

DOJIN NEWS

ドージンニュース

2026 No.196

ISSN 0385-1516

新製品

リソソーム内

鉄イオン測定試薬 p.20

膨張顕微鏡法

標本作成キット p.22

計算化学、フェロトキシス

総説

計算化学に基づく色素分子の励起状態の理論解析

名古屋大学 柳井 毅、藤本 和宏、稲井 直人

N-オキソ化学に基づく二価鉄蛍光プローブの開発

岐阜薬科大学 平山 祐

連載

生命科学の最前線～タイ王国研究者の現場から～③

Targeting DNA Repair Mechanisms: Exploiting Acquired Vulnerabilities to Overcome Resistance in Cholangiocarcinoma

Mahidol University Donniphat Dejsuphong, Rakkreat Wikiniyadhane, Tassanee Lerksuthirat, Sermsiri Chitphuk

注目の研究

細胞機能解析における「Click-to-Release」反応の可能性

株式会社同仁化学研究所 吉村 建司



CONTENTS

Review

計算化学に基づく色素分子の励起状態の理論解析

Computational Chemistry for Theoretical Analysis of Excited States in Dye Molecules

名古屋大学 柳井 毅、藤本 和宏、稲井 直人

1

Review

N- オキシド化学に基づく二価鉄蛍光プローブの開発

Development of N-oxide chemistry-based ferrous ion fluorescent probes

岐阜薬科大学 平山 祐

7

Topics on Chemistry

細胞機能解析における「Click-to-Release」反応の可能性

株式会社同仁化学研究所 吉村 建司

6

連載

生命科学の最前線～タイ王国研究者の現場から～③

Targeting DNA Repair Mechanisms: Exploiting Acquired Vulnerabilities to Overcome Resistance in Cholangiocarcinoma

Mahidol University Donniphat Dejsuphong, Rakkreat Wikiniyadhane, Tassanee Lerksuthirat, Sermsiri Chitphuk

16

Commercial

関連製品

細胞内鉄イオン測定試薬	12
ミトコンドリア内鉄検出蛍光試薬	12
ミトコンドリア脂溶性過酸化検出試薬	13
脂質過酸化検出試薬	13
過酸化脂質検出蛍光試薬	14
マロンジアルデヒド測定キット	14
耐光性トータル ROS 検出キット	15
トータル ROS 検出キット	15
遺伝子導入試薬	19
細胞増殖・細胞毒性アッセイキット	19

新製品

リソソーム内鉄イオン測定試薬	20
膨張顕微鏡法標本作成キット	22

お役立ち

代謝物分析のご案内 - 同仁グローバル	21
---------------------	----

※希望納入価格には消費税等は含まれておりません。

※記載価格は本誌発行時における希望納入価格です。

予告なしに変更する場合がございますのでご注意ください。

※掲載製品は試験・研究用のみに使用するものです。医療用その他の目的には使用できません。

※製品内容に記載の技術指導・技術移転および情報提供元に関する記載は、製品発売当時の情報に基づくものであり、現在の状況とは異なる場合があります。



表紙：人吉市
桜と列車
photo：永島俊介氏



X(旧ツイッター)

小社製品の最新情報や使用文献などを投稿しています。



フォロー
お願いします

@dojindoinfo

計算化学に基づく色素分子の励起状態の理論解析

Computational Chemistry for Theoretical Analysis of Excited States in Dye Molecules



柳井 毅

名古屋大学
トランスフォーマティブ生命分子研究所
教授



藤本 和宏

名古屋大学
トランスフォーマティブ生命分子研究所
特任准教授



稲井 直人

名古屋大学大学院
理学研究科 理学専攻
助教

Abstract

The expanding applications of molecular dyes in fluorescence imaging, OLEDs, and photocatalysis demand theoretical tools capable of reliably predicting absorption and emission spectra and excited-state dynamics. This review outlines current computational approaches to dye photophysics, focusing on quantum chemical calculations based on density functional theory (DFT) and its time-dependent extension (TD-DFT) for analyzing excited states and transition processes. We showcase our recent research on fluorescence quantum yields of phosphorus-bridged stilbenes, energy-transfer analysis of photosynthetic antenna complexes, *in silico* exploration of novel π -frameworks, and spin-orbit-coupling-driven dynamics simulations. These examples demonstrate how quantum chemical calculations can quantitatively uncover mechanisms inaccessible to experiment, advancing theory-experiment interplay in dye-molecule research.

1. はじめに

蛍光イメージングプローブや有機 EL 材料、光触媒など、色素分子の応用範囲は急速に広がっており、それに伴い、分子設計段階から光吸収・発光特性や失活機構を予測することの重要性が高まっている。本稿では、計算化学手法を用いた色素分子（主には有機分子）の励起状態解析の現状と展望を概説する。計算機性能と量子化学ソフトウェアの発展により、基底状態の最適化構造だけでなく、励起エネルギーや遷移状態の分子構造の特定が計算機上でルーチンに実施されている。さらには、状態間遷移の速度定数やエネルギー・電子移動のダイナミクスなど、量子的な過程の詳細な情報を評価できる時代に入りつつある。本レビューでは、まず量子化学計算の主力である密度汎関数理論 (DFT/TD-DFT) を中心に、励起状態を扱う基礎理論を紹介する。続いて、当研究室で行った理論研究として、架橋スチルベン類縁体の蛍光量子収率の計算、光合成アンテナのような複合系、新奇骨格の *in silico* 探索、スピン軌道相互作用を含むダイナミクス計算など、色素分子研究における計算化学の役割がどのように展開されているかを示す。特に、本稿で取り上げる例はいずれも、実験的知見だけでは捉えにくい励起状態の詳細を、量子化学計算・電子状態理論に基づいて、高精度に明らかにしたものであり、計算と実験の協奏による色素分子の化学研究の将来像を示すことを目指したい。

2. 励起状態を扱う量子化学計算法

2.1 量子化学計算とは

量子化学計算は、分子の電子状態を量子力学に基づいて記述

し、分子構造や化学反応を数値的に予測するための理論的手法である^{1,2)}。実験では観測が難しい短寿命の中間体や遷移状態を“計算機上で可視化できる”点は大きな利点であり、実験化学を補完する研究手段として広く利用されている。近年は高速計算機の普及やソフトウェア環境の整備³⁾により、理論の専門家以外の化学者が利用する場面が一般化している。

分子の性質を記述する際の中心となるのが、電子の振る舞いを定めるシュレディンガー方程式である。この方程式を厳密に解くことは多くの場合不可能であるため、量子化学では多様な近似法や計算アルゴリズムが発展してきた。その中でも密度汎関数法 (DFT) は、計算精度と計算コストのバランスが良く、分子軌道やエネルギーを効率的に求められる方法として現在最も広く使われている。DFT を含む量子化学手法の発展は、ポーブルやコーンらによる基礎理論の構築に支えられており、ノーベル化学賞に結実したことでよく知られている。

実際の計算では、ユーザーは分子の三次元構造を入力するだけで、経験的パラメータに頼ることなく、エネルギーや分子軌道、電子密度といった量子論的情報を得ることができる。量子化学計算の強みとして特に重要な点は次の二つである。(1) 電子の波動関数に基づき化学結合を直接記述できるため、反応経路やポテンシャルエネルギー面を解析できること、(2) 基底状態だけでなく励起状態のエネルギーや性質を扱えるため、光吸収・発光や電子移動など分子の電子物性に関わる現象を解析できることである。さらに、単一（気相中）の分子だけでなく、溶媒の効果を取り入れる連続誘電体モデル (PCM) や、タンパク質環境などを

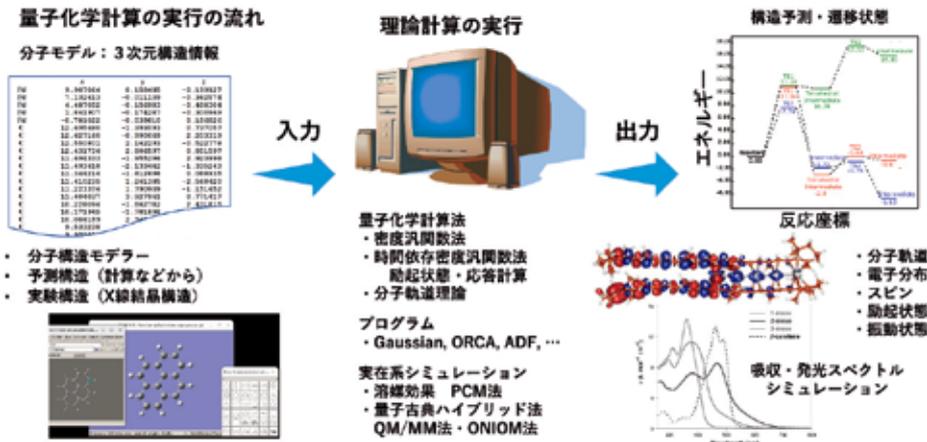


図1. 量子化学計算法における、分子構造の入力から理論計算の実行、結果として得られる励起エネルギー・スペクトル・反応経路解析など、全体的な実行スキームを示す概要図。

扱う QM/MM 法など、より現実の条件に近いシミュレーション手法も確立されている。計算機性能の向上とソフトウェアの進展により、現在では理論化学の専門家でなくともルーチンな DFT 計算を実行でき、構造情報さえあれば高度な電子状態解析を容易に行える環境が整いつつある。

2.2 密度汎関数理論と励起状態理論

密度汎関数法 (DFT) は、分子から固体材料まで多様な系の電子状態を扱う第一原理計算法であり、現代量子化学の主要手法となっている²⁾。電子密度を基本変数とすることで、全電子の波動関数を直接扱う必要がなく、エネルギーや構造、反応性を効率よく求められる点が特徴である。電子密度と基底状態エネルギーの対応関係がコーンの定理によって保証され、DFT が厳密な量子力学に基づく理論であることが示された。分子向け近似やアルゴリズムの整備により、現在では構造最適化や反応経路解析に欠かせない標準手法となっている。実用的な DFT の中心はコーン・シャム法である。電子密度のみでは運動エネルギーを十分に表せないため、非相互作用電子系の軌道を導入し、残る電子間相互作用を「交換相関汎関数」として近似する。局所密度近似や密度勾配補正、さらにハイブリッド汎関数 (B3LYP など) が広く利用され、計算精度と効率のバランスに優れている。

励起状態を扱うためには、時間依存密度汎関数法 (TD-DFT) が用いられる。時間変化する電子密度への線形応答を解析することで、電子励起エネルギーや吸収・発光波長を求める手法であり、多くの量子化学プログラムに実装されている。バレンス (価) 電子励起については良好な精度を示し、色素分子の光吸収特性解析に有効である。一方、電子の空間的な転送を伴う電荷移動励起では、従来の汎関数が遠距離ポテンシャルを正確に再現できず、励起エネルギーを過小評価する問題があった。それに対応して、長距離補正型ハイブリッド汎関数の開発による改善が達成され^{2,4)}、TD-DFT 法は色素分子の励起状態計算において重要性を増している。

2.3 状態遷移・エネルギー移動の計算法

有機色素分子の光物性は、励起後にどの経路で失活 (輻射・無輻射) あるいは反応へと進むのかを決定する電子状態遷移の理解に大きく依存しており、その解析にはシミュレーション計算が重要な役割を担う。近年では、量子化学計算と組み合わせることで、遷移速度定数を理論的に評価する試みが現実的になってきた⁵⁾。輻射失活、内部転換、項間交差などの過程は、時間依存シ

ムレーション方程式に対する摂動論、すなわちフェルミの黄金律に基づき、遷移双極子モーメント、非断熱結合、スピン-軌道相互作用、さらには振動状態の重なり積分を入力として速度定数が求められる。これらの計算手法は、熱活性化遅延蛍光 (TADF) 分子⁶⁾の逆項間交差の高速化設計や、光触媒の反応機構解析など、多様な物性設計研究に応用されている。一方で、円錐交差を経由した遷移は、励起状態上の反応座標に沿ったエネルギープロファイルから活性化エネルギーを評価し、アイリングの式などを用いて速度論的推定を行うアプローチが補完的に用いられる^{7,8)}。

分子間のエネルギー移動の理解は、状態遷移解析と並ぶ重要な理論計算の対象である。代表例として FRET (蛍光共鳴エネルギー移動) は、色素間のエネルギー輸送を高感度に反映する現象として知られ、分子間距離の指標として広く利用されている。理論的には、遷移双極子間のクーロン相互作用に基づくフェルスター理論が基盤となり、蛍光・吸収スペクトルの重なり積分や配向因子を用いてエネルギー移動速度を定量化できる。これらの物理量を量子化学計算から求めることが可能となっている。

また、光合成アンテナ複合体や分子凝集体のように多数の色素が密接に相互作用する系では、単一の二分子近似では記述しきれない集団励起効果が重要となる。この場合、各色素分子の励起エネルギーと分子間電子カップリングを要素として励起子ハミルトニアンを構築し、その対角化によって得られる励起子状態を基にエネルギー移動経路や光吸収特性を解析する励起子理論が有効である⁹⁻¹¹⁾。分子間電子カップリングの計算法としては、モノマーの電荷分布から相互作用を高精度に再現する遷移電荷相互作用 (TrESP) 法¹²⁾が広く用いられており、低計算コストで大規模系のエネルギー移動解析を可能とする点で特に有用である。

3. 色素分子の励起状態解析への計算化学の応用

3.1 リンの酸化状態がリン架橋スチルベン類縁体の蛍光量子収率にもたらす影響

新規の物性を持つ π 共役有機分子を開発する手段の 1 つとして、典型元素を π 共役系に組み込む骨格開発が行われている。中でも、リンは注目されている典型元素の 1 つであり、高い光耐久性を持つ分子や近赤外領域に発光を示す分子など、種々の分子開発に用いられてきた。リン含有有機色素の特徴の 1 つに、リン原子の状態による顕著な電子状態の変化があげられる。3 個のリンが非共有電子対を持つ状態、ルイス酸に配位した状態、酸化

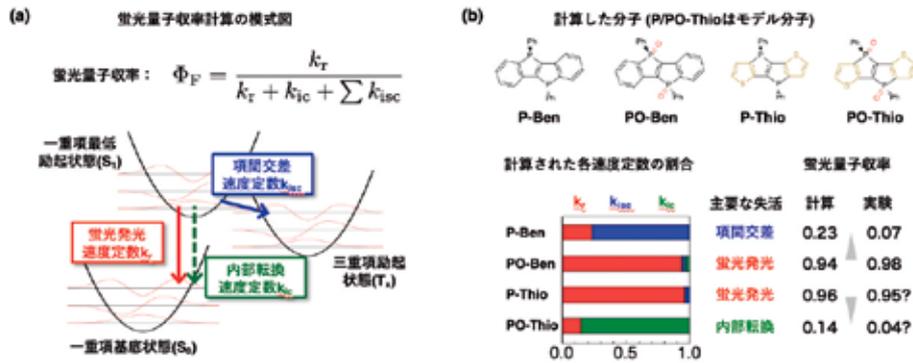


図 2. リン架橋スチルベンの蛍光量子収率に関する計算の概要

(a) 蛍光量子収率の計算式と関係する速度定数。(b) 計算した分子と計算された速度定数の割合および蛍光量子収率。

によって5個になった状態、と状態に応じた物性を示すとされている¹³⁾。山口らは、リン架橋スチルベン類縁体が、架橋するリンの酸化状態や主骨格の種類によって大きく異なる蛍光波長を示すことを報告した¹⁴⁾。同時に、蛍光量子収率もまたリンの酸化状態などに大きく依存することが判明した。しかしながら、同じ酸化であっても収率が向上するものと低下するものの両方が存在し、リンの酸化状態の違いによる量子収率変化の要因を理解するには至っていなかった。

この問題に対して我々は、一重項最低励起 (S_1) 状態からの状態間遷移 (図 2a) — 蛍光発光、内部転換、項間交差 — それぞれの速度定数を計算することにより、各分子の主要な失活過程及び蛍光量子収率を調べた¹⁵⁾。TD-DFT に基づき、合成された分子 (**P-Ben** と **PO-Ben**) とモデル分子 (**P-Thio** と **PO-Thio**) の S_1 状態と三重項励起状態を計算した。得られた構造を用いた TVCF 理論⁵⁾ に基づく速度定数計算は、分子の違いによる蛍光量子収率の変化を定性的に再現した (図 2b)。分子 **P-Ben** には S_1 状態より僅かに安定な三重項励起状態が2つ存在し、それらへの項間交差が主要な過程になるために蛍光量子収率の低下を引き起こすと計算された。ここへリンの酸化またはチオフェンの導入を行うと、項間交差が抑制されて量子収率が大幅に向上すると計算された。これは、部分構造の変化によって最高占有軌道 (HOMO) や最低非占有軌道 (LUMO) の準位が変化し、HOMO-LUMO 励起に帰属される S_1 状態が安定化され、結果として三重項状態が相対的に不安定化したことによると示唆された。一方、

リンの酸化とチオフェンの導入の両方を行った分子 **PO-Thio** では S_1 状態が強く安定化され、結果として内部転換が支配的になり、量子収率の低下を招くと計算された。このように、リンの酸化状態の変化が S_1 状態のエネルギー準位を変化させ、項間交差の抑制や内部転換の加速を引き起こすことが、リン架橋スチルベン類縁体の蛍光量子収率の変化をもたらす物理化学的要因である可能性を示した。

3.2 珪藻の光合成アンテナの特異な光学機能の量子化学計算

光合成アンテナは多数の色素分子が集積して光エネルギーを吸収・移動する巨大複合体であり、その吸収特性は生物種によって大きく異なる。特に珪藻が示す赤褐色の体色は 500–560 nm 領域の強い吸収に起因するが、その分子機構は未解明であった。本研究では、クライオ電子顕微鏡で明らかになった FCPII の構造を基に、量子化学計算と励起子理論を統合した計算法を用いて、特異な光吸収の起源を分子レベルで解析した⁹⁾。

励起子理論では、各色素の励起エネルギー・遷移双極子モーメント・分子間電子カップリングを入力として励起子ハミルトニアンを構築し、その対角化から複合体全体の吸収スペクトルを求める。FCPII は数十個の色素を含み、全電子励起計算は実質的に不可能であるが、励起子モデルを用いることで大規模系にみられる相互作用を効率的に取り込める。本研究では特に、電子カップリングに TrESP 法を導入し、カロテノイドとクロロフィルが密集した環境における相互作用を高精度に評価した。

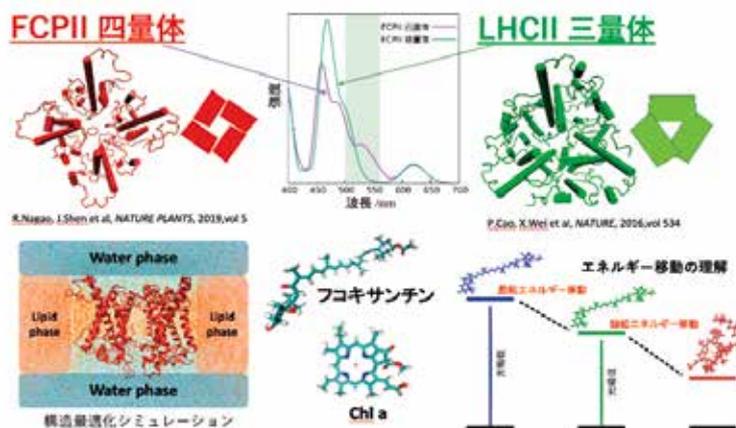


図 3. 量子化学計算と励起子理論により、FCPII 四量体で生じる特異な吸収帯とフコキサンチン -S の役割、および Chl a への高効率エネルギー移動機構を分子レベルで解明した。

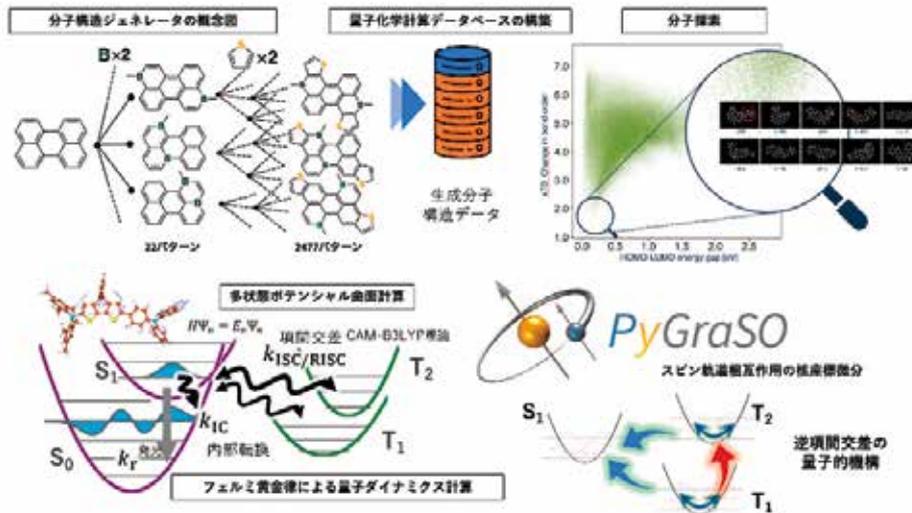


図4. 分子構造ジェネレータによる大規模分子生成と量子化学計算データベース構築、分子探索、励起状態ダイナミクス解析、スピン軌道相互作用評価までを統合した計算基盤の概要図

計算によって得られた FCP11 四量体の吸収スペクトルは実験結果を良好に再現し、500–560 nm の吸収帯が確かに存在することが確認された。スペクトル分解の結果、この吸収は通常のコキサンチンとは異なる配置に置かれた特別な分子、コキサンチン-S に由来することが明らかになった。立体構造比較から、この位置にはホウレンソウ LHCII には対応するカロテノイドが存在せず、コキサンチン-S が珪藻アンテナに特有の構造要素であることが示唆された。

さらに励起子解析により、四量体化に伴うプロトマー間の近接化がコキサンチン-S と荷電アミノ酸や Chl a の静電相互作用を強め、励起エネルギーを低下させて赤方吸収を生じることが判明した。また電子カップリングの計算から、コキサンチン-S は他のコキサンチンよりも効率的に Chl a へエネルギー移動を行い、補助的な集光素子として機能していることが示された。

本研究は、励起子理論と量子化学計算を組み合わせることで、光合成アンテナのような大規模色素集合体の光物性を高精度に記述できることを示し、珪藻が海中環境に適応する分子戦略を包括的に理解する手がかりを与えた。

3.3 色素分子の *in silico* 探索に向けた量子化学アルゴリズムの高度化

近赤外発光色素や TADF 分子など、高度な光機能をもつ色素の設計には、膨大な化学空間の中から有望候補を効率よく絞り込む *in silico* 探索が不可欠になりつつある。本研究では、分子構造ジェネレータ¹⁶⁾と量子化学計算に加え、スピン軌道相互作用を精密に扱う励起状態ダイナミクス理論¹⁷⁾を組み合わせることで、色素分子探索のための計算枠組みを高度化し、従来は経験的試行錯誤に依存していた分子設計を理論主導へと転換することを目指している。

近年我々は、多環芳香族炭化水素 (PAH) 骨格にホウ素ドーブとチオフェン縮環を施すという設計コンセプトに基づき、独自に開発した分子構造ジェネレータにより約 2500 個の候補構造を自動生成し、TD-DFT 計算によって吸収・発光波長と遷移双極子モーメントを一括評価した¹⁶⁾。その結果、近赤外領域で強い蛍光を示す候補を抽出し、実際に合成した標的分子が高い蛍光量子収率を示すことを確認した。設計原理で定めた化学空間を網羅的にスクリーニングし、計算結果を実験で検証するというスキームは、新規 π 共役骨格の探索や機能性ナノグラフェンの開発に有効

な戦略であり、今後の高スループット分子探索への展開が期待される。

さらに、スピン反転を伴う無輻射失活過程 (項間交差・逆項間交差) を扱うため、その量子的な過程を支配するスピン軌道相互作用を高精度に評価するソフトウェア開発も進めている。PyGraSO¹⁸⁾はその一例であり、スピン-振動結合項を解析的な核微分により高精度かつ効率良く取り込むことを可能にするプログラムである。このプログラム開発により、多数の TADF 分子やフォトレドックス触媒候補に対する RISC・ISC 速度定数の高精度予測が現実的となった。これにより、近赤外発光分子のような放射・無輻射過程が競合する系に対しても、発光波長だけでなく寿命や量子収率を同時に最適化するための *in silico* 設計指針を与える計算基盤が整備されつつある。今後は、機械学習的な分子生成モデルや実験データとの連成解析と組み合わせることで、色素材料設計における理論駆動型探索の一層の加速と、真に新規な分子骨格の創出が期待される。

4. おわりに

本稿では、密度汎関数理論に基づく基礎的な励起状態計算から、状態遷移速度やエネルギー移動の理論評価、さらには光合成アンテナや近赤外発光分子を対象とした大規模シミュレーションまで、計算化学が色素分子研究にもたらしている知見を概観した。これらの例は、量子化学計算が単なるスペクトルの再現にとどまらず、無輻射失活過程の詳細な解析や電子カップリング・スピン軌道相互作用の定量化を通じて、光機能発現の分子設計指針を与える段階に達していることを示している。今後は、機械学習ポテンシャルや自動分子生成アルゴリズムとの連携、高度なダイナミクス計算法の普及により、より複雑な環境下での励起状態挙動を現実的なコストで追跡できるようになるだろう。計算化学に基づく励起状態解析は、実験ではアクセスが難しい情報を補充しつつ、新しい色素材料や光機能の開拓を先導する中核的な役割を担うと期待される。そのためには、計算結果の不確かさや理論の適用限界を意識しつつ、実験とのフィードバックを通じてモデルを高度化していく相乗性が重要である。本稿が、色素分子の励起状態を先端的計算化学の視点から捉え直し、新たな研究展開を構想する一助となれば幸いである。

[References]

- 1) F. Jensen 著, 後藤仁志ら監訳, 五十幡康弘ら共訳, 「計算化学 (第3版)」, 森北出版, 2023.
- 2) 常田貴夫, 武次徹也, 「密度汎関数法による量子化学計算」, 講談社, 2025.
- 3) Gaussian 16, Gaussian, Inc.
- 4) T. Yanai et al., *Chem. Phys. Lett.*, **2004**, 393, 51-57.
- 5) Z. Shuai, *Chin. J. Chem.*, **2020**, 38, 1223-1232.
- 6) H. Uoyama et al., *Nature*, **2012**, 492, 234-238.
- 7) N. Inai et al., *J. Phys. Chem. A*, **2021**, 125, 559-569.
- 8) A. Nomoto et al., *J. Phys. Chem. A*, **2022**, 126, 497-505.
- 9) K. J. Fujimoto et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **2024**, 146, 3984-3991.
- 10) K. J. Fujimoto et al., *ACS Phys. Chem Au*, **2024**, 4, 499-509.
- 11) K. J. Fujimoto et al., *J. Phys. Chem. Lett.*, **2025**, 16, 11884-11892.
- 12) K. J. Fujimoto, *J. Chem. Phys.*, **2014**, 141, 214105.
- 13) Y. Matano, H. Imahori, *Org. Biomol. Chem.*, **2009**, 7, 1258-1271.
- 14) A. Fukazawa et al., *C. R. Chim.*, **2010**, 13, 1082-1090.
- 15) N. Inai et al., *ACS Phys. Chem Au*, **2023**, 3, 540-552.
- 16) I. Hattori et al., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2024**, 63, e202403829.
- 17) M. Hagai et al., *Sci. Adv.*, **2024**, 10, eadk3219.
- 18) M. Hagai et al., *J. Chem. Theory Comput.*, **2025**, 21, 11604-11619.

[著者プロフィール]

氏名: 柳井 毅 (Takeshi Yanai)
 所属: 名古屋大学 トランスフォーマティブ生命分子研究所
 〒464-8601
 愛知県名古屋市千種区不老町
 E-mail: yanait@chem.nagoya-u.ac.jp
 出身学校: 東京大学大学院
 学位: 博士 (工学)
 専門分野: 量子化学・計算化学
 現在の研究テーマ: 量子化学計算基盤の高度化と応用

氏名: 藤本 和宏 (Kazuhiro J. Fujimoto)
 所属: 名古屋大学 トランスフォーマティブ生命分子研究所
 〒464-8601
 愛知県名古屋市千種区不老町
 E-mail: fujimotok@chem.nagoya-u.ac.jp
 出身学校: 京都大学大学院
 学位: 博士 (工学)
 専門分野: 理論化学
 現在の研究テーマ: 生命に潜む量子現象の解明、インシリコスクリーニングによる分子設計

氏名: 稲井 直人 (Naoto Inai)
 所属: 名古屋大学大学院 理学研究科 理学専攻
 〒464-8602
 愛知県名古屋市千種区不老町
 E-mail: inai.naoto.f1@f.mail.nagoya-u.ac.jp
 出身学校: 名古屋大学大学院
 学位: 博士 (理学)
 専門分野: 量子化学
 現在の研究テーマ: 有機色素分子の電子励起状態

同仁化学研究所公式アプリのご案内

同仁化学研究所の公式アプリをリリースしました!

研究者の皆さまの実験成功をサポートするため、小社では製品開発や技術コンテンツの作成に取り組んでいます。このたび、便利に楽しく情報をご利用いただけるよう、公式アプリをリリースしました。日頃から小社製品をご愛用いただいている方はもちろん、実験に関するお困りごとや新しい研究テーマの情報収集にも、ぜひ本アプリをご活用ください。



お役立ち 学術情報メールのご案内



製品に関する情報や Science Note と題して学術情報をメールにて配信しております。

最新の論文情報と論文で使用された製品を定期で配信しています (月2回程度)

- ・論文の要旨
- ・論文の注目ポイント
- ・研究に関連する製品の案内



バックナンバー。お申込みはこちらのQRもしくは検索で。

Science Note 同仁

検索



Topics on Chemistry

細胞機能解析における「Click-to-Release」反応の可能性

株式会社同仁化学研究所 吉村 建司

生きた細胞内で特定の分子や反応を時空間的に制御することは、生命現象の理解や創薬研究において重要な課題である。しかし、細胞内環境は極めて複雑であり、通常の化学反応をそのまま適用すると、生体分子との非特異的な副反応や細胞機能の錯乱を引き起こす恐れがある。これらの問題を克服する概念として「生体直交化学 (bioorthogonal chemistry)」が提唱され、生体分子と干渉しない選択的反応の開発が進められてきた^{1), 2), 3)}。

この分野の発展を支えてきた代表的手法が「クリックケミストリー (click chemistry)」である⁴⁾。Sharpless らにより提唱された本概念は、高効率・高選択性・操作の簡便性を特徴とする反応群を指し、主として分子間の共有結合形成を目的として利用されてきた。近年、このクリックケミストリーの概念は「結合」から「切り離し」へと拡張され、「click-to-release」反応として新たな展開を見せている⁵⁾。この反応は、「クリックケミストリー」を化学的トリガーとして利用し、標的分子の放出・活性化の時空間的な制御を可能にしており(図1)、近年、抗体-薬物複合体(ADC)やプロドラッグ設計などのドラッグデリバリー分野への広がりを示している^{6), 7)}。そこで本稿では、「click-to-release」反応を利用した細胞機能解析への応用例について紹介する。

樹状細胞(DCs)は、CD1d 受容体を介して外因性糖脂質抗原を提示し、不変型ナチュラルキラーT細胞(iNKT細胞)を活性化する。また、DCsはMHC-I分子を介して外因性ペプチド抗原を交差提示し、CD8⁺T細胞を活性化する。これら外因性抗原はエンドサイトーシスによってDCs内に取り込まれるものの、取り込み後に抗原提示へ至る過程でリソソームをどの程度経由するのかについては長らく明らかでなかった。この問題を解決するために、Lighthart らは「click-to-release」反応を利用して、外因性の糖脂質抗原およびペプチド抗原が抗原提示の過程でリソソームを通過するか否かを検証した⁸⁾。

著者らはまず、リソソームに選択的に集積するテトラジン誘導体を新たに設計した(図2, A)。このテトラジン誘導体のリソソーム集積性を確認するため、蛍光色素を導入した *trans*-cyclooctene (TCO) 誘導体を作成した(図2, B)。この誘導体は、放出分子として消光基が導入されており、この分子自体は無蛍光であるが、テトラジンと反応すると消光基が脱離し、蛍光を発するプローブである。あらかじめリソソーム集積性のテトラジン誘導体を添加した細胞に、この TCO 誘導体を導入したところ、リソソームに蛍光が観察された。この結果は、開発したテトラジン誘導体が細胞内のリソソームに選択的に集積し、リソソーム内で TCO 誘導体と「click-to-release」反応を惹起できることを示している(図2)。

その後、著者らは糖脂質抗原またはペプチド抗原を放出分子として結合させた TCO 誘導体を作製した。この抗原-TCO 誘導体

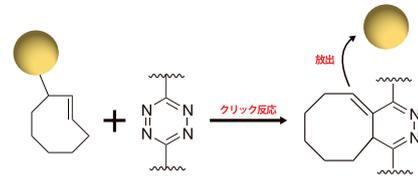


図1 「click-to-release」反応の模式図

は、TCO が結合した状態では DCs によって抗原提示されず、それぞれ iNKT 細胞や CD8⁺T 細胞を活性化しないことが確認されている。これらの抗原-TCO 誘導体を、リソソーム集積性テトラジン誘導体を導入した細胞に添加したところ、糖脂質抗原においては iNKT 細胞の活性化が観察されたが、ペプチド抗原では CD8⁺T 細胞の活性化は観察されなかった。これらの結果は、糖脂質抗原は抗原提示過程でリソソームを通過する一方、ペプチド抗原はリソソームを経由しないことを示している(図3)。

本稿で取り上げた研究は、リソソームを標的とした「click-to-release」反応設計により、DCs における外因性抗原処理経路について、リソソームをどの程度経由するのかを解明した。このように特定の細胞小器官に「click-to-release」反応を適用する技術は、より複雑な細胞機能の解析を進展させる新しい手法として、今後さらなる応用と発展が期待される。

[参考文献]

- 1) E. M. Sletten *et al.*, "Bioorthogonal Chemistry: Fishing for Selectivity in a Sea of Functionality", *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2009**, 48(38), 6974-6998.
- 2) C. R. Bertozzi, "A Decade of Bioorthogonal Chemistry", *Acc. Chem. Res.*, **2011**, 44(9), 651-653.
- 3) R. Chaudhuri *et al.*, "Bioorthogonal Chemistry in Translational Research: Advances and Opportunities", *Chem. Bio. Chem.*, **2023**, 24(23), e202300474.
- 4) H. C. Kolb *et al.*, "Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions", *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2001**, 40(11), 2004-2021.
- 5) R. M. Versteegen *et al.*, "Click to Release: Instantaneous Doxorubicin Elimination upon Tetrazine Ligation", *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2013**, 52(52), 14112-14116.
- 6) R. Rossin *et al.*, "Chemically triggered drug release from an antibody-drug conjugate leads to potent antitumour activity in mice", *Nat. Commun.*, **2018**, 9(1484).
- 7) J. M. Mejia Oneto *et al.*, "In Vivo Bioorthogonal Chemistry Enables Local Hydrogel and Systemic Pro-Drug To Treat Soft Tissue Sarcoma", *ACS Cent. Sci.*, **2016**, 2(7), 476-482.
- 8) S. T. Lighthart *et al.*, "A Lysosome-Targeted Tetrazine for Organelle-Specific Click-to-Release Chemistry in Antigen-Presenting Cells", *J. Am. Chem. Soc.*, **2023**, 145(23), 12630-12640.

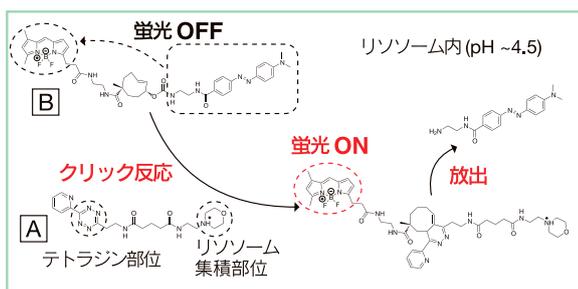


図2 リソソーム集積性テトラジン誘導体の評価

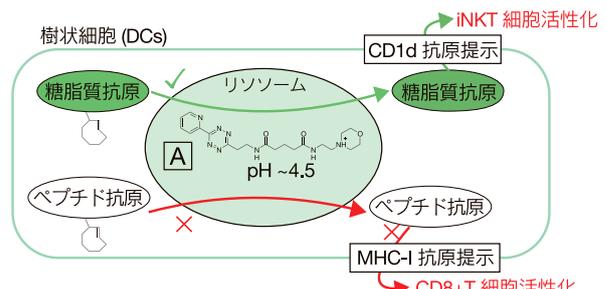


図3 樹状細胞の外因性抗原処理経路

N- オキシド化学に基づく二価鉄蛍光プローブの開発

Development of N-oxide chemistry-based ferrous ion fluorescent probes



平山 祐

岐阜薬科大学
創薬化学大講座
ケミカルバイオロジー研究室
教授

Abstract

Iron is vital yet toxic in excess, triggering ferroptosis via reactive oxygen species generation¹⁾. To visualize labile Fe²⁺ dynamics, we developed reaction-based turn-on fluorescent probes utilizing N-oxide chemistry, where Fe²⁺ selectively reduces a non-fluorescent N-oxide moiety. The N-oxide chemistry, initiated with RhoNox-1, was expanded to target specific organelles, revealing significant Fe²⁺ accumulation in the endoplasmic reticulum (ER) and lysosomes during ferroptosis. We also established the highly sensitive probe RhoNox-4 (FerroOrange), which has enabled high-throughput screening for iron-modulating compounds. Notably, because the N-oxides selectively oxidize Fe²⁺ to Fe³⁺, probes localizing to the ER and lysosomes were found to effectively inhibit ferroptosis, highlighting their utility as both imaging tools and biological modulators.

1. はじめに

鉄はほぼすべての生命体にとって必須の元素であり、ヒトにおいては最も多く存在する遷移金属元素である。酸素運搬やエネルギー産生など、必須の役割を担いつつも、過剰な鉄イオンは、酸化ストレスをもたらすことから、その濃度は厳密に制御されている¹⁾(図1)。そのため、鉄代謝異常は多くの重度疾患との関連が報告されており²⁾、さらに2012年には鉄依存性の細胞死(フェロトーシス)といった、鉄が起点となる細胞死が報告されている³⁾。二価鉄は、フェントン反応: Fe(II) + H₂O₂ (or L-OOH, Lは脂質) → Fe(III) + HO• (L-O•) + HO⁻により、非常に高反応性のヒドロキシルラジカルや脂質ラジカルを生成することが知られており、本反応が酸化ストレスにおける細胞傷害の根源となっている⁴⁾(図1)。また、細胞内における鉄イオン輸送は二価鉄の状態で行われており、生細胞中において二価鉄を検出することは、細胞内鉄代謝だけでなく、酸化ストレスの理解を深める上でも重要な課題の一つであった。本稿では、筆者らが開発してきた二価鉄検出用蛍光プローブについて、その原理と応用例について紹介する。

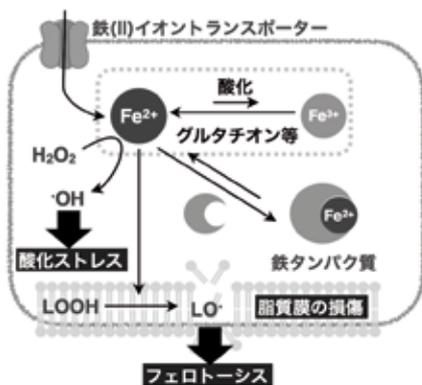


図1. 細胞内鉄動態の概要

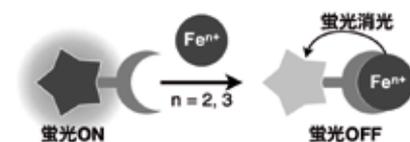
ヒト細胞では鉄トランスポーターや鉄シャペロンタンパク質は二価鉄を認識する。また、細胞内が還元的环境であることから輸送の中心は二価鉄である。同時に、フェントン反応により酸化ストレスを生じさせるのも二価鉄である。

2. N- オキシド化学を使った各種二価鉄蛍光プローブ

2.1 初の蛍光増大型二価鉄蛍光プローブ RhoNox-1

鉄イオンが強力な蛍光消光作用を持つことから、キレート効果に基づく蛍光プローブでは、蛍光応答様式が消光型となることを避けられない⁵⁾(図2.1)。そこで化学反応を使った分子設計を採用することにした。化学反応型の蛍光プローブは、活性酸素種等、反応性の生体内化学種の検出によく使われている(図2.2)が、金属イオンとの化学反応を使用した蛍光プローブは当時まだ限定的であった⁵⁾。満たすべき要件は①二価鉄選択的に進行する反応であること、②蛍光が増大するものであること、③細胞内環境(水溶液中)で反応が起こることの3つである。鉄を使った化学反応自体は無数に存在するものの、上記の3要件を満たすものとなると限られてくる。筆者は、第三級アミンN-オキシド(以下、N-オキシド)という化合物群が、鉄により還元的に三級アミンに変換される反応が、水溶液中でも進行することに着目し、これを蛍光団(ローダミンB)に組み込んだ化合物 RhoNox-1 を合成

2.1 キレート型プローブ



2.2 化学反応型プローブ

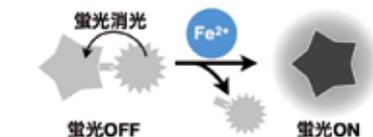


図2. 鉄イオン蛍光プローブの概要

2.1 キレート型蛍光プローブは鉄イオンとキレートを形成することで蛍光がOFFになる。例として Calcein や PhenGreen-SK がある。

2.2 化学反応型プローブでは、蛍光がOFFになるように反応基を導入し、それが二価鉄と反応することにより除去され、蛍光がONになる。

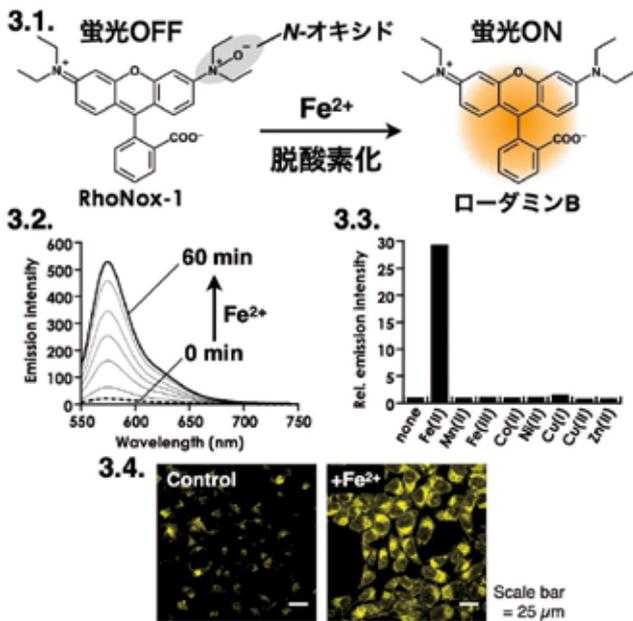


図3. N-オキシド化学を使った蛍光増大型二価鉄蛍光プローブ RhoNox-1

- 3-1. RhoNox-1 の構造と作用機序。二価鉄により N-オキシド部が脱酸素化を受け、蛍光が ON になる。
- 3-2. RhoNox-1 に二価鉄を添加した際の蛍光スペクトル変化。励起波長：540 nm。
- 3-3. RhoNox-1 の金属イオン選択性試験。二価鉄を加えた際のみ蛍光強度が増大する。
- 3-4. RhoNox-1 を使った生細胞二価鉄イメージングの例。

した (図 3.1)。RhoNox-1 は、水溶液中にて二価鉄選択的に蛍光強度の増大を示し (図 3.2、3.3)、また、生細胞イメージングにおいても二価鉄に反応することがわかった (図 3.4)。本化合物は、世界初の二価鉄選択的かつ蛍光増大型の蛍光プローブとして報告した⁶⁾。

2.2 N-オキシド化学の展開：多色化と多機能化

ローダミン B の蛍光性は、窒素原子上の孤立電子対が非局在化した π 共役系によりもたらされる。N-オキシド化によりこの非局在化が阻害されると、蛍光強度が減弱し、二価鉄により脱酸素化が起こると蛍光が回復するという仕組みになっている。このことから、RhoNox-1 の蛍光 OFF/ON 原理は類似の性質を持つキサンテン系色素やアミノクマリン系蛍光色素にも拡張できる。筆者らは、ローダミン B 同様に、窒素原子を含む π 共役系を持つクマリン、ロドール、ケイ素ローダミンを N-オキシド化した化合物を合成し (それぞれ、CoNox-1、FluNox-1、および SiRhoNox-1) (図 4.1)、二価鉄への蛍光応答を確認したところ、これらプローブ群はすべて、水溶液中、生細胞いずれにおいても二価鉄に対して蛍光増大を示した (図 4.2)。この中で SiRhoNox-1 が深赤色蛍光での観察が可能であることを利用して、スフェロイド中心部では低酸素状態により二価鉄濃度が上昇していることを明らかにした⁷⁾ (図 4.3)。

筆者らはさらなる多機能化の例として、細胞内小器官局在化について検討した。現在、ターゲティングに成功している小器官は、ミトコンドリア⁸⁾、リソソーム⁹⁾、小胞体⁷⁾、ゴルジ体¹⁰⁾、および細胞膜¹¹⁾である (図 5)。このうち、ミトコンドリア、リソソーム、小胞体を標的とした蛍光プローブ (それぞれ、Mito-FluNox、Lyso-RhoNox、SiRhoNox-1) は、蛍光応答性が同レベルであり、かつ、励起・蛍光波長が互いに異なることから、蛍光顕微鏡観察にて同時に使用することができ、上記 3 つの蛍光プローブカクテルを使った同時多色イメージングにて各小器官での

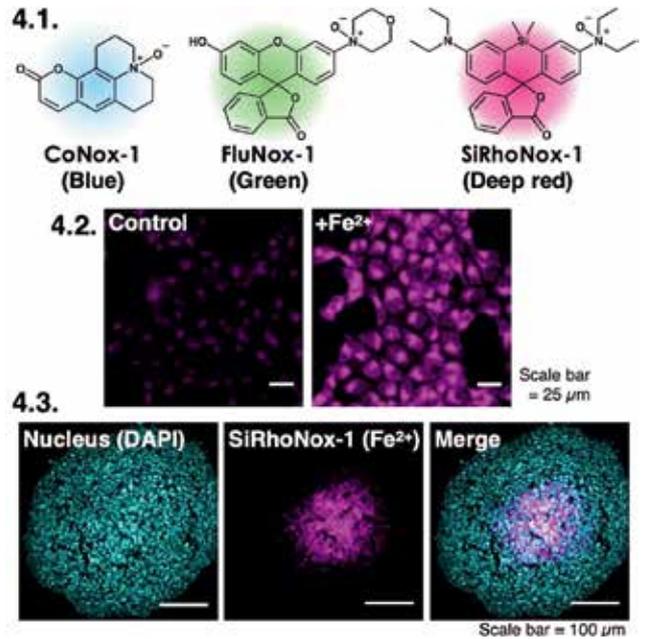


図4. N-オキシド型二価鉄蛍光プローブの多色化

- 4-1. 青色、緑色、深赤色二価鉄蛍光プローブの構造と励起・蛍光波長。これらプローブは RhoNox-1 と同等かそれ以上の蛍光応答を示す。
- 4-2. SiRhoNox-1 を使った生細胞二価鉄イメージングの実例。
- 4-3. スフェロイド培養した HepG2 細胞の二価鉄蛍光イメージング。一定の大きさ以上のスフェロイドでは中心部が低酸素状態になっていることが知られている。酸素濃度の低い部位にて二価鉄濃度が上昇していることが分かった。

二価鉄検出に成功している¹²⁾。フェロトキシ (鉄依存的細胞死) においては、二価鉄量が増加することは、他のグループから報告されていたものの、小器官レベルでの二価鉄動態は不明であった。そこで、本イメージング法をフェロトキシへと応用したところ、リソソーム、小胞体にて二価鉄が増加していることが明らかになった¹²⁾ (図 6)。フェロトキシでは脂質過酸化・損傷が細胞死に重要なプロセスであるが、他のグループからも小胞体¹³⁾およびリソソーム¹⁴⁾において脂質過酸化が進行していることが報告され、筆者らの観察結果と良く一致しており、現在はこれらの小器官がフェロトキシにおける過酸化脂質発生のあることが示唆されている。

これまでの蛍光プローブと少し異なる性能を示すのが膜局在型二価鉄蛍光プローブ Mem-RhoNox である¹¹⁾。本プローブは、膜アンカリングのためのパルミトイル基が、ローダミン-N-オキシド構造の両端に導入されている (図 5)。アスパラギン酸を間に挟むことで膜透過による細胞内移行を防ぎ、二価鉄検出部位が細胞膜の外側を向くように設計してある (図 7.1)。本化合物は、トランスフェリンによる鉄取り込みをリアルタイムで可視化すること、および、同鉄取り込み過程において、エンドソーム内で二価鉄が二価鉄に還元されることを明らかにするべく、設計・開発した。プローブで処理した HepG2 細胞 (ヒト肝がん細胞) にトランスフェリンを処理したところ、直後 5 分以内に蛍光性の輝点が徐々に出現した (図 7.2)。本現象はエンドサイトーシスの阻害薬 (アジ化ナトリウム)、エンドソーム酸性化阻害薬 (塩化アンモニウム)、鉄キレート剤 (デフェロキサミン、DFO) で抑制され、さらに、マンガントランスフェリン (三価鉄の代わりに二価マンガンが結合したもの) では蛍光シグナルの上昇は確認されなかったことから、トランスフェリンによる鉄取り込み時には、エンドソーム内での還元反応により二価鉄が生成することを明らかにすることができた。さらに、本プローブを初代培養神経細胞に応用し、同様にトランスフェリンを使ったイメージングか

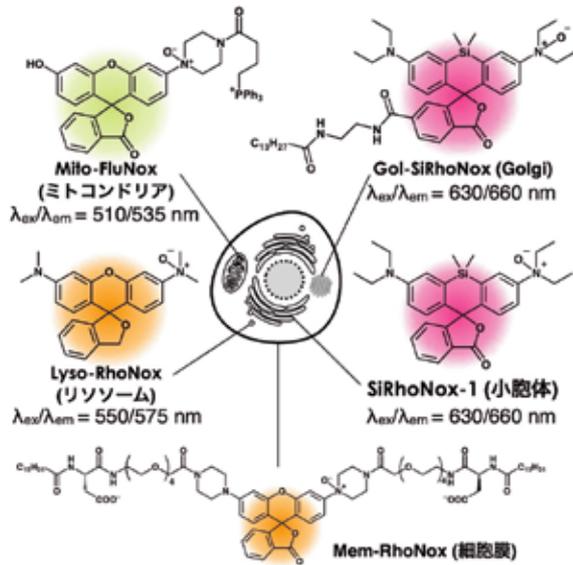


図5. 小器官局在型二価鉄蛍光プローブ

ミトコンドリア、ゴルジ体、リソソーム、小胞体、および細胞膜局在型蛍光プローブの構造と励起・蛍光波長。

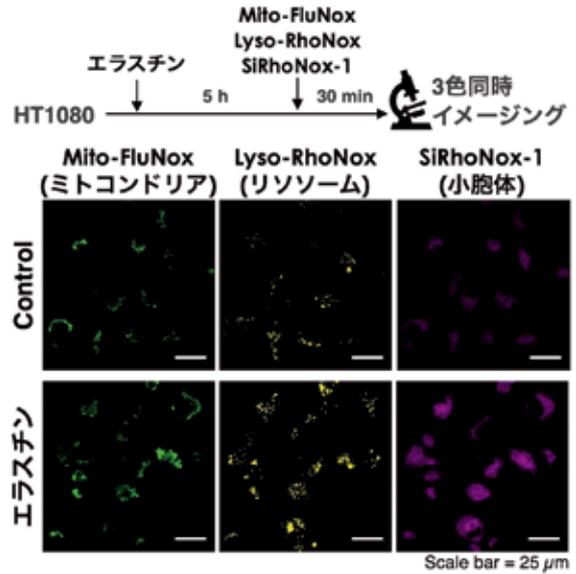


図6. フェロトーシスにおける各小器官の二価鉄蛍光イメージング

エラスチンによりフェロトーシスを誘導し、Mito-FluNox (ミトコンドリア)、Lyso-RhoNox (リソソーム)、SiRhoNox-1 (小胞体) を同時に使用し、三色同時に二価鉄イメージングを実施した。

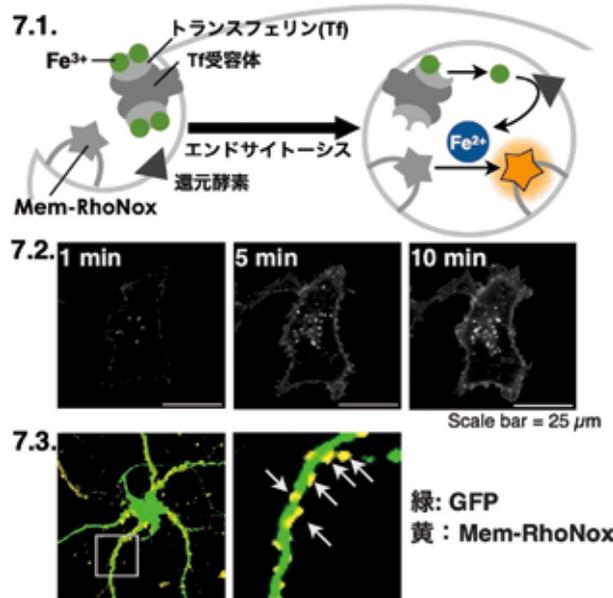


図7. 膜局在型二価鉄蛍光プローブによる鉄取り込みイメージング

7-1. トランスフェリン (Tf) による鉄取り込み経路と、Mem-RhoNox の作用機序。プローブがエンドサイトーシスにより Tf と同時に取り込まれ、エンドソーム内で生じる二価鉄と反応して蛍光を示す。

7-2. HepG2 細胞に Mem-RhoNox を作用させ、Tf を加えた際のタイムラプスイメージング。5 分後には細胞内に輝点が多く発生している様子がわかる。

7-3. マウス初代培養神経細胞に Mem-RhoNox を作用させ、Tf を加えた 30 分後のイメージング画像。左：神経細胞一細胞。右：左画像の四角部を拡大したもの。神経細胞の細胞室は緑色蛍光タンパク質 (GFP) にて染色 (緑色)。プローブのシグナルは黄色にて描画。神経突起に沿って輝点が確認される (矢印)。

ら、神経細胞ではスパイン様の構造体において鉄取り込みが亢進していることが示唆された (図 7.3)。

2.3. 超高感度二価鉄蛍光プローブ RhoNox-4 の開発

RhoNox-1 はプロトタイプとしては十分な性能を発揮していたものの、その蛍光応答性、特に細胞イメージングにおける応答性には改善の余地があった。そこで、多機能化と同時に、高感度化にも取り組んだ。N-オキシド化学の拡張について検討している際、環状アミン構造を持つローダミン系色素の N-オキシド化体

が、比較的蛍光応答性が良くなる傾向を見出していった。そこで、様々な環状アミン N-オキシド構造を有する誘導體群 (RhoNox-2 ~ RhoNox-8) を合成 (図 8.1) し、これらの二価鉄応答性を水溶液中および生細胞にて評価した。すべての環状アミン型プローブは RhoNox-1 (鎖状アミン型) に比較して反応速度、蛍光強度増大比ともに向上したが、特に RhoNox-4、RhoNox-7、及び RhoNox-8 が 15 分以内に 100 倍を超える蛍光強度の上昇を示し、これらが有用な候補化合物となった。生細胞イメージングに応用したところ、RhoNox-4 が他を圧倒的に凌駕する蛍光応答を示し

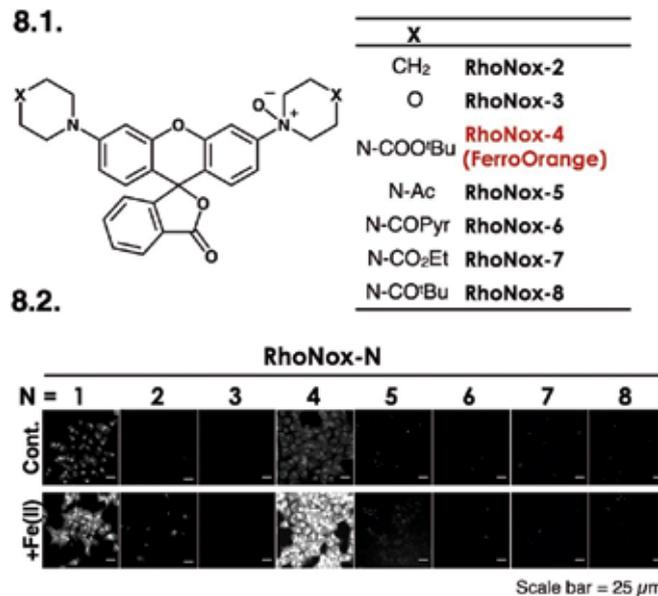


図 8. 高感度二価鉄蛍光プローブ

8-1. 高感度化に向けた構造活性相関と各プローブの構造。
8-2. 各プローブを使った生細胞二価鉄イメージングの結果。RhoNox-4 が圧倒的に良好な応答を示した。

た¹⁵⁾ (図 8.2)。RhoNox-4 を使った二価鉄イメージングは条件検討がほぼ不要なレベルであり、その鋭敏かつ堅実な応答性を利用し、筆者らは、かねてより検討していた、「鉄摂動化合物」探索のためのハイスループットスクリーニング (HTS) を実施した。東京大学創薬機構より供与いただいた 3399 化合物について、3 回のスクリーニング・対照実験を繰り返した結果、lomofungin を見出した。まだ作用機序解析の途中であるが、lomofungin の処理により細胞内のフェリチン量が減少することがわかっており、鉄貯蔵タンパク質であるフェリチンの分解が促進されることにより、遊離の二価鉄が上昇したものと考えられる。この超高感度二価鉄蛍光プローブ RhoNox-4 は、FerroOrange という名称にて同仁化学より販売されており、フェロトリス研究の隆盛もあいまって、これまでに 2000 報を超える研究論文に貢献している (2025 年 11 月、Google Scholar 調べ)。

2.4 N-オキシド型蛍光プローブのフェロトリス阻害作用

N-オキシド化学を使った蛍光プローブは、「化学反応型」であるが、二価鉄による脱酸素過反応では、プローブ側から酸素原子が除去されるため、還元されることになる。このことから、二価鉄側は酸化されていると予想される。そこで、鉄イオンの酸化状態を決定すべく、X-ray absorption near edge structure (XANES) スペクトルを測定したところ、予想通り、N-オキシドとの反応後、二価鉄は三価鉄に酸化されていることがわかった¹⁶⁾。フェロトリスにおいては、過酸化脂質と二価鉄の反応により、ラジカル連鎖反応が進行することが、最終的な細胞死のトリガーとなる (図 9.1)。N-オキシド型蛍光プローブの二価鉄選択性の高さを考慮すると、これらプローブ群は、細胞内において二価鉄を三価鉄へと変換できる可能性がある。実際、九州大学の池田らは、Mito-FerroGreen (Ac-Mito-FluNox) が、ドキシソルピシンにより誘発されるミトコンドリア傷害型のフェロトリスを阻害する効果があることを報告していた¹⁷⁾。そこで筆者らは、これまで開発してきた一連の N-オキシド型蛍光プローブについて、フェロトリス阻害性を評価した。エラスチンにてフェロトリスを誘導し、各プローブの濃度を変えて共存させたところ、RhoNox-1、SiRhoNox-1、RhoNox-4、および Lyso-RhoNox が、

1 μM 前後の IC₅₀ 値にてフェロトリスを阻害することがわかった (図 9.2)。これは、鉄キレート薬デフェロキサミン (DFO) による阻害効果と同等、あるいはやや強い効果であった。エラスチンはシスチントランスポーター (System Xc⁻) を阻害することでフェロトリスを誘導するが、作用点の異なるフェロトリス阻害薬 RSL-3 (グルタチオンペルオキシダーゼ 4、GPx4 阻害)、FIN56 (GPx4 阻害)、FINO₂ (二価鉄によるラジカル反応活性化) に対しても阻害効果を示した。一方で、スタウロsporin 等、アポトシス・ネクロシスの誘導時には全く効果がなく、フェロトリス選択的な阻害作用が確認された。さらに興味深いことに、Mito-FerroGreen や、H-FluNox (N-オキシドを使ったヘム蛍光プローブ)、Mem-RhoNox はフェロトリス阻害作用が無く、上述の 4 つと活性の差があることがわかった。RhoNox-1、SiRhoNox-1、RhoNox-4、および Lyso-RhoNox は、小胞体あるいはリソソームに局在が見られることが特徴であり、既出のとおり、小胞体とリソソームはフェロトリス誘導時において二価鉄の蓄積が見られた小器官である。また、既出のとおり、これらの小器官では脂質過酸化が亢進していることが報告されており、当該小器官への局在性を持つプローブ群が効果的であったことは、たいへん興味深い。また、N-オキシド化学とならんで、二価鉄蛍光プローブ開発に使用されるエンドパーオキシド化学は、FINO₂ で見られるようにフェロトリス誘導作用があることがわかっている^{17,18)}。両者とも二価鉄との反応性を有するものの、フェロトリスに対する効果が正反対である。現在、この活性の差についてはよくわかっていないが、細胞内の局在や反応する二価鉄の成分が異なるものと推察される。

3. おわりに

本稿では、筆者らが開発してきた二価鉄蛍光プローブとその応用について概説させていただいた。奇しくもフェロトリスの報告 (2012 年 5 月) と初の N-オキシド型二価鉄蛍光プローブ RhoNox-1 の報告 (2012 年 12 月) が同時期であったことは不思議な縁を感じる (筆者が一時的に感じているだけである)。また、今回紹介させていただいた蛍光プローブのうちいくつかは下記の名称にて市販されているので、容易に入手可能になっている

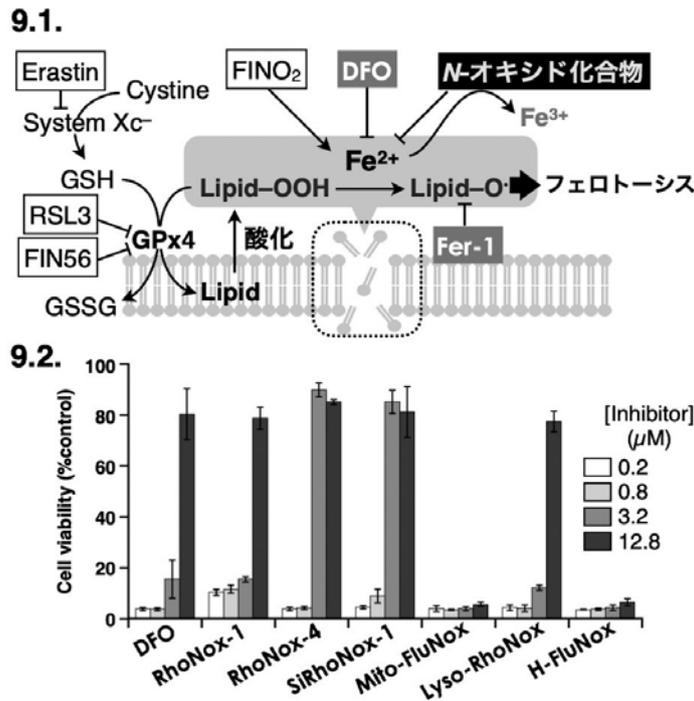


図9. N-オキド型蛍光プローブによるフェロトーシス阻害作用

9-1. 各種フェロトーシス誘導薬と作用機序。GSH：グルタチオン、GSSG：酸化型グルタチオン、GPx4：グルタチオンペルオキシダーゼ4、DFO：デフェロキサミン、Fer-1：Ferrostatin-1。黒文字+黒枠：フェロトーシス誘導薬。白文字化合物：フェロトーシス阻害薬
 9-2. 各 N-オキド化合物のフェロトーシス阻害作用。エラスチンと同時に各濃度のプローブを投与し、細胞生存率を測定したところ、RhoNox-1、RhoNox-4、SiRhoNox-1、Lyso-RhoNox にて阻害効果が見られた。

(RhoNox-4: FerroOrange、Mito-FluNox: Mito-FerroGreen、Lyso-RhoNox: Lyso-FerroRed、SiRhoNox-1: FerroFarRed)。現在は細胞レベルのイメージングが主流であるが、マウスをはじめとする個体への応用ができる新たなプローブ開発が進めば、フェロトーシスを含む鉄の関与する生命科学の理解がより深まると期待される。

最後に、本稿で紹介した筆者らの研究は、位田雅俊教授、保住功教授（岐阜薬科大学薬物治療学研究室）、王丹准教授（当時、京都大学 iCeMS）、野澤俊介准教授（高エネルギー加速器研究機構）との共同研究の成果であり、この場を借りて深く感謝申し上げます。

[著者プロフィール]

氏名：平山 祐 (Tasuku Hirayama)
 所属：岐阜薬科大学 創薬化学大講座 ケミカルバイオロジー研究室
 〒501-1196
 岐阜市大学西 1-25-4
 Tel: 058-230-8112
 E-mail: hirayamat@gifu-pu.ac.jp
 出身学校：京都大学大学院人間・環境学研究科
 学位：博士（人間・環境学）
 専門分野：ケミカルバイオロジー
 現在の研究テーマ：鉄のケミカルバイオロジー研究

[参考文献]

- 1) Y. Shiro *et al.*, "Iron in Biology: Molecular Structures, Cellular Processes and Living Systems", *Royal Society of Chemistry*, **2025**.
- 2) B. Galy *et al.*, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2024**, 25, 133-155.
- 3) S. J. Dixon *et al.*, *Cell*, **2012**, 149, 1060-1072.
- 4) B. R. Stockwell *et al.*, *Cell*, **2017**, 171, 273-285.
- 5) T. Hirayama, *Free Radic. Biol. Med.*, **2019**, 133, 38-45.
- 6) T. Hirayama *et al.*, *Chem. Sci.*, **2013**, 4, 1250-1256.
- 7) T. Hirayama *et al.*, *Chem. Sci.*, **2017**, 8, 4858-4866.
- 8) T. Hirayama *et al.*, *Metallomics*, **2018**, 10, 794-801.
- 9) M. Niwa *et al.*, *Org. Biomol. Chem.*, **2014**, 12, 6590-6597.
- 10) T. Hirayama *et al.*, *Chem. Sci.*, **2019**, 10, 1514-1521.
- 11) M. Niwa *et al.*, *ACS Chem. Biol.*, **2018**, 13, 1853-1861.
- 12) T. Hirayama *et al.*, *Metallomics*, **2019**, 11, 111-117.
- 13) A. N. von Krusenstiern *et al.*, *Nat. Chem. Biol.*, **2023**, 19, 719-730.
- 14) Y. Saimoto *et al.*, *Nat. Commun.*, **2025**, 16, 3554.
- 15) T. Hirayama *et al.*, *ACS Sens.*, **2020**, 5, 2950-2958.
- 16) T. Tadokoro *et al.*, *JCI Insight*, **2020**, 5, 132747.
- 17) M. M. Gaschler *et al.*, *Nat. Chem. Biol.*, **2018**, 14, 507-515.
- 18) Y.-C. Chen J. *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **2020**, 142, 19085-19093.

ウェビナーアーカイブ配信のご案内

2025年11月13日および20日に開催された「日米共催 Dojindo ウェビナー 2025 アーカイブ：フェロトーシス研究の最前線」のアーカイブ配信のご案内です。視聴期間は、2026年5月31日までとなっております。なお、視聴期間終了後は予告なく公開を終了する場合がございます。



<https://dojindo.co.jp/products/contents/ferroptosis-webinar-archive-2025-view.html>



関連製品

細胞内鉄イオン測定試薬

FerroOrange

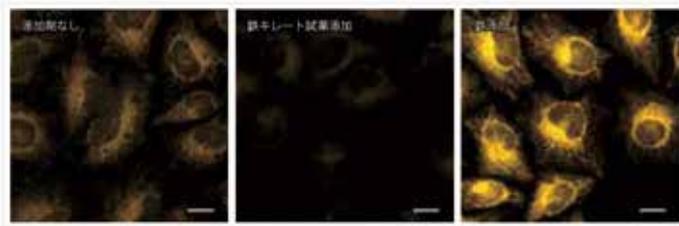
鉄は生体内で最も多く存在する遷移金属元素であり、様々な生理活性を示すことが報告されています。近年、タンパク質非結合型の鉄イオン（自由鉄）としての存在が注目されており、その高い反応性は細胞損傷や細胞死にも関与していることが示唆されています。生細胞内において、細胞内還元的環境、水溶性、トランスポーターの存在等を考慮すると鉄(III)イオン(Fe³⁺)よりも鉄(II)イオン(Fe²⁺)の挙動を知ることが重要であると考えられています。

本製品は、蛍光顕微鏡およびプレートリーダーにて細胞内の二価鉄を簡便に検出することができます。試薬を培養細胞に添加するだけで細胞膜を透過し、細胞内の Fe²⁺ と選択的に反応し強い蛍光を発します。(λ_{ex} = 543 nm、λ_{em} = 580 nm)

FerroOrange にはキレート能はありません。FerroOrange と Fe²⁺ は非可逆的に反応するため、Fluo 3 のようなカルシウムイオンブロープの検出原理とは異なります。

<蛍光顕微鏡によるイメージング例>

HeLa 細胞を用いて、細胞内に内在する Fe²⁺ および鉄キレート試薬 Bpy (2,2'-Bipyridine、終濃度：100 μmol/l) と鉄（硫酸アンモニウム鉄(II)、終濃度：100 μmol/l) の添加有無により、細胞内の Fe²⁺ の変化を FerroOrange により確認した。鉄キレート試薬を添加することで無刺激の細胞に比べ蛍光強度が低下したことから、細胞内には内在性の Fe²⁺ が存在することが確認できた。



<検出条件>
Ex = 561 nm、Em = 570-620 nm
スケールバー：20 μm

※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。

関連製品

ミトコンドリア内鉄検出蛍光試薬

Mito-FerroGreen

Mito-FerroGreen は、FeS クラスターやヘム合成の場として知られるミトコンドリア内の鉄(II)イオン(Fe²⁺)と選択的に反応し強い蛍光 (λ_{ex} = 505 nm、λ_{em} = 535 nm) を発する試薬であり、細胞内鉄(II)イオンのライブセルイメージングに利用することが可能です。

Mito-FerroGreen にはキレート能はありません。Mito-FerroGreen と Fe²⁺ は非可逆的に反応するため、Fluo 3 のようなカルシウムイオンブロープの検出原理とは異なります。

<蛍光顕微鏡によるイメージング例>

HeLa 細胞を用い、ミトコンドリア内に内在する Fe²⁺ および鉄キレート試薬 DFO (Deferoxamine, 10 mmol/l) と鉄 (100 μmol/l 硫酸アンモニウム鉄(II)) の添加有無により、ミトコンドリア内の Fe²⁺ の変化を 5 μmol/l Mito-FerroGreen により確認した。その結果、ミトコンドリア内に内在する鉄 (左図) は、鉄を添加した場合にはより強い蛍光 (中央図) が見られ、鉄キレート試薬と鉄を添加した細胞では、Mito-FerroGreen の蛍光 (右図) はほとんど見られなかった。



<検出条件>
Ex = 488 nm、Em = 500-565 nm

※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。

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
FerroOrange	1 tube ^{※1}	18,100	F374
	3 tubes	40,800	
Mito-FerroGreen	50 μg × 2 ^{※2}	32,000	M489

<使用回数目安> ※1) 1 tube あたり、μ-Slide 8 well 20 枚 ※2) 50 μg あたり、μ-Slide 8 well 6 枚

関連製品

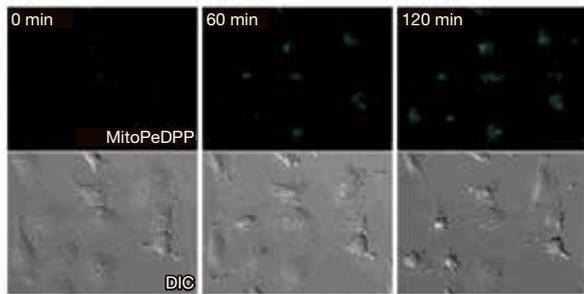
ミトコンドリア脂溶性過酸化検出試薬

MitoPeDPP

MitoPeDPP は、細胞膜を透過してミトコンドリアに集積し、膜中の脂溶性過酸化物によって特異的に酸化され蛍光を発生します。酸化体の励起および蛍光波長が長波長 ($\lambda_{ex} = 452 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 470 \text{ nm}$) であるため、測定試料への光によるダメージや試料由来の自家蛍光の影響を軽減できることから、蛍光顕微鏡を用いたミトコンドリアの脂溶性過酸化物のイメージングが可能です。

< Rotenone を用いた脂溶性過酸化物の検出例 >

HeLa 細胞に本製品を添加した後、Rotenone 溶液を加え、蛍光顕微鏡を用いて観察した。Rotenone 添加により細胞内に発生するミトコンドリアの脂溶性過酸化物を検出することを確認した。



写真：
 左) Rotenone 添加直後 上) 蛍光画像
 中) Rotenone 添加 90 分後 下) 位相差画像
 右) Rotenone 添加 180 分後

※本品は福岡大学理学部 塩路准教授らにより開発された製品です。

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
MitoPeDPP	5 μg \times 3	24,500	M466

< 使用回数の目安 > 5 μg あたり、96 well plate 1-5 枚、35mm dish 5-25 枚

関連製品

脂質過酸化検出試薬

Lipid Peroxidation Probe -BDP 581/591 C11-

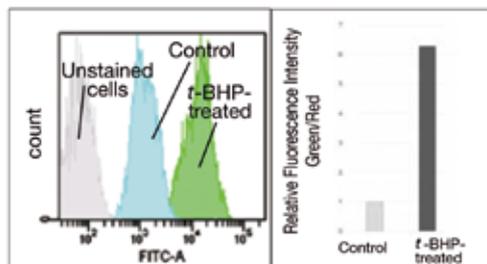
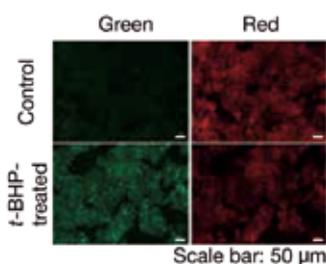
< 特長 >

- ・ 脂質過酸化を高感度に検出できる
- ・ 顕微鏡、マイクロプレートリーダー、フローサイトメーターで検出可能

本製品は、酸化前は常時赤色の蛍光を発生していますが、脂質周囲の ROS (Reactive Qxygen Species) によって酸化されることで、緑色の蛍光に変化します。赤色と緑色の 2 色の蛍光比率を算出することで、脂質の過酸化現象を高感度に検出することが可能です。また、プレートリーダーでの検出が可能であるため、蛍光の数値化やスクリーニングに適用が可能です。

< ささまざまな検出器で検出可能 >

HepG2 細胞を 200 $\mu\text{mol/l}$ *tert*-butyl hydroperoxide (*t*-BHP) で 2 時間処理後に本製品で脂質過酸化現象を検出した。その結果、顕微鏡、プレートリーダー、フローサイトメーターのいずれの検出器でも検出できることが分かった。



【落射型蛍光顕微鏡】
 Green: Ex = 450-490 nm Em = 500-550 nm
 Red: Ex = 540-580 nm Em = 593-667 nm
 【フローサイトメーター】
 FITC フィルター (Ex = 488 nm Em = 515-545 nm)
 【プレートリーダー】
 Green: Ex = 490 nm Em = 530 nm
 Red: Ex = 570 nm Em = 610 nm

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
Lipid Peroxidation Probe -BDP 581/591 C11-	200 tests	33,500	L267

関連製品

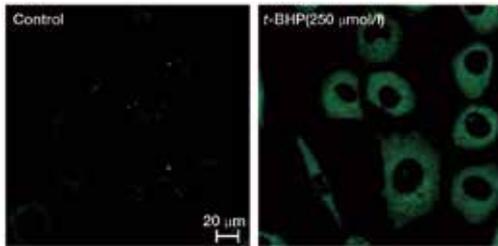
過酸化脂質検出蛍光試薬

Liperfluo

Liperfluo は、酸化体の励起および蛍光波長が長波長 ($\lambda_{ex} = 524 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 535 \text{ nm}$) であるため、測定試料への光によるダメージや試料由来の自家蛍光の影響を軽減できます。酸化体は水中ではほとんど蛍光性はありませんが、細胞膜等の脂溶性の高い部位では蛍光性となることから、蛍光顕微鏡による生細胞の過酸化脂質のイメージングやフローサイトメトリーによる細胞の過酸化脂質量の分析に使用することができます。また、Liperfluo は細胞死メカニズムの一つとして注目を集めるフェロトシス研究において、鉄依存性の脂質過酸化物の検出用蛍光プローブとして使用されています。

< L929 細胞用いた検出例 >

L929 細胞に本製品を含む新しい培地を添加 (終濃度: $1 \mu\text{mol/l}$) した ($37 \text{ }^\circ\text{C}$ 、30 分)。培地除去後、*t*-BHP (*tert*-Butylhydroperoxide) を含む新しい培地を添加 (終濃度: $250 \mu\text{mol/l}$) し、2 時間後に共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。



測定装置: Zeiss LSM510META
 フィルターセット:
 FITC (GFP, Alexa488) wide filter HFT UV/488,
 NFT490, BP505-550

生細胞を用いた過酸化脂質の共焦点顕微鏡イメージング
 データ提供: 北里大学薬学部 今井浩孝先生、熊谷剛先生

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
Liperfluo	1 set (50 μg \times 5)	27,200	L248

< 使用回数の目安 > 50 μg あたり、5-50 回 (保存不可)

関連製品

マロンジアルデヒド測定キット

MDA Assay Kit

< 特長 >

- ・細胞や組織中のマロンジアルデヒド量が測定可能 (蛍光/比色)
- ・試薬の秤量が不要なため溶液調製が簡便
- ・マイクロプレート測定に対応

MDA Assay Kit は、チオバルビツール酸 (TBA) とマロンジアルデヒド (MDA) の反応により生成する化合物の吸光度または蛍光を測定することで、試料中の MDA 濃度を定量できます。なお、本キットには測定過程における試料の酸化を防ぐために酸化防止剤が付属しています。

< 細胞や組織サンプルで測定可能 >

細胞を測定試料とする場合は、蛍光法で測定できます。組織を測定試料とする場合は、サンプル量や予想される MDA 含有量より測定方法 (蛍光法もしくは比色法) を選択できます。

	蛍光法	比色法	必要サンプル量	測定可能 MDA 濃度範囲
細胞	○	×	$1-3 \times 10^7 \text{ cells}$	$1-10 \mu\text{mol}$
組織	○	○	蛍光法: $10-30 \text{ mg}$ 比色法: $20-50 \text{ mg}$	蛍光法: $1-10 \mu\text{mol}$ 比色法: $1-50 \mu\text{mol}$

測定例や参考文献はこちらから

MDA 同仁 [検索](#)

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
MDA Assay Kit	100 tests	34,900	M496

関連製品

耐光性トータル ROS 検出キット

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

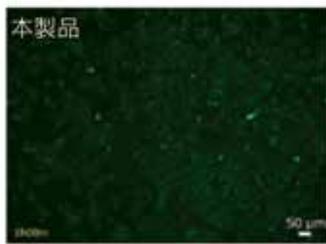
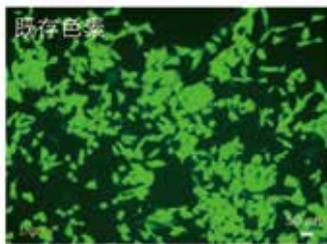
<特長>

- ・ 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

<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、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。



[タイムラプスイメージング動画]



<https://youtu.be/SME10sR3ZOs>

観測光連続照射の比較
(12 回照射後)

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	40,500	R253

<使用回数の目安> 96 well plate 1 枚

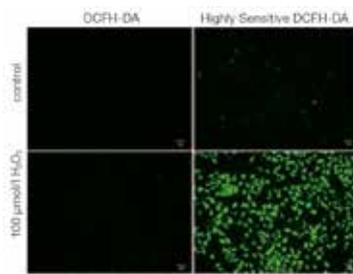
関連製品

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が高く、DCFH-DA と比較してより高感度に 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。

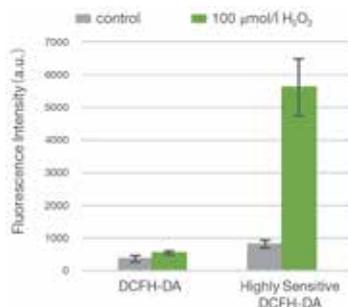
蛍光顕微鏡



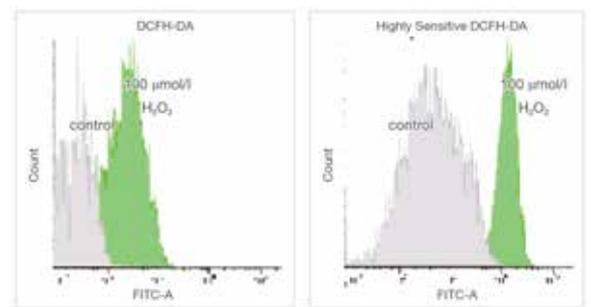
DCFH-DA との検出感度比較 (HeLa 細胞)
② Highly Sensitive DCFH-DA の検出感度比較

HeLa 細胞, 1×10^4 cells/well,
100 $\mu\text{mol/l}$ -H₂O₂/HBSS 添加後
37°C, 30 min. インキュベート
スケールバー: 50 μm

プレートリーダー



フローサイトメーター



<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	21,800	R252

<使用回数の目安> 96 well plate 1 枚

連載

生命科学の最前線 ～タイ王国研究者の現場から～ ③

小社が立地する熊本にある熊本大学とパートナーシップ協定を結んでいるタイの大学研究者によるライフサイエンス分野の連載(4回)をお届けします。

Targeting DNA Repair Mechanisms: Exploiting Acquired Vulnerabilities to Overcome Resistance in Cholangiocarcinoma



Donniphat Dejsuphong

Program in Translational Medicine,
Chakri Naruebodindra Medical Institute,
Faculty of Medicine Ramathibodi Hospital,
Mahidol University.



Rakkreat Wikiniyadhanee

Program in Translational Medicine,
Chakri Naruebodindra Medical Institute,
Faculty of Medicine Ramathibodi Hospital,
Mahidol University.



Tassanee Lerksuthirat

Research Center,
Faculty of Medicine Ramathibodi Hospital,
Mahidol University.



Sermsiri Chitphuk

Offices of Health Science Research,
Faculty of Medicine Ramathibodi Hospital,
Mahidol University.

Abstract

Current therapeutic strategies for Cholangiocarcinoma (CCA) are frequently constrained by the rapid onset of chemoresistance, rendering standard-of-care regimens like gemcitabine and cisplatin (GEM/CIS) ineffective over time. Recent advances in genomic profiling have revealed that CCA possesses a high frequency of alterations in DNA Damage Response (DDR) genes, providing a landscape for targeted intervention. This article explores the transition from traditional cytotoxic approaches to the strategic inhibition of DNA repair enzymes, such as PARP and ATR. We argue that the adaptive reprogramming of CCA cells during treatment creates specific acquired vulnerabilities — molecular dependencies that do not exist in drug-naïve cells. By mapping these resistance trajectories, our research demonstrates that combinations of PARP and ATR inhibitors can effectively exploit the genomic instability inherent in CCA. This approach transforms the challenge of drug resistance into a therapeutic opportunity, offering a blueprint for more durable and personalized clinical interventions.

The Crisis of Resistance in Cholangiocarcinoma

Cholangiocarcinoma (CCA) represents a heterogeneous group of malignancies arising from the biliary epithelia¹⁾. Despite its relatively low global incidence compared to other gastrointestinal cancers, its mortality rate remains alarmingly high, largely due to late-stage diagnosis and a lack of effective long-term therapies. For decades, the combination of gemcitabine and cisplatin (GEM/CIS) has remained the frontline standard; however, the median progression-free survival remains measured in months rather than years.

The primary obstacle to clinical success is the inherent and acquired resistance to DNA-damaging agents. CCA tumors often exhibit a “plastic” phenotype, allowing them to circumvent the DNA lesions induced by cisplatin through the upregulation of

bypass repair mechanisms. Recent large-scale genomic analyses have identified that approximately 20–30% of CCA cases harbor mutations or epigenetic silencing in DDR-related genes, including *BAP1*, *ARID1A*, and *PBRM1*^{2), 3)}. This genomic landscape suggests that CCA cells may be “prime” for a collapse in genomic integrity if their compensatory repair pathways are strategically blocked.

Mechanism of Targeting DNA Repair

The maintenance of genomic stability is governed by a complex, coordinated network of DNA repair pathways, collectively termed the DNA Damage Response (DDR). In malignant cells, these pathways are often co-opted or selectively inactivated, creating unique therapeutic vulnerabilities relatively

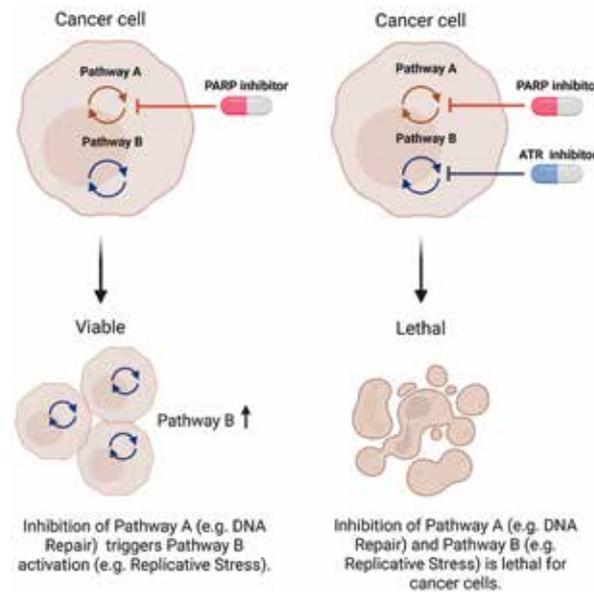


Figure 1: The concept of acquired vulnerability in DDR

Drug-naïve cells develop resistance to "Drug A" (e.g., a PARP inhibitor) by upregulating compensatory repair pathways or adaptive responses to replicative stress (e.g., the ATR/CHK1 axis). This adaptation creates a novel, targetable dependency for "Drug B" (an ATR inhibitor).

specific to cancer cells ⁴⁾.

- **PARP Inhibitors and the “Trapping” Phenomenon**

PARP1 is an essential enzyme for the detection and repair of single-strand breaks (SSBs) via the Base Excision Repair (BER) pathway. When PARP1 is inhibited, SSBs persist and are converted into lethal double-strand breaks (DSBs) during the S-phase of the cell cycle when they encounter replication forks ⁵⁾.

Modern PARP inhibitors (PARPi) such as olaparib, rucaparib, and talazoparib act not only through catalytic inhibition but also through “PARP trapping” ⁶⁾. This mechanism involves the stabilization of PARP-DNA complexes, which act as physical barriers to replication machinery. In cells with Homologous Recombination (HR) deficiency — such as those with *BRCA1/2* mutations — these DSBs cannot be repaired accurately, leading to “synthetic lethality.” Among clinical inhibitors, talazoparib is identified as a significantly more potent trapper, showing higher cytotoxic potency in various models.

- **The ATR/ATM Axis: Master Regulators of DDR**

While ATM (Ataxia-Telangiectasia Mutated) is the primary transducer for DSBs, ATR (Ataxia Telangiectasia and Rad3-related) is the apical kinase responding to replication stress and SSBs. In the context of cancer, ATR is often upregulated to protect the cell from the high levels of replication stress induced by oncogenes or exogenous DNA damage ^{7), 8)}.

- o **ATM Function:** ATM responds primarily to DSBs by phosphorylating targets like H2AX (creating γ H2AX) and recruiting high-fidelity repair machinery.
- o **ATR Function:** ATR stabilizes stalled replication forks, preventing their collapse into DSBs. By inhibiting ATR, we force the cell to continue through the cell cycle with damaged or incomplete DNA. This leads to “mitotic

catastrophe”, where the cell attempts to divide with fragmented chromosomes.

- **NHEJ Inhibitors: Modulating Error-Prone Repair**

Non-homologous end joining (NHEJ) is a predominant, yet error-prone, repair pathway for DSBs that operates throughout the cell cycle. Research using biosensors, such as 53BP1 fluorescent tagging, has identified compounds that modulate this pathway. By inhibiting NHEJ, we can sensitize tumors that have become reliant on this “quick-fix” pathway when their high-fidelity HR pathways are compromised or therapeutically blocked ⁹⁾.

Current Usage and Limitations in Clinical Practice

While DNA repair inhibitors have significantly advanced oncology, their application in solid tumors faces substantial hurdles that necessitate new combinatorial strategies.

- **Breast Cancer:** PARPi are approved for *BRCA*-mutated cases, but acquired resistance frequently emerges through “reversion mutations” that restore the *BRCA* reading frame or the restoration of HR activity via the loss of end-resection antagonists ^{10), 11)}.
- **Pancreatic Cancer:** Despite clinical benefits in *BRCA*-mutated metastatic cases, the aggressive nature of the disease and the dense stroma often lead to the rapid bypass of repair protein dependency ¹²⁾.
- **Prostate Cancer:** While effective in metastatic castration-resistant models (mCRPC) harboring DDR mutations, tumor heterogeneity necessitates the identification of robust biomarkers beyond simple mutation status to predict long-term responses ¹³⁾.

The Concept of Acquired Vulnerability in DNA Repair

Rather than focusing solely on primary oncogenic drivers, we

investigate “acquired vulnerability”. When CCA cells are exposed to primary therapeutic agents, they undergo molecular reprogramming to facilitate survival ¹⁴. In doing so, they manifest a fundamental biological trade-off by developing new weaknesses — specifically, a heightened dependency on alternative DNA repair pathways or stress response axes ¹⁵.

Finding the Right Combination: PARP + ATR Inhibition

A key insight from our research is that exploiting these vulnerabilities is most effective when secondary treatments are combined with primary therapy to induce a concerted multifaceted disruption of the cancer cell’s genomic integrity ^{10, 16-18}.

Synergy of PARP and ATR Inhibitors

Our laboratory has demonstrated that the combination of PARP and ATR inhibitors (e.g., olaparib and AZD6738) provides a powerful synergistic effect. In CCA cell lines and TK6 models, we observed that ATR inhibition prevents the compensatory survival mechanisms that cells use to bypass PARP inhibition ^{19, 20}.

This combination results in:

- 1. Increased Replication Stress:** Simultaneous inhibition leads to an accumulation of unrepaired DNA lesions.
- 2. Exhaustion of Repair Capacity:** The cell is forced into a “checkpoint collapse”. ATR inhibition prevents the G2/M arrest that would normally allow the cell to repair damage. Instead, the cell enters mitosis prematurely, leading to apoptosis even in cells that were previously resistant to PARPi monotherapy.
- 3. Genomic Instability:** We observed significant increases in micronuclei formation and γ H2AX foci in treated cells, markers of catastrophic DNA fragmentation.

Validation and Future Directions

For clinical translation, we need to validate these findings using patient-derived organoids (PDOs), capture the unique heterogeneity of CCA more accurately than traditional 2D cultures. However, several challenges remain:

- **Biomarker Development**
 - **Functional HRD Assays:** Measuring the actual repair capacity of the tumor rather than just the presence of mutations.
 - **Liquid Biopsies:** Monitoring circulating tumor DNA (ctDNA) to track the “reversion” of phenotypes or the emergence of new DDR mutations in real-time.
- **Scheduling and Toxicity Management**
 - Determining whether sequential or concomitant administration of DDR inhibitors best prevents resistance is critical. Because both PARPi and ATRi can cause myelosuppression, research is focused on “pulsatile” dosing schedules that allow the bone marrow to recover while maintaining selective pressure on the tumor.

Conclusion

We redefine drug resistance in CCA not as an insurmountable barrier, but as a window of opportunity. By targeting specific

DNA repair adaptations — such as the dependency on the replicative stress following PARP inhibition — we can design sophisticated, adaptive combination therapies. This paradigm shift from static genetic targeting to dynamic adaptation targeting holds the potential to significantly improve survival outcomes for patients with aggressive malignancies like CCA.

[References]

- 1) M. Squadroni, L. Tondulli, G. Gatta, S. Mosconi, G. Beretta, R. Labianca, “Cholangiocarcinoma”, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, **2017**, *116*, 11-31.
- 2) P. J. Brindley, M. Bachini, S. I. Ilyas, S. A. Khan, A. Loukas, A. E. Sirica, B. T. Teh, S. Wongkham, G. J. Gores, “Cholangiocarcinoma”, *Nat. Rev. Dis. Primers*, **2021**, *7*(1), 65.
- 3) A. Scheiter *et al.*, “Wnt/ β -Catenin-Pathway Alterations and Homologous Recombination Deficiency in Cholangiocarcinoma Cell Lines and Clinical Samples: Towards Specific Vulnerabilities”, *J. Pers. Med.*, **2022**, *12*(8), 1282.
- 4) P. G. Pilié *et al.*, “State-of-the-art strategies for targeting the DNA damage response in cancer”, *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, **2019**, *16*(2), 81-104.
- 5) A. D. D’Andrea, “Mechanisms of PARP inhibitor sensitivity and resistance”, *DNA Repair (Amst)*, **2018**, *71*, 172-176.
- 6) D. Slade, “PARP and PARG inhibitors in cancer treatment”, *Genes Dev.*, **2020**, *34*(5-6), 360-394.
- 7) H. Gaillard *et al.*, “Replication stress and cancer”, *Nat. Rev. Cancer*, **2015**, *15*(5), 276-289.
- 8) A. da Costa *et al.*, “Targeting replication stress in cancer therapy”, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2022**, *21*(6), 463-482.
- 9) T. Lerksuthirat *et al.*, “DNA Damage and Repair Activities of Crude Secondary Metabolite Extracts from *Guignardia bidwellii* Obtained from the Leaf of *Garcinia cowa*”, *BMC Complement. Med. Ther.*, **2020**, *20*, 142.
- 10) S. A. Yazinski *et al.*, “ATR inhibition disrupts rewired homologous recombination and fork protection pathways in PARP inhibitor-resistant BRCA-deficient cancer cells”, *Genes Dev.*, **2017**, *31*(3), 318-332.
- 11) P. C. Fong *et al.*, “Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase in tumors from BRCA mutation carriers”, *N. Engl. J. Med.*, **2009**, *361*(2), 123-134.
- 12) Y.-Y. Chu *et al.*, “Biomarkers beyond BRCA: promising combinatorial treatment strategies in overcoming resistance to PARP inhibitors”, *J. Biomed. Sci.*, **2022**, *29*, 19.
- 13) D. E. Spratt *et al.*, “Translational and clinical implications of the genetic landscape of prostate cancer”, *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, **2016**, *13*(10), 597-610.
- 14) S. Prasoporn *et al.*, “Combining the SMAC mimetic LCL161 with gemcitabine plus cisplatin therapy inhibits and prevents the emergence of multidrug resistance in cholangiocarcinoma”, *Front. Oncol.*, **2022**, *12*, 1021632.
- 15) S. Jamnongsong *et al.*, “Comprehensive drug response profiling and pan-omic analysis identified therapeutic candidates and prognostic biomarkers for Asian cholangiocarcinoma”, *iScience*, **2022**, *25*(10), 105182.
- 16) G. Smith *et al.*, “DNA Damage Repair Inhibitors — Combination Therapies”, *Cancer J.*, **2021**, *27*(6), 501-505.
- 17) E. K. Lee, U. A. Matulonis, “PARP Inhibitor Resistance Mechanisms and Implications for Post-Progression Combination Therapies”, *Cancers (Basel)*, **2020**, *12*(8), 2054.
- 18) D. Bhamidipati *et al.*, “PARP inhibitors: enhancing efficacy through rational combinations”, *Br. J. Cancer*, **2023**, *129*(6), 904-916.
- 19) T. Lerksuthirat *et al.*, “DNA damage response mutations enhance the antitumor efficacy of ATR and PARP inhibitors in cholangiocarcinoma cell lines”, *Oncol. Lett.*, **2025**, *29*(3), 128.
- 20) R. Wikiniyadhanee *et al.*, “ATR inhibitor synergizes PARP inhibitor cytotoxicity in homologous recombination repair-deficient TK6 cell lines”, *Biomed Res. Int.*, **2023**, *2023*, 7891753.

[Contact]

Donniphat Dejsuphong (MD, PhD)

ORCID: 0000-0001-8367-9415 (Associate Professor)

E-mail: donniphat.dej@mahidol.ac.th

Program in Translational Medicine, Chakri Naruebodindra Medical Institute, Faculty of Medicine Ramathibodi Hospital, Mahidol University, Samut Prakan 10540, Thailand

Current research area: DNA repair and diseases from mutation, hereditary cancer syndromes, genetic testing and biological indicators

Rakkreat Wikiniyadhane (PhD)

ORCID: 0000-0002-2886-5415 (Postdoctoral Researcher)

E-mail: wiki.rakkreat@gmail.com

Program in Translational Medicine, Chakri Naruebodindra Medical Institute, Faculty of Medicine Ramathibodi Hospital, Mahidol University, Samut Prakan 10540, Thailand

Current research area: CRISPR-Cas9 homology-directed repair (HDR) editing, PARP inhibitor combination therapy

Tassanee Lerksuthirat (PhD)

ORCID: 0000-0001-9526-951X (Senior Researcher)

E-mail: tassanee.ler@mahidol.ac.th

Research Center, Faculty of Medicine Ramathibodi Hospital, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand

Current research area: Functional genomics in DNA damage and repair pathways, drug discovery, preventive and social medicine

Sermsiri Chitphuk (MS)

ORCID: 0000-0002-8149-0341 (Medical Technologist)

E-mail: sermsiri.chi@mahidol.ac.th

Offices of Health Science Research, Faculty of Medicine Ramathibodi Hospital, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand

Current research area: DNA repair and diseases from mutation, hereditary cancer syndromes, genetic testing and biological indicators

関連製品

遺伝子導入試薬

HilyMax

導入条件や実績はこちら

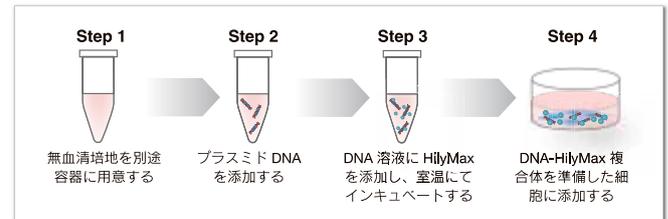
HilyMax

検索

<特長>

- ・コストパフォーマンスに優れた純国産試薬
- ・多岐にわたる細胞へ DNA を高効率に導入
- ・導入遺伝子の細胞内シグナル応答が良好
- ・血清を含む培地での導入が可能

<ワンチューブによるシンプルな操作>



< CAR-T 細胞療法における使用実績 >

固形がんにおける CAR-T 細胞の影響の評価で、本製品は CAR-T 細胞作製時のトランスフェクションに使用されています。

D. Kato *et al.*, "GPC1 specific CAR-T cells eradicate established solid tumor without adverse effects and synergize with anti-PD-1 Ab", *eLife*, **2020**, 9: e49392

※本製品は、福岡県工業技術センター生物食品研究所ならびに京都大学の研究成果のもと製品化しました。

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
HilyMax	1 ml	25,900	H357

関連製品

細胞増殖・細胞毒性アッセイキット

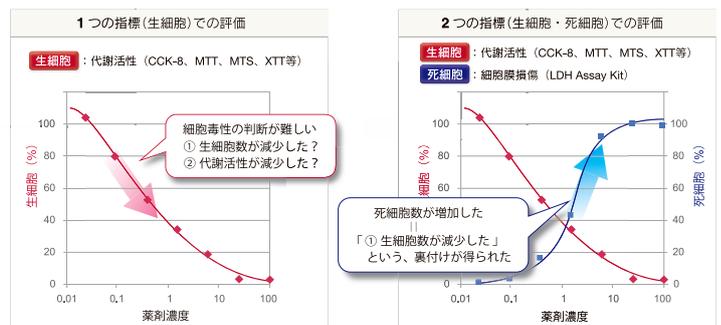
Viability/Cytotoxicity Multiplex Assay Kit

<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

細胞傷害性の確認では、生細胞または死細胞のみを指標とするとデータの信頼性が十分でない場合があることから、測定原理の異なる複数指標で評価することで実験の裏付けを行うケースが増えていきます。

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
Viability/Cytotoxicity Multiplex Assay Kit	500 tests	38,200	CK17



※本製品は、生細胞測定 Cell Counting Kit-8 と、死細胞測定 Cytotoxicity LDH Assay Kit-WST (各 500 tests) のセットです。

新製品

リソソーム内鉄イオン測定試薬

Lyso-FerroRed

<特長>

- ・リソソーム二価鉄のライブセルイメージングが可能
- ・蛍光顕微鏡、蛍光プレートリーダー、フローサイトメーターで検出可能
- ・二価鉄への高い選択性

二価鉄イオン (Fe²⁺) に依存した脂質過酸化物の蓄積により引き起こされる細胞死 (フェロトーシス) が Stockwell らに提唱されてから 10 年以上経過し、これまでにフェロトーシスに関する様々な研究がなされています。遊離した Fe²⁺ がフェントン反応により活性酸素を発生させ、脂質が酸化されることから、フェロトーシスは鉄依存性の細胞死であることが明らかになってきています。また最近では、脂質酸化により、リソソームの膜が損傷し、リソソーム中の鉄が漏出することによって、他の細胞小器官へ脂質酸化が広がっていくことが報告されています¹⁾。本製品は岐阜薬科大学ケミカルバイオロジー研究室 平山祐先生ご指導の下、製品化しました。

1) K. Yamada et al., Nat. Commun., 2025, 16, 2554.

<原理>

Lyso-FerroRed は細胞内のリソソームの遊離二価鉄を検出することができます。試薬を培養細胞に添加すると細胞膜を透過し、リソソームの Fe²⁺ と選択的に反応して強い蛍光を発します。Lyso-FerroRed にはキレート能はなく、Lyso-FerroRed と Fe²⁺ は非可逆的に反応するため、Fluo 3 のようなカルシウム蛍光プローブの検出原理とは異なります。

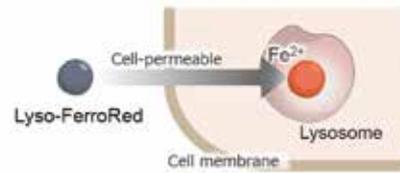
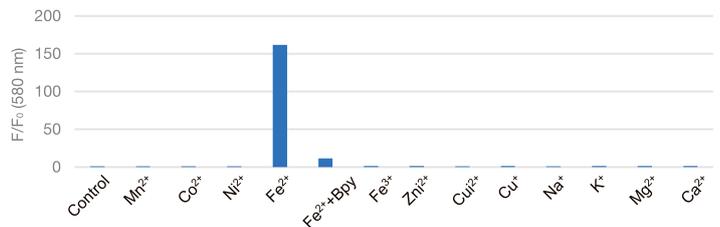


図 Lyso-FerroRed の原理

<二価鉄への高い選択性>

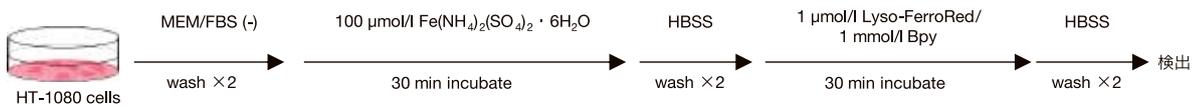
【実験条件】
 金属イオン濃度：20 μmol/l
 Lyso-FerroRed 濃度：2 μmol/l
 Buffer：50 mmol/l HEPES (pH 7.2)
 反応時間：1 時間

【検出条件】
 検出器：蛍光プレートリーダー M200PRO (TECAN)
 Ex = 550 nm, Em = 580 nm



<実験例：HT-1080 細胞内リソソーム二価鉄の検出>

硫酸アンモニウム鉄(II)六水和物を用いて HT-1080 細胞に二価鉄を取り込ませ、各方法でリソソームの二価鉄を検出しました。その結果、いずれの検出器においても、二価鉄の取り込みによって細胞の蛍光強度が上がり、二価鉄のキレート剤 Bpy (2,2'-Bipyridyl) との併用により細胞の蛍光強度が下がることが確認されました。

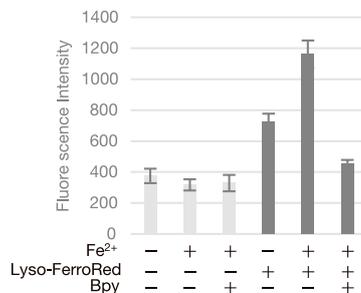


蛍光顕微鏡



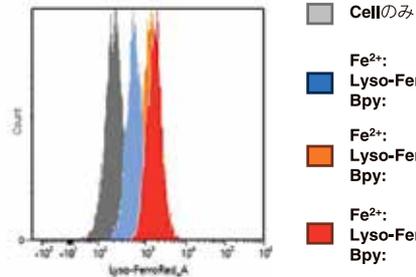
【検出条件】
 LSM800 (Zeiss)
 Ex = 564 nm, Em = 570-620 nm
 Scale bar : 20 μm

蛍光プレートリーダー



【検出条件】
 infinite M200 PRO (TECAN)
 Ex = 550 nm, Em = 580 nm

フローサイトメーター



【検出条件】
 SA3800 (SONY)
 Ex = 561 nm, Em = 565-617 nm

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
Lyso-FerroRed	35 nmol	39,800	L270

<使用回数の目安> 35 nmol あたり 35 mm dish 17 枚

代謝物分析のご案内 - 同仁グローバル

生体由来サンプルや発酵サンプルなどに含まれる代謝物(脂肪酸、アミノ酸、核酸、糖など)の同時一斉分析を行っています。

<分析事例>

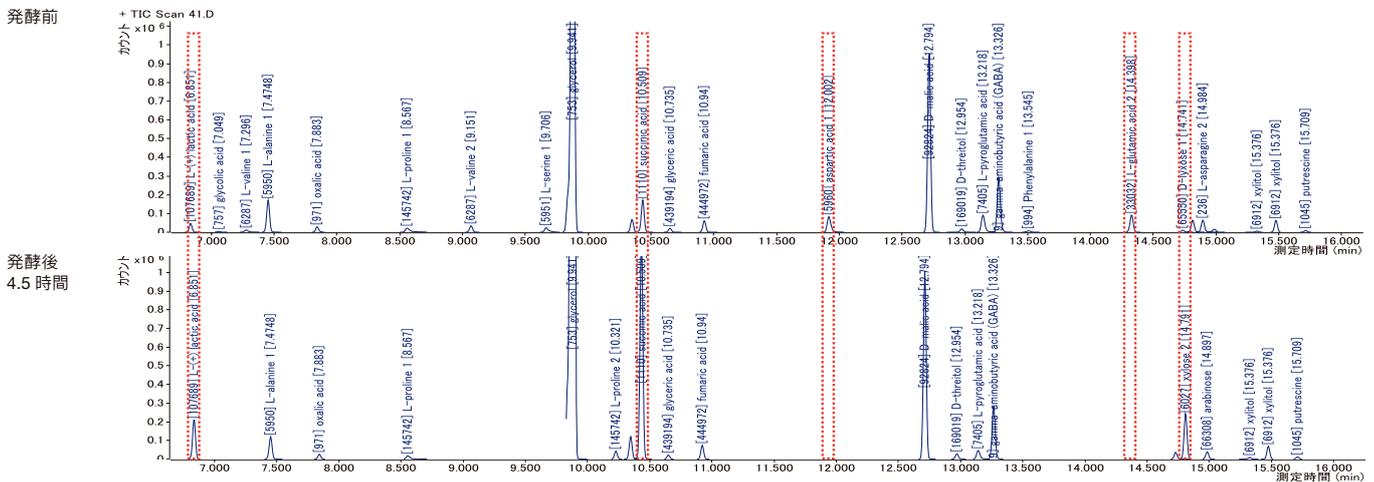
パンの発酵過程における糖やアミノ酸、その他代謝物の時間変化をモニターしました。強力粉のみ使用したサンプル(サンプルA)と強力粉と全粒粉を1:1で混合したサンプル(サンプルB)を調製し、酵母は市販のドライイーストを用いました。発酵温度を23℃に設定、発酵時間は最大4.5時間とし、30分毎にサンプリングしました。サンプルはBligh-Dyer法で抽出、遠心分離し上相を試験液とし、誘導体化後、GC/MS分析しました。

材料	サンプルA	サンプルB
強力粉	150 g	75 g
全粒粉	0 g	75 g
砂糖	10 g	10 g
塩	2 g	2 g
バター	10 g	10 g
酵母	3 g	3 g
水	100 ml	100 ml

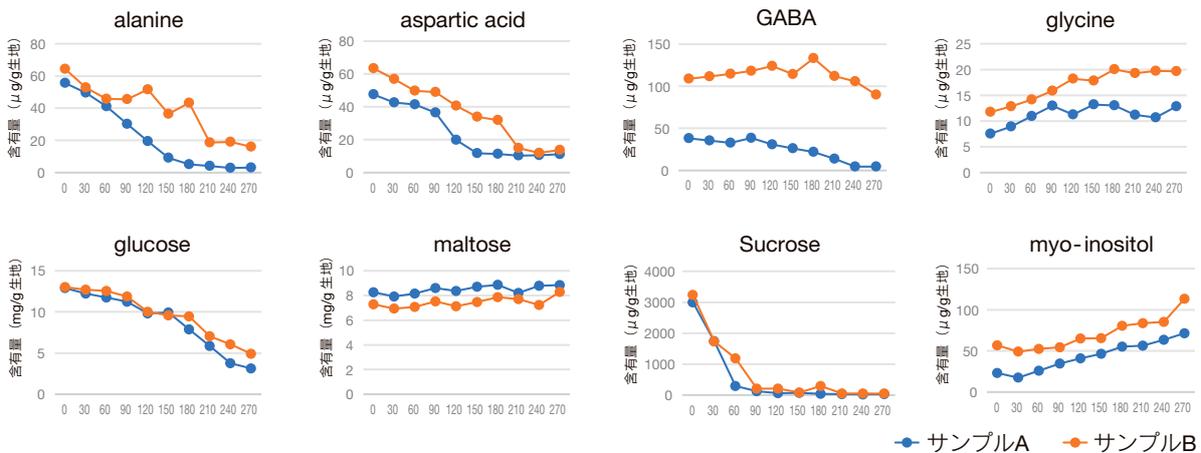
【分析方法】

誘導体化: オキシム化トリメチルシリル化
分析装置: GC/MS (アジレント・テクノロジー社製)

【クロマトグラフ例】 サンプルB



【アミノ酸及び糖の時間変化】



株式会社同仁グローバル

<お問合せ>

Tel 096-286-1311
Fax 096-286-1312
glocal@dojindo.co.jp



www.dojin-glocal.com

代謝物分析



同仁グローバル 検索

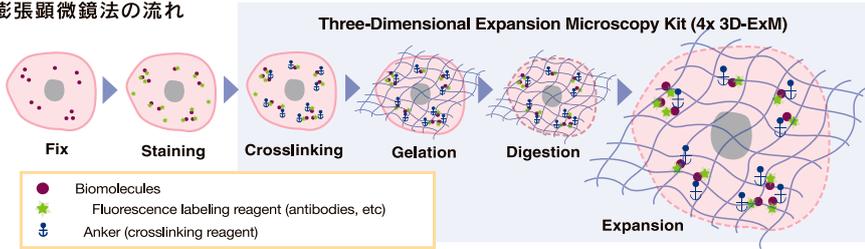
新製品

膨張顕微鏡法標本作成キット (4x 3D-ExM)

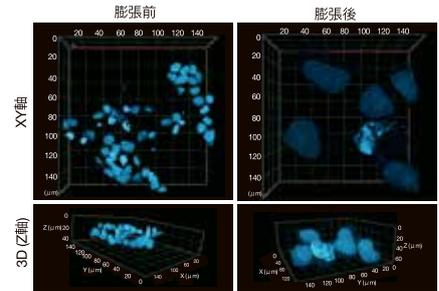
Three-Dimensional Expansion Microscopy Kit (4x 3D-ExM)

細胞内のオルガネラの構造解析は細胞機能や疾患メカニズムの理解に重要です。高解像度イメージングには電子顕微鏡や超解像顕微鏡が必要ですが、蛍光顕微鏡では回折限界により観察が困難でした。2015年に開発されたExpansion Microscopy法(ExM)は、吸水性ゲルでサンプルを拡大し、蛍光顕微鏡で微細構造の観察を可能にしました。本キットはこの手法に必要な試薬と枠を含み、細胞を3次元的に約4倍に拡張できます。

膨張顕微鏡法の流れ

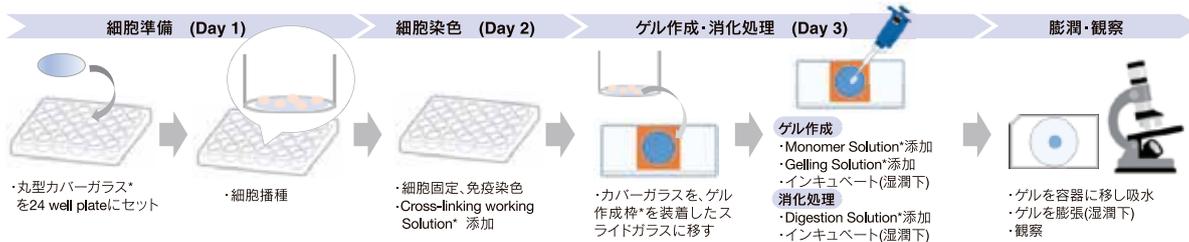


※ This product is covered by U.S. Patent Application No. 17/466, 434. This technology is based on research conducted by Dr. Aussie Suzuki at the University of Wisconsin-Madison.



＜検出条件＞
 検出装置：共焦点レーザー顕微鏡 Lens 40× Water objective
 DAPI (青)：Ex/Em = 405/420-480 nm
 膨張前：Laser 1.0%, Gain 550 V
 膨張後：Laser 2.5%, Gain 680 V

＜実験の流れ (例)＞



製品には実験に必要な試薬が含まれています。細胞の準備からゲル作成、観察までの詳細なプロトコルで、はじめてでも安心して実験ができます。

■ミトコンドリア形態変化の観察

脱分極剤である CCCP で処理した HeLa 細胞のミトコンドリアの TOM20 (外膜) および COX IV (内膜) を染色し、本製品を用いて膨張顕微鏡法により観察しました。

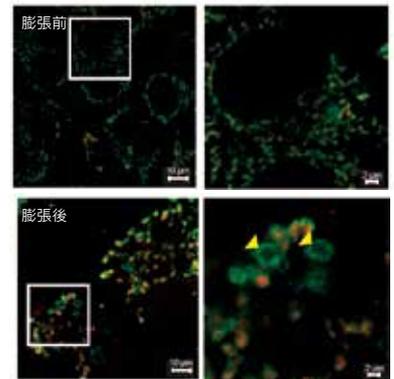
【結果】

膨張前の細胞では、ミトコンドリアの外膜と内膜の判別がし難いのに対し、膨張後の細胞では、外膜がリング状(ミトコンドリア分裂)を示し、内部に内膜タンパク質が存在しない構造(黄色矢印)が観察されました。

＜検出条件＞
 検出装置：共焦点蛍光顕微鏡
 Lens: 63× Oil objective
 TOM20 (緑): Ex/Em = 488/500-550 nm
 COX IV (赤): Ex/Em = 561/580-620 nm

膨張前
 TOM20: Laser 1.0%, Gain 650 V
 COX IV: Laser 2.0%, Gain 650 V

膨張後
 TOM20: Laser 70%, Gain 700 V
 COX IV: Laser 70%, Gain 750 V



品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
Three-Dimensional Expansion Microscopy Kit (4x 3D-ExM)	10 tests	48,000	T517

<p>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/</p>	<p>次号テーマ 脂質</p>
--	-----------------------------