

厚生労働科学研究費補助金
医療機器開発推進研究事業

非侵襲的生体膵島イメージングによる
糖尿病の超早期診断法の開発
に関する研究

平成 19 年度 総括研究報告書

主任研究者 稲垣 暢也
平成 20 (2008) 年 4 月

目 次

I. 総合研究報告書	1
非侵襲的生体膵島イメージングによる 糖尿病の超早期診断法の開発に関する研究 稲垣 暢也	
II. 分担報告書	
1. 非侵襲的生体膵島イメージングに必要なプローブの選定と β細胞選択的画像解析に必要な <i>in vivo</i> 実験系の構築 豊田 健太郎	5
2. 非侵襲的生体膵島イメージングプローブの <i>in vivo</i> 評価に 必要な大動物膵島移植系の確立 興津 輝	8
3. 非侵襲的生体膵島イメージングに必要なプローブの設計	10
佐治 英郎	
4. 非侵襲的生体膵島イメージングに必要なプローブ標識法の検討	12
天満 敬	
5. 非侵襲的生体膵島イメージング用プローブの <i>in vivo</i> 評価 - ¹²⁵ I 標識 Exendin(9-39)を用いた検討 - 河嶋 秀和	14
6. 非侵襲的生体膵島イメージングに必要な小動物用高分解能 PET システムの構築 上田 真史	16
7. 非侵襲的生体イメージングによる糖尿病の超早期診断法の開発	18
富樫 かおり	
8. 非侵襲的生体膵島イメージングに必要な超高磁場 MRI による 膵島撮像法の開発 松田 哲也	20
9. 非侵襲的生体膵島イメージングのためのグルコース誘導体の開発	22
斉藤 美佳子	
10. 非侵襲的生体膵島イメージングに必要なプローブの作製	24
平尾 佳	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	26
IV. 研究成果の刊行物・別刷	31

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）

総括研究報告書

「非侵襲的生体膵島イメージングによる糖尿病の超早期診断法の開発に関する研究」

主任研究者 名前 稲垣 暢也 所属 京都大学糖尿病・栄養内科

研究要旨：糖尿病の発症過程では、膵島量が耐糖能異常に先行して減少する。この知見に基づき、本研究では糖尿病超早期診断を目的とした、膵島量を測定する非侵襲的画像診断技術の開発を目標とする。生体内の直径 50～500 μm の膵島を定量化するためには、膵島特異的に集積して周囲組織とのコントラストを発生させるプローブが必要である。本年度は、まず β 細胞特異的な機能タンパクを中心に詳細に検討して候補を選定し、分子プローブの設計、作製を分担研究者らとともにに行った。同時に、*in vitro* の評価系は既に確立していたため、*in vivo* における評価系を新たに構築し、 ^{125}I 標識 Exendin (9-39) を用いた初期検討を行い、 β 細胞選択性の評価が可能であることを確認した。平成 19 年度内に作製が完了するプローブより順次初期検討を開始している。また MRI による膵島の可視化については、まだプローブが存在しないため、非プローブ下における撮像条件の検討を超高磁場 MRI を用いて開始した。膵島の解析を確実かつ効率的に行うための新たな実験法を開発し、実際に非プローブ下での β 細胞の撮像を試みることができた。以上のように、平成 19 年度は、各分担研究者らとともにプローブの選定から設計、そして作製を行うとともに、評価系を構築してきた。平成 20 年度には、プローブの有効性を評価していく予定である。

分担研究者

豊田 健太郎	京都大学医学研究科 糖尿病・栄養内科学 助教	上田 真史	京都大学医学研究科 放射性医薬品学 助教
興津 輝	京都大学医学部附属病院 臓器移植医療部 助教	富樫 かおり	京都大学医学研究科 画像診断学・核医学 教授
佐治 英郎	京都大学薬学研究科 病態機能分析学分野 教授	松田 哲也	京都大学情報学研究科 教授
天満 敬	京都大学薬学研究科 病態機能分析学分野 助教	斉藤 美佳子	東京農工大学共生科学技術 研究院 生命機能科学部門 准教授
河嶋 秀和	京都大学医学研究科 画像診断学・核医学 助教	平尾 佳	アークレイ株式会社 研究開発本部第 5 チーム

A. 研究目的

平成 14 年度には糖尿病 740 万人、境界型 880 万人で、現在も増加し続けており、この対策として耐糖能検査を基準とした糖尿病発症前の介入が行われているが、十分な成果が得られていない。その原因として、機能異常が明らかとなる境界型糖尿病の段階では膵島の障害はすでに高度に進行しており、介入開始時期としては遅い可能性がある。よって、適切な時期の介入を行うための超早期診断の必要性が求められている。

よって、本研究の目的は、糖尿病の超早期診断のために生体内の膵島量を非侵襲的な画像診断法を用いて定量化するための技術開発を行うことである。

B. 研究方法

非侵襲的膵島定量に必要な分子プローブの開発と画像診断法の検討のためには、以下の 5 つの手順が必要である。

1. 膵島イメージング標的分子

生体内の直径 50~500 μm の膵島を定量化するためには、膵島特異的に集積して周囲組織とのコントラストを発生させるプローブが必要である。 β 細胞研究を通して得た情報を元に、分担研究者の豊田とともに β 細胞特異的な機能タンパクの選定作業を行った。また GLUT2 の基質であるグルコース誘導体については、分担研究者の齊藤らとともに検討を行っている。

2. イメージング分子プローブの設計・開発

プローブとしての特性を最大限に発揮できる設計を分担研究者の佐治らとともにを行い、その設計に基づいて作製した。その際、結合能、安定性を考慮した設計を行い、それに基づいて、実際の作製をアークレイ社が行った。作製された化合物への RI などの標識法は分担研究者の天満らとともに開発を行った。

3. 標識分子プローブの基礎的評価 (*in vitro*~*ex vivo* まで)

(1). *in vitro*: 単離膵島での結合特性、

機能変化 (インスリン分泌)、毒性を評価は、豊田らにより行っている既に確立した方法である。

(2). *ex vivo*: 膵灌流モデルで(1)と同様の検討を行う。本法も、豊田らによって行う。

4. *In vivo* における分子プローブの有効性と画像撮像条件の検討

(1). *In vivo* でのプローブの選択性を評価する。具体的には、プローブを尾静注後経時的に臓器を摘出し RI カウンティングを行う。これは、分担研究者の河嶋らとともに行う。また、 β 細胞選択性については、同様に尾静注後膵臓を摘出し、膵切片中の膵島と RI シグナルが重なるかどうかを確認するが、今回、豊田と河嶋らによって、新規のスクリーニング法として膵 β 細胞特異的に GFP を発現するトランスジェニックの膵臓を用いることで、 β 細胞の蛍光シグナルと RI シグナルが重なるかどうかを検討した。(2). プローブの基礎評価後に、実際の撮像を microPET もしくは MRI で行い、指摘撮像条件の検討を行う。microPET の撮像条件検討は、分担研究者の上田らとともに行う。(3). 腎被膜下移植を用いて、計数して標識膵島を移植してから、microPET もしくは MRI によって撮像し、得られるシグナルとの検量線を作成することによってプローブの有効性と撮像条件の確認する。膵島移植は、分担研究者の興津らとともに行う。なお、動物を用いた実験については、京都大学動物実験に関する指針に基づいて施行する。

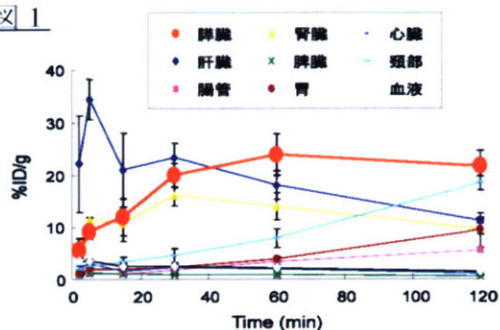
C. 研究結果

平成 19 年度選定したプローブを示す。

- 1) グルコース輸送担体 2 (GLUT2) の基質、
- 2) K_{ATP} チャネルのリガンド: ミチグリニド、
- 3) 小胞モノアミントランスポーター (VMAT2) のリガンド: Dihydropyridazine (DHPZ)、
- 4) Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) 受容体のリガンド: Exendin(9-39)、
- 5) G 蛋白共

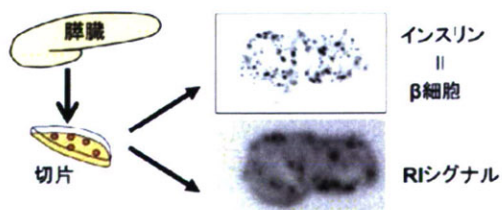
役受容体 (GPR40) のリガンド : GW9508, GW1100 を選定し、設計した後、2) ~5) は作製済み、もしくは作製中である。これ以外にもグレリン受容体や GIP 受容体の抗体についても検討中である。標識分子プローブの β 細胞選択性については、単離膵島を用いた基礎的評価と同時に、*in vivo* での β 細胞選択性が重要であるため、初期検討に加えて行う必要がある。まず、Exendin (9-39) について、 ^{125}I 放射性標識体をマウスに静注投与後に経時的に各臓器を摘出して集積を評価した。その結果、図 1 に示すように膵臓に集積性が高いことが示された。

図 1



次に、同じ ^{125}I 標識 Exendin (9-39) を、膵島特異的に GFP を発現するマウスと同様に尾静注し、膵臓への集積が高かった 120 分後において膵臓を摘出して切片化した後、蛍光と RI シグナルをイメージアナライザーで解析したところ、双方が一致することを確認した。

図 2



今後、従来法での確認、GLP-1 受容体欠損マウスを用いた検討を行う。さらに、単離膵島を用いた基礎評価、機能評価を現在行っている。

D. 考察

Exendin (9-39) は、臓器特異性、 β 細胞選

択性を認めており、プローブとしての有用性が示されている。今後、その他の評価も行うと同時に、PET 核種である ^{18}F の標識体を用いて *in vivo* での評価に入り、プローブとしての有用性評価を進める。蛍光タンパクを膵島において発現するトランスジェニックマウスを用いた β 細胞選択性確認法は、簡便で迅速に施行可能であり、非常に有用であることが判明した。

E. 結論

Exendin (9-39) を初めとして、 β 細胞選択性、プローブ特性を十分考慮して選定、作製したその他の候補についても、速やかに同様の検討を行い、有用なプローブについては、*in vivo* 定量化の検討に入ることが可能と思われる。

F. 健康危険情報 特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Toyoda K, Okitsu T, Yamane S, Uonaga T, Liu X, Harada N, Uemoto S, Seino Y, Inagaki N. GLP-1 receptor signaling protects pancreatic beta cells in intraportal islet transplant by inhibiting apoptosis. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 367(4), 793-798, 2008.
2. Toyoda K, Fukushima M, Mitsui R, Harada N, Suzuki H, Takeda T, Taniguchi A, Nakai, Y Kawakita T, Yamada Y, Inagaki N, Seino Y. Factors responsible for age-related elevation in fasting plasma glucose: a cross-sectional study in Japanese Men. **Metabolism** 57(2), 299-303, 2008
3. Harada N, Yamada Y, Tsukiyama K, Yamada C, Nakamura Y, Mukai E, Hamasaki A, Liu X, Toyoda K, Seino Y, Inagaki N. A novel gastric inhibitory polypeptide (GIP) receptor splice variant influences GIP sensitivity of pancreatic β -cells in obese mice. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.** 294(1), E61-8, 2008
4. Nakamura Y, Ogura M, Tanaka D, Inagaki N. Localization of mouse mitochondrial SIRT proteins: Shift of SIRT3 to nucleus by co-expression with SIRT5. **Biochem.**

Biophys. Res. Commun. 366, 174–179, 2008.

5. Yamada, C., Yamada, Y., Tsukiyama, K., Yamada, K., Udagawa, N., Takahashi, N., Tanaka, K., Drucker, D. J., Seino, Y., and Inagaki, N. (2008) The murine GIP1r is essential for control of bone resorption.

Endocrinology 2008, in press.

6. Yamada, C., Yamada, Y., Tsukiyama, K., Yamada, K., Yamane, S., Harada, N., Miyawaki, K., Seino, Y., and Inagaki, N. Genetic inactivation of GIP signaling reverses aging-associated insulin resistance through body composition changes. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 2007, 364: 175-180.

7. Yamada, K., Saito, M., Matsuoka, H., and Inagaki, N. A Real-time Method of imaging of glucose uptake in single, living mammalian cells. **Nat. Protocols.** 2007, 2: 753-762.

8. Mukai, E., Fujimoto, S., Sakurai, F., Kawabata, K., Yamashita, M., Inagaki, N., Mizuguchi, H. Efficient gene transfer into murine pancreatic islets using adenovirus vectors. **J Controlled Release** 119: 136-141, 2007.

9. Miyake, A., Yamada, K., Kosaka, T., Miki, T., Seino, S., Inagaki, N. Disruption of Kir6.2-containing ATP-sensitive potassium channels impairs maintenance of hypoxic gasping in mice. **Eur. J. Neuroscience** 25(8): 2349-63, 2007.

10. Hamasaki, A., Yamada, Y., Kurose, T., Ban, N., Nagashima, K., Takahashi, A., Fujimoto, S., Shimono, D., Fujiwara, M., Toyokuni, S., Seino, Y., and Inagaki, N. Adult pancreatic islets require differential pax6 gene dosage. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 2007, 353: 40-46.

2. 学会発表 なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし。

2. 実用新案登録 なし。

3. その他 なし。

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）

分担研究報告書

「非侵襲的生体膵島イメージングに必要なプローブの選定とβ細胞選択的画像解析に必要な *in vivo* 実験系の構築」

分担研究者 名前 豊田 健太郎 所属 京都大学糖尿病・栄養内科

研究要旨：糖尿病の発症過程では、膵島量が耐糖能異常に先行して減少する。この知見に基づき、本研究では糖尿病超早期診断を目的とした、膵島量を測定する非侵襲的画像診断技術の開発を目標とする。生体内の直径 50～500 μm の膵島を定量化するためには、膵島特異的に集積して周囲組織とのコントラストを発生させるプローブが必要であるため、β細胞特異的な機能タンパクを中心に詳細に検討して候補の選定作業を行った。また膵β細胞特異的に蛍光タンパク（GFP）を発現するマウスの膵臓を用いて、*in vivo* におけるβ細胞特異性評価のために二次元的に RI シグナルとβ細胞の蛍光シグナルを簡便に比較できる系を新たに構築した。さらに、MRI による撮像を、膵島存在面で可能とするための、三次元的な位置特定法を新たに構築した。

A. 研究目的

現在、我が国における 2 型糖尿病は推定 740 万人を越えて増加し続けており、この対策として耐糖能検査を基準とした糖尿病発症前の介入が行われているが、十分な成果が得られていない。その原因として、機能異常が明らかとなる境界型糖尿病の段階では膵島の障害はすでに高度に進行しており、介入開始時期としては遅い可能性がある。よって、適切な時期に介入を行うための超早期診断の必要性が求められている。

よって、本研究の目的は、糖尿病の超早期診断のために生体内の膵島量を非侵襲的な画像診断法を用いて定量化するための技術開発を行うことである。

B. 研究方法

1. 生体内の直径 50～500 μm の膵島を定量化するためには、膵島特異的に集積して周囲組織とのコントラストを発生させるプローブが必要であるため、β細胞特異的な機能タンパクを中心に詳細に検討して候補を選定した。選定に当たり既報において有用性に乏しいものを排除することにつとめた。

2. 標識分子プローブの *in vitro* における結合特性、機能特性（インスリン分泌に及ぼす影響）を単離膵島を用いて評価する。

3. *In vivo* でのプローブの選択性を評価する。具体的には、プローブを尾静注後経時的に臓器を摘出し RI カウンティングを行う。また、β細胞選択性を、従来法では尾静注後膵臓を摘出し、膵切片中の膵島と RI シグナルが重なるかどうかを免疫組織学的に確認していたが、今回、新規のスクリーニング法として膵β細胞特異的に GFP を発現するトランスジェニックマウスの膵臓を用いることで、β細胞の蛍光シグナルと RI シグナルが重なるかどうかを検討した。

4. MRI の撮像評価を従来よりも確実かつ効率よくするために、撮像面を固定できるように膵島の三次元的な位置を特定できる実験系を構築した。

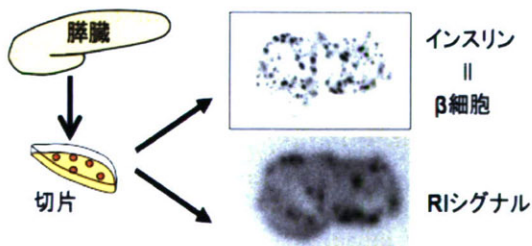
C. 研究結果

1. 平成 19 年度には、以下のプローブを選定した。1) 小胞モノアミントランスポーター（VMAT2）のリガンド：DTBZ、2) GLP-1 受容体のリガンド：Exendin (9-39)、

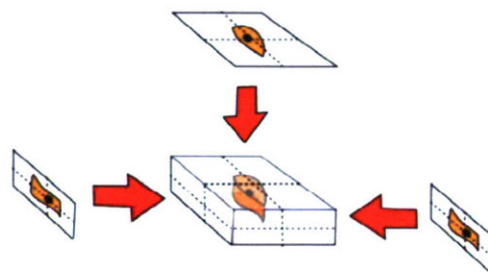
3) GPR40 のリガンド：GW9508, GW1100、
 4) K_{ATP} チャネルのリガンド：ミチグリニド、
 5) グルコース輸送担体2 (GLUT2) の基質：ブドウ糖誘導体である。1) はβ細胞特異性に問題があるが、これまでのところ最も報告が多いプローブであり、今回の評価における陽性コントロールとする。2) は、Exendin-4 と同様 GLP-1 受容体に結合し、拮抗的に作用するため、プローブとして使用しやすい。3) は、β細胞選択性が高いことは報告されているが、プローブとしては未報告のものであり選定した。4) はスルホニル尿素薬、グニリド薬とも報告があるが、β細胞選択性の問題が指摘されていた。ミチグリニドは結合能、β細胞特異性も非常に高いため選定した。5) については、既報はあるが臨床応用可能なものはない。しかし、β細胞親和性が高いため、新たなブドウ糖誘導体の可能性について検討中である。これ以外にもβ細胞特異性の高いペプチド受容体であるグレリン受容体や GIP 受容体の抗体の標識化を検討中である。

2. 標識分子プローブの単離膵島を用いた基礎的評価は現在施行中である。

3. 標識分子プローブの *in vivo* でのβ細胞特異性を調べる方法を新たに構築した。具体的には、膵β細胞において特異的に蛍光タンパクの GFP を発現するトランスジェニックマウスへ Exendin(9-39) の ¹²⁵I 放射性標識体投与後、膵臓集積が認められた 2 時間後に摘出した膵臓を切片化して蛍光と RI シグナルをイメージアナライザーで解析し、双方が一致することを確認した (下図)。



4. また、MRI において確実かつ効率のよい撮像条件検討を行うために、膵島において特異的に GFP を発現するマウスの膵臓の一塊をゲルに封入して蛍光実体顕微鏡で観察し、膵島の三次元的位置を特定した。その結果、非プローブ存在下での撮像において、T1 強調画像で高信号を呈するとの結果を得ることができた。



D. 考察

Exendin(9-39) のβ細胞選択性を、新しく開発した評価法によって示すことができた。この蛍光タンパクを膵島において発現するトランスジェニックマウスを用いたβ細胞選択性確認法は、簡便で迅速に施行可能であり、Exendin(9-39) 以外のプローブについても適用して評価可能である。同じマウスの膵臓を用いた三次元解析法も MRI の撮像の効率化と検討に非常に有用であることが判明した。

E. 結論

Exendin(9-39) を初めとして、β細胞選択性を十分に考慮したプローブを選定し、作製した。*in vitro*, *in vivo* における迅速かつ十分なプローブ評価の体制が確立しており、*in vivo* 定量化を検討できるプローブを選定可能と思われる。

F. 健康危険情報 特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Toyoda K, Okitsu T, Yamane S, Uonaga T, Liu X, Harada N, Uemoto S, Seino Y, Inagaki K. GLP-1 receptor signaling protects pancreatic beta cells in intraportal islet transplant by inhibiting apoptosis. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 367(4), 793-8, 2008

2. Toyoda K, Fukushima M, Mitsui R, Harada N, Suzuki H, Takeda T, Taniguchi A, Nakai, Y Kawakita T, Yamada Y, Inagaki N, Seino Y. Factors responsible for age-related elevation in fasting plasma glucose: a cross-sectional study in Japanese Men. **Metabolism** 57(2), 299-303, 2008
 3. Harada N, Yamada Y, Tsukiyama K, Yamada C, Nakamura Y, Mukai E, Hamasaki A, Liu X, Toyoda K, Seino Y, Inagaki N. A novel gastric inhibitory polypeptide (GIP) receptor splice variant influences GIP sensitivity of pancreatic β -cells in obese mice. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.** 294(1), E61-8, 2008
 4. Fujiwara H, Hosokawa M, Zhou X, Fujimoto S, Fukuda K, Toyoda K, Nishi Y, Fujita Y, Yamada K, Yamada Y, Seino Y, Inagaki N. Curcumin inhibits glucose production in isolated mice hepatocytes. **Diabetes Res. Clin. Pract.** 2008 Epub ahead of print.
2. 学会発表 なし。
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得 なし。
 2. 実用新案登録 なし。
 3. その他 なし。

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）

分担研究報告書

「非侵襲的生体膵島イメージングプローブの *in vivo* 評価に必要な
大動物膵島移植系の確立」

分担研究者 名前 興津 輝 所属 京都大学病院 臓器移植医療部

研究要旨：*In vivo* での非侵襲的膵島量検出技術を確認する補助手段として膵島移植技術の応用が有用である。中動物での実施を可能とするためイヌ膵臓から良質な膵島を大量に安定して分離できる手技を確立した。

A. 研究目的

現在国民病として認識されている糖尿病に対して効果的に介入するためには現在の機能的評価によって判明する耐糖能異常の時期ではなく、より以前の膵内分泌細胞量が減少しはじめる時期を同定する必要がある。そのために、*in vivo* における非侵襲的な膵島量評価方法の開発を行うことが今回の研究提案であるが、その検証を行うためには、生体内に存在する膵島量をあらかじめ把握しておく必要がある。現在インスリン依存状態糖尿病に対して膵臓より膵内分泌細胞塊である膵島を分離して移植する膵島移植の手技が確立され臨床実施されている。

この方法を応用することで移植によって生体内に存在する膵島量を体外であらかじめ評価することが可能となる。また、分離した膵島を対象として開発されるプローブの効果を *ex vivo*、*in vivo* で評価することができる。この膵島移植モデルを前臨床として中動物で実現するため、イヌの膵島分離手技を確立することを目指した。我々はすでにブタ膵臓から効率的に大量の膵島を分離する方法を確立しており（*Cell Transplant*, 14(10):

757-762, 2005)、それをイヌに適応可能かどうかを評価した。

B. 研究方法

1. 動物

体重 15kg 程度のビーグル犬（2 歳～3 歳）

2. 膵臓摘出

麻酔：ドルミカム、硫酸アトロピンを麻酔前投与、イソゾールにて麻酔を導入し、マスキュラックスにて筋弛緩後、挿管後セボフルレンによる吸入麻酔にて維持。

膵臓摘出術：Cobb らの方法（*J Surg Res* 1984）に準じて膵臓全摘術を施行。すなわち、右胃大網動脈の反回十二指腸肢を温存し、第一膵十二指腸動脈弓を膵臓に沿って切除することで十二指腸を切除することなく膵臓を全摘した。

3. 膵島分離

膵管を同定し、体部と鉤部に向かってカテーテルを挿入。カテーテルから膵管保護の目的で保存液を注入し、二層法にて膵臓を保存。Liberase CI（0.5mg/ml）を膵管から注入し 37℃にて膵臓消化。比重遠沈法にて膵島を純化した。

4. 膵島評価

ディチゾンにて膵島を赤染後、検鏡にて膵島径を測定し、Ricordi らの方法（*Acta*

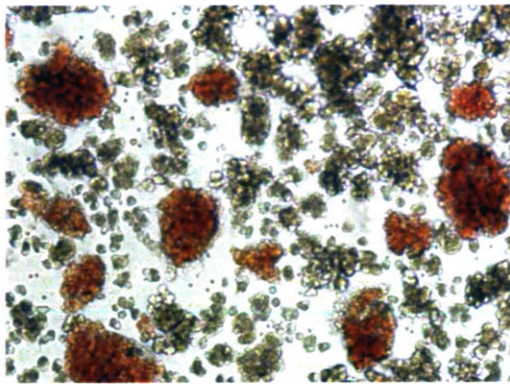
Diabetol Lat 1990) に基づいて膵島量(径 150 μ m の膵島を単位とする相当量)を算出した。また、AO/PI 染色(acridine orange/propidium iodide)によって viability を評価した。

(倫理面への配慮)

この度の実験に関しては、施設の動物実験に関する指針に基づいて施行した。

C. 研究結果

3 頭のビーグル犬を使用し、4553 \pm 879 IEQ/g の膵島を分離することができた。Viability はいずれも 90%以上であった。



(図) 分離したイヌ膵島の顕微鏡像
膵島はディチゾンにて赤染している。

D. 考察

形態的に良質な膵島を安定して分離することができている。今後は引き続き in vitro、in vivo での機能評価を行う。

E. 結論

良質なイヌ膵島を大量に分離する方法を確立した。

F. 健康危険情報 なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1 Noguchi H, **Okitsu T**, Matsumoto S, et.al. Comparison of M-Kyoto solution and histidine-tryptophan-ketoglutarate solution with a trypsin inhibitor for

pancreas preservation in islet transplantation. **Transplantation** 84(5):655-8, 2007

- 2 Rivas-Carrillo JD, **Okitsu T**, Tanaka N, Kobayashi N. Pancreas development and beta-cell differentiation of embryonic stem cells. **Current medicinal chemistry** 14(14):1573-8, 2007

- 3 Rivas-Carrillo JD, **Okitsu T**, Kobayashi N, et. al. Cell-permeable pentapeptide V5 inhibits apoptosis and enhances insulin secretion, allowing experimental single-donor islet transplantation in mice. **Diabetes** 56(5):1259-67, 2007

2. 学会発表

1. **Okitsu T**. ISLET ALLOGRAFTS FROM NON-HEART BEATING DONORS IN TYPE 1 DIABETIC PATIENTS AT KYOTO, JAPAN: TWO YEAR FOLLOW UP. CTS-IPITA-IXA 2007 Joint Conference, 2007 Sep 15-20, Minnesota, USA

2. **Okitsu T**. THE ESTABLISHMENT OF ISLET ISOLATION METHOD WITH NON-HEART BEATING DONORS FOR CLINICAL ISLET TRANSPLANTATION. CTS-IPITA-IXA 2007 Joint Conference, 2007 Sep 15-20, Minnesota, USA

3. **Okitsu T**. LIVING DONOR ISLET TRANSPLANTATION – PROGRESS SINCE 2005. CTS-IPITA-IXA 2007 Joint Conference, 2007 Sep 15-20, Minnesota, USA

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)なし。

- 1.特許取得 なし。
- 2.実用新案登録 なし。
- 3.その他 なし。

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）

分担研究報告書

「非侵襲的生体膵島イメージングに必要なプローブの設計」

分担研究者 名前 佐治 英郎 所属 京都大学薬学研究科・病態機能分析学分野

研究要旨：本研究では糖尿病超早期診断を目的とした、膵島量を測定するための新規分子イメージング用分子プローブの設計を行うために、イメージの標的とする分子の探索を行い、その結果、有望と考えられる5つの標的を選択し、それぞれの標的分子について、特異的に認識する分子プローブを設計した。

A. 研究目的

本研究における分担業務の目的は、糖尿病の超早期診断のために生体内の膵島量を非侵襲的な画像診断法を用いて定量化するための、分子イメージング用分子プローブの設計を行うことである。

B. 研究方法

非侵襲的膵島定量化に必要な分子プローブの開発を目的とし、まず、膵島細胞における標的分子の探索から開始し、それらを特異的に認識する分子イメージング用分子プローブの設計を行なった。対象は、 ^{11}C や ^{18}F 等を用いる PET、 ^{123}I 等を用いる SPECT 核種、Mn や Gd 等を用いる MRI とした。

1. 標的分子の探索

主任研究者の稲垣と分担研究者の豊田らとともに、これまでに開発されている糖尿病薬や、糖尿時に変化する膵β細胞内に存在する標的分子を中心に探索を行ない、ターゲット分子を選択した。

2. イメージング用分子プローブの設計

プローブ作製において、リガンドや基質などに、分子イメージングが可能な ^{11}C や ^{18}F 等の PET 核種、 ^{123}I 等の SPECT 核種、MR 造影核種 (Mn や Gd など) などを導入するべく、分子設計を行なった。標識核

種の導入に当たっては、合成の容易さ、標的分子への親和性と導入核種の安定保持を考慮した。また、抗体は、非標的組織からのクリアランスと高いコントラストを達成させるため、フラグメント化した抗体可変領域の使用も検討した。

C. 研究結果

平成 20 年 2 月現在の標的分子の探索、分子プローブの設計状況を以下に示す。

1. 標的分子の探索

生体内の直径 50~500 μm の膵島を定量化するためには、膵島特異的に集積して周囲組織とのコントラストを発生させるプローブが必要であるため、β細胞特異的な機能タンパクを中心に詳細に検討した。その結果、本研究では次の5つをターゲットとして選定した。

- 1) GLUT2：膵β細胞に存在し、インスリン分泌に必要なグルコース取り込みに関与しているトランスポーター、
- 2) SUR1：膵β細胞膜特異的に発現するKATPチャネルの構成成分、
- 3) VMAT2：膵β細胞内の小胞に発現する小胞膜の機能タンパク質、
- 4) GLP-1R：7回膜貫通型GPCRであり、膵β細胞に分布、
- 5) GPR40/120：脂肪酸をリガンドとする、膵β細胞膜特異的に発現する受容体タンパク質。

2. イメージング用分子プローブの設計

上記 1)~5)のターゲットを、特異的に認識する分子プローブの母体化合物を選定し、それらにイメージング可能な元素の導入を考慮して分子設計を行なった。

1) GLUT2: 糖鎖骨格を持つ低分子化合物、あるいは抗体などを対象とした。抗体標識では、標的分子への親和性に関する部位とこれと独立してイメージング用金属核種を安定に保持する部位とを具備する二官能性キレート試薬の概念に基づき、 ^{99m}Tc や ^{111}In 等の放射性核種あるいは MR 造影核種の導入を試みた。2) SUR1: 医薬品として用いられている Mitiglinide を母体化合物に選択し、これに ^{18}F を導入可能な低分子化合物を設計した、3) VMAT2: 既に開発されている、 ^{11}C -DTBZ、 ^{18}F -(+)-DTBZ を基に、新規プローブを設計した。4) GLP-1R: ペプチド性リガンドの antagonist として Exendin(9-39) を、agonist として Exendin-4 を母体化合物に選択し、リジン残基側差のアミノ基に標識部位を設定した。これまでの研究より、Exendin-4 は腎臓に高く集積することが報告されており、これが撮像時の S/N 比を低下させる要因になり得ると予想されたことから、腎臓からのクリアランスを高める分子修飾を施した化合物を設計した。5) GPR40/120: GPR40/GPR120 agonist として GW9508、GPR40 antagonist として GW1100 を母体化合物に選択し、 ^{18}F 、 ^{123}I などを導入した分子設計を行なった。

D. 考察

膝島特異的に集積して周囲組織とのコントラストを明瞭にするために、 β 細胞特異的な機能タンパクに結合する分子プ

ローブの設計を行なった。今後はそれらの有効性を評価し、最適化を行なっていくことが必要である。

E. 結論

本研究では、標的分子の探索を行い、有望と考えられる 5 つのターゲットを選択した。それぞれのターゲットについて、特異的に認識する分子イメージング用分子プローブを設計した。今後は実際に化合物を合成・評価し、分子プローブとしての最適化を行なって行く予定である

F. 健康危険情報 特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Aita K, Temma T, Kuge Y, Saji H. Development of a novel neodymium compound for in vivo fluorescence imaging. **Luminescence** 22(5):455-61, 2007
 2. Kiyono Y, Yamashita T, Doi H, Kuge Y, Katsura T, Inui K, Saji H. Is MIBG a substrate of P-glycoprotein? **Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging** 34(4):448-52, 2007
 3. Kanegawa N, Kiyono Y, Kimura H, Sugita T, Kajiyama S, Kawashima H, Ueda M, Kuge Y, Saji H. Synthesis and evaluation of radioiodinated (S,S)-2-(alpha-(2-iodophenoxy)benzyl)morpholine for imaging brain norepinephrine transporter. **Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging** 33(6):639-47, 2006
 2. 学会発表 なし。
- ### H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得 なし。
 2. 実用新案登録 なし。
 3. その他 なし。

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）

分担研究報告書

「非侵襲的生体膵島イメージングに必要なプローブ標識法の検討」

分担研究者 名前 天満 敬 所属 京都大学薬学研究科・病態機能分析学分野

研究要旨：本研究では糖尿病超早期診断を目的とした、膵島量を測定するための新規分子イメージング用分子プローブの作製を行った。 β 細胞特異的な機能タンパクを認識する分子プローブとして、低分子化合物、ペプチド・抗体などの高分子化合物の作製を行い、それに、 ^{11}C / ^{18}F 等の PET 核種、 ^{123}I 等の SPECT 核種、MR 造影核種（Mn や Gd など）などを導入するための、基礎的検討を行った。

A. 研究目的

本研究における分担業務の目的は、共同研究者らによって設計された、膵島量を測定するための新規分子イメージング用分子プローブの作製を行うことである。

B. 研究方法

設計を行なった低分子化合物、ペプチド・抗体などの高分子化合物の作製を行い、それに、 ^{11}C や ^{18}F 等の PET 核種、 ^{123}I 等の SPECT 核種、MR 造影核種（Mn や Gd など）などを導入するための、基礎的検討を行った。

1. プローブの作製

1) GLUT2: 糖鎖骨格を持つ低分子化合物、あるいは抗体などの合成ルートの作成。抗体標識では、標的分子への親和性に関する部位とこれと独立してイメージング用金属核種を安定に保持する部位とを具備する二官能性キレート試薬の概念に基づき、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ や ^{111}In 等の放射性核種あるいは MR 造影核種の導入法の確立、2) SUR1: 設計したフッ素導入 Mitiglinide 誘導体の合成ルートの作成、少量スケールでの合成検討、3) VMAT2: ^{11}C -DTBZ、 ^{18}F -(+)-DTBZ の標識化の確立、新規プローブの合成ルートの作成、4) GLP-1R: ペプチド性リガンドの antagonist として

Exendin(9-39) を、agonist として Exendin-4 を母体化合物に選択し、リン残基側差のアミノ基に標識部位を設定した。 ^{18}F が導入可能な Exendin(9-39) の少量スケールでの合成検討、標識化の確立、5) GPR40/120: フッ素導入 GW9508 誘導体、フッ素導入 GW1100 誘導体の少量スケールでの合成検討、標識化の確立。

2. 標識化の基礎的検討

プローブ作製において、リガンドや基質などに、 ^{11}C や ^{18}F 等の PET 核種、 ^{123}I 等の SPECT 核種、MR 造影核種（Mn や Gd など）などの導入法の確立。特に、ペプチド化合物である Exendin(9-39) を ^{18}F 標識する為の標識試薬である、 ^{18}F SFB の合成法の確立。

C. 研究結果

平成 20 年 2 月現在のプローブの作製状況を以下に示す。

1. プローブの作製

1) GLUT2: 糖鎖骨格を持つ低分子化合物、あるいは抗体などの合成ルートを作成中。抗体標識では、標的分子への親和性に関する部位とこれと独立してイメージング用金属核種を安定に保持する部位とを具備する二官能性キレート試薬の概念に基づき、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ や ^{111}In 等の放射性核種あるいは

はMR造影核種の導入を検討中、2) SUR1 : 設計したフッ素導入 Mitiglinide 誘導体の合成ルートを作成、少量スケールでの合成を行い、中間体までの合成に成功。引き続き最終化合物までの合成を継続中、3) VMAT2 : C-11-DTBZ の標識化の確立、新規プローブの合成ルートを作成中、4) GLP-1R : 標識可能な Exendin(9-39)誘導体の合成修了、5) GPR40/120 : フッ素導入 GW9508 誘導体、標識前駆体の合成修了、フッ素導入 GW1100 誘導体、標識前駆体の合成修了。

2. 標識化の基礎的検討

ペプチド化合物である Exendin(9-39)、Exendin-4 を ^{18}F 標識するための標識試薬である、 ^{18}F SFB の合成法を検討した結果、放射化学的収率 30~40%程度で目的の ^{18}F SFB を得ることに成功した。

D. 考察

β 細胞特異的な機能タンパクを認識する分子プローブとして、低分子化合物、ペプチド・抗体などの高分子化合物の作製を行い、一部化合物については合成を修了した。しかし、新規に設計中のプローブも含まれており、化合物の合成を加速する必要がある。

E. 結論

本研究では、共同研究者らによって設計された、膵島量を測定するための新規分子イメージング用分子プローブの作製を行った。標識前駆体等の合成が修了した、Exendin(9-39)誘導体、GW9508 誘導体、GW1100 誘導体に関しては、標識化の検討中である。中間体までの合成を行っている Mitiglinide 誘導体に関しては、最終化合物までの合成を加速する。GLUT2、

VMAT2 をターゲットにした分子プローブに関しては、設計段階のものも含まれており、今後重点的に加速する予定である。総じて、ほぼ計画通りにプローブの作製は行われていると考えられる。

F. 健康危険情報 特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Aita K, Temma T, Kuge Y, Saji H.

Development of a novel neodymium compound for in vivo fluorescence imaging.

Luminescence 22(5): 455-61, 2007

2. 学会発表 なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし。

2. 実用新案登録 なし。

3. その他 なし。

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）

分担研究報告書

「非侵襲的生体膵島イメージング用プローブの *in vivo* 評価

－ ^{125}I 標識 Exendin(9-39)を用いた検討－

分担研究者 名前 河嶋 秀和 所属 京都大学医学研究科 画像診断学・核医学

研究要旨：糖尿病の超早期診断を実現するための新規 PET プローブ候補の一つとして、膵臓ランゲルハンス島 β 細胞膜上に特異的に発現する glucagon-like peptide-1 (GLP-1) 受容体を標的とした、ペプチド性リガンドの Exendin(9-39) を選択し、その 12 番リジン残基への ^{18}F の導入を計画した。そこで、市販の ^{125}I 標識 Exendin(9-39) をマウスに投与し、その体内動態を基礎的に評価した結果、本リガンドは、体幹部においては膵臓に高く集積することが示された。

A. 研究目的

糖尿病の超早期診断を実現するため、膵臓ランゲルハンス島 β 細胞膜上に発現するタンパク質を標的とした PET プローブの創製を試みる。具体的には、①脂肪酸受容体 (GPR40)、② K_{ATP} チャンネル構成タンパク (SUR1)、③glucagon-like peptide-1 (GLP-1) 受容体を対象として、それぞれに結合する標識リガンドを作製する。

当該分担研究分野の目的は、GLP-1 受容体に高い親和性を有するペプチド性リガンド、Exendin(9-39) のイメージングプローブとしての有効性に関する基礎的評価である。現在、Exendin(9-39) の 12 番リジン残基に、陽電子放出核種である ^{18}F を導入することを計画している。そこで、まず市販の ^{125}I 標識 Exendin(9-39) をマウスに投与し、その体内動態を測定することで、本ペプチドを β 細胞のインビボイメージングに適用できる可能性について検討した。

B. 研究方法

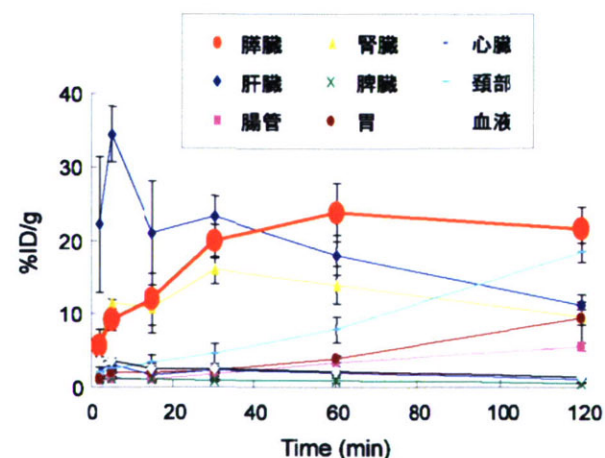
^{125}I -Bolton-Hunter labeled exendin(9-39) (PerkinElmer) を、雄性 ddY マウス (6 週齢、28-30 g) に 37 kBq ずつ尾静脈より投与した。投与 2, 5, 15, 30, 60, 120 分後に屠殺し (n=5)、臓器を摘出した。それぞれの重量と放射能を測定し、単位重

量あたりの放射能 (%ID/g) を算出した。

(倫理面への配慮)

動物実験は事前に研究実施機関の動物実験委員会の承認を受けた上で、各機関の動物実験指針に基づきこれを行う。

C. 研究結果



各臓器への放射能集積について、その経時変化をグラフに示す。 ^{125}I 標識 Exendin(9-39) は膵臓に高く集積し、投与 60 分後で 23.8%ID/g、120 分後で 21.5%ID/g となった。また、血液からのクリアランスも速やかであった。

D. 考察

所期の通り、 ^{125}I 標識 Exendin(9-39) が膵

臓に高く集積したことから、本ペプチド性リガンドはインビボでもβ細胞に結合することが示唆された。したがって、¹⁸Fを Exendin(9-39)で標識することにより、膵臓β細胞を PET 撮像できる可能性が示された。なお、胃と頸部(甲状腺を含む)にも経時的な放射能集積の増加を認めたが、これらは代謝により生じた ¹²⁵I イオンが集積した結果と推察され、¹⁸F 標識した場合は異なる挙動を取るものと予想される。

E. 結論

Exendin(9-39)は生体に投与した場合も膵臓に集積したことから、陽電子放出核種の ¹⁸F で標識することで、膵臓β細胞のインビボイメージングに応用できることが示唆された。今後は実際に ¹⁸F 標識 Exendin(9-39)を合成し、動物を用いた基礎評価と PET 撮像へと展開する。

F. 健康危険情報 特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Zhao S, Kuge Y, Kohanawa M, Takahashi T, Kawashima H, Temma T, Takei T, Zhao Y, Seki K, Tamaki N.

Extensive FDG uptake and its modification with corticosteroid in a granuloma rat model: an experimental study for differentiating granuloma from tumors.

Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging 34(12): 2096-105, 2007.

2. Saji H, Ogawa K, Kitamura Y, Kubota-Akizawa M, Kawashima H.

Chemical control of biological activity and biodistribution of metal compounds: Drug design of metal complexes with biological activity and target-specific biodistribution.

Biomed. Res. Trace. Elements 18(3): 255-63, 2007.

2. 学会発表

Kawashima H, Yamane M, Kimura H, Kuge Y, Saji H

A novel low molecular weight radiotracer for apoptosis imaging: radioiodinated isatin sulfonamide targeting caspase-3

The Society of Nuclear Medicine 54th Annual Meeting. Washington DC (2007)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし。

2. 実用新案登録 なし。

3. その他 なし。

研究要旨:本研究で使用する小動物用高分解能 PET システムの性能の基礎評価を行ったところ、画像再構成の方法によらず 1.35 mm が十分に分解可能であり、画像のシグナル強度は実験で使用すると考えられる放射能強度の範囲で高い直線性を示した。また、画像上で算出した臓器の放射能と摘出した臓器の放射能はほぼ等しい値を示した。以上の結果から、本研究にて使用する小動物用高分解能 PET システムは、生体内の膵島量を非侵襲的に定量可能な画像解析法の開発に十分に貢献しうると考えられた。

A. 研究目的

本研究の目的は、糖尿病の超早期診断のために、生体内の膵島量を非侵襲的に定量化可能な分子プローブおよび画像診断法の開発を行うことである。その目的を達成するために、本研究では小動物用高分解能 PET システムを使用することから、あらかじめ当該システムの性能・特性に関する知見を得ておくことは重要であると考えられる。そこで本年度は、ファントムを用いて装置の分解能・定量性評価を行うとともに、動物を用いた基礎的検討を行った。

B. 研究方法

まず、デレンゾファントム（径：2.4、2.0、1.7、1.35、1.0、0.7 mm）に ^{18}F 溶液 13.7 MBq を加えて 60 分間撮像し、3 種の再構成法（FBP 法、2D-OSEM 法、3D-OSEM 法）を用いて画像再構成を行い、それぞれの画像の比較と分解能の評価を行った。

次に、中空ファントム（径：3 cm）に ^{18}F 溶液 68 MBq を加えて 1.5 時間毎に 30 分間撮像し、FBP 法を用いて画像再構成を

行い、定量性・直線性を評価するとともに、PET シグナルを放射能の絶対値に変換するための値（Cross Calibration Factor, CCF）を算出した。

最後に、マウスに ^{18}F 溶液を投与して撮像を行い、画像上で算出した臓器の放射能と摘出した臓器の放射能との相関を調べた。なお、動物実験は事前に京都大学動物実験委員会の承認を受けた上で、動物実験指針を遵守して行った。

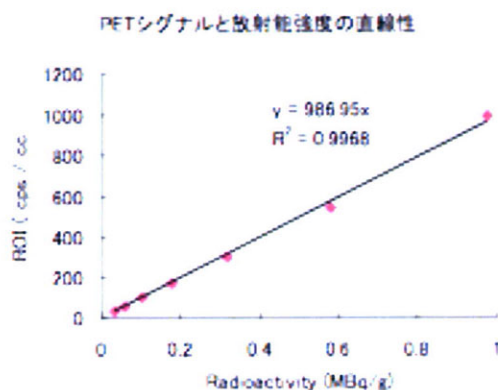
C. 研究結果

デレンゾファントムでの検討の結果、いずれの再構成法を用いても 1.35 mm が十分に分解できた。また 3D-OSEM 法がもっとも高コントラストな画像を与えた。



次に、

中空ファントムの画像に関心領域を設定して算出した PET 画像のシグナル強度を縦軸に、その時の中空ファントム内の放射能強度を横軸にとって両者の関係を調べたところ、 $R^2 > 0.99$ と非常に高い相関、直線性を示した。またこの時、CCF を計算すると 1.05 となった。



最後にマウスの PET 撮像を行い、算出した CCF を用いて画像上で求めた臓器への放射能集積量と摘出した臓器の放射能集積量を比較したところ、ほぼ同等の値が得られた。

D. 考察

分解能が 1.35 mm と非常に高かったことから、小動物の膵臓を他臓器と充分区別して画像化できると考えられた。また、画像上で算出した放射能集積量と摘出して測定した放射能集積量が等しかったことから、画像を利用した非侵襲的な定量が可能であることが示された。

E. 結論

本研究にて使用する小動物用高分解能 PET システムは高い分解能、直線性、定量性を有しており、生体内の膵島量を非侵襲的に定量可能な画像解析法の開発に十

分に貢献しうると考えられる。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Mamede M, Ishizu K, Ueda M, Mukai T, Iida Y, Kawashima H, Fukuyama H, Togashi K, Saji H. Temporal change in human nicotinic acetylcholine receptor after smoking cessation: 5IA SPECT study.

J. Nucl. Med. 48(11):1829-35, 2007.

2. Oishi N, Hashikawa K, Yoshida H, Ishizu K, Ueda M, Kawashima H, Saji H, Fukuyama H. Quantification of nicotinic acetylcholine receptors in Parkinson's disease with (123)I-5IA SPECT.

J. Neurol. Sci. 256(1-2): 52-60, 2007

2. 学会発表

なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし。

2. 実用新案登録 なし。

3. その他 なし。

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）

分担研究報告書

「非侵襲的生体イメージングによる糖尿病の超早期診断法の開発」

分担研究者 名前 富樫 かおり 所属 京都大学 画像診断学・核医学

研究要旨：糖尿病の超早期診断を膵島量の検知の点からアプローチすることを目的に、感度・特異度の高いプローブを作成するためにβ細胞特異的なリガンドや基質、抗体の検討が進められているが、一方で、超早期診断を病態の検知からアプローチすることも重要である。すなわち、糖尿病へと到る病理学的変化の過程において、膵島破壊に貪食細胞の関与が疑われていることに着目し、糖尿病発症以前に貪食細胞をターゲットにした可視化・定量化の可能性について検討した。

A. 研究目的

糖尿病を発症するまでに膵島の70%以上が破壊されるが、その過程に貪食細胞の関与が指摘されている。残存膵島量を定量する以外にも、糖尿病の前段階で発生している破壊過程を特異的に検出することで、未発症段階での早期発見と予防・機能回復を図れる可能性がある。そこでこの細胞をターゲットとしたイメージングが可能であるかについて、特に動物モデルを対象とした実験方法の検討を行った。

B. 研究手法検討

貪食細胞は膵β細胞とは異なる細胞であり、膵島可視化を目的とした表面マーカーを用いた描出は困難と考えられた。また、活性化していない貪食細胞は、全身に存在するため、活性化した貪食細胞をより選択的に検知するマーカーが必要である。すなわち、貪食作用を利用したイメージングを試みる。まず、生体内の細網内皮系に集積する、MRIでコントラストを示す金属(Gd, Mn, Fe)を有するコロイド様製剤が対象となる(2)。しかしGd, Mnでは人体に対する毒性問題を回避できない可能性があるため、Fe製剤を対象として検討を進めた。

C. 検討結果

代表的なFe製剤としては超常磁性酸化鉄粒子(superparamagnetic iron oxide particles: SPIO)製剤が挙げられる。通常量の静脈投与により生体内の肝臓や脾臓、骨髄といった細網内皮系に摂取される量が多く、破壊が進行する組織への集積は必ずしも高くないと推測された。これに対して、粒子サイズがSPIOより小さな微小超常磁性酸化鉄粒子(ultrasmall superparamagnetic iron oxide particles: USPIO)製剤は、炎症組織や梗塞後組織、リンパ節などへの集積が報告されており、今回の目的により適切と考えられた。ただし、国内未承認薬であり、入手についての検討から開始した。

実験方法は、糖尿病モデル動物を対象として、SPIO製剤の大量投与によりおこなう。最初に集積する肝臓、脾臓ならびに骨髄の細網内皮系を飽和させることでそれに続く膵島内の貪食細胞への集積を図る。集積に十分な時間経過の後、MRI撮像を行い組織所見における膵島炎、膵島量と膵島内の賦活化された貪食細胞への集積を発症前後で検討する。なお入手可能