

細胞および組織内脂質滴の 高感度可視化試薬

群馬大学大学院理工学府
分子科学部門

准教授 吉原 利忠



発明の背景と概要①

技術分野

本発明は、細胞及び組織内に存在する脂質滴を観察する蛍光イメージング試薬に関するものである。

課題

NAFLD(非アルコール性脂肪性肝疾患)における脂肪変性の定義は、5%以上の肝細胞に脂肪滴を認めるもの。しかし、肝生検による病理組織採取によらない方法では、脂肪滴割合が5%~30%の状態を検出できない。

ギャップ

解決手段

生きた組織内の脂質滴をイメージング可能な分子プローブ(8-ジメチルアミノベンゾクマリン骨格)を提供。

効果

- 生きた細胞や組織内の脂質滴を高感度にリアルタイムイメージングを実現。
- 画像診断で軽度な脂肪肝を確認することが可能。

現状

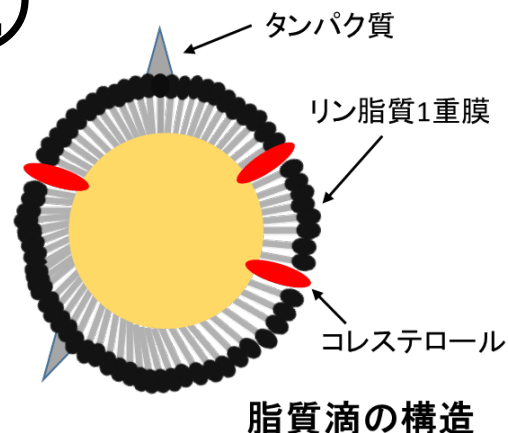
- 画像診断(超音波:Bモード、CT)検査では、脂肪沈着が30%以下は診断が困難(感度が低い)。
- NAFL/NASH(非アルコール性脂肪肝/非アルコール性脂肪肝炎)の血清診断マーカーは存在しない。

発明の背景と概要②

脂質滴



脂質滴

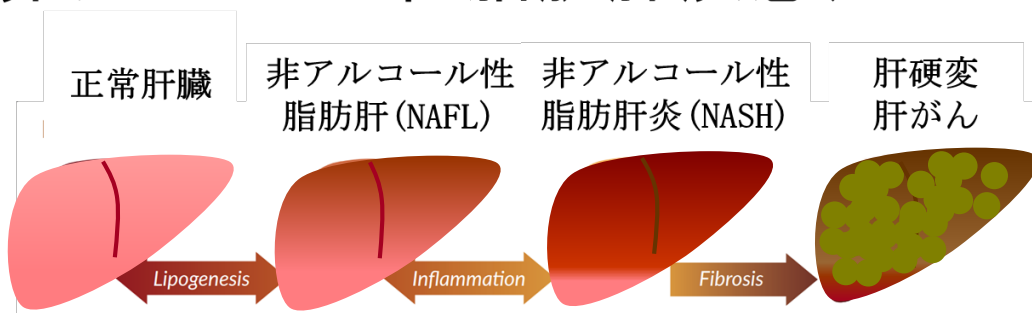


細胞のエネルギー貯蔵



脂質代謝の異常は肥満症、糖尿病、脂肪肝、動脈硬化症などの病気に関係

非アルコール性脂肪肝疾患(NAFLD)



正常肝臓に戻れる。

病気が進行
(NASHの有効な治療法はない。)

生体内脂質の関わる生理学的，病理学的過程を追跡するために脂質滴イメージングは重要



発明の背景と概要③

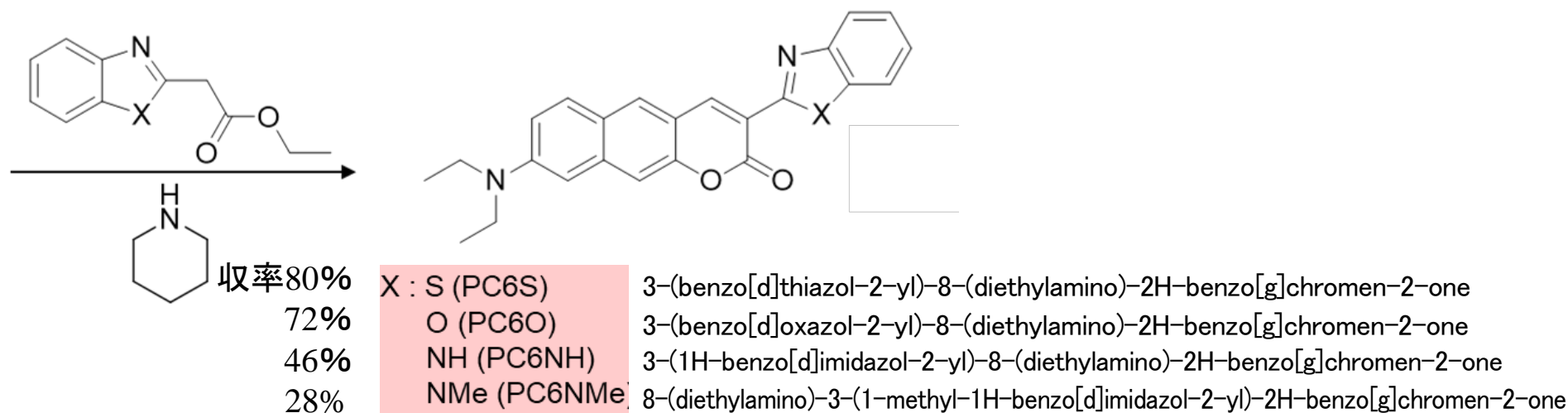
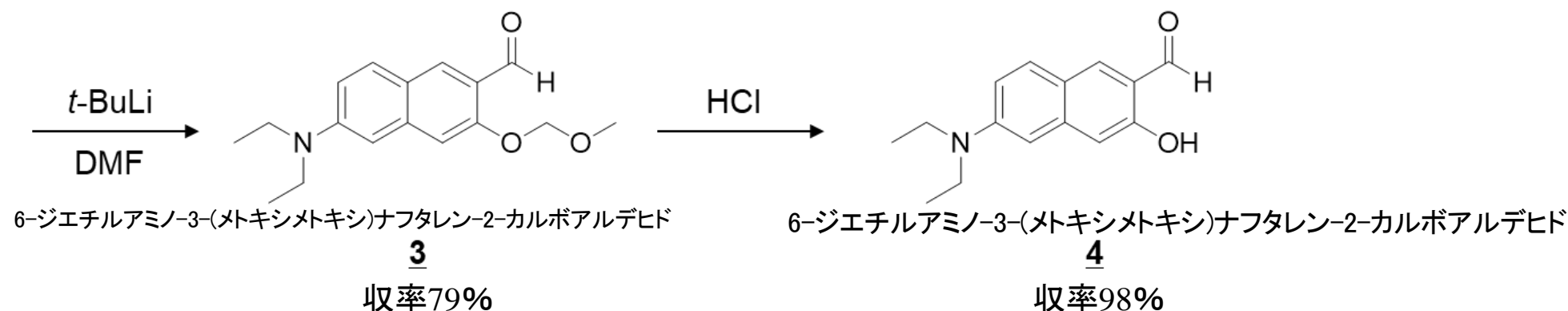
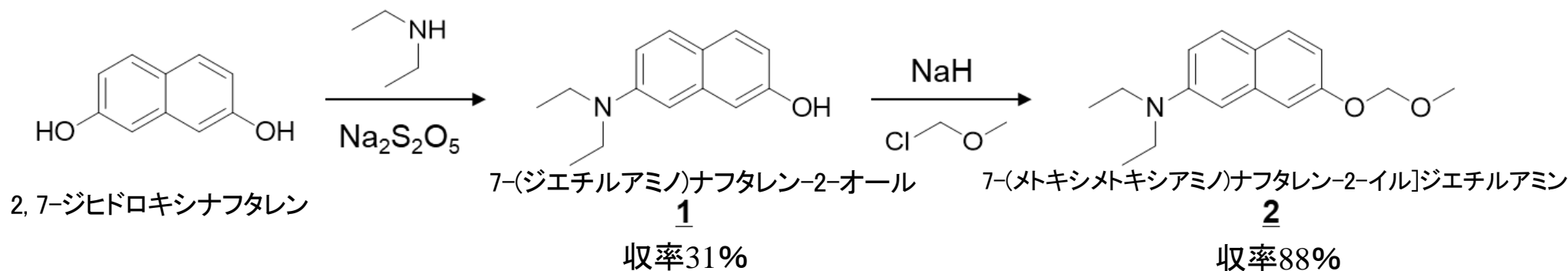
従来技術(試薬)と本発明の性能比較

	本発明	市販の試薬			
	PC6S (代表化合物)	BODIPY 493/503	Nile Red	Lipi-Green	LipiDye
細胞内での明るさ	◎	△	○	△	○
脂質滴への選択性	○	○	X	○	○
汎用フィルターへの 適応	◎	○	X	◎	X
光安定性	◎	X	△	X	○
細胞内滞留性	◎	X	△	◎	◎
組織内脂質滴イ メージング	◎	○ (脂肪組織) X (肝臓, 腎臓)	—	—	—

既に実用化されている脂質滴イメージングのための蛍光性試薬は、**細胞内での明るさ、脂質滴への選択性、光安定性、組織イメージング**等のいずれかに問題があり、広く利用されるまでには至っていない。

発明の技術内容①

実施例：化合物の合成(PC6S, PC6O, PC6NH, PC6NMe)

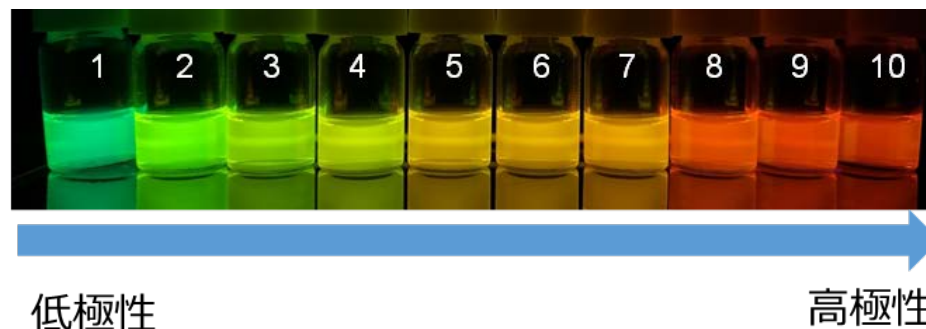


発明の技術内容②

実施例：PC6類の光物理特性

PC6S

吸収極大波長：455～504 nm
 蛍光極大波長：498～642 nm
 蛍光量子収率： ≥ 0.8



表：PC6Sの吸収・蛍光特性

solvents	ϵ	$\lambda_{\max}^{\text{abs}}$ / nm	$\lambda_{\max}^{\text{flu}}$ / nm	Φ_f	τ_f / ns
n-Hexane	1.89	455	498	0.89	2.55
Bu ₂ O	3.08	468	538	0.88	2.91
EtOAc	6.08	483	585	0.84	3.41
MeCN	36.6	492	625	0.80	3.72
DMSO	49.5	504	642	0.83	3.46

n-Hexane: n-ヘキサン
 Bu₂O: ジブチルエーテル
 EtOAc: 酢酸エチル
 MeCN: アセトニトリル
 DMSO: ジメチルスルホキシド

ϵ : 誘電率

$\lambda_{\max}^{\text{abs}}$: 吸収極大波長, $\lambda_{\max}^{\text{flu}}$: 蛍光極大波長,

Φ_f : 蛍光量子収率, τ_f : 蛍光寿命

表：PC6類の吸収・蛍光特性

probe	Solvents	$\lambda_{\max}^{\text{abs}}$ / nm	$\lambda_{\max}^{\text{flu}}$ / nm	Φ_f	τ_f / ns
PC6S	Bu ₂ O	468	538	0.88	2.91
	MeCN	493	625	0.80	3.72
PC6O	Bu ₂ O	460	530	0.86	2.83
	MeCN	478	613	0.80	3.70
PC6NH	Bu ₂ O	458	523	0.89	2.79
	MeCN	477	604	0.82	3.76
PC6NMe	Bu ₂ O	438	512	0.67	3.53
	MeCN	449	590	0.77	4.08

$\lambda_{\max}^{\text{abs}}$: 吸収極大波長, $\lambda_{\max}^{\text{flu}}$: 蛍光極大波長, Φ_f : 蛍光量子収率, τ_f : 蛍光寿命

発明の技術内容③

実施例：PC6Sの特長：明瞭な脂質滴

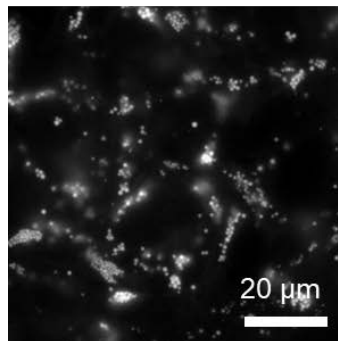
PC6Sおよび市販の脂質滴イメージング試薬をHeLa細胞に添加



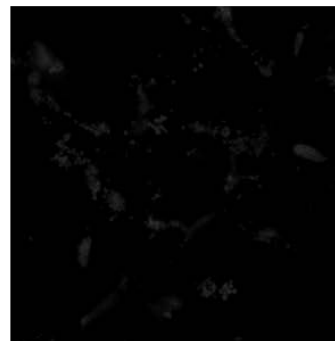
蛍光顕微鏡を用いてイメージング画像を取得

LipiDyeは、汎用的な緑色蛍光試薬用のフィルターを使用できない。405 nm付近の励起波長を使用するため、長時間の観察においては細胞に対する光毒性が懸念される。

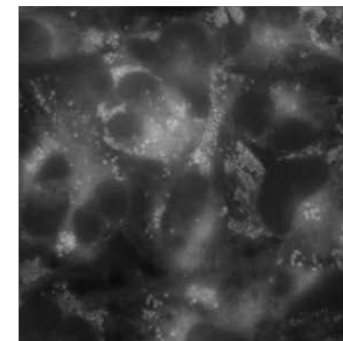
PC6S



BODIPY493/503



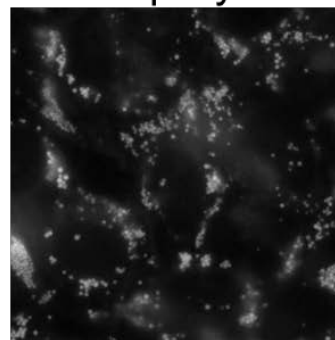
Nile Red



Lipi-Green



LipiDye



LipiDye以外

λ_{ex} : 450-500 nm
 λ_{em} : 515-565 nm

LipiDye

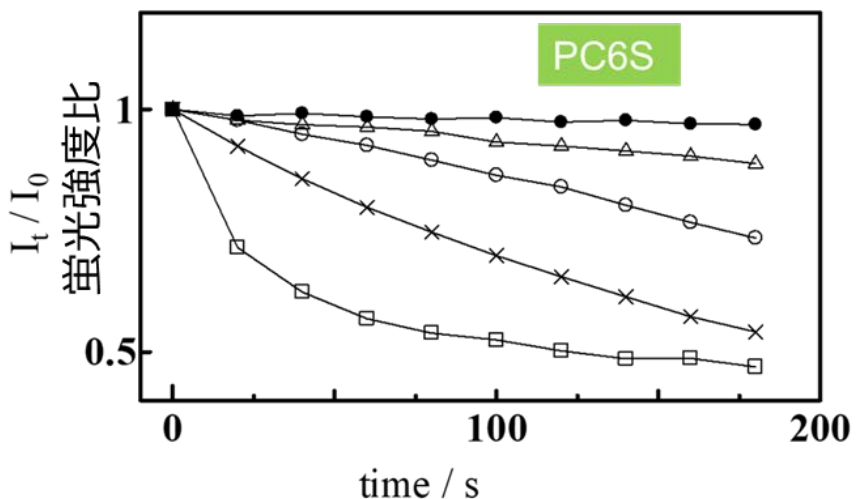
λ_{ex} : 400-440 nm
 λ_{em} : > 475 nm

	本発明	市販の試薬			
	PC6S (代表化合物)	BODIPY 493/503	Nile Red	Lipi-Green	LipiDye
細胞内での明るさ	◎	△	○	△	○
脂質滴への選択性	○	○	X	○	○
汎用フィルターへの適応	◎	○	X	◎	X

発明の技術内容④

実施例：PC6Sの特長：長時間測定OK

光安定性

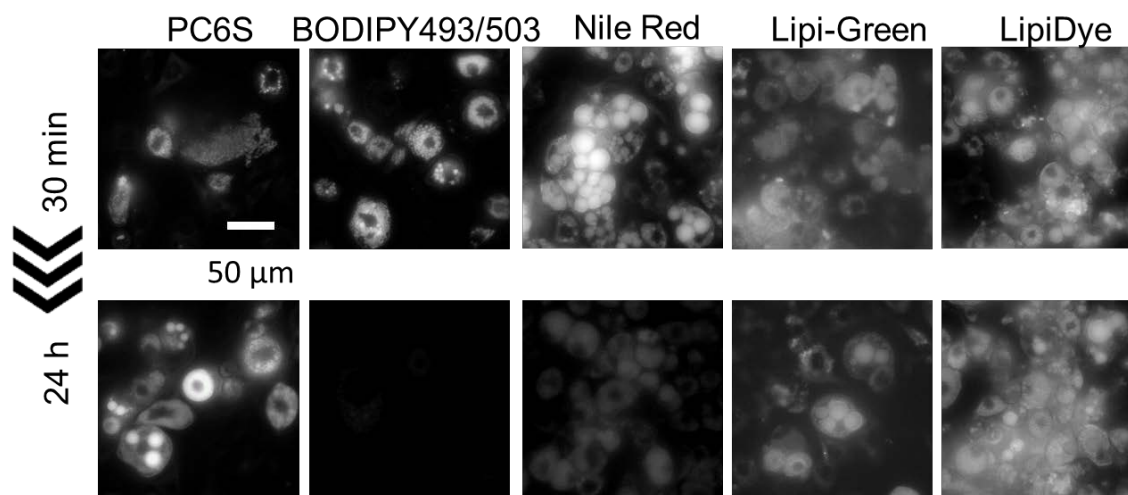


● PC6S
 △ LipiDye
 ○ Nile Red
 × BODIPY493/503
 □ Lipi-Green

滞留性

3T3-L1

従来品



- 試薬を添加して30分培養後の写真(上)。
- その後洗浄してから24時間後の写真(下)。

	本発明	市販の試薬			
	PC6S (代表化合物)	BODIPY 493/503	Nile Red	Lipi-Green	LipiDye
光安定性	◎	×	△	×	○
細胞内滞留性	◎	×	△	◎	◎

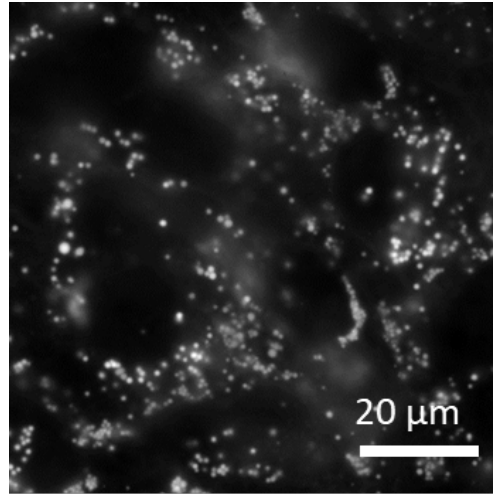
発明の技術内容⑤

実施例：固定した標本や多色イメージングも可能

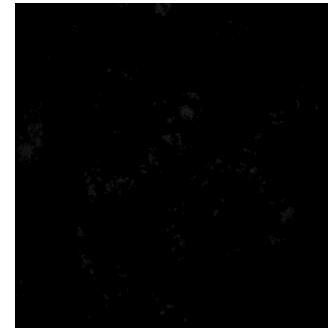
HeLa細胞の培地にオレイン酸(400 μM)を添加して2日間培養

4% パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液で20分間処理

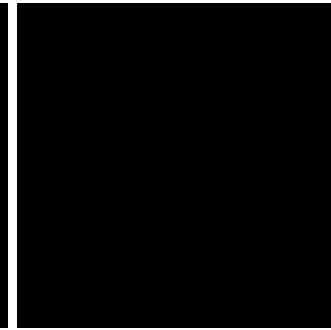
各プローブで染色(100 nM, 30分培養)



PC6S



BODIPY493/503



Lipi-Green

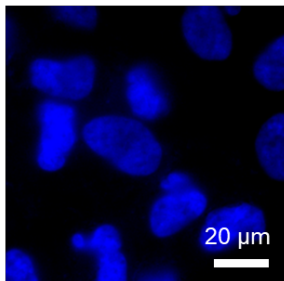


Nile Red

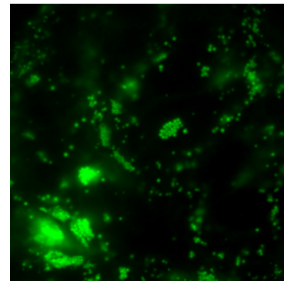
従来品

複数の蛍光試薬との併用が可能。

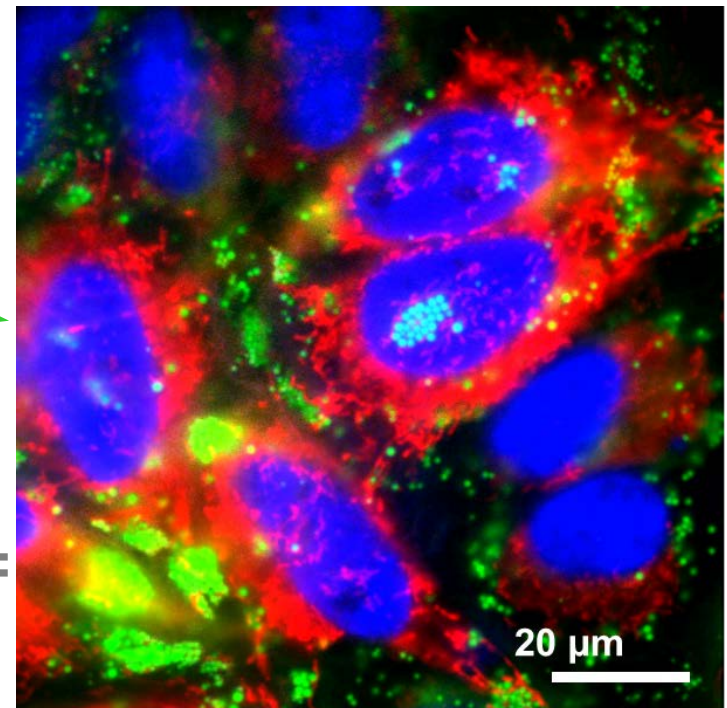
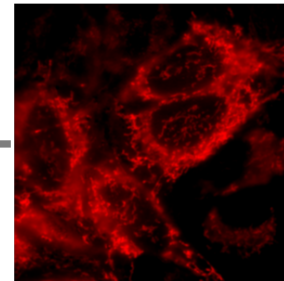
Hoechst 33342



PC6S



Mito tracker red

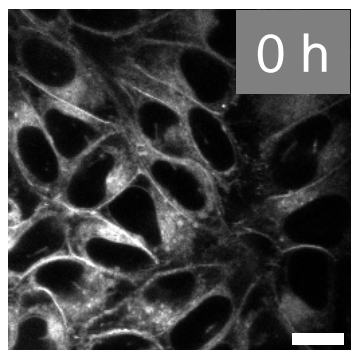


発明の技術内容⑥

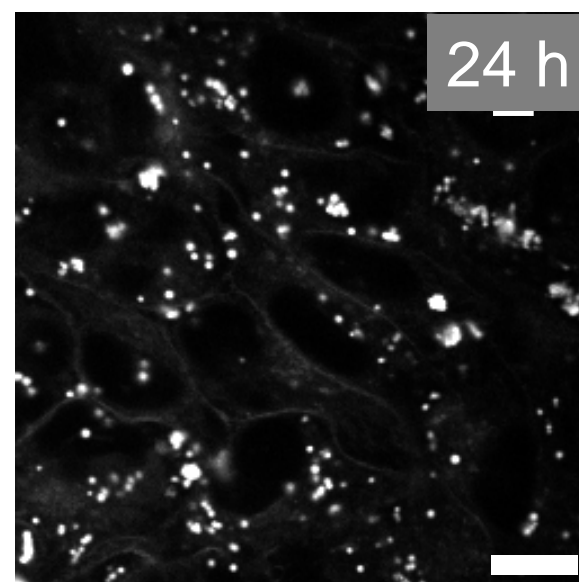
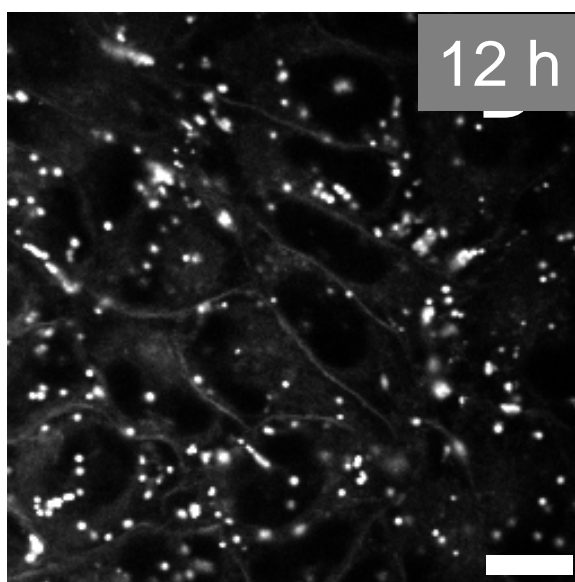
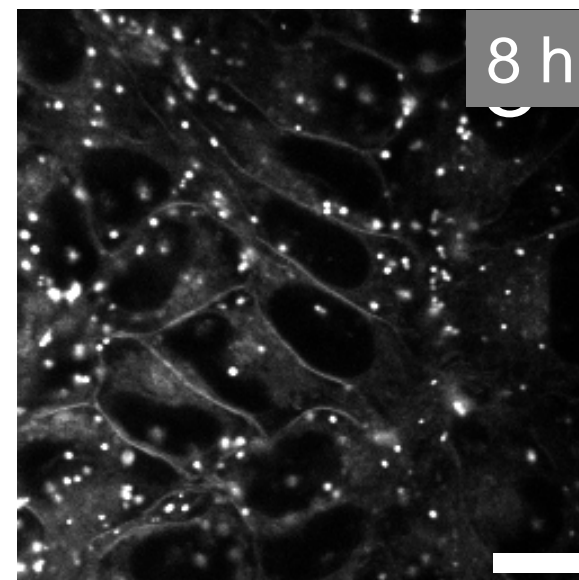
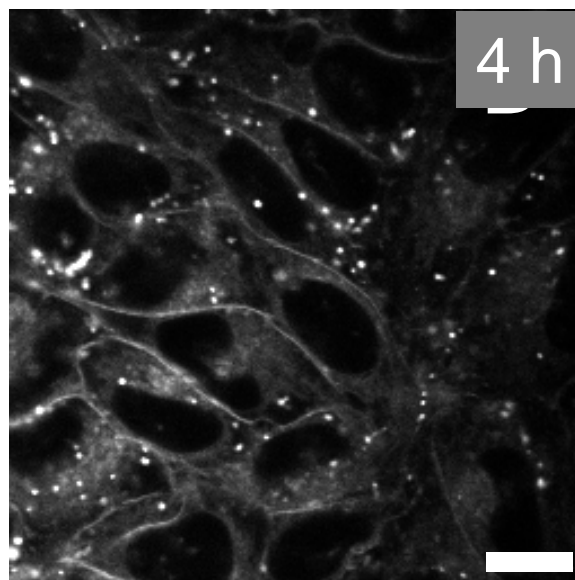
実施例：培養細胞を経時的にイメージング

HeLaの培地にPC6Sを100 nMになるように添加

30分培養後，細胞内に取り込まれていないPC6Sを除去し蛍光顕微鏡でイメージ画像を取得 (0 h)



オレイン酸を培地に400 mMになるように添加し，各時間で同視野のイメージ画像を撮影



徐々に脂質滴が形成されていく様子がイメージングできている。

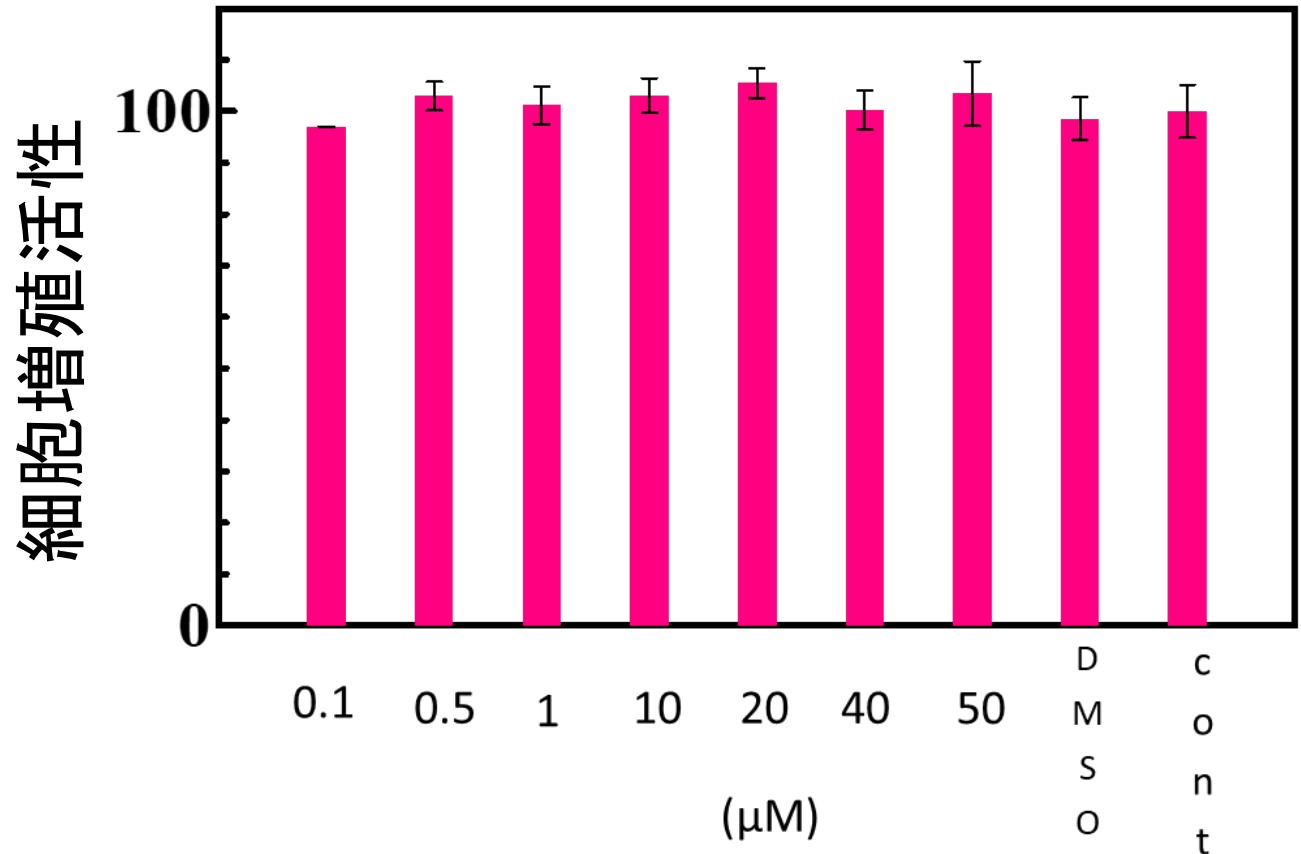
発明の技術内容⑦

実施例：PC6Sの細胞毒性なし

96区画プレートにHeLa細胞を播種し、ガラス面に接着後PC6Sを培地に添加

PC6Sを添加して24時間培養後、洗淨し、CCK8を10 μ L添加

CCK8添加から2時間後、吸光度を測定



発明の技術内容⑧

実施例：優れた*in vivo*脂質滴イメージング

麻酔下にあるマウスの尾静脈からPC6Sを投与し，腹部を開腹し肝臓を露出させる。



スライドガラスチャンバーにマウスを乗せ，倒立顕微鏡を用いて測定

脂肪肝の形成過程

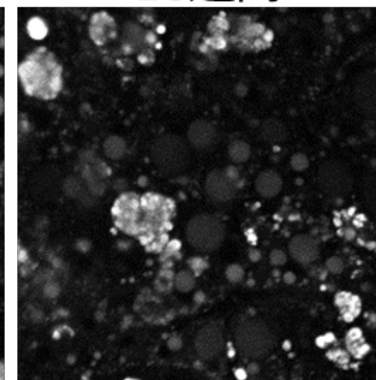
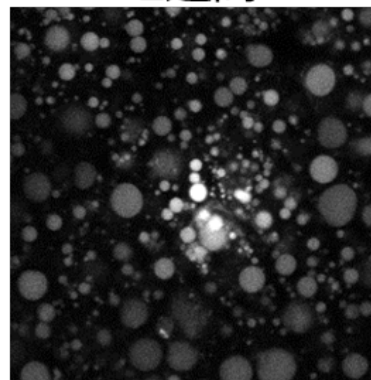
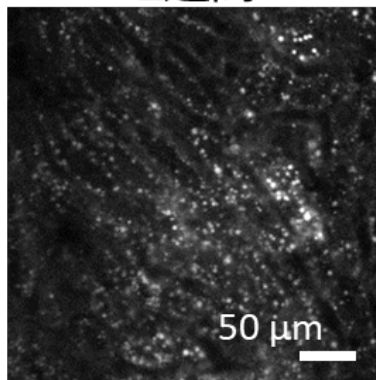
強度画像

通常飼料
2週間

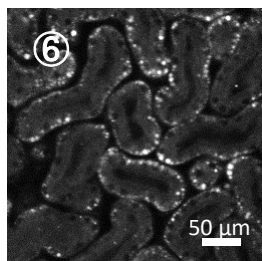
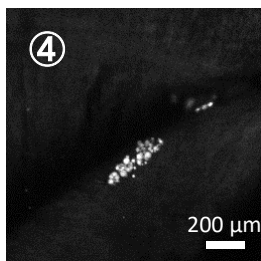
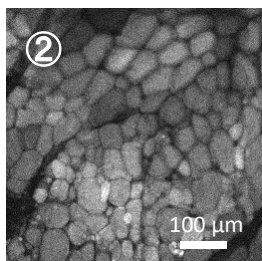
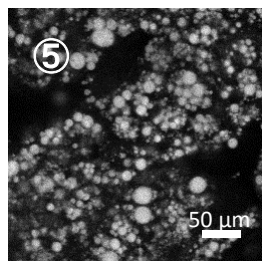
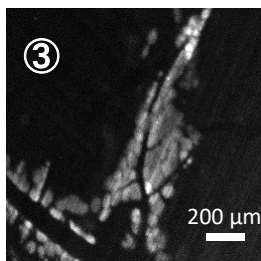
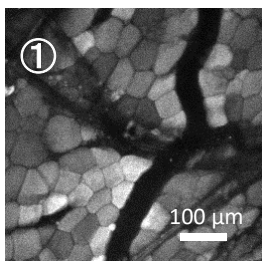
高脂肪飼料
2週間



高脂肪飼料
10週間



様々な組織のイメージング



- ① 皮下脂肪組織
- ② 腹部脂肪組織
- ③ 骨格筋
- ④ 心筋(摘出後)
- ⑤ 心臓周囲脂肪組織(摘出後)
- ⑥ 腎臓

肝細胞内に脂質が蓄積し，
脂質滴が形成されていく
過程がイメージングできる。

従来技術とその問題点

既に実用化されている脂質滴イメージングのための蛍光性試薬は、

細胞内での明るさ

脂質滴への選択性

光安定性

組織イメージング

等のいずれかに問題があり、広く利用されるまでには至っていない。

新技術の特徴・従来技術との比較

- 従来技術の問題点であった、**明るさ**、**選択性**、**安定性**、**組織への使用制限**を改良することに成功した。
- 従来は脂質滴イメージングの点で細胞内での使用に限られていたが、**組織親和性を向上**させることができたため、**生きた生体組織内の脂質滴をイメージング**することが可能となった。
- 本技術の適用により、**脂質蓄積が関与する疾患の発見**や、**治療薬の開発**に貢献できることが期待される。

想定される用途

- 本技術の特徴を生かすためには平面培養細胞だけでなく、**3次元細胞やオルガノイド培養に適用することで創薬支援ツールとしてのメリット**が大きいと考えられる。
- 上記以外に、**組織内の脂質蓄積に対する知見が得られる**ことも期待される。
- また、達成された蛍光特性に着目すると、**細胞内小器官のイメージングや細胞内微量元素センシング**といった分野や用途に展開することも可能と思われる。

実用化に向けた課題

- 現在，平面培養細胞や小動物について，脂質滴イメージングが可能なところまで開発済み。しかし，**脂質滴の定量化の点が未解決**である。
- 今後，**脂質滴の定量について実験データを取得し，定量化に適用していく場合の条件設定**を行っていく。
- 実用化に向けて，**脂質滴の定量精度をできる限り向上できるよう技術を確立する必要**もあり。

企業への期待

- 未解決の定量性については、マイクロプレートリーダーやフローサイトメーターを用いた測定により克服できると考えている。
- 創薬開発，バイオイメージング，試薬合成の技術を持つ，企業との共同研究を希望。
- また，創薬，創薬支援ツール，バイオイメージング用試薬を開発中の企業，これら分野への展開を考えている企業には，本技術の導入が有効と思われる。

本技術に関する知的財産権

- 発明の名称 : 細胞・組織内脂質滴の蛍光
イメージング試薬
- 出願番号 : PCT/JP2020/12002
- 出願人 : 群馬大学
- 発明者 : 吉原利忠、丸山凌、
飛田成史

お問い合わせ先

群馬大学 産学連携・知的財産活用センター

〒376-8515 群馬県桐生市天神町1-5-1

TEL 0277-30-1171~1175

FAX 0277-30-1178

e-mail tlo@ml.gunma-u.ac.jp