

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670258

研究課題名(和文)核磁気共鳴(NMR)技術を利用した非侵襲的膵細胞定量法の開発

研究課題名(英文)Development of a noninvasive method for beta cell mass measurement using a nuclear magnetic resonance

研究代表者

稲垣 暢也 (INAGAKI, Nobuya)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：30241954

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：膵細胞特異的に発現するGLP-1受容体を標的分子としexendin(9-39)を基本骨格とした¹⁹F MRI用プローブを合成した。プローブの基本特性評価を行った結果、GLP-1受容体への特異的な結合を示すことができたが、膵島・MIN6細胞に結合したプローブのピークは検出できなかった。基本骨格をexendin4に変更し、同様に検討を行った結果、ファントム実験で2つのピークを検出した。1つはTFA由来であると示すことができたため、プローブ由来のピークを同定できた。細胞に結合させたピークを検出できなかったため、期間内に¹⁹F MRI用プローブの確立はできなかったが、今後さらに検討を重ねる予定である。

研究成果の概要(英文)：We used an exendin(9-39), which bind to GLP-1 receptor specifically, as a basic frame of probe. As a results of probe characteristic analysis, we could show a specific binding against GLP-1 receptor. However, ¹⁹F peak derived from probe could not be detected on islets cells and MIN6 cells. Therefore, we synthesized a new probe used an exendin4. We analyzed the new probe using same methods. In phantom experiment of the probe using ¹⁹F-MRS, two peaks were detected. We identified a peak derived from probe with ¹⁹F because we could show that a one of the peaks was derived from TFA. However, we could not detect a peak of probe on islets and INS-1cells due to insufficiency number of ¹⁹F molecules. Though we could not establish a MR imaging probe in this period, we plane a new probe to establish the probe.

研究分野：糖尿病

キーワード：膵島イメージング ¹⁹F-MRI

1. 研究開始当初の背景

糖尿病はインスリン分泌障害または、抵抗性、あるいはその両方から高血糖を呈する疾患である。我が国において糖尿病と強く歌がれる人の数は年々増え、平成 24 年には 950 万人となり、糖尿病の可能性を否定できない人の数を含めると 2050 万人にまで達する。患者の抑制、医療費の削減のためには、糖尿病発症前より早期に介入し、適切な指導を行うことが重要である。現在、糖尿病の診断は経口ブドウ糖負荷試験 (OGTT) や空腹時血糖値、随時血糖値、ヘモグロビン A1c (HbA1c) など血液検査から得られる情報を基に行われている。また、血中インスリンや C ペプチドを測定することで膵細胞の機能面での評価が行われている。一方、OGTT により耐糖能異常が明らかとなる境界型糖尿病の段階ではすでに膵細胞の量が減少している報告が多くなされているため、膵細胞量は糖尿病の発症過程や発症後の経過を知るためのバイオマーカーの一つとして期待されている。そのため、生体の膵細胞量を非侵襲的に評価するための手法の開発が求められている。

現在、我々は、非侵襲的な膵細胞イメージング手法として、放射性同位元素を用いた研究を進めている。しかしながら、放射性同位元素の扱いは、被曝や扱いの制限があるため、取り扱える施設や環境に限界がある。そのため、放射性同位元素を用いないイメージング技術である MRI で使用可能なイメージングプローブの開発を進めることとした。中でも ^{19}F NMR シグナルは、 ^{19}F の局所的な微環境に対する化学シフトの高感度性やほぼ 0 に等しいバックグラウンドシグナル、高い磁気回転比、生体適合性、さらに天然存在率により魅力的なものであると期待されている。本研究では、その ^{19}F を用いた膵細胞のイメージング技術の開発を目的としている。

2. 研究の目的

我々は、これまでに膵細胞特異的プローブの標的として Glucagon-like peptide-1 受容体の有用性 (Mukai E. et al BBRC 2009) し、体内微量分子の検知における ^{19}F -MRS の有用性 (Nature Chemistry 2009) を明らかにしてきた。これからの技術を用いて本研究では、水素やフッ素など各種元素の解析を可能とする核磁気共鳴 (Nuclear magnetic resonance, NMR) を用いて非侵襲的に膵細胞量を検知する技術を開発することである。具体的には、1. 膵細胞特異的なプローブを設計・合成する、2. 超高磁場 MR 装置を用いて核磁気共鳴 (NMR) スペクトロスコピー (MR spectroscopy, MRS) を用いて評価する、3. 糖尿病モデル動物を用いて MRS と核磁気共鳴イメージング (MR

imaging, MRI) を施行することを計画した。

3. 研究の方法

MRI : Bruker 7T, 1H/19F 40mmCoil

(1) F 元素を有する ($\text{CF}_3 \times 2$) 化合物を用いて基本骨格となる exendin に標識し、BTFM-Exendin(9-39) を合成した。(exendin:GLP-1 受容体に特異的に結合するペプチド)

BTFM-Exendin(9-39) の基本性能評価

ファントム実験

2 mM BTFM-exendin(9-39) を 2mM のサンプルチューブ内に入れて実施。

結合実験による BTFM-Exendin(9-39) の結合能の評価

市販の ^{125}I ボルトンハンターラベル exendin(9-39)、GLP-1R 発現細胞膜を用いて BTFM-exendin(9-39) の結合実験を行った。

膵島細胞への結合 ^{19}F -NMR 試験

C57 BL/6 マウスから膵島 (2.1×10^4 IEQ) を単離し、BTFM-exendin(9-39) を暴露後 ^{19}F -NMR スペクトルを評価した。

MIN6 細胞への結合 ^{19}F -NMR 試験

GLP-1R を強発現しているマウスインスリノーマ細胞 (MIN6) (3×10^7 cells) に BTFM-exendin(9-39) を 30 分間暴露し、 ^{19}F -NMR スペクトルを評価した。

(2) exendin4 を基本骨格としたプローブの開発

ファントム実験

0.05, 0.5, 5 mM の濃度でのフッ素由来ピークを ^{19}F -NMR で測定した。

結合実験による BTFM-Exendin4 の結合能の評価

上記と同様に市販の ^{125}I ボルトンハンターラベル exendin(9-39)、GLP-1R 発現細胞膜を用いて BTFM-exendin4 の結合実験を行った

INS-1 細胞への結合 ^{19}F -NMR 試験

GLP-1R を強発現しているマウスインスリノーマ細胞 (INS-1 細胞) (1×10^8 cells) に BTFM-exendin4 を 60 分間暴露し、 ^{19}F -NMR スペクトルを評価した。

ペプチド合成時の TFA (トリフルオロ酢酸) の影響についての検討

用いたプローブはペプチドであるため、合成の脱保護時に TFA を使用する。また、しよした TFA はペプチドのリジン残基のカウンターイオンとして存在するため、TFA 除去カラムを用いて TFA を除去し、 ^{19}F -NMR で検討を行った。その際、GLP-1R の量を増やすことを目的に GLP-1R 過剰発現細胞

(hGLP-1R-HEK1 細胞) を作製・使用した。

4. 研究成果

BTFM-Exendin(9-39) は図 1 に示すようにサンプルチューブに入れたファントム実験により F 由来のピーク (矢印) を確認できた

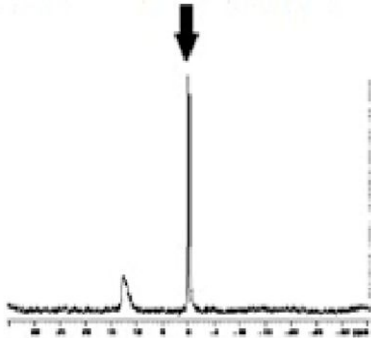


図 1 ファントム実験

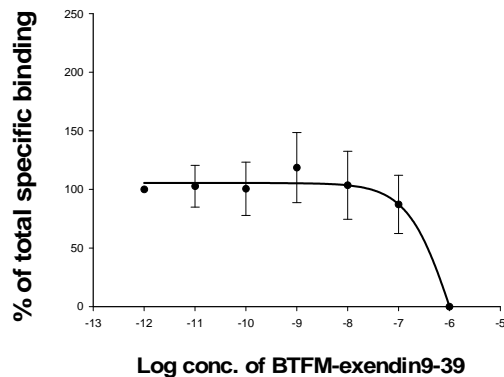


図 2 ; 結合実験

次に結合実験の結果 (図 2) より IC50 の値が BTFM-Exendin(9-39) では 1.15×10^{-6} 、対象とした非標識 exendin(9-39) では 1.59×10^{-7} となった。

単離膵島への暴露実験 (2.1×10^4 個の膵島)

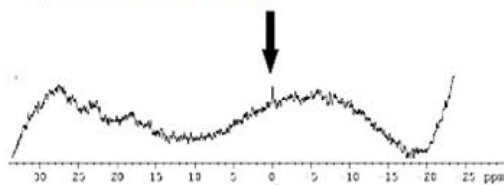


図 3 単離膵島への暴露実験

単離膵島への暴露実験の結果を図 3 に示す。矢印に示すようにプローブ由来と思われる微小なピークの観察が可能であった。次により GLP-1R の発現のある MIN6 細胞を用いて同様の暴露実験を行った結果を図 4 に示す。

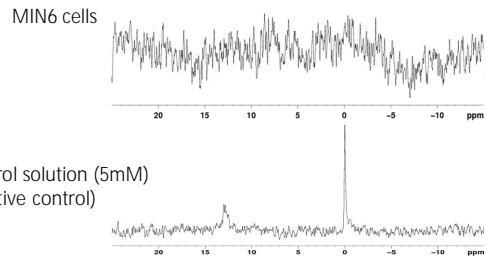


図 4 MIN6 細胞への暴露実験

その結果、プローブ溶液のみで観察可能であったピークが細胞暴露下では観察できなかった。細胞に反応したプローブ量が少ないためにとらえられなかったと考え、次に基本骨格をアンタゴニストに exendin(9-39) ではなくアゴニストの exendin4 への変更し検討を行った。

BTFM-Exendin4	9.36E-08
BTFM-Exendin9-39	1.15E-06
Exendin4	8.24E-08
Exendin9-39	1.59E-07

その結果、結合実験においては、上記のようになり基本骨格を変更することによる GLP-1 受容体へのプローブの結合能は上昇した。また、フッ素の標識化を行ってもその結合能に大きな変化を与えることはなかった。

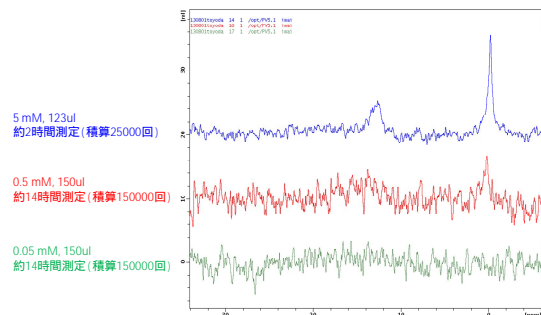


図 5 BTFM-exendin4 のファントム実験

ファントム実験の結果 (図 5)、5 mM まで濃度をあげることでピークの検出が可能であった。

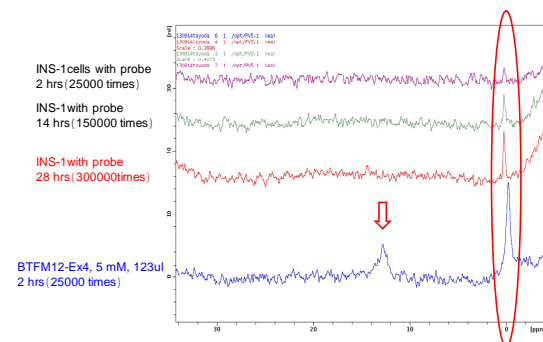


図 6 INS-1 細胞への結合実験

INS-1 細胞への結合試験(19F-NMR)の結果を図6に示す。ファントム実験の結果(青線)にみられる0 ppm 付近のピークを細胞へ暴露後も観察できた。ファントムで観察されていた13ppm 付近のピークは検出できなかった。

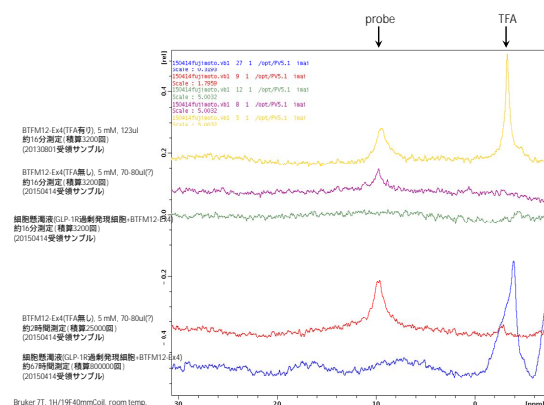


図7 TFA 除去後のプローブの 19FNMR

TFA 除去カラムにより TFA 除去後のプローブの 19F-NMR の結果を図7に示す。TFA 除去により TFA 由来ピーク(0-6 ppm 付近)の消失を確認した。そのため、プローブ由来のピークは13 ppm 付近のものであると考えられた。しかしながら、細胞へのプローブ結合後のサンプルでは、プローブのみと同様の積算回数では検出できなかった。また、積算回数を増やすことでも特異的なピークは検出できなかった

以上の結果より、この BTFM-exendin では F 数が少ないことから検出可能な範囲内で 19F を検出することが困難であったことが考えられる。そのため、今後は F 数を増やしたプローブを用いてその有用性について検討をすすめる予定である

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 3 件)

(1) 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 内科医から見た先制医療 糖尿病の先制医療、日本内科学会雑誌、104 巻、2015、1803-1807

(2) 藤田直尚、藤本裕之、稲垣暢也、膵細胞定量 糖尿病の先制医療のために 実験医学 Vol13, No7, 2015,144-150

(3) H. Kimra, H. Matsuda, H. Fujimoto, K. Arimitsu, K. Toyoda, E. Mukai, H. Nakamura, Y. Ogawa, M. Takagi, M. Ono, N. Inagaki,

H. Saji, Synthesis and evaluation of 18F-labeled mitiglinide derivatives as positron emission tomography tracers for b-cell imaging. Bioorganic & Medicinal Chemistry 査読有 Vol.22, 2014、3270-3278. DOI:10.1016/j.bmc.2014.04.059

[学会発表](計 4 件)

(1) 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細胞定量の試み 第 30 回糖尿病・肥満動物学会 2016 年 3 月 11 日-12 日 大宮ソニックシティ(埼玉)

(2) N. Inagaki, H. Fujimoto, H. Kimura, K. Hamamatsu, N. Fujita, and H. Saji, Noninvasive Pancreatic Beta-Cell Imaging Using Radiolabeled Exendin Probe. KEYSTONE SYMPOSIA “Daibetes:New Insights into Molecular Mechanisms and Therapeutic Strategies” 2015 年 10 月 25 日-29 日 ウェスティン都ホテル(京都)

(3) 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 みやこメッセ(京都)

(4) 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 膵細胞特異的プローブを用いた移植膵島可視化の試み 第 42 回膵・膵島移植研究会 2015 年 3 月 7 日-8 日 京王プラザホテル(東京)

6. 研究組織

(1)研究代表者

稲垣 暢也 (INAGAKI Nobuya)
京都大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：30241954

(2)研究分担者

松田 哲也 (MATSUDA Tetsuya)
京都大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：00209561

豊田 健太郎 (TOYODA Kentaro)
京都大学医学部附属病院・講師
研究者番号：00447971

木村 寛之 (KIMURA Hiroyuki)
京都薬科大学・薬学部・准教授
研究者番号：50437240