

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6月3日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2010年度～2012年度

課題番号：22249046

研究課題名（和文）糖尿病の早期・予防診断法構築のための膵β細胞標的核医学分子イメージング法の開発

研究課題名（英文）Development of molecular imaging probes for measurement of β-cell mass in pancreatic islets.

研究代表者

佐治 英郎（SAJI HIDEO）

京都大学・大学院薬学研究科・教授

研究者番号：40115853

研究成果の概要（和文）：膵島量及び膵β細胞量の減少を早期に発見することができれば、糖尿病を予防・治療できる可能性がある。したがって、糖尿病の予防・診断を行うために非侵襲の膵島イメージング技術、とりわけ膵島量及び膵β細胞量を測定するための非侵襲の膵島イメージング技術が望まれている。その中でも、膵β細胞のイメージングを可能とする分子プローブが特に望まれている。本研究では、標的分子には膵島β細胞膜特異的に発現する脂肪酸受容体GPR40、7回膜貫通型Gタンパク質共役型受容体であるペプチド受容体GLP-1R、および膵島β細胞への糖取り込みを担うトランスポーターであるGLUT2を選択し、PET/SPECT用イメージングプローブの開発を行った。

研究成果の概要（英文）：If a decrease in the amount of pancreatic islets and the amount of pancreatic β-cells can be detected at an early stage, there is a possibility for the prevention and treatment of diabetes. Therefore, a noninvasive technique for imaging of pancreatic islets, particularly a noninvasive technique for imaging of pancreatic islets for determining the amount of the pancreatic islets and the amount of pancreatic β-cells, has been desired for the prevention and diagnosis of diabetes. Among these, a molecular probe that enables the imaging of pancreatic islets, preferably the pancreatic β-cell imaging, has been desired in particular. In designing a molecular probe for imaging of pancreatic β-cells, various targets molecule in pancreatic islet cells, particularly functional proteins specific in the β-cells, are being researched. Among these, GLP-1R, GPR40 and GLUT2 are being researched as a target molecule.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成22年度	21,500,000	6,450,000	27,950,000
平成23年度	8,400,000	2,520,000	10,920,000
平成24年度	7,700,000	2,310,000	10,010,000
年度			
年度			
総計	37,600,000	11,280,000	48,880,000

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：膵島β細胞、分子イメージング、糖尿病、早期診断

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

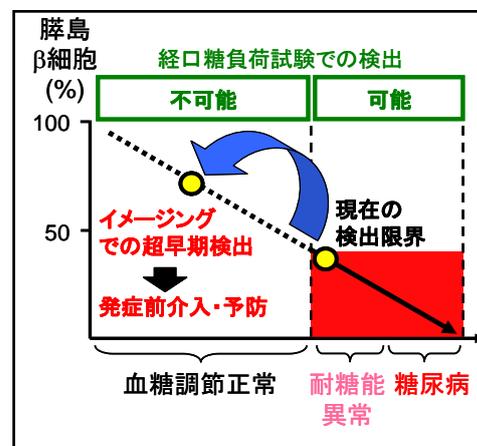
日本国内の糖尿病患者とその予備群は平成18年の段階で合計1870万人と推計されており、罹患者数は増加し続けている。現在のところ、糖尿病の早期診断は経口糖負荷試験に依っているが、耐糖能異常が認められた時点で膵島β細胞はすでに半数以上が脱落していると報告されており、その時点で介入しても十分な成果は得られにくい。一方、膵島β細胞には予備能・代償能があることも報告されており、β細胞数が減り始めた直後にそれを捉え、適切な介入を行うことができれば、β細胞数の回復・維持による糖尿病発症予防が可能となり得る。このような考えに基づき、近年、膵島β細胞に着目した分子プローブ開発に関する研究が注目されているが、膵島β細胞数の非侵襲的定量イメージングが可能なプローブはいまだ開発されていない。

一方、申請者はこれまでに、分子プローブを単一の化合物ではなく「標的認識ユニット」「リンカーユニット」「シグナル放出ユニット」の集合体として捉える『機能性ユニット結合型分子プローブ』という新しい分子プローブ設計概念を構築しており、その概念に基づいた膵島β細胞標的PET/SPECT用分子プローブの開発を先駆的に行っている。その結果、膵島β細胞の特徴的機能であるインスリン分泌に関与する受容体であるGlucagon-like peptide-1 (GLP-1) 受容体とG-protein-coupled receptor (GPR)40をイメージング標的に選択し、前者に対してはExendin-4(9-39)を母体とするPET/SPECTプローブが、後者に対してはGW9508を母体とするSPECTプローブが、標的に対して高親和性を維持していることをインビトロ実験系で見出し、論文・学会発表、特許出願を行った。そこで本申請課題では、これらの成果を基盤に、Exendin-4(9-39)・GW化合物をリード化合物とする構造活性分布相関に基づく検討、および膵島β細胞に発現するトランスポーター・酵素を対象とした新たな標的とそれに結合する化合物探索を行うことで、膵島β細胞に特異的・選択的に集積するPET/SPECT用分子イメージングプローブを創生し、さらに実用化に向けてその効率的合成法を開発し、それらを用いて膵島β細胞数を体外から非侵襲的に定量イメージングする方法を構築することを計画した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、糖尿病の超早期・予防診断を目指して、『機能性ユニット結合型分子プローブ』という新しい分子設計概念に基づき、膵島β細胞に特異的・選択的に集積する

PET/SPECT用分子イメージングプローブを設計・創生し、それを用いて膵島β細胞数を体外から非侵襲的に定量イメージングする方法を構築することである。最近、インスリン分泌を担う膵島β細胞が糖尿病発症前から減少することが報告されたことから、膵島β細胞数の非侵襲的定量を可能とする分子イメージング法の開発は、超早期段階でのβ細胞数減少を検出して糖尿病発症前の予防的介入を可能にするのみならず、糖尿病発症過程の病態解明やβ細胞を標的とした糖尿病治療薬開発にも貢献し得ることから、それによってもたらされる成果は非常に意義深いものとなる。



3. 研究の方法

GLP-1受容体イメージングプローブの設計・合成

GLP-1受容体はインスリン分泌に関与するタンパク質で、そのアゴニストは抗糖尿病薬としての開発が進められている。膵臓内では膵島β細胞に特異的に発現しており、その他の臓器では肺で高発現が報告されているが、位置が離れているため、イメージングの際に問題となることはない。申請者はこれまでに、GLP-1受容体に高い親和性を有するペプチドExendin-4(9-39)を母体として¹⁸F標識および¹²⁵I標識プローブ開発を行い、単離膵島を用いたインビトロアッセイ系で標識体のGLP-1受容体への親和性を評価したところ、標識を行っても高親和性が維持されていることを確認している。これらのプローブについては、インビボでの評価を行うとともに、さらなる有効なプローブを開発するため、報告されているGLP-1受容体とExendin-4(9-39)の複合体の結晶構造解析から、結合に必須の領域、あるいは親和性が非常に高くなるアミノ酸配列を探索し、新規誘導体の開発に利用する。また設計した化合物をインシリコで評価し

精密設計を行なう。

GPR40 イメージングプローブの設計・合成

GPR40 はオーファン受容体として知られていたが、近年、遊離脂肪酸がリガンドとして作用することでインスリン分泌を促進させる作用を持つことが報告された。膵臓内では膵島β細胞に特異的に発現しており、GLP-1 受容体やソマトスタチン受容体などペプチドをリガンドとする受容体よりも発現量が高いことが報告されている。また、膵臓以外の臓器での発現はきわめて低いことから、膵島β細胞特異的・選択的イメージングの標的としては非常に有望である。申請者はこれまでに GPR40/120 アゴニストとして GW9508、GPR40 アンタゴニストとして GW1100 を母体化合物に選択し、¹²⁵I 標識プローブ開発を行い、単離膵島を用いたインビトロアッセイ系で GPR40 への高親和性が維持されていることを確認している。そこで、これらのプローブのインビボでの評価を行うとともに、さらなる有効なプローブを開発するため、報告されている GPR40 ホモロジーモデリングの立体構造情報に基づき、新規誘導体の開発に利用する。また設計した化合物をインシリコで評価し精密設計を行なう。

GLUT2 イメージングプローブの設計・合成

GLUT2 は膵島β細胞への糖取り込みを担うトランスポーターである。膵島β細胞を選択的に破壊する薬物であるストレプトゾトシンは、GLUT2 を介してβ細胞に取り込まれて毒性を発揮することから、β細胞選択的集積プローブの母体化合物としての可能性を有している。さらに、トランスポーターを介して継続してプローブが取り込まれることで、シグナルの増強・高感度イメージングにつながる可能性があることから、本申請課題では、ストレプトゾトシンの糖骨格を母体として種々の修飾を加え、GLUT2 イメージングプローブの開発を行う。

分子イメージングプローブのインビトロスクリーニング

マウスあるいはラットから単離した膵島、あるいは各標的タンパク質高発現細胞株を利用して標的への親和性・選択性の評価を行う。各標的タンパク質に結合する既存の放射性化合物が存在する場合には、開発した分子プローブの非標識体を用いる結合阻害実験を行い、阻害定数 (Ki) を算出する。既存の放射性化合物が存在しない場合には、開発した分子プローブの標識体を用いる飽和結合実験を行い、結合定数 (Kd) を算出する。Ki あるいは Kd が nM オーダー以下の化合物については、イメージングに十分な親和性を有

していると考えられるので、インビボスクリーニングへ移行する。

分子イメージングプローブのインビボスクリーニング

正常マウス、ラットにプローブを投与して経時的に屠殺し、各臓器の重量および集積した放射能を測定する。膵臓への集積性、血液膵臓比、膵臓肝臓比を指標に、イメージングを行うのに適した動態を示すプローブの選別を行う。また、非標識体を投与するインビボブロック実験、膵島β細胞特異的 GFP 発現マウスを用いるオートラジオグラフィを行うことで、プローブの標的特異性を評価する。β細胞特異的集積が示されたプローブについて、PET あるいは SPECT でイメージングを行い、膵臓が描出可能かどうかを検討する。

4. 研究成果

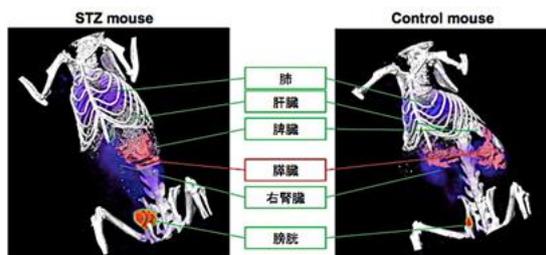
GPR40 受容体を標的としたプローブについては、14 種類の PET/SPECT 用分子イメージングプローブを設計・合成した。正常マウスを用いて体内分布実験を実施したところ、最も膵臓への高い集積を示した化合物でも 5%ID/g 程度であった。更に、膵臓のイメージングには、近傍臓器との比が重要であり、特に肝臓との比が重要になってくる。そこで、膵/肝比を算出したところ、投与後 30 分で 0.3 と低い値を示した。

GLUT2 を標的としたプローブについては、2 種類の PET/SPECT 用分子イメージングプローブを設計・合成した。標品の合成には成功したものの、光による分解が見られインビトロ評価を実施するだけの十分な安定性を得ることが出来なかった。

前述の通り、GLUT-2、GPR40 受容体を標的としたプローブについては、それぞれのタンパク質に親和性を有する化合物の合成には成功したものの、分布動態の観点から、インビボイメージングに有効な化合物を創製することは難しく、さらに母体化合物の検討が必要となった。

GLP-1 受容体を標的としたプローブについては、SPECT 用分子イメージングプローブである [¹²³I]IB-SKY1 の開発に成功した。

STZ 処置により膵β細胞量を段階的に減少させたマウスを用いて、[¹²³I]IB-SKY1 投与後の膵臓の放射能に対する膵β細胞量減少の影響を評価した。その結果、空腹時血糖が上昇する以前の糖尿病進行度を、膵臓の放射能の減少という形で確認でき、この放射能の減少は SPECT でも検出可能であることを見出した。従って、[¹²³I]IB-SKY1 を用いれば、SPECT 撮像により現在の診断法より糖尿病を早期に診断できる可能性が示された。



またこの化合物の臓器分布データをもとに、血液と膵臓にコンパートメントを設定し、2コンパートメントモデルおよび3コンパートメントモデルに基づくカーブフィッティングを行って $K1 \sim k4$ の速度定数を算出した。その結果、2コンパートメントおよび3コンパートメントのいずれの場合でも良好なカーブフィットが得られ、受容体密度の指標となる分布容積 ($K1/k2$) は29、結合能 ($k3/k4$) は7と算出された。

以上、本研究の成果は、今後の糖尿病の病態解明と臨床診断、及びペプチド性化合物を母体とした核医学分子イメージングプローブの分子設計に有用な情報を与えるものと考えられる。

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7件)

1. Kenji Arimitsu, Hiroyuki Kimura, Tetsuya Kajimoto, Masahiro Ono, Yoshiro Ohmomo, Masayuki Yamashita, Manabu Node, and Hideo Saji. Novel design and synthesis of a radioiodinated glycolipid analog as an acceptor substrate for *N*-acetylglucosaminyltransferase V. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*. in press (査読有)

2. Hiroyuki Watanabe, Masahiro Ono, Kenji Matsumura, Masashi Yoshimura, Hiroyuki Kimura, Hideo Saji. Molecular Imaging of β -Amyloid Plaques with Near-Infrared BODIPY-based Fluorescent Probes. *Molecular Imaging*. in press (査読有)

3. Takashi Temma, Hideo Saji. Radiolabelled probes for imaging of atherosclerotic plaques. *Am J Nucl Med Mol Imaging*. 2(4), 2012, 432-447 (査読有)

4. Masahiro Ono, Hiroyuki Watanabe, Hiroyuki Kimura, Hideo Saji. BODIPY-based molecular probe for imaging of cerebral β -amyloid plaques. *ACS Chemical Neuroscience*. 18;3(4), 2012, 319-324 (査読有)

5. Hiroyuki Kimura, Daisuke Mori, Naoya

harada, Masahiro Ono, Yoshiro Ohmomo, Tetsuya Kajimoto, Hidekazu Kawashima, Hideo Saji. Microwave-assisted Synthesis of Organometallic Complexes of $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$ and $\text{Re}(\text{CO})_3$: Its Application to Radiopharmaceuticals. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. 60(1) 79-85 2012 (査読有)

6. 豊田健太郎, 稲垣暢也. 膵 β 細胞の非侵襲的定量法開発の現状. *Diabetes Frontier*. 23, 2012, 391-397 (査読有)

7. Hiroyuki Fujimoto, Kentaro Toyoda, Teru Okitsu, Xibao Liu, Eri Mukai, Xiaotong Zhuang, Shinji Uemoto, Naoki Mochizuki, Nobuya Inagaki. Three-dimensional ex vivo imaging and analysis of intraportal islet transplants. *TransplantInternational*. 24(8), 2011, 839-844 (査読有)

[学会発表] (計15件)

1. 松田洋和, 木村寛之, 小川祐, 豊田健太郎, 高木美佳子, 今麻実, 小野正博, 稲垣暢也, 佐治英郎: Insulinoma イメージングを目的とした In-111 標識 Exendin(9-39)誘導体の開発、第12回放射線医薬品・画像診断薬研究会、2012年12月15日(京都)

2. 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. 2012, 11, 27 (Kyoto)

3. Fujimoto H, Toyoda K, Kimura H, Ogawa Y, Mukai E, Zhuang X, Ueda M, Temma T, Hirai M, Matsuda H, Saji H, Inagaki N. 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. 2012, 11, 27 (Kyoto)

4. Toyoda K, Inagaki N. Development of imaging technique for evaluating pancreatic β -cell mass. Kyoto University Global COE "Center for Frontier Medicine" International Symposium. 2012, 11, 27 (Hyogo)

5. H. Matsuda, H. Kimura, Y. Ogawa, M. Takagi, A. Kon, M. Ono, K. Toyoda, N. Inagaki, H. Saji. Development of ^{123}I -labeled Exendin derivative

binding to GLP-1 receptors for imaging insulinoma by SPECT. Society of Nuclear Medicine 59th Annual Meeting. 2012, 6, 9 (Miami beach)

6. 松田洋和, 木村寛之, 小川祐, 豊田健太郎, 高木美佳子, 今麻実, 小野正博, 稲垣暢也, 佐治英郎: Insulinoma の核医学イメージングのための GLP-1R 標的^[123I]Exendin(9-39)誘導体の開発、第7回日本分子イメージング学会、2012年05月24日~2012年05月25日(浜松)

7. 小川祐, 木村寛之, 河嶋秀和, 豊田健太郎, 向英里, 藤本裕之, 松田洋和, 小野正博, 稲垣暢也, 佐治英郎: 膵β細胞 GLP-1 受容体を標的とする PET 用イメージングプローブとしての ¹⁸F 標識 Exendin-4 誘導体の開発、日本薬学会 第132年会、2012年3月30日(札幌)

8. 小川祐, 木村寛之, 河嶋秀和, 豊田健太郎, 向英里, 藤本裕之, 松田洋和, 小野正博, 稲垣暢也, 佐治英郎: 膵β細胞 GLP-1 受容体を標的とする SPECT 用イメージングプローブ Exendin(9-39)誘導体の開発、第51回日本核医学会学術総会、2011年10月28日(筑波)

9. 小川祐, 木村寛之, 河嶋秀和, 豊田健太郎, 向英里, 藤本裕之, 松田洋和, 小野正博, 稲垣暢也, 佐治英郎: 膵β細胞 GLP-1 受容体標的放射性プローブとしての I-123 標識 Exendin-4 誘導体、第9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 (PPF2011)、2011年9月12日(箱根)

10. Kimura H, Ogawa Y, Kawashima H, Mukai E, Toyoda K, Fujimoto H, Hirao K, Ono M, Inagaki N, Saji H. Synthesis and evaluation of radioiodinated exendin derivatives for the imaging of GLP-1 receptor expression in pancreatic islets. Society of Nuclear Medicine 57th Annual Meeting. 2011, 6, 8 (Salt Lake City)

11. 豊田健太郎, 木村寛之, 佐治英郎 他: GLP-1 受容体を標的とする非侵襲的膵島イメージングのための 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、2011年5月12日(札幌)

12. 小川祐, 木村寛之, 河嶋秀和, 豊田健太郎, 向英里, 藤本裕之, 平尾佳, 松田洋和, 小野正博, 稲垣暢也, 佐治英郎: 膵β細胞 GLP-1 受容体を標的とする SPECT 用イメージングプローブの開発、日本薬学会 第131年会、2011年3月30日(静岡)

13. 松田洋和, 木村寛之, 小川祐, 豊田健太郎, 向英里, 藤本裕之, 中村博, 平尾佳, 小野正博, 稲垣暢也, 佐治英郎: スルホニル尿素受容体 SUR1 を標的とした膵β細胞イメージング用放射性分子プローブの開発、日本薬学会 第131年会、2011年3月29日(静岡)

14. 小川祐, 木村寛之, 河嶋秀和, 豊田健太郎, 向英里, 藤本裕之, 平尾佳, 松田洋和, 小野正博, 稲垣暢也, 佐治英郎: GLP-1 受容体を標的とする放射性ヨウ素標識イメージングプローブの開発、第50回日本核医学会学術総会、2010年11月11~13日(大宮)

15. 松田洋和, 木村寛之, 小川祐, 河嶋秀和, 豊田健太郎, 向英里, 藤本裕之, 平尾佳, 小野正博, 稲垣暢也, 佐治英郎: SUR1 受容体を標的とした膵β細胞イメージング用放射性プローブの開発、第50回日本核医学会学術総会、2010年11月11~13日(大宮)

〔図書〕(計1件)

1. 佐治英郎, 小野正博, 天満敬, 上田真史, 木村寛之. 生体分子イメージングと創薬・臨床画像診断. トランスレショナルリサーチを支援する遺伝子医学 MOOK20 号 ナノバイオ技術と最新創薬応用研究 (橋田充・佐治英郎編) 2012:132-143

〔産業財産権〕

○出願状況(計4件)

名称: ポリペプチド及びイメージング方法
発明者: 佐治英郎, 稲垣暢也, 木村寛之, 豊田健太郎

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願 2012-262908 号

出願年月日: 2012年11月30日

国内外の別: 国内

名称: 膵島イメージング用分子プローブ及びその使用

発明者: 佐治英郎, 稲垣暢也, 木村寛之, 豊田健太郎

権利者: 同上

種類: 特許

番号: PCT/JP2010/072041

出願年月日: 2010年12月8日

国内外の別: 海外

名称: ペプチド誘導体及びその使用

発明者: 佐治英郎, 稲垣暢也, 木村寛之, 豊田健太郎

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願 2010-229009 号

出願年月日: 2010年10月8日

国内外の別：国内

名称：膝島イメージング用分子プローブ及びその使用

発明者：佐治英郎、稲垣暢也、木村寛之、豊田健太郎

権利者：同上

種類：特許

番号：PCT/JP2010/066940

出願年月日：2010年9月29日

国内外の別：海外

○取得状況（計1件）

名称：膝島イメージング用分子プローブ前駆体及びその使用

発明者：稲垣暢也、佐治英郎、豊田健太郎、木村寛之

権利者：同上

種類：特許

番号：特許第4642920号

取得年月日：2010年12月10日

国内外の別：国内

[その他]

京都大学・薬学研究科・病態機能分析学分野
ホームページ

<http://www.pharm.kyoto-u.ac.jp/byotai/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

京都大学大学院・薬学研究科・教授

佐治 英郎 (SAJI HIDEO)

研究者番号：40115853

(2) 研究分担者

豊田 健太郎 (TOYODA KENTARO)

京都大学大学院・医学研究科・講師

研究者番号：00447971

上田 真史 (UEDA MASASHI)

岡山大学大学院・医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：40381967

木村 寛之 (KITAMURA HIROYOKI)

京都大学・放射性同位元素総合センター・助教

研究者番号：50437240

河嶋 秀和 (KAWASHIMA HIDEKAZU)

国立循環器病センター・画像診断医学部・室長

研究者番号：70359438

天満 敬 (TEMMA TAKASHI)

京都大学大学院・薬学研究科・助教

研究者番号：90378787