

NAFLDイメージングのための 蛍光性試薬の開発

群馬大学 大学院理工学府 分子科学部門
准教授 吉原 利忠

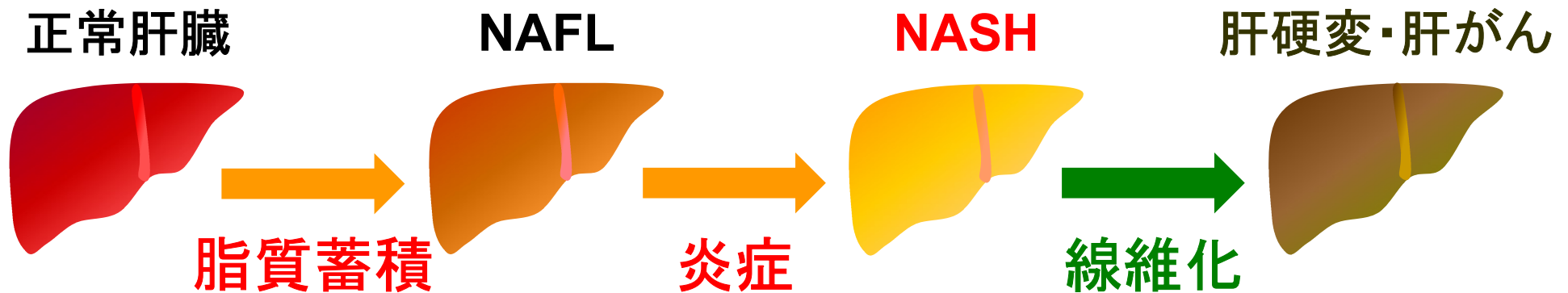
2023年11月16日

非アルコール性脂肪肝疾患 (NAFLD)

- **アルコールを原因としない**脂肪肝から脂肪肝炎や肝硬変に進行した状態を含む一連の肝臓病

NAFLDの国内推定患者数
1000~2000万人

- ・ 非アルコール性脂肪肝 (NAFL)
- ・ **非アルコール性脂肪肝炎 (NASH)**
200~400万人

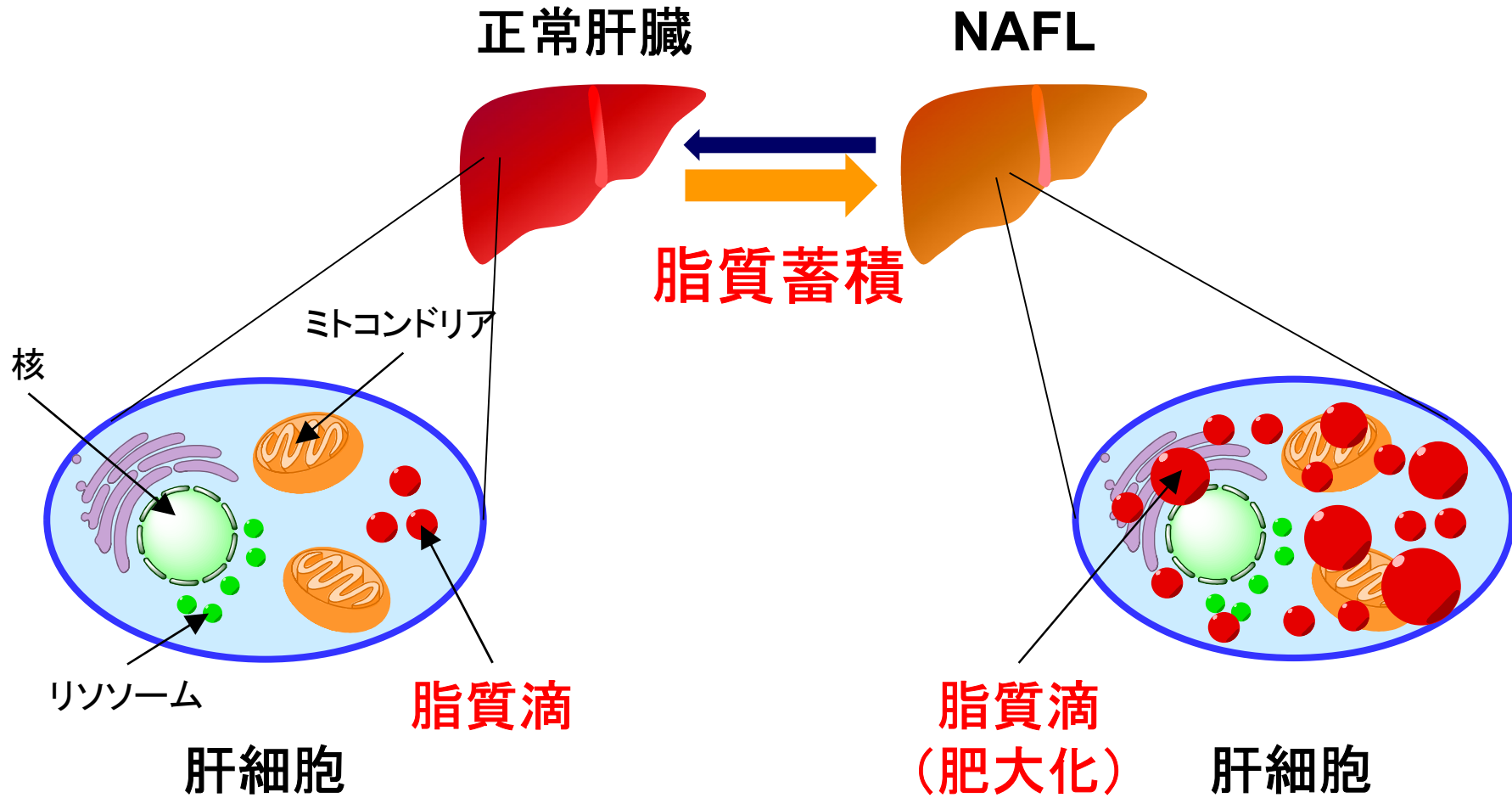


- NAFLDは肥満、糖尿病、高血圧、脂質異常症を伴うことが多い。
- NASHは肝臓組織の線維化を経て、肝硬変や肝がんに行進する可能性が高い。
- NASHは自覚症状がほとんどないため、肝硬変に行進するまで気が付きにくい。

NAFLDの主な診断法

- **血液検査**:トランスアミラーゼ(AST、ALT)や γ -GTPを測定
 - ✓ 簡便に検査できる。
 - ✓ NAFL、NASHを確定するための血液マーカーはない。
- **画像検査**:超音波、CT、MRIを用いた診断
 - ✓ 超音波検査は比較的簡便に検査できる。
 - ✓ 肝内に脂肪滴が蓄積すると超音波が散乱して、肝全体が高輝度を呈する。
 - ✓ NAFLとNASHとの鑑別は困難であり、主観的所見になりやすい。
 - ✓ 肝臓の線維化の評価は困難である。
- **肝生検**:肝臓に針を刺して肝臓組織の一部を採取
 - ✓ NAFL、NASHの確定診断に有効である。
 - ✓ 局部あるいは全身麻酔下で実施するため、入院が必要である。
 - ✓ 侵襲的な方法であるため、受診者への負担が大きい。

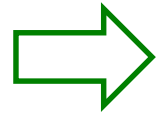
脂質滴(脂肪滴)の過剰発現と肥大化



NAFLの発症機構の解明、早期診断法、治療法の開発には、肝細胞内に過剰発現し、肥大化した脂質滴を検出・イメージングすることが有効

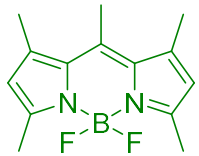
蛍光性脂質滴イメージング試薬

蛍光法を用いた
バイオイメージング

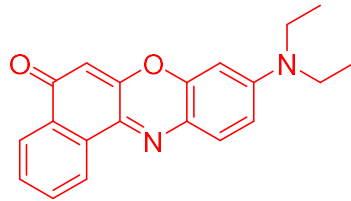


高感度、低侵襲、リアルタイム計測が可能
深部計測が困難

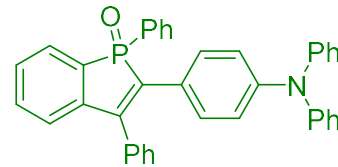
市販の主な蛍光性脂質滴イメージング試薬



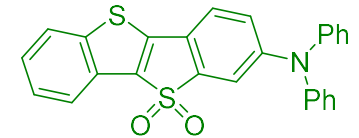
BODIPY493/503



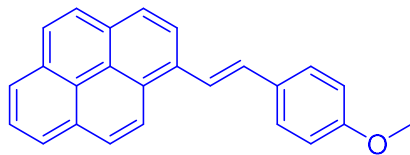
Nile Red



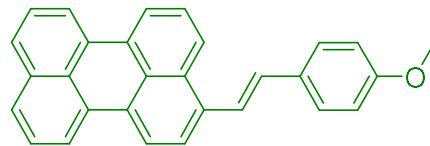
LipiDye®



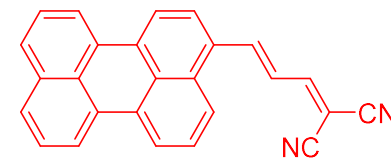
LipiDye®II



Lipi-Blue



Lipi-Green

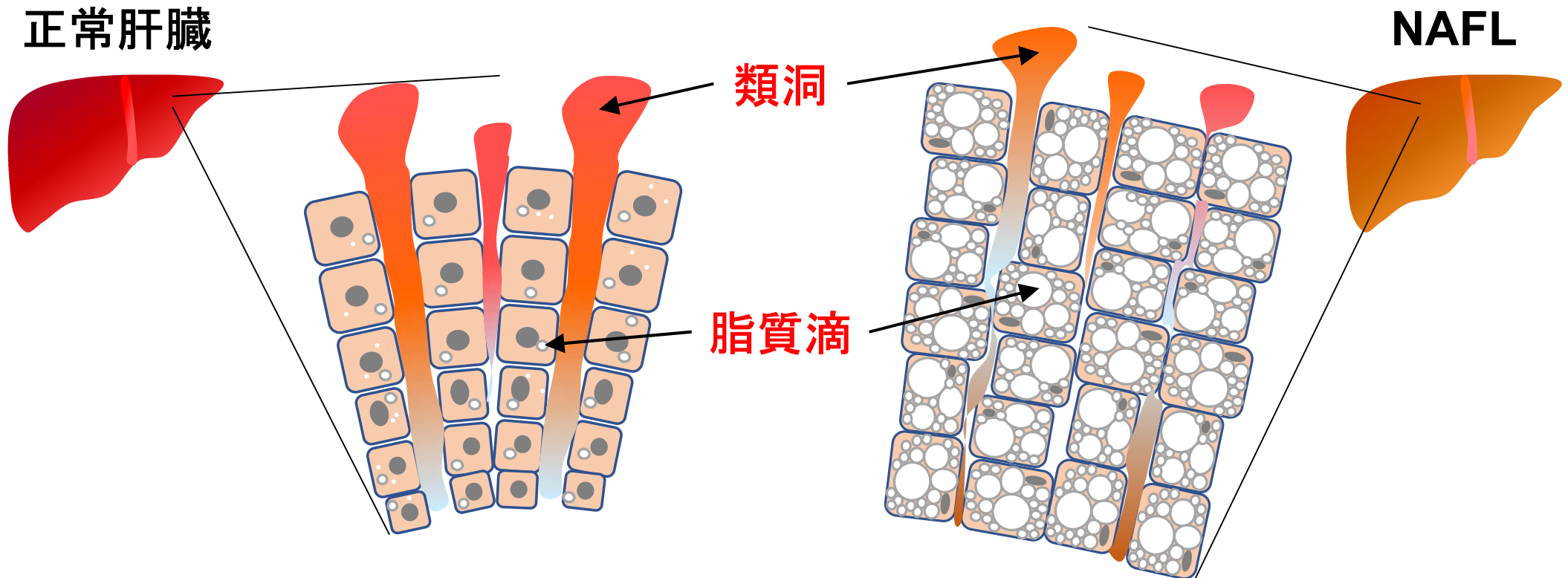


Lipi-Red

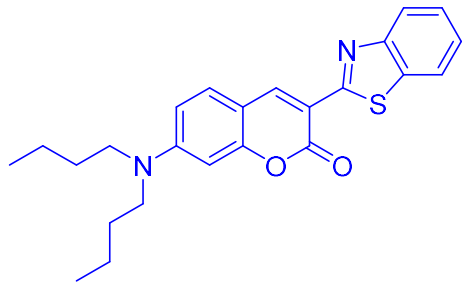
上記試薬の対象は、培養細胞や組織切片

本技術の概要

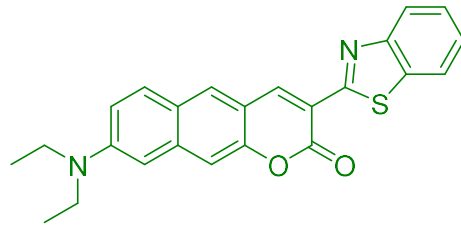
- 培養細胞、組織切片、小動物内の脂質滴のイメージングを可能とする分子プローブ群を提供
- NAFLDモデルマウスの肝臓内の脂質滴および血管走行の同時イメージングを可能とする分子プローブ群を提供



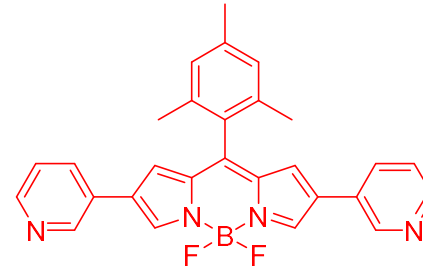
蛍光性脂質滴イメージング試薬の吸収スペクトル



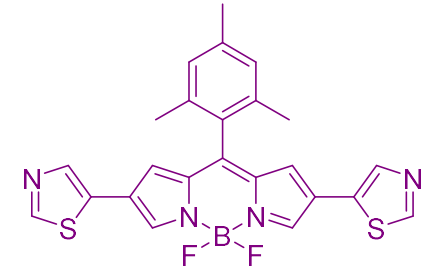
DBC30



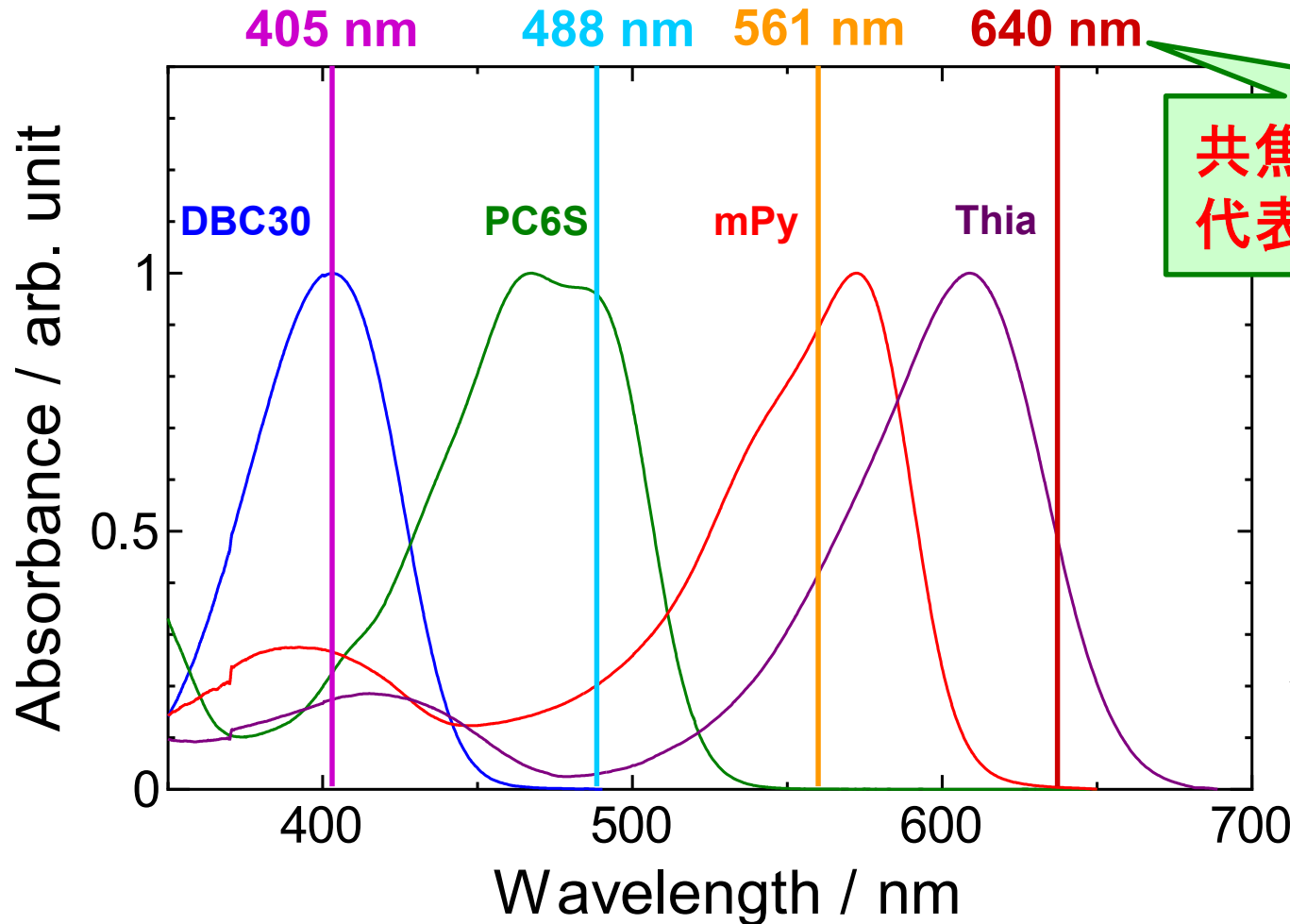
PC6S



mPy



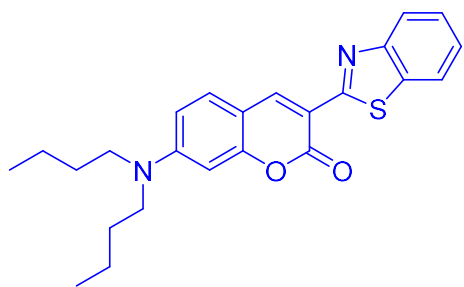
Thia



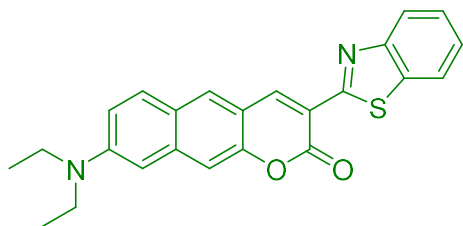
共焦点レーザー顕微鏡の
代表的な励起波長

ジブチル
エーテル中

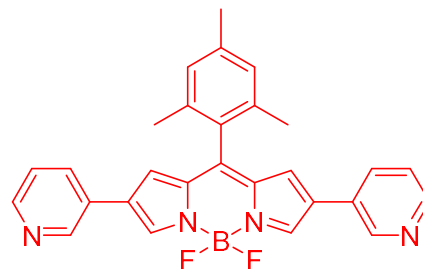
蛍光性脂質滴イメージング試薬の蛍光特性



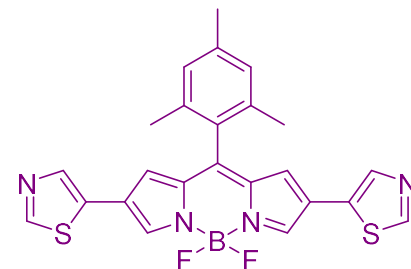
DBC30



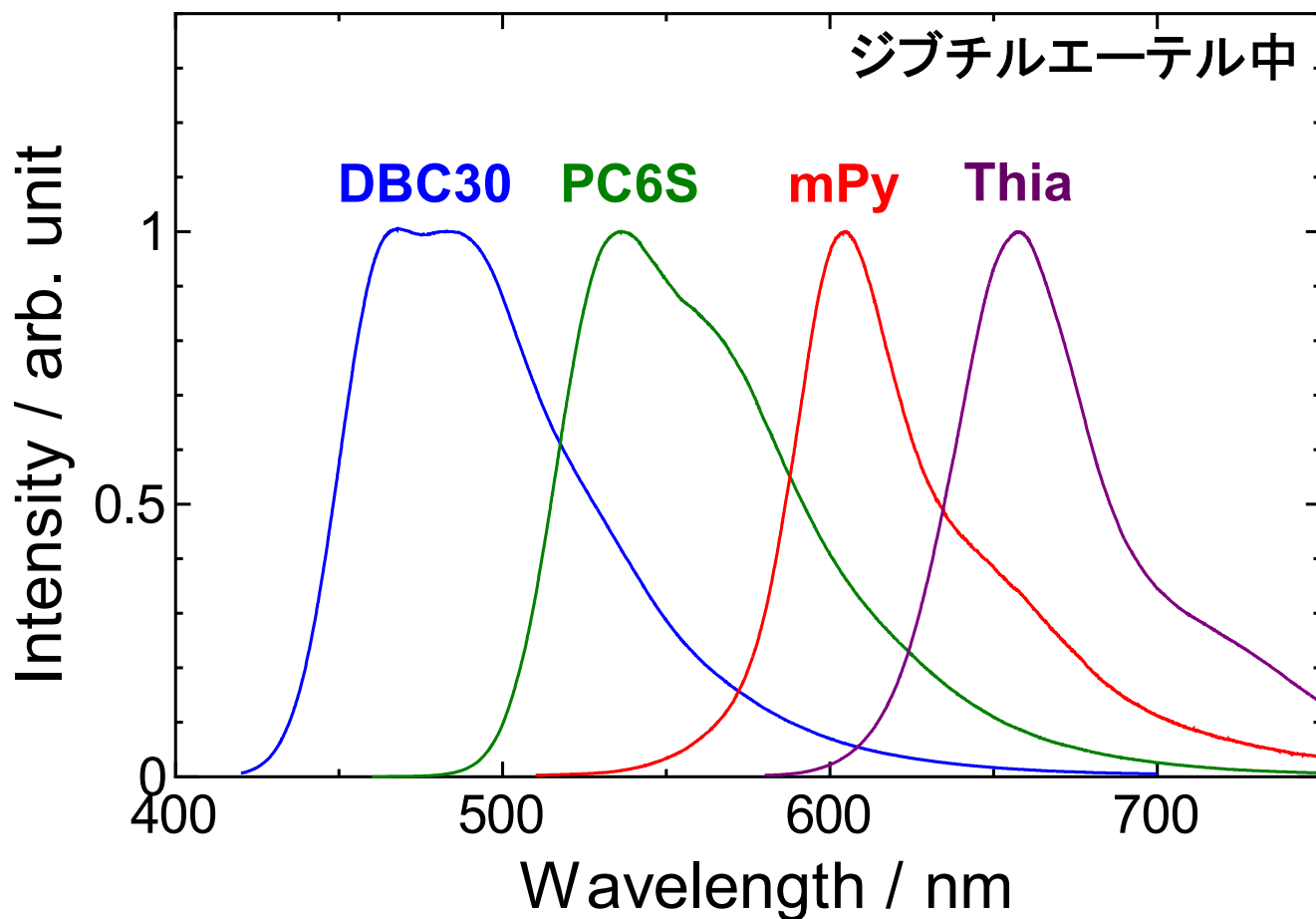
PC6S



mPy



Thia

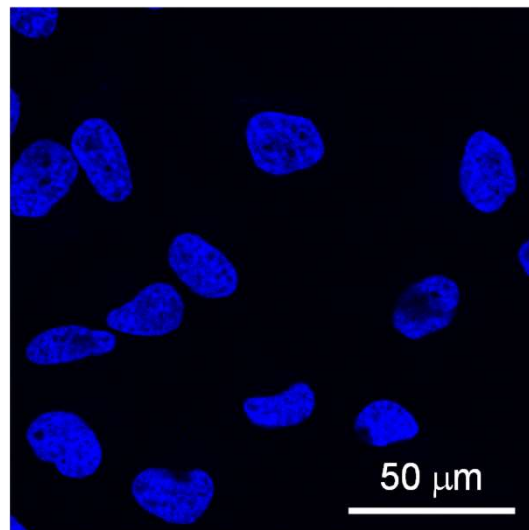


化合物	蛍光量子収率
DBC30	0.93
PC6S	0.88
mPy	0.71
Thia	0.29

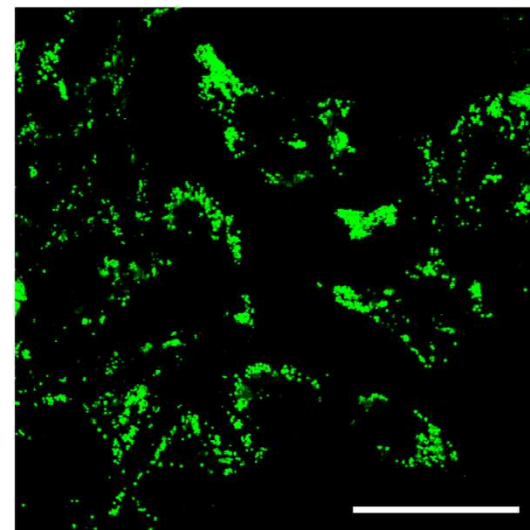
マルチカラーイメージング

- ・HeLa細胞の培地にオレイン酸を添加し、24時間培養
- ・Hoechst 33342、PC6S、MitoTracker Redを含む培地に置換して、37°Cで30分間培養
- ・培地を取り除き、PBS(-)で2回洗浄
- ・共焦点蛍光顕微鏡で観察

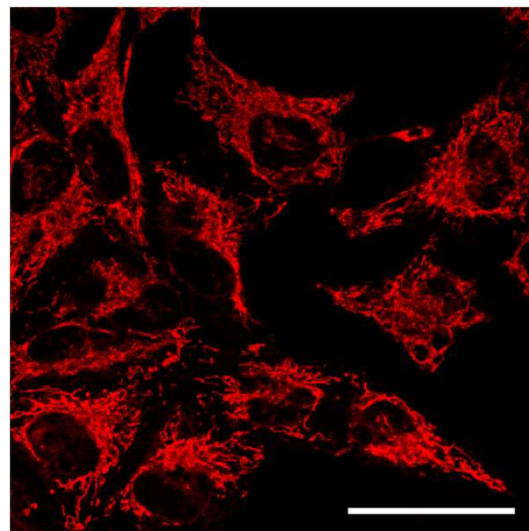
細胞核



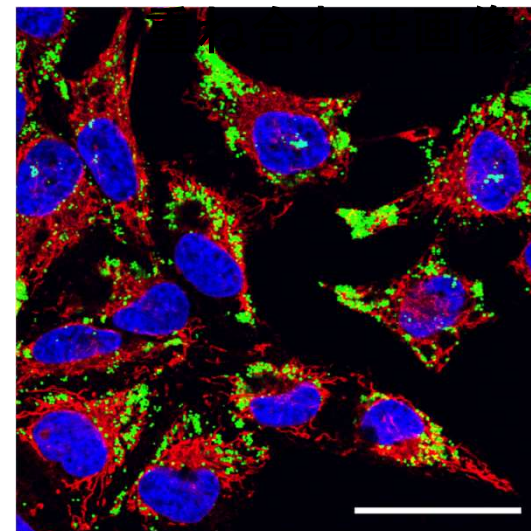
脂質滴



ミトコンドリア



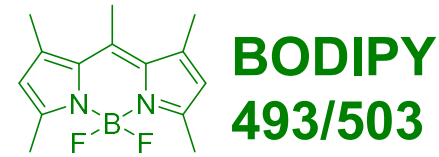
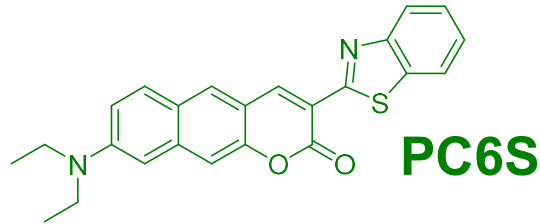
重ね合わせ画像



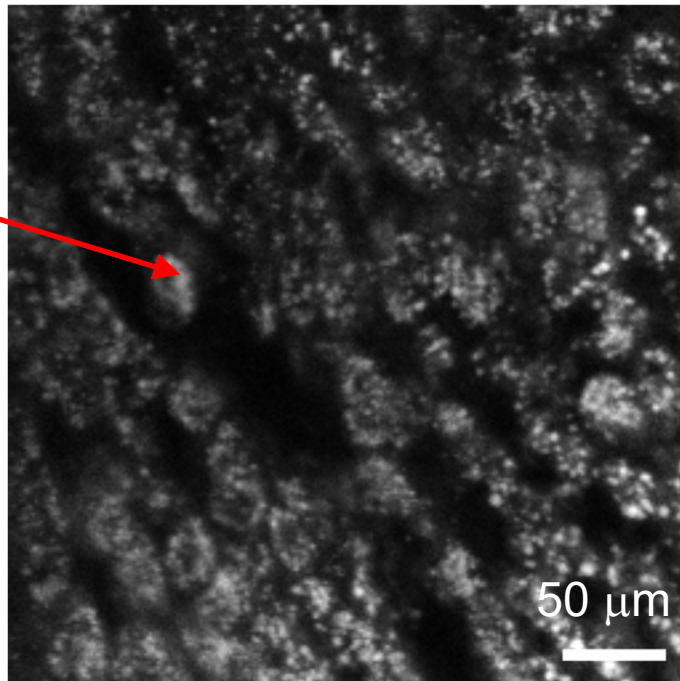
脂質滴を含む細胞内
オルガネラを明瞭に
イメージング

マウス肝臓の脂質滴イメージング

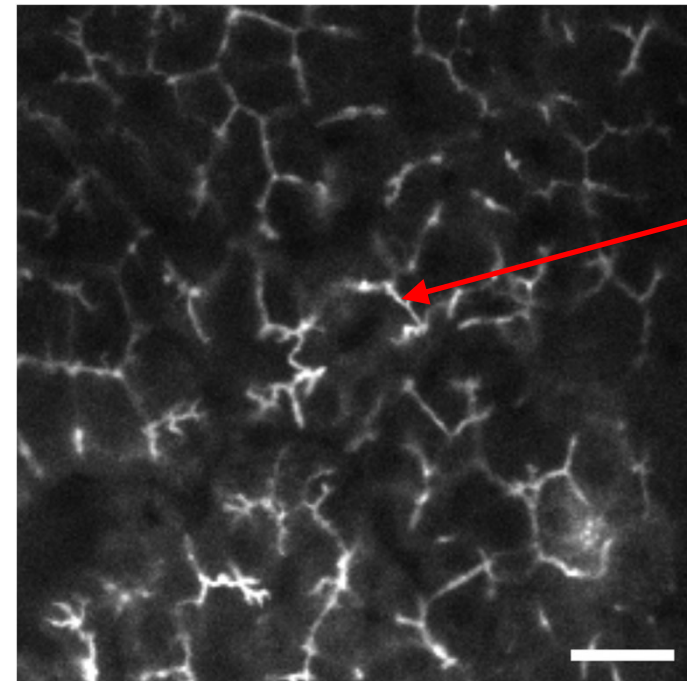
- ・ 麻酔下にあるマウスの尾静脈からPC6SあるいはBODIPY493/503を50 nmol投与
- ・ 30分後、開腹して肝臓表面を共焦点蛍光顕微鏡で観察
励起波長: 488 nm、観察波長: 500–540 nm



脂質滴



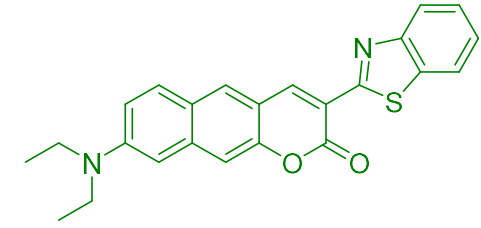
胆管



*in vivo*においても脂質滴を明瞭にイメージング

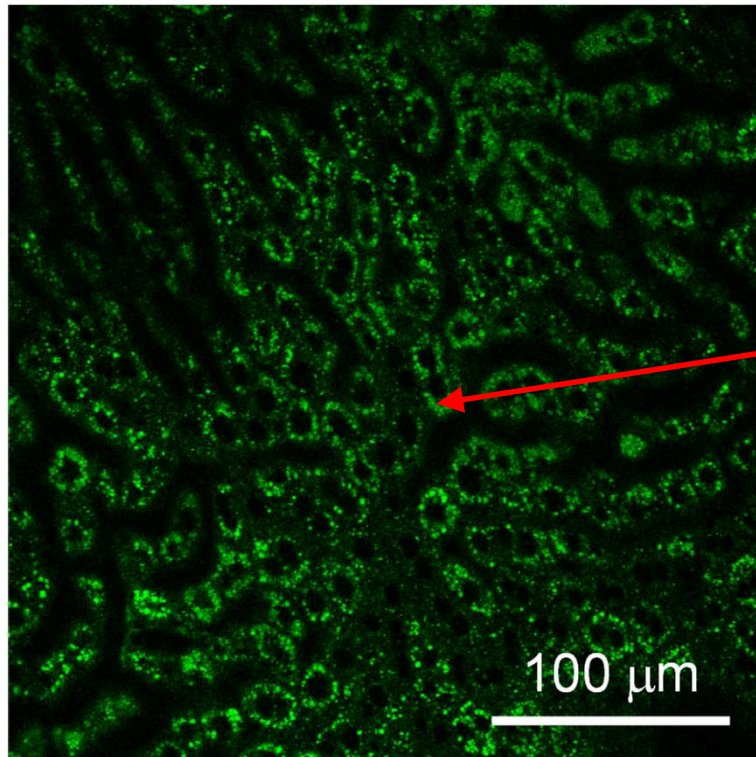
NAFLDマウス肝臓の脂質滴イメージング

- ・ 超高脂肪コリン欠乏メチオニン減量飼料を1週間餌として与える
- ・ 麻酔下にあるマウスの尾静脈からPC6Sを50 nmol投与
- ・ 30分後、開腹して肝臓表面を共焦点蛍光顕微鏡で観察
励起波長: 488 nm、観察波長: 500–540 nm

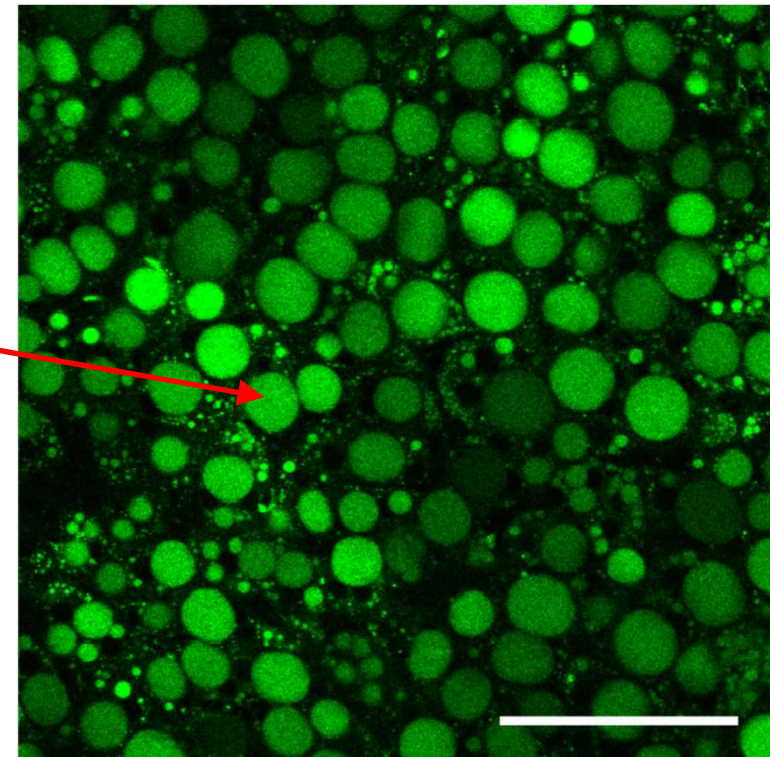


PC6S

健常マウス



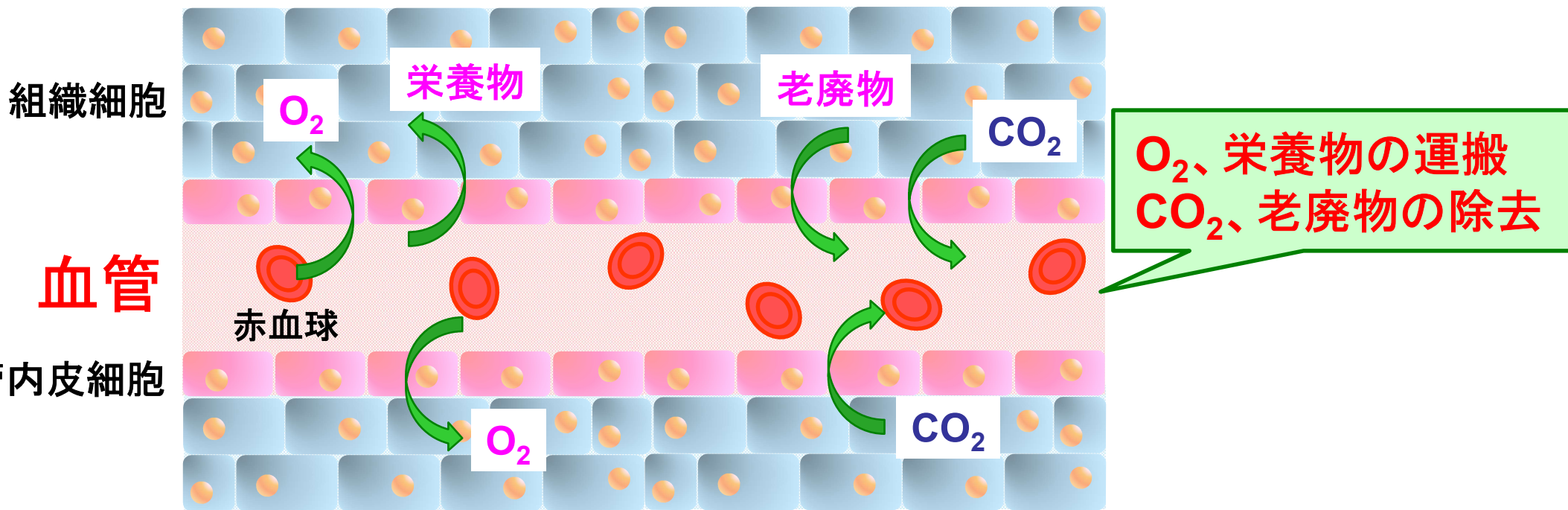
NAFLDモデルマウス



脂質滴

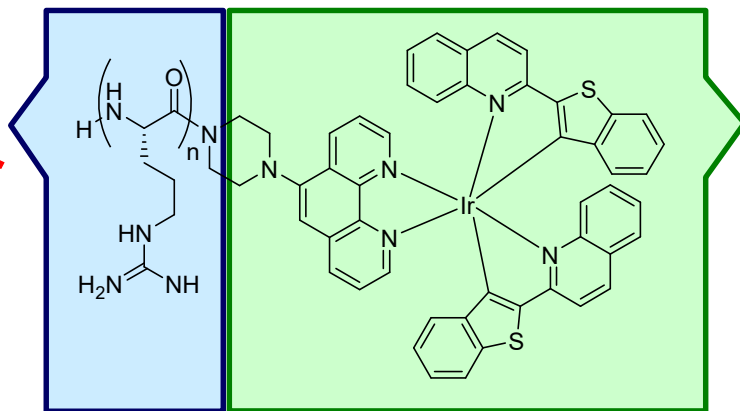
NAFLDマウスにおいても脂質滴を明瞭にイメージング

血管イメージング試薬



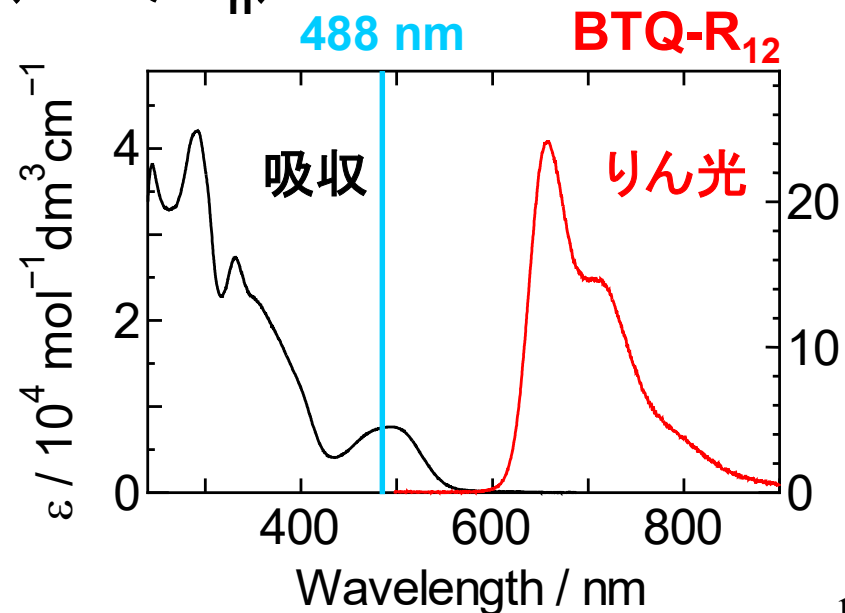
オリゴアルギニンを用いた血管イメージング試薬 (BTQ-R_n)

血管内皮
識別ユニット



n: 4, 8, 12, 16

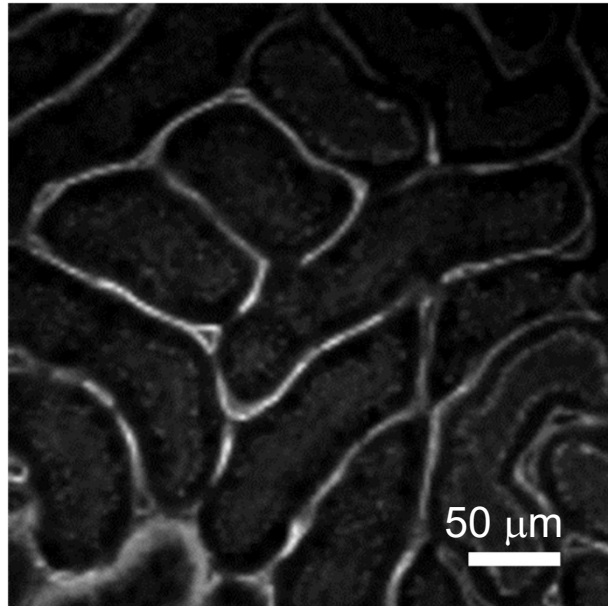
赤色
発光団



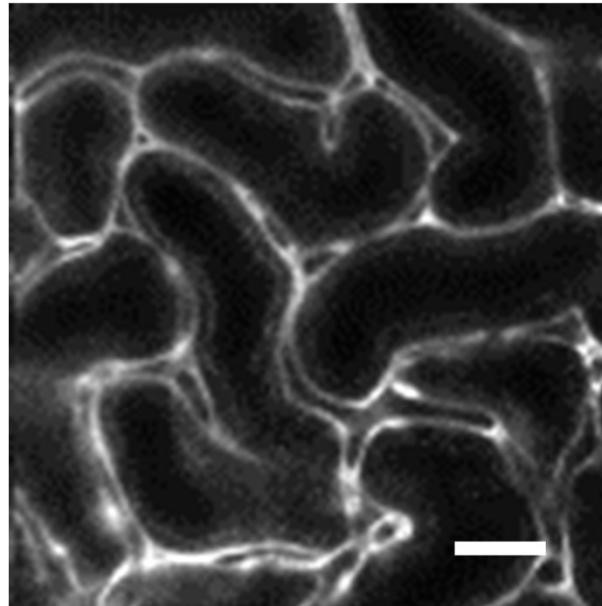
BTQ-R₁₂を用いた毛細血管イメージング

- ・ 麻酔下にあるマウスの尾静脈からFITC-lectin(1 mg/mL、50 μL)あるいはBTQ-R₁₂を100 nmol投与
- ・ 開腹して腎臓表面を共焦点蛍光顕微鏡で観察
FITC-lectin: 励起波長: 488 nm、観察波長: 500–560 nm
BTQ-R₁₂: 励起波長: 488 nm、観察波長: >590 nm

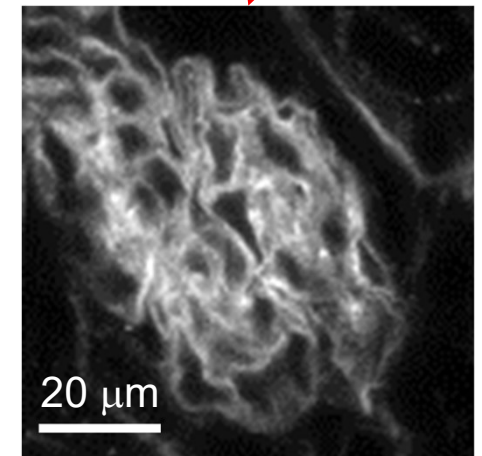
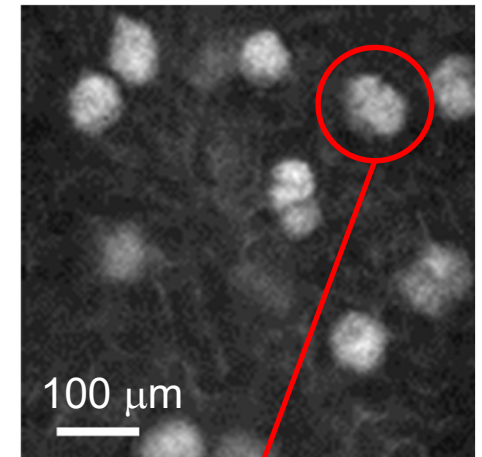
FITC-lectin



BTQ-R₁₂



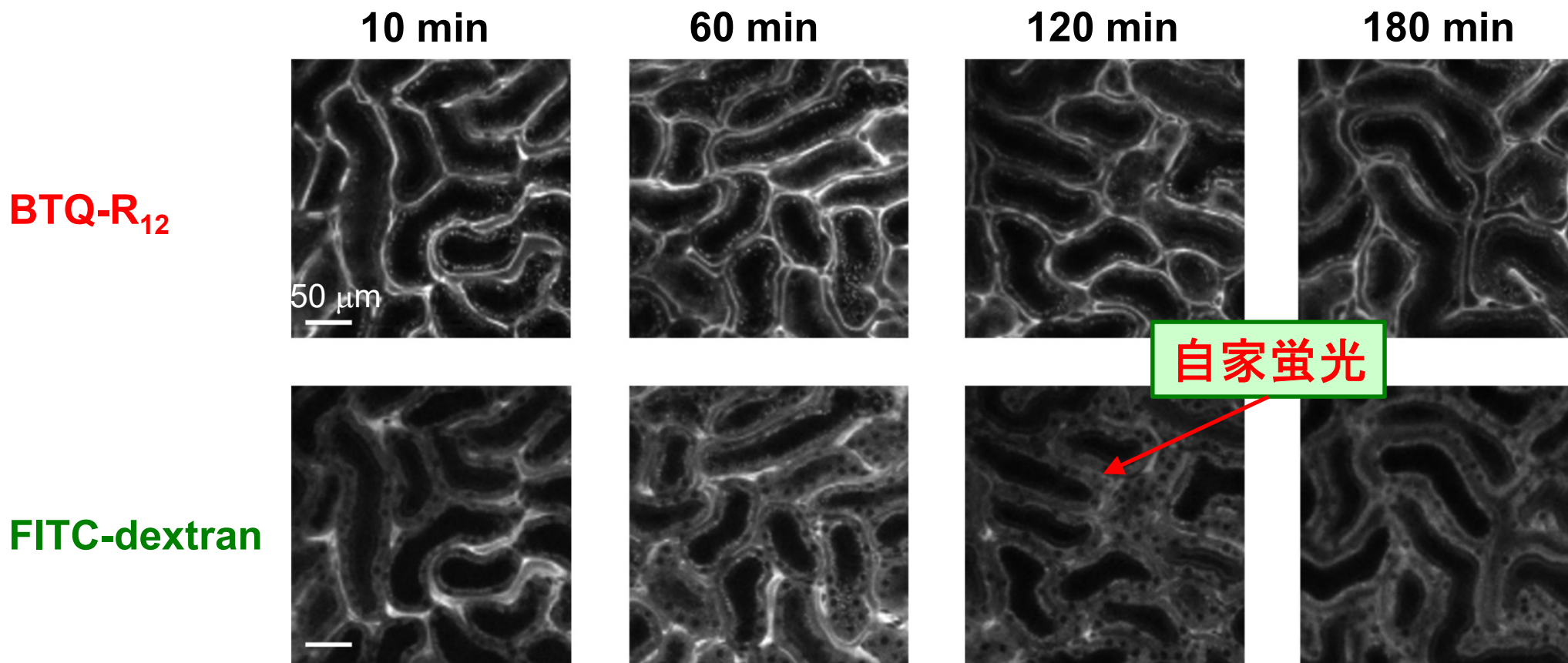
糸球体



BTQ-R₁₂はFITC-lectinと同様に
毛細血管を明瞭にイメージング

BTQ-R₁₂の血管滞留性

- ・ 麻醉下にあるマウスの尾静脈からFITC-dextran(70kDa、1 mg/mL、100 μ L)あるいはBTQ-R₁₂を100 nmol投与
- ・ 開腹して腎臓表面を共焦点蛍光顕微鏡で観察
FITC-dextran: 励起波長: 488 nm、観察波長: 500–560 nm
BTQ-R₁₂: 励起波長: 488 nm、観察波長: >590 nm



BTQ-R₁₂はFITC-dextranよりも長時間イメージングが可能

PC6SとBTQ-R₁₂を用いたNAFLイメージング

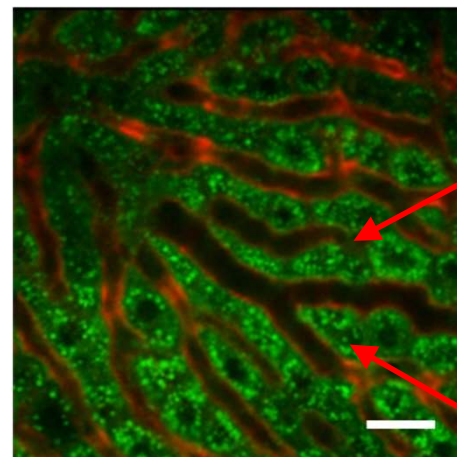
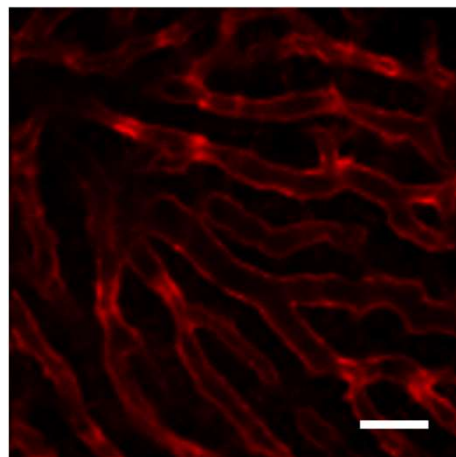
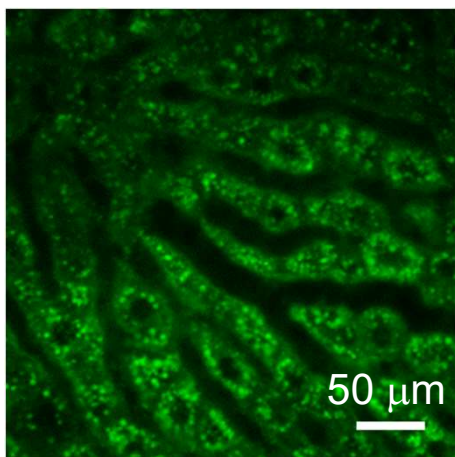
- ・ 麻醉下にあるマウスの尾静脈からPC6S(50 nmol)およびBTQ-R₁₂(100 nmol)を投与
- ・ 開腹して肝臓表面を共焦点蛍光顕微鏡で観察
FITC-lectin: 励起波長: 488 nm、観察波長: 500–560 nm
BTQ-R₁₂: 励起波長: 488 nm、観察波長: >590 nm

PC6S

BTQ-R₁₂

重ね合わせ

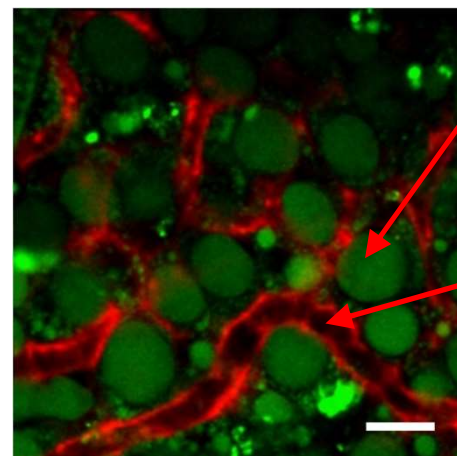
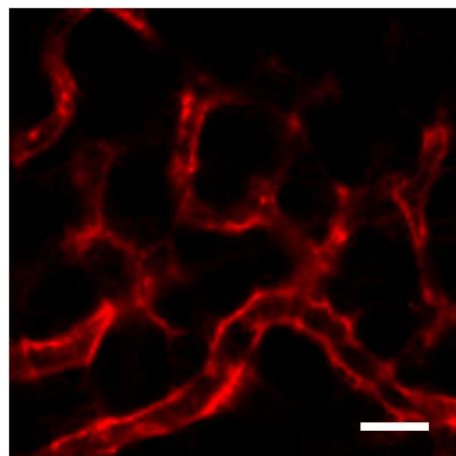
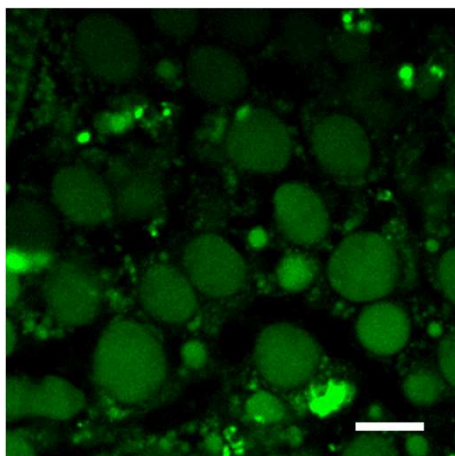
健常マウス



類洞

脂質滴

NAFLD
モデルマウス



類洞の
蛇行

PC6SとBTQ-R₁₂を用いて脂質滴と類洞を同時にイメージング

従来技術とその問題点

既に実用化されている脂質滴をイメージングする試薬は、

小動物内の脂質滴イメージングが困難

**脂質滴と血管走行の同時イメージングが
困難**

等の問題があり、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、**小動物内の脂質滴をイメージングすることに成功**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、組織親和性を向上できたため、**健常・病態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、小動物を用いた実験ができるため、**NAFLDの発生機構の解明、診断法、治療法の開発**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、本試薬をNAFLDモデル動物に適用することで、**病態の発生機構の解明、診断薬、治療薬開発のための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、**疾患と血管走行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、**他の疾患の蛍光イメージング**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、**試薬を尾静脈投与することで、組織内の脂質滴分布や血管走行についてイメージングが可能**なところまで開発済み。しかし、**脂質滴分布や血管走行の3次元(深部)イメージング**が未解決である。
- 今後、**透明化した組織**について実験データを取得し、**3次元イメージング**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、**試薬の安全性、薬物動態、安定性を明らかにする**必要もあり。

企業への期待

- 未解決の**3次元(深部イメージング)**については、**組織透明化やライトシート顕微鏡の技術**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：細胞および組織内脂質滴の蛍光イメージング試薬
 - 出願番号：特願2021-507397
PCT/JP2020/012002
 - 出願人：国立大学法人群馬大学
 - 発明者：吉原利忠、丸山凌、飛田成史
-
- 発明の名称：細胞および組織内脂質滴の蛍光イメージング試薬
 - 出願番号：PCT/JP2022/040063
 - 出願人：国立大学法人群馬大学
 - 発明者：吉原利忠、渋谷優妃

本技術に関する知的財産権

- 発明の名称：細胞および組織内脂質滴の赤色および深赤色
蛍光イメージング試薬
- 出願番号：特願2022-069958
- 出願人：国立大学法人群馬大学
- 発明者：吉原利忠、宇田梨紗

- 発明の名称：血管のイメージング試薬
- 出願番号：特願2022-571439
PCT/JP2021/046991
- 出願人：国立大学法人群馬大学
- 発明者：吉原利忠、安力川真美、鷺見さくら、飛田成史

産学連携の経歴

- 2022年-2023年 JST 研究成果展開事業
A-STEP トライアウトに採択
「組織内脂肪滴のライブイメージングのための赤色および近赤外蛍光性脂肪滴試薬の開発」

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

T E L : 0277-30-1171~1175

F A X : 0277-30-1178

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