

平成23年5月30日現在

機関番号： 82401

研究種目： 若手研究(B)

研究期間： 2009～2010

課題番号： 21791228

研究課題名(和文)

64Cuまたは68Ga標識Exendin-4を用いた膵臓β細胞の分子イメージング
研究課題名(英文) Pancreatic β cell imaging using 64Cu- or 68Ga-labeled Exendin-4

研究代表者

長谷川 功紀 (HASEGAWA KOKI)

独立行政法人理化学研究所・分子プローブ動態応用研究チーム・研究員

研究者番号： 50525798

研究成果の概要(和文)：

64Cuおよび68Ga標識Exendin-4の合成とPET撮像を行った。DOTA-Exendin-4はチオエステル法を用いて合成した。DOTAを有するN末端側セグメントとC末端側セグメントを縮合し、DOTA-Exendin-4を得た。得られたDOTA-Exendin-4には68Ga標識することができた。また64Cu標識Exendin-4は銅結合モチーフATCUNをExendin-4に導入し目的物を得た。得られたプローブを用いてPET撮像および生体内分布の解析を行った。生体内分布の結果から、肝臓、膵臓への高い集積を認めた。PETの結果から投与後30分以内であれば膵臓の集積を確認できた。それ以上は胆汁排泄により膵臓と腸管の集積が判別できなくなることが判った。

研究成果の概要(英文)：

64Cu- or 68Ga-labeled Exendin-4 was synthesized and PET imagings were performed. DOTA-Exendin-4 was synthesized by thioester method. N-terminal segment with DOTA moiety [DOTA-Exendin(1-4)] was condensed with C-terminal segment [Exendin-4(5-39)] to give DOTA-Exendin4. Obtained DOTA-Exendin-4 could be labeled with Ga-68. 64Cu-labeled Exendin-4 was synthesized utilizing Cu binding motif (ATCUN). Exendin-4 with ATCUN motif was could be labeled with Cu-64. PET imagings and biodistribution studies were performed. Biodistribution studies revealed the high accumulation in liver and pancreas. The results of PET imaging, the accumulation of pancreas was determined within 30 min after injection. Over 30 min, metabolized probe was secreted into the bile. So the accumulation of pancreas could not be distinguished from the intestine including the bile.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・放射線科学

キーワード：

PET、GLP-1 受容体イメージング、Exendin-4、⁶⁸Ga 標識、⁶⁴Cu 標識、チオエステル法

1. 研究開始当初の背景

2型糖尿病の研究において、臨床症状発症前の、つまりは血糖値が上昇する前の段階で膵臓のβ細胞数が一度代償的に上昇し、その後減少することが報告されている。そこでβ細胞数の増減を検査して確かめることができれば、糖尿病発症の予知・予防ができ、さらにはβ細胞保護剤等の開発を行う上でその治療効果を確認することができると考えた。そこで我々はそのための基礎技術開発としてβ細胞に高発現するソマトスタチン受容体イメージングにより膵臓のβ細胞数評価を試みた。しかしラットを用いた実験では膵臓に高い集積を示すソマトスタチン誘導体プローブが、マウスでは高い集積を示さなかった。ラットに対しマウスの方が遺伝子改変動物作成技術が進んでおり、より人間に近い糖尿病モデルでの実験が行える。そこでマウスではソマトスタチン受容体よりGLP-1受容体が高発現するとの報告から、GLP-1受容体リガンドのExendin-4をPETプローブ化しβ細胞数評価を試みた。

2. 研究の目的

非侵襲的膵β細胞数評価のための基盤技術として、Exendin-4のPETプローブ化とそれを用いた体内動態解析を行った。

3. 研究の方法

Exendin-4の合成では長鎖ペプチドの合成法であるチオエステル法によりキレーターである1,4,7,10-テトラアザシクロドデカン-N,N',N'',N'''-四酢酸(DOTA)をN末端に修飾したDOTA-Exendin-4を合成した。そこに⁶⁸Ge-⁶⁸Gaジェネレーターで溶出した⁶⁸Gaを標識しプローブを得た。また新規の⁶⁴Cu標識法の開発を行った。タンパク質の銅結合モチーフであるATCUNモチーフを利用し、その配列を有するExendin-4を合成した。そこに⁶⁴Cu標識しプローブを得た。

次に健康なマウスを用いて、動物用PETで撮像を行った。撮影後には、主要な臓器を取り出しγカウンターによる各臓器中の放射線の定量を行い、生体内分布の評価を行った。PET画像で得られた膵臓への放射線集積と実際に取り出した膵臓の放射線量を比較してPET画像から非侵襲的に膵臓β細胞数を定量できるか検討した。

4. 研究成果

(1) DOTA-Exendin-4の合成を行った。

DOTA-Exendin-4は最初にFmoc固相合成法を用いた逐次伸長法で合成を試みたが、得られた粗生成物からの目的物分離はRP-HPLCを用いても困難であった。そこでペプチドセグメント縮合法であるチオエステル法を用いて合成を行った。各セグメントはFmoc固相合成法により合成した。その際、N末端側ペプチドチオエステルフラグメントのN末端アミノ基へはDOTA(tBu)₃を導入した。またC末端側セグメントは合成後、側鎖アミノ基のみをBoc基で保護した部分保護ペプチドとして調製した。得られたフラグメントをチオエステル法にて縮合反応を行った。活性化剤としては硝酸銀、活性エステル成分としてはHOObtを用いた。

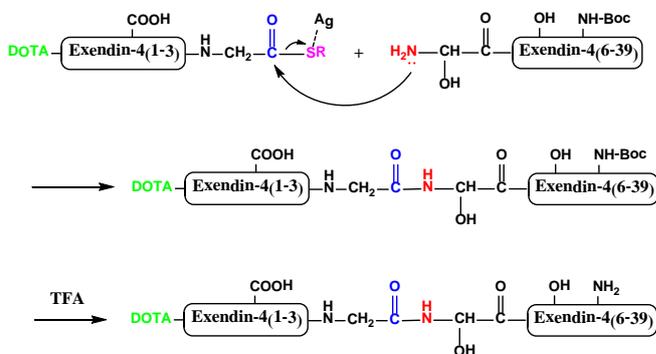


図 チオエステル法を用いた DOTA-Exendin-4 の合成

縮合反応後に目的物を精製し、側鎖保護基であるBoc基をTFA処理にて除去し最終目的物となるDOTA-Exendin-4を得た。目的物の確認は質量分析を用いた。DOTA-Exendin-4には⁶⁸Gaを標識することができた。このことからチオエステル法を用いてプローブ合成できることを明らかにした。また⁶⁸Ga-DOTA-Exendin-4の合成に成功した。

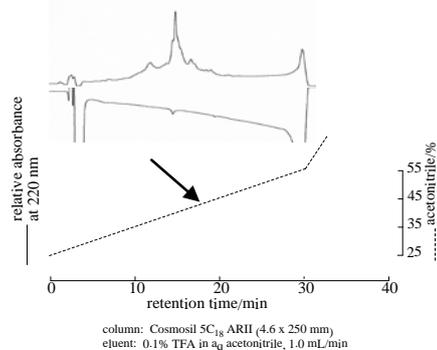


図 逐次伸長法 (上段) とチオエステル法 (下段) の合成結果の比較

(2) 新規 ^{64}Cu 標識法の開発を行った。アルブミン N 末端にある銅結合モチーフ (ATCUN) を利用して ^{64}Cu 標識を試みた。

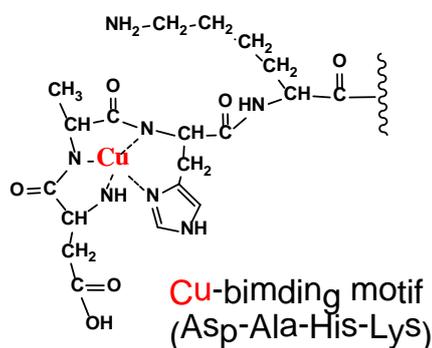


図 銅結合モチーフ (ATCUN)

モデルペプチドとして Octreotide を選び、N 末端に ATCUN 配列を導入した ATCUN-Octreotide を合成した。酢酸緩衝液中 (pH6.5)、室温、1 時間で ^{64}Cu 標識できることを確認した。また健常ラットを用いて PET 撮像を行った結果、Octreotide の集積部位となる膵臓と下垂体に集積を認めた。この結果から銅結合モチーフ (ATCUN) を利用して ^{64}Cu 標識し PET 撮像できることが明らかになった。

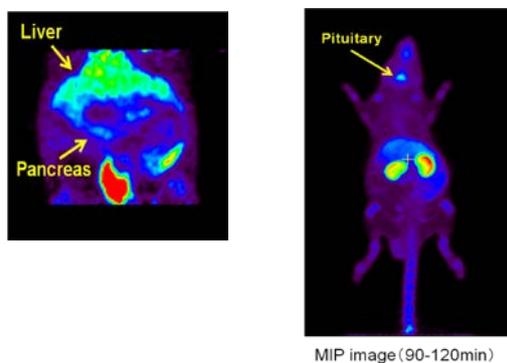


図 ^{64}Cu -ATCUN-Octreotide を用いたソマトスタチン受容体イメージング (左:腹部、右:全身)

次に Exendin-4 への ^{64}Cu 標識を行うために ATCUN-Exendin-4 の合成を行った。ATCUN-Exendin-4 は Fmoc 固相合成法を用いた逐次伸長法で目的物を得ることができた。また酢酸緩衝液中、室温、1 時間で ^{64}Cu 標識できた。このことから ^{64}Ga -ATCUN-Exendin-4 の合成に成功した。

(3) ポジトロン標識 Exendin-4 を用いた GLP-1 受容体イメージングを行った。 ^{68}Ga -DOTA-Exendin-4 を健常マウスに投与した結果、投与後 30 分の PET 画像で膵臓の集積を確認することができた。しかしそれ以

降、肝臓への集積が高まり、腸管への胆汁排泄にプローブの代謝物が含まれ、膵臓の集積を評価することは難しくなることが判明した。

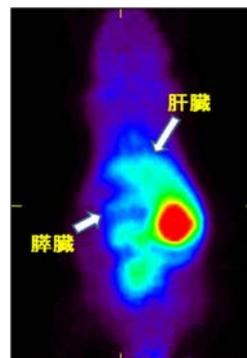


図 Exendin-4 を用いた GLP-1 受容体イメージング

投与 90 分後にマウスを解剖し、体内分布を解析した。その結果、膵臓、肝臓、腎臓への高い集積を明らかにした。また血液中への高い滞留性も明らかになった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

① Koki Hasegawa, Mie Nishimura, Emi Hayashinaka, Yasuhiro Wada, Yosky Kataoka and Yasuyoshi Watanabe N-terminus-specific ^{64}Cu -labeling utilizing the Cu binding motif (ATCUN) Peptide Science 2012, in press 査読有

[学会発表] (計 6 件)

① Koki Hasegawa, Mie Nishimura, Emi Hayashinaka, Yasuhiro Wada, Yosky Kataoka and Yasuyoshi Watanabe N-terminus-specific ^{64}Cu -labeling utilizing the Cu binding motif (ATCUN), 2010 5th International Peptide Symposium, December 4-9

② 長谷川功紀、西村三恵、林中恵美、和田康弘、片岡洋祐、渡辺恭良 N 末端 Cu 結合モチーフ (ATCUN) を用いた ^{64}Cu 標識法の開発、第 30 回日本核医学技術学会総会学術大会 平成 22 年 11 月 11-13 日

③ Koki Hasegawa, Mie Nishimura, Emi Hayashinaka, Yasuhiro Wada, Yosky Kataoka, Yasuyoshi Watanabe ^{64}Cu -labeling of octreotide utilizing the N-terminal Cu binding motif (ATCUN), 2010 World Molecular Imaging Congress, September 8-11

④ 長谷川功紀、西村三恵、林中恵美、和田康弘、渡辺恭良 N 末端 Cu 結合モチーフ (ATCUN) を用いた ^{64}Cu 標識法の開発、第 5 回日本分子イメージン

グ学会学術集会 平成 22 年 5 月 22-23 日

⑤長谷川功紀、西村三恵、林中恵美、和田康弘、渡辺恭良 長鎖ペプチドの N 末端特異的標識体の合成法開発～68Ga-DOTA-Exenatide(1-39)-NH₂の合成～、日本薬学会第 130 年会 平成 22 年 3 月 28-31 日

⑥長谷川功紀、西村三恵、和田康弘、渡辺恭良 ペプチドチオエステルを用いたフラグメント縮合法(チオエステル法)による DOTA-Exenatide の合成、第 9 回放射性医薬品・画像診断薬研究会 平成 21 年 11 月 14 日

〔図書〕(計 4 件)

①腫瘍内科 抗体医薬における molecular imaging、長谷川功紀、渡辺恭良 2010 年 科学評論社

②遺伝子医学 MOOK 別冊「創薬技術の革新：マイクロドーズから PET 分子イメージングへの新展開」 バイオ医薬品開発への応用：バイオ医薬品のマイクロドーズ臨床試験に向けた PET プローブ化技術開発 長谷川功紀、渡辺恭良 2010 年 メディカルドゥ

③臨床医とコメディカルのための「最新クリニカル PET」 ペプチド・抗体プローブ 長谷川功紀 2010 年 先端医療技術研究所

④遺伝子医学 MOOK 別冊「創薬研究への分子イメージング応用」 ペプチド、タンパク質の PET プローブ化への合成戦略 長谷川功紀 2010 年 メディカルドゥ

〔産業財産権〕

○出願状況(計 2 件)

1)

名称：生体内にて標的組織に指向する放射標識化合物およびその利用

発明者：渡辺恭良，長谷川功紀

権利者：独立行政法人理化学研究所

種類：特許

番号：特願 2009-295135

出願年月日：平成 21 年 12 月 25 日

国内外の別：国内

2)

名称：膵臓内分泌細胞用指示薬、及びその利用化合物およびその利用

発明者：渡辺恭良，佐古健生，長谷川功紀，金山洋介，片岡洋祐

権利者：独立行政法人理化学研究所

種類：特許

番号：特願 2009-179935

出願年月日：平成 21 年 7 月 31 日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ

<http://www.cmis.riken.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長谷川 功紀 (HASEGAWA KOKI)

独立行政法人理化学研究所・分子プローブ動態応用研究チーム・研究員
50525798

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし