

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5229700号  
(P5229700)

(45) 発行日 平成25年7月3日(2013.7.3)

(24) 登録日 平成25年3月29日(2013.3.29)

(51) Int.Cl.		F I		
<b>C 0 7 J</b>	<b>41/00</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>C 0 7 J</b>	<b>41/00</b> <b>C S P</b>
<b>C 1 2 Q</b>	<b>1/02</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>C 1 2 Q</b>	<b>1/02</b>
<b>G O 1 N</b>	<b>33/92</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>G O 1 N</b>	<b>33/92</b> <b>A</b>
<b>G O 1 N</b>	<b>21/78</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>G O 1 N</b>	<b>21/78</b> <b>C</b>

請求項の数 6 (全 10 頁)

(21) 出願番号	特願2007-110515 (P2007-110515)	(73) 特許権者	504145364
(22) 出願日	平成19年4月19日 (2007.4.19)		国立大学法人群馬大学
(65) 公開番号	特開2008-266192 (P2008-266192A)		群馬県前橋市荒牧町四丁目2番地
(43) 公開日	平成20年11月6日 (2008.11.6)	(74) 代理人	100100549
審査請求日	平成22年4月15日 (2010.4.15)		弁理士 川口 嘉之
		(74) 代理人	100089244
			弁理士 遠山 勉
		(74) 代理人	100126505
			弁理士 佐貫 伸一
		(72) 発明者	吉原 利忠
			群馬県桐生市天神町一丁目5番1号 国立
			大学法人群馬大学内
		(72) 発明者	飛田 成史
			群馬県桐生市天神町一丁目5番1号 国立
			大学法人群馬大学内

最終頁に続く

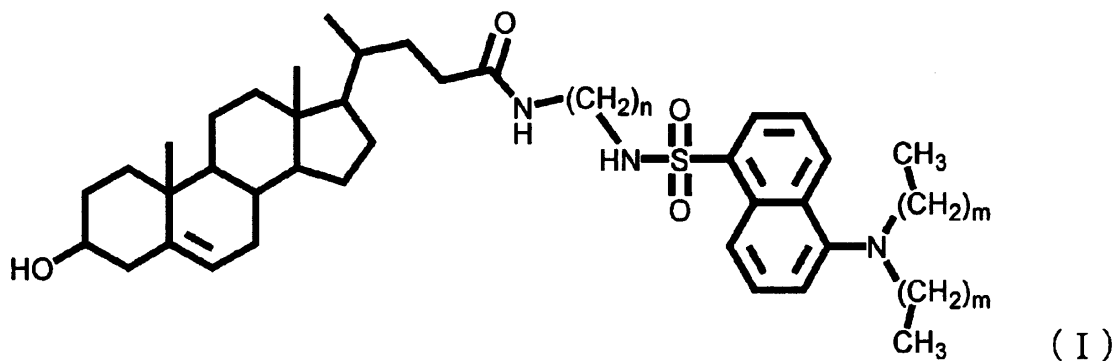
(54) 【発明の名称】 新規蛍光化合物およびそれを用いた細胞内コレステロールの検出方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

下記一般式(1)で表される化合物。

【化 1】



10

n は 2、m は 0 ~ 3 の整数を示す。

【請求項 2】

n が 2 であり、m が 0 である、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 3】

20

請求項 1 または 2 に記載の化合物を単離された細胞に添加し、蛍光を測定することを特徴とする、細胞内コレステロールの検出方法。

【請求項 4】

前記化合物を methyl- $\beta$ -cyclodextrin とともに溶解して単離された細胞に添加することを特徴とする、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

請求項 1 または 2 に記載の化合物を含む、コレステロール検出キット。

【請求項 6】

さらに methyl- $\beta$ -cyclodextrin を含む、請求項 5 に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

10

【技術分野】

【0001】

本発明は新規蛍光化合物に関する。本発明はまた、当該化合物を用いた細胞内コレステロール検出法および検出キットに関する。

【背景技術】

【0002】

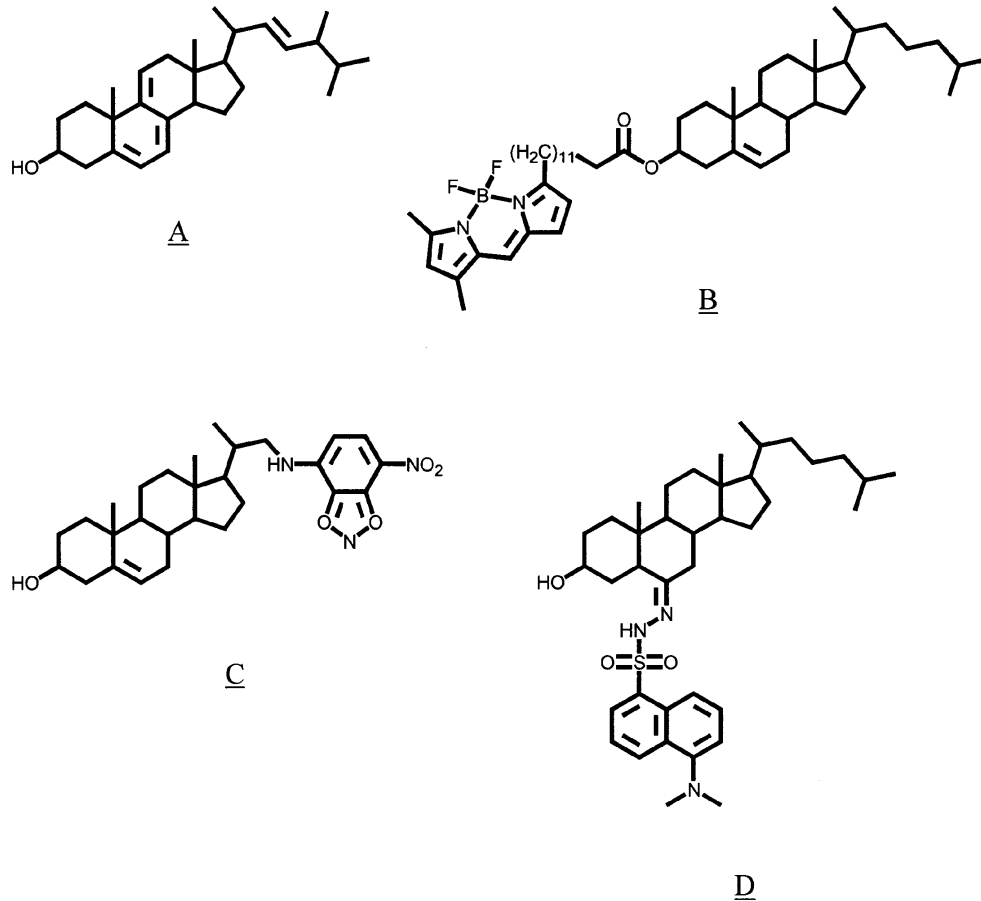
生体内のコレステロールの分布や動態を解析する上で、蛍光分光法は、高感度な分光法のため有用である。現在では、共焦点レーザー顕微鏡、二光子励起蛍光顕微鏡など測定機器が飛躍的に進歩し、高い時空間分解で分布や動態を解析することができる。しかしながらコレステロールは蛍光を示さないため、これらの技術を用いるためには、コレステロールに蛍光分子を標識させる必要があり、そのような蛍光性コレステロールが開発されている。ここで、重要な要素として、蛍光団を結合させてもコレステロール本来の性質を保持させなければならないことが挙げられる。

20

以下、これまで開発されている蛍光性コレステロールおよびそれらの問題点を示す。デヒドロエルゴステロール(下記化合物 A) はコレステロールに分子構造が類似しているため内因性コレステロールに近い性質を有する。しかしながら、蛍光強度が弱いため精度の高い解析が困難である。Molecular Probes 社(米国)において、コレステロールの 3 位のヒドロキシル基をエステル化して蛍光団を組み込んだ化合物(下記化合物 B) が販売されている。しかしながら、細胞内に存在するコレステロールは 3 位のヒドロキシル基が遊離して存在しており、細胞内コレステロールの動態解析には不向きである。また、同社はコレステロールの 2 2 位にニトロベンゾフラザンを置換した化合物(下記化合物 C) を市販している。しかしながら、化合物 C はミトコンドリアの膜に特異的に集積してしまいコレステロールの性質を保持していないことが報告されている[非特許文献 1]。近年、コレステロールの 7 位にダンシルヒドラゾンに結合させた化合物(下記化合物 D) が開発されている。D は内因性コレステロールの性質に近いことが報告されており、蛍光性コレステロールアナログとして使用されている[非特許文献 2]。

30

## 【化 1】



10

20

【非特許文献 1】S. Mukherjee, X. Zha, I. Tabas, and F. R. Maxfield, *Biophys. J.*, 1998, 75, 1915.

【非特許文献 2】V. Wiegand, T. Y. Chang, J. F. Strauss, III, F. Fahrenholz, G. Gimpl, *FASEB J.*, 2003, 17, 782.

【発明の開示】

30

【発明が解決しようとする課題】

【0003】

本発明は、細胞内コレステロールの検出などに有用な、新規な蛍光化合物を提供することを課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0004】

本発明者は上記課題を解決すべく鋭意検討を行った。その結果、下記一般式 (I) で表される蛍光化合物 (以下、本発明の化合物とも呼ぶ) を合成することに成功し、さらに、当該化合物が細胞内でコレステロールと同様の挙動を示すことを見出して本発明を完成するに至った。

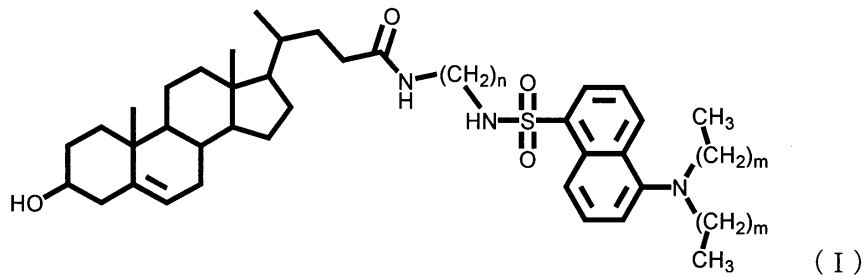
40

【0005】

すなわち、本発明は以下の通りである。

(1) 下記一般式 (I) で表される化合物。

## 【化2】



nは2～5の整数、mは0～3の整数を示す。

10

(2) nが2であり、mが0である、(1)の化合物。

(3) (1)または(2)の化合物を細胞に添加し、蛍光を測定することを特徴とする、細胞内コレステロールの検出方法。

(4) 前記化合物をmethyl- $\beta$ -cyclodextrinとともに溶解して細胞に添加することを特徴とする、(3)の方法。

(5) (1)または(2)の化合物を含む、コレステロール検出キット。

(6) さらにmethyl- $\beta$ -cyclodextrinを含む、(5)のキット。

## 【発明の効果】

## 【0006】

本発明の蛍光化合物は、細胞内に取り込まれ、コレステロールと同様の挙動を示すため、細胞内コレステロールの検出に好適に使用することができる。例えば、細胞内のコレステロール含有小胞の同定など、細胞内コレステロール分布の測定などに使用することができる。同化合物は細胞に添加してもアポトーシスなどの悪影響を起しにくいという利点も有している。

20

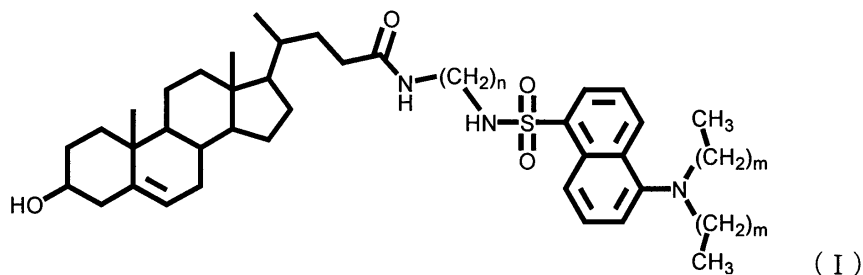
## 【発明を実施するための最良の形態】

## 【0007】

以下に本発明を詳しく説明する。

本発明の化合物は、以下の一般式(1)で表される。

## 【化3】

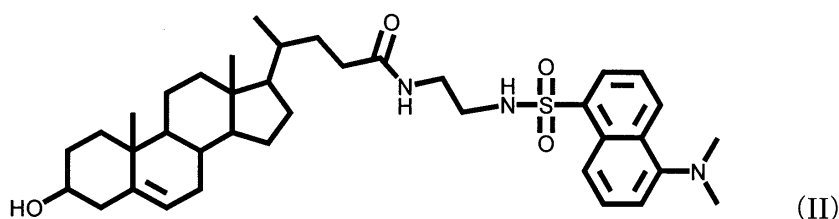


30

ここで、nは2～5の整数、mは0～3の整数を示す。

この中では、nが2であり、mが0である、下記の化合物が特に好ましい。

## 【化4】



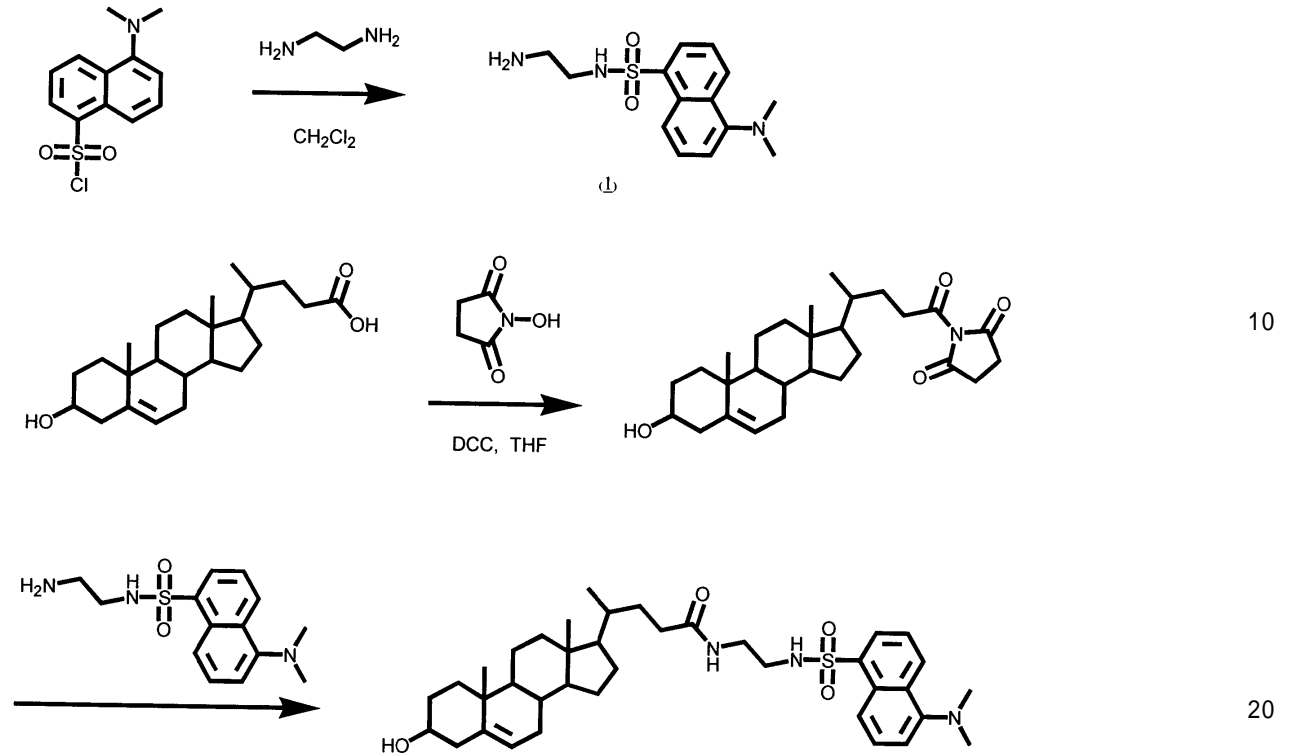
40

## 【0008】

この化合物は下記の合成方法によって合成することができる。なお、nが2であり、mが0である化合物以外の化合物も原料を代えることによって同様にして合成することができる。

50

## 【化5】



## 【0009】

本発明の化合物は、蛍光を発する。したがって、蛍光標識剤や蛍光プローブとして使用することができる。

特に、本発明の化合物は、細胞内に取り込まれ、コレステロールと同様の挙動を示すため、細胞内コレステロールの検出に好適に使用することができる。

## 【0010】

具体的には、本発明の化合物を細胞に添加し、蛍光顕微鏡などで蛍光を測定することによって、細胞内コレステロールの分布などを検出することができる。

検出対象の細胞の種類は特に制限されないが、コレステロールを蓄積する培養細胞が好ましい。

細胞に化合物を添加する場合、本発明の化合物を単独で添加してもよいし、同化合物の溶解を助ける働きをする他の化合物とともに添加してもよい。

本発明の化合物を単独で添加する場合、例えば、同化合物をDMSOなどに溶解させることができる。また、本発明の化合物を水に溶解しやすくするため、methyl- $\beta$ -cyclodextrinとともに水溶液にしてもよい。

本発明の化合物は培養細胞の培地中に加えることができるが、その濃度は細胞の種類によっても異なるが、好ましくは、0.5  $\mu$ M ~ 50  $\mu$ Mである。

蛍光顕微鏡などの蛍光測定装置を使用することによって本発明の化合物による蛍光を検出することができる。

なお、本発明の化合物を認識する抗体を用いて検出することも可能である。そのような抗体としては、本発明の化合物に含まれるダンシル基に対する抗体が挙げられる。

## 【0011】

本発明はまた、本発明の化合物を含むコレステロール検出キットに関する。該キットは、本発明の化合物を溶解するための溶媒や、methyl- $\beta$ -cyclodextrinなどの、本発明の化合物の溶解を助ける働きをする物質をさらに含むものであってもよい。また、本発明の化合物に対する抗体を含むものであってもよい。

## 【実施例】

## 【0012】

以下に実施例を示し、本発明をさらに具体的に説明する。もっとも、本発明は下記実施

例に限定されるものではない。なお、以下の実施例では、上記一般式 (I) において  $m = 0$ 、 $n = 2$  の化合物を DCho24 と呼ぶ。

【 0 0 1 3 】

実施例 1 : DCho24 の合成

1-ダンシルスルホンアミド-2-アミノエタン (1)

ダンシルクロリド (312 mg, 1.16 mol) を無水ジクロロメタン (8 ml) に溶解させ、エチレンジアミン (0.4 ml, 6 mmol) を加え、室温で1時間攪拌した。反応液にジクロロメタン (100 ml) 加え、水で2回洗浄した。有機層を  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  で乾燥させエバポレーターで減圧乾固させた (収量 : 320 mg, 収率 : 94 %)。

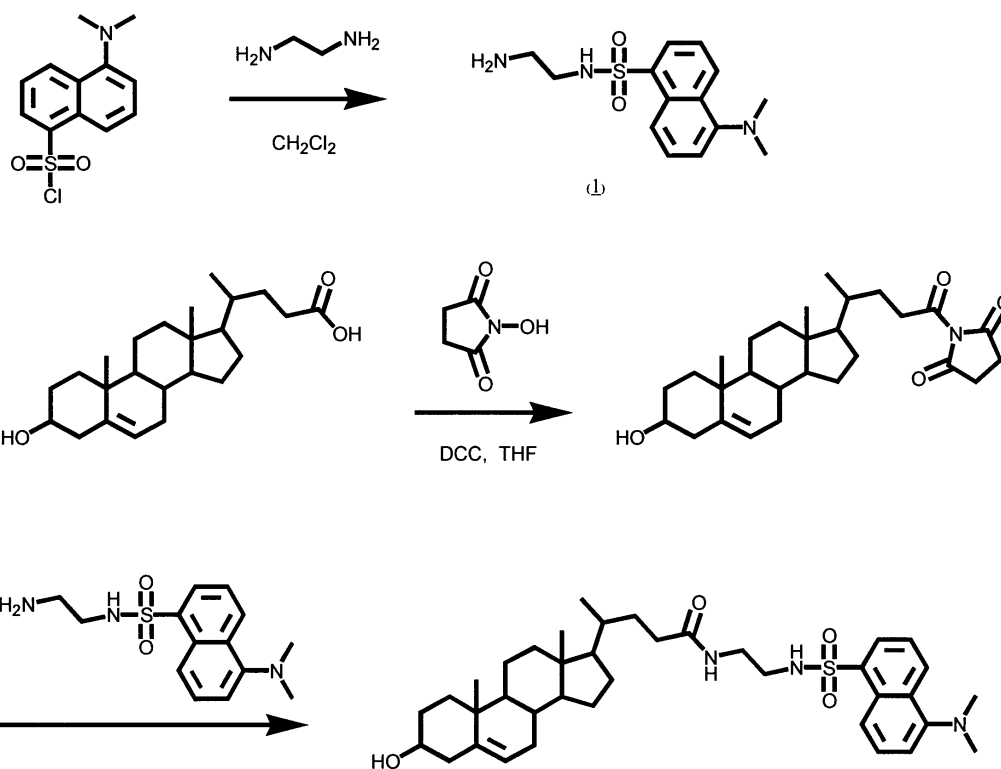
【 0 0 1 4 】

3-ヒドロキシ- $\delta^5$ -コレン酸 (0.201 mg, 0.54 mmol), N-ヒドロキシコハク酸イミド (130 mg, 0.65 mmol) を無水テトラヒドロフラン (15 ml) に溶解させ、氷浴で 0 °C に冷やす。この溶液にジシクロヘキシルカルボジイミド (130 mg, 0.63 mmol) を加え、0 °C で1時間、室温で24時間攪拌した。この溶液に1-ダンシルスルホンアミド-2-アミノエタン (1) (157 mg, 0.66 mmol) を加え、室温で24時間攪拌した。反応液をろ過し、N,N'-ジシクロヘキシル尿素を取り除き、ろ液にジクロロメタン (100 ml) を加え、水で2回洗浄した。有機層を  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  で乾燥させエバポレーターで減圧乾固させ、カラムクロマトグラフィー (充填剤 : シリカゲル, 展開溶媒 : クロロホルム : 酢酸エチル (7 : 3)) を用いて単離した (収量 : 180 mg, 収率 : 51 %)。

$^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS, RT) : 8.56-7.18 (6H, m, Ar-H of naphthalene), 5.78 (1H, s,  $-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-$ ), 5.30 (1H, m,  $-\text{C}=\text{H}-\text{CH}_2-$ ), 3.53 (1H, m,  $-\text{CH}_2-\text{C}(\text{OH})\text{H}-\text{CH}_2-$ ), 3.30-3.01 (4H, m,  $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-$ ), 2.89 (6H, s,  $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ), 2.23-0.68 (34H, m, cholesterol moiety)

【 0 0 1 5 】

【化6】



DCho24 の合成スキーム

【 0 0 1 6 】

実施例 2 : DCho24 の吸収・蛍光スペクトル

図 1 に DCho6 (前出の化合物 D), DCho24 のエタノール中における吸収および蛍光スペ

10

20

30

40

50

クトルを示す。これらの化合物は、ダンシル基を有しているため、340nm付近に吸収極大波長を示す。蛍光極大波長は、DCho6では527nm、DCho24では526nmであり、いずれも緑色蛍光が観測される。蛍光量子収率(  $\phi_f$  )は、DCho6では0.52、DCho24では0.59である。DCho24は、DCho6よりも蛍光量子収率が大きいいため、蛍光顕微鏡下での観測に有利である。

【0017】

実施例3：培養細胞での蛍光測定

マウス脾細胞由来MIN6細胞に75  $\mu$ M (溶媒DMSO) でdansyl-cholesterol probe (DCho6, DCho24)を添加して、5分、30分、1時間、2時間培養し、蛍光顕微鏡で各プローブの自家蛍光を観察した。その結果、図2に示されるように、DCho24は細胞内に取り込まれ、公知のコレステロールプローブであるDCho6よりも強い蛍光を示すことがわかった。

10

【0018】

次に、マウスマクロファージ細胞由来RAW264.7細胞において、75  $\mu$ M (溶媒DMSO) でdansyl-cholesterol probe (DCho6, DCho24)を添加して5分、30分、1時間、2時間培養し、蛍光顕微鏡で各プローブの自家蛍光を観察した。その結果、図3に示されるように、RAW264.7細胞においてもDCho24は細胞内に取り込まれ、公知のコレステロールプローブであるDCho6よりも強い蛍光を示すことがわかった。

【0019】

次に、マウスマクロファージ細胞由来RAW264.7細胞に5  $\mu$ Mのmethyl- $\beta$ -cyclodextrin (M $\beta$ CD)とdansyl-cholesterol probe (DCho24)の複合体(溶媒PBS)を添加して5分間培養し、同様に10分間添加培養したナイルレッド(細胞内脂質滴マーカー: SIGMA)との局在を顕微鏡で比較した。

20

結果を図4に示す。細胞内コレステロールはエステル化され脂質滴に貯えられるため、ナイルレッドで染色されるが、DCho24も同様の局在を示した。

【0020】

次に、マウスマクロファージ細胞由来RAW264.7細胞に5  $\mu$ Mのmethyl- $\beta$ -cyclodextrinとdansyl-cholesterol probe (DCho24)の複合体(溶媒PBS)を添加して5分間培養し、同様に10分間添加培養したナイルレッドとの局在を、コレステロールエステル合成阻害剤(ACAT阻害剤: SIGMA58-035)存在下(+)、非存在下(-)で比較した。結果を図5に示す。ACAT阻害剤はコレステロールの3位のアシルCoAから脂肪酸を転移し、コレステロールエステル合成を触媒する細胞内小胞体酵素阻害剤で、この阻害剤存在下ではコレステロールはエステル化されず、脂質滴に局在できないが、DCho24も同様の挙動を示した。

30

【0021】

実施例4：細胞毒性試験

チャイニーズハムスター卵巣由来CHO細胞に10  $\mu$ g/mlで種々の蛍光プローブ(DCho6, DCho24, dehydroergosterol (DHE), 22-NBD-cholesterol (NBD-choI), 7-ketocholesterol)を添加して培養し、24時間後に蛍光プローブ非存在下(control)との細胞毒性(アポトーシス)を比較した。具体的には、添加24時間後に、Hoechst 33342 (H0342)とPI試薬(プロピジウムアイオダイド)でアポトーシスが起きている細胞数をカウントとした。H0342はUV励起可能な核酸染色色素で青色蛍光を示し、アポトーシス細胞の凝縮された核では特に明るい蛍光を発する。一方、PIは原形質膜が損傷している細胞にのみ取り込まれる。このふたつの核酸染色剤を同時に使用した時の染色パターンから、健康な細胞群、アポトーシス細胞群、死細胞群を蛍光顕微鏡法で区別し、カウントした。

40

なお、DHE、NBD-choIは既存のコレステロール類似蛍光試薬である。7-ketocholesterolはアポトーシスのコントロールとして加えた。

結果を図6に示した。グラフのバーが大きいほど細胞毒性が高いことを示す。

その結果、DCho24は既存の蛍光プローブよりも細胞毒性が少ないことがわかった。

【図面の簡単な説明】

【0022】

【図1】DCho6およびDCho24のエタノール中における吸収(上)・蛍光(下)スペクトル

50

【図2】MIN6細胞の、DCho6（上段）、DCho24（下段）による染色結果を示す図（写真）。左から、5分、30分、1時間、2時間。

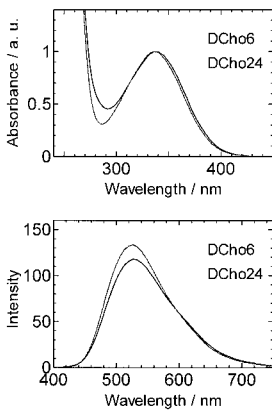
【図3】RAW264.7細胞の、DCho6（上段）、DCho24（下段）による染色結果を示す図（写真）。左から、5分、30分、1時間、2時間。

【図4】RAW264.7細胞における、DCho24染色像とナイルレッド染色像を示す図（写真）。左から、m CD-DCho24添加5分後、Nile Red 添加10分後、Merged、contrast phase。m CD-DCho24はDCho24をmethyl-β-cyclodextrinとともに溶解した溶液を細胞に添加したことを示す。Mergedは両染色像を重ね合わせた像、contrast phaseは光学像を示す。

【図5】RAW264.7細胞における、ACAT阻害剤存在下（下段）と非存在下（上段）での、DCho24染色像とナイルレッド染色像を示す図（写真）。左から、m CD-DCho24添加5分後、Nile Red 添加10分後、Merged、contrast phase。m CD-DCho24はDCho24をmethyl-β-cyclodextrinとともに溶解した溶液を細胞に添加したことを示す。Mergedは両染色像を重ね合わせた像、contrast phaseは光学像を示す。

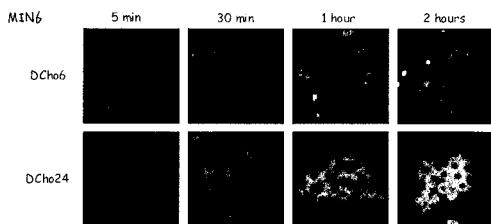
【図6】DCho24およびその他の蛍光化合物の細胞毒性を示す図。

【図1】



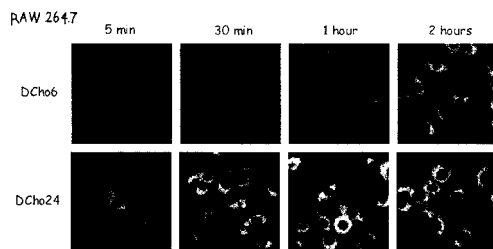
【図2】

Self Fluorescence of DCho6, DCho24



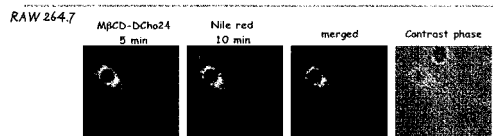
【図3】

Self Fluorescence of DCho6, and DCho24



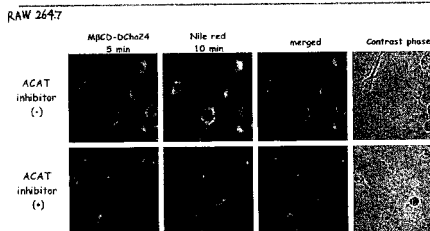
【図4】

Colocalization of DCho24 and Nile red



【図5】

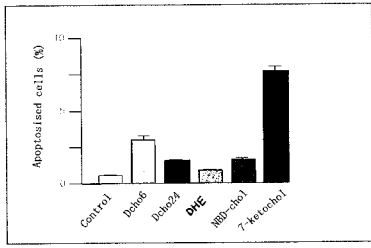
DCho24 and Nile red after ACAT inhibition





【 6 】

Apoptosis



## フロントページの続き

- (72)発明者 竹内 利行  
群馬県前橋市昭和町三丁目39番15号 国立大学法人群馬大学内
- (72)発明者 穂坂 正博  
群馬県前橋市昭和町三丁目39番15号 国立大学法人群馬大学内

審査官 清水 紀子

- (56)参考文献 特開2004-277312(JP,A)  
特表2000-506491(JP,A)  
国際公開第2007/022089(WO,A1)  
吉原利忠ら,分子構造総合討論会講演要旨集,2006年,p.2P080  
DESFOSES,B. et al, Interaction between rat alpha1-fetoprotein and fluorescent derivatives of estrone in relation to the position and type of the fluorescent label, Journal of Steroid Biochemistry, 1983年, Vol.19, No.6, p.1811-16  
CRAWFORD,J.M. et al, Physical and biological properties of fluorescent dansylated bile salt derivatives: the role of steroid ring hydroxylation, Biochimica et Biophysica Acta, Lipids and Lipid Metabolism, 1991年, Vol.1085, No.2, p.223-34

## (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07J 41/00

C12Q 1/02

G01N 21/78

G01N 33/92

CAPLUS/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)