

令和元年6月4日現在

機関番号：34413

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19880

研究課題名(和文)核医学的手法を用いた膵外作用指向型新規GLP-1アナログの開発

研究課題名(英文)Development of GLP-1 based imaging probes focused on extrapancreatic action of glucagon-like peptide receptor agonist

研究代表者

近藤 直哉 (Naoya, Kondo)

大阪薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：80756172

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、グルカゴン様ペプチド受容体アゴニスト(GLP-1RA)の膵外作用に着目し、生体内GLP-1R発現の定量を可能とする核医学イメージングプローブ、及びGLP-1Rが関与する炎症性疾患の診断用プローブを開発した。新規GLP-1Rプローブは、高比放射能、簡便な標識を実現し、GLP-1R高発現組織である膵臓への高集積性、放射能集積領域とGLP-1R発現領域の共局在性を有したことから、GLP-1Rイメージングプローブとして有効であると示された。一方、GLP-1RAによる治療効果の報告のある前立腺がん組織への集積性は低く、治療効果とGLP-1R発現量の相関については今後の詳細な検討が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

GLP-1Rはインスリン放出に関わるターゲットとして着目されており、GLP-1Rアゴニストが糖尿病治療薬として上市されている。近年の研究では、GLP-1Rアゴニストは、がん、動脈硬化、アルツハイマー病など多様な疾患への治療効果を有することが示され、GLP-1Rの各疾患での機能、GLP-1Rアゴニストの生体内挙動の解明が求められている。本研究ではGLP-1Rイメージングプローブの開発やGLP-1Rの治療標的となる炎症性疾患のマーカーを標的としたイメージングプローブの開発に成功した。本研究成果はGLP-1R作動薬と治療に関連する今後の診断・治療領域の医療に有益な情報をもたらすと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we focused on the extrapancreatic action of glucagon-like peptide receptor agonist (GLP-1RA) and developed a novel imaging probe that enables quantification of GLP-1R expression in vivo. In addition, we developed novel probes targeting MMPs, representative markers of inflammatory diseases which are therapeutic targets for GLP-1 RA. The novel GLP-1R imaging probe achieves high specific activity, convenient labeling, and high accumulation in pancreas, which is a GLP-1R high expression tissue. And co-localization of the radioactive accumulation region and the GLP-1R expression region were observed. As a result, it was shown to be effective as a GLP-1R imaging probe. On the other hand, the accumulation in prostate cancer tissues that have been reported to have therapeutic effects by GLP-1RA is low. Therefore, the correlation between the therapeutic effects and the amount of GLP-1R expression needs to be examined in detail in the future.

研究分野：核医学診断

キーワード：放射性医薬品 GLP-1

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

GLP-1 (Glucagon-like peptide-1) は消化管より分泌されるホルモンであり、膵臓の GLP-1 受容体 (GLP-1R) を刺激することで、インスリン分泌を促進する。GLP-1 は生体内の DPP-4 等の酵素により分解を受けるため、安定性を向上させた GLP-1 アナログが GLP-1R 作動薬として多数開発・上市されており、糖尿病治療薬として良好な効果が認められている。最近の研究においては、前立腺がんにおいて、GLP-1R 高発現腫瘍の GLP-1R アゴニストを用いた治療報告や、アルツハイマー病 (AD) モデル動物において GLP-1 アナログが脳内 GLP-1R に作用し、アミロイドプラークの形成を抑制する結果が報告されている。臨床においても、AD 患者に対する GLP-1 アナログの治療有効性の評価が計画されるなど GLP-1R アゴニストの膵臓以外への作用、いわゆる膵外作用が注目されている。しかしながら、GLP-1R アゴニストの膵外作用については対象疾患における標的への移行量や代謝物による効果など、GLP-1R との相互作用について詳細な検証がなされていない。したがって、GLP-1 アナログの膵外作用のメカニズム解明に資する手法の開発が強く求められ、その手法の開発は GLP-1R 刺激を機序とする治療薬開発や既存薬の適応拡大等に重要な情報をもたらすと考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、生体内分子を体外より非侵襲的に捉える質的診断法である核医学診断法に着目し、GLP-1R を標的とする核医学イメージングプローブの開発を目的とする研究を実施した。イメージングプローブの設計として、膵外の GLP-1R は発現密度が低い可能性を有するため、標的の競合阻害が生じない比放射能の高いプローブとすること、また、簡便で汎用性の高い標識を可能とすること、の 2 点の条件を満たす新規プローブを GLP-1 アナログ Exendin-4 (Ex4) を母体として設計した。膵外作用の標的としては、前立腺がんを設定し、モデル動物を用いた動態評価を行った。さらに、GLP-1R アゴニストの作用により増減すると考えられる炎症性疾患のマーカーであるマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) の定量を可能とする新規イメージングプローブについても並行して創製し、GLP-1R アゴニストの膵外作用の解明のため、核医学的手法を用いた多面的なアプローチにより研究を推進した。

3. 研究の方法

(1) [¹²⁵I]Ex4 の設計・合成

Ex4 の配列の N 末端に標識用のチオールを有するアミノ酸 Cys を導入したペプチド Ex4-0-Cys を設計した。Ex4-0-Cys は、Fmoc 法により固相合成後、95%TFA により脱樹脂し、逆相 HPLC により精製した。標識に用いる *N*-(3-[¹²⁵I]iodophenyl)maleimide ([¹²⁵I]IPM) は前駆体 (*N*-[3-Tri-(*n*-butyl)stannylphenyl]maleimide) からスズ-ヨウ素交換により合成した。得られた Ex4-0-Cys (50 µg/ 100 µL PBS(-)) とアセトニトリルに溶解した [¹²⁵I]IPM を 40、30 分間反応させ、下記条件における逆相 HPLC により精製を行い、[¹²⁵I]Ex4 を得た。

Condition; 5C₁₈-AR-II 10×250 mm column, 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) in water/0.1%TFA in acetonitrile= 90/10 (0 min) to 50/50 (20 min), flow rate = 5.0 mL/min.

(2) [¹²⁵I]Ex4 の GLP-1R 発現細胞結合性評価

野見山らの実験結果 (*Diabetes*. 2014) を参考に、GLP-1R 低発現細胞としてヒト前立腺がん細胞 PC-3 を、GLP-1R 高発現細胞としてヒト前立腺がん細胞 LNCaP をそれぞれ Ham's F-12 培地、RPMI 培地により培養した。陽性対照として、顕著な GLP-1R 発現が報告されるラットインスリノーマ細胞 RIN-m5F を RPMI (High glucose) 培地により培養した。各細胞の GLP-1R 発現評価のため、4%パラホルムアルデヒドによる固定後、一次抗体に抗 GLP-1R 抗体、二次抗体に Alexa488 標識抗体を用い、蛍光顕微鏡により観察した。核染色には Hoechst33342 を用いた。結合性評価のため、6 well プレートに PC-3, LNCaP, RIN-m5F 細胞を播種し、実験当日に 1%BSA 含有 RPMI 培地に交換した。6 well プレート中に [¹²⁵I]Ex4 (18.5 kBq/ 1 mL RPMI) を添加し、4 1 時間インキュベートした。阻害群として、10 μM の Ex4 を添加したのものについて同様にインキュベートを行った。インキュベート後、well 内を 0.1 % Tween80 含有 PBS (TPBS) で wash し、1M NaOH により細胞を溶解、回収し、放射能を測定した。細胞由来のタンパク量は BCA 法により定量し、結合量 (%ID/mg protein) を算出した。

(3) 体内分布実験 (正常動物)

ddY マウス (雄性、6 週齢) に [¹²⁵I]Ex4 (18.5 kBq/100 μL TPBS) を尾静脈より投与後、5, 15, 45, 120 分後に麻酔下で屠殺し、血液採取、心臓、肺、肝臓、腎臓、胃、腸、膵臓、脾臓、筋肉、脳を摘出した後、重量及び放射能を測定し、集積量 (%ID/g) を算出した。

(4) オートラジオグラフィによる膵臓内集積局在評価

ddY マウス (雄性、6 週齢) に [¹²⁵I]Ex4 (370 kBq/ 100 μL TPBS) を尾静脈より投与後、30 分後に麻酔下で屠殺し、膵臓を摘出・凍結後、クリオスタットにより 20 μm の薄切片を作製した。切片についてイメージングプレートに 10 日間コンタクトし、オートラジオグラムを得た。隣接切片に関して、抗インスリン抗体、HRP 標識二次抗体、DAB 染色により GLP-1R 陽性領域である細胞の染色を行った。

(5) 体内分布実験 (担癌モデル動物)

BALB/c nu/nu マウス (雄性、4 週齢) に PC-3, LNCaP, RIN-m5F 細胞を皮下移植した担癌モデル動物を作製し、[¹²⁵I]Ex4 (18.5 kBq/ 100 μL TPBS) を尾静脈より投与後、30 分後に麻酔下で屠殺し、血液採取、及び心臓、肺、肝臓、腎臓、胃、腸、膵臓、脾臓、筋肉、脳、腫瘍を摘出した後、重量及び放射能を測定し、集積量 (%ID/g) を算出した。

4. 研究成果

(1) [¹²⁵I]Ex4 の設計・合成

[¹²⁵I]Ex4 は、放射化学的収率 73%、純度 99%以上で合成した。また標識前駆体である Ex4-0-Cys の保持時間は 16.8 min、[¹²⁵I]Ex4 の保持時間は 17.3 min となり、両者の分離が可能であった。[¹²⁵I]Ex4 の比放射能は 740 MBq/mg 以上であった。

(2) [¹²⁵I]Ex4 の GLP-1R 発現細胞結合性評価

細胞染色の結果、GLP-1R 発現量は PC-3 < LNCaP < RIN-m5F となった (Fig. 1a)。[¹²⁵I]Ex4 は RIN-m5F への結合性を示し、過剰量の Ex4 の添加により集積量は有意に低下した。一方で、LNCaP、PC-3 における [¹²⁵I]Ex4 の結合量は RIN-m5F と比較して低く、LNCaP においては過剰量の Ex4 の添加により集積量の低下傾向を認めたものの、PC-3 とともに有意な減少は認められなかった (Fig. 1b)。

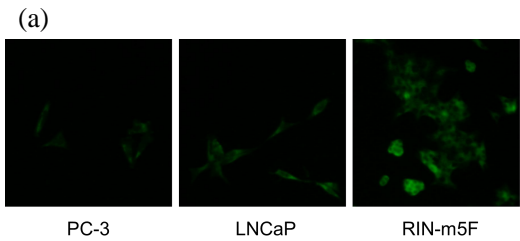
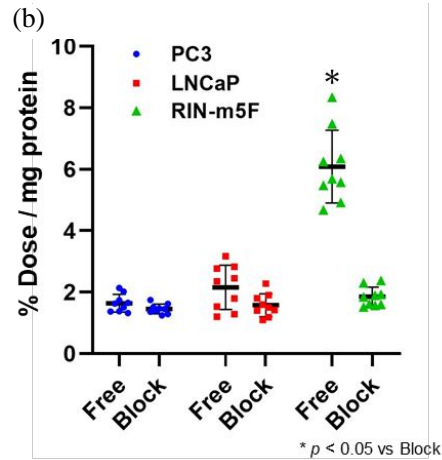


Fig.1a Immunostaining of GLP-1R expression in PC-3, LNCaP, and RIN-m5F cells.

Fig.1b Radioactivity accumulation in PC-3, LNCaP, and RIN-m5F cells.



(3) 体内分布実験 (正常動物)

[¹²⁵I]Ex4 は投与 45 分後において GLP-1R 発現臓器である膵臓に 23.3%ID/g と高集積を示し、集積放射能の膵臓/血液比は 16.5 と高コントラストな GLP-1R イメージングを可能とする優れた体内動態を示した (Fig. 2)。

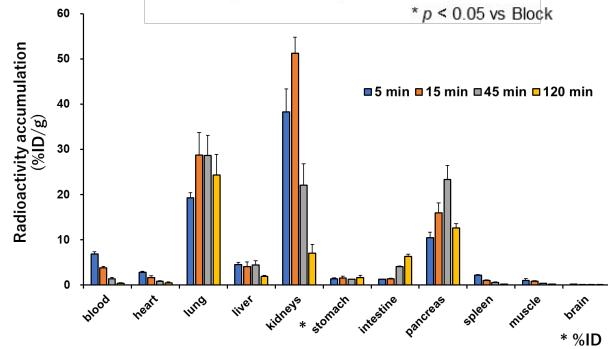


Fig.2 Biodistribution of [¹²⁵I]Ex4

(4) オートラジオグラフィによる膵臓内集積局在評価

[¹²⁵I]Ex4 は投与 30 分後における膵臓内放射能分布は GLP-1R 陽性領域である細胞の局在と一致することが隣接切片におけるインスリン染色により示された (Fig. 3)。

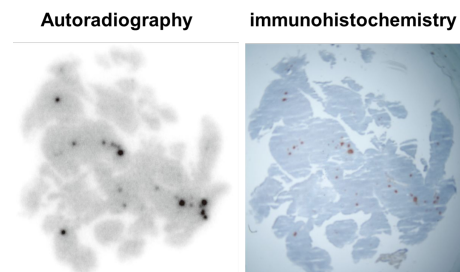


Fig.3 representative sections of autoradiogram (left) and insulin staining (right)

(5) 体内分布実験 (担癌モデル動物)

各種腫瘍における [¹²⁵I]Ex4 投与 30 分後の集積量を示した (Fig. 4)。RIN-m5F 腫瘍に極めて高い放射能集積を示し、[¹²⁵I]Ex4 のインスリンイメージングプローブとしての有効性が示された。一方、前立腺がん PC-3, LNCaP 由来の腫瘍への高い放射能集積は認められなかった。

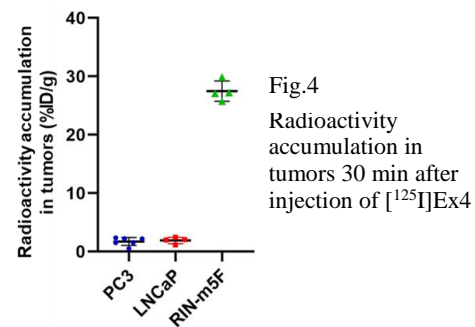


Fig.4 Radioactivity accumulation in tumors 30 min after injection of [¹²⁵I]Ex4

(6) 炎症疾患イメージングプローブの開発

新規開発した [¹⁸F]IPFP は、各種 MMP への高い阻害活性を示した (MMP-2; IC₅₀ = 4.4 nM, MMP-12; IC₅₀ = 1.5 nM)。¹⁸F-IPFP 投与後の肺への放射能集積量は 90 分後にモデル動物群で 4 倍高く、肺/血液比は 10 以上となった (Fig. 5)。よって、[¹⁸F]IPFP は炎症疾患のマーカーである MMP のプローブとして有効である可能性が示された。

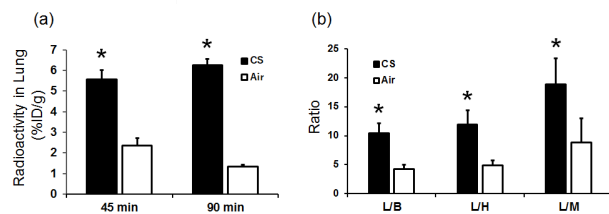


Fig. 5

(a) Radioactivity accumulation in the lungs of mice in the CS and Air groups at 45 and 90 min after injection of [¹⁸F]IPFP. (b) Radioactivity accumulation ratio (L/B, lung to blood; L/H, lung to heart, L/M, lung to muscle) for the CS and Air groups at 45 min after injection.

以上、本研究では、GLP-1R を標的としたイメージングプローブ^[125I]Ex4 の開発、及び炎症疾患マーカー MMP イメージングプローブ^[18F]IPFP の開発に成功した。^[125I]Ex4 は GLP-1R 過剰発現腫瘍であるインスリノーマや膵臓に発現する GLP-1R イメージングに有効であると考えられるが、本研究で膵外作用のモデルとして作製した前立腺がんモデルマウスへ適用は困難であると示唆された。今後は、新たなモデル動物の採用を含め、開発した^[125I]Ex4 の集積データと、免疫染色等で得たモデル動物の GLP-1R 発現量の相関や治療効果との関係の精査を継続し、GLP-1R アゴニストによる治療効果と GLP-1R 発現量の相関、またその適用診断の可能性について追求する予定である。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Kondo N, Temma T, Aita K, Shimochi S, Koshino K, Senda M, Iida H, Development of matrix metalloproteinase-targeted probes for lung inflammation detection with positron emission tomography. *Scientific reports*, 8(1): 1347 (2018) 査読有

〔学会発表〕(計 8 件)

近藤 直哉、天満 敬、相田 一樹、國見 昌子、下地 佐恵香、千田 道雄、飯田 秀博：慢性閉塞性肺疾患の質的イメージングを目的とした MMP 活性標的新規 PET プローブの開発、第 56 回 日本核医学会学術総会 (2016 年 11 月、名古屋)

近藤 直哉、天満 敬、下地 佐恵香、飯田 秀博：前立腺がんを発現する GLP-1 受容体を標的とした新規放射性ヨウ素標識プローブの開発、日本薬学会第 137 年会 (2017 年 3 月、仙台)

Kondo N, Temma T, Aita A, Shimochi S, Koshino K, Senda M, Iida H; Development of matrix metalloproteinase-targeted probes for PET imaging of COPD. Society of Nuclear Medicine and Molecular Imaging 64th Annual Meeting (2017 年 6 月、Denver, USA)

近藤 直哉、天満 敬、相田 一樹、下地 佐恵香、千田 道雄、飯田 秀博：慢性閉塞性肺疾患のインビボ病態分析のための MMP 標的核医学イメージングプローブの開発、第 15 回 次世代を担う若手のためのフィジカル・ファーマフォーラム (2017 年 9 月、金沢)

近藤 直哉、天満 敬、依田敬子、西郡寛太郎、尾江悟、塩見雅志、小野正博、佐治英郎：動脈硬化の質的診断を目的とした酸化 LDL 結合性核医学イメージングプローブの開発、第 5 回日本ウサギバイオサイエンス研究会学術集会 (2018 年 7 月、神戸)

近藤 直哉、天満 敬、相田 一樹、下地 佐恵香、千田 道雄、飯田 秀博：疾患におけるマトリックスメタロプロテアーゼ発現のインビボ定量法構築を目的とした核医学イメージングプローブの開発、第 68 回 日本薬学会近畿支部総会・大会 (2018 年 10 月、姫路)

池田 有快、近藤 直哉、大石 綾香、平田 雅彦、天満 敬：糖尿病薬リキシセナチドを母体とした GLP-1 受容体標的イメージングプローブの開発、日本薬学会第 139 年会 (2019 年 3 月、千葉)

中林 真理、近藤 直哉、土屋 友亮、平田 雅彦、天満 敬：CD147/EMMPRIN 結合ペプチド AP9 を母体とする放射性ヨウ素標識ペプチドプローブの開発、日本薬学会第 139 年会 (2019 年 3 月、千葉)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.oups.ac.jp/academics/lab/ba.html>

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名:

研究者番号(8桁):

(2)研究協力者

研究協力者氏名:

ローマ字氏名: