

2009/2017E

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 19～21 年度 総合・分科研究報告書

主任研究者 稲垣暢也

平成 22(2010)年 4 月

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 19～21 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 稲垣 暢也

平成 22(2010)年 4 月

## 目 次

I. 総括研究報告	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. 分担研究報告	
1. 非侵襲的生体膵島イメージングに必要な膵島定量モデル 動物実験系の構築 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	7
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	9
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開発	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 － $^{18}\text{F}$ 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プローブを用いた小動物用 高分解能 PET 撮像の検討 上田 真史	16
7. MRI を用いた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 富樫 かおり	18
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	21
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	24
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	28
平尾 佳	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	31
IV. 研究成果の刊行物・別刷	37

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」

研究代表者 稲垣 暢也 所属 京都大学 糖尿病・栄養内科学

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  $\mu\text{m}$  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。平成 19 年度には、 $\beta$  細胞特異的な機能タンパクを中心に分子プローブを選定して合成を開始し、平成 20 年度は作製したプローブの標識化実験、プローブの基礎評価を行い、平成 21 年度にかけて Exendin(9-39) の  $^{18}\text{F}$  標識体など複数のプローブによる PET 撮像実験で膵臓への集積を確認した。以上の結果をもとに平成 21 年度はプローブの改良を行った。また 3 年の間に膵  $\beta$  細胞特異的にルンフェラーゼを発現するマウスを用いた IVIS による定量系、OPTscanner による三次元定量系を構築し、さらに膵島移植を利用した定量系を併せた系で IVIS と PET 撮像の比較実験を開始した。MRI による膵島の可視化については、平成 19 年度に非プローブ下における超高磁場 MRI による膵島描出は困難と判断し、平成 20 年度からプローブ存在下における検討を開始し、平成 21 年度はプローブ存在下での *in vitro* の検討を行った。以上のように、3 年間の間に、有用性が期待される複数のプローブを得たため、今後定量性の評価、糖尿病モデル動物での評価を行っていききたい。

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 臓器移植治療部 助教	富樫 かおり	京都大学医学研究科 放線診断学 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 放射線診断学 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 19 年度には糖尿病 880 万人、境界型 1320 万人で、平成 14 年度の調査に比べてさらに増加し続けており、これまでの耐糖能検査を基準とした糖尿病発症前の介入によっても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。従って、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。

以上より本研究の目的は、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探索

生体内の直径 50~500  $\mu\text{m}$  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。(豊田、斉藤)

### 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、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 などの標識は分担研究者の天満らとともに行った。

### 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)などの評価は、豊田らにより行った。

(2).*ex vivo*: 膵灌流モデルで(1)と同様の検討を行う。(豊田)

## 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。分担研究者の河嶋らとともに行う。また、β細胞選択性は、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に標識プローブを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、至適撮像条件の検討を行う。microPET、MRI の撮像実験は、各々分担研究者の上田、松田、富樫らとともに行う。(3). 膵島移植モデルを用いて、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、豊田らで行う。

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 年度に以下の 1)~5) の標的に対するリガンドや抗体を選定し、作製した化合物について、平成 20 年度は標識化、基礎評価、そして PET 撮像の検討を行い、本年度はそれらの結果を元に新たなプローブの合成と評価を行った。それぞれについて結果を示す。

1) グルコース輸送担体 2 (GLUT2) の基質: 毒性が無く膵β細胞に良好な集積性を示す化合物の設計終了し、合成し、標識化検討を開始した。

2)  $K_{ATP}$  チャンネルのリガンド: ミチグリニド: β細胞への結合性評価、標識化終了し、 $^{18}\text{F}$  標識したプローブによる体内分布実験と PET 撮像実験を行い、膵臓への集積を認めたが、S/N 比低く改変を要した。

3) 小胞モノアミントランスポーター

( VMAT2 ) の リ ガ ン ド : Dihydratotetabenazine (DTBZ)については、合成収率悪く再設計検討となった。

4) Glucagon-like peptide-1 (GLP-1)受容体のリガンド：ペプチド性リガンドとして Exendin(9-39)を母体化合物に選択し、標識部位を種々設定し Exendin(9-39)の誘導体として、 $^{18}\text{F}$  もしくは  $^{123}\text{I}$  を導入した7種類の標品と標識前駆体を合成。さらに、新規のリガンド化合物の設計と合成、標識化を行った。いずれも膵臓への集積を認めた。(右図は化合物AのPET画像)

5) G 蛋白共役受容体(GPR40)のリガンド：分担研究者の佐治らと GW9501, GW1100 を選定して設計し、 $^{18}\text{F}$  もしくは  $^{123}\text{I}$  を導入した GPR40/GPR120 agonist GW9508 誘導体である3化合物を、さらに GPR40 antagonist GW1100 誘導体である3化合物を設計した。合成検討、標識化検討を行った。

6) ペプチド受容体の抗体：新たに3つのペプチド受容体を選定し、その抗体の標識化を検討中。

以上の結果をもとに、平成21年までに別記に示すように特許を申請した。

#### D. 考察

Exendin(9-39)の化合物で、PET 撮像実験まで進み、膵臓への集積を認めた。同化合物はさらにプローブとしての有用性評価と改良を行い、新たな化合物合成を行った。今後、*in vivo*膵島量定量モデルを用いて PET 撮像を行い、プローブの定量性の評価を行うことによって、目的である超早期診断を可能とするプローブの絞り込みを行った上で、糖尿病モデル動物での最終的評価を行いたい。MRI によるイメージングは非プローブ存在下では困難であった。

#### E. 結論

Exendin(9-39)をはじめとして、 $\beta$  細胞選択性、膵臓集積性の高いプローブを得ており、今後の開発が期待できる状態であ

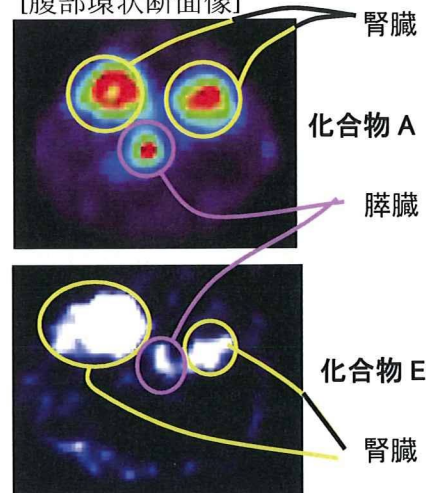
る。

図：ddY マウス(6週齢)

155  $\mu\text{Ci}$  の化合物尾静注後

撮像装置：ExploreVista(GE)

[腹部環状断面像]



F. 健康危険情報 特になし。

G. 研究発表

#### 1. 論文発表

1. 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.** 2: 753-762, 2007.

2. 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.

3. Naitoh R, Miyawaki K, Harada N, Mizunoya W, Toyoda K, Fushiki T, Yamada Y, Seino Y and Inagaki N. Inhibition of GIP signaling modulates adiponectin levels under high-fat diet in mice. **Biochem Biophys Res Commun.** 376(1): 21-5, 2008

4. 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  $\beta$ -cells in obese mice. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.** 294(1), E61-8, 2008

5. Yamada, C., Yamada, Y., Tsukiyama, K., Yamada, K., Udagawa, N., Takahashi, N., Tanaka, K., Drucker, D. J., Seino, Y., and Inagaki, N. The murine Gp1r is essential for control of bone resorption. **Endocrinology**. 149(2): 574-9, 2008

6. Kominato R, Fujimoto S, Mukai E, Nakamura Y, Nabe K, Shimodahira M, Nishi Y, Funakoshi S, Seino Y and Inagaki N. Src activation generates reactive oxygen species and impairs metabolism-secretion coupling in diabetic Goto-Kakizaki and ouabain-treated rat pancreatic islets. **Diabetologia**. 51(7): 1226-35, 2008

7. E. Mukai, K. Toyoda, H. Kimura, H. Kawashima, H. Fujimoto, M. Ueda, T. Temma, K. Hirao, K. Nagakawa, H. Saji, and N. Inagaki. GLP-1 receptor antagonist as a potential probe for pancreatic beta-cell imaging. **Biochem Biophys Res Commun** 389: 523-6, 2009.

8. Liu, X. Harada, N. Yamane, S. Kitajima, L. Uchida, S. Hamasaki, A. Mukai, E. Toyoda, K. Yamada, C. Yamada, Y. Seino, Y. and Inagaki, N. Effects of long-term dipeptidyl peptidase-IV inhibition on body composition and glucose tolerance in high fat diet-fed mice. **Life Sci** 84: 876-81, 2009.

## 2. 学会発表

1. K. Toyoda, E. Mukai, H. Kimura, H. Kawashima, H. Fujimoto, M. Ueda, T. Temma, K. Hirao, K. Nagakawa, H. Saji, and N. Inagaki. GLP-1 Receptor Signaling Protects Pancreatic Beta-Cells in the Intraportal Islet Transplant by Inhibiting Apoptosis. A 2008 **American Diabetes Association, 68<sup>th</sup> Scientific sessions**, June 6-10, SAN FRANCISCO, CA, in U.S.A.

2. K. Toyoda, T. Okitsu, X. Liu, S. Yamane, N. Harada, S. Uemoto, and N. Inagaki. Improved glucose metabolism by islet transplant at periportal site than intraportal site. A **European Association for the Study of Diabetes (EASD), 44<sup>th</sup> Annual Meeting 2008**, September 7-11, ROME, in ITALY

3. E. Mukai, K. Toyoda, H. Kimura, H.

Kawashima, H. Fujimoto, M. Ueda, T. Temma, K. Hirao, K. Nagakawa, H. Saji, and N. Inagaki. Non-invasive imaging of pancreatic islets targeting glucagon-like peptide-1 receptors. A **European Association for the Study of Diabetes (EASD), 44<sup>th</sup> Annual Meeting 2008**, September 7-11, Rome, in ITALY

4. K. Toyoda, E. Mukai, H. Kimura, H. Kawashima, H. Fujimoto, M. Ueda, T. Temma, K. Hirao, K. Nagakawa, H. Saji, and N. Inagaki. Non-invasive imaging of pancreatic islets targeting glucagon-like peptide-1 receptors. **2009 Asia Islet Biology & Incretin Symposium (AIBIS)**, July 30-31, in Korea

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 出願番号：PCT/JP2009/56628

特願2009-68837号

特願2009-68838号

特願2009-68839号

特願2009-204769号

特願2009-228658号

PCT/JP2009/066398

特願 2009-185470 号

2. 実用新案登録 なし

3. その他 なし

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  $\mu\text{m}$  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り、 $\beta$  細胞特異的な機能タンパクを選定してプローブの設計を行い作製した化合物の基礎評価を行っている。膵  $\beta$  細胞特異性を認めたプローブは、*in vivo* における  $\beta$  細胞の定量性を評価する必要がある、そのためのモデル動物実験系の構築を行った。

#### A. 研究目的

現在、我が国における 2 型糖尿病は平成 19 年度の統計で推定 880 万人を越え、平成 14 年度よりもさらに増加し続けている。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。

本研究の目的は、本開発研究事業で作製し基礎評価で有用性が示された膵  $\beta$  細胞特異的なプローブについて、*in vivo* における膵島定量性を評価するための実験系を構築することである。

#### B. 研究方法

1. *in vivo/ex vivo* ARG 法の開発：膵  $\beta$  細胞特異的に GFP を発現するマウスにプローブを投与後、イメージアナライザーにより蛍光と ARG による位置と集積量を比較検討した。

2. 3D マッピングによる MRI 撮像解析：膵島に焦点を絞って解析するために、膵  $\beta$  細胞特異的に蛍光を発現するマウスの膵断片をアガロースゲルに埋包し、実態蛍光顕微鏡で膵島の三次元位置特定した後に MRI 撮像を行う方法を構築した。

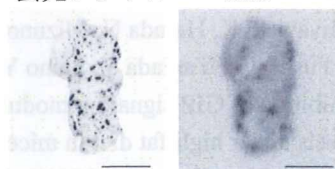
3. 膵島定量モデルの構築：プローブ集積と膵島量を比較するために、OPT Scanner と IVIS システムの 2 種類を用いる。実験動物として

は、膵  $\beta$  細胞特異的にルシフェラーゼを発現するトランスジェニックマウスを用い、実験系としては部分膵摘、膵島移植、少量 STZ 投与による膵島減少モデルを選択した。

#### C. 研究結果

1. 図 1 に示すように、蛍光で示される膵  $\beta$  細胞と ARG で示されるプローブ集積が一致することが分かった。

図 1: 蛍光シグナル ARG



2. 3D マッピングして非プローブ存在下での膵島描出を試みたができなかった。

3. OPT Scanner によって膵臓内の膵島を 3 次元的に描出できた。また、膵  $\beta$  細胞特異的にルシフェラーゼを発現するマウスの膵島量は IVIS システムで生体のまま定量可能であった。膵島移植モデルでは、虹彩上への膵島移植を確立した。少量 STZ モデルを確立した。

部分膵摘モデルでは、膵島量を 50～100% で調整できた。50%膵摘したモデルの耐糖能は問題ないことを確認した。

#### D. 考察

膵  $\beta$  細胞特異的プローブを評価するための様々な系が構築され、今後、有用性の高いプローブの選択が可能である。

#### E. 結論

*in vivo* におけるプローブの定量性の評価に



必須の定量系モデルと測定計を構築した。これを用いて最終的に有用なプローブの選定が可能になると思われる。

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 beta-cells in obese mice. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.** 294(1), E61-8, 2008

4. Naitoh R, Miyawaki K, Harada N, Mizunoya W, Toyoda K, Fushiki T, Yamada Y, Seino Y, Inagaki, N. Inhibition of GIP signaling modulates adiponectin levels under high-fat diet in mice. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 376(1), 21-5, 2008

5. Harada, N., M. Fukushima, Toyoda K, Mitsui R, Izuka T, Taniguchi A, Nakai Y, Yamada Y, Seino Y, Inagaki N. Factors responsible for elevation of 1-h postchallenge plasma glucose levels in Japanese men. **Diabetes Res Clin Pract** 81(3): 284-9, 2008

6. E. Mukai, K. Toyoda, H. Kimura, H. Kawashima, H. Fujimoto, M. Ueda, T. Temma, K. Hirao, K. Nagakawa, H. Saji, and N. Inagaki, GLP-1 receptor antagonist as a potential probe for pancreatic beta-cell imaging. **Biochem Biophys Res Commun** 389: 523-6, 2009.

7. Liu, X, N. Harada, S. Yamane, L. Kitajima, S. Uchida, A. Hamasaki, E. Mukai, K. Toyoda, C. Yamada, Y. Yamada, Y. Seino, and N. Inagaki,

Effects of long-term dipeptidyl peptidase-IV inhibition on body composition and glucose tolerance in high fat diet-fed mice. **Life Sci** 84 : 876-81, 2009.

2. 学会発表

1. Toyoda K, et al. GLP-1 Receptor Signaling Protects Pancreatic Beta-Cells in the Intraportal Islet Transplant by Inhibiting Apoptosis. A 2008 **American Diabetes Association, 68<sup>th</sup> Scientific sessions**, June 6-10, SAN FRANCISCO, CA, in U.S.A.

2. Toyoda K, et al. Improved glucose metabolism by islet transplant at periportal site than intraportal site. A **European Association for the Study of Diabetes (EASD), 44<sup>th</sup> Annual Meeting 2008**, September 7-11, ROME, in ITALY

3. Mukai E, Toyoda K, et al. Non-invasive imaging of pancreatic islets targeting glucagon-like peptide-1 receptors. A **European Association for the Study of Diabetes (EASD), 44<sup>th</sup> Annual Meeting 2008**, September 7-11, Rome, in ITALY

4. Toyoda K, et al. Non-invasive imaging of pancreatic islets targeting glucagon-like peptide-1 receptors. 2009 Asia Islet Biology & Incretin Symposium (AIBIS), July 30-31, in Korea

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 出願番号 : PCT/JP2009/56628  
特願2009-68837号  
特願2009-68838号  
特願2009-68839号  
特願2009-204769号  
特願2009-228658号  
PCT/JP2009/066398  
特願 2009-185470 号

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立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、ビーグル犬を用いた自家膵島移植モデルを確立した。

#### A. 研究目的

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。

この方法は膵島を一旦体外に取り出すことができるため、膵島量を体外であらかじめ評価することが可能となる。すなわち膵島移植を応用することで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* で評価するための効果的なモデルを提供できる。前臨床として中動物での実施を実現するため、イヌの自家膵島移植モデルの作成を目指した。このためには、イヌ膵島分離技術、イヌ膵島移植技術、長期生着モデルの確立が必須である。

#### 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、膵島評価

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。

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  $\mu$ 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。

##### 4. 膵島移植

膵全摘後から全身麻酔下にて管理しているビーグル犬の脾静脈より門脈本幹にカニューレーションを行い、それを通して分離した膵島を分離後直ちに門脈内移植した。

（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

膵島分離技術の確立には、3頭のビーグル犬を使用した。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。

膵島移植技術および長期生着モデルの確立には 4頭のビーグル犬を使用した。うち

2 頭について膵島移植後、6 ヶ月以上正常血糖を維持することを確認した。

#### D. 考察

イヌ膵臓から機能膵島を分離する技術、ならびにその分離膵島を長期生着に到らせることが可能な膵島移植技術を開発することに成功した。

#### E. 結論

ビーグル犬を用いたイヌ自家膵島移植モデルを確立することによって、非侵襲的生体膵島イメージングのために開発されたプローブの効果検証を目的とした前臨床試験のための準備を完了することができた。

#### F. 健康危険情報 なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

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**, 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
3. Toyoda K, **Okitsu T**, Yamane S, et al. GLP-1 receptor signaling protects pancreatic beta cells in intraportal islet transplant by inhibiting apoptosis. **Biochem Biophys Res Com** 367(4): 793-8, 2008.
4. Noguchi H, Yamada Y, **Okitsu T**, et al. Secretory unit of islet in transplantation (SUIT) and engrafted islet rate (EIR) indexes are useful for evaluating single islet transplantation. **Cell Transplant**. 17(1-2):121-8, 2008
5. Liu X, Matsumoto S, **Okitsu T**, et al. Analysis of donor- and isolation-related variables from non-heart-beating donors (NHBDs) using the Kyoto islet isolation method. **Cell Transplant**. 17(6):649-56, 2008
7. Sato E, Yano I, Shimomura M, Masuda S, Katsura T, Matsumoto S, **Okitsu T**, et al. Larger dosage required for everolimus

than sirolimus to maintain same blood concentration in two pancreatic islet transplant patients with tacrolimus. **Drug Metab Pharmacokin**. 24(2):175-9, 2009

##### 2. 学会発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

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
4. **Okitsu T**. Three Year Follow-Up after Clinical Islet Transplantation from Donation-After-Cardiac-Death (DCD) Donors to Type 1 Diabetic Patients. A 2008 American Transplant Congress, May 31-June 4, Toronto, CANADA
5. **Okitsu T**. Islet Transplantation in Japan. 2009 Joint Conference of 10th CTS (Cell Transplant Society) and 36th JSOPMB (Japan Society for Organ Preservation and Medical Biology), April 20-21, Okayama, JAPAN

#### 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

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、C-11/F-18 等を用いる PET、I-123 等を用いる SPECT 核種、Mn、Gd、F-19 等を用いる MRI とした。

### 1. 標的分子の探索

糖尿病薬や、糖尿時に変化する膵臓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 C-11/F-18 等の PET 核種、I-123 等の SPECT 核種、MR 造影核種 (Mn、Gd、F-19 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。

## C. 研究結果

平成 19 年度～21 年度までに行われた標的分子の探索、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  $\mu\text{m}$  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、 $\beta$  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  $\beta$  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  $\beta$  細胞膜特異的に発現する KATP チャンネルの構成成分、3) VMAT2：膵  $\beta$  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  $\beta$  細胞に分布、5) GPR40/120：脂肪酸をリガンドとする、膵  $\beta$  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、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$  や  $^{111}\text{In}$  等の放射性核種あるいは MR 造影核種の導入を試みた。低分子化合物として、F-18 を導入した化合物を 2 種類設計した。2) SUR1：医薬品として用いられている Mitiglinide を母体化合物とした F-18、I-123 導入化合物を 2 種類設計した。3) VMAT2：既が開発されている、C-11-DTBZ、F-18(+)-DTBZ を基に、F-18 を導入した化合

物を1種類設計した。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標識部位を探索した。Exendin 誘導体として、F-18、I-123 導入化合物を9種類設計した。5) GPR40/120: F-18、I-123、F-19、を導入した GPR40/GPR120 agonist GW9508 誘導体を3種類、さらに GPR40 antagonist GW1100 誘導体を4種類設計した。構造最適化に関して、計算化学を用いて行った。

設計した化合物は共同研究者に提案し、合成検討を行った。

#### D. 考察

膵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、 $\beta$  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。更に in vivo、in vitro の評価を基に、構造最適化を行った。

#### 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。標的分子の探索の結果、特に GLP-1R がイメージングの対象として最適であることを見出した。更に、GLP-1R をターゲットにした膵臓  $\beta$  細胞イメージングプローブとして、今後の臨床研究に向けた有望な化合物の開発に成功した。

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. Kuge Y, Kume N, Ishino S, Takai N, Ogawa Y, Mukai T, Minami M, Shiomi M, Saji H. Prominent lectin-like oxidized low density lipoprotein (LDL) receptor-1 (LOX-1) expression in atherosclerotic lesions is associated with tissue factor expression

and apoptosis in hypercholesterolemic rabbits. *Biol Pharm Bull*. 31(8): 1475-82, 2008.

3. Ishino S, Mukai T, Kuge Y, Kume N, Ogawa M, Takai N, Kamihashi J, Shiomi M, Minami M, Kita T, Saji H. Targeting of lectinlike oxidized low-density lipoprotein receptor 1 (LOX-1) with 99mTc-labeled anti-LOX-1 antibody: potential agent for imaging of vulnerable plaque. *J Nucl Med*. 49(10): 1677-85, 2008.
4. Kuge Y, Obokata N, Kimura H, Katada Y, Temma T, Sugimoto Y, Aita K, Seki K, Tamaki N, Saji H. Synthesis and evaluation of a radioiodinated lumiracoxib derivative for the imaging of cyclooxygenase-2 expression. *Nucl Med Biol*. 36(8): 869-76, 2009.
5. Ono M, Watanabe R, Kawashima H, Cheng Y, Kimura H, Watanabe H, Haratake M, Saji H, Nakayama M. Fluoro-pegylated chalcones as positron emission tomography probes for in vivo imaging of beta-amyloid plaques in Alzheimer's disease. *J Med Chem*. 52(20): 6394-401, 2009.
6. Ono M, Hayashi S, Kimura H, Kawashima H, Nakayama M, Saji H. Push-pull benzothiazole derivatives as probes for detecting beta-amyloid plaques in Alzheimer's brains. *Bioorg Med Chem*. 17(19): 7002-7, 2009.
7. Mukai E, Toyoda K, Kimura H, Kawashima H, Fujimoto H, Ueda M, Temma T, Hirao K, Nagakawa K, Saji H, Inagaki N. GLP-1 receptor antagonist as a potential probe for pancreatic beta-cell imaging. *Biochem Biophys Res Commun*. 389(3): 523-6, 2009.
8. Maya Y, Ono M, Watanabe H, Haratake M, Saji H, Nakayama M. Novel radioiodinated auronones as probes for SPECT imaging of beta-amyloid plaques in the brain. *Bioconjug Chem*. 20(1): 95-101, 2009.

##### 2. 学会発表

1. Kimura H, Ogawa Y, Kawashima H, Mukai E, Toyoda K, Fujimoto H, Hirao K, Nagakawa K, Ono M, Inagaki N, Saji H. Development of in vivo imaging agents targeting glucagon-like peptide-1 receptor (GLP-1R) in pancreatic islets  
SNM's 56<sup>th</sup> Annual Meeting, Tronto, Canada,

2009,6,13

2. Kimura H, Ogawa Y, Kawashima H, Mukai E, Toyoda K, Fujimoto H, Hirao K, Nagakawa K, Ono M, Inagaki N, Saji H. Development of in vivo imaging agents targeting glucagon-like peptide-1 receptor (GLP-1R) in pancreatic islets  
World Molecular Imaging Congress 2009, Montreal, Canada, September, 23-26, 2009

H. 知的財産権の出願・登録状況

1.特許出願

GLP-1R 関連：

特願 2008-241889、PCT/JP2009/56628、特願 2009-185470 号、特願 2009-204769 号、PCT/JP2009/66398

SUR1 関連：

特願 2009-68837 号

GPR40/120 関連：

特願 2009-68838 号、特願 2009-68839 号の計 8 件を出願した。

膵島イメージング用分子プローブ前駆体及びその使用

2.実用新案登録 なし

3.その他 なし

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、C-11/F-18等のPET核種、I-123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、ペプチドの作製を行い、それに、C-11/F-18等のPET核種、I-123等のSPECT核種、MR造影核種（Mn、Gd、F-19）などを導入するための検討を行った。

##### 1. プローブの作製

1) GLUT2：糖鎖骨格を持つ低分子化合物の合成ルートの作成、少量スケールでの合成検討。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：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として Exendin を母体化合物に選択し、標識部位を設定した。F-18、I-123 が導入可能な Exendin 誘導体の合成ルートの作成、少量スケールでの合成検討。5) GPR40/120：F-18、I-123 導入 GW9508 誘導体、GW1100 誘導体の合成ルートの作成、少量スケールでの合成検討。

##### 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、C-11/F-18等のPET核種、I-123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 を F-18 標識する為の標識試薬である、 $^{18}\text{F}$ SFB の迅速合成法の確立。マ

イクロウエーブを用いた F-18 迅速合成法の確立。

#### C. 研究結果

平成 19 年度～21 年度までに行われた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の合成ルートを作成し、2種類の F-18 導入化合物の標品と標識前駆体を合成。2) SUR1：F-18、I-123 導入 Mitiglinide 誘導体 2種類の標品と標識前駆体を合成。3) VMAT2：DTBZ 誘導体の合成ルートの作成。4) GLP-1R：ペプチド性リガンドとして Exendin を母体化合物に選択し、標識部位を設定した。Exendin(9-39)の誘導体として、F-18 もしくは I-123 を導入した 9種類の標品と標識前駆体を合成。5) GPR40/120：F-18 もしくは I-123 を導入した GW9508 誘導体 3種類、さらに GW1100 誘導体 4種類の標品と標識前駆体を合成。

##### 2. 標識化の基礎的検討

糖鎖骨格を持つ低分子化合物の  $^{18}\text{F}$  標識化を確立した。Mitiglinide 誘導体の  $^{18}\text{F}$  標識化を確立した。 $^{18}\text{F}$ SFB の迅速合成法である、one-pot 法を確立した。ペプチド化合物である Exendin の、 $^{18}\text{F}$ SFB を用いた  $^{18}\text{F}$  標識化を確立した。同様に  $^{125/123}\text{I}$ SIB を用いた  $^{125/123}\text{I}$  標識化を確立した。GW9508、GW1100 誘導体の  $^{18}\text{F}$  標識化、 $^{123}\text{I}$  標識化を確立した。

#### 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・

などの合成を行い、設計したほぼ全ての化合物の合成、標識化を修了した。特に、標識化に関しては、ペプチド、タンパクなどの標識試薬である、 $[^{18}\text{F}]\text{SFB}$  の迅速合成法を確立した。本法を用いることで、これまで90分かかっていた合成時間を、40分程度まで短縮可能となった。今後の誘導化を考慮した各化合物の合成ルートを、今回新たに構築することが出来た。当初計画した化合物の開発を本研究期間内で終わることが出来たと考えている。

#### 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合成を行った。**Exendin** に関しては、標的分子との結合実験の結果を基に最適化を行った。その結果、膵臓への集積が高く、近傍の臓器への非特異的な集積が低い化合物の開発に成功した。現在この化合物の大量合成法の確立を行っている。標識化に関しては、確立した迅速合成法を基に自動合成化を検討している。**GW9508** 誘導体、**GW1100** 誘導体に関しては、今年度新たに6種類の化合物の開発に成功した。これまでの結果を基に更なる最適化が必要と考えている。**GLUT2** をターゲットにした分子プローブに関しては、今回新たに合成ルートおよび標識法の確立を行った。今後プローブの評価を進める予定である。総じて、ほぼ計画通りにプローブの作製は行われたと考えている。

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. 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

3. Mukai E, Toyoda K, Kimura H, Kawashima H, Fujimoto H, Ueda M, Temma T, Hirao K, Nagakawa K, Saji H, Inagaki N. GLP-1 receptor antagonist as a potential probe for pancreatic beta-cell imaging. **Biochem Biophys Res Commun**. 389(3): 523-6, 2009.
4. Kuge Y, Obokata N, Kimura H, Katada Y, Temma T, Sugimoto Y, et al. Synthesis and evaluation of a radioiodinated lumiracoxib derivative for the imaging of cyclooxygenase-2 expression. **Nucl Med Biol**. 36(8):869-76, 2009.
5. Temma T, Iida H, Hayashi T, Teramoto N, Ohta Y, Kudomi N, et al. Quantification of regional myocardial oxygen metabolism in normal pigs using positron emission tomography with injectable  $(^{15}\text{O})\text{-O}$  (2). **Eur J Nucl Med Mol Imaging**. 37(2):377-85, 2009

##### 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



研究要旨：糖尿病の超早期診断を実現するための新規 PET プローブとして、膵臓ランゲルハンス島β細胞膜上の Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) 受容体に結合するペプチド性リガンド：Exendin(9-39)につき、4種の F-18 標識体 (Exendin analog 1-4) を合成した。単離膵島を用いた *in vitro* 結合実験の結果、各化合物は GLP-1 に対して高い親和性を保持していた。さらに ddY マウスに投与し、*ex vivo* 臓器摘出法により体内動態を基礎的に評価したところ、何れの化合物も膵臓に 4% ID/g 以上集積し、非侵襲的生体膵島イメージング用プローブとしての有用な知見が示された。

#### A. 研究目的

糖尿病の超早期診断を目指し、膵臓ランゲルハンス島β細胞膜に発現する Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) 受容体を標的とした PET プローブの基礎評価を行った。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)を母体とし、陽電子放出核種である F-18 を分子内の異なる位置に導入した4種の化合物、Exendin analog 1-4を合成した。各化合物の GLP-1 への親和性を *in vitro* で評価するとともに、ddY マウスに投与後の体内動態を比較した。これにより、本化合物によるβ細胞インビボイメージングの可能性を検討した。

#### B. 研究方法

Exendin analog 1-4 の非放射性フッ素体を合成し、<sup>125</sup>I]Exendin(9-39)と単離膵島を用いた *in vitro* 結合阻害実験により、膵島細胞に対する親和性を 50%阻害濃度 (IC<sub>50</sub>) として求めた。また、F-18 標識体を ddY マウス (雄性、6 週齢) に静脈内投与し、投与 5, 15, 30, 60, 120 分後に血液と臓器を摘出した (n=5)。各臓器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行った。

#### C. 研究結果

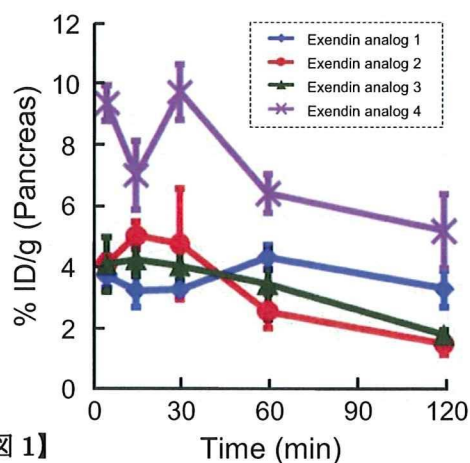
4種の Exendin analog (非放射性フッ素体) について、結合阻害実験から求めた IC<sub>50</sub> を表 1 に示す。

【表 1】

Compound	IC <sub>50</sub> (nM)
Exendin(9-39)	1.4
Exendin analog 1	1.5
Exendin analog 2	6.0
Exendin analog 3	23.6
Exendin analog 4	10.7

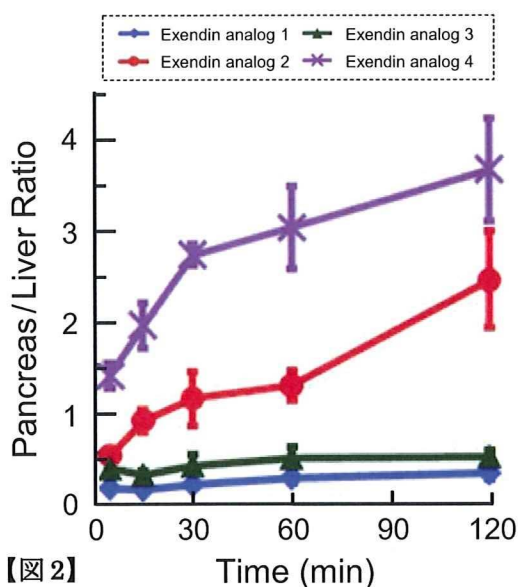
Exendin analog1-4 は、単離膵島に対し、何れも母体化合物である Exendin(9-39)と同等の低い IC<sub>50</sub> を示した。

また、正常マウス静脈内投与後における Exendin analog1-4 につき、膵臓放射能集積の経時変化を図 1 に示す。



【図 1】

4種のExendin analogは膵臓に4% ID/g以上集積し、投与後120分までは比較的緩やかな放射能消失を認めた。特にExendin analog 4は投与後30分の時点で9.7% ID/gと最大の膵集積性を示し、また、隣接する肝臓との集積比も最大であった(図2)。



【図2】 Time (min)

#### D. 考察

[<sup>125</sup>I]Exendin(9-39)はGLP-1受容体リガンドであることから、Exendin analog 1-4がGLP-1に対して高い親和性を有することが*in vitro*で示唆された。

そこで、4種類の化合物をマウスに静脈内投与し、臓器摘出法により*ex vivo*で体内動態を比較した。膵島GLP-1受容体の高感度イメージングを考慮した場合、プローブとしては膵臓に高集積し、周囲の臓器(肝臓、胃、腸)への集積が低い化合物が好ましい。投与30分後における定量値を比較した結果、Exendin analog 4が膵島イメージングプローブとして最も適していると考えられた。

#### E. 結論

Exendin(9-39)を母体とする4種のF-18標識化合物を合成し、GLP-1を標的とした膵島イメージングプローブとしての可能性を*in vitro*および*ex vivo*実験にて評価した。その結果、膵島β細胞の*in vivo*定量評価が期待されるExendin analog 4を得た。本PETプロ

ーブを用いることにより、糖尿病の超早期診断の実現に向けた基礎的知見を得られるものと確信している。

F. 健康危険情報 特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Mukai E, Toyoda K, Kimura H, Kawashima H, Fujimoto H, Ueda M, Temma T, Hirao K, Nagakawa K, Saji H, Inagaki N. GLP-1 receptor antagonist as a potential probe for pancreatic beta-cell imaging. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** (2009) **389**: 523-6.
2. Ogawa K, Kawashima H, Shiba K, Washiyama K, Yoshimoto M, Kiyono Y, Ueda M, Mori H, Saji H. Development of [<sup>90</sup>Y]DOTA-conjugated bisphosphonate for treatment of painful bone metastases. **Nucl. Med. Biol.** (2009) **36**: 129-35.
3. Ono M, Watanabe R, Kawashima H, Cheng Y, Kimura H, Watanabe H, Haratake M, Saji H, Nakayama M. Fluoro-pegylated chalcones as positron emission tomography probes for *in vivo* imaging of β-amyloid plaques in Alzheimer's disease. **J. Med. Chem.** (2009) **52**: 6394-401.

##### 2. 学会発表

1. Kimura H, Ogawa Y, Kawashima H, Mukai E, Toyoda K, Fujimoto H, Hirao K, Ono M, Inagaki N, Saji H. Development of *In Vivo* Imaging Agents Targeting Glucagon-like Peptide-1 Receptor (GLP-1R) in Pancreatic Islets. **Society of Nuclear Medicine 2009**, Toronto.
2. Kimura H, Ogawa Y, Kawashima H, Mukai E, Toyoda K, Fujimoto H, Hirao K, Nagakawa K, Ono M, Inagaki N, Saji H. Development of *In Vivo* Imaging Agents Targeting Glucagon-like Peptide-1 Receptor (GLP-1R) in Pancreatic Islets. **World Molecular Imaging Congress 2009**, Montreal.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 5件
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

研究要旨：本研究では、非侵襲的イメージングによりインビボで膵島量を測定可能なプローブおよびその撮像法を開発し、糖尿病の超早期診断法を確立することを目指す。そのために開発されたプローブを正常マウスに投与して PET 撮像の検討を行った。その結果、化合物 A および化合物 E により明瞭に膵臓が描出され、両化合物が膵島量の非侵襲的測定を可能とするプローブである可能性が示された。

#### 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。当分担研究においては、PET 撮像法の確立を目指しており、はじめに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い、その後に他分担研究者により開発された分子プローブを用いた PET 撮像実験を行った。また、比較対照のための既存の膵島イメージングプローブの合成も試みた。

#### B. 研究方法

1. 小動物用高分解能 PET システムの基礎評価 デレンゾファントム（径：2.4～0.7 mm）や中空ファントム（径：3 cm）に  $^{18}\text{F}$  溶液を加えて撮像後画像再構成による評価や、FBP 法を用いて PET シグナルを放射能の絶対値に変換するための評価を行った。

またマウスに  $^{18}\text{F}$  溶液を投与して放射能測定値と実際の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。

#### 2. PET 撮像

GLP-1 受容体のリガンドである Exendin(9-39)を  $^{18}\text{F}$  標識した化合物 A、および GLP-1 受容体のリガンドをもとに新規に設計・合成・標識を行った化合物 E に関して、インビボ PET 撮像実験を行った。6 週齢 ddY マウスの尾静脈より 7.4 MBq の化合

物 A あるいは化合物 E を投与し、GE 社製小動物用 PET 装置（eXolore Vista）を用いて投与直後から経時的に撮像を行った。

#### 3. 既存プローブの合成

比較対照用のプローブとして、膵臓に存在する小胞性モノアミノトランスポーターを標的とした  $^{11}\text{C}$  標識 dihydrotetrabenazine ( $^{11}\text{C}$ -DTBZ) を選択し、その合成を試みた。前駆体であるデスメチル体と  $^{11}\text{C}$  ヨウ化メチルを DMF 中で 10 分間加熱（40 °C）し、HPLC にて精製を行った。

#### C. 研究結果

1. 小動物用高分解能 PET システム基礎評価 複数の再構成法で 1.35 mm が十分に分解できた。PET 画像のシグナル強度と中空ファントム内の放射能強度は  $R^2 > 0.99$  と非常に高い相関、直線性を示した。また、マウスでの評価も同等の結果であった。

#### 2. PET 撮像

化合物 A および化合物 E ともに膵臓への集積が認められ、インビボでの画像化に成功した。膵臓以外の臓器として、腎臓にも高集積を認めたが、本研究で使用する小動物用 PET 装置は高解像度であり、膵臓と腎臓を明確に判別することが可能であった。

#### 2. 既存プローブの合成

DTBZ およびそのデスメチル体のコールド標品を用いて HPLC の保持時間を確認したところ、それぞれ 9 分と 7.5 分であった。 $^{11}\text{C}$  標識後の反応溶液を HPLC で精製したところ、保持時間 7 分と 9 分に放射能ピー

クが認められ、その割合は6:1であった。

#### D. 考察

本小動物用高分解能 PET システムには、マウスの膵臓を検知するための十分な分解能があることが判明し、本研究に用いることが可能と判断した。

化合物Aおよび化合物Eを用いたPET撮像実験によって膵臓への集積を認め、両化合物の有用性が明らかとなった。今後、膵島量と放射能集積との相関を明らかにして定量が可能かどうか検討する必要がある。一方、既存プローブの合成研究においては、<sup>11</sup>C-DTBZ とされる放射能ピークは認められたものの、比較対照用として用いるためには収率の向上が必要であることが明らかとなった。

#### E. 結論

化合物Aおよび化合物Eは、非侵襲的膵島イメージング用プローブとしての可能性が高い。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Doue T, Ohtsuki K, Ogawa K, Ueda M, Azuma A, Saji H, Strauss HW, Matsubara H. Cardioprotective effects of erythropoietin in rats subjected to ischemia-reperfusion injury: assessment of infarct size with <sup>99m</sup>Tc-annexin V. *J Nucl Med.* 49(10); 1694-700, 2008

2. Kiyono Y, Sugita T, Ueda M, Kawashima H, Kanegawa N, Kuge Y, Fujibayashi Y, Saji H. Evaluation of radioiodinated (2S,S)-2-(alpha-(2-iodophenoxy)benzyl)morpholine as a radioligand for imaging of norepinephrine transporter in the heart. *Nucl Med Biol.* 35(2) : 213-8, 2008

3. Ueda M, Iida Y, Tominaga A, Yoneyama T, Ogawa M, Magata Y, et al. Nicotinic acetylcholine receptors expressed in the ventralposterolateral thalamic nucleus play an important role in anti-allodynic effects. *Br J Pharmacol.* Feb 5.

4. Kudo T, Ueda M, Kuge Y, Mukai T, Tanaka S,

Masutani M, et al. Imaging of HIF-1-active tumor hypoxia using a protein effectively delivered to and specifically stabilized in HIF-1-active tumor cells. *J Nucl Med.* 2009 Jun;50(6):942-9.

##### 2. 学会発表

1: Ueda M, Konishi H, Kudo T, Kawashima H, Kuge Y, Saji H. Synthesis and biological evaluation of a novel <sup>18</sup>F-labeled biotin derivative for (strept)avidin-based pretargeted diagnosis. 55th SNM annual meeting, New Orleans, June 14-18, 2008.

2: 上田真史, 土井久子, 清野泰, 安部潤, 久下裕司, 佐治英郎. 経口投与された亜鉛-ジチオセミカルバゾン (Zn-DTS) 錯体の血糖降下作用に関する研究: 糖尿病モデルマウスでの検討. 第19回微量元素学会学術集会、東京、2008年7月3-4日

#### 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