

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15106

研究課題名(和文) 糖尿病の早期・予防診断のための膵 細胞標的ポータブルPETプローブの開発

研究課題名(英文) Development of PET probes targeting pancreatic b-cells for early diagnosis and preemptive medicine of diabetes.

研究代表者

佐治 英郎 (Saji, Hideo)

京都大学・薬学研究科・教授

研究者番号：40115853

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、糖尿病の超早期診断、更に先制医療を目的として、Glucagon-like peptide-1(GLP-1)受容体を標的とした⁶⁸Ga標識ポータブルPETプローブ(⁶⁸Ga-Df9-Ex(9-39))を設計し、その高収率かつ高比放射能での合成に成功した。さらに、⁶⁷Ga-Df9-Ex(9-39)が正常マウスの膵臓に高く取り込まれ、その集積は長時間保持されることを見出した。以上の結果より、GLP-1受容体イメージングプローブ⁶⁸Ga-Df9-Ex(9-39)の開発に成功した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we designed and synthesized a ⁶⁸Ga labeled PET probe (⁶⁸Ga-Df9-Ex(9-39)) targeting GLP-1 receptor for early diagnosis and preemptive medicine of diabetes. ⁶⁷Ga-Df9-Ex(9-39) was synthesized with high specific radioactivity and radiochemical yield. In addition, it showed the high uptake in normal mouse pancreas and the radioactivity was maintained until 120 min after injection. These results suggested that ⁶⁸Ga-Df9-Ex(9-39) may be a useful probe for imaging GLP-1 receptors.

研究分野：病態機能分析学

キーワード：PET 膵 細胞 糖尿病

1. 研究開始当初の背景

陽電子断層撮像法(PET)は定量的な機能診断が可能な臨床画像診断法として利用されているが、現在これに用いられている ^{18}F 、 ^{11}C 標識プローブは、臨床使用現場にサイクロトロン、自動合成装置などの特殊な大型設備を必要とし、その利用範囲には制限がある。一方、 ^{68}Ga はポータブルなデスクトップ型 ^{68}Ge - ^{68}Ga ジェネレータによって供給でき、かつ標識化合物はキレート生成反応により迅速、定量的に合成できることから、 ^{68}Ga 標識プローブは汎用性に優れた PET プローブとして開発が注目されている (Theranostics 2014;4:47)。しかしながら、特に受容体の生体イメージング用の ^{68}Ga 標識プローブにおいては、比放射能、標識反応効率、インビボでの非特異的集積などの点から、未だ有効なものとは開発されていない。

一方、現在 950 万人の患者、1100 万人の可能性者が存在し、今後もその数の増加が予測されている糖尿病は、不可逆的な進行性の疾患であり、その病態進行には膵β細胞の減少が重要な因子となっていることから、その早期診断、さらには先制医療には膵β細胞量が優れたバイオマーカーとなりえることが期待されている (J Nucl Med 2012;53:908)。そこで本研究では、糖尿病の超早期・予防診断、先制医療を目指して、膵β細胞に特異的に発現しているグルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1) 受容体にインビボで選択的に結合する、汎用性の高い ^{68}Ga 標識 PET 分子プローブを創生し、それを用いて膵β細胞量を体外から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、汎用性に優れたポータブル PET 法による糖尿病の超早期・予防診断、先制医療を目指して、『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β細胞量を非侵襲的、特異的に定量イメージングできる、ジェネレータ産生 ^{68}Ga ポータブル PET 分子イメージングプローブを創生することにある。

本研究で提案する、膵β細胞数の非侵襲的

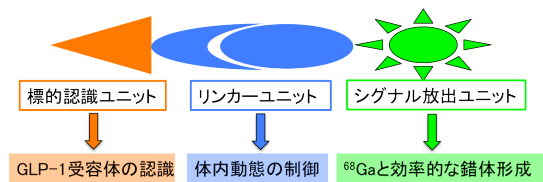


図 1. 新規プローブの設計概念

定量的な分子イメージング法は、これまでにない全く新しいカテゴリーの糖尿病の超早期診断、発症や合併症を未然に防止する先制医療を可能にするのみならず、糖尿病発症過程

の病態解明や治療薬開発研究のバイオマーカーとしても利用できる。したがって、本法は糖尿病診断から治療への新たなワークフローシステムを構築することが可能となり糖尿病の根本治療への道筋を切り拓くことが期待できる(図 2)。

上記の目的を達成するため、本研究では、プローブの分子設計、効率的な高比放射能の ^{68}Ga 標識体の合成法の検討、正常マウス体内における非標的臓器への集積量の評価を行い、 ^{68}Ga 標識ポータブル PET プローブによる糖尿病の定量分子イメージングの可能性を評価した。

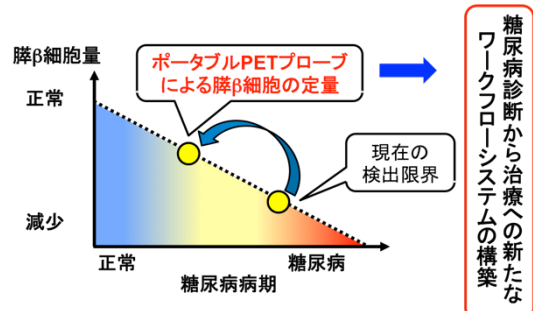


図 2. 本研究の概念図

3. 研究の方法

(1) GLP-1 受容体イメージングプローブの設計・合成

プローブの設計に当たっては、『機能性ユニット結合型分子プローブ』の概念に基づき、膵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 GLP-1 受容体に対する結合部分、すなわち標的認識ユニットとして、GLP-1 受容体への高い親和性が報告されている Exendin-(9-39)を、また、 ^{68}Ga のキレート形成部、すなわちシグナル放出ユニットには、 ^{68}Ga との強い配位能を有し、安定度定数が大きく、温和な条件で速やかに錯形成が進行する Deferoxamine (Df) をそれぞれ選択し、 ^{68}Ga 標識ポータブル PET プローブとして新規 ^{68}Ga -Df-Ex(9-39)を設計した。

標識前駆体の合成は、合成した Ex(9-39)の N 末側の Fmoc 基を樹脂上で除去し Df を反応、その後脱保護および樹脂からの切り出しを行うことで、目的物を得た。

(2) ^{68}Ga 標識法の検討

標識前駆体を 0.1-1.0M の MES buffer (0 - 0.1% Tween 80) に溶解させた溶液 (0.5-50 μM) 20 μL に、Eckert & Ziegler 社製 Obninsk $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -Generator より抽出した ^{68}Ga 溶液 (1.2 M NaOAc buffer) 20 μL を加え、室温にて 30 分間静置した。精製は島津社製 LC-20A の HPLC 分析装置を用い、ナカライ社製逆層カラム COSMOSIL 5C₁₈-AR-II (10×250mm) を用いて行った。なお、移動相は、0.1%TFA

H₂O : 0.1%TFA MeCN = 7:3 (0.01 min) → 1:9 (20 min)、流速は 3.5 mL/min とした。

また、非標識体は、標識前駆体 (2-4 mg) を 100 - 150 μL の 0.01 M MES buffer (0.1% Tween 80) に溶解させ、20 μL の GaCl₃ 溶液 (12 mg/120 μL) を加えた。室温にて 5 分間静置し、LC-MS にて目的物の生成を確認した。精製は ⁶⁸Ga 標識体と同様の条件を用いて行った。

(3) 血漿中安定性評価

BALB/c nu/nu マウスから血漿を採取し、37 °C にて 10 分間振盪した。⁶⁷Ga-Df9-Ex(9-39) (1.85 MBq/20 μL) を血漿 (200 μL) と混和し、37 °C にて 30, 60, 120, 240 分間振盪した。振盪液へメタノール (100 μL) を加え、血漿中タンパク成分を凝集させ、4 °C にて 10000×g、5 分遠心し上清を得た。上清を Millex-GV (13 mm) を用いてろ過し、⁶⁸Ga 標識体と精製と同様の条件を用いて HPLC 分析を行った。

(4) 正常マウスを用いた体内動態評価

ddY マウス (6 週齢、雄性) へ ⁶⁷Ga-Df9-Ex(9-39) (18.5 - 37.0 kBq/100 μL) をマウス尾静脈より投与した。投与後、5, 30, 120 分にマウスを屠殺、各臓器 (膵臓、血液、心臓、肺、胃、小腸、大腸、肝臓、脾臓、腎臓) を摘出した (n = 5)。各臓器の重量と放射能とを測定し、単位重量あたりの放射能から集積量 (% injection dose/g) を算出した。

4. 研究成果

(1) ⁶⁸Ga 標識検討

Df9-Ex(9-39)の ⁶⁸Ga 標識反応における、MES buffer の濃度と可溶化剤である Tween 80 添加による放射化学的収率への影響に関して検討した。

その結果、まず標識前駆体濃度を 50 μM で用いた場合、放射化学的収率に与える MES buffer の濃度影響はほとんどなかったが、若干その濃度が高い条件 (1.0 M) の場合には放射化学的収率が低下 (97% → 87%)する傾向が示された。また、MES buffer 濃度 0.1 M において Tween 80 添加による放射化学的収率への影響を検討した結果、Tween 80 添加による影響はなく、いずれの場合においても放射化学的収率は高かった (添加有 : 98%、添加無 : 97%)。

次に標識前駆体濃度を 5 μM にして、Tween 80 添加下、MES buffer の濃度条件を検討した結果、MES buffer の濃度が放射化学的収率に与える影響を検討した結果、MES buffer の濃度を低くすると放射化学的収率が上昇する傾向が見られた (0.01 M : 89%、0.1 M : 80%、1.0 M : 69%)。また、MES buffer 濃度 0.1 M において Tween 80 添加の有無による放射化学的収率への影響を検討した結果、Tween 80 添加により 5.7%から 88.8%へと大幅な放射化学的収率の向上が示された。

さらに比放射能の向上を目的として、標識前駆体濃度を 0.5 μM の条件にて標識検討を行ったが、標識体の放射化学的収率は低値 (9-14%)を示した。

以上の結果より、Df9-Ex(9-39)の ⁶⁸Ga 標識において、0.01 M MES buffer に 0.1% Tween 80 添加した条件が最も高比放射能の ⁶⁸Ga-Df9-Ex(9-39)を得ることができる条件であることが明らかとなった。

(2) 血漿中安定性評価

生体内での化合物の安定性を確認するために、*in vitro* における血漿中での安定性を評価した (図 3)。なお、本検討では基礎実験での取り扱いの容易さの観点から ⁶⁸Ga (半減期 : 68 分) に比べて放出エネルギーが低く、半減期が長い ⁶⁷Ga (半減期 : 3.26 日) を用いて検討した。

⁶⁷Ga-Df9-Ex(9-39) の血漿中安定性は、⁶⁷Ga-Df9-Ex(9-39)を血漿中にて 0, 30, 60, 120, 240 分間 37 °C にてインキュベートし、その溶液を Radio-HPLC で分析して得られた未変化体の割合から算出した。その結果、240 分後においても未変化体が 78%存在し、⁶⁸Ga の半減期とほぼ同時間の 60 分後においても未変化体が 94%存在することを認めた。

このことより、本プローブは血漿中に存在する代謝酵素による分解はほとんど受けないことが認められ、*in vivo* 評価に値する放射性プローブであることが示された。

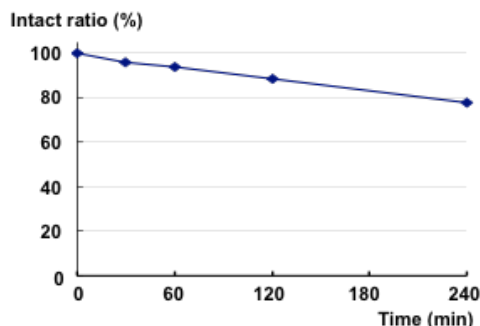


図 3. ⁶⁷Ga-Df9-Ex(9-39)の血漿中安定性

(3) 正常マウスを用いた体内動態評価

膵β細胞に特異的に発現している GLP-1 受容体を標的としたイメージングプローブとしての放射性 Ga 標識 Ga-Df9-Ex(9-39)の有用性を評価するために、⁶⁷Ga-Df9-Ex(9-39)の正常マウス (ddY マウス、6 週齢、雄性) での体内動態を評価した (表 1)。

その結果、膵臓への高い集積 (投与 30 分後で 16.5%/g)、滞留性 (投与 120 分後で 13.8%/g) が確認された。また、画像化に重要な近接臓器比に関しても投与 30 分後において、膵臓/血液比 4.01、膵臓/胃比 7.69、膵臓/肝臓比 12.5、膵臓/脾臓比 10.6 と高い近接臓器比が得られ、投与 120 分後においても、膵臓/血液比 7.22、

膵臓/胃比 3.51、膵臓/肝臓比 12.5、膵臓/脾臓比 12.4 と高い近接臓器比を示した。

以上の結果より GLP-1 受容体イメージングプローブとして $^{68}\text{Ga-Df9-Ex(9-39)}$ を新規に設計、開発することに成功し、その有効性を見出した。これにより、生体での GLP-1 受容体イメージングの可能性を示すことができた。

表 1. $^{67}\text{Ga-Df9-Ex(9-39)}$ のマウス体内分布

	%ID/g \pm S.D.		
	5min	30min	120min
Pancreas	12.72 \pm 1.26	16.45 \pm 5.59	13.80 \pm 1.71
Blood	8.54 \pm 0.63	4.10 \pm 1.48	1.91 \pm 0.30
Heart	3.13 \pm 0.39	1.66 \pm 0.52	0.87 \pm 0.16
Lung	26.64 \pm 6.07	35.13 \pm 4.83	23.89 \pm 3.27
Stomach	1.55 \pm 0.32	2.14 \pm 0.62	3.93 \pm 1.09
Small Intestine	2.10 \pm 0.38	2.60 \pm 0.27	3.37 \pm 0.55
Large Intestine	0.86 \pm 0.16	0.70 \pm 0.07	0.75 \pm 0.15
Liver	2.13 \pm 0.30	1.32 \pm 0.33	1.10 \pm 0.14
Spleen	2.44 \pm 0.24	1.55 \pm 0.46	1.11 \pm 0.17
Kidney	66.33 \pm 8.96	117.60 \pm 24.23	103.88 \pm 6.84

渡邊 裕之 (WATANABE, Hiroyuki)
京都大学・薬学研究科・助教
研究者番号： 40710786

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. *Biol. Pharm. Bull.*, **40**(10), 1605-1615, (2017)

H. Saji.

In vivo Molecular Imaging

[その他]

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐治 英郎 (SAJI, Hideo)

京都大学・薬学研究科・教授

研究者番号： 40115853

(2) 研究分担者

小野 正博 (ONO, Masahiro)

京都大学・薬学研究科・教授

研究者番号： 80336180

木村 寛之 (KIMURA, Hiroyuki)

京都薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号： 50437240

佐野 紘平 (SANO, Kohei)

神戸薬科大学・薬学部・講師

研究者番号： 00546476