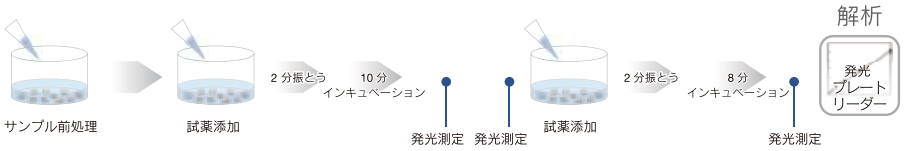
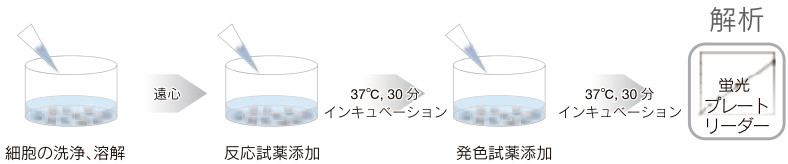
[著者プロフィール]
氏名：サンペトラ　オルテア（SAMPETREAN Oltea）
所属：慶應義塾大学医学部　先端医科学研究所　遺伝子制御研究部門
〒160-8582　東京都新宿区信濃町 35
Tel：03-5363-3983
E-mail：oltea@a6.keio.jp
出身学校：東京医科歯科大学
学位：博士（医学）
専門分野：脳腫瘍、腫瘍生物学
現在の研究テーマ：脳腫瘍幹細胞の代謝、浸潤、治療抵抗性

氏名：佐谷　秀行（Hideyuki Saya）
所属：慶應義塾大学医学部　先端医科学研究所　遺伝子制御研究部門
〒160-8582　東京都新宿区信濃町 35
Tel：03-5363-3983
E-mail：hsaya@keio.jp
出身学校：神戸大学
学位：博士（医学）
専門分野：腫瘍生物学
現在の研究テーマ：治療抵抗性がんの克服

関連製品

細胞内代謝関連製品

細胞内の代謝システム（解糖系や TCA 回路、ペントース - リン酸経路等）の解析は、細胞状態を理解する上で重要であり、グルコースや乳酸、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。
既存の市販製品よりも高い操作性を実現した小社製品は、測定に必要な試薬やコンポーネントも同梱しています。

測定指標	検出	操作
グルコース 乳酸 グルタミン グルタミン酸 NAD/NADH NADP/NADPH	比色	**培養上清をプレートに移し発色試薬と混合するだけ** 
		キット同梱の除タンパク質チューブ※と細胞溶解バッファーにより前処理が簡便  ※ グルタミン、グルタミン酸、NAD(P)/NAD(P)H に同梱しています。
ATP ADP/ATP	発光	**キット同梱の ATP 標準試薬と小容量のラインナップにより、手軽に試せる** 
		
α-ケトグルタル酸	蛍光	**既存品の課題であるバラつきを低減した操作** 

品名	容量	希望納入価格（¥）	メーカーコード
Glucose Assay Kit-WST	50 tests 200 tests	18,600 39,200	G264
Lactate Assay Kit-WST	50 tests 200 tests	30,000 70,200	L256
Glutamine Assay Kit-WST	100 tests	55,000	G268
Glutamate Assay Kit-WST	100 tests	50,000	G269
NAD/NADH Assay Kit-WST	100 tests	55,800	N509
NADP/NADPH Assay Kit-WST	100 tests	55,800	N510
ATP Assay Kit-Luminescence	50 tests 200 tests	25,000 45,000	A550
ADP/ATP Ratio Assay Kit-Luminescence	100 tests	50,000	A552
α-Ketoglutarate Assay Kit-Fluorometric	100 tests	64,000	K261

Topics on Chemistry

簡便かつ多検体処理可能なシスチン取り込み測定技術の開発

株式会社同仁化学研究所　髙橋　政孝、濵砂　柊人

シスチン・グルタミン酸トランスポーター（xCT）は、主に細胞外液のシスチンと細胞内のグルタミン酸を 1 対 1 で交換輸送するアミノ酸トランスポーターである[1)]。xCT を介して取り込まれたシスチンは、抗酸化物質であるグルタチオンの原料として利用され、細胞内の酸化ストレス応答に重要な働きをしている。一部のがんにおいては、活発な代謝による活性酸素の産生に対応するため、細胞内グルタチオンが高く、xCT も高発現している[2)]。例えば、がん幹細胞ではマーカー分子である CD44 タンパク質が細胞膜上の xCT を安定化し、シスチン取り込み能力を高め、転移能や薬剤耐性の発揮、悪性化に寄与していることが報告されている[3)]。このような細胞に対し、xCT 阻害剤を用いると、細胞内で過酸化脂質が蓄積し、鉄依存性の細胞死であるフェロトーシスを引き起こすことが知られている。そのため、xCT 阻害剤は新たながん治療薬として期待されている。

本稿では、小社が開発した簡便かつ多検体処理を可能とした細胞のシスチン取り込み能力測定法（本技術[4)]）について紹介する。

既存のシスチン取り込み能力測定技術としては、RI 標識シスチンの取り込み（RI 法）、メタボローム解析法、グルタミン酸定量法がある。RI 法は、RI 標識シスチンを細胞に取り込ませ、洗浄し溶解後、シンチレーションカクテルと混合して、RI 測定を行う方法である。一般的な方法で定量性が高いが、RI 取り扱いや施設などの規制がある。メタボローム解析法は、薬剤などで処理した細胞を溶解し、LC-MS により代謝物を検出する方法である。様々な代謝物をまとめて測定できるが、膨大なデータ解析と費用が高額であることがデメリットである。グルタミン酸定量法は、シスチン取り込みと 1 対 1 で放出されるグルタミン酸を細胞上清で測定することで、シスチン取り込み能力を間接的に評価する技術である。プレートアッセイに対応しており、簡便な技術であるが、グルタミン酸は xCT 以外からも排出されるため正確性に欠ける。それぞれの利点と課題を表 1 にまとめた。

技術	利点	課題
RI 法	・定量性	・RI の使用規制、煩雑さ
メタボローム解析法	・定量性 ・様々な代謝物の同時測定	・得られたデータの解析の手間 ・費用が高額
グルタミン酸定量法	・プレートアッセイ可能	・間接的なため正確性に欠ける

表 1　既存のシスチン取り込み能力測定技術の利点と課題

上述の通り、それぞれの手法には課題がある。我々はこれらの課題を克服するべく、安全かつ簡便に細胞内シスチン取り込み能力を測定する技術を開発した。

本技術は以下の特長を有している。

・RI を用いない簡便な蛍光測定法
・多検体処理可能なプレートアッセイ

本技術では、図 1 の通り、2 段階で細胞のシスチン取り込み能力を蛍光測定する。まず、細胞にシスチンアナログ（CA）であるセレノシスチンを xCT 経由で取り込ませ、その後セレノシスチン特異的に反応する蛍光色素 FOdA と反応させ、生成されるフルオレセインの蛍光強度からシスチン取り込み能力を測定することができる。

本技術の実験例を紹介する。xCT 阻害剤として知られているスルファサラジン又はエラスチンを添加した HeLa 細胞を用いて測定を行った。結果、xCT 阻害剤を処理すると、蛍光強度が顕著に低下し、阻害剤の効果を測定することが可能であった（図 2）。他にも、xCT ノックアウトや薬剤処理による xCT 発現誘導による xCT 活性の変化を測定しており、セレノシスチンはシスチンと同様に xCT を介し細胞内へ取り込まれており、細胞ごとの xCT 活性や阻害剤の効果を確認する用途で用いることができることが確認された。また、本技術は RI 法との相関が得られている（data not shown）。

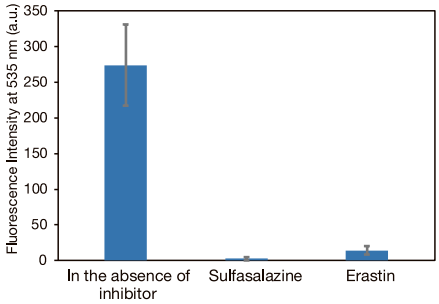


図 2　xCT 阻害剤のシスチン取り込み能力阻害効果の測定
（Sulfasalazine: 0.5 mmol/l, Erastin: 2 μmol/l）

今回開発した技術は、既存の手法と比べ安全かつ簡便に細胞のシスチン取り込み能力を測定できる。また、プレートリーダー測定も可能なことから多検体処理にも適している。がん細胞の代謝変化や酸化ストレスの解析、また抗がん剤のスクリーニングなど、本技術ががん研究の一助となることを期待している。

［参考文献］
1）S. Bannai, *J. Biol. Chem.*, **1986**, *261*(5), 2256-2263.
2）P. Koppula *et al.*, *Protein Cell*, **2021**, *12*(8), 599-620.
3）O. Nagano *et al.*, *Oncogene*, **2013**, (32), 5191-5198.
4）T. Shimomura *et al.*, *ACS Sens.*, **2021**, *6*(6), 2125-2128.

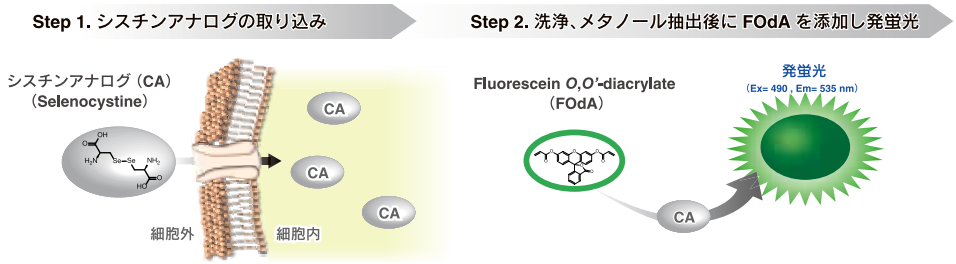


図 1　新規シスチン取り込み測定技術の概要

関連製品

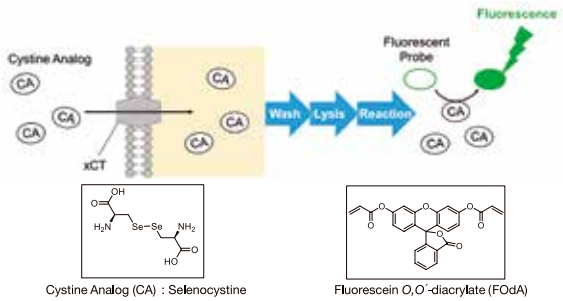
シスチン取り込み検出キット

Cystine Uptake Assay Kit

＜特長＞
- **シスチン取り込み能力を簡便に検出できる**
- **プレートリーダーを用いて検出が可能**

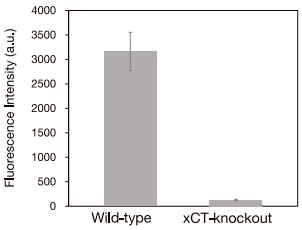
本製品は Cystine Analog（CA）として Selenocystine を用い、シスチンと同様に xCT を経由して細胞内に取り込まれ、CA と特異的に反応する蛍光色素 FOdA を用いることで検出するキットです。本製品はプレートリーダーで測定することができます。

＜測定原理＞



＜野生型細胞と xCT KO 細胞のシスチン取り込み能の比較＞

xCT KO 細胞では、ほとんどシスチンの取り込みは観察されなかった。



細胞：U251 (wild-type or xCT-knockout)
前処理：DMEM (cystine-free, serum-free), 37 ℃, 5 min
取込条件：Cystine Analog / DMEM (cystine-free, serum-free)、37℃、30 min
検出装置：プレートリーダー
測定波長：Ex ＝ 490 nm, Em ＝ 535 nm

※ U251 wild-type 及び xCT knockout 細胞は京都大学 加藤裕教先生にご提供いただきました。

［参考文献］
1) T. Shimomura *et al*., *ACS Sens.*, **2021**, *6*(6), 2125-2128.

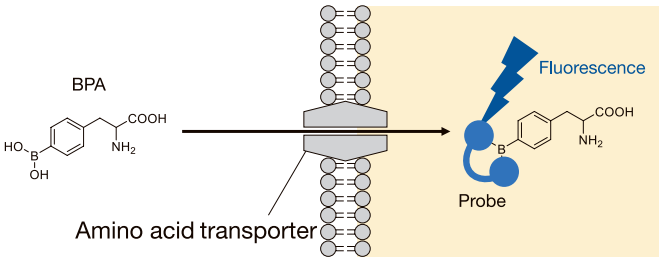
アミノ酸取り込み検出キット

Amino Acid Uptake Assay Kit

＜特長＞
- **アミノ酸取り込み能力を簡便に検出できる**
- **蛍光顕微鏡、プレートリーダー、フローサイトメーターを用いて検出が可能**

本製品は大型中性アミノ酸類似体であるホウ素アミノ酸（boronphenylalanine: BPA）を用い、大型中性アミノ酸と同様に LAT を経由して細胞内に取り込まれ、BPA と特異的に反応する蛍光プローブを用いることで検出するキットです。本製品は蛍光顕微鏡、プレートリーダー、フローサイトメーターを用いて検出が可能です。

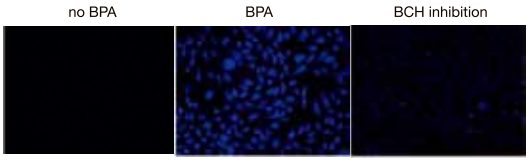
＜測定原理＞

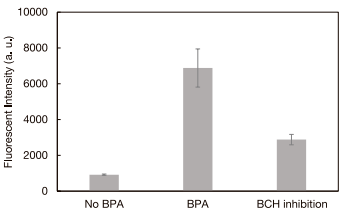


＜ LAT 阻害剤 BCH を用いたアミノ酸取り込み阻害実験＞

Amino Acid Uptake Assay Kit を用いて LAT 阻害剤 BCH によるアミノ酸取り込み阻害を確認した。

BCH : 2-aminobicyclo[2.2.1]heptane-2-carboxylic acid





細胞：HeLa
前処理：0 or 1 mmol/l BCH / HBSS、37 ℃、5 min
取込条件：0 or 1 mmol/l BCH / BPA / HBSS、37 ℃、5 min
検出装置、測定波長：
蛍光顕微鏡
DAPI (Ex ＝ 340-380 nm, Em ＝ 435-485 nm)
プレートリーダー
Ex ＝ 360 nm　Em ＝ 460 nm

※本キットは大阪公立大学 切畑光統先生から技術指導、情報提供をいただき開発した製品です。

［参考文献］
1） Y. Hattori *et al*., *ACS Sens.*, **2016**, *1*(12), 1394-1397.
2） Y. Hattori *et al*., *Sensors*, **2017**, *17*(10), 2436.

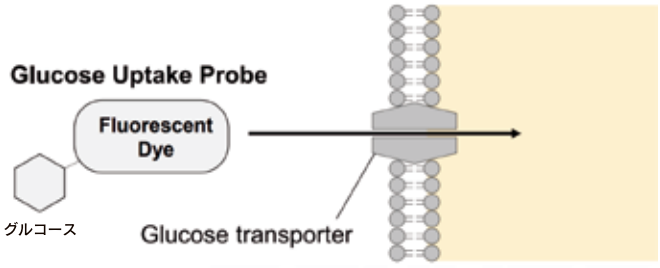
グルコース取り込み検出キット

Glucose Uptake Assay Kit-Blue, -Green, -Red

＜特長＞
・既存法（2-NBDG）よりも高感度
・簡便な操作と短時間での染色が可能
・染色後の色素の漏れ出しを軽減

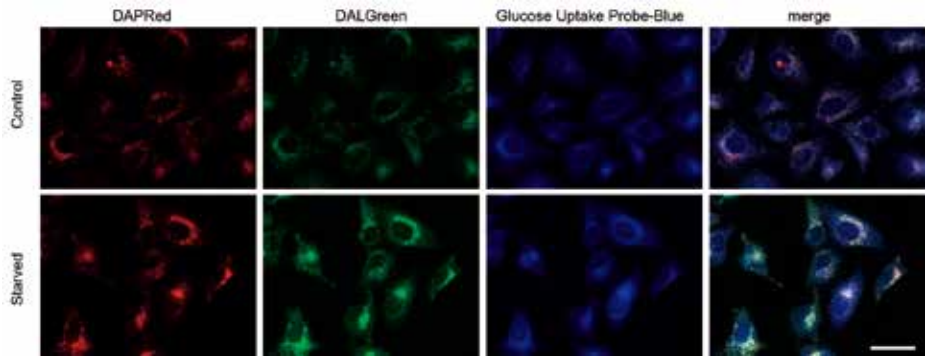
本キットに含まれる Glucose Uptake Probes は、既存品 2-NBDG と同様の蛍光標識グルコースです。グルコース類似体であるこれらの試薬はグルコーストランスポーターを介して細胞内に取り込まれるため、蛍光顕微鏡などの蛍光測定法によって細胞のグルコース取り込み能力を測定することができます。

＜測定原理＞



＜飢餓培養によるオートファジーとグルコース取り込み実験＞

HeLa 細胞をオートファゴソーム染色試薬 DAPRed（→ P. 13）とオートリソソーム染色試薬 DALGreen（→ P. 13）で染色した後、アミノ酸不含培地による飢餓培養を 3 時間行いオートファジーを誘導しました。DAPRed および DALGreen の蛍光強度が増大したことでオートファジーを確認し、また、Glucose Uptake Probe-Blue を用いて細胞のグルコース取り込み能力の上昇も観察されました。



〈検出条件〉
落射型蛍光顕微鏡
Blue: Ex = 340-380 nm, Em = 435-485 nm
Green: Ex = 450-490 nm, Em = 500-550 nm
Red: Ex = 533-557 nm, Em = 570-640 nm
スケールバー：50 μm

品名	容量	希望納入価格(￥)	メーカーコード
Amino Acid Uptake Assay Kit	20 sets	16,000	UP04
	100 sets	45,000	
Cystine Uptake Assay Kit	20 sets	18,000	UP05
	100 sets	50,000	
Glucose Uptake Assay Kit-Blue	1 set	40,000	UP01
Glucose Uptake Assay Kit-Green	1 set	38,000	UP02
Glucose Uptake Assay Kit-Red	1 set	40,000	UP03

ホームページにてデータ集を公開中です

栄養素 データ同仁 検索

Column

新型コロナウイルスと細胞老化

株式会社同仁化学研究所　髙橋　政孝

2019 年の冬に中国の武漢市で新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）が発見されてから、コロナウイルスは次々に変異し、その猛威は収まるところを知らない。コロナウイルスの恐ろしい点は、ウイルス感染そのものよりも、感染によりサイトカインが大量に放出され（サイトカインストーム）、免疫機能が暴走し重症化することで、血栓症や肺疾患など様々な病気を併発することである[1)]。さらに、最近の研究では老化細胞と SARS-CoV-2 の関係性にも注目が集まっている。本稿では、老化の側面から SARS-CoV-2 に対する治療戦略にまで視野を広げ紹介していきたい。

老化細胞とは文字通り、細胞が老化を起こし細胞周期が止まった状態の細胞を指し、細胞のがん化を防ぐための一つの機構であると長年考えられてきた。一方で、老化細胞によってがん化が促されるという報告もあり、細胞老化の二面性が明らかになってきている。Lee らは他のウイルス同様、SARS-CoV-2 も感染細胞のストレス応答として細胞老化が誘発されることを示した[1)]。これは、老化細胞の炎症性因子として知られる SASP（Senescence-associated secretory phenotype）が SARS-CoV-2 感染による炎症反応を増幅させ、サイトカインストームや多臓器不全のリスクが高まるのではないかとの仮定による。実際に Camell らのグループが、SARS-CoV-2 に感染させた老齢のマウスに老化細胞除去薬（senolytic drug）であるフィセチンを投与すると、死亡率が 50% 減少したことに加え、血清および組織中の炎症性タンパク質の発現が減少し、免疫応答が改善されるという結果が得られた[2)]。これらの研究は、老化細胞除去薬が健康寿命の増進だけでなく、SARS-CoV-2 感染に対しても有効だとする報告であり、パンデミック下の我々には希望を与えるものである。

この様な研究の後押しもあり、近年、老化細胞除去薬の研究はますます注目を集めている。その中でも、Amor らは CAR-T（chimeric antigen receptor T）細胞を使った新たな老化細胞除去法を報告した。彼らは、まず多くの老化細胞表面に発現、かつ正常細胞には発現しないタンパク質を探索し、その結果、uPAR（urokinase-type plasminogen activator receptor）を発見した。次に、uPAR に対する CAR-T 細胞を作製し、これを肝線維症モデルマウスへ投与した結果、投与しない場合と比べ、細胞老化マーカーである SA-β-gal の減少と肝線維化の抑制が認められ、目立った毒性も見られず肝機能が向上した。この結果から、senolytic CAR-T 細胞は老化細胞除去が可能であり、肝線維化に対しても有効であることを示した[3)]。その他にも、順天堂大学の南野らは、GPNMB（glycoprotein nonmetastatic melanoma protein B）が老人斑治療薬の分子標的であることを同定し、これは老化細胞に多く発現する膜貫通ドメインを持つ分子であることを特定した。また、彼らはこの GPNMB 陽性遺伝子の減少が老化を抑制することを示し、これは GPNMB を標的としたワクチン接種も老化防止治療の戦略となる可能性を示している[4)]。

SARS-CoV-2 の猛威はしばらく続きそうではあるが、ワクチンや治療薬の開発や研究は進んでいる。今回紹介した老化細胞除去薬については、健康増進だけでなく、治療薬としても次々に最新の研究がなされ新しい発見がもたらされている。このパンデミック終結に向かって、研究の発展に益々の期待がよせられる。

［参考文献］
1）S. Lee *et al*., *Nature*, **2021**, *599*, 283-289.
2）C. D. Camell *et al*., *Science*, **2021**, *373*, eabe4832.
3）C. Amor *et al*., *Nature*, **2020**, *583*, 127-132.
4）M. Suda *et al*., *Nat Aging*, **2021**, *1*, 1117-1126.

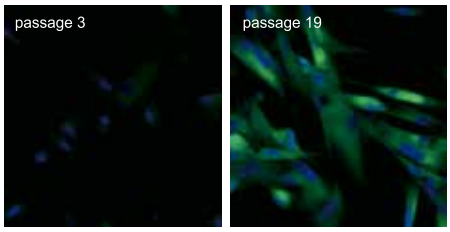
関連製品

細胞老化検出キット

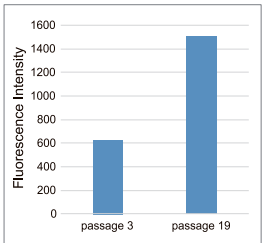
【蛍光顕微鏡・FCM】Cellular Senescence Detection Kit - SPiDER-βGal
【プレートリーダー】Cellular Senescence Plate Assay Kit - SPiDER-βGal

小社の老化細胞検出キットは、老化細胞の指標の一つである SA-β-gal（senescence-associated β-galactosidase）活性を特異的に検出することができます。各キットには、蛍光検出が可能なβ-galactosidase 基質（SPiDER-βGal）を用いており、蛍光顕微鏡・フローサイトメーター・プレートリーダーを用いた解析が可能です。

測定例



イメージング評価



マイクロプレートアッセイ

継代数の異なる WI-38 細胞を用い Cellular Senescence Plate Assay Kit - SPiDER-βGal［メーカーコード：SG05］によるプレートアッセイ（右図）および Cellular Senescence Detection Kit - SPiDER-βGal［メーカーコード：SG03］によるイメージング（左図）を行いました。その結果、継代数を重ねた細胞では、SA-β-gal の発現が亢進していることが双方の解析結果で確認されました。

＜検出条件＞
イメージング評価（左図）
緑色：Ex = 488 nm, Em = 500-600 nm
青色：Ex = 405 nm, Em = 450-495 nm
（DAPI による核染色）

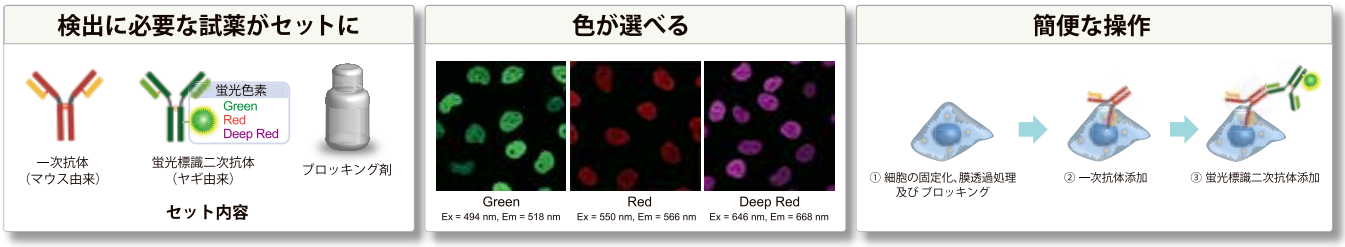
プレートアッセイ（右図）
Ex = 535 nm, Em = 580 nm

関連製品

γH2AX 検出キット

DNA Damage Detection Kit - γH2AX -Green, Red, Deep Red

γH2AX 検出キットは、DNA ダメージの指標であるγH2AX を二次抗体法で簡便に検出するキットです。初めての方も使いやすいよう、検出に必要な試薬をセットにしており、γH2AX を指標とした論文報告や実験例を小社 HP に掲載しています。



＜細胞老化マーカーとの共染色例＞

継代を 19 回行った WI-38 細胞を用い、本キットによりγH2AX を検出、また Cellular Senescence Detection Kit - SPiDER-βGal（メーカーコード：SG03）にて SA-β-gal（senescence-associated β-galactosidase）を検出しました。結果、継代を繰り返した WI-38 細胞において、γH2AX 由来の蛍光が増大し、SA-β-gal 活性が亢進する結果が得られました。比較データは小社 HP に掲載しています。

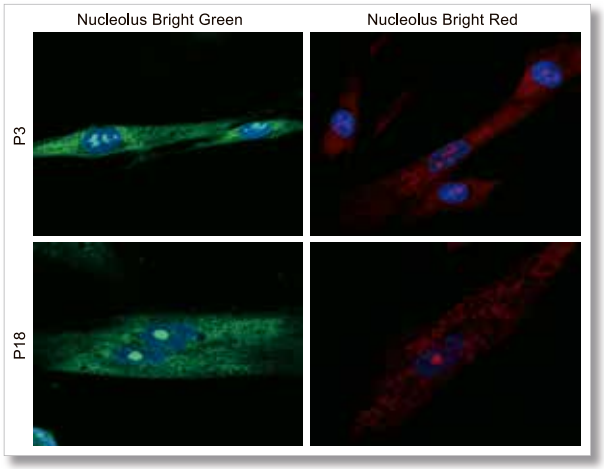
γH2AX　同仁　**検索**

核小体染色色素

Nucleolus Bright Green, Red

＜老化細胞を用いた実験例＞

Nucleolus Bright は RNA に結合し蛍光を発する蛍光色素で、固定化した細胞に試薬を添加するだけで簡単にイメージングすることができます。



継代数の異なる WI-38 細胞を 4% PFA にて固定化後、PBS 洗浄および 1% Triton X-100 により膜透過処理し、Nucleolus Bright Green または Red および核染色試薬（DAPI）により観察しました。

結果、継代数 3 回の細胞（P3）では 1 つの核に複数個の核小体が存在する細胞が多く確認されましたが、継代を 18 回行った細胞（P18）では核小体は肥大化し一つになっていることが確認されました。

＜染色条件＞
細胞を 4% PFA に 5 分間、1% Triton X-100 に 20 分間浸漬後、各蛍光プローブにて 5 分間インキュベーション。
＜検出条件＞
Nucleolus Bright Green：Ex = 488 nm , Em = 500-600 nm
Nucleolus Bright Red　：Ex = 561 nm , Em = 565-650 nm
DAPI　：Ex = 405 nm , Em = 450-495 nm

品名	容量	希望納入価格（¥）	メーカーコード
Cellular Senescence Plate Assay Kit - SPiDER-βGal	20 tests 100 tests	11,400 33,000	SG05
Cellular Senescence Detection Kit - SPiDER-βGal	10 assays	40,200	SG03
DNA Damage Detection Kit - γH2AX - Green	1 set ※1	35,200	G265
DNA Damage Detection Kit - γH2AX - Red	1 set ※1	35,200	G266
DNA Damage Detection Kit - γH2AX - Deep Red	1 set ※1	35,200	G267
Nucleolus Bright Green	60 nmol ※2	29,000	N511
Nucleolus Bright Red	60 nmol ※2	29,000	N512

〈使用回数の目安〉　※ 1. 1 set で 5 ml 分の染色溶液を調製可能　※ 2. 35 mm dish：30 枚分使用可能（色素濃度 1 μmol/l で使用した場合）

新製品

耐光性トータル ROS 検出キット

ROS Assay Kit -Photo-oxidation Resistant DCFH-DA-

＜特長＞

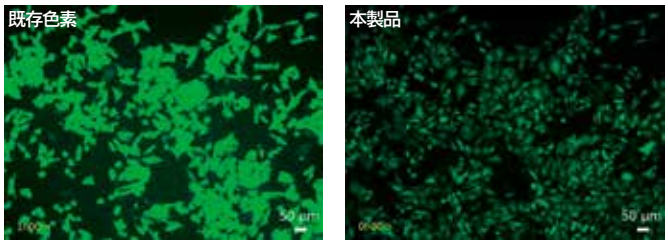
- **励起光照射による自動酸化を低減**
- **染色後の固定化や免疫染色との共染色が可能**
- **既存の固定化可能な色素に比べ高感度**

ROS（Reactive oxygen species）は主にミトコンドリアでの ATP 合成過程で発生する反応性の高い酸素種です。情報伝達のシグナル物質としての役割や、マクロファージなどの免疫機能の一部として重要である一方、DNA やタンパク質に対し酸化剤として作用することで様々な疾病や老化を引き起こす要因となります。最近の研究では、二価鉄を触媒とするフェントン反応によって起こる新しい細胞死（フェロトーシス）研究分野においても ROS が注目されてきており、ROS を検出する意義はますます高まっています。

＜自動酸化の比較＞

断続的な励起光照射による自動酸化の様子を、本製品または既存色素で染色した HeLa 細胞で観察しました。その結果、既存色素では自動酸化により蛍光の上昇が認められるのに対して、本製品では蛍光の上昇が抑えられました。このことより、観察時のバックグラウンド上昇を最小限に抑えながら観察することが可能となります。

タイムラプスイメージングの様子は右の動画リンクから参照頂けます。



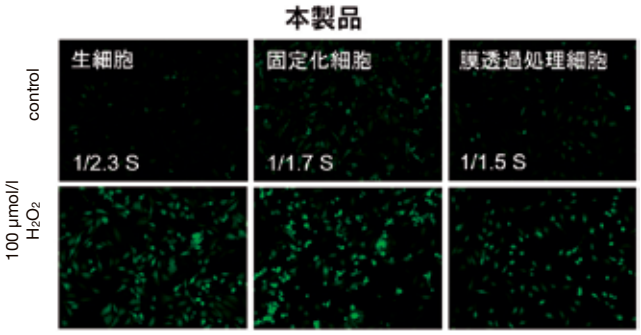
観測光連続照射の比較（12 回照射後）

https://youtu.be/SME10sR3ZOs

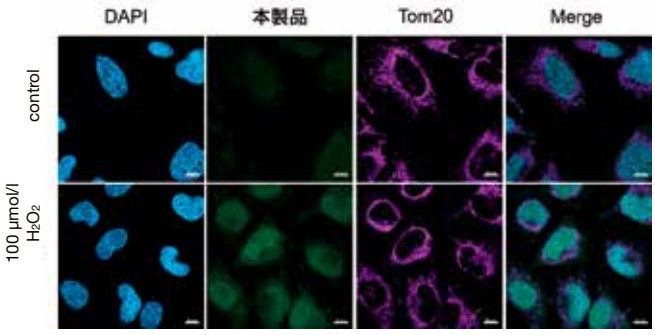
＜固定化処理と免疫染色での共染色＞

HeLa 細胞に過酸化水素で ROS を発生添加した際の蛍光強度を生細胞・固定化細胞・膜透過処理細胞にて観察しました。その結果、高感度を維持したままいずれの細胞でも ROS を検出できました。（左図）

また、HeLa 細胞に過酸化水素を添加した際の ROS の発生とミトコンドリアの形態を本製品と Tom20 antibody を用いて観察しました。その結果、外部からの過酸化水素刺激によりミトコンドリアの顕著な形態異常は見られませんでした。（右図）



落射型蛍光顕微鏡
Fluorescence microscopy（KEYENCE）
GFP フィルター
Ex = 450-490 nm
Em = 500-550 nm



共焦点蛍光顕微鏡
Confocal microscopy（Zeiss）
（青）DAPI（Ex = 405 nm, Em = 450-495 nm）
（緑）本製品（Ex = 488 nm, Em = 500-550 nm）
（紫）Alexa Fluor 647（Ex = 633 nm, Em = 640-700 nm）
スケールバー : 10 µm

＜感度の比較＞

RAW264.7 細胞に LPS 誘導を行い、マクロファージを活性化させた際の ROS の発生を観察しました。結果、本製品と小社製品 ROS Assay Kit - Highly Sensitive DCFH DA-（R252）は他社品 C 色素よりも高感度に ROS を検出できることが分かりました。

詳細は小社 HP をご参照下さい。

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
ROS Assay Kit -Photo-oxidation Resistant DCFH-DA-	100 tests	36,000	R253

※＜使用回数の目安＞ 96 well プレート 1 枚分

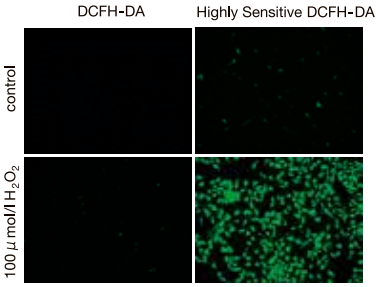
関連製品

トータル ROS 検出キット

ROS Assay Kit -Highly Sensitive DCFH-DA-

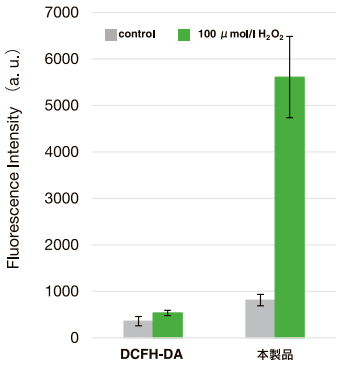
本製品は ROS（Reactive Oxygen Species）を蛍光プレートリーダー、蛍光顕微鏡、もしくはフローサイトメーターを使って蛍光法により検出するキットです。一般的に ROS により酸化されることで発蛍光する DCFH-DA が使用されますが、本キットに含まれる蛍光基質は細胞膜透過性を向上させた構造を有しており、DCFH-DA と比較して高感度に ROS を検出することができます。また、DCFH-DA と同等の蛍光波長を有することから DCFH-DA と同じ検出器やフィルターを使用することができます。

蛍光顕微鏡

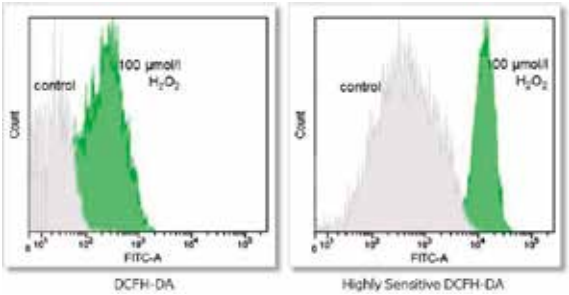


DCFH-DAとの検出感度比較（HeLa 細胞）
※Highly Sensitive DCFH-DAの観察条件で比較

プレートリーダー



フローサイトメーター



HeLa 細胞 , 10,000 cells/well,
10 μmol/l-H2O2/HBSS 添加後 37℃, 30min. インキュベート

＜測定条件＞
・蛍光顕微鏡（GFP フィルター）
露光時間　0.13 s
・マイクロプレートリーダー
Ex = 490 nm, Em = 530 nm
・フローサイトメーター
FITC Filter

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
ROS Assay Kit -Highly Sensitive DCFH-DA	100 tests	18,000	R252

※＜使用回数の目安＞　96 well プレート 1 枚分

関連製品

酸化ストレス検出試薬

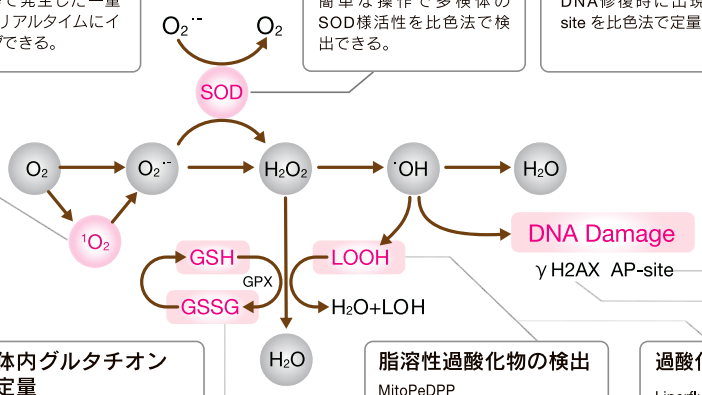
小社では、酸化ストレス検出試薬を各種取りそろえています。各製品の測定例やプロトコルについては、小社 HP をご覧ください。

一重項酸素の検出
Si-DMA for Mitochondrial Singlet Oxygen Imaging
メーカーコード：MT05
UV照射等で発生した一重項酸素をリアルタイムにイメージングできる。

SOD 様活性の検出
SOD Assay Kit - WST
メーカーコード：S311
簡単な操作で多検体のSOD様活性を比色法で検出できる。

DNA 塩基除去部位の定量
DNA Damage Quantification Kit -AP Site Counting-
メーカーコード：DK02
DNA修復時に出現するAP site を比色法で定量できる。

キーワードで検索
メーカーコード　同仁　検索



DNAダメージの検出
DNA Damage Detection Kit - γ H2AX
-Green, -Red, -Deep Red
メーカーコード: G265, G266, G267
DNA ダメージ指標であるγH2AXを二次抗体法で検出できる。

生体内グルタチオンの定量
GSSG/GSH Quantification Kit
メーカーコード：G257
プレートアッセイ（比色）で酸化型グルタチオン（GSSG）と還元型グルタチオン（GSH）の分別定量ができる。

脂溶性過酸化物の検出
MitoPeDPP
メーカーコード：M466
ROS により酸化障害を受けたミトコンドリア中の脂溶性過酸化物を検出できる。

過酸化脂質の検出
Liperfluo
メーカーコード：L248
細胞中の過酸化脂質のイメージングやフローサイトによる検出ができる。

開発中

リソソーム染色色素 DeepRed

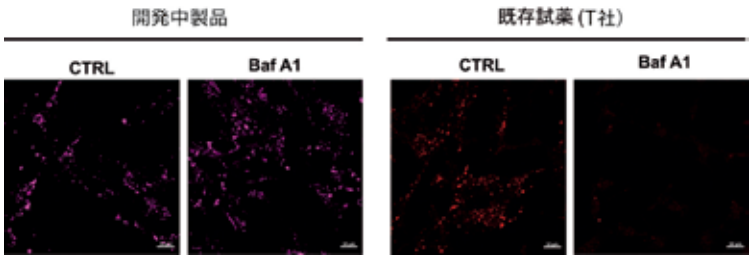
リソソームの生細胞解析では低分子蛍光色素を用いたライブイメージングが汎用されてきましたが、特異性や pH 変化による染色能の低下が課題として挙げられてきました。

小社ではこれらの課題を解決した lysoPrime Green - High Specificity and pH Resistance（メーカーコード：L261）を発売後、カラーバリエーションのご要望をいただいておりました。

今回、開発中ではありますが、リソソーム染色色素 Deep Red の一部データをご案内致します。

＜実験例：既存試薬との比較＞

HeLa 細胞のリソソームを、本製品と既存試薬（T 社）でそれぞれ染色した後、リソソーム阻害剤 Bafilomycin A1 を添加して蛍光イメージングを行いました。開発中製品の蛍光シグナルは、Bafilomycin A1 の有無にかかわらず殆ど変化しませんでしたが、既存試薬は、Bafilomycin A1 添加に伴うリソソームの中性化により蛍光シグナルが低下することが観察されました。



共焦点蛍光顕微鏡　confocal microscope（Zeiss）
既存試薬（T 社）
　Ex = 561 nm, Em = 560-650 nm
LysoPrime DeepRed:
　Ex = 633 nm, Em = 640-700 nm
スケールバー：10 μm

関連製品

リソソーム染色色素 Green

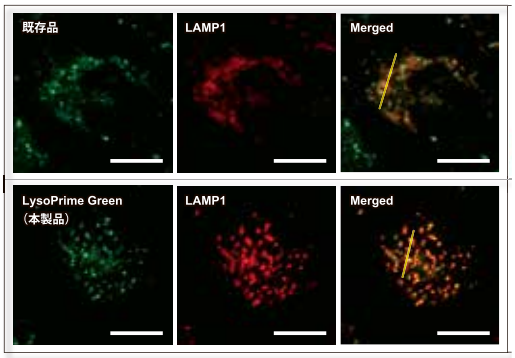
LysoPrime Green - High Specificity and pH Resistance

＜特長＞

- **リソソームへの特異性が高い**
- **リソソームの pH 変化の影響を受けにくい**

＜実験例：リソソームへの特異性の高さ＞

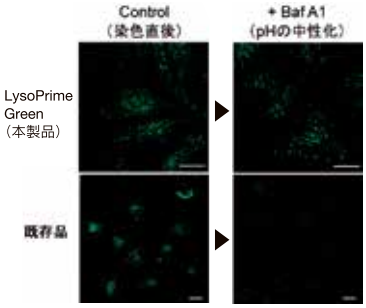
既存色素と LysoPrime Green（本製品）のリソソーム局在性を LAMP1-RFP 発現 HeLa 細胞を用いて比較しました。既存色素に比べ本製品ではバックグラウンドが抑えられる結果が得られました。（蛍光画像 Merged）



Green　：Ex = 488 nm , Em = 500 - 570 nm
Red　　：Ex = 561 nm , Em = 560 - 620 nm
スケールバー：20 μm

＜実験例：pH 非依存な色素の確認実験＞

本製品および既存色素は酸性状態にあるリソソームに集積する性質を有しますが、リソソーム酸性阻害剤である Bafilomycin A1（Baf A1）で処理すると、既存色素は蛍光シグナルが著しく低下します。一方、本製品ではリソソームに保持されやすい構造を有するため蛍光シグナルの低下が抑えられました。

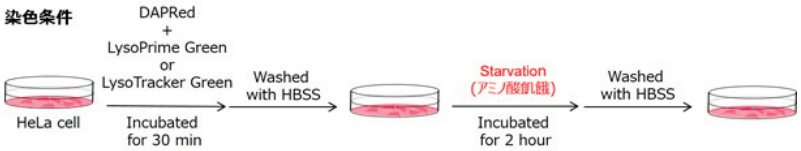


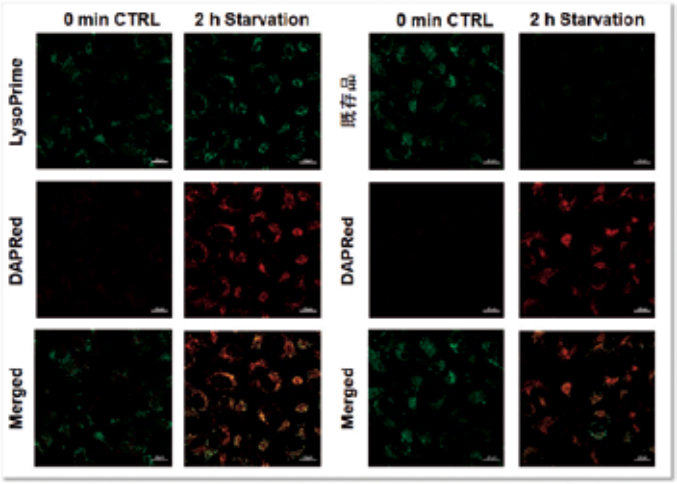
細胞：HeLa
染色条件：
LysoPrime Green working solution（2000 倍希釈）、37℃、30 分
Bafilomycin A1 100 nmol/l、37℃、30 分

品名	容量	希望納入価格（￥）	メーカーコード
LysoPrime Green - High Specificity and pH Resistance	10 μl 10 μl × 3	13,000 27,000	L261

＜オートファジー検出試薬との併用実験例＞

オートファジー検出色素 DAPRed - Autophagy Detection（製品コード：D677）と LysoPrime Green もしくは既存品で染色した HeLa 細胞に、アミノ酸飢餓の刺激を与え蛍光イメージングを行いました。既存品では蛍光シグナルが低下し、飢餓培養後のリソソーム局在を確認できませんが、LysoPrime Green の蛍光シグナルは低下せず経時的なリソソームの局在が確認されました。このことより、DAPRed の蛍光輝点が既存品よりも共局在率が高くなるため、より正確なフォートファジー解析をすることが可能です。





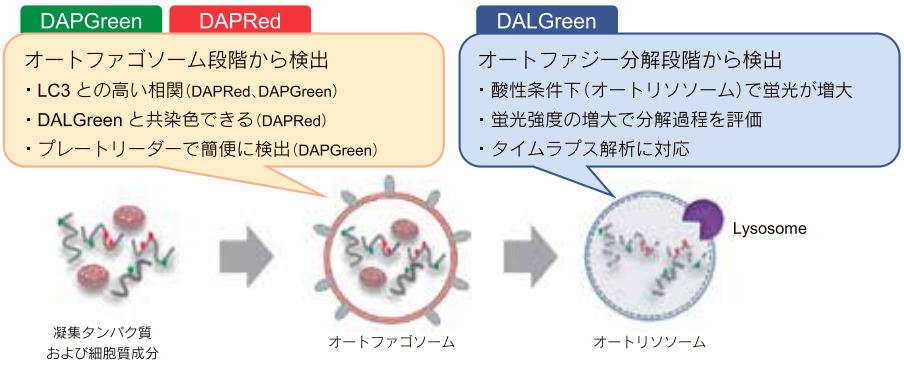
＜検出条件＞
Green: Ex = 488 nm, Em = 500-570 nm
Red: Ex = 561 nm, Em = 560-650 nm
スケールバー：20 μm

関連製品

オートファジー検出色素

DAPRed - Autophagy Detection
DAPGreen - Autophagy Detection
DALGreen - Autophagy Detection

DAPRed、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。このように DAPRed または DAPGreen と 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ます。



品名	容量	希望納入価格（￥）	メーカーコード
DAPRed - Autophagy Detection	5 nmol	37,200	D677
DAPGreen - Autophagy Detection	5 nmol	37,200	D676
DALGreen - Autophagy Detection	20 nmol	29,000	D675

新製品

免疫染色用青色蛍光基質

CLAMP F405-Signal Boosting

＜特長＞

- **従来の蛍光免疫染色法よりも高感度（10-100 倍程度）**
- **さまざまなサンプルに適用可能**
- **特定の抗原を発現している細胞のみを染色することが可能**

近年、細胞表面抗原を標的としたがん治療や診断が注目され、がん細胞や免疫細胞などの細胞表面抗原の研究が盛んになっています。細胞表面タンパク質の特異的な検出方法として、蛍光標識抗体を用いた蛍光免疫染色法が広く知られていますが、細胞表面タンパク質には発現量が少ないものも多く、従来技術では感度が低く、適用対象が限られています。小社はこれらの課題を解決するために、高感度蛍光免疫染色法 CLAMP ※法を開発しました。

※ Quinone Methide-based Catalyzed Labeling for Signal Amplification

＜原理＞

本製品では、細胞表面タンパク質に対する一次抗体、β-Galactosidase（βGal）標識二次抗体、およびβGal の蛍光基質 CLAMP F405（無蛍光）を使用します。細胞表面タンパク質を介して細胞表面にβGal が存在すると、この蛍光基質が反応して、キノンメチド構造を有する化合物を生成します。この反応生成物は細胞膜透過性を有しているため、細胞内に入り込み、細胞内のチオールやアミノ基など（Nu: 求核剤）と反応して共有結合を形成し蛍光を発します。この反応は抗原の量に依存したβGal の存在により進行し、蛍光色素が細胞内に蓄積するため、細胞表面タンパク質特異的かつ高感度に細胞を蛍光染色することが可能となります。

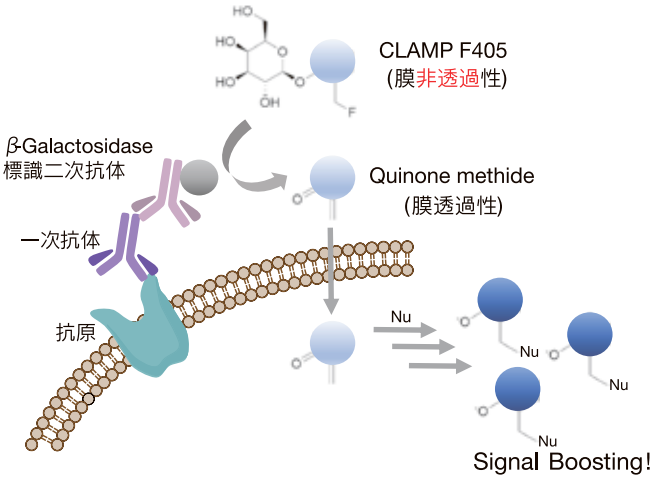


図　CLAMP法の原理

＜蛍光標識二次抗体法よりも高感度＞

A549 細胞表面に存在する CD44 を CLAMP 法または蛍光標識二次抗体法により検出しました。その結果、本法は蛍光免疫染色法よりも高感度に検出できることが確認されました。

CLAMP 法
1': 抗 CD44 抗体
2': βGal 標識二次抗体
3': CLAMP F405 染色

蛍光標識二次抗体法
1': 抗 CD44 抗体
2': Alexa®405 標識二次抗体

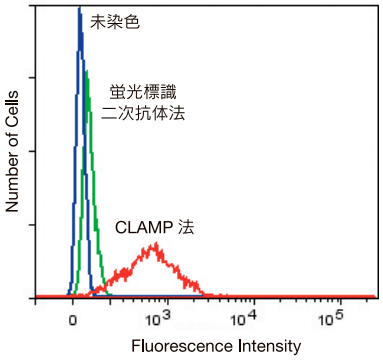
Control

【サンプル】
ヒト肺胞基底上皮腺癌（A549）細胞
生細胞

【検出条件】
蛍光顕微鏡 BZ-X700（Keyence 社）
Ex 360/40 nm, Em 460/50 nm

＜実験例：特定抗原を発現している細胞の染色＞

免疫チェックポイント阻害剤の標的分子の一つである PD-1 を CLAMP 法または蛍光標識二次抗体法で染色し、フローサイトメーターで測定しました。蛍光免疫染色法に比べ、CLAMP 法では高い蛍光シグナルが得られることが確認されました。



CLAMP 法
1': 抗 PD-1 抗体
2': βGal 標識二次抗体
3': CLAMP F405 染色

蛍光標識二次抗体法
1': 抗 PD-1 抗体
2': Alexa®405 標識二次抗体

【サンプル】
ヒト急性リンパ芽球性（MOLT4）細胞
PFA 固定細胞

【検出条件】
フローサイトメーター
LSRFortessa X-20（BD 社）
Ex = 405 nm, Em = 425-475 nm

＜さまざまなサンプルに適用可能＞

本製品は下記のサンプルに適用可能です。

	細胞表面抗原	細胞内抗原
生細胞	○	×
PFA 固定細胞	○	○
凍結組織	○	○
パラフィン包埋組織切片		

（※）本製品は九州大学の片山佳樹先生から技術指導、情報提供いただき開発した製品です。

品名	容量	希望納入価格（￥）	メーカーコード
CLAMP F405-Signal Boosting	10 μl	49,000	C554

※＜使用回数の目安＞ 96 well プレート 1 枚分

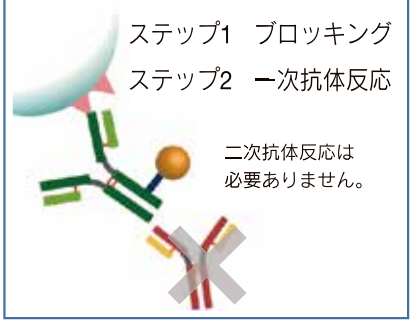
関連製品

DOJINDO MOLECULAR TECHNOLOGIES, INC.

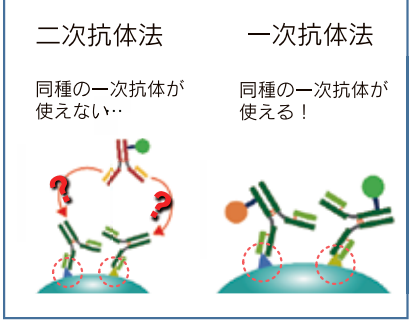
抗体標識キット

Dojindo Ab-10 Labeling Kit シリーズは、お手持ちの少量（10 μg）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。
一次抗体法には、以下のような利点があります。

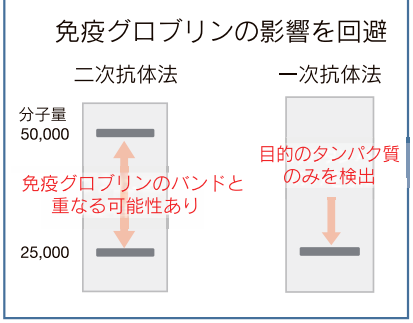
ステップが減る 免疫反応



気にしないでいい交差性



解決する 共免疫沈降



〈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。

品名	容量	希望納入価格（￥）	メーカーコード
Ab-10 Rapid Fluorescein Labeling Kit	3 samples	24,800	LK32
Ab-10 Rapid HiLyte Fluor™ 555 Labeling Kit	3 samples	24,800	LK35
Ab-10 Rapid HiLyte Fluor™ 647 Labeling Kit	3 samples	24,800	LK36
Ab-10 Rapid R-Phycoerythrin Labeling Kit	3 samples	29,000	LK34
Ab-10 Rapid Perxidase Labeling Kit	3 samples	19,600	LK33
Ab-10 Rapid Biotin Labeling Kit	3 samples	18,600	LK37

50 ～ 200 μg、1 mg の抗体標式キットもございます。詳しくは小社 HP からご参照ください。

お役立ち

エクソソーム研究 学術セミナーアーカイブ動画案内

2022 年 3 月 24 日にエクソソーム研究の最前線でご活躍されておられる東京医科大学 吉岡祐亮先生を講師にお迎えし、エクソソームを用いた研究の概要や実験手法、サンプル精製の意義などご自身の経験を踏まえた内容にてご講演いただきました。再視聴のご要望を多数いただき、この度、先生のご協力のもと動画のアーカイブ配信に加え、発表後の意見交換や質疑応答の詳細を Q&A 形式で公開しました。エクソソーム研究やエクソソームに興味があるといった方にオススメの内容ですので是非ご視聴ください。また、本誌 176 号では総説をご執筆いただいておりますので、こちらもご参照ください。

吉岡 祐亮 先生
東京医科大学
医学総合研究所

動画視聴はこちら

エクソソームセミナー 同仁 検索

関連製品

エクソソーム精製キット・キット用フィルター

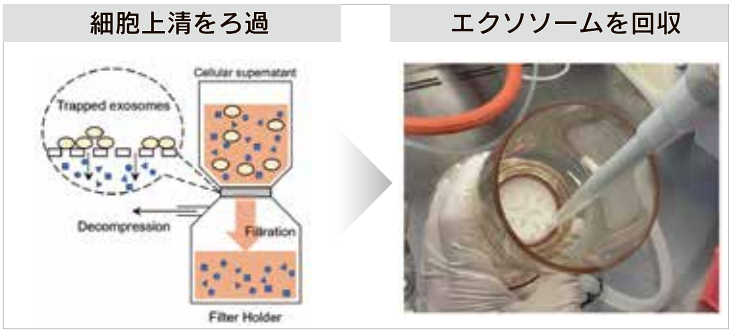
Exo*lsolator* Exosome Isolation Kit

＜特長＞

- **細胞培養上清のフィルトレーションだけでエクソソームを精製可能**
- **エクソソームの回収率は超遠心法と同等**
- **超遠心機等の高額な機器は不要**

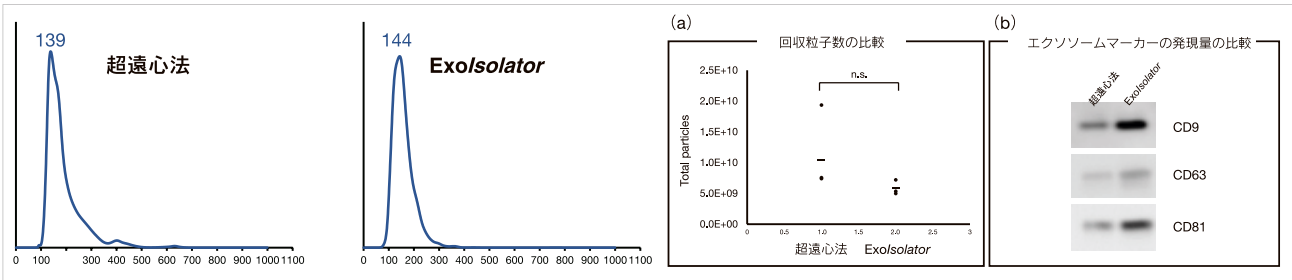
細胞が分泌する細胞外小胞（Extracelluar vesicle: EV）の一種であるエクソソームは、さまざまなタンパク質や核酸などを内包しており、エクソソームを介して内包物質が伝達されることで、受け手側の細胞にいろいろな影響を与えることが明らかとなっております。近年、特にがん研究分野では悪性化や転移に促進的に寄与することから注目を集めています。

Exo*lsolator* Exosome Isolation Kit は、培養上清中に分泌されたエクソソームをフィルトレーションの操作だけで簡単に、短時間で回収することができるキットです。



＜超遠心法と同等の回収実績＞

エクソソーム回収法で最も良く使用される超遠心法と本キットのそれぞれを用いて、HEK293S 細胞の培養上清から回収したエクソソームの粒度分布（下記左図）、粒子数（下記右図（a））とエクソソームマーカーの発現量（下記右図（b））を比較しました。結果、本キットで回収されたエクソソームは超遠心法と同等の粒度分布を示しており、回収できた粒子数も同等で、さらにエクソソームマーカーが多く発現していることがわかりました。



超遠心法と Exo*lsolator* の比較（左図：ナノ粒子トラッキング解析結果、右図：回収粒子数とマーカータンパク発現量の結果）

品名	容量	希望納入価格（￥）	メーカーコード
Exo*lsolator* Exosome Isolation Kit	3 tests	73,000	EX10
Exo*lsolator* Isolation Filter	10 pieces	89,000	EX11

関連製品

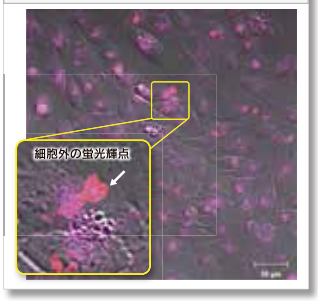
エクソソーム染色キット

エクソソーム膜 蛍光染色キット
ExoSparkler Exosome Membrane Labeling Kit-Green, Red, Deep Red
エクソソームタンパク質 蛍光染色キット
ExoSparkler Exosome Protein Labeling Kit-Green, Red, Deep Red

＜特長＞
- 細胞外で凝集しない
- キットだけで蛍光標識から精製まで可能
- エクソソームの性質にほとんど影響しない

小社製品 Deep Red（紫）と製品 P（緑）の共染色

小社製品 Deep Red（紫）と製品 P（赤）の共染色



ExoSparkler Exosome Membrane Labeling Kit-Deep Red 及び S 社製品 P（緑または赤）で染色したエクソソームを HeLa 細胞へ添加し、細胞内へ取り込まれるエクソソームを蛍光顕微鏡で確認した結果、ExoSparkler シリーズでは色素の凝集が見られなかったのに対し製品 P（緑または赤）で染色したエクソソームでは、色素の凝集が疑われる細胞外の蛍光輝点が確認されました。

〈観察条件〉
ExoSparkler Exosome Membrane Labeling Kit-Deep Red（紫）：
Ex 640 nm / Em 640-760 nm

S 社 製品 P（緑）：
Ex 488 nm / Em 490-540 nm

S 社 製品 P（赤）：
Ex 561 nm / Em 570-640 nm

品名	容量	希望納入価格（¥）	メーカーコード
ExoSparkler Exosome Membrane Labeling Kit-Green	5 samples	25,000	EX01
ExoSparkler Exosome Membrane Labeling Kit-Red	5 samples	25,000	EX02
ExoSparkler Exosome Membrane Labeling Kit-Deep Red	5 samples	25,000	EX03
ExoSparkler Exosome Protein Labeling Kit-Green	5 samples	20,000	EX04
ExoSparkler Exosome Protein Labeling Kit-Red	5 samples	20,000	EX05
ExoSparkler Exosome Protein Labeling Kit-Deep Red	5 samples	20,000	EX06

※精製済エクソソーム（超遠心法）として、タンパク質：1-10 μg/sample、粒子数：10-100 × 10^8 個 /sample

お役立ち

動画で学ぶ試薬の使い方 ～ 開発者が解説するセミナーアーカイブ動画紹介

「試薬の使い方セミナー」を全 5 回にわたり開催しました。再視聴のご要望を多数いただきまして、この度アーカイブ動画として小社ホームページにて公開いたしました。また各回の資料もダウンロードいただけます。
「これから実験を始められる方」や「いまさら人には聞きづらい、もう一度勉強したいという方」に、各タイトルの開発者たち “ DOJIN 5 ” が試薬の使い方や測定意義などをわかりやすく解説しますのでぜひご覧ください。

	セミナータイトル	
第 1 回	出た！細胞内代謝の全貌	～ エネルギー代謝解析の実験を解説 ～
第 2 回	光れ！ミトコンドリアたちっ！	～ ミトコンドリア膜電位の実験を解説 ～
第 3 回	潜入！細胞膜の先へ…	～ 細胞膜関連実験の入門編 ～
第 4 回	魁！エクソソーム塾	～ エクソソーム回収実験の入門編 ～
第 5 回	栄養素よ！何処へ行く…	～ 様々な栄養素の測定意義や実験例を解説 ～

動画視聴はこちら

dojin5 検索

小社へのお問い合わせ等は下記 HP よりお願いします
URL：https://www.dojindo.co.jp/

次号テーマ
アミノ酸トランスポーター

DOJIN NEWS No.181

ドージンニュース No.181　令和 4 年 6 月 17 日発行
株式会社同仁化学研究所　DOJINDO LABORATORIES
熊本県上益城郡益城町田原 2025-5 〒 861-2202
発行責任者 松野寛明　編集責任者　岩永竜弥　年４回発行　許可なくコピーを禁ず