

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 3 月 31 日現在

機関番号：14301
 研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22390185
 研究課題名（和文）糖尿病の超早期診断のための核磁気共鳴画像（MRI）による膵島定量法の開発
 研究課題名（英文）Development of the novel diagnostic method for quantification of pancreatic beta-cell mass by magnetic resonance imaging
 研究代表者
 稲垣 暢也（Nobuya Inagaki）
 京都大学・医学（系）研究科・教授
 研究者番号：30241954

研究成果の概要（和文）：2型糖尿病の病態を膵β細胞量の観点から解析するため、非侵襲的に核磁気共鳴画像(MRI)を用いて画像化できるかどうか検討した。初めに、マウスより摘出した膵臓断片を種々の解析条件でMRI撮像したが膵島は描出できなかった。Gd造影剤などを用いて同様に検討したが同様の結果であった。そこで、β細胞に発現するグルカゴン様ペプチド1 (glucagon-like peptide-1) 受容体(以下GLP-1R)のリガンドであるexendin(9-39)にフッ素(F)を付加したプローブを単離した膵島に暴露してMRI解析を行った。しかし、前検討で認められたシグナルが全く認められず、膵β細胞腫瘍株のINS-1細胞を用いて同様の実験を行っても結果は同様であった。シグナルが得られない原因探索のため、このプローブのGLP-1R親和性を結合実験で評価した結果、親和性が著明に低下していることが判明した。そこで、新たにexendin-4にFを付加したプローブを合成した。このプローブのGLP-1R親和性はexendin-4と同様に維持されていた。研究期間は終了したが、今後このプローブを用いてMRI解析を行う予定である。

研究成果の概要（英文）：The volume of pancreatic β-cells is known to decrease during development and progression of diabetes. The aim of this study is to develop the technique of measurement of β-cell volume in vivo by using magnetic resonance imaging (MRI). We first evaluated whether pancreatic islets were detected by various analytical parameters of MRI with or without the common enhancers such as Gd-solution or not, however, they were not imaged. Second, we tried to perform MRI by using newly developed probe. We synthesized the probe by adding the fluorine to one of the ligands of glucagon-like peptide-1 receptor (GLP-1R), exendin(9-39), which is specifically expressed on pancreatic β-cells. However, contrary to our preliminary experiment, no signals were detected at all. Same analysis using INS-1 cell line showed similar poor results. The reason of this poor signal was suggested to be due to the extremely low affinity of our fluorine-labeled exendin(9-39) to GLP-1R compared to intact exendins. Therefore, we synthesized new probe that fluorine was added to exendin-4, another GLP-1R ligand, and it showed similar binding affinity to intact exendins. We are now planning to perform MRI analysis by using this new probe.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2012年度	5,800,000	1,740,000	7,540,000
2013年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2014年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学

キーワード：エネルギー・糖質代謝異常・イメージング

1. 研究開始当初の背景

我が国における2型糖尿病の増加は深刻な状況にある。現在、この対策として耐糖能検査を基準とした糖尿病発症前の介入が行われているが、十分な成果が得られていない(厚生労働省)。その原因として、耐糖能障害出現段階で既に膵島量は減少していることが示唆されている(Diabetes Care. Vol29, 2006)。従って、非侵襲的に膵島量を検知する技術が開発されれば、糖尿病の質的超早期診断が可能となるだけでなく、膵島回復の可塑性が残存する時期へ介入でき、最も効果的な糖尿病予防が可能となる。

我々はすでに膵β細胞特異的に発現するGLP-1受容体に結合するGLP-1拮抗ペプチドのExendin(9-39)の有用性を報告してきた(Mukai, E., et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 389: 523, 2009)。

RIプローブによるPETでの評価は現在もっとも定量性に優れる診断法であるが、放射性試薬を用いなければならない。

今回我々は放射性試薬を用いない非侵襲的な解析可能なmagnetic resonance imaging (MRI)による解析に着目した。

2. 研究の目的

非侵襲的に膵β細胞量の検知を行うことを可能とする、MRIを用いた解析の基盤技術を開発する

3. 研究の方法

- i) プローブ: フッ素分子を6個導入されたExendin(9-39)もしくはExendin4を神戸天然物化学において合成する
- ii) 結合実験: 野生型マウスより膵島を単離後、トリプシンEDTAを用いて単一細胞に分離する。¹²⁵I 標識-BH-Exendin(9-39)を暴露する際、種々の濃度のプローブを同時に暴露する。洗浄後、放射能と測定し、IC50を算出する。
- iii) プローブ暴露実験: 野生型マウスより膵島を単離後、0.5mMのプローブを含むもしくは含まない培養液中で30分暴露後、PBSで洗浄後3回洗いMR解析を行った。

iv) MR解析: 齧歯類用高磁場MRI装置を用いて、MRIならびにNMR解析を実施した。

4. 研究成果

平成22年度は、付加条件無しでの膵島描出を検討した。アガロース中に膵β細胞特異的に蛍光タンパクを発現する遺伝子改変マウスより摘出した膵臓を切片化して埋包し、蛍光実体顕微鏡で3次的に部位を決定した後、解析部位を膵島部に限定してMRI撮像解析を行った。Gd造影剤などを用い、種々の撮像条件で解析したが、膵島を描出できる撮像条件は得られなかった。そこで、プローブ存在下でのMRI解析の検討に移行した。平成22年度に確立した膵島分離条件で単離した膵島を用いて以下の実験を行った。まず予備試験の¹⁹F MR解析のファントム実験でシグナルを認めた¹⁹Fで標識したExendin(9-39)を1.1×10⁴IEQの膵島へ30分暴露後、3回PBSで洗浄後に¹⁹F MR解析を施行した。しかしながら、明らかなシグナルの再現が認められなかった。そこで、単位細胞当たりのプローブ結合面積拡大を期待して、膵島を0.05%トリプシンを用いて単一細胞に分離させた後に、¹⁹Fで標識したExendin(9-39)を暴露する実験を行った。それでも、MR解析において、明らかなシグナルの再現が認められなかった。予備検討の結果との乖離の原因として、解析の直前にそれまで用いていた消化酵素のロットが変更となったため、消化の条件が大幅に変化し、それに伴い膵島の消化状態が以前と異なり、膜たんぱくが高度に傷害されている可能性ことや、GLP-1受容体発現が¹⁹F MR解析で検知するには少ない可能性を考えた。そこで、シグナルの感度を上げた実験を可能とするために、細胞株を用いた*in vitro*での評価系を構築することを試みた。平成23年度にはGLP-1受容体の発現ベクターを作成し、それをHEK293細胞にトランスフェクションし、GLP-1受容体を過剰発現させた上で上記と同様の暴露実験を行うために、ヒトGLP-1受容体のフラグメントをpcDNATM3.1/HisAベクターのマルチプルクローニングサイトに挿入した。サブクローニングして得られたベクターをシークエンスを行って核

酸配列を確認し、目的のベクターを得ることができた事を確認した。同ベクターを HEK293 細胞にトランスフェクションし、細胞を回収後ウエスタンブロッティングを行い、タンパクの発現を調べたが、コントロールのレポータータンパクも含めて発現が認められず、MR 解析の実験を遂行できなかった。ベクターの作り直しを余儀なくされた。平成 24 年度は GLP-1 受容体をカイコに強発現させて感染細胞から膜画分を精製し、それを用いる Binding assay 法を新たに構築し、¹⁹F 標識 Exendin(9-39)と ¹⁹F 標識 Exendin4 それぞれの GLP-1 受容体への結合能を、新たに構築した Binding assay 法で評価した結果、¹⁹F 標識 Exendin(9-39)の結合能が 100 分の 1 に低下しており、¹⁹F 標識 Exendin4 の結合能は Exendin4 と同様に保たれていることが判明した。¹⁹F 標識 Exendin(9-39)の結合能が著明に低下する原因は不明であったが、単離膵島での再現ができない理由の 1 つと考えられた。以上の結果をふまえ、結合能が維持されていた ¹⁹F 標識 Exendin4 を用いて INS1 細胞への暴露実験を実施した。その結果、¹⁹F 標識 Exendin4 は GLP-1 受容体を介して INS1 細胞に結合していることを示すことができた。¹⁹F-MRI で細胞量に応じた ¹⁹F シグナルが得られるかどうかの実験をする前に、最終年度末を迎えたが、今後も実験を重ねて ¹⁹F 標識 Exendin4 プローブを利用した ¹⁹F-MRI による非侵襲的イメージングの可能性を評価する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 10 件)

- i) Sasaki, M., Fujimoto, S., Inagaki, N. (他 8 人、11 番目) Reduction of reactive oxygen species ameliorates metabolism-secretion coupling in islets of diabetic GK rats by suppressing lactate overproduction. *Diabetes* 62: 1996-2003, 2013.
- ii) Himeno, T., Kamiya, H., Inagaki, N.(他 14 人、14 番目) Beneficial effects of exendin-4 on experimental polyneuropathy in diabetic mice. *Diabetes* 60: 2397-2406, 2011.
- iii) Suzuki, K., Harada, N., Inagaki, N.(他 10 人、13 番目). Transcriptional regulatory factor X 6 (Rfx6) increases gastric inhibitory polypeptide (GIP) expression in enteroendocrine K-cells and

is involved in GIP hypersecretion in high-fat diet-induced obesity. *J. Biol. Chem.* 288: 1929-1938, 2013.

iii) Fujimoto, H., Toyoda, K., Inagaki, N. (他 6 人、9 番目). Three dimensional ex vivo imaging and analysis of intraportal islet transplants. *Transpl. Int.* 24: 839-844, 2011.

iv) Fujimoto S, Mukai E, Inagaki, N. Role of endogenous ROS production in impaired metabolism-secretion coupling of diabetic pancreatic β cells. *Prog Biophys Mol Biol.* 304-310,2011

v) Takeda, Y., Amano, A., Noma, A., Nakamura, Y., Fujimoto, S., and Inagaki, N. Systems analysis of GLP-1 receptor signaling in pancreatic β -cells. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* 301: C792-803, 2011.

vi) Ogawa, E., Yamada, Y., Inagaki, N. (他 10 人、13 番目). The effect of gastric inhibitory polypeptide on intestinal glucose absorption and intestinal motility in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 404: 115-120, 2011.

vii) Mukai, E., Fujimoto, S., Okada, M., Inagaki, N. (他 6 人、10 番目).Exendin-4 suppresses Src activation and reactive oxygen species production in diabetic GK rat islets in an Epac-dependent manner. *Diabetes* 60:218-226, 2011

viii) Uonaga, T., Toyoda, K., Okitsu, T., Liu, X.-B., Yamane, S., Uemoto, S., and Inagaki, N. FGF-21 enhances islet engraftment in mouse syngeneic islet transplantation model. *Islets.* 2: 247-251.

ix) Kawasaki, Y., Harashima, S., Inagaki, N. (他 10 人、13 番目). Exendin-4 protects pancreatic beta cells from the cytotoxic effect of rapamycin by inhibiting JNK and p38 phosphorylation. *Horm. Metab. Res.*42: 311-317, 2010.

x) Fujita, Y., Inagaki, N. (他 10 人、12 番目). Metformin suppresses hepatic gluconeogenesis and lowers fasting blood glucose levels through reactive nitrogen species. *Diabetologia* 53: 1472-1481, 2010.

〔学会発表〕(計 5 件)

i) Toyoda, K. Iwanaga, Y., Kawaguchi, M., Uemoto, S., Inagaki, N. Current status of clinical pancreas and islet transplantation in Japan. 9th International Diabetes Federation Western Pacific Region Congress / 4th Scientific Meeting of the Asian Association for the Study of Diabetes. Kyoto, Japan. 2012.11.27

ii) Fujimoto, H., Toyoda, K., Kimura, H., Saji, H.,

Inagaki, N. (他 8 人、13 番目). Development of non-invasive PET probe for quantifying pancreatic β -cell mass using fluorine-18-labeled exendin-4. 9th International Diabetes Federation Western Pacific Region Congress / 4th Scientific Meeting of the Asian Association for the Study of Diabetes. Kyoto, Japan. 2012.11.27

iii) Toyoda K, Kimura H, Inagaki N. (他 10 人、13 番目). Development of non-invasive PET probe for quantifying pancreatic β -Cell mass using fluorine-18-labeled exendin-4. American Diabetes Association 71th Scientific Sessions. San Diego, CA., USA. 2011.6.29

iv) Fujimoto, H., Inagaki, N. (他 9 人、11 番目). Non-Invasive SPECT Imaging of Pancreatic Islets Targeting Glucagon-Like Peptide-1 Receptors. American Diabetes Association 71th Scientific Sessions. San Diego, CA., USA. 2011.6.30

v) 豊田健太郎、木村寛之、稲垣暢也 (他 9 人). GLP-1 受容体を標的とする非侵襲的膵島イメージングの PET 用プローブの開発. 第 54 回日本糖尿病学会年次学術集会、札幌. 2011.5.19

[図書] (計 2 件)

i) 豊田健太郎、稲垣暢也 膵 β 細胞の非特異的定量法開発の現状 *Diabetes Frontier* 23:391-397, 2013.

ii) 豊田健太郎、稲垣暢也 GLP-1 の膵島再生・膵島イメージングへの応用 *最新医学* 66: 90-96, 2011

[産業財産権]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

稲垣 暢也 (Nobuya Inagaki)
京都大学・医学 (系) 研究科・教授
研究者番号: 30241954

(2) 研究分担者

- i) 豊田 健太郎 (Kentaro Toyoda)
京都大学・医学 (系) 研究科・講師
研究者番号: 004477971
- ii) 松田 哲也 (Matsuda Tetsuya)
京都大学・情報学研究科・教授
研究者番号: 00209561
- iii) 富樫 かおり (Kaori Togashi)
京都大学・医学 (系) 研究科・教授

研究者番号: 90135484

iv) 木村 寛之
京都大学・薬学研究科・助教
研究者番号: 50437240

v) 上田 真史
京都大学・医学 (系) 研究科・助教
研究者番号: 40381967

(3) 連携研究者

なし