

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 21 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461334

研究課題名(和文) 蛍光イメージング法を用いた量的診断法の開発

研究課題名(英文) Development for pancreatic beta cell imaging method by using a fluorescent probe

研究代表者

藤本 裕之 (FUJIMOTO, Hiroyuki)

京都大学・環境安全保健機構・助教

研究者番号：50437274

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：蛍光イメージング手法を用いた膵細胞の量的評価方法の確立を目的に研究を開始した。膵細胞において高発現しているGlucagon like-peptide-1受容体(GLP-1R)を標的分子としたexendinを基本骨格とする蛍光プローブを作製した。まず、評価を簡便に行うためにGLP-1Rを高発現する細胞HEK-GLP-1Rを構築した。プローブの基礎的性能評価は、結合親和性評価、細胞への結合評価、膵切片の染色実験により行った。本研究で検討を行った蛍光標識exendinプローブは膵細胞イメージングの可能性を有するものと考えられた。

研究成果の概要(英文)：In this study, I start to develop the imaging method for measuring a pancreatic beta cell mass by using fluorescent probe. A fluorescent probe with exendin frame was prepared. The probe targeted a glucagon like-peptide 1 receptor (GLP-1R) which highly expressed in pancreatic beta cells. To evaluate the probe properties, binding affinity study and binding study for cells, and immunostaining study of pancreatic slices were performed. The specific binding for GLP-1R was shown by binding affinity study. And the binding for cell with GLP-1R was shown by fluorescent image analysis and flow cytometry analysis. These studies showed that the fluorescent probe with exendin has a possibility for imaging the pancreatic beta cell and analyzing the mass.

研究分野：糖尿病

キーワード：膵島イメージング 蛍光イメージング

1. 研究開始当初の背景

近年、糖尿病患者およびその予備軍の数は増加の一途をたどっている。1型糖尿病は、膵β細胞が選択的に障害され、膵島が枯渇する糖尿病である。強化インスリン療法によっても良好なコントロールが困難であり、合併症の進行により医療経済上も大きな問題となっている。また、2型糖尿病においても、現在、日本における患者数は推定890万人を越え、近年その増加は世界的にも深刻な状況にある(厚生労働省)。この2型糖尿病においても、耐糖能障害出現段階で既に膵島量は減少していること、そして膵島量の減少により治療抵抗性となる可能性が指摘されている(Diabetes Care. Vol29, 2006, Diabetes. Vol.44, 1995)。また、最近では、膵β細胞量を増加させる、もしくは、減少を抑制する可能性のある薬の開発が進んだことや、1型糖尿病の治療法として膵島移植が期待されることにより生体内の膵β細胞量を非侵襲的に知るための技術、とくに膵β細胞イメージング技術が注目されている。膵島イメージング技術を用いることで、より早期に膵島量の減少をとらえることができれば早期介入で糖尿病の進行を抑制し、発症率の低下が期待できる。また、糖尿病の発症と膵島量の関係や現在特定されていない糖尿病の成因の解明にも大きく寄与できると考えられる。これまでのところ、膵β細胞のイメージングのために核磁気共鳴画像法(MRI)や核医学的イメージング、生体発光イメージングなどの研究が進められている。しかしながら、生体内の膵島量を評価するための十分な機能を持ったプローブ開発には至っていないのが現状である。申請者もこれまでに膵島特異的に発現しているGLP-1受容体を標的にした放射性同位元素標識プローブの開発に携わり、PET用プローブおよびSPECT用プローブの作製に成功している。放射性同位元素を用いたプローブの問題点は、作製時や使用時の被爆が懸念されることである。そこで、本申請では、放射性同位元素標識プローブ作製時に得られた知見を基にして、GLP-1受容体に特異的に結合するExendinを骨格とした蛍光イメージングプローブの作製および蛍光膵島イメージングを行うことが最初の目的である。

また、申請者はこれまでにOptical Projection Tomography(OPT)を用いて、マウス肝臓に移植した膵島の三次元的観察について検討(科学研究費若手B課題番号22790617)し、移植膵島の観察及び膵島数・量の評価に成功している(Transplant international, 24, 839-844 2011)。OPTはJ. Sharpeらによって確立された光投射型断層撮影技術(Science 296: 541-545, 2002)を用い二次元の断層画像から生体標本の三次元画像を再構築する技術である。OPTでは、共焦点顕微鏡で観察可能なサンプルよりも大きな組織を5-50μmの高分解能で観察でき、

生体内に発現するRNAやタンパク質を切片を作製することなく観察可能であるため、従来の切片からの解析では不可能であった臓器単位での正確な三次元的解析が可能となる。今回の膵島特異的蛍光プローブを利用することで、これまでOPT用の試料作製で必須であった免疫染色過程を省略することができる利点がある。OPTを用いることで、より詳細な膵島の数・量について蛍光イメージング結果との相関を評価すること可能となる。

本研究の最終的な目的は、膵島(膵β細胞)特異的蛍光標識プローブを用いて膵臓内の膵β細胞の定量評価系を確立し、さらに、糖尿病の発症と膵島量の関係を明らかにすることにある。

2. 研究の目的

増え続ける糖尿病患者及びその予備軍の数を抑制するために、膵β細胞の量的観点から糖尿病の病態を解析することが求められている。そのためには、生体内に存在する膵β細胞量を早期に検知する必要がある。本申請では、GLP-1受容体に特異的に結合するExendinを骨格とする蛍光イメージングプローブの作製および蛍光膵島イメージングを行い、糖尿病の発症と膵β細胞量の関係を明らかにすることを目的としている。

3. 研究の方法

(1) 蛍光標識Exendinの合成

Rink-amide MBHA resinを用いた固相合成法によりExendin骨格を有するペプチドを合成した。蛍光分子(FITC、TAMRA)を結合させた後、TFAにより脱保護を行い精製し目的の化合物を得た。

(2) 作製したプローブの基本性能評価

- ・GLP-1受容体高発現細胞の構築
- ・結合実験：作製プローブのGLP-1受容体への結合親和性評価

HEK-GLP-1R細胞の懸濁液に非標識exenin4または、蛍光標識exendin4を 1×10^{-12} から 1×10^{-5} までの濃度で各チューブに添加後125I標識Ex9-39を添加し、1時間後にガラスフィルターを用いて細胞を回収した。γカウンタにてフィルター内のRIカウントを測定し結合親和性を評価した。

・細胞への結合評価：蛍光顕微鏡およびフローサイトメトリーによる評価

HEK-GLP-1R細胞(DMEM(10%FBS、P/S含)にて維持培養)を35mmガラスボトムディッシュ上に播種した。接着後細胞をHBSSにて洗浄し、binding buffer中200nMになるように蛍光標識exendinを添加した。30分反応後PBS(-)にて洗浄し、蛍光顕微鏡にて観察を行った。ブロッキング処理は蛍光プローブ添加30分前に20μMになるように非標識exendinを添加し行った。フローサイトメトリーには蛍光顕微鏡観察後セルスクレイパーにて細

胞を回収し懸濁液を調製後評価した。

- ・プローブ構造の再検討：骨格ペプチドと蛍光プローブの結合様式の再検討
- ・膵切片の染色評価

C57BL/6 マウスの膵臓を摘出しクライオモルド内にて 0. C. T. コンパウンドを用いて封入し凍結させることで凍結ブロックを得た。次に 5 μ m の凍結切片を作成した。アセトン固定の後 BlockingOne にてブロッキングを行った。洗浄後 100 nM 蛍光プローブ溶液により染色し洗浄後、蛍光顕微鏡にて観察を行った。

4. 研究成果

(1) 蛍光 exendin の合成

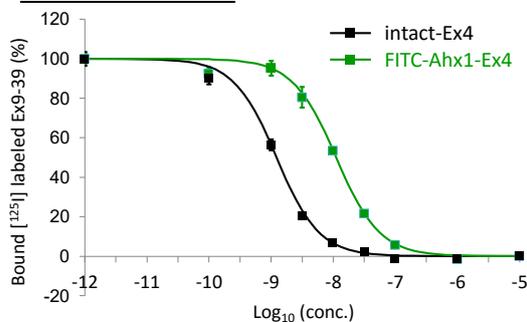
Exendin 骨格が有するアミノ基に対して n-hydroxysuccinimide (NHS) を用いて蛍光分子を縮合反応により付加させ、サイズ排除クロマトグラフィーを用いて精製した。しかしながら反応効率が低く十分な収量が得られなかったため、スペーサーを導入し、標識部位を限定することで十分な化合物を得、その後の検討に使用した。

(2) プローブの基礎的検討

GLP-1 受容体高発現細胞の作製

プローブの GLP-1 受容体への結合評価を行うために GLP-1 受容体高発現細胞を作製した。HEK 細胞に GLP-1 受容体のコンストラクトを導入し HEK-GLP-1R 細胞を構築した。

結合親和性の評価



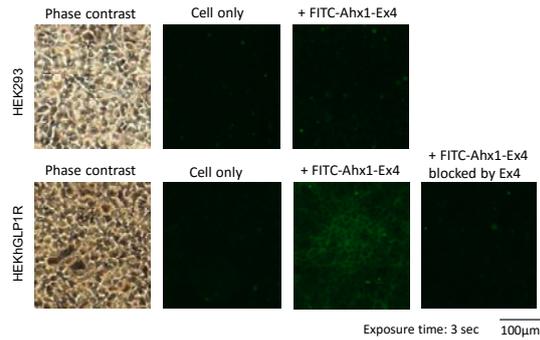
結合実験の結果、蛍光標識プローブは GLP-1 受容体特異的であることを示すことができた。しかしながら、IC₅₀ は、intact-Ex4 では 1.2 nM であったのに対し、FITC-Ahx1-Ex4 では 11.3 nM であった。蛍光分子の導入により結合能が低くなったと考えられる。

細胞への結合評価

蛍光イメージ

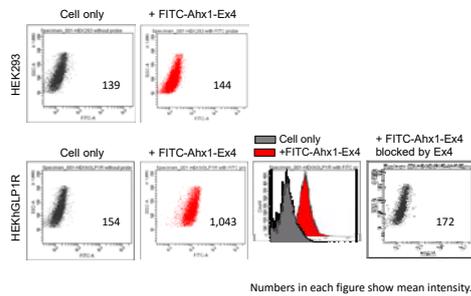
まず、GLP-1 受容体の発現のない HEK293 細胞では蛍光プローブ添加の有無に関わらず蛍光は観察されなかった。GLP-1 受容体を発現する HEK-GLP-1R 細胞においてはプローブ由来の蛍光が観察でき、かつプローブ添加前に過剰の非標識 exendin4 を添加した blocking 系においてはその蛍光は観察できなかった。このことから、プローブは GLP-1 受容体を介

して細胞に結合していることが分かった。



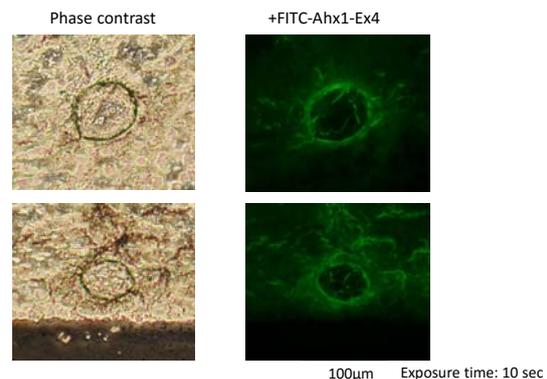
フローサイトメトリー

次に、蛍光標識プローブの細胞への結合をフローサイトメトリーにて実施した。HEK293 細胞においては蛍光標識プローブの有無での細胞の分布 (mean 値) は変わらなかった。それに対して、HEK-GLP-1R 細胞では、プローブを反応させることでプローブ由来の蛍光を検出し、プローブ反応前と比較して大きくシフトしていることが観察できた。非標識 exendin による blocking 処理を行ったところプローブの細胞への結合が抑制され各細胞におけるプローブ由来の蛍光は観察されなかった。このことから蛍光標識 exendin プローブは GLP-1R 特異的に細胞へ結合していることが明らかとなった。



膵切片での膵β細胞の染色評価

蛍光プローブをマウス膵の凍結切片に反応させた結果、膵島とくに膵β細胞への十分な染色を観察することができなかった。染色の条件についてさらなる検討が必要であると同時に蛍光分子の結合方法の検討が必要であると考えられた。



以上のことから蛍光標識 exendin は GLP-1 受容体特異的に結合し、細胞レベルでの評価が可能であり、膵β細胞イメージングへの利用可能性を示すことができた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

① Kimura H, Matsuda H, Ogawa Y, Fujimoto H, Toyoda K, Fujita N, Arimitsu K, Hamamatsu K, Yagi Y, Ono M, Inagaki N, Saji H, Development of ¹¹¹In-labeled exendin(9-39) derivatives for single-photon emission computed tomography imaging of insulinoma. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 査読有、25 巻、1406-1412. DOI:10.1016/j.bmc.2016.12.051

② Kimura H, Matsuda H, Fujimoto H, Arimitsu K, Toyoda K, Mukai E, Nakamura H, Ogawa Y, Takagi M, Ono M, Inagaki N, Saji H, Synthesis and evaluation of ¹⁸F-labeled mitiglinide derivatives as positron emission tomography tracers for β-cell imaging. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 査読有、22 巻、2014、3270-3278. DOI:10.1016/j.bmc.2014.04.059.

[学会発表] (計 14 件)

① 西田 なつき、木村 寛之、有光 健治、桶谷 亮、宮本 佳美、河嶋 秀和、藤本 裕之、渡邊 裕之、小野 正博、稲垣 暢也、佐治 英郎、安井 裕之：インスリノーマの局在診断を目指した PET 分子イメージングプローブの開発研究. 日本薬学会第 137 年会、2017 年 3 月 24 日-27 日仙台国際センター(宮城県仙台市)

② 桶谷 亮、木村 寛之、有光 健治、宮本 佳美、河嶋 秀和、藤本 裕之、渡邊 裕之、小野 正博、稲垣 暢也、佐治 英郎、安井 裕之：移植膵島量の定量評価を目的とした分子イメージング法の開発. 日本薬学会第 137 年会、2017 年 3 月 24 日-27 日仙台国際センター(宮城県仙台市)

③ 藤田 直尚、藤本 裕之、浜松 圭太、村上 隆亮、木村 寛之、豊田 健太郎、佐治 英郎、稲垣 暢也、GLP-1 受容体を標的とした、放射性同位元素標識プローブによる膵島尾量定量の試み 第 44 回日本膵・膵島移植研究会 2017 年 3 月 10、11 日 芝蘭会館(京都府京都市)

④ Fujimoto, H., Noninvasive pancreatic beta cell imaging, Asia Islet Biology and Incretin Symposium, 2017/3/3, Seoul

(Korea)

⑤ 藤田 直尚、藤本 裕之、浜松 圭太、村上 隆亮、木村 寛之、豊田 健太郎、佐治 英郎、稲垣 暢也、インジウム標識 Exendin プローブを用いた膵β細胞量定量に対する高血糖の影響の検討 第 31 回糖尿病・肥満動物学会、2017 年 2 月 10 日、はまぎんホール (神奈川県横浜市)

⑥ 浜松 圭太、藤本 裕之、藤田 直尚、塩谷 正治、木村 寛之、豊田 健太郎、佐治 英郎、稲垣 暢也、¹¹¹In-Exendin4 SPECT を用いたカナグリフロジンの膵β細胞保護効果の検討、第 31 回糖尿病・肥満動物学会、2017 年 2 月 10 日、はまぎんホール (神奈川県横浜市)

⑦ Fujita, N., Fujimoto, H., Hamamatsu, K., Kimura, H., Sano, K., Toyoda, K., Saji, H., Inagaki, N., Noninvasive Quantification of Beta-Cell Mass with Radioisotope-labeled Exendin Probe, American Diabetes Association 76th Scientific sessions, 2016/6/10-14, New Orleans LA (USA).

⑧ 藤田 直尚、藤本 裕之、浜松 圭太、村上 隆亮、木村 寛之、豊田 健太郎、佐治 英郎、稲垣 暢也 放射性同位元素標識プローブによる膵β細胞量の定量化 第 59 回日本糖尿病学会年次学術集会、2016 年 5 月 19 日、京都国際会館 (京都府京都市)

⑨ 藤田 直尚、浜松 圭太、藤本 裕之、稲垣 暢也、先制医療の実現に向けてバイオマーカーとしての膵β細胞量、第 59 回日本糖尿病学会年次学術集会、2016 年 5 月 19 日、京都国際会館 (京都府京都市)

⑩ 浜松 圭太、藤本 裕之、木村 寛之、藤田 直尚、佐治 英郎、稲垣 暢也、¹¹¹In-Exendin プローブを用いたマウス in vivo SPECT/CT 像の膵β細胞量の非侵襲的定量化のための画像解析法の検討、第 59 回日本糖尿病学会年次学術集会、2016 年 5 月 19 日、京都国際会館 (京都府京都市)

⑪ 藤田 直尚、藤本 裕之、浜松 圭太、木村 寛之、豊田 健太郎、佐治 英郎、稲垣 暢也、インジウム標識 Exendin プローブを用いた膵β細胞量定量の試み、第 30 回糖尿病・肥満動物学会 2016 年 3 月 11 日、大宮ソニックシティ (埼玉県大宮市)

⑫ Inagaki N, Fujimoto H, Kimura H, Hamamatsu K, Fujita N, Saji H, Non-invasive Pancreatic Beta-Cell Imaging Using Radiolabeled Exendin Probe. KEYSTONE SYMPOSIA” Diabetes:New Insights into Molecular Mechanisms and Therapeutic

Strategies” 2015年10月25日-28日、ウエ
スティン都ホテル（京都府京都市）

⑬ 稲垣 暢也、藤田 直尚、木村 寛之、
浜松 圭太、佐野 紘平、平井 光春、村上
淳、佐治 英郎、藤本 裕之、糖尿病の先制
医療、第112回日本内科学会講演会、2015年
4月10日、みやこめっせ（京都府京都市）

⑭ 藤田 直尚、藤本 裕之、木村 寛之、
浜松 圭太、神戸 香織、豊田 健太郎、佐
治 英郎、稲垣 暢也、膵β細胞特異的プロ
ーブを用いた膵島移植可視化の試み 第42
回膵・膵島移植研究会 2015年3月7日、京
王プラザホテル（東京都新宿区）

〔図書〕（計3件）

① 藤田 直尚、藤本 裕之、浜松 圭太、
稲垣 暢也、実験医学増刊 Vol. 35 No. 2 糖
尿病 研究の“いま”と治療の“これから”
綿田裕孝／編 2017年01月発行 ISBN
978-4-7581-0360-2

② 藤田 直尚、藤本 裕之、稲垣 暢也、
Medicament News 特集＝先制医療が目指す
もの 2型糖尿病の場合、2016年3月15日
第2225号 12-13

③ 藤本 裕之、稲垣 暢也 ホルモンと臨
床 特集ラ氏島研究 Update β細胞の非観血
的定量法 2014年1月号 62巻1号 47-52
2015年11月発行

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）
なし

○取得状況（計 0 件）
なし

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤本 裕之 (FUJIMOTO, Hiroyuki)
京都大学・環境安全保健機構・助教
研究者番号：50437274